

*Kluyveromyces lactis*에 의한 유청으로부터 과일향 성분의 생성

김소미 · 이형주*

서울대학교 농과대학 식품공학과

Formation of Fruit Aroma Compounds from Whey by *Kluyveromyces lactis*

Kim, So-Mi and Hyong-Joo Lee*

Department of Food Science and Technology, College of Agriculture,
Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

Abstract— To enhance the productivity of fruit flavor compounds from whey by the lactose fermenting yeast, *Kluyveromyces lactis* ATCC 8585 was treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG). After the NTG treatments, a mutant showing resistance to antifungal activity of geraniol, and strong fruity but low yeasty flavor was selected and named as *K. lactis* 450 K. Flavor compounds from 3-day culture broth were extracted with pentane-dichloromethane (2:1) and the concentrated oleoresins were analyzed by gas chromatography. The mutant strain produced more classes and larger amount of flavor compounds than the parent strain. Tentatively identified volatile compounds from the culture of the mutant were: terpenes such as myrcenol; alcohols such as cis-3-hexenol, n-hexanol; esters such as ethyl isovalerate, cis-3-hexenyl n-butyrate, n-amyl-n-hexanoate, phenyl ethyl n-propioate; ketones such as methyl vinyl ketones; other compounds such as vanillin, 3-methylcoumarin.

식생활 수준의 향상과 더불어 식품의 고급화가 이루어짐에 따라 천연 풍미료나 향료에 대한 선호도가 높아지게 되고 이에 따라 풍미료 등을 식물의 세포 배양이나 미생물에 의해 생산하려는 생물공학적인 방법이 활발하게 시도되고 있다(1-4). 미생물이 생산하는 풍미 성분은 테르페노이드류, 알콜류, 에스테르류, 알데하이드류, 락톤류 등 광범위한 화합물군을 포함하고 있으며, 향의 특성으로는 바나나, 복숭아, 사과, 배 등의 과일향과 기타 장미, 재스민 등 꽃향을 나타내는 것으로 보고되었다(5-9). 미생물에 의해 생산되는 휘발성 향기 성분의 생합성은 대부분의 경우 에너지면에서 불리하다는 점과 1차 대사산물과는 다른, 별도의 대사경로를 거치는 까닭으로 그 생산량이 극히 적다. 따라서 생산성 향상을 위해서는 배지의 조성, pH, 배양일수의 조절, 소수성 흡착제의 첨가(5), 그리고 돌연변이나 유전자 조작을 통한 균주의 개량이

요구되고 있다.

본 연구에서는 유당발효 효모인 *Kluyveromyces lactis*(*K. lactis*)를 이용하여 유청에서 테르페노이드류 등 과일향 풍미 성분의 생산성 향상을 위한 기초자료를 얻기 위하여, *K. lactis*를 약제 처리하여 돌연변이주를 유도하고 모균주와 변이주의 배양특성, 배양액에서 분리된 방향 성분의 화학적 특성을 분석하였으며 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주

모균주는 ATCC에서 구입한 *K. lactis* ATCC 8585를 2주일마다 YM agar 사면배지에 계대하여 4°C에 보관하면서 사용하였다.

배지 및 배양조건

종균의 배양에는 YM배지(yeast extract, malt extract, peptone; 0.3, 0.3, 0.5% w/v, pH 6.2)를 사용했

Key words: *Kluyveromyces lactis*, fruit aroma, microbial flavor

*Corresponding author

으며 우수균주 선발에는 YM-geraniol 배지를 사용하였다. 물에 불용성인 geraniol이 골고루 현탁된 YM agar 배지를 만들기 위해 geraniol(1 ml), 물(90 ml), ethanol(10 ml), Tween-80(10 mg)의 비율로 혼합한 액을 초음파 처리하여 geraniol stock solution을 제조하고 필요에 따라 희석하여 사용하였다. 풍미 성분 생산에 사용한 유청배지는 국내 치즈제조업체(해태유업)에서 감성유청(total solids, lactose, protein, lipid-mineral; 6.5, 4.5, 1.0, 0.3, 0.6% w/v, pH 5.5~6.9)을 분양받아 냉동고에 보관하며 사용했으며, 저장중 떨어진 pH를 배지로 사용하기 직전에 조정하였다.

시약

변이주 유도시에 사용한 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG, sigma)은 stock solution을 제조한 후 상온에 보관하여 7일이 경과하면 다시 만들어 사용하였다.

변이주의 유도 및 선발

변이주의 유도는 Coruzzi 등(10)과 Campbell 등(11)의 방법을 응용하여 행했는데, 먼저 YM배지에서 정상기까지 배양된 세포를 원심분리하여 회수하고 10^7 cell/ml 농도의 현탁액을 만든 후 새 배지에서 1시간 정도 배양시킨 다음 NTG와 반응을 시켰다. NTG로 처리한 세포는 5% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 용액에 현탁하여 세척한 후 새배지에 접종하여 2~3시간 배양하고 적정농도로 희석하여 geraniol 농도가 400, 450, 500 ppm인 geraniol-YM 한천배지에 전개하고 30°C에서 1~3일간 배양했을 때 생육이 빠르고 colony 크기가 큰 것을 선발하고 이들의 액체배양으로 얻은 발효액을 선정된 검사원 18인의 관능검사에 의하여 발효액의 yeasty-flavor는 약하나 fruity-flavor가 강한 변이주를 2차적으로 선발하였다.

Geraniol의 항균역가

모균주를 최종 geraniol 농도가 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 1000, 5000, 10000, 20000 ppm으로 조절된 geraniol-YM 한천배지에 전개하고 30°C에서 7일간 배양 후 각 농도에서 형성된 colony의 총 면적을 계산하여 비교하였다.

변이주의 생육특성

모균주와 선발한 변이주의 생육특성을 조사하기 위하여 YM배지와 유청배지를 사용하여 배양하면서 생균수를 분석하였다. 생균수는 배양배지에 14시간 동안 배양한 전배양액을 1%씩 접종하고 30°C에서 계속적으로 진탕배양하면서 2시간 간격으로 10 ml씩 취하여 적정농도로 희석후 YM배지에 도말하므로써 측정하였다.

풍미 성분의 추출 및 농축

선발된 균주를 27°C, pH 6.0의 YM 액체배지에서 2~4일간 배양한 후, 균체를 제거한 발효액 600 ml를 liquid-liquid extraction 장치에서(12) pentane- CH_2Cl_2 (2:1) 혼합용매로 13시간 동안 연속추출하였다. 그 후 5% NaHCO_3 로 free acids를, anhydrous Na_2SO_4 로 미량의 수분을 제거한 다음 진공회전증발기로 농축하여 oleoresin을 얻고 gas chromatography(GC)의 시료로 사용하였다.

풍미 성분의 동정

배양액 oleoresin의 향기 성분을 동정하기 위해 사용한 gas chromatograph는 Hewlett Packard사의 HP 5890이며 컬럼은 fused silica open tubular column(0.2 mm×50 m, OV-101), 컬럼온도는 35°C에서 5분간 유지시킨 후 120°C까지 5°C/min, 250°C까지 7°C/min로 승온하였다. 주입구 및 검출(FID)온도는 250°C, 운반기체는 질소를 사용하였다. 각 향기 성분의 확인은 표준물질의 머무름 시간(retention time)과 비교하였고, 미지의 peak는 Kovat's Indice(13)를 이용하여 잠정적으로 동정하였다.

결과 및 고찰

Geraniol의 항균역가

NTG 처리 후에 살아 남은 세포들 중에서 풍미성분 특히 terpenoid의 고생산성변이주를 선발하기 위한 간편한 방법은 아직 알려진 바가 없다. 따라서, 변이주를 선발하기 위한 1차적인 과정으로 terpenoid의 일종인 geraniol의 antifungal activity를 이용하고자 하였다. 이는, 각종 식물체의 정유성분이 항균효과를 갖는 것으로 이미 잘 알려져 있고(13-17) 이 중 geraniol은 fungi에 대하여 항균효과를 나타내는 것으로 보고된 바 있기 때문이다(18).

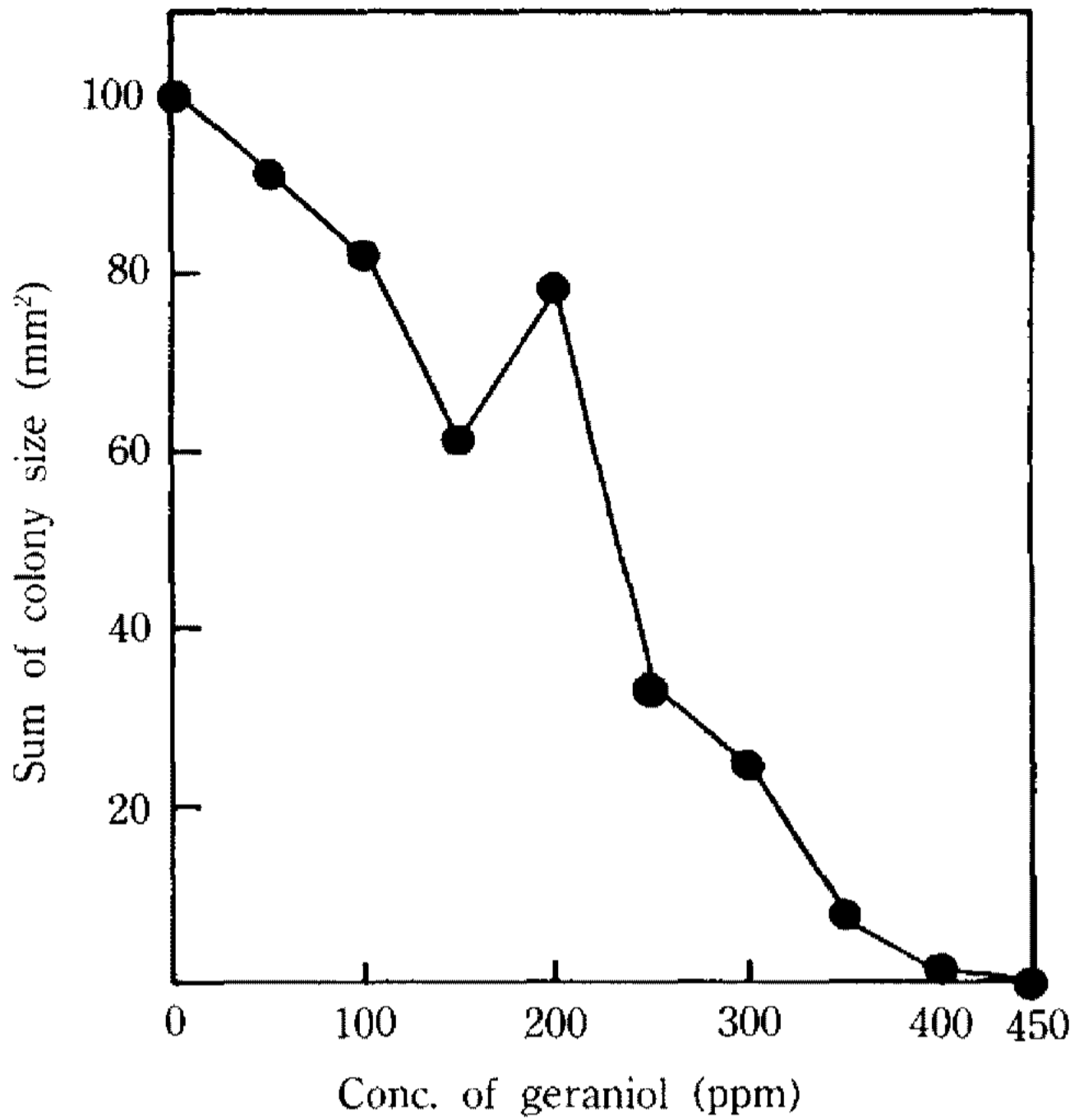


Fig. 1. Relationships between sum of colony size of *K. lactis* and concentration of geraniol.
K. lactis was cultivated on YM agar plate containing geraniol at 30°C. Summations of the colony areas were calculated after 7-day culture.

geraniol에 대한 *K. lactis*의 항균역가를 살펴본 결과 (Fig. 1), 배지내 함유되어 있는 geraniol의 농도가 0에서 450 ppm까지 50 ppm 단위로 증가함에 따라 각 농도에서 형성된 colony의 갯수 및 크기는 점점 감소하였으며, 500 ppm 이상에서는 colony가 형성되지 않아 geraniol이 *K. lactis*에 대해서도 항균역가가 있음을 확인할 수 있었다.

발효액의 관능검사에 의한 우수변이주 선발

대수기의 모균주에 NTG를 30분간 처리하였을 때 균주의 생존율은 약 8%로 나타났다. 제 1차 NTG 처리를 하고 geraniol농도가 400 및 450 ppm인 geraniol-YM 배지에 배양했을 때 모두 10개의 집락이 나타나 이들을 액체발효하여 얻은 발효액을 관능검사하고 모균주에 비해 yeasty flavor는 약하면서 fruity flavor가 강한 4개의 균주를 1차로 선발하였다. 선발된 1차 변이주에 2차로 NTG 처리를 한 결과, geraniol 농도 450 ppm인 배지에서 43개의 colonies가 형성되었으며 이들로부터 집락형태가 양호하고 크기가 비교적 큰 12개의 집락을 임의로 선발하여 이들의 발효액을 관능검사하고 4개의 균주를 2차로 선발하였다.

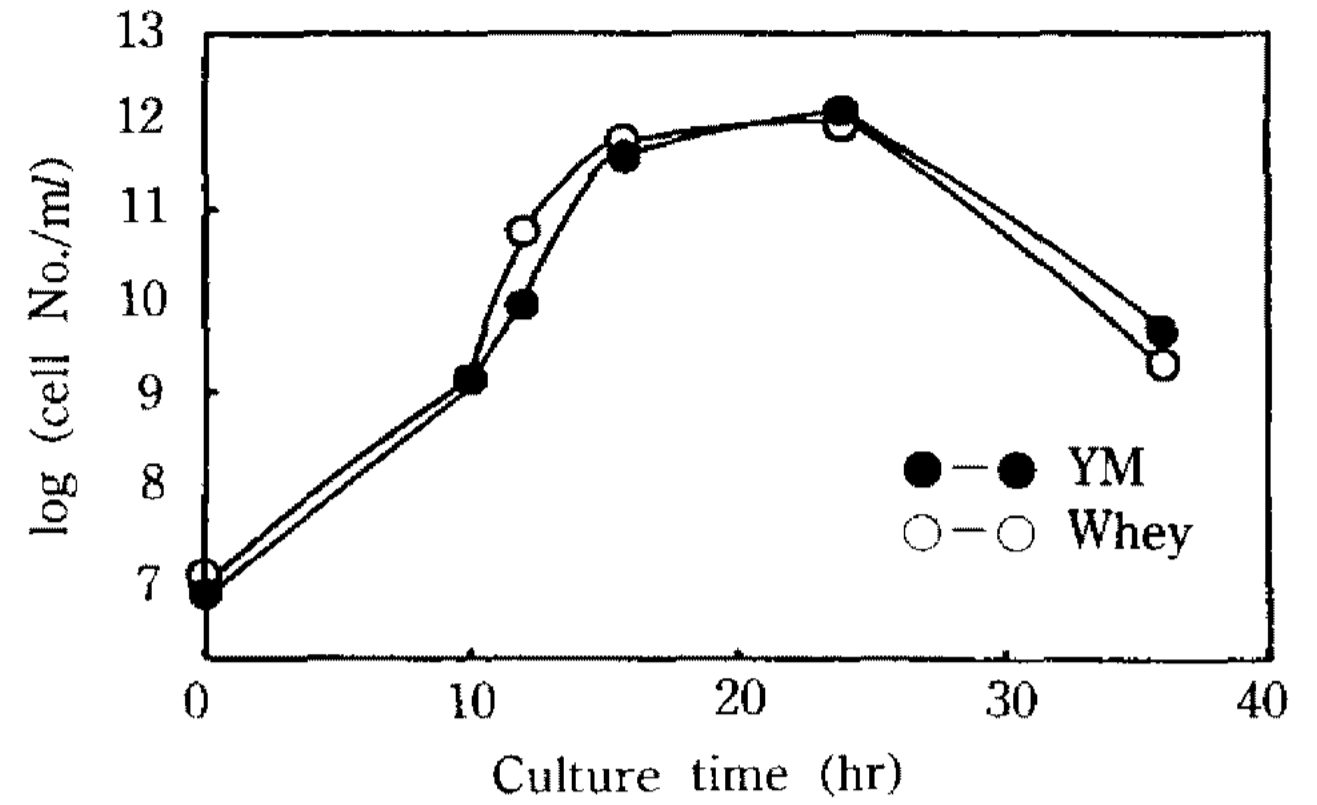


Fig. 2. Growth curve of the *K. lactis* ATCC 8585 (parent) on YM and whey media at 30°C.

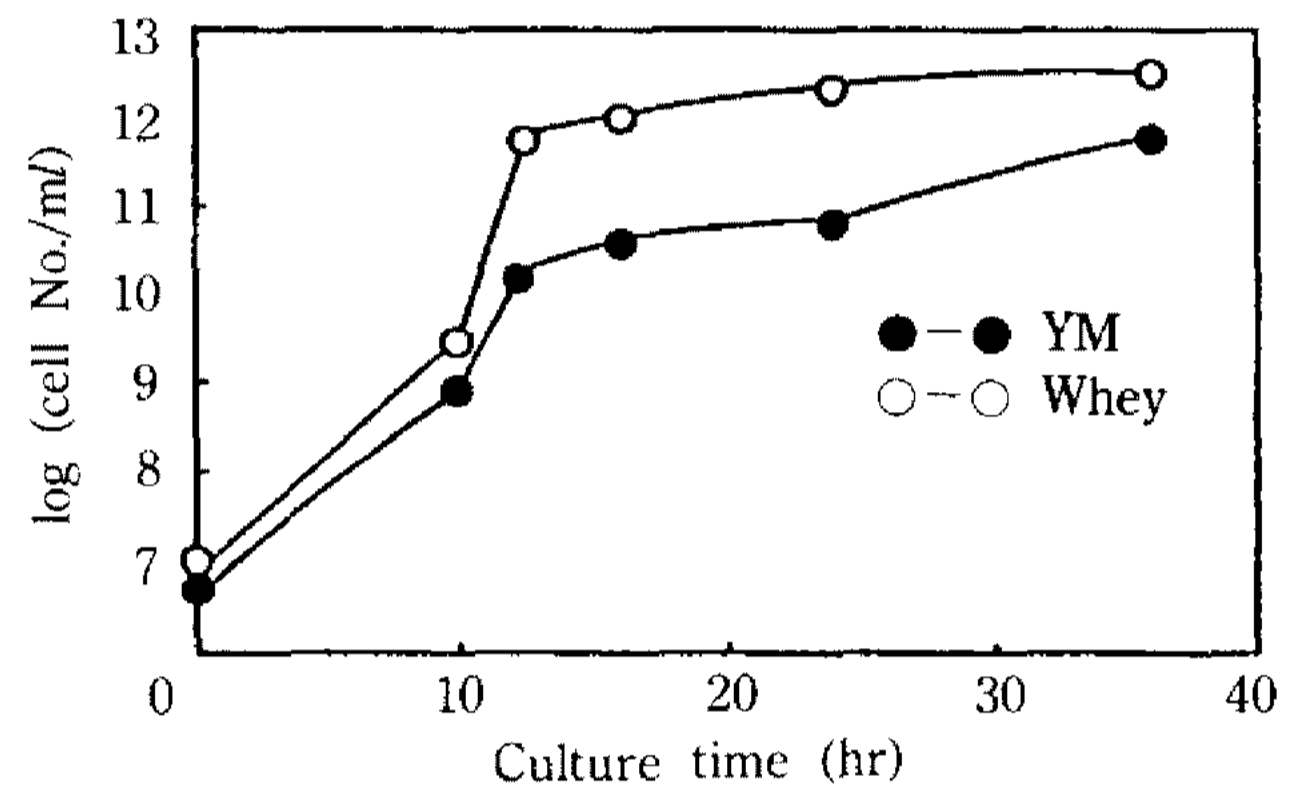


Fig. 3. Growth curve of the *K. lactis* 450 K (mutant) on YM and whey media at 30°C.

선발된 2차 변이주에 3차로 NTG를 처리한 후 geraniol 농도 450 ppm인 배지에서 형성된 12개의 colonies의 발효액에 대해 또 다시 관능검사를 실시하고 최종적인 우수균주를 선정해 *K. lactis* 450 K로 명명하고 이후의 변이주와 모균주의 대조실험에 이용하였다.

YM배지와 유청배지에서의 생육특성

모균주와 변이주의 YM배지와 유청배지에서의 생육도를 비교한 결과, 모균주는 유청배지와 YM배지에서 모두 12시간 이후부터 정상기에 들어가 24시간 후부터는 사멸기로 접어들어 Barbosa *et al.*(19)의 보고와 일치하는 경향을 보였으나(Fig. 2), 변이주는 대수기에서 정상기로의 전환점이 뚜렷하지 않아 12시간 경에 정상기에 도달한 후 36시간이 경과될 때까지 완만한 균체증식을 나타냈다(Fig. 3).

일반적으로 미생물은 대수기를 거쳐서 정상기로 들어섰을 때 비로소 2차대사산물의 생산이 시작된다

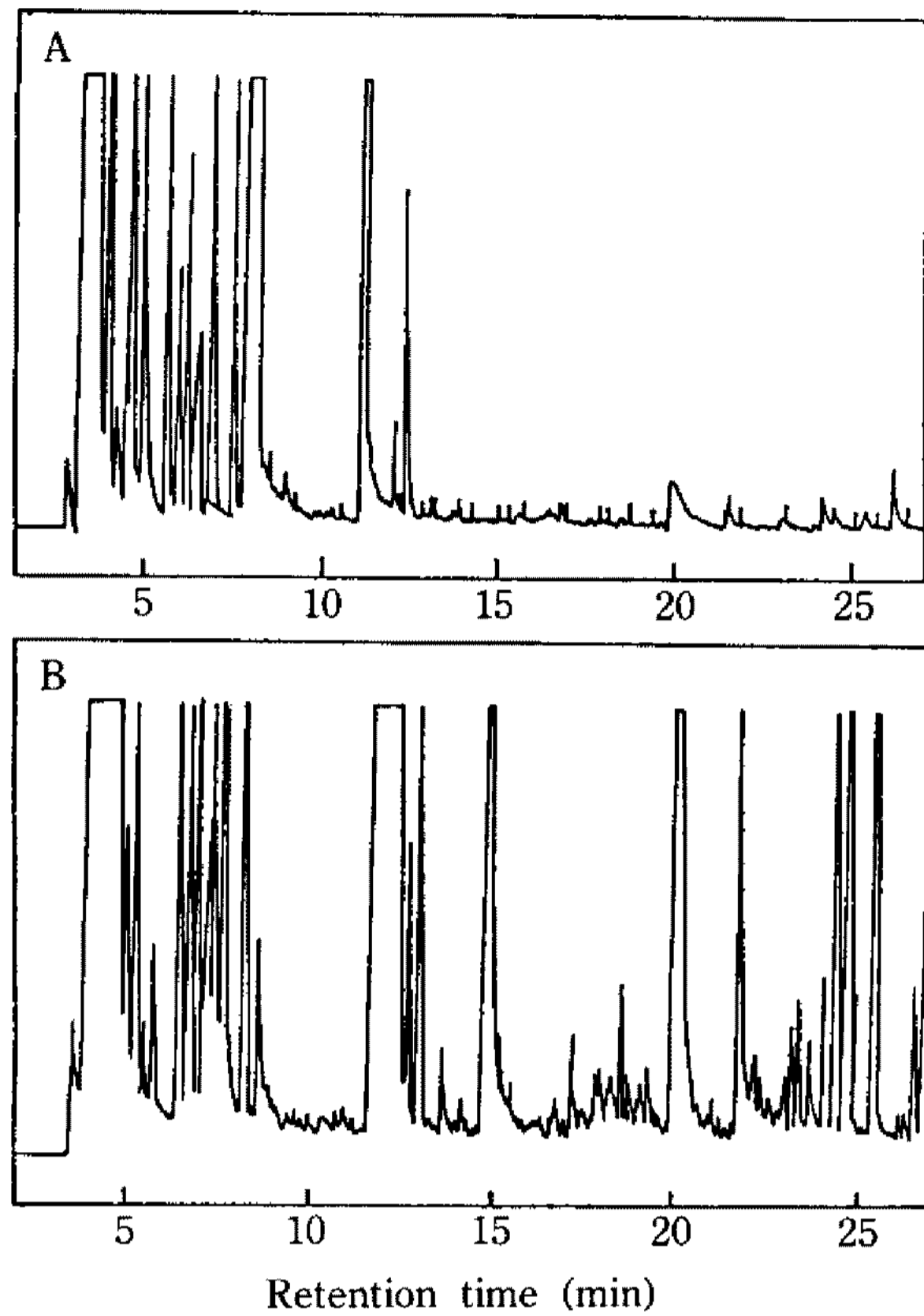


Fig. 4. Gas chromatograms of volatile flavor compounds from culture of *K. lactis*, parent (A) and mutant (B) strain.

Oleoresins extracted and concentrated from 3-day culture of each strain on whey medium were analyzed by GC (column: fused silica open tubular, $\phi 0.2$ mm \times 50 m OV-101, detector: FID).

고(20) 알려져 있으므로, 모균주에 비해 정상기가 훨씬 더 길어진 변이주 450 K가 더 많은 2차대사산물을 생산할 수 있으리라 기대할 수 있는데 실제 이와 같은 결과는 배양액의 GC 분석결과에서도 잘 나타나고 있다(Fig. 4).

배양액 oleoresin의 풍미성분

모균주와 변이주를 유청배지에서 1일, 2일, 3일간 배양시킨 배양액을 용매추출하고 농축된 oleoresin을 GC로 분석하였다. 이중 3일 배양액의 chromatogram을 Fig. 4에 나타냈다. 그림에 나타난 바와 같이 모균주보다 변이주가 더 많은 종류의 향기성분을 생산하고 있으며, 배양일수가 길어질수록 생성되는 화합물의 종류가 증가하였다. 그러나 배양일수가 4일 이상 경과하면 효모의 자가소화 등에 의한 효모취가 증가하여 발효액의 과일향 풍미를 약화시키므로 각 배양일수에 대한 검사원들의 종합평가는 3일간 배양

Table 1. Tentatively identified aroma constituents from 3-day culture *K. lactis* 450 K, the mutant strain.

Compound*	Odor description
ALCOHOLS	
tert-butanol	
n-propanol	
2-methyl propanol	
2-buten-1-ol	
3-methyl butane-2-ol	
n-pentane-2-ol	
isoamyl alcohol	
cis-3-hexenol	green leaves odor, leaf alcohol
n-hexanol	
anise alcohol	
ESTERS	
ethyl acetate	
ethyl isovalerate	apple odor
cis-3-hexenyl n-butyrate	fruity, pineapple like odor
n-amyl-n-hexanoate	
phenyl ethyl n-propionate	
butyl phenyl acetate	
nonyl acetate	
TERPENES	
myrcenol	fragrant odor
KETONES	
methyl vinyl ketone	
2-butanone	
diethyl ketone	
m-aminoacetophenone	yellow leaflets
MISCELLANEOUS	
isobutyl mercaptan	
vanillin	vanilla odor
3-methylcoumarin	vanilla bean, fragrant odor

*Each compound of the main peaks from the gas chromatogram was tentatively identified in comparison with the Kovat's index (13).

했을 때 가장 좋았다.

이들로부터 얻어진 GC의 머무름 시간과 Kovat's Indice를 이용하여 3일 배양액으로부터 잠정적으로 확인된 향기성분은 모균주에서는 알콜류 3종, 에스테르류 9종, 알데하이드류 1종 케톤류 1종, 테르펜류 1종, 기타 7종 등 22종이었으며, 변이주에서는 알콜류 14종, 에스테르류 19종, 알데하이드류 2종, 케톤류 4종, 테르펜류 12종, 기타 7종등 58종이었다. 따라서, 변이주 450K에서의 풍미 성분 생산이 훨씬 증가되었음을 알 수 있었다.

변이주 발효액에 함유되어 있는 주요성분을 Table

1에 나타내었다. 이중 과일향과 관계있는 성분은 다음과 같다. 즉, 알콜 성분인 cis-3-hexenol은 green leafy odor를 내는 것으로 알려져 있는 풍미 성분이며, 과일의 중요한 풍미 성분으로 알려져 있는 에스테르류 중에서는 사과향을 내는 ethyl isovalerate가 상당량 검출되었고, 과일향 및 파인애플향을 내는 cis-3-hexenyl n-butyrate 등이 확인되었다. 테르펜류 중에서는 향긋한 향을 지닌 myrcenol이 상당량 확인되었다. 또한, 이들 성분들은 모균주의 발효액에서는 검출되지 않은 것들이다.

이와 같은 결과는 본 실험의 배지로 사용한 유청이 lactose를 4.8% 정도 함유하고 있을 뿐만 아니라 기타 다른 영양원들도 골고루 지니고 있어(21-23) 미생물 배지로 적합하다고 알려진 바(19, 24), 유당발효효모인 *K. lactis*의 풍미 생산용 배지로도 양호함을 나타내 준다. 또한 NTG 처리를 하여 풍미 성분 생산능이 개선된 변이주를 유도, 선발하고 이에 의해 실제 과일향 성분의 생산이 증대될 수 있음을 보여주는 예가 되리라 생각된다.

미생물에 의한 풍미 성분 생산에서는 우수 균주를 선발하는 좋은 방법을 개발하는 것이 큰 과제인데 NTG 처리 후에 만들어진 모든 변이주 발효액의 특정 풍미 생산성을 GC 등으로 일일이 검색하는 것은 너무 복잡하므로 본 연구에서는 terpenoid의 일종인 geraniol의 항균효과를 이용하여 geraniol 내성균주를 선발하고 이를 테르펜류를 비롯한 기타 풍미 성분 고 생산성 가능 균주로 선발하였다. 앞으로는 일부 풍미 성분을 특정 발색단과 작용시켜 육안으로 우수균주를 선발하거나 풍미 성분 생합성 경로의 특정 효소 역할을 측정하는 등보다 정확하고 간편한 선발방법이 개발되어야 하겠다.

요 약

유당발효 효모인 *Kluyveromyces lactis* ATCC 8585를 이용하여 유청에서 과일향 풍미성분의 생산성을 향상시키기 위하여 3차에 걸쳐 NTG를 처리하고 geraniol의 항균력에 내성을 지니는 변이주 중 모균주에 비해 yeasty-flavor는 약하나 fruity-flavor가 강한 변이주를 선발하고 *K. lactis* 450 K라 명명하였다. 3일간 배양시킨 발효액을 pentane-dichloromethane(2:1) 용매로 추출하여 얻은 oleoresin을 gas chromatogra-

phy로 분석한 결과, 모균주보다 변이주가 더 많은 종류와 양의 향기성분을 생산한 것으로 나타났다. 변이주의 배양액으로부터 잠정적으로 확인된 주요향기성분은 테르펜류로는 myrcenol 등이, 알콜류로는 cis-3-hexenol, n-hexanol, 에스테르류로는 ethyl isovalerate, cis-3-hexenyl n-butyrate, n-amyl-n-hexanoate, phenyl ethyl n-propioate, 케톤류로는 methyl vinyl ketone, 기타 성분으로 vanillin, 3-methylcoumarin 등이었다.

감사의 말

본 연구는 한국학술진흥재단의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Knorr, D.: *Food Technol.*, **41**(4), 45 (1987)
2. Knorr, D. and A.J. Sinskey.: *Science*, **229**, 1224 (1985)
3. Moshy, R.J.: *Food Technol.*, **39**(10), 113 (1985)
4. Wasserman, B.P., T.J. Montville and E.L. Korwek: *Food Technol.*, **42**(1), 133 (1988)
5. Schindler, J. and R.D. Schmid: *Process Biochem.*, Sep./Oct., 2(1982)
6. Collins, R.P. and A.F. Halim: *J. Agric. Food Chem.*, **20**, 437 (1972)
7. Tressl, R.: *Flavor of Foods and Beverages* (Charam-Imbus, G., G.E. Inglett, eds.), Academic Press, New York/London, 145 (1978)
8. Lanza, E. and J.K. Palmer: *Phytochemistry*, **16**, 1555 (1977)
9. Drawert, F. and H. Borton: *J. Agric. Food Chem.*, **26**, 765 (1978)
10. Coruzzi, G., M. Trembath and A. Tzagoloff: *Methods in Enzymology*, Vol. LVI, 95 (1979)
11. Camphell, I. and J.H. Duffus: *Yeast-a practical approach*, IRL Press, 83 (1988)
12. Drawert, F., W. Heimann, R. Emberger and R. Tressal: *Chromatographia*, **2**, 65 (1969)
13. Murdock, D.I. and W.E. Allen: *Food Technol.*, **14**, 441 (1960)
14. Bullerman, L.B.: *J. Food Sci.*, **39**, 1163 (1974)
15. Beuchat, L.R.: *J. Food Sci.*, **41**, 899 (1976)
16. Bullerman, L.B., F.Y. Lieu and S.A. Sair: *J. Food Sci.*, **42**, 1107 (1977)
17. Kurita, N., M. Miyaji, R. Kurance, Y. Takahara and K. Inchimura: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 2365

(1975)

18. Kurita, N., M. Miyaji, R. Kurance and Y. Takahara: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 945 (1981)
19. Wasserman, A.E.: *J. Dairy Sci.*, **43**, 1231 (1960)
20. Scharpf, L.G., E.W. Seitz, J.A. Morris and M.I. Farbood: *ACS. Symposium Series*, 317 (1986)
21. Glass, L. and T.I. Hedrick: *J. Dairy Sci.*, **60**, 190

(1977)

22. Nielsen, V.H.: *Am. Dairy Rev.*, **36**, 68 (1974)
23. Zall, R.R., A. Kuipers, L.L. Muller and K.R. Marshall: *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.*, **14**, 79 (1979)
24. Friend, B. and K.M. Shahani: *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.*, **14**, 143 (1979)

(Received August 19, 1991)