

## *E. coli* 형질전환주의 공동배양에 의한 유자정유의 생전환

박연진·장해춘\*<sup>†</sup>

조선대학교 대학원 식품영양학과  
\*조선대학교 식품영양학과

### Bioconversion of Citron oil by Co-Culture of *E. coli* EC3, EC4, and EC6

Yeon-Jin Park · Hae-Choon Chang\*

\*Department of Food & Nutrition, Chosun University

#### Abstract

*E. coli* transformants EC3, EC4, and EC6, harboring citron oil degrading pathway genes, were co-cultured in M9 media with citron oil as a sole carbon source at 28°C. Each co-culture (EC3+EC4, EC3+EC6, EC4+EC6 and EC3+EC4+EC6) showed three to four times higher cell growth than each transformant single culture. Microbial conversion products from the co-cultures were determined by GC-MS. Linalool, 4-terpineol and  $\alpha$ -terpineol were the major common products from co-cultures. Various minor products also were detected and important in flavor characteristics of cultures.

Key Words : Citron oil: *E. coli* transformants: co-cultures

---

<sup>†</sup>Corresponding author : Hae Choon Chang, Department of Food and Nutrition, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea.  
Tel : 062-230-7345, Fax : 062-225-7726  
E-mail : hcchang@mina.chosun.ac.kr

## I. 서론

유자에는 비타민 A, C 등의 영양소가 다량 함유되어 있는 것 이외에도 유자 특유의 향을 결정하는 많은 정유성분이 함유되어 있는데, 과피의 건조증광으로 환산했을 때 약 30% 정도의 정유성분을 함유하고 있다. 이 정유성분은 리모넨(limonene)과 같은 monocyclic terpenoid 화합물이며 유자나 오렌지와 같은 감귤류 껍질 정유성분의 공통적인 주요성분으로 약 70~95% 정도를 차지한다(Ohloff, 1994). 이는 저렴한 가격으로 손쉽게 구할 수 있는 terpene류로서, 많은 식품이나 그 밖의 향료산업에 직접 이용되어 질 수 있을 뿐만 아니라(Braddock, Cadwallader, 1992) 미생물의 대사체계를 이용하여 값비싼 다른 향기물질로 전환시킬 수 있는 초기 기질물질로 이용될 수 있다. 유자 정유성분 중의 중요한 향기성분은  $\alpha$ -limonene,  $\gamma$ -terpinene, linalool, camphene, myrcene 그리고 phellandrene 등이 있으며(Chung, Lee, 1998; Kieslich, 등 1986; Miyake, 1990) 이들로부터 얻을 수 있는 유용한 산화화합물로는 perillyl alcohol, perillylaldehyde,  $\alpha$ -terpineol, nerol, cryptone,  $\gamma$ ,  $\delta$ -valerolactone, hydroxycitronellol, cuminol 등이 있다(박연진 2001; Chang, Oriol, 1994; Chang, Oriol, 1995). 이들 향기물질은 천연적으로 감귤 류 뿐 아니라 각종 식물체의 꽃, 씨, 잎, 줄기, 뿌리, 껍질 등에 미량씩 함유되어 있으며 식품뿐만 아니라 의약품, 향산업 등에 널리 쓰여지고 있다(Feraloni, 1975; Krings, Berger, 1998).

향의 생산방법은 화학적 합성법에 의한 합성향과 천연물에서 추출한 천연향으로 나뉠 수 있다. 합성 향은 경제성 때문에 많이 사용되어져 왔으나 최근의 환경오염, 이로부터 파생되는 각종 질환이 인간이 만들어 낸 화합물에서 비롯됨이 밝혀진 후 천연물에 대한 기호가 급격히 증가하고 화학합성에 의한 화합물에 대한 사용규제 등이 법령화되고 있다. 그러나 동·식물로부터 얻어지는 천연향은 시간제한성, 기후·천재지변과 같은 자연의존성, 고 비용·고 인력 소모 등의 단점이 있고 이를 해결할 수 있는 방안으로 미생물에 의한 천연 향 생산에 많은 관심이 모아지고 있다.

본자 생물학적 수준에서 유자정유와 같은 terpene화합물의 분해 경로에 관여하는 유전자군을 클로닝하여,

대장균에 형질전환시킨 후, 이로부터의 대사산물을 분리 동정함으로써 대사 경로를 밝힌 연구로는 현재까지 Chang과 Oriol 등(1995), Cheong 등(2000) 등의 보고에 불과하다. 이러한 연구의 문제점은 정유성분의 미생물 독성 때문에 높은 농도로 기질인 정유성분을 첨가할 수 없는 것이다(Dhavalikar, Bhattacharyya, 1966). 정유성분만을 유일한 에너지 대사로써 첨가시 미생물의 낮은 기질 이용능에 따라 충분한 양의 미생물 세포생장이 이루어지지 않는다. 따라서 배지 내에 반드시 추가적인 영양물을 공급해야 정유성분을 생전환시킬 수 있는 적정 수준의 형질전환주 미생물 세포생장을 얻을 수 있다는 것이다. 본 연구에서는 *Enterobacter* ssp. 6L의 유자정유 대사능유전자를 지닌 *E. coli* 형질전환주인 EC3, EC4, EC6의 공동배양에 의하여 유자정유를 생전환시켜 고부가가치의 천연향기물질을 생산하고자 하였다. 이들 형질전환주는 유자정유 성분을 대사 할 수 있고 정유성분의 독성에 강한 내성을 지니며 유자정유가 유일한 배지에서 어떠한 영양물의 추가적인 공급 없이도 적정 수준의 세포생장을 보인다.

본 연구에서는 *E. coli* 형질전환주들의 공동배양으로 유자정유를 생전환 하여 고부가가치 향기 화합물을 생산하고 그 대사산물의 최적 생산시기 및 생산대사산물을 규명하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 유자정유배지에서의 성장과 생전환

Triple-baffled nephelo culture flask(250 mL)를 사용하여 50mL M9 최소배지에 전배양된 배양액 1%를 접종하였다. 유일한 탄소원으로서 유자정유를 기체상태로 배양액에 지속적으로 주입하고 28°C에서 진탕 배양했다. 600nm에서 흡광도( $A_{600}$ )를 측정하여 미생물의 성장을 검토하였다.

### 2. *E. coli* 형질전환주의 배양

본 실험에서 사용한 균주 및 plasmid는 Table 1에 표시하였다. 유자정유 성분 대사능을 지닌 모균주 *Enter-*

Table 1. The bacterial strains, and plasmids used in this experiment

Strain & plasmid	Description	Reference
PLASMIDS		
pREC3	pUC18 + 8.8kb citron oil degrading gene from <i>Enterobacter</i> ssp. 6L, cit+	(장해춘 2000b)
pREC4	pUC18 + 4.6kb citron oil degrading gene from <i>Enterobacter</i> ssp. 6L, cit+	(장해춘 2000b)
pREC6	pUC18 + 8.2kb citron oil degrading gene from <i>Enterobacter</i> ssp. 6L, cit+	(장해춘 2000b)
STRAINS		
TG1	<i>E. coli</i> host strain, cit-	(Gibson 1984)
EC3	<i>E. coli</i> TG1 harboring 11.5kb pREC3, AP+, cit+	(장해춘 2000b)
EC4	<i>E. coli</i> TG1 harboring 7.3kb pREC4, AP+, cit+	(장해춘 2000b)
EC6	<i>E. coli</i> TG1 harboring 10.9kb pREC6, AP+, cit+	(장해춘 2000b)

<sup>a</sup>Abbreviations : AP+, Ampicillin resistant; cit+, grows on citron oil as a sole carbon source

*obacter* ssp.의 염색체 DNA를 분리하고 shot gun method에 따라 클로닝하여 획득한 서로 다른 크기의 DNA 단편을 지닌 *E. coli* 형질전환주 EC3, EC4, EC6를(장해춘 2000b) 공동배양하였다. 공동배양액은 EC3+EC4, EC3+EC6, EC4+EC6, EC3+EC4+EC6로 하였다. Ampicillin 50µg/mL가 든 M9 최소배지는 물 1L에 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 g, NaCl 5 g, NH<sub>4</sub>Cl 1 g을 녹인 다음 pH 7.0으로 조절하였다. Triple-baffled nephelo culture flask(Bellco Inc., Vineland, NJ)에 전 배양액 1%를 접종하고 폐유자박을 스팀 증류로 추출한 유자정유를 기체상태로 배양액에 지속적으로 주입하고 28°C에서 진탕 배양하였다. 단독배양은 공동배양과 동일한 조건에서 EC3, EC4, EC6를 각각 단독으로 접종하여 시행하였다. 이때 유자정유성분의 자동산화와 미생물대사에 의한 유자정유의 생전환을 구분하기 위하여 대조구로는 미생물 생전환 플라스크와 동일한 조건에서 배양 미생물을 접종을 하지 않은 것으로 삼았다.

### 3. 생전환 된 물질추출 및 관능검사

배양이 종료된 미생물 배양액을 4°C에서 원심분리(12,800×g, 20min)하여 상정액을 얻었다. 상정액은 pH 2.0로 조정된 후 0.45µm filter(Millipore)로 상정액을 완전히 제거하였다. 이 상정액은 에테르(3×0.5 vol)를 사용하여 추출한 후 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 수분을 제거하였다. 수분이 제거된 추출액은 휘발성 향기성분이므로 질소가스 기류 하에서 천천히 에센셜 오일 상태로 농축하였다. GC분석 직전의 시료 모두를 1µl씩 취하여 후각 테스트를 하여 추출물의 전체적인 향에 대한 관능 검사를 시행하였다.

### 4. 향기성분의 분석

미생물 배양액으로부터 얻어진 추출액의 대사산물 분석을 위하여 GC-MS(Shimadzu QP-5000, Japan)을 사용하였다. 대사산물 분석은 GC-MS의 결과에 따른 GC-MS분석 조건을 Table 2에 나타내었다. 표준물질의 authentic RI와 비교하여 최종 화합물로 결정하였다.

Table 2. GC/MS conditions for the analysis of bioconverted products from citron oil by single culture and co-cultures

Column	DB-wax fused silica 0.32mm×60mm(J & W Sci. Co.)
Carrier gas	Helium (1.0ml/min)
Injector	250°C, splitless
Injection volume	1 µl
Detector	230°C
Column temp. program	40°C ~230°C 40°C(3min) → 2°C/min → 150°C(0min) → 4°C/min → 220°C/15min →5°C/min→ 230°C/5min with a 3min initial hold time
Temperature	ion source and interface 230°C
Ionization	electron impact ionization (EI)
Ionization voltage	70eV
Mass range(m/z)	41~450

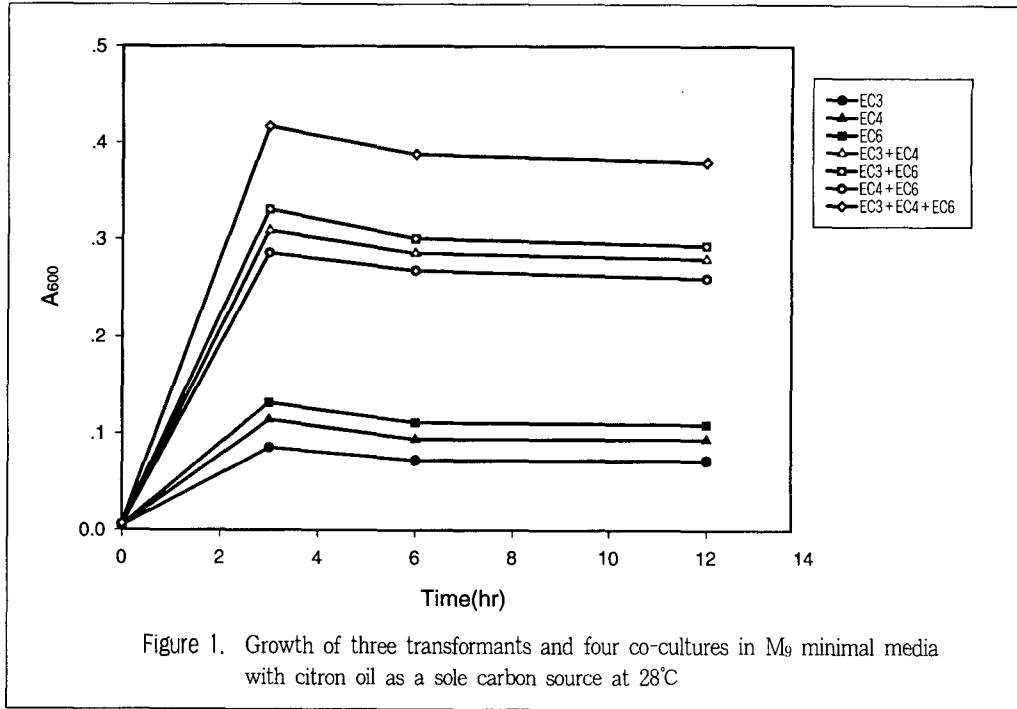
### III. 결과 및 고찰

#### 1. 단독배양과 공동배양의 유자정유에서의 성장곡선

*E. coli* 형질전환주 EC3, EC4, EC6과 공동배양액을 M9 최소배지에서 유일한 탄소원으로 유자정유를 기체 상태로 지속적으로 공급하며 28°C에서 진탕 배양하였다. A<sub>600</sub>에서의 혼탁도로 측정하여 공동배양액의 성장곡선을 측정하였다(Fig. 1). 단독배양에서 *E. coli* 형질전환주 EC3, EC4, EC6는 배양 후 3시간만에 최고의 성장률을 보였으며, A<sub>600</sub>에서 각각 0.072, 0.094, 0.109을 나타내었다. 공동배양에서 각각의 형질전환주는 동 시간대에 A<sub>600</sub>에서 0.3에서 0.4에 이르는 모두 매우 높은 성장률을 나타내었다. 따라서 *E. coli* 형질전환주를 단독배양했을 때 보다 공동배양 했을 때 약 3~4배 더 높은 세포 배양을 할 수 있었다.

유자정유의 주요화합물인 limonene 및 그 밖의 terpene 화합물의 대사능을 지닌 미생물의 대사경로는 이미 밝혀진 것들이 있다(Chang, 1997; Krasnobajew, 1984).

이들 미생물의 대부분은 이 경로들 중 한 가지 대사 경로를 주 경로로 이용하는 것으로 알려지고 있다. 그러나 *Enterobacter* ssp. 6L은 이중 한 가지 대사경로만 가지 않고 여러 가지 경로를 동시 다발 적으로 운영하는 것으로 보인다. 이러한 *Enterobacter* ssp.(장해춘 2000a)로부터 각각의 다른 유자정유 대사능 유전자 단편을 클로닝 하여 지니고 있는 *E. coli* 형질전환주인 EC3, EC4, EC6는 모균주 에서와 같이 다양한 유자정유 대사능 경로를 지니고 있지 않고 그중 한 부분에 속하는 정유 대사능(한가지 대사경로)을 지니고 있다. 각각의 다른 대사경로에 해당하는 유자정유 대사능 유전자를 동시에 발현시키는 시스템(두 가지 또는 세 가지 대사경로)인 공동배양에서는 부분적인 유자정유 대사능이 상보적으로 전체대사에 관계하므로 단독 배양에서 보다 높은 대사체계 구축이 가능하고 그러므로 동 시스템에서 단독 배양에서 보다 높은 균 생육도를 나타내는 것으로 사료된다.



## 2. 생전환 된 물질의 GC-MS를 통한 분석

### 1) 단독배양액의 대사산물 분석

GC-MS분석 전에 모든 시료는 후각 테스트를 통하여 추출물의 전체적인 향에 대한 관능검사를 시행하였다. EC3시료에서는 floral향수와 비슷한 꽃향기가 났으며 EC4시료에서는 citrus계열 향과 시원한 꽃향기가 났고 EC6시료에서는 화한 냄새와 mild floral향이 났다. 모든 시료에서 탄소원으로 공급한 유자정유와는 전혀 다른 향이 났으며 각 시료에서 각각의 다른 향을 느낄 수 있었다.

EC3, EC4, EC6 모두 유자정유를 대사 하여 새로운 terpene화합물을 생산하는데 배양시간(3시간, 12시간, 24시간, 36시간)에 따라서 대사산물의 종류와 양이 다르게 나타났으며(data not shown), 이중 배양 24시간에 가장 많은 종류의 화합물이 검출되었으며 검출되는 화합물의 양도 일정한 함량으로 안정되게 생산되었다(Table 3, 4, 5). 세 형질전환주 모두 대사산물 중 linalool이 가장 많은 함량으로 검출되었고 4-terpineol과  $\alpha$ -terpineol이

주요 대사산물 이었다. Linalool의 함량은 배양 3시간 부터 점차 증가하여 배양 24시간에 최고에 달하였으며 36시간에는 약간 감소하였다. 이외에 소량씩이기는 하지만 각각의 형질전환주 배양에 따라 독특한 terpene 계열 화합물이 각 형질전환주의 대사산물로 검출되었다. 즉 EC3배양은 thujyl alcohol, nerolidol이 EC4는 nerol, veridiflorol, spathulenol이 EC6는 nerolidol, nerol, veridiflorol, spathulenol이 각각 검출되었다. 각각의 단독 배양에 따라 검출되는 화합물 중 특정 향을 나타내는 것으로 알려진 물질에 대해서는 제시된 표에서(Table 3, 4, 5) 각각의 화합물 명 옆의 별도의 괄호 안에 그 화합물이 나타내는 향을 표시하였다. 본 표에 기술된 이러한 각각 향들의 threshold value에 따라 총체적인 각 시료의 향을 결정하였을 것이다. 이 중 어떠한 특정 향이 전체 시료의 향을 좌우하는지 아니면 이들이 복합적으로 작용하여 전체 시료 향을 결정하는지의 여부는 각 화합물별 관능검사 즉 GC-sniffing test에 의해 결정 될 것이며 이 부분의 실험은 현재 진행 중이다.

유자정유의 70~90%는 limonene이 차지하고 있다고

Table 3. Citron oil bioconversion products of *E. coli* EC3 at 28°C 24h cultivate

Component	RT	RI	Peak Area
Acetic acid	40.772	1440	81,097,811
Linalool(refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	47.500	1544	1,661,591,902
$\alpha$ -Terpineol(fragrant, floral, lilac)	56.796	1689	315,968,721
Limonene	23.481	1186	105,048,584
$\gamma$ -Terpinene(refreshingly herbaceous-citrusy odor)	26.705	1233	18,819,747
4-Terpineol(warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.988	1595	204,257,907
Hexadecanol(sweet oily odor)	81.686	2340	59,084,789
Thujyl alcohol(lime like, minty)	52.618	1621	28,411,497
Dodecanal	55.214	1664	9,408,174
Trans-geraniol(sweet, floral, rose, fruity)	64.981	1851	27,869,179
$\beta$ -Terpineol(pungent-woody-earthy)	52.746	1623	9,248,874
Citral(lemon)	58.653	1723	12,453,670
Nerolidol(woody, floral)	70.742	2004	20,723,802
Tetradecanol	74.942	2123	20,349,644

Table 4. Citron oil bioconversion products of *E. coli* ECA at 28°C 24h cultivate

Component	RT	RI	Peak Area
Acetic acid	40.612	1438	326,333,308
Linalool(refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	47.525	1544	2,379,891,625
$\alpha$ -Terpineol(fragrant, floral, lilac)	56.718	1688	303,965,817
Limonene	23.473	1186	695,630,883
$\gamma$ -Terpinene(refreshingly herbaceous-citrusy odor)	26.670	1233	88,533,731
4-Terpineol(warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.943	1594	279,589,375
Hexadecanol(sweet oily odor)	82.270	2353	14,057,922
Thujyl alcohol(lime like, minty)	52.544	1620	18,471,454
Trans-geraniol(sweet, floral, rose, fruity)	64.602	1843	27,153,211
Tetradecanol	75.748	2157	12,227,139
1,8-Cineol	24.292	1198	25,803,808
3-Hexene-1-ol(green grass)	36.639	1377	16,082,682
2-Hexene-1-ol(powerful, leafy green, wine-like fruity)	38.111	1398	8,027,943
Linalool oxide(powerful sweet-woody, penetrating odor, floral-woody-earthy)	42.428	1467	16,915,145
1-Octanol(sharp, fatty, waxy, citrus)	48.255	1555	17,956,222
Linalyl acetate(pleasant, sweet, floral, fruity)	48.539	1559	24,746,941
$\beta$ -Terpineol(pungent-woody-earthy)	52.649	1622	15,861,302
Z-Citral	56.052	1677	3,830,441
1-Nonanol(powerful, oily-floral, fresh, petallike odor)	57.421	1699	4,502,476
Citral(lemon)	58.587	1721	16,656,114
Nerol(sweet rosy, refreshing, wet seashore odor)	62.422	1793	8,290,429
Veridiflorol	73.201	2068	49,721,832
Spathulenol	74.596	2107	42,987,556

Table 5. Citron oil bioconversion products of *E. coli* EC6 at 28°C 24h cultivate

Component	RT	RI	Peak Area
Acetic acid	40.628	1438	221,911,568
Linalool(refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	47.458	1543	1,968,065,486
$\alpha$ -Terpineol(fragrant, floral, lilac)	56.722	1688	400,220,078
Limonene	23.443	1185	205,401,907
$\gamma$ -Terpinene(refreshingly herbaceous-citrusy odor)	26.671	1232	25,842,139
4-Terpineol(warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.920	1594	261,909,302
Thujyl alcohol(lime like, minty)	52.568	1620	22,009,195
Trans-geraniol(sweet, floral, rose, fruity)	63.503	1840	73,371,953
1-Hexanol(very slightly fatty and fruity odor)	34.552	1347	25,932,963
Linalool oxide(powerful sweet-woody, penetrating odor, floral-woody-earthy)	40.525	1436	13,845,299
1-Octanol(sharp, fatty, waxy, citrus)	48.189	1554	12,925,312
$\beta$ -Terpineol(pungent-woody-earthy)	52.646	1622	16,929,134
Z-Citral(lemon)	58.584	1721	11,372,796
Carvone(warm-herbaceous, breadlike, spicy and slightly floral odor)	58.857	1726	13,536,192
Nerol(sweet rosy, refreshing, wet seashore odor)	62.388	1793	16,858,560
Trans-carveol(caraway-like)	63.969	1828	9,320,629
Veridiflorol	73.182	2068	26,452,524
Tetradecanol	75.718	2156	7,151,055

알려지고 있다(곽재진 등 1992; Ohloff, 1994). Limonene의 현재 단가는 72\$/1kg이며 유자정유는 폐유자박으로부터 손쉽게 구할 수 있다. 이에 반해 전체 대사산물 중 28~30%를 차지하는 linalool의 단가는 198\$/1kg이며 nerol은 1,820\$/1L, nerolidol은 1,270\$/1kg로 원료기질로 공급되는 유자정유내의 limonene에 비해 고부가가치 화합물이며 여기서 제시된 이러한 가격은 화학적 합성에 의한 화합물의 가격으로 본 물질들이 천연물인 경우 단가가 10~100배 상승할 것이며 안전성 면에서도 화학적 화합물과는 비교 우위를 논할 필요조차 없을 것이다.

### 3. 공동배양액의 대사산물 분석

단독배양에서와 같이 공동배양에서도 GC-MS분석 전에 모든 시료를 후각을 통한 관능검사를 시행하였다. EC3+EC4에서는 연한 citrus 계열 향이 났고, EC3+EC6에서는 달콤한 꿀냄새, EC4+EC6에서는 꽃향과 시원한 citrus 계열 향이 섞여서 났으며 EC3+EC4+EC6에서는 꽃향과 달콤한 향이 섞인 화장품 냄새를 느낄

수 있었다. 이는 유자정유 냄새와는 전혀 다른 향이었으며 단독배양 시료의 향과도 다른 향을 느낄 수 있었다.

공동배양액의 대사산물을 Table 6, 7, 8, 9에 나타내었다. 공동배양액에서도 단독배양에서와 같이 유자정유를 생전환시킨 대사산물 중 linalool이 가장 많은 함량으로 검출되었고 4-terpineol과  $\alpha$ -terpineol이 주요대사산물이었다. *E. coli* 형질전환주 공동배양에서 검출되는 그 밖의 화합물들은 단독배양과는 각기 다른 terpene계열 화합물들이 각각의 공동배양액 대사산물로 검출되었다. 즉 EC3+EC4의 공동배양에서는 elemol, ocimene, nonanal, trans-2-nonenal, EC3+EC6의 공동배양에서는 cis-ocimene, 2-octanol, octanal,  $\alpha$ -terpinolene, EC4+EC6의 공동배양에서는 ocimene, 그리고 EC3+EC4+EC6의 공동배양에서는 nonanal, 2-octenol, iso-menthol, ocimene이 각각 검출되었는데 이들 화합물들이 각각의 공동배양에 따른 독특한 향을 나타내는 원인물질로 추정된다. 또한 각각의 공동배양에 따라 검출되는 화합물 중 특정 향을 나타내는 것으로 알려진 물질에 대해서는 제시된 표에서(Table 6, 7, 8, 9) 각각의 화합물 명 옆의 별도의 괄호 안에

Table 6. Citron oil bioconversion products of *E. coli* EC3+EC4 at 28°C

(a) 24h cultivate				
Component	RT	RI	Peak Area	
$\beta$ -Myrcene(sweet-balsamic-resinous)	20.179	1154	16.563.461	
Limonene	22.825	1195	266.695.961	
$\alpha$ -Phellandrene(pleasant, fresh-citrusy, peppery-woody)	23.403	1204	8.366.755	
$\alpha$ -Terpinene	25.958	1241	54.336.504	
Acetic acid	39.908	1448	20.425.730	
Linalool oxide(powerful sweet-woody, penetrating odor, floral-woody-earthly)	41.623	1474	4.668.531	
Linalool(refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	46.745	1552	1.262.071.099	
4-Terpineol(warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.130	1604	113.037.889	
$\beta$ -Terpineol(pungent-woody-earthly)	51.863	1633	10.619.441	
Cryptone	54.300	1673	2.460.138	
$\alpha$ -Citral(lemon)	54.775	1681	2.572.591	
Citral(lemon)	55.229	1689	2.599.799	
$\alpha$ -Terpineol(fragrant, floral, lilac)	55.932	1701	147.565.206	
$\beta$ -Citronellol(sweet, fresher, lighter rosy-floral)	57.782	1734	5.220.198	
Valeic acid(powerful, penetrating, diffusive acid odor)	58.011	1738	5.793.226	
trans-Geraniol(sweet, floral, rose, fruity)	61.663	1804	6.307.417	
Nerol(sweet rosy, refreshing wet seashore odor)	63.826	1853	16.985.892	
Veridiflorol	72.591	2085	14.191.390	
Nerolidol(woody, floral)	72.872	2092	26.570.904	
Tetradecanol	83.441	2330	15.439.523	



(b) 48h~72h cultivate

Component	RT	RI	Peak Area
$\beta$ -Myrcene(sweet-balsamic-resinous)	20.958	1166	47,946.701
Limonene	23.075	1199	334,289.381
$\alpha$ -Phellandrene(pleasant, fresh-citrusy, peppery-woody)	23.508	1206	24,195.215
trans-Ocimene	24.808	1225	1,417.680
$\gamma$ -Terpinene(refreshingly herbaceous citrusy odor)	26.242	1245	65,778.822
Ocimene(warm-herbaceous, sweetness)	26.608	1251	13,601.167
$\alpha$ -Terpinolene(powerful, minty-camphoraceous)	28.692	1281	6,749.445
Cyclohexanone(powerful, minty-camphoraceous)	29.308	1290	4,585.991
Nonanal(floral-waxy, rosy, sweet, fresh)	33.925	1357	1,446.981
Tetradecane	37.025	1403	1,277.122
Linalool oxide(powerful sweet-woody, penetrating odor, floral-woody-earthy)	41.808	1477	21,063.179
$\beta$ -Cyclocitral	44.775	1523	6,094.444
Linalyl acetate(sweet, floral-fruity)	45.342	1531	770.444
2-Nonanal(powerful, penetrating)	45.808	1538	1,324.970
Linalool(refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	47.492	1564	3,224,853.745
trans-2-Nonenal	49.658	1596	4,874.223
4-Terpineol(warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.742	1614	421,038.242
Dodecanal(sweet, waxy-herbaceous, fresh, clean-floral odor)	52.575	1645	2,791.771
Thujyl alcohol(lime like, minty)	54.533	1677	9,844.456
$\alpha$ -Citral	54.908	1683	6,264.848
$\beta$ -Terpineol	55.367	1691	15,307.157
$\alpha$ -Terpineol(fragrant, floral, lilac)	56.283	1707	586,642.575
Carvone	58.783	1751	49,334.081
trans-Carveol(caraway-like)	62.117	1814	1,645.189
Nerol(sweet rosy, refreshing, wet seashore odor)	64.408	1866	16,087.940
2-Decenal	64.950	1878	9,822.636
Elemol(very faint)	72.033	2069	23,401.854
Nerolidol(woody, floral)	73.033	2097	99,952.635

Table 7. Citron oil bioconversion products of *E. coli* EC3+EC6 at 28°C

(a) 24h cultivate

Component	RT	RI	Peak Area
Limonene	22.800	1195	135,905.296
$\gamma$ -Terpinene(pleasant, citrusy)	25.967	1241	25,040.102
Acetic acid	39.924	1448	11,186.163
Linalool oxide(powerful sweet-woody, penetrating odor, floral-woody-earthly)	41.634	1475	2,935.337
Linalool(refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	46.694	1552	819,118.220
4-Terpineol(warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.113	1604	66,956.087
Thujyl alcohol(lime like, minty)	51.868	1633	2,580.092
$\alpha$ -Terpineol(fragrant, floral, lilac)	55.919	1700	86,322.427
cis-Geraniol	63.854	1854	6,862.422
Nerolidol(woody, floral)	72.877	2092	17,586.466
Hexadecanol(sweet oily odor)	83.454	2330	14,346.575

(b) 48h~72h cultivate

Component	RT	RI	Peak Area
$\beta$ -Myrcene(sweet-balsamic-resinous)	21.008	1167	95,529.412
Limonene	23.142	1200	648,725.996
$\alpha$ -Phellandrene(pleasant, fresh-citrusy, peppery-woody)	23.542	1206	45,890.176
trans-Ocimene	24.792	1224	1,415.783
cis-Ocimene	25.542	1235	16,695.722
$\gamma$ -Terpinene(slightly bitter-herbaceous, pleasant, citrusy)	26.258	1246	134,340.746
Ocimene(warm-herbaceous, sweetness)	26.625	1251	28,331.091
$\alpha$ -Terpinolene	28.858	1284	18,838.930
Cyclohexanone(powerful, minty, camphoraceous)	29.308	1290	6,876.470
2-Octanol(fresh, orange-rose-like)	33.075	1345	781.816
Octanal(powerful, orange-like slightly fatty)	33.408	1350	1,188.381
Alloocimene	34.858	1371	3,198.370
trans-Pinocarveol(warm-woody-balsamis)	36.375	1393	2,468.935
Linalool oxide(powerful sweet-woody, penetrating odor, floral-woody-earthly)	41.858	1478	33,843.553
$\beta$ -Cyclocitral	42.492	1488	700.972
$\alpha$ -Ylangene	42.742	1492	2,223.239
Linalyl acetate(pleasant, sweet, floral, fruity)	45.342	1531	679.253
2-Nonanol(powerful, penetrating)	45.775	1538	1,417.572
Linalool(refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	47.483	1564	4,382,816.537
4-Terpineol(warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.942	1617	635,238.986
$\beta$ -Terpineol(pungent-woody-earthly)	52.150	1638	67,703.545
Dodecanal(sweet, waxy-herbaceous, fresh, clean-floral odor)	52.608	1645	3,905.690
Thujyl alcohol(lime like, minty)	53.358	1658	2,343.914
z-Citral(lemon)	54.900	1683	8,957.144
$\alpha$ -Terpineol(fragrant, floral, lilac)	56.317	1707	868,921.315
Isoborneol	56.775	1716	5,195.293
Citronellol(fresh rosy odor)	57.025	1720	2,207.344
Citral(lemon)	57.900	1736	24,671.897
Carvone(warm-herbaceous, breadlike, spicy, slightly floral odor)	58.233	1742	23,037.442
trans-Geraniol(sweet, floral, rose, fruity)	64.400	1866	27,700.060
cis-Carveol	64.858	1876	9,665.375
Elemol(very faint)	72.067	2070	31,167.421
Nerolidol(woody floral)	73.025	2096	116,431.874

Table 8. Citron oil bioconversion products of *E. coli* ECA+EC6 at 28°C

(a) 24h cultivate

Component	RT	RI	Peak Area
$\beta$ -Myrcene(sweet-balsamic-resinous)	20.539	1160	23,790.659
Limonene	22.850	1196	302,789.540
$\beta$ -Phellandrene	23.396	1204	8,761.452
$\gamma$ -Terpinene(refreshingly herbaceous-citrusy odor)	25.970	1241	56,066.216
Acetic acid	39.913	1448	13,280.776
Linalool oxide(powerful sweet-woody, penetrating odor, floral-woody-earthly)	41.630	1474	4,651.697
Linalool(refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	46.746	1552	1,207,378.678
4-Terpineol(warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.126	1604	104,180.573
$\beta$ -Terpineol(pungent-woody-earthly)	51.857	1633	6,175.301
Cryptone	54.321	1674	4,196.186
Citral(lemon)	54.770	1681	3,391.357
<i>z</i> -Citral(lemon)	55.225	1689	2,046.297
$\alpha$ -Terpineol(fragrant, floral, lilac)	55.927	1700	132,850.435
Nerol(sweet rosy, refreshing, wet seashore odor)	61.672	1804	6,995.853
<i>trans</i> -Geraniol(sweet, floral, rose, fruity)	63.865	1854	9,537.672

(b) 48h~72h cultivate

Component	RT	RI	Peak Area
$\beta$ -Myrcene(sweet-balsamic-resinous)	21	1167	47,845.232
Limonene	23.183	1201	356,449.879
$\alpha$ -Phellandrene(pleasant, fresh-citrusy, peppery-woody)	23.517	1206	21,234.507
$\gamma$ -Terpinene(pleasant, citrusy)	26.267	1246	67,825.994
Ocimene(warm-herbaceous, sweetness)	26.750	1253	12,059.304
Cyclohexanone(powerful, minty-camphoraceous)	29.333	1291	6,667.744
Alloocimene	34.833	1371	1,650.207
Tetradecane	37.417	1409	3,433.205
Linalool oxide(powerful sweet-woody, penetrating odor, floral-woody-earthly)	41.850	1478	18,897.007
$\alpha$ -Ylangene	42.650	1490	1,448.832
2-Nonanol(powerful, penetrating)	45.639	1536	1,129.197
Linalool(refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	46.862	1544	2,822,135.865
4-Terpineol(warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.775	1615	309,511.545
$\beta$ -Terpineol(pungent-woody-earthly)	51.853	1633	33,176.985
Thujyl alcohol(lime like, minty)	54.650	1679	3,664.835
<i>z</i> -Citral(lemon)	55.205	1688	11,647.461
$\alpha$ -Terpineol(fragrant, floral, lilac)	55.960	1701	420,167.794
Isoboneol	56.384	1709	3,280.423
Citral(lemon)	57.722	1733	8,454.460
Carvone(warm-herbaceous, breadlike, spicy, slightly floral odor)	58.036	1738	10,346.586
<i>trans</i> -Geraniol(sweet, floral, rose, fruity)	64.002	1857	15,896.179
<i>cis</i> -Carveol	64.673	1872	3,721.151
Nerolidol(woody floral)	72.589	2084	14,084.938

Table 9. Citron oil bioconversion products of *E. coli* EC3+EC4+EC6 at 28°C

(a) 24h cultivate

Component	RT	RI	Peak Area
$\beta$ -Myrcene(sweet-balsamic-resinous)	20.7	1162	14,589.543
Limonene	22.770	1194	283,101.094
$\gamma$ -Terpineol	25.907	1241	55,763.319
Linalool oxide(powerful sweet-woody, penetrating odor, floral-woody-earthy)	41.565	1473	4,441.497
Linalool(refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	46.674	1551	1,210,392.889
4-Terpineol(warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.066	1603	112,712.798
$\alpha$ -Terpineol(fragrant, floral, lilac)	55.874	1700	157,559.963
Citral	57.943	1736	4,396.183
Nerol(sweet rosy, refreshing, wet seashore odor)	63.927	1855	4,594.965
Hexadecanol(sweet oily odor)	81.575	2281	16,596.806

(b) 48h~72h cultivate

Component	RT	RI	Peak Area
$\beta$ -Myrcene(sweet-balsamic-resinous)	20.558	1160	98,532.965
Limonene	22.916	1197	725,801.543
$\alpha$ -Phellandrene(fresh-citrusy, peppery-woody)	23.416	1204	53,724.860
trans-Ocimene	24.500	1220	2,265.585
$\gamma$ -Terpinene(bitter-herbaceous, pleasant citrusy)	25.988	1242	143,924.686
Ocimene(warm-herbaceous)	26.397	1248	33,365.608
$\alpha$ -Terpinolene	28.512	1279	21,293.832
Cyclohexanone	29.047	1286	5,332.096
Alloocimene(diffusive, fresh-gassy)	34.683	1368	4,038.229
trans-Pinocarveol(warm-woody-balsamic slightly piney-fen-nel-like odor)	36.122	1389	2,589.551
Nonanal(powerful, diffusive fatty-floral, waxy odor)	36.436	1394	1,139.893
Tetradecane	37.071	1403	4,244.531
trans-2-Nonenol(powerful, diffusive, penetrating, fatty-orrisy odor)	41.342	1470	293.271
Linalool oxide(powerful sweet-woody, penetrating odor, floral-woody-earthy)	41.624	1474	25,621.108
2-Octenol	43.240	1500	13,235.091
$\beta$ -Cyclocitral(condensation of citral with aniline)	44.621	1520	8,321.747
Linalyl acetate	45.223	1529	1,020.517
2-Nonanol	45.628	1536	1,687.395
Linalool	47.048	1543	3,809,343.014
4-Terpineol(warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.215	1605	456,115.119
$\beta$ -Terpineol	51.868	1633	41,599.200
$\alpha$ -Citral(lemon)	53.506	1660	2,324.239
Thujyl alcohol(lime like, minty)	54.617	1679	1,985.968
$\alpha$ -Terpineol(fragrant, floral, lilac)	55.997	1702	589,065.476
Iso-menthol(soap perfumes, detergent fragrances)	56.381	1709	4,398.363
Valeic acid(powerful, penetrating, diffusive acid odor)	57.939	1736	36,579.739
trans-Geraniol(sweet, floral, rose, fruity)	61.715	1805	10,062.503
Nerol(sweet rosy, refreshing, wet seashore odor)	63.932	1855	20,816.561
cis-Carveol	64.639	1871	6,573.719
Elemol(sweet-woody, very-faint)	71.802	2063	20,480.326
Nerolidol(woody floral)	72.235	2075	3,801.831
Veridifolol	72.593	2085	28,796.900

그 화합물이 나타내는 향을 표시하였다. 공동배양의 배양 시간에 따른 대사산물의 생산은 주 대사산물인 linalool의 경우 배양 후 12시간과 24시간에 걸쳐 점차 증가하여 48시간배양액과 72시간배양액을 섞은 배양액에서는 최대 생산량을 나타냈다. 이 밖의 대사산물의 생산도 단독배양에서는 배양 12~24시간만에 최대생산이 이루어 졌으나 공동배양에서는 배양 48시간~72시간만에 최대생산을 얻을 수 있었다. 즉 배양 후 48시간~72시간에 단독 배양시의 linalool 최대생산량 보다 EC3+EC4공동배양은 약 2배, EC3+EC6 공동배양은 약 2.6배, EC4+EC6 공동배양은 약 1.5배, EC3+EC4+EC6 공동배양은 약 2배 더 높았고, 4-terpineol은 단독 배양시 보다 공동배양 EC3+EC4은 약 2배, EC3+EC6은 약 3배, EC4+EC6은 약 1.2배, EC3+EC4+EC6은 약 1.6배 더 높았으며  $\alpha$ -terpineol은 단독배양시 보다 공동배양 EC3+EC4은 약 2배, EC3+EC6은 약 2.8배, EC4+EC6은 약 1.5배, EC3+EC4+EC6은 약 1.9배 더 높았다(Table 3, 4, 5참조).

Trans-2-nonenal의 단가가 4,152 \$/1kg 2-octanol은 15,090 \$/1kg octanal은 220 \$/1kg iso-menthol은 2,244 \$/1kg으로 유자정유의 최대 구성물질인 limonene의 단가에 비해 약 3~200여배 높음을 알 수 있고, 본 물질들은 천연물이므로 가격 면이나 안전성 면에서 월등한 비교우위에 설 수 있다. 또한 각각의 유자정유 대사능을 지닌 형질전환주 EC3, EC4, EC6의 조합에 따른 공동배양으로 특정 향을 지닌 각각의 향기물질 생산이 가능함을 알 수 있었다. 즉 각기 다른 유자정유대사 체계를 지닌 미생물의 조합에 의하여 여러 가지 향기 생산이 가능함으로 저렴하고 신속한 방법으로 다양한 생물학적 향기생산이 가능하다는 것이다. 이들 미생물 대사에 의해 생산된 이들 고부가가치 향기 대사산물의 활용분야는 식품첨가제, 식품 보존제, 향신료등의 식·음료용(Feraloni, 1975) 뿐만 아니라 항암제, 진정, 구풍, 소화, 해열, 진정, 강장, 향우울제, 피부질환 치료제 등의 기능이 있는 의약품, 그의 각종 향장품, 비누, 목욕 용품, 피부 관리제, 가글제, 방향제를 비롯하여 난분해성 terpene화합물 분해시키는 환경 정화제, 부엌 및 자동차 등의 세정 및 방향제 등에 응용되는 향균세정제 등으로 활용될 수 있을 것이다.

#### IV. 요약

본 연구에서는 미생물의 대사체계를 이용하여 유자 껍질내의 유자정유성분을 생전환 시키므로써 고부가가치 고기능성 천연향의 발굴 생산을 시도하였다. 유자정유 성분 대사능 유전자를 지닌 E. coli 형질전환주 EC3, EC4, EC6의 공동 배양액을 유자정유가 유일한 탄소원인 M9배지에서 28°C로 진탕배양 하였다. 각 공동 배양액 (EC3+EC4, EC3+EC6, EC4+EC6 and EC3+C4+EC6)은 각 형질전환주의 단독배양 보다 3~4배 더 높은 생육도를 나타냄을 알 수 있었다. 공동배양에 의해 생전환된 물질들은 GC-MS에 의해 확인하였다. 각 공동배양액의 주요한 대사산물로는 linalool, 4-terpineol,  $\alpha$ -terpineol이 공통적으로 검출되었다. 소량씩 존재하나 배양액의 주요한 향을 결정할 것으로 보이는 각기 다른 terpene 계열 화합물들이 각각의 공동배양액 대사산물로 검출되었는데, 공동배양액EC3+EC4에서는 elemol, ocimene, nonanal, trans-2-nonenal이 공동배양액EC3+EC6에서는 cis-ocimene, 2-octanol, octanal,  $\alpha$ -terpinolene, 공동배양액 C4+EC6에서는 ocimene, 그리고 공동배양액 EC3+EC4+EC6에서는 nonanal, 2-octenol, iso-menthol, ocimene이 각각 검출되었다.

#### 감사의 글

본 연구는 1998년 농림기술개발 사업에 의해 수행된 연구결과 중의 일부이며 연구비 지원에 감사 드립니다.

#### 참고 문헌

- 곽재진, 김도연, 이근희(1992). 금귤의 휘발성 향기성분. *한국식품과학회지*, 24: 423-427.
- 박연진 (2001). 유자정유성분의 대사능을 지닌 미생물의 분리 및 특성. 조선대 대학원 석사학위 논문.
- 장해춘 (2000). 미생물의 대사체계를 이용한 향기물질의 생산. *한국식품과학회 64회 학술발표회, Proceeding*, 193-205.a.
- 장해춘 (2000) 폐유자박을 이용한 고부가가치 제품제조

- 기술 개발. 농림기술개발과제 보고서.b.
- Braddock, R.J., Cadwallader, K.R. (1992). Citrus by-products many factors for food use. *Food Technol.* 40: 105-110.
- Chang, H.C. (Nov. 18, 1997). Process for the preparation of monoterpenes using bacterium containing recombinant DNA. *US Patent*, 5,688,673.
- Chang, H.C., Oriol, P.J. (1994). Bioproduction of perillyl alcohol and related monoterpenes by isolates of *Bacillus stearothermophilus*. *J. Food Sci.* 59: 660-662.
- Chang, H.C., Oriol, P.J. (1995). Cloning and expression of a limonene degradation pathway from *Bacillus stearothermophilus* in *E. coli*. *J. Food Sci.* 60: 551-553.
- Cheong, T.K., Oriol, P.J. (2000). Cloning and expression of the limonene hydroxylase of *Bacillus stearothermophilus* BR388 and utilization in two-phase limonene conversions. *Appl Biochem Biotechnol.* spring: 84~86: 903-15.
- Chung, J., Lee, Y. (1998). Manufacture condition of oleoresin using citron peel. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 139-145.
- Dhavalikar, R.S., Bhattacharyya, P.K. (1966). Microbiological transformation of terpenes: Part IX-pathways of degradation of limonene in a soil *Pseudomonas*. *Indian J. Biochem.* 3: 158-164.
- Feraloni, G. (1975). Handbook of Flavor Ingredients, 2nd ed. *CRC Press, Boca Raton, FL.*
- Kieslich, K., Abraham, W.R., Thede, B., Washausen, D. (1986). Transformation of terpenoids. *In progress in Essential oil research*, XVI, Ernst-Joachim Brunlce, ed. 367-394.
- Krasnobajew, V. (1984). Terpenoids, Ch 4. In *Biotechnology-Biotransformations*, Vol. 6a. K. Lieslich (Ed.), *Verlag Chemie, Weinheim.* p.98-125.
- Krings, U.R., G. Berger. (1998). Biotechnological production of flavors and fragrances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 1-8.
- Miyake, M. (1990). Quality Characteristics of Jabara (*Citrus jabara Hort. ex Tanaka*) and Yuzu (*Citrus Junos Sieb. ex Tanaka*) fruit juices. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 37: 346-354.
- Ohloff, G. (1994). Scent and Fragrance. (Ed.), *Springer-Verlag, Berlin.*