

## 천연 향미소재 소톨론 생산을 위한 생물전환공정

장인환 · 강민숙<sup>1</sup> · 채희정\*

호서대학교 식품생물공학전공 및 벤처전문대학원 첨단산업기술전공, <sup>1</sup>식품영양학전공

(2003년 9월 22일 접수, 2003년 11월 25일 수리)

소톨론은 호로파(*fenugreek*)라는 콩과식물을 원료 물질로 하여 여러 가지 전환반응에 의해 생산될 수 있는 천연 향미소재로서 본 연구에서는 생물 전환율을 높이기 위한 미생물이나 효소원을 탐색하였다. 원료로부터 소톨론을 추출하기 위한 유기용매로서 *dichloromethane*이 선별되었다. 효소원으로 사용될 수 있는 유산균, 효모, 사상균 등의 여러가지 미생물에 대한 스크리닝 결과 신령버섯(*Agaricus blazei*)이 높은 전환율을 보였다. 다양한 첨가물 및 전처리 조건에 따른 전환율을 조사한 결과 호로파 현탁액에 *isoleucine*,  $\alpha$ -ketoglutaric acid, ascorbate, FeSO<sub>4</sub> 등의 첨가물을 첨가한 후 신령버섯의 균사체 배양액을 혼합하여 반응시키는 공정을 통하여 원료의 초기 소톨론 함량을 대략 77배 수준으로 높일 수 있었다.

**Key words:** 소톨론, 천연 향미소재, 생물전환반응

### 서 론

식품의 향미(flavor)는 맛, 냄새 및 촉감에 의해 복합적으로 느껴지는 관능적 품질 요소이다. 맛은 한가지 요소에 의해 정해지는 것이 아니라 여러 가지 맛이 복잡하게 작용하여 이루어진다. 각종 음식과 식품의 향미를 향상시키기 위하여 조미료, 향신료, 양념, 풍미료 등이 다양하게 사용되고 있으며 이를 총칭하여 향미 증진제(flavor enhancer 또는 taste enhancer)라고 한다. 향미 증진제의 기능을 하는 맛 성분은 아미노산, 펩타이드, 당, 유기산, 핵산 관련물질, 무기질 등이다. 이들 맛 성분은 주로 천연물을 원료로 하여 추출, 분해, 가열, 농축, 건조, 조립 등의 방법으로 생산되며, 이 과정 중 효소처리 시의 효소의 선정과 그 밖에 화학적 처리(산 또는 알칼리), 물리적 또는 미생물의 처리는 조미료의 맛 특성에 따라 필요성이 결정된다. 이는 조미료의 고유한 맛의 강도를 높일 수 있다는 관점에서 처리 조건이 선택되어야 하며 그 밖의 추출, 여과, 농축 및 건조 과정은 최종 제품의 형태(농축액 또는 분말)에 따라 최적 조건이 확립되어야 한다.

우리나라의 향미 증진제, 이른바 조미료에 대한 소비자의 선호 경향은 1960년대 초반 발효에 의한 글루타민산나트륨(monosodium glutamate, MSG)의 제조 방법이 산업화된 뒤 소비가 증가하면서 식품 산업 전반에 크게 영향을 끼쳐왔다. 최근 국민의 경제적 수준이 향상되면서 식품의 고유한 맛을 향상시키기 위해 천연 소재를 이용하고자 하는 움직임이 활발해졌다. 천연 향미(조미)소재는 조리 또는 가공된 식품 자체의 자연의 맛을 충족시킬 수 있다는 장점이 있지만, 제조 및 이용에 다음과 같은 문제점이 있다. 첫째, 대부분의 천연 향미소재는 맛의 강도가 비교적 약하여 많은 양이 사용되어야 하므로 첨가

된 식품의 점도, 텍스처, 색 및 안정성에 영향을 준다. 천연 향미료의 제품 형태는 농축된 상태나 분말로서 제조과정 중 추출 용매 선택의 어려움과 가열처리 및 증발과정 중 향미성분의 변화 및 손실의 가능성이 많다. 둘째, 원료의 품종 및 성숙도나 재배지역에 따라 전체적인 맛의 프로파일은 물론 맛의 강도에도 많은 차이가 있다. 셋째, 원료의 연중 공급이 일정치 않고 수확 후 가공 및 저장 중에 일어나는 호흡활동과 효소작용에 의해 향미가 변한다. 넷째, 천연 조미료의 안전성에 대한 자료가 충분치 않으며 제조된 제품의 맛과 물리적 성질의 변질 가능성이 있다.<sup>1)</sup>

최근 들어 관심이 모아지고 있는 특유의 향과 맛을 내는 천연 향미소재인 소톨론(sotolon, 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone)<sup>2)</sup> 호로파(*fenugreek*)<sup>3)</sup>나 당귀(*lovage*)<sup>4)</sup>같은 콩과 식물에 소량 함유되어 있는 4-hydroxyisoleucine<sup>5)</sup> 출발 물질로 하여 여러 가지 전환반응에 의해 생산될 수 있다.<sup>6-10)</sup> 호로파는 현재 식품, 화장품 첨가제 및 한약재로 사용되고 있다. 호로파 중지는 천연 식이섬유의 일종인 갈락토만난(galactomannan)을 함유하고 있으며 이것은 혈중 콜레스테롤과<sup>11)</sup> 혈당을 저하시키는 작용이<sup>12)</sup> 있어 기능성 식품 소재로서 각광을 받고 있다. 갈락토만난은 일명 호로파검(gum)이라 하며 수용성으로 oil-in-water 에멀전(emulsion)에서 구아검(guar gum) 또는 로커스트 빈검(locust bean gum) 보다도 우수한 계면 활성능력을 보여주어 천연 계면 활성제로의 용도개발이 주목되고 있는 물질이다.<sup>13)</sup>

소톨론은 인도 카레 특유의 향미를 풍기는 물질로서 Fig. 1A와 같은 화학구조를 갖고 있다. 소톨론은 호로파가 함유하는 4-hydroxyisoleucine(4-HIL, Fig. 1B)을 출발물질(starting material)로 하여 효소나 미생물에 의한 처리, 열처리 등에 의해 제조하는데, 4-HIL을 소톨론으로 전환하는 공정이 다수의 특허로 보고되었다.<sup>14-16)</sup> 이와 같이 대부분 국내에서 제조되고 있는 시즈닝 등의 조미소재는 농·축·수산물의 추출물을 적절한 맛을 내도록 배합하는 기술에 의존하여 제품화되고 있으나, 독특한 향미 베이스(base)의 소재화는 이루어지지 못하고 있다. 따라서

\*연락처

Phone: 82-41-540-5642; Fax: 82-2-6280-6346

E-mail: hjchae@office.hoseo.ac.kr

Table 1. Microorganisms used for the bioconversion process and culture conditions

| No. | Abbreviation | Species  | Incubation temperature (°C) | Media   |
|-----|--------------|--|-----------------------------|---------|
| 1   | Leu1         | <i>Leuconostoc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293  | 37                          | MRS     |
| 2   | Leu2         | <i>Leuconostoc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> KFRI 00819 | 37                          | MRS     |
| 3   | Lac1         | <i>Lactobacillus acidophilus</i> IFO3025                                 | 37                          | MRS     |
| 4   | Bif1         | <i>Bifidobacterium infantis</i>  | 37                          | MRS     |
| 5   | Lac3         | <i>Lactobacillus delbruekii</i> KCTC1047                                 | 37                          | MRS     |
| 6   | Leu3         | <i>Leuconostoc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> KFRI 00820 | 37                          | MRS     |
| 7   | Leu4         | <i>Leuconostoc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> KFRI 00821 | 37                          | MRS     |
| 8   | Leu5         | <i>Leuconostoc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 33313 | 37                          | MRS     |
| 9   | Natto        | <i>Bacillus subtilis</i> (natto) KCCM 12027                              | 30                          | NB      |
| 10  | Len.         | <i>Lentinus edodes</i>   | 25                          | MB, PDB |
| 11  | Aga.         | <i>Agaricus blazei</i> 1   | 25                          | MB      |
| 12  | Asp.         | <i>Aspergillus oryzae</i> KCTC 6983                                      | 30                          | PDB     |
| 13  | Sacc.        | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (y-15903; KCTC)                          | 30                          | YEP, YM |
| 14  | Bac.         | <i>Bacillus subtilis</i> KCTC 1028                                       | 30                          | NB      |

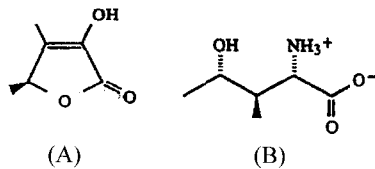


Fig. 1. Structure of sotolon (3-hydroxy-4,5-dimethyl-2 (5H)-furanone, A) and 4-hydroxy isoleucine (4-HIL, B). A: sotolon (3-hydroxy-4,5-dimethyl-2 (5H)-furanone), B: 4-hydroxy-isoleucine (4-HIL).

본 연구에서는 호로파로부터 소톨론의 특유의 향과 맛을 내는 천연 향미제를 개발하기 위한 효소적 전환공정의 가능성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

**실험재료.** 시중에 유통되고 있는 호로파는 모두 중국산으로 한약재 시장에서 구입하였다. 추출용매로 사용한 유기용매로는 hexane, dichloromethane, methanol, diethylether, ethylacetate 및 chloroform은 J.T. Baker(USA)사로부터 일반 시약을 구입하였다. 전환반응에 첨가물로 사용된 유기산과 아미노산 등은 시약등급으로 사용하였으며, 표준물질인 소톨론은 Sigma chemical(St. Louis, USA)사로부터 구입하였다.

**미생물 배양 및 전환반응 조건.** 호로파 소톨론 함량을 높이기 위한 생물전환공정을 위해 사용된 미생물들을 Table 1의 배양온도 및 배지에서 배양하였다. 생물전환공정에 사용된 미생물 중 유산균과 바실러스균을 각각 MRS배지(peptone 10 g/l, beef extract 10 g/l, yeast extract 5 g/l, glucose 20 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g/l,  $\text{NH}_4$ -citrate 2 g/l, Na-acetate 5 g/l,  $\text{MaSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g/l,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.05 g/l,  $\text{CaCO}_3$  6 g/l, pH 6.8/l) 및 NB배지(nutrient broth, beef extract 3 g/l, peptone 5 g/l)를 사용하여 전배양하였다. 사상균, 신령균과 효모를 각각 PDB배지(potato dextrose broth, potato starch 4 g/l, dextrose 20 g/l), MB배지(molasses broth, molasses extract 10 g/l)와 YEP배지(yeast extract 10 g/l, peptone 10 g/l, NaCl 5 g/l) 또는 YM배

지(yeast extract 3 g/l, malt extract 3 g/l, peptone 5 g/l, dextrose 10 g/l)를 사용하여 전배양하였다.

배양 후, 플라스크의 균체 현탁액을 4°C에서 10분간 원심분리(1000×g)하여 균체만을 PBS(phosphate buffered saline, 1.44 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.24 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2 g/l KCl, 8 g/l NaCl, pH 7.4)로 2회 세척 후, 균체액을 플라스크에 각각 동일 부피(1 ml)로 나누어 담았다. 호로파를 분쇄기에서 분쇄하여 증류수에 현탁한 5%(w/w) 반응액에 Table 2와 같이 준비된 반응액을 일정량(200 ml)씩 혼합하여 전환반응을 시작하였다. 전환반응은 진탕배양기로 40°C에서 200 rpm으로 24시간 동안 수행하였다.

한천을 포함하는 고체배지(molasses broth, MB)로 계대배양 중인 신령균(*Agaricus blazei*) 균사체 한 백금을 MB 액체배지에 접종하고 25°C에서 48시간 동안 200 rpm으로 진탕배양하였다. 배양균사체를 원심분리하고 2회 세척한 후 PBS에 현탁한 균체 현탁액(1 ml)을 Table 3의 조건으로 준비된 반응액(100 ml)과 혼합하여 전환반응을 하였다. 전환반응 조건은 40시간동안 40°C에서 200 rpm으로 진탕배양 하였으며, 전환반응 전후의 열처리 조건은 120°C에서 4시간동안 autoclave 하였고 열처리 한 실험구는 열처리 전에 pH를 1 N HCl을 이용하여 pH 2.0으로 하였다.

**추출조건.** 반응액 15 ml를 취하여 4°C에서 300×g으로 20분간 원심분리하였다. 원심분리한 상등액 10 ml를 dichloromethane을 비롯한 여러가지 유기용매(hexane, diethyl ether,

Table 2. Potential substrates of the bioconversion for sotolon production

| Additives                                 | Concentration |
|---|---------------|
| fenugreek                                 | 5% (w/w)      |
| isoleucine                                | 5 mM          |
| $\alpha$ -ketoglutaric acid               | 5 mM          |
| ascorbate                                 | 5 mM          |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.025 mM      |
| $\alpha$ -ketobutyric acid                | 2.5 mM        |
| threonine                                 | 5 mM          |
| pyruvate                                  | 5 mM          |

**Table 3. Reaction conditions for the production of sotolon by *Agaricus blazei* at various conditions**

| No. | Treatment conditions  | Additives   | Additives concentration            | Sotolon (ppm) |
|-----|---|---|------------------------------------|---------------|
| 1   | Direct dichloromethane extraction of aqueous extract of fenugreek 5% (without reaction) | -   | -                                  | 0.0718        |
| 2   | Heating (120°C, 4 hr) after pH adjustment (pH=2)  | -   | -                                  | 0.0718        |
| 3   | Conversion by <i>A. blazei</i> without additives  | -   | -                                  | 0.3164        |
| 4   | Heating (120°C, 4hr) after conversion by <i>A. blazei</i> without additives             | -   | -                                  | 0.0990        |
| 5   | Conversion by <i>A. blazei</i> with additives   | isoleucine<br>$\alpha$ -ketoglutaric acid<br>ascorbate<br>FeSO <sub>4</sub> | 10 mM<br>5 mM<br>10 mM<br>(0.2 mM) | 5.5896        |
| 6   | Heating (120°C, 4 hr) after conversion by <i>A. blazei</i> with additives               | isoleucine<br>$\alpha$ -ketoglutaric acid<br>ascorbate<br>FeSO <sub>4</sub> | 10 mM<br>5 mM<br>10 mM<br>(0.2 mM) | 0.9018        |
| 7   | Conversion by <i>A. blazei</i> with additives   | threonine<br>acetaldehyde   | 10 mM<br>0.23 mM                   | 0.2156        |
| 8   | Heating (120°C, 4 hr) after conversion by <i>A. blazei</i> with additives               | threonine<br>acetaldehyde   | 10 mM<br>0.23 mM                   | 0.1264        |
| 9   | Conversion by <i>A. blazei</i> with additives   | $\alpha$ -ketobutyric acid<br>acetaldehyde                                  | 5 mM<br>0.23 mM                    | 0.0784        |
| 10  | Heating (120°C, 4 hr) after conversion by <i>A. blazei</i> with additives               | $\alpha$ -ketobutyric acid<br>acetaldehyde                                  | 5 mM<br>0.23 mM                    | 0.1674        |
| 11  | Conversion by <i>A. blazei</i>  | $\alpha$ -ketobutyric acid  | 5 mM                               | 0.0163        |

chloroform 등) 20 ml와 혼합하여 교반 추출한 후 농축하여 반응 수용액 상의 소톨론 함량을 분석하고 이로부터 호로파 고형분 기준의 소톨론 함량을 ppm 단위로 환산하였다.

**Gas chromatography(GC)를 이용한 소톨론의 분석.** FFAP 컬럼(30 m×0.32 mm×0.25 μm, Agilent, USA)이 장착된 GC (HP 5890, USA)를 사용하여 소톨론을 분석하였다. 오븐의 온도는 60°C에서 2분간 유지한 후 1분에 6°C씩 230°C가 될 때까지 승온시켰으며, 230°C에서 10분간 유지하였다. 질소(N<sub>2</sub>) 가스를 이동상으로 하여 유속 2 ml/min으로 분석하였다. Dimethylsulfoxide(DMSO)를 첨가하여 내부표준법(internal standard method)으로 정량하였다.

### 결과 및 고찰

**소톨론 분석조건 설정 및 추출용매 선정.** 효소 및 미생물 전환 반응을 위한 반응기질로 호로파 현탁액의 농도를 10%(w/v) 이상으로 할 경우 호로파가 다량으로 함유하고 있는 galactomannan 등의 다당류가 용출되고 swelling현상이 발생하여 물리적인 교반이 어려웠다.<sup>11)</sup> 따라서 호로파의 농도를 3-5%로 하여 추출실험 및 효소적 전환 실험을 수행하였다. 분석의 재현성을 높이고자 내부표준법으로 정량하였으며 내부표준물질로서 DMSO를 사용하였다. 분석 대상 물질인 소톨론과 DMSO를 각각 3.125 ppm과 2.5 ppm의 농도가 되도록 methanol에 용해하여 GC로 분석한 결과 두 물질이 Fig. 2와 같이 각각 11.7분과 11.3분에서 분리되었다. 호로파를 이용한 소톨론으로의 전환공정은 미생물이나 효소를 이용한 공정이므로 반응매질은 수용액상이다. 따라서 수용액상에 존재하는 소톨론을 앞서 설정

한 GC 분석조건에 의해 정량하려면 적절한 유기용매를 사용하여 수용액층으로부터 유기용매층으로 소톨론을 추출분배시켜야 한다. 실제 호로파 내의 소톨론의 함량을 정확하게 분석하기 전까지는 추출 수율을 계산하기 어려우므로 표준품을 증류수에 임의의 농도로 녹인 다음 여러 가지 유기용매를 이용하여 추출 실험을 실시하고 유기용매상의 소톨론 농도를 GC분석하여 각 유기용매 상에서 추출 효율을 비교하였다.

소톨론 표준품을 물에 100 ppm 되도록 용해한 용액 1 ml에 여러 가지 유기용매(methanol을 제외하고 나머지는 물에 혼합되지 않는 용매)를 각각 9 ml씩 첨가한 다음 vortex mixer로 강하게 혼합하여 소톨론을 추출하고 유기용매층과 수용액층이 분리될 때까지 정치시킨 다음 유기용매층을 따로 담아 황산나트륨(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)으로 탈수하여 추출액 시료를 확보하였다. 이 시료 200 μl에 내부표준법으로 DMSO(25 ppm)를 20 μl씩 첨가하여 (시료 : DMSO = 10 : 1) GC로 소톨론의 농도를 분석하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 dichloromethane > methanol > chloroform > ethyl acetate의 순으로 추출 수율이 높았다. 테스트한 용매 중 methanol은 물과 섞이는 유기용매(water miscible organic solvent)이므로 물과 층 분리가 되지 않아 수율 계산이 어려웠으며 추출용매로 부적절하였다. Fig. 3의 결과를 토대로 물에 혼합되지 않는 용매(water-immiscible solvent)이면서 추출 수율도 가장 높은 dichloromethane을 추출용매로 선정하였다. 사용한 추출용매 중에서 dichloromethane이 chloroform에 비하여 3배 이상의 추출수율을 보였다. 재현성을 확인하기 위하여 표준물질인 소톨론의 농도를 20 ppm으로 하여 dichloromethane과 chloroform, 두 용매에 대하여 2차 추출효율 비교 실험에서도 유사한 결과를 얻었다. 1차 선별한 두 유기용매를 수용액상 : 유

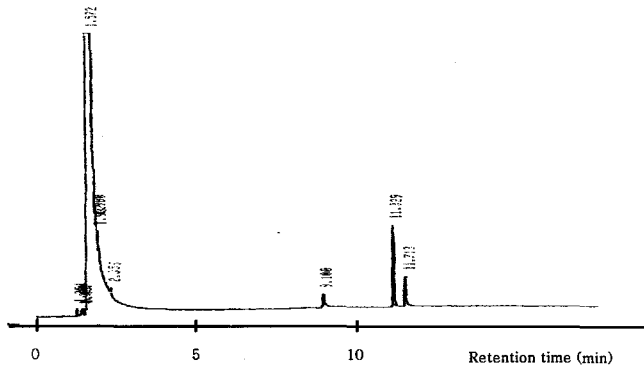


Fig. 2. Gas chromatography for the analysis of sotolon.

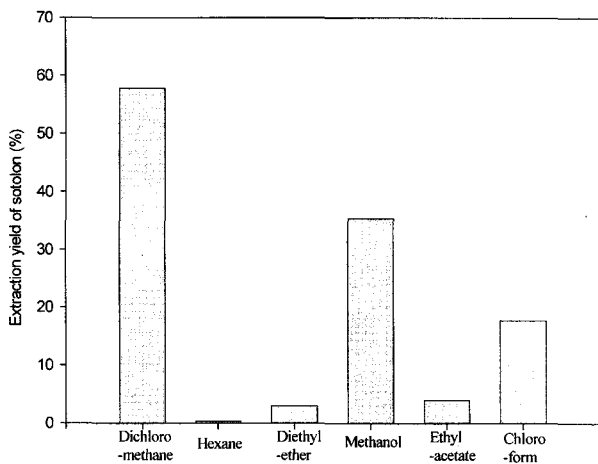


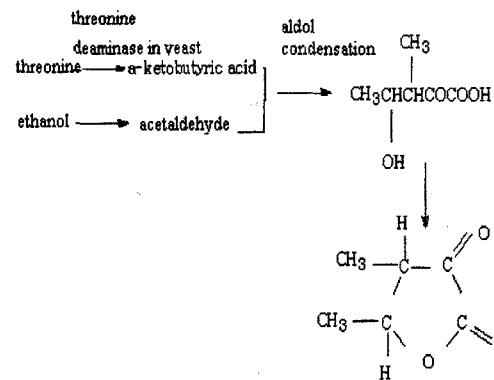
Fig. 3. Extraction of sotolon by various solvents.

기 용매 상 = 1 : 1의 부피비로 혼합하여 1차 추출한 다음 남은 수용액 층에 다시 새로운 용매를 동량 혼합하여 2차 추출한 다음 동일한 방법으로 3차 추출하여 추출용매를 모아서 추출된 소톨론의 양을 확인한 결과 앞의 실험과 마찬가지로 dichloromethane이 약 3배 정도 우수한 추출 수율을 보였다.

호로파에 존재하는 소톨론의 함량은 수 ppm 이하인 것으로 보고되고 있다. 시중에서 유통되고 있는 호로파 5종을 입수하여 소톨론의 함량을 비교, 분석하였다. 구입처별 소톨론의 함량은 0.18~0.21 ppm으로 큰 차이를 보이지 않았다.

**미생물처리에 의한 소톨론의 함량 변화.** 현재까지 알려진 소톨론 제조 기술에 의하면 4-HIL을 1차적으로 증성조건, 상온에서 L-amino oxidase를 생산하는 미생물로 처리하여 4-hydroxy-3-methyl-2-keto-pentanoic acid로 전환한 다음 이를 산성조건에서 80°C 내외로 일정시간 열처리하여 lactone의 형태로 cyclization 시켜서 제조하는 것이 보고된 바 있으며,<sup>14)</sup> HIL을 함유하고있는 호로파를 아미노 그룹(amino group)을 다량 함유하고 있는 단백질 가수분해물(protein hydrolysate)과 일정 비율이 되도록 혼합한 다음 100°C에서 수 십 시간 가열하여 가수분해 혼합물 중에 소톨론이 생성되도록 하는 것이 보고되었다.<sup>15,16)</sup> 발아된 호로파를 효소적 가수분해한 다음 이를 열처리하고 원심분리하고 농축하여 소톨론이 함유된 가수분해 추출물을 제조하여 향미소재로서의 응용가능성을 제시한 보고도 있다.<sup>17)</sup> 여러 가지 문헌 고찰을 통하여 Fig. 4와 같이 소톨론 생

[Pathway I]



[Pathway II]

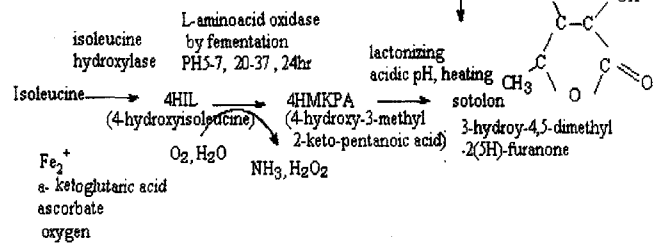


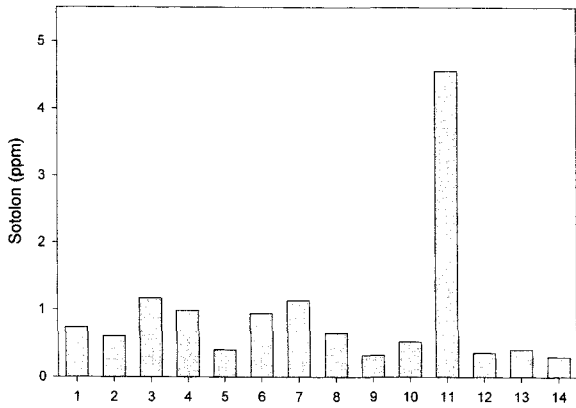
Fig. 4. Possible pathway for the conversion reaction for sotolon.

산을 위한 가능한 경로를 정리하였다. 미생물 또는 효소에 의한 생물공학적 전환공정의 가능성을 검토하기 위하여 14종의 미생물(유산균 8종, 세균 2종, 버섯균 2종, 사상균 1종, 효모 1종)을 첨가하여 호로파로부터 소톨론의 전환반응을 수행하였다. 테스트한 미생물의 목록은 Table 1과 같다.

미생물 전환공정에 전구물질로 사용될 수 있는 여러 가지 유기산, 아미노산과 무기질을 첨가하는 것이 전환율을 높이기 위한 방법으로 판단되었고 그 사용 근거는 Fig. 4와 같다. 현재까지 알려져 있는 sotolon 제조관련 공정 특허에 의하면 4-hydroxyisoleucine(4-HIL)을 전구물질로 하되, 호로파로부터 이를 추출하거나 다른 유기합성의 방법으로 확보한 다음 L-amino acid oxidase 활성을 갖고 있는 미생물을 이용하는 기술은 보고된 바 있다. 따라서 본 연구에서는 4-HIL을 출발물질로 하지 않거나 다른 경로에 의해 소톨론의 합성방법을 확인하고자 하였다. Fig. 4는 문헌적 고찰을 통하여 정리한 소톨론의 생합성 경로를 단순화한 경로로서 소톨론의 전환율을 높일 수 있을 것으로 기대되는 경로이다. 미생물 스크리닝 작업에서 <Pathway I>과 <Pathway II>의 반응기질이 될 것으로 판단되는 물질을 Table 2에서 보여주는 농도로 조제하였다. 효소원으로 사용할 14종의 미생물의 배양조건은 Table 1과 같으며 전환반응 조건은 동일하였다.

Fig. 5에서 보는 바와 같이 여러 미생물 중에서 *Agaricus blazei*(신령균)와 반응한 시료에서 가장 높은 소톨론 생성량을 보였으며 이는 호로파 고형분 기준으로 9.122 ppm이었다. 앞에서 분석한 호로파 원료의 소톨론 함량이 0.18 ppm이었으므로 생물전환 반응 전보다 50배 정도 증가한 값이다.

**호로파로부터 A. blazei에 의한 소톨론 생합성 경로 확인.** *A. blazei*가 어떠한 경로로 소톨론을 생합성 하는지를 알아보기



**Fig. 5. The first screening of microorganism for the conversion process of sotolon.** 1: Leu1, 2: Leu2, 3: Lac1, 4: Bif1, 5: Lac3, 6: Leu3, 7: Leu4, 8: Leu5, 9: Natto, 10: Len, 11: Aga, 12: Asp, 13: Sacc, 14: Bac.

위하여 첨가물의 종류와 미생물의 종류를 달리하여 전환 실험을 수행하였다. *A. blazei*의 배양조건은 MB배지에 균을 접종하여 48시간동안 25°C에서 진탕배양(200 rpm) 하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 비교실험을 위하여 열처리나 *A. blazei* 등에 의한 전환공정 없이 호로파를 5%의 농도로 증류수에 현탁한 후 원심분리하고 이를 다시 유기용매로 추출한 시료(No. 1)를 대조구로 사용하였다. <Pathway I>과 <Pathway II>의 반응기질로서 가능성 있는 물질들을 5% 호로파 현탁액에 지정된 농도가 되도록 조제하였다. 전환반응을 수행한 다음 앞서 확립한 분석 조건에 의해 소톨론의 함량을 GC로 분석하고 추출용매 기준의 소톨론 농도를 원료의 호로파 건물 기준의 농도로 환산하여 Table 3에 나타내었다.

실험결과, 다양한 반응조건 중에서 isoleucine,  $\alpha$ -ketoglutaric acid, ascorbate와 FeSO<sub>4</sub>를 첨가한 호로파 현탁액에 신령균을 접종하여 반응한 실험구(No. 5)가 가장 높은 소톨론 전환 활성을 보였다. 이것은 앞서 제안한 두 가지 경로 중에서 <Pathway II>가 신령균에 의한 호로파로부터의 소톨론 전환 공정에 실질적 경로인 것임을 암시하는 결과이다. 한편 열처리하지 않은 실험구(No. 7 와 No. 9)에 비해 열처리한 실험구(No. 8와 No. 10)에서 소톨론의 함량이 낮게 분석된 것으로 보아 낮은 pH에서 열처리 공정을 통해 소톨론의 함량의 늘어난다는 지금까지의 보고와는 상이한 결과를 보였으나 No. 9-11의 결과에 비추어 낮은 pH에서의 열처리 공정에 의한 소톨론 함량 증대의 효과는 확인되지 않은 것으로 판단되었다.

호로파로부터 *A. blazei*에 의한 소톨론 생합성 경로 확인 실험에서 호로파 원료의 건물기준 소톨론의 초기 농도에 비해 신령버섯을 이용한 전환 공정에 의해 소톨론 함량을 대략 77배 수준으로 높일 수 있는 것으로 나타났다. 이를 토대로 호로파를 물에 현탁한 후 isoleucine,  $\alpha$ -ketoglutaric acid, ascorbate와 FeSO<sub>4</sub> 등의 첨가물을 첨가한 후 신령버섯의 균사체 배양액을 혼합하여 반응시키는 공정을 제안하고자 한다. 이상의 결과를 토대로 추가적인 최적화 연구(각 첨가물의 처리농도 및 온도, pH 등의 공정 조건에 대한 최적화)를 통해 소톨론이 함유된 천연 조미소재 생산공정을 확립할 수 있을 것으로 기대된다.

## 감사의 글

본 연구는 중소기업청에서 시행한 산·학·연 공동기술개발 컨소시엄사업(2001년)의 지원과 (주)삼조셀텍의 참여하에 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Kim, W. J. (1986) manufacture and possibilities of nature taste enhancer. *Korean J. Food Sci. Technol.* **19**, 46-51.
- Dubois, P., Rigaud, J. and Dekimpe, J. (1976) Identification of 4,5-dimethyltetrahydro-furanedione-2,3 in vin jaune. *Lebensm. Wiss. Technol.* **9**, 366-368.
- Munch, P., Hofmann, T. and Schieberle, P. (1997) Comparison of key odorants generated by thermal treatment of commercial and self-prepared yeast extract: Influence of the amino acid composition on odorant formation. *J. Agric. Food. Chem.* **45**, 1338-1344.
- Haefele, C., Bonfils C. and Sauvaire, Y. (1997) Characterization of a dioxygenase from *Trigonella foenumgraecum* involved in 4-hydroxyisoleucine biosynthesis. *Phytochemistry* **44**, 563-566.
- Girardon, P., Sauvaire, Y., Baccou, J. C. and Bessiere, J. M. (1986) Identification of 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone in the aroma of fenugreek seeds. *Lebensm. Wiss. Technol.* **19**, 44-46.
- Kobayashi, A. (1989) In *Flavor Chemistry: Sotolon: identification, formation and effect on flavor*. Teranishi, R., (ed.), ACS, Washington D. C., pp. 49-59.
- Fowden, L., Pratt, H. M. and Smith, A. (1973) 4-Hydroxyisoleucine from seed of *Trigonella foenumgraecum*. *Phytochemistry* **12**, 1701-1707.
- Pham, T. T., Guichard, E., Schlich, P. and Charpentier, C. (1995) Optimal conditions for the formation of sotolon from  $\alpha$ -ketobutyric acid in the French "vin jaune". *J. Agric. Food. Chem.* **43**, 2616-2619.
- Masuda, M., Okawa, E. and Nishimura, K. (1984) Identification of 4,5-dimethyl-3-hydroxy-2 (5H) furanone (sotolon) and 9-hydroxynonanone in botrytised wine and evaluation of the roles of compounds characteristic of it. *Agric. Biol. Chem.* **48**, 2707-2710.
- Sauvaire, Y., Girardon, J., Baccou, C. and Risterucci, A. M. (1984) Changes in growth, proteins and free amino acids of developing seed and pod of fenugreek. *Phytochemistry* **23**, 479-486.
- Molham, A. H. and Amalam, R. (1998) Antidiabetic and hypocholesterolaemic effects of fenugreek. *Phytother. Res.* **12**, 233-242.
- Broca, C., Manteghetti, M., Gross, R., Baissac, Y., Jacob, M., Petit, P., Sauvaire, Y. and Ribes, G. (2000) 4-hydroxyisoleucine: effects of synthetic and natural analogues on insulin secretion. *Eur. J. Pharmacol.* **390**, 339-345.
- Chatterjee, B. P., Saker, N. and Rao, A. S. (1982) Serological and chemical investigations of the anomeric configuration of sugar units in the D-galactomannan of fenugreek (*Trigonella foenumgraecum*) seeds. *Carbohydr. Res.* **104**, 348-353.
- Lerch, K. (1994) Compounds and process for making a

- flavorant, U.S. Patent 5,449,823.
15. Batenburg, A. M., Wesdorp, J. J. (1999) Process for the preparation of sotolon, U.S. Patent 6,087,138.
16. Blank, I., Jaeger, D. and Zurbriggen, B. D. (1998) Flavorant prepared from *trigonella foenum-graecum* seed, U.S. Patent 6,013,289.

---

**Biotransformation Process for the Production of Sotolon as a Natural Flavour Enhancer**

In-Hwan Jang, Min-Sook Kang<sup>1</sup> and Hee Jeong Chae\* (*Dept. of Food and Biotechnology and Dept. of Innovative Industrial Technology, <sup>1</sup>Dept. of Food and Nutrition, Hoseo University, Asan 336-795, Korea*)

**Abstract:** Biotransformation process using microorganisms was examined to improve the bioconversion rate for the production of sotolon from the raw material. First, the extraction condition was optimized with regard to solvent type and pretreatment conditions. Dichloromethane was selected as a suitable solvent for the extraction of sotolon and sotolon-related compounds. Second, various microorganisms such as lactic acid-producing bacteria, yeast and fungi were tested for the biotransformation. Among the tested microbes, *Agaricus blazei* showed the highest conversion rate. Additives including amino acids, salts, and organic acids were investigated to test their effects on bioconversion. When the solution was added by isoleucine,  $\alpha$ -ketoglutaric acid, ascorbate, and  $\text{FeSO}_4$  and later incubated by culture broth containing the mycelium of *Agaricus blazei*, the sotolon content increased up to about 77 times as compared to that of the raw material.

---

Key words: sotolon, natural flavour enhancer, biotransformation

\*Corresponding author