

발간등록번호

11-1543000-000994-01

농산 유지로부터 생물전환법에 의한
다양한 바이오 향료 개발에 관한 연구

(Development of various bioflavors from
agricultural-originated oils by bioconversion)

전국대학교

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “농산 유지로부터 생물전환법에 의한 다양한 바이오향료 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015 년 10 월 5 일

주관연구기관명 : 건국대학교
주관연구책임자 : 오 덕 근
연 구 원 : 김 경 록
연 구 원 : 이 선 화
연 구 원 : 안 정 웅
연 구 원 : 강 우 리
연 구 원 : 김 민 지
연 구 원 : 박 지 영
연 구 원 : 한 정 은
연 구 원 : 정 연 주
협동연구기관명 : (주)제노포커스
협동연구책임자 : 김 성 희
연 구 원 : 주 속 자
연 구 원 : 홍 승 현
연 구 원 : 장 재 경
연 구 원 : 이 동 범
연 구 원 : 박 근 수

요 약 문

I. 제 목

농산 유지로부터 생물전환법에 의한 다양한 바이오향료 개발에 관한 연구

II. 연구성과 목표 대비 실적

가. 정량적 목표 대비 실적

1. 농산유지로부터 lipase 처리에 의한 지방산 생산:

목표) 지방산 회수율 90%이상

실적) 지방산 회수율 96% (*Candida rugosa* lipase 사용)

2. 지방산으로부터 hydratase 처리에 의한 hydroxy 지방산 생산:

목표) 최종농도: 48 g/L 이상, 생산성: 10 g/L-h 이상, 수율: 96% (w/w)

실적) 최종농도: 49 g/L, 생산성: 12.3 g/L-h, 수율: 98% (w/w)

(*Stenotrophomonas maltophilia* 유래 지방산 hydratase 재조합 균주 전세포 사용 10-hydroxystearic acid 생산)

3. 지방산으로부터 lipoxygenase 처리에 의한 hydroxy 지방산 생산

목표) 최종농도: 38 g/L 이상, 생산성: 3 g/L-h 이상, 수율: 96% (w/w)이상

실적) 최종농도: 38.4 g/L, 생산성: 38.4 g/L-h, 수율: 96% (w/w)

(*Nostoc* sp. lipoxygenase 사용 9*R*-hydroperoxy-10*E*,12*Z*,15*Z*-octadecatrienoic acid 생산)

4. 효모에 의한 hydroxy 지방산으로부터 락톤 생산

목표) 최종농도: 45 g/L 이상, 생산성: 1.5 g/L-h 이상, 수율: 75% (w/w) 이상

실적) 최종농도: 45.7 g/L, 생산성: 1.52 g/L-h, 수율: 76% (w/w)

(*Waltomyces lipofer*를 사용하여 10-hydroxystearic acid로부터 γ -dodecalactone 생산)

5. Hydroxy fatty acid 및 락톤의 분리 정제

목표) 정제 수율 60% 이상

실적) Hydroxy fatty acid 정제 수율 70%, 락톤 정제 수율 63%

6. 바이오향료 6가지 이상 시제품 제조 및 상품화

실적) γ -Butyrolactone, γ -decalactone, γ -dodecalactone, γ -dodecelactone, 올리브유에서 γ -dodecalactone, 홍화유에서 γ -dodecelactone 시제품 생산

나. 정성적 실적

1. 다양한 hydroxy 지방산 생산

- (1) Hydratase에 의한 hydroxy지방산 생산: 10-hydroxystearic acid, 10-hydroxy-12(*Z*)-octadecadienoic acid, 10-hydroxy-12,15(*Z,Z*)-octadecadienoic acid, 10,12-dihydroxystearic acid, 13-hydroxy-9(*Z*)-octadecadienoic acid, 13-hydroxy-12,15(*Z,Z*)-octadecadienoic acid

- (2) Lipoxygenase에 의한 hydroxy지방산 생산: 13-hydroxy-9,11(*Z,E*)-octadecadienoic acid, 9*R*-hydroxy-10*E*,12*Z*-octadecadienoic acid, 9*R*-hydroxy-10,12,15(*E,Z,Z*)-octadecatrienoic acid

acid

(3) Diol synthase에 의한 hydroxy지방산 생산: 8*R*-hydroperoxy-9,12(*Z,Z*)-octadecadienoic acid, 5,8-dihydroxy-9,12(*Z,Z*)-octadecadienoic acid,

5,8-dihydroxy-9,12,15(*Z,Z,Z*)-octadecatrienoic acid, 5,8-dihydroxy-9(*Z*)-octadecanoic acid, 7,8-dihydroxy-9,12(*Z,Z*)-octadecadienoic acid,

7,8-dihydroxy-9,12,15(*Z,Z,Z*)-octadecatrienoic acid, 7,8-dihydroxy-9(*Z*)-octadecanoic acid

2. 유지로부터 lipase 처리에 의한 지방산 생산

CRL(*Candida rugosa* lipase) 선택, CRL(*Candida rugosa* lipase) 유전자가 삽입된 *Aspergillus niger*를 사용, Lipase에 의한 농산유지 가수분해 조건 확립, Lipase에 의한 다양한 유지 가수분해

3. Hydroxy 지방산으로부터 락톤류 생산

Hydroxy 지방산으로부터 γ -dodecalactone, γ -decalactone, γ -butyrolactone, γ -dodecelactone, δ -decalactone, japonilure 생산

4. Hydroxy 지방산 및 락톤류 분리 정제

Hydroxy 지방산은 저온 분별 정제법 또는 silicic acid open column chromatography를 사용하여 정제, Lactone은 oil bath를 사용하여 환류냉각증류법으로 정제

5. Hydroxy 지방산 및 락톤류 생산 및 정제법 기술 이전

Hydroxy 지방산 생산, 분리 정제법 기술 이전, 락톤류 생산 및 분리 정제법 기술 이전

6. 유지로부터 바이오향료의 생산 공정 개발

Candida rugosa lipase (CRL) lipase에 의한 농산유지 가수분해, 지방산에 hydratase 처리에 의한 hydroxy 지방산 생산, Hydroxy 지방산에서 효모의 β -oxidation에 의한 lactone 생산, 올리브의 lipase 가수분해 산물로부터 확보한 10-hydroxystearic acid로부터 γ -dodecalactone을 생산, 홍화유의 lipase 가수분해 산물로부터 확보한 10-hydroxy-12(*Z*)-octadecenoic acid로부터 γ -dodecelactone을 생산, 들기름 가수분해 물로부터 9*R*-hydroxy-10,12,15(*E,Z,Z*)-octadecatrienoic acid 생산, 화장품 원료로 사용 시 생물전환으로 생산된 lactone은 정제가 필요 없음.

7. 시제품생산 및 경제성 분석

γ -Butyrolactone, γ -decelactone, γ -dodecalactone, γ -dodecelactone, 올리브유에서 γ -dodecalactone, 홍화유에서 γ -dodecelactone 시제품 생산, 농산유지로부터 락톤 혼합품 생산, 경제성 분석: 원부재료비 분석 및 전주기 분석을 통한 경제성 분석

III. 연구개발 내용 및 범위

가. 농산 유지로부터 다양한 hydroxy 지방산 생산 공정 개발

1. 농산 유지로부터 lipase 처리에 의한 지방산 생산:

유지 처리용 lipase 개발, lipase 특성 조사 및 반응 최적화, 지방산 고농도 생산, 농산 유 지로부터 지방산 생산

2. 지방산으로부터 hydratase 처리에 의한 hydroxy 지방산 생산

효소 반응 최적화, Hydroxy 지방산 고농도 생산, oleic acid, linoleic acid, alpha-linolenic acid로부터 다양한 hydroxy 지방산 생산, Hydroxy fatty acid의 분리 정제

3. 지방산으로부터 lipoxygenase 처리에 의한 hydroxy 지방산 생산

9-, 10-, 13-lipoxygenase 중심으로 한 위치특이적 효소 유전자 및 효소 확보, 효소 특성 조사 및 효소 반응 최적화, Hydroxy 지방산 고농도 생산, Oleic acid, linoleic acid, alpha-linolenic acid로부터 다양한 hydroxy 지방산 생산, Hydroxy fatty acid의 분리 정제

나. 다양한 hydroxy 지방산으로부터 다양한 락톤류의 생산

효모의 beta-oxidation 활성 최적화: 온도, pH, rpm, 배지 등, 효모의 반응성 최대화 (cell permeabilization): 유기용매 및 detergent 처리 조건 최적화, 효모의 반응 조건 최적화: 기질농도, 균체농도, 반응시간 등 최적화, 락톤류 고농도 생산, 다양한 hydroxy 지방산로부터 다양한 락톤류 생산

다. 바이오 향료의 산업화 연구

1. 농산유지로부터 바이오향료 락톤류의 생산 전 공정의 최적화

Lipase와 hydratase를 사용한 농산유지로부터 hydroxy 지방산의 생산의 최적화, Lipase와 lipoxygenase를 사용한 농산유지로부터 hydroxy 지방산의 생산의 최적화, 효모와 lactonase를 사용한 hydroxy 지방산로부터 락톤류의 생산의 최적화, 농산유지로부터 바이오향료 락톤류의 생산 전 공정의 최적화, 올리브유, 홍화유, 들깨유에 의한 바이오향료 락톤류의 생산, 폐식용유에 의한 바이오향료 락톤류의 생산

2. 바이오향료 락톤류의 생산공정 scale-up

발효조를 이용한 생물전환, 락톤류 분리 정제 공정 최적화

3. 화장품 원료 적합성 분석

기호성, 독성 및 알러지 시험, 화장품에 적용

라. 시제품 제조 및 경제성 분석

바이오향료의 6가지 이상 정제 시제품 (감마-락톤류 3종 이상, 델타-락톤류 3종 이상), 농산유지(올리브유, 홍화유, 들기름)로부터 락톤 혼합품 생산, 제품 순도 조사: 98% 이상 순품 제조, 경제성 분석: 원부재료비 감마-락톤류 15 \$/kg 이하, 델타-락톤류 30 \$/kg 이하

마. 기술실시 및 상품화

1. 4 건의 기술실시:

Hydratase에 의한 감마-락톤류 생산법, Lipoxygenase에 의한 델타-락톤류 생산법, 락톤류 분리 정제법, Hydroxy fatty acid 분리 정제법

2. 상품화: 4건

유지로부터 hydratase에 의한 감마-락톤류 혼합품, 유지로부터 hydratase에 의한 감마-락톤류 정제품, 유지로부터 lipoxygenase에 의한 델타-락톤류 혼합품, 유지로부터 lipoxygenase에 의한 델타-락톤류 정제품

IV. 연구개발결과

가. Hydroxy 지방산 생산

1. Hydratase에 의한 hydroxy 지방산 생산

- (1) *Lysinibacillus fusiformis* 유래 재조합 지방산 hydratase의 반응조건을 최적화하여 40 g/L oleic acid와 같은 농도가 함유된 가수분해 올리브유로부터 각각 3시간 및 6시간에 40 g/L 10-hydroxystearic acid를 생산함.
- (2) *Stenotrophomonas maltophilia* 유래 지방산 hydratase 재조합 균주 전세포 개발 및 생산 최적화: 전세포 반응조건을 최적화하여 50 g/L oleic acid를 기질로 하여 4시간 동안 발효 시 49 g/L 10-hydroxystearic acid를 생산함.
- (3) 지방산 hydratase 함유 wild-type *Stenotrophomonas nitritireducens* 전세포 촉매 개발 및 생산 최적화: 전세포 반응조건을 최적화하여 20 g/L linoleic acid를 기질로 하여 3시간 동안 반응시 15 g/L 10-hydroxy-12Z-octadecenoic acid 생산함.
- (4) *L. fusiformis* oleate hydratase의 반응조건을 최적화하여 반응 3시간 후에 13.5 g/L 10,12-dihydroxystearic acid를 생산함.
- (5) 지방산 hydratase 함유 wild-type *S. nitritireducens* 전세포에 의한 α -linolenic acid에서 10-hydroxy-12,15(Z,Z)-octadecadienoic acid 생산: permeabilized cell을 사용하여 2시간 동안 22.5 g/L α -linolenic acid에서 16.4 g/L 10-hydroxy-12,15(Z,Z)-octadecadienoic acid를 생산함.
- (6) *Lactobacillus acidophilus* linoleate 13-hydratase의 반응조건을 최적화하여 100 g/L linoleic acid로부터 3시간 동안 79 g/L 13-hydroxy-9Z-octadecenoic acid를 생산함.
- (7) *L. acidophilus* linoleate 13-hydratase의 반응조건을 최적화하여 15 g/L α -linolenic acid로부터 6시간 동안 7.5 g/L 13-hydroxy-12,15 (Z,Z)-octadecadienoic acid를 생산함.

2. Diol synthase에 의한 hydroxy 지방산 생산

- (1) *Aspergillus nidulans* 유래 diol synthase 함유 재조합 전세포에 의한 linoleic acid에서 5,8-dihydroxy-9,12(Z,Z)-octadecadienoic acid 생산: 재조합 전세포 23 g/L를 사용하여 5.0 g/L linoleic acid에서 150분 반응하여 5.0 g/L의 5,8-dihydroxy-9,12(Z,Z)-octadecadienoic acid를 얻었음.
- (2) *A. nidulans* 유래 diol synthase 함유 재조합 전세포에 의한 α -linolenic acid에서 5,8-dihydroxy-9,12,15(Z,Z,Z)-octadecatrienoic acid 생산: 재조합 전세포 40 g/L를 사용하여 12 g/L α -linolenic acid에서 100분 반응하여 9.1 g/L의 5,8-dihydroxy-9,12,15(Z,Z,Z)-octadecatrienoic acid를 얻었음.
- (3) *A. nidulans* 유래 diol synthase 함유 재조합 전세포에 의한 oleic acid에서 5,8-dihydroxy-9(Z)-octadecanoic acid 생산: 재조합 전세포 35 g/L를 사용하여 12 g/L oleic acid에서 60분 반응하여 5.2 g/L의 5,8-dihydroxy-9(Z)-octadecanoic acid를 얻었음.
- (4) *A. nidulans* 유래 diol synthase의 peroxygenase 부분만을 활용한 선택적 8R-hydroperoxy-9,12(Z,Z)-octadecadienoic acid 생산: Diol synthase의 variant 함유 재조합 전세포 20 g/L를 사용하여 이용 6 g/L linoleic acid로부터 1시간 반응하여 1.8 g/L 8R-hydroperoxy-9,12(Z,Z)-octadecadienoic acid를 생산함.
- (5) *Glomerella cingulate* 유래 diol synthase 함유 재조합 전세포에 의한 linoleic acid에서 7,8-dihydroxy-9,12(Z,Z)-octadecadienoic acid 생산: 재조합 전세포 46 g/L를 사용하여 14

g/L linoleic acid에서 120분 반응하여 6.4 g/L의 7,8-dihydroxy-9,12(*Z,Z*)-octadecadienoic acid를 얻었음.

- (6) *G. cingulate* 유래 diol synthase 함유 재조합 전세포에 의한 α -linolenic acid에서 7,8-dihydroxy-9,12,15(*Z,Z,Z*)-octadecatrienoic acid 생산: 재조합 전세포 46 g/L를 사용하여 14 g/L α -linolenic acid에서 180분 반응하여 6.3 g/L의 7,8-dihydroxy-9,12,15(*Z,Z,Z*)-octadecatrienoic acid를 얻었음.
- (7) *G. cingulate* 유래 diol synthase 함유 재조합 전세포에 의한 oleic acid에서 7,8-dihydroxy-9(*Z*)-octadecanoic acid 생산: 재조합 전세포 46 g/L를 사용하여 14 g/L oleic acid에서 150분 반응하여 6.4 g/L의 7,8-dihydroxy-9(*Z*)-octadecanoic acid를 얻었음.

3. Lipoxygenase에 의한 hydroxy 지방산 생산

- (1) *Nostoc* sp. stereo-selective lipoxygenase 의한 linoleic acid에서 9*R*-hydroxy-10*E*,12*Z*-octadecadienoic acid 생산: 재조합 lipoxygenase 함유 전세포반응으로 40 g/L linoleic acid로부터 1시간 반응하여 37.6 g/L 9*R*-hydroxy-10*E*,12*Z*-octadecadienoic acid 확보.
- (2) *Nostoc* sp. 로부터 stereo-selective lipoxygenase 의한 α -linolenic acid에서 9*R*-hydroperoxy-10*E*,12*Z*,15*Z*-octadecatrienoic acid 생산: 재조합 lipoxygenase 함유 전세포반응으로 40 g/L α -linolenic acid로부터 1시간 반응하여 38.4 g/L 9*R*-hydroxy-10,12,15(*E,Z,Z*)-octadecatrienoic acid 확보.
- (3) *Burkholderia thailandensis* lipoxygenase에 의한 linoleic acid에서 13-hydroxy-9,11(*Z,E*)-octadecadienoic acid 생산: 효소 2.5 g/L를 사용하여 20 g/L linoleic acid에서 1.5시간 반응하여 21 g/L의 13-hydroxy-9,11(*Z,E*)-octadecadienoic acid를 얻었음.

나. 락톤 생산

1. 막 투과성을 증가시킨 효모 *Waltomyces lipofer*를 이용하여 10-hydroxystearic acid로부터 γ -dodecalactone의 생산: 효모의 반응조건을 최적화하고 막투과성을 증가시켜 30 g/L 균체를 사용하여 60 g/L 10-hydroxystearic acid로부터 30시간 후에 45.7 g/L γ -dodecalactone를 생산하여 세계 최고의 농도와 생산성 기록함.
2. 지방산을 이용한 효모 *W. lipofer*의 베타-산화 유도에 의한 hydroxy 지방산으로부터 γ -락톤류의 생산: oleic acid로 베타-산화 유도시켜 10-hydroxystearic acid로부터 γ -dodecalactone의 전환율은 22%, 생산성은 1.3배 향상시킴. 30시간동안 60 g/L의 12-hydroxystearic acid를 기질로 사용하였을 때, 28 g/L의 γ -decalactone을 생산하였고 30시간동안 60 g/L의 10-hydroxydecanoic acid를 기질로 사용하였을 때에는 12 g/L의 γ -butyrolactone을 생산하였음. γ -decalactone의 경우 현재까지 보고된 것보다 2.2배 높은 생산량을 보였으며, 전환율은 13%, 생산성은 5.2배 높은 것으로 나타났고, γ -butyrolactone의 경우에는 생물전환법에 의한 첫 보고임.
3. 10-Hydroxy-12(*Z*)-octadecenoic acid로부터 γ -dodecalactone 생산: 효모 *Candida boidinii*의 베타-산화 유도에 의해 5 g/L 10-hydroxy-12(*Z*)-octadecenoic acid로부터 6시간 반응하여 2.2 g/L의 γ -dodecalactone을 생산 (몰수율 64%)하였고 생산성은 350 mg L⁻¹ h⁻¹로 나타남.
4. 효모 *Yarrowilia lipolytica*를 이용하여 13-hydroxy-9-octadecenoic acid로부터 δ

-decalactone의 생산: 효모의 반응조건을 최적화하여 세계 최초로 7.5 g/L 13-hydroxy-9-octadecenoic acid로부터 24시간 반응하여 1 g/L δ -decalactone을 생산

5. 효모 *Candida palmiolephila*를 이용하여 8-hydroxy-9-octadecenoic acid로부터 Japanese beetle의 pheromone으로 잘 알려진 락톤 japonilure 전환을 확인함.

다. 농산유지로부터 락톤 생산공정 확립

1. *Candida rugosa* lipase (CRL) lipase에 의한 농산유지 가수분해

5L scale에서 1차년에 선발된 CRL lipase 효소와 가수분해 조건으로 올리브유 가수분하여 oleic acid 함량이 80% 이상 되는 crude oleic acid를 얻을 수 있음.

2. Oleic acid로부터 oleate hydratase 처리에 의한 10-hydroxy stearic acid 생산

시중에서 구매한 oleic acid와 위에서 농산 유지인 올리브유를 가수분해하여 얻은 crude oleic acid를 기질로 사용하여 10-hydroxy stearic acid 전환 실험을 수행하고, 얻어진 물질은 NMR로 10-hydroxy stearic acid임을 확인하고, GC 분석 결과 전환율 모두 78% 정도이고 기질의 순도에 따른 전환율에는 차이는 크게 없는 것을 확인함.

3. β -Oxidation (*Waltomyces lipofer* KCTC 17657) 의한 γ -dodecalactone 생산

위에서 얻은 10-hydroxy stearic acid는 β -Oxidation에 의한 γ -dodecalactone 생산에 이용되었고 GC 분석 결과, 시중에서 구매한 oleic acid로부터 얻어진 10-hydroxy stearic acid로부터 γ -dodecalactone 전환율은 78%이고 올리브유를 가수분해하여 얻은 crude oleic acid로부터 얻어진 10-hydroxy stearic acid로부터 γ -dodecalactone 71% 정도 전환됨을 확인함.

4. 올리브유의 lipase 가수분해 산물로부터 확보한 hydroxy 지방산으로부터 γ -dodecalactone을 생산: Olive유를 *Candida rugosa* lipase (CRL)를 이용하여 가수분해한 후 *S. maltophilia* oleate hydratase를 반응 시켜 oleic acid를 10-hydroxystearic acid로 전환 시키고 *W. lipofer* whole cells을 첨가하여 γ -dodecalactone을 생산. 40 g/L의 olive유로부터 25 g/L의 γ -dodecalactone을 생산함.

5. 홍화유의 lipase 가수분해 산물로부터 확보한 hydroxy 지방산으로부터 lactone 생산

홍화유를 *Candida rugosa* lipase (CRL)를 이용하여 가수분해한 후 *S. nitritireducens*를 반응 시켜 linoleic acid를 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid 등의 hydroxy 지방산으로부터 γ -lactone류를 생산함. 7.5 g/L의 홍화씨유로부터 1.88 g/L의 γ -dodecalactone을 생산하였고, 생산성은 $235 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 로 나타남.

6. 들기름의 lipase 가수분해 산물로부터 hydroxy 지방산 생산

들기름을 *C. rugosa* lipase (CRL)를 이용하여 가수분해한 후 *Nostoc* sp. lipoxigenase를 반응 시켜 50 g/L의 들기름(40 g/L α -linolenic acid 함유)에서 34 g/L 9R-hydroperoxy-10E,12Z,15Z-octadecatrienoic acid 생산함.

7. 화장품 원료로 사용 시 생물전환으로 생산된 lactone은 정제가 필요 없음

정제된 생물 전환된 lactone은 화학 합성된 lactone과 차별성이 없으나 천연오일에서 생산된 정제되지 않은 생물 전환된 lactone은 화학 합성된 lactone과 차별성이 있음.

라. 바이오 향료의 산업화 연구

1. Hydroxy 지방산 및 락톤류 분리 정제

- (1) Hydroxy 지방산의 분리 정제: hydroxy fatty acids는 유기용매 저온 분별 정제법 또는 silicic acid open column chromatography를 사용하여 정제하였음. Methanol 정제법으로 83.9 g의 10-hydroxystearic acid를 70% 수율로 98% 이상의 순도로 얻음.
- (2) γ -Lactones 정제 및 물질 동정: γ -lactones은 oil bath를 사용하여 환류냉각증류법을 통해 각 해당 락톤을 63% 수율로 99% 순도 이상으로 정제하고 GC/MS로 동정함.

2. 바이오 향료 시제품 생산

- (1) γ -Dodecalactone(51% 전환율), γ -decalactone(30% 이상 전환율), γ -dodecalactone(20% 이상 전환율), γ -butyrolactone(25% 이상 전환율), δ -decalactone(20% 이상 전환율) 시제품 생산
- (2) 10 L 발효조: 10-Hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid로부터 γ -dodecalactone 생산: 30% 이상 전환율
- (3) 올리브유로부터 γ -dodecalactone 혼합품 생산: 50% 이상 전환율
- (4) 홍화유로부터 γ -dodecalactone 혼합품 생산

3. 경제성 분석

- (1) *Waltomyces lipofer*에 의한 γ -dodecalactone 생산 원부재료비는 kg 당 20,469원으로 계산됨.
- (2) *Y. lipolytica*에 의한 γ -lactone kg 당 생산 원부재료비: γ -decalactone는 82,260원 γ -decalactone는 84,260원 γ -dodecalactone는 174,075원 γ -dodecalactone는 374,075원으로 계산됨.
- (3) *Y. lipolytica*에 의한 γ -lactone kg당 생산단가: γ -decalactone는 611,545원 γ -dodecalactone는 703,360원으로 추정됨.
- (4) 화학합성한 판매가는 감마-락톤류가 30-40 \$/kg이지만 천연유래 (동·식물로부터 직접 추출) 제품의 경우 가격이 950 \$/kg 정도이므로 경쟁력이 있음.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

가. 실용화산업화 계획

1. 참여 기업이 세부 과제로 역할 분담하고 3년 동안 scale-up 연구를 공동으로 수행하여 자연스럽게 기술이전을 함. 본 기술은 생물 전환법을 사용하는 청정 기술로 화학 합성법에 비하여 경쟁력이 있으므로 벤처기업이나 중소기업이 산업화하기 적당함.
2. γ -decalactone은 현재 산업화가 완료단계로 부가가치가 적은 반면 dodecalactone은 시장이 형성된 시간이 짧아 시장진입이 유리할 것으로 예상되며 그 외 본 과제에서 제안한 락톤류들은 가격이 비싼 델타-락톤류의 새로운 락톤으로 본 과제 수행 후 새로운 제품으로 원천 산업화로 높은 부가가치 창출이 예상됨. 특히 본 연구진이 보유한 효소전환 및 최적화 기술이 이미 세계 최고 수준이므로 dodecalactone의 경우 단기간 내에 산업화가 가능함.
3. 개발된 바이오향료는 화장품 적용을 위하여 국내 대기업과 같이 제품 적용 연구를 수행

할 예정이고, 결과를 바탕으로 국내용 제품화를 통한 국내 시장 진입(2016년 예상)이 용이할 것임.

4. 국내 시장 진입 완료 시점에 여러 유지로부터 직접 제조한 혼합품인 경우 화장품 원료로 아모레 퍼시픽 또는 LG생활건강과 같은 대기업과 같이 제품 연구를 수행한 후 대기업과 같이 세계 시장 진입(2017년 예상)을 계획하고 있음.
5. 국내 시장 진입 완료 시점에 같이 정제품의 조합 연구를 천연향료 사용 및 수입 업체인 보락이나 서울향료와 같이 세계 시장 진입(2017년 예상)을 계획하고 있음.

나. 활용계획

1. 천연 향료 및 향장 원료 물질의 상품화: 본 연구를 통하여 개발된 생물 전환 기술을 제약품, 산업용 유기 용매, 합성 고분자등 유사한 화학 합성물질의 상품화와 경쟁력 강화를 위하여 직접 활용함. 과제 수행 결과를 특허 출원할 뿐만 아니라 참여 기업에게 기술 이전을 하여 산업화에 활용함.
2. 다양한 제품에 활용: 미생물 및 미생물의 효소를 이용한 생물전환 공정으로 친환경적으로 생산된 천연 바이오향료는 품질의 식품, 화장품, 및 생활용품으로 다양한 범위에 적용될 것으로 예상하고 있음.

다. 연구성과

1. 논문: 주저자로 Biotechnology Advances (IF=9.599) 및 Advanced Synthesis and Catalysis (IF=5.663, 분야별 상위 2.8%, VIP paper, cover picture)을 포함하는 SCI 논문 총 15편 발표
2. 특허: 대한민국 특허 3 편 등록 및 5 편 출원 총 8건
3. 기술이전: (주) 제노포커스에 계약금 천만원에 총매출액에 1%로 기술이전

SUMMARY

I. Title

Development of various bioflavors from agricultural-originated oils by bioconversion

II. Comparison of Objectives and Results

1) Quantitative comparison of objectives and results

1. Production of fatty acid from agricultural oil by lipase treatment

Objective) Recovery of fatty acid: Above 90%

Result) Recovery of fatty acid: 96% (Use of *Candida rugosa* lipase)

2. Production of hydroxy fatty acid from fatty acid by fatty acid hydratase

Objective) Concentration: Above 48 g/L, Productivity: Above 10 g/L-h, Yield: 96% (w/w)

Result) Concentration: 49 g/L, Productivity: 12.3 g/L-h, Yield: 98% (w/w)

(Production of 10-hydroxystearic acid by whole cells of *Stenotrophomonas maltophilia* expressing fatty acid hydratase)

3. Production of hydroxy fatty acid from fatty acid by lipoxygenase

Objective) Concentration: Above 38 g/L, Productivity: Above 3 g/L-h, Yield: 96% (w/w)

Result) Concentration: 38.4 g/L, Productivity: 38.4 g/L-h, Yield: 96% (w/w)

(Production of 9*R*-hydroperoxy-10*E*,12*Z*,15*Z*-octadecatrienoic acid by *Nostoc* sp. lipoxygenase)

4. Production of lactone from hydroxy fatty acid by yeast

Objective) Concentration: Above 45 g/L, Productivity: Above 1.5 g/L-h, Yield: 75% (w/w)

Result) Concentration: 47.5 g/L, Productivity: 1.52 g/L-h, Yield: 76% (w/w)

(Production of γ -dodecalactone from 10-hydroxystearic acid by *Waltomyces lipofer*)

5. Recovery of hydroxy fatty acid and lactone

Objective) Recovery yield: Above 60%

Result) Recovery yield of hydroxy fatty acid: 70%, Recovery yield of lactone: 63%

6. Preparation of lactone samples

γ -Decalactone, γ -decelactone, γ -dodecalactone, γ -dodecelactone, γ -dodecalactone from olive oil, 홍화유에서 γ -dodecelactone from safflower oil

2) Qualitative results

1. Production of various hydroxy fatty acids

(1) Production of hydroxy fatty acid by hydratase: 10-hydroxystearic acid, 10-hydroxy-12(*Z*)-octadecadienoic acid, 10-hydroxy-12,15(*Z,Z*)-octadecadienoic acid, 10,12-dihydroxystearic acid, 13-hydroxy-9(*Z*)-octadecadienoic acid, 13-hydroxy-12,15(*Z,Z*)-octadecadienoic acid

(2) Production of hydroxy fatty acid by lipoxygenase: 13-hydroxy-9,11(*Z,E*)-octadecadienoic acid, 9*R*-hydroxy-10*E*,12*Z*-octadecadienoic acid, 9*R*-hydroxy-10,12,15(*E,Z,Z*)-octadecatrienoic acid

(3) Production of hydroxy fatty acid by diol synthase:

8*R*-hydroperoxy-9,12(*Z,Z*)-octadecadienoic acid, 5,8-dihydroxy-9,12(*Z,Z*)-octadecadienoic acid, 5,8-dihydroxy-9,12,15(*Z,Z,Z*)-octadecatrienoic acid, 5,8-dihydroxy-9(*Z*)-octadecanoic acid, 7,8-dihydroxy-9,12(*Z,Z*)-octadecadienoic acid, 7,8-dihydroxy-9,12,15(*Z,Z,Z*)-octadecatrienoic acid, 7,8-dihydroxy-9(*Z*)-octadecanoic acid

2. Production of fatty acid from oil by lipase

Selection of CRL(*Candida rugosa* lipase), Use of *Aspergillus niger* expressing CRL(*Candida rugosa* lipase), Establishment of hydrolysis conditions, hydrolysis of agricultural oils by lipase

3. Production of lactone from hydroxy fatty acid by yeast

Production of γ -dodecalactone, γ -decalactone, γ -butyrolactone, γ -dodecelactone, δ -decalactone, japonilure

4. Recovery of hydroxy fatty acid and lactone

Recovery of hydroxy fatty acid by low temperature fractional method or silicic acid open column chromatography, Recovery of lactone using oil bath by circulating and cooling evaporation method.

5. Transfer of recovery method of hydroxy fatty acid and lactone

6. Development for production process of lactone from agricultural oil

Establishment of hydrolysis conditions by *Aspergillus niger* expressing CRL, Production of hydroxy fatty acid by hydratase, Production of lactone from hydroxy fatty acid by yeast,

7. Production of test product and analysis of economic feasibility

Production of test product and analysis of economic feasibility for γ -decalactone, γ -decelactone, γ -dodecalactone, and γ -dodecelactone.

III. Contents and Scopes

1. Production of various hydroxy fatty acids from oils

(1) Production of fatty acid from agricultural oil by lipase treatment

Selection of lipase for oil hydrolysis, determination of properties and optimization of reaction conditions of lipase, Production of fatty acid from agricultural oil at high concentration.

(2) Production of hydroxy fatty acid from fatty acid by hydratase

Optimization of enzymatic reaction conditions, Production of hydroxy fatty acid at high concentration, Production of various hydroxy fatty acids from oleic acid, linoleic acid, alpha-linolenic acid, Recovery of hydroxy fatty acid.

(3) Production of hydroxy fatty acid from fatty acid by lipoxygenase

Achievement of 9-, 10-, 13-lipoxygenase, Investigation of enzyme properties, Optimization of enzymatic reaction conditions, Production of hydroxy fatty acid at high concentration, Production of various hydroxy fatty acids from oleic acid, linoleic acid, alpha-linolenic acid, Recovery of hydroxy fatty acid.

2. Production of lactone from hydroxy fatty acid by yeast

Maximization of β -oxidation activity (Temperature, pH, rpm, medium etc), Maximization

of activity by cell permeabilization of yeast, Optimization of reaction conditions (solvent, detergent, substrate concentration, cell concentration, reaction time), Production of lactone at high concentration, Production of lactones from hydroxy fatty acids

3. Industrialization study of bioflavor

- (1) Optimization for production process of lactone from oil
- (2) Scale-up for production process of lactone
- (3) Suitability analysis for cosmetic ingredient

4. Production of test product and analysis of economic feasibility

Test products of 6 types of lactones (γ -lactones 3 types, δ -lactones 3 types), Production of lactone mixtures from agricultural oils (olive oil, safflower oil, perilla oil), Investigation of product purity

5. Implementation and Industrialization

- (1) Implementation: 6 cases

Production of γ -lactones by hydratase from fatty acid and oil, Production of γ -lactone by lipoxygenase from fatty acid and oil, Production of δ -lactone by hydratase, Recovery of hydroxy fatty acid and lactone

- (2) Industrialization: 6 cases

Production of γ -lactones by hydratase from fatty acid and oil, Production of γ -lactone by lipoxygenase from fatty acid and oil, Production of δ -lactone by hydratase, Recovery of hydroxy fatty acid and lactone

IV. Results

1) Production of hydroxy fatty acid

1. Production of hydroxy fatty acid by hydratase

- (1) *Lysinibacillus fusiformis* hydratase produced 40 g/L 10-hydroxystearic acid from 40 g/L oleic acid after 3 h.
- (2) Recombinant cells expressing *Stenotrophomonas maltophilia* hydratase produced 49 g/L 10-hydroxystearic acid from 50 g/L oleic acid after 4 h.
- (3) *Stenotrophomonas nitritireducens* containing hydratase produced 15 g/L 10-hydroxy-12*Z*-octadecenoic acid 10-hydroxystearic acid from 20 g/L linoleic acid after 3 h.
- (4) *L. fusiformis* oleate hydratase produced 13.5 g/L 10,12-dihydroxystearic acid from 15 g/L ricioleic acid after 3 h,
- (5) *Stenotrophomonas nitritireducens* containing hydratase produced 16.4 g/L 10-hydroxy-12,15(*Z,Z*)- octadecadienoic acid from 22.5 g/L α -linolenic acid after 2 h.
- (6) *Lactobacillus acidophilus* linoleate 13-hydratase produced 79 g/L 13-hydroxy-9*Z*-octadecenoic acid from 100 g/L linoleic acid after 3 h.
- (7) *L. acidophilus* linoleate 13-hydratase produced 7.5 g/L 13-hydroxy-12,15 (*Z,Z*)-octadecadienoic acid from 15 g/L α -linolenic acid after 6 h.

2. Production of hydroxy fatty acid by diol synthase

- (1) Recombinant cells expressing *Aspergillus nidulans* diol synthase produced 5.0 g/L 5,8-dihydroxy-9,12(*Z,Z*)-octadecadienoic acid from 5.0 g/L linoleic acid after 150 min.
- (2) Recombinant cells expressing *A. nidulans* diol synthase produced 9.1 g/L 5,8-dihydroxy-9,12,15(*Z,Z,Z*)-octadecatrienoic acid from 12 g/L α -linolenic acid after 100 min.
- (3) Recombinant cells expressing *A. nidulans* diol synthase produced 5.2 g/L 5,8-dihydroxy-9(*Z*)-octadecanoic acid from 12 g/L oleic acid after 60 min.
- (4) Recombinant cells expressing *A. nidulans* diol synthase variant produced 1.8 g/L 8*R*-hydroperoxy-9,12(*Z,Z*)-octadecadienoic acid from 6 g/L linoleic acid after 60 min.
- (5) Recombinant cells expressing *Glomerella cingulate* diol synthase produced 6.4 g/L 7,8-dihydroxy-9,12(*Z,Z*)-octadecadienoic acid from 14 g/L linoleic acid after 120 min.
- (6) Recombinant cells expressing *G. cingulate* diol synthase produced 6.3 g/L 7,8-dihydroxy-9,12,15(*Z,Z,Z*)-octadecatrienoic acid from 14 g/L α -linolenic acid after 180 min.
- (7) Recombinant cells expressing *G. cingulate* diol synthase produced 6.4 g/L 7,8-dihydroxy-9(*Z*)-octadecanoic acid from 14 g/L oleic acid after 150 min.

3. Production of hydroxy fatty acid by lipoxygenase

- (1) Recombinant cells expressing *Nostoc* sp. lipoxygenase produced 37.6 g/L 9*R*-hydroxy-10*E*,12*Z*-octadecadienoic acid from 40 g/L linoleic acid after 60 min.
- (2) Recombinant cells expressing *Nostoc* sp. lipoxygenase produced 38.4 g/L 9*R*-hydroperoxy-10*E*,12*Z*,15*Z*-octadecatrienoic acid from 40 g/L α -linolenic acid after 60 min.
- (3) *Burkholderia thailandensis* lipoxygenase produced 21 g/L 13-hydroxy-9,11(*Z,E*)-octadecadienoic acid after 90 min.

2) Production of lactone

1. *Waltomyces lipofer* produced 45.7 g/L γ -dodecalactone from 60 g/L 10-hydroxystearic acid after 30 h.
2. β -Oxidation induction of *W. lipofer* by oleic acid: 22% increase in the yield of γ -dodecalactone from 10-hydroxystearic acid and 1.3-fold in the productivity. *W. lipofer* produced 28 g/L γ -decalactone from 60 g/L 12-hydroxystearic acid after 30 h. *W. lipofer* produced 12 g/L γ -butyrolactone from 60 g/L 10-hydroxydecanoic acid after 30 h.
3. *Candida boidinii* produced 2.2 g/L γ -dodecelactone from 5 g/L 10-hydroxy-12(*Z*)-octadecenoic acid after 6 h.
4. *Yarrowilia lipolytica* produced 1 g/L δ -decalactone from 7.5 g/L 13-hydroxy-9-octadecenoic acid after 24 h.
5. *Candida palmiolephila* produced japonilure as Japanese beetle pheromone from 8-hydroxy-9-octadecenoic acid.

3) Development for production process of lactone from agricultural oil

1. **Production of 25 g/L γ -dodecalactone from 40 g/L olive oil hydrolyzate with lipase treatment:** Hydrolysis of olive oil by *Aspergillus niger* expressing CRL, Production of 10-hydroxy stearic acid from oleic acid by *S. maltophilia* oleate hydratase, Production of γ -dodecalactone by β -oxidation of *W. lipofer* whole cells.
2. **Production of 1.88 g/L γ -dodecelactone from 7.5 g/L safflower oil hydrolyzate with lipase treatment:** Hydrolysis of safflower oil by CRL, Production of 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid from linoleic acid by *S. nitritireducens* containing hydratase, Production of γ -dodecelactone by β -oxidation of *C. boidinii* whole cells.
3. **Production of 34 g/L 9R-hydroperoxy-10E,12Z,15Z-octadecatrienoic acid from 50 g/L perilla oil hydrolyzate containing 40 g/L α -linolenic acid with lipase treatment:** Hydrolysis of perilla oil by CRL, Production of 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid from linoleic acid by *Nostoc* sp. lipoxygenase.
4. **Recovery of biotransformed lactones were not needed for the use of cosmetic ingredient because biotransformed lactones were considered as natural lactone distinguished from chemically synthesized lactones.**

4) Industrialization study of lactone

1. Recovery of hydroxy fatty acid and lactone

- (1) Recovery of hydroxy fatty acid: Recovery of hydroxy fatty acid by low temperature fractional method or silicic acid open column chromatography. 10-Hydroxystearic acid was recovered with 98% purity and 70% yield by methanol method.
- (2) Recovery of lactone: γ -Lactones was recovered with 99% purity and 63% yield using oil bath by circulating and cooling evaporation method.

2. Manufacture of test lactone samples

- (1) Manufacture of γ -dodecalactone (51% yield), γ -decalactone (above 30% yield), γ -dodecelactone (above 20% yield), γ -butyrolactone (above 25% yield), δ -decalactone (above 20% yield)
- (2) Production of γ -dodecelactone from 10-Hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid in a 10 L fermentor: above 30% yield
- (3) Production of γ -dodecalactone mixture from olive oil: above 50% yield

3. Analysis of economic feasibility

- (1) Raw material cost of γ -dodecelactone produced by *W. lipofer*: Estimation of 20,469 ₩/kg
- (2) Raw material cost of γ -lactones produced by *Y. lipolytica*: Estimation of 82,260 ₩/kg for γ -decalactone, 84,260 ₩/kg for γ -decelactone, 174,075 ₩/kg for γ -dodecalactone, and 374,075 ₩/kg for γ -dodecelactone.
- (3) Production cost of γ -lactones produced by *Y. lipolytica*: Estimation of 611,545 ₩/kg γ -decalactone and 703,360 ₩/kg for γ -dodecalactone.

- (4) Selling price of chemically synthesized γ -lactones: 30-40 \$/kg, Selling price of natural γ -lactones: 950 \$/kg. Thus, biotransformed lactones exhibit cost competitiveness because they are near to natural γ -lactones.

V. Achievement and Its Practical Use

1. Achievement

- (1) Paper: 15 papers publication of international SCI journal including Biotechnology Advances (IF=9.599) and Advanced Synthesis and Catalysis as corresponding author (IF=5.663, SCI field rank 2.8%, VIP paper, cover picture)
- (2) Patent: 8 patents, including 3 patents registered and 5 patents applied in the Korean Intellectual Property Office.
- (3) Technology Transfer: Initial Fee 1,000,000 ₩ + 1% of Total sales

2. Practical Use

We have a plan for the industrialization of lactone production by transferring skill.

CONTENTS

Chapter 1. Overview	1
Section 1. Objective	1
Section 2. Needs and scopes	2
Section 3. Comparison of goal and results	5
Chapter 2 Current State of Affairs	9
Section 1. Current state of market	9
Section 2. Current state of patents	12
Section 3. Current state of papers	12
Chapter 3. Contents and Results	14
Section 1. Contents	14
Section 2. Production of hydroxy fatty acids from fatty acids	16
Section 3. Production of lactones from hydroxy fatty acids	53
Section 4. Production of hydroxy fatty acids and lactones from oils	68
Section 5. Industrial studies on lactones	76
Chapter 4. Achievement of Objective and Contribution in Field	92
Section 1. Achievement of objective	92
Section 2. Achievement of quantitative objective	95
Section 3. Contribution in field	99
Chapter 5. Outcome and Application Plan	100
Section 1. Outcome	100
Section 2. Application plan	102
Chapter 6. Foreign Scientific Information Achieved during Research	104
Chapter 7. Current Status of Instrument and Facilities	106.
Chapter 8. performance result of Facilities safety management	107
Chapter 9. References	108
<Attachment> Analysis Report of Market, Papers, and Patents	111

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 및 성과목표	1
제 1 절	연구개발의 목적	1
제 2 절	필요성 및 범위	2
제 3 절	연구성과 목표 대비 실적	5
제 2 장	국내외 기술개발 현황	9
제 1 절	시장 현황	9
제 2 절	특허 현황	12
제 3 절	논문 현황	12
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	14
제 1 절	연구개발수행 내용	14
제 2 절	지방산으로부터 hydroxy 지방산 생산	16
제 3 절	Hydroxy 지방산으로부터 락톤 생산	53
제 4 절	유지로부터 hydroxy 지방산 및 락톤 생산 연구	68
제 5 절	바이오 향료의 산업화 연구	76
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	92
제 1 절	연구개발 목표의 달성도	92
제 2 절	정량적 목표의 달성도	95
제 3 절	관련분야의 기술발전예의 기여도	99
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	100
제 1 절	연구개발 성과	100
제 2 절	성과활용 계획	102
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	104
제 7 장	연구시설·장비 현황	106
제 8 장	연구실 안전관리 이행실적	107
제 9 장	참고문헌	108
<첨부>	특허, 논문 및 시장분석 보고서	111

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

제 1 절 연구개발의 목적

1. 기술적 측면

○ **청정 생물전환기술법의 개발:** 생물전환법은 미생물을 비롯한 생물학적 촉매를 사용하여 유기 화학물질을 합성 생산하는 방법으로 생물 전환법 기술을 이용할 경우 1. 환경 친화적 생산 공정 개발 및 최소한의 환경오염 물질 방출, 2. 선택적인 광활성 이성질체의 생산, 3. 새로운 유기 합성 물질의 개발의 장점이 있음.

○ **화학 합성법을 대체하는 새로운 바이오향료 생산법 개발:** 현재 화학합성법으로 생산된 락톤류 및 green leaf volatiles는 경쟁력 있는 생물전환법으로 개발되어 대체되면 최초로 생물학적인 방법으로 고부가의 천연 향료 및 향장 원료물질을 경제적으로 생산하는 산업화 기술을 확보할 수 있음.

○ **국내산 농산유지의 고부가가치화 기술 확보:** 국내산 올리브유, 카놀라유, 아몬드유, 홍화유, 포도유, 옥수수유, 해바라기유 아마유 등의 식물성 기름을 선택하여 생물 전환기술을 이용하여 고부가의 다양한 락톤류 및 green leaf volatiles를 생산하면 국내산 유지 및 폐식용유의 고부가가치화 기술이 확보됨.

2. 경제적 · 산업적 측면

○ **생물 전환법에 의한 새로운 시장 창출:** 전 세계의 락톤류 및 green leaf volatile의 세계시장은 각각 12억불 및 30억불로, 이중 잠재적으로 10%의 시장규모가 미생물을 비롯한 생물전환법을 이용한 생물 공학을 이용하여 생산된 제품으로 교체될 것으로 예측되고 있음. 생물 공학을 이용한 천연 향료 및 향장 원료물질은 화학 유기 합성을 통해 생산된 물질에 비하여 소비자가 쉽게 받아들일 수 있어 높은 가격으로 판매할 수 있어 경제적인 경쟁력을 갖춘 생산 공정을 개발할 수 있는 기회를 제공함.

○ **청정 생물전환 기술 확보를 통한 국제 경쟁력 향상 및 수출:** 국내 향료 및 향장 시장은 약 2,000억 원 정도의 규모이지만, 국내 향료 및 향장물질에 대한 생산 기술의 미비로 외국 향료 회사를 위주로 조합 향료의 공급에 의한 유통 시장만이 형성되어 있음. 그러나 천연 향료 및 향장 원료 물질의 청정 생물전환 기술이 확보된다면 국제 경쟁력이 향상되어 수입대체 뿐만 아니라 수출도 가능하게 될 것임.

○ **경쟁력 있는 새로운 생산 방법개발:** 생물전환법에 의한 향료 및 향장물질 생산은 친환경적인 방법으로 화학 유기 합성을 생산 공정에서 발생하는 환경문제의 해결하며, 국내 및 세계적인 소비자의 천연 소재 대한 선호로 인하여 천연 원료물질의 요구를 충족시켜 고부가를 창출하므로 경제적인 측면에서 경쟁력을 확보될 것으로 예상됨. 또한, 생물전환법은 화학합성법보다 생산성이 높고 부산물이 적고 정제가 용이하며 우수한 품질의 천연 향료 및 향장물질을 값싸게 공급할 수 있어 가격 및 품질 경쟁력이 있음.

○ **농가의 수익성 향상:** 최근까지 국내의 농산물은 제한된 가공을 통하여 소비자에게 공급되어 부가 가치 면에서 제한되어 농가의 수익성에 한계를 가지고 있음. 이러한 면에서 생물공학을 비롯한 새로운 기술을 통해 농산물의 고부가가치의 새로운 소재로 변환시켜 생산함으로써 농가 수익의 안정성을 이룩할 계기를 만들 수 있음. 성공하면 식물유 재배 농가를 활성화 시키고 지속적인 수익을 보장할 수 있음.

제 2 절 필요성 및 범위

1. 기술적 측면

○ 천연에서 락톤류를 추출하는 것은 비경제적이고 현재 락톤류의 생산기술인 화학합성법은 환경친화적이지 못하고 소비자 선호도가 떨어져 환경친화적이고 경제적인 생물전환법으로 개발해야 함.

○ 현재 생물전환법으로 불포화 지방산으로부터 바이오향료를 생산하는 기술 수준은 수율이 낮아 산업화되지 않음. 산업화를 위해서는 생산 수율 향상 및 경제적인 새로운 공정 기술 개발이 요구되고 있음. 본 연구팀은 이미 생물전환법으로 높은 생산 수율로 바이오향료 락톤을 생산한 결과가 있어 본 과제를 수행하면 산업화 가능성이 매우 큼.

○ 불포화 지방산이 함유된 국내산 농산유지로부터 효소 및 미생물의 생물전환을 이용하여 락톤류를 생산하면 고부가의 천연 과일 향을 위한 중요한 향료 및 향장 원료물질을 생산기술을 확보할 수 있고, 현재는 자연에 존재하는 hydroxy 지방산인 ricinoleic acid에서 γ -decalactone만이 생산하여 주로 판매되고 있으나 다양한 hydroxy 지방산을 제조하여 다양한 락톤류를 개발이 필요함.

○ 미생물의 효소 및 균체를 이용하여 생물전환 공정으로 친환경적으로 생산된 천연 락톤류 제품은 식품, 화장품 및 생활용품으로 다양한 산업 분야에 적용될 것으로 예상됨.

○ 본 연구 결과에 의한 다양한 천연 향료 및 향장 원료물질의 생산은 부가 가치가 매우 높은 기술 집약적 제품으로 생명공학 기술을 향료 산업에 접목시켜 생물전환 기술을 축적함으로써 한국 향료 업계의 국가적 경쟁력을 향상할 수 있는 계기가 될 수 있음.

2. 경제·산업적 측면

가. 새로운 방법에 의한 천연 향료 및 향장 원료의 생산

○ 전 세계의 향료 산업 규모는 2010년 약 220억불이고, 락톤류의 세계시장은 12억불로 화학합성법과 천연추출법으로 생산되어 생물전환법이 개발되면 이중 많은 부분의 시장이 효소 및 미생물 균체를 이용한 생물전환 산물로 교체될 것으로 예상됨.

○ 생명공학을 이용한 천연 향료 및 향장물질은 친환경물질로 화학합성 생산 공정에서 발생하는 환경문제의 해결하며, 국내 및 세계적인 소비자의 천연 소재 선호에 따른 천연 원료물질의 사용 요구를 충족시켜줄 수 있어, 고부가 가치를 창출 할 수 있으므로 경제적인 측면에서 경쟁력을 확보될 것으로 예상됨.

나. 천연 향료 및 향장 원료물질의 청정 생산 기술 확보를 통한 국제 경쟁력 향상

○ 국내 향료 및 향장 시장 규모는 약 2,000억 원 정도를 형성되어있지만 국내 제품의 품질 및 기술력의 취약으로 인하여, 향료 및 향장 원료물질을 100%에 가깝게 수입하고 외국 업체 점유율이 80% 이상임. 그러므로 본 기술의 생물 전환 방법을 이용한 락톤류의 생산 공정의 개발 및 기술력 확보는 필수적임.

○ 자연에서 존재하는 락톤류는 향료 중 GRAS(generally recognized as safe)로 인정되고 있고 FDA는 “Nature“이라는 용어를 미생물전환 물질들에서도 허용되어 있어 고가의 천연향료를 값싸게 생산하려면 농산유지로부터 락톤류를 생산하는 생물전환법의 개발이 필요함.

○ 가수분해로 지방산 제조 시 리파제로 사용하면 친환경적 청정생산법으로 화학적인 방법보

다 부산물 생산이 적어 수산화 지방산 제조 시 수율 및 생산성이 우수함.

○ 현재의 세계 천연 향료 및 향장에 대한 시장은 석유화학물질에 의한 환경오염 및 건강에 대한 염려로 인한 천연 향료 및 향장 원료물질에 대한 요구가 많은 미국을 비롯한 유럽 국가로 장기적으로 안정된 시장성을 가지고 있음.

다. 국내 농산 유지의 고부가가치화

○ 국내 농산 식용유의 경우 활용성에 한계가 있으므로 바이오 향료로의 전환을 통하여 고부가가치화가 필요함.

○ 국내 농산 유지 및 폐식용유를 리파제를 처리한 후 hydroxylation을 시키면 저온에서 hydroxy 지방산이 용해되지 않는 특성을 이용하면 국내산 유지 및 폐식용유에서 쉽게 hydroxy 지방산을 분리할 수 있음. Oleic acid의 가격이 1-2 \$/kg, linoleic acid의 가격이 5-6 \$/kg이고, FOB가격으로 화학 합성한 델타-락톤류가 100-120 \$/kg이고 감마-락톤류가 30-40 \$/kg임 (www.cischem.com). 천연향료의 경우 가격이 1,000-2,500 \$/kg이고 일반적으로 바이오제품이 화학합성품에 비하여 3-5배 정도 가격이 높음. 품질의 경우 정제품은 큰 차이가 없으나 정제정도가 낮은 제품은 불순물의 차이에 의하여 화학합성품보다 생물전환 제품이 우수함.

○ 기존 생산법인 화학합성법으로 생산된 락톤류는 생산단가가 낮은 장점은 있으나 불순물의 정제가 어렵고 제조방법이 환경 친화적이지 않은 단점이 있음. 이에 비하여 생물전환 락톤류는 정제가 용이하고 제조방법이 환경 친화적이지만 생산 단가가 높고 단점이 있으나 본 과제에서 처음 시도하는 재조합 효소법은 경제적인 방법으로 낮은 단가로 생산 할 수 있음.

○ 식물유에서 가장 많이 존재하는 지방산인 oleic acid, linoleic acid, α -linolenic acid와 각각의 지방산이 가장 많이 함유되어 있는 국내산 올리브유(oleic acid 75% 함유), 홍화유(linoleic acid 80% 함유), 들깨유(α -linolenic acid 63% 함유)를 사용하면 고부가가치에 유리함.

라. 경제적인 다양한 락톤류의 생산

○ 향료로 많이 사용되고 있는 락톤은 주로 γ -decalactone 한 종류이지만 사용할 수 있는 락톤류는 10여 종으로 γ -undecalactone, γ -decalactone, δ -decalactone, δ -dodecalactone, γ -dodecalactone로 다양한 락톤류의 생산이 필요하고, 감마-락톤을 위해 hydratase가 델타-락톤을 위해 lipxygenase가 필요함.

○ 폐식용유를 이용하여 락톤류를 생산하면 폐기물의 활용으로 경제적인 생산법이 확립 됨.

3. 사회·문화적 측면

○ **농가의 수익성 향상:** 최근까지 한국의 농산물은 제한된 가공을 통하여 소비자에게 공급되어 부가 가치 면에서 제한되어 농가의 수익성에 한계를 가지고 있음. 이러한 면에서 생물공학을 비롯한 새로운 기술을 통해 농산물의 고부가 가치의 새로운 소재로 변환시켜 생산함으로써 농가 수익의 안정성을 이룩할 계기를 만들 수 있음.

○ **천연 향료 및 향장 원료 물질의 공급 및 수출:** 소비자의 천연 식품에 대한 요구는 세계적인 추세로, 이러한 추세에 능동적으로 대처하기 위해서는 국내 향료 및 향장 업체의 고부가의 천연 향료 및 향장 생산기술의 축적은 필수적이며, 또한 고부가의 천연 향료 및 향장 원료물질을 생산함으로써 향료 및 향장 원료물질의 전량 수입국으로부터 생산 수출국으로서의 자부심을 가지게 할 수 있음.

○ **친환경 대체 기술에 의한 국민 건강에 기여:** 친환경 생명공학을 이용한 생물전환은 환경 친화적 공정으로 환경보존의 한 몫을 하게 되며, 이 기술은 점진적으로 중금속을 이용한 유기 합성을 대체할 수 있는 친환경 대체 기술로서 이용될 수 있음. 천연 향료 및 향장 원료물질의 생산으로 석유화학 제품에서 유래될 수 있는 잠재적인 발암 물질을 포함한 독성 물질의 전이를 최소한으로 줄일 수 있어 국민 건강에도 직접적으로 공헌을 할 수 있음.

○ **선진 기술 개발에 의한 국제 기술 경쟁력 향상:** 생물전환 개념을 이용하여 연구 결과를 빠른 시간 내에 산업화하여 연구 결과의 경제적 가치를 증대할 수 있어 국제 기술 경쟁력을 높일 수 있음. 선진 기술을 한국이 주도적으로 개발하여 세계 정밀 화학 시장을 주도 할 수 있음.

제 3 절 연구성과 목표 대비 실적

1. 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명 명칭등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차 년도	목표	1						2		
	달성	2						2		
2차 년도	목표	2	1					4		
	달성	2	1					6		
3차 년도	목표	3	2					4		
	달성	1	1					7		
계	목표	6	3					10		
	달성	5	3					15		

2. 성과

계제 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2013	New biotransformation process for the production of the fragrant compound γ -dodecalactone from 10-hydroxystearate by permeabilized <i>Waltomyces lipofer</i> cells.	안정웅	오덕근	주영철	<i>Appl. Environ. Microbiol.</i>	79(6) 2636-2641	국외	SCI (IF=3.678)
2013	Increased production of γ -lactones from hydroxy fatty acids by whole <i>Waltomyces lipofer</i> cells.	안정웅	오덕근		<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i>	97(18) , 8265-8272	국외	SCI (IF=3.689)
2013	Production of 10,12-dihydroxystearic acid from ricinoleic acid by an oleate hydratase from <i>Lysinibacillus fusiformis</i> .	서민호	오덕근	김경록	<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i>	97(20) , 8987-8995	국외	SCI (IF=3.689)
2013	Production of hydroxy fatty acids by microbial fatty acid-hydroxylation enzymes.	김경록	오덕근		<i>Biotechnol. Adv.</i>	31(8) , 1473-1485	국외	SCI (IF=9.599)
2014	Stereospecific production of 9R-hydroxy-10E,12Z-octadeca dienoic acid from linoleic acid by recombinant <i>Escherichia coli</i> cells expressing 9R-lipoxygenase from <i>Nostoc</i> sp. SAG 25.82.	김경록	오덕근	서민호 박진병	<i>J. Mol. Catal. B: Enzym.</i>	104 , 56-63	국외	SCI (IF=2.823)
2014	Enzymatic production of 15-hydroxyecosatetraenoic acid from arachidonic acid by	김백중	오덕근	신경철	<i>J. Microbiol. Biotechnol.</i>	24(3) , 359-362	국내	SCI (IF=1.399)

	using soybean lipoxygenase.							
2014	γ -Dodecelactone production from safflower oil via 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid intermediate by whole cells of <i>Candida boidinii</i> and <i>Stenotrophomonas nitritireducens</i> .	조예슬	오덕근	안정용	<i>J. Agric. Food Chem.</i>	62(28): 6736-6745	국외	SCI (IF=2.906)
2014	Production of 5,8-dihydroxy-9,12(Z,Z)-octadecadienoic acid from linoleic acid by whole recombinant <i>Escherichia coli</i> cells expressing diol synthase from <i>Aspergillus nidulans</i> .	서민주	오덕근	신경철	<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i>	98(17), 7447-7456	국외	SCI (IF=3.689)
2015	Production of 5,8-dihydroxy-9(Z)-octadecenoic acid from oleic acid by whole recombinant cells expressing diol synthase from <i>Aspergillus nidulans</i> .	서민주	오덕근	신경철	<i>Biotechnol. Lett.</i>	37(1), 131-137	국외	SCI (IF=1.591)
2015	Biotransformation of linoleic acid into hydroxy fatty acids and carboxylic acids using a linoleate double bond hydratase as key enzyme	오혜진 김세음	오덕근 박진병	송지원 이정후 강우리 조예슬 김경록 Uwe T. Bornscheuer	<i>Adv. Synth. Catal.</i>	357(2-3), 408-416	국외	SCI (IF=5.663) 상위 2.8% Cover picture
2015	Production of 8-hydroxy-9,12(Z,Z)-octadecadienoic acid from linoleic acid by recombinant cells expressing H1004A-C1006S variant of <i>Aspergillus nidulans</i> diol synthase	정연주	오덕근	서민주 신경철	<i>J. Mol. Catal. B: Enzym.</i>	115, 35-42	국외	SCI (IF=2.823)
2015	Characterization of an omega-6 linoleate lipoxygenase from <i>Burkholderia thailandensis</i> and its application in the production of 13-hydroxyoctadecadienoic acid	안정용	오덕근	김백중 홍승혜	<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i>	99(13), 5487-5497	국외	SCI (IF=3.689)
2015	Production of 13S-hydroxy-9(Z)-octadecenoic acid from linoleic acid by whole recombinant cells expressing linoleate 13-hydratase from <i>Lactobacillus acidophilus</i>	박지영	오덕근	이선화 김경록 박진병	<i>J. Biotechnol.</i>	208, 1-10	국외	SCI (IF=2.871)
2015	Selective production of 9R-hydroxy-10E,12Z,15Z-octadecatrienoic acid from α -linolenic acid in perilla seed oil hydrolyzate by a lipoxygenase from <i>Nostoc</i> sp. SAG 25.82	김경록	오덕근	이선화 안정용	<i>PLoS One</i>	10(9), e0137785	국외	SCI (IF=3.234)
2015	Production of 10-hydroxy-12,15(Z,Z)-octadec	최혜연	오덕근	서민주 신경철	<i>Biotechnol. Lett.</i>	37(11), 2271-2277	국외	SCI (IF=1.591)

adienoic acid from α -linolenic acid by permeabilized <i>Stenotrophomonas nitireducens</i> cells								
---	--	--	--	--	--	--	--	--

3. 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원 연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록 연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2013	지방산 수화효소에 의한 리시놀레산으로부터 10,12-이수산화스테아르산의 제조방법 및 그 조성물	오덕근 서민호	한국	10-2012-0108758	2014	효모의 베타-산화유도에 의한 수산화 지방산으로부터 감마-데카락톤과 감마-부티로락톤의 제조방법 및 그 조성물	오덕근 안정웅	한국	10-1383342
2013	효모의 베타-산화유도에 의한 수산화 지방산으로부터 감마-데카락톤과 감마-부티로락톤의 제조방법 및 그 조성물	오덕근 안정웅	한국	10-2013-0022062	2014	지방산 수화효소에 의한 리시놀레산으로부터 10,12-이수산화스테아르산의 제조방법 및 그 조성물	오덕근 서민호	한국	10-1404043
2013	미생물에 의한 홍화유로부터 고수율의 감마-락톤류의 제조방법 및 그 조성물	오덕근 조예슬	한국	10-2013-0156111	2015	미생물에 의한 홍화유로부터 고수율의 감마-락톤류의 제조방법 및 그 조성물	오덕근 조예슬	한국	10-1556115
2014	락토바실러스 에시도필러스 유래 13-리놀레산 수화효소에 의한 13-수산화 지방산의 생산 및 율토마이세스 리포퍼를 이용한 델타-데카락톤의 제조방법 및 그 조성물	오덕근 강우리 오혜진	한국	10-2014-0019855					
2015	락토바실러스 에시도필러스 유래 13-리놀레산 수화효소에 의한 13-수산화 지방산의 생산 및 율토마이세스 리포퍼를 이용한 델타-데카락톤의 제조방법 및 그 조성물	오덕근 강우리 오혜진	한국	10-2015-00127223					

4. 기술이전

기술이전명	날짜	기술이전주체	기술받는 기업체	기술이전액수
생물전환법에 의한 다양한 락톤류 생산기술	2015.08.13	건국대	제노포커스	선급료 천만원 매출액의 1%

5. /양성 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
5		5			2	3	5		

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 시장 현황

1. 생산 및 시장현황

가. 국내 제품생산 및 시장 현황

○ 국내 향료 시장은 약 2,000 억원 규모이며 화장품, 식품 및 생활용품에 사용되고 있으나 외국기업의 시장 점유율이 80%임(Forbes Korea, 2004년; 중소기업청, 2012년).

○ 생산품목은 분야 및 품목별로 2,400 여개 품목으로 다양하나 완제품 또는 원료를 외국에서 100% 수입하여 판매만 하거나 국내에서 일부 조합 판매하는 형태를 취하고 있어 원천 기술개발이 시급함(한국향료공업협회, http://kffa-kr.or.kr/gen/gen_01.asp).

○ 국내 외국 향료공급업체들 대부분이 agent를 통해 판매하고 있으며 국내에서 가장 많은 매출규모를 보이고 있는 업체는 Hasegawa로 약 1500만달러(약 110억원) 정도의 매출 규모를 보이고 있고 국내 향료 제조업체인 서울향료를 통해 판매하고 있음.

○ 국내 향료는 식품용도가 60%, 화장품등의 용도가 40%정도를 차지하고 있고 향장향료는 조합식품향료와 조합향장 향료가 대부분의 시장을 차지하고 있는 것으로 알려지고 있다. 조합식품향료가 차지하는 비중은 약 55% 정도이고, 조합향장향료가 35%, 나머지는 합성향료와 천연향료가 차지하고 있음.

○ 국내 유기농, 천연 원료 선호도 증가에 따라 천연향미제 및 향료에 대한 사용비율이 증가할 것으로 전망되어 본 과제에서의 제안대로 천연향료 중심으로 개발할 경우 식품, 화장품, 생활용품 등 광범위하게 사용되어 높은 부가가치 창출과 관련 분야에 대한 영향이 클 것임.

○ 국내 천연 향료는 시장은 약 100억 원 정도이고 천연 원료 선호도 증가에 따라 성장률이 약 10-20% 비교적 높지만 아직까지 가격이 고가이고 공급에 한계가 있음.

○ 국내에서 사용되는 락톤류는 모두 화학합성품이고의 2010년 국내시장은 약 200억 원으로 수입 1660만불, 수출 20만 불임(표). FOB가격으로 화학합성한 델타-락톤류가 100-120 \$/kg이고 감마-락톤류가 30-40 \$/kg임 (www.cischem.com).

표. 국내시장 규모 한국무역협회 무역통계 자료(<http://www.kita.net>)

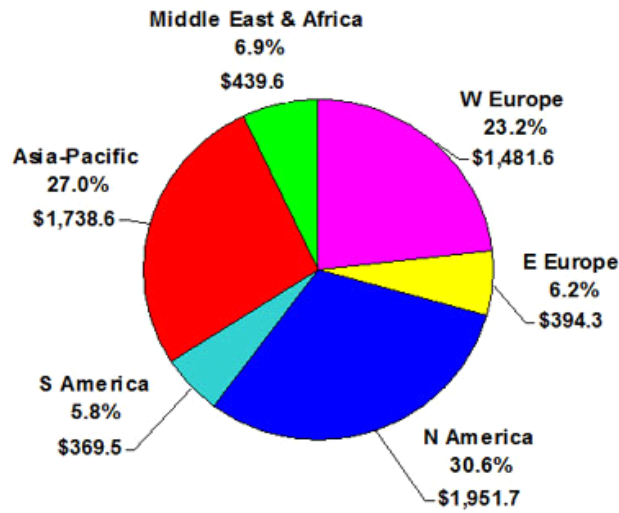
락톤류	2005	2006	2007	2008	2009	2010
수 입	952	984	1200	1295	1495	1660
수 출	56	28	19	47	24	20

[금액: 만불(\$)]

나. 국외 제품생산 및 시장 현황

○ 세계 향료시장 규모는 220억불 (Leffingwell & Associates, 2010, http://www.leffingwell.com/top_10.htm)이고 Givaudan Roure (스위스), Firmenich (스위스), IFF (미국), Symrise (독일), Takasago (일본), Mane SA (프랑스), Sensient Flavors (미국), Hasegawa (일본)의 8개 회사가 전 세계 시장의 70%를 점유하고 있고 소비량 및 시장도 유럽, 북미, 아시아 순임 (그림).

Global Market For Flavors, 2006 (US\$ (Million))



Source: IAL Consultants, 16 April 2007, Press release

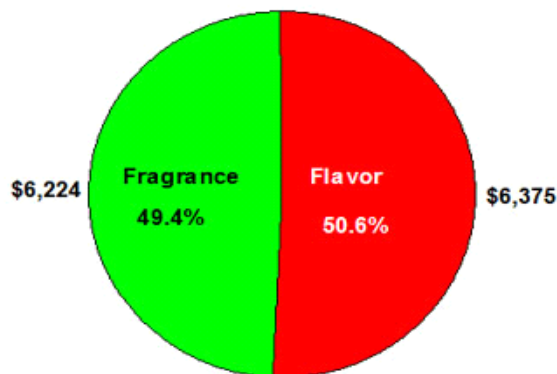
그림. 향료의 지역별 세계시장 규모 (IAL consultant, 2007)

○ 분야별로는 화장품 용도인 향수 (fragrance)가 35%, aroma compound, essential oil등이 15% 식품 용도인 향미제 (flavor)가 40% 및 기타 천연재료가 10% 정도를 차지 함 (그림). 향수 용 성분 중에서도 화장품용도에서 비누, 샴푸 등 생활용품의 비중이 증가하고 있음.

○ 식품분야의 천연 향료 시장은 2009년 6억 유로 규모 (UBIC consulting, 2010)로 매년 8%씩 성장하고 있음.

○ 락톤류의 세계시장 규모는 12억불로 추정되며(Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 14, 451-460) 매년 증가하고 있음.

Global Market for Flavors & Fragrances by Value, 2006 (US\$ Million)



Source: IAL Consultants, 16 April 2007, Press release

그림 . 향료의 분야별 시장 규모 (IAL consultant, 2007)

2. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

○ 현재 lactone 중 가장 시장이 큰 decalactone과 dodecalactone은 천연원료로부터 추출하는 방식이 존재하지 않아 미생물을 이용한 생물전환 방식이 가장 유력하며 특히 저렴한 원료와 전구체를 이용하는 방식에 따라 경제성이 결정되므로 본 과제에서 제안하는 값싼 농산원료를 사용할 경우 경쟁력이 높아 산업화에 유리함.

○ γ -decalactone은 현재 산업화가 완료단계로 부가가치가 적은 반면 dodecalactone은 시장이 형성된 시간이 짧아 시장진입이 유리할 것으로 예상되며 그 외 본 과제에서 제안한 락톤류는 가격이 비싼 델타-락톤류의 새로운 락톤으로 본 과제 수행 후 새로운 제품으로 원천 산업화로 높은 부가가치 창출이 예상됨. 특히 본 연구진이 보유한 효소전환 및 최적화 기술이 이미 세계 최고 수준이므로 dodecalactone의 경우 단기간 내에 산업화가 가능함.

○ 통상 천연원료의 경우 합성품보다 가격이 3-5배 높아 부가가치 창출에 더 유리함.

○ 본 과제 수행을 통해 산업화에 성공할 경우 국내 락톤류 시장 200억 원에서 초기 5년간 11% 시장을 선점하고 향후 10년 내 20%를 대체할 것으로 기대됨.

3. 원료 분석

○ 국내 유지별로 원료물질이 되는 지방산인 oleic acid, linoleic acid 및 α -linolenic acid 함량을 분석한 결과를 표에 나타내었다.

○ 각각의 지방산이 가장 많이 함유되어 있는 올리브유(oleic acid 75% 함유), 홍화유(linoleic acid 80% 함유), 들깨유(α -linolenic acid 63% 함유)를 사용하면 다양한 락톤류 생산에 유리함.

○ 또한 유채유(oleic acid 62% 함유), 콩유(linoleic acid 54% 함유), 아마인유(α -linolenic acid 53% 함유)의 락톤류 생산에 사용도 가능함.

표. 국내 유지별 oleic acid, linoleic acid 및 α -linolenic acid의 함량

종류	Oleic acid (%)	Linoleic acid (%)	α -Linolenic acid (%)
유채유	62	22	10
콩유	24	54	7
참깨유	39	40	1
들깨유	18	20	63
땅콩유	47	27	0
올리브유	71	10	1
아마인유	21	16	53
홍화유	13	78	0

4. 제품 및 시장분석 을 통한 연구추진계획

○ 국내 및 국외시장 분석결과 저가의 합성 γ -decalactone을 이용한 제품 등의 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 현재 시장이 이미 성숙하였고 부가가치가 낮아 본 연구과제에서는 초기에는 미생물을 이용한 γ -dodecalactone을 주로 생산하는 방향으로 연구를 추진하고 후반기에는 델타-락톤을 중심으로 다양한 lactone을 생산하는 방식으로 연구를 추진하여 관련 제품 10종을 생산하여 국내 및 국외에 판매할 계획임

○ 본 과제에 개발 품목인 바이오향료는 환경 친화적이므로 기존 화학합성품의 대체가 용이하고 화학합성품보다 가격도 고가이므로 본 과제에서는 지방에서 바이오향료를 생산하는 전공정의 전환수율과 생산성을 높이는 연구에 주력하여 가격경쟁력을 확보할 예정이다.

○ 유지에서 직접 락톤 생산하는 방법 개발: 화장품에 사용하는 유지를 리파제로 가수분해하고 효모발효를 시키면 향을 얻게 되고 정제하지 않은 상태로 사용이 가능하므로 경제적으로 실용화 할 수 있는 좋은 방법임.

○ 다양한 지방산으로부터 다양한 락톤을 생산 할 경우 여러 가지 신규 락톤이 생산됨. 신규 락톤의 경우 시약으로 실용화가 가능함.

○ 락톤 향은 시제품을 만들어 1차로 국내 대기업에 화장품 원료로 공급함. 천연락톤이므로 화학합성품에 비하여 경쟁력이 있음.

제 2 절 특허 현황

○ 유효특허들 중 핵심특허는 EP0795607 및 US4560656으로 공통적으로 본 과제에서 제안하는 락톤으로의 전환에 관련된 내용을 포함하고 있으며 전반적으로 세포자체를 이용하는 기술들이 주를 이루고 있어 본 과제에서 제안하는 효소 및 세포공장 등의 개념 및 균체의 투과성 향상 내용은 포함하고 있지 않음.

○ Hydroxy 지방산 생산을 위해 필요한 기술 요소 중 lipoxygenase 관련해서는 주로 lipoxygenase inhibitor screening 및 assay 방법, 식물성 지방산을 이용한 oxylipin 생합성에 관련된 mutant와 특성에 관련된 특허들이 검색되었고 본 과제와 관련한 락톤 생산 특허는 1건만이 검색됨. 본 과제에서는 lipoxygenase 및 hydratase를 기반으로 락톤을 생산하여 기존 균체에 의한 생산법과는 차별화 됨.

○ 본 과제에서 연구가 성공적으로 수행되어 생물학적 방법에 의한 락톤 생산에 대한 신규 원천특허가 창출되었음.

제 3 절 논문 현황

1. Hydroxy 지방산류 관련 논문 분석

○ 현재까지 hydroxy 지방산의 생산은 관여 효소도 정확히 모르는 상태에서 균체 반응으로 생산되어 왔음.

○ 사용된 wild-type 균체는 함유된 효소량이 낮아 고농도, 고수율, 고생산성으로 hydroxy 지방산을 생산하는데 한계가 있음.

○ 생산된 hydroxy 지방산을 바이오 향료 생산과 연결하여 실험한 경우는 거의 없음.

○ 지방산 유래 다양한 바이오 향료를 생산하기 위하여 관여 효소인 hydratase와 lipoxygenase의 사용이 필수적임.

○ 본 과제에서 연구가 성공적으로 수행되어 hydratase, lipoxygenase 및 diol synthase에 의하여 다양한 hydroxy 지방산이 생산되어 관련논문을 발표하였음.

2. 락톤류 관련 논문 분석

- 현재까지 락톤류 생산은 효모의 생물전환기술을 이용하여 지방산유도배지에서 발효를 통해 이루어져 많은 부산물이 생성되고 수율도 낮음.
- 효모를 이용한 생물전환기술은 hydroxy 지방산에 대한 베타-산화 활성이 낮거나 락톤에 대한 분해 활성이 강하여 고수율의 생산이 불가능 함.
- 락톤 생산을 위한 효율적인 지방산 산화 효소에 대한 규명이 미흡 함.
- 고수율 락톤 생산을 위한 산업적인 세포 공정 및 효소 공정은 아직까지 확립되지 않음.
- 본 과제에서 연구가 성공적으로 수행되어 다양한 hydroxy 지방산을 생산하였고 이중 이중 결합이 없거나 하나를 지닌 hydroxy 지방산으로 부터 락톤이 생산되어 관련논문을 발표하였음.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발수행 내용

1. 농산 유지로부터 다양한 hydroxy 지방산 생산 공정 개발

- 농산 유지로부터 lipase 처리에 의한 지방산 생산
 - 유지 처리용 lipase 개발
 - lipase 특성 조사 및 반응 최적화
 - 지방산 고농도 생산
 - 농산 유지로부터 지방산 생산
- 지방산으로부터 hydratase 처리에 의한 hydroxy 지방산 생산
 - 효소 반응 최적화
 - Hydroxy 지방산 고농도 생산
 - Oleic acid, linoleic acid, alpha-linolenic acid로부터 다양한 hydroxy 지방산 생산
 - Hydroxy fatty acid의 분리 정제
- 지방산으로부터 lipoxygenase 처리에 의한 hydroxy 지방산 생산
 - 9-, 10-, 13-lipoxygenase 중심으로 한 위치특이적 효소 유전자 및 효소 확보
 - 효소 특성 조사 및 효소 반응 최적화
 - Hydroxy 지방산 고농도 생산
 - Oleic acid, linoleic acid, alpha-linolenic acid로부터 다양한 hydroxy 지방산 생산
 - Hydroxy fatty acid의 분리 정제

2. 다양한 hydroxy 지방산으로부터 다양한 락톤류의 생산

- Hydroxy 지방산으로부터 락톤류 생산
 - 효모의 beta-oxidation 활성 최적화: 온도, pH, rpm, 배지 등
 - 효모의 반응성 최대화 (cell permeabilization): 유기용매 및 detergent 처리 조건 최적화
 - 효모의 반응 조건 최적화: 기질농도, 균체농도, 반응시간 등 최적화
 - 락톤류 고농도 생산
 - 다양한 hydroxy 지방산로부터 다양한 락톤류 생산

3. 바이오 향료의 산업화 연구

- 농산유지로부터 바이오향료 락톤류의 생산 전 공정의 최적화
 - Lipase와 hydratase를 사용한 농산유지로부터 hydroxy 지방산의 생산의 최적화
 - Lipase와 lipoxygenase를 사용한 농산유지로부터 hydroxy 지방산의 생산의 최적화
 - 효모와 lactonase를 사용한 hydroxy 지방산로부터 락톤류의 생산의 최적화
 - 농산유지로부터 바이오향료 락톤류의 생산 전 공정의 최적화
 - 올리브유, 홍화유, 들깨유에 의한 바이오향료 락톤류의 생산
- 바이오향료 락톤류의 생산공정 scale-up
 - 발효조를 이용한 생물전환
 - 락톤류 분리 정제 공정 최적화

4. 시제품 제조 및 경제성 분석

- 바이오향료의 5종 제품 (감마-락톤류 4 이상, 델타-락톤류 1종)
- 농산유지(올리브유, 홍화유, 들기름)에서 hydroxy 지방산 및 락톤 생산
- 제품 순도 조사: 98% 이상 순품 제조
- 경제성 분석: 원부재료비 *Y. lipolytica*에 의한 γ -lactone kg 당 생산 원부재료비: γ -decalactone는 82,260원 γ -decelactone는 84,260원 γ -dodecalactone는 174,075원 γ -dodecelactone는 374,075원으로 계산

5. 기술실시 및 상품화

- 기술실시: 5 건
 - Hydratase에 의한 감마-락톤류 생산법
 - Lipoxygenase에 의한 델타-락톤류 생산법
 - 락톤류 분리 정제법
 - Hydroxy fatty acid 분리 정제법
- 상품화
 - 감마-락톤류 정제품 및 혼합품, 델타-락톤류 정제품

대표적인 지방산인 oleic acid와 linoleic acid로부터 생성되는 락톤류를 그림 1에 나타내었음.

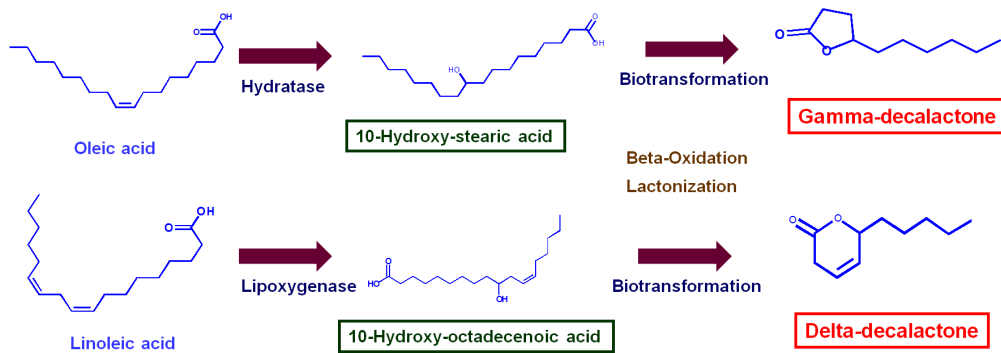


Fig 1. 효소(hydratase/lipoxygenase) 및 효모의 beta-oxidation과 lactonization에 의한 락톤 생산.

제 2 절 지방산으로부터 hydroxy 지방산 생산

농산유지로부터 바이오향료인 락톤을 생산하기 위해서는 먼저 농산유지에 포함된 지방산을 hydroxy 지방산으로 전환을 시켜야 함. 농산유지로부터 lipase 처리를 통해 지방산을 얻은 뒤 다양한 효소를 처리하여 hydroxy 지방산을 생성할 수 있음. 대표적으로 2개 이상의 이중결합 사슬을 가지는 불포화지방산으로부터 hydroxy 지방산을 생성하는 lipoxygenase, 이중결합 사슬을 가지는 불포화지방산으로부터 dihydroxy 지방산을 생성하는 diol synthase, 불포화지방산의 이중결합을 끊어주면서 -OH기를 붙여주는 hydratase가 있으며, lipoxygenase와 hydratase는 각각 linoleic acid와 oleic acid를 기질로 사용하였을 때 가장 높은 활성을 보이는 것으로 알려져 있음. hydroxy 지방산은 락톤의 전구체가 되는 물질로 향료 물질을 개발하는데 큰 의미를 지님. 뿐만 아니라 hydroxy 지방산은 화장품, 의약품 및 페인트, 플라스틱같은 물질의 원료가 되어 산업적으로도 큰 의미를 지니고 있어 주목을 받고 있음.

1. Fatty acid hydratase

가. Oleic acid에서 10-hydroxystearic acid 생산

(1) 지방산 hydratase 함유 *Stenotrophomonas nitritireducens* 전세포에 의한 10-hydroxystearic acid 생산

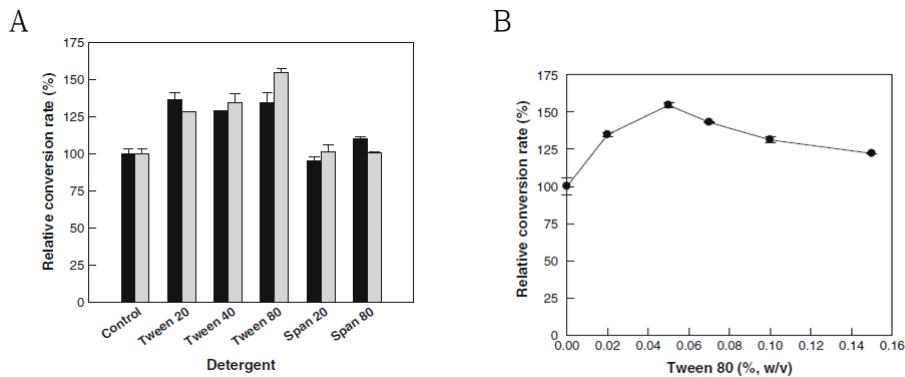


Fig. 1. Effect of detergent on the conversion of oleic acid to 10-hydroxystearic acid production by whole cells of *S. nitritireducens*. a Effect of detergent kind. b Effect of Tween 80 concentration.

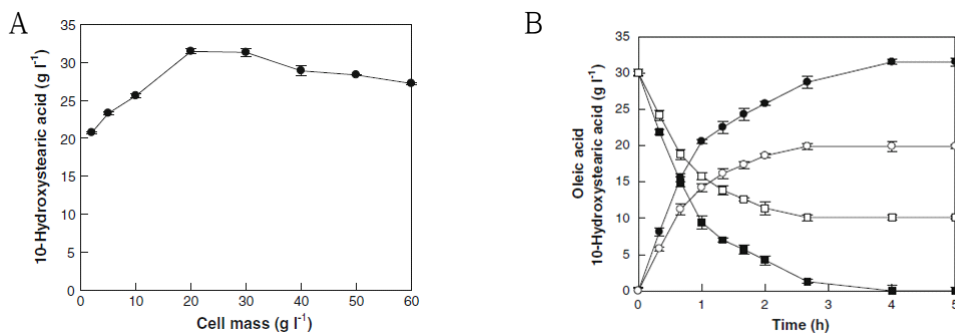


Fig. 2. a Effect of the cell concentration on the conversion of oleic acid to 10-hydroxystearic acid by whole cells of *S. nitritireducens*. b Time-courses for the conversion of oleic acid into 10-hydroxystearic acid by whole cells of *S. nitritireducens* under the optimum conditions in anaerobic and aerobic atmospheres. Oleic acid (filled circle) and 10-hydroxystearic acid (filled square) in anaerobic atmosphere and oleic acid (open circle) 10-hydroxystearic acid (open square) in aerobic atmosphere.

Table 1. Microbial conversion of oleic acid to 10-hydroxystearic acid from.

Strain	Oleic acid (g l ⁻¹)	10-Hydroxystearic acid (g l ⁻¹)	Yield (g g ⁻¹)	Productivity (g l ⁻¹ h ⁻¹)
<i>Enterococcus faecalis</i>	0.9	0.63	0.70	0.01
<i>Flavobacterium</i> sp. DS5	5.4	0.34	0.06	0.01
<i>Nocardia paraffinae</i>	18.0	8.00	0.44	1.33
<i>Nocardia cholesterolicum</i>	17.8	16.02	0.90	2.67
<i>Selenomonas ruminantium</i>	0.9	0.80	0.89	0.01
<i>Stenotrophomonas nitritireducens</i>	30.0	31.50	1.05	7.88

(가) 야생균주인 *S. nitritireducens*를 기반으로 전세포 촉매를 활용한 hydroxy 지방산 생산 공정을 완수함.

(나) *S. nitritireducens*의 hydroxy 지방산 생산 최적화 확립: *S. nitritireducens*로부터 hydroxy 지방산의 효율적인 생산을 위해 배양온도, pH를 포함하여 계면활성제 (Fig. 1. 참조, 0.05% 트윈 80), 세포 농도 (Fig. 2. 참조, 20 g/L 세포 농도) 등의 발효 조건을 최적화함.

(다) *S. nitritireducens*를 이용한 hydroxy 지방산 생산 전세포 촉매 발효는 혐기적인 조건에서 더 효과적임 .

(라) Table 1과 같이 *S. nitritireducens*는 hydroxy 지방산 생산에서 세계 최고의 농도와 생산성 기록: 30 g/L oleic acid를 기질로 하여 4시간 동안 발효시 31.5 g/L를 생산함. 20 g/L linoleic acid를 기질로 하여 3시간 동안 반응시 15 g/L 10-hydroxy-12*Z*-octadecenoic acid 생산.

(2) *Macrococcus caseolyticus* 및 *Lysinibacillus fusiformis* 지방산 hydratase에 의한 10-hydroxystearic acid 생산

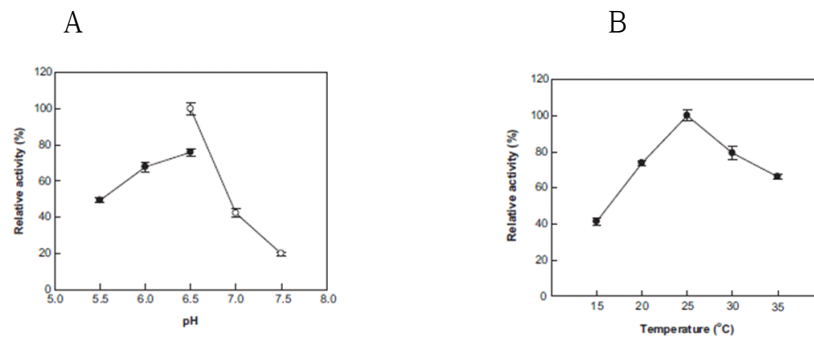


Fig. 3. Effects of (a) pH, (b) temperature on the activity of oleate hydratase from *M. caseolyticus*.

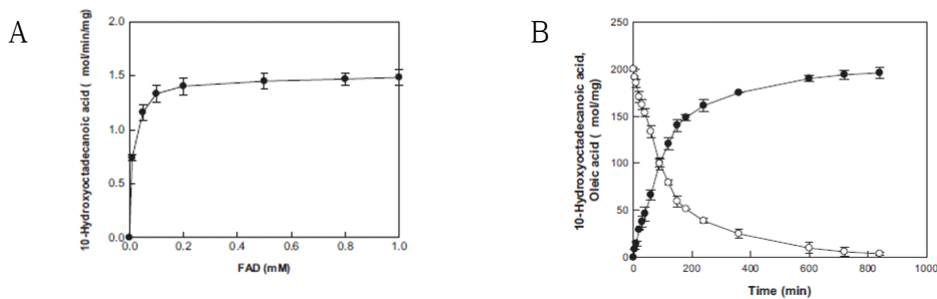


Fig. 4. a Effects of FAD concentrations on the activity of oleate hydratase from *M. caseolyticus*. b Time-course reaction.

Table 2. Specific activity and kinetic parameters of the putative fatty acid hydratase from *M. caseolyticus* for fatty acids as substrates.

Substrate	Product(s)	Specific activity (unit/mg)	K_m (μ M)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$)
Myristoleic acid	10-Hydroxytetradecanoic acid	18 \pm 0.2	300 \pm 7	2 \pm 0.1	8 \pm 0.2
Palmitoleic acid	10-Hydroxyhexadecanoic acid	1,680 \pm 5.1	570 \pm 9	230 \pm 4.0	390 \pm 6.3
Oleic acid	10-Hydroxyoctadecanoic acid	3,300 \pm 9.1	340 \pm 2	470 \pm 1.3	1,360 \pm 5.1
Linoleic acid	10-Hydroxy-12(<i>Z</i>)-octadecenoic acid	58 \pm 0.9	390 \pm 1	8 \pm 0.2	20 \pm 0.4
	10,13-Dihydroxyoctadecanoic acid	5 \pm 0.8	340 \pm 2	1 \pm 0.1	3 \pm 0.6
α -Linolenic acid	10-Hydroxy-12(<i>Z</i>),15(<i>Z</i>)-octadecadienoic acid	59 \pm 2.9	320 \pm 2	8 \pm 0.2	25 \pm 0.6
	10,13-Dihydroxy-15(<i>Z</i>)-octadecenoic acid	17 \pm 0.9	330 \pm 4	2 \pm 0.6	8 \pm 0.2
γ -Linolenic acid	10-Hydroxy-6(<i>Z</i>),12(<i>Z</i>)-octadecadienoic acid	1,120 \pm 1.2	590 \pm 2	160 \pm 1.1	270 \pm 0.1
	10,13-Dihydroxy-6(<i>Z</i>)-octadecenoic acid	90 \pm 0.9	600 \pm 4	12 \pm 0.2	21 \pm 0.5

(가) 전세포 촉매에서 지방산의 수산화반응에 관여하는 효소의 유전자 클로닝 및 고농도 발현 완수.

(나) 지방산 hydratase의 생화학적 특성 규명: *M. caseolyticus* 유래 지방산 수산화효소는 pH 6.5와 25°C에서 최적 활성을 보임 (Fig. 3 참조), 수산화효소는 보조 효소 flavin adenosine dinucleotide (FAD)가 결합된 반응에서 전체 촉매활성이 상실된 것으로 나타나 FAD 보조효소에 의존적임을 확인하였으며 0.2 mM에서 최적임을 확인, 2 mM oleic acid를 hydroxystearic acid로 전환하는 반응에서 14시간 후 최대 99%의 전환율을 나타냄 (Fig. 4b 참조).

(다) *M. caseolyticus* 유래 지방산 수산화효소의 기질 특이성 분석 (Table 2 참조): 지방산 수산화효소는 대부분의 포화지방산 및 트랜스형 불포화지방산에 대해 활성이 나타내지 않으며, 특이적으로 14-18개 탄소 9번 및 9번, 12번 시스형을 갖는 불포화지방산에 활성을 나타냄, 또한 oleic acid > palmitoleic acid > γ -linolenic acid > α -linolenic acid > linoleic acid > myristoleic acid 순으로 specific activity와 catalytic efficiency를 나타내었고 가장 높은 활성을 나타내는 oleic acid가 주 기질임을 확인함.

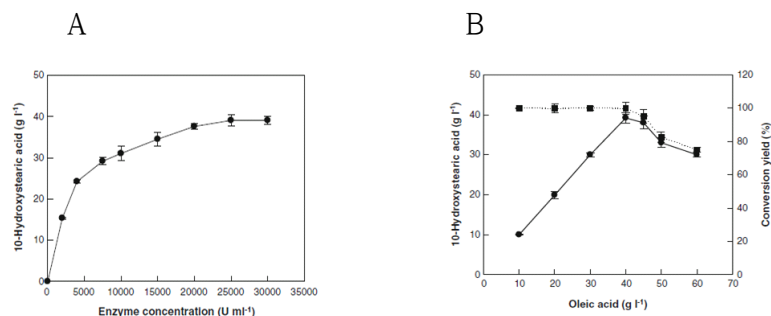


Fig. 5. Effect of the concentrations of substrate and enzyme on 10-hydroxystearic acid production from oleic acid by oleate hydratase from *L. fusiformis*. a Effect of enzyme concentration. b Effect of substrate concentration. Conversion yield (filled square) and 10-hydroxystearic acid production (filled circle).

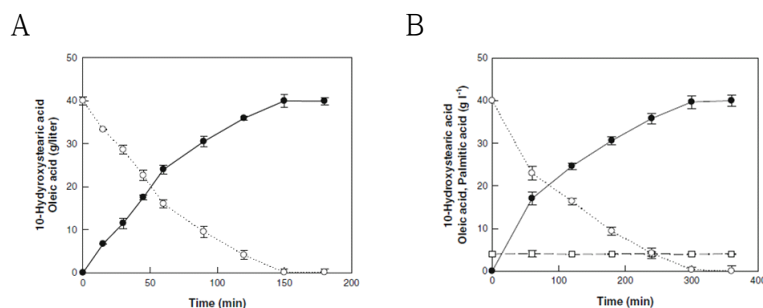


Fig. 6. Time-course reactions of 10-hydroxystearic acid production from reagent grade oleic acid.

acid and olive oil hydrolyzate by oleate hydratase of *L. fusiformis* under optimal conditions. a Reagent grade oleic acid. Oleic acid (empty circle) and 10-hydroxystearic acid (filled circle). b Olive oil hydrolyzate. Oleic acid (empty circle), palmitic acid (empty square), and 10-hydroxystearic acid (filled circle).

(가) 유지 가수분해물을 이용한 지방산 수산화효소 활성 분석: 농산유 가수분해물로부터 지방산 수산화효소를 이용한 대량생산기술 확립.

(나) *L. fusiformis* 유래 지방산 수산화효소를 이용한 생산 최적화: *L. fusiformis* 유래 oleate hydratase는 25,000 U/ml (8.4 mg/ml) 효소 농도에서 최대 생산성을 보임 (Fig. 5A. 참조), 기질 농도는 40 g/L의 oleic acid에서 10-hydroxystearic acid를 최대 생산을 보였고 40 g/L 이후부터는 생산량과 전환율이 감소되어 40 g/L가 최적임을 나타냄 (Fig. 5B. 참조).

(다) 고순도 oleic acid와 가수분해 올리브유를 이용한 생산성 비교: Fig. 6A와 같이 고순도의 oleic acid를 사용하였을 경우 $8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 의 생산성을 보이나 Fig. 6B와 같이 가수분해처리한 올리브유를 사용할 경우 포함된 palmitoleic acid로 인해 10-hydroxystearic acid 생산성이 $4 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 로 2배 감소, 가수분해 올리브유는 고순도 oleic acid와 비교해 동일량의 10-hydroxystearic acid를 생산하기 위한 시간은 2배 정도 소요되나 6시간 이후 100%에 가까운 수율을 나타냄.

(3) 지방산 hydratase 함유 *Stenotrophomonas maltophilia* 재조합 세포에 의한 10-hydroxystearic acid 생산

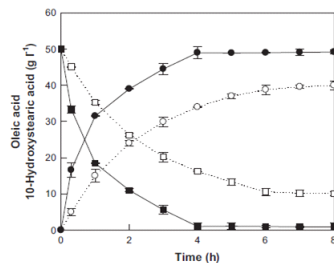


Fig. 7. Time-course reactions for 10-hydroxystearic acid production from oleic acid by whole cells of recombinant *E. coli* and wild-type *S. maltophilia* under the optimal conditions. 10-Hydroxystearic acid production (filled circle) from oleic acid (filled square) by whole cells of recombinant *E. coli*, and 10-hydroxystearic acid production (empty circle) from oleic acid (empty square) by whole cells of wild-type *S. maltophilia*.

Table 3. Microbial conversion of oleic acid to 10-hydroxystearic acid.

Strain	Substrate (g l ⁻¹)	Product (g l ⁻¹)	Yield (g g ⁻¹)	Volumetric productivity (g l ⁻¹ h ⁻¹)	Specific productivity (g g-cells ⁻¹ h ⁻¹)	Reference
<i>Enterococcus faecalis</i>	0.9	0.80	0.89	0.011	NR	Hudson et al. (1995)
<i>Enterococcus gallinarum</i>	2.0	1.9	0.97	0.027	NR	Morvan and Joblin (1999)
<i>Flavobacterium</i> sp. DS5	18.0	0.71	0.04	0.015	NR	Heo and Kim (2009)
<i>Lactobacillus</i> sp.	2.0	1.5	0.76	0.011	NR	Morvan and Joblin (1999)
<i>Nocardia cholesterolicum</i>	17.8	16.0	0.90	2.7	0.03	Bagby and Calson (1989)
<i>Nocardia paraffinae</i>	18.0	8.0	0.44	1.6	0.46	Latrasse et al. (1997)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	2.0	1.9	0.93	0.013	NR	Morvan and Joblin (1999)
<i>Selenomonas ruminantium</i>	0.9	0.63	0.70	0.009	NR	Hudson et al. (1995)
<i>Sphingobacterium thalpophilum</i>	18.0	7.1	0.39	0.074	NR	Kuo and Levinson (2006)
<i>Stenotrophomonas nitritireducens</i>	30.0	31.5	1.05	7.9	0.39	Kim et al. (2011)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	50.0	40.0	0.80	5.0	0.50	This study
<i>E. coli</i> containing oleate hydratase from <i>S. maltophilia</i>	50.0	49.0	0.98	12.6	1.23	This study

(가) 지방산 수산화효소 재조합 균주와 야생균주에 대한 생산성 분석: 야생균주에 비해 재

조합 균주를 이용한 생산이 더 효과적임.

(나) 지방산 수산화효소 재조합 균주와 야생균주를 이용한 생산성 비교: Fig. 3과 같이 지방산 수산화효소 재조합 균주를 사용하였을 경우 $12.1 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 의 생산성을 보이나 야생균주를 사용할 경우 생산성이 $6.6 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 로 1.8배 감소, 지방산 수산화효소 재조합 균주는 야생균주에 비해 생산속도와 수율 면에 있어서 효율적임.

(다) 우수한 hydroxy 지방산 생산 재조합 균주: Table 3와 같이 야생형 균주들과 비교하여 $1.23 \text{ g g-cells}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 의 높은 특이적 생산성을 기록함.

나. Linoleic acid에서 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid 생산

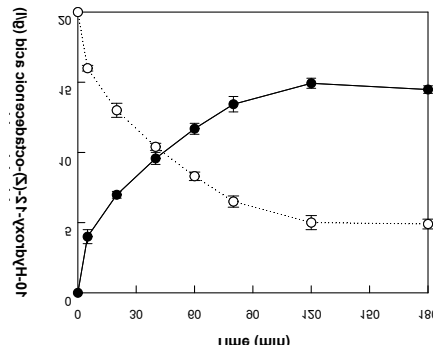


Fig. 8. Time-courses for the production of 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid in a bioreactor by washed cells of *S. nitritireducens* under the optimized conditions. ○: Linoleic acid, ●: 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid.

Table 4. Hydroxy fatty acid productions from unsaturated fatty acid by various microorganisms with high productions

Strain	Substrate	Product	Substrate conc. (g/l)	Product conc. (g/l)	Product yield (g/g)	Productivity (g/l·d)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Linoleic acid	10-Hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid	1.00	0.22	0.22	0.09
<i>Flavobacterium</i> sp.	Linoleic acid	10-Hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid	5.40	2.97	0.55	1.98
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Linoleic acid	10-Hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid	5.00	1.45	0.29	0.72
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Linoleic acid	10-Hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid	2.00	1.82	0.91	0.26
<i>Pseudomonas</i> sp. 42A2	Oleic acid	10-Hydroxy-8(E)-octadecenoic acid	20.0	5.58	0.28	5.58
<i>Pseudomonas</i> sp. PR3	Oleic acid	7,10-Dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid	11.7	7.35	0.63	3.67
<i>Stenotrophomonas nitritireducens</i>	Linoleic acid	10-Hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid	2.00	1.92	0.96	92
			20.0	14.9	0.75	177

(가) 최적 조건에서 15 g/l의 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid가 2시간 후에 생성되었으며 (Fig. 8) 이것은 생산성 177 g/l·d (=7.5 g/l·h)에 해당된 결과임.

(나) 여러 미생물들의 불포화 지방산으로부터 고농도 hydroxy fatty acids 생산을 Table 4에 요약함. 지금까지 가장 높은 농도의 hydroxy fatty acids 생산은 *Pseudomonas* sp. PR3에 의한 11.7 g/l의 oleic acid를 사용하여 48시간에 7.35 g/l의 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid를 생산한 경우임. *S. nitritireducens*의 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid 생산 농도는 *Pseudomonas* sp. PR3의 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid 생산 농도보다 2배 높았고 생산성도 32배 높았음. 지금까지 가장 높은 수율의 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid 생산은 2 g/l

linoleic acid로 부터 *Lactobacillus paracasei* 91% 수율을 보였지만 같은조건에서 *S. nitritireducens* 는 96%의 수율을 나타내었음.

다. Ricinoleic acid에서 10,12-dihydroxystearic acid 생산

현재까지의 이산화 지방산은 길고 여러 단계의 과정이 요구되거나 과망간칼륨과 같은 산화 시약을 사용하였을 때 합성됨. 최근에는 이러한 단점들을 보완하기 위해 미생물 전환에 의해 palmitoleic acid, oleic acid, eicosenoic acid, α -linolenic acid, ricinoleic acid 으로부터 7,10-dihydroxy-8(E)-hexadecenoic acid, 7,10-dihydroxy-8(E)-hexadecenoic acid, 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid, 9,10-dihydroxy-10(E)-eicosenoic acid, 13,16-dihydroxy-12,15-epoxy-9(Z)-octadecenoic acid, 10,12-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid, 7,10,12-trihydroxy-8(E)-octadecenoic acid이 각각 생산이 되었음. 특히 포화지방산인 이산화 스테아르산은 말레이시아 팜유나, *Claviceps* 종의 진균에서 9,10번 탄소의 위치에 수산화기를 가지는 9,10-dihydroxystearic acid 을 생산하였음. 미생물 전환을 이용한 제조방법은 반응시간이 길며 전환수율이 낮은 문제점 때문에 효소를 이용한 제조방법에 관심을 가지게 되었음.

(1) Ricinoleic acid 로부터 10,12-dihydroxystearic acid 생산을 위한 oleate hydratase 의 최적 농도와 ricinoleic acid 의 기질 농도에 대한 효과

효소농도를 변화시키며 10,12-dihydroxystearic acid 의 생산을 조사한 결과 효소농도 9 mg/mL 까지는 증가하였으나 10,12-dihydroxystearic acid 의 생산이 그 이상의 농도에서는 일정하였음 (Fig. 8A). 그러므로 9 mg/mL를 10,12-dihydroxystearic acid 의 생산의 최적 효소농도로 결정하였음. Ricinoleic acid를 5 g/L-20 g/L로 변화를 주어 각각 반응을 진행 한 결과 기질 15 g/L까지는 기질이 높아짐에 따라 product양이 높고, 수율이 높으나 그 이상의 기질농도에서는 수율과 product의 양이 급히 감소함에 따라 기질 15 g/L에서 최적임을 확인할 수 있었음 (Fig. 8B).

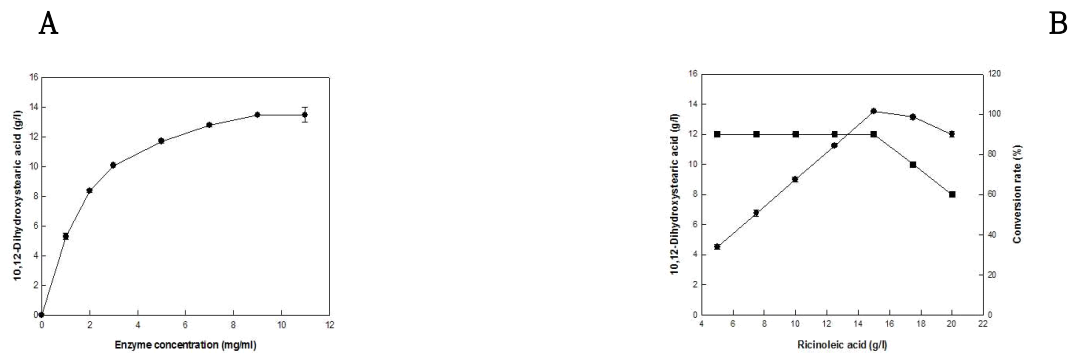


Fig. 8. (A) Effect of enzyme concentration on the production and conversion yield of 10,12-dihydroxystearic acid by *L. fusiformis* oleate hydratase. (B) Effect of substrate concentration on production (■) and conversion yield (●) of 10,12-dihydroxystearic acid by *L. fusiformis* oleate hydratase.

(2) *L. fusiformis* oleate hydratase 를 이용하여 10,12-dihydroxystearic acid 의 생산

L. fusiformis oleate hydratase 를 이용하여 10,12-dihydroxystearic acid 의 고농도 생산을 위하여, 효소의 최적 pH 6.5 및 효소활성이 절반으로 줄어든 시간을 고려한 온도 (30°C)에서 15 g/L ricinoleic acid로부터 10,12-dihydroxystearic acid 의 시간별 생산량을 측정하여, 반응 3시간 후에 13.5 g/L의 10,12-dihydroxystearic acid 가 생산되어 시간당 4.5 g/L의 생산성과 90% 전환 수율을 나타내었음 (Fig. 9).

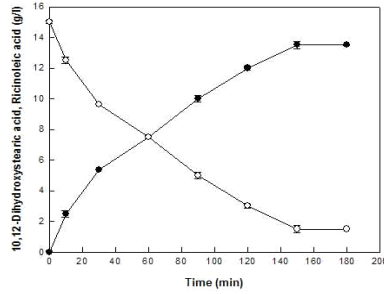


Fig. 9. Time course of 10,12-dihydroxystearic acid (●) from 15 g/L ricinoleic acid (○) by *L. fusiformis* oleate hydratase.

라. α -Linolenic acid에서 10-hydroxy-12,15(Z,Z)-octadecadienoic acid 생산

Hydroxy 지방산은 다른 지방산들에 비해 높은 점도와 반응성을 가지는 특성 때문에 계면활성제, 윤활유, 화장품 등 폭넓은 분야에서 사용되어짐. 이러한 hydroxy fatty acid를 만들기 위해 *Sternotrophomonas maltophilia*로부터 유래된 oleate hydratase를 이용하여 지방산 중에 하나인 α -linolenic acid의 10번 탄소위치의 이중결합을 끊고 그 위치에 -OH기를 붙여줌으로써 10-hydroxy-12,15(Z,Z)-octadecadienoic acid 를 만들어 주고자 함. 또한 cell membrane에 permeabilization 처리를 해줌으로써 기질과 cell 안의 enzyme의 이동을 향상시켜 product의 양을 증가시킴.

(1) 10-Hydroxy-12,15(Z,Z)-octadecadienoic acid의 생산을 증가시키기 위해 NaCl과 EDTA에 의한 recombinant *E. coli* cell의 permeabilization.

Product의 생산을 증가시키기 위해 solvents(ethanol, 2-propanol, acetone, toluene, hexane)와 detergents(Tween 20, Tween 40, Tween 80, Span 20, Span 80)를 이용하여 cell을 permeabilization 처리함. permeabilized cell의 경우 처리하지 않은 cell보다 relative activity가 120%이하였고, 0.125 M NaCl or 2 mM EDTA를 사용 시 150% 이상 이였다 (Fig. 10A and 10B). NaCl과 EDTA를 연속적으로 처리 시 174%로 증가함 (Fig 10C).

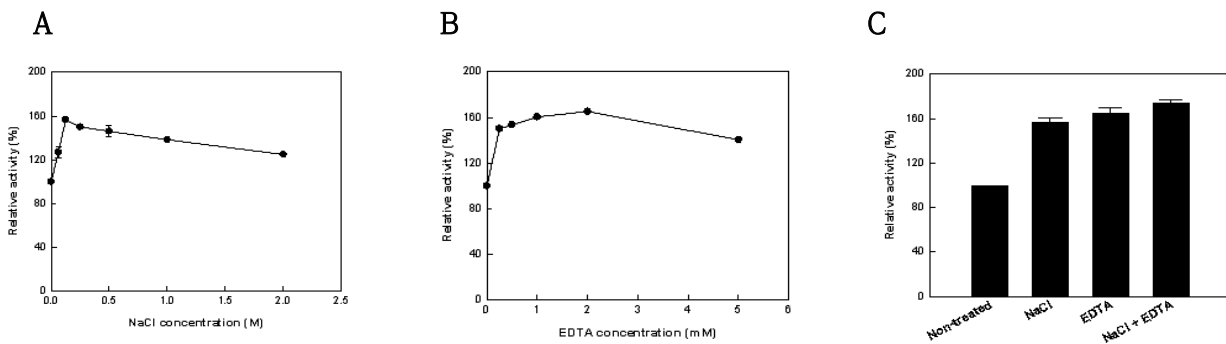


Fig. 10. Effects of NaCl and/or EDTA treatments on the permeabilization of *E. coli* expressing the oleate hydratase gene of *S. maltophilia* for the conversion of α -linolenic acid to 10-hydroxy-12,15(Z,Z)-octadecadienoic acid. (A) Effect of NaCl treatment. (B) Effect of EDTA treatment. (C) Effects of NaCl and/or EDTA treatments. The concentrations of NaCl and EDTA were 0.125 M and 2 mM, respectively.

(2) 10-hydroxy-12,15(Z,Z)-octadecadienoic acid 최대생산을 위한 detergent 종류 및 농도의 최적화

다음 실험에서는 50 mM Tris-HCl buffer, 35 ° C, pH 7.0에서 수행하였다. 기질의 solubility를 높혀 10-hydroxy-12,15(Z,Z)-octadecadienoic acid의 생산을 증가시키도록 detergents (Span 20, Span 80, Tween 20, Tween 40, Tween 80) 실험을 진행한 결과 Tween 40이 가장 최적임을 확인하였고, 농도별로 실험을 진행해 0.1%에서 가장 활성이 좋음 (Fig. 11).

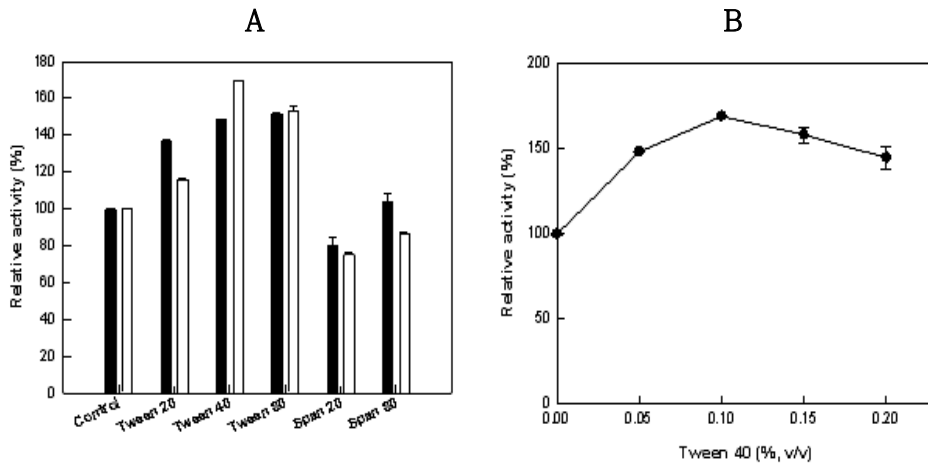


Fig. 11. Effect of detergent on the conversion of α -linolenic acid to 10-hydroxy-12,15(Z,Z)-octadecadienoic acid by whole cells of *E. coli* expressing the oleate hydratase gene of *S. maltophilia*. **(A)** Effect of detergent type. 0.05% (filled bar) or 0.1% (empty bar) (v/v) detergent. **(B)** Effect of detergent concentration.

(3) 10-Hydroxy-12,15(Z,Z)-octadecadienoic acid 최대생산을 위한 cell 농도, 기질 농도 최적화

10-Hydroxy-12,15(Z,Z)-octadecadienoic acid 최대 생산을 위해 cell 농도별, 기질 농도별 실험을 진행함. 기질 17.5 g/L를 넣고 permeabilized cell 농도를 20 g/L-60g/L로 다르게 하여 각각 24시간 동안 반응을 진행 한 결과, cell 50 g/L에서 최적임을 나타내었고 (Fig. 12A), cell 50g/L을 넣고 기질을 5 g/L-20 g/L로 변화를 주어 각각 반응을 진행한 결과, 기질 17.5 g/L까지는 기질이 높아짐에 따라 product양이 높고, 수율이 높으나 그 이상의 기질농도에서는 수율과 product의 양이 급격히 감소함에 따라 기질이 17.5 g/L 일 때 최적임을 확인함 (Fig. 12B).

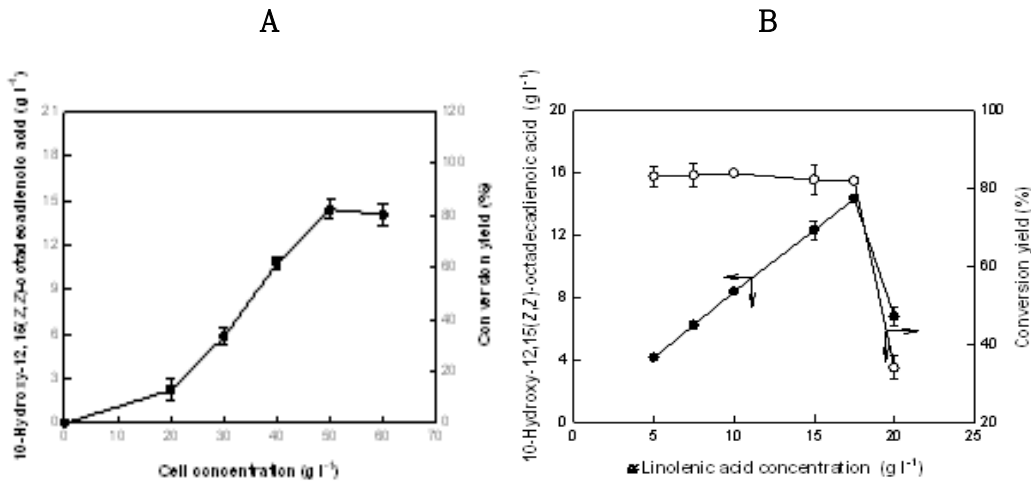


Fig. 12. Effects of the concentrations of substrate and permeabilized cells on 10-hydroxy-12,15(Z,Z)-octadecadienoic acid production from α -linolenic acid by whole cells of *S. maltophilia*. **(A)** Effect of cell concentration. **(B)** Effect of cell concentration.

(4) Time-course (permeabilized cell / non-treated cell 비교)

위의 실험에서 얻어진 최적조건에서 product의 최대 생산을 위해 permeabilized cell과 non-permeabilized cell을 이용하여 반응을 진행해 시간별로 sampling하여 최대 생산을 나타내는 시간을 알아보면서 두 cell을 비교함. Non-permeabilized cell은 24시간동안 11.3 g/L의 10-hydroxy-12,15(Z,Z)-octadecadienoic acid을 생산하였고, permeabilized cell의 경우 18시간동안 14.3 g/L를 생산함. Non-treated cell보다 permeabilized cell이 conversion yield과 volumetric, specific productivity 가 각각 18%, 1.7배, 1.7배 높은 것을 확인 할 수 있었음 (Fig. 13).

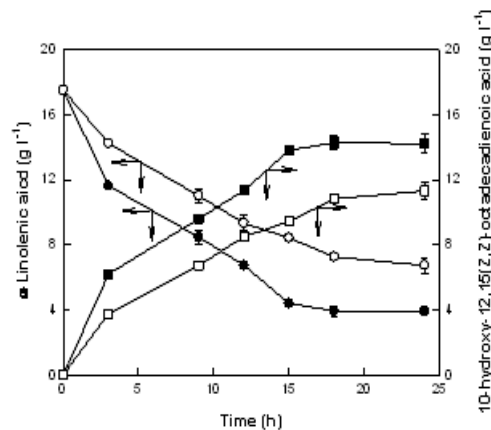


Fig. 13. Time-course reactions for the production of 10-hydroxy-12,15(Z,Z)-octadecadienoic acid from α -linolenic acid by permeabilized cells and nonpermeabilized cells of *S. maltophilia* under the optimum conditions. The production of 10-hydroxy-12,15(Z,Z)-octadecadienoic acid (■) from α -linolenic acid (●) by permeabilized cells and the production of 10-hydroxy-12,15(Z,Z)-octadecadienoic acid (□) from α -linolenic acid (○) by nonpermeabilized.

마. Linoleic acid로 부터 13-hydroxy-9(Z)-octadecadienoic acid 생산

기존의 oleate 및 linoleate hydratase는 공통적으로 cis-9,10 위치의 이중결합 사슬을 수산화 시킴. 새로운 지방산 수산화효소로서 linoleic acid를 기질로 cis-12,13위치에 수산화시키는 linoleic acid 13-hydratase를 확보하였고 이 효소를 향후 13-hydroxy-9Z-octadecenoic acid (13-HOD)생산에 이용함 (Fig. 14).



Fig. 14. Scheme of enzymatic conversion of 13-hydroxy-9Z-octadecenoic acid from linoleic acid by linoleated 13-hydratase.

(1) 생성 산물의 확인

Lactobacillus acidophilus KCTC 3164의 genomic DNA로부터 PCR을 통해 해당 유전자를 cloning한 후 expression vector인 pET-15b에서 발현 시키고 IMAC affinity column을 통해 정제하여 hydratase 효소를 얻음. 정제 효소의 활성을 확인하기 위해 linoleic acid를 기질로 반응한 결과 GC상에서 생성물을 확인할 수 있었고, GC-MS 분석을 통해 분자량 371과 179를 통해 C₁₃ 위치에 수산화가 일어났음을 알 수 있어 생성물은 13-hydroxy-9Z-octadecenoic acid (13-HOD)로 확인함 (Fig. 15A, B).

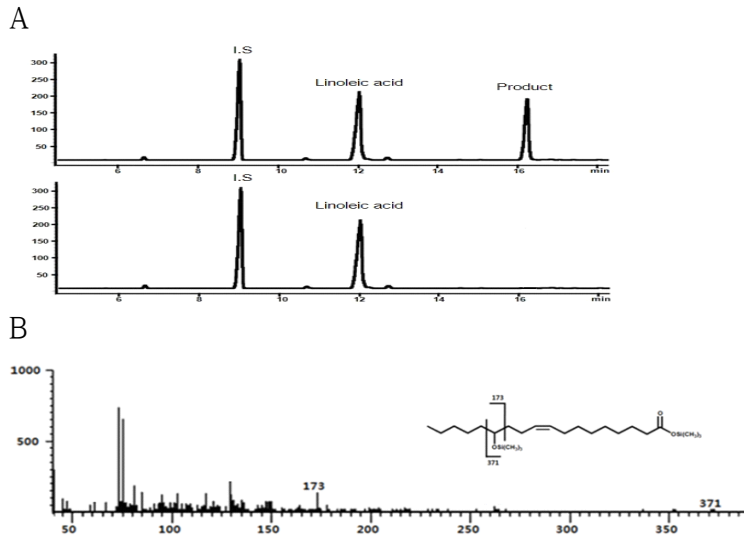


Fig. 15. (A) SDS-PAGE analysis of expressed and purified 13-hydratase. Gas chromatogram (B) and GC-MS of 13-HOD.

(2) 13-Hydroxy-9(Z)-octadecenoic acid 생산 효소활성 최적화

Lactobacillus acidophilus 유래 지방산 산화효소 (hydratase)의 정제. His-taq affinity 정제가 가능한 pET-15b, pACYC, pTrc99a, 그리고 pSTV28 vector를 이용하여 발현한 것을 정제한 결과 발현과 정제에서 pACYC가 다른 pET-15b, pTrc99a 그리고 pSTV28 vector에 비하여 더 우수하였음 (Fig. 16).

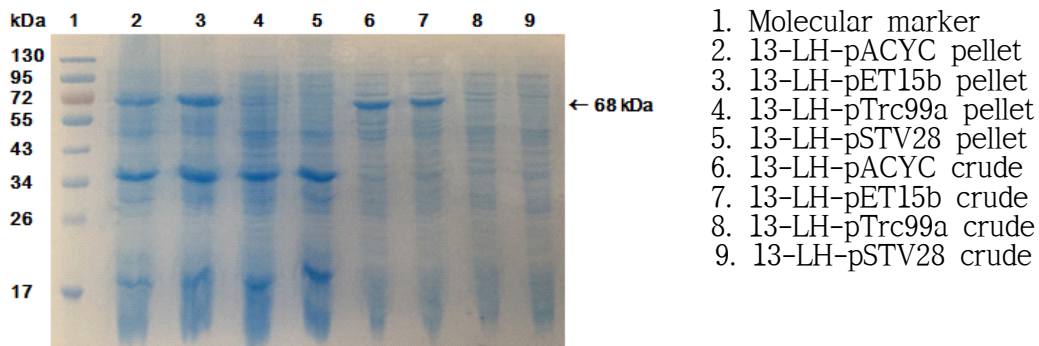


Fig. 16. SDS-PAGE analysis of recombinant *E. coli* cells expressing *L. acidophilus* linoleate 13-hydratase from originating from different plasmids.

L. acidophilus hydratase를 포함하는 recombinant cell의 발현을 높이기 위한 배양 배지효과. SOC (super optimal broth with catabolite repression)배지에서 배양하였을 때 다른배지들보다 높은 specific activity와 total activity를 보임 (Fig. 17).

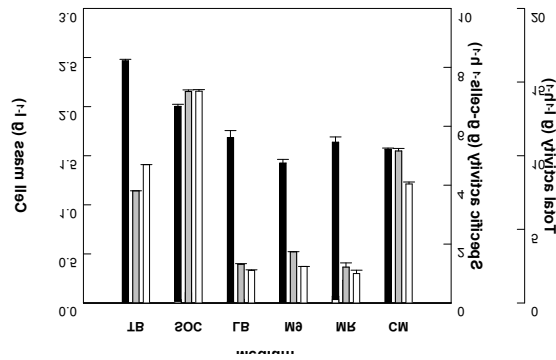


Fig. 17. Effect of culture media on the cell mass, specific activity, and total activity by whole recombinant cells expressing linoleate 13-hydratase from *L. acidophilus*.

(3) 13-Hydroxy-9(Z)-octadecenoic acid 생산 조건 최적화

L. acidophilus hydratase를 포함하는 recombinant cell conversion에 의한 13S-HOD 생산 최적화를 수행한 결과 pH 6.0 (Citrate/phosphate, 50mM), 45 °C에서 최적 활성을 보였음 (Fig. 18A, B). 지방산 산화효소에 의해 생성된 13-HOD 생산 최적화를 위한 detergent효과를 살펴 본 결과 0.25% Tween40에서 대조군 대비 1.2배 생산성 증대 확인함 (Fig. 19A, B). 이는 기질 및 산물의 용해도 향상 및 mixing effect가 좋아진 것으로 판단됨.

13-HOD 생산을 위한 최적의 지방산 산화효소 cell 농도와 기질농도를 살펴본 결과 linoleic acid 100 g/L 일때 지방산 산화효소 25 g/L cell에서 최적을 보였으며 (Fig. 20A, B), 100 g/L linoleic acid에서 conversion 79 % yield 유지하고, 그 이상 농도에서 conversion yield가 떨어짐.

지방산 산화효소에 의한 13-HOD 생산 (Fig. 21). 25 g/L cell, 100 g/L linoleic acid를 기질로 pH 6.0, 40°C, 0.25 % (v/v) Tween 40 첨가한 상태에서 3시간 반응 시 79 g/L의 13-HOD가 전환되어 79% conversion과 생산 수율을 보였으며 26.3 g/L/h의 생산성을 나타냄.

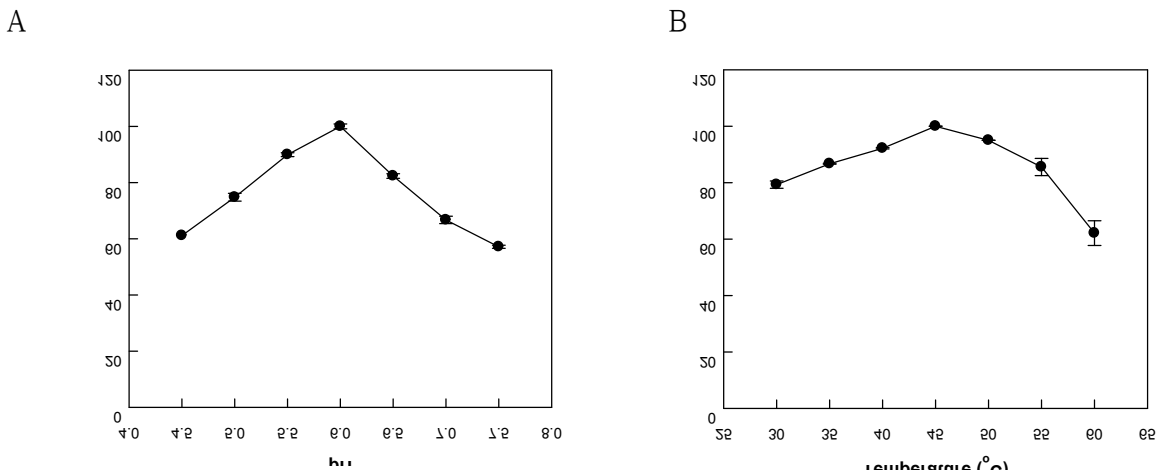
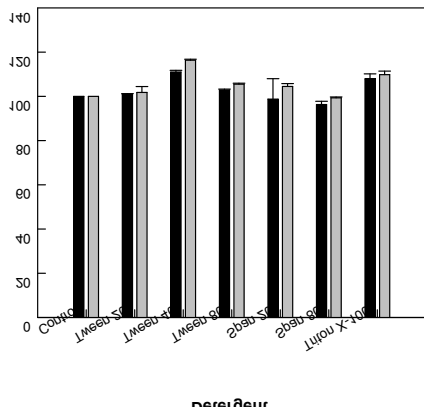


Fig. 18. Optimal pH, temperature and cell stability of recombinant *L. acidophilus* linoleate 13-hydratase in *E. coli*

A



B

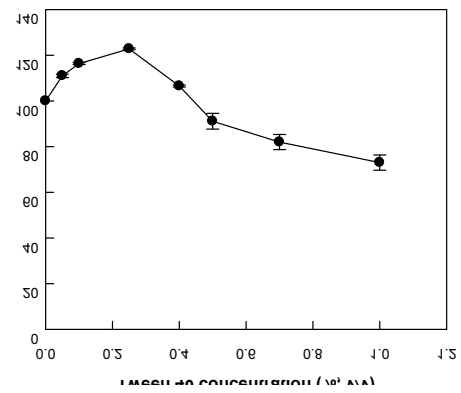
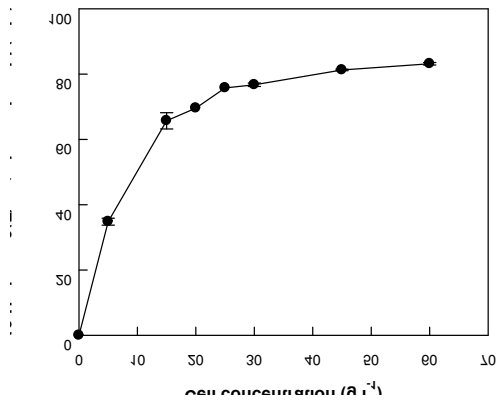


Fig. 19. Effect of detergent and optimal concentrations of Tween 40 on the activity of recombinant *L. acidophilus* linoleate 13-hydratase in *E. coli*

A



B

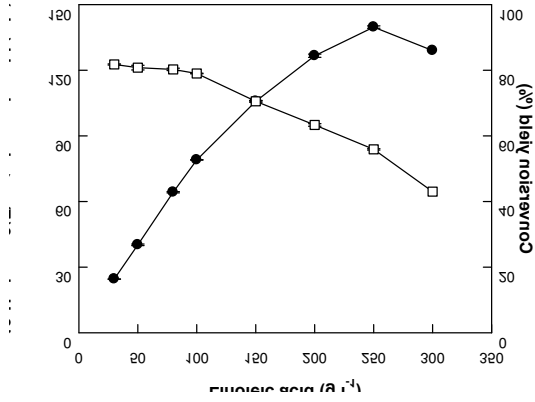


Fig. 20. Effects of cell concentration and substrate concentration on the activity of recombinant *L. acidophilus* linoleate 13-hydratase in *E. coli*

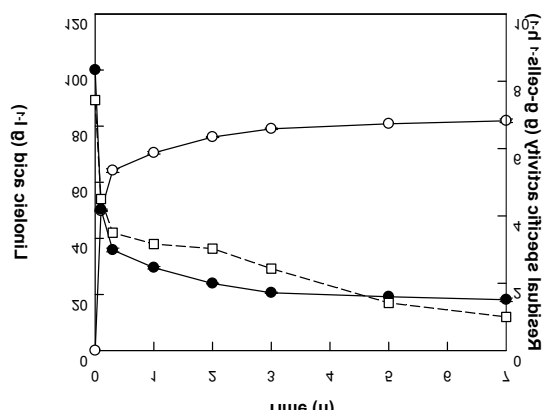


Fig. 21. Production of 13S-HOD from 100g/L of linoleic acid by recombinant *L. acidophilus* linoleate 13-hydratase in *E. coli*

마. α -Linolenic acid에서 13-hydroxy-12,15(*Z,Z*)-octadecadienoic acid 생산

(1) 산물 확인

L. acidophilus hydratase에 의한 13-hydroxy-12,15(*Z,Z*)-octadecadienoic acid의 생성을 α -linolenic acid (0.5 mM)를 기질로 60 분간 반응 시 기질의 60% 감소 및 13-hydroxy-12,15(*Z,Z*)-octadecadienoic acid 생성을 확인할 수 있음 (Fig. 22). GC-MS 분석을 통해 생성물 확인 (Fig. 23). 정제 효소에 의한 생성물인 13-hydroxy-12,15(*Z,Z*)-octadecadienoic acid에 해당하는 분자량 296.4의 존재를 확인 함.

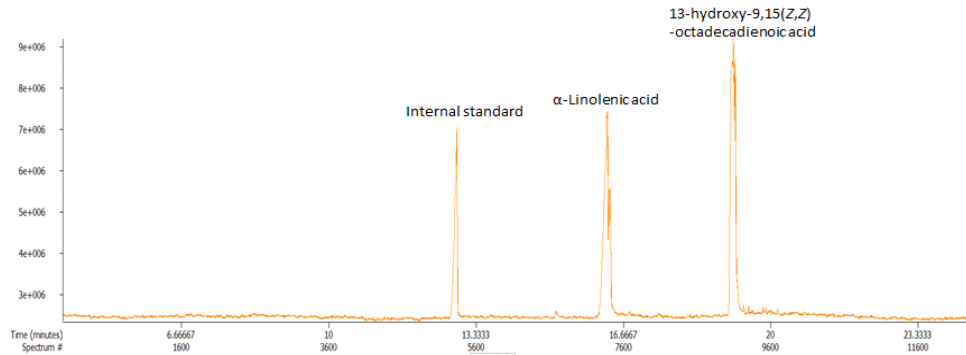


Fig. 22. GC analysis of 13-hydroxy-12,15(*Z,Z*)-octadecadienoic acid formation from α -linolenic acid by *L. acidophilus* linoleate 13-hydratase.

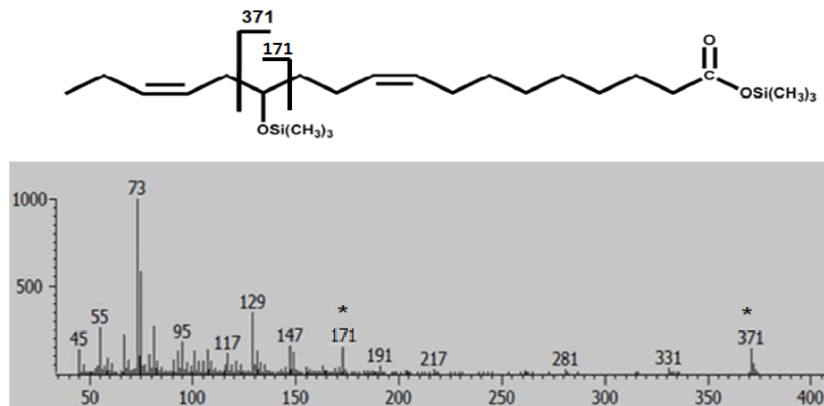


Fig. 23. GC mass analysis of 13-hydroxy-12,15(*Z,Z*)-octadecadienoic acid from α -linolenic acid by *L. acidophilus* linoleate 13-hydratase.

(2) 생산성 향상을 위한 cell permeabilization

L. acidophilus hydratase를 포함하는 permeabilization recombinant cell conversion에 의한 13-hydroxy-12,15(*Z,Z*)-octadecadienoic acid 생산 최적화를 수행함 (Fig. 24). Detergent (Fig. 24A), solvent (Fig. 24C)는 대조군 대비 큰 영향이 없음을 확인 함. 반면, salt, chemical (Fig. 24B)에서 NaCl이 대조군 대비 약 1.2배 증가 한 것으로 확인 되어, NaCl 농도별 로 확인 하였을 때 NaCl 0.2 M에서 약 1.4배 증가 된 것을 확인 함 (Fig. 24D).

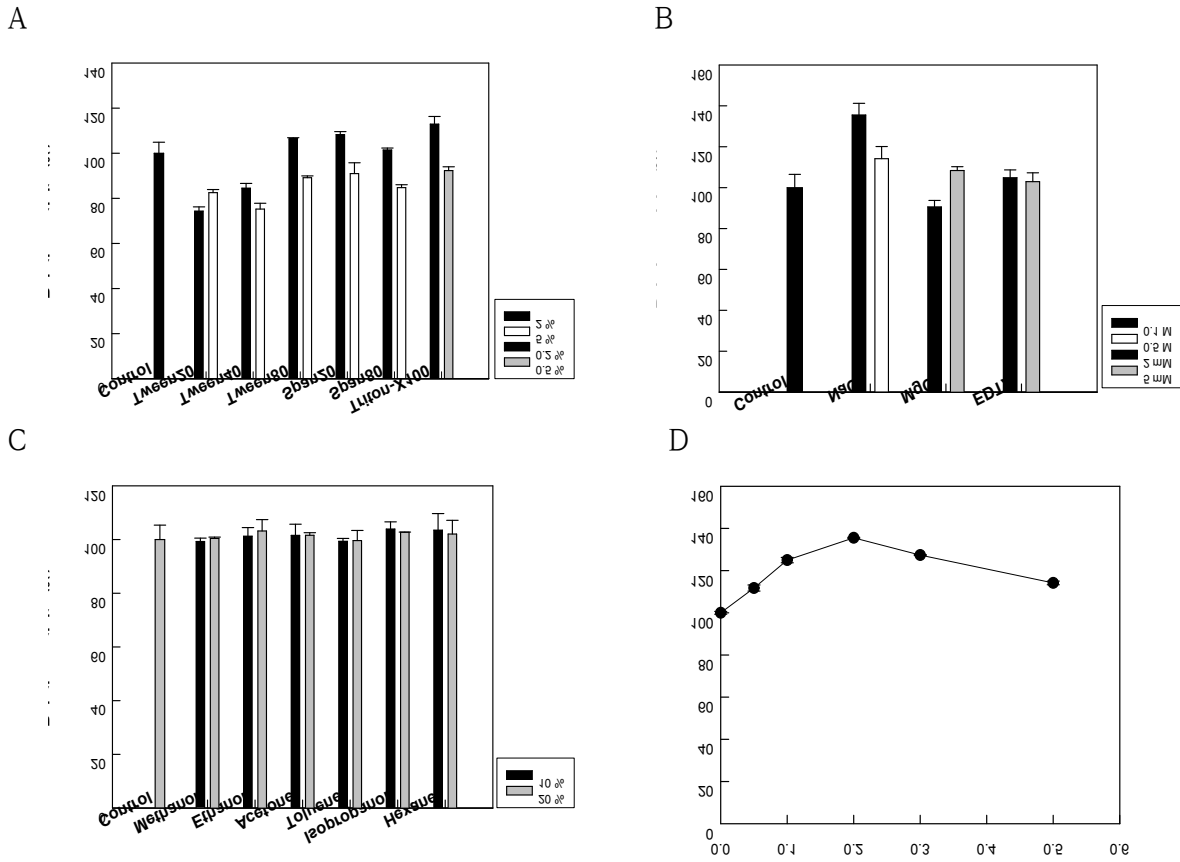


Fig. 24. Effects of detergent, salt, chemical and solvent treatments by permeabilized cells of *E. coli* expressing linoleate 13-hydratase from *L. acidophilus*

(3) pH, 온도 및 solvent 최적화

L. acidophilus hydratase를 포함하는 recombinant cell conversion에 의한 13-hydroxy-12,15 (*Z,Z*)-octadecadienoic acid 생산에 대한 pH, 온도 및 solvent의 최적화를 수행함 (Fig. 25). pH 6.0 (ctirate/phosphate, 50mM), 40 °C에서 최적 활성을 보였음 (Fig. 25A, B). 생산 최적온도는 40°C로 확인함. 지방산 hydratase에 의해 생성된 13-hydroxy-12,15 (*Z,Z*)-octadecadienoic acid 생산 최적화를 위한 solvent 효과를 조사한 결과 (Fig 26A), solvent 중 7.5 % methanol 에서 대조군 대비 1.2배 생산성 증대 확인함 (Fig 26B). 이는 기질 및 산물의 용해도 향상 및 mixing effect가 좋아진 것으로 판단 됨.

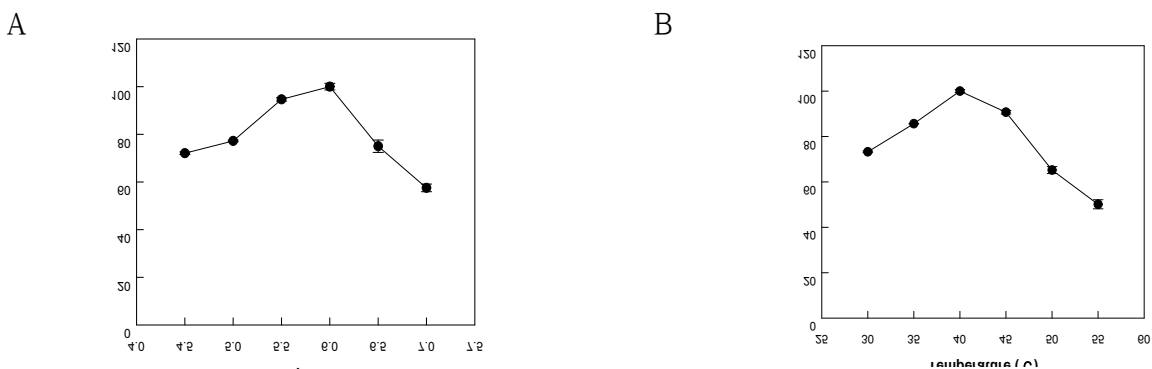
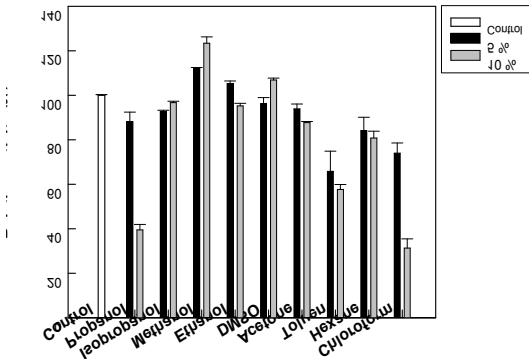


Fig. 25. Optimal pH, temperature and cell stability by permeabilized cells of recombinant *L. acidophilus* linoleate 13-hydratase in *E. coli*

A



B

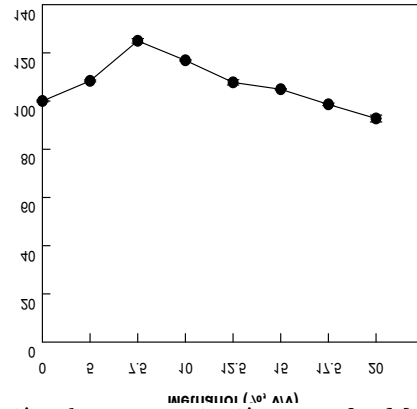
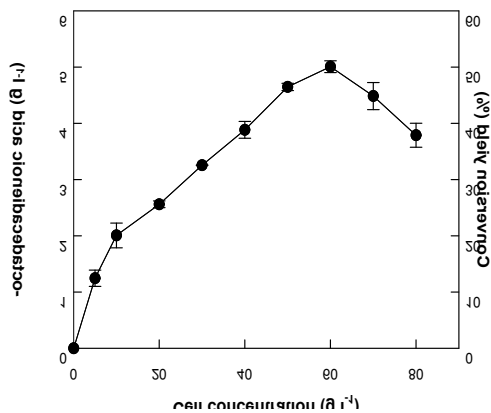


Fig. 26. Effect of detergent, solvent and optimal concentrations of Methanol by permeabilized cells of recombinant *L. acidophilus* linoleate 13-hydratase in *E. coli*

(4) 생산조건 최적화

13-Hydroxy-12,15 (*Z,Z*)-octadecadienoic acid 생산을 위한 최적의 지방산 hydratase 함유 cell 농도와 기질농도의 최적화를 수행함. Cell 농도는 α -linolenic acid 10 g/L 일 때 지방산 산화효소 60 g/L cell에서 최적을 보였고 (Fig. 27A), 기질 농도는 15 g/L α -linolenic acid에서 conversion 45% yield 와 13-hydroxy-12,15(*Z,Z*)-octadecadienoic acid 6.6 g/L를 얻었으며 그 이상 농도에선 conversion yield 대비 product 양의 비율이 기질 15 g/L와 차이가 없으므로 기질 농도는 15 g/L로 최적화 결정함 (Fig. 27B). 지방산 hydratase에 의한 13-hydroxy-12,15 (*Z,Z*)-octadecadienoic acid 생산을 수행함. 60 g/L cell, 15 g/L α -linolenic acid를 기질로 pH 6.0, 40 °C, 7.5 %(*v/v*) methanol 첨가한 상태에서 6시간 반응 시 7.5 g/L의 13-hydroxy-12,15 (*Z,Z*)-octadecadienoic acid가 전환되어 50 % conversion 과 생산 수율을 보였으며 1.25 g/L/h의 생산성을 나타냄. 또한, permeabilized cells과 non-permeabilized cells을 비교 하였을 때 permeabilized cells에서 13-hydroxy-12,15(*Z,Z*)-octadecadienoic acid의 생산이 약 1.6배 높은 생산율을 보임 (Fig. 28).

A



B

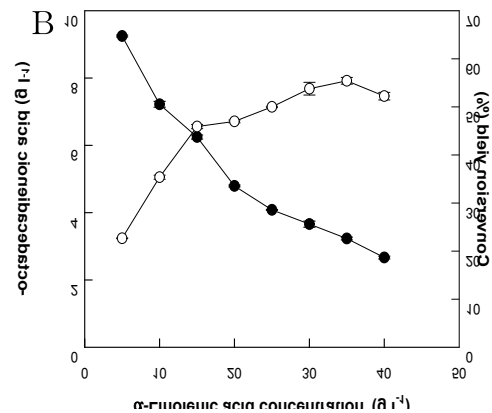


Fig. 27. Effects of cell concentration and substrate concentration by permeabilized cells of recombinant *L. acidophilus* linoleate 13-hydratase in *E. coli*

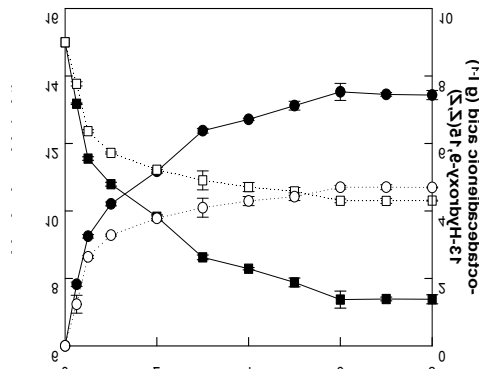


Fig. 28. Production of 13-hydroxy-12,15(Z,Z)-octadecadienoic acid by nonpermeabilized and permeabilized cells of recombinant *E. coli* under optimized conditions.

2. Fatty acid Diol synthase

. Linoleic acid로부터 5,8-dihydroxy-9Z,12Z-octadecadienoic acid 생산

Fungal 유래의 linoleate diol synthase인 PpoA를 재조합 *E. coli*에서 발현시켜 poly unsaturated fatty acid로부터 dihydro-fatty acid (diHFA)를 생산함. 먼저 diHFA를 생산할 수 있는 유전자원으로 linoleate diol synthase를 활용하고자 하였으며 linoleic acid로부터 5,8-Dihydroxy-9Z,12Z-octadecadienoic acid (5,8-diHODE) 생성함 (Fig. 1).

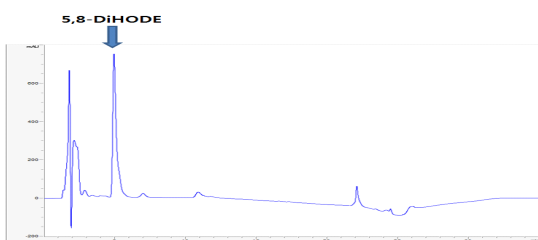


Fig. 1. Scheme of 5,8-dihydroxy-9Z,12Z-octadecadienoic acid production from linoleic acid.

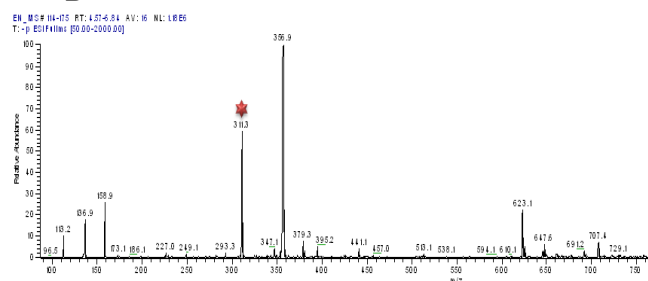
(1) 5,8-Dihydroxy-9Z,12Z-octadecadienoic acid 생성 확인

정제한 diol synthase에 의해 linoleic acid로부터 생성되는 물질을 HPLC chromatogram (Fig. 2A) 상에서 확인하였고 이를 추출 후 semi-prep. HPLC를 통해 정제하였다. 정제한 물질을 LC-ESI-M/S를 통해 질량분석 한 결과 m/z 311임을 확인하였고 이는 5,8-dihydroxy-octadecadienoic acid (5,8-diHODE)의 분자량과 동일함을 확인 (Fig. 2B). LC-MS/MS를 통해 295 peak의 full scan에서 hydroxy 부근 fragment의 분자량 173의 존재를 확인한 후 173 peak의 full scan을 통해 추가적인 peak의 존재 확인 (Fig. 2C). 이들 peak는 8-hydroxy 및 5-hydroxy 위치 주변에서의 alpha-carbon cleavage를 통해 59+115 및 179의 생성과 carboxyl group 이탈에 의해 71 및 129 peak의 생성으로 판단되어 최종 5,8-diHODE임을 확정함 (Fig. 2D, E).

A



B



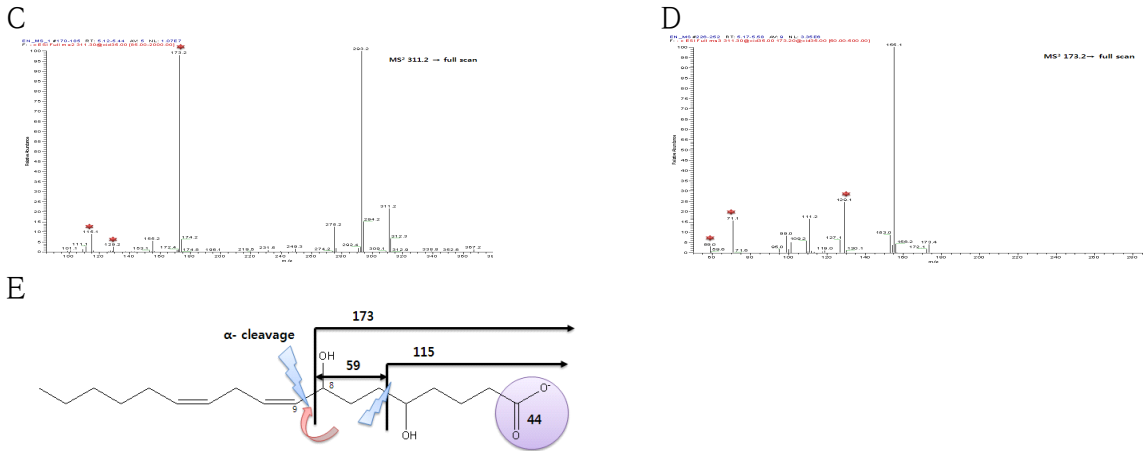


Fig. 2. HPLC chromatogram (A), LC-ESI-M/S (B), LC-ESI-MS/MS (C, D), and structure of purified 5,8-dihydroxy octadecadienoic acid (5,8-diHODE) from linoleic acid by diol synthase.

(2) 5,8-diHODE 생산 최적화를 위한 통기 및 교반 효과

5,8-DiHODE를 대량생산하기 통기 (aeration) 및 교반 (agitation) 효과를 확인. 그 결과 교반한 것이 통기시킨 것 보다 효과가 좋았으며 200-250 rpm 이상에서는 비슷한 효과를 확인 (Fig. 3A, B). 이는 용매 첨가효과와 함께 기질과 효소의 접촉 향상 및 mixing effect가 향상된 것으로 판단됨.



Fig. 3. Effect of (A) aeration and agitation (B) optimal agitation speed for the production of 5,8-diHODE from linoleic acid by 5,8-diol synthase from *A. nidulans*.

(3) 최적 조건에서의 5,8-diHODE 생산

5,8-diHODE 생산을 위한 최적 조건 (cell 25 g/L, linoleic acid 5 g/L, pH 7.5, 35°C, 20% DMSO, 교반속도 250 rpm)에서 2시간 30분 반응 시 최종 product인 5,8-DiHODE를 4,98 g/L를 확보하였으며 99%의 수율을 보였고 2.5 g/L/h의 생산성을 나타냄 (Fig. 4).

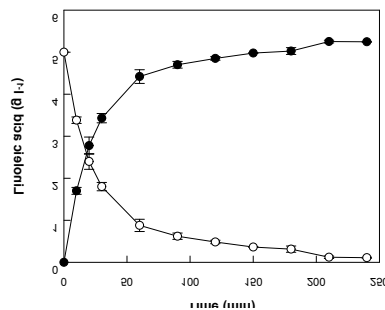


Fig. 4. Time-course reactions for the production of 5,8-diHODE from linoleic acid by 5,8-diol synthase from *A. nidulans*.

나. α -Linolenic acid로부터 5,8-dihydroxyoctadecatrienoic acid (5,8-diHOTrE) 생산

A. nidulans 유래의 5,8-diol synthase를 포함한 대장균 전세포 (whole cell) 반응을 이용하여 α -linolenic acid로부터 5,8-dihydroxy-octadecatrienoic acid를 생산 (Fig. 5).

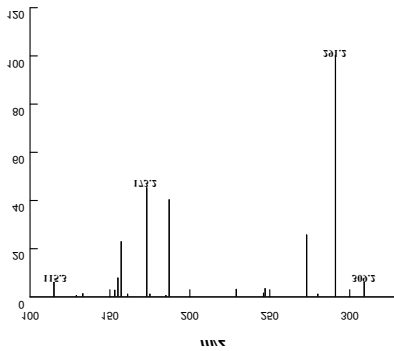


Fig. 5. Scheme of 5,8-dihydroxy-octadecatrienoic acid production from α -linolenic acid.

(1) LC-MS/MS를 이용한 5,8-dihydroxy-9Z,12Z,15Z-octadecatrienoic acid (5,8-diHOTrE)의 구조

α -Linolenic acid로부터 생성된 5,8-diHOTrE의 구조를 규명하고자 LC-MS를 통해 확인 한 결과 총 분자량인 309 peak를 이용하여 LC-MS/MS를 확인 한 결과 173, 115의 peak를 통해 α -linolenic acid의 α -carbon으로부터 C₅ 및 C₈에 hydroxylation 됨을 확인 (Fig. 6A, B)).

A



B

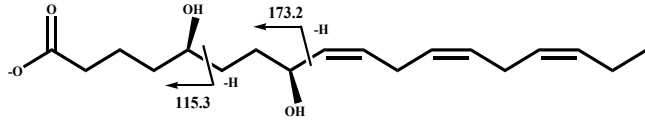


Fig. 6. LC-MS/MS spectrum (A) and structure (B) of 5,8-dihydroxy-9Z,12Z,15Z-octadecatrienoic acid (5,8-diHOTrE) from α -linolenic acid.

(2) α -Linolenic acid로부터 5,8-DiHOTrE 생산

선행 실험들의 결과들을 바탕으로 40 °C, pH 7.0, recombinant whole cell 40 g/L, α -linolenic acid 12 g/L, 5% DMSO, 250 rpm에서 100 min동안 time-course 실험 진행 결과 100 min 동안 약 9.1 g/L의 5,8-diHOTrE를 생성하는 것을 확인하였고 75 %의 conversion yield와 5.5 g/L/h의 productivity를 나타내는 것을 확인하였고 (Fig. 7). 또한, 100 min동안 약 1.4 g/L 중간물질인 8-HPOTrE이 형성되는 것도 확인하였음.

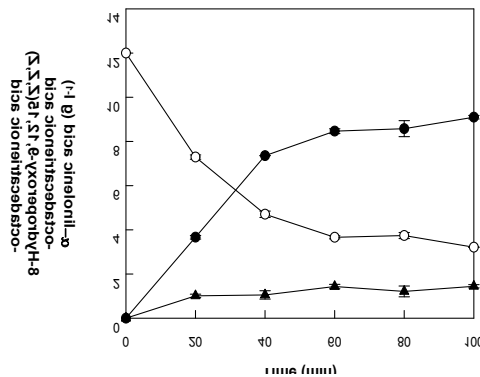


Fig. 7. Time course reactions for the production of 5,8-diHOTrE from α -linolenic acid by 5,8-diol synthase from *A. nidulans*.

다. Oleic acid로부터 5,8-dihydroxyoctadecenoic acid (5,8-diHOME) 생산

A. *nidulans* diol synthase 효소를 이용하여 oleic acid로부터 5,8-diHOME를 생산하고자 하였으며 그 scheme은 그림과 같음 (Fig. 8).



Fig. 8. Scheme of 5,8-dihydroxy-octadecenoic acid production from oleic acid.

(1) LC-MS/MS를 이용한 oleic acid로부터 5,8-dihydroxy-octadecenoic acid의 구조 확인

Oleic acid로부터 생성된 5,8-dihydroxy-octadecenoic acid (5,8-diHOME)의 구조를 규명하고자 LC-MS를 통해 확인 한 결과 총 분자량인 313 peak를 이용하여 LC-MS/MS를 확인 한 결과 173, 115의 peak를 통해 C₅ 및 C₈에 hydroxylation 됨을 확인하였음 (Fig. 9A, B).

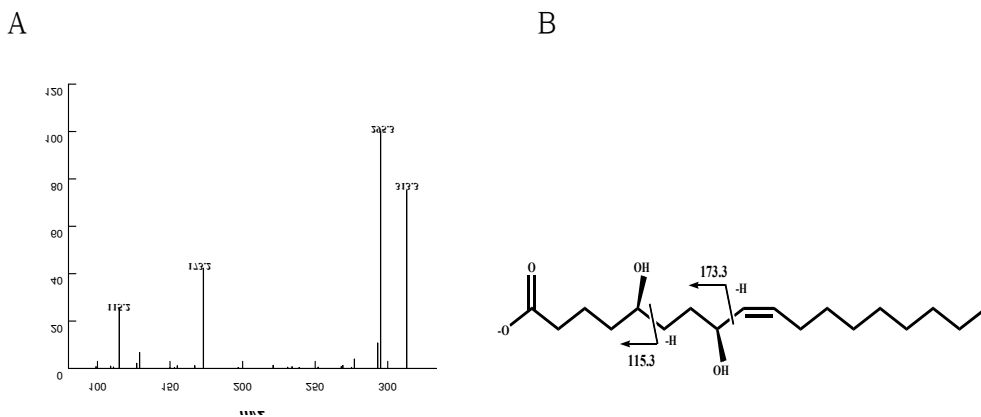


Fig. 9. LC-MS/MS spectrum and structure of 5,8-dihydroxyoctadecenoic acid (5,8-diHOME) from oleic acid.

(2) Oleic acid로부터 5,8-DiHOME 생산

선행결과들을 바탕으로 지방산 이수산화 효소에 의한 5,8-diHOME의 40 °C, pH 7.5, 10 % DMSO, 250 rpm, 35 g/L recombinant cell, 12 g/L oleic acid를 이용하여 생산하였다. 1 시간 반응결과 5.2 g/L 5,8-diHOME를 생산하였고 47 %의 conversion yield와 5.2 g/L/h의 productivity를 보이는 것을 확인하였음 (Fig. 10).

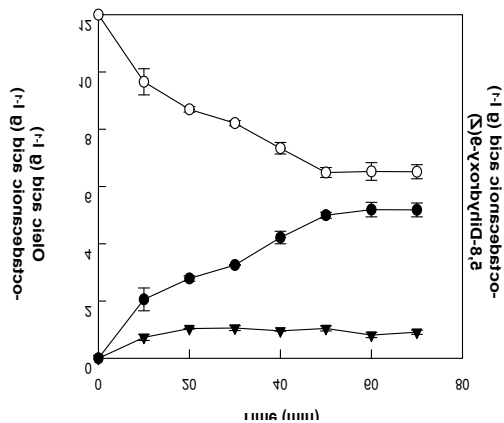


Fig. 10. Time course reactions for the production of 5,8-diHOME from oleic acid by 5,8-diol synthase from *A. nidulans*.

5. Linoleic acid로부터 8-hydroxy octadecadienoic acid 생산

(1) 효소 유전자의 클로닝 및 발현

*Aspergillus nidulans*의 cDNA로부터 linoleate diol synthase를 확보하고 이 중 C-terminal의 P450 유전자를 Cys1004 및 H1006 잔기를 각각 serine과 alanine으로 site-directed mutagenesis (SDM)를 통해 N-terminal의 heme-oxygenase의 활성에 의해 단일 수산화지방산이 생성하도록 하였음 (Fig. 11). Sequencing을 통해 SDM 성공여부를 확인한 결과 SDM이 이루어진 것을 확인하였음 (Fig. 12). Cloning된 유전자를 Gibson assembly 방법으로 pET-21a(+) vector에 cloning한 후 대장균에서 발현여부를 확인한 결과 soluble한 단백질을 확인하였고 성공적으로 정제도 이룸 (Fig. 13).

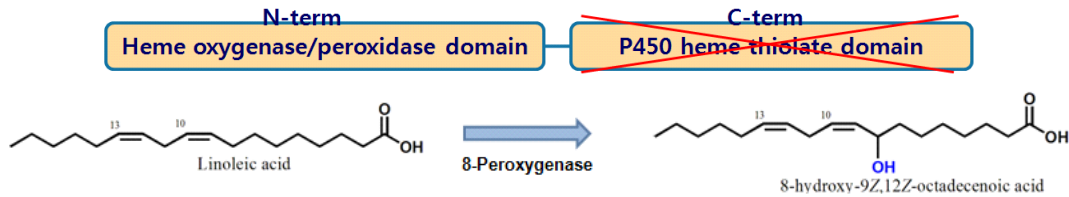


Fig. 11. Scheme of conversion linoleic acid to 8-hydroxy-10Z,12Z-octadecadienoic acid.

```

SDM  ACTTTGGCTTTGGGCCCCACAAGTGTGGGCTTAGACCTATGCAAGACAGGGCTGAGCA
      ACTTTGGCTTTGGGCCCCGCAAGAGTTTGGGCTTAGACCTATGCAAGACAGGGCTGAGCA
      *****

      CGATGCTAAAAGTACTTGGACGCTTGGACAATCTCCGTCGTGCTCCTGGAGCGCAGGGAC
      CGATGCTAAAAGTACTTGGACGCTTGGACAATCTCCGTCGTGCTCCTGGAGCGCAGGGAC
      *****

      AGTTGAAGAAGCTTTCTGGACCTGGCGGGATCGCTAAGTATATGAATGAGGATCAAAGCG
      AGTTGAAGAAGCTTTCTGGACCTGGCGGGATCGCTAAGTATATGAATGAGGATCAAAGCG
      *****

      GCITCACTCCCTTCCCGTCAACTATGAAGATCCAATGGGACGGCGAATTGCCCAACTGA
      GCITCACTCCCTTCCCGTCAACTATGAAGATCCAATGGGACGGCGAATTGCCCAACTGA
      *****

      AGGAAGATTTT
      AGGAAGATTTT
      *****
  
```

Fig. 12. Sequencing result of site-directed mutagenesis .

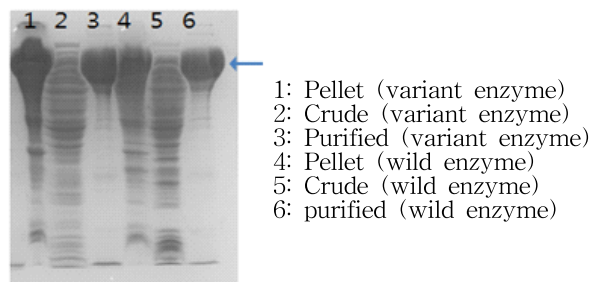


Fig. 13. Expression of linoleate diol synthase variant to produce 8-hydroxy-10Z,12Z-octadecadienoic acid.

(2) 8-HODE 확인

A. nidulans FGSC A4 의 PpoA(linoleate diol synthase) 유전자를 cloning하여 site-directed mutagenesis를 통해 H1004A, C1006S로 치환된 double-site variant (H100A, C1006S)를 제조하고 *Escherichia coli*에서 발현시킴. 정제한 diol synthase variant 에 의해 linoleic acid로부터 생성되

는 물질을 HPLC chromatogram(Fig. 13A) 상에서 확인하였고 이를 추출 (ethyl acetate, 2회) 한 후 silicic acid column chromatography를 통해 chloroform/MeOH로 용출하여 정제함. 정제한 물질을 LC-ESI-M/S를 통해 질량분석 한 결과 m/z 295임을 확인하였고 이는 8-hydroxy-9Z,12Z-octadecadienoic acid(8-HODE)의 분자량과 동일함을 확인하였고 LC-MS/MS를 통해 295 peak의 full scan에서 hydroxy 부근 fragment의 분자량 157의 존재를 확인한 후 157 peak의 full scan을 통해 최종적으로 8-HODE임을 확정하였고 그 구조를 나타냄 (Fig. 13 B, C).

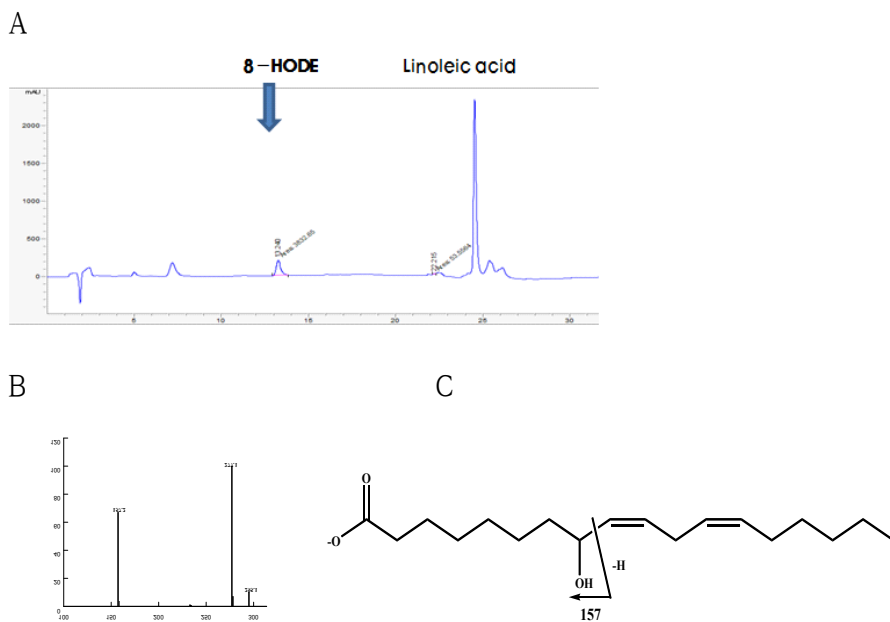


Fig. 13. Identification of the 8-hydroxy-9Z,12Z-octadecadienoic acid(8-HODE). A. HPLC chromatogram of purified 8-HODE from linoleic acid. B. LC-ESI-MS/MS of purified 8-hydroxy octadecadienoic acid (8-HODE). C. Structure of 8-HODE.

(3) 전세포에서의 기질별 활성 및 상대적 기질특이성 분석

향후 생산을 위해 diol synthase double-site variant의 활성 및 상대적 기질 특이성을 recombinant *E. coli*에 전세포 (recombinant whole cell)반응을 통해 분석함 (Table 1). 탄소 수 16개인 불포화지방산인 palmitoleic acid와 탄소 수 18개인 불포화지방산들 중 이중결합 수가 하나에서 세 개 존재하는 oleic acid, linoleic acid, alpha-linolenic acid에 대해 활성을 나타내며 이중결합이 없는 stearic acid, 수산화기를 하나 가진 ricinoleic acid, 탄소 수 22개인 erucic acid에 대해서는 활성이 없음. 활성 (specific activity)은 linoleic acid > palmitoleic acid > α -linolenic acid > oleic acid 순으로 나타나 가장 높은 활성을 나타내는 linoleic acid가 주 기질임을 확인하여 향후 생산에서 linoleic acid를 주로 사용.

Table. 1. Specific activity of double-site variant (H100A, C1006S) of diol synthase from *A. nidulans* for fatty acids as substrates.

Substrate	Product	Specific activity (mmol g cells ⁻¹ min ⁻¹)
Palmitoleic acid (16 :1, Δ^{9Z})	8-Hydroxy-9(Z)-hexadecenoic acid	333 ± 30
Stearic acid (18:0)	NA	NA
Oleic acid (18:1, Δ^{9Z})	8-Hydroxy-9(Z)-octadecenoic acid	103 ± 0.2
Ricinoleic acid (18:1-OH, Δ^{9Z})	NA	NA
Linoleic acid (18:2, $\Delta^{9Z,12Z}$)	8-Hydroxy-9,12(Z,Z)-octadecadienoic acid	855 ± 14.4
α -Linolenic acid (18:3, $\Delta^{9Z,12Z,15Z}$)	8-Hydroxy-9,12,15(Z,Z,Z)-octadecadienoic acid	215 ± 3.0
Erucic acid (C22:1, Δ^{13Z})	NA	NA

(4) 전세포반응에서 8-HODE 생산

이상의 최적 조건하에서 8-HODE 생산을 실시하고 시간별로 생산량을 측정함. 그 결과 6 g/L (21.4 mM)의 linoleic acid를 기질로 pH 8.0, 35°C, 25% DMSO, 교반속도 200 rpm에서 1시간 반응 시 30% conversion과 생산 수율을 보였으며 1.8 g/L/h의 생산성을 나타냄 (Fig. 14 A-C).

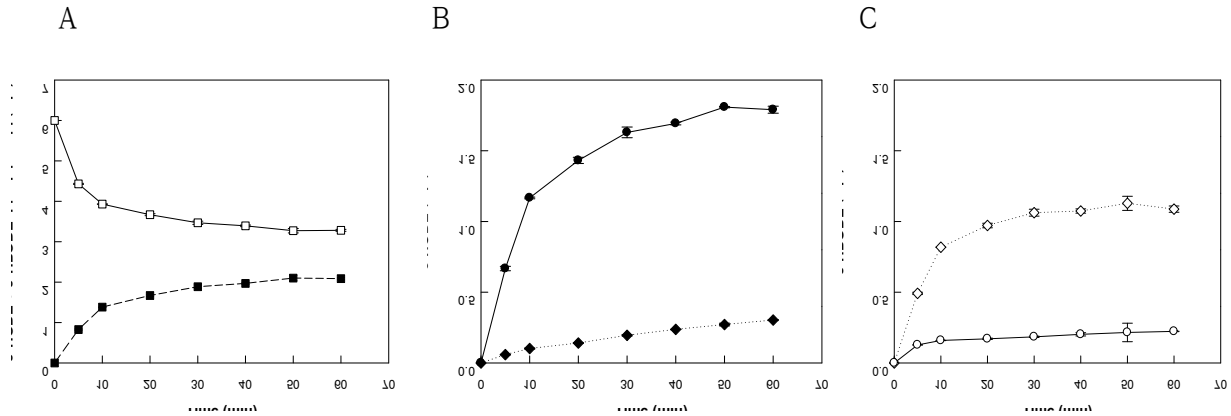


Fig. 14. Production of 8-HODE using double-site variant (H100A, C1006S) of diol synthase from *A. nidulans*. 6 g/L (21.4 mM) linoleic acid was supplemented. A: Production of 8-HOD plus 8-HPOD from linoleic acid, B: Production of 8-HOD from linoleic acid, C: Production of 8-HPOD from linoleic acid

라. 7,8-Dihydroxy-octadecadienoic acid (7,8-diHODE)생산

(1) Cloning, expression, purification of 7,8-diol synthase

신규 지방 이수산화 생산효소 확보: 기존의 확인된 5,8-diol synthase와 8,11-diol synthase를 제외하고 위치별 지방산 이수산화를 위하여 7,8-diol synthase를 확보하기 위하여 노력한 결과 *Glomerella cingulate* 유래의 지방 이수산화를 cloning하여 protein expression시켜 SDS-PAGE를 이용하여 확인한 결과 127 kDa 부근에서 expression되는 것을 확인하였고 7,8-diol synthase의 molecular mass를 확인한 결과 tetramer임을 확인하였음 (Fig. 15).

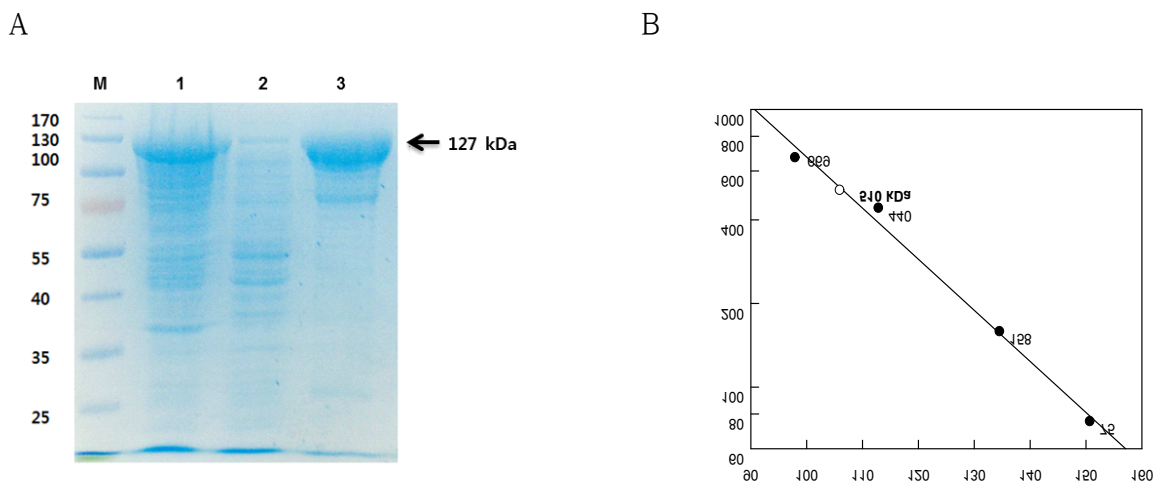


Fig. 15. SDS-PAGE analysis and molecular mass determination of the 7,8-diol synthase from *Glomerella cingulate*. (A) SDS-PAGE analysis of purified enzyme from each purification step. Lane1, molecular mass markers; lane2, Pellet; lane3, Crude enzyme; lane4, His-Trap column product (purified enzyme). (B) Molecular mass of the 7,8-diol synthase from *G. cingulate* using gel filtration with reference proteins.

(2) *G. cingulate* 유래 지방 이수산화효소 기질특이성 확인

G. cingulate 유래 지방산 이수산화효소의 활성 및 상대적 기질 특이성 분석함 (Table 2): *G. cingulate* 유래 지방산 이수산화효소는 탄소 수 16, 18, 20개인 불포화지방산들 중 이중결합 수가 하나이상 존재하는 palmitoleic acid, oleic acid, linoleic acid, alpha-linolenic acid, arachidonic acid에 대해 활성을 나타내며 활성 정도는 효소가 linoleic acid > α -linolenic acid > oleic acid > palmitoleic acid > arachidonic acid순으로 나타났으며 가장 높은 활성을 나타내는 linoleic acid가 주 기질임을 확인함.

Table. 2 Specific activity of 7,8-diol synthase from *G. cingulate* for polyunsaturated fatty acids as substrates.

Substrate	Major product	N-terminal domain				Whole enzyme			
		Specific activity ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)	Specific activity ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)
Palmitoleic acid	8-HPMME, 7,8-DiHMME	1.92	30.5	21.2	0.69	0.39	48.0	4.86	0.10
Oleic acid	8-HPOME, 7,8-DiHOME	2.29	29.3	24.7	0.84	0.48	33.3	5.62	0.17
Linoleic acid	8-HPODE, 7,8-DiHODE	3.89	19.3	35.0	1.82	0.87	22.3	6.58	0.37
Conjugated linoleic acid	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
α -Linolenic acid	8-HPOTrE, 7,8-DiHOTrE	2.81	26.4	25.1	0.95	0.75	37.1	10.5	0.34
Eicosenoic acid	8-HPEME	1.39	32.4	22.0	0.68	NA	NA	NA	NA
Eicosadienoic acid	8-HPEDE	1.20	31.9	17.7	0.56	NA	NA	NA	NA
Dihomo- γ -linolenic acid	8-HPETrE	1.18	36.8	17.2	0.47	NA	NA	NA	NA
Arachidonic acid	8-HPETE	1.17	35.8	18.2	0.51	NA	NA	NA	NA
Docosapentaenoic acid	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Docosahexaenoic acid	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

NA No Activity

(3) *G. cingulate* 유래 지방 이수산화효소 product 확인

G. cingulate 유래의 7,8-diol synthase를 이용하여 불포화 지방산을 이용한 생산물에 대한 HPLC 결과를 분석하였음 (Fig. 16) 탄소 수 16개인 palmitoleic acid를 이용하였을 때 7,8-dihydroxyhexadenoic acid (7,8-diHHME)가 생성되는 것을 확인하였고, 탄소 수 18개의 oleic acid, linoleic acid, α -linolenic acid를 이용하였을 때 각각 7,8-dihydroxyoctadenoic acid (7,8-diHOME), 7,8-dihydroxyoctadecadienoic acid (7,8-diHODE), 7,8-dihydroxyoctadecatrienoic acid (7,8-diHOTrE)로 전환되는 것을 확인하였으며 탄소 수 20개인 arachidonic acid를 이용하였을 때는 8-hydroxyeicosatetraenoic acid (8-HETE)가 생성되는 것을 확인하였음.

G. cingulate 유래의 7,8-diol synthase이용하여 생성된 products에 대한 identification을 위하여 LC-MS/MS를 진행한 결과 palmitoleic acid, oleic acid, linoleic acid, α -linolenic acid를 이용하였을 때 생성되는 생산물들의 경우 C7, C8번 위치에 hydroxylation 되는 것을 확인하였으며 (Fig. 17A, B, C, D), arachidonic acid의 경우 C8번 위치에만 hydroxylation되는 것을 확인하였음.

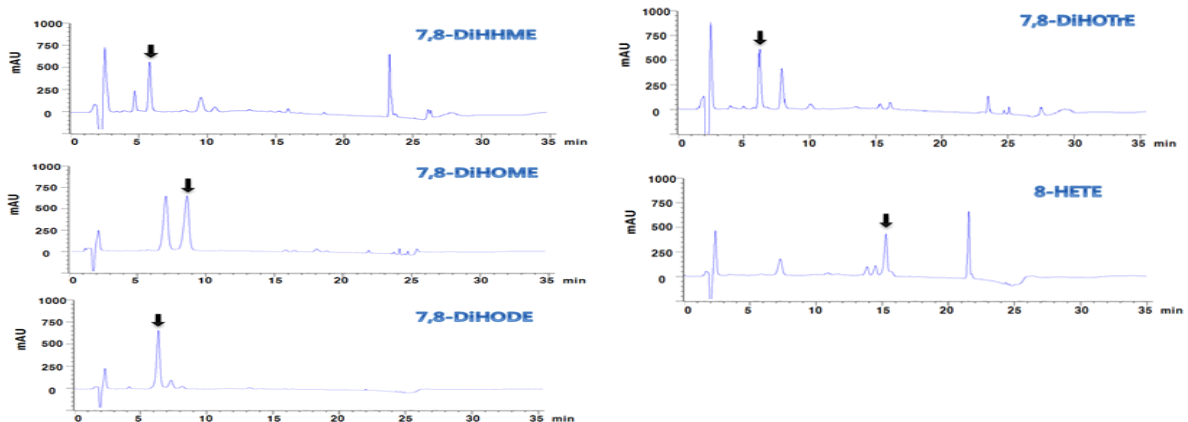


Fig. 16. HPLC chromatogram of the products obtained from fatty acids by 7,8-diol synthase from *G. cingulate*.

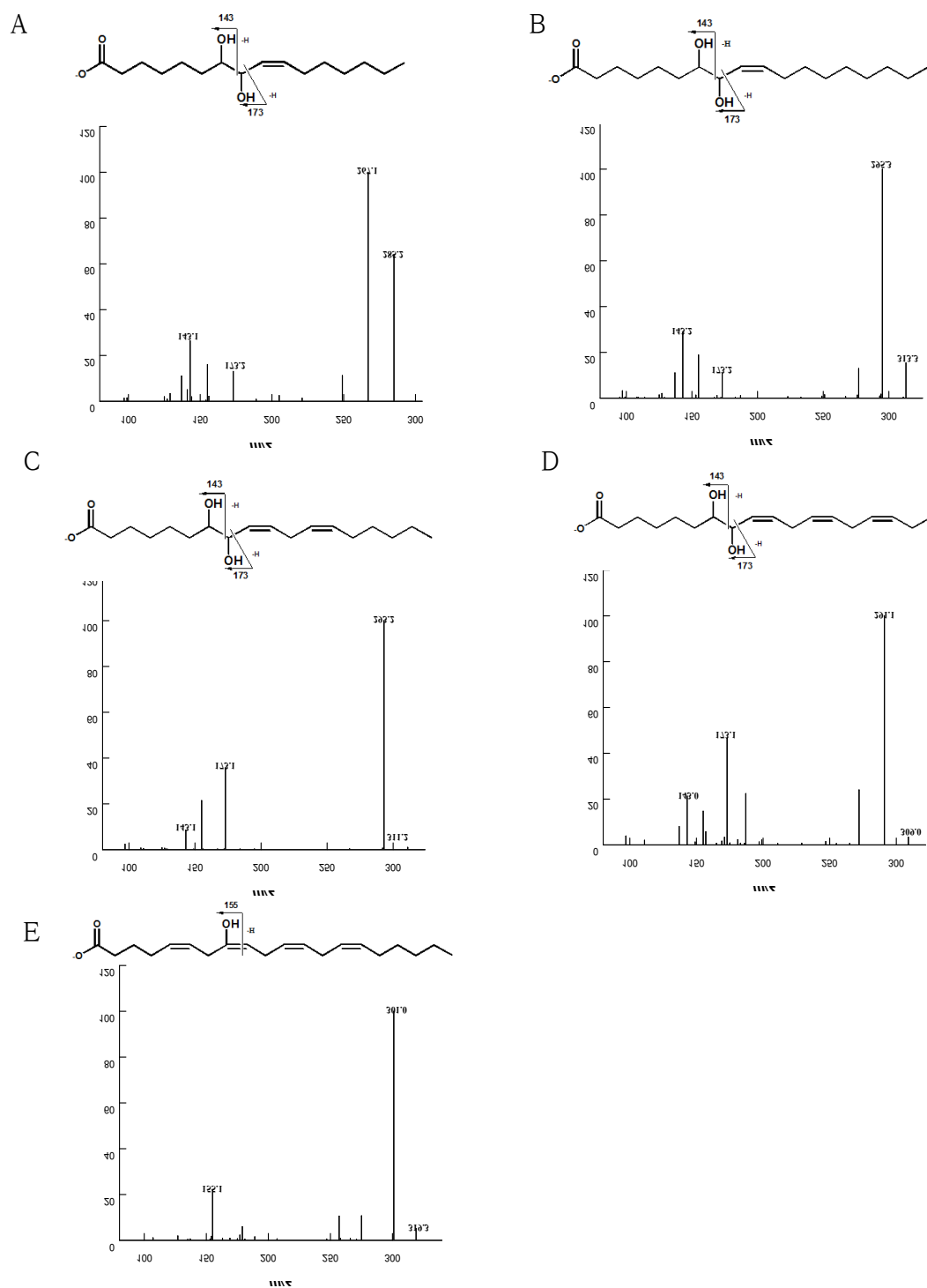


Fig. 17. LC-MS/MS spectrum of the reaction products obtained from the conversion of fatty acids by 7,8-diol synthase from *G. cingulate*.

(4) 7,8-Dihydroxy fatty acids (7,8-diHFA)생산

(가) 7,8-DiHFA 생산을 위한 최적조건 확인

G. cingulate 유래의 7,8-diol synthase를 이용하여 7,8-diHFA를 생산하기 위한 최적조건을 확인하기 위하여 기질특이성이 가장 높았던 linoleic acid를 이용하여 조건을 확인하였으며, 생산을 위한 최적조건 확인은 response surface methodology (RSM)을 이용하여 3가지 factor의 상관관계를 확인한 결과 pH 7.0, 20°C, 5% DMSO가 최적 조건임을 확인함 (Fig. 18).

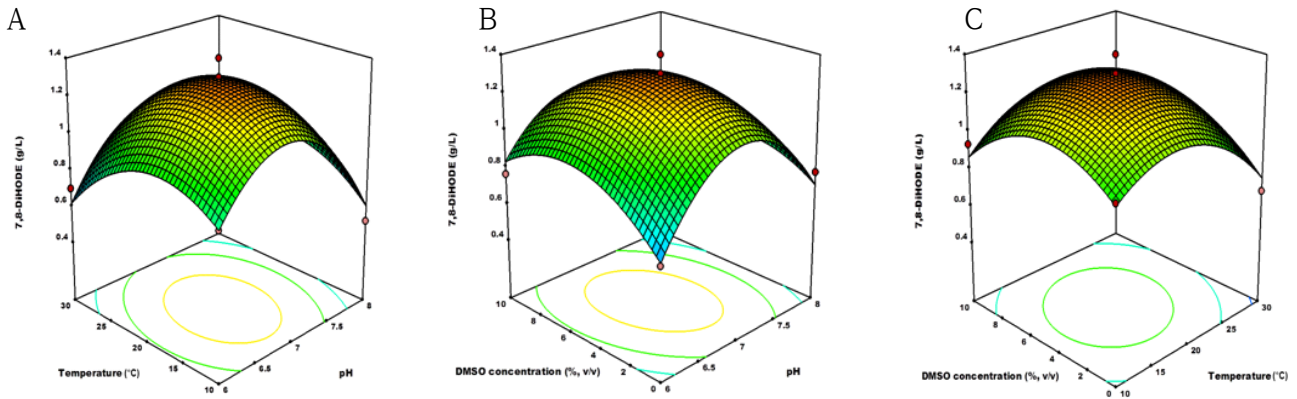


Fig. 18. Effects of temperature, pH, and DMSO concentration for the production of 7,8-dihydroxy-9,12(*Z,Z*)-octadecadienoic acid from linoleic acid by 7,8-diol synthase from *G. cingulate*.

(나) 7,8-DiHFA 생산을 위한 최적 cell, 기질 및 agitation speed 조건 확인

G. cingulate 유래의 7,8-diol synthase를 이용하여 7,8-diHFA를 생산하기 위한 cell, 기질 및 agitation speed 조건에 대한 상관관계를 RSM을 통하여 확인한 결과 최적 cell농도는 46 g/L, 기질 14 g/L, 233 rpm에서 최적임을 확인하였음 (Fig. 19).

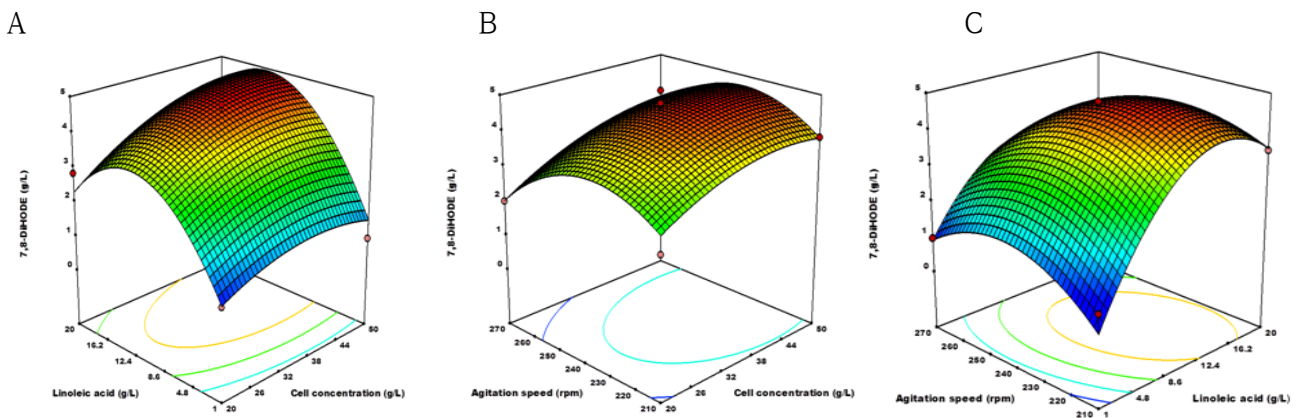


Fig. 19. Effects of cells and linoleic acid concentrations, and agitation speed for the production of 7,8-dihydroxy-9,12(*Z,Z*)-octadecadienoic acid from linoleic acid by 7,8-diol synthase from *G. cingulate*.

(다) 7,8-DiHFA 생산

7,8-Diol synthase를 이용하여 linoleic acid를 이용하여 7,8-dihydroxy-9,12(*Z,Z*)-octadecadienoic acid (7,8-diHODE)생산의 최적조건인 cell 46 g/L, 기질 14 g/L, 233 rpm에서 linoleic acid와 oleic acid, α -linolenic acid를 기질로 하여 time-course를 진행하여 7,8-dihydroxy-9(*Z*)-octadecenoic acid (7,8-diHOME)와

7,8-dihydroxy-9,12,15(*Z,Z,Z*)-octadecatrienoic acid (7,8-diHOTrE)를 생산한 결과 linoleic acid를 기질로 하였을 때에는 total 68%의 conversion yield와 9.6 g/L의 total product 생산하였고 그 중 6.4 g/L의 7,8-diHODE를 생산하여 4.3 g/L/h의 productivity와 46%의 conversion yield를 보이는 것을 확인하였으며 (Fig. 20A), oleic acid를 기질로 하였을 때에는 total 53%의 conversion yield와 7.4 g/L의 total product 생산하였고 그 중 6.3 g/L의 7,8-diHODE를 생산하여 3.2 g/L/h의 productivity와 45%의 conversion yield를 보이는 것을 확인하였고 (Fig. 20B), α -linolenic acid를 기질로 하였을 때에는 total 53%의 conversion yield와 9.6 g/L의 total product 생산하였고 그 중 6.4 g/L의 7,8-diHODE를 생산하여 4.3 g/L/h의 productivity와 46%의 conversion yield를 보이는 것을 확인하였음 (Fig. 20C).

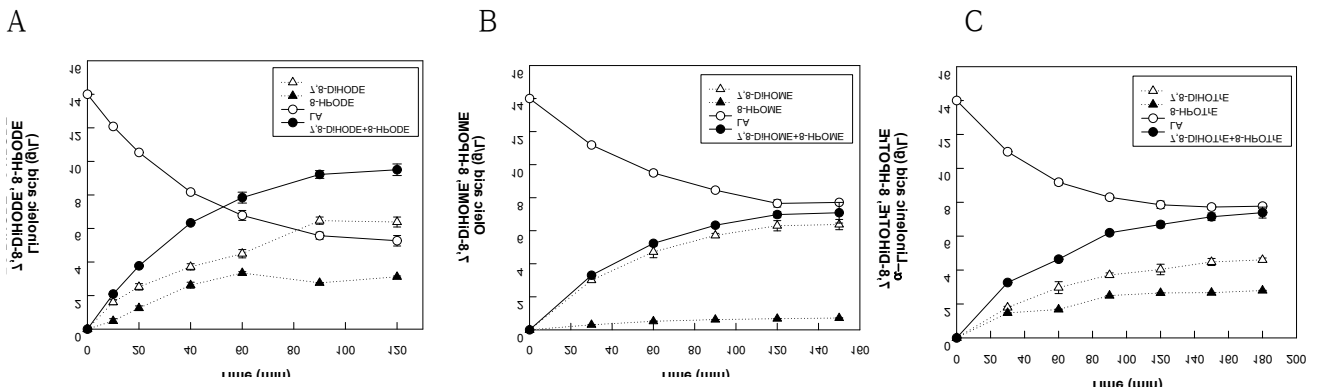


Fig. 20. Time course reactions for the production of 7,8-dihydroxy fatty acids. (A) Production of 7,8-diHODE from linoleic acid by 7,8-diol synthase from *G. cingulate*. (B) Production of 7,8-diHOME from oleic acid by 7,8-diol synthase from *G. cingulate*. (C) Production of 7,8-diHOTrE from α -linolenic acid by 7,8-diol synthase from *G. cingulate*.

3. Lipoxygenase

가. Linoleic acid에서 9*R*-hydroxy-10,12(*E,Z*)-octadecadienoic acid 생산

Blue green algae의 일종인 *Nostoc* sp. 유래 lipoxygenase를 이용하여 linoleic acid로부터 전환되는 9-hydroperoxy-10,12(*E,Z*)-octadecadienoic acid는 9번 탄소에 -OH기를 가지며, 두 개의 이중결합이 있어, δ -dodecalactone의 전구체로 이용될 수 있음 (Fig. 1).

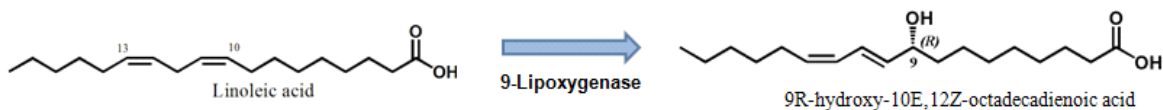


Fig. 1. Scheme of conversion of linoleic acid to 9*R*-hydroperoxy-10,12(*E,Z*)-octadecadienoic acid by linoleic acid 9-lipoxygenase

(1) 효소 유전자의 클로닝 및 발현

Nostoc sp. SAG 25.82 (culture collection of algae, SAG, Goettingen, Germany)의 genomic DNA에서 forward primer (*NdeI*) 5'-ACCATATGCAGTATTTGTATGGAAGTAAGGAT-3'와 reverse primer (*XhoI*) 5'-CACTCGAGTAAATGTTGATACTCATCATGAG-3'를 사용하여 *NdeI*, *XhoI*을 linker로 expression vector인 pET-15b에 cloning하였음. Cloning 한 pET-15b + *Nostoc* lox plasmid를 *E.coli* ER2566에 도입한 뒤 IPTG를 통한 induction을 한 결과 발현된 것을 확인할 수 있었고 이것을 IMAC affinity column을 통해 정제하여 lipoxygenase 효소를 얻음 (Fig. 2A). *Nostoc* lox의 활성을 lipoxygenase가 생성하는 conjugate diene (cis-trans or trans-cis)을 이용하여 간단하게 spectrophotometer (235nm)에서 생성물의 증가를 확인할 수 있었고 일정하고 안정된 활성을 나타내었음 (Fig. 2B).

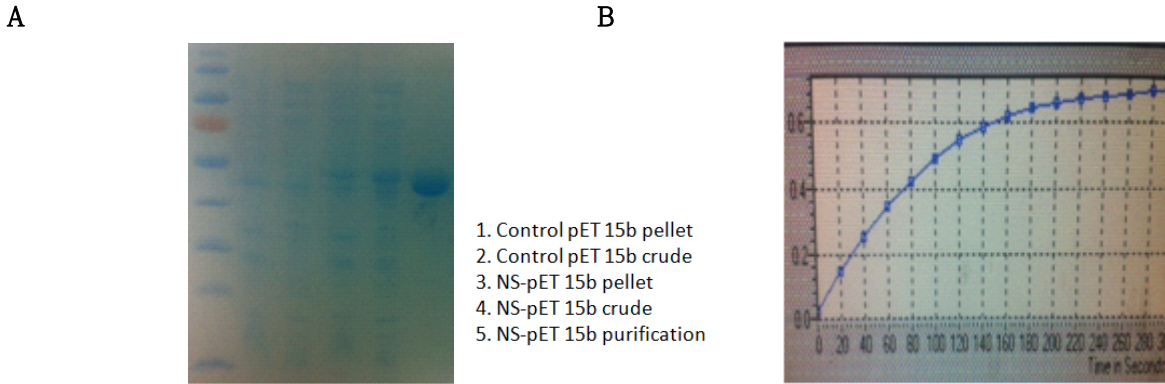


Fig. 2. Expression of lipoxigenase from *Nostoc* sp. (A) and its activity (B).

(2) *Nostoc* sp. 유래 9*R*-lipoxigenase를 이용한 9*R*-hydroxy-10*E*,12*Z*-octadecadienoic acid (9*R*-HODE) 생성 확인 및 분석

Linolate 9-lipoxigenase의 활성을 정제효소와 재조합 전세포를 비교한 결과 전 세포반응이 우수하므로 전세포반응을 이용하여 linoleic acid로부터 9*R*-hydroxy-10,12(*E,Z*)-octadecadienoic acid (9*R*-HODE)를 생산. 전 세포 반응 후 반응물의 생성여부를 HPLC로 확인한 결과 hydroxy 지방산과 hydroperoxy-지방산이 함께 생성되며 이를 적절한 환원제로 환원할 경우 hydroxy 지방산만 생성되는 것을 9*R*-HODE 표준품과 대조군 (가장아래)을 이용 비교하여 확인 (Fig. 3A). LC-MS/MS를 통해 9*R*-HODE임을 확정함 (Fig. 3B).

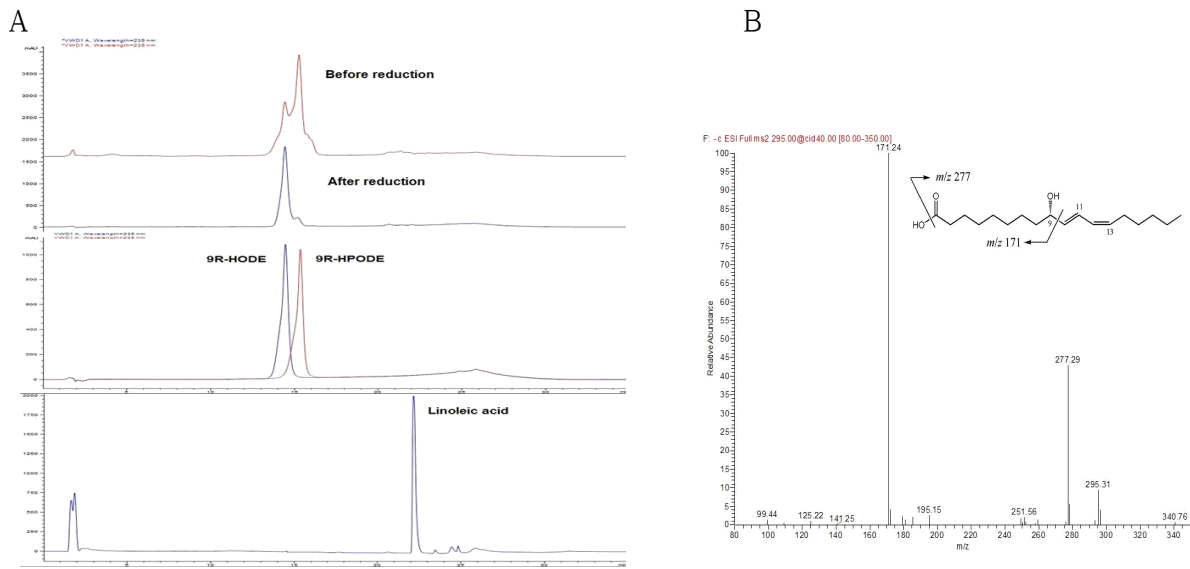


Fig. 3. Analysis of 9*R*-hydroxy octadecadienoic acid formation formation from linoleic acid by *Nostoc* lipoxigenase. (A) Regioselectivity and chirality of 9*R*-hydroxy octadecadienoic acid (B) LC-MS/MS chromatogram and structure of 9*R*-HODE.

(2) *Nostoc* sp. 유래 9*R*-lipoxigenase 정제 효소의 상대적 활성

Nostoc lipoxigenase 효소의 상대적 기질 특이성 분석하였음 (Table 1). 탄소 수 18개 및 20 개인 불포화지방산들 중 이중결합 수가 두 개 이상 존재하는 linoleic acid, alpha-linoleic acid, gamma-linoleic acid, arachidonic acid 등에 대해 활성을 나타내며 정제한 효소와 재조합 cell 모두 linoleic acid > α-linolenic acid > arachidonic acid > gamma-linoleic acid순임.

Table 1. Relative activity of purified enzyme and recombinant cell of *Nostoc* 9R-lipoxygenase.

기질	Product	Relative activity (%/mg enzyme/h)	Relative activity (%/mg cell/h)
Linoleic acid	9R-hydroxy octadecadienoic acid	100	100
α -linolenic acid	9R-hydroxy octatrienoic acid	61.1	78.8
γ -linolenic acid	9R-hydroxy octatrienoic acid	15.2	36.0
Arachidonic acid	11R-hydroxy eicosadecadienic acid	21.0	48.1

(3) Linolate 9-lipoxygenase의 전세포 반응을 위한 pH, 온도, solvent 최적화

9-Lipoxygenase를 포함한 재조합 전세포를 이용해 9R-hydroxy-10,12(*E,Z*)-octadecadienoic acid 생산을 위해 pH와 온도를 확인함. 우선 pH를 확인 한 결과 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.5에서 가장 높은 활성을 가지는 것으로 나타났음 (Fig 4A). 온도 실험을 한 결과는 25 °C 에서 최적을 보였으며, 35 °C 이상의 온도부터는 급격하게 활성이 감소하는 것으로 보아 이 효소는 열에 대해서 민감한 것으로 보임 (Fig. 4B). 열 안정성을 간이적으로 각 온도에서 4시간동안 방치 후 시험한 결과 25 °C > 20 °C 순서로 나타났음 (Fig. 4C). pH 및 온도실험에서 얻어진 최적 조건에서 9-HODE의 생산성을 증대시키기 위하여 solvent의 종류별 적용과 농도를 시험하였다. Solvent의 효과는 기질과 biocatalyst의 접촉을 좋게하여 반응성을 증대시키는 효과를 기대할 수 있음. 종류별로 시험한 결과 methanol에서 가장 높은 활성을 보였으며 1-2% (vol/vol) 농도에서 큰 차이가 없어 향후 1%를 적용하여 생산하였음 (Fig. 5).

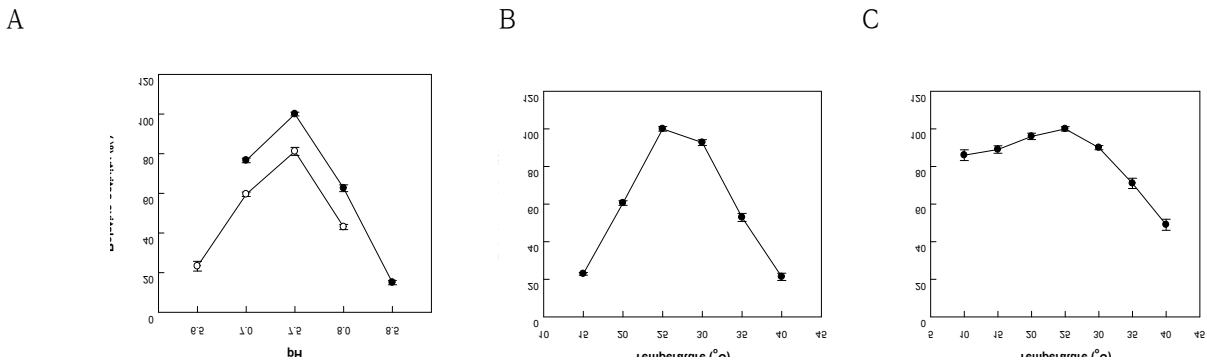


Fig. 4. Effects of (A) pH and (B) temperature.

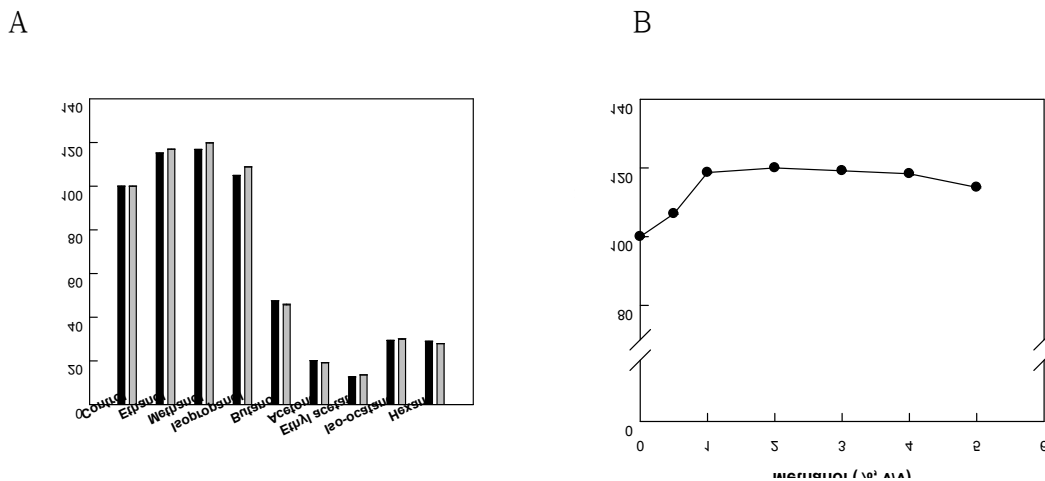


Fig. 5. Effects of solvents (A) and optimal concentration (B).

(4) Aeration 방법에 의한 9R-HODE 생산을 위한 효과

지방산 산화효소에 의해 생성된 9R-HODE 생산 최적화를 위한 aeration 방법 및 특성을 조사한 결과 9R-lipoxygenase는 oxygen 투입과 agitation이 air 투입보다 생산능이 우수함 (Fig. 6A). 우수한 두 가지 조건을 병행한 산소+agitation이 가장 높은 생산성을 나타내었으나 air+agitation도 유사한 수준을 나타냄 (Fig. 6B). 따라서, agitation이 생산성을 결정하는 요소로 보여 agitation 최적조건을 조사한 결과 250rpm이 가장 좋은 것으로 나타남 (Fig. 6C).

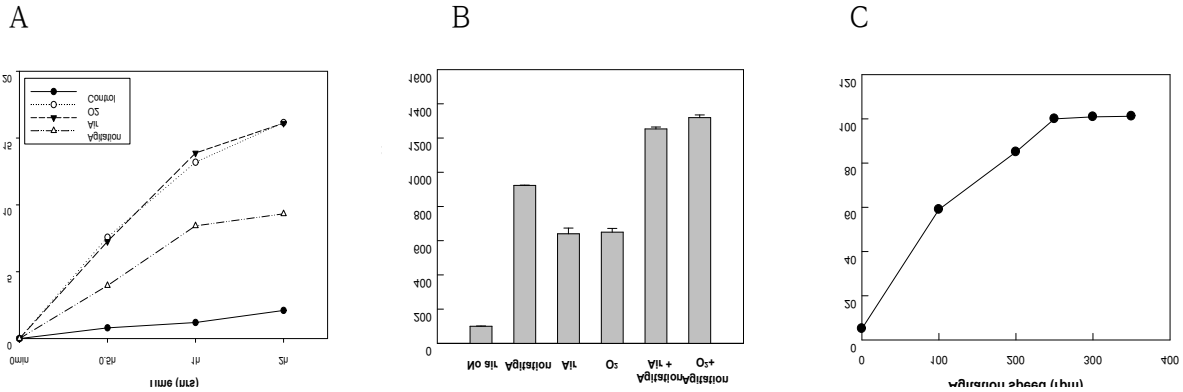


Fig. 6. Effects of aeration methods for 9R-HODE production. (A) Comparative aeration effect of oxygen, air, and agitations. (B) Separated and mixed effect of aeration methods. (C) Optimal agitation speed for 9R-HODE production by *E. coli* whole cell harboring *Nostoc* 9R-lipoxygenase.

Air/O₂ 공급방식에 따른 산물의 chirality 분석결과를 살펴보면 산소와 함께 agitation을 가한 시료군에서 가장 높은 9-hydroxy-10,12(*E,Z*)-octadecadienoic acid 생산성을 나타내었고 air나 agitation이 공급되지 않은 대조군에서는 13S의 축적이 12%까지 늘어났고 생산성도 좋지 않았음 (Table 2).

Table 2. Effect to chirality of 9-hydroxy-10,12(*E,Z*)-octadecadienoic acid by air/O₂ supplying methods

Air source	9R-HODE (%)	13S-HODE (%)	9R/13S ratio
Oxygen (1vvm)	95.4	4.6	20.7
Air (1vvm)	91.3	8.7	10.5
Oxygen (1vvm) with agitation (250 rpm)	96.2	3.8	25.3
Air (1vvm) with agitation (250 rpm)	93.7	6.3	14.9
Agitation (250rpm)	93.8	6.2	15.1
No air or agitation	87.3	12.7	6.3

(5) 9-Hydroxy-10,12(*E,Z*)-octadecadienoic acid 생산최적화

본격적인 생산을 위해 9-lox를 포함한 recombinant cell의 적절한 농도를 확인하였다. 그 결과 40 g/L농도 (dry cell weight)에서 가장 높은 활성을 나타내었음 (Fig. 7A). 한편 적절한 기질 (linoleic acid)농도를 확인한 결과 15g/L 농도의 linoleic acid에서 12 g/L의 9-hydroxy-10,12(*E,Z*)-octadecadienoic acid 생산을 나타내었음 (Fig. 7B).

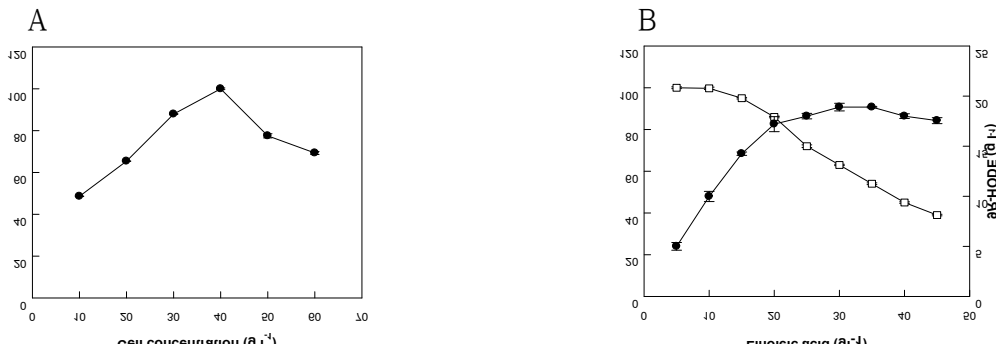


Fig. 7. Effects of cell (A) and substrate concentration (B).

(6) 환원제 처리에 의한 9R-HODE 생산 효과

지방산 산화효소에 의해 생성된 9R-hydroperoxide를 9R-hydroxide로 환원시킬 방법을 조사함. 환원제를 선정할 후 투입시점은 반응 전 투입이 1 mM cysteine이 대조군 대비 1.7배 더 생산성이 좋았으며 반응 후 에는 NaBH₄가 3.2배 더 좋은 생산성을 보임 (Fig. 8).

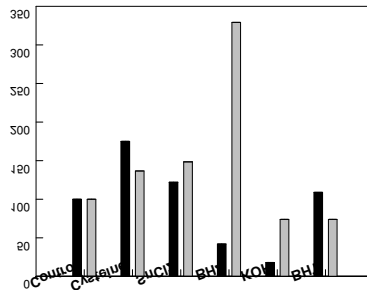


Fig. 8. Effects of reducing agents and aeration methods on the activity of recombinant *Nostoc* 9R-lipoxygenase.

(7) Recombinant whole cell 반응에서의 9R-HODE 생산

지방산 산화효소에 의한 9R-HODE 생산을 살펴봄 (Fig. 9). 40g/L cell, 15g/L linoleic acid를 기질로 pH 7.5, 25°C, 1% MeOH, 1 v/v/m O₂, 250 rpm에서 1시간 반응 시 14.3g/L의 9R-HODE가 전환되어 95% conversion과 생산 수율을 보였으며 14.3 g/L/h의 생산성을 나타내었다. 9R-hydroxy-10,12(E,Z)-octadecadienoic acid의 chirality는 96% 이상 유지됨.

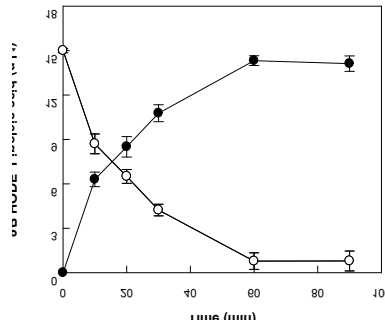


Fig. 9. Production of 9R-HODE from linoleic acid by recombinant *Nostoc* 9R-lipoxygenase.

나. α-Linolenic acid에서 9R-hydroxy-10E,12Z,15Z-octadecatrienoic acid 생산

(1) 9R-hydroxy-10E,12Z,15Z-octadecatrienoic acid 생산을 위한 정제 효소 획득 및 분석

9R-HOTE 생산을 위해 *Nostoc* sp. 유래 지방산 산화효소 (lipoxygenase)의 정제 및 분석. His-taq affinity 정제가 가능한 pET-15b vector를 이용하여 발현한 것을 정제한 결과 52 kDa의 크기를 보였고 gel-filtration chromatography를 통해 trimer임을 알 수 있었음 (Fig. 10).

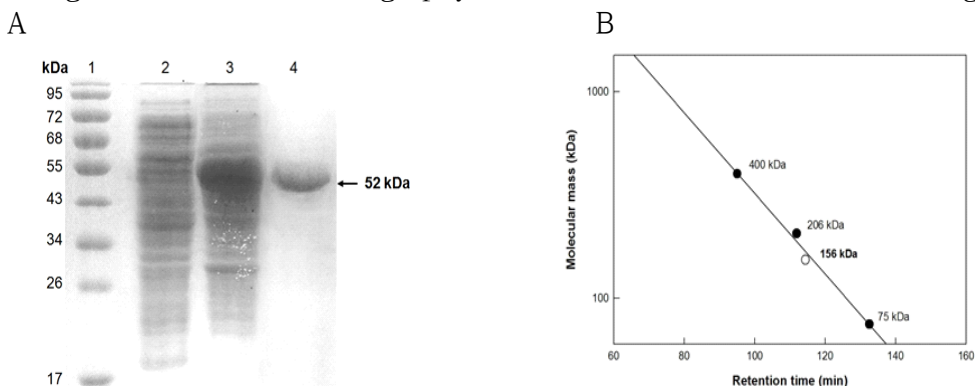


Fig. 10. SDS-PAGE and gel-filtration chromatography analysis of purified enzyme of 9R-lipoxygenase from *Nostoc* sp. in *E. coli*. (A) SDS-PAGE of recombinant 9R-lipoxygenase

from each purification steps. (B) Molecular mass based on the gel filtration chromatography of native 9R-lipoxygenase.

(2) 정제효소를 이용한 α -linolenic acid로부터 9R-hydroxy-10E,12Z,15Z-octadecatrienoic acid (9R-HOTE) 생성 확인 및 분석

Nostoc lipoxygenase에 의한 9R-HOTE의 생성 및 산물 분석. Alpha-linolenic acid 부터 9R-hydroperoxy-10E,12Z,15Z-octadecatrienoic acid의 생성과 환원된 9R-HOTE 생성을 RP-HPLC (235nm)로 검출 (Fig. 11A). 기질 감소에 따른 특이적인 산물 생성을 RP-HPLC (202nm)로 검출 (Fig. 11B). LC-MS/MS를 통해 9R-HOTE임을 확정함 (Fig. 11C). Chiral 분석을 통해 9R-형임을 9S-HOTE와 비교를 통해 알 수 있었음 (Fig. 11D).

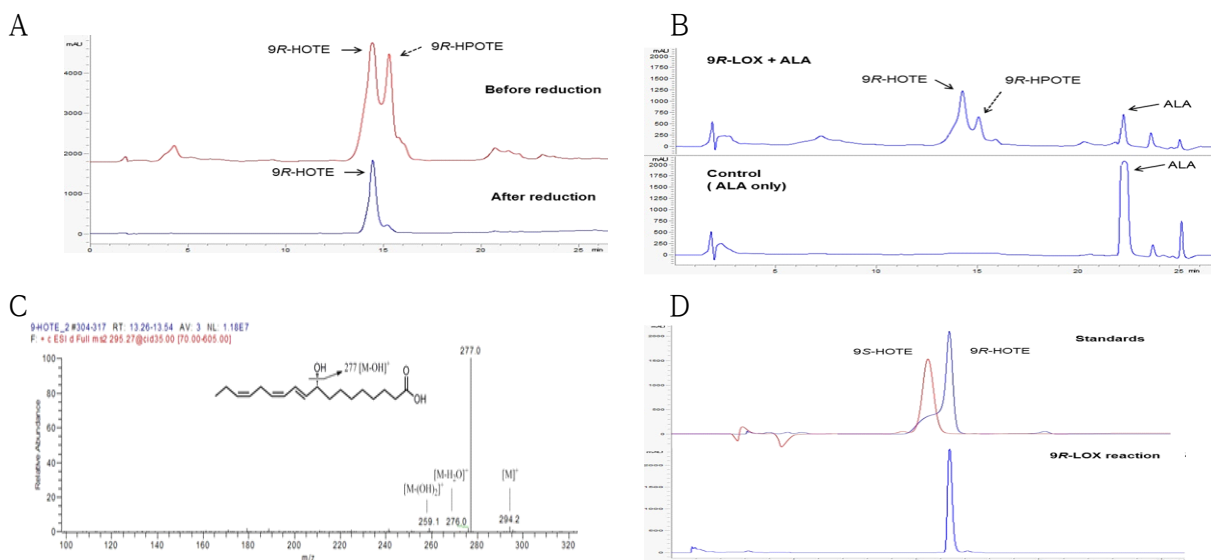


Fig. 11. Identification and analysis of reaction product of 9R-LOX by HPLC and LC-MS/MS. (A) Reversed-phase HPLC for 9R-HPOTE and reduced 9R-HOTE formation from ALA. (B) Reversed-phase HPLC for 9R-HOTE formation and substrate (ALA) reduction. The control reaction was carried out without the addition of 9R-LOX. (C) LC-MS/MS of converted product by 9R-LOX. (D) Chiral-phase HPLC for 9R-HOTE.

(3) 9R-HOTE 생산을 위한 정제효소의 생화학적 특성

Nostoc lipoxygenase 정제효소의 생화학적 특성. *Nostoc* 지방산 산화효소는 pH 8.5 (Tris-HCl, 50mM), 15 °C에서 최적 활성을 보임 (Fig. 12A, B). 온도 안정성은 30°C 아래에서는 거의 동일하며 35 °C 이상에서 감소하기 시작하여 45 °C 이상에서는 불 활성화됨 (Fig. 12C).

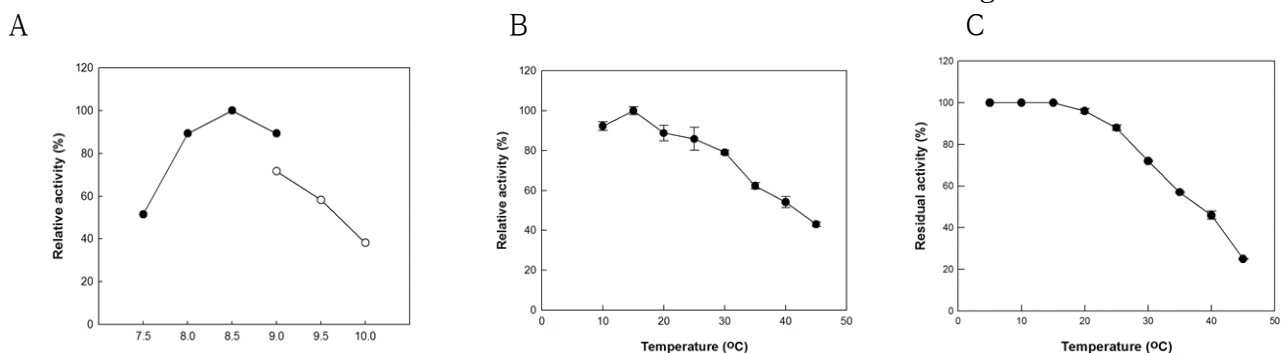


Fig. 12. Optimal^{pH} pH (A), temperature (B), and thermal stability (C) of purified 9R-lipoxygenase.

(4) 9R-lipoxygenase 정제 효소를 이용한 9R-HODE 생산에서의 solvent와 detergent 첨가 효과
 9R-HOTE 생산을 위한 solvent 및 detergent 효과. 5 % acetone이 대조군 대비 2배의 생산성 증대가 확인됨 (Fig. 13A, B). Tween 80 (0.2 %)이 타 detergent에 비해 효과가 좋았음. 이는 기질 및 산물의 용해도 향상 및 mixing effect가 좋아진 것으로 판단됨.

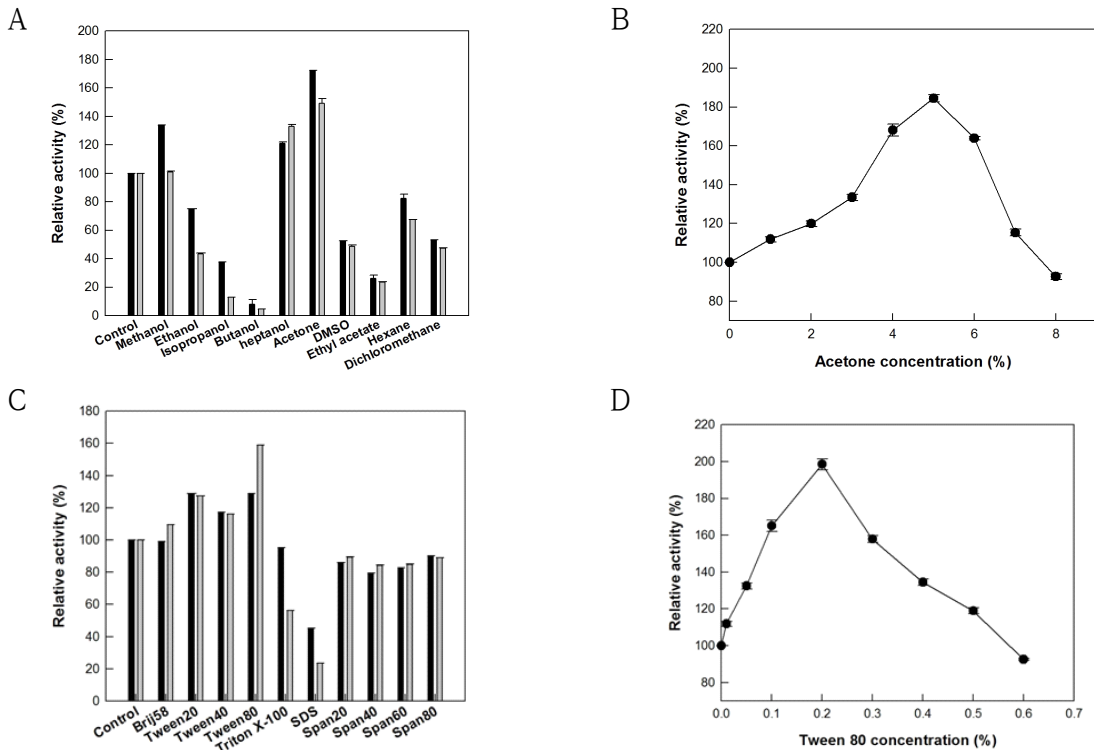


Fig. 13. Effect of solvents and detergent for 9R-HOTE production (A) Effect of solvents and (B) optimal concentrations of acetone on the activity of purified *Nostoc* 9R-lipoxygenase. (C) Effect of detergents and (D) optimal concentrations of acetone on the activity of purified *Nostoc* 9R-lipoxygenase.

(5) 9R-lipoxygenase 정제 효소의 상대적 활성 및 kinetic parameters

Nostoc lipoxygenase 효소의 상대적 기질 특이성 분석 (Table 3): 탄소 수 18개 및 20개인 불포화지방산들 중 이중결합 수가 두 개 이상 존재하는 linoleic acid, alpha-linolenic acid, gamma-linolenic acid, arachidonic acid 등에 대해 활성을 나타내며 정제한 효소의 kinetic parameter 또한 linoleic acid > alpha-linolenic acid > gamma-linolenic acid 순임. LA에 비해 ALA에 대한 상대 활성은 낮아 보이나 초기 반응속도가 유사하여 ALA 생산에 활용하여도 문제가 없는 정도임.

Table 3. Relative activity of purified enzyme and recombinant cell of *Nostoc* 9R-lipoxygenase.

Substrate	Product	Specific activity (U mg ⁻¹)	K _m (mM)	k _{cat} (min ⁻¹)	k _{cat} /K _m (mM ⁻¹ min ⁻¹)
Linoleic acid	9R-HODE	18.4 ± 1.1	0.404 ± 0.03	204.6 ± 8	507 ± 11
α-Linolenic acid	9R-HOTE (10E,12Z,15Z)	6.3 ± 0.5	0.078 ± 0.01	10.7 ± 0.5	137 ± 8
γ-Linolenic acid	9R-HOTE (6Z,10E,12Z)	5.4 ± 0.6	0.054 ± 0.80	5.8 ± 0.4	109 ± 7

(6) 9R-HOTE 최적 생산을 위한 효소 및 기질농도 조사

9R-HOTE 생산 최적화를 위한 효소 및 기질농도 조사 (Fig. 14). pH 7.5 (Tris-HCl, 50mM), 15°C 에서 10 g/L의 ALA로 반응 시 최적 효소농도는 1mg/ml 이었음(Fig. 14). 최적 ALA 농도는 40 g/L로 조사됨 (Fig. 14B).

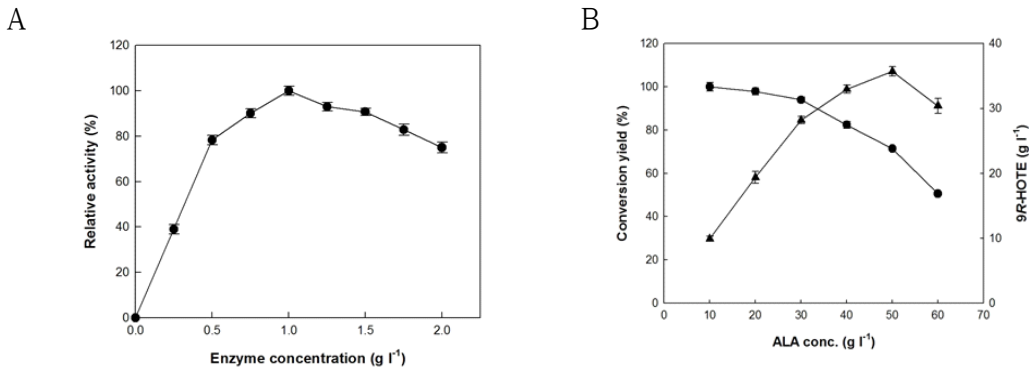


Fig. 14. Effects of the concentrations of enzyme and substrate on the production of 9R-HOTE from ALA by 9R-LOX. (A) Effect of enzyme concentration. The reactions were performed in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) containing 10 g/L ALA, 5 % (v/v) acetone, and 0.2 % (w/v) Tween 80 at 15 ° C for 20 min by varying the enzyme concentration from 0.05 to 2 mg/ml. (B) Effect of ALA concentration. The reactions were performed in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) containing 0.5 mg/ml enzyme, 5% (v/v) acetone, and 0.2 % (w/v) Tween 80 at 15 ° C for 20 min by varying the ALA concentrations from 5 to 50 g/L.

(7) 정제 효소에 의한 ALA와 LA로부터 9R-HOTE 및 9R-HODE의 생산

ALA 및 LA로부터 9R-HOTE 및 9R-HODE 생산하였음. 최적 조건에서 9R-LOX정제효소는 40 g/L ALA로부터 37.6 g/L의 9R-HOTE를 생산하여 94 %의 수율과 시간당 37.6 g/L의 생산성을 보임. LA의 경우에도 40 g/L LA로부터 38.4 g/L의 9R-HODE를 생산하여 96 %의 수율과 시간당 38.4 g/L의 생산성을 나타냄 (Fig. 15A 및 B).

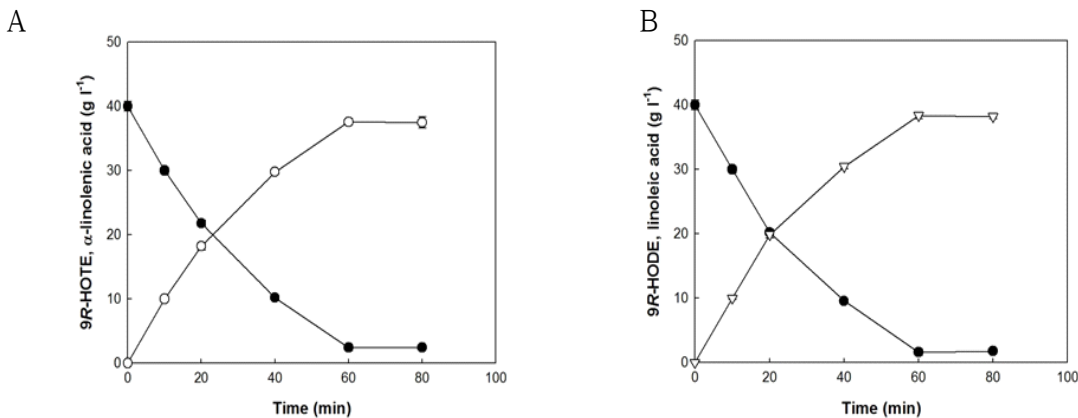


Fig. 15. Time-course reactions for the production of 9R-HOTE and 9R-HODE by recombinant 9R-LOX. The data represent the means of three separate experiments, and error bars represent the standard deviation. (A) Production of 9R-HOTE (empty circle) from reagent grade ALA (filled circle) by 9R-LOX. The reactions were performed in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) containing 40 g/L reagent-grade ALA, 1 g/L 9R-LOX, 5% (v/v) acetone, and 0.2% (w/v) Tween 80 at 15 ° C for 80 min. (B) Production of 9R-HODE (empty inverse triangle) from reagent-grade LA (filled circle) by 9R-LOX. The reactions were performed in the same manner as those of 9R-HOTE production, except for the substrate LA.

다. Linoleic acid로부터 13-hydroxy-9Z,11E-octadecadienoic acid 생산

기존의 Soybean lipoxygenase를 대체할 수 있는 높은 활성의 lipoxygenase를 bacteria인 *Burkholderia thailandensis* 로부터 확보하였고 이 효소를 이용하여 linoleic acid로부터 13-hydroxy-9Z,11E- octadecadienoic acid (13-HODE)를 생산하였음 (Fig. 16).



Fig. 16. Scheme of 13-hydroxy-9Z,11E- octadecadienoic acid (13-HODE) production from linoleic acid using 9-lipoxygenase.

(1) 효소 유전자의 클로닝 및 발현

Burkholderia thailandensis KACC 12027 gDNA에서 forward primer (NheI) GCTAGCATGGTCAATCACA AAACCGG와 reverse primer (HindIII) AAGCTTTCAAATGTTTCGTGCTTGCCG 를 사용하여 NheI, HindIII을 linker로 expression vector 인 pET 28a에 cloning하였음 (Fig. 17A). Cloning 한 pET28a + BTlox plasmid를 *E.coli* ER2566에 도입한 뒤 IPTG를 통한 Induction을 한 결과 발현된 대부분의 BTlox가 inclusion body에 있는 것을 확인 할 수 있었고 이것을 IMAC affinity column을 통해 정제하여 lipoxygenase 효소를 얻 었음 (Fig. 17B).

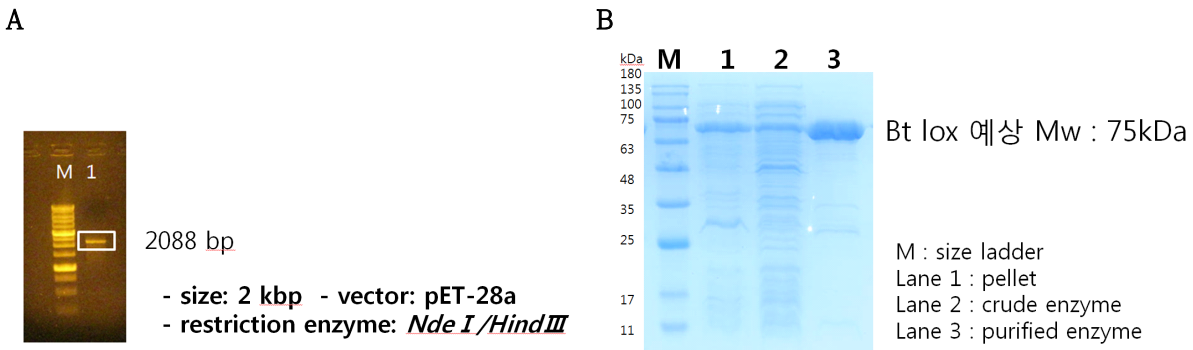


Fig. 17. Gene of lipoxygenase from *B. thailandensis* (A) and its expression (B).

(2) *Burkholderia thailandensis* 유래 lipoxygenase의 생성 산물 확인

현재 까지 미생물 유래 lipoxygenase는 활성이 높지 않고 선택성도 제한적이어서 활성이 높은 산업용 대체 lipoxygenase에 대한 연구가 이어져 왔음. 본 연구진은 *Burkholderia thailandensis* 유래 lipoxygenase를 확보하였음. *B. thaliandensis* lipoxygenase (이하 Bt-Lox) 정제 효소의 생성 산물을 확인하기 위해 13-hydroxy-9Z,11E- octadecadienoic acid (13-HODE) 및 9-HODE 표준품을 사용하여 HPLC로 확인. Fig. 18A와 같이 생성물은 13-HODE로 나타났으며 S-configuration을 가졌음 (Fig. 18B).

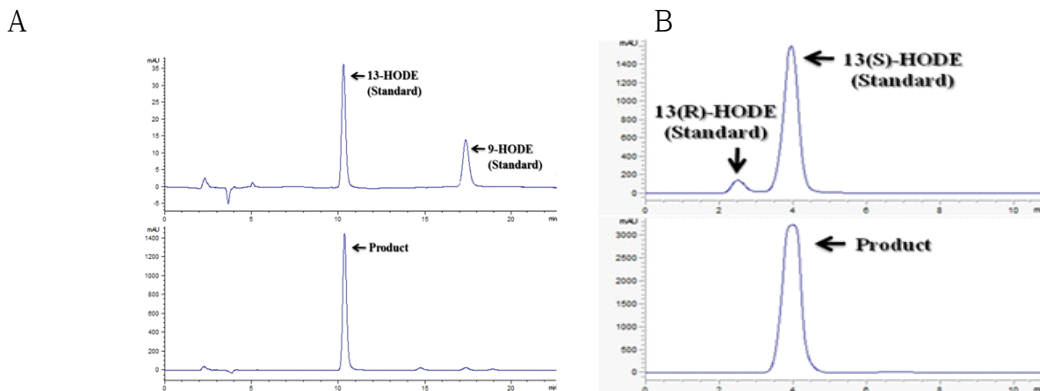


Fig. 18. HPLC analysis of the product obtained from linoleic acid by the conversion of recombinant *E. coli* expressing *B. thailandensis* 13-lipoxygenase for regioselectivity (A) and chirality (B). The product was identified as 13*S*-HODE based on the retention time of the reaction product in HPLC.

(3) 13-HODE 생산을 위한 온도, pH, metal ion 및 solvent 최적화

다음 실험은 13-HODE의 생산을 위해 *B. thailandensis* 유래의 lipoxygenase가 높은 활성을 갖을 수 있는 온도와 pH를 확인. pH를 확인 한 결과 buffer로 50 mM HEPES pH 7.5를 사용하는 것이 가장 높은 활성을 가지는 것으로 나타났음 (Fig. 19A). 온도 실험을 한 결과는 25 °C에서 최적임 (Fig. 19B).

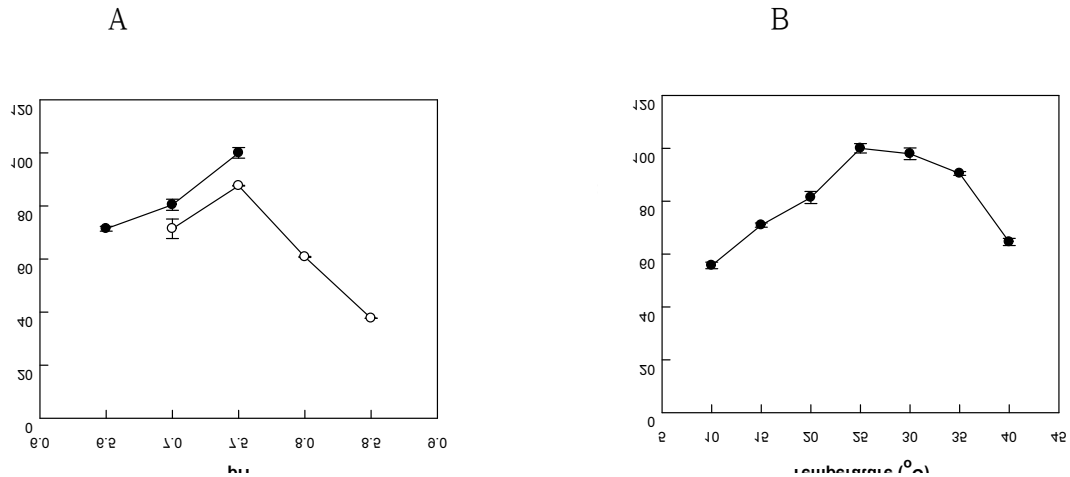


Fig. 19. Effects of pH and temperature (A) pH (B) temperature. 50 mM HEPES buffer (*filled circles*: pH 6.5-7.5), and 50mM Tris-HCl buffer (*open circles*: pH 7.0-8.5)

위의 실험에서 얻어진 최적 조건에서 13-HODE의 생산성을 증대시키기 위하여 metal dependent한 lipoxygenase의 성질을 이용하여 metal 실험을 진행하였음. Control로 아무 처리도 하지 않은 효소를 이용하였고, 나머지 조건은 EDTA를 이용하여 효소가 가지고 있는 metal을 킬레이팅 시킨 후 각각의 metal ion을 4°C에서 30분 간 처리하였다. 그 결과 0.1 mM Cu^{2+} 를 처리한 조건에서 control에 비하여 약 300% 향상된 활성을 보였다. 그에 비하여 일반적으로 알려진 Fe^{2+} 에 의한 효과는 미미한 것으로 나타났음 (Fig. 20).

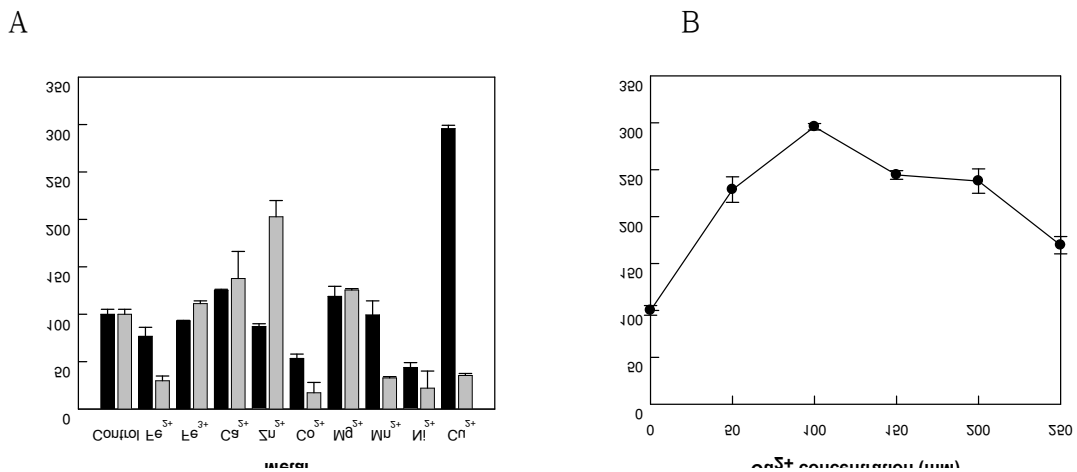
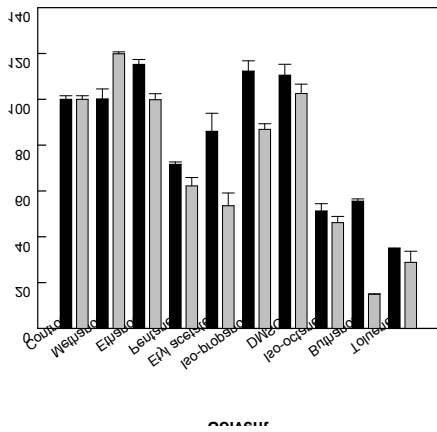


Fig. 20. Effect of metal on the activity of *B. thailandensis* lipoxygenase for linoleic acid. (A) Effect of metal type. 0.1 mM (*black bar*) or 1.0mM (*gray bar*) solvent. (B) Effect of Cu^{2+} concentration.

기질로 사용하는 linoleic acid의 insoluble한 성질 때문에 기질 농도가 일정 농도 이상이 되면 반응계의 buffer와 섞이지 않고 aggregation되는 문제가 발생하며, micelle을 형성함으로써 반응성이 감소함. 그렇기 때문에 기질의 solubility를 높여야 13-HODE의 생산성 증가가 이루어진다. Lipoxygenase로 하이드록시 지방산의 생산에는 일반적으로 organic solvent를 이용하여 기질의 solubility를 높이기 때문에 본 실험에서도 solvent의 종류별 실험을 진행함. 9종의 solvent에 대하여 2% 와 6%의 농도로 실험을 진행하였고, 그 결과 methanol에서 가장 높은 생산성이 나타남. 이에 따라 methanol의 농도별 영향 실험을 추가로 진행 하였고, 6%의 농도에서 가장 높은 값이 나오는 것을 확인하였음 (Fig. 21).

A



B

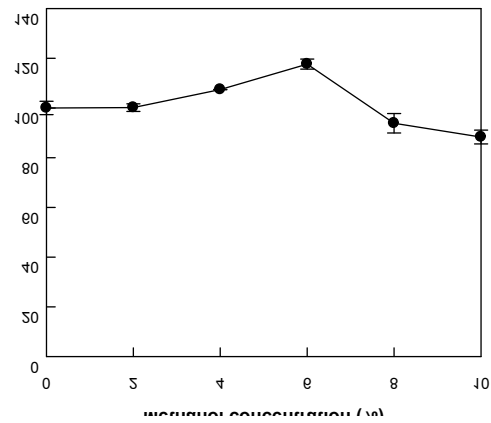
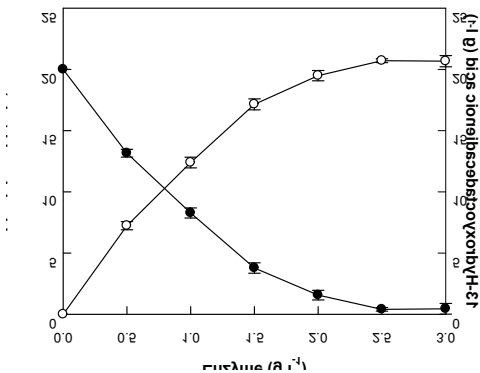


Fig. 21. Effect of solvent on the activity of *B. thailandensis* lipoxygenase for linoleic acid. (A) Effect of solvent type. 2 % (black bar) or 6 % (v/v) (gray bar) solvent. (B) Effect of methanol concentration.

(4) 13-HODE 생산 최적화

13-HODE 최대 생산을 위해 효소 농도별, 기질 농도별 실험을 진행함. 기질 20 g/L를 넣고 효소 농도를 0.5 g/L-3.0g/L로 다르게 하여 각각 90분 동안 반응을 진행 한 결과, 효소 2.5 g/L에서 최적임을 나타내었고 (Fig. 22A), 효소 2.5 g/L을 넣고 기질을 5 g/L-30 g/L로 변화를 주어 각각 반응을 진행한 결과, 기질 20 g/L까지는 기질이 높아짐에 따라 product양이 높고, 수율이 높으나 그 이상의 기질농도에서는 수율과 product의 양이 급격히 감소함에 따라 기질이 20 g/L일 때 최적임을 확인 (Fig. 22B).

A



B

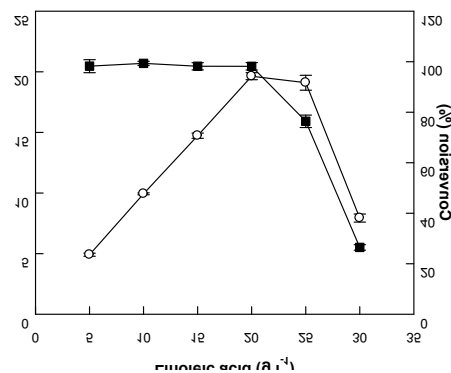


Fig. 22. Effects of enzyme and substrate concentrations on the production of 13-Hydroperoxy-9,11(*Z,E*)-octadecadienoic acid from linoleic acid.

(A) Effect of enzyme concentration. 13-Hydroperoxy-9,11(*Z,E*)-octadecadienoic acid (*open circle*) and linoleic acid (*filled circle*). (B) Effect of substrate concentration. Conversion yield (*filled circle*) and 13-hydroxy-9,11(*Z,E*)-octadecadienoic acid production (*filled square*).

최적 조건을 바탕으로 linoleic acid를 기질로 하여 시간대 별 13-HODE의 생산량을 확인 하였다. 효소 농도 2.5 g/L, 기질 농도 20 g/L, 25°C, 200 rpm, 50 mM HEPES pH 7.5조건에서 120 분 까지 측정 한 결과 104%(w/w)의 conversion rate의 전환을 보였고, 약 21 g/L의 13-HODE를 얻을 수 있었음 (Fig. 23A, B). 비교 실험으로 같은 농도로 반응하였을 때 *B. thailandensis* lipoxygenase (Bt-Lox)의 경우 soybean lipoxygenase (commercial enzyme) 보다 활성이 3배 높았고 120분 후에 13-hydroxy-9,11(*Z,E*)-octadecadienoic acid 생산량도 1.5배 높았음. 따라서, Bt-Lox는 향후 새로운 산업효소로 개발되어 활용될 가치가 매우 높을 것으로 판단됨.

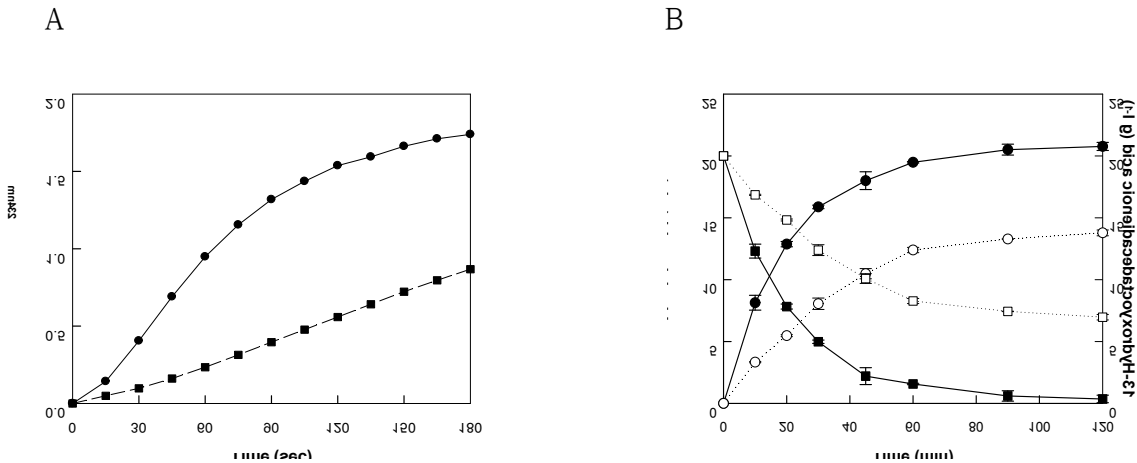


Fig. 23. Time-course production of 13-hydroxy-9,11(*Z,E*)-octadecadienoic acid from linoleic acid by *B. thailandensis* lipoxygenase and soybean lipoxygenase (commercial enzyme). (A) Determination of activity by spectrometer. *B. thailandensis* lipoxygenase (*filled circle*) and soybean lipoxygenase (*filled square*) (B) Production of 13-hydroxy-9,11(*Z,E*)-octadecadienoic acid from linoleic acid Linoleic acid (*filled square*) and 13-hydroxy-9,11(*Z,E*)-octadecadienoic acid (*filled circle*) of *B. thailandensis* lipoxygenase. Linoleic acid (*empty square*) and 13-hydroxy-9,11(*Z,E*)-octadecadienoic acid (*empty circle*) of soybean lipoxygenase.

제 3 절 Hydroxy 지방산으로부터 락톤 생산

락톤은 고리형 에스테르로써 향료물질로 알려짐. 현재까지 대부분의 락톤은 화학적인 공정에 의해 대량으로 생성되어져 왔으나, 천연향료에 대한 소비자의 욕구 증가에 따른 천연 생물전환 법에 의한 락톤 생산에 관심이 증가하였음. Hydroxy 지방산으로부터 락톤의 생성은 yeast 내부의 세포 소기관인 peroxisome의 베타-산화를 통해 이루어짐. 이 베타-산화는 acyl-CoA oxidase, thiolase를 포함하는 5가지의 효소가 complex로 작용을 하여 기작이 이루어지며, 지방산에 의해 활성이 유도될 수 있다고 알려졌음.

1. 10-Hydroxystearic acid로부터 γ -dodecalactone 생산

가. γ -Dodecalactone 최대 생산을 위한 효모 균주 선발

효모 내에서 hydroxy 지방산은 세포소기관인 peroxisome에서 베타-산화를 통해 락톤의 전구 물질이 되는 4-hydroxy 지방산으로 전환되며, 카복실기와 -OH기가 축합반응을 통해 락톤링을 형성하게 된다. 뿐만 아니라 베타 산화에서 생성된 acetic acid은 다시 효모의 지방산 합성경로에 의해 기질인 hydroxy 지방산으로 전환될 수 있으며, 이를 통해 락톤의 생산성이 증가될 수 있음 (Fig. 1). 10-Hydroxystearic acid을 γ -dodecalactone으로 전환하는 베타-산화 관여 효소의 활성이 높은 효모를 선별하기 위해 해당 효모(*Cryptococcus curvatus*, *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula glutinis*, *Myxozyma lipomycoides*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Candida oleophila*, *Yarrowia lipolytica*, *Lipomyces spencermartinsiae*, *Candida palmioleophila*, *Waltomyces lipofer*)와 기질을 반응하였으며 상대적인 생산 활성을 비교해본 결과, *Waltomyces lipofer*가 가장 높은 생산성을 보여 γ -dodecalactone 생산 균주로 선정하였음 (Fig. 2).

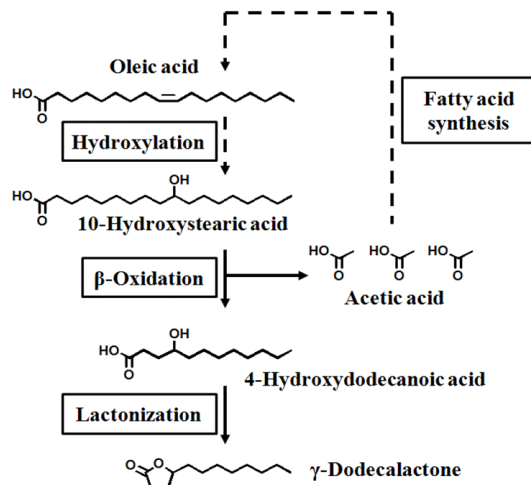


Fig. 1. Proposed metabolic pathway from 10-hydroxystearic acid to γ -dodecalactone by yeast.

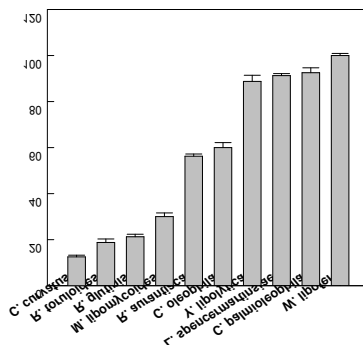


Fig. 2. γ -Dodecalactone production from 10-hydroxystearic acid by whole cells of oleaginous yeast strains.

나. γ -Dodecalactone의 생산을 증가시키기 위한 cell permeabilization

Product의 생산을 증가시키기 위해 solvents (ethanol, methanol, toluene)와 detergents (SDS, Triton X-100, Tween 80)를 이용하여 cell을 permeabilization 처리 하였음 (Fig. 3A). Ethanol과 triton X-100을 처리하였을 때 relative activity가 각각 50%씩 증가하는 것을 보았으며 (Fig. 3BC), 동시에 처리하였을 시, 처리하지 않은 cell보다 약 80% 이상 증가하는 것을 확인하였음.

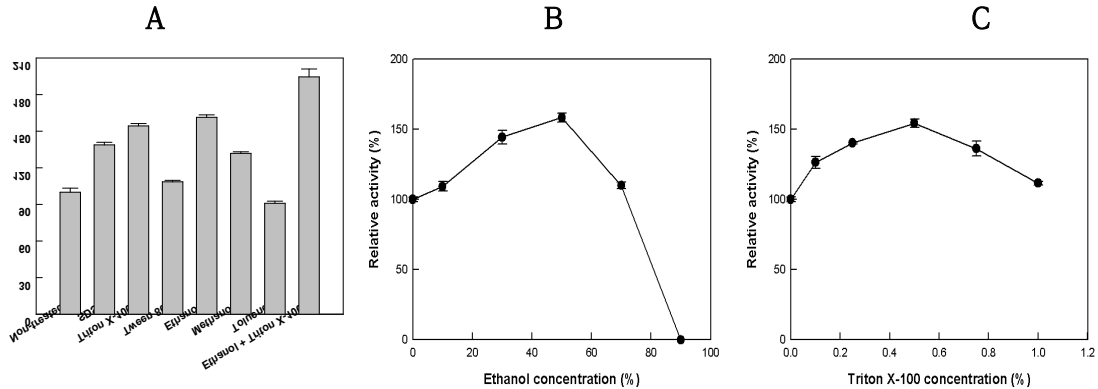


Fig. 3. Effects of ethanol and/or triton X-100 treatments on the permeabilization of *W. lipofer* for the conversion of 10-hydroxystearic acid to γ -dodecalactone. (A) Effect of solvents and detergents type. (B) Effect of ethanol concentration. (C) Effect of triton X-100 concentration.

다. γ -Dodecalactone 생산위한 배양조건 최적화

효모 *W. lipofer*에 대한 최적 pH는 6.5 이었고 (Fig. 4A), 최적 온도는 35 °C이였음 (Fig. 4B). 또한 최적의 교반 속도는 200 rpm으로 확인되었음 (Fig. 4C). 효모 *W. lipofer*를 이용하여 whole cell 반응 진행 시, 질소원 (yeast nitrogen base, yeast extract, malt extract, beef extract, peptone, polypeptone, casitone peptone, protease peptone, soytone, tryptone, ammonium chloride, ammonium sulfate, ammonium citrate, ammonium phosphate, calcium nitrate, tris, MES, PIPES, urea) 반응배지의 종류에 따른 γ -dodecalactone의 생산량 비교해본 결과, tris를 사용하였을 때 relative activity가 가장 높은 것을 확인하였고 (Fig. 5A), 최적의 tris 질소원 농도는 10 g/L 인 것으로 확인되었음 (Fig. 5B).

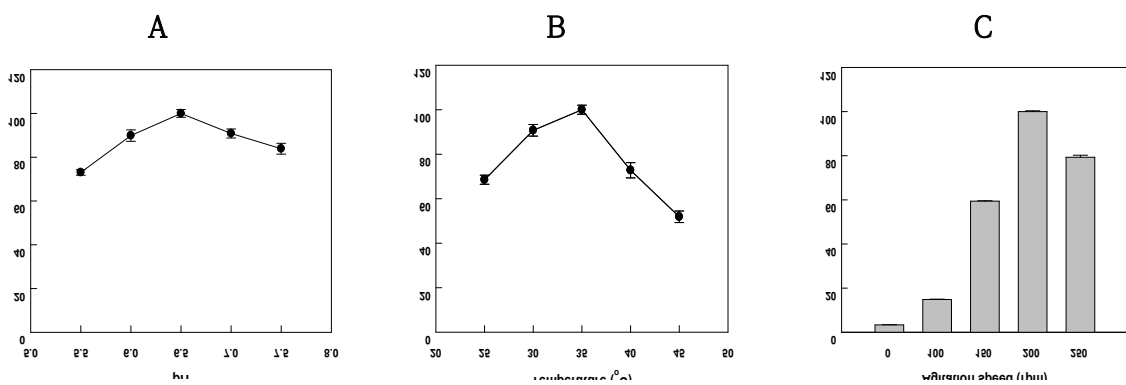


Fig. 4. Effects of pH and temperature and agitation speed on γ -dodecalactone production from 10-hydroxystearic acid by permeabilized cells of *W. lipofer*. (A) Effect of pH. (B) Effect of temperature. (C) Effect of agitation speed.

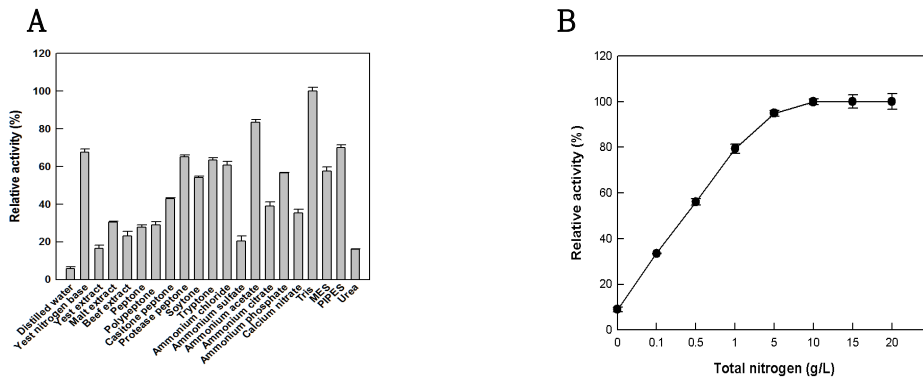


Fig. 5. Effect of nitrogen source on γ -dodecalactone production from 10-hydroxystearic acid by permeabilized cells of *W. lipofer*. (A) Effect of nitrogen source type. (B) Effect of tris concentration.

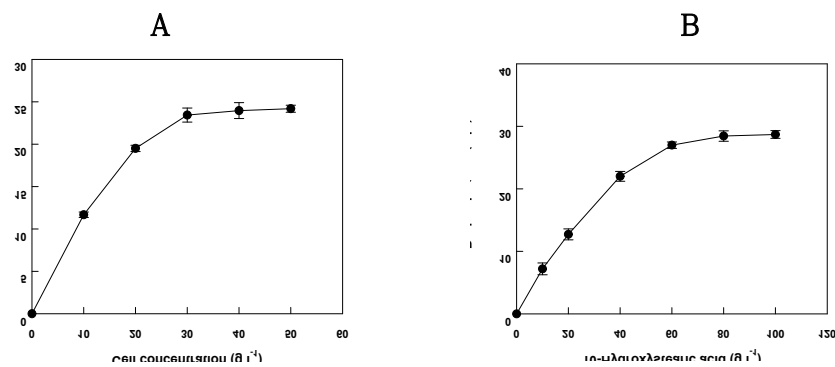


Fig. 6. Effects of the concentrations of cells and substrates on γ -dodecalactone production from 10-hydroxystearic acid by permeabilized cells of *W. lipofer*. (A) Effect of cell concentration. (B) Effect of substrate concentration.

라. γ -Dodecalactone의 최대생산을 위한 cell 농도, 기질 농도 최적화 및 time-course

Product인 γ -dodecalactone의 최대생산을 위해 cell 농도별, 기질 농도별 실험을 진행함. 먼저 기질 50 g/L를 넣고 permeabilized cell 농도를 0-50 g/L 사이에서 각각 10시간동안 반응을 진행한 결과, permeabilized cell의 최적농도가 30 g/L임을 확인하였고 (Fig. 6A), cell 농도를 30 g/L로 고정시키고 기질을 0-100 g/L로 변화를 주어 각각 6시간동안 반응을 진행한 결과, 기질 60 g/L를 사용하였을 때 가장 최적임을 확인 (Fig. 6B).

위의 실험에서 얻어진 최적조건에서 γ -dodecalactone의 최대 생산을 위해 permeabilized cell 과 non-permeabilized cell을 이용하여 반응을 진행해 시간별로 sampling하여 최대 생산을 나타내는 시간을 알아보면서 두 cell의 생산을 비교함. 그 결과, permeabilized cell의 경우 30시간동안 60 g/L의 10-hydroxystearic acid로부터 46 g/L의 γ -dodecalactone을 생산하였고, 전환율은 76%였으며, 생산성은 $1.5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 로 나타남. 그에 반해, non-permeabilized cell은 30시간동안 60 g/L의 10-hydroxystearic acid로부터 12 g/L의 γ -dodecalactone을 생산하였으며, 전환율은 21%, 생산성은 $0.4 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 로 나타남. induced cell이 전환율은 55%, 생산성은 3.8배 높은 것으로 나타남 (Fig. 7A). 뿐만 아니라, 베타-산화를 통해 acetic acid가 생성되는 것을 확인할 수 있었으며, 지방산 합성경로를 통해 acetic acid가 oleic acid로 전환되어 (Fig. 7B), 다시 기질인 10-hydroxystearic acid을 생성함을 확인 (Fig. 7C). 60 g /L 10-hydroxystearic acid를 γ -dodecalatone로 전환하는 반응에서 최대 30시간 후, 45.7 g/L γ -dodecalatone이 생산되었으며 분자수준의 수율은 94%로 확인. Table 1과 같이 기존에 보고된 γ -dodecalatone 생산 효모들과 비교하였을 때, $1,523 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 의 높은 생산성과 락톤 생산 한계치였던 수율 25%를 초과 생산에 성공함.

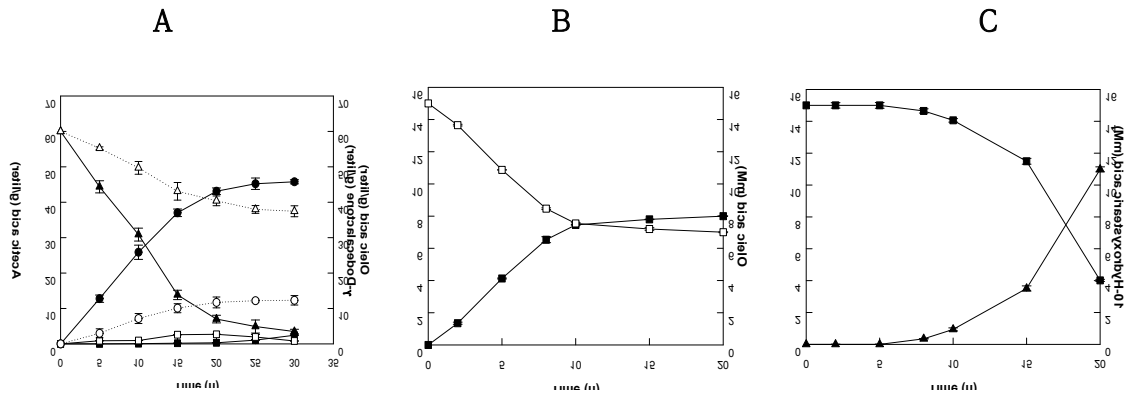


Fig. 7. Time-course reactions of for γ -dodecalactone production from 10-hydroxystearic acid, acetic acid, and oleic acid using permeabilized *W. lipofer* cells under optimal conditions. (A) Acetic acid, oleic acid and γ -dodecalactone production from 10-hydroxystearic acid. γ -Dodecalactone production (●) from 10-hydroxystearic acid (▲) by permeabilized cells with the byproducts acetic acid (□) and oleic acid (■); and γ -dodecalactone production (○) from 10-hydroxystearic acid (△) by non-permeabilized cells. (B) Transformation reaction of acetic acid to oleic acid. Acetic acid (□) and oleic acid (■). (C) Transformation reaction of oleic acid to 10-hydroxystearic acid. 10-Hydroxystearic acid (▲) and oleic acid (■).

Table 1. γ -Dodecalactone production by yeast fermentation and permeabilized *W. lipofer*

Biocatalyst	Source	Substrate (g/liter)	γ -Dodecalactone (g/L)	Productivity (mg/L/h)	Conversion yield (% g/g)
Fermentation	<i>Yarrowia lipolytica</i>	10-Hydroxystearic acid (14.4)	3.5	194	24.3
	<i>Mortierella isabellina</i>	Dodecanoic acid (19.2) ^a	4.1	171	21.4
	<i>Sporobolomyces odorus</i>	Oleic acid (0.25)	< 0.035	NR	< 14.0
	<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	Culture medium (0)	< 0.0006	NR	NR
Whole cells	Baker's yeast	10-Hydroxystearic acid (0.5) and oleic acid	NR	NR	22.5
Permeabilized cell	<i>Waltomyces lipofer</i>	10-Hydroxystearic acid (60)	45.7	1,523	76.2

마. 베타-산화 유도에 의한 γ -dodecalactone의 최대생산

(1) 효모 *W. lipofer*의 베타-산화 유도 조건 최적화

효모 *W. lipofer*의 베타-산화 유도를 위하여 다양한 지방산 (capric acid, lauric acid, myristic acid, palmitic acid, stearic acid, arachidic acid, oleic acid, gondoic acid, erucic acid, linoleic acid, α -linolenic acid, 10-hydroxystearic acid, ricinoleic acid)을 유도물질로 사용하여 γ -dodecalactone 생산에 미치는 영향을 알아본 결과, 지방산 중에서도 oleic acid를 유도물질로 사용하였을 때 가장 높은 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었으며 (Fig. 8A), 5 g/L의 oleic acid를 사용하였을 때 약 30% 생산량이 증가하였음 (Fig. 8B).

효모 *Waltomyces lipofer*의 베타-산화 유도를 위하여 균 배양 시 배지에 함유된 탄소원 종류와 유도시간에 따른 베타-산화의 활성을 비교해 본 결과, 탄소원으로 glucose와 oleic acid를 함께 사용하였을 때 베타-산화의 활성이 가장 높았고, 12시간동안 배양을 하였을 때 활성이 가장 높았음 (Table 2).

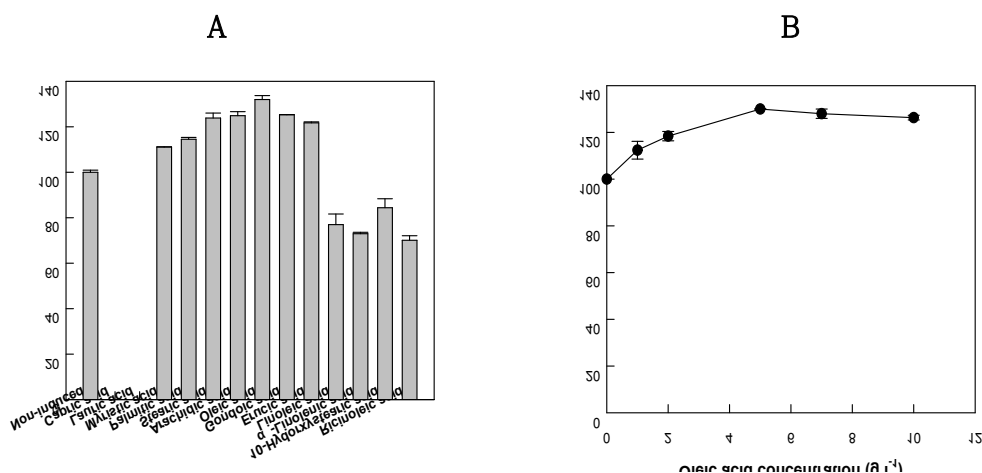


Fig. 8. Effect of inducer on the conversion of 10-hydroxystearic acid to γ -dodecalactone by permeabilized cells of *W. lipofer*. **(A)** Effect of inducer type. The cells of *W. lipofer* were obtained after growing in YPGO medium containing 5 g/L inducer, and the obtained cells were permeabilized. **(B)** Effect of oleic acid concentration. The cells of *W. lipofer* were obtained after growing in YPGO medium containing 0–10 g/L oleic acid, and the obtained cells were permeabilized.

Table 2. Specific activity of β -oxidation of whole cells of *W. lipofer* grown in YPG, YPO, and YPGO media during fermentation

Medium (carbon source)	Induction time (h)	Cell mass (g l ⁻¹)	Specific activity of β -oxidation (mg g-cell ⁻¹ h ⁻¹)
YPG (glucose)	4	0.10	0.00±0.0
	8	1.75	9.43±0.3
	12	2.45	39.0±0.8
	14	2.56	38.8±0.5
	24	2.46	23.9±1.7
YPO (oleic acid)	4	0.28	12.1±0.8
	8	1.94	30.1±0.3
	12	2.59	58.8±0.3
	14	3.05	54.7±1.8
	24	4.19	29.8±1.1
YPGO (glucose + oleic acid)	4	0.23	2.47±0.0
	8	1.97	8.26±0.8
	12	2.65	81.8±0.6
	14	3.81	76.0±2.4
	24	4.43	35.5±1.6

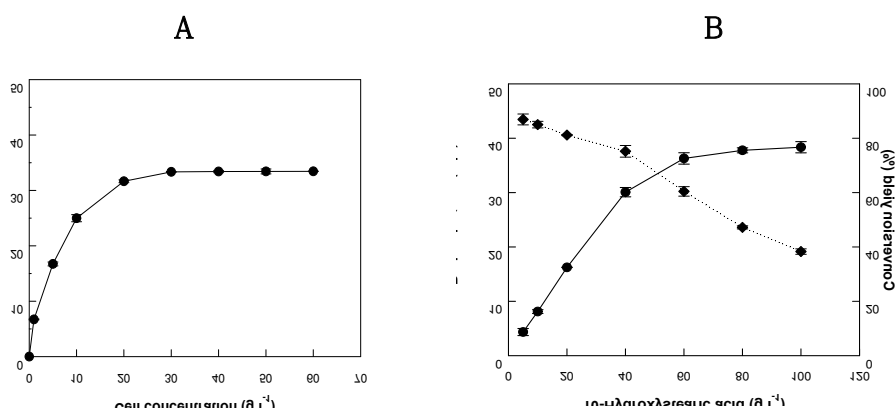


Fig. 9. Effects of the concentrations of cells and substrates on γ -dodecalactone production from 10-hydroxystearic acid by induced cells of *W. lipofer*. The cells of *W. lipofer* were obtained after growing in YPGO medium containing 5 g/L oleic acid, and the obtained cells were permeabilized. (A) Effect of cell concentration. (B) Effect of substrate concentration. Conversion yield (◆) and γ -dodecalactone production (●).

(2) γ -Dodecalactone의 최대생산을 위한 cell 농도, 기질 농도 최적화

Product인 γ -dodecalactone의 최대생산을 위해 cell 농도별, 기질 농도별 실험을 진행하였음. 먼저 기질 60 g/L를 넣고 permeabilized cell 농도를 2.5-60 g/L 사이에서 각각 6시간동안 반응을 진행한 결과, cell의 최적농도가 20 g/L임을 확인하였고 (Fig. 9A), cell 농도를 20 g/L로 고정시키고 기질을 5-100 g/L로 변화를 주어 각각 6시간동안 반응을 진행한 결과, 기질 60 g/L를 사용하였을 때 가장 최적임을 확인할 수 있었음 (Fig. 9B).

(3) Induced cell / non-induced cell γ -dodecalactone의 생산 비교

위의 실험에서 얻어진 최적조건에서 γ -dodecalactone의 최대 생산을 위해 induced cell과 non-induced cell을 이용하여 반응을 진행해 시간별로 sampling하여 최대 생산을 나타내는 시간을 알아보면서 두 cell의 생산을 비교함. 그 결과 induced cell의 경우 30시간동안 60 g/L의 10-hydroxystearic acid로부터 51 g/L의 γ -dodecalactone을 생산하였고, 전환율은 85%였으며, 생산성은 1.7 g/l/h로 나타남. 그에 반해, non-induced cell은 30시간동안 60 g/L의 10-hydroxystearic acid로부터 38 g/L의 γ -dodecalactone을 생산하였으며, 전환율은 63%, 생산성은 1.3 g/l/h로 나타남. induced cell이 전환율은 22%, 생산성은 1.3배 높은 것으로 나타남 (Fig. 10).

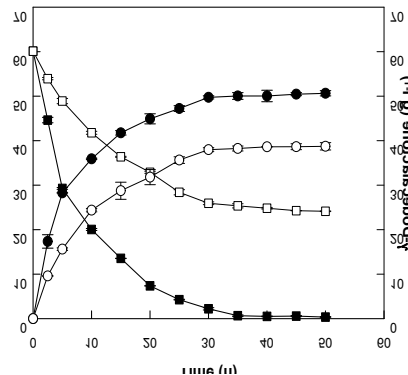


Fig. 10. Time-course reactions for the production of γ -dodecalactone from 10-hydroxystearic acid by induced and non-induced whole cells of *W. lipofer* under the optimized conditions. γ -Dodecalactone production (●) from 10-hydroxystearic acid (■) by induced cells and γ -dodecalactone production (○) from 10-hydroxystearic acid (□) by non-induced cells.

2. Hydroxy 지방산으로부터 γ -decalactone 및 γ -butyrolactone의 생산

가. 기질 종류에 따른 효모 *W. lipofer*의 기질특이성 및 전환율 비교

효모 *W. lipofer*의 기질특이성을 알아보기 위하여, induced cell로 다양한 hydroxy 지방산 (10-hydroxystearic acid, 12-hydroxystearic acid, ricinoleic acid, ricinoleic acid methyl ester, 10-hydroxydecanoic acid, 12-hydroxydodecanoic acid, 16-hydroxyhexadecanoic acid)을 기질로 사용하여 총 3가지의 다른 γ -락톤 (γ -dodecalactone, γ -decalactone, γ -butyrolactone)을 전환하였으며, 10-hydroxystearic acid에서 기질특이성 및 전환율이 가장 높은 것을 확인함 (Table 3).

Table 3. Conversion yield and specific productivity of permeabilized whole cells of *W. lipofer* for hydroxy fatty acid

Substrate ^a	Product	Product concentration (g/L ¹)	Conversion yield (%)	Specific productivity (mg g-cell ⁻¹ h ⁻¹)
10-Hydroxystearic acid	γ -Dodecalactone	0.20	27.9±0.2	66.2±0.4
12-Hydroxystearic acid	γ -Decalactone	0.15	24.7±0.2	49.5±0.3
Ricinoleic acid	γ -Decalactone	0.14	23.5±0.2	47.8±0.6
Ricinoleic acid methyl ester	γ -Decalactone	0.09	16.7±0.0	30.4±0.1
10-Hydroxydecanoic acid	γ -Butyrolactone	0.04	8.66±0.0	9.78±0.1
12-Hydroxydodecanoic acid	γ -Butyrolactone	0.03	6.47±0.1	8.58±0.1
16-Hydroxyhexadecanoic acid	γ -Butyrolactone	0.01	4.11±0.1	4.32±0.1

^a The used concentration of substrate was 1 g/L.

나. γ -Decalactone 및 γ -butyrolactone의 생산

위의 실험에서 얻어진 최적조건에서 γ -decalactone과 γ -butyrolactone의 최대 생산을 위해 induced cell을 이용하여 반응을 진행해 시간별로 sampling하여 최대 생산을 나타내는 시간을 알아봄. 그 결과 induced cell을 이용하여 30시간동안 60 g/L의 12-hydroxystearic acid를 기질로 사용하였을 때, 28 g/L의 γ -decalactone을 생산하였고, 전환율은 47%였으며, 생산성은 0.9 g L⁻¹ h⁻¹로 나타남 (Fig. 11A). 또한 induced cell을 이용하여 30시간동안 60 g/L의 10-hydroxydecanoic acid를 기질로 사용하였을 때에는 12 g/L의 γ -butyrolactone을 생산하였으며, 전환율은 20%, 생산성은 0.4 g L⁻¹ h⁻¹로 나타남 (Fig. 11B). γ -decalactone의 경우 현재까지 보고된 것보다 2.2배 높은 생산량을 보였으며, 전환율은 13%, 생산성은 5.2배 높은 것으로 나타났다. 그 뿐만 아니라, γ -butyrolactone의 경우에는 효모를 이용한 생물전환법에 의해 hydroxy 지방산에서 생산은 이번이 첫 보고임.

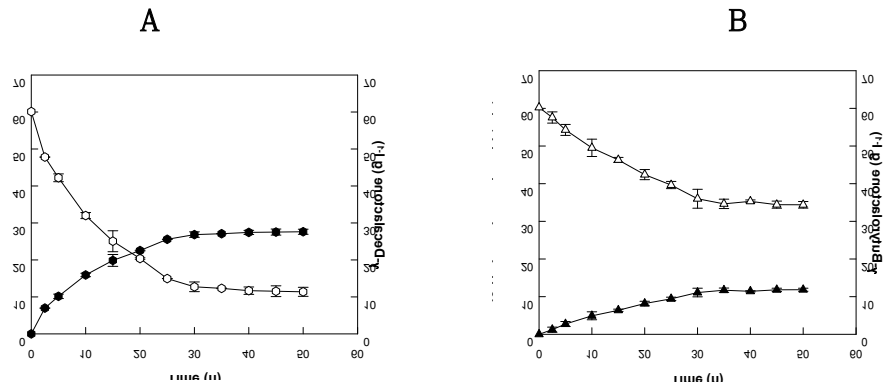


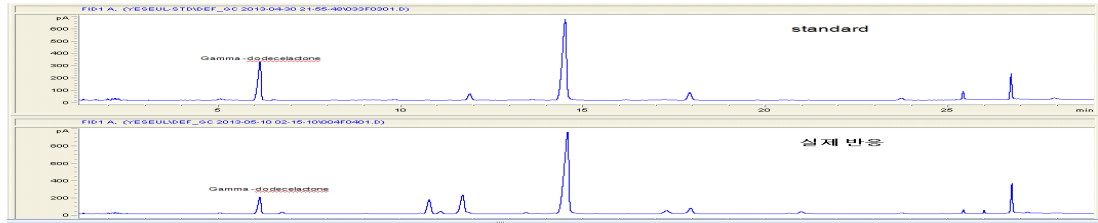
Fig. 11. Time-course reactions for the production of γ -decalactone from 12-hydroxystearic acid and the production of γ -butyrolactone from 10-hydroxydecanoic acid by induced whole cells of *W. lipofer* under optimal conditions. (A) γ -Decalactone production (●) from 12-hydroxystearic acid (○) by induced cells. (B) γ -Butyrolactone production (▲) from 10-hydroxydecanoic acid (△) by induced cells.

3. 10-Hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid로부터 γ -dodecalactone 생산

가. 10-Hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid에서 γ -dodecalactone 전환 확인

효모 *Candida boidinii*를 이용하여 10-hydroxyoctadecenoic acid로부터 γ -dodecalactone을 생산. 기질로 사용되는 10-hydroxyoctadecenoic acid는 *Stenotrophomonas nitritireducens*에 의해 linoleic acid에서 전환된 것을 사용하였으며, 반응 후 GC 분석한 결과, 기질인 10-hydroxydotadecenoic acid는 감소하였고, γ -dodecalactone은 증가함을 standard와 비교하여 확인하였으며 (Fig. 12A), GC/MS를 통해 product가 γ -dodecalactone임을 증명하였음 (Fig. 12B).

A



B

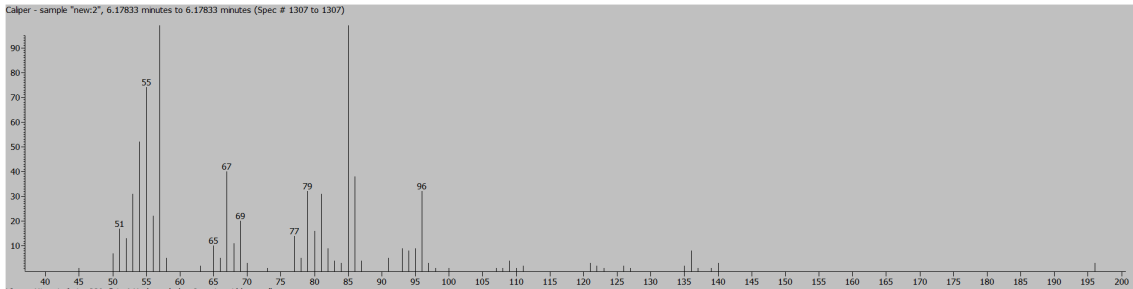


Fig. 12. Analysis for the production of γ -dodecelactone from 10-hydroxyoctadecenoic acid by whole cells of *C. boidinii*. (A) GC analysis for production of γ -dodecelactone. Reaction sample was compared with standard. (B) The product was identified as γ -dodecelactone by GC/MS analysis.

나. γ -Dodecelactone의 lactonization 과정에 미치는 산처리의 영향 비교

효모의 베타-산화에 의해 생성된 4-hydroxy 지방산은 산처리를 통해 락톤으로 전환되게 된다. 효모 *C. boidinii*를 이용하여 10-hydroxyoctadecenoic acid로부터 γ -dodecelactone을 생산 시 최적의 산처리 조건을 알아보기 위하여, 5-50%의 HCl을 첨가한 결과, 20% HCl을 처리하였을 때 relative activity가 높은 것을 확인할 수 있었음 (Fig. 13).

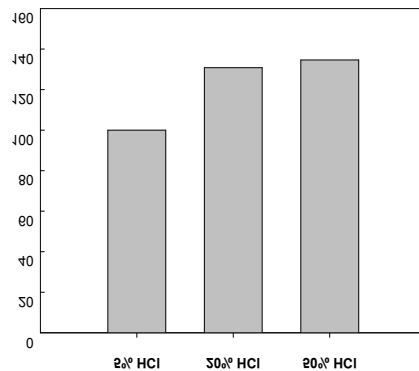


Fig. 13. Effect of HCl concentration on the conversion of 10-hydroxyoctadecenoic acid to γ -dodecelactone by *C. boidinii* cells.

다. γ -Dodecelactone 최대 생산을 위한 효모 균주 선발

10-Hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid을 γ -dodecelactone으로 전환하는 베타-산화 관여 효소의 활성이 높은 효모를 선별하기 위해 해당 효모 (*Candida boidinii*, *Candida palmiophila*, *Candida tropicalis*, *Citeromyces matritensis*, *Cryprococcus curvatus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Sporobolomyces odor*, *Starmerella bombicola*, *Waltomyces lipofer*, *Yarrowia lipolytica*)와 기질을 반응하였으며 상대적인 생산 활성을 비교해본 결과, *Candida boidinii*가 가장 높은 생산성을 보여 γ -dodecelactone 생산 균주로 선정하였음 (Fig. 14).

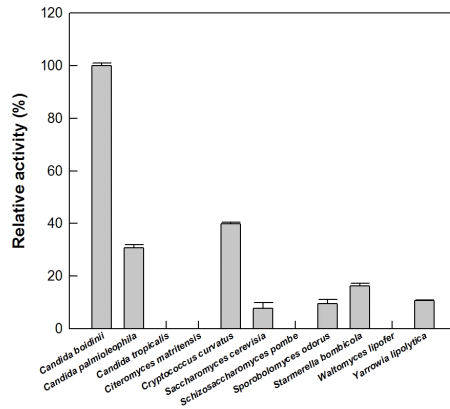


Fig. 14. γ -Dodecalactone production from 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid by whole cells of oleaginous yeast strains.

라. 효모 *Candida boidinii*의 베타-산화 유도 조건 최적화

효모 *C. boidinii*의 베타-산화 유도를 위하여 다양한 지방산 및 수산화 지방산(lauric acid, stearic acid, oleic acid, erucic acid, linoleic acid, 10-hydroxydecanoic acid, and 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid)을 유도물질로 사용하여 γ -dodecalactone 생산에 미치는 영향을 알아본 결과, 지방산 중에서도 oleic acid를 유도물질로 사용하였을 때 가장 높은 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었으며 (Fig. 15A), 7 g/L의 oleic acid를 사용하였을 때 약 122% 생산량이 증가하였음 (Fig. 15B).

효모 *C. boidinii*의 베타-산화 유도를 위하여 균 배양 시 배지에 함유된 탄소원 농도와 유도시간에 따른 베타-산화의 활성을 비교해 본 결과, glucose 5g/l 와 oleic acid를 함께 사용하였을 때 베타-산화의 활성이 가장 높았고, 15시간동안 배양을 하였을 때 활성이 가장 높았음 (Fig. 16).

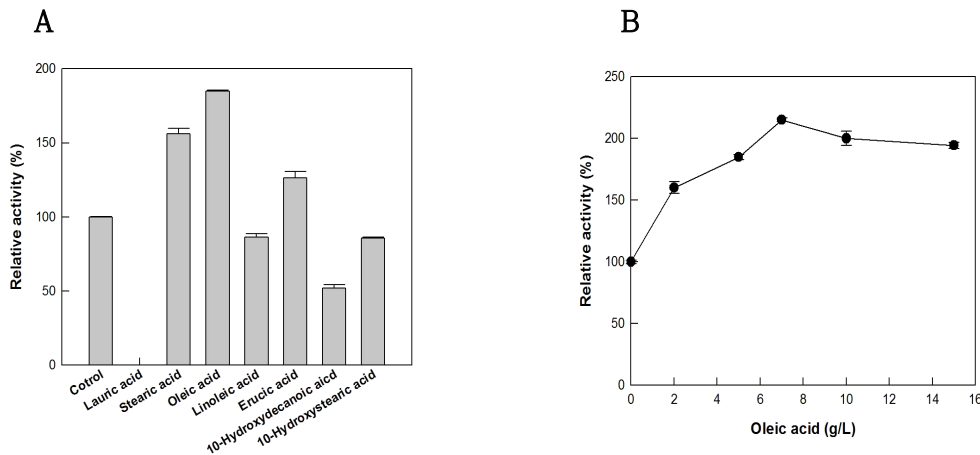


Fig. 15. Effect of inducer on the conversion of 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid to γ -dodecalactone by induced cells of *C. boidinii*. **(A)** Effect of inducer type. The cells of *C. boidinii* were obtained after growing in induction medium containing 7 g/L inducer. **(B)** Effect of oleic acid concentration. The cells of *C. boidinii* were obtained after growing in induction medium containing 0–15 g/L oleic acid.

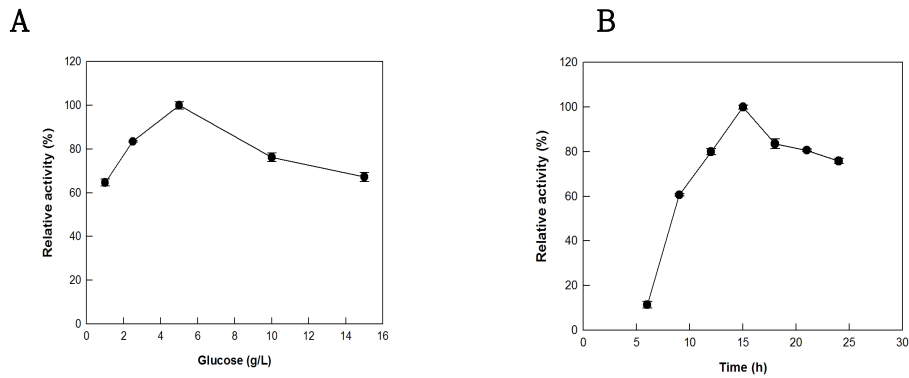


Fig. 16. Effects of glucose concentration and induction time on the conversion of 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid to γ -dodecelactone by induced cells of *C. boidinii*. (A) Effect of glucose concentration. (B) Effect of induction time. The cells of *C. boidinii* were obtained after growing in induction medium containing 7 g/L oleic acid.

마. 효모 *Candida boidinii*를 이용한 γ -dodecelactone 생산의 최적 조건화

효모 *Candida boidinii*에 대한 최적 조건으로 pH와 온도를 조사한 결과 pH는 5.5 이었고 (Fig. 17A), 최적 온도는 25 °C로 확인함 (Fig. 17B).

Product인 γ -dodecelactone의 최대생산을 위해 cell 농도별, 기질 농도별 실험을 진행. 먼저 기질 20 g/L를 넣고 induced cell 농도를 0-40 g/L 사이에서 각각 3시간동안 반응을 진행한 결과, permeabilized cell의 최적농도가 30 g/L임을 확인하였고 (Fig. 18A), cell 농도를 30 g/L로 고정시키고 기질을 2.5-15 g/L로 변화를 주어 각각 3시간동안 반응을 진행한 결과, 기질 5 g/L를 사용하였을 때 가장 최적임을 확인 (Fig. 18B).

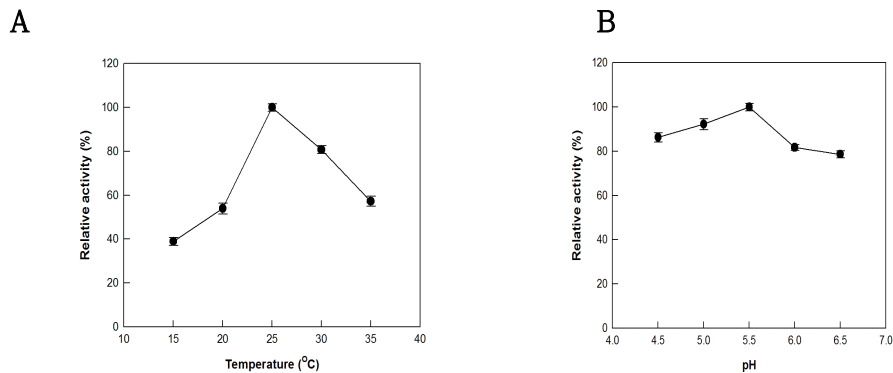


Fig. 17. Effects of pH and temperature on γ -dodecelactone production from 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid by induced cells of *C. boidinii*. (A) Effect of pH. (B) Effect of temperature.

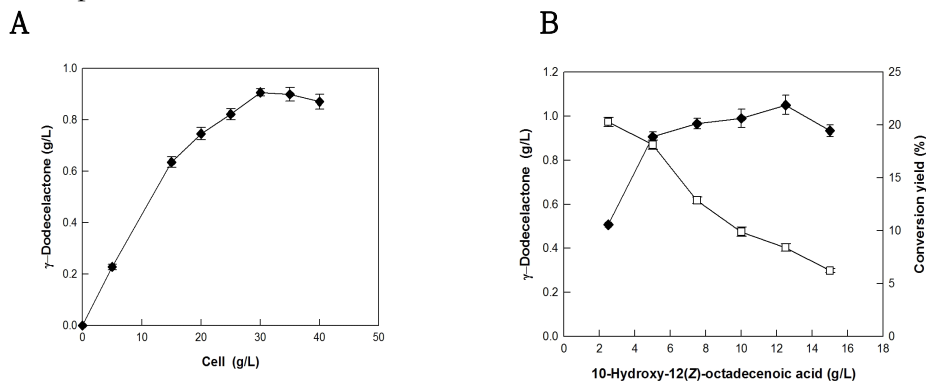


Fig. 18. Effects of the concentrations of cells and substrates on γ -dodecelactone production from 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid by induced cells of *C. boidinii*. (A) Effect of cell concentration. (B) Effect of substrate concentration.

concentration. (B) Effect of substrate concentration. 10-Hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid (●) and conversion yield (□)

바. 최적조건에서 γ -dodecelactone 생산

위의 실험에서 얻어진 최적조건에서 γ -dodecelactone의 최대 생산을 위해 induced cell을 이용하여 반응을 진행해 시간별로 sampling하여 최대 생산을 나타내는 시간을 알아봄. 그 결과, 6시간동안 5 g/L의 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid로부터 2.2 g/L의 γ -dodecelactone을 생산하였고, 분자수준의 전환율은 64%였으며, 생산성은 $350 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 로 나타남 (Fig. 19).

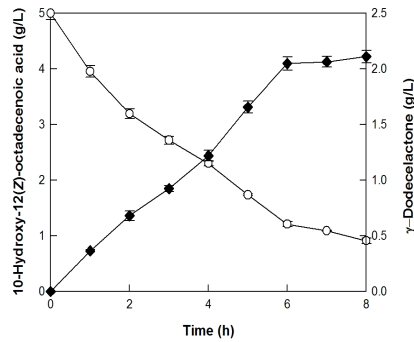


Fig. 19. Time-course production of γ -dodecelactone (◆) from 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid (○).

4. 13-Hydroxy-9-octadecenoic acid로부터 δ -decalactone 생산

가. 효모 *Yarrowia lipolytica*를 이용한 13-hydroxy-9(Z)-octadecenoic acid로부터 δ -decalactone 생산 확인

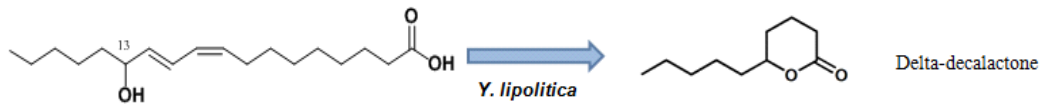


Fig. 20. Conversion of linoleic acid to δ -decalactone.

효모 *Yarrowia lipolytica*를 이용하여 13-hydroxy-9-octadecenoic acid로부터 δ -decalactone을 생산 (Fig. 20). 기질로 사용되는 13-hydroxy-9-octadecenoic acid는 *Lactobacillus acidophilus*로부터 유래한 linoleate hydratase를 cloning한 recombinant cell에 의해 linoleic acid에서 전환된 것을 사용하였고, 반응 후 GC 분석 결과, 기질인 13-hydroxy-9-octadecenoic acid는 감소하였고, δ -decalactone은 증가함을 standard와 비교하여 확인 (Fig. 21A). 동 product를 GC/MS를 통해 product가 δ -decalactone임을 확인함 (Fig. 21B).

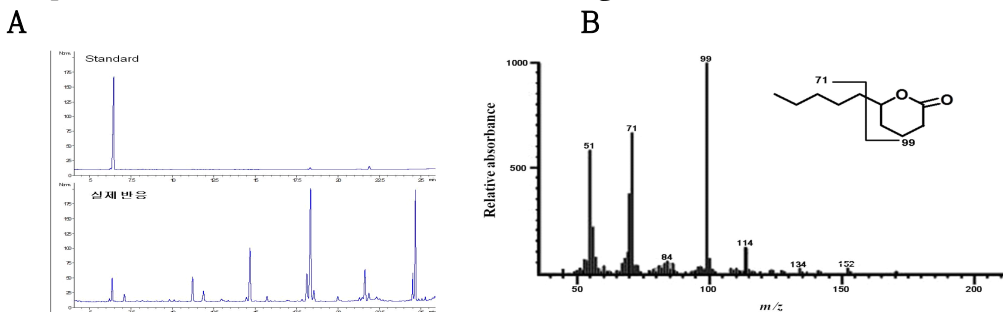


Fig. 21. Analysis for the production of δ -decalactone from 13-hydroxy-9-octadecenoic acid by whole cells of *Y. lipolytica*. (A) GC analysis for production of δ -decalactone. Reaction sample was compared with standard. (B) The product was identified as δ -decalactone by GC/MS analysis.

나. 효모 *Yarrowia lipolytica*를 이용한 δ -decalactone 생산의 최적 조건 최적화

효모 *Yarrowia lipolytica*에 대한 최적 조건으로 pH와 온도를 조사한 결과 pH는 7.0 이었고 (Fig. 22A), 최적 온도는 30 °C 이었음 (Fig. 22B). Product인 δ -decalactone의 최대생산을 위해 cell 농도별, 기질 농도별 실험을 진행하였다. 먼저 기질 5 g/L를 넣고 cell 농도를 0-40 g/L 사이에서 각각 15시간동안 반응을 진행한 결과, 최적농도가 25 g/L임을 확인하였고 (Fig. 23A), cell 농도를 25 g/L로 고정시키고 기질을 2.5-15 g/L로 변화를 주어 각각 15시간동안 반응을 진행한 결과, 기질 7.5 g/L를 사용하였을 때 가장 최적임 (Fig. 23B).

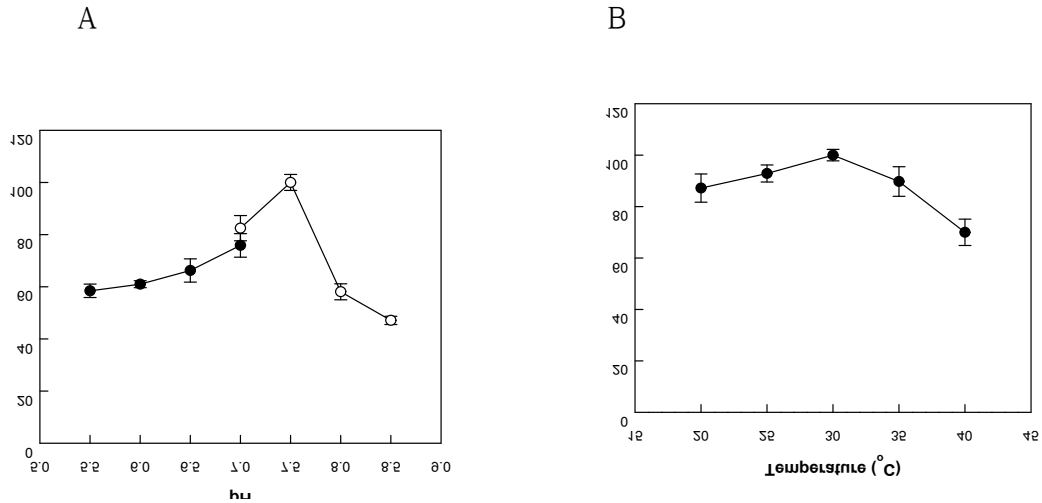


Fig. 22. Effect of pH and temperature on δ -decalactone production from 13-hydroxy-9(Z)-octadecenoic acid by *Y. lipolytica* cells. (A) Effect of pH. (B) Effect of temperature.

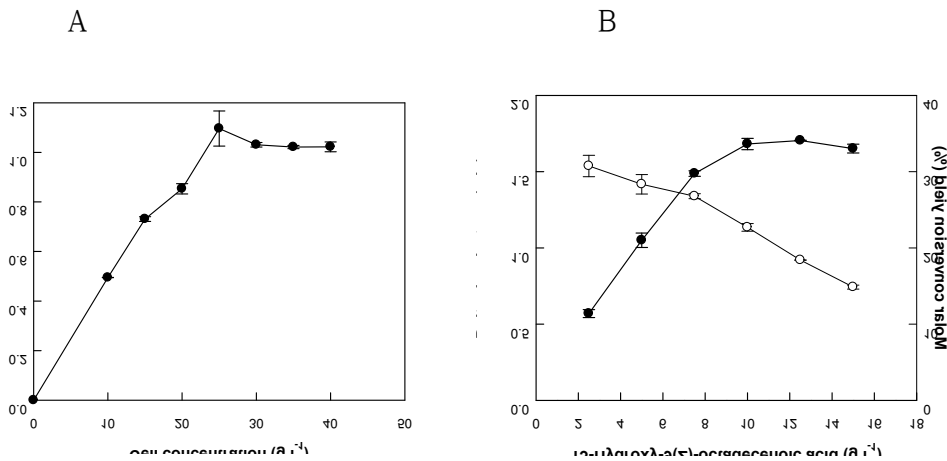


Fig. 23. Effects of the concentrations of cells and substrates on δ -decalactone production from 13-hydroxy-9(Z)-octadecenoic acid by *Y. lipolytica* cells. (A) Effect of cell concentration. (B) Effect of substrate concentration. 13-Hydroxy-9(Z)-octadecenoic acid (●) and conversion yield (○).

다. 13-Hydroxy-9(Z)-octadecenoic acid로부터 δ -decalactone 생산

최적조건에서 δ -decalactone의 최대 생산을 위해 *Y. lipolytica* cell을 이용하여 반응을 진행해 시간별로 sampling하여 최대 생산을 나타내는 시간을 알아본 결과, 18시간동안 7.5 g/L의 13-hydroxy-9(Z)-octadecenoic acid로부터 1 g/L의 δ -decalactone을 생산하였고, 분자수준의 전환율은 23.5%였으며, 생산성은 55.6 mg L⁻¹ h⁻¹로 나타났음 (Fig. 24).

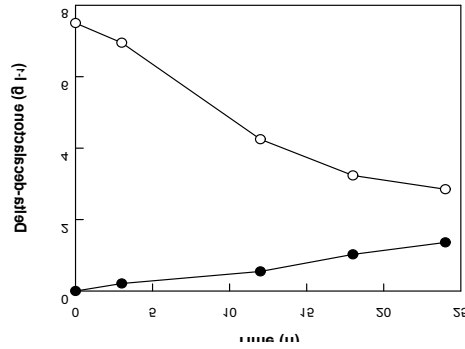


Fig. 24. Time-course production of δ -decalactone (●) from 13-hydroxy-9(Z)-octadecenoic acid (○).

5. *Candida palmiolephila*를 이용한 8-hydroxy-9-octadecenoic acid로부터 japonilure 전환 확인

Japanese beetle의 pheromone으로 잘 알려진 japonilure는 현재까지 화학반응을 거쳐 합성되어져 왔으나 온화한 방법인 생물전환법으로 japonilure를 생산을 시도함 (Fig. 25).

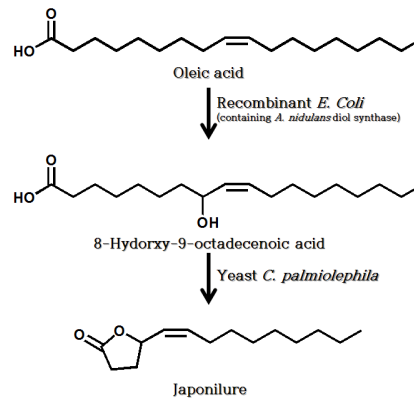


Fig. 25. Scheme of conversion linoleic acid to Japonilure.

가. Japonilure 생산을 위한 효모 균주 선발

8-Hydroxy-9-octadecenoic acid을 japonilure으로 전환하는 베타-산화 관여 효소의 활성이 높은 효모를 선별하기 위해 해당 효모(*Candida africana*, *Candida boidinii*, *Candida palmiolephila*, *Candida oleophila*, *Candida tropicalis*, *Candida tanzawaensis*, *Candida ergastensis*, *Candida silvicultrix*)와 기질을 반응하였으며 상대적인 생산 활성을 비교해본 결과, *Candida palmiolephila*가 가장 높은 생산성을 보여 japonilure 생산 균주로 선정하였음 (Fig. 26).

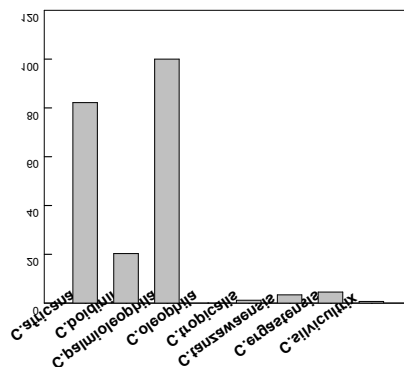


Fig. 26. Japonilure production from 8-Hydroxy-9-octadecenoic acid by whole cells of oleaginous yeast strains.

나. Japonilure의 물질 동정

효모 *C. palmiolephila*를 이용해 8-hydroxy-9(*Z*)-octadecenoic acid로부터 얻어진 생성물을 확인하기 위해 HPLC 및 GC를 이용한 분리조건을 찾고, semi-prep HPLC를 이용해 정제된 product를 GC/MS를 통해 japonilure으로 확인됨 (Fig. 27). 또한, 생성물의 정확한 동정을 하기 위하여 NMR로 분석함 (Fig. 28).

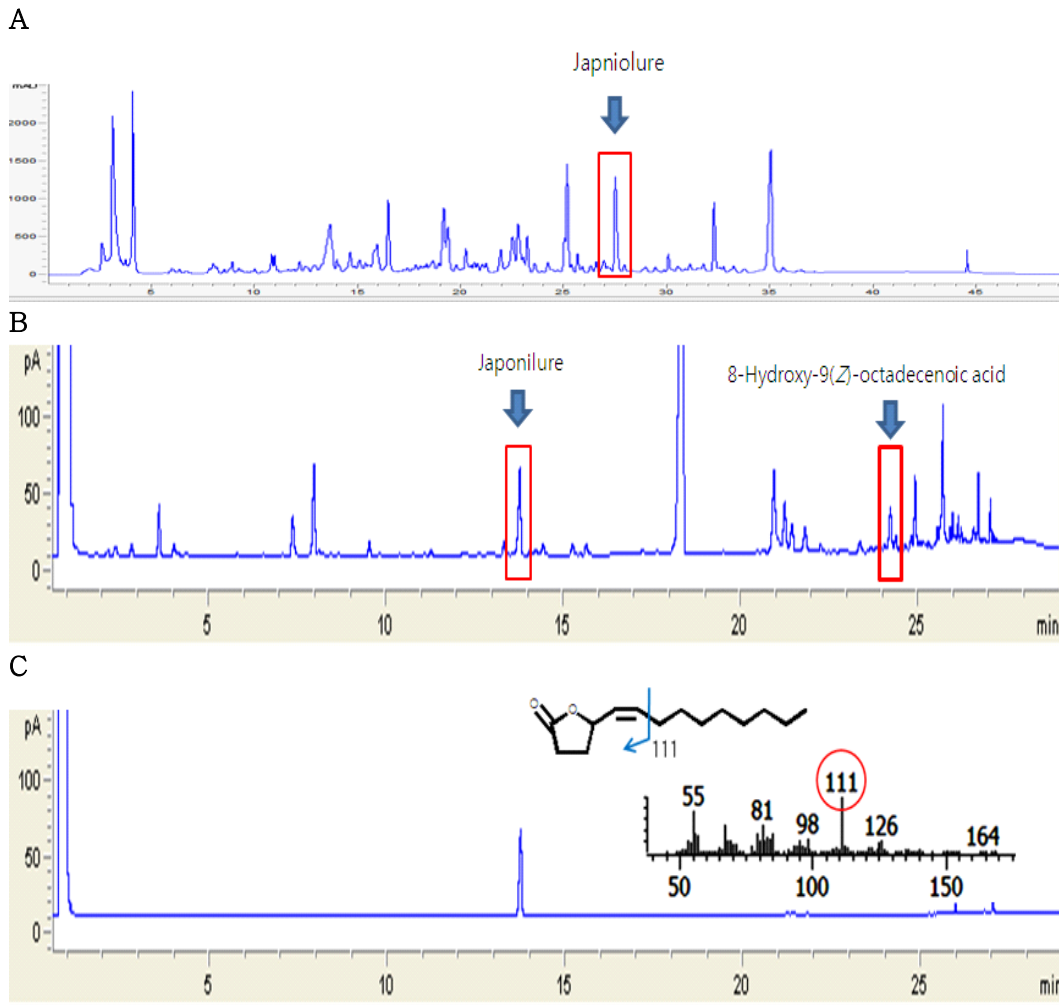


Fig. 27. Product identification of japonilure from 8-hydroxy-9-octadecenoic acid by whole cells of *C. palmiolephila*. (A) HPLC analysis of japonilure, (B) GC analysis of japonilure, (C) GC-MS analysis of purified japonilure.

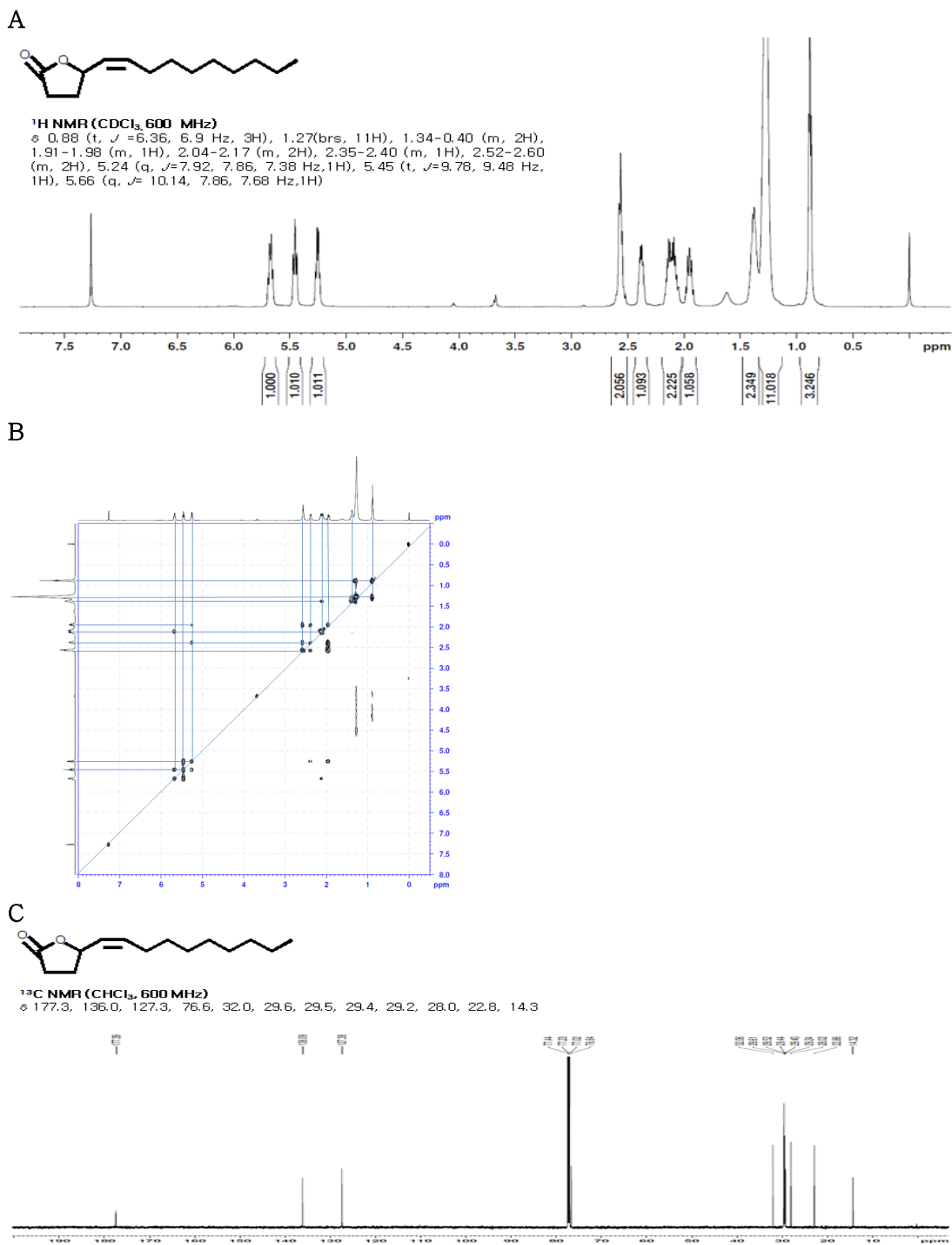


Fig. 28. NMR analysis of japonilure from 8-hydroxy-9-octadecenoic acid by whole cells of *C. palmiophila*. (A) ¹H NMR analysis of japonilure, (B) 2D-COSY analysis of japonilure, (C) ¹³C NMR analysis of purified japonilure.

제 4 절 유지로부터 hydroxy 지방산 및 락톤 생산 연구

농산유지로부터 바이오향료인 락톤을 생산하기 위해서는 우선 농산유지를 지방산으로 가수분해해야 함. 이에 1차년도는 lab scale에서 농산유지 가수분해에 사용할 여러 종류의 lipase를 개발하고 효소별 가수분해 실험함. 그 결과 CRL(*Candida rugosa* lipase) 유전자를 *Aspergillus niger* 에 삼입하여 생산한 CRL lipase 효소의 가수분해 효과가 제일 좋은 것으로 확인되었음.

각종 농산 유지 중 oleic acid 함량이 많은 것으로 확인된 올리브유를 가수분해하여 crude oleic acid를 얻었음. 시중에서 구매한 oleic acid와 올리브유를 가수분해하여 crude oleic acid로부터 10-hydroxy stearic acid로 전환실험 및 β -Oxidation에 의한 γ -dodecalactone 생산 실험을 진행하여 올리브유로부터 γ -dodecalactone을 생산하였음. 농산 유지 중 홍화유로부터 가수분해한 crude linoleic acid로부터 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid로 전환실험 및 β -Oxidation에 의한 γ -dodecalactone 생산 실험을 진행하여 홍화유로부터 γ -dodecalactone을 생산하였다. 들기름으로부터 9R-hydroxy-10E,12Z,15Z-octadecatrienoic acid (9R-HOTE) 와 9-Hydroxy-10,12(E,Z)-octadecadienoic acid (9R-HODE)를 생산하였으나 효모 반응으로 lactone 이 만들어지지 않았음.

1. CRL Lipase에 의한 농산유지 가수분해

농산유지로부터 바이오향료인 γ -dodecalactone의 scale up 생산을 목적으로 1차년도에 확립한 농산유지 가수분해 조건으로, 시중 마트에서 구매한 올리브유 가수분해 실험을 수행함. 실험에 사용된 CRL lipase는 CRL(*Candida rugosa* lipase) 유전자가 삼입된 *Aspergillus niger*를 자사의 고농도 액상배양기술로 발효 후 원심 분리하여 cell을 제거함. 회수된 상등액은 Ultrafiltration으로 5배이상 농축하고 효소 농축액에 일정한 양의 formulator를 첨가 후 Vacuum Control Freeze Dryer로 2,000 U/g 분말 제품을 생산함. 생산된 CRL lipase 제품은 아래 실험에 사용하였고, 올리브유는 아래와 같은 조건으로 가수분해 실험을 수행함.

기질: 유지 2kg와 물 1.4kg 혼합 (유지와 물을 무게비로 1 대 0.7);
효소: CRL lipase 5g (0.025%(유지무게기준));
반응조건: 37°C, 250 RPM;
반응시간: 24h이상
분석방법: KOH를 이용한 산가 측정법 및 GC 분석

가수분해 산물은 시간대별로 샘플링 후 바로 KOH를 이용한 산가 측정법으로 1차 확인하고, 가수분해율의 정밀분석은 GC를 이용. GC분석법은 아래에 같고, HP-INNOWAX 칼럼으로 분석한 결과 (Fig. 1) 가수분해 반응 24시간 때 올리브유 가수분해 산물 중 oleic acid의 함량은 80% 이상인 것으로 확인하고, 아래 γ -dodecalactone 생산 실험에 사용함. GC 분석조건은 다음과 같음.

Column: HP-INNOWAX
Oven temp: 100°C →15°C /min→260°C (10min)
Injector temp: 260°C
Detector temp: 250°C
Carrier gas: N2
Detector: FID dec
Sample: 1ul
Split ratio: 100:1

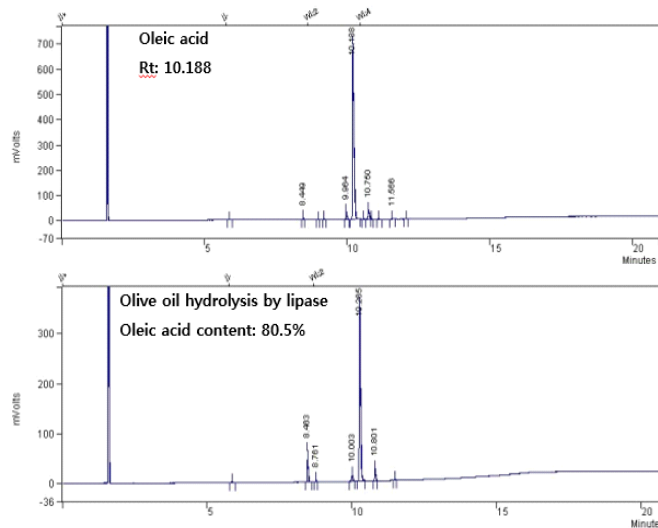


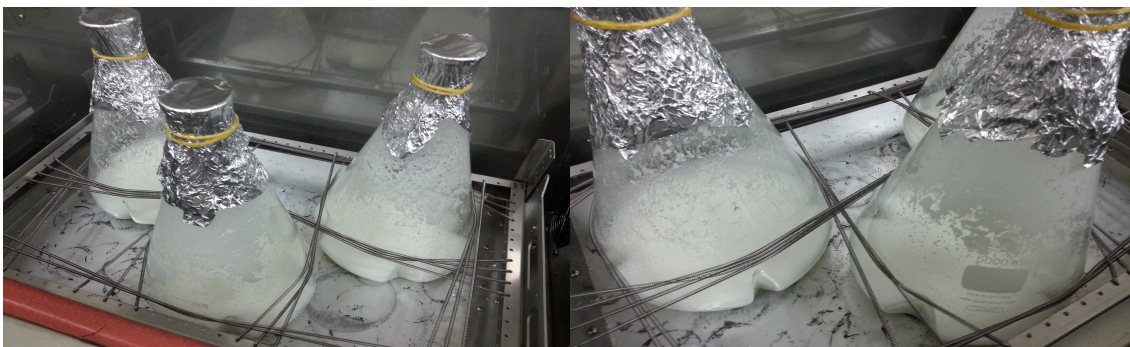
Fig. 1. Analysis of oleic acid content from olive oil hydrolysis.

2. Oleic acid로부터 oleate hydratase 처리에 의한 10-hydroxy stearic acid 생산

본 실험에 사용할 oleate hydratase 효소를 준비하기 위해 kanamycin20(항생제)을 넣은 LB(Difco)배지에 Pzt28a-hydratase가 삽입된 *E.coli* BL21를 5 L flask (working volume 1 L)에 3 개 배양함. IPTG induction 후 overnight 배양 후 회수함. 배양액은 Cell OD₆₀₀ 20으로 맞추어 아래 실험에서 oleate hydratase 효소를 사용함.

Oleic acid로부터 10-hydroxy stearic acid 전환 실험을 3 L 멸균한 flask (1L working volume)에서 수행함. 전환 실험에 사용한 기질은 시중에서 구매한 oleic acid와 위에서 농산 유지인 올리브유를 가수분해하여 얻은 crude oleic acid를 각각 사용함.

전환 반응 조건은 최종으로 oleic acid 50 g/L(올리브유를 가수분해하여 얻은 crude oleic acid는 oleic acid의 실제 함량을 감안하여 계산해서 넣음), Cell (oleate hydratase) 20g/L, tween80 0.05%, 50 mM Tris-Cl buffer(pH6.5)로 volume을 맞추고 200rpm, 35°C에서 16시간 반응함.



반응 종료 후 반응액은 2 N HCl 2~3방울로 적정하여 pH 2로 맞추고, 반응액이 들어 있는 flask 자체에 열을 가하여 10 min 끓여줌. 적당한 온도로 식힌 후 Ethyl acetate를 1:1로 동량 처리 후 centrifugation (6,000 rpm, 4 °C, 30 min) 및 용매를 휘발시킴.

회수된 10-hydroxystearic acid는 NMR (Fig. 2, 3) 분석을 수행. 시중에서 10-hydroxystearic acid는 구할 수 없으므로 12-hydroxyoctadecanoic acid (시그마사)를 구매하여 표준품으로 사용. NMR분석 결과 oleic acid로부터 oleate hydratase 효소에 의해 전환된 물질은 10-hydroxystearic acid임을 확인함.

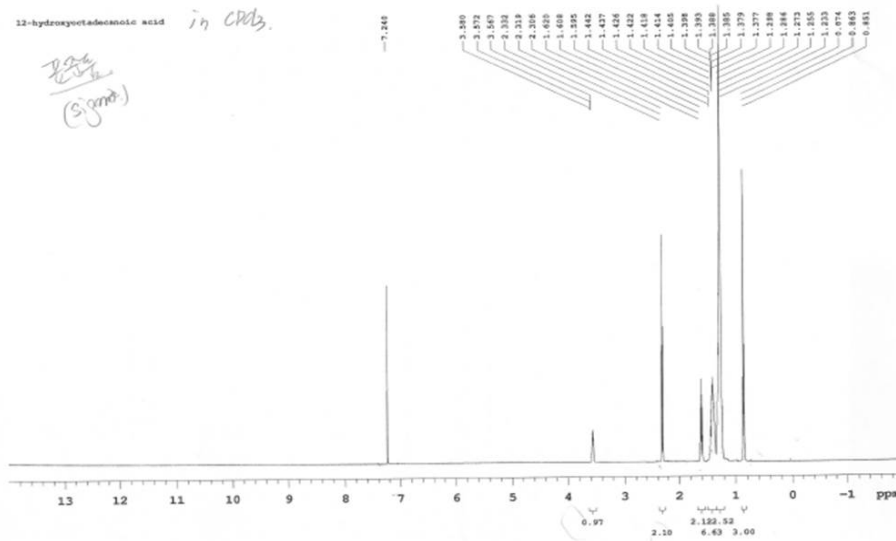


Fig. 2. MNR Data (12-hydroxyoctadecanoic acid from sigma)

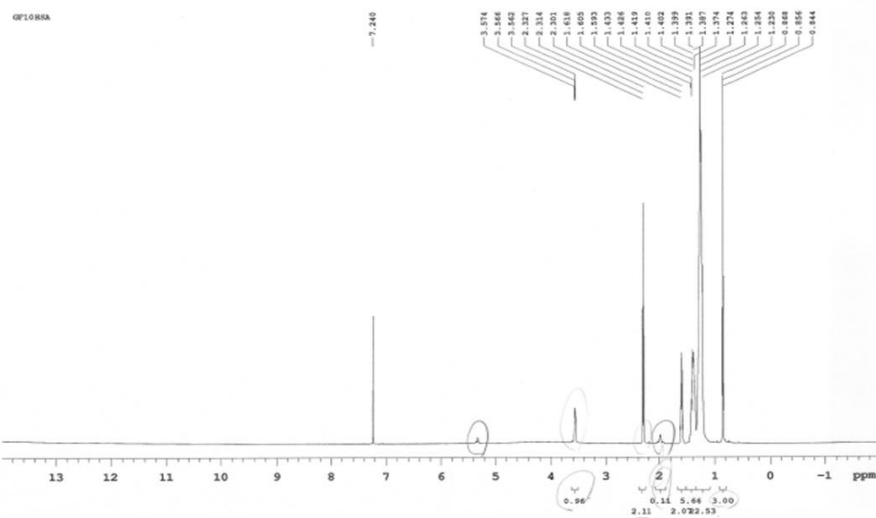


Fig. 3. MNR Data (from oleic acid to 10-hydroxy stearic acid by oleate hydratase)

oleic acid로부터 10-hydroxystearic acid 전환율을 확인하기 위해 GC (Fig. 4)로 분석하였고, 그 결과 상당수의 oleic acid가 10-hydroxystearic acid로 전환됨을 확인. 시중에서 구매한 oleic acid 와 올리브유를 가수분해하여 얻은 crude oleic acid로부터 10-hydroxy stearic acid 전환율은 모두 78% 정도이고 기질의 순도에 따른 전환율에는 차이는 크게 없는 것을 확인할 수 있었음. 이에 oleic acid나 올리브유를 가수분해하여 얻은 crude oleic acid 모두 γ -dodecalactone 생산에 모두 사용가능할 것으로 기대함.

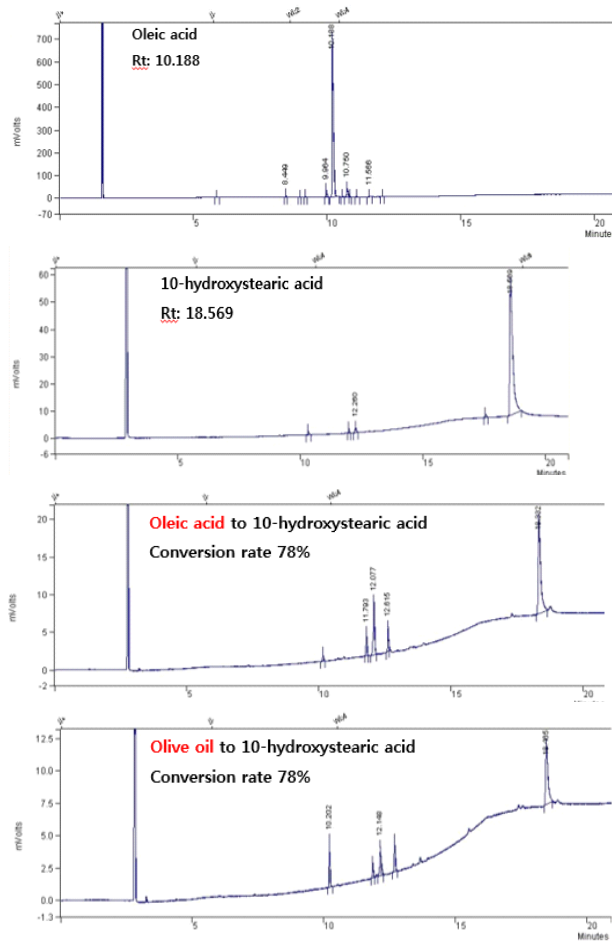


Fig. 4. Analysis of 10-hydroxystearic acid conversion yields from oleic acid and olive oil

3. *W. lipofer*에 의한 γ -dodecalactone 생산

YPG 배지 4 L에 *Waltomyces lipofer* (KTCC17657) 접종하고 200rpm, 28°C, 12~15hr 전배양한다. YPG 배지에 Oleic acid를 첨가하여 YTGO배지를 만들어 전배양한 Seed를 접종하고 200 rpm, 28 °C, 12~15 hr 배양하여, Cell을 회수(6,000 rpm, 4 °C, 30 min).

회수한 Cell은 아이스에 방치 후 0.85 % NaCl로 녹여서 Washing하여 centrifugation (6,000 rpm, 4 °C, 30 min)하여 회수하고 아래 β -Oxidation 실험에 이용함.

회수한 Cell을 Permeabilization하여 γ -dodecalactone 전환 실험에 사용함. Cell pellet에 50 % EtOH (100 mM Buffer를 이용하여 만듦)를 넣고 풀어준 뒤, 5 min간 Ice에 보관함. 12,000 rpm, 30 min 동안 cell down, Cell pellet에 100 mM Tris-HCl buffer (pH 6.5)로 두 번 세척함. (12,000 rpm, 4 °C, 30 min) Cell pellet에 0.5 % Triton X-100 (Buffer 이용하여 만듦)을 넣고 풀어준 뒤, 5 min간 Ice에 보관, 12,000 rpm, 30 min 동안 cell down, 100 mM Tris-HCl buffer (pH 6.5)로 두 번 세척하여 Permeabilization을 종료함.

멸균한 5 L Flask에 기질 (10-hydroxystearic acid) 20 g/L, *Waltomyces lipofer*(Permeabilization) 10 g/L, 0.2 % tween80을 첨가하여, 0.7 M Tris-HCl buffer (pH 6.5)로 200 rpm, 35 °C에서 30 hr 반응함.

반응 종료 후 20 %의 HCl로 적정하여 pH2 를 맞추고 flask 자체에 열을 가하여 100 °C, 5 min 끓여줌. 충분히 식힌 후 Ethyl acetate를 1:1로 동량 처리 후 추출. centrifugation (6,000 rpm, 4 °C, 30 min) 한 후 상층액만 취함. 모아진 상층액을 speed vac(30°C, 30min)을 이용하여 용매를 제거 후, silylation (3:1, pyridine : N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide)을 시켜 GC로 분석함.

Column: Supelco SPB-1 capillary column
 Oven temp: 100°C → 20°C/min → 220°C (25min)
 Injector temp: 260°C
 Detector temp: 250°C
 Carrier gas: N₂
 Detector: FID dec
 Sample: 1 μ l
 Split ratio: 100:1

10-hydroxystearic acid로부터 γ -dodecalactone 전환율은 위에 GC 분석조건으로 분석했고, 생성된 γ -dodecalactone을 정량하여 71% 전환율을 얻음.

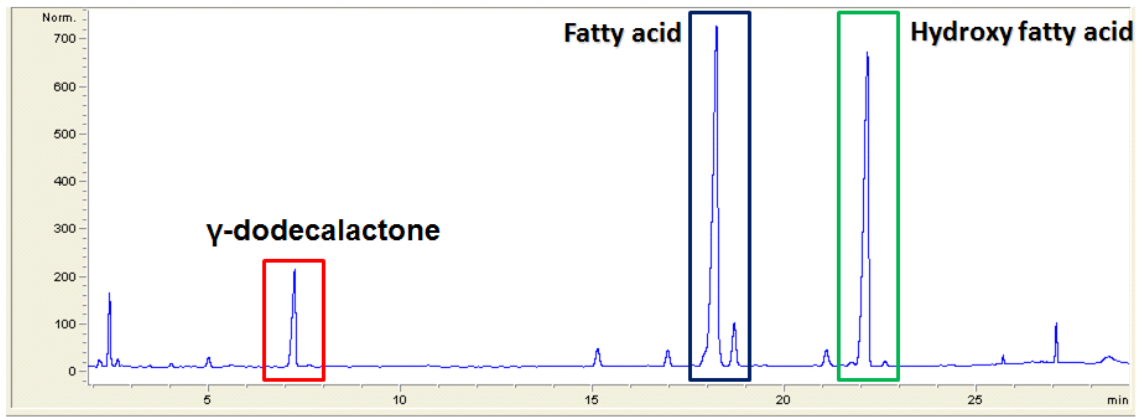


Fig. 5. Analysis of γ -dodecalactone conversion yields from 10-hydroxystearic acid.

4. 올리브유로부터 γ -dodecalactone 생산

올리브유를 CRL lipase 효소를 처리하여 crude oleic acid를 만들고 *S. maltophilia* oleate hydratase를 반응 시켜 oleic acid를 10-hydroxystearic acid로 전환시킨 후 만들어 *W. lipofer* whole cells을 첨가하여 γ -dodecalactone을 생산함 (Fig. 6). 40 g/L의 olive유로부터 25 g/L의 γ -dodecalactone을 생산함.

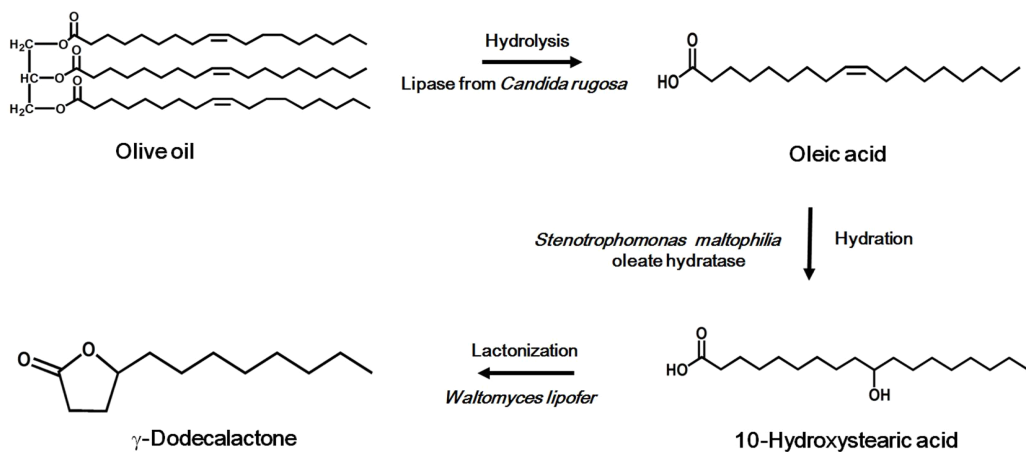


Fig. 6. Production of γ -dodecalactone from olive oil by *C. rugosa* lipase, *S. maltophilia* oleate hydratase, and whole cells of *W. lipofer* via oleic acid and 10-hydroxy stearic acid.

5. 홍화유로부터 γ -dodecelactone 생산

홍화유(Safflower oil)를 CRL lipase 효소를 처리하면 80% linoleic acid와 14% oleic acid가 만들어 짐. 이 용액에 *S. nitritireducens* 전세포와 반응시켜 linoleic acid를 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid로 oleic acid를 10-hydroxystearic acid로 전환시킨 후 *Candida boidinii* whole cells을 첨가하여 γ -dodecelactone과 γ -dodecalactone을 생산함 (Fig. 7). 총 γ -lactones 중 γ -dodecelactone이 75%이었고 γ -dodecalactone이 25%이었음. 생산된 γ -dodecelactone과 γ -dodecalactone은 정제없이 화장품 원료로 사용할 수 있을것으로 보임.

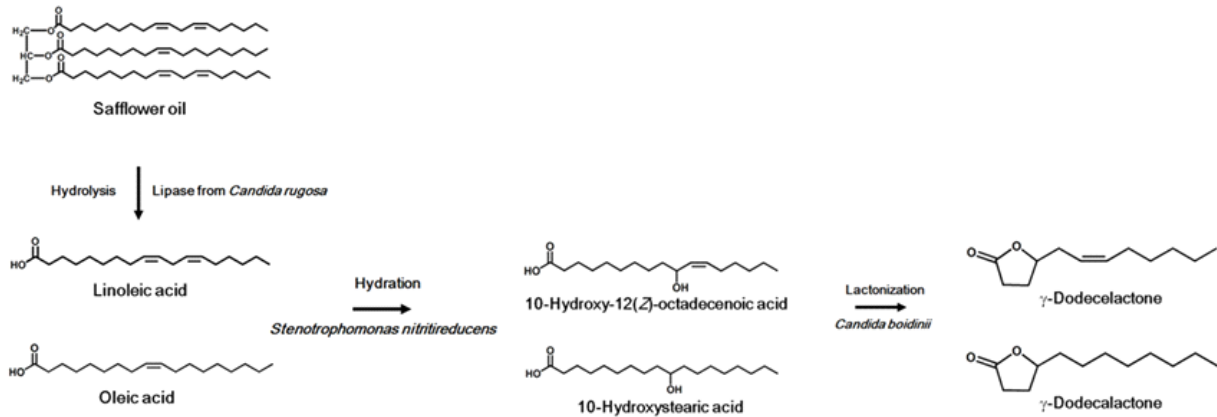


Fig. 7. Production of γ -lactones from safflower oil by lipase and whole cells of *S. nitritireducens* and *C. boidinii* via fatty acids and hydroxy fatty acids.

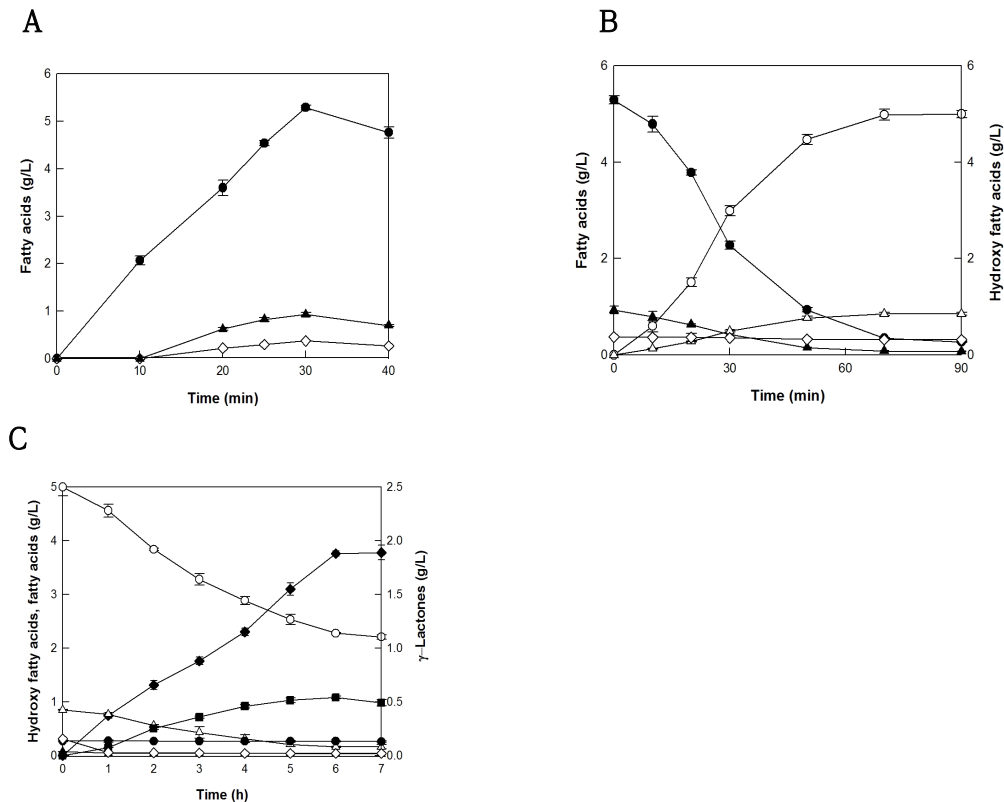


Fig. 8. (A) Production of fatty acids from safflower oil by lipase from *C. rugosa*. Fatty acids were linoleic acid (●), oleic acid (▲), and palmitic acid (◇). (B) Production of hydroxy fatty acids from fatty acids by whole *S. nitritireducens* cells. Linoleic acid (●) and oleic acid (▲) were converted to 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid (○) and 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid acid (△), respectively, by whole *S. nitritireducens* cells. (C) Production of γ -lactones

from hydroxy fatty acids by whole *C. boydini* cells. The cells consumed oleic acid (▲) and linoleic acid (●), however, they poorly consumed palmitic acid (◇). γ -Dodecelactone (◆) and γ -dodecalactone (■)

홍화유를 *Candida rugosa* lipase를 이용하여 다양한 지방산을 생산함 (Fig. 8A). 회수한 지방산 산물을 기질로 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid를 전환할 수 있는 *S. nitritireducens*를 이용하여 oil 가수분해 물의 지방산을 수산화 시켜 수산화 지방산을 생산 (Fig. 8B). 이를 이용하여 최종 생산물인 γ -dodecelactone을 생산함 (Fig. 8C). 홍화유로부터의 최대 생산을 나타내는 시간을 알아본 결과, oil을 가수분해하는 시간을 포함한 총 8시간동안 7.5 g/L의 홍화씨유로부터 1.88 g/L의 γ -dodecelactone을 생산하였고, 전환율은 25%였으며, 생산성은 $235 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 로 나타냄. 홍화유에서 γ -lactones로의 생물전환 과정 중에 각각의 단에서 전환수율과 생산성은 Table 1에 나타냄.

Table 1. Biotransformation of safflower oil to γ -lactones

Step	Hydrolysis	Hydration	Lactonization
Substrate (g/L) [mM]	Safflower oil (7.50)	Linoleic acid (5.30) [18.90] Oleic acid (0.93) [3.20]	10-Hydroxy-12-(Z)-octadecenoic acid (5.00) [16.78] 10-Hydroxystearic acid (0.85) [2.82]
Product (g/L) [mM]	Linoleic acid (5.30) Oleic acid (0.93) Palmitic acid (0.37)	10-Hydroxy-12-(Z)-octadecenoic acid (5.00) [16.78] 10-Hydroxystearic acid (0.85) [2.82]	γ -Dodecelactone (1.88) [9.60] γ -Dodecalactone (0.54) [2.7]
Productivity (g/L/h)	10.6 ± 0.09 1.86 ± 0.89 0.74 ± 0.005	4.27 ± 0.09 0.73 ± 0.03	0.310 ± 0.004 0.090 ± 0.002
Step yield (g/g) [mM/mM]	0.71 0.12 0.05	0.94 [0.89] 0.91 [0.88]	0.38 [0.57] 0.64 [0.96]
Total yield (% g/g)	0.71 0.12 0.05	0.67 0.12	0.25 0.08

- 화장품 원료로 사용 시 생물전환으로 생산된 lactone은 정제가 필요 없음. 정제된 생물 전환된 lactone은 화학 합성된 lactone과 차별성이 없으나 천연오일에서 생산된 정제되지 않은 생물 전환된 lactone은 화학 합성된 lactone과 차별성이 있음.

6. 들기름으로부터 9R-HOTE 생산

가. 들기름으로부터 9R-HOTE 생산을 위한 lipase 가수분해 효과 및 성분분석

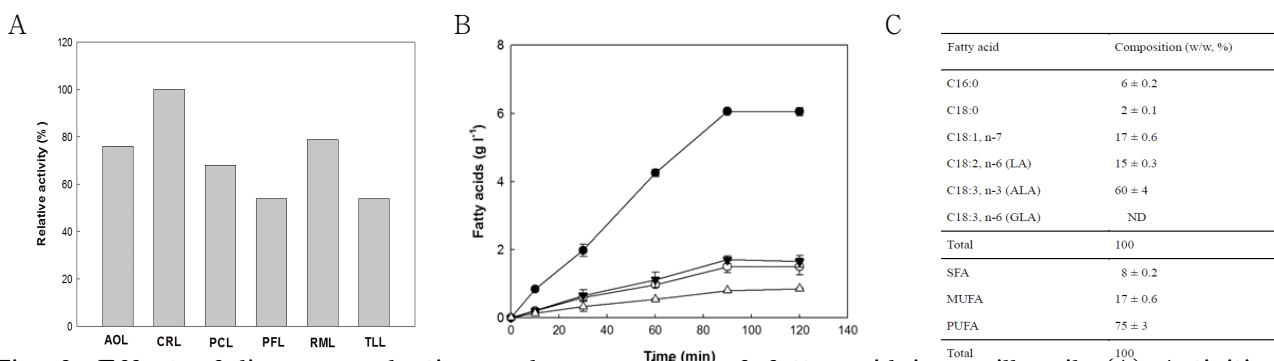


Fig. 9. Effect of lipase, production and composition of fatty acid in perilla oil. (A) Activities of lipase for releasing ALA from perilla oil. Lipases from recombinant *Aspergillus oryzae* (AOL), *Candida rugosa* (CRL), *Pseudomonas cepacia* (PCL), *Pseudomonas fluorescense* (PFL), *Rhizomucor meihei* (RML), and *Thermomyces lanoginosus* (TLL) were obtained from Sigma and used as 0.1 U/ml for reaction at room temperature for 1h. (B) Production of fatty acids from PO by *candida rugosa* lipase (CRL). Fatty acids were α -linoleic acid (filled circle), linoleic

acid (empty circle), oleic acid (filled inverse triangle), and other fatty acids (empty triangle). The reactions were performed in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 1 g/L lipase, 10 g/L PO, and 0.02% (w/v) Tween 80 at 37 ° C with agitation at 200 rpm for 2 h. (C) Fatty acid composition of perilla oil by CRL. Detection was performed using GC.

들기름으로부터 수산화지방산을 생산하기 위해 몇 가지 lipase를 이용하여 분석한 결과 *Candida rugosa* lipase (CRL)가 가장 적합하였고 직접 생산결과 시간 당 4 g/L의 ALA를 유리시켰음 (Fig. 9A 및 B). 들기름의 성분을 조사한 결과 75 %가 ALA와 LA로 구성되어 9R-LOX의 기질이 될 수 있었음 (Fig. 9C).

나. 들기름 가수 분해물로부터 9R-HOTE 및 9R-HODE 생산

들기름 가수 분해물을 이용한 수산화지방산의 생산을 수행하였음. 들기름 가수 분해물에서 확보한 40 g/L ALA로부터 34 g/L의 9R-HOTE를 생산하여 85%의 수율과 시간당 34 g/L의 생산성을 보임. LA의 경우 10 g/L LA로부터 10 g/L의 9R-HODE를 생산하여 99.9 %의 수율과 시간당 20 g/L의 생산성을 나타냄 (Fig. 10).

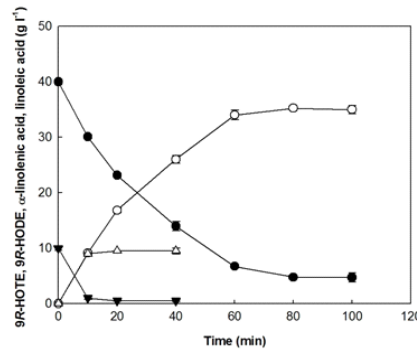


Fig. 10. Production of 9R-HOTE (empty circle) and 9R-HODE (empty triangle) from ALA (filled circle) and LA (filled inverse triangle) in PO hydrolyzate. The reactions were performed in a 500 mL baffled flask in 80 mL of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) consisting of PO hydrolyzate, which contained 40 g/L ALA, 10 g/L LA, 15.3 g/L of other fatty acids, 5% (v/v) acetone, 0.2% (v/v) Tween 80, and 1 g/L purified 9R-LOX at 15 ° C for 100 min with agitation at 250 rpm.

다. 9R-HODE 및 9R-HODE 생산 결과 비교

Lipoxygenase를 이용한 기존결과와 9R-HOTE 및 9R-HODE 생산정도를 본 연구결과와 비교한 결과 본 연구에서의 생산성이 가장 우수한 것으로 나타남 (Table 1).

Table. 1 Production of hydroperoxy- and hydroxy fatty acids from PUFA and oil hydrolyzate by lipoxygenases.

Source of LOX	Biocatalyst	Substrate (g/L)	Product (g/L)	Molar yield (%)	Productivity (g/L/h)	Reference
Potato	immobilized	LA (0.12)	9-HODE (0.077)	64.2	NA	(del Carmen Pinto et al. 1997)
Potato	crude	TLH (1.5)	9S-HPODE (1.24)	82.7	NA	(Gargouri and Dominique Legoy 2002)
Soybean	Two-phase	LA (20)	13-HPODE* (12.04)	60.2	NA	(Drouet et al. 1994)
Soybean	Crude	LA (40)	13S-HPODE (36)	90	9	(Elshof et al. 1998)
Soybean	Crude	TLH (6 ^{***})	13S-HPODE (5.7)	96.1	NA	(Gargouri and Legoy 1997)
Soybean	Crude	FOH (78.5 ^{***})	13S-HPOTE ^{****} (62.8)	80	31.4	(Fauconnier and Marlier 1996)
Soybean	Partial purified	LA (28)	13-HPODE (22.4)	80	22.4	(Iacazio et al. 1990)
Soybean	Partial purified	LA (28)	13S-HPODE (15.1)	54	NA	(Martini et al. 1994)
<i>G. graminis tritici</i> LOX in <i>T. reesei</i>	Secreted crude	LA (300)	13S-HPODE* (120)	40	3.6	(Villaverde et al. 2013b)
<i>P. aeruginosa</i> LOX in <i>T. reesei</i>	Secreted crude	LA (10)	9S+13S-HPODE (7.5)	75	0.16	(Villaverde et al. 2013a)
<i>Nostoc</i> sp. LOX in <i>E. coli</i>	Recombinant cells	LA (15)	9R-HODE (14.3)	95	14.3	(Kim et al. 2014)
<i>B. thaliandensis</i> LOX in <i>E. coli</i>	Recombinant enzyme	LA (20)	13-HODE (20.8)	99	10.1	(An et al. 2015)
<i>Nostoc</i> sp. LOX in <i>E. coli</i>	Recombinant enzyme	LA (40)	9R-HODE (38.4)	96	38.4	this study
		ALA (40)	9R-HOTE (37.6)	94	37.6	this study
		POH (40 ^{***})	9R-HOTE (35.2)	85	34	this study

NA: Not available, TLH: Trilimolein hydrozate, FOH: Flax seed oil hydrozate, POH: Perilla seed oil hydrozate.

제 5 절 바이오 향료의 산업화 연구

1. Hydroxy 지방산 및 락톤류 분리 정제

당해연도 연구에서 확보한 hydroxy 지방산을 정제하고 정제 산물로부터 lactone을 생산 후 분리 정제할 수 있는 방법을 수행함.

가. Hydroxy 지방산의 분리 정제 공정 연구

(1) 반응산물로부터 hydroxy fatty acids 정제 및 물질 동정

Hydroxy fatty acids 정제: 전세포 촉매 또는 지방산 수산화효소를 이용하여 생산된 hydroxy fatty acids는 유기용매 저온 분별 정제법 또는 silicic acid open column chromatography를 사용하여 순도 99%로 정제하여(Fig. 1) GC로 분석하였음 (Fig. 2A).

Hydroxy fatty acids 물질 동정: 유기용매 저온 분별 정제법 또는 silicic acid open column chromatography를 이용하여 정제된 hydroxy fatty acids는 GC/MS를 통해 각 해당 물질의 구조 분석을 완료함 (Fig. 2BC 및 Table 1).

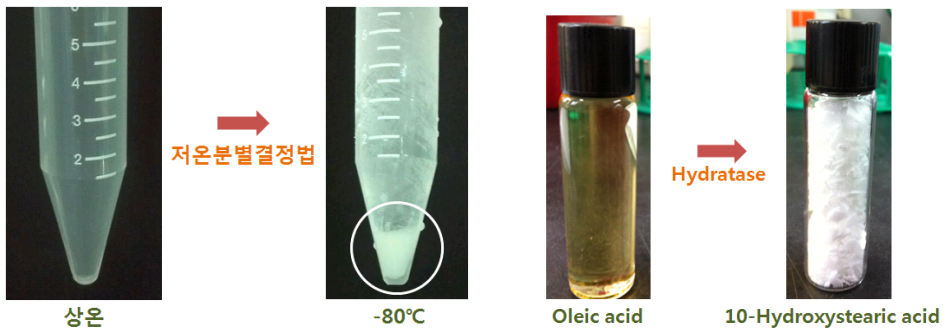


Fig. 1. 저온분별법에 의한 산물정제

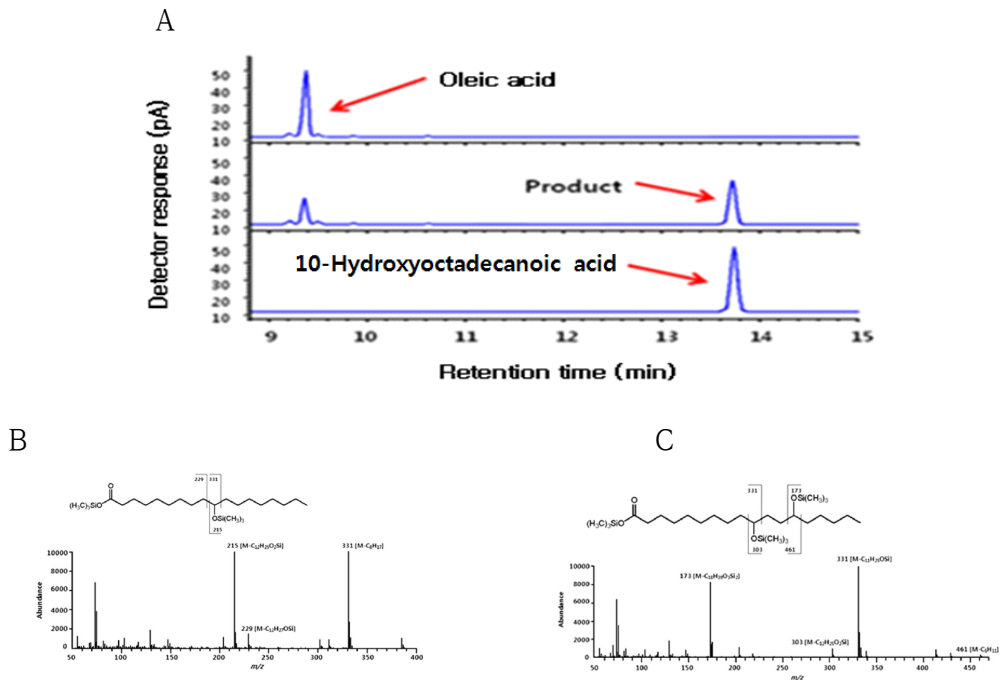


Fig. 2. Gas chromatography and gas chromatography/mass spectroscopy (GC/MS) analysis of purified hydroxy fatty acid products.

Table 1. GC/MS spectrum of the hydroxy fatty acids product obtained from *cis*-9 or *cis*-9 and *cis*-12 unsaturated fatty acids by oleate hydratase.

Substrate	Product(s)	GC retention time (min)	GC/MS fragments (m/z)
Myristoleic acid	10-Hydroxytetradecanoic acid	7.15	388(M), 331, 229, 159
Palmitoleic acid	10-Hydroxyhexadecanoic acid	10.26	416(M), 331, 229, 187
Oleic acid	10-Hydroxyoctadecanoic acid (A)	13.76	444(M), 331, 229, 215
Linoleic acid	10-Hydroxy-12(<i>Z</i>)-octadecenoic acid	13.39	442(M), 331, 229, 213
	10,13-Dihydroxyoctadecanoic acid	13.60	532(M), 461, 331, 303, 173
α -Linolenic acid	10-Hydroxy-12(<i>Z</i>),15(<i>Z</i>)-octadecadienoic acid (B)	13.45	440(M), 331, 229, 211
	10,13-Dihydroxy-15(<i>Z</i>)-octadecenoic acid	13.65	530(M), 461, 331, 301, 171
γ -Linolenic acid	10-Hydroxy-6(<i>Z</i>),12(<i>Z</i>)-octadecadienoic acid	12.72	440(M), 329, 227, 213
	10,13-Dihydroxy-6(<i>Z</i>)-octadecenoic acid	12.84	530(M), 459, 329, 303, 173

(2) 배양액에서 10-hydroxystearic acid (10-HSA)의 추출

Ethyl acetate, Chloroform, Hexane, Methanol을 사용하여 추출하여 Gas Chromatograph를 통해 분석하여 본 결과 Methanol의 추출 효율이 가장 높음을 확인 (Fig. 3).

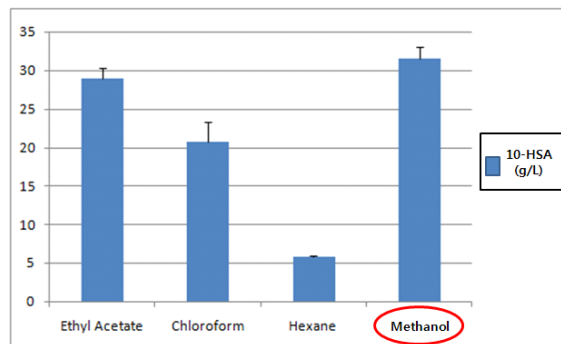


Fig. 3. 추출용매 효율 실험 결과

Methanol을 사용하여 10-HSA를 분리·정제하여 본 결과 Table 5와 같이 83.9g을 추출하였으며 추출 수율을 계산하여 본 결과 약 70%의 수율을 나타내었다. 분석한 결과 정제 순도 역시 98% 이상을 나타냄 (Fig. 4).

Table 2. Methanol을 사용하여 추출된 10-HSA양의 측정

Methanol 추출 횟수	1차	2차	3차	4차	합계
규조토 + 10-HSA (g)	447.26	355.39	318.49	274.82	
추가한 Methanol의 부피 (ml)	900	710	640	550	
10-HSA 생산량 (g)	41.69	23.24	14.47	4.5	83.9

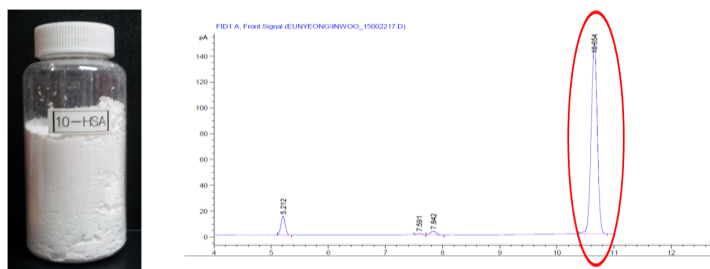


Fig. 4. 10-Hydroxy stearic acid의 제품 및 순도 측정 결과

나. γ -Lactones 정제 및 물질 동정

(1) γ -Lactones 정제

W. lipofer 전세포 촉매를 이용하여 생산된 γ -lactones은 oil bath를 사용하여 환류냉각증류법을 통해 각 해당 락톤을 99% 순도 이상으로 정제하고 (Fig. 5) GC로 분석함 (Fig. 6A).

(2) γ -Lactones 물질 동정

환류냉각증류법을 이용하여 정제된 γ -lactones은 GC/MS를 통해 각 해당 물질의 구조분석을 완료함 (Fig. 6BCD 및 Table 3).



Fig. 5. 정제된 고순도 γ -dodecalactone

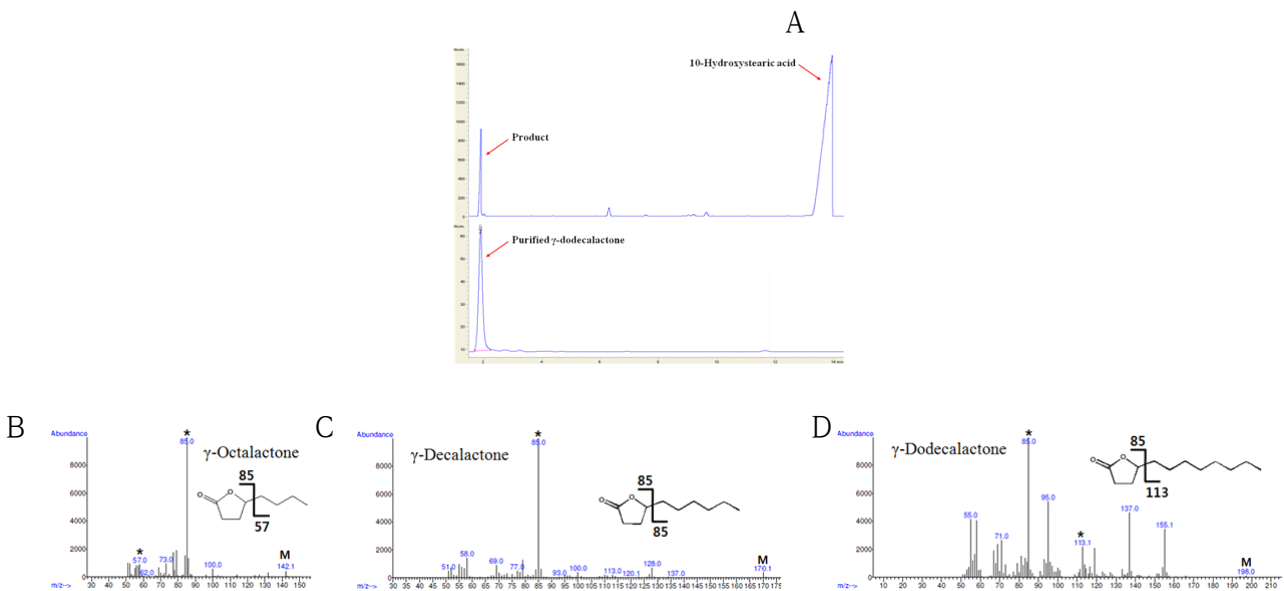


Fig. 6. Gas chromatography and gas chromatography/mass spectroscopy (GC/MS) analysis of purified γ -lactone products.

Table 3. Gas chromatography/mass spectroscopy (GC/MS) spectrum of the γ -lactone products obtained from hydroxy fatty acids by *W. lipofer*.

Substrate name	Product name	GC/MS fragments (m/z)
10-Hydroxytetradecanoic acid	γ -Octalactone (C)	85, 57, 142(M)
10-Hydroxyhexadecanoic acid	γ -Decalactone (D)	85, 170(M)
10-Hydroxystearic acid	γ -Dodecalactone (E)	85, 113, 198(M)
Ricinoleic acid	γ -Decalactone (D)	85, 170(M)
12-Hydroxystearic acid	γ -Decalactone (D)	85, 170(M)

2. 락톤 생산 산업화 연구

기존의 γ -lactone을 생성하는 조건에서 사용되는 배지와 반응 완충용액의 경우에는 재료로 사용되는 물질들 중 가격이 비싸 것들이 많음. 이는 소량으로 반응을 진행하기에는 적합할 수 있으나 대량으로 생산할 때는 부적합할 것으로 사료되어 산업화에 맞춰 저렴한 재료들로 변경하는 실험을 진행함.

가. 효모 *Yarrowia lipolytica*의 배양 배지 성분 최적화

γ -Lactone을 생성하는 실험을 진행할 때 사용되는 균주인 효모 *Y. lipolytica*는 yeast nitrogen base과 peptone을 포함하는 YPGO 배지에서 배양을 진행. 하지만 yeast nitrogen base와 peptone은 고가의 배지성분으로 균주를 대량으로 배양 시 사용하기 부적합할 것으로 예상되어짐. 이에 따라 저렴하고 대체 가능한 배지성분으로 yeast extract와 malt extract를 선발함. 이를 조합하여 기존배지와 세 종류의 대체배지를 선정함 (Table 4).

Table 4. Various medium composition for production of γ -lactone.

		Amount used (g/L)	Sales (kg)	Price (₩)	Per unit (g)	Price (₩)	Price for 1L medium (₩)
Basic compositions (YPGO medium)	Yeast nitrogen	10	10	4,970,000	1	497	4,970
	Peptone	10	10	2,270,000	1	227	2,270
	Glucose	1	22.6	60,000	1	2	2
	Oleic acid	5	1000	3,000,000	1	3	15
							7,257
Other compositions (YPO medium)	Yeast extract	10	1	18,700	1	18.7	187
	Peptone	10	10	2,270,000	1	227	2,270
	Oleic acid	5	1000	3,000,000	1	3	15
							2,472
Other compositions (YMO medium)	Yeast extract	10	1	18,700	1	18.7	187
	Malt extract	10	1	49,500	1	49.5	495
	Oleic acid	5	1000	3,000,000	1	3	15
							697
Other compositions (YGO medium)	Yeast extract	20	1	18,700	1	18.7	187
	Glucose	1	22.6	60,000	1	2	2
	Oleic acid	5	1000	3,000,000	1	3	15
							391

선정한 세 종류의 대체배지와 기존배지와 비교실험을 진행함. 네 종류의 배지에서 균주인 효모 *Y. lipolytica*를 배양하였으며 시간별로 cell mass를 측정하여 비교함. 그 결과, YPGO > YGO > YPO > YMO 순서로 균주의 성장을 확인할 수 있었으며 가장 많이 자란 YPGO 배지에서는 균이 약 4.5 g/L까지 자라는 것을 확인함 (Fig. 7).

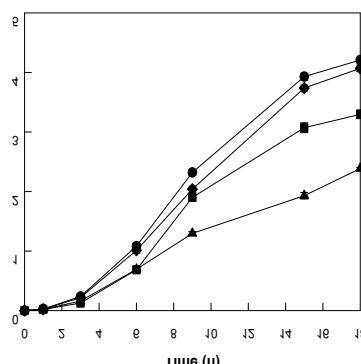


Fig. 7. Effect of culture media on the cell mass of yeast *Y. lipolytica*. Cultivation in YPGO medium (●), Cultivation in YPO medium (■), Cultivation in YMO medium (▲), Cultivation in YGO medium (◆).

다음으로 각각 네 종류의 배지에서 키운 효모 *Y. lipolytica*를 회수하여 whole cell 반응을 진행하여 활성을 비교함. 반응은 아래와 같은 조건에서 수행함.

- 기질: 10-Hydroxystearic acid 1g;
- Cell: Yeast *Y. lipolytica* 6g;
- 반응조건: 35°C, 200 RPM;
- 반응시간: 3 h
- 분석방법: HCl을 이용하여 반응 종료 및 GC 분석

그 결과, YMO > YGO > YPGO > YPO 순서로 활성을 확인할 수 있었으며, 기존의 YPGO 배지에서 균주를 배양하였을 때보다 YMO 배지에서 균주를 배양하였을 때 약 2.3배의 활성이 증가되는 것을 확인함 (Fig. 8). 가격이 가장 저렴하고 세포 생장이 두 번째로 우수하고 단위 세포당 활성이 두 번째로 우수하고 총 활성이 우수한 YGO 배지를 선정하였음.

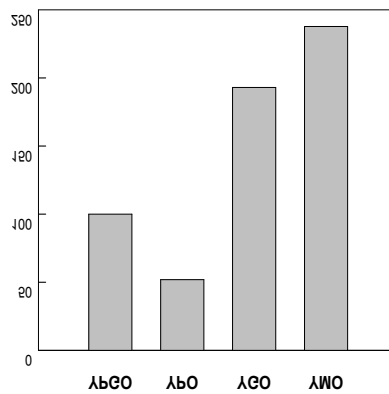


Fig. 8. Effect of culture media on the activity of γ -lactone production by whole cell reaction using yeast *Y. lipolytica*.

나. 효모 *Y. lipolytica*의 반응 완충용액 성분 최적화

기존 효모 *Y. lipolytica*를 이용하여 γ -lactone을 생성할 때 whole cell 반응을 진행함. 이 때 사용되는 완충용액은 lactone 생성반응에 필요한 질소원을 공급해줌. 선행 연구를 통해 Tris 10g/L에서 가장 활성이 높은 것을 확인함. 하지만 대량의 생산을 위해서 반응을 진행할 때 Tris를 사용하는 것은 부적합한 것으로 판단이 되어 대체 가능한 물질로 ammonium chloride와 ammonium acetate를 선정함 (Table 5).

Table 5. Various reaction buffer for production of γ -lactone.

		Amount used (g/L)	Sales (kg)	Price (₩)	Per unit (g)	Price (₩)	Price for 1L medium (₩)
Basic reaction buffer	Tris	12.11	50	2,340,000	1	46	557
	Ammonium chloride	5.3	907	1,300,000	1	1	5.3
Other reaction buffer	Ammonium acetate	7.7	1000	1,400,000	1	1	7.7

선정한 두 종류의 대체 완충용액과 기존 완충용액은 모두 100 mM로 농도를 맞추어 진행하였으며, 효모 *Y. lipolytica*를 이용하여 whole cell 반응을 진행함. 반응은 아래와 같은 조건에서 진행함.

기질: 10-Hydroxystearic acid 1g;
 Cell: Yeast *Y. lipolytica* 6g;
 반응조건: 35°C, 200 RPM;
 반응시간: 3 h
 분석방법: HCl을 이용하여 반응 종료 및 GC 분석

그 결과, 기존의 Tris를 완충용액으로 사용하였을 때, 가장 높은 활성을 보이는 것을 확인하였으며, ammonium acetate를 사용하였을 때 약 97%의 활성을 보이는 것을 확인함. 이 결과를 토대로 하여 기존의 Tris 대신 ammonium acetate를 반응의 완충용액으로 사용하기로 함 (Fig. 9).

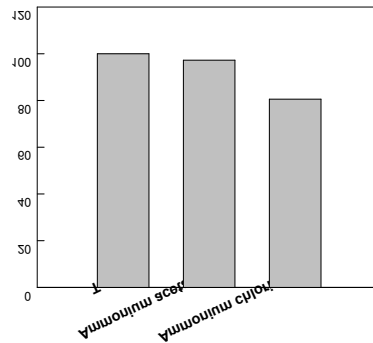


Fig. 9. Effect of various reaction buffer for production of γ -lactone.

다. 효모 *Y. lipolytica*를 이용한 다양한 γ -lactone의 생산

최적으로 확인된 조건아래에서 다양한 수산화 지방산을 기질로 하여 다양한 γ -lactone을 생산하는 실험을 진행함. 기질은 대표적으로 10-hydroxystearic acid와 추가적으로 12-hydroxystearic acid, 10-hydroxydecanoic acid를 선정하여 진행함. 최대 생산의 확인을 위해 시간별로 sampling을 진행하였으며, 반응조건은 아래와 같은 조건으로 진행함.

기질: 10-Hydroxystearic acid, 12-hydroxystearic acid, 10-hydroxydecanoic acid 20g;
 Cell: Yeast *Y. lipolytica* 120g;
 완충용액: 100 mM ammonium acetate buffer (pH 7.5)
 반응조건: 35°C, 200 RPM;
 반응시간: 12 h
 분석방법: HCl을 이용하여 반응 종료 및 GC 분석

분석은 GC를 이용하여 하였으며, standard 물질과의 retention time을 비교하여 확인함 (Fig. 10). Time course 확인 결과, 효모 *Y. lipolytica*를 이용하여 9시간동안 20 g/L의 10-hydroxystearic acid를 기질로 사용하였을 때, 8 g/L의 γ -dodecalactone을 생산하였고, 전환율은 40%, 생산성은 $0.8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 로 나타났음 (Fig. 11A). 또한 20 g/L의 12-hydroxystearic acid를 기질로 사용하였을 때, 6 g/L의 γ -decalactone을 생산하였고, 전환율은 30%, 생산성은 $0.6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 로 나타났음 (Fig. 11B). 세 번째로 20 g/L의 10-hydroxydecanoic acid를 기질로 사용하였을 때, 3 g/L의 γ -butyrolactone을 생산하였고, 전환율은 15%, 생산성은 $0.3 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 로 나타났음 (Fig. 11C). 또한 세 가지 반응에서 모두 9시간 이후에 생성된 γ -lactone이 분해되는 것을 확인할 수 있었으며, 이를 통해 γ -lactone의 최적 생산시간을 확인함.

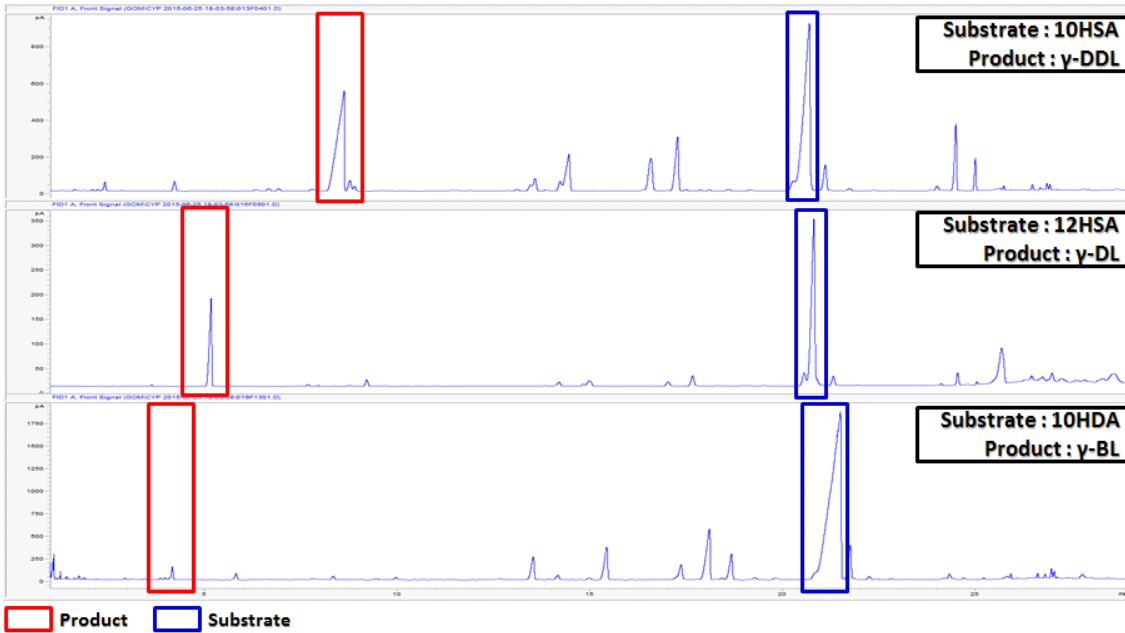


Fig. 10. GC analysis of γ -lactone from various hydroxy fatty acid by whole cells of *Y. lipolytica* under optimal conditions.

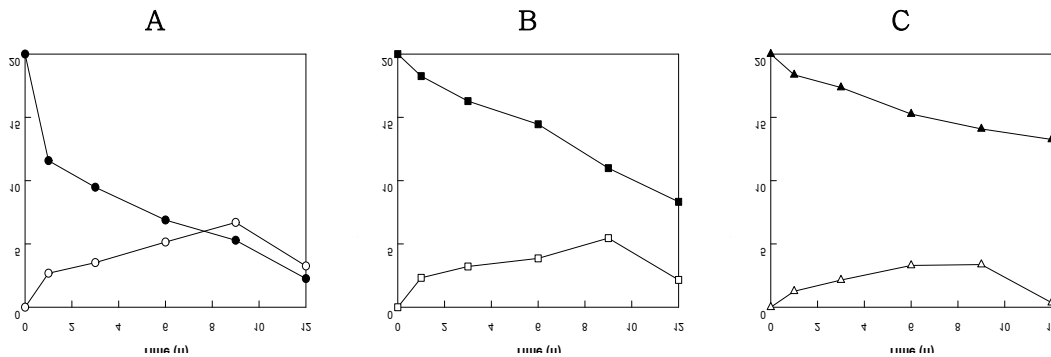


Fig. 11. Time-course reactions for the production of γ -lactone from various hydroxy fatty acid by whole cells of *Y. lipolytica* under optimal conditions. (A) γ -Dodecalactone production (●) from 10-hydroxystearic acid (○) by whole *Y. lipolytica* cells. (B) γ -Decalactone production (■) from 12-hydroxystearic acid (□) by whole *Y. lipolytica* cells. (C) γ -Butyrolactone production (▲) from 10-hydroxydecanoic acid (△) by whole *Y. lipolytica* cells.

라. Reactor을 이용한 γ -lactone의 대량생산 실험

현재까지 γ -lactone의 생산반응은 모두 작은 scale로 flask level로 진행함. 하지만 이를 이용하여 대량으로 생산하기 위해서는 reactor을 이용한 실험이 진행되어야 할 것으로 판단하여 2L 크기의 reactor을 이용하여 1 L volume으로 아래와 같은 조건으로 진행함.

- 기질: 10-Hydroxystearic acid 20g;
- Cell: Yeast *Y. lipolytica* 120g;
- 완충용액: 100 mM ammonium acetate buffer (pH 7.5) 1L
- 반응조건: 35°C, 200 RPM;
- 반응시간: 9 h
- 분석방법: HCl을 이용하여 반응 종료 및 GC 분석

그 결과, flask scale에서는 효모 *Y. lipolytica*를 이용하여 20 g/L 10-hydroxystearic acid로부터 8 g/L γ -dodecalactone이 생산되는 것을 확인하였으며, 전환율은 40%, 생산성은 0.8 g L⁻¹ h⁻¹로 나타났지만 반응 volume을 증가시켜 reactor scale로 반응을 하였을 때는 20 g/L

10-hydroxystearic acid로부터 5 g/L γ -dodecalactone이 생산되는 것을 확인하였으며, 전환율은 25%, 생산성은 0.5 g L⁻¹ h⁻¹로 나타났음 (Fig. 12). 이는 반응 volume이 증가함에 따라 생산 저해를 받는 것으로 사료됨.

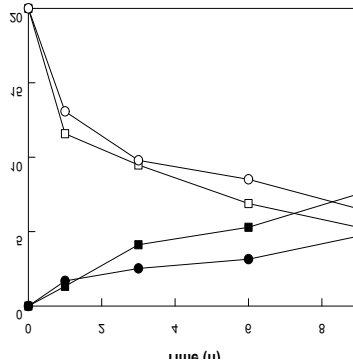


Fig. 12. Comparison of time-course reactions for the production of γ -dodecalactone from 10-hydroxystearic acid by whole cells of *Y. lipolytica* under optimal conditions. γ -Dodecalactone production (●) from 10-hydroxystearic acid (○) by whole *Y. lipolytica* cells using reactor, and γ -Dodecalactone production (■) from 10-hydroxystearic acid (□) by whole *Y. lipolytica* cells using flask.

3. 바이오향료의 제품화

당초 다양한 종류의 락톤류를 scale-up 생산하여 화장품 원료로서의 적합성 분석을 계획하였으나, γ -락톤류 고수율 전환 효모인 *Waltomyces lipofer* 균주의 성능 저하 문제로 고농도 락톤 생산이 불가하였고 이에 원인 파악 및 대안 발굴에 최선을 다하고 있음.

상기 노력의 일환으로 협동기관인 (주)제노포커스는 2015년 주관기관에서 등록 및 출원한 락톤 생산 핵심 특허 2건을 기술이전 받아 상용화 기술 개발을 위해 힘쓰고 있음. 현재 화장품 원료 적합성 실험에 사용할 수십 g이상의 고순도 바이오향료 시제품 생산을 위해 연구 중임.

기술이전 계약서

■ 계약의 명칭 : "생물전환 기술에 의한 다양한 락톤류 생산기술"에 관한 기술이전

2015년 08월 13일

계약당사자
(갑) 주주소: 서울시 용인구 농성로 15
 기관: 건국대학교 산학협력단
 대표: 단장 서정향 (인)
 연구개발자: 생명특성화대학 오덕근 교수
 담당자: 산학협력단 기술이전 이종환
 연락처: (02) 2049-6076

(을) 주주소: 대전시 유성구 테크노1로 65
 기관: (주)제노포커스
 대표이사: 김의중 (인)
 담당자: 경영지원실 이장자
 연락처: (042) 862-4483

(병) (중개기관) 주주소: 대전시 유성구 테크노1로 15
 기관: 제단법인 유성구 테크노1로 15
 원장: 권광희 (인)
 담당자: 지식재산팀 권재욱
 연락처: (042) 930-8113

제 1 조 (용어의 정의)
 본 계약서에서 사용되는 다음 각호에 기재되어 있는 용어는, 다른 특별한 언급이 없는 한, 각각 다음에 의미를 갖는다.
 ① "계약기술"이란 "갑"이 "병"에 관한 기술을 말한다.
 ② "계약특허"라 함은 (가)가 특허 출원 또는 등록 상태에 있는 하기의 특허를 말한다.

No	등록번호 (등록일자)	등록번호 (년/월/일)	발명의 명칭	상태
1	10-1383342 (2014/04/10)	10-201202062 (12/28)	효모의 배타-산화 유도에 의한 수산화 지방산으로부터 감마-데카락톤과 감마-부티로락톤의 제조방법 및 그 조성물	등록
2	-	10-2012156111 (12/16)	미생물에 의한 총화유로부터 고수율의 감마-락톤류의 제조방법 및 그 조성물	출원

③ "계약제품"이라 함은 "계약기술"을 사용하여 생산되는 제품을 말하고, 중간체 또는 원료를 생산하는 경우 그 중간체를 말한다.
 ④ "생산개시"라 함은 (을)이 "계약기술"을 이용하여 "계약제품"을 생산한 것을 말하며 그 해당 일을 "생산개시일"이라 한다.

제 2 조 (실시권의 내용)
 ① (갑)은 (을)이 본 계약 조건에 따라 대한민국 내에서 "계약기술"을 실시하는데 동의하여 (을)에게 권리의 통상실시권을 허여한다. 단, 국외 실시의 경우에는 제3조에 따른다.
 ② 본 조 제①항의 통상실시권이라 함은 (을)이 정당하게 "계약제품"을 제조, 판매(국내 제품 판매 및 해외 제품 판매 포함)할 수 있는 권리를 말한다.
 ③ (갑)은 본 계약 발효 이후 "계약특허"에 대한 보정, 등록 및 유지, 실시권 설정에 소요되는 비용을 부담한다.
 ④ (을)은 (갑)의 사전 동의 없이 제3자에게 "계약기술"을 제공하거나 양도할 수 없으며, (갑) 또한 본 계약의 효력이 존속하는 동안에는 본 계약에 의하여 취득되는 제반권리와 의무 제3자에게 제공하거나 양도할 수 없다.

제3조(국외실시)
 "국외실시"는 대한민국 이외의 지역에 실시권을 대여하거나 기술을 수출하는

4. 바이오 향료 시제품 생산

본 과제 수행기간에 개발한 기술을 활용하여 flask scale에서 다음과 같은 다양한 종류의 바이오향료 시제품을 생산하였음.

가. γ -Dodecalactone

10-hydroxystearic acid는 oleic acid를 기질로 하고 *S. maltophilia* 유래 oleate hydratase 재조합 효소에 의해 생산됨. oleate hydratase 효소를 생산하기 위해 kanamycin을 넣은 LB배지에 Pzt28a-hydratase가 삽입된 *E.coli* BL21를 1L flask에 배양함. Cell O.D. (600 nm)가 0.6 ~ 0.8일 때 0.1 mM IPTG로 16 °C, 150rpm 조건에서 induction함. overnight 배양 후 회수한 배양액은 0.85 % saline으로 1회 washing하고 아래 실험에 사용하였음.

Oleic acid로부터 10-hydroxy stearic acid로의 전환은 1L 멸균한 flask에 기질 50g/L oleic acid, 효소 *S. maltophilia* 유래 oleate hydratase cell 10 g/L, 50 mM Citrate-phosphate (pH 6.5), 0.05 % Tween 40, 35 °C, 200 rpm 조건에서 16시간 반응함. 반응 종료 후 반응액은 HCl로 pH 2로 맞추고, 반응액이 들어 있는 flask에 열을 가하여 10분간 끓여줌. 식힌 후 동량의 Ethyl acetate를 처리하고 centrifugation (6,000 rpm, 4 °C, 30 min) 및 용매를 휘발시키고 10-hydroxystearic acid를 회수하여 γ -dodecalactone 전환 기질로 사용하였음.

락톤은 고리형 에스테르로서 Hydroxy 지방산으로부터 락톤의 전환은 yeast 내부의 세포 소기관인 peroxisome의 acyl-CoA oxidase, thiolase를 포함하는 5가지의 효소가 복합적으로 작용되는 베타-산화 (beta-oxidation) 기작으로 이루어지는데, 이는 기질인 지방산에 의해 활성이 유도됨. 본 실험에서 락톤 전환 실험은 베타-산화 효소를 생산하는 yeast cell을 사용하였음.

본 연구에서 락톤 전환을 위한 yeast cell로 *Yarrowia lipolytica* 균주를 10 g/L yeast extract, 10 g/L malt extract, 1 g/L oleic acid 배지에서 200rpm, 28°C 조건에서 15~18시간 배양 후 Cell을 회수(6,000 rpm, 4 °C, 30 min)함. 회수한 Cell은 아이스박스에서 0.85 % saline으로 Washing하고 centrifugation (6,000 rpm, 4 °C, 30 min)하여 회수함. 락톤 전환 수율을 높이기 위해 Cell을 Permeabilization하여 γ -dodecalactone 전환 실험에 사용하였음. Cell pellet에 50 % EtOH (100 mM Buffer를 이용하여 만듦)를 넣고 풀어준 뒤, 5 분간 ice에 보관함. 12,000 rpm, 30분동안 cell down후 Cell pellet에 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)로 두 번 washing함 (12,000 rpm, 4 °C, 30 min). Cell pellet에 0.5% Triton X-100을 넣고 5분간 ice에 보관 후 12,000 rpm, 30 min 동안 cell down, 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)로 두 번 washing하고 10-hydroxy stearic acid로부터 β -Oxidation에 의한 γ -dodecalactone 전환 실험에 사용하였음.

멸균한 1L Flask에 10-hydroxystearic acid 2 g/L, Permeabilization된 *Yarrowia lipolytica* 10 g/L, 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 200 rpm, 35 °C 최적 조건에서 9시간 반응함. 반응 종료 후 6M의 HCl로 적정하여 pH 2를 맞추고 flask에 열을 가하여 100 °C에서 10분간 끓여줌. 충분히 식힌 후 동량의 Ethyl acetate를 처리 후 추출함. centrifugation (6,000 rpm, 4 °C, 30 min)후 상등액을 취하여 speed vac (30°C, 30min)을 이용하여 용매를 제거하고 silylation (3:1, pyridine : N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide)을 시켜 GC로 전환을 분석하였음.

분석조건은 다음과 같음.

Column:	Supelco SPB-1 capillary column
Oven temp:	100°C →20°C /min→220°C (25min)
Injector temp:	260°C
Detector temp:	250°C
Carrier gas:	N2
Detector:	FID dec
Sample:	1ul
Split ratio:	100:1

10-hydroxystearic acid로부터 γ -dodecalactone 전환은 위에 GC 분석조건으로 분석했고, γ -dodecalactone을 정량하여 51% 전환율을 얻었음.

과제 2차년도에 보고하였던 γ -락톤류 고수율 전환 효모인 *Waltomyces lipofer* 균주는 알지 못하는 이유로 재현성이 떨어져 현재 사용하지 못하고 있으며, 이에 3차년도 락톤 전환 실험에는 *Yarrowia lipolytica* 와 *Candida boidinii* 효모를 주로 사용하였음.

나. γ -Decalactone

γ -decalactone의 생산은 12-hydroxystearic acid를 기질로 사용함. 멸균한 1 L flask에 기질인 12-hydroxystearic acid 2 g/L, Permeabilization된 *Yarrowia lipolytica* 10 g/L, 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 200 rpm, 35 °C 최적 조건에서 9시간 반응함. 반응액은 γ -dodecalactone과 동일한 방법으로 회수 후 GC로 분석하여 30%이상 전환됨을 확인할 수 있었음 (Fig. 13).

다. γ -Dodecelactone

S. maltophilia 유래 oleate hydratase 재조합 균주는 10-hydroxystearic acid 생산 시와 같은 방법으로 생산함. 기질은 50g/L linoleic acid, 효소는 *S. maltophilia* 유래 oleate hydratase cell 10 g/L, 50 mM Citrate-phosphate (pH 6.5), 0.05 % Tween 40, 35 °C, 200 rpm 조건에서 반응하고 생산한 10-hydroxy-12Z-octadecenoic acid는 γ -dodecelactone 전환 기질로 사용하였음.

효모 *C. boidinii*는 5 g/L glucose, 7 g/L oleic acid, 0.1 g/L yeast extract, 2.1 g/L potassium phosphate monobasic, 4.51 g/L potassium phosphate dibasic, 0.1 g/L sodium chloride, 0.2 g/L magnesium sulfate, 9.14 mg/L iron sulfateheptahydrate, 0.5 mg/L zinc chloride, and 1.56 mg/L copper sulfate이 포함된 배지에, pH 5.5, 25 °C 조건에서 배양함. 배양액을 회수 0.85 % saline 으로 상등액 투명해질 때까지 washing하여 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid로부터 γ -dodecelactone 전환 실험에 사용하였음.

멸균한 1 L Flask에 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid 5g/L, *Candida boidinii* 5g/L, 50 mM Citrate-phosphate (pH 5.5 containing 3.4 g/L yeast nitrogen base), 25°C, 200 rpm 최적 조건에서 9시간 반응함. 반응액은 γ -dodecalactone과 동일한 방법으로 회수 후 GC로 분석하여 20% 이상 전환됨을 알 수 있었음 (Fig. 13).

라. γ -Butyrolactone

γ -Butyrolactone 생산은 10-hydroxydecanoic acid를 기질로 사용하였다. 멸균한 1 L flask에 기질인 10-hydroxydecanoic acid 2 g/L, *Yarrowia lipolytica*(Permeabilization) 10 g/L, 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 200 rpm, 35 °C 최적 조건에서 9시간 반응함. 반응액은 γ -dodecalactone과 동일한 방법으로 회수후 GC로 분석하여 15%이상 전환됨을 알 수 있었음 (Fig. 13).

마. δ -Decalactone

13-Hydroxy-9(Z)-octadecenoic acid는 Linoleic acid를 기질로 사용하고 *Lactobacillus acidophilus* 유래 13-hydratase 효소로 생산함. 13-hydratase 효소를 생산하기 위해 Chloramphenicol를 넣은 LB배지에 13-hydratase가 삽입된 *E.coli*를 1L flask 배양하고 Cell O.D. (600 nm)가 0.6 ~ 0.8일 때 0.1 mM IPTG로 16 °C, 150rpm 조건에서 induction함. overnight 배양 후 회수한 배양액은 0.85 % saline으로 washing하여 아래 실험에 사용하였음.

1L 멸균한 flask에 기질은 100g/L Linoleic acid, 효소는 *Lactobacillus acidophilus* 유래 13-hydratase cell 25 g/L, 50 mM Citrate-phosphate (pH 6.0), 0.05 % Tween 40, 40 °C, 200 rpm 조건에서 반응함. 반응 종료 후 반응액은 HCl로 pH 2로 맞추고, 반응액이 들어 있는 flask에 열을 가하여 10분간 끓여줌. 적당한 온도로 식힌 후 동량의 Ethyl acetate 처리 후 centrifugation (6,000 rpm, 4 °C, 30 min) 및 용매를 휘발시키고 13-Hydroxy-9(Z)-octadecenoic acid를 회수하여 δ -decalactone 전환 기질로 사용하였음.

13-Hydroxy-9(Z)-octadecenoic acid로부터 δ -decalactone 전환에 사용하는 효모 *Y. lipolytica*(

Permeabilization)는 γ -dodecalactone 전환시와 같은 방법으로 생산함. 멸균한 1 L flask에 기질인 13-Hydroxy-9(*Z*)-octadecenoic acid 7.5g/L, *Y. lipolytica*(Permeabilization) 25 g/L, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 200 rpm, 30 °C 최적 조건에서 24시간 반응함. 반응액은 γ -dodecalactone과 동일한 방법으로 회수후 GC로 분석하여 20%이상 전환됨을 확인할 수 있었음 (Fig. 13).

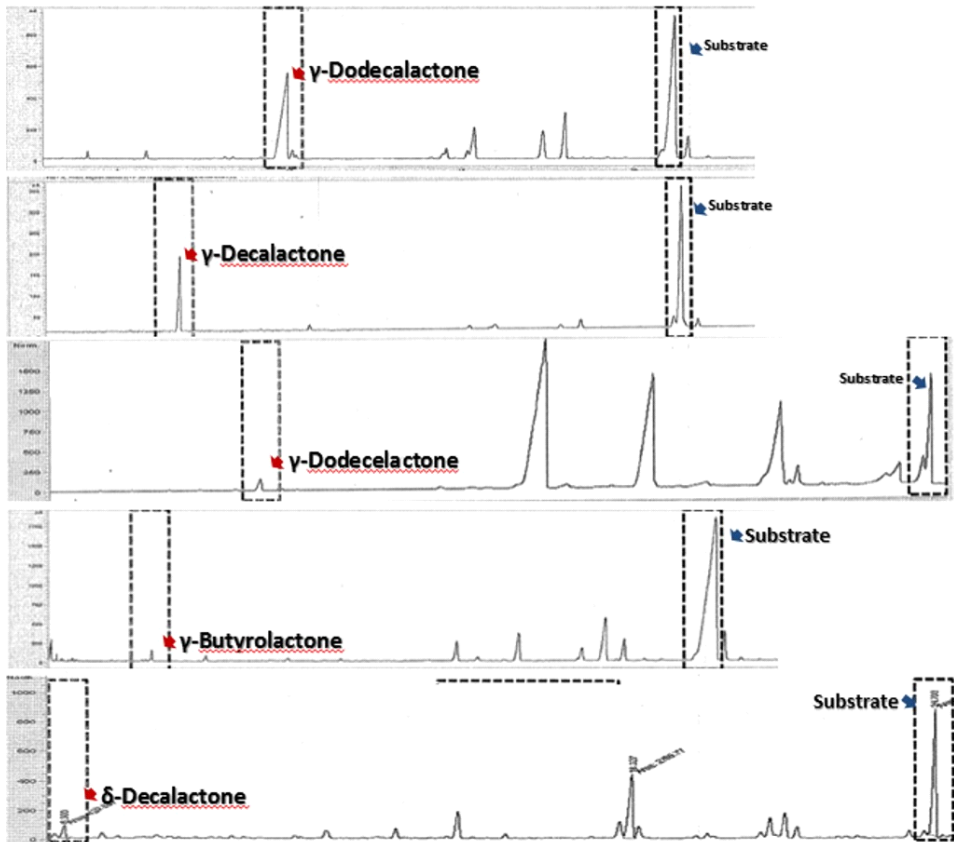


Fig. 13. Analysis of lactone conversion yields from hydroxy fatty acid.

대량 생산을 위해 10 L이상 발효조에서 scale up 생산을 시도하였음. 여러 가지 락톤 생산은 위에서와 같은 방법으로 수행하였고, 다양한 락톤 반응액을 GC 분석 결과 10-hydroxy-12(*Z*)-octadecenoic acid로부터 γ -dodecalactone 생산 결과는 상기 서술한 Lab. scale 결과보다 다소 높은 30%이상 전환되었으나 나머지 락톤류는 수%만 전환된 것으로 확인되었음 (Fig. 14).

현재 기질 준비, 효모 생산, 반응조건, 외부 환경 등 다방면으로 원인 분석중이지만 아직까지 뚜렷한 원인은 밝히지 못했음. 참여기업인 (주)제노포커스는 기술 이전한 락톤생산 핵심 특허의 사업화를 위한 scale up 연구를 지속적으로 수행하고 있음.



Fig. 14. Analysis of γ -dodecalactone conversion yields from 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid.

5. 농산유지로부터 락톤 혼합품 생산

농산유지로부터 γ -dodecalactone의 생산을 목적으로 flask scale에서 시중에서 확보한 올리브유를 가수분해하여 crude oleic acid를 생산하였음 (Fig. 15). 실험에 사용된 CRL lipase는 CRL(*Candida rugosa* lipase) 유전자가 삽입된 재조합 *Aspergillus niger*로부터 발효 생산하여 사용함. 위에서 언급한 *S. maltophilia* oleate hydratase를 반응 시켜 oleic acid를 10-hydroxystearic acid로 전환 후 permeabilization된 *Yarrowia lipolytica* whole cell을 첨가하여 γ -dodecalactone을 생산하였음. 10-hydroxystearic acid로부터 γ -dodecalactone 전환율은 위에 GC 분석조건으로 분석 후 γ -dodecalactone을 정량하여 50% 가까이 전환됨을 확인하였음 (Fig. 16).

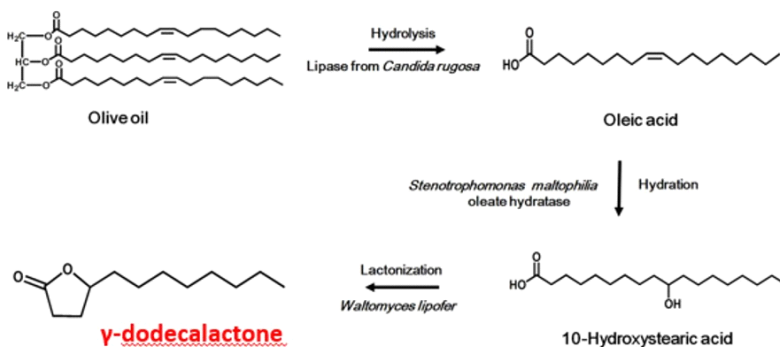


Fig. 15. γ -Dodecalactone production process from olive oil.

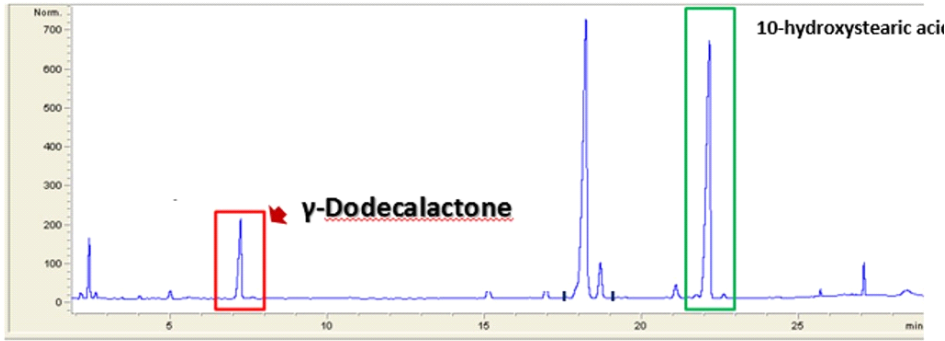


Fig. 16. Analysis of γ -dodecalactone conversion yields from olive oil.

6. 경제성 분석

가. *Waltomyces lipofer*에 의한 γ -dodecalactone 생산

원부재료비 분석: 12 g/L bacterial whole cells을 사용하여 60 g/L oleic acid로부터 58 g/L 10-hydroxystearic acid가 생성되고, 20 g/L yeast whole cells을 사용하여 58 g/L 10-hydroxystearic acid로부터 32 g/L γ -dodecalactone이 생산됨. 가격 절감을 위하여 Tris 대신 ammonium acetate를 사용.

화학합성한 판매가는 감마-락톤류가 30-40 \$/kg이고, 본 연구의 생물전환 감마-락톤의 원부재료비가 약 20 \$/kg이므로 천연 제품개념으로 접근해야 함.

Table 6. 락톤 생산 분석

배지	g/L	단가(kg/원)	브랜드	L당 단가	kg 당 단가(원)
glycerol	80	800	DUKSAN	64	500
(NH ₄) ₂ HPO ₄	2	6640	DUKSAN	13.28	103.75
K ₂ HPO ₄	14.6	5440	DUKSAN	79.42	620.47
NaH ₂ PO ₄	3.6	4400	DUKSAN	15.85	123.83
MgSO ₄	2	3120	DUKSAN	6.24	48.75
(NH ₄) ₂ H-citrate	0.5	10000	DUKSAN	5	39.06
lactose (Inducer)	20	600	DUKSAN	12	93.75
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.02	191000	Sigma	3.82	29.84
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.004	8000	Shinyo	0.032	0.25
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.0044	83000	Sigma	0.3652	2.85
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0.001	22000	DUKSAN	0.022	0.17
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₄ · 4H ₂ O	0.0002	157600	Sigma	0.03152	0.25
Na ₂ B ₄ O ₇ · 10H ₂ O	0.00004	54000	DCM	0.00216	0.02
oleic acid	60	1200	Bulk	72	2250
yeast extract	20	5000	Cheil	100	15625
oleic acid	5	1200	Bulk	6	937.5
glucose	1	600	DUKSAN	0.6	93.75
ammonium acetate	85	2700	Bulk	229.5	7171.88
합계					20469

나. *Yarrowia lipolytica*에 의한 γ -lactone 생산

기존 식품 및 향료산업에서 일부 lactone은 화학적으로 합성이 가능하여 구조가 간단한 γ -lactone류의 경우 가격이 kg당 10불 이하임. 그러나 구조가 복잡하거나 천연유래 (동·식물로부터 직접 추출) 제품의 경우 가격이 5-30배 높게 형성되어 있음을 알 수 있음 (Table 7). 예를 들면 탄소 수가 8개인 γ -octalactone의 경우 화학합성제품은 평균 45불 정도이나 천연유래 제품은 최소 940불 이상이었고 탄소 수 10개인 γ -decalactone의 경우 화학합성제품은 1 kg당 40불 정도였지만 천연제품은 kg당 최소 950불임. 탄소 수 12개인 γ -dodecalactone의 경우 화학합성 제품은 1 kg당 45불 정도였지만 천연제품은 kg당 최소 970불이었음. 본 연구에서와 같이 천연 lactone을 생산하는 연구에 있어 경제성 분석은 천연유래 제품시장에 targeting하고 화학제품과 상호비교를 통해 경제성을 분석하였음.

Table 7. List of price of γ -lactone products in market.

Product (CAS number)	Production method	Volume	Price (₩) ¹	Feature
γ -octalactone	Chemical (bulk)	kg	34,000	
	Natural	kg	1,109,200	
γ -decalactone	Chemical (bulk)	kg	43,000	
	Natural or organic	kg	1,121,000	Cosmetics or food
γ -dodecalactone (706-14-6)	Chemical	Ton (solid)	11,800,000	
		Liter (23%, w/v)	630,000	
	Natural or organic	kg (solid)	1,144,600	Cosmetics or food
		Liter (99%)	1,160,000	

¹ Average price as Korea won (exchange rate was calculated as 1,180 won for 1 USD at 2nd Oct. 2015).

Fig. 17에서 나타낸 것과 같이 원료 기질의 공급 방법에 따라 생산 방법과 경제성이 달라질 수 있고 이에 따라 서로 다른 시나리오를 적용함. Lactone의 전구체인 수산화지방산을 직접 제조하는 방법과 저렴한 수산화지방산을 배지 원료로 하여 투입하여 직접 락톤을 생산하는 방법을 적용하여 분석하였음.

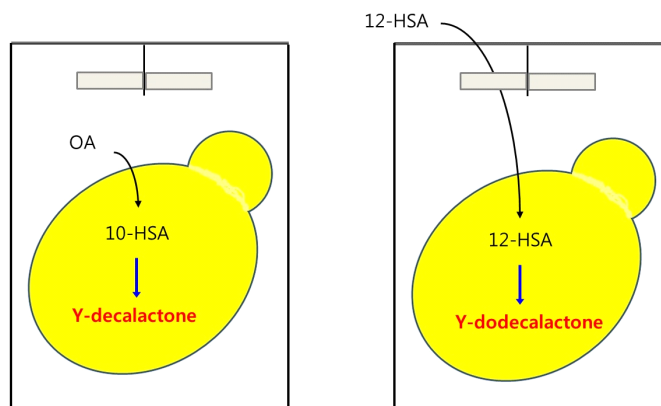


Fig. 17. Scenario of lactone production route by substrate or precursor supplementation. Lactone production from unsaturated fatty acid substrate (Left panel). γ -decalactone production from oleic acid(OA) via 10-hydroxystearic acid or γ -decalactone production from linoleic acid via 10-hydroxy-12Z-octadecenoic acid. Direct lactone production from hydroxy fatty acid (right panel). 12-Hydroxystearic acid (12-HSA) or ricinoleic acid to γ -dodecalactone or γ -dodecelactone.

(1) γ -Lactone 제조가격

γ -Lactone제조에 필요한 배지가격은 앞서 언급한 원가비교 실험에서 도출된 YGO 배지 사용 시 L 당 391원이 소요되었고 이를 통해 확보한 균체반응에 필요한 ammonium sulfate buffer 5.3원이 소요됨. γ -dodecalactone은 oleic acid 가격이 15원 소요되어 411.3원이 소요되며 γ -dodecelactone의 경우 linoleic acid 가격이 25원 소요되었으나 10-hydroxystearic acid 또는 10-hydroxy-12Z-octadecenoic acid를 구입하여 직접 투입하는 경우 비용이 상승하는 결과를 가져옴. 반면 상대적으로 가격이 저렴한 12-hydroxystearic acid의 경우 kg당 가격이 7불 정도로 원료는 가장 저렴함. 여기에 각 lactone별 수율을 적용하여 lactone kg당 생산비용을 산출함 (Table 8).

Table 8. Production costs for of γ -lactone.

Product	List of cost factors	Cost for 1 L batch (₩)	Cost for 1 kg of lactone preparation (₩)
γ -dodecalactone	Oleic acid	15	
	Medium	391	
	Buffer	5.3	
	Sum	411.3	82,260
	10-Hydroxystearic acid	2,300	
	Medium	391	
γ -dodecelactone	Medium	391	
	Buffer	5.3	
	Sum	2,696.3	539,260
	Linoleic acid	25	
	Medium	391	
	Buffer	5.3	
γ -decalactone	Sum	421.3	84,260
	10-Hydroxy-12Z-octadecenoic acid	3,500	
	Medium	391	
	Buffer	5.3	
	Sum	3,896.3	779,260
	γ -decalactone	12-Hydroxystearic acid	300
Medium		391	
Buffer		5.3	
Sum		696.3	174,075
γ -decalactone	Ricinoleic acid	1,100	
	Medium	391	
	Buffer	5.3	
	Sum	1,496.3	374,075

γ -dodecalactone의 경우 반응기에서의 수율 25%를 적용하였을 시 L당 5 g이 생산되어 1 kg 생산을 위해서는 최소 200 L의 반응이 소요되므로 10-hydroxystearic acid를 전구체로 직접 적용 시 539,260원이 소요되고 oleic acid를 전구체로 사용 시 82,260원이 소요되는 것으로 예상된다. γ -dodecalactone의 경우에도 linoleic acid를 전구체로 사용하면 Kg 당 84,260원으로 더 저렴하게 생산 할 수 있는 것으로 나타남. Decalactone류의 경우 12-hydroxystearic acid를 직접 사용 시 반응기 수율은 20%로 1 kg 생산을 위해서는 250 L의 반응이 필요하여 174,075원이 소요되고 ricinoleic acid의 경우 374,075원이 소요되는 것으로 판단됨. 따라서 생산 원가별 가격 경쟁력은 γ -dodecalactone은 oleic acid로부터 직접 제조하고 γ -decalactone은 저렴한 12-hydroxystearic acid로부터 직접 제조하는 것이 바람직하다고 판단됨.

(2) 제조가 대비 경제성

Table 7과 8를 비교하여 제조가 비교를 통해 경제성을 확인하였음.

Table 9. Comparison of production cost versus market price.

Product	Production method	Production cost per kg (₩) [B]	Market price (₩) [A]	A-B (₩)	Profit Rate
γ -decalactone	Natural	82,260	1,121,000	1,038,740	92.66
γ -decelactone	Natural	84,260	1,121,000	1,036,740	92.48
γ -dodecalactone	Natural	174,075	1,301,200	1,127,125	86.62
γ -dodecelactone	Natural	374,075	1,301,200	927,125	71.25

Table 9에서와 같이 단순 생산원가 비교로 72~92%의 이익 (net profit)이 산출될 수 있는 것으로 나타났음.

(3) 전주기 분석을 통한 경제성 분석

실제 제품 생산 시 소요되는 시설 투자비, 인건비, 전기 및 수도요금, 임대료, 운영비 등을 감안하여 주기 분석을 실시하였음. Lactone 연간 생산량을 20 ton으로 하면 주 3회 연간 140회 생산하는 것으로 하면 20 ton 반응기 2대를 작동하는 것으로 하였고 생산 간격은 주 3회로 하였으며 시간은 1회 10시간으로 하여 부대비용을 산출하였음. 인건비는 연봉 3,000만원인 직원이 2교대로 3명씩 작업에 투입되는 것으로 하였다. 장비의 수명은 10년으로 하고 감가상각은 10%를 적용하였음.

Table 10. Capital cost for initial investment and operation cost for lactone production

Items	Capital cost (₩) per year	Feature
제조장비	72,000,000	Life-span is 10years
공간 임대료 및 운영비	12,000,000	₩1,000,000/month
인건비	180,000,000	per year
계	264,000,000	

Table 10에서 계산된 초기 투자비와 연간운영비를 생산비용과 연결하여 적용함. 앞서 언급한 것과 같이 주 3회 연간 140회 생산하는 것으로 하면 Table 11에서 나타낸 것과 같이 대표적으로 γ -decalactone의 경우 1 kg 생산비용이 92,846원으로 나타났고 γ -dodecalactone의 경우 184,660원으로 산출됨.

Table 11. Input and output of cost for lactone production (per kg).

Product name	Items	per kg (₩)
γ -decalactone	원료 및 생산비	82,260
	임대/운영비	257
	인건비	12,857
	장비비	1,357
	정제 및 회수 비용	400
	계	97,132
γ -dodecalactone	원료 및 생산비	174,075
	임대/운영비	257
	인건비	12,857
	장비비	1,357
	정제 및 회수 비용	400
	계	188,946

회사이윤(profit)을 60%로 정하여 γ -decalactone의 경우 화학 합성품 kg 당 11,800원과 천연 추출물 1,121,000원이지만 본 연구에서의 발효제품의 가격을 243,000원으로 책정하고 γ -dodecalactone의 경우 화학 합성품 kg 당 43,000원과 천연추출물 1,127,000원이지만 발효제품의 가격을 472,000원으로 책정함. 따라서 천연 lactone 생산을 통해 natural/organic market을 target으로 적용하면 경제성이 있을 것으로 판단됨.

Table 12. Comparison of total capital cost versus market price (per kg).

Product	Production method	Production cost per Kg (₩) [B]	Market price (₩) [A]	Target price (₩)	Profit Rate
γ -decalactone	Natural	92,846	1,121,000	243,000	60%
γ -dodecalactone	Natural	184,660	1,127,125	472,000	60%

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표의 달성도

1. 목표 및 연구개발 수행내용

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2012)	유지로부터 바이오향료의 생산 관련 효소 및 균체의 개발	지방산으로부터 hydratase 처리에 의한 hydroxy 지방산 생산	100	- 효소 기질특이성 조사 - 효소 반응 최적화 - 효소에 의한 hydroxy 지방산 생산 - 재조합 균체 반응 최적화 - 다양한 지방산로부터 다양한 hydroxy 지 방산 생산
		지방산으로부터 lipoxygenase 처리에 의한 hydroxy 지방산 생산	100	- 효소 유전자의 클로닝 및 발현 - 효소 정제 - 효소 반응 최적화 - 재조합 균체 반응에 의한 hydroxy 지방 산 생산
		락톤류 생산 및 기술 이전	100	- 감마-락톤류 생산법 기술 이전 - 감마-락톤류 정제법 기술 개발
	유지로부터 바이오향료의 생산 공정 개발	유지로부터 lipase 처리에 의한 지방산 생산	100	- 유지 처리용 lipase 개발 - Lipase 정제, 특성 조사 및 반응 최적화 - 다양한 종류 유지에 대한 활성 조사 - 필요시 lipase 개량 - 효소 반응 최적화 - 효소에 의한 지방산 생산 최적화 - 다양한 유지로부터 지방산 생산
2차 년도 (2013)	유지로부터 바이오향료의 생산 관련 효소 및 균체의 개발	다양한 hydroxy 지방산 생산	100	- Hydratase에 의한 hydroxy 지방산 생산 - Lipoxygenase에 의한 hydroxy 지방산 생산 - Diol synthase에 의한 hydroxy 지방산 생산
		Hydroxy 지방산으로부터 락톤류 생산	100	- 배지 및 반응환경 최적화 - 효모의 반응성 최적화 - 효소에 의한 hydroxy 지방산 생산 - 반응 조건 최적화 - 재조합 균체 반응 최적화 - 다양한 hydroxy 지방산으로부터 락톤류 생산
		Hydroxy 지방산 및 락톤류 분리 정제	100	- Hydroxy 지방산 분리 정제 - 락톤류 분리 정제
		락톤류 생산 및 기술 이전	100	- Hydroxy 지방산 분리정제법 기술 이전 - 락톤류 분리정제법 기술 이전
	유지로부터 바이오향료의 생산 공정 개발	바이오향료 락톤류의 생산 및 정제 공정 확립	100	- 농산유지로부터 지방산 생산 - 지방산으로부터 hydroxy 지방산 생산 - Hydroxy 지방산으로부터 락톤류 생산

				<ul style="list-style-type: none"> - Hydroxy 지방산 분리 정제 공정 최적화 - 락톤류 분리 정제 공정 최적화
3차 년도 (2014)	유지로부터 바이오향료의 생산 관련 효소 및 균체의 개발	농산유지로부터 락톤류 생 산 전공정의 최적화	100	<ul style="list-style-type: none"> - 농산유지로부터 지방산의 생산 - 지방산으로부터 hydroxy 지방산의 생산 - hydroxy 지방산으로부터 락톤 생산 - 농산유지로부터 락톤 생산 전공정
		유지로부터 hydroxy 지방 산 및 락톤류 생산	100	<ul style="list-style-type: none"> - 올리브유로부터 γ-dodecalactone 생산 - 홍화유로부터 γ-dodecalactone 생산 - 들기름으로부터 9R-HOTE 생산
	유지로부터 바이오향료의 생산 공정 개발	바이오향료의 제품화	10	<ul style="list-style-type: none"> - 화장품 원료 적합성 분석 - 여러 화장품에 적용
		시제품제조 및 경제성 분 석	90	<ul style="list-style-type: none"> - 바이오향료의 6가지 이상 시제품 - 농산유지(올리브유, 홍화유, 들깨유)로부 터 락톤 혼합품 생산 - 제품순도 조사 - 경제성 분석 및 상품화

2. 및 연구수행 방법

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	연구 결과
다양한 hydroxy 지방산 생산	<ul style="list-style-type: none"> - 효소 유전자의 클로닝 및 발현 - 효소 정제 - 효소 반응 최적화 - 재조합 균체 반응에 의한 hydroxy 지방산 생산 	<ul style="list-style-type: none"> - Hydratase에 의한 hydroxy지방산 생산: 10-hydroxystearic acid, 10-hydroxy-12(<i>Z</i>)- -octadecadienoic acid, 10-hydroxy-12,15(<i>Z,Z</i>) -octadecadienoic acid, 10,12-dihydroxystearic acid, 13-hydroxy-9(<i>Z</i>)-octadecadienoic acid, 13-hydroxy-12,15(<i>Z,Z</i>)-octadecadienoic acid - Lipoygenase에 의한 hydroxy지방산 생산: 13-hydroxy-9,11(<i>Z,E</i>)-octadecadienoic acid, 9R-hydroxy-10<i>E</i>,12<i>Z</i>-octadecadienoic acid - Diol synthase에 의한 hydroxy지방산 생산: 8R-hydroperoxy-9,12(<i>Z,Z</i>)-octadecadienoic acid, 5,8-dihydroxy-9,12(<i>Z,Z</i>)-octadecadienoic acid, 5,8-dihydroxy-9,12,15(<i>Z,Z,Z</i>)-octadecatrienoic acid, 5,8-dihydroxy-9(<i>Z</i>)-octadecanoic acid, 7,8-dihydroxy-9,12(<i>Z,Z</i>)-octadecadienoic acid, 7,8-dihydroxy-9,12,15(<i>Z,Z,Z</i>)-octadecatrienoic acid, 7,8-dihydroxy-9(<i>Z</i>)-octadecanoic acid
유지로부터 lipase 처리에 의한 지방산 생산	<ul style="list-style-type: none"> - 유지 처리용 lipase 개발 - Lipase 정제, 특성 조사 및 반 응 최적화 - 다양한 종류 유지에 대한 활 성 조사 - 필요시 lipase 개량 - 효소 반응 최적화 - 효소에 의한 지방산 생산 최 	<ul style="list-style-type: none"> - CRL(<i>Candida rugosa</i> lipase) 선택 - CRL(<i>Candida rugosa</i> lipase) 유전자가 삽입된 <i>Aspergillus niger</i>를 사용 - Lipase에 의한 농산유지 가수분해 조건 확립 - Lipase에 의한 다양한 유지 가수분해

	<p>적화</p> <ul style="list-style-type: none"> - 다양한 유지로부터 지방산 생산 	
Hydroxy 지방산으로부터 락톤류 생산	<ul style="list-style-type: none"> - 배지 및 반응환경 최적화 - 효모의 반응성 최적화 - 반응 조건 최적화 - 재조합 균체 반응 최적화 - 다양한 hydroxy 지방산으로부터 락톤류 생산 	Hydroxy 지방산으로부터 γ -dodecalactone, γ -decalactone, γ -butyrolactone, γ -dodecelactone, δ -decalactone, japonilure 생산
Hydroxy 지방산 및 락톤류 분리 정제	<ul style="list-style-type: none"> - Hydroxy 지방산 분리 정제 - 락톤 분리 정제 	<ul style="list-style-type: none"> - Hydroxy 지방산은 저온 분별 정제법, silicic acid open column chromatography, 또는 methanol 추출법을 사용하여 정제 - Lactone은 oil bath를 사용하여 환류냉각증류법으로 정제
Hydroxy 지방산 및 락톤류 생산 및 정제법 기술 이전	<ul style="list-style-type: none"> - Hydroxy 지방산 생산 및 정제법 기술 이전 - 감마-락톤류 생산 및 정제법 기술 이전 	<ul style="list-style-type: none"> - Hydroxy 지방산 생산 및 분리 정제법 기술 이전 - 락톤류 생산 및 분리 정제법 기술 이전
유지로부터 바이오향료의 생산 공정 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 농산유지로부터 지방산 생산 - 지방산으로부터 hydroxy 지방산 생산 - hydroxy 지방산으로부터 락톤류 생산 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Candida rugosa</i> lipase (CRL) lipase에 의한 농산 유지 가수분해 - 지방산에 hydratase 처리에 의한 hydroxy 지방산 생산 - Hydroxy 지방산에서 효모의 β-oxidation에 의한 lactone 생산 - 올리브유의 lipase 가수분해 산물로부터 확보한 10-hydroxystearic acid으로부터 γ-dodecalactone을 생산 - 홍화유의 lipase 가수분해 산물로부터 확보한 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid으로부터 γ-dodecelactone을 생산 - 들기름 가수분해물로부터 9R-hydroxy-10,12,15(E,Z,Z)-octadecatrienoic acid 생산 - 화장품 원료로 사용시 생물전환으로 생산된 lactone은 정제가 필요없음.
시제품생산 및 경제성 분석	<p>바이오향료의 제품화</p> <p>시제품생산 및 경제성 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> - γ-Decalactone, γ-decelactone, γ-dodecalactone, γ-dodecelactone 시제품 생산 - 경제성 분석: 원부재료비 분석 및 전주기 분석을 통한 경제성 분석

제 2 절 정량적 목표의 달성도

1. 정량적 목표 대 실적

- 농산유지로부터 lipase 처리에 의한 지방산 생산:
목표) 지방산 회수율 90%이상
실적) 지방산 회수율 96% (*Candida rugosa* lipase 사용)
- 지방산으로부터 hydratase 처리에 의한 hydroxy 지방산 생산:
목표) 최종농도: 48 g/L 이상, 생산성: 10 g/L-h 이상, 수율: 96% (w/w)
실적) 최종농도: 49 g/L, 생산성: 12.3 g/L-h, 수율: 98% (w/w)
(*Stenotrophomonas maltophilia* 유래 지방산 hydratase 재조합 균주 전세포 사용
10-hydroxystearic acid 생산)
- 지방산으로부터 lipoxygenase 처리에 의한 hydroxy 지방산 생산
목표) 최종농도: 38 g/L 이상, 생산성: 3 g/L-h 이상, 수율: 96% (w/w)이상
실적) 최종농도: 38.4 g/L, 생산성: 38.4 g/L-h, 수율: 96% (w/w)
(*Nostoc* sp. lipoxygenase 사용 9*R*-hydroperoxy-10*E*,12*Z*,15*Z*-octadecatrienoic acid 생산)
- 효모에 의한 hydroxy 지방산으로부터 락톤 생산
목표) 최종농도: 45 g/L 이상, 생산성: 1.5 g/L-h 이상, 수율: 75% (w/w) 이상
실적) 최종농도: 45.7 g/L, 생산성: 1.52 g/L-h, 수율: 76% (w/w)
(*Waltomyces lipofer*를 사용하여 10-hydroxystearic acid로부터 γ -dodecalactone 생산)
- Hydroxy fatty acid 및 락톤의 분리 정제
목표) 정제 수율 60% 이상
실적) Hydroxy fatty acid 정제 수율 70%, 락톤 정제 수율 63%
- 락톤의 시제품 생산: 6건
 γ -Decalactone, γ -decelactone, γ -dodecalactone, γ -dodecelactone, 올리브유에서 γ -dodecalactone, 홍화유에서 γ -dodecelactone 시제품 생산

2. Hydroxy 지방산 생산

가. Hydratase에 의한 hydroxy 지방산 생산

(1) *Lysinibacillus fusiformis* 유래 재조합 지방산 hydratase의 반응조건을 최적화하여 40 g/L oleic acid와 같은 농도가 함유된 가수분해 올리브유로부터 각각 3시간 및 6시간에 40 g/L 10-hydroxystearic acid를 생산함.

(2) *Stenotrophomonas maltophilia* 유래 지방산 hydratase 재조합 균주 전세포 개발 및 생산 최적화: 전세포 반응조건을 최적화하여 50 g/L oleic acid를 기질로 하여 4시간 동안 발효시 49 g/L 10-hydroxystearic acid를 생산함.

(3) 지방산 hydratase 함유 wild-type *Stenotrophomonas nitritireducens* 전세포 촉매 개발 및 생산 최적화: 전세포 반응조건을 최적화하여 20 g/L linoleic acid를 기질로 하여 3시간 동안 반응시 15 g/L 10-hydroxy-12*Z*-octadecenoic acid 생산함.

(4) *L. fusiformis* oleate hydratase의 반응조건을 최적화하여 반응 3시간 후에 13.5 g/L 10,12-dihydroxystearic acid를 생산함.

(5) 지방산 hydratase 함유 wild-type *S. nitritireducens* 전세포에 의한 α -linolenic acid에서 10-hydroxy-12,15(*Z,Z*)- octadecadienoic acid 생산: permeabilized cell을 사용하여 2시간동안 22.5 g/L α -linolenic acid에서 16.4 g/L 10-hydroxy-12,15(*Z,Z*)- octadecadienoic acid를 생산함.

(6) *Lactobacillus acidophilus* linoleate 13-hydratase의 반응조건을 최적화하여 100 g/L linoleic acid로부터 3시간 동안 79 g/L 13-hydroxy-9Z-octadecenoic acid을 생산함.

(7) *L. acidophilus* linoleate 13-hydratase의 반응조건을 최적화하여 15 g/L α -linolenic acid로부터 6시간 동안 7.5 g/L 13-hydroxy-12,15 (Z,Z)-octadecadienoic acid를 생산함.

나. Diol synthase에 의한 hydroxy 지방산 생산

(1) *Aspergillus nidulans* 유래 diol synthase 함유 재조합 전세포에 의한 linoleic acid에서 5,8-dihydroxy-9,12(Z,Z)-octadecadienoic acid 생산: 재조합 전세포 23 g/L를 사용하여 5.0 g/L linoleic acid에서 150분 반응하여 5.0 g/L의 5,8-dihydroxy-9,12(Z,Z)-octadecadienoic acid를 얻었음.

(2) *A. nidulans* 유래 diol synthase 함유 재조합 전세포에 의한 α -linolenic acid에서 5,8-dihydroxy-9,12,15(Z,Z,Z)-octadecatrienoic acid 생산: 재조합 전세포 40 g/L를 사용하여 12 g/L α -linolenic acid에서 100분 반응하여 9.1 g/L의 5,8-dihydroxy-9,12,15(Z,Z,Z)-octadecatrienoic acid를 얻었음.

(3) *A. nidulans* 유래 diol synthase 함유 재조합 전세포에 의한 oleic acid에서 5,8-dihydroxy-9(Z)-octadecanoic acid 생산: 재조합 전세포 35 g/L를 사용하여 12 g/L oleic acid에서 60분 반응하여 5.2 g/L의 5,8-dihydroxy-9(Z)-octadecanoic acid를 얻었음.

(4) *A. nidulans* 유래 diol synthase의 peroxygenase 부분만을 활용한 선택적 8R-hydroperoxy-9,12(Z,Z)-octadecadienoic acid 생산: Diol synthase의 variant 함유 재조합 전세포 20 g/L를 사용하여 이용 6 g/L linoleic acid로부터 1시간 반응하여 1.8 g/L 8R-hydroperoxy-9,12(Z,Z)-octadecadienoic acid를 생산함.

(5) *Glomerella cingulate* 유래 diol synthase 함유 재조합 전세포에 의한 linoleic acid에서 7,8-dihydroxy-9,12(Z,Z)-octadecadienoic acid 생산: 재조합 전세포 46 g/L를 사용하여 14 g/L linoleic acid에서 120분 반응하여 6.4 g/L의 7,8-dihydroxy-9,12(Z,Z)-octadecadienoic acid를 얻었음.

(6) *G. cingulate* 유래 diol synthase 함유 재조합 전세포에 의한 α -linolenic acid에서 7,8-dihydroxy-9,12,15(Z,Z,Z)-octadecatrienoic acid 생산: 재조합 전세포 46 g/L를 사용하여 14 g/L α -linolenic acid에서 180분 반응하여 6.3 g/L의 7,8-dihydroxy-9,12,15(Z,Z,Z)-octadecatrienoic acid를 얻었음.

(7) *G. cingulate* 유래 diol synthase 함유 재조합 전세포에 의한 oleic acid에서 7,8-dihydroxy-9(Z)-octadecanoic acid 생산: 재조합 전세포 46 g/L를 사용하여 14 g/L oleic acid에서 150분 반응하여 6.4 g/L의 7,8-dihydroxy-9(Z)-octadecanoic acid를 얻었음.

다. Lipoxygenase에 의한 hydroxy 지방산 생산

(1) *Nostoc* sp. stereo-selective lipoxygenase 의한 linoleic acid에서 9R-hydroxy-10E,12Z-octadecadienoic acid 생산: 재조합 lipoxygenase 함유 전세포반응으로 40 g/L linoleic acid로부터 1시간 반응하여 37.6 g/L 9R-hydroxy-10E,12Z-octadecadienoic acid 확보.

(2) *Nostoc* sp. 로부터 stereo-selective lipoxygenase 의한 α -linolenic acid에서 9R-hydroperoxy-10E,12Z,15Z-octadecatrienoic acid 생산: 재조합 lipoxygenase 함유 전세포반응으로 40 g/L α -linolenic acid로부터 1시간 반응하여 38.4 g/L 9R-hydroxy-10,12,15(E,Z,Z)-octadecatrienoic acid 확보.

(3) *Burkholderia thailandensis* lipoxygenase에 의한 linoleic acid에서 13-hydroxy-9,11(Z,E)-octadecadienoic acid 생산: 효소 2.5 g/L를 사용하여 20 g/L linoleic acid에서 1.5시간 반응하여 21 g/L의 13-hydroxy-9,11(Z,E)-octadecadienoic acid를 얻었음.

3. 락톤 생산

가. 막 투과성을 증가시킨 효모 *Waltomyces lipofer*를 이용하여 10-hydroxystearic acid로부터 γ -dodecalactone의 생산: 효모의 반응조건을 최적화하고 막투과성을 증가시켜 30 g/L 균체를 사용하여 60 g/L 10-hydroxystearic acid로부터 30시간 후에 45.7 g/L γ -dodecalactone를 생산하여 세계 최고의 농도와 생산성 기록함.

나. 지방산을 이용한 효모 *W. lipofer*의 베타-산화 유도에 의한 hydroxy 지방산으로부터 γ -락톤류의 생산: oleic acid로 베타-산화 유도시켜 10-hydroxystearic acid로부터 γ -dodecalactone의 전환율은 22%, 생산성은 1.3배 향상시킴. 30시간동안 60 g/L의 12-hydroxystearic acid를 기질로 사용하였을 때, 28 g/L의 γ -decalactone을 생산하였고 30시간 동안 60 g/L의 10-hydroxydecanoic acid를 기질로 사용하였을 때에는 12 g/L의 γ -butyrolactone을 생산하였음. γ -decalactone의 경우 현재까지 보고된 것보다 2.2배 높은 생산량을 보였으며, 전환율은 13%, 생산성은 5.2배 높은 것으로 나타났고, γ -butyrolactone의 경우에는 생물전환법에 의한 첫 보고임.

다. 10-Hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid로부터 γ -dodecelactone 생산: 효모 *Candida boidinii*의 베타-산화 유도에 의해 5 g/L 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid로부터 6시간 반응하여 2.2 g/L의 γ -dodecelactone을 생산 (수율 64%)하였고 생산성은 $350 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 로 나타남.

라. 효모 *Yarrowilia lipolytica*를 이용하여 13-hydroxy-9-octadecenoic acid로부터 δ -decalactone의 생산: 효모의 반응조건을 최적화하여 세계 최초로 7.5 g/L 13-hydroxy-9-octadecenoic acid로부터 24시간 반응하여 1 g/L δ -decalactone을 생산

마. 효모 *Candida palmiolephila*를 이용하여 8-hydroxy-9-octadecenoic acid로부터 Japanese beetle의 pheromone으로 잘 알려진 락톤 japonilure 전환을 확인함.

4. 농산유지로부터 락톤 생산공정 확립

가. *Candida rugosa* lipase (CRL) lipase에 의한 농산유지 가수분해

5L scale에서 1차년에 선발된 CRL lipase 효소와 가수분해 조건으로 올리브유 가수분하여 oleic acid 함량이 80% 이상 되는 crude oleic acid를 얻을 수 있음.

나. Oleic acid로부터 oleate hydratase 처리에 의한 10-hydroxy stearic acid 생산

시중에서 구매한 oleic acid와 위에서 농산 유지인 올리브유를 가수분해하여 얻은 crude oleic acid를 기질로 사용하여 10-hydroxy stearic acid 전환 실험을 수행하고, 얻어진 물질은 NMR로 10-hydroxy stearic acid임을 확인하고, GC 분석 결과 전환율 모두 78% 정도이고 기질의 순도에 따른 전환율에는 차이는 크게 없는 것을 확인함.

다. β -Oxidation (*Waltomyces lipofer* KCTC 17657) 의한 γ -dodecalactone 생산

위에서 얻은 10-hydroxy stearic acid는 β -Oxidation에 의한 γ -dodecalactone 생산에 이용되었고 GC 분석 결과, 시중에서 구매한 oleic acid로부터 얻어진 10-hydroxy stearic acid로부터 γ -dodecalactone 전환율은 78%이고 올리브유를 가수분해하여 얻은 crude oleic acid로부터 얻어진 10-hydroxy stearic acid로부터 γ -dodecalactone 71% 정도 전환됨을 확인함.

라. Olive유의 lipase 가수분해 산물로부터 확보한 hydroxy 지방산으로부터 γ -dodecalactone을 생산: Olive유를 *Candida rugosa* lipase (CRL)를 이용하여 가수분해한 후 *S. maltophilia* oleate hydratase를 반응 시켜 oleic acid를 10-hydroxystearic acid로 전환 시키고 *W. lipofer* whole cells을 첨가하여 γ -dodecalactone을 생산. 40 g/L의 olive유로부터 25 g/L의 γ -dodecelactone을 생산함.

마. 홍화유의 lipase 가수분해 산물로부터 확보한 hydroxy 지방산으로부터 lactone 직접 생산

홍화유를 *Candida rugosa* lipase (CRL)를 이용하여 가수분해한 후 *S. nitritireducens*를 반응 시켜 linoleic acid를 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid 등의 hydroxy 지방산으로부터 γ -lactone류를 생산함. 7.5 g/L의 홍화씨유로부터 1.88 g/L의 γ -dodecelactone을 생산하였고, 생산성은 235 mg L⁻¹ h⁻¹로 나타남.

바. 들기름의 lipase 가수분해 산물로부터 hydroxy 지방산 생산

들기름을 *C. rugosa* lipase (CRL)를 이용하여 가수분해한 후 *Nostoc* sp. lipoxygenase를 반응 시켜 50 g/L의 들기름(40 g/L α -linolenic acid 함유)에서 34 g/L 9R-hydroperoxy-10E,12Z,15Z-octadecatrienoic acid 생산함.

사. 화장품 원료로 사용 시 생물전환으로 생산된 lactone은 정제가 필요 없음

정제된 생물 전환된 lactone은 화학 합성된 lactone과 차별성이 없으나 천연오일에서 생산된 정제되지 않은 생물 전환된 lactone은 화학 합성된 lactone과 차별성이 있음.

5. 바이오 향료의 산업화 연구

가. Hydroxy 지방산 및 락톤류 분리 정제

(1) Hydroxy 지방산의 분리 정제: hydroxy fatty acids는 유기용매 저온 분별 정제법 또는 silicic acid open column chromatography를 사용하여 정제하였음. Methanol 정제법으로 83.9 g의 10-hydroxystearic acid를 70% 수율로 98% 이상의 순도로 얻음.

2. γ -Lactones 정제 및 물질 동정: γ -lactones은 oil bath를 사용하여 환류냉각증류법을 통해 각 해당 락톤을 63% 수율로 99% 순도 이상으로 정제하고 GC/MS로 동정함.

나. 바이오 향료 시제품 생산

(1) γ -Dodecalactone(51% 전환율), γ -decalactone(30% 이상 전환율), γ -dodecelactone(20% 이상 전환율), γ -butyrolactone(25% 이상 전환율), δ -decalactone(20% 이상 전환율) 시제품 생산

(2) 10 L 발효조: 10-Hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid로부터 γ -dodecelactone 생산: 30% 이상 전환율

(3) 올리브유로부터 γ -dodecalactone 혼합품 생산: 50% 이상 전환율

(4) 홍화유로부터 γ -dodecelactone 혼합품 생산

다. 경제성 분석

(1) *Waltomyces lipofer*에 의한 γ -dodecelactone 생산 원부재료비는 kg 당 20,469원으로 계산됨.

(2) *Y. lipolytica*에 의한 γ -lactone kg 당 생산 원부재료비: γ -decalactone는 82,260원 γ -dodecalactone는 84,260원 γ -dodecelactone는 174,075원 γ -dodecelactone는 374,075원으로 계산됨.

(3) *Y. lipolytica*에 의한 γ -lactone kg 당 생산단가: γ -decalactone는 611,545원 γ -dodecalactone는 703,360원으로 추정됨.

(4) 화학합성한 판매가는 감마-락톤류가 30-40 \$/kg이지만 천연유래 (동물·식물로부터 직접 추출) 제품의 경우 가격이 950 \$/kg 정도이므로 경쟁력이 있음.

제 3 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

1. 기술적 측면

○ **청정 생물전환기술법의 개발:** 생물전환법은 미생물을 비롯한 생물학적 촉매를 사용하여 유기 화학물질을 합성 생산하는 방법으로 생물 전환법 기술을 이용할 경우 1. 환경 친화적 생산 공정 개발 및 최소한의 환경오염 물질 방출, 2. 선택적인 광활성 이성질체의 생산, 3. 새로운 유기 합성 물질의 개발의 장점이 있음.

○ **화학 합성법을 대체하는 새로운 바이오향료 생산법 개발:** 현재 화학합성법으로 생산된 락톤류 및 green leaf volatiles는 경쟁력 있는 생물전환법으로 개발되어 대체되면 최초로 생물학적인 방법으로 고부가의 천연 향료 및 향장 원료물질을 경제적으로 생산하는 산업화 기술을 확보할 수 있음.

○ **국내산 농산유지의 고부가가치화 기술 확보:** 국내산 올리브유, 카놀라유, 아몬드유, 홍화유, 포도유, 옥수수유, 해바라기유 아마유 등의 식물성 기름을 선택하여 생물 전환기술을 이용하여 고부가의 다양한 락톤류 및 green leaf volatiles를 생산하면 국내산 유지 및 폐식용유의 고부가가치화 기술이 확보됨.

2. 경제적 · 산업적 측면

○ **생물 전환법에 의한 새로운 시장 창출:** 전 세계의 락톤류 및 green leaf volatile의 세계시장은 각각 12억불 및 30억불로, 이중 잠재적으로 10%의 시장규모가 미생물을 비롯한 생물 전환법을 이용한 생물 공학을 이용하여 생산된 제품으로 교체될 것으로 예측되고 있음. 생물 공학을 이용한 천연 향료 및 향장 원료물질은 화학 유기 합성을 통해 생산된 물질에 비하여 소비자가 쉽게 받아들일 수 있어 높은 가격으로 판매할 수 있어 경제적인 경쟁력을 갖춘 생산 공정을 개발할 수 있는 기회를 제공함.

○ **청정 생물전환 기술 확보를 통한 국제 경쟁력 향상 및 수출:** 국내 향료 및 향장 시장은 약 2,000억 원 정도의 규모이지만, 국내 향료 및 향장물질에 대한 생산 기술의 미비로 외국 향료 회사를 위주로 조합 향료의 공급에 의한 유통 시장만이 형성되어 있음. 그러나 천연 향료 및 향장 원료 물질의 청정 생물전환 기술이 확보된다면 국제 경쟁력이 향상되어 수입대체 뿐만 아니라 수출도 가능하게 될 것임.

○ **경쟁력 있는 새로운 생산 방법개발:** 생물전환법에 의한 향료 및 향장물질 생산은 친환경적인 방법으로 화학 유기 합성을 생산 공정에서 발생하는 환경문제의 해결하며, 국내 및 세계적인 소비자의 천연 소재 대한 선호로 인하여 천연 원료물질의 요구를 충족시켜 고부가를 창출하므로 경제적인 측면에서 경쟁력을 확보될 것으로 예상됨. 또한, 생물전환법은 화학합성법보다 생산성이 높고 부산물이 적고 정제가 용이하며 우수한 품질의 천연 향료 및 향장물질을 값싸게 공급할 수 있어 가격 및 품질 경쟁력이 있음.

○ **농가의 수익성 향상:** 최근까지 국내의 농산물은 제한된 가공을 통하여 소비자에게 공급되어 부가 가치 면에서 제한되어 농가의 수익성에 한계를 가지고 있음. 이러한 면에서 생물공학을 비롯한 새로운 기술을 통해 농산물의 고부가가치의 새로운 소재로 변환시켜 생산함으로써 농가 수익의 안정성을 이룩할 계기를 만들 수 있음. 성공하면 식물유 재배 농가를 활성화 시키고 지속적인 수익을 보장할 수 있음.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

1. 연구개발성과

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명 명칭등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차 년도	목표	1						2		
	달성	2						2		
2차 년도	목표	2	1					4		
	달성	2	1					6		
3차 년도	목표	3	2					4		
	달성	0	1					7		
계	목표	6	3					10		
	달성	5	3					15		

2. 논문게재 성과

1. J. U. An, Y. C. Joo, **D. K. Oh**. New biotransformation process for the production of the fragrant compound γ -dodecalactone from 10-hydroxystearate by permeabilized *Waltomyces lipofer* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **79(6)**, 2636-2641 (2013)
2. J. U. An, **D. K. Oh**. Increased production of γ -lactones from hydroxy fatty acids by whole *Waltomyces lipofer* cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97(18)**, 8265-8272 (2013)
3. M. H. Seo, K. R. Kim, **D. K. Oh**. Production of a novel compound 10,12-dihydroxystearic acid from ricinoleic acid by an oleate hydratase from *Lysinibacillus fusiformis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97(20)**, 8987-8995 (2013)
4. M. J. Seo, K. C. Shin, **D. K. Oh**. Production of 5,8-dihydroxy-9,12(Z,Z)-octadecadienoic acid from linoleic acid by whole recombinant *Escherichia coli* cells expressing diol synthase from *Aspergillus nidulans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98(17)**, 7447-7456 (2014)
5. K. R. Kim, **D. K. Oh**. Production of hydroxy fatty acids by microbial fatty acid-hydroxylation enzymes. *Biotechnol. Adv.* **31(8)**, 1473-1485 (2013)
6. K. R. Kim, M. H. Seo, J. B. Park, **D. K. Oh**. Stereospecific production of 9R-hydroxy-10E,12Z-octadecadienoic acid from linoleic acid by recombinant *Escherichia coli* cells expressing 9R-lipoxygenase from *Nostoc* sp. SAG 25.82. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **104**, 56-63 (2014)
7. B. J. Kim, K. C. Shin, **D. K. Oh**. Enzymatic production of 15-hydroxyeicosatetraenoic acid from arachidonic acid by using soybean lipoxygenase. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24(3)**, 359-362 (2014)
8. Y. S. Jo, J. U. An, **D. K. Oh**. γ -Dodecalactone production from safflower oil via 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid intermediate by whole cells of *Candida boidinii* and *Stenotrophomonas nitritireducens*. *J. Agric. Food Chem.* **62(28)**: 6736-6745 (2014)
9. M. J. Seo, K. C. Shin, **D. K. Oh**. Production of 5,8-dihydroxy-9(Z)-octadecenoic acid from

- oleic acid by whole recombinant cells expressing diol synthase from *Aspergillus nidulans*. *Biotechnol. Lett.* **37(1)**, 131-137 (2015)
10. H. J. Oh, S. U. Kim, J. W. Song, J. H. Lee, W. R. Kang, Y. S. Jo, K. R. Kim, U. T. Bornscheuer, D. K. Oh, J. B. Park. Biotransformation of linoleic acid into hydroxy fatty acids and carboxylic acids using a linoleate double bond hydratase as key enzyme. *Adv. Synth. Catal.* **357(2-3)**, 408-416 (2015)
11. Y. J. Jeong, M. J. Seo, K. C. Shin, D. K. Oh. Production of 8-hydroxy-9,12(*Z,Z*)-octadecadienoic acid from linoleic acid by recombinant cells expressing H1004A-C1006S variant of *Aspergillus nidulans* diol synthase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **115**, 35-42 (2015)
12. J. U. An, B. J. Kim, S. H. Hong, D. K. Oh. Characterization of an omega-6 linoleate lipoxygenase from *Burkholderia thailandensis* and its application in the production of 13-hydroxyoctadecadienoic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99(13)**, 5487-5497 (2015)
13. J. Y. Park, S. H. Lee, K. R. Kim, J. B. Park, D. K. Oh. Production of 13*S*-hydroxy-9(*Z*)-octadecenoic acid from linoleic acid by whole recombinant cells expressing linoleate 13-hydratase from *Lactobacillus acidophilus*. *J. Biotechnol.* **208**, 1-10 (2015)
14. K. R. Kim, J. U. An, S. H. Lee, D. K. Oh. Selective production of 9*R*-hydroxy-10*E*,12*Z*,15*Z*-octadecatrienoic acid from α -linolenic acid in perilla seed oil hydrolyzate by a lipoxygenase from *Nostoc* sp. SAG 25.82. *PLoS One* **10(9)**, e0137785 (2015)
15. H. Y. Choi, M. J. Seo, K. C. Shin, D. K. Oh. Production of 10-hydroxy-12,15(*Z,Z*)-octadecadienoic acid from α -linolenic acid by permeabilized *Stenotrophomonas nitireducens* cells. *Biotechnol. Lett.* **37(11)**, 2271-2277 (2015)

3. 특허 성과

가. 출원

- (1) 오덕근, 서민호, “지방산 수화효소에 의한 리시놀레산으로부터 10,12-이수산화스테아르산의 제조방법 및 그 조성물” 한국특허 출원번호 10-2012-0108758 (2012) 9월 28일
- (2) 오덕근, 안정용, “효모의 베타-산화 유도에 의한 수산화 지방산으로부터 감마-데카라톤과 감마-부티로라톤의 제조방법 및 그 조성물” 한국특허 출원번호 10-2013-002206 (2013) 2월 28일
- (3) 오덕근, 조예슬 “미생물에 의한 홍화유로부터 고수율의 감마-락톤류의 제조방법 및 그 조성물” 한국특허 출원번호 10-2013-0156111 (2013) 12월 16일
- (4) 오덕근, 강우리, 오혜진 “락토바실러스 에시도필러스 유래 13-리놀레산 수화효소에 의한 13-수산화 지방산의 생산 및 윌토마이세스 리포퍼를 이용한 델타-데카라톤의 제조방법 및 그 조성물” 한국특허 출원번호 10-2014-0019855 (2014) 2월 20일
- (5) 오덕근, 강우리, 오혜진 “락토바실러스 에시도필러스 유래 13-리놀레산 수화효소에 의한 13-수산화 지방산의 생산 및 윌토마이세스 리포퍼를 이용한 델타-데카라톤의 제조방법 및 그 조성물” 한국특허 출원번호 10-2015-0127223 (2015) 9월 8일

나. 등록

- (1) 오덕근, 안정용, “효모의 베타-산화 유도에 의한 수산화 지방산으로부터 감마-데카라톤과 감마-부티로라톤의 제조방법 및 그 조성물” 한국특허 등록번호 10-1383342 (2014) 4월 2일
- (2) 오덕근, 서민호, “지방산 수화효소에 의한 리시놀레산으로부터 10,12-이수산화스테아르산의 제조방법 및 그 조성물” 한국특허 등록번호 10-1404043 (2014) 5월 29일
- (3) 오덕근, 조예슬 “미생물에 의한 홍화유로부터 고수율의 감마-락톤류의 제조방법 및 그 조성물” 한국특허 등록번호 10-1556115 (2015) 9월 22일

제 2 절 성과활용 계획

1. 실용화·산업화 계획

가. 20 L pilot에서 생산 기술 확보

○ 20 L pilot에서의 최적화가 수행되지 않아 플라스크 보다 수율이 낮게 나왔음. 락톤 발효에서는 산소가 많이 들어가면 락톤이 분해되고 균체 증식이 많이 이루어지나 산소가 부족하게 되면 락톤 생산에 관여하는 β -oxidation이 조효소 생성 부족으로 잘 이루어지지 않음. 이를 해결하기 위해서는 최적 산소 공급조건을 결정해야함. 향후 20 L pilot에서 교반 속도 별 실험을 수행하여 최적 교반 속도를 결정하여 락톤 생산량을 플라스크 이상의 수율로 생산 할 예정임.

○ Hydroxy 지방산의 정제는 환경 친화적인 개념으로 화장품에 사용하기 위하여 메탄올 대신 에탄올로 정제할 예정임. 에탄올을 사용한 hydroxy 지방산의 정제 최적화 실험을 수행할 예정임.

○ 락톤의 정제는 oil bath를 사용하여 환류냉각증류법으로 정제하였으나 규모가 커지면서 효율성이 떨어지는 단점이 있어 20 L pilot에서는 여러 가지 용매를 적용하여 용매추출법의 기술을 확보할 예정임.

나. 산업화 계획

○ 참여 기업이 세부 과제로 역할 분담하고 3년 동안 scale-up 연구를 공동으로 수행하여 자연스럽게 기술이전을 함. 본 기술은 생물 전환법을 사용하는 청정 기술로 화학 합성법에 비하여 경쟁력이 있으므로 벤처기업이나 중소기업이 산업화하기 적합함.

○ 현재 lactone 중 가장 시장이 큰 decalactone과 dodecalactone은 천연원료로부터 추출하는 방식이 존재하지 않아 미생물을 이용한 생물전환 방식이 가장 유력하며 특히 저렴한 원료와 전구체를 이용하는 방식에 따라 경제성이 결정되므로 본 과제에서 제안하는 값싼 농산원료를 사용할 경우 경쟁력이 높아 산업화에 유리함.

○ 원료 조달측면에서 국내 생산유 및 국내폐유를 대상으로 확대 보완하여 국내 농업 생산 활성화와 국내 환경보전차원에서 기여할 예정임. 특히 국내 폐유 조성은 linoleic acid가 60-65%, oleic acid 25-30% 함유하고 있어 본 과제에서 개발한 방법을 사용하면 linoleic acid에서 γ -dodecalactone을 oleic acid에서 γ -dodecalactone을 생산 할 수 있어 폐유는 락톤 생산에 좋은 기질임.

○ Gamma-decalactone은 현재 산업화가 완료단계로 부가가치가 적은 반면 dodecalactone은 시장이 형성된 시간이 짧아 시장진입이 유리할 것으로 예상되며 그 외 본 과제에서 제안한 락톤류들은 가격이 비싼 델타-락톤류의 새로운 락톤으로 본 과제 수행 후 새로운 제품으로 원천 산업화로 높은 부가가치 창출이 예상됨. 특히 본 연구진이 보유한 효소전환 및 최적화 기술이 이미 세계 최고 수준이므로 dodecalactone의 경우 단기간 내에 산업화가 가능함.

○ 통상 천연원료의 경우 합성품보다 가격이 3-5배 높아 부가가치 창출에 더 유리함.

○ 생산된 천연 향료 및 향장 원료물질은 국내외의 향료 회사를 통해 새로운 고부가의 조합 향 제조에 사용함.

○ 개발된 바이오향료는 화장품 적용을 위하여 국내 대기업과 같이 제품 적용 연구를 수행할 예정이고, 결과를 바탕으로 국내용 제품화를 통한 국내 시장 진입(2016년 예상)이 용이할 것임.

○ 현재 락톤류의 경우 국내시장이 200억 원 규모이지만 시제품과 같은 바이오 향료 락톤류는 화학 합성하므로 현재 시장은 없고 천연물질에 대한 선호도로 인하여 개발되면 기존 시장을 급속히 잠식할 뿐만 아니라 새로운 시장의 창출로 성장기(2020년 예상)에 전체 규모의 60%인 약 200억 원이 예상함.

○ 국내 시장 진입 완료 시점에 여러 유지로부터 직접 제조한 혼합품인 경우 화장품 원료로 아모레 퍼시픽 또는 LG생활건강과 같은 대기업과 같이 제품 연구를 수행한 후 대기업과 같이 세계 시장 진입(2017년 예상)을 계획하고 있음.

○ 국내 시장 진입 완료 시점에 같이 정제품의 조합 연구를 천연향료 사용 및 수입 업체인 보락이나 서울향료와 같이 세계 시장 진입(2017년 예상)을 계획하고 있음.

○ 본 과제 수행을 통해 산업화에 성공할 경우 국내 락톤류 시장 200억 원에서 초기 5년간 11% 시장을 선점하고 향후 10년 내 20%를 대체할 것으로 기대됨.

2. 활용방안

○ 생물소재 개발에 활용: 본 과제에서 개발되는 신규 기능성 소재 발굴기술, 유지의 가수분해 기술, 효소의 분리정제기술, 효소의 분자진화기술, 효소의 구조변형기술, 생물전환 기술, 세포공장 기술, 산물의 분리정제기술, 생물공정의 개발기술 등의 생물공학의 핵심기술은 다른 생물소재 개발에 활용될 수 있음.

○ 천연 향료 및 향장 원료 물질의 상품화: 본 연구를 통하여 개발된 생물 전환 기술을 제약품, 산업용 유기 용매, 합성 고분자등 유사한 화학 합성물질의 상품화와 경쟁력 강화를 위하여 직접 활용함. 과제 수행 결과를 특허 출원할 뿐만 아니라 참여 기업에게 기술 이전을 하여 산업화에 활용함.

○ 다양한 제품에 활용: 미생물 및 미생물의 효소를 이용한 생물전환 공정으로 친환경적으로 생산된 천연 바이오향료는 품질의 식품, 화장품, 및 생활용품으로 다양한 범위에 적용 될 것으로 예상하고 있음.

○ 락톤의 천연 향료 이외에도 다른 응용분야에 활용: 락톤은 항균력이 있으므로 방부제로 사용할 수 있음.

○ 중간체인 hydroxy 지방산의 유화제로 개발: 유일한 수산화 지방산 유화제인 ricinoleic acid이지만, 본 과제에서는 식물 유지로부터 생물전환으로 다양한 hydroxy 지방산을 생산할 수 있고 유화제로서 적용이 가능 할 것으로 예상됨.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 과제에서 생산한 7,8-DiHODE, 7,8-diHOME, 7,8-diHOTrE의 유화제로써의 활성을 측정하기 위하여 soybean oil을 hydrophobic phase로 사용하여 각각의 물질과 기존의 계면활성제로 이용되어지는 Span, Tween 계열들의 detergents들을 이용하여 유화력을 측정한 결과 detergent 중에서는 Spna 80이 가장 높은 유화력을 보였으며 그 다음으로는 Tween 60이 높음을 확인하였고, 7,8-diHFA중에서는 7,8-diHOME가 Tween 40과 비슷한 유화력을 보이는 것을 확인하였음 (Fig. 1). 이것은 hydroxy fatty acid를 유화제로써 사용 가능성을 제시하였으므로 유화제관련 해외과학기술정보를 조사하였음.

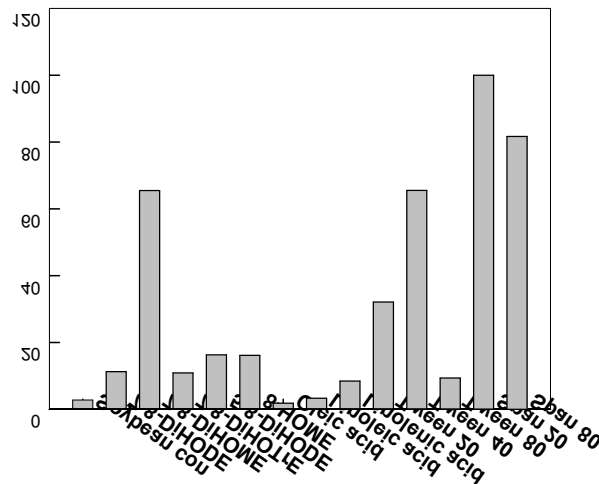


Fig. 1. Emulsifying activity of 7,8-dihydroxy fatty acids.

1. 유화제의 경제적/산업적 현황

가. 화장품용 계면활성제(유화제) 시장

화장품 유화제는 클렌징에 사용되는 피부 자극도가 높은 음이온성과 크림, 로션 등에 사용되는 피부자극도가 낮은 비이온성 유화제 및 천연유화제로 구분됨.

화장품용 유화제 산업은 다품종 소량생산의 형태를 띠고 있으며, 화장품 제조에 있어 차지하는 중요성이 높아 화장품산업 전 분야에 미치는 영향이 매우 큰 기술집약적 산업임.

최근 응용기술의 발전 및 소비자들의 친환경적 요구에 따라 수요구조의 변화를 보이면서 점차 천연계 유화제 사용비율이 증가하고 있는 추세이나, 피부와 환경에 친화적인 당류계 유화제와 천연유화제는 고급제품에 한해 이용하고 있는 것이 현 실정임.

나. 화장품용 유화제의 산업적 현황

1970년대에는 음이온성 유화제로서 저급제품에는 스테아린산-TEA, 고급제품에는 스테아린산-엘아르기닌(L-arginine)을 주로 많이 사용하였으며, 1980년대 들어 피부 부담을 줄이기 위해 비이온성 유화제로 에테르계 유화제를 많이 이용하였음.

그러나 에테르계 유화제는 비이온성 유화제 중 피부에 자극을 가장 많이 주는 유화제이므로,

1990년대 들어 비이온성 유화제로서 피부 부담이 상당히 적은 에스테르계 및 이보다 더 순한 폴리올 에스테르계를 주로 이용하게 되었음.

화장품 유화제의 경우, 점차 피부자극도가 낮고 더 순한 친환경계 유화제에 대한 시장 요구가 증대되고 있으며, 향후 폴리올 에스테르계 유화제에서 친환경계 유화제로의 시장변화가 가속화되고 있음.

다. 천연계 계면활성제 현황

화장품 계면활성제로써, 안정성과 알레르기성 및 피부자극성이 낮은 제품의 시장요구 추세에 따라, 천연계 계면활성제에 대한 수요가 증가하고 있음.

올레산(oleic acid)은 올리브유에 포함되어 있는 지방산의 주성분으로 오메가-9 불포화지방산으로 화장품용 유화제로 가장 많이 사용되어 품귀현상이 우려되는 가운데, 수입제품의 가격이 상승하고 있음.

국내 라우린산(lauric acid)은 Acid Chem, Henkel, Natural Oleo Chemical, Palm Oleo社 제품 등이 수입되고 있는데, 화장품업체들이 자체 수요를 목적으로 현지에서 직수입하거나 해외 제조 기업들을 통해 수입하고 있음. 점차 수입화장품의 소비 증가로 국산 화장품 제조에 이용되는 라우린산에 대한 수입량은 감소되고 있는 추세임.

Soya Lecithin은 세포막을 구성하는 인지질성분으로 계면활성력이 있으며, 현재 시중에는 대두에서 추출한 인지질이 EMULMETIK, AMISOL SOFT 및 HELIOGEL(프랑스의 Lucas Meyer사 제품), 이라는 상품명으로 출시되어 있음.

라. Hydroxy 지방산의 산업적 현황

유일한 hydroxy 지방인 피마자유는 화장품으로 가치가 높은 천연 자원이지만 자체내에 이중결합으로 인해 산패가 발생하여 사용 시 한계가 있어 수소화 과정, 열처리, 산처리 등의 화학적 과정을 통해 이중결합을 제거하여 사용함.

Hydroxy 지방산으로는 유일하게 화학합성된 12-hydroxystearic acid가 판매되고 있고 주로 폴리머나 코팅제 원료로 사용되고 있음.

2. 유화제의 기술적 현황

가. 유화제 생산 기술

현재 많이 사용되는 폴리올 에스테르계를 포함하는 대부분의 유화제는 화학합성법으로 생산되고 있고 유일한 수산화 지방인 피마자유도 수소 첨가하는 화학합성법을 사용함.

피부와 환경에 친화적인 당류계 유화제는 효소법을 사용함.

천연유화제로는 oleic acid, lauric acid, lecithin 등이 있고 추출법으로 생산하고 있음.

나. Hydroxy 지방산의 생산 기술

대두 지방산화효소와 사람 지방산화효소가 지방을 hydroxy 지방으로 전환한다는 정성적인 되었지만 이들 지방산화효소는 열 안정성이 매우 낮고 생산수율이 현저히 떨어져 산업적인 적용은 불가능함.

미국 농무성 산하 National Center for Agricultural Utilization Research에서 20년간 미생물로

수산화 지방산을 생산하는 연구를 수행하여 300여 편은 논문을 발표하였지만 화장품 적용은 보고되지 않음.

과제를 통하여 다양한 hydroxy 지방산 생산 기술이 확보되었으므로 유화제 적용 연구가 필요함.

3. 문제점 및 전망

가. 화장품용 유화제의 문제점 및 전망

효소법으로 지방에 당을 결합시킨 당류계 유화제 피부와 환경에 친화적이지만 고가이고, 천연 유화제는 수입에 의존하며 유화력에 한계가 있음. 시장요구에 따라 친환경계 유화제를 개발하여야 하며 시장 확대를 위해서는 경제적인 신소재의 개발이 필수적임.

유화제의 대부분은 수입에 의존하므로 자체 경제적을 지닌 유화력이 우수한 신소재 생물전환 유화제 개발이 필요함.

생물전환으로 생산되는 수산화 지방 및 수산화 지방산은 신소재 유화제로 유화력이 우수하고 경제적인 생산이 가능하여 연구개발이 필요함.

나. Hydroxy 지방산의 화장품용 유화제로서의 사용

유일한 수산화 지방산 유화제인 ricinoleic acid이지만, 본 과제에서는 식물 유지로부터 생물전환으로 다양한 hydroxy 지방산을 생산할 수 있고 유화제로서 적용이 가능 할 것으로 예상됨.

제 7 장 연구시설·장비 현황

이 과제로 도입·개발한 연구시설·장비가 없음

제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

○ 본 연구실은 연구실 ‘안전 환경 조성에 관한 법률’ [제10446호, 2011년] 및 교육과학기술부고시 제2009-37호 [2009년]에 따라 연구책임자의 관리 하에 연구실 안전에 관한 계획을 수립하고 이행하였음.

○ 본 연구실은 연구실 안전을 위한 아래와 같은 기본적인 연구 안전장비 및 장치를 보유하고 있음.

장비명	용도	수량
Hood	유기용매 실험 및 배기	2
용매 안전 캐비닛	폭발 방지 및 차폐	1
소화기	화재시 소화용	3
화재경보기	화재경보용	1
가스누출감지기 및 차단기	가스누출 감지 및 차단	3
가스고정 장치	고정용	1
방진 및 방독 마스크	유해물질 흡입방지	다수

○ 대학 내 안전관리위원회 안전관리규정에 따라 연구책임자의 지도하에 안전점검계획을 수립하고 이행할 것임. 일상점검은 매일 실시하고 주간, 월간 및 연간 정기점검으로 내용을 달리 하여 실시하였음.

○ 본 연구실은 기본적으로 화학물질(약품) 대장, 물질안전보건자료(MSDS), 보관 장소 기록서, 보호 장구 목록 및 관리대장, 기계기구·설비장비 명세서 및 이력카드, 안전방호 장치 목록 등을 제작하여 비치 및 수시 관리하였음.

○ 참여연구원은 전원 상해보험을 의무적으로 가입하였고 사망 및 상해에 대한 보장을 포함하였음. 동시에 건강검진이 이루어질 수 있도록 조치하였음.

○ 참여연구원의 연구실 안전의식 고취를 위해 연 2회 총 4시간의 교육훈련을 실시하였음.

제 9 장 참고문헌

- Aguedo M, Beney L, Wache Y, Belin JM (2003) Mechanisms underlying the toxicity of lactone aroma compounds towards the producing yeast cells. *J Appl Microbiol* 94:258-265
- Alchihab M, Destain J, Aguedo M, Majad L, Ghalfi H, Wathelet JP, Thonart P (2009) Production of g-decalactone by a psychrophilic and a mesophilic strain of the yeast *Rhodotorula aurantiaca*. *Appl Biochem Biotechnol* 158:41-50
- An JU, Joo YC, Oh DK (2013) New biotransformation process for the production of the fragrance compound g-dodecalactone from 10-hydroxystearate by permeabilized *Waltomyces lipofer* cells. *Appl Environ Microbiol* 79:2636-2641
- Carrau FM, Medina K, Farina L, Boido E, Henschke PA, Dellacassa E (2008) Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. *FEMS Yeast Res* 8:1196-1207
- Chen TC, Ju YH (2001) An improved fractional crystallization method for the enrichment of g-linolenic acid in borage oil fatty acid. *Ind Eng Chem Res* 40:3781-3784
- Dommes P, Dommes V, Kunau WH (1983) b-Oxidation in *Candida tropicalis*. Partial purification and biological function of an inducible 2,4-dienoyl coenzyme A reductase. *J Biol Chem* 258:10846-10852
- Elss S, Preston C, Hertzog C, Heckel F, Richling E, Schreier P (2005) Aroma profiles of pineapple fruit (*Ananas comosus* [L.] Merr.) and pineapple products. *Lwt-Food Sci Technol* 38:263-274
- Endrizzi A, Awade AC, Belin JM (1993) Presumptive involvement of methyl ricinoleate b-oxidation in the production of g-decalactone by the yeast *Pichia guilliermondii*. *FEMS Microbiol Lett* 114:153-160
- Endrizzi A, Pagot Y, Le Clainche A, Nicaud JM, Belin JM (1996) Production of lactones and peroxisomal b-oxidation in yeasts. *Crit Rev Biotechnol* 16:301-329
- Farbood MI, Morris JA, Mclean LB (1998) Fermentation process for preparing 10-hydroxy-C18-carboxylic acid and g-dodecalactone derivatives. European Patent 0578388
- Farbood MI, Willis BJ, Ramsey, N J (1985) Production of g-decalactone. United States Patent 4560656
- Feron G, Dufosse L, Pierard E, Bonnarme P, Quere JL, Spinnler H (1996) Production, identification, and toxicity of g-decalactone and 4-hydroxydecanoic acid from *Sporidiobolus* spp. *Appl Environ Microbiol* 62:2826-2831
- Fickers P, Benetti PH, Wache Y, Marty A, Mauersberger S, Smit MS, Nicaud JM (2005) Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Res* 5:527-543
- Gatfield I (1988) Production of flavor and aroma compounds by biotechnology. *Crit Rev Biotechnol* 42:110-122
- Han O, Han SR (1995) Process for production of C10 and/or C12 gamma-lactones from the

corresponding C10 and/or C12 carboxylic acid by means of microbial biotransformation in the presence of mineral oil. United States Patent 5457036

Hara Y, Takahashi K (2002) A novel production of γ -butyrolactone catalyzed by homogeneous ruthenium complexes. *Catal Surv JPN* 6:73-78

Joo YC, Seo ES, Kim YS, Kim KR, Park JB, Oh DK (2012) Production of 10-hydroxystearic acid from oleic acid by whole cells of recombinant *Escherichia coli* containing oleate hydratase from *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Biotechnol* 158:17-23

Kawamoto S, Nozaki C, Tanaka A, Fukui S (1978) Fatty acid β -oxidation system in microbodies of n-alkane-grown *Candida tropicalis*. *Eur J Biochem* 83:609-613

Kondo A, Liu Y, Furuta M, Fujita Y, Matsumoto T, Fukuda H (2000) Preparation of high activity whole cell biocatalyst by permeabilization of recombinant flocculent yeast with alcohol. *Enzyme Microb Technol* 27:806-811

Lalel HJD, Singh Z, Tan SC (2003) Aroma volatiles production during fruit ripening of 'Kensington Pride' mango. *Postharvest Biol Technol* 27:323-336

Lee SL, Chen HY, Chen WC, Chou CC (1998) Production of γ -decalactone from ricinoleic acid by immobilized cells of *Sporidiobolus salmonicolor*. *Process Biochem* 33:453-459

Maga JA (1976) Lactones in foods. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 8:1-56

Nicaud JM, Belin JM, Pagot Y, Joran EA (1996) Bioconversion of substrate with microbe auxotrophic for specific compound in medium deficient in this compound. French Patent 2734843

Pagot Y, Le Clainche A, Nicaud JM, Wache Y, Belin JM (1998) Peroxisomal β -oxidation activities and γ -decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol* 49:295-300

Rabenhorst J, Gatfield I (2002) Method of producing γ -decalactone using *Yarrowia lipolytica* strain HR 145 (DSM 12397). United States Patent 6451565

Romero-Guido C, Belo I, Ta TM, Cao-Hoang L, Alchihab M, Gomes N, Thonart P, Teixeira JA, Destain J, Wache Y (2011) Biochemistry of lactone formation in yeast and fungi and its utilisation for the production of flavour and fragrance compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:535-547

Schöttler M, Boland W (1995) On the biosynthesis of γ -dodecanolactone in ripening fruits: flavor constituents from strawberries (*Fragaria ananassa*) and peaches (*Prunus persica*). *Helv Chim Acta* 78:847-856

Sulter GJ, Waterham HR, Goodman JM, Veenhuis M (1990) Proliferation and metabolic significance of peroxisomes in *Candida boidinii* during growth on D-alanine or oleic acid as the sole carbon source. *Arch Microbiol* 153:485-489

Ta TM, Cao-Hoang L, Phan-Thi H, Tran HD, Souffou N, Gresti J, Marechal PA, Cavin JF, Wache Y (2010) New insights into the effect of medium-chain-length lactones on yeast membranes. Importance of the culture medium. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:1089-1099

Titorenko VI, Nicaud JM, Wang H, Chan H, Rachubinski RA (2002) Acyl-CoA oxidase is imported as a heteropentameric, cofactor-containing complex into peroxisomes of *Yarrowia*

lipolytica. J Cell Biol 156:481-494

Valenciano S, Lucas JR, Pedregosa A, Monistrol IF, Laborda F (1996) Induction of β -oxidation enzymes and microbody proliferation in *Aspergillus nidulans*. Arch Microbiol 166:336-341

Veenhuis M, Mateblowski M, Kunau WH, Harder W (1987) Proliferation of microbodies in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 3:77-84

Vose J, Tighe T, Schwartz M, Buel E (2001) Detection of γ -butyrolactone (GBL) as a natural component in wine. J Forensic Sci 46:1164-1167

Wache Y, Aguedo M, Nicaud JM, Belin JM (2003) Catabolism of hydroxyacids and biotechnological production of lactones by *Yarrowia lipolytica*. Appl Microbiol Biotechnol 61:393-404

<첨부> 특허, 논문 및 시장분석 보고서

특허, 논문, 제품(시장) 분석보고서

신청과제명	농산 유지로부터 생물전환법에 의한 다양한 바이오향료 개발		
주관연구책임자	오 덕 근	주관기관	건국대학교

1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
지방산으로부터 hydratase 처리에 의한 hydroxy 지방산 생산	미국: 균체반응 농도:16 g/L, 수율:90% 생산성:2.7 g/L-h	균체반응 농도:0.34 g/L, 수율:6% 생산성:1 mg/L-h	효소반응 농도:38 g/L, 수율:95% 생산성:8 g/L-h	효소반응 농도:48 g/L, 수율:96% 생산성:10 g/L-h	세계 최고 수준
지방산으로부터 lipoxygenase 처리에 의 한 hydroxy 지방산 생 산	미국: 균체반응 농도:8.7 g/L, 수율:87% 생산성:0.16g/L-h	균체반응 농도:4.56 g/L, 수율:63% 생산성:0.06g/L-h	효소반응 농도:28 g/L, 수율:93% 생산성:1.2 g/L-h	효소반응 농도:38 g/L, 수율:96% 생산성:3 g/L-h	세계 최고 수준
Hydroxy 지방산으로부 터 락톤류의 생산	농도:9.5 g/L 수율:19% 생산성:0.13g/L-h	락톤 생산 확인	농도:18 g/L, 수율:15% 생산성:0.75g/L-h	농도:45 g/L 수율:75% 생산성:1.5 g/L-h	세계 최고 수준

※ 기존연구는 wild-type은 균체 반응으로 생산하였으나 본 연구는 재조합 효소 또는 재조합 균체를 사용하기 때문에 높은 농도와 생산성을 나타냄.

2. 특허분석

가. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허 DB	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr), Aureka DB
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목 및 초록

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		미생물 배양에 의한 락톤 생산	Hydroxy 지방산으로부터 락톤 생산
Keyword		Hydroxy fatty acid, lactone, flavor	Hydroxy fatty acid, gamma- or delta-lactone, flavor
검색건수		782	1801
유효특허건수		20	48
핵심특허 및 관련성	특허명	Process for the production of lactone	Production of γ -decalactone
	보유국	스위스 (Givoudan Roure Int.)	미국 (Fritzsche Dodge & Olcott Inc.)
	등록년도	1997	1985
	관련성	70%	60%
	유사점	곰팡이를 전구체 γ -carboxylic acid ester와 함께 배양하여 γ -decalactone 생산함	곰팡이 및 효모의 β -oxidation을 이용하여 hydroxy fatty acid를 γ -decalactone으로 전환됨을 확인.
	차이점	전구체를 넣었음에도 생산량이 10.5 g/L에 불과함. 본 과제 제안서 선행연구에서 당 연구팀은 γ -carboxylic acid ester없이도 18 g/L γ -dodecalactone을 생산하였음.	주로 미생물 균체를 이용하는 기술로 최적화가 이루어지지 않아 수율이 낮음. 본 과제상 제안과 같은 최적화 과정을 거치면 현저히 높은 생산성으로 원천특허 확보가 가능함.

○ 유효특허들 중 핵심특허는 EP0795607 및 US4560656으로 공통적으로 본 과제에서 제안하는 락톤으로의 전환에 관련된 내용을 포함하고 있으며 전반적으로 세포자체를 이용하는 기술들이 주를 이루고 있어 본 과제에서 제안하는 효소 및 세포공장 등의 개념 및 균체의 투과성 향상 내용은 포함하고 있지 않음.

○ Hydroxy 지방산 생산을 위해 필요한 기술 요소 중 lipoxygenase관련해서는 주로 lipoxygenase inhibitor screening 및 assay 방법, 식물성 지방산을 이용한 oxylipin 생합성에 관련된 mutant와 특성에 관련된 특허들이 검색되었고 본 과제와 관련한 락톤 생산 특허는 1건만이 검색됨. 본 과제에서는 lipoxygenase 및 hydratase를 기반으로 락톤을 생산하여 기존 균체에 의한 생산법과는 차별화 됨.

○ Green leaf volatile 관련 특허는 (US Patent 6274358) 등의 특허로 10여건 정도 검색되지만 모두 자연 상태의 과일, 콩, 효모 등을 효소원으로 이용하여 본 과제와 같은 재조합 정제된 효소를 사용하여 생산에 관련된 특허는 검색되지 않음.

○ 본 과제에서 제안하는 연구가 성공적으로 수행될 경우 신규 원천특허 창출 가능성이 높음을 알 수 있음.

3. 논문분석

가. 논문분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽
논문 DB	Pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov), ScienceDirect(www.sciencedirect.com)
검색기간	최근 10년간
검색범위	제목, 초록 및 키워드

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		균체를 이용한 hydroxy 지방산 생산	균체를 이용한 hydroxy 지방산 생산
Keyword		Hydroxy fatty acid, hydroxylation, bioconversion, oleic acid, linoleic acid	Hydroxy fatty acid, hydroxylation, bioconversion, oleic acid, linoleic acid
검색건수		1452	1452
유효논문건수		231	231
핵심논문 및 관련성	논문명	Microbial conversion of oleic acid to 10-hydroxystearic acid	Production and recovery of oxygenated fatty acids from oleic acid by <i>Flavobacterium</i> sp.
	학술지명	Appl. Microbiol. Biotechnol.	Korean Chem. Eng. Res.
	저자	S. L. Koritala et al.(미국)	S. H. Heo et al. (한국)
	게재년도	1989	2009
	관련성(%)	60%	60%
	유사점	불포화지방산에서 hydroxy 지방산 생산 Hydratase가 함유되었다고 추정되는 미생물 균체를 이용하여	불포화지방산에서 hydroxy 지방산 생산 불포화지방산에서 hydroxy 지방산 생산한 국내 최고수준이지만 이미 본 연구팀은 hydratase를 클로닝하여 생산한 효소로 더 높은 수준의 hydroxy 지방산 생산을 생산함.
	차이점	불포화지방산에서 hydroxy 지방산 생산한 문헌보고 최고수준이지만 이미 본 연구팀은 hydratase를 클로닝하여 생산한 효소로 더 높은 수준의 hydroxy 지방산 생산을 생산함.	불포화지방산에서 hydroxy 지방산 생산한 국내 최고수준이지만 이미 본 연구팀은 hydratase를 클로닝하여 생산한 효소로 더 높은 수준의 hydroxy 지방산 생산을 생산함.

개발기술명		균체를 이용한 hydroxy 지방산 생산	균체를 이용한 hydroxy 지방산 생산
Keyword		Hydroxy fatty acid, hydroxylation, bioconversion, oleic acid, linoleic acid	Hydroxy fatty acid, hydroxylation, bioconversion, oleic acid, linoleic acid
검색건수		1452	1452
유효논문건수		231	231
핵심논문 및 관련성	논문명	Production of a novel compound, 7,10,12-trihydroxy-8(E)-octadecenoic acid from ricinoleic acid by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PR3.	Production of 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid from olive oil by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PR3.
	학술지명	Curr. Microbiol.	Appl. Microbiol. Biotechnol.
	저자	T. M. Kuo et al.(미국)	M. J. Suh et al. (한국)
	게재년도	2001	2009
	관련성(%)	60%	60%
	유사점	불포화지방산에서 hydroxy 지방산 생산 Lipoxygenase가 함유되었다고 추정되는 미생물 균체를 이용하여 불포화지방산에서 hydroxy 지방산 생산한 문헌보고 최고수준이지만 이미 본 연구팀은 lipoxygenase를 클로닝하여 생산한 효소로 더 높은 수준의 hydroxy 지방산 생산을 생산함.	불포화지방산에서 hydroxy 지방산 생산 Lipoxygenase가 함유되었다고 추정되는 미생물 균체를 이용하여 불포화지방산에서 hydroxy 지방산 생산한 국내 최고수준이지만 이미 본 연구팀은 lipoxygenase를 클로닝하여 생산한 효소로 더 높은 수준의 hydroxy 지방산 생산을 생산함.

개발기술명		효모를 이용한 lactone 생산	효소적 lactone 생산
Keyword		γ -Lactone, γ -decalactone, γ -dodecalactone, lactonase, β -oxidation	γ -Lactone, γ -decalactone, γ -dodecalactone, lactonase, β -oxidation
검색건수		369	369
유효논문건수		164	164
핵심논문 및 관련성	논문명	Production of γ -Decalactone by a Psychrophilic and a Mesophilic Strain of the Yeast <i>Rhodotorula aurantiaca</i>	Expression of POX2 gene and disruption of POX3 genes in the industrial <i>Yarrowia lipolytica</i> on the γ -decalactone production
	학술지명	Appl. Biochem. Biotechnol.	Microbiol. Res.
	저자	M. Alchihab et al.	Y. Guo et al.
	게재년도	2009	2011
	관련성(%)	60%	60%
	유사점	락톤 생산에 관련된 지방성 효모 효모의 온도 및 pH 특성을 통해 γ -decalactone 생산 최적화에만 연구가 한정. 본 연구에서는 효소 차원에서 특성을 연구하여 β -oxidation 및 lactonization 시스템의 확립도 연구 대상	락톤 생산에 관련된 효소 효모의 β -oxidation에 관여하는 효소인 acyl-CoA oxidase 특성 규명에만 연구가 한정. 본 연구에서는 락톤 전구체 합성에 대한 활성이 높은 acyl-CoA oxidase 특성 규명 및 락톤 생산 시스템의 확립도 연구 대상

개발기술명		효모를 이용한 lactone 생산	효모를 이용한 lactone 생산
Keyword		γ -Lactone, γ -decalactone, γ -dodecalactone, lactonase, β -oxidation	γ -Lactone, γ -decalactone, γ -dodecalactone, lactonase, β -oxidation
검색건수		369	369
유효논문건수		164	164
핵심논문 및 관련성	논문명	Production of 3-hydroxy- γ -decalactone, the precursor of two decenolides with flavouring properties, by the yeast <i>Yarrowia lipolytica</i>	The use of Macronet resins to recover γ -decalactone produced by <i>Rhodotorula aurantiaca</i> from the culture broth
	학술지명	Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic	J. Ind. Microbiol. Biotechnol.
	저자	E. E. Garcia et al.	M. Alchihab et al.
	게재년도	2009	2010
	관련성(%)	50%	50%
	유사점	락톤 생산에 관련된 지방성 효모	락톤 생산에 관련된 지방성 효모
차이점	효모의 발효를 통하여 ricinoleic acid를 기질로 하여 γ -decalactone을 생산하였으나 세포내 다른 대사과정으로 인하여 다양한 락톤류가 부산물로 생산됨. 본 연구에서는 효소적 시스템을 세포내에 확립하여 원하는 단일 락톤을 생산하는 체계 확립도 연구 대상	효모의 발효를 통해 생산된 γ -decalactone을 resin을 이용하여 정제에만 연구가 한정. 본 연구에서는 고온분별증류를 통하여 다양한 락톤류를 고순도로 정제하는 시스템 확립도 연구 대상	

■ Hydroxy 지방산류 관련 논문 분석

- 현재까지 hydroxy 지방산의 생산은 관여 효소도 정확히 모르는 상태에서 균체 반응으로 생산되어 왔음.
- 사용된 wild-type 균체는 함유된 효소량이 낮아 고농도, 고수율, 고생산성으로 hydroxy 지방산을 생산하는 데는 한계가 있음.
- 생산된 hydroxy 지방산을 바이오 향료 생산과 연결하여 실험한 경우는 거의 없음.
- 지방산 유래 다양한 바이오 향료를 생산하기 위해서는 관여 효소인 hydratase와 lipoxygenase의 사용이 필수적임

■ 락톤류 관련 논문 분석

- 현재까지 락톤류 생산은 효모의 생물전환기술을 이용하여 지방산유도배지에서 발효를 통해 이루어져 많은 부산물이 생성되고 수율도 낮음.
- 효모를 이용한 생물전환기술은 hydroxy 지방산에 대한 베타-산화 활성이 낮거나 락톤에 대한 분해 활성이 강하여 고수율의 생산이 불가능 함.
- 락톤 생산을 위한 효율적인 지방산 산화 효소에 대한 규명이 미흡 함.
- 고수율 락톤 생산을 위한 산업적인 세포 공정 및 효소 공정은 아직까지 확립되지 않음.
- 락톤으로 전환하는 락톤화 효소는 아직까지 밝혀지지 않음. 본 연구에서는 lactonase를 클로닝하여 락톤화에 최초로 적용할 것임.

4. 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황

(1) 국내 제품생산 및 시장 현황

○ 국내 향료 시장은 약 2,000 억 원 규모이며 화장품, 식품 및 생활용품에 사용되고 있으나 외국기업의 시장 점유율이 80%임(Forbes Korea, 2004년; 중소기업청, 2012년).

○ 생산품목은 분야 및 품목별로 2,400 여개 품목으로 다양하나 완제품 또는 원료를 외국에서 100% 수입하여 판매만 하거나 국내에서 일부 조합 판매하는 형태를 취하고 있어 원천 기술개발이 시급함(한국향료공업협회, http://kffa-kr.or.kr/gen/gen_01.asp).

○ 국내 외국 향료공급업체들 대부분이 agent를 통해 판매하고 있으며 국내에서 가장 많은 매출규모를 보이고 있는 업체는 Hasegawa로 약 1500만 달러(약 110억 원) 정도의 매출 규모를 보이고 있고 국내 향료 제조업체인 서울향료를 통해 판매하고 있음.

○ 국내 향료는 식품용도가 60%, 화장품등의 용도가 40%정도를 차지하고 있고 향장향료는 조합식품향료와 조합향장 향료가 대부분의 시장을 차지하고 있는 것으로 알려지고 있다. 조합식품향료가 차지하는 비중은 약 55% 정도이고, 조합향장향료가 35%, 나머지는 합성향료와 천연향료가 차지하고 있음.

○ 국내 유기농, 천연 원료 선호도 증가에 따라 천연향미제 및 향료에 대한 사용비율이 증가할 것으로 전망되어 본 과제에서의 제안대로 천연향료 중심으로 개발할 경우 식품, 화장품, 생활 용품등 광범위하게 사용되어 높은 부가가치 창출과 관련 분야에 대한 영향이 클 것임.

○ 국내 천연 향료는 시장은 약 100억 원정도이고 천연 원료 선호도 증가에 따라 성장률이 약 10-20% 비교적 높지만 아직까지 가격이 고가이고 공급에 한계가 있음.

○ 국내에서 사용되는 락톤류는 모두 화학합성품이고의 2010년 국내시장은 약 200억 원으로 수입 1660만 불, 수출 20만 불임(표 3). FOB가격으로 화학 합성한 델타-락톤류가 100-120 \$/kg 이고 감마-락톤류가 30-40 \$/kg임 (www.cischem.com).

표 3. 국내시장 규모 한국무역협회 무역통계 자료(<http://www.kita.net>)

락톤류	2005	2006	2007	2008	2009	2010
수입	952	984	1200	1295	1495	1660
수출	56	28	19	47	24	20

[금액: 만불(\$)]

(2) 국외 제품생산 및 시장 현황

○ 세계 향료시장 규모는 220억불 (Leffingwell & Associates, 2010, http://www.leffingwell.com/top_10.htm)이고 Givaudan Roure (스위스), Firmenich (스위스), IFF (미국), Symrise (독일), Takasago (일본), Mane SA (프랑스), Sensient Flavors (미국), Hasegawa (일본)의 8개 회사가 전 세계 시장의 70%를 점유하고 있고 소비량 및 시장도 유럽, 북미, 아시아 순임 (Fig. 17).

Global Market For Flavors, 2006 (US\$ (Million))

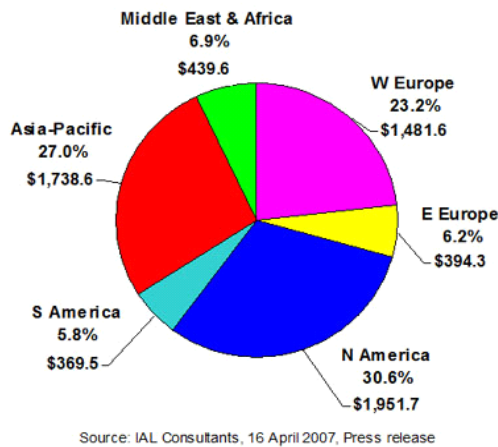


Fig 1. 향료의 지역별 세계시장 규모. (IAL consultant, 2007)

○ 분야별로는 화장품 용도인 향수 (fragrance)가 35%, aroma compound, essential oil등이 15% 식품 용도인 향미제 (flavor)가 40% 및 기타 천연재료가 10% 정도를 차지 함 (Fig. 18). 향수용 성분 중에서도 화장품용도에서 비누, 샴푸 등 생활용품의 비중이 증가하고 있음.

○ 식품분야의 천연 향료 시장은 2009년 6억 유로 규모 (UBIC consulting, 2010)로 매년 8%씩 성장하고 있음.

○ 락톤류의 세계시장 규모는 12억불로 추정되며(Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 14, 451-460) 매년 증가하고 있음.

Global Market for Flavors & Fragrances by Value, 2006 (US\$ Million)

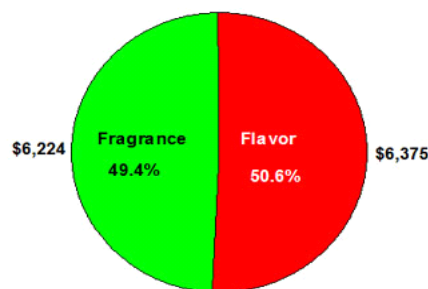


Fig 2. 향료의 분야별 시장 규모. (IAL consultant, 2007)

나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

(1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

○ 현재 lactone 중 가장 시장이 큰 decalactone과 dodecalactone은 천연원료로부터 추출하는 방식이 존재하지 않아 미생물을 이용한 생물전환 방식이 가장 유력하며 특히 저렴한 원료와 전구체를 이용하는 방식에 따라 경제성이 결정되므로 본 과제에서 제안하는 값싼 농산원료를

사용할 경우 경쟁력이 높아 산업화에 유리함.

○ Gamma-decalactone은 현재 산업화가 완료단계로 부가가치가 적은 반면 dodecalactone은 시장이 형성된 시간이 짧아 시장진입이 유리할 것으로 예상되며 그 외 본 과제에서 제안한 락톤류들은 가격이 비싼 델타-락톤류의 새로운 락톤으로 본 과제 수행 후 새로운 제품으로 원천 산업화로 높은 부가가치 창출이 예상됨. 특히 본 연구진이 보유한 효소전환 및 최적화 기술이 이미 세계 최고 수준이므로 dodecalactone의 경우 단기간 내에 산업화가 가능함.

○ 통상 천연원료의 경우 합성품보다 가격이 3-5배 높아 부가가치 창출에 더 유리함.

○ 본 과제 수행을 통해 산업화에 성공할 경우 국내 락톤류 시장 200억 원에서 초기 5년간 11% 시장을 선점하고 향후 10년 내 20%를 대체할 것으로 기대됨.

(2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	10	50	100	500	1000	1,660
경제적 파급효과	5	30	100	250	1200	1,585
부가가치 창출액	0	10	50	250	1500	1,810
합 계	15	80	250	1000	3700	5,055

(가) 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치

(나) 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치

(다) 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

다. 원료 분석

○ 국내 유지별로 원료물질이 되는 지방산인 oleic acid, linoleic acid 및 α -linolenic acid 함량을 분석한 결과를 Table 4에 나타내었다.

○ 각각의 지방산이 가장 많이 함유되어 있는 올리브유(oleic acid 75% 함유), 홍화유(linoleic acid 80% 함유), 들깨유(α -linolenic acid 63% 함유)를 사용하면 다양한 락톤류 생산에 유리함.

○ 또한 유채유(oleic acid 62% 함유), 콩유(linoleic acid 54% 함유), 아마인유(α -linolenic acid 53% 함유)의 락톤류 생산에 사용도 가능함.

Table 4. 국내 유지별 oleic acid, linoleic acid 및 α -linolenic acid의 함량

종류	Oleic acid (%)	Linoleic acid (%)	α -Linolenic acid (%)
유채유	62	22	10
콩유	24	54	7
참깨유	39	40	1
들깨유	18	20	63
땅콩유	47	27	0
올리브유	71	10	1
아마인유	21	16	53
홍화유	13	78	0

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.