

최 종
연구보고서

식물유를 이용한 생물 전환법에 의한
고부가의 천연 향료 Aldehydes 및 Alcohol과
Butter Lactone의 생산 기술 개발

세종대학교 산학협력단
건국대학교 산학협력단

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “식물유를 이용한 생물 전환법에 의한 고부가의 천연 향료 Aldehydes 및 Alcohol과 Butter Lactone의 생산 기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 5월 24일

주관연구기관명 : 세종대학교

총괄연구책임자 : 김 용 휘

연 구 원 : 유 상 호

연 구 원 : 김 경 주

연 구 원 : 이 병 호

연 구 원 : 권 순 향

연 구 원 : 성 수 경

연 구 원 : 최 병 선

연 구 원 : 오 효 정

연 구 원 : 임 병 철

협동연구기관명 : 건국대학교

협동연구책임자 : 오 덕 근

요 약 문

I. 제 목

식물유를 이용한 생물 전환법에 의한 고부가의 천연 향료 Aldehydes 및 Alcohol과 Butter Lactone의 생산 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 목적

본 연구는 불포화 지방산 Linoleic acid를 다량으로 함유한 국내산 식물유를 이용하여 단순히 상대적으로 저가인 기능성 식품 소재로서 뿐만 아니라 새로운 **Biotechnology** 기술을 이용하여 고부가의 다양한 천연 **Flavor and Fragrance chemical**을 생산하여 향료 원자재 생산을 위한 생산 기술을 개발하는데 목적이 있다.

2. 필요성

Flavor and Fragrance chemical을 포함한 제약품, 산업용 유기용매, 합성 Polymer 등의 Specialty chemical 생산 공정에는 대부분 중금속등을 포함한 독성이 강한 촉매를 이용한 생산 과정을 가지고 있으나, 최근 환경 보존 노력에 따른 청정 유기합성 (**Green Chemistry**)에 대한 관심이 늘어남에 따라 **Biotransformation** 및 **Biocatalysis**를 이용한 대체 **Bio-organic synthesis**에 관심이 집중되고 있다. 전 세계의 Flavor and Fragrance chemical market는 70% 이상이 Organic synthesis에 의하여 생산되고 있다. 국내 및 세계적인 소비자의 천연 소재에 대한 선호도로 인한 천연 Flavor and Fragrance chemical에 요구가 증대되었다. 생물공학적인 기술로 생산되는 소재는 미국 FDA를 비롯한 각국의 Regulatory Agent로부터 천연 소재로 인정되기 때문에 최근 미생물, 효소, 조직 배양 등을 이용한 천연 Flavor and Fragrance chemical 생산에 관한 연구가 활발하다.

본 연구는 불포화 지방산 Linoleic acid를 다량으로 함유한 국내산 식물유를 이용하여 단순히 상대적으로 저가인 기능성 식품 소재로서 뿐만 아니라 새로운 **Biotechnology** 기술을 이용하여 고부가의 다양한 천연 Flavor and Fragrance chemical을 생산하여 향료 원자재 생산을 위한 생산 기술을 개발하는데 목적이 있다. 국내산 식물유중 불포화 지방산의 함량이 높은 홍화유는 (>80%)는 천연 향료 및 향장 원자재로서의 그 가치가 크다

국내에서 생산되는 천연 식물유 중 홍화는 1-2년생 초본으로 영경귀와 비슷하게 자라 6-7월경 꽃이 피며 3-4개월 후 꽃이 진 후 팔알 크기만한 씨가 백색으로 익어 포기 째 베어서 햇볕에서 말려 탈곡하여 황화씨를 추수한다. 수확된 씨는 단순 압착법 또는 산업용 Expeller를 이용하여 착유한다. 착유된 홍화유는 전통 식용유나 건강 보조 식품으로서 판매 되고 있다. 하지만 정제된 높은 함량의 Linoleic acid라도 그 가격은 <\$20/kg에 미쳐 홍화를 대량으로 재배하여 농가의 수익성을 올리기에는 경제성이 미약하다. 하지만 본 연구를 통해 홍화유에 다량 함유된 불포화 지방산인 Linoleic acid은 다양한 미생물을 이용한 Whole cell 발효에 의하여 hydroxy 지방산으로 변환될 수 있다. 이렇게 변환된 hydroxy 지방산은 미생물의 제한된 β -oxidation 대사에 의하여 4- 또는 5- hydroxy 지방산으로 변환되어, Lactonization reaction에 의하여 γ - 또는 δ -Lactone으로 변환되어 고부가의 천연 과일 향을 위한 중요한 향료 및 향장 원료물질을 생산할 수 있다.

이러한 이유로 불포화 지방산인 Linoleic acid 다량 함유하고 있어 경제적 가치가 큰 국내산 홍화유 (국내에서 재배되는 홍화는 80% 이상의 높은 불포화 지방산인 Linoleic acid를 함유하고 있어 경제적 가치성이 더욱 큼.)를 Biotransformation 및 Biocatalysis를 이용하여 \$1,000-2,500/Kg 가치의 다양한 천연 향료 및 향장 원료물질을 생산하여 국내 홍화 재배 농가를 활성화 시키고 지속적인 수익을 보장할 수 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. Lipoxygenase 및 Hydroperoxide Lyase의 Characterization 과 Reaction condition의 최적화

Lipoxygenase의 선별 - Lipoxygenase의 효소 활성을 지니고 있는 것으로 알려진 농작물을 대상으로 Lipoxygenase를 가진 국내산 농작물을 선발

Lipoxygenase의 생리적 특성 - 높은 Lipoxygenase 활성을 지니고 있는 국내 농작물과 과일의 Lipoxygenase는 효소의 생리적 특성을 조사하여 최적 반응조건을 결정

Hydroperoxide Lyase의 선별 - Hydroperoxide Lyase의 효소 활성을 지니고 있는 것으로 알려진 농작물을 대상으로 국내산 농작물의 Hydroperoxide Lyase의 존재와 활성측정

Hydroperoxide Lyase의 생리적 특성 - 높은 Hydroperoxide Lyase 효소 활성을 지니고 있는 농작물과 과일의 Hydroperoxide Lyase는 효소의 생리적 특성조사

식물의 Lipoxygenase 및 Hydroperoxide Lyase의 효소 반응의 최적화-선별된 농작물과 과일의 Lipoxygenase 및 Hydroperoxide Lyase을 이용하여 천연 aldehydes와 alcohol을 생산하는 효소공정의 최적화 조건을 설정

반응 조건의 최적화

반응 온도 (Temperature) / 반응 pH / 반응 Buffer system /
반응 효소 Kinetics

2. Hydroxylation 및 제한적 α -oxidation을 위한 미생물의 생리학적 특성 연구

미생물의 Hydroxylation 반응의 선별 - 불포화 지방산을 포함한 지방산을 Hydration 또는 Hydroxylation을 시켜 Hydroxy 지방산을 생성할 수 있

는 미생물을 한국식품연구원 및 한국 미생물 균주협회를 통해 구입하거나 필요한 경우 자연 환경 내에서 미생물을 분리 동정하여 선별한다.

높은 Hydroxylation 반응 활성을 가진 미생물의 생리적 특성 연구 -
 ● 높은 Hydroxylation 반응 활성을 지니고 있는 우수한 미생물을 동정한 후 다양한 미생물학적 및 생화학적 분석을 통해 생리적 특성을 조사하여 최적의 Whole cell을 이용한 Fermentation의 조건을 결정하여, 산업용 생물 공정 개발에 응용한다.

미생물의 제한적인 β -Oxidation의 대사 작용의 선별 - Hydroxy 지방산 및 불포화 지방산을 포함한 지방산의 β -Oxidation의 대사 작용을 가진
 ● 미생물을 한국식품연구원 및 한국 미생물 균주협회를 통해 구입하거나 필요한 경우 자연 환경 내에서 미생물을 분리 동정하여 선별한다.

미생물의 제한적인 β -Oxidation의 생리적 특성 연구 - β -Oxidation의 대사 작용을 가진 미생물을 동정한 후 다양한 미생물학적 및 생화학적 분석을 통해 생리적 특성을 조사하여 최적의 Whole cell을 이용한 Fermentation의 조건을 결정하여, 산업용 생물공정 개발에 응용한다.

3. 생물전환법의 산업적 생산 공정의 개발

Hydroxylation 및 제한적인 β -Oxidation의 Whole Cell Fermentation의 개발

-산업적 규모로 Hydroxylation 및 제한적인 β -Oxidation의 두 단계 미생물 발효 공정을 개발 β

생물 공정의 최적화 β

Fermentation Temperature / Fermentation pH / Oxygen Tension

Mixing / Bubbling capacity of Bioreactor / 산업용 배지의 설정

분리 정제 기술

Solvent Extraction / Distillation / Fractionation

4. 관능검사와 제품생산 기준의 설정

천연 향료의 관능검사를 통한 제품 관리 기준의 확립 - 기기 분석과 관
●능검사를 통해 생산된 향료 및 향장 원료물질의 순도와 향을 특성을 조사
한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. Lipoxygenase 및 Hydroperoxide Lyase의 Characterization 과 Reaction condition의 최적화

농산물의 9-lipoxygenase (LOX)는 linoleic acid를 9-hydroperoxy-octadecadienoic acid (HPODE)로 전환되는 dioxygenation을 촉진시키는 효소이며, 9-hydroperoxy-octadecadienoic acid (HPODE)는 Hydroperoxide Lyase(HPL)에 의해서 고부가의 천연 식물향인 cis-3-nonenal로 전환된다. 따라서 농산물 내의 9-LOX 활성 측정을 위해 국내외 보고된 내용을 근거로 가지, 감자, 고구마, 고추, 당근, 대두, 오이, 토마토, 피망, 호박 등을 시장에서 구입하여 분쇄한 후, 조효소액으로 사용하였다. pH 5-9 사이에서 최적 pH를 Spectrophotometer를 이용하여 Abs234에서 증가량을 측정하여 최적 pH를 측정하였다. 실험한 농산물 중에서는 대두, 감자, 가지의 효소액이 가장 높은 LOX 효소 활성을 보였다. LOX family에는 몇 가지 isomers가 존재하며, 식물의 LOXs는 HPODE의 두 개의 서로 다른 dioxygenation site에 작용한다고 알려져 있다. 가지와 감자의 효소액에 의한 반응에서는 9-HPODE가 주요 생성물이고, 대두의 경우는 13-HPODE가 주요 생성물로 나타났다. 따라서 감자와 가지의 LOXs가 9-HPODE를 생산하는데 중요한 농산물임을 알 수 있었다.

나. Hydroxylation 및 제한적 α -oxidation을 위한 미생물의 생리학적 특성 연구

Linoleic acid로부터 10-hydroxy-12 ^{β} (Z)-octadecenoic acid 생산하는 균체를 동정하여, 16S rRNA full sequencing (1,415 bp)과 Phylogenetic tree, nitrite reduction 을 통하여 *Stenotrophomonas nitritireducens*를 분리 동정

하였다. *S. nitritireducens* 는 cis-hydroxy fatty acid의 C16과 C18에 대한 regio-와 stereospecificity 때문에 by-products 없이 10-hydroxy fatty acids를 생산하였다. 이 균체는 cis-9-unsaturated fatty acid 중에서 linoleic acid에 대한 매우 높은 specificity를 보였다. linoleic acid 농도를 변화시켰을 때 30°C, pH 7.5 에서 10-hydroxy-12(*Z*)-octadecenoic acid의 최대 생산은 linoleic acid 농도 20 g/l가 최적이었다. 결과적으로 이것은 생산성 177 g/l-d (=7.5 g/l-h)에 해당되며 지금까지 보고된 연구 결과 중에서 최대이다. *Stenotrophomonas nitritireducens*에 의해서 Linoleic acid로부터 전환된 10-hydroxy-12(*Z*)-octadecenoic acid를 *Candida tropicalis*를 이용하여 두 번째 과정인 β -oxidation 반응을 통하여 (*Z*)-dodecen-4-olide를 생산하였다.

β

다. 생물전환법의 산업적 생산 공정의 개발

모든 Hydroxylation과 제한적 β -oxidation의 산업적 생산 공정은 in-situ bioreactor에서 진행되었다. 2-단계 미생물 생물전환법을 이용하여 불포화 지방산을 다량 함유하고 있는 식물유로부터 천연6-dodecen-4-olide (Butter lactone)의 생산하였다. 식물유에 함유된 불포화 지방산을 microbial lipase를 이용하여 분리한 후, *Pseudomonas sp.* NRRL B-2994의 hydroxylation 기작을 이용하여 광활성의 hydroxyl fatty acid(HFA)로 전환시켰다. 불포화 지방산 linoleic acid를 >75% 함유한 홍화유를 이용하여 *P. sp.* 는 48 시간의 생물전환공정기간 중 8 g/l의 10-hydroxy-12(*z*)-octadecenoic acid를 생성하였으며 평균 39.2% 생물전환율을 보였다. 원심 분리된 10-hydroxy-12(*z*)-octadecenoic acid는 2차적으로 *Yarrowia lipolytica* ATCC 34088의 제한적인 β -oxidation기작을 이용하여 4-hydroxy-6-dodecenoic acid로 전환되었다. 배양액 내 존재하는 4-hydroxy-6-dodecenoic acid는 4N H₂SO₄를 첨가하여 배양액을 pH 4로 낮추고 100°C에서 5분 동안 가열하여 6-dodecen-4-olide (Butter lactone)으로 lactone화 하였다. 천연6-dodecen-4-olide는 불포화 lactone으로 기존에 사용된 6-dodecan-4-olide (dodecalactone) 및 4-decan-4-olide 비교하

여 독특한 향 특성을 지니고 있다.

라. 관능검사와 제품생산 기준의 설정

Ethyl acetate를 이용하여 분리된 10-hydroxy-12(z)-octadecenoic acid는 gas chromatography-mass spectrometry를 이용하여 확인하였다. 90% 이상의 순도를 갖는 butter lactone를 분리 정제한 후, 관능검사를 통해 butter lactone의 독특한 향 특성을 분석하였다. 더 높은 순도의 butter lactone은 향후 과일향이나 낙농향의 조향에 사용이 가능할 수 있다.

2. 활용에 대한 건의

● 천연 향료 및 향장 원료 물질의 상품화

본 연구를 통해 개발된 생물 전환 기술은 천연 향료, 향장 원료물질을 생산하는데 응용될 수 있으며, 이러한 천연 향료 및 향장 원료 물질의 상업화를 통해 향료회사의 경쟁력 강화를 위하여 직접 활용할 수 있다. 국내산 홍화유를 이용한 고부가의 천연 향료 원료 물질의 생산은 농가 수익의 증대를 통해 홍화유 생산을 증대시킬 수 있다. 더욱이, 본 연구를 통하여 개발된 생물 전환 기술을 의약품, 산업용 유기 용매, 합성 고분자등 유사한 화학 합성물질의 상품화와 경쟁력 강화를 위하여 직접 활용한다.

생물 전환 기술은 향료회사의 향 제조에 이용되는 천연 향료 및 향장 원료물질의 생산에 이용될 수 있을 뿐만 아니라 중금속 촉매를 사용하여 정밀화학물질을 생산하는 화학회사로의 기술이전도 가능하다.

SUMMARY

I. Subject of the Study

Production of Natural Flavor Chemical by Biotransformation using plant oil;
Production of Aldehydes, Alcohols and Butter Lactones

II. The Objective and Importance of Research

1. Objective of Research

The objective of this research is the process development for the production of high-valued natural flavor and fragrance chemicals, that are used for the production of natural flavors and fragrances, from relatively lower-priced plant oils containing high amount of unsaturated fatty acid, linoleic acid as used for functional foods.

2. Importance of Research

Toxic heavy metals are usually required for processes of specialty chemicals including flavor and fragrance chemicals, pharmaceuticals, industrial solvents, and synthetic polymers as catalysts. Recent efforts to preserve environment renew interests to develop "Green Chemistry", bio-organic synthesis using biotransformation and biocatalysis. In the worldwide flavor and fragrance market, 70% of chemicals are synthesized by organic synthesis. Due to preference of natural products by consumers in world including Korea, a demand for natural flavor and fragrance chemicals is increased. As chemicals produced by biotechnology can be recognized as natural by many regulatory agents in the world including FDA (USA), recently there have been great research

efforts to produce natural flavor and fragrance chemicals using microorganisms, enzymes and tissue cultures.

The objective of this research is the process development for the production of high-valued natural flavor and fragrance chemicals, that are used for the production of natural flavors and fragrances, from relatively lower-priced plant oils containing high amount of unsaturated fatty acids, such as linoleic acid, as used for functional foods. Especially, Korean safflower oil that contains high amounts of unsaturated fatty acids including linoleic acid (>80%) is valuable for the production of natural flavor and fragrance chemicals. Safflower is one of plant oils that can be produced in Korea. Safflower oil is produced from seeds by a simple pressure process or commercial expeller. This oil is usually sold as a traditional cooking oil and a functional food supplement. However, the price of purified safflower oil containing high amounts of linoleic acid is only <\$20, and safflower is not an economical crop to improve farm income. In this research, linoleic acid in safflower oil can be biotransformed to hydroxy fatty acids by whole cell biotransformation process using various microorganisms. Hydroxy fatty acids can be further biotransformed to shorter 4- and/or 5-hydroxy fatty acids that can be transformed to γ - and/or δ -lactone, that are one of important components for high-valued natural fruit and dairy flavors, via lactonization reaction. Natural γ - and/or δ -lactone can be sold as \$1,000–2,000/kg. In addition, linoleic acid in safflower oil can be biotransformed to various aldehydes and alcohols that are also important components for high-valued natural fruit and dairy flavors by lipoxygenase and hydroperoxide lyase of various agricultural crops and fruits. Natural aldehydes and alcohols can be sold as \$500–1,000/kg. The development of natural flavor and fragrance chemicals, by microbial biotransformation and biocatalysts using Korean safflower oils eventually encourage safflower farming and improves income of safflower farmers in

Korea.

III. The Scope and Contents of Research

1. Characterization of lipoxygenase and hydroperoxide lyase and optimization of reaction conditions

Selection of lipoxygenase - Screening of lipoxygenase from crops / fruits produced from Korea

● **Characterization of lipoxygenase** - Biochemical characterization of lipoxygenase from crops / fruits with high lipoxygenase activities.

● **Selection of hydroperoxide lyase** - Screening of hydroperoxide lyase from crops / fruits produced from Korea

● **Characterization of hydroperoxide lyase** - Biochemical characterization of lipoxygenase from crops / fruits with high hydroperoxide lyase activity

● **Optimization of reaction conditions** - Optimization of enzyme processes for the production of natural aldehydes and alcohols using crude preparation of selected lipoxygenase and hydroperoxide lyase from crops / fruits

Optimization of Reaction Conditions

Temperature / pH / Buffer System / Enzyme Kinetics

2. Characterization Microorganisms for hydroxylation and limited -oxidation

Selection of microorganisms for hydroxylation - Selection of microorganisms with hydroxylation activities from natural environments and culture collections

●

β

Characterization of microorganisms with higher hydroxylation activities - Microbial and biochemical characterization for the development of whole cell biotransformation process

Selection of microorganisms for limited β -oxidation - Selection of microorganisms with limited β -oxidation activities from natural environments and culture collections β

Characterization of microorganisms with limited β -oxidation activities - Microbial and biochemical characterization for the development of whole cell biotransformation process β

3. Development of commercial biotransformation processes

Whole cell biotransformation process development for hydroxylation and limited β -oxidation - 2-stage microbial biotransformation process developments for hydroxylation and limited β -oxidation in commercial bioreactors β lactonization reactions

Optimization of whole cell biotransformation process in bioreactors

Fermentation temperature / pH / Oxygen Tension

Mixing / Aeration / commercial medium

Recovery and Purification Process

Solvent extraction / Distillation / Fractionation

4. Sensory evaluation and establishment of quality standards

Sensory evaluation and quality standards of samples (natural products) - Analysis of products using analytical instruments and sensory evaluation to set purity and flavor characteristics

●

IV. Results of Research and Recommendation

1. Results of research

1) Characterization of lipoxygenase and hydroperoxide lyase and optimization of reaction conditions

Plant 9-lipoxygenase (LOX) catalyzes dioxygenation by converting linoleic acid (LA) to 9-hydroperoxy-octadecadienoic acid (HPODE). These HPODEs can be utilized as substrates of hydroperoxide lyase (HPL) to produce *cis*-3-nonenal which is high-valued natural green odor. The purpose of this study is to characterize 9-LOX activity of Korean agricultural products such as eggplant, potato, sweet potato, pepper, carrot, soybean, cucumber, tomato, bell pepper and pumpkin. Crude enzyme extracts prepared from the homogenized plant materials were used for investigating the LOX activity. In the pH range of 5-9, optimal pH of plant LOX was determined by observing the increase in absorption at 234nm. Soybean, potato, eggplant extracts displayed the greatest LOX activity among the plant samples tested. There were isomers in LOX family, and plant LOXs have been known to mainly attack two different dioxygenation sites on HPODE. In the HPLC analysis of the LOX-catalyzed products 9-HPODE was a major compound from eggplant and potato but 13-HPODE was a predominant product of soybean. Therefore, potato and eggplant LOXs maybe potential candidates for 9-HPODE production.

2) Characterization Microorganisms for hydroxylation and limited -oxidation

An isolated strain for the conversion of linoleic acid to

β

10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid was identified as *Stenotrophomonas nitritireducens* by full sequencing of 16S rRNA, phylogenetic tree, and nitrite reduction. *S. nitritireducens* had novel specificity with a unique regio- and stereo-specificity only to *cis*-unsaturated fatty acids of C16 and C18, which were converted into their 10-hydroxy fatty acids without detectable by products. The strain showed the highest specificity for linoleic acid among *cis*-9-unsaturated fatty acids. The cells of 20 g/l produced 15 g/l 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid, a material for natural flavor production, from 20 g/l linoleic acid concentration at 30°C and pH 7.5 after 2 h with a productivity of 7.5 g/l · h. Consequently, this productivity in such a concentration showed the highest value among the production of hydroxy fatty acids reported thus far. The characterization of *Yarrowia lipolytica* ATCC 34088 is being investigated for the production of butter lactone from converted 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid.

3) Development of commercial biotransformation processes

All commercial biotransformation processes for hydroxylation and limited α -oxidation was carried out using in-situ bioreactor. Natural 6-dodecen-4-olide (Butter lactone) was produced from plant oils containing high unsaturated fatty acids via 2-stage microbial biotransformation. After unsaturated fatty acids were liberated from plant oil by microbial lipase, these were converted to optically active hydroxyl fatty acid (HFA) by hydroxylation reaction of *Pseudomonas sp.* NRRL B-2994. When safflower oil containing >75% unsaturated fatty acid, linoleic acid was used, *P.sp* produced 8g/l of 10-hydroxy-12(z)-octadecanoic acid with average of 39.2% bioconversion efficiency during 48hr biotransformation period. The

recovered 10-hydroxy-12-octadecanoic acid was further bioconverted to 4-hydroxy-6-dodecenoic acid via partial β -oxidation by *Yarrowia lipolytica* ATCC 34088. 4-hydroxy-6-dodecenoic acid ^{β} in culture was lactonized by lowering pH to 4 using 4N H₂SO₄ and heating for 5 min to 6-dodecen-4-olide (Butter lactone). Natural 6-dodecen-4-olide had characteristic aroma properties when to be compared to 6-dodecan-4-olide (dodecalactone) and 4-decen-4-olide (decalactone).

4) Sensory evaluation and establishment of quality standards

The chiral specific 10-hydroxy-12(z)-octadecenoic acid was extracted by ethyl acetate and its structure was identified by gas chromatography-mass spectrometry. The purity of butter lactone was >90% of the recovered lactone preparation. The limited sensory evaluation of crude preparation of butter lactone showed characteristic profiles. Further purification of butter lactone can be used for the production of unique fruit and dairy flavors

2. Recommendation

Commericalization of natural flavor and fragrance chemicals: The results of this research can be applied for the production of natural flavor and fragrance chemicals with optimization of these biotransformation processes. The commercialization can be carried out by flavor companies to improve their flavor formula that can be competitive in the worldwide flavor market. The production of natural flavor and fragrance chemicals, by microbial biotransformation and biocatalysts using Koran safflower oils eventually will encourage safflower farming and improve income of safflower farmers in Korea. Furthermore, the biotransformation processes for hydroxylation and limited β -oxidation can be used for the production of

pharmaceuticals, industrial organic solvents and high-molecular weight polymers with the development of organic chemical synthesis.

We will encourage flavor companies to produce natural flavor and fragrance chemicals and to applicate these chemicals into their flavor formular for commercialization. In addition, we will fucus on transferring these technology to chemical companies for the production of various chemicals that are usually synthesized by heavy metal catalysts using petrochemicals.

CONTENTS

Chapter 1. Outline of the research project

1. Objective of the research
2. Necessity of the research
3. Scope of the research

Chapter 2. The state of art in the country and abroad

Chapter 3. Contents and results of the research

Chapter 4. Objective achievements and contributions to relative field

Chapter 5. Application plans of the results

Chapter 6. Science technology information collected from abroad during
research program

Chapter 7. References

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요.....	21
제 1절	연구개발의 목적	21
제 2절	연구개발의 필요성.....	22
1.	기술적 측면.....	22
2.	경제, 산업적 측면.....	22
3.	사회, 문화적 측면.....	28
제 3절	연구개발 범위.....	29
1.	연구 기술의 개요.....	29
2.	연구개발 공정의 내용.....	34
제 2 장	국내외 기술개발 현황.....	36
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과.....	40
제 1절	Lipoxygenase 및 Hydroxyperoxide Lyase의 characterization과 reaction condition의 최적화.....	40
1.	실험재료.....	40
2.	실험방법.....	40
3.	실험결과.....	42
4.	결론.....	45
제 2절	Hydroxylation 및 제한적 β -Oxidation을 위한 미생물의 생리학적 특성 연구.....	63
1.	실험재료.....	63
2.	실험방법.....	64
3.	실험결과.....	68
4.	결론.....	71

제 3절 생물전환법의 산업적 생산 공정의 개발.....	95
1. 실험재료.....	95
2. 실험방법.....	96
3. 실험결과.....	103
4. 결론.....	109
제 4절 관능검사와 제품생산 기준의 설정.....	125
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	126
제 5장 연구개발결과의 활용계획.....	128
제 6 장 연구개발과정에서의 수집한 해외과학기술정보.....	130
제 1절 정밀화학산업의 특성.....	130
제 2절 Hydroxy Fatty Acid (HFA) 및 유도체.....	131
제 3절 향료산업의 특성.....	132
1. 향료산업의 특성.....	132
2. 향료산업의 시장 현황.....	133
제 7 장 참고문헌.....	137

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목표

전 세계의 향료 및 향장 산업의 규모는 2002년 기준으로 약 160억불 (\$16 Billion)로, 이중 잠재적으로 10%의 시장은 미생물을 비롯한 Biotransformation and Biocatalysis를 이용한 Biotechnology Product로 교체될 것으로 예측되고 있다. 전 세계의 향료 및 향장 원료물질의 시장 구조는 유기합성에 의한 합성 향료가 전체의 70%를 차지하고 있으나, 세계적으로나 국내의 국민 소득의 증가와 천연 음식 및 향장 소재의 요구, 소비재의 고급화 추세로 인한 천연 향료가 안정성과 기호도에서 선호되는 경향으로, Biotechnology를 이용한 향료 및 향장 원료물질 생산은 천연물로 받아들여져 고부가의 소재 생산에 적합하다.

국내에서 생산되는 천연 식물유 중 홍화는 1-2년생 초본으로 영경귀와 비슷하게 자라 6-7월경 꽃이 피며 3-4개월 후 꽃이 진 후 팔알 크기만한 씨가 백색으로 익어 포기 째 베어서 햇볕에서 말려 탈곡하여 황화씨를 추수한다. 수확된 씨는 단순 압착법 또는 산업용 Expeller를 이용하여 착유한다. 착유된 홍화유는 전통 식용유나 건강 보조 식품으로서 판매 되고 있다. 하지만 정제된 높은 함량의 Linoleic acid라도 그 가격은 <\$20/kg에 미쳐 홍화를 대량으로 재배하여 농가의 수익성을 올리기에는 경제성이 미약하다. 하지만 본 연구를 통해 홍화유에 다량 함유된 불포화 지방산인 Linoleic acid은 다양한 미생물을 이용한 Whole cell 발효에 의하여 hydroxy 지방산으로 변환될 수 있다. 이렇게 변환된 hydroxy 지방산은 미생물의 제한된 β -oxidation 대사에 의하여 4- 또는 5- hydroxy 지방산으로 변환되어, Lactonization reaction에 의하여 γ - 또는 δ -Lactone으로 변환되어 고부가의 천연 과일 향을 위한 중요한 향료 및 향장 원료물질을 생산할 수 있다. 이러한 이유로 불포화 지방산인 Linoleic acid 다량 함유하고 있어 경제적 가치가 큰 국내산 홍화유 (국내에서 재배되는 홍화는 80% 이상의 높은 불포화 지방산인 Linoleic acid를 함유하고 있어 경제적

가치성이 더욱 큼.)를 Biotransformation 및 Biocatalysis를 이용하여 \$1,000-2,500/Kg 가치의 다양한 천연 향료 및 향장 원료물질을 생산하여 국내 홍화 재배 농가를 활성화 시키고 지속적인 수익을 보장할 수 있다.

본 연구는 불포화 지방산 Linoleic acid를 다량으로 함유한 국내산 식물유를 이용하여 단순히 상대적으로 저가인 기능성 식품 소재로서 뿐만 아니라 새로운 **Biotechnology** 기술을 이용하여 고부가의 다양한 천연 Flavor and Fragrance chemical을 생산하여 향료 원자재 생산을 위한 생산 기술을 개발하는데 목적이 있다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

가. 향료 및 향장 원료 물질의 화학합성법을 대체하는 청정 생물전환법 개발

Flavor and Fragrance chemical을 포함한 제약품, 산업용 유기용매, 합성 Polymer 등의 Specialty chemical 생산 공정에는 대부분 중금속등을 포함한 독성이 강한 촉매를 이용한 생산 과정을 가지고 있으나, 최근 환경 보존 노력에 따른 **청정 유기합성 (Green Chemistry)**에 대한 관심이 늘어남에 따라 **Biotransformation** 및 **Biocatalysis**를 이용한 대체 **Bio-organic synthesis**에 관심이 집중되고 있다.

Biotransformation 및 **Biocatalysis**는 미생물을 비롯한 생물학적 촉매를 사용하여 유기 화학물질을 합성 생산하는 방법을 말한다. Biotransformation 및 Biocatalysis 이용한 Bio-organic synthesis 생산 기술을 이용할 경우 다음과 같은 효과를 기대할 수 있다.

- a. 환경 친화적 생산 공정 개발 및 최소한의 환경 오염 물질 방출
- b. 선택적인 광활성 물질의 생산
(Steroselectivity and Regioselectivity)
- c. 새로운 유기 합성 물질의 개발 (New/Alternative Biosynthesis)

전 세계의 Flavor and Fragrance chemical market는 70% 이상이 Organic synthesis에 의하여 생산되고 있다. 국내 및 세계적인 소비자의 천연 소재에 대한 선호도로 인한 천연 Flavor and Fragrance chemical에 요구가 증대되었다. 생물공학적인 기술로 생산되는 소재는 미국 FDA를 비롯한 각국의 Regulatory Agent로부터 천연 소재로 인정되기 때문에 최근 미생물, 효소, 조직 배양 등을 이용한 천연 Flavor and Fragrance chemical 생산에 관한 연구가 활발하다.

나. 불포화 지방산을 다량 함유한 국내산 식물유를 이용한 고부가 향료 및 향장 원료물질의 생산

본 연구는 불포화 지방산 Linoleic acid를 다량으로 함유한 국내산 식물유를 이용하여 단순히 상대적으로 저가인 기능성 식품 소재로서 뿐만 아니라 새로운 **Biotechnology** 기술을 이용하여 고부가의 다양한 천연 Flavor and Fragrance chemical을 생산하여 향료 원자재 생산을 위한 생산 기술을 개발하는데 목적이 있다. 국내산 식물유중 불포화 지방산의 함량이 높은 홍화유는 (>80%)는 천연 향료 및 향장 원자재로서의 그 가치가 크다.

홍화 (Safflower- *Carthamus tinctorius* L.)는 예로부터 널리 알려진 홍색 염료로 유명한 식물이며 염료 및 기름을 얻기 위한 유지식물로 전 세계적으로 재배되고 있다. 홍화 꽃에서 추출한

●

붉은색 염료는 연지를 비롯한 화장 소재 및 옷감을 물들이기 위한 염료로 또한 식품의 착색제로 사용되고 있다. 또한 홍화씨는 20-30%의 지방유 (oil)를 함유하고 있어 이 기름을 Safflower oil 이라하는데 주성분은 불포화 지방산인 Linoleic acid으로 전체 지방산의 70-80% 이상을 함유하고 있어 콜레스테롤의 대사 정상화 작용을 하는 것으로 알려져 기능성 식품소재로 사용됨으로서 미국을 비롯하여 대량 재배되고 있다. 특히 국내에서 재배되는 홍화는 **80% 이상의 높은 불포화 지방산인 Linoleic acid**를 함유하고 있어 경제적 가치성이 더욱 크다.

천연 Aldehyde 및 Alcohol 생산: 홍화유등에 다량 함유된 불포화 지방산인 Linoleic acid는 식물이나 미생물에 존재하는 **Lipoxygenase** 및 **Oxygenase (Mono- and Di-)**의 Enzyme activity에 의하여 Hydroperoxy 지방산으로 변환되어 천연 향료 및 향장 원료물질을 생산할 수 있는 다양한 중간체로 변환될 수 있다. 변환된 Linoleic acid 유도체는 식물 및 미생물의 Hydroperoxide lyase 에 의하여 **C6, C9 and C12 aldehyde 및 Alcohol**로 변환되어 고부가의 신선한 야채 맛의 천연 향을 위한 중요한 향원료 성분을 생산할 수 있다. 생산된 다양한 Aldehyde 및 Alcohol은 천연 향으로서 뿐만 아니라 잠재적으로 Antifungal 또는 Antimicrobial agent로 사용될 수 있다.

천연 Lactone의 생산: 홍화유등에 다량 함유된 불포화 지방산인 Linoleic acid의 이중 결합에 위치에 다양한 농작물 과 미생물에서 분리 정제된 불포화 지방산 변이 효소에 의하여 Hydroperoxy 지방산으로 변환되며, Hydroperoxy 지방산은 불안정하여 쉽게 안정한 Hydroxy fatty acid 로 변환될 수 있다. 또한 다양한 미생물을 이용한 Whole cell 발효에 의하여 불포화 Linoleic acid는 Hydroxy 지방산으로 변환된다. 이렇게 생성된 Hydroxy 지방산은 미생물의 제한된 β -Oxidation 대사에 의하여

4- 또는 5- hydroxy fatty acid로 변환되어, Lactonization reaction에 의하여 - 또는 -Lactone으로 변환되어 고부가의 천연 과일 향을 위한 중요한 향료 및 향장 원료물질을 생산할 수 있다.

광학 활성 이성질체의 생산 (Optically Pure Isomers):
 Biocatalysis 및 Biotransformation을 이용하여 생산된 천연 Linoleic acid를 이용해 생산된 천연 향료 및 향장 원료 물질은 유기화학 합성으로 생산된 물질과 달리 **선택적 광학적인 활성 (Optically pure isomers)**을 지니며 천연 향료 및 향장 원료로서의 생활성이 높은 이성체를 선택적으로 생산하게 되어 그 가치가 증가 된다.

다. 생물전환법에 의한 향료 및 향장 원료물질 생산을 위한 세계적인 기술 수준

불포화 지방산인 Linoleic acid를 이용한 천연 향료 및 향장 원료물질 생산은 국제적인 향료회사인 International Flavors and Fragrances (IFF), Givaudan 및 Firmenich를 포함한 많은 향료 회사와 미 농무성 연구소 (USDA-ARS)를 비롯한 다양한 연구소에서 지난 15년간 Biotechnology를 이용한 생산 기술 개발이 시도 되었으나, 생산성이 상업화에는 미치지 못하고 부분적으로 자체 내 향료 및 향장 원료물질 생산을 위한 제한적인 생산에 그치고 있다.

현재의 불포화 지방산인 Linoleic acid를 이용한 천연 향료 및 향장 원료 생산 기술 수준은 대체적으로 초보적인 단계로서 다양한 물질이 실험실에서는 생산될 수 있어도, 산업체에서 대량으로 생산하기 위해서는 Biotransformation 및 Biocatalysis를 이용한 생산 수율 향상 및 천연 합성 물질의 분리 정제에 따른 경

제적인 새로운 기술 개발이 요구되고 있다.

2. 경제·산업적 측면

가. 천연 향료 및 향장 원료의 생산의 경제적 가치

전 세계의 향료 및 향장 산업 규모: 전 세계의 향료 및 향장 산업의 규모는 2002년 기준으로 약 **160억불(\$16 Billion)**로, 이 중 잠재적으로 10%의 시장은 미생물을 비롯한 Biotransformation and Biocatalysis를 이용한 Biotechnology Product로 교체될 것으로 예측되고 있다. Biotechnology를 이용한 천연 Flavor and Fragrance Chemical은 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 제공한다.

천연 추출물: 전통적으로 천연 향료 및 향장 원료물질은 향식물을 이용한 천연 추출물로서, 질과 공급은 자연 재해, 생산국의 정치적 불안정 및 사회, 경제적인 불안요소로 인하여 매년 일정치 않아 세계적인 시장의 요구에 부응하기에는 어려움이 있다.

유기합성 향료 및 향장 원료물질 생산: 전 세계의 향료 및 향장 원료물질의 시장구조는 유기합성에 의한 합성 향료가 전체의 70%를 차지하고 있으나, 세계적으로나 국내의 국민 소득의 증[●]와 천연 음식 및 향장 소재의 요구, 소비재의 고급화 추세로 인한 천연 향료가 안정성과 기호도에서 선호되는 경향으로, Biotechnology를 이용한 향료 및 향장 원료물질 생산은 천연물로 받아들여져 고부가의 소재 생산에 적합하다.

나. 농가 소득 증대를 위한 고부가 천연 향료 및 향장 원료물질의

생산

국내에서 생산되는 천연 식물유 중 홍화는 1-2년생 초본으로 영
 ●귀와 비슷하게 자라 6-7월경 꽃이 피며 3-4 개월 후 꽃이 진
 후 팔알 크기만한 씨가 백색으로 익어 포기 껍 베어서 햇볕에서
 말려 탈곡하여 홍화씨를 추수한다. 수확된 씨는 단순 압착법 또
 는 산업용 Expeller를 이용하여 착유한다. 착유된 홍화유는 전통
 식용유나 건강 보조 식품으로서 판매되고 있다. 하지만 정제된
 높은 함량의 Linoleic acid라도 그 가격은 <\$20/kg에 미쳐 홍화
 를 대량으로 재배하여 농가의 수익성을 올리기에는 경제성이 미
 약하다.

이러한 이유로 불포화 지방산인 Linoleic acid 다량 함유하고 있
 어 경제적 가치가 큰 국내산 홍화유를 Biotransformation 및
 ●ocatalysis를 이용하여 \$1,000-2,500/kg 가치의 다양한 천연
 향료 및 향장 원료물질을 생산하여 국내 홍화 재배 농가를 활성화
 시키고 지속적인 수익을 보장할 수 있다.

다. 천연 향료 및 향장 원료물질의 청정 생산 기술 확보를 통한 국 제 경쟁력 향상

국내 향료 시장 현황: 한국의 향료 시장은 약 2,000억 원 정도
 의 규모이지만, 한국 내 향료 및 향장 원료물질에 대한 생산 기
 술의 미비로 외국 향료회사를 위주로 조합 향료의 공급에 의한
 ●통 시장만이 형성되어 있다. 이러한 내수 시장의 국산화합계
 해외 시장을 개척하기 위해서는 국내의 향료 및 향장 원료물질
 의 생산 기술 개발은 필수적이며, 생산 기술 개발 및 기술 축적
 을 위한 산학 협동은 필수적이다.

생화학합성을 통한 국제 경쟁력: 본 연구 결과에 의한 다양한

천연 향료 및 향장 원료물질의 생산은 홍화유를 포함한 생산 농가의 수익성 보장 뿐 만이 아니라, 향료는 부가 가치가 매우 높은 기술 집약적 제품으로 생명공학 기술을 향료 산업에 접목시켜 **생화학합성 (Bioorganic Synthesis)** 기술을 축적함으로써 한국 향료 업계의 **국가적 경쟁력을 향상**할 수 있는 계기가 될 수 있다.

시장의 안정성: 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 있다.

3. 사회·문화적 측면

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

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 있다.

친환경 대체 기술에 의한 국민 건강에 기여: 친환경 생물공학

을 이용한 Bio-Organic Synthesis (생유기합성)는 환경 친화적 공정으로 환경보존의 한 몫을 하게 되며, 이 기술은 점진적으로 중금속을 이용한 유기합성을 대체할 수 있는 친환경 대체 기술로서 이용될 수 있다. 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 있다.

선진 기술 개발에 의한 국제 기술 경쟁력 향상: “Process Chemistry” 개념을 이용한 학교 내의 연구 결과를 빠른 시간 내에 산업화하여 연구 결과의 경제적 가치를 증대할 수 있어 국제 기술 경쟁력을 높일 수 있다. 본 연구는 미국을 비롯한 국제적인 향료 및 향장 원료물질 생산 회사와 함께 일할 수 있는 기회를 제공하여 선진 기술을 한국에 토착화하여 한국의 정밀 화학 시장 개척에 커다란 도움을 줄 수 있다.

제 3절 연구개발 범위

1. 연구 기술의 개요

불포화 지방산인 Linoleic acid를 다량 포함한 홍화유를 비롯한 국내 식물유를 이용한 천연 향료 및 향장 원료물질 생산을 위한 **생물 전환 (Biotransformation 및 Biocatalysis)**를 포함한 산업용 생물공정 개발에는 다음과 같은 **4 단계의 연구 목표**를 중심으로 개발될 계획이다. 본 연구 과제 추진은 다양한 향료 및 향장 원료물질 생산 공정 개발을 목표로 **“Process Chemistry”** 개념을 도입하여 진행될 계획이다. **“Process Chemistry”** 개념은 생산 시설과 실험실내에서 생길 수 있는 생물공정 조건의 차이를 최소한으로 줄여 결과적으로 새로운 물질의 산업화를 가장 빠른 시간 내에 이룰 수 있도록 한다. 또한 생물공정 개발을 위한 실험실 내의 연구

내용은 실험실내 조건의 최적화 이전에 그 가능성을 생산시설 내에 적용할 수 있는 실험 장비와 조건으로 검증된다. **"Process Chemistry"** 에 대한 개요는 Figure 1과 같으며, 불포화 지방산을 이용한 천연 향료 및 향장 원료물질의 생산 개요는 Figure 2, 산업용 생물 공정의 개발 기술 개요는 Figure 3과 같다.

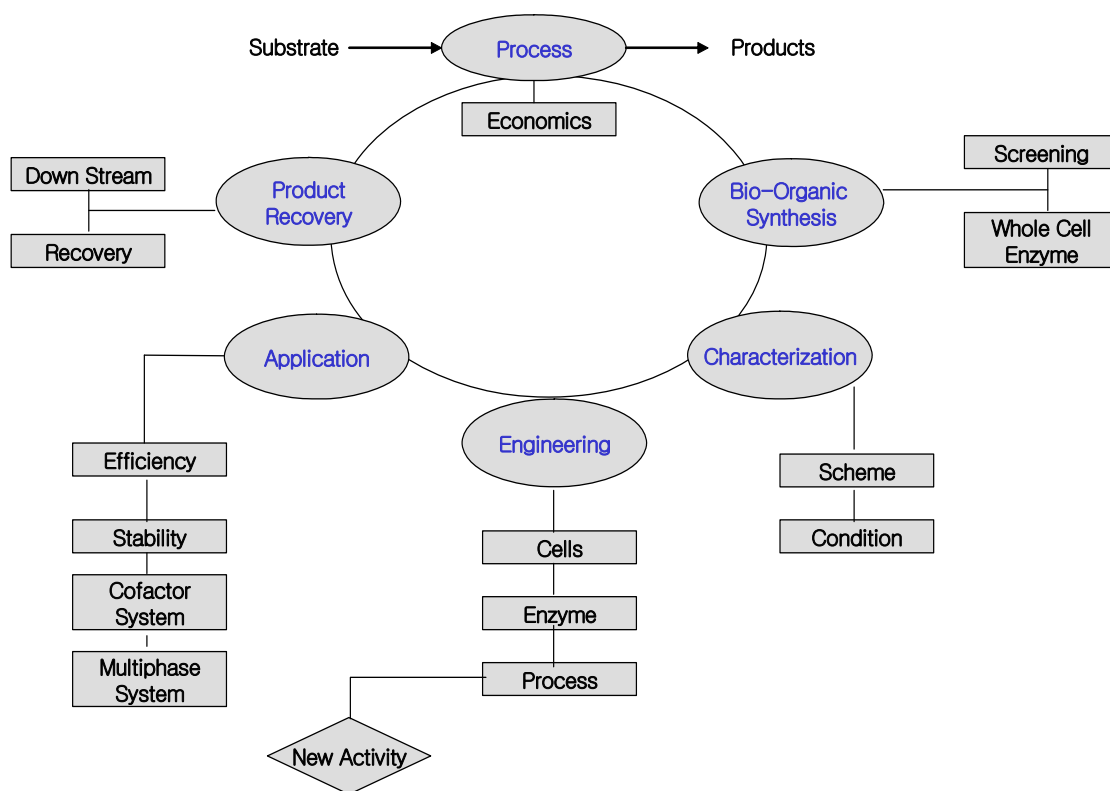
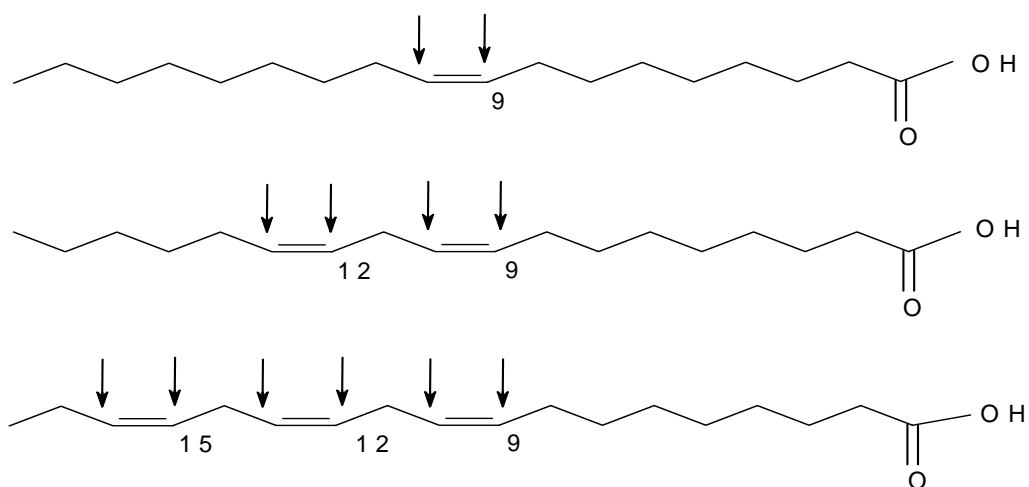
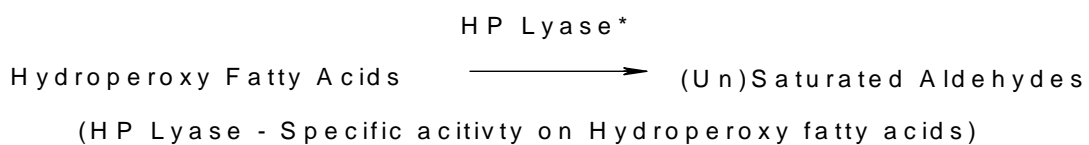


Figure 1. Process Chemistry의 공정도



1. Lipoxygenase - Hydroperoxide formation at different sites



2. Oxygenase - Hydroxy fatty acid formation at different sites

Hydroxy Fatty Acids via Limited Beta-Oxidation for Lactones

Figure 2. Flow Chart for the Development of Bioprocess for the Production of Flavor Chemicals from Fatty Acid.

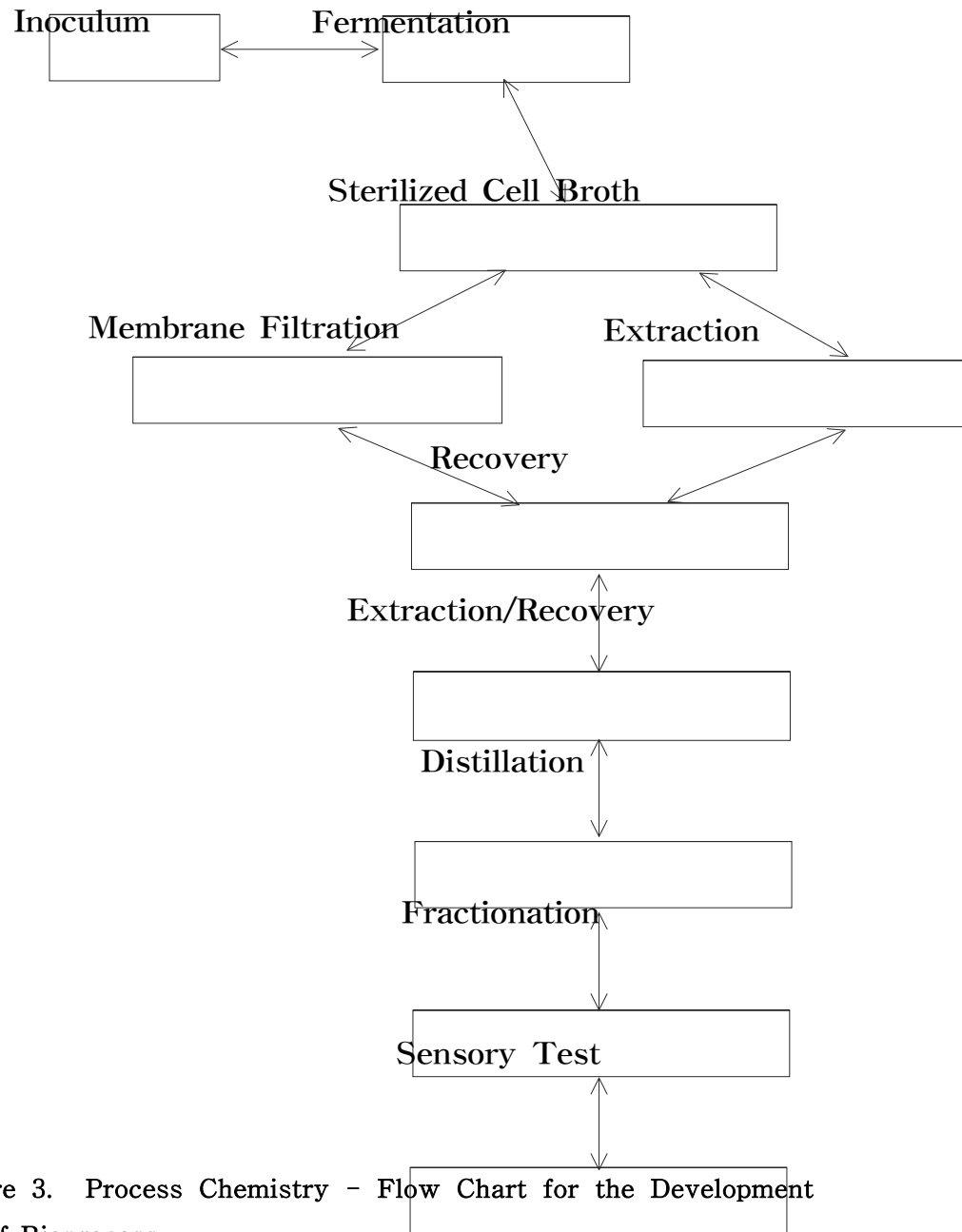


Figure 3. Process Chemistry - Flow Chart for the Development of Bioprocess

2. 연구개발 공정의 내용

가. 불포화 지방산 Linoleic acid를 변환 시킬 수 있는 효소 및 미생물의 분리 - (Identification of Biotransformation / Biocatalysis Process) - Linoleic acid Modification system and Bioprocess

불포화 지방산 Linoleic acid로부터 Aldehyde 및 Alcohol 생산을 위한 다양한 **국내산 농산물**의 Lipoxygenase와 Hydroperoxide Lyase의 분류, Characterization 및 생물 전환
 ● 불포화 지방산 Linoleic acid를 Mono- and Di-oxygenase를 이용하여 Hydroxy 지방산으로 전환할 수 있는 **국내 미생물** 분리
 ● 동정 및 생물전환

Hydroxy 지방산을 이용하여 - 또는 -Lactone 생산을 위한 제한적 -Oxidation 대사 작용을 지닌 **국내 미생물**의 분리 동정
 ● 및 생물전환

γ δ

β

나. 생물전환법의 산업적 생산 공정의 개발 - (Development of Industrial Bioprocess for Biotransformation and Biocatalysis)

천연 Aldehyde 및 Alcohol 생산을 위한 Lipoxygenase와 Hydroperoxide Lyase를 이용한 Laboratory & Pilot Plant 수준의 생물공정의 개발 **5-10g/Liter의 생산성**

● 천연 Hydroxy 지방산 생산을 위한 미생물/ 식물의 Hydroxylation 기작을 이용한 Laboratory & Pilot Plant 수준의 Hydroxylation 생물공정의 개발 - **10-20g/Liter의 생산성**

● 미생물의 제한적 -Oxidation 기작을 이용한 Laboratory & Pilot plant scale Lactone Bioprocess의 개발 - **5-10g/Liter**

●

의 생산성

다. 산업적 분리 정제 기술 개발 및 관능검사 (Development of Industrial Recovery and Purification Process, and It's Organoleptic Evaluation)

Counter Current Extraction을 포함한 다양한 화학물질의 Laboratory & Pilot Plant 수준의 분리 정제 기술의 개발

Molecular Distillation 및 Fractionation을 포함한 다양한 화학물질의 Laboratory & Pilot Plant 수준의 분리 정제 기술의 개발

생산된 천연 향료 및 향장 원료물질의 기기분석 및 관능검사를 통한 산업적 생산 기준 (Quality Control)의 확립

라. 천연 향료 및 향장 원료물질 시제품의 생산 및 이를 이용한 조합향 제작 생산 (Production of Sample and their Application into Flavor and Fragrance Formulation)

본 연구 결과는 최종적으로 불포화 지방산을 다량 함유한 홍화유를 비롯한 다양한 국내산 식물유로부터 천연 향료 및 향장 원료물질을 생산하여 경제적 생산 가능성을 확보하는 것이다. 이를 위해 천연 향료 및 향장 원료물질 제조 공정이 개발을 진행되는 동안 “**Process Chemistry**” 개념을 이용하여 시제품이 Laboratory 및 Pilot Plant 수준에서 제작되어 전문적인 기기분석 및 관능검사를 통해 향료 및 향장 원료물질로서의 생물활성을 측정 받게 되며, 상업적인 조합 향료 및 향장 제작을 통해 가치 (Flavor Quality) 및 경제성 (Economics)을 평가한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

불포화 지방산을 포함한 모든 지방산은 향료 및 향장 원료물질을 생산하는 가장 중요한 물질중의 하나로, IFF (International Flavors and Fragrances), Givaudan 및 Firmenich를 비롯한 세계적인 향료 회사를 중심으로 생물 전환법 (Biotransformation / Biocatalysis)를 이용한 지방산을 이용한 천연 향료 및 향장 원료물질 생산 공정 개발에 주력하고 있다. 지난 15년간 각 국제적 향료회사의 연구 노력으로 생물공학을 이용한 천연 향료 및 향장 원료물질의 생산 기술이 개발되어 부분적으로 상업화 되었지만, 대부분 자체 내 조합 향의 제작을 위한 공급에 제한되고 있다.

식물에서 분리된 Lipoxygenase and Hydroperoxide Lyase Aldehyde 및 Alcohol 생산



가. Lipoxygenase는 Soybean에서 65년 전에 처음 알려졌고, Non-heme Iron 효소로서 최근에 X-ray diffraction 방법에 의하여 3차원 구조가 결정되었다. Lipoxygenase는 불포화 지방산의 이중 결합에 반응하여 Hydroperoxy 지방산을 형성하는 효소로서, 콩, 감자, 오이 등 농작물과 다양한 미생물에 존재하며 농산물의 향기 성분 형성에 중요한 역할을 한다. 지방산의 이중 결합 위치에 따라 9-, 10- 또는 12-, 13-Hydroperoxy 지방산을 형성하게 되며 hydroperoxy 지방산은 Hydroperoxide Lyase에 의하여 지방산의 C-chain이 끊어져 다양한 Aldehyde와 그에 따른 Alcohol을 생산하게 된다.

나. 다양한 식물의 향기 성분 형성에 Lipoxygenase의 activity가 관계한다는 사실은 오래 전부터 잘 알려져 있었지만, 이 Enzyme의 식물체내에서의 정확한 대사 기작은 정확히 알려져 있지 않다. 다양한 식물에서 분리된 Lipoxygenase는 C9-, C10- 또는 C12-, C13- 위치에 입체 특이성 (S-Regio-/Stereo- specific activity)를 가지

고 있으나, Lipoxygenase의 생성량은 식물의 재배 장소에 따라 차이가 많이 난다.

- 다. Hydroperoxide Lyase는 엽록체 막에 부착되어있어 순수 분리 정제가 어려워 효소기작이 잘 알려져 있지 않다. Hydroperoxide Lyase는 C9- 또는 C-13 hydroperoxide 기질 특이성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다.
- 라. Hydroperoxide Lyase는 차 잎(Tea Leaves), Green Bell Pepper Fruits, 토마토 잎, 바나나 그리고 Guava 에 분리 정제 되어, 일부는 산업적 규모의 C6 Aldehyde (Green Note) 생산에 사용되고 있으나, Hydroperoxide Lyase를 분리 정제를 신선한 과일의 공급에 한계가 있다. 특히 계절적인 공급의 한계가 크다.
- 마. 최근에 Guava Fruit의 C-13 Hydroperoxide Lyase가 Clone되어 *E. coli*에서 활성을 지닌 제조합 단백질로 분리 정제 되어 실험실 수준의 C6 Aldehyde (Green Note) 생산에 이용되었으나 산업적 공정으로서 개발에는 한계가 있다.
- 바. Hydroperoxide Lyase를 안정화를 위해 Yeast Alcohol Dehydrogenase를 이용하여 독성이 강한 Aldehyde를 안정한 Alcohol를 변환시켜 Hydroperoxide Lyase의 안정화를 유도하였으나, 그 효과는 미비하며, 상대적으로 향 활성도가 떨어진 Alcohol을 생산함으로써 상품의 경제성이 낮아졌다.

미생물의 Hydroxylation과 제한적인 (limited) β -Oxidation 반응에 의한 Lactone 생산

- 가. 다양한 Lactone은 과일, 낙농향 (Dairy Flavor)의 중요한 성분으로, 천연 과일 향 음료수 생산에 중요한 역할을 한다. 과일에서 추출

된 천연 과일 향의 제한적인 공급으로 각 향료 회사를 중심으로 생물공학을 이용한 새로운 Lactone 생산 기술 개발에 적극적으로 진행되고 있다. 그 중 미생물을 이용한 천연 Lactone 생산 기술이 개발되어, Castor oil의 주성분인 Ricinoleic acid (12-Hydroxy-10-octenoic acid)를 *Candida sp.*을 이용하여 제한적인 α -Oxidation 통해 α -decalatone 생산 기술이 개발되어 상업화 되었다. β 하지만 천연 Hydroxy 지방산인 Ricinoleic acid를 이용한 Lactone 생산과 달리 Linoleic acid를 비롯한 불포화 지방산을 이용한 Lactone 생산에는 두 단계로 진행된다. 첫 번째는 불포화 지방산의 이중 결합에서의 Hydroxylation 이고, 두 번째는 Hydroxy 지방의 제한적인 α -Oxidation 반응을 이용하여 중간체인 4- 또는 5-Hydroxy 지방산을 생산하는 과정이다. 4- 또는 5-Hydroxy 지방산은 Lactonization β reaction을 거쳐 천연 α - 또는 β -Lactone으로 변화된다.

⋈

- 나. 천연 Lactone 생산은 Ricinoleic acid를 이용한 α -decalatone을 생산하는 기술로서 개발되었어도, 대사분해로 인한 유도체인 4-Hydroxy Decanoic acid의 분해로 인해 축적이 γ 안되며, Ricinoleic acid의 독성으로 인한 전환속도의 한계를 지니고 있어 좀더 효율적인 α -decalatone 생산 기술의 개발이 필요하다. 최근 **10-11 g/L의 α -Decalactone** 생산 기술이 향료업계를 중심으로 개발되었으나, 현재도 경제적인 산업용 생산 기술 개발을 요구하고 있다.

⋈

⋈

- 다. 천연 Hydroxy 지방산인 Ricinoleic acid와 달리 Linoleic acid를 포함한 불포화 지방산은 불포화 지방산의 Hydroxylation 반응이 필요하며, *Enterococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Acetobacterium sp.*, *Nocardia sp.*, *Lactobacillus sp.*, 그리고 *Flavobacterium sp.*, 에 의해 이루어지는 것으로 보고됐으며, Linoleic acid는 주로 Ricinoleic acid의 이성질체인 10-hydroxy-12-octadecenoic acid로

변환되는 것으로 알려져 있다. 그러나 미생물을 이용한 **Hydroxylation** 생산성 <2-3 g/L로 상업화하기에는 현저히 낮은 상태이다.

라. 미생물을 이용한 불포화 지방산의 낮은 Hydroxylation 반응의 생산성으로 인해 그에 따른 **-Dodecalactone**의 생산성은 <1 g/L의 낮은 상태로, Linoleic acid를 이용한 Lactone 생산 기술은 상업화 되지 않고 있다.

마. 미생물을 Hydroxylation 반응은 불포화 지방산의 이중결합과 반응하여 광활성(Optically active)한 다양한 중간체를 형성할 수 있으나 대부분 (+)10-Hydroxy 지방산을 생성하여, 다양한 Lactone을 생산하기위해 9-, 12-, 또는 13-Hydroxy 지방산을 비롯한 새로운 광학 이성질체를 생산할 수 있는 미생물의 동정이 필요하다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 Lipoxygenase 및 Hydroperoxide Lyase의 Characterization 과 Reaction condition의 최적화

1. 실험재료

가. 실험재료

LOX 효소 반응을 위한 기질은 Linoleic Acid(Sigma Chemical Co. U.S.A)를 구입하여 이용하였으며 표준 효소로는 Fluka에서 구입한 Lipoxidase (EC. 1. 13. 11. 12) 9.2U/mg을 이용하였다. 농산물 내의 Lipoxygenase (LOX) 활성 측정을 위해 국내외 보고된 내용을 근거로 가지, 감자, 고구마, 고추, 당근, 대두, 오이, 토마토, 피망, 호박 등을 시장에서 구입하되 신선한 재료만을 사용하였다. 또한 Hydroperoxide Lyase(HPOL) 활성 측정을 위해서는 꿀, 딸기, 바나나, 방울 토마토, 배, 사과, 오이, 참다래, 토마토, 피망 등을 시장에서 구입하여 사용하였으며 LOX와 마찬가지로 신선한 재료만을 사용하였다. 그 밖에 활성 측정이나 결과산물 분석을 위해서 1급 시약과 HPLC용 용매를 사용하였다.

2. 실험방법

가. Lipoxygenase (LOX) 활성 측정

실험은 Jean-Louis Bonnet등¹⁾의 방법을 응용하여 실험한다. 즉 기질은 10 μ l의 Linoleic Acid와 1ml의 0.1N NaOH, 5 μ l의 Ethanol을 4ml의 H₂O과 함께 잘 섞어 준 후 H₂O를 가해 25ml로 맞추어 이를 기질 용액으로 사용한다. 효소액은 깨끗

이 씻은 시료 100g(콩같이 수분이 적은 시료의 경우 5g)과 다양한 pH의 buffer(pH 5 : citrate buffer, pH 7 : phosphate buffer, pH 9 : borate buffer, 4°C)와 섞은 후 blender로 혼합하여 이를 cheese cloth에 통과한 후 걸러진 용액을 원심 분리(10,000 rpm, 10min, 4°C)한 후 상정액을 효소액으로 사용한다. 기질 용액 0.3ml을 buffer 2.7ml(pH 5,7,9)와 섞은 후 효소 추출액 10 μ l와 섞은 후 Spectrophotometer를 이용하여 Abs234에서 증가량을 30초 간격으로 10분간 측정한다.

나. LOX 반응에 의한 생성물 분석

LOX 생성물의 확인을 위해서는 Zecai Wu 등²⁾의 방법을 이용한다. 1.29mM의 Linoleic Acid가 섞인 0.2M의 buffer 50 ml에 효소액 3ml을 넣고 실온에서 15분간 O₂를 가한다. 반응이 끝나면 반응을 중단시키고 HCl로 pH 2까지 맞춘다. Diethyl ether로 두 번 추출한 후 Sodium sulfate에 통과하여 수분을 제거한다. 이 시료를 rotary evaporator를 이용하여 증발시키고 Hexane 3ml을 첨가하여 이를 HPLC용 용매로 사용한다. 분석 장비로는 Waters 600 pump와 waters 486 UV detector가 장착된 HPLC system을 사용하며 column은 ZORBAX SIL column을 사용하고, 이동상으로는 Hexane/2-Propanol/Acetic Acid(98:2:0.05, v/v/v)을 사용한다.

다. Hydroperoxide Lyase (HPOL) 활성 측정

기질은 LOX 활성 측정을 위해 만든 기질에 효소 활성이 높은 시료를 선정하여 Abs(234)의 증가를 통하여 HPODE가 생성되었음을 입증하고, 이 생성물을 HPOL 활성 측정을 위한 기질로 사용한다. 이 생성물 0.3ml과 buffer 2.7ml을 섞고 이를 기질로 사용한다. HPOL 조효소 추출을 위해 0.04mM의 dithiothritol과 0.02%의 Triton-X100(sigma)가 포함된 buffer(pH 6, 7, 8) 20ml과 sample 10g을 blender로 혼합 후에

cheese cloth를 통과 시키고 걸러진 용액을 원심분리 (10,000 rpm, 10분 4℃)하여 이를 효소액으로 사용한다. 위에 만들어 놓은 기질 용액에 효소 추출액 0.2ml을 섞어 Spectrophotometer를 사용해 Abs234에서 감소량을 측정한다.

3. 실험결과

가. Lipoxygenase (LOX) 활성 측정

Fluka에서 구입한 효소를 이용하여 LOX 활성을 측정한 결과는 Fig 4. 과 같다. Fluka Enzyme의 경우 콩에서 추출한 Enzyme으로 pH에서 활성을 가지며 다른 pH에서는 활성이 나타나지 않는다. 분말 형태의 효소(1mg/1ml)를 buffer(pH 9)에 녹여 처음엔 1 μ l를 가지고 실험하고 2 μ l, 0.5 μ l를 넣어 반응시킨 결과 Fig.1과 같은 graph를 얻었다. 각 반응의 직선 구간에 대한 식을 구하면 기울기가 1 μ l를 기준으로 각각 2, 0.5배 증가한다.

위의 실험을 바탕으로, Linoleic acid를 기질로 하여 LOX 활성을 측정할 수 있음을 확인하고, 이 직선 구간을 기준으로 하여, 여러 가지 시료를 구입하여 상대적인 LOX 활성을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 콩을 제외하고 대부분의 시료는 pH 7 부근에서 활성이 높게 나왔고 콩은 pH 9 부근에서 활성이 가장 높게 나왔다. 모든 시료에서 LOX 활성은 나타났지만, 가지와 감자는 pH 7부근에서, 콩은 pH 9에서 다른 시료들보다 LOX 활성이 높게 나왔다. 이는 Matoba 등이나, Axelord 등이 제시한 LOX의 iso형태인 LOX-I의 경우 pH 9, LOX-II인 경우 pH 6.5~7부근에서 활성이 가장 높다는 결론과 일치한다는 결론을 내릴 수 있었다. 단 토마토나 피망, 오이 등의 경우도 보고된 결과에 의하면 LOX 활성이 높다고 알려져 있지만 Spectrophotometer에서는 활성이 작게 나왔는데 이는 뒤에서 제시될 HPOL 활성을 동시에 가지고 있기 때문이라고 생각되며, 시료마다 수분의 함유량이 다르기 때문에 상대적인 활성의 크기가 다른 것으로 판단된다.

HPOL도 pH 7 부근에서 비슷한 활성을 가지고 있으며 이 효소가 반응할 때는 Abs가 감소하게 된다. 그러나 토마토와 피망, 오이의 경우에는 LOX와 HPOL의 두 효소반응이 동시에 일어나게 되므로 단순히 Abs만 가지고 활성의 높고 낮음을 판단할 수는 없다. 그러므로 생성물을 정량적으로 동정할 수 있는 분석법의 이용이 요구된다.

나. pH에 따른 LOX 활성 변화 측정

다른 시료들에 비해 상대적으로 활성이 높은 시료의 경우, 좀더 정확한 활성의 pH 의존도를 측정하기 위해 세분화된 pH범위에서 활성측정 실험을 실시하였다. Fig. 5, 6, 7를 보면 기존에 보고된 결과와 유사하게 감자는 pH 6~7, 가지는 pH 6~8의 좀더 넓은 활성범위를 가지고 있었으며, 콩의 경우는 pH9에서 가장 활성이 가장 높은 것으로 측정되었다(Fig. 8).

다. 콩에서 추출한 LOX의 기질에 대한 작용 특성

지금까지 알려진 LOX 활성의 경우 보고된 결과를 조사해보면 LOX 효소반응 중 반응 초기단계에서 나타나는 lag period의 존재에 대해 많이 다루지 않았는데 UV absorbance의 변화를 측정할 결과 반응 초반에는 속도가 서서히 증가하였다가, 반응시작 2분 후 속도가 상승하다가 속도가 점진적으로 감소하는 현상이 나타난다. 이는 William 등이 제시한 내용과 일치함을 보였고, 향후 보다 정확한 LOX enzyme kinetics를 측정하는 데 도움이 될 것으로 판단된다.

라. HPLC를 이용한 LOX 작용 결과생성물 확인

LOX의 탐색 단계에서 이용된 UV 흡광도의 증가의 측정만으로는 궁극적인 효소작용에 의한 결과산물의 생성을 확인하는 것이 불가능하다. 특히 LOX의 경우 효소의 이성체의 존재로 조효소액의 추출대상인 된 농산물의 종류에 따라 생성물의 비율이

달라질 것으로 예상되며, 실제로 목적하는 결과산물을 생성하는지의 여부와 pH 변화에 따른 생성물간의 비율이 달라지는지에 대한 검증이 필요하다. 이를 위하여 HPLC분석법을 이용하였고, 해당 표준시료를 내부표준물질로 사용, 비교하여 확인하였다. 표준시료는 Cayman Chemical(city, USA)에서 구입한 13-HPODE (13-hydroperoxy-octadeca-9,11-dienoic acid)와 9-HPODE (9-hydroperoxy-octadeca-10,12-dienoic acid) 를 이용하였다. Fig 9.에서와 같이 13-HPODE가 먼저 컬럼을 통해 분리되어 검출되었으며 다음으로 9-HPODE가 컬럼을 통해 분리 되었다. 각각의 피크머무름시간(retention time)은 21, 27분이었다.

위와 같은 표준시료의 검출결과를 바탕으로 Soybean에서 추출한 Lipoxxygenase(LOX)와 Fluka에서 구입한 LOX를 이용하여 효소반응시킨 결과산물의 동정을 Fig. 7과 8에서와 같이 비교 분석하였다.

Fig. 10에서 보는 것과 같이 Fluka에서 구입한 LOX를 이용한 실험에서는 13-HPODE가 생성됨을 확인 할 수 있었다. 이는 Fluka에서 구입한 효소가 soybean에서 추출한 효소이며 soybean은 LOX-I 활성이 높기 때문에 13-HPODE가 생성되기 때문이며, Fig. 11에서 보면 soybean 시료에서 효소를 추출하여 반응시킨 결과도 위와 동일한 위치에서 검출됨을 확인할 수 있었다. 이로써 Fluka에서 구입한 효소와 soybean에서 직접 추출한 효소가 LOX-I의 형태로 같은 이성체 효소인 것으로 추정할 수 있는 판단근거가 된다. 또한 본 실험결과는 LOX-I의 활성이 pH 9 부근에서 가장 높다는 결과를 재확인 시켜주었다. 다음단계로 LOX-I과는 다른 pH에서 활성이 나타나는 효소에 대해 분석을 실시하였다. Fig. 6, 7에서 제시한 결과와 같이 활성이 높게 나타나는 가지와 감자를 이용해서 감자는 pH 6과 pH 7, 가지는 pH 6, 7, 8에서 동일한 방법으로 실험을 실시한 결과 효소작용에 의해 확인된 생성물은 다음의 크로마토그램에서 검출된 바와 같다 (Fig. 12, 13, 14, 15, 16).

마. HPOL 활성 측정

HPOL 활성 측정은 Hydroperoxide group이 있는 위치에서 HPOL의 작용에 의해 결합이 분해되면서 UV absorbance가 감소하는 직선 구간을 측정하도록 했다. HPOL의 기질에 대한 특이성 및 Isozyme의 존재여부는 위의 LOX HPLC data을 바탕으로 13-HPODE는 대두, 9-HPODE는 감자 추출액의 Linoleic acid에 대한 반응을 이용하여 간접적인 추정이 가능하다. 각 기질에 대한 반응실험 결과 13-HPODE는 Table 2에 예시된 바와 같이 모든 10종의 농산물로부터 추출된 조효소액와 반응시 흡광도의 감소가 나타났지만, 9-HPODE를 기질로 하였을 때는 바나나와 피망의 조효소액으로부터 상대적으로 낮은 활성이 pH6에서 나타난 것을 제외하고는 다른 농산물에서는 활성이 검출되지 않았다 (Table 3). 이는 본 연구에서 이용된 농산물 시료내에 존재하는 HPOL가 13-HPODE만을 선택적으로 분해하는 효소임을 나타내는 결과이며, 아울러 9-HPODE를 기질로 하는 9-Hydroperoxide Lyase가 존재하지 않거나 활성이 매우 낮기 때문이라 생각된다.

4. 결론

농산물의 9-lipoxygenase (LOX)는 linoleic acid를 9-hydroperoxy-octadecadienoic acid (HPODE)로 전환되는 dioxygenation을 촉진시키는 효소이며, 9-hydroperoxy-octadecadienoic acid (HPODE)는 Hydroperoxide Lyase(HPL)에 의해서 고부가의 천연 식물향인 cis-3-nonenal로 전환된다. 따라서 농산물 내의 9-LOX 활성 측정을 위해 국내외 보고된 내용을 근거로 가지, 감자, 고구마, 고추, 당근, 대두, 오이, 토마토, 피망, 호박 등을 시장에서 구입하여 분쇄한 후, 조효소액으로

사용하였다. pH 5-9 사이에서 최적 pH를 Spectrophotometer를 이용하여 Abs234에서 증가량을 측정하여 최적 pH를 측정하였다. 실험한 농산물 중에서는 대두, 감자, 가지의 효소액이 가장 높은 LOX 효소 활성을 보였다. LOX family에는 몇 가지 isomers가 존재하며, 식물의 LOXs는 HPODE의 두 개의 서로 다른 dioxygenation site에 작용한다고 알려져 있다. 가지와 감자의 효소액에 의한 반응에서는 9-HPODE가 주요 생성물이고, 대두의 경우는 13-HPODE가 주요 생성물로 나타났다. 따라서 감자와 가지의 LOXs 가 9-HPODE를 생산하는데 중요한 농산물임을 알 수 있었다.

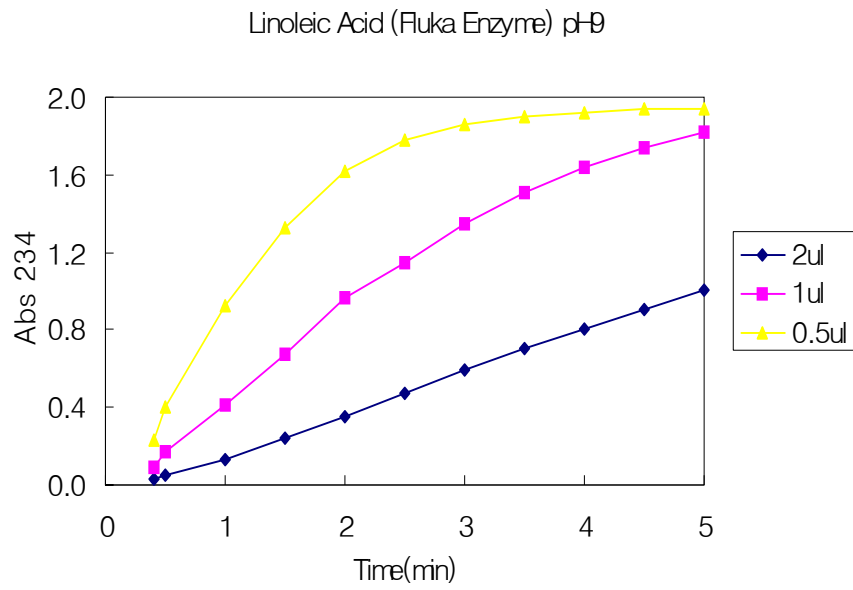
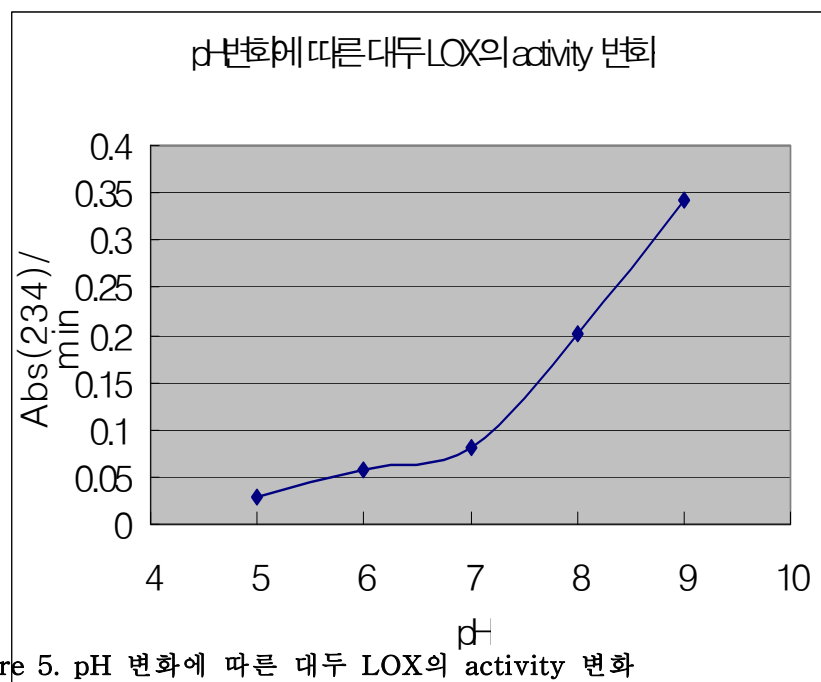


Figure 4. 효소 농도에 따른 Lipoxygenase (Fluka) Activity

Table 1. Linoleic acid를 기질로 한 Lipoxygenase 변화량 측정

Sample	pH		
	5	7	9
가지	0.0137	0.1833*	활성 ×
감자	0.0099	0.1333*	활성 ×
고구마	0.001	0.001	활성 ×
고추	0.0057	0.0107	활성 ×
당근	0.0019	0.0015	활성 ×
대두	0.0172	0.0806	0.0851*
오이	0.0016	0.0088	활성 ×
토마토	활성 ×	0.0086	활성 ×
피망	활성 ×	0.0047	활성 ×
호박	0.0021	0.0056	활성 ×



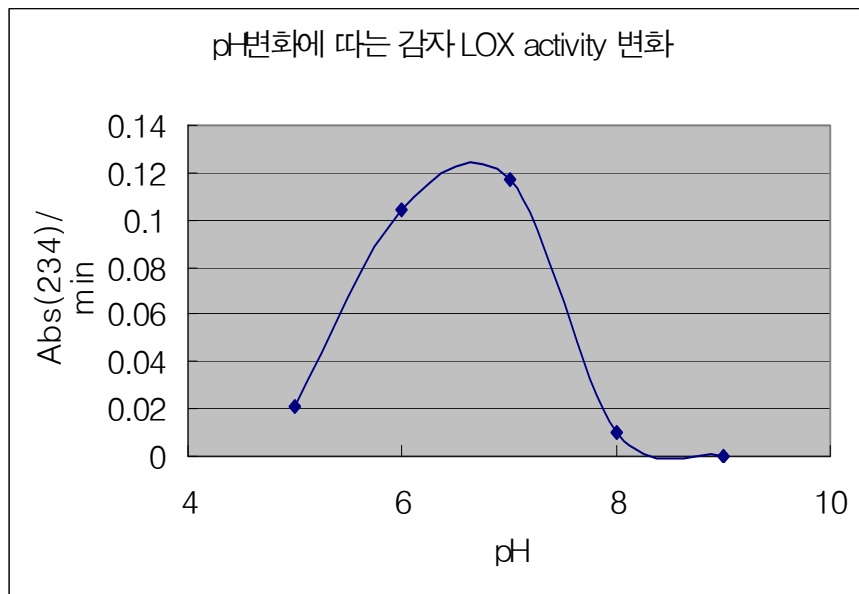
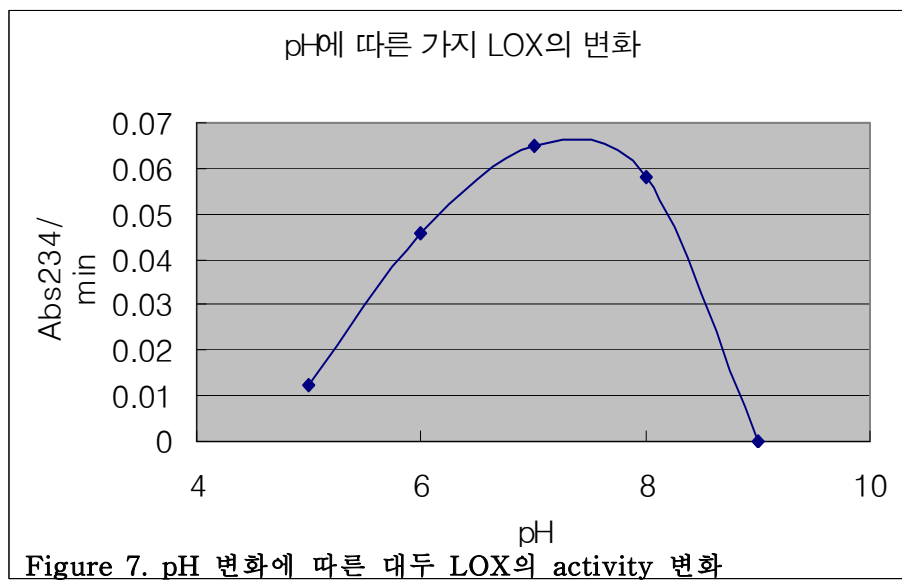


Figure 6. pH 변화에 따른 대두 LOX의 activity 변화



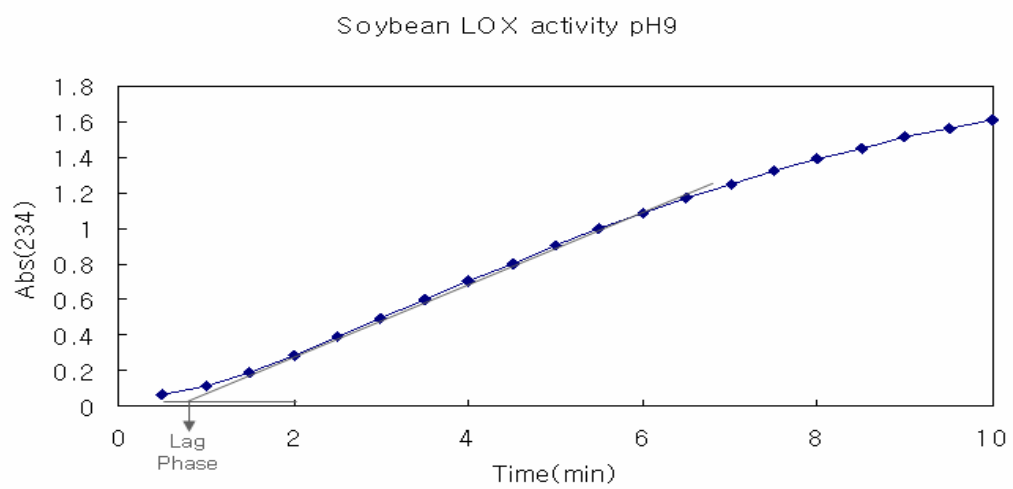


Figure 8. Soybean LOX activity (pH9)

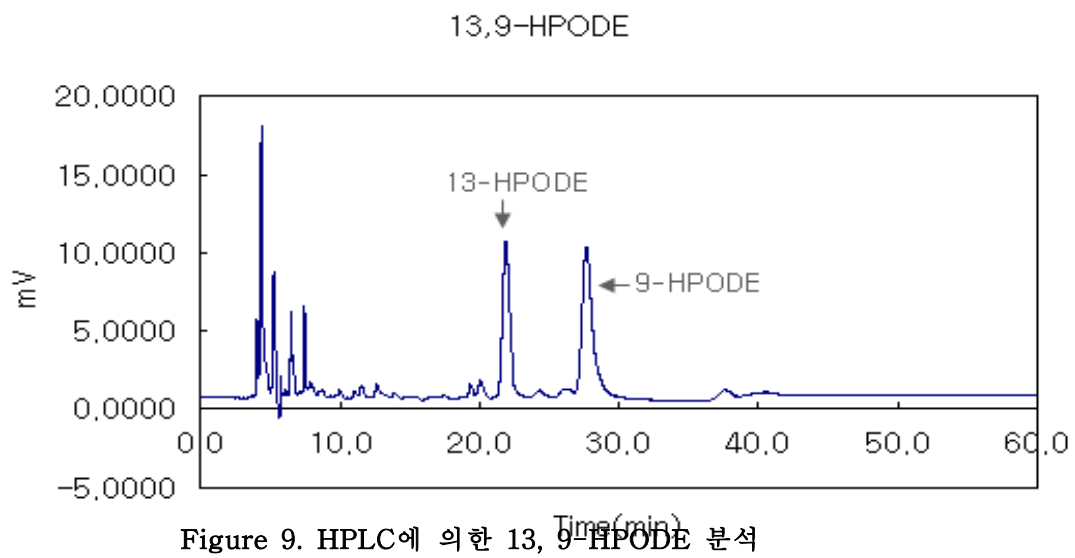


Figure 9. HPLC에 의한 13, 9-HPODE 분석

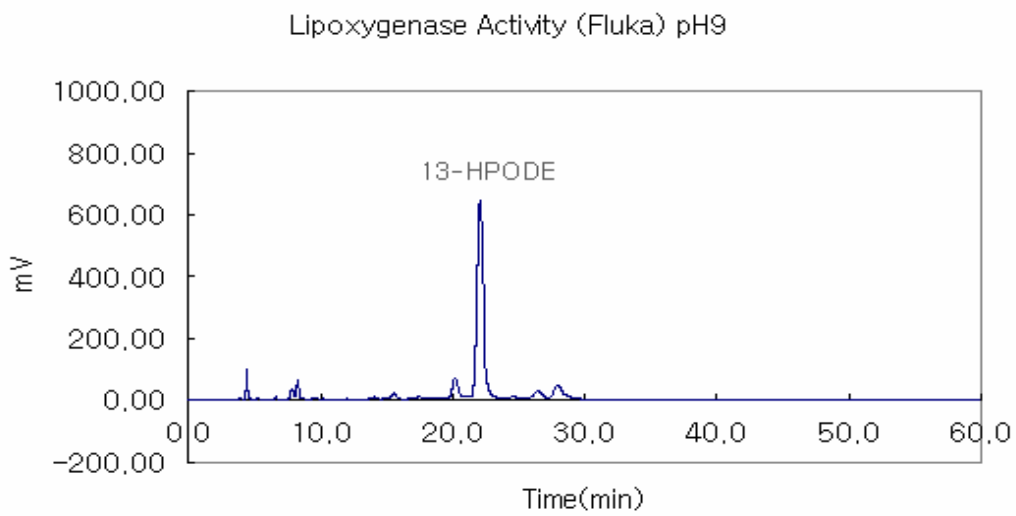
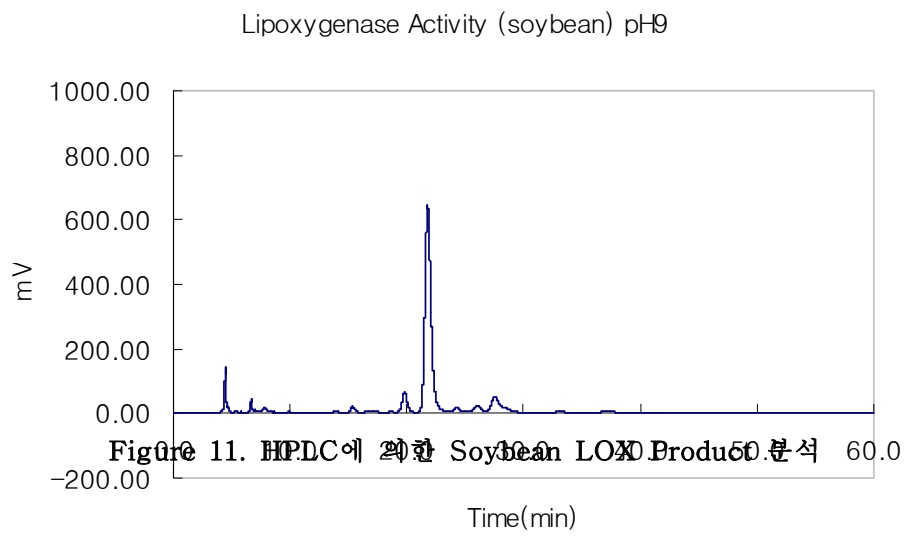


Figure 10. HPLC에 의한 Fluka LOX Product



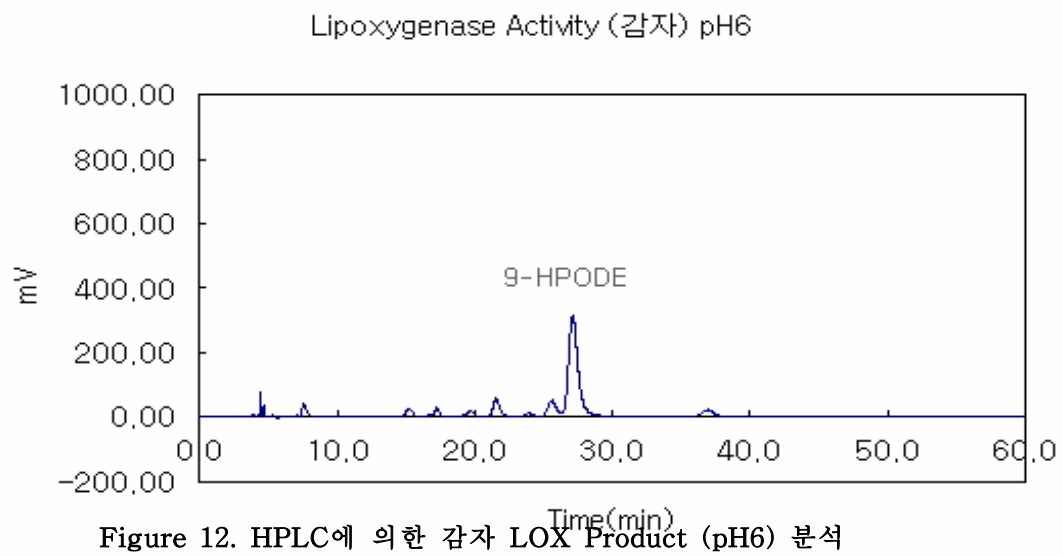


Figure 12. HPLC에 의한 감자 LOX Product (pH6) 분석

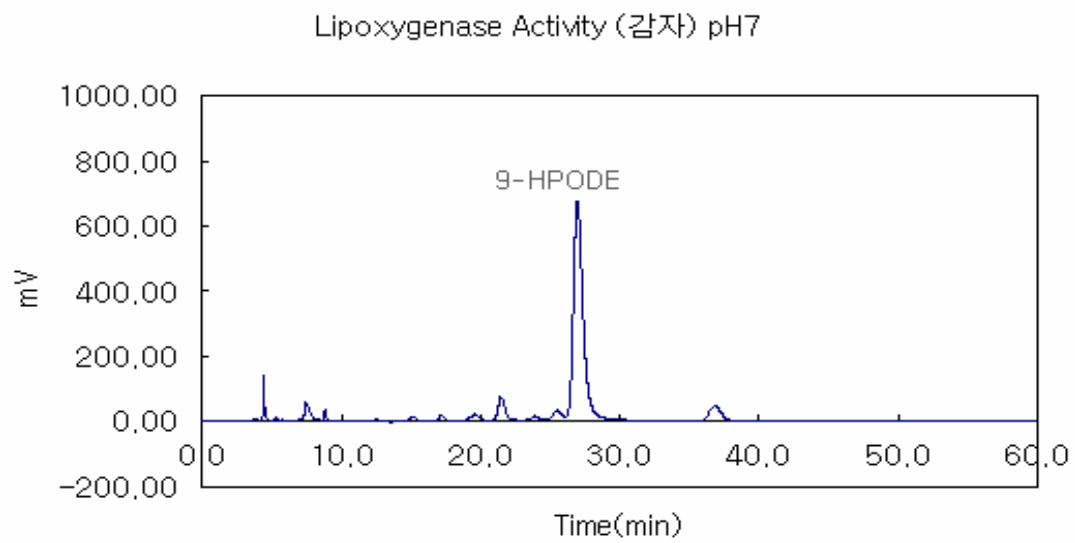


Figure 13. HPLC에 의한 감자 LOX Product (pH7)

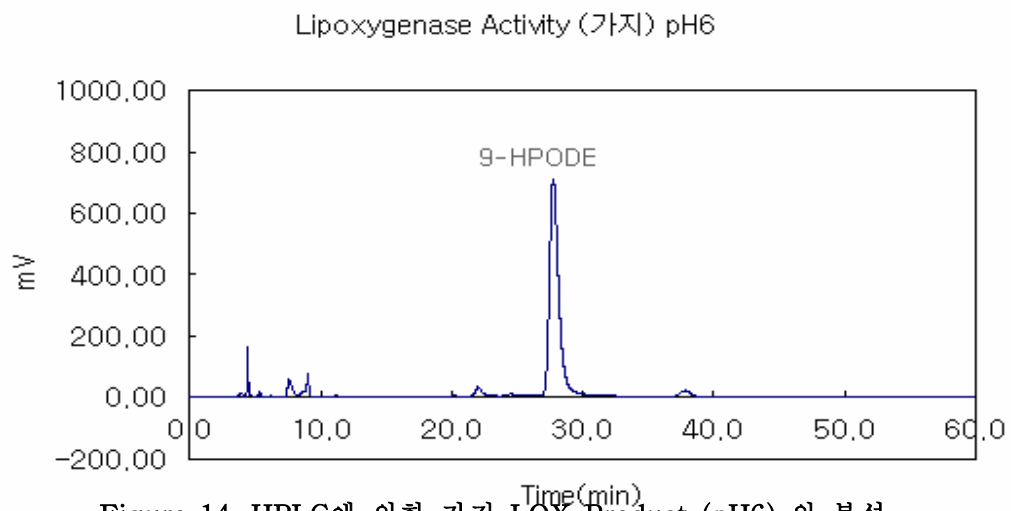


Figure 14. HPLC에 의한 가지 LOX Product (pH6) 의 분석

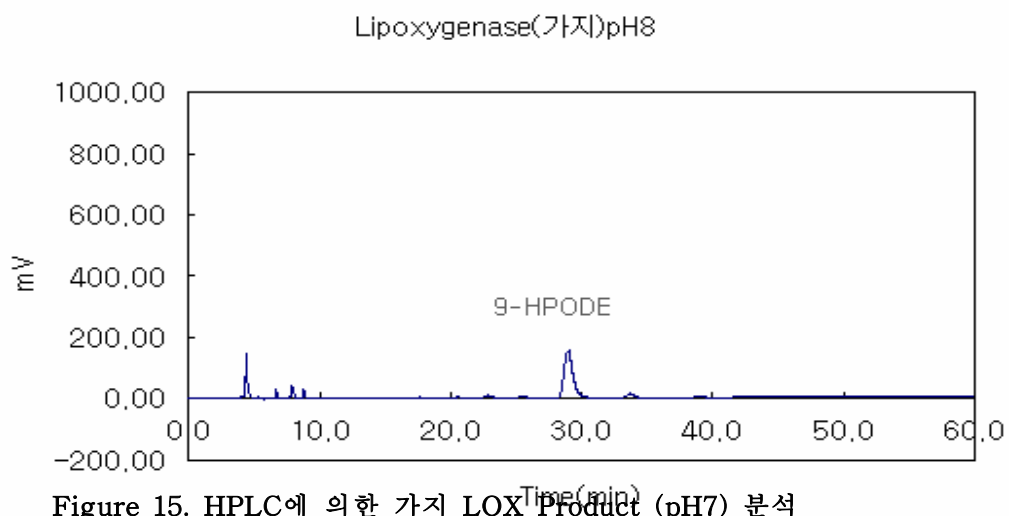


Figure 15. HPLC에 의한 가지 LOX Product (pH7) 분석

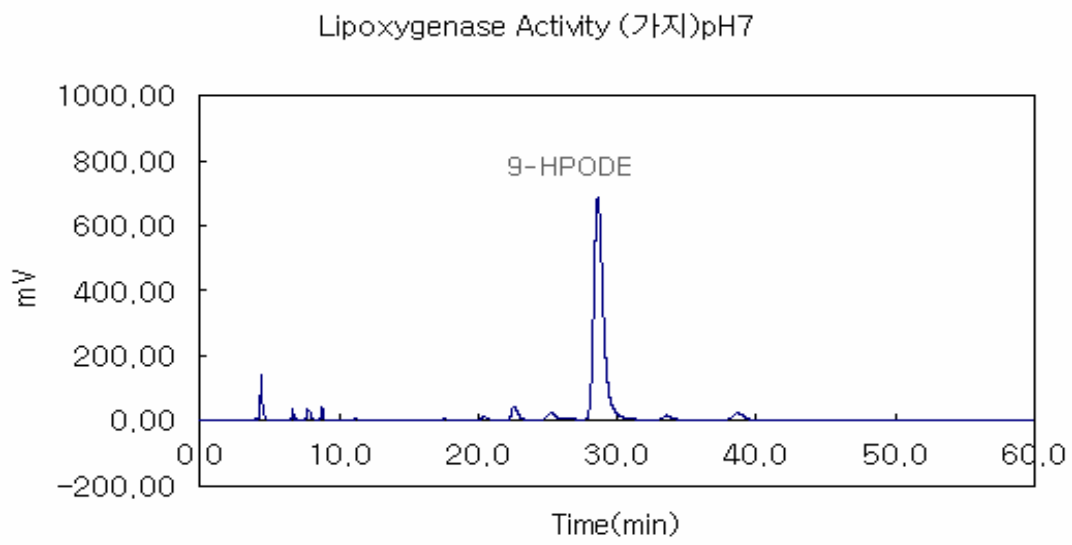


Figure 16. HPLC에 의한 가지 LOX Product (pH8) 분석

Table 2. 13-HPODE를 기질로 한 HPOL 활성측정 (Abs/min)

Sample	pH		
	6	7	8
귤	0.0137	0.0153	0.0134
딸기	0.0148	0.0065	0.0045
바나나	0.0386	0.0366	0.0146
방울 토마토	0.0139	0.008	0.0017
배	0.0057	0.0027	0.0009
사과	0.0111	0.0054	0.0025
오이	0.042	0.0456	0.0192
키위	0.0488	0.044	0.037
토마토	0.0188	0.0042	0.0022
피망	0.0478	0.0035	0.0187

Table 3. 9-HPODE를 기질로 한 HPOL 활성측정 (Abs/min)

Sample	pH			Δ
	6	7	8	
바나나	0.0033	활성 ×	활성 ×	
괴방	0.0037	활성 ×	활성 ×	

제 2절 Hydroxylation 및 제한적 β -Oxidation을 위한 미생물의 생리학적 특성 연구

1. 실험재료

가. 사용균주 및 배지

Sludge로부터 Linoleic acid를 hydroxy 지방산으로 전환할 수 있는 균체를 선별했다. 하나의 colony를 3 ml Nutrient broth(contained 5 g/l of gelatin peptone, 3 g/l of beef extract)에 접종하여 28°C에서 12시간 seed 배양했다. 이 배양액은 production medium (consisted of 0.2 g/l of glucose, 5 g/l of yeast extract, 4 g/l of potassium phosphate monobasic, 0.5 g/l magnesium sulfate heptahydrate, 0.2 ml/l of Tween 80, and 1.2 g/l of linoleic acid (purity>99%))로 transfer하여 28°C에서 교반하여 Glucose가 모두 고갈 될 때(약 18시간)까지 배양하였다. 그 후에 hydroxy 지방산을 생산하는 효소의 활성을 높이기 위해서 (induction: 또는 유도하기 위하여), 고무마개로 플라스크의 주입구를 밀봉하여 혐기적인 조건에서 3시간동안 배양한다. induction된 균체는 4°C에서 10분 동안 1,000×g로 원심 분리하여 회수하였다. 그 후 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)로 두 번의 washing한 후 hydroxy 지방산의 생산을 위하여 균체를 농축시켰다. 선별한 균은 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid 생산에 높은 수율을 보였다.

나. Identification of microorganism

균체의 지방산분석과 API kit 20E를 이용하여 균체의 속을 확인하였고, 균체의 DNA를 추출한 후 16S rRNA full sequencing (1,415 bp) 을 통하여 sequence database에서 분리한 균의 sequencing을 결정하고 가장 높은 유사성을 보이는 균을 GenBank or Ribosomal Database Project (RDP)의 libraries로부

터 균체를 동정하였다. Nucleotide sequence는 PHYDIT 프로그램을 통하여 유사성을 계산하였고, MegAlign software를 사용하여 Pairwise evolutionary distance와 계통학적 트리를 만들었다.

2. 실험방법

가. Substrate specificity

동정한 균체의 기질특이성은 다양한 종류의 불포화 지방산을 사용하여 조사하였다. 반응은 20 g/l의 균체와 각각의 20 mM의 불포화 지방산을 0.2 ml/l의 Tween 80이 함유되어 있는 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)에서 2시간동안 수행했다. 각각의 불포화 지방산의 녹는점에 의하여 Myristoleic acid, Palmitoleic acid, Petroselinic acid, Oleic acid, Linoleic acid, Linolenic acid, γ -Linolenic acid, 그리고 Arachidonic acid는 30°C에서 반응이 이루어진 반면, Vaccenic acid, Erucic acid, Elaidic acid는 47°C에서 반응을 실행했다. 각각의 불포화 지방산의 전환률은 기질의 감소량으로 정량하였고, 그 값들은 Linoleic acid의 감소에 대하여 상대적으로 나타냈다.

나. Reaction optimization

1) pH and temperature effects

10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid 생산에 있어서 pH의 효과를 알아보기 위해 15 ml Falcon에서 10 ml의 volume으로 pH 6.0~pH 8.0의 범위에서 250 rpm으로 수행했다. 이 반응은 10 g/l washed cell, 10 g/l Linoleic acid, 그리고 0.2 ml/l Tween 80으로 포함하고 각각의 pH 조건에서 이루어졌다. pH 6.0에서 pH 7.0의 범위에서는 50 mM potassium phosphate buffer를 사용하였고, pH 7.0에서 pH 8.0의 범위는 50 mM Tris-HCl buffer를 사용하였다. 각각의 반응의 production을 보기 위하여 30°C

에서 60분 동안 이루어졌다.

10-hydroxy-12(*Z*)-octadecenoic acid의 최대 생산 온도를 알아보기 위하여 20℃에서 40℃의 온도 범위 내에서 실험하였다. 이 반응은 10 g/l cell, 10 g/l Linoleic acid, 0.2 ml/l Tween 80을 함유한 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)에서 60분 동안 250 rpm으로 각각의 온도로 이루어졌다.

2) Cell and substrate concentration effects

Stenotrophomonas nitritireducens 균체의 농도가 미치는 효과를 알아보기 위하여, 10 g/l Linoleic acid, 0.2 ml/l Tween 80이 포함된 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)하고 균체의 농도를 10 g/l부터 40 g/l의 범위에서 반응을 시켰다. 반응은 앞에서 언급했듯이 10 ml의 volume으로 250 rpm으로 이루어졌다. 이 때 반응 온도는 30℃로 하고 반응시간은 1시간으로 조정하였다. Linoleic acid의 농도에 따른 생산량을 알아보기 위하여, 반응은 Linoleic acid의 농도 5 g/l에서 40 g/l까지의 범위에서 20 g/l 균체, 0.2 ml/l Tween 80이 포함된 50 mM Tris-HCl buffer에서 각각 1시간 동안 수행했다.

다. Bioconversion in a bioreactor

최적의 조건 하에서 보다 반응용량을 크게 하여 250 ml의 용량의 Bioreactor (Fig. 17)을 제작해 10-hydroxy-12(*Z*)-octadecenoic acid의 생산을 하였다. 균체의 농도와 기질의 농도는 최적의 농도를 사용하여 20 g/l의 균체와 20 g/l의 기질 (Linoleic acid)을 0.2 ml/l의 Tween 80이 녹아있는 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)에서 30℃의 온도 조건하에서 3시간 동안 200 rpm로 교반하여 반응하였다. 혐기적인 조건에서 반응이 이루어지기 때문에 Bioreactor의 space의 air는 95%의 N₂와 5%의 CO₂로 구성된 혼합가스로 치환되었다.

라. Preparation of fatty acid

반응은 50% H₂SO₄로 pH 2.0로 낮추어 반응을 종결시킨 후, 동일 양의 ethyl acetate를 첨가하여 두 번 추출한다. 그 추출액은 evaporator에 의하여 농축시켜서 회수한다. 회수한 지방산은 14%의 BF₃/MeOH을 첨가하여 100℃에서 5분 동안 Methylation 시켰다. Methylation된 지방산은 GC 분석을 위하여 n-hexane에 의하여 다시 추출했다.

마. Analysis of products

Substrate specificity 실험에서 product는 silica gel 60 F254 TLC plate를 사용하여 실온에서 확인했다. Silica gel plate에 reaction 물질을 1 μl 점적했고 toluene/dioxane/acetic acid(97:14:7,v/v/v)의 혼합용액을 전개용매로 사용하였다. 전개용매에 의하여 분리된 plate를 건조시킨 후 methane/H₂SO₄/N-1-naphtylethylenediamine dihydrochloride (95:5:0.3, v/v/w)의 발색시약을 이용하여서 발색했다.

Methyl ester형태로 전환된 지방산은 GC (Agilent 6890N)를 이용하여 분석했다. Detector로는 Flame ionization detector를 사용하였고, split injection system을 사용했다. column은 SPB-1 capillary column (15 m×0.32 mm, 0.25 μm thickness)를 사용했다. column의 온도는 150℃에서 210℃까지 4℃/min으로 올린 후 210℃로 유지시켰다. Injector와 detector의 온도는 각각 260℃와 250℃를 사용하였다. 정량적인 분석을 위해서는 internal standard로서 palmitic acid를 사용하였다.

Product의 화학적인 구조는 GC-MS를 이용하여 확인하였다. Electron impact mass spectra는 Agilent 6890N G.C와 Agilent 5973N mass spectrometer를 구성되었다. GC-MS는 230℃의 ion source temperature로 70 eV의 electron impact로 작동시켰다. 다른 조건들은 앞에서 설명한 G.C의 조건과 동일하게 수행했다.

바. Purification of 10-hydroxy-12(*Z*)-octadecenoic acid

Linoleic acid로부터 전환시킨 10-hydroxy-12(*Z*)-octadecenoic acid를 ω -oxidation 반응의 기질로 사용하기 위하여 Florisil resin이 충전^β되어 있는 Sep-Pak Florisil column을 사용하였다. Sample (Hydroxylation 반응 물질)을 column에 loading 하기 전에 100 ml의 hexane/diethyl ether (95:5, v/v)을 흘려주어 column을 씻어주고 resin을 activation 시켰다. 그 후 Sample을 loading 하고 hexane/diethyl ether (95:5, v/v) 100 ml을 흘려주어 non-hydroxy 지방산을 분리해내고 ethyl acetate를 100 ml로 hydroxy 지방산을 elution했다. ethyl acetate로 elution한 fraction은 농축한 후 높은 순도를 얻기 위해 다시 한번 florisil column으로 정제된 후 위의 과정을 반복 걸쳐서 G.C로 순도를 확인하였고 높은 순도의 10-hydroxy-12(*Z*)-octadecenoic acid를 얻었다.

사. Cell cultivation

ω -oxidation 반응을 하는 *Candida tropicalis*의 colony를 3 ml YM broth(contained 3 g/l yeast extract, 3 g/l malt extract, 5 g/l peptone, 10 g/l dextrose)에 접종하여 28°C에서 12시간 seed 배양했다. 이 배양액은 production medium (consisted of 15 g/l of glucose, 2.5 g/l ammonium chloride, 0.1 g/l yeast extract, 2.1 g/l potassium phosphate monobasic, 4.51 g/l potassium phosphate dibasic, 0.2 g/l magnesium sulfate, 0.1 g/l sodium chloride, 9.14 mg/l iron (II) sulfate heptahydrate, 0.5 mg/l zinc chloride, 1.56 mg/l copper sulfate)으로 transfer하여 28°C에서 140 rpm으로 교반이 잘되게 하여 18시간 동안 배양하였다. 18시간 동안 배양된 균체는 4°C에서 10분 동안 1,000×g로 회수하였다. 그 후 0.85% NaCl로 두 번의 washing한 후 균체를 농축시켰다.

3. 실험결과

가. 분리 균의 동정

하수에서 분리한 균을 동정하기 위하여 API 분석, 세포막의 지방산분석 및 16S rRNA full sequencing을 수행하였다. 분리한 균의 API 20NE 분석 결과는 Table 4과 같다. 구체적으로 Citrate를 제외한 Glucose, Arabinose, Mannose, Mannitol, N-acetyl-glucosamine, Maltose, Gluconate, Caprate, Adipate, Malate 및 Phenylactate의 이용성은 기존의 *Stenotrophomonas* 속의 균주와 높은 유사성을 보였다. 분리된 균주에서 세포막의 지방산을 분석하고 그 결과를 Table 5에 나타냈다. 구체적으로 G.C로 분석한 결과, *Stenotrophomonas* 속 균주의 특징으로 알려진 지방산 11:0 iso, 11:0 iso 3OH alc 13:0 iso 3OH 성분이 분리균주의 지방산 구성에 포함되어 있었다.

분리된 균주의 16S rRNA full sequencing 결과, 분리한 균주는 *Stenotrophomonas nitritireducens*와 98.94%의 가장 높은 similarity 보였다 (Table 6). 16S rRNA full sequencing을 기반으로 phylogenetic tree를 작성한 결과 Fig. 18와 같았다. 분리된 균주와 *S. nitritireducens*는 94.1%로의 확률로 같은 branch에 속하였다. 균주를 확실하게 구분하는 특징은 nitrite의 환원 유무인데 *S. nitritireducens*는 nitrite를 환원할 수 있는데 비하여 *S. acidaminiphilia*는 nitrite를 환원할 수 없다. 분리한 균은 nitrite를 환원할 수 있다. 16S rRNA full sequencing, phylogenetic tree 및 nitrite를 환원평가의 결과 분리한 균주는 *Stenotrophomonas* 속의 *S. nitritireducens*로 동정되었다.

나. *Stenotrophomonas nitritireducens*가 생산하는 지방산 동정

*Stenotrophomonas nitritireducens*가 생산하는 지방산을 GC-MS를 이용하여 동정한 결과 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid로 규명되었다 (Fig. 19)

다. 10-Hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid 생산 조건 최적화

pH가 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid 생산에 미치는 영향을 30℃에서 살펴본 결과 (Fig. 20) pH 7.5에서 최대 생산을 나타냈다. 또한, 온도가 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid 생산에 미치는 영향을 pH 7.5에서 살펴본 결과 (Fig. 21) 30℃에서 최대 생산을 나타냈다.

10-Hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid 생산을 위한 최적 균체농도를 조사하기 위하여 *S. nitritireducens*의 균체 농도를 10에서 40 g/l로 변화시켰다 (Fig. 22). 균체농도가 증가 할수록 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid 생산이 증가하였으나 균체농도 20 g/l 보다 높은 농도에서는 균체 농도가 증가할수록 감소하였다. 최대 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid 생산을 위한 기질농도를 결정하기 위해서 linoleic acid 농도를 5에서 40 g/l로 변화시켜 실험을 수행하였다 (Fig. 23). 그 결과 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid 생산을 위한 최적 농도는 20 g/l이었다.

라. 생물반응기에서 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid의 생산

생물반응기에서는 tube보다 혐기적인 상태와 혼합이 더 잘 일어나기 때문에 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid 생산을 생물반응기에서 수행하였다. linoleic acid 농도를 변화시켰을 때 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid의 최대 생산은 linoleic acid 농도 20 g/l가 최적이었다(Fig. 24). 최적 조건에서 15 g/l의 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid가 2시간 후에 생성되었으며 (Fig. 25) 이것은 생산성 177 g/l-d (=7.5 g/l-h)에 해당된 결과이다.

여러 미생물들의 불포화 지방산으로부터 고농도 hydroxy fatty acids 생산을 Table 7에 요약하였다. 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 경우이다. *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 높았다. 지금까지 가장 높은 수율의 10-hydroxy-12(*Z*)-octadecenoic acid 생산은 2 g/l linoleic acid로 부터 *Lactobacillus paracasei* 91% 수율을 보였지만 같은 조건에서 *S. nitritireducens* 는 96% 의 수율을 나타내었다.

마. *S. nitritireducens*의 불포화 지방산에 대한 기질특이성

*S. nitritireducens*의 불포화 지방산에 대한 기질특이성을 살펴보았다. TLC, GC 및 GC-MS를 사용하여 생물전환의 생성물 조사하였고 lineoleic acid에 대한 상대 활성을 조사하였다 (Fig. 26, Fig. 27, Table 8). *S. nitritireducens*는 C16과 C18의 cis-9 불포화 지방산에 대하여 독특한 regio-와 stereospecificity를 지녔다. 활성 순서는 linoleic acid > linolenic acid > -linolenic acid > oleic acid > palmitoleic acid 이었고, 부산물 없이 각각 10-hydroxy fatty acid 10-hydroxy-12(*Z*)-octadecenoic acid, 10-hydroxy-12,15(*Z,Z*)-octodecadienoic acid, ^Y10-hydroxy-6,12(*Z,Z*)-octodecadienoic acid, and 10-hydroxypalmitic acid로 전환되었다.

바. The pH of production 6-dodecen-4-olide by *Candida tropicalis*

-oxidation 반응에 있어서 pH의 효과를 알아보기 위해 pH 6.0~pH 8.0의 범위 내에서 30°C, 250 rpm으로 수행했다. 이 반응은 10 g/l washed cell, 10 g/l 10-hydroxy-12(*Z*)-octadecenoic acid를 포함하는 각각의 pH 조건에서 ^β 60분 동안 이루어졌다. pH 6.0에서 pH 7.0의 범위에

서는 50 mM potassium phosphate buffer를 사용하였고, pH 7.0에서 pH 8.0의 범위는 50 mM Tris-HCl buffer를 사용하였다. 정제과정을 통하여 높은 순도의 10-hydroxy-12(*Z*)-octadecenoic acid를 얻었다 (Fig. 28). Hexane/diethyl ether 용액으로 non-hydroxy 지방산을 elution할 때 loss 발생하였지만 약 30%의 수율로 순도100%의 10-hydroxy-12(*Z*)-octadecenoic acid를 얻었다 (Table 9). 현재 *Candida tropicalis* 균주를 이용하여 10-hydroxy-12(*Z*)-octadecenoic acid로부터 천연 tuberose lactone 향료인 (*Z*)-6-dodecen-4-olide를 생산하는 연구를 수행하고 있다.

4. 결론

본 연구는 *S. nitritireducens*를 사용하여 linoleic acid로부터 10-hydroxy-12(*Z*)-octadecenoic acid의 regio-and stereospecific 생산을 처음 수행하였다. *S. nitritireducens* system은 다른 미생물을 사용한 경우와 비교하여 몇 가지 차별되는 우수성을 지녔다.

(i) Linoleic acid 전환 미생물 중에 유일하게 regio-and stereospecific 하게 10-hydroxy-12(*Z*)-octadecenoic acid를 생산하였다.

(ii) 이 system은 regio-와 stereospecificity 때문에 by-products없이 10-hydroxy-12(*Z*)-octadecenoic acid만 생산하였다.

(iii) 천연향료 물질인 10-hydroxy-12(*Z*)-octadecenoic acid의 첫 산업적 수준(고농도)의 생산이었다.

(iv) 문헌보고 최고 수준의 10-hydroxy-12(*Z*)-octadecenoic acid의 생산이었다. 기존에 알려진 가장 좋은 생산균인 *Flavobacterium* sp. NRRL B-14859의 10-hydroxy-12(*Z*)-octadecenoic acid의

농도 및 생산성에 각각 5배와 89배의 높은 수준을 얻었다.

(v) *Stenotrophomonas* 속에서 처음으로 hydroxy fatty acid의 생산 보고이고, linoleic acid 전환 미생물로 *S. nitritireducens* 를 동정하였다.

그러므로 본 과제를 통하여 *S. nitritireducens*에 의한 10-hydroxy-12(*Z*)-octadecenoic acid 생산의 성공적인 최적화로 산업화의 가능성이 높아졌다.



Figure 17. Bioreactor

Table 4. 분리한 균의 API 20NE 분석 결과

	분석 종류	API 20E
1	Reduction of nitrates to nitrites	-
2	Indole production	-
3	Glucose acidification	-
4	Arginine dihydrolase	-
5	Urease	-
6	Esculin hydrolysis (β -glucosidase)	+
7	Gelatine hydrolysis(protease)	+
8	β -Glucosidase	+
9	Glucose assimilation	+
10	Arabinose assimilation	-
11	Mannose assimilation	+
12	Mannitol assimilation	-
13	N-acetyl-glucosamine assimilation	+
14	Maltose assimilation	+
15	Gluconate assimilation	-
16	Caprate assimilation	-
17	Adipate assimilation	-
18	Malate assimilation	-
19	Citrate assimilation	+
20	Phenyl-acetate assimilation	-
21	Cytochrome oxidase	-

Table 5. 분리한 균주의 세포막 지방산 분석 결과

Rt	Area	Ar/Ht	Respon	ECL	명칭
2.815	1333	0.023	1.110	9.605	10 : 0 ISO
3.009	2097	0.024	1.098	10.001	10 : 0
3.418	38290	0.026	1.081	10.608	11 : 0 ISO
3.476	1794	0.027	1.079	10.694	10 : 0 ANTEISO
4.058	659	0.026	1.060	11.419	10 : 0 3OH
4.227	603	0.025	1.055	11.608	12 : 0 ISO
4.677	16806	0.031	1.044	12.087	11 : 0 ISO 3OH
5.069	1020	0.029	1.036	12.436	11 : 0 3OH
5.268	4770	0.038	1.032	12.613	13 : 0 ISO
5.369	832	0.033	1.030	12.702	13 : 0 ANTEISO
5.834	13033	0.034	1.022	13.097	12 : 0 ISO 3OH
6.312	11119	0.035	1.015	13.453	12 : 0 3OH
6.534	43944	0.035	1.012	13.619	14 : 0 ISO
6.926	524	0.038	1.006	13.911	14 : 0 #5c
7.046	16445	0.037	1.005	14.000	14 : 0
7.209	12579	0.036	1.003	14.107	13 : 0 ISO 3OH
7.337	3606	0.036	1.001	14.192	13 : 0 2OH
7.675	20811	0.038	0.997	14.414	15 : 1 ISO F
7.994	195615	0.038	0.993	14.625	15 : 0 ISO
8.129	36123	0.039	0.992	14.713	15 : 0 ANTEISO
8.251	915	0.044	0.990	14.794	15 : 1 #8c
8.343	765	0.046	0.989	14.855	15 : 1 #6c
8.565	7101	0.039	0.987	15.001	15 : 0
9.232	523	0.046	0.981	15.321	16 : 0 ISO H
9.594	27389	0.040	0.977	15.627	16 : 0 ISO
9.835	4164	0.037	0.974	15.773	16 : 1 #9c
10.207	26398	0.040	0.971	16.000	16 : 0
10.922	34765	0.043	0.965	16.416	ISO 17 : 1 #9c
11.287	7634	0.042	0.962	16.630	17 : 0 ISO
11.567	1872	0.036	0.959	16.793	17 : 1 #8c
13.268	428	0.034	0.946	17.770	18 : 1 #9c

Table 6. 16S rRNA full sequencing 결과

Strain	Accession No.	Similarity	nt differences /compared
<i>Stenotrophomonas nitritireducens</i> DSM 12575T	AJ012229	98.94	15/1409
<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> DSM 13117T	AF273080	98.51	21/1414
<i>Stenotrophomonas koreensis</i> KCTC 12211T	AB166885	97.24	39/1413
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> LMG 958-TT	X95923	96.95	43/1412

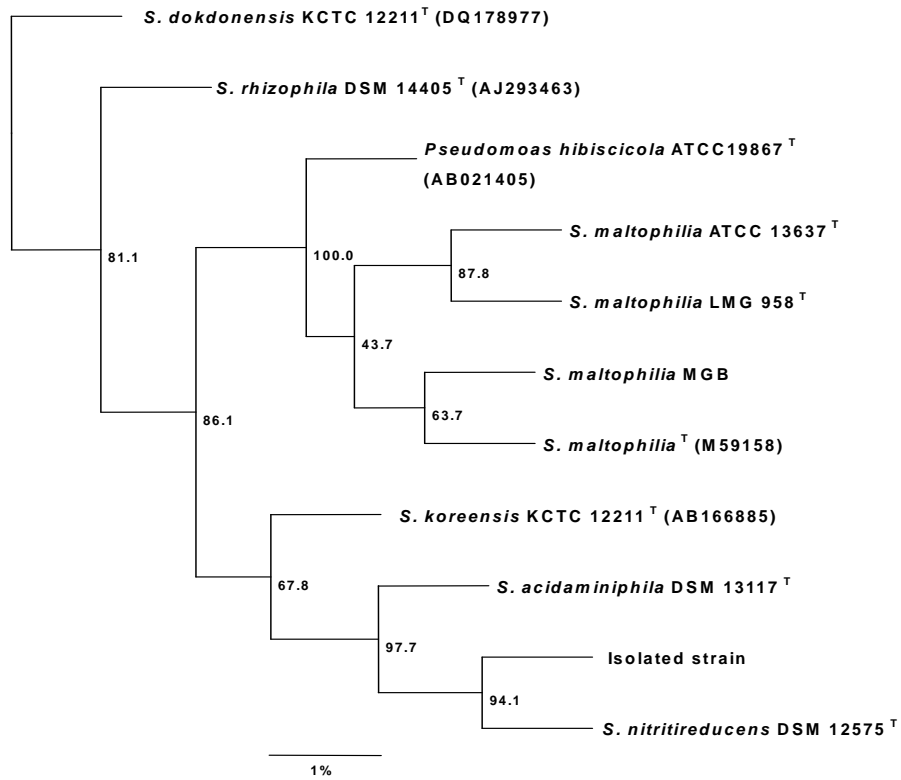


Figure 18. Phylogenetic positions of the isolate strain among other members of family *Stenotrophomonas* based on 16S rRNA gene sequences.

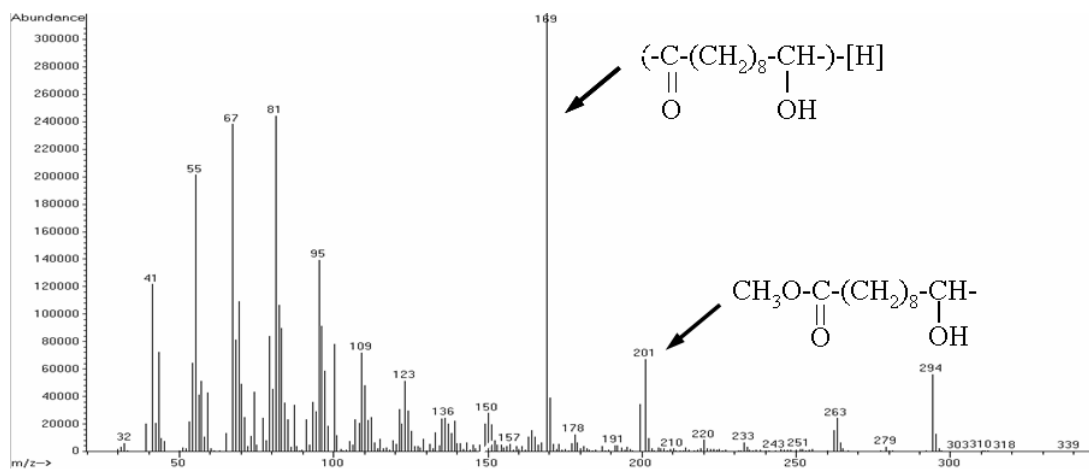


Figure 19. GC-MS analysis of 10-hydroxy-12(*Z*)-octadecenoic acid

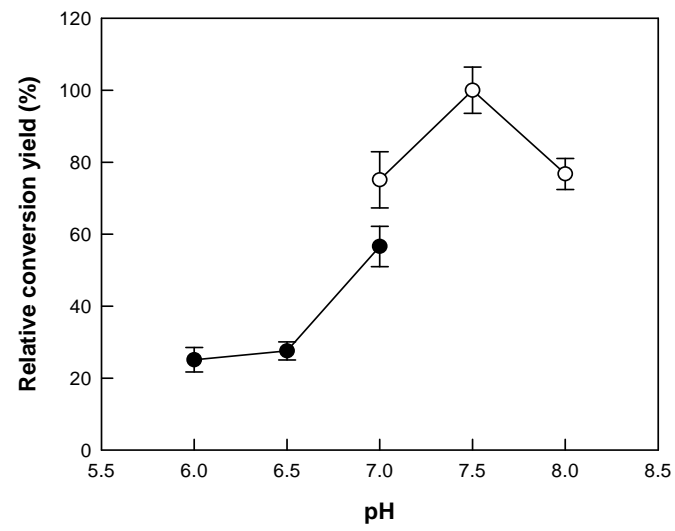


Figure 20. Effect pH of maximum production by *Stenotrophomonas nitritireducens*

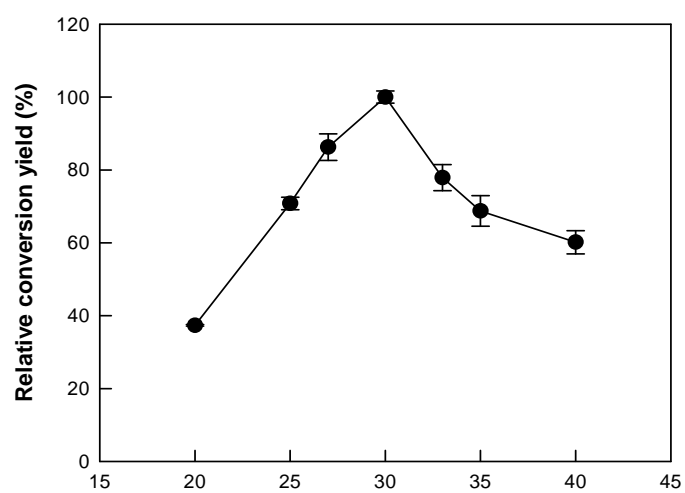


Figure 21. Effect temperature of maximum production of 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid

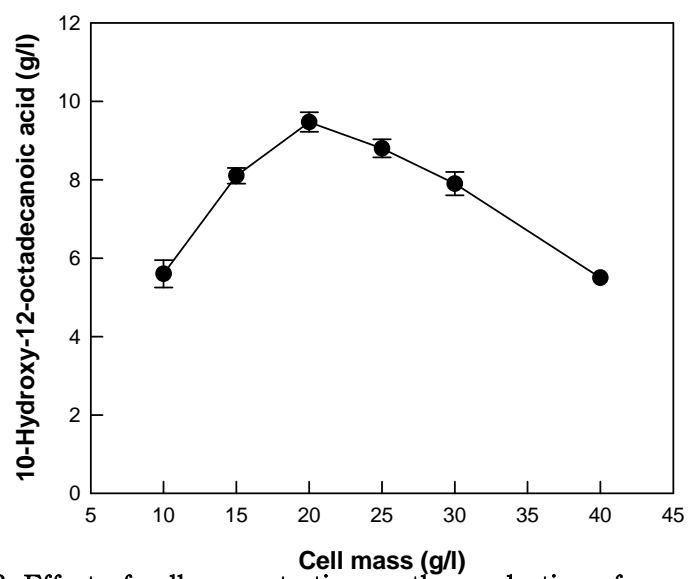


Figure 22. Effect of cell concentration on the production of 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid and by washed of *S. nitrireducens*.

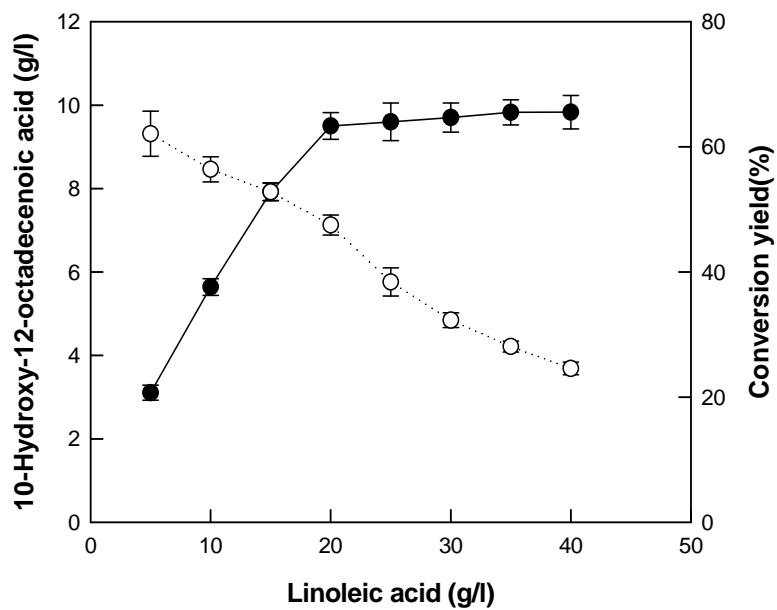


Figure 23. Effect of the Linoleic acid concentration on the production and the conversion yield of 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid by washed cells of *S. nitritireducens*. : production (●), conversion yield (○)

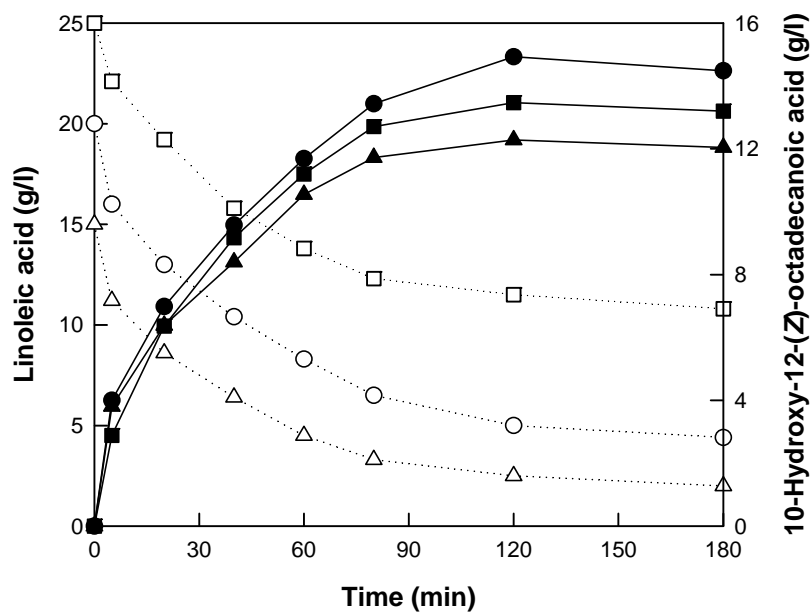


Figure 24. Time-courses of the production of 10-hydroxy-12(*Z*)-octadecenoic acid in a bioreactor by washed cells of *S. acidaminiphilia* with varying the linoleic acid concentration. The reactions were performed in a 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer containing 20 g/l cells and 0.2 ml/l Tween 80 at 30°C for 120 min. The 15 g/l linoleic acid (△) and its 10-hydroxy-12(*Z*)-octadecenoic acid (▲); 20 g/l linoleic acid (○) and its 10-hydroxy-12(*Z*)-octadecenoic acid (●) and 25 g/l linoleic acid (□) and its 10-hydroxy-12(*Z*)-octadecenoic acid (■).

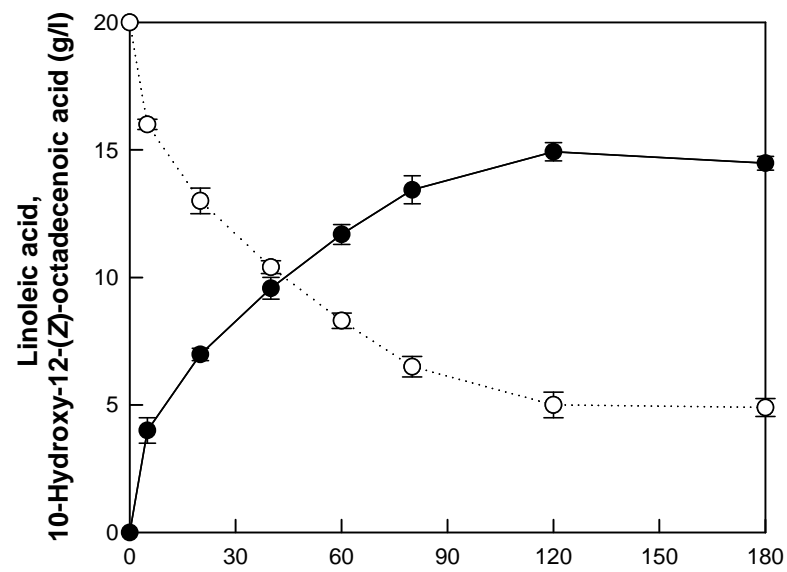
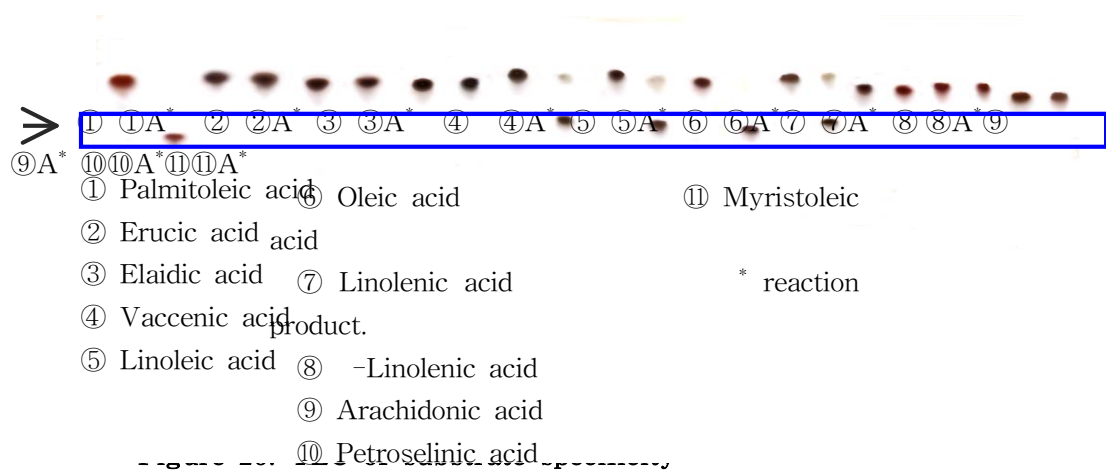


Figure 25. Time-courses for production of 10-hydroxy-12(*Z*)-octadecenoic acid in a bioreactor by washed cells of *S. nitritireducens* under the optimized conditions. : Linoleic acid (○), 10-hydroxy-12(*Z*)-octadecenoic acid (●)

Table 7. Hydroxy fatty acid productions from unsaturated fatty acid by various microorganisms with high productions

<i>Strain</i>	<i>Substrate</i>	<i>Product</i>	<i>Substrate conc. (g/l)</i>	<i>Product conc. (g/l)</i>	<i>Product yield (g/g)</i>	<i>Productivity (g/l.d)</i>	<i>Reference</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	Linoleic acid	10-Hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid	1.00	0.22	0.22	0.09	(15)
<i>Flavobacterium</i> . sp. NRRL B-14859	Linoleic acid	10-Hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid	5.40	2.97	0.55	1.98	(10)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Linoleic acid	10-Hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid	5.00	1.45	0.29	0.72	(25)
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Linoleic acid	10-Hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid	2.00	1.82	0.91	0.26	(17)
<i>Pseudomonas</i> sp. 42A2	Oleic acid	10-Hydroxy-8(E)-octadecenoic acid	20.0	5.58	0.28	5.58	(8)
<i>Pseudomonas</i> sp. PR3	Oleic acid	7,10-Dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid	11.7	7.35	0.63	3.67	(12)
<i>Stenotrophomonas nitritireducens</i>	Linoleic acid	10-Hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid	2.00	1.92	0.96	92	This study
			20.0	14.9	0.75	177	



A)

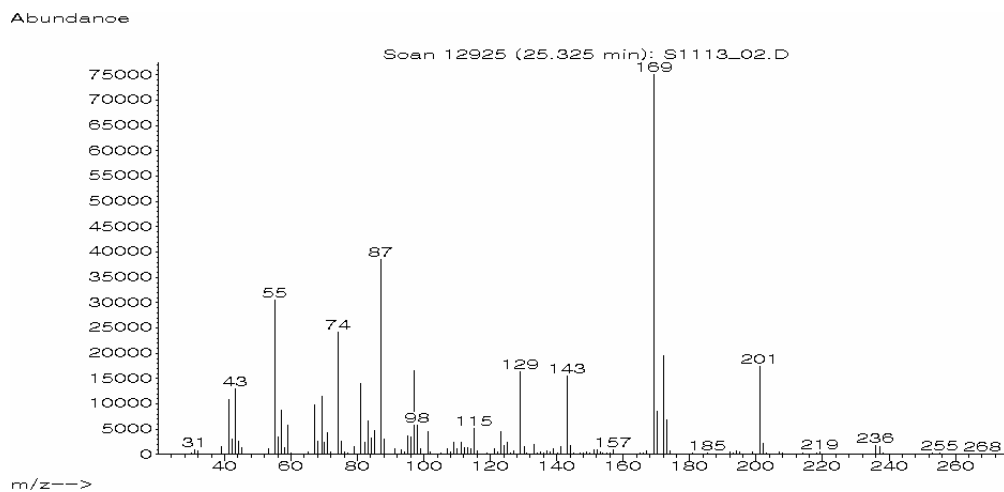


Figure 27. Determination of compounds produced by the hydroxylation of unsaturated fatty acids using GC-MS. - cont.

A. Determination of compound produced by palmitoleic acid hydroxylation (10-Hydroxypalmitic acid)

B)

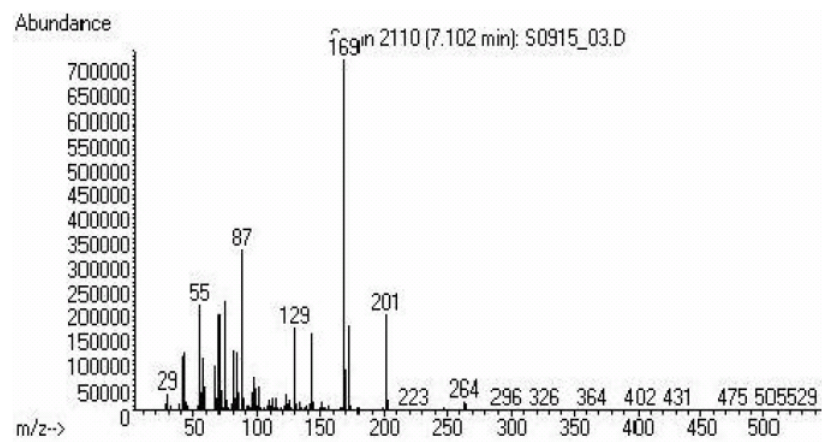


Figure 27. Determination of compounds produced by the hydroxylation of unsaturated fatty acids using GC-MS.- cont.

B. Determination of compound produced by oleic acid hydroxylation (10-Hydroxystearic acid)

C)

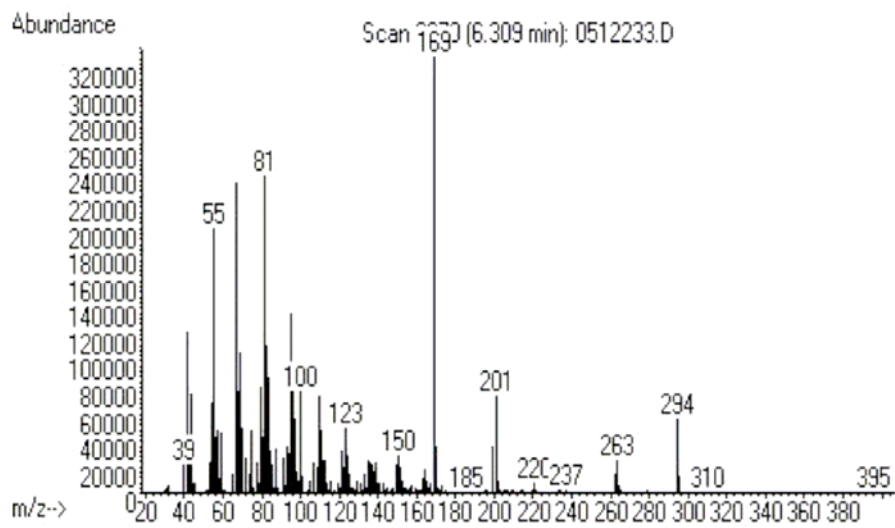


Figure 27. Determination of compounds produced by the hydroxylation of unsaturated fatty acids using GC-MS.- cont.

C. Determination of compound produced by linoleic acid hydroxylation (10-Hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid)

D)

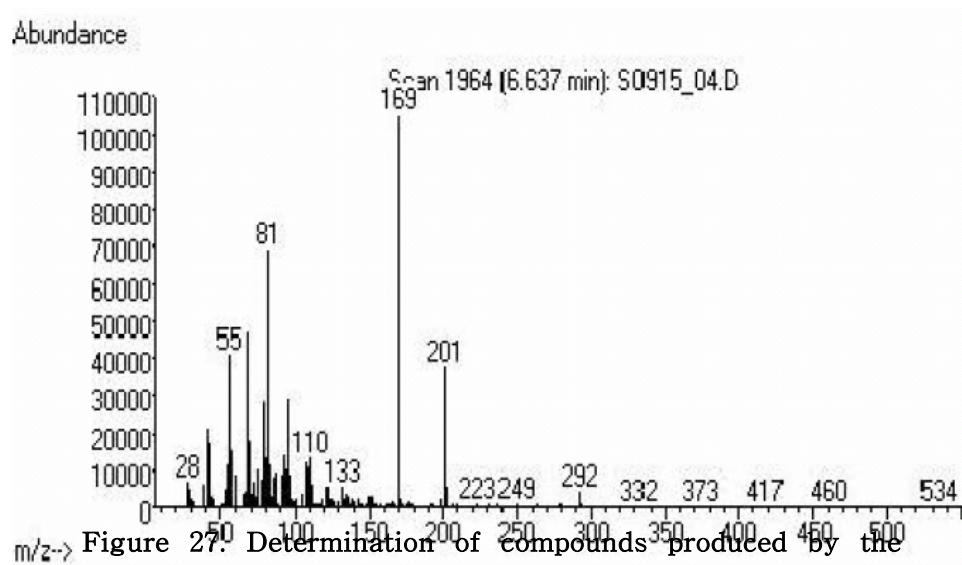
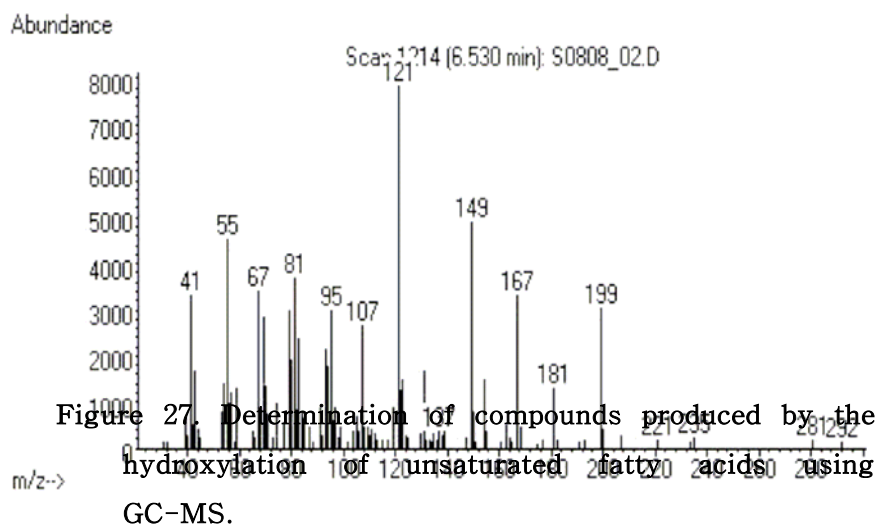


Figure 27. Determination of compounds produced by the hydroxylation of unsaturated fatty acids using GC-MS.- cont.

D. Determination of compound produced by linolenic acid hydroxylation (10-Hydroxy-12(*Z*), 15(*Z*)-octadecadienic acid)

E)



E. Determination of compound produced by α -linolenic acid hydroxylation (10-Hydroxy-6(*Z*), 12(*Z*)-octadecadienic acid)

λ

Table 8. Substrate specificity of *Stenotrophomonas nitritireducens* for unsaturated fatty acid

Substrate	Relative activity (%)	Product		
		TLC	GC/MS (m/z)	Hydroxy fatty acid
Myristoleic acid (C14: $\Delta^{9(Z)}$)	0	-	-	—
Palmitoleic acid (C16: $\Delta^{9(Z)}$)	26	+	169, 201, 268	10-Hydroxypalmitic acid
Petroselinic acid (C18: $\Delta^{6(Z)}$)	0	-	-	—
Oleic acid (C18: $\Delta^{9(Z)}$)	64	+	169, 201, 296	10-Hydroxystearic acid
Elaidic acid (C18: $\Delta^{9(E)}$)	0	-	-	—
Vaccenic acid (C18: $\Delta^{11(Z)}$)	0	-	-	—
Linoleic acid (C18: $\Delta^{9(Z),12(Z)}$)	100	+	169, 201, 294	10-Hydroxy-12(<i>Z</i>)-octadecenoic acid
Linolenic acid (C18: $\Delta^{9(Z),12(Z),15(Z)}$)	79	+	169, 201, 292	10-Hydroxy-12,15(<i>Z,Z</i>)-octodecadienoic acid
α -Linolenic acid (C18: $\Delta^{6(Z),9(Z),12(Z)}$)	70	+	167, 199, 292	10-Hydroxy-6,12(<i>Z,Z</i>)-octodecadienoic acid
Arachidonic acid (C20: $\Delta^{5(Z),8(Z),11(Z),14(Z)}$)	0	-	-	—
Erucic acid (C22: $\Delta^{13(Z)}$)	0	-	-	—

Table 9. Purification of 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid

Fatty acids	Sample (g)	Ethyl acetate fraction (g)
Linoleic acid	0.160	-
10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid	0.370	0.107

제 3절 생물전환법의 산업적 생산 공정의 개발

Hydroxylation 및 제한적인 β -oxidation을 이용한 상업적 생산공정의 개발은 in-situ sterilization fermentor 와 분리 정제를 위한 Fractional distillation unit을 이용하여 개발하였다 (Fig. 29)

1. 실험재료

가. 재료 및 시약

본 실험 중 일반 분석 및 배지 모든 시약은 일급 분석용으로 Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) 및 (주) 대정화학 (Korea)에서 구입하여 사용하였다. 배지 준비를 위한 물은 일반수 (tap water)와 deionization 수지를 이용한 탈 이온수 (d-water)를 사용하였다. 실험에 사용된 홍화유는 대구 의성 홍화원에서 추출된 홍화씨유를 사용하였다. 홍화유는 >75%의 고 linoleic acid를 함유하는 것으로 홍화유의 불포화 지방산의 함량은methylation reaction 후 Gas Chromatography(GC)를 이용하여 검증한 후 사용하였다. 홍화유는 생물반응기에 홍화유 20%와 lipase MY(AMANO, Japan)를 oil양 기준으로 1%넣고 d-water를 함께 넣은 후 37℃에서 800 rpm으로 회전시키면서 16-18시간 동안 가수분해 시켰다. 가수분해 반응 중 pH 조절기를 이용하여 25% (w/w) NaOH로 pH를 6.5로 유지하였다. 가수분해 반응은 65℃에서 30분간 가열하여 정지시켰다. 가수분해된 홍화유는 실온으로 냉각시킨 후, 상층의 오일층을 회수하여 지방산을 분리수거한 후 생물전환공정에 사용하였다.

나. 사용균주 및 균주의 동정

Hydroxylation reaction 활성을 지닌 미생물을 분리하기 위하여 한국 생명공학 연구원 KTCT (Youseoung, Korea) 에서

분양 받은 *Pseudomonas* 균주 및 실험실 내 보유하고 있는 미생물 47종을 사용하였다(Table 3). Nutrient Agar Plate(NA)에서 24시간 28°C 에서 배양하여 4°C에서 보관하였다. 장기간 균주를 보관하기 위하여 모든 균주는 Nutrient Broth medium (NB, Difco Laboratories Detroit, USA)에서 24시간 28°C 에서 배양한 후, 급속 동결 후 -70°C에서 보관하였다. 높은 hydroxylation 활성을 지닌 균주를 동정하기 위하여 *Pseudomonas* screening medium(PSM, yeast extract 0.5%, K₂HPO₄ 0.15%, KH₂PO₄ 0.15%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, tween #80 0.02%)를 사용하였다. PSM는25% NaOH 사용하여 pH 7.0로 조정하였다. 멸균된 배지에 균주를 접종하기 직전에 멸균된 50% glucose (w/w)를5 g/l와 microbial lipase로 가수분해 된 홍화유를 멸균하여 0.14% (v/v) 넣어주고 150 rpm, 28°C 에서 24시간 배양하였다.

제한적 α -oxidation 기능을 지니고 있는 *Yarrowia lipolytica* ATCC34088는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 구입하였다. 구입된 *Y. lipolytica*는 YM medium (Difco Laboratories Detroit, USA))을 이용하여 24시간 28°C 에서 배양하여 4°C에서 보관하였다. 장기간 균주를 보관하기 위하여 모든 균주는 YM medium에서 24시간 28°C 에서 배양한 후, 급속 동결 후 -70°C에서 보관하였다

2. 실험방법

가. 홍화유의 linoleic acid 함량 조사

반응기에 홍화유 20%와 lipase MY(AMANO, Japan)를 oil양 기준으로 1%넣고 증류수를 함께 넣는다. 반응시간 동안 2.5% NaOH를 사용하여 pH를 6.5로 유지하였다. 37°C에서 800 rpm으로 회전시키면서 16-18시간 동안 가수분해 시킨다. 효소 반응은 65°C에서 30분간 유지하여 정지시킨다. 반응액이 식은

후, 상층의 오일층을 회수하여 지방산을 추출하고 methyl ester화 시켜 GC/MS로 홍화유의 linoleic acid 함량을 조사하였다

나. 지방산의 추출과 methyl ester화

지방산을 추출하기 위해 시료를 50% H₂SO₄를 사용하여 pH 2.0으로 맞추고, 시료와 같은 분량의 ethyl acetate로 3회 추출하였다. 추출액을 포화 NaCl로 두 번 씻어준 후, anhydrous sodium sulfate로 수분을 제거하였다. 용매는 감압 농축하여 제거하고 지방산을 회수하여 methyl ester를 만들었다. 시료에 10% BF₃ Methanol을 5배 첨가하고, 시료는 증탕으로 100℃에서 5분간 열을 가하였다. 반응액이 식으면 반응액의 1-2배의 증류수로 씻어내고, 포화Na₂HCO₃를 첨가한 후, 두 층으로 분리되면 윗층을 회수한다.

다. Gas Chromatograph를 이용한 분석

Methyl ester된 지방산은 HP-5 Capillary Column(30m x 0.32mmID, 0.25 μ m, Hewlett Packard, USA)가 장착된 Gas Chromatography(Model DS 6200, Donam, Korea)을 사용하여 분석하였다. 오븐의 온도는 200℃에서 300℃까지 10℃/min으로 시켰다. Detector는 flame ionization detector를 사용하였으며 detector의 온도는 275℃, injector의 온도는 250℃로 하였다. Carrier Gas로 Helium을 사용하였다.

라. 균주의 동정(pre-step)

1) 균주의 선별

한국 생명공학 연구원에서 분양 받은 *Pseudomonas* 균주와 보유하고 있는 미생물 47종을 screening하였다. 균주의 동정에 사용한 *Pseudomonas* screening medium의 조성은 yeast extract 0.5%, K₂HPO₄ 0.15%, KH₂PO₄ 0.15%, MgSO₄·7H₂O

0.05%, tween #80 0.02%로 구성되었으며, pH는 25% NaOH를 사용하여 7.0로 조정하였다. 균주를 접종하기 직전에 멸균된 50% glucose를 5 g/l을 넣어 주고 가수분해 된 홍화유를 멸균하여 0.14% 넣어주었다. TGY broth (0.5% yeast extract, 0.5% tryptone, 0.1% K_2HPO_4 , 0.1% glucose (멸균 후 첨가), pH는 25% KOH를 사용하여 7.0으로 조정하였다.)에서 24시간 배양한 균을 *Pseudomonas* screening media에 접종하여 26°C에서 150 rpm으로 24시간 배양하였다. 가수분해 된 홍화유를 10 g/l를 첨가하여 다시 24시간 배양한 후, 배양액에 50% H_2SO_4 를 첨가하여 pH를 4.0로 하고 ethyl acetate로 추출한다. 시료를 TLC로 분석하였다.

2) TLC(Thin Layer Chromatography)를 이용한 분석

Silica gel 60 F254 TLC plate(Merck Co., Germany) 사용하여 실온에서 확인했다. Silica gel plate에 reaction물질을 1 μ l 점적하고, toluene / dioxane / acetic acid (97:14:7, v/v/v)의 혼합용액을 전개용매로 사용하였다. 전개용매에 의하여 분리된 plate를 건조시킨 후, methane / H_2SO_4 / N-1-naphtylethylenediamine dihydrochloride (95:5:0.3, v/v/w)의 발색시약을 이용하여 발색시키고, 100°C의 oven에 5분간 두어 생산물을 확인하였다.

마. 생물전환공정을 위한 균주의 배양조건

1) Hydroxylation

Hydroxylation 반응을 보이는 균주를 동정한 결과 가장 hydroxylation 반응성이 큰 균주로 확인 된 *Pseudomonas*. sp. NRRL B-2994를 사용하여 홍화유에 함유된 불포화 지방산 linoleic acid로부터 10-hydroxy-12(z)-octadecenoic acid를 생산하는 생물공정을 개발하였다. Inoculum은 NB medium에서 자란 후 동결 보관된 *P.* sp. Inoculum medium에

접종하여 24시간 25°C를 자란 배양액을 사용하였으며, 그 조성은 yeast extract 0.5%, KH_2PO_4 0.4%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, tween#80 0.02%로 구성되었으며 pH는 25% KOH를 사용하여 멸균 전 7.0으로 조정하였다. 멸균된 Inoculum medium에 가수분해 된 홍화유 0.14% (멸균), glucose 0.25% (멸균)을 첨가한 후 접종하였다. 100-ml inoculum media를 넣은 500-ml 삼각 플라스크에 동결 보관된 균주를 1% 접종하고 25°C에서 200 rpm으로 48시간 배양한다. Hydroxylation 반응은 Production medium을 사용하였으며, 그 조성은 yeast extract 1.0%, soypeptone 0.5%, KH_2PO_4 0.4%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, tween#80 0.02%로 구성되었으며, pH는 25% KOH를 사용하여 멸균 전 6.5로 조정하였다. 멸균 된 production media에 가수분해 된 홍화유 0.14% (멸균), glucose 0.5% (멸균)를 첨가한 후 접종하였다. 2.5-l production media를 넣은 3-l lab. fermenter에 inoculums 1% 접종하고 26°C에서 420 rpm, 0.3 v/v/m aeration, 24-30시간 배양하였다. 탄소원으로 넣어준 glucose양이 0이 되고 spectrophotometer (Model Spectronic 20D, MILTON ROY Co., USA)를 이용하여 1/10로 희석된 배양액의 Optical Density (OD_{660})가 약 1이 되었을 때, aeration을 멈추고 25% phosphoric acid를 사용하여 pH를 6.5로 조절하였다. Lipase MY를 0.5 g/l로 넣고 홍화유를 10 g/l을 0.52 g/l/hr로 첨가하면서 agitation을 900 rpm으로 높인다. 홍화유가 완전히 첨가된 후, 생물전환과정을 48시간 동안 지속시킨 후, 25% phosphoric acid를 사용하여 pH를 3.0로 조절한 후 121°C에서 15분간 멸균하였다. 발효조의 온도가 50°C에 도달하면 agitation을 멈추고 오일층을 분리하고 수거하여 methylation reaction 후, GC분석을 통해 HFA 함량을 측정하였다.

2) 제한적 β -oxidation

Ricinoleic acid(12-hydroxy-9-octadecenoic acid)를 -decalactone로 생물전환 시키는 것으로 알려진 *Y. lipolytica*를 사용하여 실험하였다. *P. sp.* 의 hydroxylation반응으로 생산된 10-hydroxy-12(z)-octadecenoic acid로부터 6-dodecane-4-oilde(Butter Lactones)의 생산을 위한 생물전환공정을 개발하였다. 동결 보관된 *Y. lipolytica*를 증식용 배지에 접종하여 28°C 에서 24시간 동안 배양 한 후, lactones 생산을 위한 생산배지에 접종하였다. 증식용 배지의 조성은 (NH₄)₂HPO₃ 13 g/l, KH₂PO₄ 7 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.8 g/l, ZnSO₄·7H₂O 60 mg/l, FeSO₄·7H₂O 90 mg/l, CuSO₄·5H₂O 5mg/l, MnSO₄·H₂O 10 mg/l, NaCl 100 mg/l, biotin 1 mg/l, Thiamin HCl 2 mg/l, glucose 20 g/l로 구성되었으며, pH는 25% NaOH를 사용하여 7.0로 조정하였다. Lactones 생산 배지의 조성은 yeast extract 30 g/l, 홍화유 20 g/l, 10-hydroxy-12(z)-octadecenoic acid 20 g/l, tween#80 0.4 g/l로 구성되었으며, pH는 25% NaOH를 사용하여 7.0로 조정하여 사용하였다. *Y. lipolytica* 를 증식용 배지에 접종하여 28°C에서 150 rpm으로 24시간 배양한 후, lactones 생산배지에 증식용 배지의 균주 2%를 접종하고 28 °C에서 750 rpm으로 24시간 동안 생물전환 과정을 진행시켰다. 10-hydroxy-12(z)-octadecenoic acid를 미생물의 제한적인 -oxidation반응을 통해 4-hydroxy-6-dodecenoic acid로 전환시킨 후, 4N H₂SO₄를 첨가하여 배양액을 pH4로 낮추고 100°C에서 5분 동안 가열하여 6-dodecen-4-oilde(Butter lactone)을 생산하였다. 생산된 6-dodecen-4-oilde는 ethyl acetate를 이용하여 분리 정제한 후 GC 분석 후 함량을 측정하였다.

바. Glucose 함량의 측정

배지 내 glucose의 함량을 결정하기 위하여 배양액을

원심분리(5,000 x g, 20 min)한 후 상층부를 회수하였다. 회수된 상층액은 glucose의 함량에 따라 희석하여 YSI 2700 SELECT Biochemistry Analyzer (YSI Life Science, Detroit, USA)를 이용하여 배지 내 glucose 함량을 정량 하였다.

사. Gas Chromatograph(GC)를 이용한 생산물의 분석

1) Hydroxy fatty acid (HFA)의 분석

배양기에서 10-hydroxy-12(z)-octadecenoic acid로 전환된 상층액을 회수하여 50% H₂SO₄를 사용하여 pH 2.0으로 조절한 후, 시료와 같은 분량의 ethyl acetate로 3회 추출하고, 포화 NaCl 용액으로 두 번 씻어준 후 적당량의 anhydrous sodium sulfate로 수분을 제거하였다. Ethyl acetate는 Rotary evaporator (Eyela, Japan) 사용하여 제거하고 지방산을 회수하였다. 회수된 지방산에 5배의 10% BF₃ Methanol을 첨가하고 증탕으로 100℃에서 5분간 가열하였다. 반응액이 식으면 1-2배의 d-water를 이용하여 BF₃ Methanol 제거한 후, 포화 Na₂HCO₃를 이용하여 오일층을 분리하여 상층액을 회수한다. Methyl ester된 지방산은 HP-5 Capillary Column(30m, 0.32mmID, Hewlett Packard, USA)가 장착된 Gas Chromatography(Model DS 6200, Donam, Korea)을 사용하여 분석하였다. 오븐의 온도는 200℃에서 300℃까지 10℃/min으로 시켰다. Detector는 flame ionization detector를 사용하였으며 detector의 온도는 275℃, injector의 온도는 250℃로 하였다. Carrier Gas로 Helium을 사용하였다.

2) 6-dodecen-4-oilide의 분석

*Y. lipolytica*의 제한적인 β -oxidation 반응을 통해 10-hydroxy-12(z)-octadecenoic acid를 4-hydroxy-6-dodecenoic acid로 전환시킨 후, 4N H₂SO₄를 첨가하여 배양액을 pH 4로 낮추고 100℃에서 5분 동안 가열하여 lactonization 반응을 통해 6-dodecen-4-oilide (Butter lactone)을 β 생산하였다. 생산된

6-dodecen-4-oilide는 ethyl acetate를 이용하여 3회 추출한 후 rotary evaporator를 사용하여 ethyl acetate를 제거하였다. 분리 정제된 6-dodecen-4-oilide 는 농도에 따라 ethyl acetate로 희석하여 HFA의 GC 분석과 동일한 조건으로 함량을 측정하였다

아. 표현형(Phenotypic variants)에 따른 hydroxylation의 차이와 Morphological character

1) Microbial adhesion to hydrocarbon (MATH) test

Microbial cell surface hydrophobicity의 측정은 microbial adhesion to hydrocarbon(MATH) test 로 측정하였다. 하룻동안 배양한 균주를 25 mM phosphate-buffered saline(PBS)로 두 번 씻어주고, 25 mM phosphate-buffered saline(PBS)를 이용하여 600 nm에서 optical density 가 약 0.6이 되도록 한다. 이 세포 현탁액 1.5ml에 다양한 volume의 hexadecane hexadecane (ranging from 0 to 900 μ l)을 넣고 30초간 vortexing한다. 30분간 평형상태가 되도록 한 후, aqueous phase의 흡광도를 측정하고 초기 세포 현탁액의 흡광도와 차이를 계산하여, hexadecane에 대한 cell adhering의 백분율로 hydrophobicity를 평가한다.

$$\text{Microbial adhesion(\%)} = (0.6 - \text{aqueous phase의 흡광도}) \times 100$$

2) Sensitivity to oxidative stress

Hassett et al.의 disk assay 을 사용하여 세포의 oxidative stress에 대한 sensitivity를 조사하였다.late-log phases의 cell culture 100 μ l를 TSA와 Nutrient agar plates에 균일하게 spread한다. 멸균한 Whatman no. 1 filter paper disks (7-mm diameter) 각각의 plate에 놓고 30% H₂O₂ 10 μ l 을 흡수시킨다.

26℃에서 24h 배양한 후, 각 disk 주변의 growth inhibition zone의 diameter를 측정한다.

3) *Pseudomonas*에 의한 색소의 생산

King et al.의 medium A 와 medium B를 변형한 *Pseudomonas* agar P와 *Pseudomonas* agar F (Hi-media, India)를 사용하여 *pseudomonas* 속이 생산하는 색소인 pyocyanin과 pyoverdine의 생산을 알아보았다.

4) 표현형에 따른 hydroxylation의 영향

위의 step-1과 동일한 방법을 이용하여, 각각의 conversion ratio를 비교한다.

3. 실험결과

가. 홍화유의 Linoleic acid 함량

일반적으로 홍화유는 50~80%의 2가 불포화 지방산인 linoleic acid를 포함한다고 알려져 있다. 실험에 사용한 경북 의성 홍화유의 지방산 조성을 분석하기 위하여 홍화유를 가수분해하여 methyl ester화하고 GC로 분석한 결과, 실험에 사용된 홍화유는 75% 이상의 linoleic acid를 함유하고 있음을 확인하였다(Fig. 30). 경북 의성에서 생산된 홍화유는 고 linoleic acid 함유한 천연 식물유로, 분리 정제된 linoleic acid를 사용하지 않고 상대적으로 저가인 홍화유를 사용하여 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid를 생산하는 생물전환공정을 개발할 경우 천연 HFA를 생성할 수 있어 천연 소재 생산에 중요한 원료로서의 가치를 지니고 있다. 국내에서 생산된 고linoleic acid홍화유를 사용할 경우, 국내 홍화 재배 농가에서 천연 향료 생산을 통한 부가 소득을 통해 지속적인 수익을 보장할 수 있게 될 것이다. 가수분해된 홍화유를 이용한 천연 lactones 생산 scheme은

figure 31에 도식화 되었다.

나. Hydroxylation Reaction을 위한 균주의 동정

총47종의 *Pseudomonas* 속 균주를 screening한 결과, 대부분 hydroxylation reaction activity를 보여 주었으며, 특히 *P. sp.* NRRL B-2994의해 홍화유에 포함된 linoleic acid를 가장 효과적으로 monooxygenase의 활성화에 의하여 hydroxylation시켜 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid로 변환시킴을 확인하였다 (Table 10, Fig. 32). El-Sharkawy et al 의 연구 결과에 의할 경우 *P. sp.* NRRL B-2994는 불포화 지방산 oleic acid를 10-ketosteraric acid를 생성하는 것으로 보고되었으나, 본 실험에서 2가 불포화 지방산이 많이 포함되어있는 가수분해된 홍화유를 사용할 경우 keto fatty acid를 환원시킨 HFA를 생성하였다. HFA합성이 상대적으로 높은 aeration에 의해 생성되는 것으로 추정되고 있으나, 생물전환공정 중 keto fatty acid가 HFA환원되는 지 혹은 HFA가 저 aeration에 의해 keto fatty acid를 생성하는 지는 정확한 규명되지는 않았다. 또한 본 실험실에 보관되어 있는 계대배양 및 보관 중 monooxygenase의 mutation에 의하여 HFA가 생성되는 지를 확인하기 위한 효소의 특이성 연구가 진행되고 있다.

다. Linoleic acid로부터10-hydroxy-12(z)-octadecenoic acid의 생물전환 공정

대부분의 이전의 연구들에서는 *P. sp.* NRRL B-2994의 whole cell을 이용한 hydroxylation 반응이 아닌 세포 추출물을 이용하였으나, 본 연구는 *P. sp.* NRRL B-2994의 whole cell을 이용한 생물전환공정을 개발하였다. 미생물을 이용한 hydroxylation 반응을 유도할 경우 미생물이 첨가된 지방산을 분해하여 성장할 수 없어 불포화 지방산의hydroxylation whole cell생물전환 공정은, hydroxylation 반응을 위한 충분한cell

mass를 확보할 수 있는 cell 성장기와 whole cell의 monooxygenase의 활성을 이용한 hydroxylation 반응기로 구분된다. *P. sp.* NRRL B-2994의 성장 확인과 발효기에 기질 첨가 시점을 알아보기 위해 OD와 glucose 농도를 측정하였다 (Fig. 33). *P. sp.* NRRL B-2994는 stationary phase cell 보다는 log phase cell 에서 monooxygenase 활성을 보여, monooxygenase activity를 지닌 균체의 양을 최대화 하기 위해 late log-phase cell을 사용하는 것이 최적으로 확인되었다. 또한 *P. sp.* NRRL B-2994는 cell 성장을 위해 공급된 glucose가 있을 경우 불포화 지방산을 이용한 monohydroxylation reaction activity를 보이지 않았다. 최적의 hydroxylation activity를 보이는 cell은 첨가한 carbon source인 glucose를 소비한 상태로, optical density는 660nm에서 측정하여 균체액을 1/10 dilution한 것이 1에 가까운 배양액으로, 이시기에 가수분해된 홍화유를 첨가하였다. 실험실 용 3-liter발효기에서 충분히 배양한 균주에 가수 분해된 홍화유를 첨가한 후, 24-30시간의 생물전환공정을 거쳐 생산된 지방산을 회수하여 methyl ester로 만들어 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid를 GC로 분석하였으며, 평균 39.2% 의 conversion ratio을 보였다 (Fig. 34, Table 11). 가수분해된 홍화유는 10 g/l을 0.52 g/l/hr 속도로 발효기에 첨가되었으며, 생물전환율을 높이기 위해 홍화유의 양을 늘리거나 첨가속도를 증가 시킬 경우 생물전환율은 상대적으로 크게 떨어졌다. 이러한 생물전환율의 급감은 가수분해된 홍화유에 함유된 불포화 지방산에 의한 cell toxicity에 기인하는 것으로 추정된다. 한편, *P. sp.* NRRL B-2994를 이용한 linoleic acid의 HFA의 전환은 기존에 연구 보고된 연구 결과와 달리 aeration을 중단하고 agitation을 900rpm으로 올려줄 경우에 효과적인 생물전환율을 보였다. 이러한 결과는 기존에 보고된 *P. sp.* NRRL B-2994의 keto fatty acid 생산과 달리 HFA생산 기작에 대한 차이를 보이는 것으로 추정된다. 현재 생산 수율의

향상 및 scale-up을 위한 발효 공정의 최적조건에 대한 연구가 15-liter Lab 발효기를 이용하여 진행되고 있다. 생산 수율 향상을 통한 산업적 공정 개발은 상대적으로 저가의 기능성 식품소재인 홍화유에서 고부가 산업 응용 소재인 수산기를 가진 HFA을 생산하게 됨으로써 천연 향료 생산뿐만 아니라 상대적으로 규모가 큰 다양한 고분자 화학분야에 전구물질로 사용될 수 있다.

라. Phenotypic variants에 따른 hydroxylation에 대한 영향과 morphological character

1) *Pseudomonas sp.* NRRL B-2994의 두 가지 phenotypic variants

Fig. 35에서 보는 바와 같이, 계속된 hydroxylation실험을 통해 두 종류에 colony type을 분리하였다. Wild-type의 *Pseudomonas sp.* NRRL B-2994를 Nutrient agar에 26°C에서 48시간 배양하면, 보통 큰 형태의 colony주변이 뿌옇게 흐려진 평평한 colony가 나타냈다(Fig. 35). Small variants는 동일한 조건으로 배양하였을 때, large variants보다 작고 붕긋하며 둥근 불투명한 colony를 나타냈다. L variants colonies와 S variants colonies를 agitated broth에 배양하였을 때, 군체가 성장하면서 L variants는 시험관 벽에 어떤 흡착된 군체 없이 균일하게 혼탁함을 나타내었으나, S variants는 시험관 벽을 따라 흡착되어 낮은 탁도를 나타냈다.

2) S variants에서 L variants로의 표현형의 변환

균주를 배양한 plate를 1주일간 room temperature에 방치하였다. 이때, L variants에서는 크게 달라진 점을 발견할 수 없었으나, S variants는 대부분의 colonies가 L variants와 유사하게 나타났다. 이를 보아 S variant는 상대적으로 더 많이 Large의 표현형으로 바뀔 수 있음을 알 수 있다.

3) Cell surface hydrophobicity

Eric et al.에 의하면, S variants의 뭉침과 흡착현상은 cell surface hydrophobicity가 L variants보다 더 높음을 나타낸다. 따라서 standard assay인 MATH test를 사용하여 cell surface hydrophobicity를 측정하였다. 그 결과 S variants가 L variants의 surface보다 더 hydrophobic했다(Fig. 36). 그러나 S의 revertant는 높은 응집성 때문에 이 실험을 수행할 수 없었다.

4) Sensitivity to oxidative stress

이 실험은 stress에 의해 살아남는 능력을 보기 위한 실험으로, Table 12의 결과와 같았다. 대수기의 cell을 사용하였을 경우, H₂O₂에 의한 저지환의 크기는 L variants가 S variants보다 약 30% 작았다. 이 결과로 L variants가 더 민감함을 알 수 있었다. 또한 이러한 결과는 TSA plate에서 관찰할 수 있었으며, Nutrient agar plate에서는 관찰할 수 없었다.

5) *Pseudomonas*에 의한 색소의 생산

Pyocyanin은 *Pseudomonas*의 blue phenazine 색소로, antibiotic activity를 가지고 있는 세포 외로 분비되는 이차 대사산물(extracellular secondary metabolite)이고, pyoverdine는 수용성의 형광 색소로 *Pseudomonas aeruginosa*와 다른 *Pseudomonas*에서 나타난다. 그러나 실험에 사용한 균주에서는 어떠한 색소도 발견하지 못했다(Table 12).

6) *Pseudomonas*의 서로 다른 표현형에 따른 hydroxylation의 차이

L variants와 S variants를 동일한 조건으로 hydroxylation 실험을 수행하였다. L variants는 1g cured microorganism extract에 함유한 curde fatty acid는 plamitic acid: linoleic acid: 10-hydroxyoctadecenoic acid가 2.0 : 3.5 : 3.6의 비율로

나타났으며, S variants는 2.0 : 5.3 : 1.9 로 나타났다(Fig. 37). 따라서 미생물을 이용한 Hydroxyl fatty acid 생산에는 *Pseudomonas* sp. NRRL B-2994의 Large variants를 사용하는 것이 더 많은 양의 hydroxyl fatty acid를 생산할 수 있을 것이다.

라. Lactone 생산을 생물전환 공정

기존에 알려진 피마자유에 다량 함유되어있는 ricinoleic acid (12-hydroxy-9-octadecenoic acid)를 이용하여 6-hydroxy-4-decanolide (γ -decalactone)으로 전환 할 수 있는 생물전환공정에 사용된 *Y. lipolytica* ATCC34088로 실험을 진행하였다. *Y. lipolytica* 는 ricinoleic acid와 함께 배양할 경우 α -oxidation 반응을 통하여 첨가된 fatty acid를 carbon source로 이용하여 성장을 하며, HFA는 자체에 포함되어 있는 hydroxyl group에 의하여 α -oxidation를 완전하게 진행시키지 못하고 분해가 정지된 상태에서 α -oxidation 반응의 중간체인 6-hydroxy-4-decanoic acid를 배양액에 축적하는 것으로 알려져 있다. 이러한 기작을 이용하여 *Y. lipolytica* ATCC 34088가 *P. sp.* NRRL B-2994의 생물전환 공정을 거쳐 생산된 10-hydroxy-12(z)-octadecenoic acid를 이용하여 성장과 더불어 α -oxidation 반응의 중간체인 6-hydroxy-4-decanoic acid 생산하는 것을 확인하기 위하여 24시간 동안 생물전환반응을 하였다. 생물전환 반응은 4N H₂SO₄ 혹은 citric acid를 사용하여 pH를 4로 낮추어 반응을 정지하였다. 이 후 배양액은 열을 가하여 lactonization시킨 후 ethyl acetate를 이용하여 추출하여 GC로 분석하였다. GC 분석은 γ -decalactone를 표준물질로 사용하여 분석하였으며, *Y. lipolytica* ATCC 34088은 24시간 생물전환반응 기간동안 γ -decalactone과는 다른 락톤 6-dodecen-4-olide (Butter lactone)을 9.2 g/l 생산하였다 (Fig. 37, Table 13). 하지만 생물전환 공정 중 α -oxidation 반응의

γ

중간체인 6-hydrox-4-decanoic acid은 생물반응을 지속할 경우 완전 분해되어 배양액 내 다량 축적되지 않았다. 배양액 내 천연 lactones 생산의 상업화를 위한 생물전환공정의 개발을 위하여 lactones 중간체의 축적 및 생물전환공정의 최적화에 관련된 연구가 현재 진행되고 있다. 이러한 2-stage microbial biotransformation을 이용하여 새로운 천연 lactones의 생산 가능성은 세계 소비자의 천연 소재에 대한 욕구를 충족시켜줄 뿐 아니라 유기합성 중에 발생할 수 있는 중금속 등의 환경오염을 방지할 수 있다. 또한 전량 수입에 의존하는 한국 향료 시장에 천연 향료 및 향장 원료 물질의 생산으로 원자재의 대체 효과를 가져올 수 있다. 또한 hydroxylation반응을 통한 HFA의 생산은 새로운 polymer 생산을 위한 전구물질의 생산으로 다양한 고분자 유기합성의 가능성을 제시하고 있다.

4. 결론

모든 Hydroxylation과 제한적 β -oxidation의 산업적 생산 공정은 in-situ bioreactor에서 진행되었다. 2-단계 미생물 생물전환법을 이용하여 불포화 지방산을 다량 함유하고 있는 식물유로부터 천연 6-dodecen-4-oilide (Butter lactone)의 생산하였다. 식물유에 함유된 불포화 지방산을 microbial lipase를 이용하여 분리한 후, *Pseudomonas sp.* NRRL B-2994의 hydroxylation 기작을 이용하여 광활성의 hydroxyl fatty acid (HFA)로 전환시켰다. 불포화 지방산 linoleic acid를 >75% 함유한 홍화유를 이용하여 *P. sp.*는 48 시간의 생물전환공정기간 중 8 g/l의 10-hydroxy-12(z)-octadecenoic acid를 생성하였으며 평균 39.2% 생물전환율을 보였다. 원심 분리된 10-hydroxy-12(z)-octadecenoic acid는 2차적으로 *Yarrowia lipolytica* ATCC 34088의 제한적인 β -oxidation기작을 이용하여 4-hydroxy-6-dodecenoic acid로 전환되었다. 배양액 내 존재하는 4-hydroxy-6-dodecenoic acid는 4N H₂SO₄를 첨가하여 배양액을 pH 4로 낮추고 100°C에서 5분 동안 가열하여 9.2 g/l의 β

6-dodecen-4-oilde (Butter lactone)으로 lactone화 하였다. 천연 6-dodecen-4-oilde는 불포화 lactone으로 기존에 사용된 6-dodecan-4-oilde (dodecalactone) 및 4-decan-4-olide 비교하여 독특한 향 특성을 지니고 있다.

DISTILLATION B/R 9600



FERMENTOR-LiFlus SL

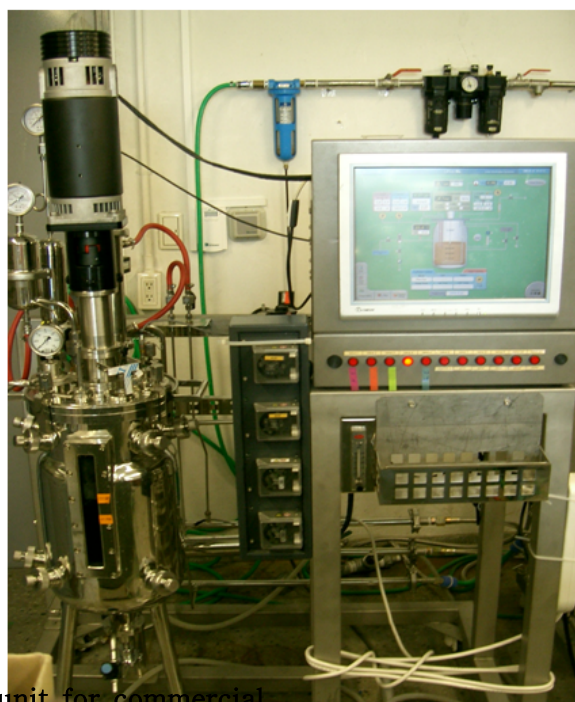


Figure 29. Fermentor and Distillation unit for commercial biotransformation process development

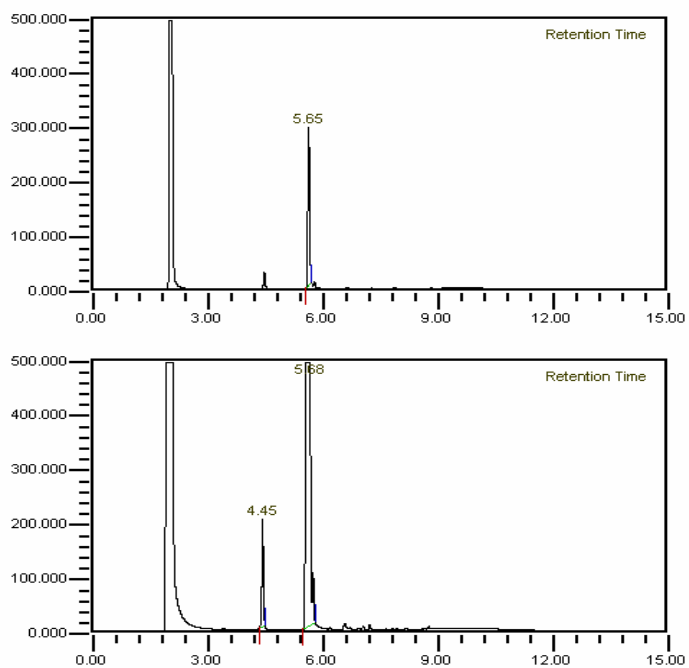


Figure 30. Gas chromatography analysis of hydrolyzed safflower oil.

(A) Methylinoleate(B) Hydrolyzed safflower oil
 palmitic acid(a): linoic acid(b) = 12 % : 79 %

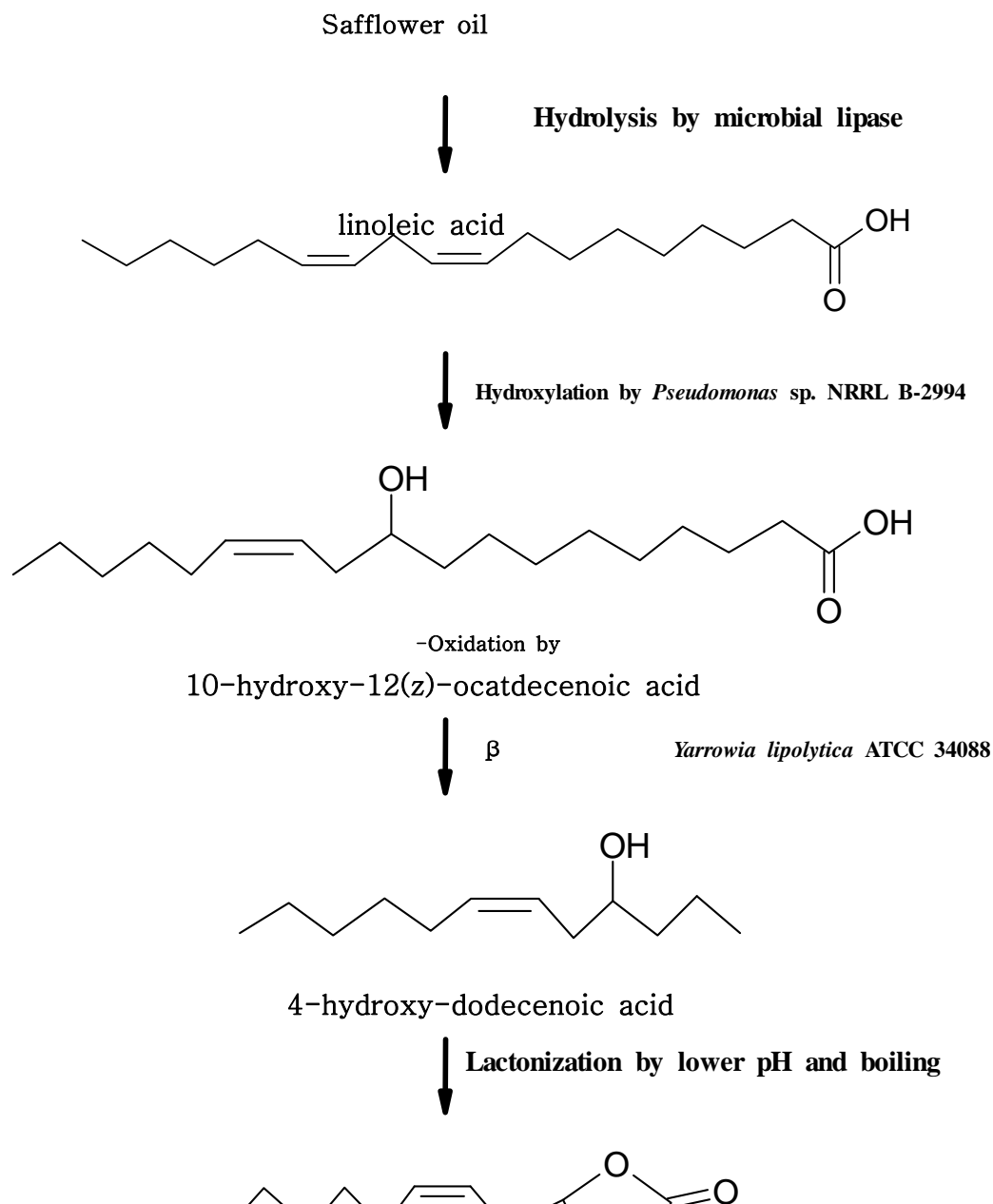


Figure 31. Production of 6-dodecen-4-olide (Butter lactone) from hydrolyzed safflower oil by 2-stage microbial biotransformation
6-dodecen-4-olide

Table 30. Screening lists of *Pseudomonas* strain

1	KCTC 2450	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
2	NRRL B-1543, ATCC 13986	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3	KCTC 12910	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>
4	NRRL B-1681, ATCC 17417	<i>Pseudomonas aurefaciens</i>
5	NRRL B-1576, ATCC 13985	<i>Pseudomonas aurefaciens</i>
6	ATCC 25416	<i>Pseudomonas cepacia</i>
7	NRRL B-2320, ATCC 17460	<i>Pseudomonas cepacia</i>
8	IFF-8296C, ATCC55792	<i>Pseudomonas cepacia</i>
9	NRRL B-1541, ATCC 17414	<i>Pseudomonas chloroaphis</i>
10	NRRL B-1854, ATCC 17810	<i>Pseudomonas chloroaphis</i>
11	NRRL B-1095, ATCC 17811	<i>Pseudomonas chloroaphis</i>
12	NRRL B-2075, ATCC 17813	<i>Pseudomonas chloroaphis</i>
13	NRRL B-1632, ATCC 17814	<i>Pseudomonas chloroaphis</i>
14	NRRL B-560, ATCC 9446	<i>Pseudomonas chloroaphis</i>
15	NRRL B-1244, ATCC 11253	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
16	NRRL B-3178, ATCC 17926	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
17	KCTC1767	<i>Pseudomonas fluorescense</i>
18	NRRL B-25, ATCC 4973	<i>Pseudomonas fragi</i>
19	KCTC 12937	<i>Pseudomonas kilonensis</i>
20	KCTC 2198	<i>Pseudomonas putida</i>
21	KCTC 2005	<i>Pseudomonas putida</i>
22	KCTC 1452 (continues)	<i>Pseudomonas putida</i>
23	KCTC 2523	<i>Pseudomonas putida</i>

Table 30. Screening lists of *Pseudomonas* strain

24	KCTC 12283	<i>Pseudomonas putida</i>
25	KCTC 1768	<i>Pseudomonas putida</i>
26	KCTC 2402	<i>Pseudomonas putida</i>
27	KCTC 2403	<i>Pseudomonas putida</i>
28	KCTC 2404	<i>Pseudomonas putida</i>
29	KCTC 2406	<i>Pseudomonas putida</i>
30	KCTC 2407	<i>Pseudomonas putida</i>
31	KCTC 2408	<i>Pseudomonas putida</i>
32	KCTC 1067	<i>Pseudomonas putida</i>
33	KCTC 1133	<i>Pseudomonas putida</i>
34	KCTC 1134	<i>Pseudomonas putida</i>
35	KCTC 1365	<i>Pseudomonas putida</i>
36	KCTC 12301	<i>Pseudomonas putida</i>
37	NRRL-21, ATCC 795	<i>Pseudomonas putida</i>
38	NRRL B-6, ATCC 14036	<i>Pseudomonas reptilovora</i>
39	NRRL B-334, ATCC 11253	<i>Pseudomonas reptilovora</i>
40	NRRL B-2081, ATCC 14545	<i>Pseudomonas septica</i>
41	KCTC 1397	<i>Pseudomonas sp.</i>
42	KCTC 2864	<i>Pseudomonas sp.</i>
43	KCTC 2409	<i>Pseudomonas sp.</i>
44	NRRL B-2994	<i>Pseudomonas sp.</i>
45	KCTC 2760	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
46	KCTC 1832	<i>Pseudomonas syringe subsp. Syringe</i>
47	NRRL B-14, ATCC 4684	<i>Pseudomonas teatrolens</i>

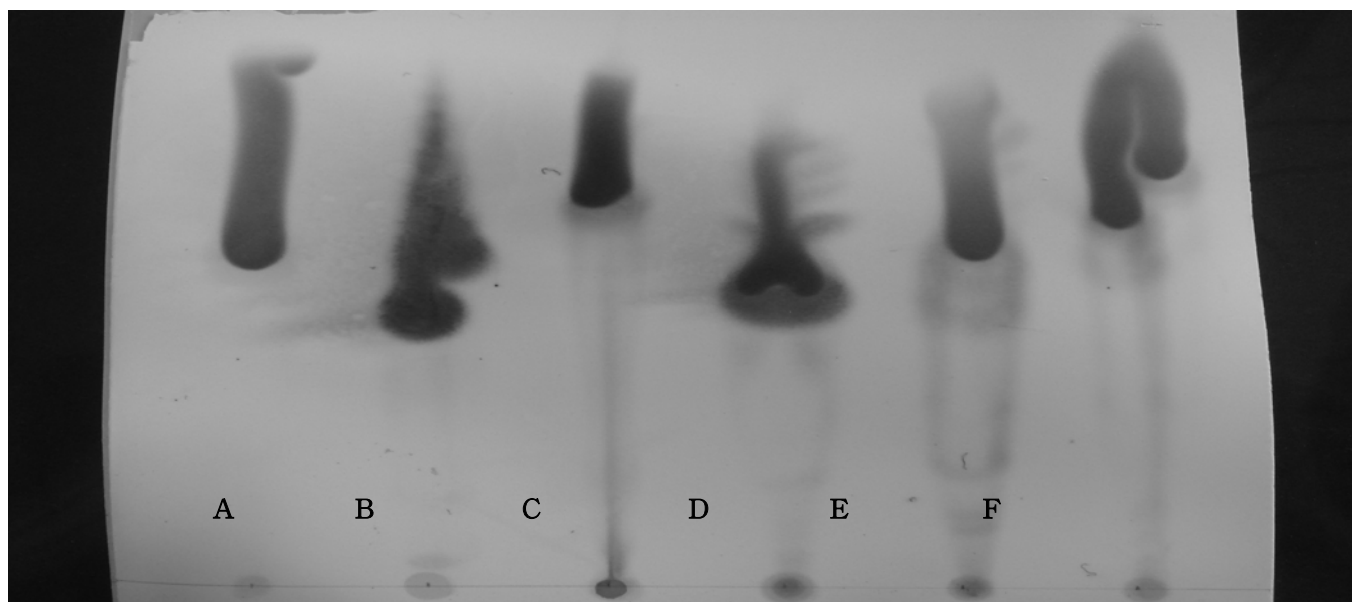


Figure 32. Thin-layer chromatography (TLC) analysis of products from the bioconversion of unsaturated fatty acids by microorganism

A : Linoleic acid (standard)

B : 12-hydroxy-9-octadecenoic acid (standard)

C : crude microorganism extract by *Pseudomonas putida* KTCT 1134

D : crude microorganism extract by *Pseudomonas sp.* NRRL B-2994

E : crude microorganism extract by *Pseudomonas sp.* KTCT 2409

F : crude microorganism extract by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 13986

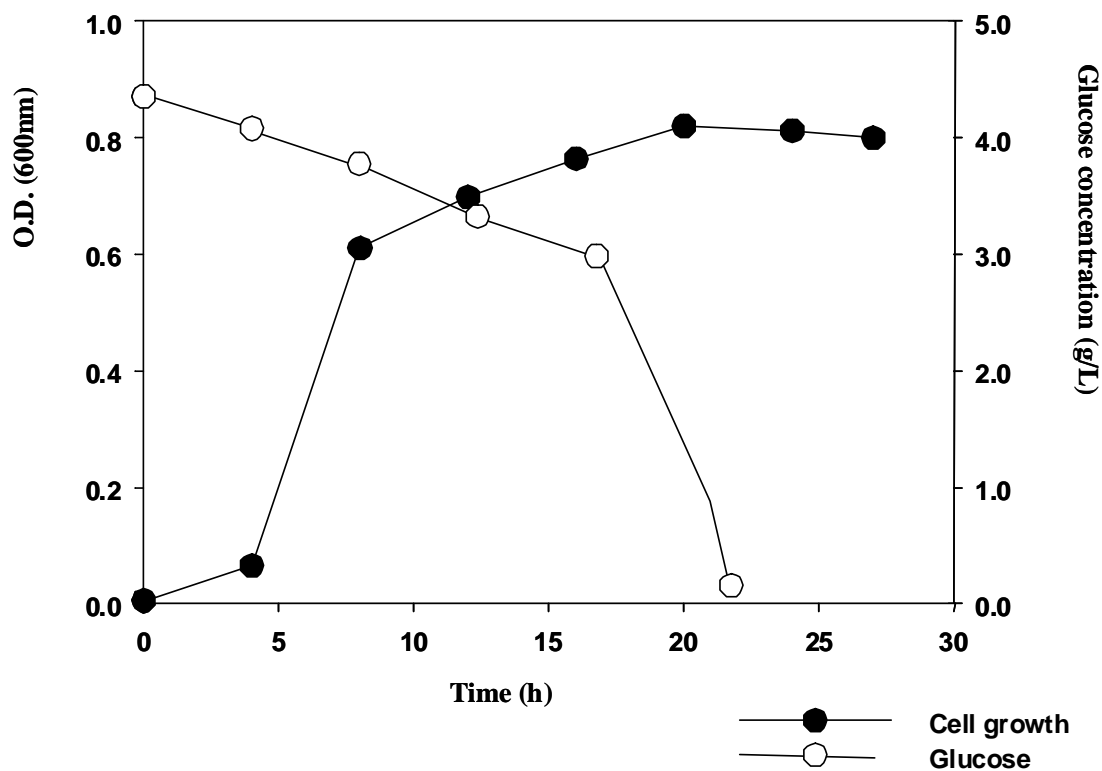


Figure 33. The adding point of substrate and cell growth condition of *P. sp.* NRRL B-2994 at 2.5-l fermenter, in glucose conc. and optical density. The arrow in Figure is adding point of substrate.

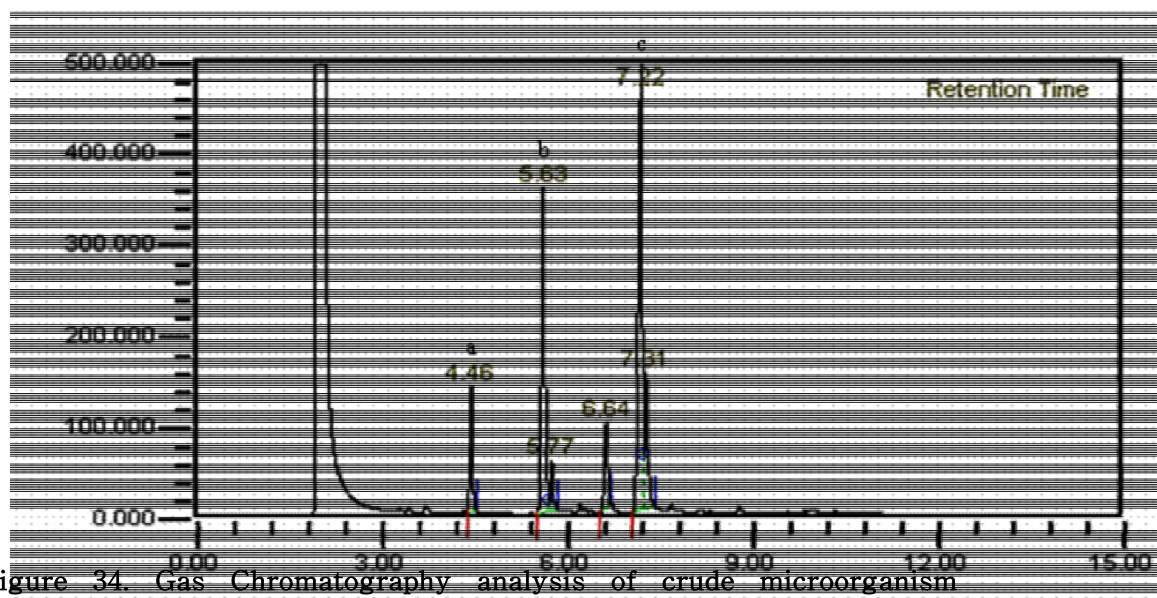


Figure 34. Gas Chromatography analysis of crude microorganism extract with 10-hydroxyoctadecenoic acid. a: Methyl Palmitate, b: Methyl linoleate, d: Methyl 10-Hydroxy-12-octadecenoic acid by *Pseudomonas sp.* NRRL B-2994

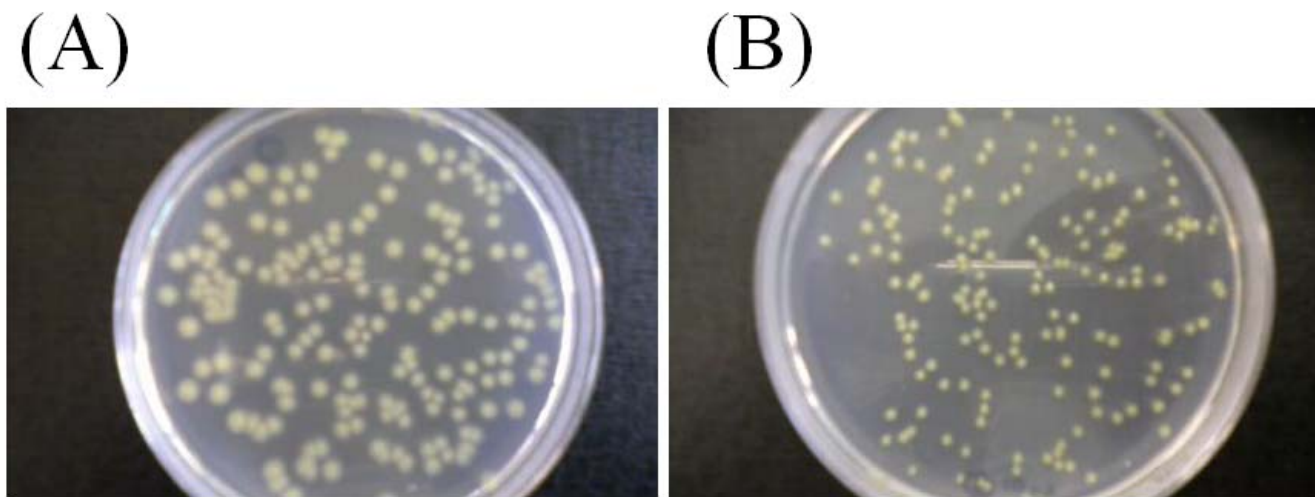


Figure 35. L-and S-variant of *Pseudomonas* sp. NRRL B-2994

(A) L-variant (B) S-variant

Table 11. Production of 10-Hydroxyoctadecenoic acid in lab fermenter

Incubation time (hrs)	Total oil added (g/l)	Crude (g/kg)	Linoleic acid (%)	10-hydroxy-12 -ctadecenoic acid (%)	Yield (g/l)
24	20	-	40.9	31.2	-
48	20	11.0	28.1	51.0	5.61

Table 12. Comparison of production of extracellular products and sensitivity to oxidative stress between the L and S variants

Variants	Large	Small
Products		
Pyocyanin	No pigment	No pigment
Pyoverdine	No pigment	No pigment
H ₂ O ₂ sensitivity	17 ± 3	24.3 ± 3.5

Table 13. Conversion of 10-hydroxyoctadecenoic acid to butter lactones

Incubation time (hrs)	Crude extract (g/l)	Butter Lactones (g/l)
24	25	9.2
48	25	7.9

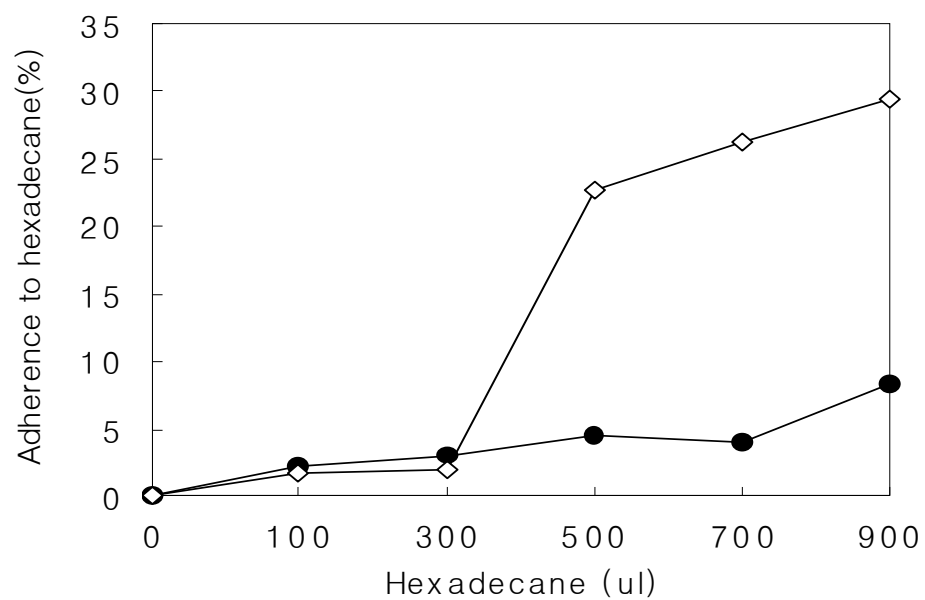


Figure 36. Evaluation of cell surface hydrophobic and adhesional potentialities by the MATH test, in L(●) and S(◇) variants.

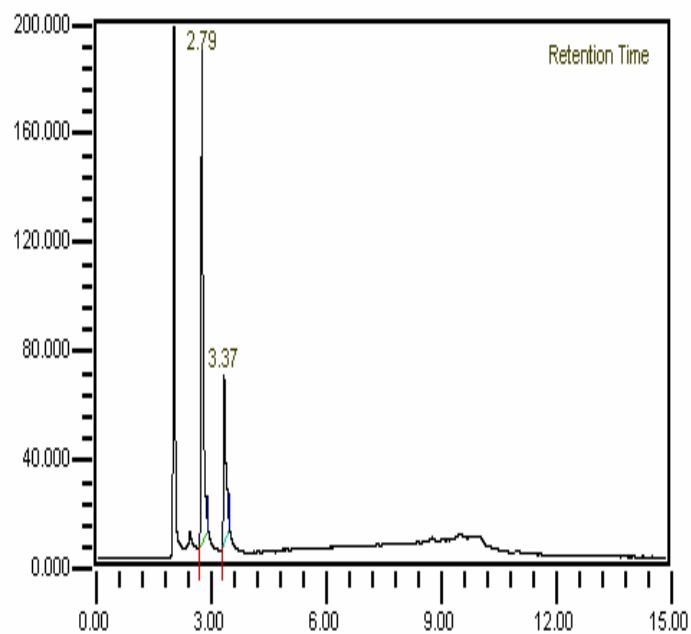


Figure 37. Gas chromatography analysis of 6-dodecen-4-olide by microbial biotransformation. a : γ -Decalactone, b : 6-dodecen-4-olide (Butter Lactone) by *Yarrowia lipolytica* ATCC34088

γ

제 4절 관능검사와 제품생산 기준의 설정

Ethyl acetate를 이용하여 분리된 10-hydroxy-12(z)-octadecenoic acid는 gas chromatography-mass spectrometry를 이용하여 확인하였다. 90% 이상의 순도를 갖는 butter lactone를 분리 정제한 후, 관능검사를 통해 butter lactone의 독특한 향 특성을 분석하였다. 더 높은 순도의 butter lactone은 향후 과일향이나 낙농향의 조향에 사용이 가능할 수 있다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

전 세계의 향료 및 향장 산업의 규모는 2002년 기준으로 약 160억불(\$16 Billion)로, 이중 잠재적으로 10%의 시장은 미생물을 비롯한 Biotransformation and Biocatalysis를 이용한 Biotechnology Product로 교체 될 것으로 예측되고 있다. 전 세계의 향료 및 향장 원료물질의 시장구조는 유기합성에 의한 합성 향료가 전체의 70%를 차지하고 있으나, 세계적으로나 국내의 국민 소득의 증가와 천연 음식 및 향장 소재의 요구, 소비재의 고급화 추세로 인한 천연 향료가 안정성과 기호도에서 선호되는 경향으로, Biotechnology를 이용한 향료 및 향장 원료물질 생산은 천연물로 받아들여져 고부가의 소재 생산에 초점을 맞추어 연구를 진행하였다.

본 연구는 국내에서 생산되는 천연 식물유 중 홍화유에 다량 함유된 불포화 지방산인 Linoleic acid은 다양한 미생물을 이용한 Whole cell 발효에 의하여 hydroxy / hydroperoxy 지방산으로 변환시킬 수 있는 생물전환공정을 개발하여 다양한 천연 flavor 및 fragrance chemical을 생산을 목표로 하였다. 이렇게 변환된 hydroxy / hydroperoxy 지방산은 미생물의 제한된 β -oxidation 대사에 의하여 4- 또는 5- hydroxy 지방산으로 변환되어, Lactonization reaction에 의하여 β - 또는 γ -Lactone으로 변환되거나 다양한 Aldehyde 및 Alcohol로 변환되어 고부가의 천연 과일 향을 위한 중요한 향료 및 향장 원료물질을 생산할 수 가능성을 제시하였다. 개발된 생물공정을 이용하여 상대적으로 가격이 낮은 γ -홍화유를 δ -고부가의 천연 flavor 및 fragrance chemical을 생산하기 위하여 연구과제 계획서에 계획된 내용에 충실하고자 하였다.

Hydroperoxidation 및 hydroxylation 반응을 위해 국내에서 생산되는 다양한 농산물과 미생물을 수집, 분리하고 분석하여 hydroperoxidation 및 hydroxylation에 적합한 농산물과 미생물을 선정하여 상업형 생물전환공정 개발의 가능성을 마련하였다. 특히 hydroxylation 반응을 이용한 불포화 지방산의 hydroxy fatty acid로의 전환 기술을 국내외 기 개발된 기술과 비교하여 탁월한 생산성을 지니고 있어, 향료회사 및 화학 관련 회사의 상업화 과정을 통하여 빠른 시간 내 상업화를 이룰 수 있는 기술로 평가되었다. 또

한 식물유를 이용한 의 생산 기술의 개발은 단순히 천연 향료 물질의 생산 뿐만 아니라 불포화 fatty acid의 Carbon Backbone 구조에 반응성이 좋은 hydroxyl group을 첨가하는 기술로 다양한 hydroxy fatty acid 생산과 그에 따른 다양한 유도체를 생산하여 점성 (viscosity)과 반응성 (Reactivity) 등의 Physical 및 chemical 특성에 다양한 변화를 주어 일반 지방산과는 달리 산업적으로 이용될 수 있는 고부가의 정밀화학 소재를 개발할 수 기회를 제공할 수 있다.

지금까지 착유된 홍화유는 전통 식용유나 건강 보조 식품으로서 판매되고 있지만 정제된 고순도의 Linoleic acid라도 그 가격은 \$20/kg에 불과하여 홍화를 대량으로 재배하여 농가의 수익성을 올리기에는 경제성이 미약하다. 그러나 국내산 홍화유를 생물 전환법을 이용하여 천연 향료 및 향장 원료물질을 생산하면 \$1,000-2,000/kg 가치의 고 부가를 창출할 수 있어 국내 홍화유를 비롯한 식물유 재배 농가를 활성화 시키고 지속적인 수익을 보장할 수 있다. 최근까지 한국의 농산물은 제한된 가공을 통하여 소비자에게 공급되어 부가 가치 면에서 제한되어 농가의 수익성에 한계를 가지고 있다. 이러한 면에서 생물공학을 비롯한 새로운 기술을 통해 농산물의 고 부가 가치의 새로운 소재로 변환시켜 생산함으로써 농가 수익의 안정성을 이룩할 계기를 만들 수 있다.

제 5장 연구개발결과의 활용계획

생물 전환법에 의한 새로운 시장 창출 - 전 세계의 향료 및 향장 시자의 규모는 2002년 기준으로 약 \$16 Billion으로, 이중 잠재적으로 10%의 시장 규모가 미생물을 비롯한 생물 전환법(Biotransformation and Biocatalysis)를 이용한 생물 공학을 이용하여 생산된 제품으로 교체될 것으로 예측되고 있다. 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 제공한다.

홍화유를 비롯한 국내산 식물유를 이용한 고부가 천연 향료 및 향장 원료 물질의 생산 - 착유된 홍화유는 전통 식용유나 건강 보조 식품으로서 판매되고 있지만 정제된 고순도의 Linoleic acid라도 그 가격은 \$20/kg에 불과하여 홍화를 대량으로 재배하여 농가의 수익성을 올리기에는 경제성이 미약하다. 그러나 국내산 홍화유를 생물 전환법을 이용하여 천연 향료 및 향장 원료물질을 생산하면 \$1,000-2,000/kg 가치의 고 부가를 창출할 수 있어 국내 홍화유를 비롯한 식물유 재배 농가를 활성화 시키고 지속적인 수익을 보장할 수 있다.

천연 향료 및 향장 원료물질의 청정 생산 기술 확보를 통한 국제 경쟁력 향상 및 수출 - 한국의 향료 및 향장 시장은 약 2,000억 원 정도의 규모이지만, 한국 내 향료 및 향장물질에 대한 생산 기술의 미비로 외국 향료회사들 주로 조합 향료의 공급에 의한 유통 시장만이 형성되어있다. 그러나 천연 향료 및 향장 원료 물질의 청정 생산 기술이 확보된다면 국제 경쟁력이 향상되어 수입대체 뿐만 아니라 수출도 가능하게 될 것이다.

농가의 수익성 향상 - 최근까지 한국의 농산물은 제한된 가공을 통하여 소비자에게 공급되어 부가 가치 면에서 제한되어 농가의 수익성에 한계를 가지고 있다. 이러한 면에서 생물공학을 비롯한 새로운 기술을 통해 농산물의

고 부가 가치의 새로운 소재로 변환시켜 생산함으로써 농가 수익의 안정성을 이룩할 계기를 만들 수 있다.

생유기합성 기술의 타 화학 산업에의 응용 - 화학 산업은 생산 집약적 산업으로 하나의 중요한 Keystone Industry로 구분되고 있다. 다양한 화학물질은 인간이 살아가는 현대사회의 중요한 기본 물질로, 주거시설, 식품, 농업, 의약, 전기 통신을 비롯한 모든 분야에 필수적으로 사용된다. 전세계적으로 연간 2억 7천만 ton의 석유화학제품을 이용하며 년 \$1.5 trillion의 화학물질이 생산되고 있다. 최근 석유의 가격의 상승에 따른 공급의 불확실성 및 소비자의 환경 보존에 대한 관심의 집중으로 인해 화학 업계의 장기적인 생산성 유지에 관한 연구는 Renewable feed stock을 이용해 화학 물질을 생산하는 생합성 공정 (Biosynthesis)의 개발에 집중되고 있다. 본 연구로 개발된 생유기합성을 이용한 새로운 고부가의 정밀화학 물질의 생산기술의 응용은 천연 바이오 오일을 미생물의 Oxidation Reaction (Hydration / Oxygenation etc.)의 기작을 이용하여 Hydroxyl Fatty acid (HFA)를 생산하는 생물학적 공정에 적용될 수 있다.

제 6 장 연구개발과정에서의 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 정밀화학산업의 특성

화학 산업은 생산 집약적 산업으로 하나의 중요한 Keystone Industry 로 구분되고 있다. 다양한 화학물질은 인간이 살아가는 현대사회의 중요한 기본 물질로, 주거시설, 식품, 농업, 의약, 전기 통신을 비롯한 모든 분야에 필수적으로 사용된다. 전세계적으로 연간 2억 7천만 ton 의 석유화학제품을 이용하며 년 \$1.5 trillion의 화학물질이 생산되고 있다.

정밀화학물질 생산업계의 가장 큰 과제는 지속적으로 생산성을 유지할 수 있는 새로운 기술의 개발이다(Development of Sustainable Chemical Process Long term Sustainability).

- 최근 석유의 가격의 상승에 따른 공급의 불확실성 및 소비자의 환경 보존에 대한 관심의 집중으로 인해 화학 업계의 장기적인 생산성 유지에 관한 연구는 Renewable feed stock을 이용해 화학 물질을 생산하는 생합성 공정 (Biosynthesis)의 개발에 집중되고 있다.
- 생합성 공정을 통해, 농산물을 비롯한 재활용이 가능한 원부자재를 이용한 화학물질의 대량생산은 기존의 유기합성과 비교하여, 생산성 및 가격 경쟁 면에서 단기간 내 유기합성을 대체할 가능성이 적다.

환경 친화적 생유기합성의 공정 개발은 과거 10여 년 동안 대다수의 국제적 화학 회사의 연구소 및 대학 화학 /화학공업 관련 연구소의 화학 관련 R&D의 중요한 과제중의 하나였다.

- 이러한 연구 노력은 작게는 유럽 공동체 (European Union; EU)를 중

심으로 추진되는 "Process Innovation towards a Cleaner Environment" 정책뿐만 아니라 "Kyoto-Conference"를 통해 세계적인 경향으로 나타나고 있으며, CO₂ 배출을 최소화할 수 있는 생촉매 (Biocatalysis)를 비롯한 환경 친화적 촉매의 개발 및 생산 공정의 개발과 재활용이 가능한 생물 소재의 사용에 목표를 두고 있다.

- 생유기합성은, 최근까지의 석유화학 제품을 이용해 유기합성을 통한 정밀화학물질의 생산을, 새롭게 개발된 분자생물학 (Molecular Biology)를 비롯한 생명공학 (Biotechnology) 기술과 정보과학 (Information Science)를 연계한 Multidisciplinary Science로, 재조합 기술 (Combinatory Technology)의 하나로써 생합성법과 유기합성법을 접목한 새로운 생유기합성 Program 개발의 가능성을 제시하고 있다.

제 2 절 Hydroxy Fatty Acid (HFA) 및 유도체

생유기합성을 이용한 새로운 고부가의 정밀화학 물질의 생산기술의 응용은 천연 바이오 오일을 미생물의 Oxidation Reaction (Hydration / Oxygenation etc.)의 기작을 이용하여 Hydroxyl Fatty acid (HFA)를 생산하는 생물학적 공정에 적용될 수 있다.

- HFA 는 자연계에서 주로 Castor Oil를 비롯한 식물체에서 미량으로 생산되거나 동물세포내 Fatty acid 분해대사의 중간 생성물로 알려져 있다.
- 1960년도 이후 미국 농무성 ARS/NCAUR (Agricultural Research Service / National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, ILL)를 중심으로 곡물오염 미생물을 연구하는 과정 중 미생물에 의하여 불포화 지방산이 HFA 생성되는 것이 보고 된 후, HFA의 다양한 생리 활성 작용 및 독특한 Chemophysical Property 등이 보고 되어, 산업적인 이용도가 연구되면서 미국 농무성의 잉여 식물유 소비 촉진 및 환경 친화적 정밀화학 물질의 생산을 위한 정책의 일환으로 지속적 연구가 진행

되고 있다.

- HFA는 Resin, Wax, Nylon, Plastics, 윤활제, 화장품, 페인트, 향료, 농약 혹은 의약품의 중간체로서 광범위하게 사용될 수 있을 뿐 아니라 그 사용 범위가 점 차적으로 증가하고 있다.
- 특히 상업적으로 수급이 가능한 HFA를 다량 함유하고 있는 피마자유(Castor oil)의 주성분인 Ricinoleic acid를 이용하여 군사적으로 중요한 Polymer를 합성하거나, 윤활유, 화장품 유화제등으로 사용하고 있으나, 그에 필요한 다양한 HFA 및 그 유도체의 공급이 극히 제한되어 있다.

바이오 오일을 이용한 HFA의 생산 기술의 개발은 불포화 fatty acid의 Carbon Backbone 구조에 반응성이 좋은 hydroxyl group을 첨가하는 기술로 다양한 HFA 생산과 그에 따른 다양한 유도체를 생산하여 점성 (viscosity)과 반응성 (Reactivity) 등의 Physical 및 chemical 특성에 다양한 변화를 주어 일반 지방산과는 달리 산업적으로 이용될 수 있는 고부가의 정밀화학 소재를 개발할 수 있다.

제 3 절 향료산업의 특성

1. 향료산업의 특성

향료산업은 반과학 반예술 산업 (Half science, half art industry)이라고 불리는 독특한 분야의 산업으로서, 고부가가치가 창출되며 과 동시에 물류비용이 비교적 적게 들고 환경친화적 분야이며, 크게 음료수, 빙과, 담배 등 식품에 들어가는 식향(flavor)과 향수, 화장품, 세제, 비누 등에 들어가는 향장(fragrance)으로 나뉜다.

향료산업은 다양한 분야의 학문 (농학, 생물학, 생리학, 유기화학, 분석화학, 유전학 등)과 다양한 분야 (농업, 원예, 유기화학,

정밀화학, 식품가공학, 위생 등) 산업의 경계점에 존재하는 특수한 산업이다.

특히 향료산업의 특성상 유능하고 재능이 있는 개인적인 조합 능력에 크게 좌우된다는 점, 그리고 상대적으로 부가가치가 높아, 원료에 대한 의존도가 낮으므로, 자원이 부족하면서도 우수한 인재를 갖고 있는 우리나라에 아주 적합한 산업으로 판단된다.

- 고부가가치 창출 산업임
- 인종에 따른 피부특성, 생활문화 의존성이 강한 산업임
- 원/부재료의 수입의존도가 높음
- 다품종소량 생산체제임
- 다양한 유통구조를 가지고 있음
- 물류 비용이 비교적 적음
- 미래지향적이며 영속 발전적인 산업

2. 향료산업의 시장 현황

가. 세계 향료업체의 시장규모

전 세계의 향 시장규모는 US\$ 180억 규모이며, 1999-2004년 사이에 연평균 5%이상의 성장을 이루었다. 아시아 향료 시장의 경우 생활수준의 향상으로 인해 연평균 10%이상의 높은 성장률을 나타냈다 (Table 14).

나. 향료의 원료 동향

대부분의 주요 향료업체들은 Formulation을 중심으로 한 조합 향을 생산 판매 하거나 제한된 향 원료 제조하고 있다. 향 원료 중에서 4,000여 향 원료는 인도나 중국의 소규모의 업체를 중심으로 생산되고 있다.

하지만 전통적으로 이용 되어온 향식물의 천연 추출물은 다음과 같은 한계로 인하여 세계적인 시장의 요구에 부응하기에는 어려움이 있다.

- 천연 추출물의 질과 공급은 자연 재해, 생산국의 정치적 불안정 및 사회 및 경제적 불안 요소로 인하여 매년 일정하지 않다.
- 천연 추출물은 제품의 속성상 그 안정성이 떨어져 보관 및 운반에 한계를 가지고 있다.
- 천연 추출물은 상대적으로 향료로서의 활성이 낮아 가격이 비싸 사용이 제한된다.

향 원료 중 70%는 유기합성을 통한 합성원료로 대체되고 있으나 합성원료는 천연원료에 비해 품질이 떨어지고, 석유화학 제품에서 유래될 수 있는 잠재적인 발암물질을 포함하는 단점이 있다.

이러한 합성원료의 단점과 경제발전에 의한 생활수준의 향상으로 소비자의 천연식품에 대한 요구는 증가하는 추세이다. 그에 따른 F+F 업체의 천연 향료의 공급은 새로운 Marketing Strategy로서 세계적인 Trend에 능동적으로 대처하고 있다.

전 세계의 Flavor and Fragrance의 Market규모는 2004년 기준 \$18 Billion 으로, 이중 잠재적으로 10%의 전체 Market product가 미생물을 비롯한 Biotechnology를 이용한 제품으로 대체될 것으로 예측되고 있다 (Table 15).

Table 14. 세계 향료산업의 규모

Item	Million US Dollar			%Annual Growth	
	1994	1999	2004	94/99	99/04
Global Demand	11,195	14,150	18,400	4.8	5.4
United States	2,915	3,865	4,770	5.8	4.3
Canada & Mexico	390	560	790	7.5	7.1
Western Europe	3,605	4,300	5,215	3.6	3.9
Japan	1,830	1,875	2,100	0.5	2.3
Other Asia/Pacific	1,100	1,680	2,720	8.8	10.1
Other World	1,355	1,870	2,805	6.7	8.4

Table 15. BT의 이용한 천연 Flavor and Fragrance chemicals 생산

Product	Fermentation	Price (\$)	Substrates	Price (\$/kg)
Hexalactone	<i>Aspergillus</i>	1,500	Hexanoic acid	30
decalactone	Yeast	100	Ricinoleic acid	100
dodecalactone	<i>Pseudomonas</i> /Yeast	1,500	Oleic acid	100
Butter Lactone	<i>Pseudomonas</i> /Yeast	2,500	Linoleic acid	150
Tuberose Lactone	<i>Pseudomonas</i> /Yeast	2,500	Linolenic acid	200
Acetophenone	<i>Commanonas</i>	900	Cinnamic acid	120
Styralyl acetate*	Yeast	2,500	Acetophenone	900
Methyl Jasmonate	<i>Diplodia</i>	50,000	Glucose	10
Nonanol*	<i>Psuedomonas</i>	300	Undecanone	70
Nonanal	<i>Acetobactoer</i>	900	Nonanol	300
Phenyl alcohol*	Yeast	1,500	Phenylalanine	20
Phenyl acetic acid*	<i>Pseudomonas</i>	1,000	Phenylalanine	20
Phenylacetaldehyde	<i>Acetobactor</i>	2,000	Phenethyl alcohol	1,500
Fraganrone	<i>Acetobactor</i>	1,500	Propyl actaldehyde	200
Tiglic acid	<i>Acetobactor</i>	3,000	Propyl aldehyde	200
Diacetyl	<i>Klebsiella</i>	50	glucose	10

제 7 장 참고문헌

- 1) 김용휘. 2004. 생유기합성: 새로운 환경 친화적 정밀화학물질 합성을 위한 생합성과 유기합성의 접목. *미생물과 산업* 30(1): 11-20
- 2) 김학렬. 2003. 미생물을 이용한 hydroxy fatty acid의 생산. *Kosen* 첨단 기술보고서
- 3) 정봉현, 홍순광, 성문희. 1995. 생물전환기술의 연구현황 및 산업적 기술이용. *생물산업* 57-67
- 4) Aguedo M., Wache Y. and Belin J. M. 2000. Biotransformation of ricinoleic acid into γ -decalactone by yeast cells. *Recent Res. Dev. Bioeng.* 3: 167-179
- 5) Bagby M. O. and Calson K. D. 1989. Chemical and biological conversion of soybean oil for industrial products. In: *Fats for the future*, Chichester: Ellis Horwood Limited Press, pp 301-307
- 6) Davis E. N., Wallen L. L., Goodwin J. C., Rohwedder W. K. and Rhodes R. A. 1969. Microbial hydration of cis-9-akdenoic acids. *Lipids* 4: 356-362.
- 7) Giesel-Bhler H., Bartsch O., Kneifel H., Sahm H. and Schemid R. 1987. The anaerobic transformation of linoleic acid by *Acetobacterium woodii*. In C. Laane, J. Tramper, & M.D. Lilly(Eds.), *Biocatalysis in organic media* (pp 241-245). *Amsterdam : Elsevier.*
- 8) Hou C. T. 1994. Conversion of Linoleic acid to 10-hydroxy-12-octadecenoic acid by *Flavobacterium* Sp.(NRRL B-14859). *JOACS* 71:975-978
- 9) Koritala S., L. Hosie , Hou C. T., C. W. Hesseltine, and M. O. Bagby. 1989. Microbial conversion of oleic acid to 10-hydroxystearic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 299-304.
- 10) Naughton F. C. 1974. Production, chemistry, and commercial applications of various chemicals from castor oil. *J Am Oil Chem Soc* 51: 65-71.

- 11) **S.H. El-Sharkawy, W. Yang, L. Dostal, and J.P.N. Rosazza.** 1992. Microbial oxidation of oleic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(7):2116-2122
- 12) The Code of Federal Regulations. 1990. 21 CFR 101.22.a3. Food and Drugs, Parts 100-169
- 13) **Wallen L. L., R. G. Benedict, and R. W. Jackson.** 1962. The microbial production of 10-hydroxystearic acid. *Arch Biochem Biophys* 99:249-253.
- 14) **Waché Y., Aguedo M., Choquet A., Gatfield I. L., Nicaud J. M. and Belin J. M.** 2001. Role of β -oxidation enzymes in γ -decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(12): 5700-5704
- 15) **Waché Y., Aguedo M., M. T. Ledall, J. M. Nicaud, and J. M. Belin.** 2002. Optimization of *Yarrowia lipolytica*'s β -oxidation pathway for γ -decalactone production. *J. Molecular Catalysis B : Enzymatic* 19:347-351
- 16) **Yamada Y., Uemura H., Nakaya H., Sakata K. Takatori T., Nagao M, Iwase H. and Iwadate K.**1996. Production of hydroxyl fatty acid(10-hydroxy-12(z)-octadecenoic acid) by *Lactobacillus plantarum* from linoleic acid and its cardiac effects to guinea pig papillary muscles. *Biochem and Biophys Research Communication* 266: 391-395
- 17) **Schroepfer G. J., Niehaus W. G. and McCloskey J. A.** 1970. Enzymatic conversion of linoleic acid to 10D-hydroxy- Δ 12-cis-octadecenoic acid. *J. Biol. Chem.* 245: 3798-3801
- 18) **Susanne H.** 2004. Biofilm formation by the small colony variant phenotype of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* 6(6):546-551
- 19) **Henderson, I. R., P. Owen, and J.P. Nataro.** 1999. Molecular switches the ON and OFF of bacterial phase variation. *Mol. Microbiol.* 33:919-932
- 20) **Eric D., Yves C., and Richard V.**2001. Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in

swimming, swarming, and twitching motilities. *J. Bacteriol.*

18.(4):1195-1204

- 21) **Okui S., Uchiyama M., and Mizugaki M.** 1963a. Metabolism of hydroxyl fatty acids. I. Metabolic conversion of ricinoleic acid by a certain microorganism to 8-D-(+)-hydroxy tetradec-cis-5-enoic acid. *J. Biochem., Tokyo* 53:265-270
- 22) **Okui S., Uchiyama M., and Mizugaki M.** 1963b. Metabolism of hydroxyl fatty acids. II. Intermediates of the oxidative breakdown of ricinoleic acid by genus *Candida*. *J. Biochem., Tokyo* 54:536-540
- 23) **Okui S., Uchiyama M., and Mizugaki M.** 1963c. Characterization of hydroxyl acids in depot fat after feeding of ricinoleic acid. *Biochem. Biophys. Acta.*, 70:344-346
- 24) **Y. Wache, M. Aguedo, J. M. Nicaud, J.M. Belin.** 2003. Catabolism of hydroxyacids and biotechnological production of lactones by *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61:393-404
- 25) **Barth G., Gaillardin C.** 1996. The dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. In: Wolf K (ed) Non-conventional yeasts in biotechnology. *Springer, Berlin Heidelberg New York*, pp314-388
- 26) **Barth G., Gaillardin C.** 1997. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol. Rev.* 19:219-237
- 27) **Gatfield IL.** 1999. Biotechnological production of natural flavor materials In: Teranishi R, Wick EL, Hornstein I(eds) Flavor chemistry, thirty years of progress. *Kluwer, New York*, pp211-227
- 28) **Mega JA.** 1976. Lactones in food. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 8:1-56
- 29) **Dufosse L., Latrasse A., and Spinnler HE.** 1993. Importance des lactones dans les arômes alimentaires : structure, distribution, propriétiessensorielle. *Sci. Aliment* 14:17-50
- 30) **Collins R.P., and Halim A.F.** 1972. Characterization of the major aroma constituent of the fungus *Trichoderma viride*. *J. Agric. Food Chem.* 20:437-438

- 31) **Sarris J., and Latrasse A.** 1985. Production of odoriferous γ -lactones by *Fusarium poae*. *Agric. Biol. Chem.* 49:3227-3230
- 32) **Berger R.G. Neuhauser K., and Drawert F.**1986. Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms. 6. Odorous constituents of *Polyporus durus* (Basidiomycetes). *Z Naturforsch* 41:963-970
- 33) **Tahara S., Fujiwara K., Ishizaka H., Mizutani J., and Obata Y.** 1972. γ -Decalactone one of the constituents in cultured broth of *Sporobolomyces odorosus*. *Agric Biol. Chem.* 36:2585-2587
- 34) **Rosenberg M., D. Gutnick, and E. Rosenberg.** 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 9:29-33
- 35) **Hassett D. F., H., P. Schweizer, and D. E. Ohman.** 1995. *Pseudomonas aeruginosa* sodA and sodB mutants defective in manganese- and iron-cofactored superoxide dismutase activity demonstrate the importance of the iron-cofactored form in aerobic metabolism. *J. Bacteriol.* 177:6330-6337
- 36) **King E. O., M. K. Ward, and D. E. Raney.** 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.* 44:301
- 37) **Hudson J. A., Morvan B. and Joblin K. N.** 1998. Hydration of linoleic acid by bacteria isolated from ruminants. *FEMS Microbiol. Letters* 169: 277-
- 38) **Hou C. T.** 1994. Conversion of linoleic acid to 10-hydroxy-12(z)-octadecenoic acid by *Flavobacterium* sp.(NRRL B-14859). *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71(9):975-978
- 39) **J. Ogawa, K. Matsumura, S. Kishino, and Y. Omura.** Conjugated linoleic acid accumulation via 10-hydroxy-12-octadecenoic acid during microaerobic transformation of linoleic acid by *Lactocillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(3):1246-1252
- 40) **Feron G. DufosséL., Mauvais G. Bonnarme P., and Spimmler H.E.**

1996. Production, identification, and toxicity of gamma-decalactone and 4-hydroxydecanoic acid from *Sporidiobolus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2826-2831

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.