

Gas Chromatographic Profiling법을 이용한 Tridecanedioic Acid를 생산해내는 *Candida tropicalis* Mutant의 탐색연구

김정한* · 이상준 · 박형국 · 김경례¹

연세대학교 공과대학 식품공학과, ¹성균관대학교 약학대학 제약학과

Gas Chromatographic Profiling for the Screening of *Candida tropicalis* Mutant Producing Tridecanedioic Acid

Kim, Jung-Han*, Sang-Jun Lee, Hyoung-Kook Park and Kyoung-Rae Kim¹

Department of Food Engineering, College of Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

¹College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-330, Korea

Abstract — Tridecanedioic acid (DC-13), starting material of the valuable musk ethylene brassylate, was obtained from n-tridecane by the *Candida tropicalis* mutant. The mutants were first obtained from primary screening step using the selective medium and then solid phase extraction sampling method was used for the selective isolation of organic acids from the cultured media of mutants. The resulting acids were directly converted to volatile tert-butylidimethyl silyl derivatives, which were then analyzed by gas chromatography. The efficient GC profiling method was used for the rapid identification of the mutant producing DC-13 in large quantity, and for the optimization of the culture conditions of mutant. The optimal culture conditions were found as follows: pH 8.0, 30°C, 250 rpm, 48 hour of culture and (NH₄)₂HPO₄ as nitrogen source.

탄소수 6~16개의 aliphatic dicarboxylic acid는 polyamide계 수지 polyester계 수지, 내한성가소제, 고성능 윤활유, 도료, 계면활성제, 향료 등으로 다양하게 이용되는 중간체로서(1, 2), 특히 탄소수 12~16개인 dicarboxylic acid(DC)는 향장산업에서 크게 각광받는 musk계 화합물의 중요한 출발물질로 사용된다(3).

이러한 12~16개의 DC를 얻는 방법은 화학적으로는 어려워 최근 미생물을 이용해 얻는 방법들이 연구되어 왔다. DC를 생산하는 미생물들은 *Candida*속을 중심으로 다수의 효모와 bacteria 등이 보고되어 왔다(4-6). 미생물의 DC생산은 탄소원으로 주어진 n-alkane을 이용하는 것으로 이들 미생물은 n-alkane을 분해하여 energy원으로 이용하기 때문에 원하는 n-alkane과 같은 길이의 DC를 생산하지 못한다(7, 8).

따라서 n-alkane과 같은 길이의 DC를 얻기 위해서 야생주를 변이시킨 변이주를 사용해야 한다.

그러나 이러한 DC을 생산하는 변이주는 대체로 원하는 길이의 DC 뿐만 아니라 다른 많은 유기산들을 생산해내기 때문에 기존의 Thin Layer Chromatography(TLC)를 사용한 screening 방법으로는 분리능이 좋지 않고 정량적으로 확인 비교하기가 어려워 최종적인 mutant의 screening 방법으로는 적절하지 못하다. 따라서 주어진 n-alkane과 같은 길이의 DC을 생산하는 mutant의 screening은 선택배지로 대량의 mutants를 1차 screening한 후(7) 최종적으로 gas chromatography(GC)를 이용해 보다 빠르고, 정확하게 분석할 수 있다면 GC의 사용은 screening 방법으로 매우 유용하다. 따라서 GC를 이용하기 위해서는 배양액을 GC로 분석가능한 시료로 신속하고 정확하게 전처리를 해야한다. 최근 흡착제를 이용한 solid-

Key words: Mutant screening, gas chromatographic profiling.

*Corresponding author

phase extraction (SPE) 방법에 의한 시료의 전처리에 관한 연구가 본 연구실에서 보고되었다(11). 이 SPE method는 기존의 sampling 방법(9, 10)과 비교해볼 때 선택적으로 유기산만을 분리, 농축하며 소량의 solvent와 시료가 사용되어 오염이 적고 시간의 소요가 적다는 장점이 있다.

또한, GC분석을 하기 위한 acids의 유도체화는 alkylation, silylation 등의 방법(10, 12)이 있으나 최근에는 기존의 방법의 단점을 보완한 tert-butyl dimethyl silyl(TBDMS)ester 유도체화 방법이 본 연구실에서 보고되었다(13).

본 연구에서는 musk향 중 현재 산업적으로 이용도가 큰 ethylene brassylate의 중요한 중간체가 되는 tridecane dicarboxylic acids(DC-13)를 *Candida tropicalis*를 이용해 얻었다. 균의 배양액 중에서 DCs를 chromosorb P를 이용하여 분리, 농축과 동시에 DCs를 TBDMS 유도체화하여 GC로 분석하였으며, GC workstation을 이용하여 DC의 동정과 정량분석을 수행하였다. 이 방법은 DC-13을 많이 생산하는 변이주를 탐색, 최적화 하는데 이용되었다.

실 험

사용균주

실험에 사용한 균주는 한국종균협회에서 분양받은 *Candida tropicalis* KCCM 32008을 실험하였다.

시약 및 시료

DC-13을 생산하는데 필요한 n-tridecane은(Aldrich Co., U.S.A) 제품을 사용하였으며, 추출용매는 diethyl ether(동양화학 공업주식회사, Korea)를 사용하였으며, 추출된 시료의 건조는 무수 magnesium sulfate (Yakuri Pure Chemical Co., Japan)를 사용하였다. Solid-phase extraction에 쓰인 흡착제는 Chromosorb P(80~100 mesh, acid washed, Supelco Co., U.S.A.)를 사용하였다. 추출된 시료의 acid를 유도체로 만들기 위하여 N-methyl-N-butyl-dimethyl-silyl tri-fluoroacetamide(MTBSTFA, Pierce Co., U.S.A.)를 사용하였다.

변이주의 분리

Candida tropicalis 균을 250 ml 삼각 flask의 25 ml

Table 1. Composition of medium

Medium	Composition(per liter)
YM medium	3g Malt extract 3g Bacto-yeast extract 5g Bacto-peptone 10g Glucose
Tridecane medium I	2g (NH ₄) ₂ HPO ₄ 4g K ₂ HPO ₄ 0.5g MgSO ₄ ·7H ₂ O 1g Bacto-yeast extract 10g FeSO ₄ ·7H ₂ O 8mg ZnSO ₄ ·7H ₂ O 8mg MnSO ₄ ·nH ₂ O filter paper dipped in tridecane
DC-13 medium II	Medium I containing 10g DC-13 instead of filter paper.
Culture medium III	Medium II containing 50 ml tridecane instead of DC-13

YM배지에서 30°C, 24시간 배양한 후 균현탁액 2 ml를 취해서 1 ml 증류수를 첨가하고 원심분리하여 세척해 얻은 cell을 0.01 M phosphate buffer(pH 7.0) 1 ml 용액으로 현탁시켜 petridish에 넣고 10분간 UV(254 nm)로 조사하여 10 µl을 YM배지가 있는 plate에 도말하였다. 30°C에서 24시간 배양한 후 DC-13을 생산하는 변이주를 얻기 위해 각 colony를 Table 1의 선택배지 tridecane medium I과 DC-13 medium II에 접종하여 72시간 배양하여 medium I에서 잘 자라나, II에서는 잘 자라지 않는 colony를 선택하였다.

생산된 DC-13의 분석

분리된 변이주를 250 ml 삼각 flask의 25 ml 배지 III에서 30°C, 48시간 동안 250 rpm으로, 회전배양하여 그 배양액에 1N NaHCO₃를 첨가하여 pH 10.0으로 조절하였다. 그 배양액을 끓는 물속에서 5분간 중탕하여 dicarboxylic acid를 완전히 용해시킨 후, 그 액을 여과하였다. 여과액 2 ml를 동량의 diethyl ether로 3회 추출하여 유기층을 제거한 후 남은 수용액 1 ml를 본 실험실에서 보고한 방법을 사용하여 선택적으로 유기산만을 추출한 후, TBDMS로 유도체화(14)시켜 60°C isothermal reactor에서 1시간 동안 반응시켰다.

분석기기 및 조건

사용한 기기는 HP-5890A gas chromatograph와 HP-3392A integrator 그리고 HP-5895A GC workstation이었으며, column은 미국 J & W사의 DB-5 fused silica capillary column(30 m×0.25 mm I.D., df 0.2 μm)를 사용하였다.

Column의 온도는 200°C에서 2분간 유지한 후 분당 10°C로 상승시켜 280°C에서 30분간 유지하였다. Flame ionization detector(FID)의 온도는 300°C이었고, injection 방법은 split mode를 사용하였고 split ratio는 30 : 1이었으며, 이 때 injection port의 온도는 280°C였다. Column내의 운반기체인 질소가스의 유속은 0.86~0.88 ml/min이었다. 각 시료의 주입량은 0.4~0.5 μl이었고 분리된 peak들의 Retention index 값을 구하기 위해서 0.4 μl의 포화탄화수소 표준용액(isooctane에 100 ppm의 C₈-C₃₂ 함유)을 시료와 함께 주입하였다.

결과 및 고찰

변이주의 분리

탄소원으로 사용되는 n-tridecane의 분해를 적게 하면서 DC-13을 생산하는 변이주를 분리하기 위하여 10분 동안 UV조사하였다. 위의 방법으로 얻은 300주의 colony를 Medium I과 Medium II의 선택배지에 tooth pick로 접종하여 Medium I에서는 잘 자라고 Medium II에서는 자라지 않는 변이주 30종을 분리하였다.

생산된 DC-13의 분석

Diethyl ether를 사용하여 *Candida tropicalis*의 배양액 중 acids 이외의 다른 유기물을 제거해준 후 solid phase extraction 방법을 사용하여 선택적으로 acids만을 분석하였다. Solide Phase Extraction은 기존의 Solvent Extraction 방법(9)과 Ion Exchange resion 방법(10)에 비해서 소량의 시료로 신속하게 sampling할 수 있는 장점을 가지고 있다. GC로 확인하기 위하여 기존의 TMS 유도체보다 만배나 가수분해에 안정한 TBDMS 유도체를 만들어 주었고, acids peak를 동정하기 위해서 본 연구실에서 작성된 생물학적으로 중요한 총 91개(dioic acid : 21개)의 유기산 retention index library를 이용하였다(16). *C. tropicalis* KCCM 32008과 UV조사하여 얻은 변이주

Table 2. DC-13 produced by *C. tropicalis* KCCM 32008 and mutants

Strain No.	Amount of DC-13 (mg/l)
KCCM 32008	ND*
Mutant-1	2500
Mutant-2	2200
Mutant-3	800

ND*: Not detected

3종의 DC-13을 GC로 분석한 chromatogram은 Fig. 1과 같았으며, 생산량의 비교는 Table 2와 같았다. 그 중에서 mutant I이 DC-13의 생산량이 가장 많았으므로 이 균의 최적배양 조건을 구하였다.

최적배양 조건의 검토

배양일수의 영향 : Medium II(Table 2)에 *C. tropicalis* M-1을 접종한 후 30°C에서 250 rpm 진탕배양하면서 배양일수에 따른 DC-13 생산량의 변화를 검토한 결과 Table 3에서와 같이 48시간 배양시 최대 생산량을 보였고 시간이 지남에 따라 감소하였다. 72시간 배양시 DC-13의 생산량은 거의 없음을 확인하였다. 배양한 균의 생육정도를 알기 위해 배양액을 증류수로 10배 희석한 후 spectrophotometer를 사용하여 측정하였다.

Initial pH의 영향 : Medium III의 pH를 6으로 조정하고 30°C, 48시간 배양결과 균의 생육이 좋지 않을 뿐 아니라 생산된 DC-13의 양도 매우 적음을 알 수 있었다. 반면 medium의 pH를 8로 조절하여 배양한 결과 생육도 좋고 생산된 DC-13의 양도 많은 것을 Table 4에서 알았다. 이러한 결과로 *C. tropicalis*균이 acidic한 상태의 medium에서는 생육이 저해되며 DC-13의 생산도 적고, 중성 상태에서 생육이 좋고 많은 DC-13을 생산하였다.

배양온도에 따른 영향 : 배양온도에 따른 *C. tropicalis*가 생산한 DC-13 양을 검토하기 위해 온도를 25~40°C로 변화시켜 배양한 결과 Table 5와 같이 30°C에서 가장 많은 DC-13이 생산됨을 볼 수 있었다. 또 균의 성장과 DC-13의 관계를 살펴보면 35°C일 때 균의 성장이 가장 좋았고 pH도 가장 낮은데도 생산된 DC-13의 양은 적었다. 이 결과로 균의 성장과 DC-13의 생산량은 일치하지 않음을 확인하였다.

교반속도의 영향 : 회전 rpm을 150~250으로 변

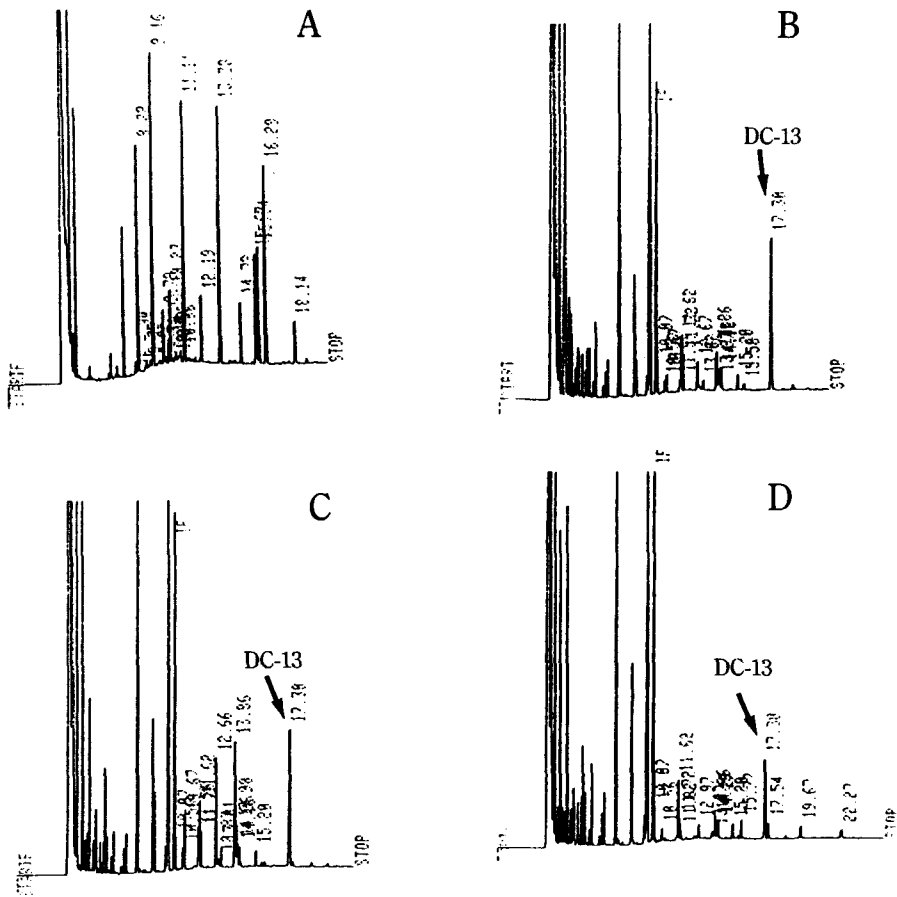


Fig. 1 DB-5 organic acids profile of microbial product.

A: *C. tropicalis* KCCM 32008; B: mutant-1; C: mutant-2; D: mutant-3

Table 3. Effects of cultivation time on the DC-13 production

Culture time	Growth (O.D. 562 nm)	Final pH	DC-13 (mg/l)	Rate of conversion
24	0.375	7.1	ND	ND
48	0.890	5.4	1,200	2.4%
60	1.010	5.1	800	1.6%
72	1.135	4.2	ND	ND

ND: Not detected

화시켜 배양해 교반속도에 따른 생산된 DC-13의 양을 검토한 결과 Table 6과 같이 교반속도가 빠르면 균의 성장과 전체적인 acid생산이 좋을 뿐 아니라 DC-13 역시 많이 생산되었음을 확인했다. 상기 결과로 볼 때 균주의 액체배양시 탄소원으로 n-tridecane을 사용하기 때문에 균체가 존재하는 수용액 층과 분리되

Table 4. Effects of pH on the DC-13 production

Initial pH	Growth (O.D. 562 nm)	DC-13 (mg/l)	Rate of conversion
6	0.580	100	0.2%
7	0.860	550	1.1%
8	0.910	1350	2.6%
9	0.890	1000	2.0%

(Culture time: 48 h)

므로 빠른 속도로 교반해 주어서 균체와 n-tridecane의 접촉을 빈번하게 하고 산소 공급을 촉진시켜서 균의 성장과 DC-13의 생산은 증가되었다.

질소원의 영향: DC-13 생산배지 III 중에 탄소원을 달리하여 생산된 DC-13의 양을 검토하였다. 질소원으로는 Table 7에서 보듯 $(NH_4)_2HPO_4$ 사용시 생산된 DC-13의 양이 다른 질소원에 비해 증가하였다. 이러

Table 5. Effects of temperature on the DC-13 production

Temperature	Growth (O.D. 562 nm)	Final pH	DC-13 (mg/l)	Rate of conversion
25	0.820	5.4	1500	3.0
30	0.850	5.4	1900	3.8
35	0.910	4.8	1300	2.6
40	0.810	5.1	800	1.6

(Culture time: 48 h)

Table 6. Effects of rpm on the DC-13 production

RPM	Growth (O.D. 562 nm)	Final pH	DC-13 (mg/l)	Rate of conversion
150	0.340	7.0	100	0.2
200	0.780	6.1	700	1.4
250	0.930	5.5	2000	4.0

(Culture time: 48 h)

Table 7. Effects of nitrogen source on the DC-13 production

Nitrogen source	Growth (O.D. 562 nm)	Final pH	DC-13 (mg/l)	Rate of conversion
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1.010	5.7	1800	3.6
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.820	6.1	1000	2.0
NH ₄ Cl	0.156	7.4	ND	ND
NH ₄ NO ₃	0.450	7.1	100	0.2

(Culture time: 418 h); ND: Not detected

한 결과는 균체가 DC-13 생성시 배양액이 산성으로 변화하기 때문에 균체의 생육이 저하되고 생성되는 DC-13의 양의 감소하게 된다. 이것을 방지하기 위해 질소원으로 (NH₄)₂HPO₄를 첨가하므로 배양액의 pH 변화를 phosphate ion의 완충작용으로 감소시켜 준다는 Shio, Uchio의 보고(8)와 일치하였다.

요 약

*C. tropicalis*를 UV조사한 후 selective medium을 통해 1차 screening해 얻은 변이주 30주의 배양액의 acid를 Chromosorb P를 이용한 solid phase extraction sampling 방법과 TBDMS derivatization method를

이용하여 신속하게 분리, 정제하고 retention index library로 확인하여 n-tridecane에서 DC-13을 고순도로 많은 양을 생산하는 변이주를 빠른 시간에 정확하게 탐색할 수 있었다.

또한 배양온도, 배양속도, pH, 배양일수, 질소원 등의 각각 조건에서 균을 배양해 생산된 DC-13를 상기의 방법으로 정량, 정성 분석함으로써 최적배양 조건을 검토하는데 유용하였다.

참고문헌

- Magat E.E. and R.E. Morrison: *Chem. Tech.*, **6**, 702 (1976)
- Korshak, V.V. and S.V. Vinogradova: *Polyesters*, B.J. Hazzard, Trans. Pergamon Press, Oxford (1965)
- Ito, Y. and T. Saegusa: *J. Org. Chem.*, **42**, 2326 (1977)
- Uemura, N.: *Hakko to Kogyo*, **43**, 438 (1985)
- Furukawa, T.: *J. Ferment. Technol.*, **58**, 05 (1980)
- Thijisse, G.J.E.: *Biochem. Biophys. Acta.*, **84**, 195 (1964)
- Okuhara, M., Y. Kubochi and T. Harada: *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 1376 (1971)
- Shio, I. and R. Uchio: *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 2033 (1971)
- Harvay, D.J., J.M. Tiffany, J.M. Duerden, K.S. Pandher and L.S. Menger: *J. Chromatogr.*, **414**, 253 (1987)
- Dietel, P., C. Holzel, K. Schneider and G. Spitteler: *J. Chromatogr.*, **422**, 1 (1987)
- 김경례, 한미경: *대한약학회지*, **32**, 6 (1988)
- Steffenrud, S. and P. Borgeat: *J. Chromatogr.*, **416**, 219 (1987)
- Kim, K.R., A. Zlatkis, E.C. Horning and B.S. Middleditch: *J. HRC & CC*, **28**, 522 (1987)
- Kim, K.R., M.K. Hahn, J.H. Kim and Park: *Proceeding of the Third Korea-Japan Joint Symposium on Analytical Chemistry*, 119 (1989)
- de Jong, A.P.J.M., J. Elema and B.J.T. Van der Berg: *Biochemical Mass Spectrometry*, **7** (1980)
- 김경례, 김정환, 박형국: *대한약학회지*, **34**, 352 (1990)
- Schooley, D.J., F.M. Kubiak and J.V. Evans: *J. Chromatogr. Sci.*, **23**, 385 (1985)

(Received February 10, 1991)