

Pseudomonas sp. CH-414에 의한 Eicosapentaenoic Acid 생산

김창호 · 홍억기 · 신원철*

강원대학교 발효공학과 및 생물산업소재연구센터

Production of Eicosapentaenoic Acid by *Pseudomonas* sp. CH-414

Chang-Ho Kim, Eock-Kee Hong and Won-Cheol Shin*

Department of Fermentation Engineering, Kangwon National University
Bioproducts Research Center, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract — The identification of eicosapentaenoic acid (EPA) by *Pseudomonas* sp. CH-414 were investigated under the optimal culture conditions. The maximum dry cell weight and phospholipid production showed about 10 mg/ml and 0.6 mg/ml, respectively, at the 48 hr cultivation. The phospholipid form produced by *Pseudomonas* sp. CH-414 was elucidated as a phosphatidyl ethanolamine by thin layer chromatography. EPA was contained about 15% in the extractable lipid, and the amount of EPA was about 83 µg/ml from the culture broth. Also myristic, palmitic, palmitoleic, stearic and oleic acids were identified with gas chromatography.

Eicosapentaenoic acid(EPA)는 ω -3 지방산의 일종으로 5, 8, 11, 14, 17 위치에 불포화 결합 5개를 가지고 있는 탄소수 20개의 고도 불포화지방산이다(1). 이러한 EPA는 생체내에서 대부분 인지질의 형태로 존재하며(2) 여러가지 약리작용이 있는 것으로 알려져 있다. 예를 들면 Goodnight 등(3)은 혈소판 응집 저해작용을, Iritani 등(4)은 혈소판 응집저해와 혈압 강하작용을, Harris 등(5)과 Nestel 등(6)은 혈장 중성지방 농도를 감소시킨다고 보고하였으며 그 외 항염증 효과(7)와 항종양 작용(8, 9)도 알려져 있다.

이러한 효과가 있는 EPA는 동식물의 유지에는 존재하지 않고 등푸른 생선인 정어리, 고등어 및 청어 등에 많이 함유되어 있다고 밝혀졌으나(10), 생선으로부터 EPA를 생산하는 것은 원료의 공급이나 추출물의 비린내로 인한 제품에 문제점이 있어서(11) 미생물을 이용한 EPA 생산이 많이 시도되고 있다. 특히 Shimizu 등(12-14), Shinmen 등(15) 및 Jareonkitmongkol 등(16)은 *Mortierella* 속의 곰팡이를 이용한 EPA 생산을 보고하였고 최근에는 Yazawa 등(17, 18)과 Akimoto 등(19)에 의하여 해양세균인 *Alteromonas* 속에 의한 EPA 생산을 보고한 바 있다.

본 연구는 미생물을 이용한 EPA 생산을 목적으로 전보에서(20) 분리된 *Pseudomonas* sp.를 이용하여 인

지질의 생산성과 EPA의 분리, 확인에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양조건

사용균주는 Shin 등(20)이 분리한 *Pseudomonas* sp. CH-414를 사용하였다. 균주의 배양은 glucose 1.5%, yeast extract 3.0%, sea water 20%(v/v)(pH 7.0)를 사용하여 20°C에서 진탕배양하면서 인지질의 생산성을 검토하였다.

건조균체량의 측정 및 인지질의 정량

건조균체량은 550 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선으로부터 구하였고 인지질의 정량은 Fiske-Subbarow 방법(21)을 이용하여 측정하였다.

인지질의 추출 및 확인

배양액을 5000×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 균체를 Bligh 등(22)의 방법으로 chloroform : methanol=1 : 2(v/v)를 첨가하여 30분간 방치한 후 다시 원심분리하여 chloroform 층을 분리하고 진공증발기에서 증발시켜 인지질을 추출하였다.

인지질의 확인은 추출한 인지질과 표준 인지질(phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl glycerol)을 TLC(silica gel 60) plate에 spot하여 CHCl_3 : Me-

Key words: Eicosapentaenoic acid, *Pseudomonas* sp. CH-414

*Corresponding author

OH : acetic acid : H₂O = 100 : 25 : 15 : 5(v/v)의 전개용매에서 전개시킨 후 Dittmer와 ninhydrin 용액으로 정색반응을 비교하여 관찰하였다.

EPA의 추출 및 확인

배양액을 원심분리하여 얻은 균체를 사용하여 Yazawa 등(17)의 방법에 따라 EPA를 추출하였다.

EPA의 확인은 표준 EPA와 같이 TLC plate에 spot 하고 hexane : ether = 18 : 1(v/v)의 용매계를 사용하여 전개시킨 후 요오드 반응으로 비교 관찰하였다. EPA의 gas chromatography(Capillary column 0.24 mm×30 m, FID, Shimadzu, Japan)는 50°C에서 분당 3°C씩 상승시켰고 질소를 carrier gas로 사용하였으며 분당 1.5 ml씩 통과시켰다.

결과 및 고찰

인지질의 생산 및 확인

인지질의 생산 *Pseudomonas* sp. CH-414 균주를 사용하여 균체생육 및 인지질 생산을 검토한 결과는 Fig. 1과 같다. 균체생육과 인지질의 생산은 배양 12시간에서부터 시작되어 48시간에서 최대에 도달하였다. 배양 48시간 후에 균체의 생산량은 약 10 mg/ml이었고 인지질의 생산은 약 0.6 mg/ml를 나타내었다. 배양시간에 따른 pH의 변화는 초기 pH 7.0에서 48시간 후에는 8.2를 나타내어 배양시간에 따라서 약간 증가하는 경향을 보였다.

인지질의 확인 Yazawa(18)에 의하면 EPA는 90% 이상이 생체내에서 인지질의 형태로 존재한다는 보

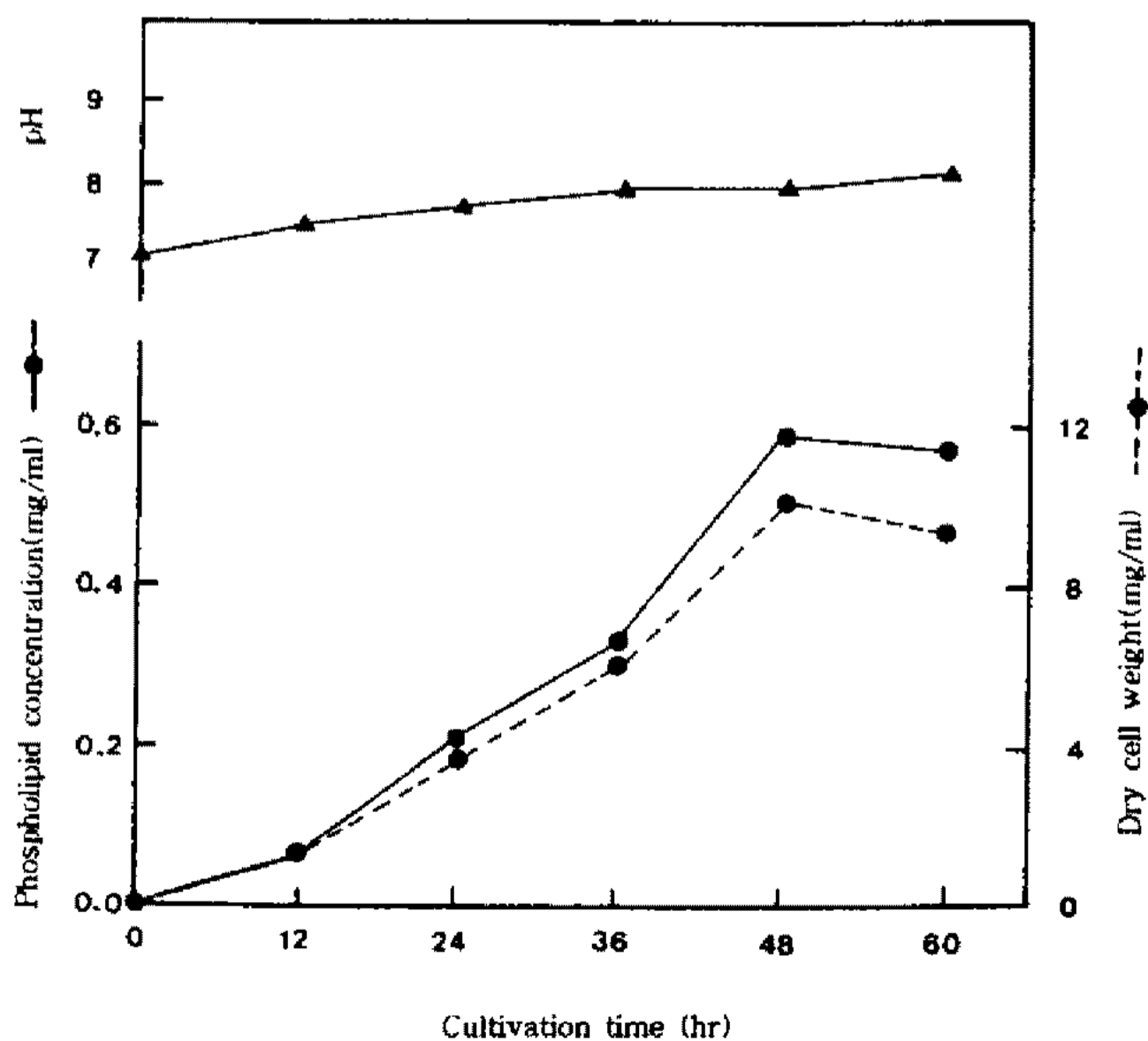


Fig. 1. Time courses of the growth and phospholipid production by *Pseudomonas* sp. CH-414.

고에 따라, 표준 인지질과 추출한 인지질을 TLC plate에서 정색반응을 비교한 결과는 Fig. 2와 3과 같다. *Pseudomonas* sp. CH-414로부터 추출한 지질은 Dittmer 반응에서 청색을 나타내어 인지질 형태로 존재함을 알 수 있었다. 또한 ninhydrin 반응은 적색을 나타내었고 R_f 값도 동일하여 인지질 중에서도 phosphatidyl ethanolamine 형태로 존재한다고 생각되었다. Yazawa(18)는 *Alteromonas* 속 SCRC-2738에서 phosphatidyl ethanolamine과 phosphatidyl glycerol을 분리 확인하였는데 본 분리균주는 phosphatidyl ethanolamine만 확인되었다. 이러한 결과의 차이는 생산균주가 다르기 때문이라고 생각되었다.

EPA의 확인 및 정량

EPA의 확인 *Pseudomonas* sp. CH-414로부터 EPA를 추출하여 표준 EPA와 같이 전개시킨 결과, Fig. 4에서 보는 바와 같이 표준 EPA와 동일한 0.66의 R_f 값을 나타내었다.

균체로부터 분리한 EPA의 gas chromatography



Fig. 2. Comparison of R_f values between the standard and sample from *Pseudomonas* sp. CH-414 by thin layer chromatography.

Solvent: CHCl₃-MeOH-Acetic acid-H₂O (100:20:12:5, v/v)

Detection: Dittmer reaction

A: Phosphatidyl ethanolamine

B: Phosphatidyl glycerol

C: Sample

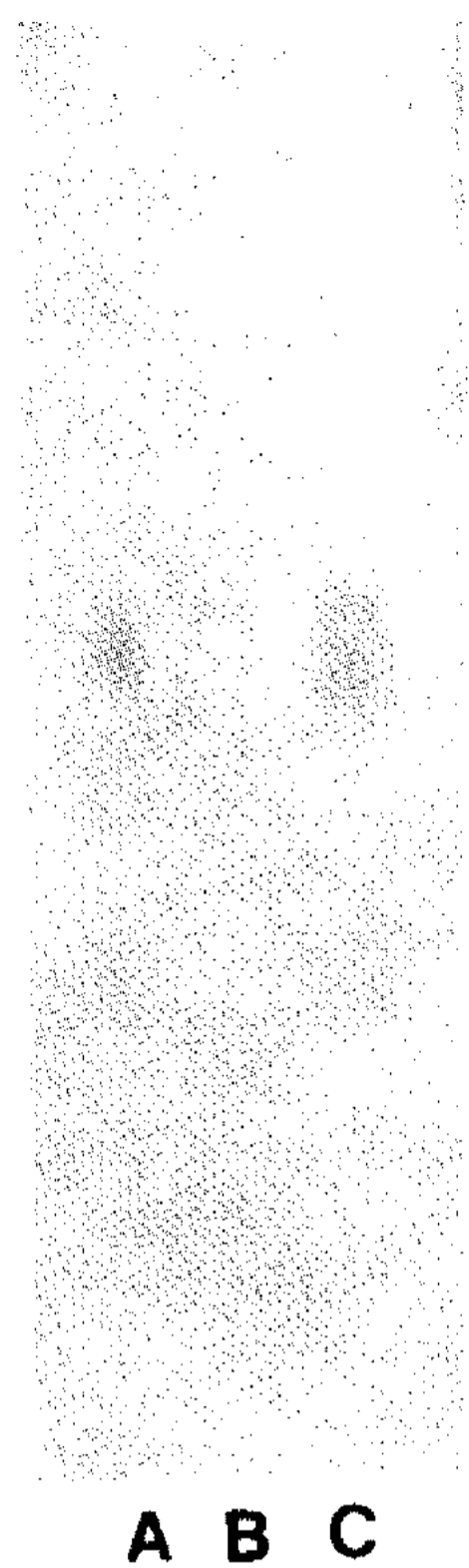


Fig. 3. Comparison of R_f values between the standard and sample from *Pseudomonas* sp. CH-414 by thin layer chromatography.

Solvent: CHCl_3 -MeOH-Acetic acid- H_2O (100:20:12:5, v/v)

Detection: Ninhydrin reaction

A: Phosphatidyl ethanolamine

B: Phosphatidyl glycerol

C: Sample

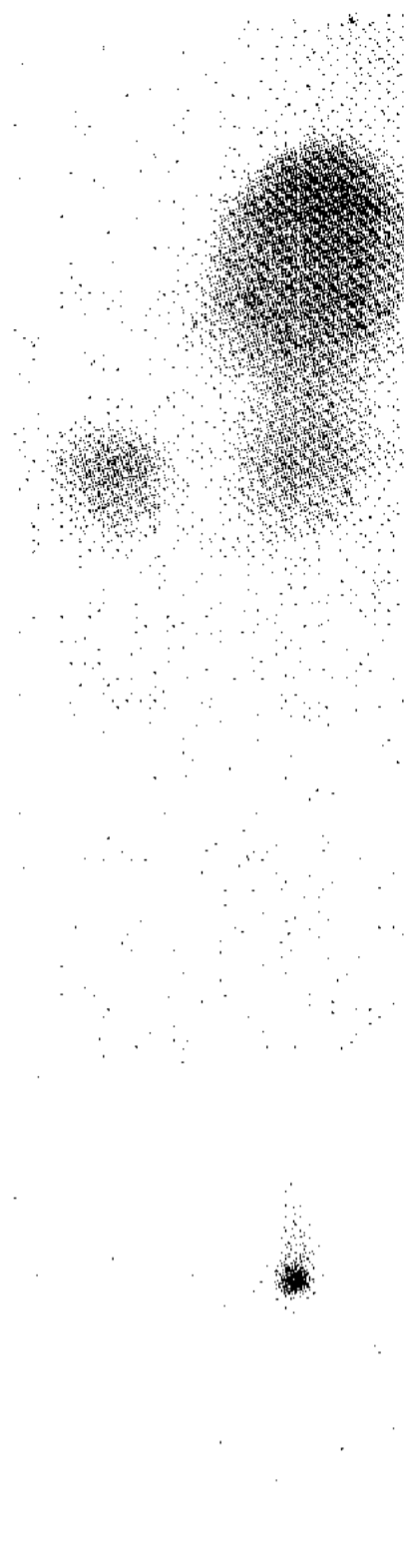


Fig. 4. Comparison of R_f values between the standard and sample from *Pseudomonas* sp. CH-414 by thin layer chromatography.

Solvent: Hexane-Ether (18:1, v/v)

Detection: Iodine reaction

A: EPA

B: Sample

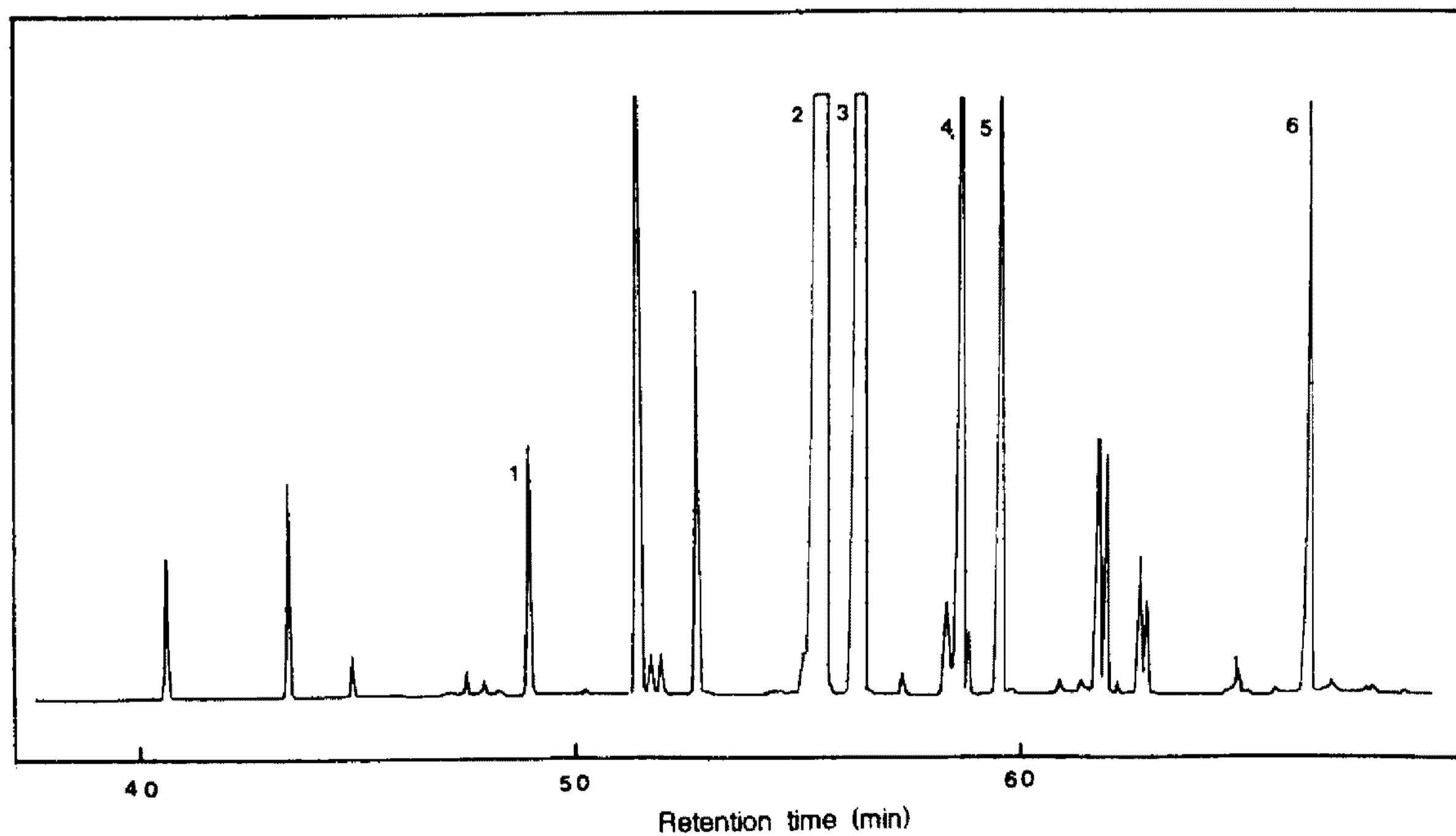


Fig. 5. Gas chromatogram of fatty acids produced by *Pseudomonas* sp. CH-414.

1: myristic acid, 2: palmitic acid, 3: palmitoleic acid, 4: stearic acid, 5: oleic acid, 6: eicosapentaenoic acid

결과를 Fig. 5에 나타내었다. 표준 EPA의 retention time은 67분이었고 분리한 EPA도 동일한 retention time에서 peak를 나타내었으며 그 외 myristic, palmitic, palmitoleic, stearic 및 oleic acid 등이 함유되어 있었다.

EPA의 정량 *Pseudomonas* sp. CH-414 균주를 배양하여 추출한 EPA를 gas chromatography로 정량하면 약 83 µg/ml(8.4 mg/g dry cell)이었으며 전체 인지질 중에는 약 15%의 EPA가 함유되어 있는 것으로 확인되었다.

Yazawa 등(17)은 *Alteromonas* 속 SCRC-2738에서 20~40 mg/l의 EPA 생산성을 보고하였고 Oda와 Uematsu(23)는 동일 균주의 EPA 생산 최적조건을 검토하여 250 mg/l의 EPA 생산을 보고하였다. 이와 같은 결과와 비교하여 볼 때 본 실험에서 분리된 *Pseudomonas* sp. CH-414의 EPA 생산량은 Oda와 Uematsu(23)가 보고한 생산량의 1/3 정도이나 배양방법이나 추출조건 등을 검토하면 생산성이 증가될 것으로 생각된다.

요 약

Pseudomonas sp. CH-414를 이용하여 EPA의 최적 생산조건에서 배양하고 분리 정제를 행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

균체 생육과 인지질의 생산은 48시간에서 최대에 도달하였으며 균체 생산량은 약 10 mg/ml, 인지질의 생산량은 약 0.6 mg/ml이었다.

인지질은 TLC 분석 결과 phosphatidyl ethanolamine의 형태로 존재하였다.

Pseudomonas sp. CH-414가 생산하는 지질에는 약 15%의 EPA가 함유되어 있었으며 EPA 외에 myristic, palmitic, palmitoleic, stearic 및 oleic acid 등이 확인되었다.

감사의 말

이 논문은 1993년도 학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. Bang, H.O., J. Dyerberg, and H.M. Sinclair. 1980. The composition of the Eskimos food in North Western Greenland. *Am. J. Clin. Nutr.* **33**: 2657-2661.

2. Neuringer, M., W.E. Conner, C.V. Petten, and L. Barstad. 1984. Dietary omega-3 fatty acid deficiency and visual loss in infant Rhesus monkeys. *J. Clin. Invest.* **37**: 272-276.
3. Goodnight, S.H., W.S. Harris, and W.E. Conner. 1981. The effect of dietary ω -3 fatty acid on platelet composition and function in man: A prospective, controlled study. *Blood* **58**: 880-885.
4. Iritani, N., K. Inoguchi, M. Endo, E. Fukuda, and M. Morita. 1980. Identification of shellfish fatty acids and their effects on lipogenic enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.* **618**: 378-381.
5. Harris, W.S., W.E. Conner, S.B. Inkeles, and D.R. Illingworth. 1984. Dietary omega-3 fatty acid prevent carbohydrate-induced hypertriglyceridemia. *Metabolism* **33**: 1016-1019.
6. Nestel, P.J., W.E. Conner, M.F. Reardon, S. Conner, S. Wong, and R. Boston. 1984. Suppression by diets rich in fish oil of very low density lipoprotein production in man. *J. Clin. Invest.* **74**: 82-89.
7. Robinson, D.R., J.D. Prickett, G.T. Makoul, A.D. Steinberg, and R.B. Colvin. 1986. Dietary fish oil reduces progression of established renal disease in (NZBX NZW)F1 mice and delay renal disease in BXSb and MRL/1 strain. *Arthritis Rheum.* **29**: 539-546.
8. Braden, L.M. and K.K. Carroll. 1986. Dietary polyunsaturated fat in relation to mammary carcinogenesis in rats. *Lipids* **21**: 285-288.
9. Reddy, B.S. and H. Maruyama. 1986. Effect of dietary fish oil on aroxy methane: induced colon carcinogenesis in male F344 rats. *Cancer Res.* **46**: 3367-3370.
10. Ahn, B.H. and H.K. Shin. 1987. Fatty acid composition and content of omega-3 polyunsaturated fatty acids of major fishes caught in Korean seas. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **19**: 181-187.
11. Haagsman, N., C.M. van Gent, J.B. Luten, R.W. de Jong, and E. van Doorn. 1982. Preparation of omega-3 fatty acid concentrate from cod liver oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **59**: 117-118.
12. Shimizu, S., Y. Shinmen, H. Kawashima, K. Akimoto, and H. Yamada. 1988. Fungal mycelia as a novel source of eicosapentaenoic acid. Activation of enzyme(s) involved in eicosapentaenoic acid production at low temperature. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **150**: 335-341.
13. Shimizu, S., H. Kawashima, Y. Shinmen, K. Akimoto, and H. Yamada. 1988. Production of eicosapentaenoic acid by *Mortierella* fungi. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **65**: 1455-1459.
14. Shimizu, S., H. Kawashima, K. Akimoto, Y. Shinmen, and H. Yamada. 1989. Conversion of linseed oil to an eicosapentaenoic acid-containing

- oil by *Mortierella alpina* 1S-4 at low temperature. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 1-4.
15. Shinmen, Y., H. Kawashima, S. Shimizu, and H. Yamada. 1992. Concentration of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in an arachidonic acid-producing fungus, *Mortierella alpina* 1S-4, grown with fish oil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 301-304.
16. Jareonkitmongkol, S., S. Shimizu, and H. Yamada. 1993. Production of an eicosapentaenoic acid-containing oil by a 12 desaturase-defective mutant of *Mortierella alpina* 1S-4. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **70**: 119-123.
17. Yazawa, K., K. Araki, N. Okazaki, K. Watanabe, C. Ishikawa, A. Inoue, N. Numao, and K. Kondo. 1988. Production of eicosapentaenoic acid by marine bacteria. *J. Biochem.* **103**: 5-7.
18. Yazawa, K. 1989. 海洋細菌によるEPAの生産と利用. *Bio Industry.* **6**: 491-501.
19. Akimoto, M., T. Ishii, K. Yamagaki, K. Ohtaguchi, K. Koide, and K. Yazawa. 1990. Production of eicosapentaenoic acid by bacterium isolated from mackerel intestines. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **67**: 911-915.
20. Shin, W.C., C.H. Kim, and E.K. Hong. 1994. Isolation, identification and culture conditions of the strain producing eicosapentaenoic acid. *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 338-342.
21. Boyer, R.F. 1986. *Modern Experimental Biochemistry*. Pp. 393-394. Addison Wesley Publishing Company, Inc. Reading, Massachusetts.
22. Kates, M. 1986. *Techniques of lipidology*, Pp. 106-107. Elsevier.
23. Oda, A, and G. Uematsu. 1989. Production of eicosapentaenoic acid by marine bacteria. *J. TO-SOH. Res.* **33**: 85-91.

(Received 10 December 1994)