

Flavobacterium sp. Strain DS5에 의한 Oleic Acid로부터 산화불포화 지방산의 생산 및 분석

송병섭¹ · 한남수² · 이봉희¹ · Ching T. Hou³ · 김범수^{1*}

¹충북대학교 공과대학 화학공학부, ²충북대학교 농과대학 식품공학과, ³National Center for Agricultural Utilization Research, United States Department of Agriculture, Peoria, IL 61604, USA.

Production and Analysis of Oxygenated Unsaturated Fatty Acids from Oleic Acid by *Flavobacterium* sp. Strain DS5

Byung-Seob Song¹, Nam Soo Han², Bong Hee Lee¹, Ching T. Hou³, and Beom Soo Kim^{1*}

¹Department of Chemical Engineering, College of Engineering, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea. ²Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea. ³National Center for Agricultural Utilization Research, United States Department of Agriculture, Peoria, IL 61604, USA.

Abstract Vegetable oils are desirable inexpensive feedstocks for various bioproducts. The content of unsaturated fatty acids such as oleic and linoleic acids are 22% and 55% for soybean oil, 26% and 60% for corn oil, and 61% and 21% for canola oil, respectively. Keto and hydroxy fatty acids are useful industrial chemicals, used in plasticizer, surfactant, lubricant and detergent formulations because of their special chemical properties such as higher viscosity and reactivity compared with other fatty acids. In this study, a microbial isolate, *Flavobacterium* sp. strain DS5 (NRRL B-14859), was used to convert oleic acid to 10-ketostearic acid (10-KSA) via 10-hydroxystearic acid (10-HSA). Two bioconversion products, 10-KSA and 10-HSA, were quantitatively and qualitatively analyzed using gas chromatography, gas chromatography-mass spectrometry, and ¹H- and ¹³C-nuclear magnetic resonance. The maximum production of 10-KSA and 10-HSA in flask cultures were 3.4 g/L and 0.5 g/L, respectively. The optimum concentrations of glucose and yeast extract, addition time and volume of oleic acid for 10-KSA production were less than 20 g/L, more than 5 g/L, 18 h and 0.3 ml/50 ml, respectively.

Keywords: oxygenated unsaturated fatty acid, *Flavobacterium* sp. strain DS5, 10-ketostearic acid, 10-hydroxystearic acid, oleic acid

서 론

최근 white biotechnology로 대변되는 산업 생명공학의 발전과 더불어 식물성 오일 등 저가의 천연자원으로부터 고부가가치 화합물 및 연료 생산, 생분해성 고분자, 효소 등의 생산 및 응용에 대해 활발한 연구가 수행되고 있다.

식물성 오일은 다른 원료물질들에 비해 비교적 값싼 물질로써 생물 산업분야에서 매우 매력적인 원료이다. 미국의 경우 매년 약 18억 파운드의 콩기름이 생산되고 이 가운데 300만 파운드 이상이 소비되지 않고 남아 이를 어떻게 유용한 고부가가치 제품으로 만드는지에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(1). 식물성 오일의 주성분인 oleic acid와 linoleic acid와 같은 불포화 지방산의 함량은 콩기름의 경우 각각 22%와 55%, 옥수수기름의 경우 26%와 60%, 유채기름의 경우 61%와 21%에 달한다(1).

미생물 변환을 통해 불포화 지방산의 탄소 이중결합에

*Corresponding author

Tel: +82-43-261-2372, Fax: +82-43-269-2370
e-mail: bskim@chungbuk.ac.kr

hydroxy나 keto group과 같은 functional group 들을 도입하여 산화불포화 지방산으로 변환시키는 연구가 오래전부터 보고되어 왔다. Hydroxy나 keto group으로 치환된 불포화 지방산들은 다른 지방산에 비해 높은 점도와 반응성 등의 특별한 화학적 특성 때문에 수지, 나일론, 왁스, 플라스틱 부식방지제, 화장품, 코팅, 윤활유 등 폭넓은 분야에 사용된다(2). Wallen 등(3)은 *Pseudomonas* sp.를 이용해 oleic acid로부터 10-hydroxystearic acid (10-HSA)를 14%의 수율로 변환시킴을 보고하였고, Schroepfe 등(4-6)은 이 반응의 반응 메커니즘, 기질 특이성, 입체화학에 대해 보고하였다. 그 후 *Rhodococcus rhodochrous*(7), *Nocardia cholesterolicum*(8), *Micrococcus leteus*(9), *Sarcina lutea*(10) 등의 미생물들을 이용하여 oleic acid로부터 주 생성물로 10-HSA, 부 생성물로 10-ketostearic acid (10-KSA)가 생산됨이 보고되었으며, *Corynebacterium* sp.(11), *Mycobacterium* 및 *Nocardia* strains(12), *Staphylococcus* sp.(13) 등을 이용하여 oleic acid로부터 주 생성물로 10-KSA가 생산됨이 보고되었다. 최근에는 *Bacillus megaterium* ALA2를 이용하여 dihydroxy, trihydroxy, epoxy group 등을 갖는 다양한 산화불포화 지방산들이 생성되는 것이 보고되었다(1).

본 연구에서는 Hou 등(14-16)이 분리한 *Flavobacterium* sp. DS5를 이용하여 oleic acid로부터 10-KSA와 10-HSA를 효율적으로 생산하기 위한 기초 연구를 수행하였다. 생산된 지방산을 정제하여 gas chromatography (GC), gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), ^1H -nuclear magnetic resonance (NMR), ^{13}C -NMR 등의 정량 및 정성 분석을 실시하여 10-KSA와 10-HSA의 합성을 확인하였으며, *Flavobacterium* sp. DS5의 플라스크 배양을 통해 배지 중의 최적 포도당 및 yeast extract 농도, oleic acid 첨가시간 및 첨가량을 결정하였다.

재료 및 방법

균주

본 실험에서 사용한 균주는 *Flavobacterium* sp. strain DS5 (NRRL B-14859)이었고, 이 균주는 미국 농무부 National Center for Agricultural Utilization Research (NCAUR)로부터 제공되었다.

배지 및 배양

균주의 보존을 위해 tryptone 0.8%, glucose 0.1%, yeast extract 0.4%, agar 1.5-3% 조성의 TGY agar 배지를 사용하였다. 접종용 균주의 배양은 glucose 10 g/L, yeast extract 5 g/L, K_2HPO_4 5 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, ZnSO_4 0.014 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.008 g/L, Nicotinic acid 0.01 g/L 조성의 SMD 배지(14)를 사용하였다.

Flavobacterium sp. strain DS5의 플라스크 배양은 SMD 배지에서 glucose와 yeast extract 농도를 각각 3-50 g/L 까지 변화시키면서 실험하였다. TGY agar plate에서 자란 단일 균체를 SMD 배지 50 ml이 들어 있는 250 ml 플라스크에 접종시킨 뒤 30°C에서 200 rpm으로 하루 동안 진탕 배양시켰다. 다시 SMD 배지 50 ml에서 glucose와 yeast extract 농도를 변화시킨 250 ml 플라스크에 2% (v/v)의 농도로 접종 시킨 뒤 실험하였다.

분석 및 정제

균체 성장 및 초기 비성장속도를 구하기 위해 UV-Visible spectrophotometer (Shimadzu, UV-1650PC)를 이용하여 600 nm에서 optical density (OD)를 측정하였다.

생산된 지방산 시료의 정제 방법은 다음과 같다. 미생물 변환이 끝난 배양액에 6N HCl 1 ml를 첨가하여 pH 2까지 산성화시키고, internal standard (IS)로 0.1 g palmitic acid/ml ethyl acetate 용액 100 μl 를 첨가한 뒤, 배양액 50 ml 당 150 ml의 ethyl acetate 용매를 첨가하여 지방산 추출 후, 유기용매 층을 분리하여 용매를 증발시켜 시료를 정제하였다.

생산된 지방산의 구조 분석을 위해 정제된 시료 2 mg을 1 ml의 CDCl_3 에 녹인 후 ^1H 와 ^{13}C NMR (Bruker, Avance 500 MHz) 분석을 실시하였고, 10 ml의 50% dichloromethane/50% (95% ethyl acetate/5% methanol) 용매로 녹인 후 1 ml를 채취하여 diazomethane으로 methylation 시킨 뒤 GC (Agilent, 6890N)와 GC-MS (Agilent, 6890N-MSD)로 정량 및 정성분석을 실시하였다.

지방산의 methylation을 위한 diazomethane은 Aldrich사에서 제조하나 보존 기간이 짧고 반응성, 휘발성이 매우 높아 미국 내에서만 판매가 되고 국내에 수입이 금지된 품목이기 때문에 Aldrich사의 diazald로부터 제조하여 사용하였다(17). 시료가 들어있는 vial에 과량의 diazomethane을 넣은 후 약 5분간 상온에서 유지하면 반응이 완료되고 N_2 로 건조 후 1 ml의 용액 (methylene chloride : methanol = 95 : 5)에 녹인 후 1 μl 를 GC에 주입하였다. GC 분석을 위해 HP-5 비극성 column (diphenyl-dimethylpoly-siloxane capillary column, 30 m length, 0.32 mm inner diameter, 0.25 μm thickness)을 사용하였고, carrier gas는 N_2 를 3 ml/min로 공급하였고, 검출기는 flame-ionization detector (FID)를 사용하였다. Column은 초기 온도 160°C에서 3 min 유지 후 8°C/min으로 250°C까지 상승시켰다(total time = 19.25 min). 주입부와 검출부의 온도는 각각 270°C와 280°C였다.

결과 및 고찰

10-KSA 및 10-HSA 분석

GC와 GC-MS의 분석 시 IS로 사용된 palmitic acid의

경우 8.95 min에서 peak가 검출되었고, oleic acid의 경우 11.02 min, stearic acid의 경우 11.29 min에서 검출되었다 (Fig. 1). 생성된 10-KSA는 13.24 min, 10-HSA는 13.41 min에서 검출되었고, 사용한 oleic acid의 순도가 약 90%이었기 때문에 다른 noise peak가 검출되었다. GC-MS의 경우 13.24 min의 peak는 m/z 199와 141의 large fragment ions를 보였으며, 13.41 min의 peak는 m/z 201과 143의 large fragment ions를 보였다(Fig. 2). 이로써 13.24 min과 13.41 min에 나타나는 피크가 각각 10-KSA와 10-HSA임을 확인할 수 있었다.

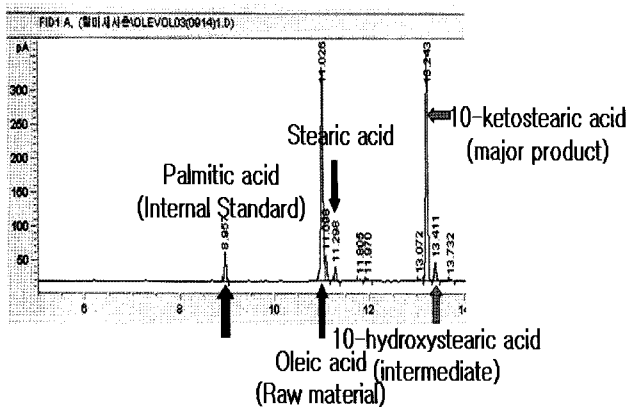


Fig. 1. GC analysis of fatty acids.

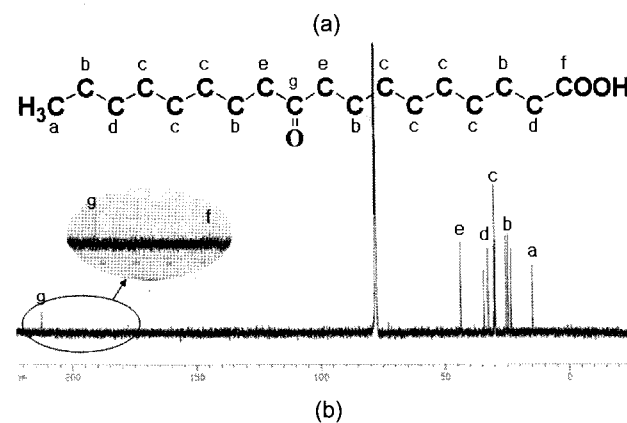
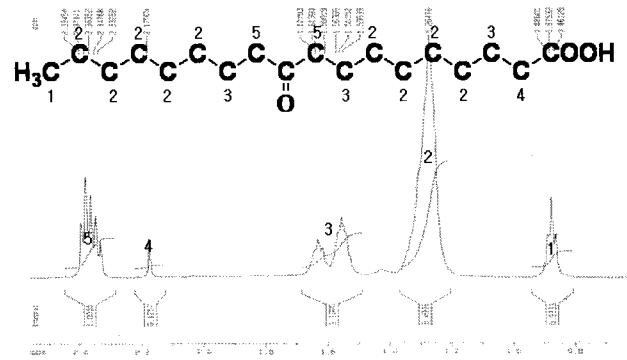


Fig. 3. NMR analysis of 10-KSA. (a) ¹H NMR, (b) ¹³C NMR

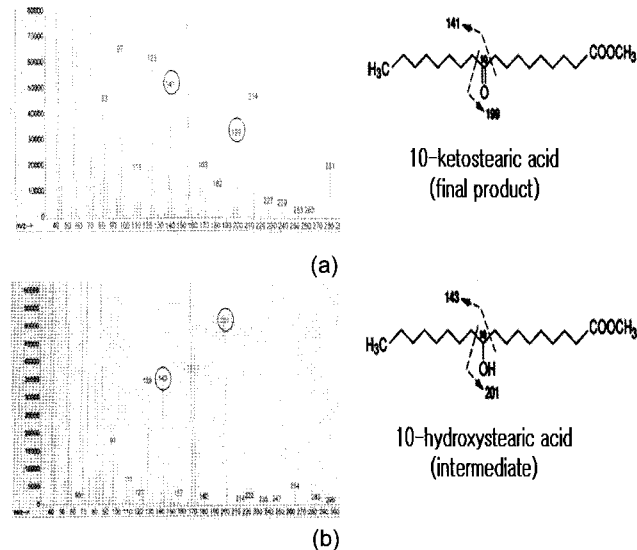


Fig. 2. GC-MS analysis of bioconversion products. (a) 10-KSA, (b) 10-HSA.

생산된 지방산의 ¹H와 ¹³C NMR 분석을 실시하였다. 10-KSA의 10번째 탄소에 있는 ketone group으로 인하여 ¹H NMR에서는 2.33-2.39 ppm의 peak가 검출되었고, ¹³C NMR에서는 약 212 ppm에서 peak가 검출되었다. 각 peak에 대한 수소와 탄소의 위치를 Fig. 3에 나타내었다. NMR 결과로부터 최종 생성물이 10-KSA임을 확인할 수 있었다.

Flavobacterium sp. strain DS5의 특성

Flavobacterium sp. strain DS5는 여러 가지 지방산을 산화시키는 특성이 있으며, 기질 특이도는 oleic acid를 100%로 보았을 때 linoleic acid 35%, α-linolenic acid 34%, γ-linolenic acid 31%, palmitoleic acid 55%, myristoleic acid 16% 등으로 보고되었다(14). 특히 oleic acid로부터 중간생성물로 10-HSA, 최종 생성물로 10-KSA를 생산해 내며 이에 관여하는 효소는 Fig. 4와 같이 oleic acid로부터 10-HSA로의 반응에서는 hydratase에 의해 진행되고, 10-HSA로부터 10-KSA 생성 반응에서는 secondary alcohol dehydrogenase에 의해 진행된다(14). 또한 Strain DS5의 hydratase는 C-10 위치 특이적임이 보고되었다(16). Strain DS5의 최적 성장 온도 및 pH는 각각 30°C와 7.5로 알려져 있다(14).

10-KSA의 생산을 위하여 SMD, TGY, YM, screening 배지에서 각각 수행하여 최종 생성물 10-KSA의 생산량을 상대적으로 비교하여 본 결과 SMD, TGY, YM, screening 배지 순으로 최종 생성물이 생산된다는 것이 밝혀졌다(14). 따라서 이후의 실험에서는 SMD 배지를 기초로 실험을 진행하였다. SMD 배지에는 복합배지인 yeast extract가 첨가되어 있어서 복합배지의 경제성과 배양 제어의 용이성을 고려하여 복합배지를 제한배지로 대체할 수 있는지를 알아보기 위하여 yeast extract를 제거한 SMD 배지와 질소

원으로써 yeast extract 대신 $(NH_4)_2SO_4$ 를 첨가한 배지에 대한 균체 성장을 측정하였다. Fig. 5는 SMD 배지, SMD 배지에서 yeast extract를 제거한 배지, yeast extract 대신 질소원으로 $(NH_4)_2SO_4$ 를 5 g/L로 첨가한 배지에서 시간에 따른 OD 값의 변화를 측정한 결과이다. 실험결과 SMD 배지에서는 약 4시간 후 지수성장기에 들어가 16시간에 정지기에 도달하였으나 나머지 배지에서는 성장을 하지 않았다. 즉, Strain DS5는 성장을 위해 yeast extract가 반드시 필요한 것으로 나타났다.

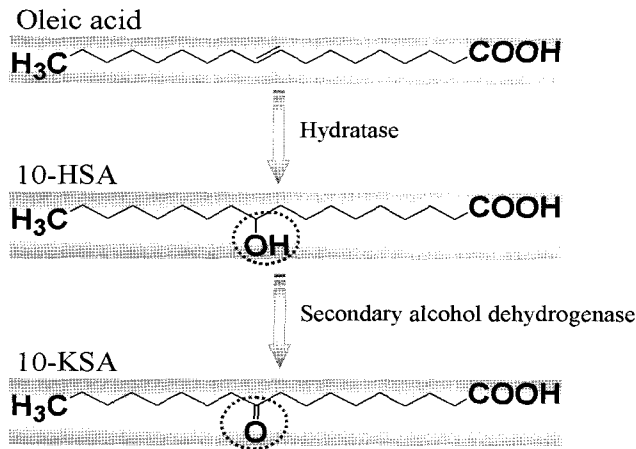


Fig. 4. Microbial conversion scheme and related enzymes for 10-KSA formation via 10-HSA from oleic acid.

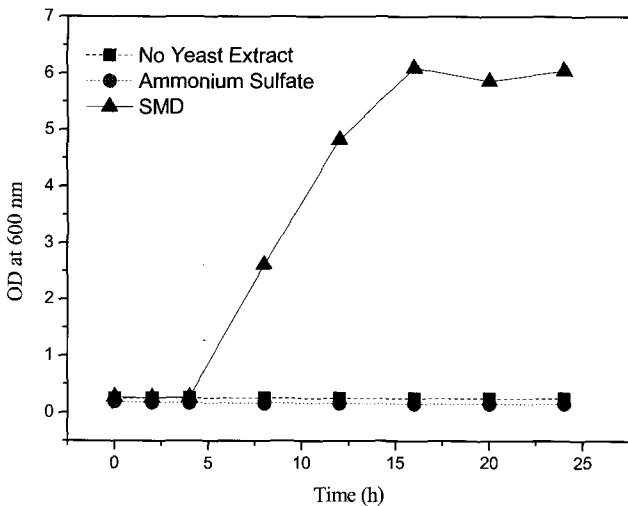


Fig. 5. Effect of nitrogen source on growth of *Flavobacterium* sp. DS5 in flask culture.

10-KSA 및 10-HSA 생산

SMD 배지에서 yeast extract 및 glucose 농도를 3-50 g/L로 변화시키면서 균체성장 및 지방산 생산을 측정하였다. 실험 결과, yeast extract의 농도가 높을수록 최종 OD 값은 증가하였으나 50 g/L의 경우에는 최종 OD 값이 감소하였

으며, yeast extract 농도에 따른 초기 비성장 속도는 yeast extract가 15 g/L일 경우에 가장 큰 값을 나타내었다(Fig. 6). 배지 중 yeast extract가 15 g/L일 때가 가장 큰 초기 비성장속도를 나타내었으므로 yeast extract를 15 g/L로 고정 한 뒤 glucose를 3-50 g/L까지 변화시키며 OD 값을 측정 하였다. Fig. 7은 glucose 농도에 따른 초기 비성장속도를 나타낸다. 10 g/L일 때 비성장속도 값이 최대였으나, 3-50 g/L까지는 큰 변화가 없었다. 따라서 Strain DS5의 성장 시 glucose는 큰 영향을 못 주는 인자임을 알 수 있었다.

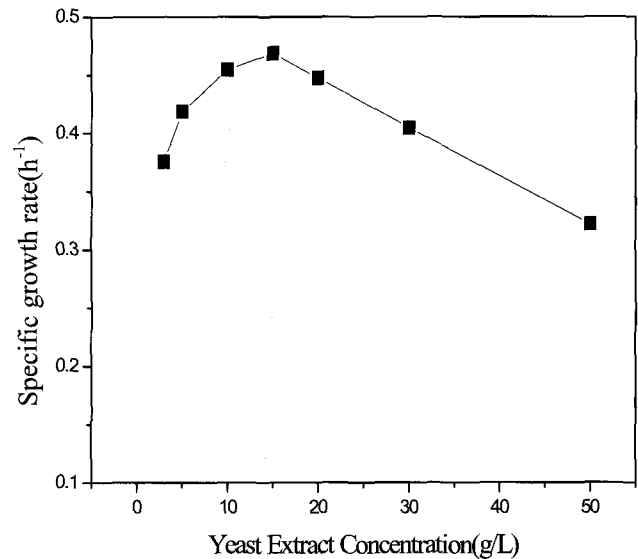


Fig. 6. Effect of yeast extract concentration on specific growth rate of *Flavobacterium* sp. DS5.

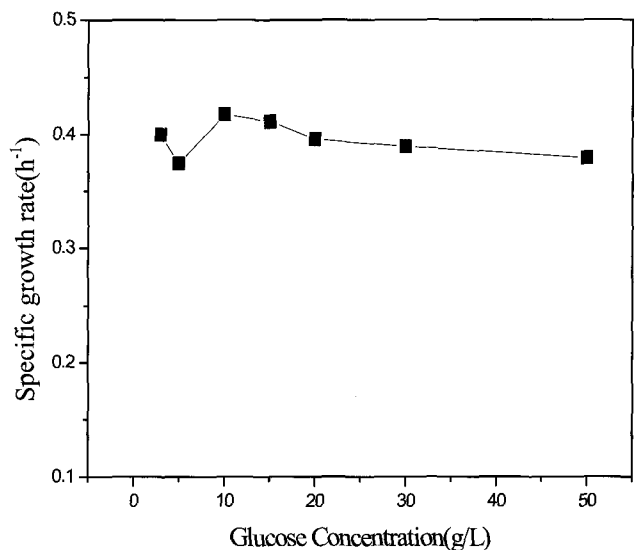


Fig. 7. Effect of glucose concentration on specific growth rate of *Flavobacterium* sp. DS5.

Yeast extract 농도와 glucose 농도의 변화에 따른 지방산 생산과의 관계를 알아보기 위해 24시간 성장 후에 각각

의 플라스크에 0.3 ml의 oleic acid를 첨가하고 10-KSA 및 10-HSA의 양을 측정하였다. Fig. 8과 9에 나타낸 것처럼 5 g/L의 yeast extract 및 glucose 농도에서 10-KSA의 생산 농도가 가장 높았으나, 전반적으로 5 g/L 이상의 yeast extract와 20 g/L 이하의 glucose에서 비슷한 10-KSA 농도를 보였다. 또한 oleic acid의 첨가 시간과 첨가량에 따른 영향을 조사하여 그 결과를 Fig. 10과 11에 나타내었다. 18시간 성장 후 oleic acid를 첨가하였을 때 가장 높은 10-KSA 생산 결과를 나타내었고, 배양액 50 ml 당 0.3 ml의 oleic acid를 첨가하였을 경우 가장 좋은 결과를 보였다. Oleic acid 첨가량이 증가할수록 배지 중 미 전환된 oleic acid가 9 g/L까지 증가하였다. 이상의 결과는 향후 10-KSA의 경제적인 생산을 위한 기초 데이터로 활용될 수 있을 것이다.

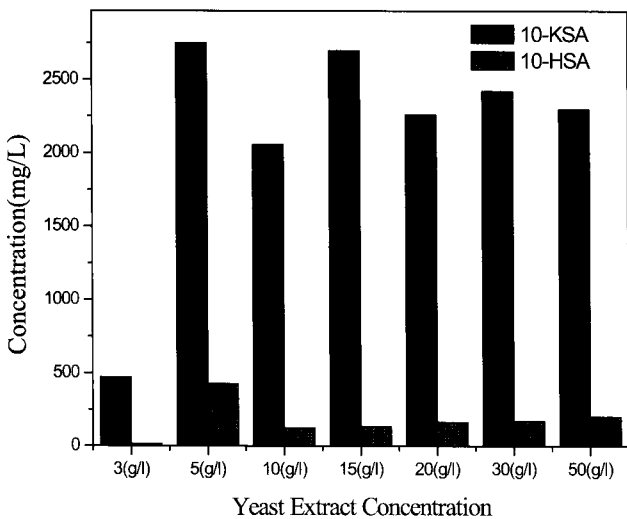


Fig. 8. Effect of yeast extract concentration on production of 10-KSA and 10-HSA.

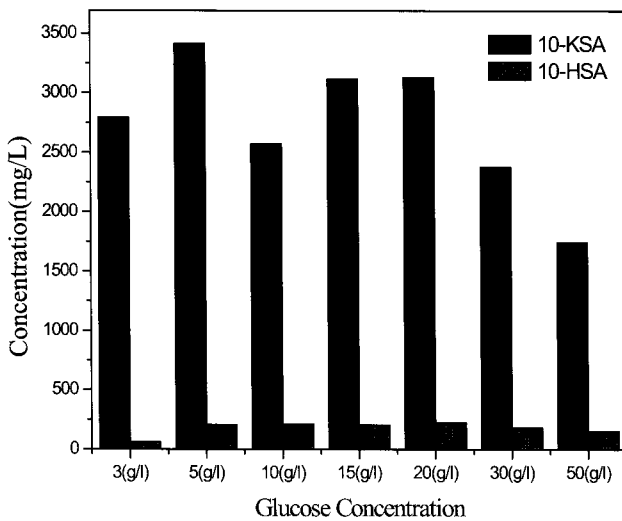


Fig. 9. Effect of glucose concentration on production of 10-KSA and 10-HSA.

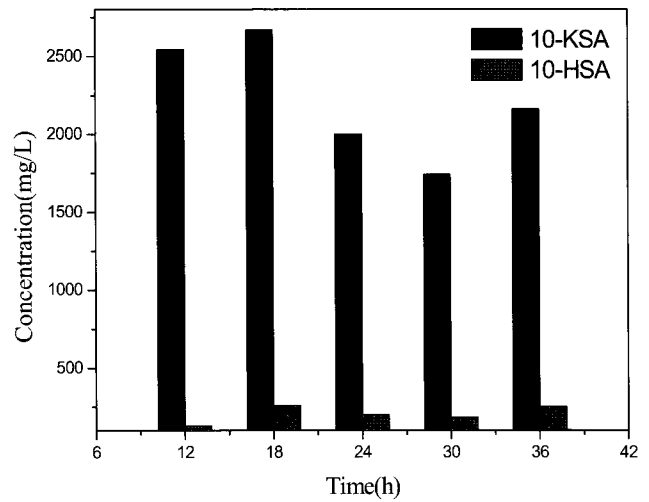


Fig. 10. Effect of oleic acid addition time on production of 10-KSA and 10-HSA.

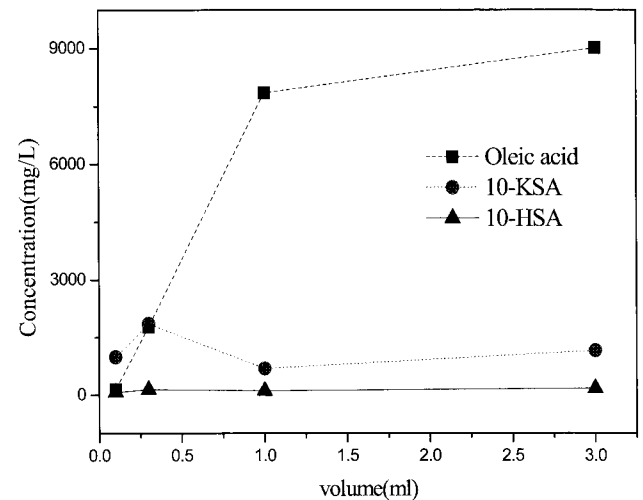


Fig. 11. Effect of oleic acid addition volume per 50 ml culture on production of 10-KSA and 10-HSA.

요약

식물성 오일은 다양한 생물제품 생산에 적합한 저가의 원료이다. 식물성 오일의 주성분인 oleic acid와 linoleic acid와 같은 불포화 지방산의 함량은 콩기름의 경우 각각 22%와 55%, 옥수수기름의 경우 26%와 60%, 유채기름의 경우 61%와 21%에 달한다. Hydroxy나 keto group으로 치환된 불포화 지방산들은 다른 지방산에 비해 높은 점도와 반응성 등의 특별한 화학적 특성 때문에 가소제, 계면활성제, 윤활유, 세제 등에 사용되는 유용한 산업 화합물이다. 본 연구에서는 *Flavobacterium* sp. strain DS5 (NRRL B-14859)를 oleic acid로부터 중간생성물로서 10-hydroxystearic acid (10-HSA)를 거쳐 10-ketostearic acid (10-KSA)로의 전환에 이용하였다. 두 개의 생물전환 생성물인 10-KSA와

10-HSA는 GC, GC-MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 을 이용하여 정량 및 정성분석을 수행하였다. 플라스크 배양에서 10-KSA와 10-HSA의 최대 생산량은 각각 3.4 g/L와 0.5 g/L 이었다. 10-KSA 생산을 위한 최적 glucose 농도, yeast extract 농도, oleic acid 첨가시간, 첨가부피는 각각 20 g/L 이하, 5 g/L 이상, 접종 후 18 h, 0.3 ml/50 ml 이었다.

감 사

본 연구는 2007학년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

접수 : 2008년 6월 10일, 게재승인 : 2008년 12월 16일

REFERENCES

- Hou, C. T. (2005), Production of value-added industrial products from vegetable oils, In *Handbook of Industrial Biocatalysis*, C. T. Hou, Eds, p7-1, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Hosokawa, M., C. T. Hou, and D. Weisleder (2003), Production of novel tetrahydrofuranly fatty acids from α -linolenic acid by *Clavibacter* sp. Strain ALA2, *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 3868-3873.
- Wallen, L. L., R. G. Benedict, and R. W. Jackson (1962), The microbial production of oleic acid to 10-hydroxystearic acid, *Arch. Biochem. Biophys.* **99**, 249-253.
- Schroepfer, G. J. Jr. (1965), Enzymatic stereospecificity in the conversion of oleic acid to 10-hydroxystearic acid, *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 1411-1412.
- Schoepfer, F. J. Jr. and K. Bloch (1965), The stereospecific conversion of stearic acid to oleic acid. *J. Biol. Chem.* **240**, 54-63.
- Schroepfer, G. J. Jr. (1966), Stereospecific conversion of oleic acid to 10-hydroxystearic acid. *J. Biol. Chem.* **241**, 5441-5447.
- Litchfield, J. H. and G. E. Pierce (1986), U. S. patent 4,582,804.
- Koritala, S., L. Hosie, C. T. Hou, C. W. Hesseltine, and M. O. Bagby (1989), Microbial conversion of oleic acid to 10-hydroxystearic acid, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 299-304.
- Koritala, S., L. Hosie, C. T. Hou, C. W. Hesseltine, and M. O. Bagby (1989), Microbial conversion of oleic acid to 10-hydroxystearic acid, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 299-304.
- Blank, W., H. Takayanagi, T. Kido, F. Meussdoerffer, N. Esaki, and K. Soda (1991), Transformation of oleic acid and its esters by *Sarcina lutea*. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 2651-2652.
- Seo, C. W., Y. Yamada, N. Takada, and H. Okada (1981), Hydration of squalene and oleic acid by *Corynebacterium* sp. S-401, *Agric. Biol. Chem.* **45**, 2025-2030.
- El-Sharkawy, S. H., W. Yang, L. Dostal, and J. P. Rosazza (1992), Microbial oxidation of oleic acid, *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2116-2122.
- Lanser, A. C. (1993), Conversion of oleic acid to 10-ketostearic acid by a *Staphylococcus* sp., *J. Am. Oil Chem. Soc.* **70**, 543-545.
- Hou, C. T. (1994), Production of 10-ketostearic acid from oleic acid by *Flavobacterium* sp. strain DS5 (NRRL B-14859), *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3760-3763.
- 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**, 975-978.
- Hou, C. T. (1995), Is strain DS5 hydratase a C-10 positional specific enzyme? Identification of bioconversion products from α - and γ -linoleic acids by *Flavobacterium* sp. DS5, *J. Ind. Microbiol.* **14**, 31-34.
- Song, B.-S. (2007), Production and analysis of oxygenated unsaturated fatty acids from oleic acid by *Flavobacterium* sp. strain DS5, M. S. Thesis, Dept. of Chemical Engineering, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk, Korea.