

미생물 생변환을 통한 필리핀 너트유로부터 기능성 지방산 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid 생산

차크라다 다사그란디^{1,†} · 조엘 엘라마^{1,†} · 김영순² · 김인환² · 김학렬^{1,3,*}
¹경북대학교 식품공학부, ²고려대학교 식품영양학과, ³경북대학교 농업과학기술연구원

Microbial bioconversion of natural Philippine nut oils into a value-added hydroxy fatty acid, 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid

Joel B. Ellamar^{1,†}, Chakradhar Dasangrandhi^{1,†}, Young Soon Kim², In Hwan Kim², and Hak-Ryul Kim^{1,3,*}

¹School of Food Science and Biotechnology, Kyungpook National University

²Department of Food and Nutrition, Korea University

³Institute of Agricultural Science & Technology, Kyungpook National University

Abstract Biocatalytic modification of natural resources can be used to generate novel compounds with specific properties, such as higher viscosity and reactivity. The production of hydroxy fatty acids (HFAs), originally found in low quantities in plants, is a good example of the biocatalytic modification of natural vegetable oils. HFAs show high potential for application in a wide range of industrial products, including resins, waxes, nylons, plastics, lubricants, cosmetics, and additives in coatings and paintings. In a recent study, *Pseudomonas aeruginosa* strain PR3 was used to produce 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid (DOD) from oleic acid. This present study focused primarily on the utilization of three natural nut oils obtained from the Philippines -pili nut oil (PNO), palm oil (PO), and virgin coconut oil (VCO)- to produce DOD by *P. aeruginosa* strain PR3. Strain PR3 produced DOD from PNO and PO only, with PNO being the more efficient substrate. An optimization study to achieve the maximum DOD yield from PNO revealed the optimal incubation time and medium pH to be 48 h and 8.0, respectively. Among the carbon sources tested, fructose was the most efficiently used, with a maximum DOD production of 130 mg/50 mL culture. Urea was the optimal nitrogen source, with a maximum product yield of 165 mg/50 mL culture. The results from this study demonstrated that PNO could be used as an efficient substrate for DOD production by microbial bioconversion.

Keywords: bioconversion, hydroxy fatty acid, natural nut oil, *Pseudomonas aeruginosa*

서 론

수산화지방산(hydroxy fatty acid, HFA)은 자연계에서 주로 식물체내에 소량으로 존재하며 동물에서는 지방산 분해의 중간물질로서 확인된다. 수산화지방산의 구조는 일반지방산에 하이드록실기가 부착되어 있는 형태로서 부착된 하이드록실기의 수에 따라 단일-, 이중-, 삼중-수산화지방산으로 구분된다. 이들이 갖는 구조적 특징으로 인해 일반 지방산과는 다른 특징을 나타낼 수 있으며 따라서 살충제, 의약품, 고기능성 수지와 섬유, 생분해성 플라스틱 물질, 세제, 화장품 그리고 페인트와 같은 광범위한 산업제품에서 활용될 수 있는 높은 잠재력을 가진다고 알려져 있다(1-4). 최근에는 수산화지방산들 중 일부에서 항균활성을 나타

낸다는 것이 알려졌다(5,6). 이러한 구조적, 생리학적 특성을 고려할 때 특정 수산화지방산의 대량생산기술 및 경제적 생산기술의 확보는 매우 중요하다고 할 수 있다.

미생물에 의한 수산화지방산 생산은 1960년대 초부터 USDA/NCAUR (United State Department of Agriculture/National Center for Agricultural Utilization Research, 미국농산부연구소)에서 처음으로 시작되어 학술적 연구가 시작되었고 최근에는 NCAUR을 중심으로 정책적 필요에 의해 활발한 연구가 진행되고 있다. 연구 초기에는 유리지방산으로부터 기능성을 증진시킨 새로운 생산물을 생산하기 위한 수단으로 미생물을 이용한 생물전환을 위해 여러 미생물들이 사용되었다(7). 연구에 사용된 미생물들 중 *Pseudomonas aeruginosa* PR3는 다양한 종류의 유리지방산과 중성지방 기질로부터 여러 종류의 수산화지방산을 성공적으로 생산하는데 사용되었다고 보고하였다(7-10).

수산화지방산 중 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid (DOD)는 PR3 균주를 이용하여 생산되는 생물학적 활성을 갖는 이중수산화지방산으로 올레산(oleic acid, C18:1 Δ^6)의 하이드록실화와 이중결합의 전이과정을 통해 생산된다(11). DOD의 생산과정을 보면 올레산의 9-10 탄소의 cis 이중결합이 8-9 탄소에 이동되면서 trans 구조로 이중결합의 재배열이 일어나며 동시에 10번 위치 탄소에 하나의 수산기가 추가되고, 두번째 수산기가 7번 탄소 위치에 추

[†]They have equal contributions as first authors for this article.

*Corresponding author: Hak-Ryul Kim, School of Food Science and Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

Tel: +82-53-950-5754

E-mail: hakrkim@knu.ac.kr

Received September 8, 2016; revised October 14, 2016;

accepted October 31, 2016

가되어 최종적으로 DOD가 만들어진다(12). 최근 DOD의 생물학적 활성을 확인하는 과정에서 식중독균과 식물병원성 미생물에 대해 광범위하게 항균활성을 나타낸다는 것이 확인되었다(5,6). 또한 DOD는 항산화활성을 갖는 새로운 류단지방산인 7,10-epoxyoctadeca-7,9-dienoic acid (7,10-EODA)의 합성을 위한 기질로 사용되기도 하였다(13). 이처럼 DOD의 생리적 특성이 다양하고 그 활용성이 높아짐에 따라 DOD의 대량생산 기술 개발 및 경제적 생산기술의 확보가 필수적으로 요구되고 있다.

일반적으로 유리 올레산과 올레산을 3개 포함하는 트리글리세라이드 형태의 트리올레인, 올리브유 등이 DOD 생산을 위한 기질로 사용되었지만, 경제학적인 관점에서 볼 때 정제된 유리지방산이나 별도의 생산과정을 거쳐야 하는 트리글리세라이드를 기질로 사용하는 것은 큰 생산원가로 인해 산업적으로 활용되기에 부적합할 것으로 판단된다. 올리브유의 경우도 일반 식물성오일에 비해 고가이므로 적합하지 않으며, 따라서 DOD 생산을 위한 저가의 식물성오일 기질의 확보는 산업적으로 중요한 의미를 갖는다. 천연 식물성오일의 경우 다양으로 이용이 가능하고 주요 성분으로 올레산과 리놀레산을 포함하는 풍부한 트리글리세라이드를 함유하고 있어 DOD 생산을 위한 경제성이 높은 기질로서 이용이 가능할 것으로 생각된다.

본 연구는 DOD를 산업적으로 활용하기 위한 경제적 생산기술 확보의 노력으로 필리핀에서 값싸게 생산되는 식물성 너트유를 사용하여 PR3 균주를 이용한 미생물 생변환을 통해 DOD를 효과적으로 생산할 수 있는 기술개발을 목표로 연구가 진행되었다. 본 연구는 먼저 필리핀 너트유가 *P. aeruginosa* PR3의 생물전환을 통해 DOD를 생산하기 위한 기질로 사용될 수 있음을 확인하였으며, DOD 생산을 위한 최적조건의 확립에 관하여도 보고하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 표준물질 헵타데칸산(C17:0)은 Nu-Chek Prep Inc. (Elysian, MN, USA)로부터 구입하였다. 필리너트유(pili nut oil, PNO), 팜유(palm oil, PO)와 버진 야자유(virgin coconut oil, VCO)는 필리핀의 지역시장에서 구입하였다. Trimethyl silyl imidazole (TMSI)과 피리딘의 혼합물은 Supelco Inc. (Bellefonte, PA, USA)로부터 구입하였다. 박충크로마토그래피 (TLC)에 사용된 박충실리카겔 60F₂₅₄ 플레이트는 EM Science (Cherry Hill, NJ, USA)로부터 구입하였다. 사용된 다른 화학물질은 별도의 언급이 없으면 Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 다른 모든 화학물질은 시약등급을 사용하였으며 추가적인 정제과정을 거치지 않고 사용하였다.

미생물과 생물전환

Pseudomonas aeruginosa NRRL strain B-18602 (PR3)는 NCAUR Culture Collection (USDA/ARS/NCAUR, Peoria, IL, USA)으로부터 분양 받았으며, 125 mL 삼각플라스크에 50 mL의 표준 배지를 넣고 진탕배양기에서 28°C, 200 rpm의 조건으로 호기적으로 배양하였다. 표준 배지는 1 L당 텍스트로오스 4 g, 인산수소2칼륨 4 g, 인산암모늄 1 g, 효모추출물 1 g, 황산제1철·7수화물 0.056 g, 황산마그네슘·7수화물 0.001 g을 함유한다. 배지의 pH는 묽은 인산을 이용하여 8.0으로 조절되었다. 별도로 언급되지 않는다면, 실험환경조건은 위에 언급된 표준상태를 기초로 하여 필요에 따라 조절되었다. 수산화지방산의 생산을 위해 각각의 오일 기질

(1% v/v)은 배양 시작 후 24시간 경과 후 배지에 첨가되었고, 72 시간 동안 추가적으로 배양이 진행되었다. 배양 마지막 단계에서 각각의 배지는 6 N 염산으로 pH 2.0으로 산성화시켜 배양을 중지시켰고, 생성물은 배양액과 동일 용량의 에틸아세테이트와 디에틸에테르를 첨가하여 2회 추출하였다. 추출물에 함유된 용매는 회전증발농축기(Han-Shin 2001N, Han-Sin Co., Seoul, Korea)를 이용하여 증발시켜 제거하였다. 모든 실험은 달리 명시되지 않는 한 오차범위 10% 이내에서 2 반복으로 수행되었다.

생성물 분석

생성물은 박충크로마토그래피(TLC, EM Science, Cherry Hill, NJ, USA)와 가스크로마토그래피(GC, ACME 6100, Younlin Co., Seoul, Korea)를 이용하여 분석하였다. TLC 플레이트는 톨루엔:다이옥산:아세트산(79:14:7, v/v/v)의 혼합 용매시스템을 이용하여 전개시켰고, 생성물의 존재여부는 TLC 플레이트에 40% 황산을 분사하고 100°C 오븐에서 10분간 가열하여 나타나는 스팟으로 확인하였다. TLC 플레이트 상에서 미지 스팟의 구조를 확인하기 위해 실리카겔 플레이트에서 목표 스팟에 대응하는 부분을 긁어 내어 회수한 뒤 클로로포름에 침지하여 추출하였다. GC 분석을 위해 적정량의 시료를 실온에서 Diazomethane 으로 5분간 메틸화하고, TMSI와 피리딘 혼합물(1:4, v/v)로 실온에서 최소 20분간 처리하여 하이드록실기를 TMSI로 치환하였다. TMSI-유도체화된 시료는 SPB-1 모세관 GC 컬럼(15 m×0.32 mm i.d., 0.25 µm thickness, Supelco Inc., Bellefonte, USA)과 불꽃 이온화 검출기를 갖춘 ACME 6100 Series GC system (Younlin Co.)을 이용하여 분석하였다. GC는 100°C부터 150°C까지 20°C/min, 150°C부터 200°C까지 5°C/min, 200°C부터 210°C까지 0.5°C/min의 온도 상승과 300°C에서 10분간 유지 시간을 통해 분석이 이루어졌다(질소 가스 유량: 0.67 mL/min). 인젝터와 검출기 온도는 각각 270°C와 280°C로 유지되었다. 헵타데칸산(C17:0)은 정량화를 위한 내부 표준물질로서 시료의 유도체화 처리 전에 분석시료에 첨가되었다. 생산물의 구조 확인은 표준 DOD의 GC/MS 스펙트럼과 분석시료의 GC/MS 스펙트럼 비교를 통해 이루어졌다. GC/MS 분석을 위해 전자충격(EI) 질량 스펙트럼은 Hewlett Packard 5890 모델 GC (Avondale, PA, USA)에 Hewlett Packard 5972 시리즈 질량 검출기를 연결하여 분석하였다. 컬럼 배출구는 이온 소스에 직접 연결되어 사용되었다. 시료의 분리는 메틸 실리콘 컬럼(30 m×0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness, Supelco Inc.)을 사용하여 70°C부터 170°C까지 20°C/min 속도로 온도 상승, 170°C에서 1분간 유지, 250°C까지 5°C/min의 온도 상승 후 15분간 유지(헬륨 가스 유속: 0.67 mL/min)를 통해 이루어졌다. Diazomethane으로 메틸화된 생성물의 TMSI 유도체는 상기한 것과 같은 방법으로 GC/MS 분석을 위해 준비되었다.

결과 및 고찰

필리핀 너트유를 이용한 DOD 생산 확인

본 실험에 사용된 모든 필리핀 너트유는 올레산을 포함하고 있으며 올레산의 함량은 14.47% (VCO), 52.05% (PO), 67.83% (PNO)에 해당하였다(Table 1). 위 세 가지 기질을 이용하여 PR3 균주에 의해 생산된 조추출물을 TLC로 분석해 본 결과 PNO와 PO로부터 생산된 생성물의 주된 스팟은 표준 DOD와 일치하였다(Fig. 1). 그러나 상대적으로 낮은 함량의 올레산을 포함한 VCO는 실제로 DOD 생산이 가능할 것으로 예상하였지만 TLC 상에서 DOD 스팟에 상응하는 스팟이 확인되지 않았다.

Table 1. Fatty acid profile of the natural Philippine nut oils

Fatty acid	Amount of fatty acid (mol %)		
	VCO	PO	PNO
C6:0	1.13	26.48	19.44
C8:0	10.77	nd	nd
C10:0	5.55	nd	nd
C12:0	30.80	nd	nd
C14:0	13.87	nd	nd
C16:0	12.46	nd	nd
C18:2 $\Delta^{9,12}$	2.64	13.62	7.11
C18:1 Δ^9	14.47	52.05	67.83
C18:0	6.90	5.40	4.12
C20:1 Δ^{11}	nd	nd	0.30
C20:1	nd	0.33	nd
C20:0	0.16	0.65	0.22
Others	1.08	1.45	0.66

nd, not detected; VCO, virgin coconut oil; PO, palm oil; PNO, pili nut oil.

TLC에서 확인된 주 생성물은 구조 확인을 위해 GC/MS로 분석되었다. Fig. 1에서 나타난 주요 스팟의 생성물을 메틸화와 TMSI 유도체 과정을 거친 뒤 GC (Fig. 2A)와 GC/MS (Fig. 2B)로 분석한 결과를 나타내었다. GC 분석에서는 표준물질 외에 새로운 피크를 보여주고 있으며, 이 피크를 EI-GC/MS로 분석한 스펙트럼을 근거로 구조를 추정했을 때, 생성물은 메틸화된 지방산으로서 탄소수 18개, 두 개의 하이드록실기, 단일 이중결합을 가진 지방산의 TMS-유도체로서 472의 분자량을 가진 물질임이 확인되었다. 스펙트럼을 자세히 분석하여 보면 먼저 여러 단편들로부터 하이드록실기의 위치는 메틸화된 지방산의 TMS-유도체의 EI 스펙트럼에서 명백히 관찰되었다. 유도체화된 하이드록실기가 메틸 말단 방향으로 알파 절단에 의해 생성된 단편은 215 m/z (하나의 TMS 유도체 포함)로 나타나고 있으며, 두 개의 TMS-유도체와 이중결합을 포함할 경우 343 m/z 단편으로 관찰되었다. 유도체화된 하이드록실기가 카복실 말단 방향으로 알파 절단에 의해 생성될 때 두 개의 주 단편이 만들어지는데 이들은 231 m/z (하나의 TMS-유도체 포함)와 359 m/z (두 개의 TMS-유도체와 이중결합을 포함)이었다. 이러한 결과들로부터 생성물의 구조는 탄소번호 7번과 10번에 각각 1개씩 두 개의 하이드록실기를 가지며 탄소 8-9 사이에 이중결합을 하나 갖고 있는 것으로 판명되었으며 이러한 스펙트럼 양상은 DOD의 스펙트럼과 정확하게 일치하였다(9,10). 위에서 언급한 바와 같이 TLC, GC, GC/MS 분석으로부터 얻은 결과로부터 천연 필리핀 너트유 PNO와 PO로부터 DOD가 성공적으로 생산되었다는 것이 확인되었다.

반응시간에 따른 PNO와 PO로부터 DOD 생산량 변화

일반적으로 오일을 기질로 하여 DOD를 생산할 때 DOD의 최대 생산량은 배양시간에 따라 다르게 나타난다(10,14). 그러므로 PNO와 PO를 이용한 DOD 생산과정에서 배양시간에 따른 DOD 생산변화를 관찰하였다. Fig. 3에서 볼 수 있듯이 DOD 생산은 두 가지 오일 기질 모두에서 48시간 배양하였을 때 최대치에 도달하였고, 생산량은 PNO (70.7 mg/50 mL)의 경우 PO (64.2 mg/50 mL)보다 약 10% 정도 높게 나타났다. 이러한 결과는 PNO의 경우 올레산 함량이 67.8%로서 52%인 PO보다 높기 때문인 것으로 판단된다(Table 1). 이러한 결과에 따라 향후 PNO를 DOD 생산 최적 기질로 선정하고 DOD 생산의 최적화 연구 시 48시간

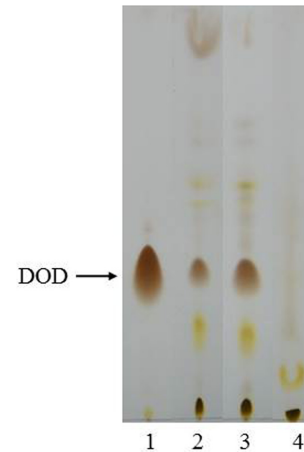


Fig. 1. TLC analysis of the crude extract from bioconversion of natural vegetable oils by *P. aeruginosa* strain PR3. Bioconversion was performed for 72 h under the standard conditions. Lane 1, standard 7,10-dihydroxy-8(*E*)-octadecenoic acid (DOD); lane 2, pili nut oil; lane 3, palm oil; lane 4, virgin coconut oil. The analytical conditions are given in the materials and methods section.

을 최적 배양시간으로 표준화하였다.

PNO를 이용한 DOD 생산에 대한 탄소원의 영향

탄소원은 미생물 성장의 필수적인 주 영양소이기 때문에 사용되는 탄소원에 따라 대사 환경이 다양하게 변화될 수 있다. 따라서 여러 다양한 탄소원들을 독립적으로 사용하여 사용된 탄소원에 따른 영향을 확인하고자 하였다. 사용된 모든 탄소원들의 경우 PNO로부터 DOD가 생산되었지만 생성효율은 다르게 나타났다(Table 2). 과당의 경우 24.8%로 가장 높은 DOD 생산 수율을 보였지만 세포성장률은 포도당을 사용하였을 때보다 상대적으로 낮은 세포성장률을 나타냈다. 세포 성장(610 nm에서의 흡광도 측정)은 포도당 첨가 시에는 8.79, 과당 첨가 시에는 5.98이었지만 DOD 생산량은 각각 68.8 그리고 84.35 mg/50 mL로 나타났다. 자일로스의 경우 세포 성장률은 10.78로 가장 높았지만 DOD 생산량은 상대적으로 낮았다. 갈락토오스를 첨가하였을 경우에는 세포 성장률과 DOD 생산량 모두 낮게 나타났다. 이러한 결과를 바탕으로 과당이 PNO를 이용한 DOD 생산의 최적 탄소원이라는 것을 확인하였다. 과당을 최적 탄소원으로 고정한 후 DOD 생산을 위한 과당의 최적 농도를 결정한 결과, Fig. 4에서 볼 수 있듯이 과당 농도가 0.3% 까지 증가함에 따라 DOD 생산은 크게 증가하였고, 이 때 DOD 생산량은 128.8 mg/50 mL를 나타내었다. 그러나 그 이후에는 점차 감소하였다. 반면 세포 농도의 경우 과당 농도에 따라 큰 영향을 받지 않음을 알 수 있다. 이러한 결과로 미루어 탄소원의 종류와 농도가 PNO로부터 DOD를 생산하는데 있어 중요한 요인이 되고 있음을 알 수 있다.

PNO를 이용한 DOD 생산에 대한 질소원의 영향

미생물 성장을 위한 배지 중의 질소원은 미생물의 세포 성장에 필수적인 주 영양소로 다양한 대사 환경에 다양한 방법으로 관여하고 있다. 여러 종류의 유기 혹은 무기 질소원을 이용하여 PNO로부터 PR3에 의해 DOD를 생산하는데 어떠한 영향을 미치는지 살펴보았다. 대조구인 SM6 배지는 질소원으로서 효모추출물(0.05%), 인산암모늄(0.2%), 질산암모늄(0.1%)이 사용되는데 본 실험에서는 사용된 각각의 질소원의 농도를 SM6에 사용된 총

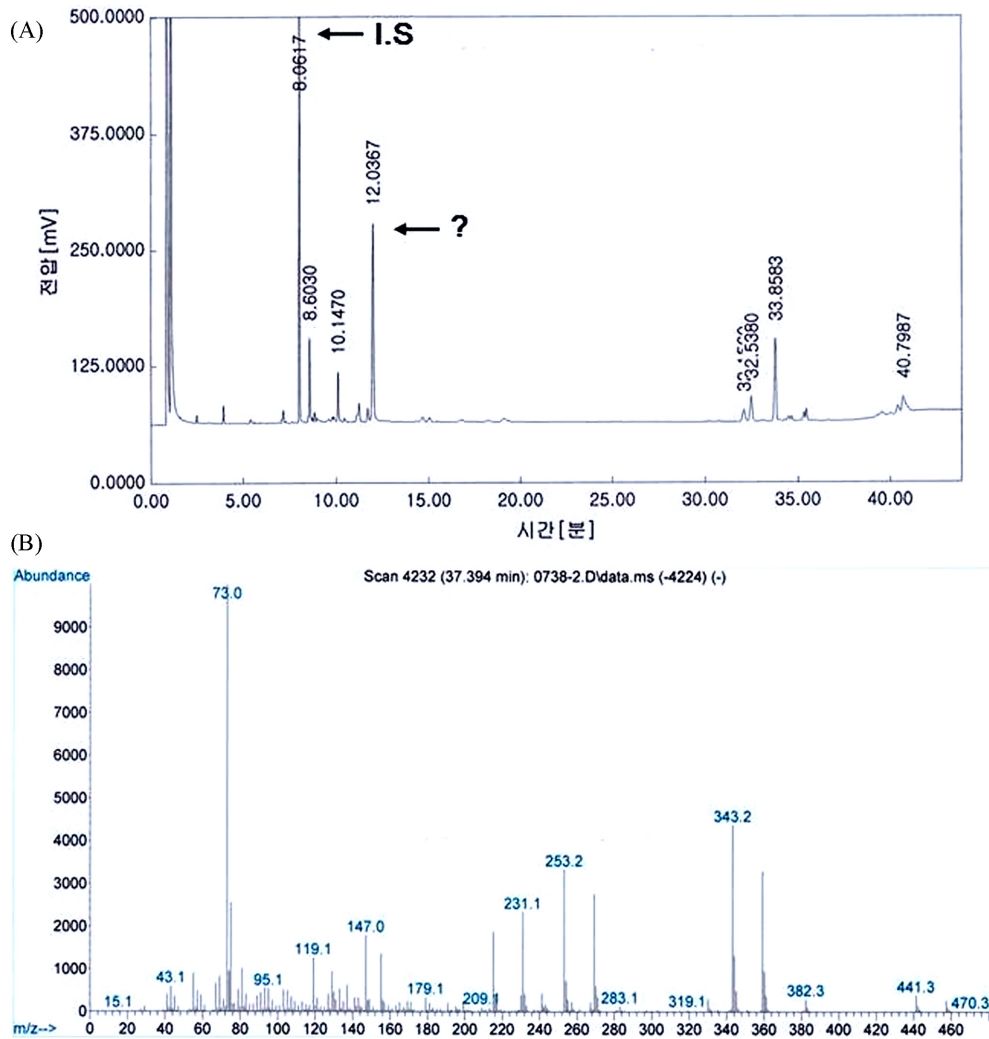


Fig. 2. GC analysis (A) and GC/MS analysis (B) of the product from bioconversion of natural vegetable oils by *P. aeruginosa* strain PR3. IS, internal standard. The analytical conditions are given in the materials and methods section.

질소함량에 맞추어 대체하여 사용하였다. Table 3에서 보여주는 바와 같이 사용된 질소원 중 요소가 가장 높은 DOD 생산량 (112.73 mg/50 mL)을 나타내었고 다음으로 글루타민(52.3 mg/50 mL), 맥아추출물(49.9 mg/50 mL), 그리고 인산암모늄(38.4 mg/50 mL) 순이었다. 요소를 포함한 배지에서의 DOD 생산량은 대조군보다 68% 정도 높게 나타났다. 반면 황산암모늄과 효모추출물은 PNO로부터 DOD를 생산하는 데에 별다른 영향을 주지 않음을 알 수 있다. 그러나 세포 성장의 경우 사용된 질소원에 의한 영향이 DOD 생산에 대한 영향과 특별한 연관성을 보여주지 않고 있다. 황산암모늄의 경우 세포성장은 가장 높았지만 DOD 생산은 가장 낮은 결과를 나타냈다. 요소의 경우 세포성장은 상대적으로 황산암모늄에 비해 낮았지만 DOD 생산은 가장 높은 결과를 나타냄으로서 이러한 사실을 뒷받침해 주고 있다. 실험에 사용된 질소원 중 요소가 가장 높은 DOD 생산성을 나타냄으로서, 다음으로 DOD 생산을 위한 요소의 최적농도를 확인하기 위한 실험이 진행되었다(Fig. 5). 그 결과 요소를 0.5% 첨가하였을 때 최대 DOD 생산량(165.4 mg/50 mL)을 나타냈으며 이것은 대조군으로 사용된 SM6 배지보다 2.5배 높은 결과를 나타낸 것이다. 요소 농도가 0.5% 보다 높게 사용되었을 경우 DOD 생산량은 오히려 크게 감소하였다. 그러나 세포성장의 경우 사용된 요소 농

도에 크게 영향을 받지 않고 일정 수준 이상을 유지하고 있어 요소 농도에 영향을 받고 있지 않음을 알 수 있다.

PNO를 이용한 DOD 생산에 대한 금속이온의 영향

식물성 오일로부터 DOD 생산이 이루어지는 과정은 lipase를 포함하여 미생물이 생산하는 효소 중 한 가지 이상의 효소가 관여할 것으로 추측하고 있다(9). 따라서 효소 반응에서 보조인자로서 중요한 역할을 하고 있는 금속이온도 DOD 생산성에 영향을 줄 것으로 예상된다. 이러한 이유로 인해 PNO로부터 PR3를 이용해 DOD를 생산할 때 DOD 생산량에 영향을 미칠 가능성을 확인하기 위해 여러 금속이온을 배지에 첨가하여 그 영향을 살펴보았다. 사용된 금속이온의 농도는 대조군 배지에 사용된 금속이온의 농도와 동일한 농도로 사용하였다. Table 4에서 보여주는 바와 같이 DOD 생산과 세포 성장은 실험에 사용된 금속이온의 종류에 따라 유의하게 영향을 받는 것으로 판단되었지만, 전반적으로 각 각의 금속이온을 한 가지만 사용하였을 때 대조군 배지에 비해 DOD 생산량과 세포 성장이 매우 낮게 나타남으로서 금속이온의 단일 사용은 PNO로부터 DOD 생산을 위한 유효한 수단이 되지 않음을 알 수 있었다.

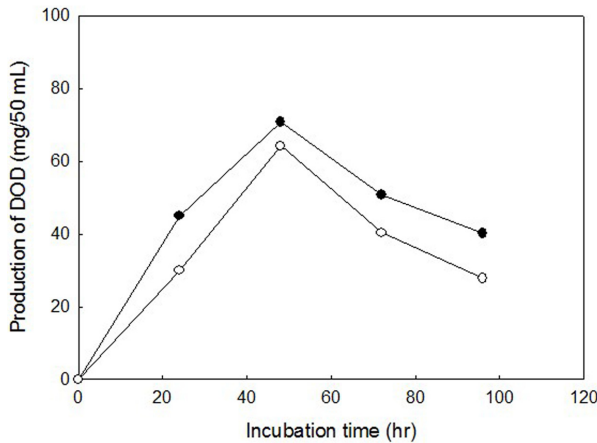


Fig. 3. Time-course analysis of 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid (DOD) production from pili nut oil (closed circle) and palm oil (open circle) by *P. aeruginosa* strain PR3. "Incubation time" represents the reaction time after the oil substrates were added to the 24-h-old culture. The amount of product was calculated from comparison of the target area with the internal standard area in the GC analysis. C17:0 was used as an internal standard and was added to the sample before methylation. See the materials and methods section for all other reaction conditions.

Table 2. Effect of carbon source on 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid (DOD) production from pili nut oil by *P. aeruginosa* strain PR3

Carbon source (0.4%)	Cell growth ^a (abs. at 610 nm)	DOD production (mg/50 mL)
Glucose	8.79	68.8
Galactose	2.97	13.6
Fructose	5.98	84.4
Xylose	10.78	27.9
Sucrose	4.33	65.3
Lactose	6.69	47.5
Maltose	3.49	58.0
Milk whey powder	5.03	63.8

^aValues represent the absorbance at 610 nm which was calculated as the original optical density value of the diluted samples multiplied by the dilution factor.

수산화지방산은 윤활유, 농약, 제약, 화장품 등 다양한 분야에서 산업적으로 유용하게 적용될 수 있는 다기능 소재이다. 특히, 다양한 식중독균과 식물병원성균에 대해 강한 항균활성을 가지고 있다고 알려져 있다(5,6). 몇몇 성공적인 연구결과는 올레산과 트리올레인을 포함한 다양한 오일 기질로부터 *P. aeruginosa* PR3 균주를 이용해 DOD를 효과적으로 생산하는데 초점을 맞추어 보고되었다(9,10,12). 그러나 생리활성을 가진 DOD를 저비용으로 생산하는 것은 산업적용성에 있어 대단히 중요한데, 이는 기존에 DOD 생산의 기질로 사용되었던 유리지방산과 트리올레인 등은 생산과 정제를 위해 추가 비용이 들기 때문에 저비용 기질로서는 적합하지 않기 때문이다. 반면 전체 지방산 중 올레산을 주성분으로 포함한 천연 식물성오일의 경우 값이 싸고 쉽게 구할 수 있기 때문에 DOD 생산을 위한 효과적인 기질로 사용될 수 있다.

DOD를 경제적으로 생산하기 위한 기술개발 과정에서 본 연구는 *P. aeruginosa* PR3에 의해 천연 필리핀 식물 너트유를 DOD로 생전환하고 DOD 생산 과정에 관여할 수 있는 영양소원을 최

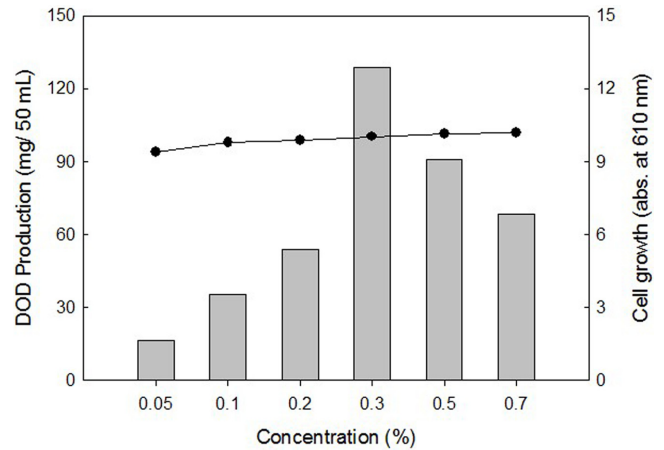


Fig. 4. Effect of fructose concentration on 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid (DOD) production from pili nut oil by *P. aeruginosa* strain PR3. Fructose was added in place of glucose (control) in the initial medium. The product amount and cell density were determined as described in the materials and methods section. The bar graph and line graph represent DOD production and cell growth, respectively.

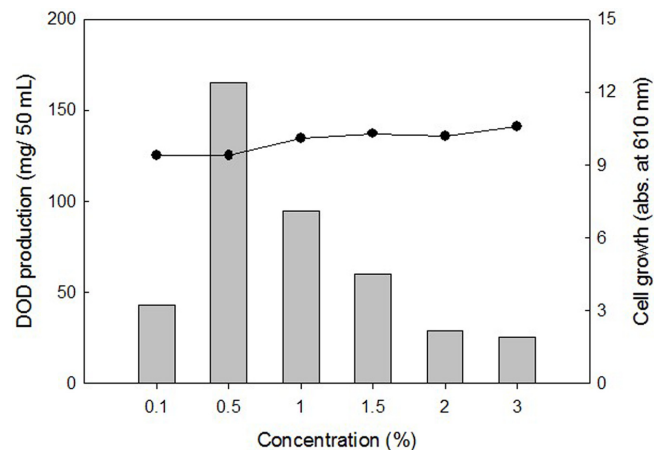


Fig. 5. Effect of urea concentration on 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid (DOD) production from pili nut oil by *P. aeruginosa* strain PR3. Urea was added as the single nitrogen source in various concentrations to the initial medium. The product amount and cell density were determined as described in figure 4. The bar graph and line graph represent DOD production and cell growth, respectively.

적화하는데 중점을 두고 진행되었다. 탄소원의 경우 사용된 탄소원에 따라 PNO로부터 생산된 DOD 양은 다양하게 나타났지만 0.3%의 과당을 사용하였을 경우 가장 효과적이었으며 다음으로는 포도당, 설탕, 그리고 말토오스 순이었다. 이러한 결과는 PNO로부터의 DOD를 생산하는데 있어 요구되는 탄소원이 다른 종류의 지질 기질을 사용한 경우와 다르다는 것을 의미한다. 예를 들어 트리올레인으로 DOD를 생산할 때 탄소원으로 사용된 포도당, 갈락토오스, 그리고 과당이 모두 비슷한 영향을 나타내었지만 설탕, 말토오스, 그리고 락토오스를 탄소원으로 할 때에는 전혀 DOD가 생산되지 않았다(9). 올리브유와 고올레산 홍화유의 경우 탄소원에 따른 영향이 PNO의 경우와 비슷한 경향을 나타내었다(10,14). 사용되는 기질에 따른 탄소원 요구성이 다르게 나타나는 이유는 정확하게 설명할 수 없지만 식물성 오일의 지방

Table 3. Effect of nitrogen source on 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid (DOD) production from pili nut oil by *P. aeruginosa* strain PR3

Nitrogen source	Cell growth ^a (abs. at 610 nm)	DOD production (mg/50 mL)
Control ^b	11.67	67.2
Glutamine (25 mM)	10.91	52.3
Yeast extract (0.1 %)	6.19	0.2
Tryptone (0.1 %)	6.01	0.2
Malt extract (0.1 %)	12.61	49.9
Urea (25 mM)	9.76	112.7
(NH ₄) ₂ HPO ₄ (50 mM)	10.21	38.4
(NH ₄) ₂ SO ₄ (50 mM)	12.39	0.3
NH ₄ NO ₃ (25 mM)	11.12	27.3

^aValues represent the absorbance at 610 nm which was calculated as the original optical density value of the diluted samples multiplied by the dilution factor.

^bSM6 medium was used as the control. The medium composition is presented in the text.

Table 4. Effect of metal ion source on 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid (DOD) production from pili nut oil by *P. aeruginosa* strain PR3

Metal ion (1 mM)	Cell growth ^a (abs. at 610 nm)	DOD production (mg/50 mL)
Control ^b	9.67	71.3
ZnSO ₄	1.91	6.7
MgSO ₄	1.19	11.8
MnSO ₄	2.01	21.5
KCl	1.21	11.2
NaCl	1.15	11.6
FeSO ₄	1.12	10.9
CaCl ₂	0.96	8.9
CuSO ₄	1.61	8.0

^aValues represent the absorbance at 610 nm which was calculated as the original optical density value of the diluted samples multiplied by the dilution factor.

^bSM6 medium was used as the control. The medium composition is presented in the text.

산 구성 성분 중 올레산을 제외한 나머지 지방산의 종류와 함량이 미생물의 세포 성장과 DOD 생산에 다른 역할을 줄 수 있기 때문이라고 추정된다. 또한 식물성오일에 포함된 지방산 외 다른 소수성 물질들도 미생물의 생리활성에 영향을 줄 가능성을 배제할 수 없을 것으로 판단된다.

PNO로부터 DOD를 생산할 때 질소원 요구 조건 역시 사용된 지질 기질에 따라 상당한 차이를 나타내었다. 본 연구에서는 요소가 DOD 생산을 위한 최적의 질소원이었고 그 다음은 글루타민으로 나타났으나 글루타민보다 요소가 2배 많은 DOD를 생산하였다. 반면 효모추출물은 세포 성장과 DOD 생산에 효과적이지 못했다. 그러나 이러한 결과들은 글루타민이 DOD 생산을 위한 최적의 질소원으로 사용되었던 올리브유와 고올레산 홍화씨유의 경우와 다른 결과를 나타내었다. 올리브유와 고올레산 홍화씨유의 경우 DOD를 생산하는데 있어 글루타민이 가장 효과적인 질소원이며 요소는 훨씬 낮은 효율을 나타내었기 때문이다(10,14). 트리올레인을 기질로 사용한 경우 요소가 가장 효과적인 질소원

이었지만 다음으로 효모추출물이 가장 효과적인 질소원이었다(9,15). 탄소원의 경우처럼 사용된 기질종류에 따라 DOD의 최적 생산을 위한 질소원 요구성이 다르게 나타나는 이유에 대해 좀 더 깊은 연구가 이루어져야 하지만, 앞서 설명한 바와 같이 오일 내 다른 지방산 화합물 구성이 이러한 역할을 할 수 있을 것이라고 추정되고 있다. 일반적으로 질소원의 경우 미생물 성장에 있어 C/N 비율값으로 탄소원과 연계되어 영향을 나타낸다고 알려져 있기 때문에 탄소원과 연계된 좀 더 종합적인 고찰이 이루어져야 할 것으로 생각된다. 그럼에도 불구하고 본 연구에서 얻어진 결과에 따르면 PNO로부터 PR3 균주를 이용하여 DOD를 생산하는 과정에서 배지의 탄소원과 질소원의 종류와 농도가 매우 중요한 영향을 나타내고 있다는 것을 확인하였으며 배지의 C/N 비율도 DOD 생산의 최적화에 또 다른 중요한 요소가 될 것이라고 판단되었다.

금속이온의 영향에 대해서는 한가지의 금속이온을 사용한 경우 PR3를 이용하여 PNO로부터 DOD를 생산하는 과정에 큰 영향을 미치지 않았다. 그러나 이러한 결과는 올리브유와 트리올레인을 기질로 사용한 경우에 비해 큰 차이점을 나타내었다. 위 두 가지 기질의 경우 황산마그네슘만 첨가하였을 경우 DOD 생산이 효과적으로 이루어진 반면 다른 금속 이온은 모두 비슷한 낮은 영향을 나타내었다(14,15). 트리올레인의 경우 금속이온이 개별적으로 조합되었을 때 마그네슘을 포함한 모든 경우에서 비슷하게 높은 세포성장률과 DOD 생산량을 나타내었고, 마그네슘을 제외한 경우 세포성장률은 크게 감소하였고 DOD 생산도 매우 낮게 나타났다(15). 이러한 결과는 트리올레인으로 PR3에 의해 DOD를 생산할 때 마그네슘이 세포 성장과 DOD 생산에 필수적이라는 것을 나타낸 것이다. 그러나 본 연구에서는 황산마그네슘이 첨가된 배지에서 배양된 PR3에 의해 PNO로부터의 DOD가 생산되지 않은 것이 관찰되었으므로 금속이온의 요구성이 다른 오일 기질의 경우와 크게 다르다는 것을 확인할 수 있었다. DOD 생산을 위한 PR3의 금속이온 요구성은 리놀레산으로부터 9,12,13-trihydroxy-11E (10E)-octadecenoic acid (THOD) 생산을 위한 요구 조건과도 크게 다르게 나타났다(16). 철과 구리 이온은 리놀레산으로부터 THOD를 생산하는데 있어 필수적인 요소로 요구되고 있지만, 반면 마그네슘은 트리올레인으로 DOD를 생산할 때 필수적으로 필요했다. 이는 리놀레산으로부터 수산화지방산을 생산하는데 있어 lipoygenase가 관여된 지질과산화 유도를 위해 철 이온이 필요하다는 보고와 관련이 있다고 판단된다(16). 왜냐하면 리놀레산의 지질과산화는 리놀레산으로부터 THOD가 생산될 때 필수 중간 과정이기 때문이다. 이러한 결과는 올레산 기질로부터의 DOD가 형성되는 과정이 리놀레산으로부터 THOD가 생산되는 과정과는 다른 경로를 통해 이루어지고 있을 가능성이 매우 높다는 것을 이야기 해주고 있다.

요 약

본 연구를 통하여 *P. aeruginosa* PR3를 이용하여 DOD를 생산하기 위해 저가의 기질로서 필리핀 너트유가 효과적으로 사용될 수 있음을 확인하였으며 배지에 첨가되는 여러 영양인자들의 영향을 조사하여 DOD 생산성을 크게 향상시킬 가능성이 있음도 확인하였다. 따라서 DOD 생산에 이용되는 올레산을 식물성오일로부터 별도의 생산과정을 거쳐 생산하지 않고 식물성오일 자체를 직접 기질로 사용함으로써 PR3 균주를 이용하여 고부가가치의 DOD를 효율적으로 생산할 수 있다는 것을 확인하였다.

감사의 글

This research was supported by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Science, ICT and future planning (2015R1A2A2A01004656).

References

1. Kato T, Yamaguchi Y, Abe N, Uyehara T, Nakai T, Yamanaka S, Harada N. Unsaturated hydroxy fatty acids, the self-defensive substances in rice plant against rice blast disease. *Chem. Lett.* 25: 409-412 (1984)
2. Hou CT, Forman RJ. Growth inhibition of plant pathogenic fungi by hydroxy fatty acids. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 24: 275-276 (2000)
3. Bajpai V, Shin SY, Kim MJ, Kim HR, Kang SC. Antifungal activity of bioconverted oil extract of linoleic acid and fractionated dilutions against phytopathogens *Rhizoctonia solani* and *Botrytis cinerea*. *Agric. Chem. Biotechnol.* 47: 199-204 (2004)
4. Shin SY, Kim HR, Kang SC. Antibacterial activity of various hydroxy fatty acids bioconverted by *Pseudomonas aeruginosa* PR3. *Agric. Chem. Biotechnol.* 47: 205-208 (2004)
5. Sohn HR, Bae JH, Hou CT, Kim HR. Antibacterial activity of a 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid against plant pathogenic bacteria. *Enz. Microb. Technol.* 53: 152-153 (2013)
6. Sohn HR, Baek KY, Hou CT, Kim HR. Antibacterial activity of a 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid against food-born pathogenic bacteria. *Biocatal. Agr. Biotechnol.* 2: 85-87 (2013)
7. Kuo TM, Kim H, Hou CT. Production of a novel compound, 7,10,12-trihydroxy-8(E)-octadecenoic acid from ricinoleic acid by *Pseudomonas aeruginosa* PR3. *Curr. Microbiol.* 43: 198-203 (2001)
8. Kim H, Gardner HW, Hou CT. Production of isomeric (9,10,13)-trihydroxy-11E(10E)-octadecenoic acid from linoleic acid by *Pseudomonas aeruginosa* PR3. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 25: 109-115 (2000)
9. Chang IA, Kim IH, Kang SC, Hou CT, Kim HR. Production of 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid from triolein via lipase induction by *Pseudomonas aeruginosa* PR3. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 301-306 (2007)
10. Bae JH, Suh MJ, Lee NY, Hou CT, Kim HR. Production of a value-added hydroxy fatty acid, 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid, from high oleic safflower oil by *Pseudomonas aeruginosa* PR3. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* 15: 953-958 (2010)
11. Hou CT, Bagby MO, Plattner RD, Koritala S. A novel compound, 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid from oleic acid by bioconversion. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68: 99-101 (1991)
12. Kim H, Gardner HW, Hou CT. 10(S)-hydroxy-8(E)-octadecenoic acid, an intermediate in the conversion of oleic acid to 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77: 95-99 (2000)
13. Ellamar JB, Song KS, Kim HR. One-step production of a biologically active novel furan fatty acid from 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid. *J. Agr. Food Chem.* 59: 8175-8179 (2011)
14. Suh MJ, Baek KY, Kim BS, Hou CT, Kim HR. Production of 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid from olive oil by *Pseudomonas aeruginosa* PR3. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89: 1721-1727 (2011)
15. Chang IA, Bae JH, Suh MJ, Kim IH, Hou CT, Kim HR. Environmental optimization for bioconversion of triolein into 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid by *Pseudomonas aeruginosa* PR3. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78: 581-586 (2008)
16. Kim H, Jang YS, Hou CT. Effect of metal ions on the production of isomeric 9,10,13 (9,12,13)-trihydroxy-11E(10E)-octadecenoic acid from linoleic acid by *Pseudomonas aeruginosa* PR3. *Enz. Microbiol. Technol.* 30: 752-757 (2002)