

Flavobacterium sp. Strain DS5에 의한 Oleic Acid로부터 산화 지방산의 생산 및 회수

허신행 · 김범수[†]

충북대학교 화학공학과
361-763 충북 청주시 흥덕구 성봉로 410
(2009년 7월 20일 접수, 2009년 8월 13일 채택)

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

Shin-Haeng Heo and Beom Soo Kim[†]

Department of Chemical Engineering, College of Engineering, Chungbuk National University,
410 Seongbong-ro, Heungdeok-gu, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea
(Received 20 July 2009; accepted 13 August 2009)

요 약

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 플라스크 배양액을 원심분리하여 세포를 모은 후 한 개의 플라스크에 재현탁하여 세포농도를 증가시킴으로써 10-KSA의 생산이 보통 플라스크 배양의 3.5 g/L에서 6.5 g/L로 향상되었다. 배양액에 Tween-80의 첨가는 10-KSA와 10-HSA의 생산에 크게 영향을 미치지 않았다. 발효 후 배양액을 원심분리한 결과, 펠렛이 두 부분(노란색과 흰색)으로 분리되는 것을 관찰하였다. 기체 크로마토그래피 분석 결과, 10-KSA와 10-HSA는 흰 펠렛에서만 검출되었다. 이는 strain DS5에 의한 생전환 생성물이 세포 밖으로 배출되며 간단한 원심분리 단계를 통해 세포로부터 쉽게 회수될 수 있음을 나타낸다.

Abstract – *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). Increase in cell concentration by centrifuging, collecting cells grown in two flasks, and resuspending in one flask, improved 10-KSA production to 6.5 g/L from 3.5 g/L in a usual flask culture. Tween-80 addition to the culture did not greatly affect the production of 10-KSA and 10-HSA. When culture broth was centrifuged after fermentation, it was observed that pellets were separated into two parts(yellow and white). Gas chromatography analysis showed that 10-KSA and 10-HSA were detected only in a white pellet, suggesting that the bio-conversion products of strain DS5 are extracellularly produced and can be easily recovered from cells by a simple centrifugation step.

Key words: Oxygenated Fatty Acids, *Flavobacterium* sp. Strain DS5, 10-Ketostearic Acid, 10-Hydroxystearic Acid, Oleic Acid

1. 서 론

최근 산업 바이오기술의 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 물질로서 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[1,2]. 식물성 오일의 주성분

인 oleic acid와 linoleic acid와 같은 불포화 지방산의 함량은 soybean oil의 경우 각각 22와 55%, corn oil의 경우 26과 60%, olive oil의 경우 78과 7%에 달한다[1,2].

미생물 전환을 통해 불포화 지방산의 탄소 이중결합에 hydroxy나 keto group과 같은 functional group들을 도입하여 산화불포화 지방산으로 변환시키는 연구가 오래 전부터 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[1,2]. *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus rhodochrous*, *Nocardia cholesterolicum*, *Micrococcus leteus*, *Sarcina lutea*, *Corynebacterium* sp., *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Staphylococcus* sp. 등의 여러 미생물들이 oleic acid로부터 10-hydroxystearic acid(10-HSA) 및 10-

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: bskim@chungbuk.ac.kr

[‡]이 논문은 KAIST 장호남 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

ketostearic acid(10-KSA)를 생산함이 보고되었다[3]. 최근에는 *Bacillus megaterium* ALA2를 이용하여 dihydroxy, trihydroxy, epoxy group 등을 갖는 다양한 산화불포화 지방산들이 생성되었다[1]. 특히 Hou 등[3-5]이 분리한 *Flavobacterium* sp. DS5는 oleic acid로부터 중간 생성물로 10-HSA, 최종 생성물로 10-KSA를 효율적으로 생산함이 보고되었다. 또한 strain DS5의 hydratase는 C-10 위치 특이적이며, 따라서 strain DS5에 의하여 oleic, linoleic, α -linolenic, γ -linolenic acid로부터 생산된 산화지방산들은 모두 10-hydroxy 지방산임이 밝혀졌다[5]. 10-KSA의 효율적 생산을 위하여 플라스크 배양에서 10-KSA 생산에 최적인 배양시간, 온도, pH 등이 조사되었으며[3], 최적 포도당 및 yeast extract 농도, oleic acid 첨가시간 및 첨가량도 결정되었다[6]. 최근에는 soybean oil, olive oil 등 저가의 식물성 오일로부터 직접 10-KSA 및 10-HSA를 생산하기 위한 연구도 수행되었다[7].

본 연구에서는 *Flavobacterium* sp. DS5를 이용하여 oleic acid로부터 10-KSA와 10-HSA의 효율적 생산을 위해 세포농도 증가가 산화지방산 생산에 미치는 영향, 계면활성제 Tween-80의 첨가 효과, 배양액의 원심분리를 통해 생성물을 간단히 회수하는 방법 등의 공학적 연구를 수행하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 균주

본 실험에서 사용한 균주는 *Flavobacterium* sp. strain DS5(NRRL B-14859)이었고, 이 균주는 미국 농무부(United States Department of Agriculture, Peoria, Illinois) ARS Culture Collection으로부터 제공되었다.

2-2. 배지 및 배양

균주의 보존을 위해 tryptone 0.8%, glucose 0.1%, yeast extract 0.4%, agar 1.5% 조성의 TGY agar 배지를 사용하였다. 접종용 균주의 배양은 glucose 10 g/L, yeast extract 15 g/L, K_2HPO_4 5 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, $ZnSO_4 \cdot 0.014$ g/L, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.008 g/L, nicotinic acid 0.01 g/L 조성의 배지를 사용하였다. 배지의 pH는 희석 phosphoric acid(1:3 v/v)를 이용, 7.0으로 조절하였다.

Flavobacterium sp. strain DS5의 플라스크 배양을 위해 TGY agar plate에서 자란 단일 균체를 50 ml의 배지가 들어 있는 250 ml 플라스크에 접종시킨 뒤 30 °C에서 200 rpm으로 하루 동안 진탕 배양시키고, 다시 50 ml의 배지에 2%(v/v)의 농도로 접종하였다. 18 시간 후, 0.3 ml의 oleic acid를 배양액에 첨가하여 48시간 동안 생 전환시켰다.

세포농도가 산화지방산 생산에 미치는 영향을 알아보기 위해 18 시간 후 두 개의 플라스크 배양액을 원심분리하여 세포를 모은 후 한 개의 플라스크에 재현탁하여 세포농도를 증가시켰다. 여기에 oleic acid 1 ml를 첨가하여 48시간 동안 생 전환시켰다.

계면활성제 Tween-80의 첨가효과를 알아보기 위한 실험에서는 18시간 후 배양액 50 ml에 oleic acid 0.3 ml를 투입하기 전 Tween-80을 0.05~1%되도록 첨가하였다.

2-3. 분석 및 정제

균체 성장은 UV-Visible spectrophotometer(Shimadzu, UV-1650PC)를 이용하여 600 nm에서 optical density를 측정하였다.

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

정제된 시료를 50% dichloromethane/50%(95% ethyl acetate/5% methanol) 용매로 녹인 후 1 ml를 채취하여 diazomethane으로 methylation시킨 뒤 GC(Agilent, 6890N)로 정량분석을 실시하였다.

지방산의 methylation을 위한 diazomethane은 diazald(Sigma)로부터 제조하여 사용하였다. 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 μ l를 GC에 주입하였다. GC 분석을 위해 HP-5 비극성 column(diphenyl-dimethylpolysiloxane capillary column, 30 m length, 0.32 mm inner diameter, 0.25 μ m thickness)를 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 270과 280 °C였다. 각각의 retention time은 IS로 사용된 margaric acid의 경우 8.95 min, oleic acid의 경우 9.8 min, stearic acid의 경우 10.1 min이었으며, 생산된 10-KSA는 12.0 min, 10-HSA는 12.2 min에서 검출되었다[6,7].

3. 결과 및 고찰

3-1. *Flavobacterium* sp. strain DS5의 성장 및 산화지방산 생산 특성

Flavobacterium sp. strain DS5는 여러 가지 지방산을 산화시키는 특성이 있으며, 각 성분 지방산에 대한 DS5 균주의 효소 반응성은 oleic > α -linolenic > γ -linolenic > linoleic acid였다[7]. 특히 oleic acid로부터 중간생성물로 10-HSA, 최종 생성물로 10-KSA를 생산해 내며 이에 관여하는 효소는 Fig. 1과 같이 oleic acid로부터 10-HSA로의 반응에서는 hydratase에 의해 진행되고, 10-HSA로부터 10-KSA 생

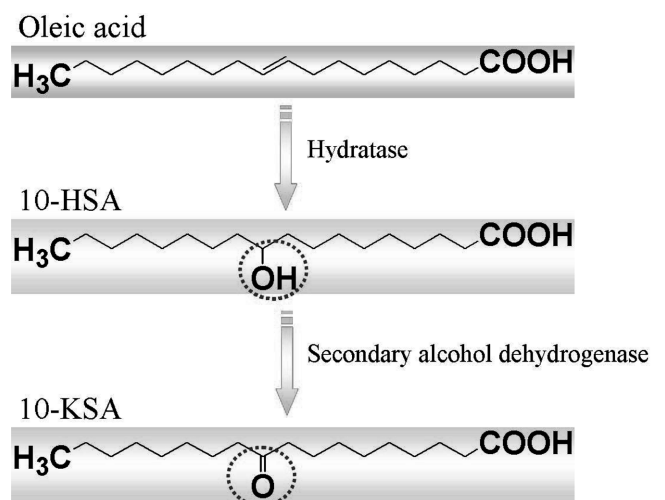


Fig. 1. Microbial conversion scheme and related enzymes for 10-KSA formation via 10-HSA from oleic acid by *Flavobacterium* sp. strain DS5.

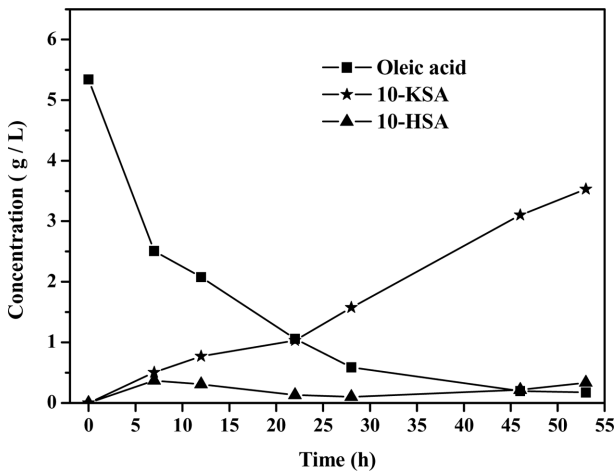


Fig. 2. Time course of the concentrations of 10-KSA, 10-HSA, and unconsumed oleic acid in batch flask culture of DS5.

성 반응에서는 secondary alcohol dehydrogenase에 의해 진행된다[3]. 또한 strain DS5의 hydratase는 C-10 위치 특이적이 보고되었다[5]. Strain DS5의 최적 성장온도 및 pH는 각각 30 °C와 7.5로 보고되었다[3]. 10-KSA 생산을 위한 배지 및 배양조건 최적화 결과, strain DS5는 성장을 위해 yeast extract가 반드시 필요한 것으로 나타났으며, 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 ml이었다[6].

Fig. 2는 위의 최적 조건에서 oleic acid 첨가 후 시간에 따른 10-KSA 및 10-HSA의 생산 농도 및 잔여 oleic acid의 농도 변화를 나타낸다. Oleic acid 소모에 따라 먼저 10-HSA의 농도가 증가하였다가 감소하면서 10-KSA의 농도가 점점 증가함을 볼 수 있다. 이는 Fig. 1의 반응경로와 같이 oleic acid로부터 두 가지 효소가 순차적으로 작용하여 먼저 중간생성물인 10-HSA가 생산되고 10-HSA가 10-KSA로 대사되는 반응이 일어남을 의미한다. 최대 10-KSA 및 10-HSA 생산농도는 각각 3.5 및 0.34 g/L이었으며, oleic acid로부터 10-KSA의 생산수율은 약 65%로 계산되었다.

3-2. 세포농도가 산화지방산 생산에 미치는 영향

세포농도의 증가가 10-KSA 및 10-HSA 생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 18시간 후 두 개의 플라스크 배양액을 원심분리하여 세포를 모은 후 한 개의 플라스크에 재현탁하여 세포농도를 약 두 배 증가시켰다. 여기에 oleic acid 1 ml를 첨가하여 48시간 동안 생전환시킨 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 미전환된 oleic acid의 농도는 7.8 g/L, 생성된 10-KSA 및 10-HSA의 농도는 각각 6.5와 0.71 g/L였다. 이는 한 개의 플라스크로부터 얻어진 3.5 g/L의 10-KSA와 0.34 g/L의 10-HSA보다 훨씬 향상된 결과로써, 세포농도 증가에 따라 oleic acid 전환에 관여하는 효소들의 활성도 비례하여 증가하여 10-KSA와 10-HSA의 생산이 증가하였음을 의미한다. 향후 유가식 배양과 같은 고농도 세포배양 전략을 이용하여 산화지방산의 생산을 더욱 증가시킬 수 있을 것으로 기대된다.

3-3. 계면활성제 Tween-80의 첨가효과

계면활성제는 수용액 상에서 지방산 기질을 균일하게 분배하여

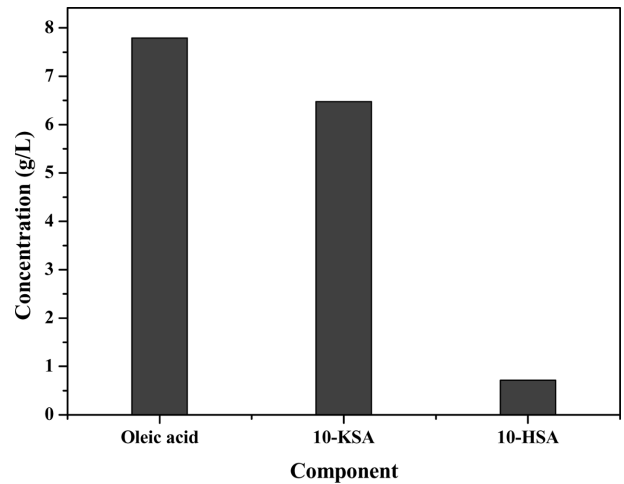


Fig. 3. Concentrations of 10-KSA, 10-HSA, and unconsumed oleic acid obtained by increasing cell concentration. Cells in two flasks were centrifuged, collected, and resuspended to one flask. 1 ml of oleic acid was added to 50 ml culture broth at 18 h.

미생물에 의한 효율적 이용을 증가시킬 수 있다. 따라서 본 연구에서는 계면활성제 중 Tween-80의 첨가가 산화지방산 생산에 미치는 효과를 조사하였다. Tween-80은 polyethylene glycol sorbitan monooleate로 알려진 비이온성 계면활성제로 물-기름 2상 시스템에서 몇 가지 생전환 생성물의 생산을 향상시키는 능력이 있음이 보고되었다[8,9]. *Candida rugosa*에 의한 lipase 생산에서 Tween-80은 lipase 생합성과 세포투과도를 증가시켜 세포 밖으로의 분비를 촉진시킴이 관찰되었다[8]. 또한 Tween-80은 수용액 상에서 soybean oil의 분산을 증가시켜 곰팡이에 의한 eicosapentaenoic acid와 arachidonic acid의 생산을 증가시킴도 보고되었다[9].

Fig. 4는 18시간 후 배양액 50 ml에 oleic acid 0.3 ml을 투입 전 Tween-80을 0.05~1%되도록 첨가하여 48시간 동안 생전환시킨 결과를 나타낸다. Tween-80을 첨가하지 않은 경우(control)보다 Tween-80을 0.1 또는 1%되도록 첨가한 경우 10-KSA 및 10-HSA 생산에 있어 약간의 증가를 나타내었으나 뚜렷한 증가효과는 관찰되지 않았다. 이는 *Bacillus megaterium* ALA2를 이용하여 linoleic acid로부터 12, 13, 17-trihydroxy-9(Z)-octadecenoic acid 생산시 Tween-80을 1% 첨

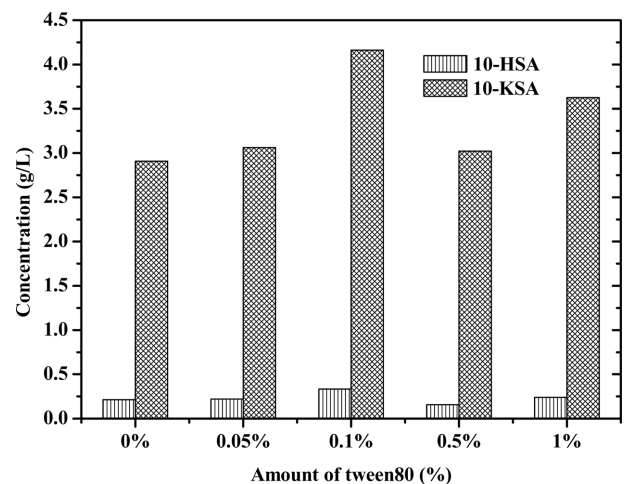


Fig. 4. Effect of Tween-80 addition on the production of 10-KSA and 10-HSA by DS5.



Fig. 5. Photographs of the culture broth after centrifugation.

가하여 control보다 2배 이상 산화지방산 생산을 증가시킨 것[10]과는 다른 결과로서, *Flavobacterium* sp. strain DS5의 경우 수용액 상에서 지방산 기질의 균일한 분배 또는 세포투과도의 증가가 10-KSA 및 10-HSA 생산에 있어 제한인자가 아님을 나타낸다.

3-4. 생성물의 간단한 회수 방법

48시간 동안 oleic acid를 생전환시킨 후 세포 배양액을 원심분리한 결과 Fig. 5와 같이 세포 펠렛 부분이 노란색과 흰색의 두 부분으로 나누어지는 것이 관찰되었다. 각각의 부분을 ethyl acetate로 추출하여 GC 분석 결과 노란 부분에서는 지방산 피크가 검출되지 않았으나 흰 부분에서는 10-KSA와 10-HSA가 모두 검출되었다. Fig. 6에 나타난 바와 같이 흰 부분은 89%의 10-KSA, 7%의 10-HSA, 1%의 oleic acid 및 기타 지방산을 포함한 성분으로 이루어져 있었다. 이는 노란 부분은 DS5 균체에 해당하며, 흰 부분은 DS5가 생산한 산화지방산을 비롯한 성분들임을 의미한다. 이러한 사실은 DS5에 의해 생산된 산화지방산은 세포 체외로 배출되며, 배양 후 원심분리 1단계 공정을 통해 세포 균체 및 상등액으로부터 10-KSA 및 10-HSA를 포함한 산화지방산을 간단히 회수할 수 있음을 나타낸다.

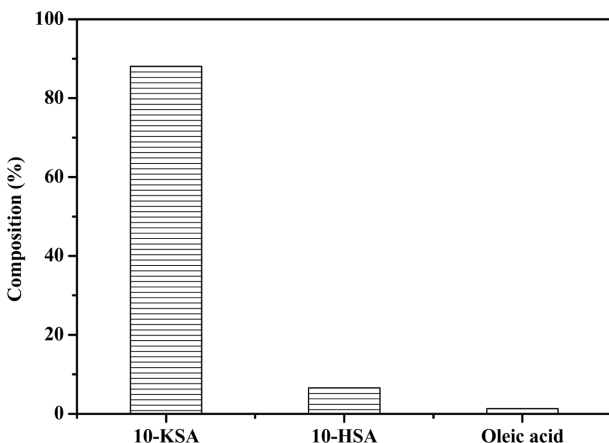


Fig. 6. Product analysis of white pellet after centrifugation.

이는 통상의 생물제품들이 복잡한 다단계 분리정제공정을 통해 생산되어 전체 생산단가 중 분리공정이 차지하는 비중이 상당히 높음을 감안할 때 손쉽게 생성물을 회수할 수 있는 방법이므로 경제적인 면에서 큰 장점이라고 할 수 있다.

이상과 같이 *Flavobacterium* sp. strain DS5를 이용하여 oleic acid로부터 10-KSA, 10-HSA 등 산화지방산 생산시 세포농도 증가가 산화지방산 생산에 미치는 영향, 계면활성제 Tween-80의 첨가 효과, 배양액의 원심분리를 통해 생성물을 간단히 회수하는 방법 등의 연구를 수행하였으며, 이상의 결과는 향후 10-KSA의 경제적인 생산을 위한 기초 데이터로 활용될 수 있을 것이다.

감 사

본 연구는 2008학년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다. 균주를 제공한 미국 농무부(United States Department of Agriculture, Peoria, Illinois) National Center for Agricultural Utilization Research의 Dr. Ching T. Hou에게 감사드립니다.

참고문헌

- Hou, C. T. and Hosokawa, M., in C. T. Hou(Ed.), Handbook of Industrial Biocatalysis, CRC Press, 7-1~7-25(2005).
- Kim, B. S., Song, B.-S. and Hou, C. T., in C. T. Hou, and J. F. Shaw(Ed.), Biocatalysis and Bioenergy, John Wiley & Sons, 547-555(2008).
- Hou, C. T., "Production of 10-ketostearic Acid from Oleic Acid by *Flavobacterium* sp. Strain DS5(NRRL B-14859)," *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 3760-3763(1994).
- Hou, C. T., "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(1994).
- Hou, C. T., "Is Strain DS5 Hydratase a C-10 Positional Specific Enzyme? Identification of Bioconversion Products from α - and γ -linolenic Acids by *Flavobacterium* sp. DS5," *J. Ind. Microbiol.*, **14**, 31-34(1995).
- Song, B. S., Han, N. S., Lee, B. H., Hou, C. T. and Kim, B. S., "Production and Analysis of Oxygenated Unsaturated Fatty Acids from Oleic Acid by *Flavobacterium* sp. Strain DS5," *Kor. Soc. Biotechnol. Bioeng. J.*, **24**, 41-46(2009).
- Heo, S.-H., Hou, C. T. and Kim, B. S., "Production of Oxygenated Fatty Acids from Vegetable Oils by *Flavobacterium* sp. Strain DS5," *New Biotechnol.*, doi:10.1016/j.nbt.2009.03.003(2009).
- Dalmau, E., Montesinos, J. L., Lotti, M. and Casas, C., "Effect of Different Carbon Sources on Lipase Production by *Candida rugosa*," *Enzyme Microb. Technol.*, **26**, 657-663(2000).
- Cheng, M. H., Walker, T. H., Hulbert, G. J. and Raman, D. R., "Fungal Production of Eicosapentaenoic and Arachidonic Acids from Industrial Waste Streams and Crude Soybean Oil," *Biore-source Technol.*, **67**, 101-110(1999).
- Kim, B. S., Kim, H.-R. and Hou, C. T., "Effect of Surfactant on Production of Oxygenated Unsaturated Fatty Acids by *Bacillus megaterium* ALA2," *New Biotechnol.*, doi:10.1016/j.nbt.2009.09.002(2009).