

## 불포화 지방산 함유 식물유를 이용한 천연 6-Dodecen-4-oilde (Butter Lactone) 생산을 위한 2-Stage Microbial Biotransformation

권순향 · 김경주 · 김용휘\*

세종대학교 생명식품공학부 식품공학과

2-단계 미생물 생물전환법을 이용하여 불포화 지방산을 다량 함유하고 있는 식물유로부터 천연 6-dodecen-4-oilde (butter lactone)을 생산하였다. Microbial lipase를 이용하여 식물유에 함유된 불포화 지방산을 분리한 후, *Pseudomonas* sp. NRRL B-2994의 hydroxylation 기작을 이용하여 광활성의 hydroxyl fatty acid (HFA)로 전환시켰다. *Pseudomonas* sp.는 불포화 지방산 linoleic acid를 >75% 함유한 홍화유를 48시간의 생물전환공정 과정을 통해 8 g/L의 10-hydroxy-12(z)-octadecenoic acid를 생성하였으며 평균 39.2% 생물전환률을 보였다. 원심 분리된 10-hydroxy-12(z)-octadecenoic acid는 2차적으로 *Yarrowia lipolytica* ATCC34088의 제한적인  $\beta$ -oxidation 기작을 이용하여 4-hydroxy-6-dodecenoic acid로 전환되었다. 배양액 내 존재하는 4-hydroxy-6-dodecenoic acid는 4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 첨가하여 배양액을 pH 4.0로 낮추고 100°C에서 5분 동안 가열하여 6-dodecen-4-oilde (butter lactone)으로 lactone 화하였다. 천연 6-dodecen-4-oilde는 불포화 lactone으로 기존에 사용된 6-dodecan-4-oilde (dodecalactone) 및 4-decan-4-olide 비교하여 독특한 향 특성을 지니고 있다.

**Key words** □ biotransformation, hydroxylation, natural lactone, unsaturated fatty acids,  $\beta$ -oxidation

전 세계의 향료 및 향장 원료물질(flavor and fragrance chemicals)은 70% 이상이 유기합성(organic synthesis)에 의하여 생산되고 있다. 유기합성에 의해 생산되는 향료 및 향장 원료물질의 생산 공정은 대부분 고온, 고압 조건과 중금속 등을 포함한 독성이 강한 촉매를 이용하는 화학공정으로 심각한 환경 문제를 야기하며(1, 3), 최근에는 환경보존 노력의 일환으로 새로운 환경 친화적 합성방법인 청정 유기합성(Green Chemistry)에 대한 관심이 증가하였다. 이에 따라 미생물 및 효소를 이용한 생물전환(biotransformation) 및 생촉매(biocatalysis)를 이용한 생유기합성(Bio-organic synthesis)은 환경친화적 방법을 통한 유기합성 기술로 재조명을 받고 있다.

또한 국내 및 세계적인 소비자의 천연 소재에 대한 선호로 인하여 천연 원료물질의 요구가 증가하고 있다. 그 중 천연 향료 및 향장 원료 물질의 생산은 대부분 식물에서 추출된 물질을 사용하고 있으나, 기후 조건의 변화 및 생산량의 한계에 따라 그 생산량에 제한이 있다. 이러한 한계를 극복하기 위해 미국 FDA의 천연물질 생산 관리 기준(12)에 따른 생물공학기술을 이용한 새로운 방법의 개발이 요구되어, 전 세계적으로 생물전환 및 생촉매를 이용한 생유기합성법 개발이 진행되고 있다. 다양한 향료 및 향장 원료물질 중 lactones은 과일향 및 낙농향(dairy flavor)의 중요한 성분으로 천연 과일향 음료 생산에 중요한 역할을 한다. 과일에서 추출된 천연 과일향의 제한적 공급으로 인하여 생

물공학기술을 이용한 새로운 lactones의 생산 기술 개발이 절실히 필요하다. 이미 피마자유(castor oil)의 주성분인 ricinoleic acid (12-hydroxy-9-octenoic acid)로 *Candida* sp.를 이용하여 제한적인  $\beta$ -oxidation을 통해  $\gamma$ -decalactone 생산 기술이 개발되었으며(4, 14, 15), 최근에는 ricinoleic acid를 *Candida* sp.의  $\beta$ -oxidation에 의하여 중간체인 4-hydroxy decanoic acid로 전환시키고, lactonization 반응을 거쳐 과일향의 주성분인 decalactone으로 합성되는 상압화 공정의 개발이 완료되었다. 하지만 피마자유의 공급과 가격이 매우 변동적이어서 일부에서는 이를 대체할 새로운 식물유의 원료확보 및 다양한 lactones 생산을 위한 새로운 생물전환법의 개발의 필요성이 대두되었다(2).

식물유는 대부분 C18 지방산을 다량 함유하고 있으며, 일부 식물유는 불포화 지방산을 다량 함유하고 있다. 불포화 지방산의 이중 결합은 미생물의 monooxygenase의 hydroxylation 기작에 의하여 hydroxy fatty acid (HFA)로 변환된다. 미생물을 이용한 monohydroxy fatty acid의 생산은 1962년 Wallen et al.에 의해 최초로 보고 되었으며(13), *Pseudomonas* sp. NRRLB-3226 (6), *Acetobacterium woodii* (8), *Nocardia cholestericum* (10), *Flavobacterium* sp. (9), *Lactobacillus plantarum* (16) 등의 다양한 미생물에 의한 상업적인 생물전환법 개발이 진행되고 있다. 미생물의 생물전환에 의해 생성된 HFA는 첨가된 hydroxy group에 의해 non-hydroxylated fatty acid에 비하여 높은 점성과 반응성 등과 같은 특이한 성질을 갖으며(5), 이러한 특성으로 인하여 resins, waxes, nylons, plastics, lubricants, cosmetics 등의 산업적으로 중요한 전구물질로 사용될 수 있고, 코팅제 및 페인트의 첨

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 82-2-3408-3228, Fax: 82-2-3408-3319  
E-mail: kimyh@sejong.ac.kr

가물로 광범위하게 사용할 수 있다(11). 하지만 생물전환법에 의한 HFA의 생산은 경제적 경쟁력을 지니지 못하고 있다. 최근 천연 향료의 공급이 확대되어 새롭게 생성된 4- 또는 5-HFA를 이용한 새로운 lactones의 생산 개발 공정의 개발에 관심이 집중되었다. 생성된 HFA는 미생물의 제한된  $\beta$ -oxidation 대사에 의하여 분자량이 작은 HFA로 전환한 후, lactonization reaction에 의하여  $\gamma$ - 또는  $\delta$ -lactone을 생성하여 고부가 천연 과일 향을 위한 중요한 향료 및 향장 원료물질이 될 수 있다.

본 연구는 불포화 지방산이 다량 함유된 식물유 중 linoleic acid가 다량 함유된 홍화유(>75%)를 이용하여 hydroxylation 반응 활성을 가진 우수한 미생물을 동정하여 whole-cell을 이용한 생물전환공정을 개발하여 상대적으로 저가인 식물유를 고부가의 산업 응용 소재인 HFA로 전환한 후, 생성된 다양한 HFA를 미생물의 제한적인  $\beta$ -oxidation을 이용한 2차적 생물전환공정을 개발하여 천연 lactone류를 생산하는데 목적이 있다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 균주의 동정

Hydroxylation reaction 활성을 지닌 미생물을 분리하기 위하여

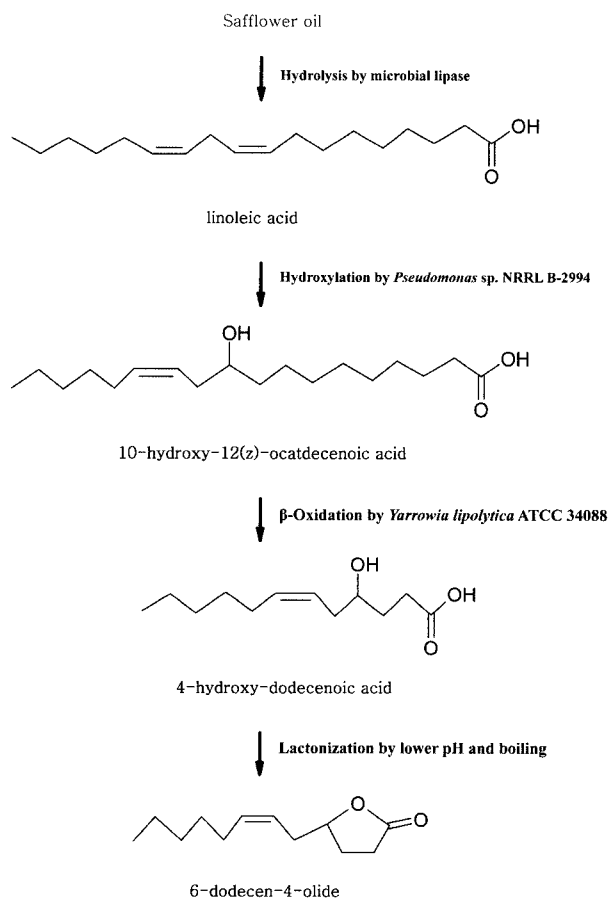


Fig. 1. Production of 6-dodecen-4-olide (butter lactone) from hydrolyzed safflower oil by 2-stage microbial biotransformation.

한국생명공학연구원 KCTC (Yusung, Korea)에서 분양 받은 *Pseudomonas* 균주 및 실험실 내 보유하고 있는 미생물 47종을 사용하였다. 모든 균주는 nutrient agar plate (NA)에서 24시간 동안 28°C에서 배양한 후 4°C에 보관하였다. 장기간 균주를 보관하기 위하여 모든 균주는 nutrient broth medium (NB, Difco Laboratories Detroit, USA)에서 24시간 동안 28°C에서 배양한 후, 급속 동결하여 -70°C에서 보관하였다. 높은 hydroxylation 활성을 지닌 균주를 동정하기 위하여 *Pseudomonas screening medium* (PSM, yeast extract 0.5%,  $K_2HPO_4$  0.15%,  $KH_2PO_4$  0.15%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05%, tween 80 0.02%)를 사용하였다. PSM는 25% NaOH 사용하여 pH 7.0로 조정하였다. 멸균된 배지에 균주를 접종하기 직전에 멸균된 50% glucose (w/w)를 5 g/L와 microbial lipase로 가수분해된 홍화유를 멸균하여 0.14% (v/v) 넣어주고 150 rpm, 28°C에서 24시간 배양하였다.

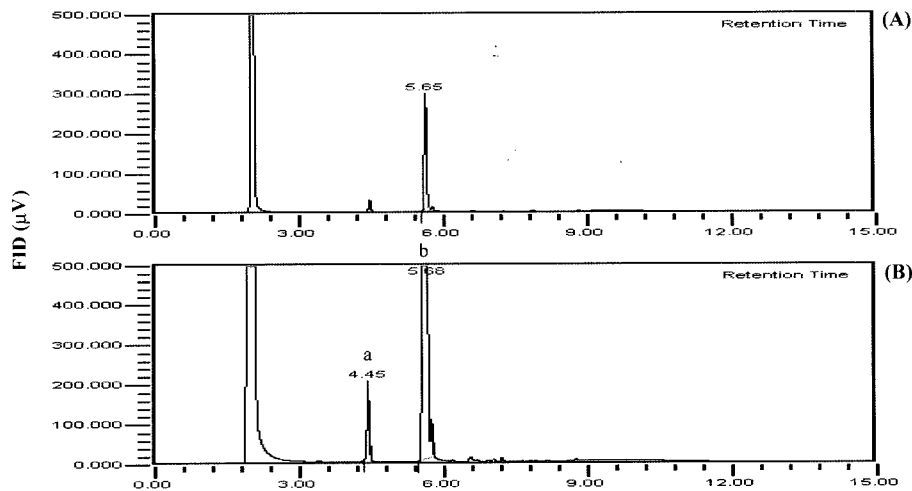
제한적  $\beta$ -oxidation 기능을 지니고 있는 *Yarrowia lipolytica* ATCC34088는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 구입하였다. 구입된 *Y. lipolytica*는 YM medium (Difco Laboratories Detroit, USA)을 이용하여 24시간 동안 28°C에서 배양하여 4°C에 보관하였다. 장기간 균주를 보관하기 위하여 모든 균주는 YM medium에서 24시간 동안 28°C에서 배양한 후, 급속 동결하여 -70°C에서 보관하였다.

### 시약 및 시료의 준비

본 실험 중 일반 분석 및 배지 모든 시약은 일급 분석용으로 Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) 및 (주)대정화학(Korea)에서 구입하여 사용하였다. 분석에 사용한 표준물질인 linoleic acid는 ICN Biomedicals, Inc. (USA)에서 구입하여 사용하였고,  $\gamma$ -decalactone은 서울향료 (주)(Korea)에서 받아서 사용하였다. 배지 준비를 위한 물은 일반수(tap water)와 deionization 수지를 이용한 탈이온수(d-water)를 사용하였다. 실험에 사용된 홍화유는 대구 의성 홍화원에서 추출된 홍화씨유를 사용하였다. 홍화유는 75% 이상의 높은 linoleic acid를 함유하는 것으로 홍화유의 불포화 지방산의 함량은 methylation reaction 후 gas chromatography (GC)를 이용하여 검증한 후 사용하였다. 홍화유는 생물반응기에 홍화유 20%와 lipase MY (AMANO, Japan)를 oil양 기준으로 1% 넣고 d-water를 함께 넣은 후 37°C에서 800 rpm으로 회전시키면서 16-18시간 동안 가수분해 시켰다. 가수분해 반응 중 pH 조절기를 이용하여 25% (w/w) NaOH로 pH를 6.5로 유지하였다. 가수분해 반응은 65°C에서 30분간 가열하여 정지시켰다. 가수분해된 홍화유는 실온으로 냉각시킨 후, 상층의 오일층을 회수하여 지방산을 분리 수거한 후 생물전환공정에 사용하였다.

### 생물전환공정을 위한 균주의 배양조건

**Hydroxylation** Hydroxylation 반응을 보이는 균주를 동정한 결과 가장 hydroxylation 반응성이 큰 균주로 확인된 *Pseudomonas* sp. NRRL B-2994를 사용하여 홍화유에 함유된 불포화 지방산 linoleic acid로부터 10-hydroxy-12(z)-octadecenoic acid를 생산하는 생물공정을 개발하였다. 접종 균주는 NB 배지



**Fig. 2.** Gas chromatography analysis of hydrolyzed safflower oil. (A) Methyl linoleate, (B) Hydrolyzed safflower oil. The relative areas of peak a (methyl palmitate) and peak b (methyl linoleate) were 12 % and 79 %, respectively. Gas chromatography was performed on Donam GC DS-62000 (Donam co., Korea) equipped with a flame ionization detector (FID) and a HP-5 capillary column (30 m, 0.32 mm ID). The column temperatures were programmed from 200 to 300°C at a rate of 10°C per min. The injector and detector temperatures were 250°C and 275°C. Helium was used as the carrier gas.

에 배양 후, 동결 보관하였다. 동결 보관된 *Pseudomonas* sp.를 증식용 배지에 접종하여 48시간 동안 25°C에서 배양하여 hydroxylation 반응을 위한 생산배지의 접종균주(inoculums)로 사용하였으며, 증식용 배지의 조성은 yeast extract 0.5%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.4%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%, tween 80 0.02%로 구성되었으며 pH는 25% KOH를 사용하여 멸균 전 pH 7.0으로 조정하였다. 멸균된 증식용 배지에 동결 보관된 균주를 접종하기 전, 가수분해 된 홍화유 0.14%(멸균)와 glucose 0.25%(멸균)를 첨가하였다. 100 ml 증식용 배지를 넣은 500 ml 삼각 플라스크에 동결 보관된 균주를 1% 접종하고 25°C에서 200 rpm으로 48시간 배양하였다. Hydroxylation 반응은 생산배지를 사용하였으며, 그 조성은 yeast extract 1.0%, soypeptone 0.5%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.4%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%, tween 80 0.02%로 구성되었으며, pH는 25% KOH를 사용하여 멸균 전 pH 6.5로 조정하였다. 멸균된 생산배지에 가수분해 된 홍화유 0.14%(멸균), glucose 0.5%(멸균)를 첨가한 후 접종하였다. 2.5-l 생산배지를 넣은 3-l fermenter에 접종균주(inoculums) 1%를 접종하고 26°C에서 420 rpm, 0.3 v/v/m aeration, 24-30시간 배양하였다. 탄소원으로 넣어준 glucose양이 0이 되고 spectrophotometer (Model Spectronic 20D, MILTON ROY Co., USA)를 이용하여 1/10로 희석된 배양액의 optical density (O.D.660)가 약 1이 되었을 때, aeration을 멈추고 25% phosphoric acid를 사용하여 pH를 6.5로 조절하였다. Lipase MY를 0.5 g/L로 넣고 홍화유를 10 g/L을 0.52 g/L/hr로 첨가하면서 agitation을 900 rpm으로 높인다. 홍화유가 완전히 첨가되면 생물 전환과정을 48시간 동안 지속시킨 후, 25% phosphoric acid를 사용하여 pH를 3.0으로 조절한 후 121°C에서 15분간 멸균하여 반응을 종결시켰다. 발효조의 온도가 50°C에 도달하면 agitation

을 멈추고 오일층을 분리하고 수거하여 methylation reaction 후, GC 분석을 통해 HFA함량을 측정하였다.

**제한적  $\beta$ -oxidation** Ricinoleic acid (12-hydroxy-9-octadecenoic acid)를  $\gamma$ -decalactone로 생물전환 시키는 것으로 알려진 *Y. lipolytica*를 사용하여 실험하였다. *Pseudomonas* sp.의 hydroxylation 반응으로 생산된 10-hydroxy-12(z)-octadecenoic acid로부터 6-dodecane-4-oilide (butter lactones)의 생산을 위한 생물전환공정을 개발하였다. 동결 보관된 *Y. lipolytica*를 증식용 배지에 접종하여 28°C에서 24시간 동안 배양 한 후, lactones 생산을 위한 생산배지에 접종하였다. 증식용 배지의 조성은  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_3$  13 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  7 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.8 g/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  60 mg/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  90 mg/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  5 mg/L,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  10 mg/L, NaCl 100 mg/L, biotin 1 mg/L, Thiamin HCl 2 mg/L, glucose 20 g/L로 구성되었으며, pH는 25% NaOH를 사용하여 7.0으로 조정하였다. Lactones 생산 배지의 조성은 yeast extract 30 g/L, 홍화유 20 g/L, 10-hydroxy-12(z)-octadecenoic acid 20 g/L, tween 80 0.4 g/L로 구성되었으며, pH는 25% NaOH를 사용하여 7.0으로 조정하여 사용하였다. *Y. lipolytica*를 증식용 배지에 접종하여 28°C에서 150 rpm으로 24시간 배양한 후, lactones 생산배지에 증식용 배지의 균주 2%를 접종하고 28°C에서 750 rpm으로 24시간 동안 생물전환 과정을 진행시켰다. 10-hydroxy-12(z)-octadecenoic acid를 미생물의 제한적인  $\beta$ -oxidation 반응을 통해 4-hydroxy-6-dodecenoic acid로 전환시킨 후, 4 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 를 첨가하여 배양액을 pH 4.0으로 낮추고 100°C에서 30분 동안 가열하여 6-dodecane-4-oilide (butter lactone)을 생산하였다. 생산된 6-dodecane-4-oilide는 ethyl acetate를 이용하여 분리 정제한 후 GC 분석 후 함량을 측정하였다.

### Glucose 함량의 측정

배지 내 glucose의 함량을 결정하기 위하여 배양액을 원심분리 (5,000×g, 20 min)한 후 상층부를 회수하였다. 회수된 상층액은 glucose의 함량에 따라 희석하여 YSI 2700 SELECT Biochemistry Analyzer (YSI Life Science, Detroit, USA)를 이용하여 배지 내 glucose 함량을 정량하였다.

### Gas Chromatograph (GC)를 이용한 생산물의 분석

**Hydroxy fatty acid(HFA)의 분석** 배양기에서 10-hydroxy-12(z)-octadecenoic acid로 전환된 상층액을 회수하여 50% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 사용하여 pH 2.0으로 조절한 후, 시료와 같은 분량의 ethyl acetate로 3회 추출하고, 포화 NaCl 용액으로 두 번 씻어준 후 적당량의 anhydrous sodium sulfate로 수분을 제거하였다. Ethyl acetate는 rotary evaporator (Eyela, Japan)를 사용하여 제거하고 지방산을 회수하였다. 회수된 지방산에 5배의 10% BF<sub>3</sub> methanol을 첨가하고 증탕으로 100°C에서 5분간 가열하였다. 반응액이 식으면 1-2배의 d-water를 이용하여 BF<sub>3</sub> methanol을 제거한 후, 포화 Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>를 이용하여 오일층을 분리하여 상층액을 회수한다. Methyl ester 된 지방산은 HP-5 capillary column (30 m, 0.32mmID, Hewlett Packard, USA)가 장착된 gas chromatography (Model DS 6200, Donam, Korea)을 사용하여 분석하였다. 오븐의 온도는 200°C에서 300°C까지 10°C/min으로 승온시켰다. Detector는 flame ionization detector를 사용하였으며 detector의 온도는 275°C, injector의 온도는 250°C로 하였다. Carrier gas로 helium을 사용하였다.

**6-dodecen-4-oilde의 분석** *Y. lipolytica*의 제한적인 β-oxidation 반응을 통해 10-hydroxy-12(z)-octadecenoic acid를 4-hydroxy-6-dodecenoic acid로 전환시킨 후, 4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 첨가하여 배양액을 pH 4.0으로 낮추고 100°C에서 30분 동안 가열하여 lactonization 반응을 통해 6-dodecen-4-oilde (butter lactone)을 생산하였다. 생산된 6-dodecen-4-oilde는 ethyl acetate를 이용하여 3회 추출한 후 rotary evaporator를 사용하여 ethyl acetate를 제거하였다. 분리 정제된 6-dodecen-4-oilde는 농도에 따라 ethyl acetate로 희석하여 HFA의 GC 분석과 동일한 조건으로 함량을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 홍화유의 linoleic acid 함량

일반적으로 홍화유는 50-80%의 2가 불포화 지방산인 linoleic acid를 포함한다고 알려져 있다. 실험에 사용한 경북 의성 홍화유의 지방산 조성을 분석하기 위하여 홍화유를 가수분해하여 methyl ester화하고 GC로 분석한 결과, 실험에 사용된 홍화유는 75% 이상의 linoleic acid를 함유하고 있음을 확인하였다(Fig. 2). 경북 의성에서 생산된 홍화유는 고 linoleic acid 함유한 천연 식물유로, 분리 정제된 linoleic acid를 사용하지 않고 상대적으로 저가인 홍화유를 사용하여 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid를 생산하는 생물전환공정을 개발할 경우 천연 HFA를 생성할 수

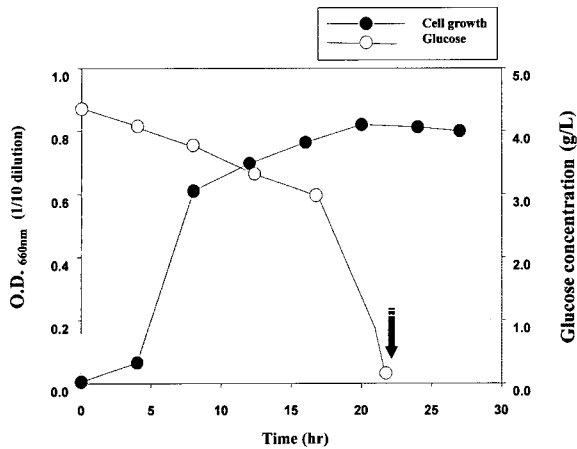
있어 천연 소재 생산에 중요한 원료로서의 가치를 지니고 있다. 국내에서 생산된 고 linoleic acid 홍화유를 사용할 경우, 국내 홍화 재배 농가에서 천연 향료 생산을 통한 부가 소득을 통해 지속적인 수익을 보장할 수 있게 될 것이다. 가수분해된 홍화유를 이용한 천연 lactones 생산 과정은 Fig. 1에 도식화 되었다.

### Hydroxylation 반응을 위한 균주의 동정

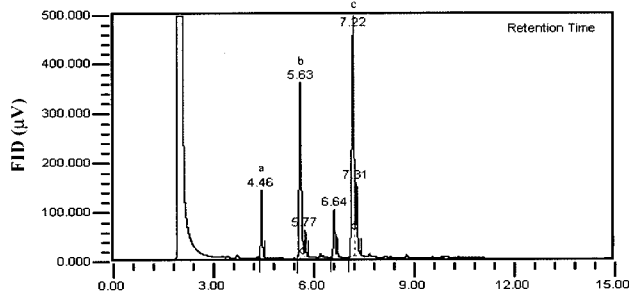
총 47종의 *Pseudomonas* 속 균주를 screening한 결과, 대부분 hydroxylation 활성을 보여 주었으며, 특히 *Pseudomonas* sp. NRRLB-2994는 monooxygenase의 활성에 의하여 홍화유에 포함된 linoleic acid를 가장 효과적으로 hydroxylation시켜 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid로 변환시킴을 확인하였다. El-Sharkawy *et al.* (7)의 연구 결과에 의하면 *Pseudomonas* sp. NRRL B-2994는 불포화 지방산 oleic acid를 10-ketosteraric acid를 생성하는 것으로 보고되었으나, 본 실험에서는 2가 불포화 지방산이 많이 포함되어있는 가수분해된 홍화유를 사용하여 keto fatty acid를 환원시킨 HFA를 생성하는 것을 확인하였다. HFA함량은 상대적으로 높은 aeration에 의해 생성되는 것으로 추정되고 있으나, 생물전환공정 중 keto fatty acid가 HFA 환원되는지 혹은 HFA가 저 aeration에 의해 keto fatty acid를 생성하는지는 정확히 규명되지는 않았다. 또한 본 실험실에서 보관하고 있는 균주가 계대배양 및 보관 중 monooxygenase의 mutation에 의하여 HFA가 생성되는지를 확인하기 위한 효소의 특이성 연구가 진행되고 있다.

### Linoleic acid로부터 10-hydroxy-12(z)-octadecenoic acid의 생물전환 공정

대부분의 이전 연구들에서는 *Pseudomonas* sp. NRRL B-2994의 세포 추출물을 이용하여 hydroxylation 반응 공정을 보고하였으나, 본 연구는 *Pseudomonas* sp. NRRL B-2994의 whole cell을 이용한 생물전환공정을 개발하였다. 미생물을 이용한 hydroxylation 반응을 유도할 경우, 미생물이 첨가된 지방산을 분해하여 성장할 수 없기 때문에 불포화 지방산의 hydroxylation whole cell 생물전환 공정은, hydroxylation 반응을 위한 충분한 cell mass를 확보할 수 있는 cell 성장기와 whole cell의 monooxygenase의 활성을 이용한 hydroxylation 반응기로 구분된다. *Pseudomonas* sp. NRRL B-2994의 성장 정도와 발효기에 기질 첨가 시점을 알아보기 위해 O.D.와 glucose 농도를 측정하였다(Fig. 3). *Pseudomonas* sp. NRRL B-2994는 stationary phase cell 보다는 log phase cell에서 monooxygenase 활성을 보여(7, 10, 12), monooxygenase activity를 지닌 균체의 양을 최대화하기 위해 late log-phase cell을 사용하는 것이 최적으로 확인되었다. 또한 *Pseudomonas* sp. NRRL B-2994는 균체의 성장을 위해 공급된 glucose가 있을 경우, 불포화 지방산을 이용한 monohydroxylation reaction activity를 보이지 않았다. 최적의 hydroxylation activity를 보이는 시기는 첨가한 탄소원인 glucose를 소비한 상태로, optical density는 660 nm에서 측정하여 균체액을 1/10 dilution한 것이 1에 가까운 배양액으로, 이 시기에 가



**Fig. 3.** The adding point of substrate and cell growth condition of *Pseudomonas* sp. NRRL B-2994 at 2.5-l fermenter, in glucose conc. and optical density. The arrow in Figure is adding point of substrate.



**Fig. 4.** Gas chromatography analysis of crude microorganism extract with 10-hydroxyoctadecenoic acid. a: methyl palmitate, b: methyl linoleate, c: methyl 10-Hydroxy-12-octadecenoic acid by *Pseudomonas* sp. NRRL B-2994. Gas chromatography was performed on Donam GC DS-62000 (Donam co., Korea) equipped with a flame ionization detector (FID) and a HP-5 capillary column (30 m, 0.32 mm ID). The column temperatures were programmed from 200 to 300°C at a rate of 10°C per min. The injector and detector temperatures were 250°C and 275°C. Helium was used as the carrier gas.

수분해된 홍화유를 첨가하였다. 실험실용 3-liter 발효기에서 충분히 배양한 균체에 가수 분해된 홍화유를 첨가한 후, 24-30 시간의 생물전환공정을 거쳐 생산된 지방산을 회수하여 methyl ester로 만들어 10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid를 GC로 분석하였으며, 평균 39.2%의 conversion 효율을 보였다(Fig. 4, Table 1). 가수분해된 홍화유는 10 g/L을 0.52 g/L/hr 속도로 발효기에 첨가되었으며, 생물전환율을 높이기 위해 홍화유의 양을 늘리거나

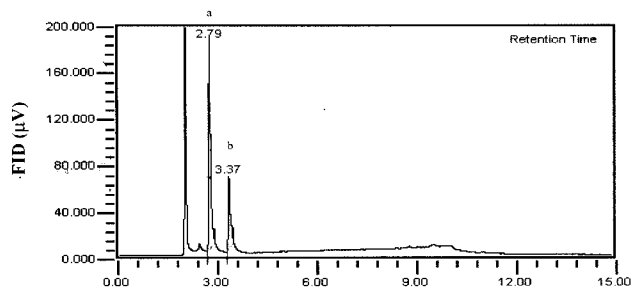
첨가속도를 증가시킬 경우 생물전환율은 상대적으로 크게 떨어졌다. 이러한 생물전환율의 급감은 가수분해된 홍화유에 함유된 불포화 지방산에 의한 cell toxicity에 기인하는 것으로 추정된다. 한편, *Pseudomonas* sp. NRRL B-2994를 이용한 linoleic acid의 HFA로의 전환은 기존에 보고된 연구 결과와 달리 aeration을 중단하고 agitation을 900 rpm으로 올려줄 경우에 가장 효과적인 생물전환율을 보였다. 이러한 결과는 기존에 보고된 *Pseudomonas* sp. NRRL B-2994의 keto fatty acid 생산과 달리 HFA 생산 기작에 대한 차이를 보이는 것으로 추정된다. 현재 생산 수율의 향상 및 scale-up을 위한 발효 공정의 최적조건에 대한 연구가 15-liter Lab 발효기를 이용하여 진행되고 있다. 생산 수율 향상을 통한 산업적 공정 개발은 상대적으로 저가의 기능성 식품소재인 홍화유에서 고부가 산업 응용 소재인 수산기를 가진 HFA을 생산하게 됨으로써 천연 향료 생산뿐만 아니라 상대적으로 규모가 큰 다양한 고분자 화학분야에 전구물질로 사용될 수 있다.

**Lactone 생산을 생물전환 공정**

기존에 알려진 피마자유에 다량 함유되어있는 ricinoleic acid (12-hydroxy-9-octadecenoic acid)를 이용하여 6-hydroxy-4-decanolide ( $\gamma$ -decalactone)으로 전환 시키는 생물전환공정에 사용된 *Y. lipolytica* ATCC34088로 실험을 진행 하였다(5, 13, 14). *Y. lipolytica*는 ricinoleic acid와 함께 배양할 경우  $\beta$ -oxidation 반응을 통하여 첨가된 fatty acid를 탄소원으로 이용하여 성장을 하며, HFA는 자체에 포함되어 있는 hydroxyl group에 의하여  $\beta$ -oxidation을 완전하게 진행시키지 못하고 분해가 정지된 상태에서  $\beta$ -oxidation 반응의 중간체인 6-hydroxy-4-decanoic acid를 배양액에 축적하는 것으로 알려져 있다. 이러한 기작을 이용하여 *Y. lipolytica* ATCC34088는 *Pseudomonas* sp. NRRL B-2994의 생물전환 공정을 거쳐 생산된 10-hydroxy-12(z)-octadecenoic acid를 이용하여 성장과 더불어  $\beta$ -oxidation 반응의 중간체인 6-hydrox-4-decanoic acid 생산하는 것을 확인하기 위하여 24시간 동안 생물전환반응을 하였다. 생물전환 반응은 4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 혹은 citric acid를 사용하여 pH를 4.0로 낮추어 반응을 정지하였다. 이후 배양액은 열을 가하여 lactonization 시킨 후 ethyl acetate를 이용해 추출하여 GC로 분석하였다. GC 분석은  $\gamma$ -decalactone를 표준물질로 사용하여 분석하였으며, *Y. lipolytica* ATCC34088은  $\gamma$ -decalactone과는 다른 락톤인 6-dodecen-4-olide (butter lactone)가 생산하였다(Fig. 5). 하지만  $\beta$ -oxidation 반응의 중간체인 6-hydroxyl-4-decanoic acid는 생물반응을 지속할 경우 완전 분해되어 배양액내 다량 축적되지 않았다. 천연 lactones 생산의 상업화를 위한 생물전환공정의 개발을 위하여 lactones 중간체의 축적 및 생물전환공정의 최적화에 관련된 연구가 현재 진행되고 있다.

**Table 1.** Production of 10-hydroxyoctadecenoic acid in lab fermenter

Incubation time (hr)	Total oil added (g)	Linoleic acid (%)	10-hydroxy-12-octadecenoic acid (%)
24	15	40.9	31.2
48	25	25.3	39.2



**Fig. 5.** Gas chromatography analysis of 6-dodecen-4-olide by microbial biotransformation. a:  $\gamma$ -decalactone, b: 6-dodecen-4-olide (butter lactone) by *Y. lipolytica* ATCC34088. Gas chromatography was performed on Donam GC DS-62000 (Donam co., Korea) equipped with a flame ionization detector (FID) and a HP-5 capillary column (30 m, 0.32 mm ID). The column temperatures were programmed from 200 to 300°C at a rate of 10°C per min. The injector and detector temperatures were 250°C and 275°C. Helium was used as the carrier gas.

이러한 2-stage microbial biotransformation을 이용하여 새로운 천연 lactones의 생산 가능성은 세계 소비자의 천연 소재에 대한 욕구를 충족시켜줄 뿐 아니라 유기합성 중에 발생할 수 있는 중금속 등의 환경오염을 방지할 수 있다. 또한 전량 수입에 의존하는 한국 향료 시장에 천연 향료 및 향장 원료 물질의 생산으로 원자재의 대체 효과를 가져올 수 있다. 더불어 hydroxylation반응을 통한 HFA의 생산은 새로운 polymer 생산을 위한 전구 물질의 생산으로 다양한 고분자 유기합성의 가능성을 제시하고 있다.

### 감사의 말

이 논문은 일부 농림부 농림기술개발사업(204067-03)과 환경부 차세대 핵심기술 개발 사업(021-071-045)의 지원에 의하여 수행되었음.

### 참고문헌

1. 김용휘. 2004. 생유기합성: 새로운 환경 친화적 정밀화학 물질 합성을 위한 생합성과 유기합성의 접목. 미생물과 산업 30, 11-20.
2. 김학렬. 2003. 미생물을 이용한 hydroxy fatty acid의 생산. Kosen첨단기술보고서 p. 1-17.
3. 정봉현, 홍순광, 성문희. 1995. 생물전환기술의 연구현황

및 산업적 기술이용. 생물산업 p. 57-67.

4. Aguedo, M., Y. Wache, and J.M. Belin. 2000. Biotransformation of ricinoleic acid into  $\gamma$ -decalactone by yeast cells. *Recent Res. Dev. Biotechnol. Bioeng.* 3, 167-179.
5. Bagby, M.O. and K.D. Calson. 1989. Chemical and biological conversion of soybean oil for industrial products, p. 301-307. In: *Fats for the future*, Chichester: Ellis Horwood Limited Press.
6. Davis, E.N., L.L. Wallen, J.C. Goodwin, W.K. Rohwedder, and R.A. Rhodes. 1969. Microbial hydration of cis-9-akdenoic acids. *Lipids* 4, 356-362.
7. El-Sharkawy, S.H., W. Yang, L. Dostal, and J.P.N. Rosazza. 1992. Microbial oxidation of oleic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2116-2122.
8. Giesel-Bhler, H., O. Bartsch, H. Kneifel, H. Sahm, and R. Schmid. 1987. The anaerobic transformation of linoleic acid by *Acetobacterium woodii*. p. 241-245. In C. Laane, J. Tramper, & M.D. Lilly (Eds.), *Biocatalysis in organic media*. Amsterdam: Elsevier.
9. Hou, C.T. 1994. Conversion of Linoleic acid to 10-hydroxy-12-octadecenoic acid by *Flavobacterium* Sp. (NRRLB-14859). *JOACS* 71, 975-978.
10. 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. Environ. Microbiol.* 32, 299-304.
11. Naughton, F.C. 1974. Production, chemistry, and commercial applications of various chemicals from castor oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 51, 65-71.
12. The Code of Federal Regulations. 1990. 21 CFR 101.22.a3. Food and Drugs, Parts 100-169.
13. Waché, Y., M. Aguedo, A. Choquet, I.L. Gatfield, J.M. Nicaud, and J.M. Belin. 2001. Role of  $\beta$ -oxidation enzymes in  $\gamma$ -decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5700-5704.
14. Wach, Y., M. Aguedo, M.T. Ledall, J.M. Nicaud, and J.M. Belin. 2002. Optimization of *Yarrowia lipolytica*'s  $\beta$ -oxidation pathway for  $\gamma$ -decalactone production. *J. Molecular Catalysis B:Enzymatic* 19, 347-351.
15. Wallen, L.L., R.G. Benedict, and R.W. Jackson. 1962. The microbial production of 10-hydroxystearic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 99, 249-253.
16. Yamada, Y., H. Uemura, H. Nakaya, K. Sakata, T. Takatori, M. Nagao, H. Iwase, and K. Iwadate. 1996. Production of hydroxyl fatty acid (10-hydroxy-12(z)-octadecenoic acid) by *Lactobacillus plantarum* from linoleic acid and its cardiac effects to guinea pig papillary muscles. *Biochem. Biophys. Res. Communi.* 266, 391-395.

(Received May 23, 2007/Accepted June 18, 2007)

---

**ABSTRACT: Two-Stage Microbial Biotransformation for the Production of 6-Dodecen-4-olide (Butter Lactone) from Plant Oils Containing Unsaturated Fatty Acids****Soonhyang Kwon, Kyoung ju Kim, and Yonghwi (Augustine) Kim\*** (Department of Food Science & Technology, Sejong University, Seoul 143-747, Republic of Korea)

Natural 6-dodecen-4-olide (Butter lactone) was produced from plant oils containing high unsaturated fatty acids via two-stage microbial biotransformation. After unsaturated fatty acids were liberated from plant oil by microbial lipase, these were converted to optically active hydroxyl fatty acid (HFA) by hydroxylation reaction of *Pseudomonas* sp. NRRLB-2994. When safflower oil containing >75% unsaturated fatty acid, linoleic acid was used, *Pseudomonas* sp. produced 8g/L of 10-hydroxy-12(z)-octadecanoic acid with average of 39.2% bioconversion efficiency during 48 hr biotransformation period. The recovered 10-hydroxy-12-octadecanoic acid was further bioconverted to 4-hydroxy-6-dodecenoic acid via partial  $\beta$ -oxidation by *Yarrowia lipolytica* ATCC34088. 4-hydroxy-6-dodecenoic acid in culture was lactonized by lowering pH to 4.0 using 4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and heating for 5 min to 6-dodecen-4-olide (Butter lactone). Natural 6-dodecen-4-olide had characteristic aroma properties when compared to 6-dodecan-4-olide (dodecalactone) and 4-decen-4-olide (decalactone).