



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0128521
(43) 공개일자 2016년11월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/64 (2006.01) C12N 9/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 7/6409 (2013.01)
C12N 9/0006 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0059734
(22) 출원일자 2015년04월28일
심사청구일자 2016년04월14일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
박진병
서울특별시 영등포구 여의동로3길 10 101동 2403호 (여의도동, 여의도자이아파트)
권용익
서울특별시 은평구 가좌로12길 15 102동 1301호 (신사동, 은평신사두산위브2차)
(74) 대리인
손민

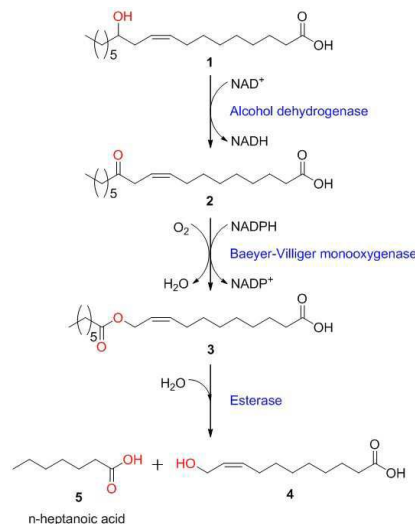
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 생물전환 및 화학전환을 이용한 장쇄 지방산으로부터 중쇄 지방산을 제조하는 방법

(57) 요약

본 발명은 알코올 탈수소효소와 BVMO(Baeyer-Villiger monooxygenase)를 발현시킬 수 있는 미생물을 사용한 생물전환 공정을 통하여 장쇄 지방산으로부터 에스터 화합물을 수득하는 단계 및 화학적인 가수분해 반응 및 산화 반응을 통하여 상기 수득한 에스터 화합물로부터 중쇄 지방산을 생성하는 단계를 포함하는 장쇄 지방산으로부터 중쇄 지방산을 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 중쇄 지방산의 제조방법에 의하면, 종래의 생물전환 공정을 일부 사용하여, 제조원가를 감축시킬 수 있으면서도, 부분적으로 화학적 공정을 사용하여 중쇄 지방산의 최종 생산 농도 및 생산성을 최대화시킬 수 있으므로, 보다 경제적인 중쇄 지방산의 생산에 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 9/0069 (2013.01)

C12N 9/0071 (2013.01)

C12N 9/20 (2013.01)

C12N 9/88 (2013.01)

C12Y 101/01001 (2013.01)

(72) 발명자

장현영

충청남도 천안시 서북구 봉서산1길 35 108동 180
2호 (쌍용동, 파크밸리동일하이빌아파트)

김수민

서울특별시 광진구 자양로4나길 44 701호 (자양동, 파라다이스리버빌)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10044604

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원

연구사업명 산업융합원천기술개발사업

연구과제명 지방/지방산으로부터 장쇄디카르복실산의 생물/화학적 전환기술 개발

기 여 율 50/100

주관기관 (주)에이피테크놀로지

연구기간 2013.06.01 ~ 2018.05.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10044647

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원

연구사업명 산업융합원천기술개발사업

연구과제명 장쇄 디카르복실산 생산공정 및 분리정제 기술 개발

기 여 율 50/100

주관기관 ㈜대림화학

연구기간 2013.06.01 ~ 2018.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 알코올 탈수소효소와 BVMO(Baeyer-Villiger monooxygenase)를 발현시킬 수 있는 형질전환체를 배양한 후, 장쇄 지방산을 배양액에 추가하여 에스터 화합물을 생성하는 단계; 및
- (b) 상기 생성된 에스터 화합물을 대상으로 화학적 반응을 수행하여 중쇄 지방산을 생성하는 단계를 포함하는, 장쇄 지방산으로부터 중쇄 지방산을 제조하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

- (a) 단계의 상기 알코올 탈수소효소는 마이크로코커스 속 균주 또는 슈도모나스 속 균주로부터 유래된 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

- (a) 단계의 상기 BVMO는 슈도모나스속 균주, 로도코커스속 균주, 브레비박테리움속 균주, 코마노나스속 균주, 아시네토박터속 균주, 아트로박터속 균주 또는 브라키모나스속 균주로부터 유래된 것인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

- (a) 단계의 상기 형질전환체는 리파제를 코딩하는 유전자, 탈수효소(dehydratase)를 코딩하는 유전자 및 이들의 조합으로 구성된 균주로부터 선택되는 유전자를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

- (a) 단계의 상기 장쇄 지방산은 16 내지 20개의 탄소로 구성된 지방산인 것인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

- (a) 단계의 상기 장쇄 지방산은 리시놀레산, 10-하이드록시스테아르산 또는 올레산인 것인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

- (b) 단계의 상기 화학적 반응은 수소화 반응, 가수분해 반응, 산화 반응, 메탄올 분해반응 및 이들의 조합으로

구성된 군으로부터 선택되는 반응인 것인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

(b) 단계의 상기 화학적 반응은 수소화 반응, 가수분해 반응 및 산화 반응을 순차적으로 수행하거나 또는 조합하여 수행하는 것인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

(b) 단계의 상기 화학적 반응은 가수분해 반응 및 산화 반응을 순차적으로 수행하는 것인 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

(b) 단계의 상기 화학적 반응은 메탄올 분해반응인 것인 방법.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 중쇄 지방산은 6 내지 14개의 탄소수로 구성된 지방산인 것인 방법.

청구항 12

하1항에 있어서,

상기 중쇄 지방산은 디카르복실산 또는 오메가-하이드록시지방산인 것인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 디카르복실산은 언데카네디오익 산 또는 아젤라 산이고, 상기 오메가-하이드록시지방산은 (Z)-11-하이드록시헵타데카-9-이노익산인 것인 방법.

청구항 14

제1항에 있어서,

상기 중쇄지방산 이외에 카르복실산 또는 메틸 카르복실레이트가 추가로 생성되는 것인 방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 카르복실산은 n-헵탄산이고, 상기 메틸 카르복실레이트는 메틸 노나노에이트인 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 생물전환 및 화학전환을 이용한 장쇄 지방산으로부터 중쇄 지방산을 제조하는 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 알코올 탈수소효소와 베이어 빌리거 모노옥시게나제(Bayer-Villiger monooxygenase, BVMO)를 발현시킬 수 있는 미생물을 사용한 생물전환 공정을 통하여 탄소수 16 내지 20의 장쇄 지방산으로부터 에스터 화합물을 수득하는 단계 및 화학적인 가수분해 반응 및 산화 반응을 통하여 상기 수득한 에스터 화합물로부터 탄소수 6 내지 14의 중쇄 지방산인 오메가 하이드록시 지방산 또는 알파,오메가-디카르복실산을 생성하는 단계를 포함하는 장쇄 지방산으로부터 중쇄 지방산을 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

중쇄 알파,오메가-디카르복실산(Medium chain α, ω -dicarboxylic acids)과 오메가-아미노카르복실산(ω -aminocarboxylic acids)은 폴리아미드, 폴리에스터와 같은 플라스틱, 의약, 가소제, 윤활유, 또는 유압유의 제조용 중간체 및/또는 구축 블록(building blocks)으로 널리 사용되고 있다. 예를 들어, 오메가-아미노엔테킨산(ω -aminoundecanoic acid)은 폴리아미드 11의 합성을 위해 사용한다. 이는 다른 고성능 및 엔지니어링 플라스틱과 비교하여 넓은 범위의 유연성과, 뛰어난 화학적, 열적, 충격 저항성을 준다. 일반적으로, 중쇄 알파,오메가-디카르복실산과 오메가-아미노카르복실산은 높은 온도와 압력, 강산(예, 황산, 질산; H_2SO_4 , HNO_3), 강산화제(예, 오존)가 요구되는 가혹한 조건 아래에서 화학적 방법을 통해 생산되는데, 예를 들어, 오메가-아미노엔테킨산은 고온 및 고압에서 지방산 절단 반응과 암모니아와 친핵성 치환(nucleophilic substitution) 후 브롬화 수소(hydrogen bromide)의 첨가를 통해서 리시놀레산으로부터 생산되고 있다.

[0003]

최근에, 재조합 대장균과 같은 재조합 미생물을 이용하여 장쇄 지방산으로부터 오메가-아미노엔테킨산과 알파,오메가-엔테카네디옥산과 같은 중쇄 지방산을 합성하는 방법이 보고되었다(한국공개특허 제2013-0132254호). 일 예로서, 리시놀레산의 C12-하이드록실 그룹은 알코올탈수소효소와 베이어 빌리거 모노옥시게나제(Bayer-Villiger monooxygenase)의 처리에 의하여 12-케토올레익산을 통해 에스터 화합물로 산화되고, 상기 에스터 화합물은 에스터라제에 의해 가수분해되어 n-헵탄산과 오메가-하이드록시엔테-9-이오익산을 생성한다. 상기 생성된 오메가-하이드록시엔테-9-이오익산은 환원효소와 알코올탈수소효소의 처리에 의하여 알파,오메가-엔테카네디옥산으로 전환되거나 또는 알코올탈수소효소와 오메가-아미노기 전이효소의 처리에 의하여 오메가-아미노엔테카노익산으로 전환될 수 있다. 이와 같이 미생물을 이용하여 중쇄 지방산을 생성할 경우, 화학적 공정에 비하여, 소요비용과 환경오염을 감소시킬 수 있다는 장점이 있으나, 생성되는 중쇄 지방산의 미생물 촉매에 대한 높은 독성과 복잡한 생물전환 경로로 인하여 목표 산물의 최종농도와 생산성을 증진시키기 어렵다는 단점이 보고되었다(Process Biochemistry 49 (2014) 617-622, Advanced Synthesis & Catalysis, 356 (2014) 1782-1786). 이 같은 단점을 극복하여, 중쇄 지방산의 생산성을 증대시키려는 연구가 활발히 진행되고 있으나, 아직까지는 별다른 성과를 얻지 못하고 있는 실정이다.

[0004]

이러한 배경하에서, 본 발명자들은 미생물을 이용하여 중쇄 지방산을 생산할 경우, 생산성을 향상시킬 수 있는 방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 미생물을 이용한 생물전환 공정을 통하여 장쇄 지방산으로부터 세포독성을 나타내지 않거나 독성이 낮은 에스터 화합물을 생산하고, 상기 생산된 에스터 화합물을 대상으로 화학적인 가수분해 반응 및 산화 반응을 수행하여 중쇄 지방산을 생산할 경우, 중쇄 지방산의 생산성을 향상시킬 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 하나의 목적은 생물전환 공정과 화학적인 가수분해 반응 및 산화 반응을 통하여 장쇄 지방산으로부터 중쇄 지방산을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명자들은 미생물을 이용하여 장쇄 지방산으로부터 중쇄 지방산을 생성하는 생물전환 공정에서, 생성되는 중쇄 지방산의 세포독성과 복잡한 생물전환 경로에 의하여 중쇄 지방산의 생산성이 저하되는 단점을 극복하는 방법을 개발하고자 다양한 연구를 수행하던 중, 생물전환 공정과 화학적 방법을 조합하는 방법을 개발하였다. 즉, 생물전환 공정에 있어서, 미생물에서 세포독성이 낮은 에스터 화합물까지는 종래의 생물전환 공정에 의하여 생산하고, 상기 생산된 에스터 화합물을 화학적인 가수분해 반응 및 산화 반응에 적용하여 최종 산물인 중쇄 지방산을 생성할 경우, 세포독성이 낮은 에스터 화합물을 높은 농도와 높은 생산성으로 생산할 수 있고, 비교적 간단한 가수분해 및 산화 반응을 통해 상기 에스터 화합물을 중쇄 지방산으로 전환시킬 수 있으므로, 결과적으로는 중쇄 지방산의 생산성을 향상시키는 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0007] 예를 들어, 재조합 대장균 촉매를 이용하여 리시놀레산으로부터 하이드록시엔테-9-이오익산을 생산하면 반응산물의 독성 때문에 목표산물인 하이드록시엔테-9-이오익산을 20 mM 이상으로 생산하는 것이 어려웠고, 생산성도 3.2 mM/h 이상으로 올리기가 어려웠다(Process Biochemistry 49 (2014) 617-622). 그러나, 본 발명에서 제공하는 방법을 이용하면 재조합 대장균을 이용하여 독성이 낮은 에스터를 생산하여 최종농도 54 mM 까지도 안정적으로 생산할 수 있었고, 생산 속도도 6.6 mM/h로 Process Biochemistry (49 (2014) 617-622)에 보고된 생물전환 공정에 비해 2배 이상 높일 수 있었다(실시예 1 및 2).

[0008] 상술한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하나의 양태로서 생물전환 공정과 화학적인 가수분해 반응 및 산화 반응을 통하여 장쇄 지방산으로부터 중쇄 지방산을 제조하는 방법을 제공한다.

[0009] 구체적으로, 본 발명에서 제공하는 장쇄 지방산으로부터 중쇄 지방산을 제조하는 방법은 (a) 알코올 탈수소효소와 BVMO(Baeyer-Villiger monooxygenase)를 발현시킬 수 있는 형질전환체를 배양한 후, 장쇄 지방산을 배양액에 추가하여 에스터 화합물을 생성하는 단계; 및 (b) 상기 생성된 에스터 화합물을 대상으로 화학적 반응을 수행하여 중쇄 지방산을 생성하는 단계를 포함한다.

[0010] 이하에서는, 본 발명에서 제공하는 장쇄 지방산으로부터 중쇄 지방산을 제조하는 방법을 단계에 따라 구체적으로 설명하기로 한다.

[0011] (a) 생물전환 공정

[0012] 본 발명에서 제공하는 장쇄 지방산으로부터 중쇄 지방산을 제조하는 방법의 첫 번째 단계는 알코올 탈수소효소와 BVMO(Baeyer-Villiger monooxygenase)를 발현시킬 수 있는 형질전환체를 배양한 후, 장쇄 지방산과 반응하여, 에스터 화합물을 생성하는 생물전환 공정이다.

[0013] 본 발명의 용어 "생물전환 공정(bioconversion)"이란, 효소 또는 상기 효소를 발현시키는 형질전환체를 이용하여 초기 물질을 목적하는 물질로 전환시키는 방법을 의미한다.

[0014] 본 발명에 있어서, 상기 생물전환 공정은 장쇄 지방산에 알코올 탈수소효소를 처리하여 수소를 제거함으로써, 상기 장쇄 지방산으로부터 케토산 유도체를 생성하며, 상기 생성된 케토산 유도체에 BVMO를 처리하여 에스터 화합물로 전환시키는 공정인 것으로 해석될 수 있다.

- [0015] 본 발명의 용어 "알코올 탈수소효소(alcohol dehydrogenase)"란, 알코올에서 수소를 제거하여 알데하이드 또는 케톤을 생성하는 반응을 촉매하는 효소를 의미한다.
- [0016] 본 발명에 있어서, 상기 알코올 탈수소효소는 상기 장쇄 지방산으로부터 수소를 제거하여 케토산 유도체를 생성하려는 목적으로 사용될 수 있다. 상기 알코올 탈수소효소는 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서 마이크로코커스 속 균주, 슈도모나스 속 균주 등의 미생물로부터 유래된 것을 사용할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 용어 "Baeyer-Villiger monooxygenase(BVMO)"란, 케톤을 산화시켜서 락톤이나 에스터화합물을 생성하는 Baeyer-Villiger 산화반응을 포함하는 다양한 산화반응을 촉매할 수 있는 효소인 monooxygenase의 일종을 의미한다. 본 발명의 목적상, 형질전환체에서 발현되어 키토 지방산으로부터 사슬내에 에스터기가 도입된 지방산 유도체(예로 10-키토스테아르산으로부터 10-옥틸옥시-10-옥소데카노산)를 생산하는 반응을 촉매하는 효소활성을 나타내는 한, 상기 BVMO는 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 슈도모나스속 균주(*Pseudomonas* sp.), 로도코커스속 균주(*Rhodococcus* sp.), 브레비박테리움속 균주(*Brevibacterium* sp.), 코마노나스속 균주(*Comamonas* sp.), 아시네토박터속 균주(*Acinetobacter* sp.), 아트로박터속 균주(*Arthrobacter* sp.), 브라키모나스속 균주(*Brachymonas* sp.) 등의 미생물로부터 유래된 BVMO 등 일 수 있고, 보다 바람직하게는 슈도모나스 플로레스센스(*Pseudomonas fluorescens*), 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*), 슈도모나스 베로니(*Pseudomonas veronii*), 로도코커스 조스티(*Rhodococcus jostii*) 또는 슈도모나스속 균주 HI-70(*Pseudomonas* sp. strain HI-70)으로부터 유래된 BVMO일 수 있으며, 가장 바람직하게는 슈도모나스 푸티다로부터 유래된 BVMO가 될 수 있다. 상기 BVMO를 코딩하는 유전자의 염기서열은 NCBI의 GenBank 등 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있는데, 그 예로서, GenBank Accession No. CAFK01000010으로 표시되는 유전자, BVMO 유전자를 발현하도록 제작된 발현벡터 pJOE-KT2440BVMO(Biotechnol. Lett., 29:1393-1398, 2007) 등으로부터 취득할 수 있는 유전자 등이 될 수 있다.
- [0018] 본 발명의 용어 "형질전환체"란, 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 벡터를 이용하여 숙주의 내부로 도입된 후, 상기 목적 단백질을 발현시키도록 변이된 세포 또는 미생물을 의미한다. 이때, 상기 숙주세포에 도입되는 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 한, 어떠한 형태라도 무방하다.
- [0019] 본 발명에서 제공하는 상기 형질전환체는 공지된 알코올 탈수소효소와 BVMO를 발현시킬 수 있도록, 상기 각 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 제작될 수 있다. 이때, 사용될 수 있는 숙주 세포로는 특별히 제한되지는 않으나, 일 예로서 생물전환 공정에 적용하기에 적합한 배양가능한 단세포성 원핵생물 또는 진핵생물의 세포를 사용할 수 있고, 다른 예로서 대장균, 효모 등을 사용할 수 있으며, 또 다른 예로서 대장균 BL21(DE3) 세포를 사용할 수 있다.
- [0020] 상기 생물전환 공정에 사용되는 장쇄 지방산은 16 내지 20개의 탄소로 구성된 지방산이 될 수 있고, 최종적으로 제조되는 중쇄 지방산은 6 내지 14개의 탄소로 구성된 지방산이 될 수 있는데, 상기 장쇄 지방산 보다도 더욱 많은 탄소수를 갖는 거대 지방산을 사용할 수도 있다. 상기 장쇄 지방산에 수산화기가 없는 경우 수화효소(hydratase)를 코딩하는 유전자를 추가로 도입하여 지방산으로부터 하이드록시 지방산을 만든 후, 이를 기질로 사용할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 용어 "배양"이란, 미생물을 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 과정을 의미한다.
- [0022] 본 발명에 있어서, 상기 배양은 상기 형질전환체를 생육시켜서 생물전환 공정을 수행하기 위한 과정으로 이해될 수 있는데, 구체적으로 배치 공정, 주입식 배치 공정 또는 반복 주입 배치 공정 등을 통하여 회분식 또는 연속식으로 수행될 수 있다.
- [0023] 상기 배양에 사용되는 배지는 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 한다. 사용될 수 있는 탄소원으로는 글루코즈, 수크로즈, 락토즈와 같은 당, 지방, 지방산, 글리세롤이 포함된다. 이들 물질은 개별적

으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 인산 암모늄과 같은 무기질소원; 글루탐산과 같은 아미노산 및 펩톤, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물 등 유기질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다.

[0024] 또한, 배양시에 호기 상태를 유지하기 위해 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체(예, 공기)를 주입하는 단계를 추가로 포함할 수 있고, 배양물의 온도는 통상적인 배양온도인 27℃ 내지 37℃를 유지할 수 있으며, 배양시간은 10 내지 100 시간이 될 수 있다.

[0025] (b) 화학적 공정

[0026] 본 발명에서 제공하는 장쇄 지방산으로부터 중쇄 지방산을 제조하는 방법의 두 번째 단계는 상기 첫 번째 생물 전환 공정에서 생성된 에스터 화합물을 대상으로 화학적 반응을 수행하여 중쇄 지방산을 제조하는 화학적 공정이다.

[0027] 일 예로서, 상기 에스터 화합물을 대상으로 수행하는 화학적 반응으로는 가수분해 반응이 될 수 있다.

[0028] 상기 가수분해 반응을 수행하면, 에스터 그룹에 H_2O 가 부가되어 절단됨으로써, 오메가-하이드록시지방산 형태의 중쇄 지방산과 카르복실산을 생성할 수 있다.

[0029] 아울러, 상기 생성된 오메가-하이드록시지방산을 대상으로 산화 반응을 추가로 수행하면, 디카르복실산 형태의 중쇄 지방산을 생성할 수 있다.

[0030] 다른 예로서, 상기 에스터 화합물을 대상으로 수행하는 화학적 반응으로는 메탄올 분해반응이 될 수 있다.

[0031] 상기 메탄올 분해반응을 수행하면, 에스터 그룹에 메탄올이 부가되어 절단됨으로써, 오메가 하이드록시지방산 형태의 중쇄 지방산과 메틸 카르복실레이트를 생성할 수 있다.

[0032] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 장쇄 지방산의 일종인 리시놀레산을 생물전환 공정에 적용하여 불포화 에스터 화합물인 (Z)-11-(헵타노일록시)헥텐-9-이노익산을 생성하고, 상기 불포화 에스터 화합물을 수소화시켜서 포화 에스터 화합물인 11-(헵타노일록시)헥텐 산을 생성하였으며, 상기 포화 에스터 화합물을 가수분해하여 오메가-하이드록시지방산인 11-하이드록시헥텐 산과 카르복실산인 n-헵탄산을 수득하고, 상기 오메가-하이드록시지방산을 산화시켜서 디카르복실산인 언데카네디옥의 산을 제조하였다. 아울러, 상기 에스터 화합물인 (Z)-11-(헵타노일록시)헥텐-9-이노익산을 메탄올 분해시켜서 오메가-하이드록시지방산인 (Z)-11-하이드록시헥텐-9-이노익산과 메틸 카르복실레이트인 메틸 헵테노에이트를 제조하였다.

[0033] 본 발명의 다른 실시예에 의하면, 장쇄 지방산의 일종인 10-하이드록시스테아르산을 생물전환 공정에 적용하여 포화 에스터 화합물인 9-(노나노일록시)노나노익 산을 생성하고, 상기 포화 에스터 화합물을 가수분해하여 오메가-하이드록시지방산인 9-하이드록시노나노익산을 수득하였으며, 상기 수득한 오메가-하이드록시지방산을 산화시켜서 디카르복실산인 아젤라 산을 제조하였다. 아울러, 상기 포화 에스터 화합물인 9-(노나노일록시)노나노익산을 메탄올 분해시켜서 오메가-하이드록시지방산과 메틸 카르복실레이트인 메틸 노나노에이트를 제조하였다.

발명의 효과

[0034] 본 발명에서 제공하는 중쇄 지방산의 제조방법에 의하면, 종래의 생물전환 공정을 일부 사용하여, 제조원가를 감축시킬 수 있으면서도, 부분적으로 화학적 공정을 사용하여 중쇄 지방산의 최종 생산 농도 및 생산성을 최대

화시킬 수 있으므로, 보다 경제적인 중쇄 지방산의 생산에 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0035]

도 1은 생물전환 공정에 의하여 장쇄 지방산인 리시놀레산으로부터 고부가 중쇄 지방산인 오메가-하이드록시지방산을 생성하는 생물전환 공정의 진행과정을 나타내는 개략도로서, 1은 장쇄 지방산인 리시놀레산을 나타내고, 2는 케토산 유도체를 나타내며, 3은 에스터 화합물을 나타내고, 4는 오메가-하이드록시지방산을 나타내며, 5는 카르복실산을 나타낸다.

도 2는 화학반응에 의하여 에스터 화합물로부터 디카르복실산을 생성하는 공정의 진행과정을 나타내는 개략도로서, 3은 에스터 화합물을 나타내고, 5는 n-헵탄산을 나타내며, 6은 포화 에스터 화합물을 나타내고, 7은 오메가-하이드록시지방산을 나타내며, 8은 디카르복실산을 나타낸다.

도 3은 화학반응에 의하여 에스터 화합물로부터 메틸 카르복실레이트와 오메가-하이드록시지방산을 생성하는 공정의 진행과정을 나타내는 개략도로서, 3은 에스터 화합물을 나타내고, 4는 오메가-하이드록시지방산을 나타내며, 9는 메틸 카르복실레이트를 나타낸다.

도 4는 생물전환 공정을 통하여 리시놀레산으로부터 에스터 화합물을 생성하는 경우, 생물전환 공정의 시간경과에 따른 리시놀레산, 케토산 유도체 및 에스터 화합물의 농도변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5a는 배지단위부피(ℓ)당 10g의 세포농도로 2차 형질전환체를 배양한 다음, 30 mM의 리시놀레산을 배양액에 처리하고 8시간 동안 생물전환 공정을 수행한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5b는 배지단위부피(ℓ)당 20g의 세포농도로 2차 형질전환체를 배양한 다음, 63 mM의 리시놀레산을 배양액에 처리하고 8시간 동안 생물전환 공정을 수행한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 6a는 배지단위부피(ℓ)당 3g의 세포농도로 2차 형질전환체를 배양한 다음, 5 mM의 10-하이드록시스테아르산을 배양액에 처리하고 12시간 동안 생물전환 공정을 수행한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 6b는 배지단위부피(ℓ)당 10g의 세포농도로 2차 형질전환체를 배양한 다음, 30 mM의 10-하이드록시스테아르산을 배양액에 처리하고 15시간 동안 생물전환 공정을 수행한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 7은 생물전환 공정에 의하여 올레산으로부터 9-(노나노일록시)노나노익 산을 생성하는 생물전환 공정의 시간경과에 따른, 반응산물의 함량변화를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036]

이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0037]

실시예 1: 리시놀레산으로부터 n-헵탄산(n-heptanoic acid)과 (Z)-11-하이드록시엔덱-9-이노익산((Z)-11-hydroxyundec-9-enoic acid)의 생산

[0038]

알코올 탈수소효소, BVMO(Baeyer-Villiger monooxygenase) 및 에스테라제가 발현되도록 형질전환된 대장균의 배양 후, 배지에 장쇄 지방산을 처리하면, 상기 장쇄 지방산을 흡수하고, 알코올 탈수소효소에 의하여 상기 장쇄 지방산으로부터 케토산 유도체를 생성하며, 상기 생성된 케토산 유도체는 BVMO에 의하여 에스터 화합물로 전환되며, 상기 에스터 화합물을 에스테라제에 의하여 절단되어, 결과적으로는 오메가-하이드록시지방산을 생성하는 생물전환 공정이 알려져 있다(한국공개특허 제2013-0132254호)(도 1). 도 1은 생물전환 공정에 의하여 장쇄 지방산인 리시놀레산으로부터 고부가 중쇄 지방산인 오메가-하이드록시지방산을 생성하는 생물전환 공정의 진행과정을 나타내는 개략도로서, 1은 장쇄 지방산인 리시놀레산을 나타내고, 2는 케토산 유도체를 나타내며, 3은 에스터 화합물을 나타내고, 4는 오메가-하이드록시지방산을 나타내며, 5는 카르복실산을 나타낸다.

[0039]

그러나, 상기 오메가-하이드록시지방산과 카르복실산은 형질전환된 대장균에 독성을 나타내어, 오메가-하이드록시지방산의 생산 농도와 생산성이 저하된다는 문제점이 있었으므로(Process Biochemistry 49 (2014) 617-622),

본 발명자들은 생물전환 공정에 의하여 에스터 화합물을 최대 농도로 생산하고, 상기 생산된 에스터 화합물을 화학적 공정에 의하여 오메가-하이드록시지방산으로 전환시킴으로써, 오메가-하이드록시지방산의 생산 농도와 생산성을 향상시키는 방법을 개발하였다.

- [0040] 또한, 상기 생산된 에스터 화합물을 화학적으로 반응시켜서, 디카르복실산, 카르복실산 또는 오메가-하이드록시지방산을 생성하였다(도 2 및 3).
- [0041] 도 2는 화학반응에 의하여 에스터 화합물로부터 디카르복실산을 생성하는 공정의 진행과정을 나타내는 개략도로서, 3은 에스터 화합물을 나타내고, 5는 n-헵탄산을 나타내며, 6은 포화 에스터 화합물을 나타내고, 7은 오메가-하이드록시지방산을 나타내며, 8은 디카르복실산을 나타낸다.
- [0042] 도 3은 화학반응에 의하여 에스터 화합물로부터 메틸 카르복실레이트와 오메가-하이드록시지방산을 생성하는 공정의 진행과정을 나타내는 개략도로서, 3은 에스터 화합물을 나타내고, 4는 오메가-하이드록시지방산을 나타내며, 9는 메틸 카르복실레이트를 나타낸다.
- [0043] 본 발명자는 상술한 방법의 예시로서 장쇄 지방산의 일종인 리시놀레산으로부터, 디카르복실산인 언테카네디익 산과 오메가-하이드록시지방산인 (Z)-11-하이드록시언텍-9-이노익산을 생성하는 공정을 다음과 같이 수행하였다.

[0044] **실시예 1-1: 생물 전환을 이용한 에스터 화합물의 생산**

- [0046] 공지된 방법(한국공개특허 제2013-0132254호)에 따라, 알코올 탈수소효소 유전자를 포함하는 발현벡터인 pACYC-ADH를 대장균 BL21(DE3)에 도입하여 알코올 탈수소효소를 발현시킬 수 있는 1차 형질전환체를 제작하고, 상기 제작된 1차 형질전환체에 BVMO 유전자를 포함하는 발현벡터인 pJOE-BVMO를 도입하여, 알코올 탈수소효소와 BVMO를 발현시킬 수 있는 2차 형질전환체를 제작하였다.
- [0047] 상기 제작된 2차 형질전환체를 엡피실린과 클로람페니콜을 포함하는 LB배지(5 g/ℓ yeast extract, 10 g/ℓ tryptone 및 10 g/ℓ NaCl)에서 배양하여 배양물을 수득하였다. 상기 배양물로부터 균체를 수득한 다음, 10 g/ℓ 글루코스와 항생제(엡피실린과 클로람페니콜)를 포함하는 리젠버그 배지(4 g/ℓ (NH₄)₂HPO₄, 13.5 g/ℓ KH₂PO₄, 1.7 g/ℓ 시트르산, 1.4 g/ℓ MgSO₄ 및 10 mL/ℓ 금속용액(10 g/ℓ FeSO₄, 2.25 g/ℓ ZnSO₄, 1.0 g/ℓ CuSO₄, 0.5 g/ℓ MnSO₄, 0.23 g/ℓ Na₂B₄O₇, 2.0 g/ℓ CaCl₂ 및 0.1 g/ℓ (NH₄)₆Mo₇O₂₄))에 접종하고, 700 rpm의 교반속도, 35℃의 배양온도 및 1vvm의 공기공급량의 조건에서 6시간 동안 배양하였다.
- [0048] 이어, 상기 배양물에 15 mM 리시놀레산과 0.1 % 트윈 60을 가하여, 12시간 동안 상기 리시놀레산의 생물전환을 수행하였다. 상기 생물전환은 장쇄 지방산인 리시놀레산(도 1의 1)에 알코올 탈수소효소가 작용하여 케토산 유도체인 12-케토옥타데카-9-이노익 산(도 1의 2)을 형성하고, 상기 형성된 12-케토옥타데카-9-이노익 산(도 1의 2)에 BVMO가 작용하여 에스터 화합물인 (Z)-11-(헵타노일록시)언텍-9-이노익산(도 1의 3)을 수득하는 과정이다.
- [0049] 상기 생물전환이 수행된 후, 배양된 2차 형질전환체로부터 에스터 화합물(도 1의 3)을 회수하였다. 구체적으로, 상기 생물전환이 수행된 배양물을 원심분리하여 균체를 수득하고, 상기 균체에 에틸아세테이트를 가하여 추출하는 과정을 반복하여 에틸아세테이트 추출물을 수득하였다. 상기 에틸아세테이트 추출물에 염화나트륨 수용액을 가하여 혼합한 다음, 이로부터 유기용매층을 수득하고, 상기 수득한 유기용매층에 황산나트륨을 가하였으며, 이를 여과하고 용매를 증발시켜서 에스터 화합물을 회수하였다.
- [0050] 상기 배양이 종료된 후, 배양배지에 잔류하는 장쇄 지방산(리시놀레산)의 농도와 상기 에틸아세테이트 추출물에 포함된 케토산 유도체(12-케토옥타데카-9-이노익 산) 및 에스터 화합물((Z)-11-(헵타노일록시)언텍-9-이노익 산)의 농도는 가스크로마토그래피/질량 분석계(gas chromatography/mass spectrometry, GC/MS)를 사용하여 측

정하였다.

[0051] 대략적으로, 상기 배양배지 또는 에틸아세테이트 추출물에 포함된 리시놀레산, 중간체 화합물 또는 에스터 화합물에 TMS(N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide)를 가하여 각각의 TMS 유도체를 수득하고, 상기 수득한 각 TMS 유도체를 ion trap mass detector(Thermo ITQ1100GC-ion Trap MS, Thermo Scientific)와 비극성 capillary 컬럼(30 m 길이, 0.25 μ m 박막 두께, HP-5MS, Agilent Technologies Palo Alto, CA, USA)이 구비된 Thermo Ultra GC system에 적용한 다음, 90 내지 280℃의 범위에서 5℃/분의 선형 온도 구배(변화도) 및 230℃의 주입 포트 온도조건에서 측정하고, 측정된 스캔 스펙트럼은 100-600 m/z 범위에서 수득하였다(도 4).

[0052] 도 4는 생물전환 공정을 통하여 리시놀레산으로부터 에스터 화합물을 생성하는 경우, 생물전환 공정의 시간경과에 따른 리시놀레산, 케토산 유도체 및 에스터 화합물의 농도변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 4에서 보듯이, 12시간 동안 생물전환 공정을 수행한 결과, 15 mM 리시놀레산으로부터 11 mM의 에스터 화합물을 생성하여 약 73%의 생물전환 수율을 나타냄을 확인하였고, 케토산 유도체는 전체적으로 매우 낮은 수준을 나타냈으므로 상기 생물전환 공정이 성공적으로 수행되었음을 확인하였다.

[0053] 실시예 1-2: 형질전환체의 균체농도가 에스터 화합물의 최종 생산농도와 생산성에 미치는 영향

[0054] 상기 2차 대장균 형질전환체의 배양시에, 최종 배양된 균체의 배지단위부피(ℓ)당 건조중량이 10g 또는 20g인 세포농도로 배양하고, 이에 각각 30 mM 또는 63 mM의 리시놀레산을 배지에 처리하고 8시간 동안 생물전환 공정을 수행하는 것을 제외하고는, 상기 실시예 1-1과 동일한 방법을 사용하여, 각각의 에스터 화합물을 생산하고, 이를 비교하였다(도 5a 및 5b).

[0055] 도 5a는 배지단위부피(ℓ)당 10g의 세포농도로 2차 형질전환체를 배양한 다음, 30 mM의 리시놀레산을 배양액에 처리하고 8시간 동안 생물전환 공정을 수행한 결과를 나타내는 그래프이고, 도 5b는 배지단위부피(ℓ)당 20g의 세포농도로 2차 형질전환체를 배양한 다음, 63 mM의 리시놀레산을 배양액에 처리하고 8시간 동안 생물전환 공정을 수행한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0056] 도 5a에서 보듯이, 10g/ ℓ 의 세포농도로 배양된 2차 형질전환체를 사용한 경우, 30 mM의 리시놀레산으로부터 27 mM의 에스터 화합물을 생성하여 약90%의 생물전환 수율과 6.2 mM/h의 생산성을 나타내었고, 도 5b에서 보듯이, 20g/ ℓ 의 세포농도로 배양된 2차 형질전환체를 사용한 경우, 63 mM의 리시놀레산으로부터 54 mM의 에스터 화합물을 생성하여 약 86%의 생물전환 수율과 6.6 mM/h의 생산성을 나타냄을 확인하였다.

[0057] 따라서, 형질전환체의 세포농도를 증가시킬 수록 에스터 화합물의 생산 농도와 생산성을 증가시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[0058] 실시예 1-3: 화학적 공정에 의한 에스터 화합물로부터 디카르복실산 및 오메가-하이드록시지방산의 생성

[0059] 실시예 1-3-1: 에스터 화합물의 정제

[0060] 먼저, 상기 실시예 1-1에서 회수한 에스터 화합물인 (Z)-11-(헵타노일옥시)언덱-9-이노익산((Z)-11-(Heptanoyloxy)undec-9-enoic acid)을 실리카겔을 사용한 컬럼 크로마토그래피에 적용하고, 20 % 에틸아세테이트 및 헥산의 혼합용매를 사용하여 용출함으로써, 정제하였다.

[0061] 정제된 에스터 화합물의 NMR 분석결과는 다음과 같다.

[0062] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 5.67-5.46 (m, 2H), 4.60 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 2.36-2.27 (m, 4H), 2.12-2.02 (m, 2H), 1.65-1.58 (m, 4H), 1.35-1.21 (m, 14H), 0.86 (m, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 178.2, 172.0, 133.4, 121.6, 58.3, 32.5, 32.2, 29.5, 27.4, 27.2, 27.1, 27.0, 26.9, 25.6, 23.0, 22.7, 20.6, 12.1.

[0063] 실시예 1-3-2: 다단계 반응을 통한 에스터 화합물로부터 디카르복실산의 생성

[0064] 에스터 화합물을 대상으로 수소화 반응, 가수분해 반응 및 산화 반응을 순차적으로 수행하여 디카르복실산을 생성하였다.

[0065] 실시예 1-3-2-1: 수소화 반응

[0066] 상기 실시예 1-3-1에서 정제된 에스터 화합물 1.0 g을 메탄올 10 ml에 용해시킨 용액을 수득하고, 상기 용액을 여과지에 가한 다음, 수화된 Raney-Ni 0.4 g을 가하였다. 이어, 8시간 동안 1기압의 수소를 가하여 상기 에스터 화합물에 수소를 결합시켜서 포화 에스터 화합물로 전환시키고, 반응혼합물을 셀라이트를 통해 여과하였으며, 메탄올로 세척하였다. 상기 여과액을 증발시켜서, 노란색의 반고형을 나타내는 포화 에스터 화합물인 11-(헵타노일록시)엔텍칸 산(11-(Heptanoyloxy)undecanoic acid)(0.95 g, 95 %)을 정제하였다.

[0067] 정제된 포화 에스터 화합물의 NMR 분석결과는 다음과 같다.

[0068] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 4.05 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.31-2.26 (m, 4H), 1.61-1.59 (m, 6H), 1.28-1.25 (m, 18H), 0.87 (t, J = 6.0 Hz, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 174.09 (2C), 64.38, 34.41, 31.45, 29.71, 29.40, 29.31, 29.18, 29.03, 28.81, 28.61, 25.89, 24.97, 24.65, 22.47, 14.01

[0069] 실시예 1-3-2-2: 가수분해 반응

[0070] 먼저, 메탄올과 증류수를 4:1(v/v)로 포함하는 혼합용매에 1 N NaOH를 용해시킨 반응용액을 수득하고, 상기 수득한 반응용액 25ml에 상기 실시예 1-3-2-1 에서 정제된 포화 에스터 화합물 950 mg을 가하여 가수분해 반응을 수행하여 가수분해 산물인 오메가-하이드록시지방산인 11-하이드록시엔텍칸 산(hydroxyundecanoic acid)과 카르복실산인 n-헵탄산(n-heptanoic acid)을 수득하였다. 상기 반응이 종료된 반응액을 냉각시키고, 6 N HCl을 천천히 가하여 pH 2로 적정한 다음, 용매를 증발시켜서 반응액의 부피를 5 ml로 맞추었다. 이어, 상기 반응액에 NaCl을 가하여 포화시키고, 30 ml의 에틸아세테이트를 가하여 3회 추출하였다. 상기 추출물을 20 ml의 NaCl 용액 및 20 ml의 증류수로 세척하고, 무수 황산나트륨을 가하여 건조시킨 다음, 여과하고 용매를 증발시켜서 상기 중쇄 지방산을 포함하는 시료를 수득하였다. 상기 수득한 시료를 실리카겔을 사용한 컬럼 크로마토그래피에 적용하고, 50 % 에틸아세테이트 및 헥산의 혼합용매를 사용하여 용출함으로써, 오메가-하이드록시지방산인 11-하이드록시엔텍칸 산(550 mg, 90 %)을 정제하였다.

[0071] 정제된 오메가-하이드록시지방산의 NMR 분석결과는 다음과 같다.

[0072] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 3.63 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.32 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.64-1.51 (m, 4H), 1.35-1.25 (m, 12H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 179.47, 62.96, 34.01, 32.60, 29.41, 29.28, 29.25, 29.12, 28.96, 25.63, 24.63

[0073] 실시예 1-3-2-3: 산화 반응

[0074] 아세토니트릴과 증류수를 3:1(v/v)로 포함하는 혼합용매에 상기 실시예 1-3-2-2 에서 정제된 오메가-하이드록시지방산 470 mg을 용해시켜 오메가-하이드록시지방산 용액을 수득하고, 상기 수득한 용액에 13 ml의 $\text{H}_5\text{IO}_6/\text{CrO}_3$

용액(2.5 당량의 H_5IO_6 및 0.01 당량의 CrO_3)을 가한 다음, 5 °C에서 30분 동안 산화반응을 수행하였으며, 산화 반응이 종료된 반응물을 0 °C에서 45분 동안 정치시키고, Na_2HPO_4 수용액을 가하여 반응을 종료시켰다. 상기 반응액에 20 mL의 에틸아세테이트를 가하고 교반하면서 추출하여 추출물을 수득하였으며, 상기 수득한 추출물에 15 mL의 NaCl 용액, 15 mL의 5% $NaHSO_3$ 용액 및 15 mL의 NaCl 용액을 순차적으로 가하여 세척하였다. 이어, 무수 황산나트륨을 가하여 건조시킨 다음, 농축하여 디카르복실산을 포함하는 시료를 수득하고, 에틸아세테이트-헥산 혼합용매에서 재결정화하여, 디카르복실산인 언데카네디오익 산(undecanedioic acid)(450 mg, 90%)을 정제하였다

[0075] 상기 정제된 디카르복실산의 NMR 분석결과는 다음과 같다.

[0076] 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 2.17 (t, J = 6.6 Hz, 4H), 1.49-1.44 (m, 4H), 1.23 (m, 10H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 174.90 (2C), 34.09 (2C), 29.23, 29.14 (2C), 28.98 (2C), 24.92 (2C).

[0077] **실시예 1-3-3: 공정단순화에 의한 에스터 화합물로부터 디카르복실산의 생성**

[0078] 상기 실시예 1-3-2에 개시된 반응공정은 매번 컬럼 크로마토그래피를 사용한 정제과정을 수행하기 때문에, 디카르복실산의 생성시에 많은 비용과 시간이 소요된다는 문제점이 있어, 산업적인 생산에 적합하지 않았다.

[0079] 이에, 공정단순화를 통해 보다 용이하게 에스터 화합물로부터 디카르복실산을 생성하고자 하였다.

[0080] 즉, 상기 실시예 1-1에서 수득한 에스터 화합물을 실시예 1-3-2-1의 수소화 반응에 적용하고, 반응이 종료된 후, 반응용매인 메탄올을 증발시켜서, 반응액의 부피를 감소시켰다. 이어, 상기 반응액에 1N의 수산화 나트륨 수용액을 가하고, 60 °C에서 2.5시간 동안 가수분해 반응을 수행하였다. 상기 가수분해 반응이 종료된 후, 반응액에 염산을 가하여 pH 2로 적정하고, 반응용매에 포함된 메탄올을 증발시킨 다음, 에틸아세테이트로 추출하여 오메가-하이드록시지방산을 포함하는 추출물을 수득하였다. 상기 수득한 추출물을 실시예 1-3-2-3의 산화반응에 적용한 결과, 65 % 이상의 수율로 디카르복실산을 생성할 수 있음을 확인하였다.

[0081] 상기 실시예 1-3-3의 다단계 공정을 수행할 경우 약 80%의 수율로 디카르복실산을 생성할 수 있는 반면, 상기 공정단순화 방법을 수행할 경우에는 약 65 % 이상의 수율로 디카르복실산을 생성할 수 있으므로, 최종 산물의 수율면에서는 다단계 공정이 효과적인 반면, 상기 공정에 소요되는 비용과 시간을 감축시킬 수 있는 공정단순화 방법은 소요되는 시간과 비용대비 효과적으로 디카르복실산을 생성할 수 있었으므로, 상기 공정단순화 방법은 산업적인 생산에 이용될 수 있을 것으로 분석되었다.

[0082] **실시예 1-3-4: 에스터 화합물로부터 오메가-하이드록시지방산의 생성**

[0083] 상기 실시예 1-1과 1-2에서 수득한 에스터 화합물들 중 0.35 g을 8mL의 메탄올에 용해시키고, 디부틸틴산화물(dibutyltin oxide) 28 mg을 가한 다음, 환류조건에서 12시간 동안 가열하여 메탄올 분해반응을 수행하였다. 상기 반응이 종료된 후, 이로부터 얻어진 반응물과 탄산수소나트륨 포화용액을 혼합하여 혼합물을 수득하고, 상기 혼합물에 에틸아세테이트를 가하여 추출함으로써, 추출물을 수득하였다. 상기 추출물을 셀라이트로 여과하여 디부틸틴 화합물을 수득하고, 이에 황산나트륨을 가하여 건조시킨 다음, 다시 여과하였다. 이어, 진공조건을 이용하여 상기 여과물로부터 용매를 제거하고, 분별증류를 통해 메틸 헵타노에이트(methyl heptanoate)(136.5 mg, 85%)을 수득하였으며, 컬럼크로마토그래피를 통해 오메가-하이드록시지방산인 (Z)-11-하이드록시언덱-9-이노익산((Z)-11-hydroxyundec-9-enoic acid)(206 mg, 92%)을 정제하였다.

- [0084] 상기 메틸 헵타노에이트와 오메가-하이드록시지방산의 NMR 분석결과는 다음과 같다.
- [0085] 메틸 헵타노에이트
- [0086] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 3.60 (s, 3H), 2.24 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.58-1.51 (m, 2H), 1.30-1.17 (m, 6H), 0.82 (t, J = 6.0 Hz, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 174.16, 51.28, 34.01, 31.39, 28.76, 24.85, 22.41, 13.89.
- [0087] (Z)-11-하이드록시엔텍-9-이노익산
- [0088] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.67 (br. s, 1H), 5.63-5.48 (m, 2H), 4.19 (d, J = 6 Hz, 2H), 2.33 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.09-2.02 (m, 2H), 1.65-1.57 (m, 2H), 1.38-1.28 (m, 8H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 179.38, 133.07, 128.14, 58.40, 34.04, 29.42, 28.97, 28.91, 28.88, 27.31, 24.63.
- [0089] **실시예 2: 올레산으로부터 오메가-하이드록시노나노익 산(ω -Hydroxynonanoic Acid) 및 알파,오메가-노나네디오익 산(α, ω -Nonanedioic Acid)의 생산**
- [0090] 본 발명자는 실시예 1에 기재된 방법의 다른 예시로서 장쇄 지방산의 일종인 올레산 또는 이로부터 유래된 10-하이드록시스테아르산으로부터, 디카르복실산인 아젤라 산과 오메가-하이드록시지방산인 9-하이드록시노나노익 산을 생성하는 공정을 다음과 같이 수행하였다.
- [0091] **실시예 2-1: 생물 전환을 이용한 에스터 화합물의 생산**
- [0092] 상기 실시예 1-1의 방법에 따라, 수득한 알코올 탈수소효소와 BVM0가 발현된 2차 형질전환체를 리젠버그 배지에 접종하여 배양하여 수득한 배양물에, 5 mM 10-하이드록시스테아르산(10-hydroxystearic acid)과 0.5 g/l의 트윈 80을 가하여 생물전환 공정을 수행하고, 에틸아세테이트 추출방법을 사용하여 에스터 화합물인 9-(노나노일록시)노나노익 산(9-(Nonanoyloxy)nonanoic acid)을 수득하였다. 이때, 케토산 유도체로는 10-케토스테아르 산이 생성됨을 확인하였다.
- [0093] 한편, 상기 실시예 1-2에서와 같이, 형질전환체의 세포농도를 증가시킬 수록 에스터 화합물의 생물전환 수율을 증가시킬 수 있는지를 확인하기 위하여, 상기 2차 형질전환체의 배양시에, 최종 배양된 균체의 배지단위부피(l)당 건조중량이 3g 또는 10g인 세포농도로 배양하고, 이에 각각 5 mM 또는 30 mM의 10-하이드록시스테아르산을 배지에 처리하고 각각 12 또는 15시간 동안 생물전환 공정을 수행하는 것을 제외하고는, 상기 실시예 1-1과 동일한 방법을 사용하여, 각각의 에스터 화합물을 생산하고, 이를 비교하였다(도 6a 및 6b).
- [0094] 도 6a는 배지단위부피(l)당 3g의 세포농도로 2차 형질전환체를 배양한 다음, 5 mM의 10-하이드록시스테아르산을 배양액에 처리하고 12시간 동안 생물전환 공정을 수행한 결과를 나타내는 그래프이고, 도 6b는 배지단위부피(l)당 10g의 세포농도로 2차 형질전환체를 배양한 다음, 30 mM의 10-하이드록시스테아르산을 배양액에 처리하고 15시간 동안 생물전환 공정을 수행한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [0095] 도 6a에서 보듯이, 3g/l의 세포농도로 배양된 2차 형질전환체를 사용한 경우, 5 mM의 10-하이드록시스테아르산으로부터 4.1 mM의 9-(노나노일록시)노나노익 산을 생성하여 약 82%의 생물전환 수율을 나타내었고, 도 6b에서 보듯이, 10g/l의 세포농도로 배양된 2차 형질전환체를 사용한 경우, 30 mM의 10-하이드록시스테아르산으로부터 21 mM의 9-(노나노일록시)노나노익 산을 생성하여 약 70%의 생물전환 수율을 나타냄을 확인하였다.

[0096] **실시예 2-2: 올레산을 이용한 에스터 화합물의 생산**

[0097] 실시예 2-1에서 10-하이드록시스테아르 산의 생물전환속도가 상당히 낮게 나왔다. 이러한 이유 중 하나는 10-하이드록시스테아르 산이 고체분말로 존재하고 수용성이 매우 낮아 세포 내로의 이동속도가 낮기 때문인 것으로 사료되었다. 따라서, 생물전환 속도를 높이기 위해 액상으로 존재하는 불포화 지방산인 올레산을 기질로 이용하는 생물전환을 실시하였다. 올레산에 수화효소를 처리하여 하이드록시 지방산인 10-하이드록시스테아르 산을 생성할 수 있다. 이에, 상기 실시예 1-1에서 수득한 2차 형질전환체와 올레산 수화효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터 pET-0hyA가 도입되어 상기 올레산 수화효소를 발현시킬 수 있는 형질전환된 대장균을 세포 수 기준 10:1로 혼합한 후 30 mM의 올레산을 처리하여 12시간 동안 생물전환 공정을 수행하고, 배양물에 포함된 올레산, 10-하이드록시스테아르산(10-HSA), 10-케토스테아르 산(10-KSA) 및 9-(노나노일록시)노나노익 산(ester)의 생물전환 공정 시간 경과에 따른 함량변화를 측정하였다(도 7).

[0098] 도 7은 생물전환 공정에 의하여 올레산으로부터 9-(노나노일록시)노나노익 산을 생성하는 생물전환 공정의 시간경과에 따른, 반응산물의 함량변화를 나타내는 그래프이다. 도 7에서 보듯이, 올레산은 3시간이 경과된 시점에서 모두 소모되었고, 10-하이드록시스테아르산은 3시간이 경과된 시점까지 그의 함량이 급격히 증가하였으나, 이후에는 지속적으로 감소되었으며, 10-케토스테아르 산은 3시간이 경과된 시점에서 검출되었으나, 미량으로 측정되었다. 한편, 9-(노나노일록시)노나노익 산은 생물전환공정이 시작된 후부터 그의 함량이 꾸준히 증가하였고, 9시간이 경과된 시점에서는 더 이상 증가하지 않고, 일정수준으로 유지됨을 확인하였다.

[0099] 아울러, 상기 도 6b의 결과와 비교하면, 배지에 동일량의 올레산 또는 10-하이드록시스테아르산을 처리한 경우를 비교하면, 올레산을 처리한 경우에 에스터 화합물의 생산속도가 현저히 높은 수준을 나타냄을 알 수 있었다.

[0100] **실시예 2-3: 화학적 공정에 의한 에스터 화합물로부터 디카르복실산 및 오메가-하이드록시지방산의 생성**

[0101] **실시예 2-3-1: 에스터 화합물의 정제**

[0102] 먼저, 상기 실시예 2-1에서 수득한 에스터 화합물인 9-(노나노일록시)노나노익 산을 실시예 1-3-1의 방법으로 정제하였다.

[0103] 정제된 에스터 화합물의 NMR 분석결과는 다음과 같다.

[0104] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 4.05 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.40-2.26 (m, 4H), 1.63-1.59 (m, 6H), 1.32-1.26 (m, 18H), 0.88 (t, J=6.6Hz, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 179.17, 174.09, 64.34, 34.41, 33.85, 31.85, 31.81, 29.23, 29.14, 29.11, 29.05, 29.03, 28.95, 28.61, 25.86, 25.02, 22.65, 14.10.

[0105] **실시예 2-3-2: 다단계 반응을 통한 에스터 화합물로부터 디카르복실산의 생성**

[0106] 에스터 화합물을 대상으로 가수분해 반응 및 산화 반응을 순차적으로 수행하여 디카르복실산을 생성하였다.

[0107] **실시예 2-3-2-1: 가수분해 반응**

[0108] 먼저, 메탄올과 증류수를 4:1(v/v)로 포함하는 혼합용매에 1 N NaOH를 용해시킨 반응용액을 수득하고, 상기 수

득한 반응용액 10ml에 상기 실시예 2-3-1 에서 정제된 에스터 화합물 130 mg을 가하였으며, 60℃에서 3시간 동안 가수분해 반응을 수행하여 가수분해 산물로써 오메가-하이드록시지방산인 9-하이드록시노나노익산(9-Hydroxynonanoic acid)과 카르복실산인 n-노난산을 수득하였다. 상기 반응이 종료된 반응액을 냉각시키고, 6 N HCl을 천천히 가하여 pH 2로 적정한 다음, 용매를 증발시켜서 반응액의 부피를 2 ml로 맞추었다. 이어, 상기 반응액에 5 ml의 증류수를 혼합하여 희석시키고, 이에 NaCl을 가하여 포화시켰으며, 15 ml의 에틸아세테이트를 가하여 3회 추출하였다. 상기 추출물을 10 ml의 NaCl 용액 및 10 ml의 증류수로 세척하고, 무수 황산나트륨을 가하여 건조시킨 다음, 여과하고 용매를 증발시켜서 상기 오메가-하이드록시지방산을 포함하는 시료를 수득하였다. 상기 수득한 시료를 실리카겔을 사용한 컬럼 크로마토그래피에 적용하고, 50 % 에틸아세테이트 및 헥산의 혼합용매를 사용하여 용출함으로써, 오메가-하이드록시지방산인 9-하이드록시노나노익산(59 mg, 85%)을 정제하였다.

[0109] 정제된 오메가-하이드록시지방산의 NMR 분석결과는 다음과 같다.

[0110] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 3.64 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.35 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.66-1.52 (m, 4H), 1.38-1.32 (m, 8H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 178.85, 63.03, 33.83, 32.68, 29.14 (2C), 28.93, 25.61, 24.63.

[0111] **실시예 2-3-2-2: 산화 반응**

[0112] 아세토니트릴과 증류수를 3:1(v/v)로 포함하는 혼합용매에 상기 실시예 1-3-2-2 에서 정제된 오메가-하이드록시지방산 100 mg을 용해시켜 오메가-하이드록시지방산 용액을 수득하고, 상기 수득한 용액에 4 ml의 $\text{H}_5\text{IO}_6/\text{CrO}_3$ 용액(3.0 당량의 H_5IO_6 및 0.014 당량의 CrO_3)을 가한 다음, 5 ℃에서 30분 동안 산화반응을 수행하였으며, 상기 반응물을 0 ℃에서 45분 동안 정치시키고, Na_2HPO_4 수용액을 가하여 반응을 종료시켰다. 상기 반응액에 10 ml의 에틸아세테이트를 가하고 교반하면서 추출하여 추출물을 수득하였으며, 상기 수득한 추출물에 10 ml의 NaCl 용액, 10 ml의 5% NaHSO_3 용액 및 10 ml의 NaCl 용액을 순차적으로 가하여 세척하였다. 이어, 무수 황산나트륨을 가하여 건조시킨 다음, 농축하여 디카르복실산을 포함하는 시료를 수득하고, 에틸아세테이트-헥산 혼합용매에서 재결정화하여, 디카르복실산인 아젤라 산(Azelaic acid)(85 mg, 79%)을 정제하였다

[0113] 상기 정제된 디카르복실산의 NMR 분석결과는 다음과 같다.

[0114] ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 2.17 (t, J = 7.5 Hz, 4H), 1.47 (m, 4H), 1.24 (m, 6H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 174.95 (2C), 34.07 (2C), 28.90, 28.86 (2C), 24.89 (2C).

[0115] **실시예 2-3-3: 공정단순화에 의한 에스터 화합물로부터 디카르복실산의 생성**

[0116] 상기 실시예 1-3-3과 동일하게 공정단순화를 통해 보다 용이하게 에스터 화합물로부터 디카르복실산을 생성하고자 하였다.

[0117] 즉, 상기 실시예 1-1 또는 2-1과 같이 생물전환반응 후 에스터 화합물을 회수하여 실시예 2-3-2-1과 같이 메탄올/증류수 4/1 (v/v) 혼합용매에 1N의 수산화 나트륨 수용액을 가하고, 60 ℃에서 3시간 동안 가수분해 반응을 수행하였다. 상기 가수분해 반응이 종료된 후, 반응액에 염산을 가하여 pH 2로 적정하고, 반응용매에 포함된 메탄올을 증발시킨 다음, 에틸아세테이트로 추출하여 오메가-하이드록시지방산을 포함하는 추출물을 수득하였다. 상기 수득한 추출물을 실시예 2-3-2-2의 산화반응에 적용하여 디카르복실산을 포함하는 시료를 수득하고, 에틸아세테이트-헥산 혼합용매에서 재결정화하여, 디카르복실산인 아젤라 산(azelaic acid)을 두 단계 화학반응 후 다른 분리과정 없이 재결정을 통해 약 58% 수율로 정제하였다.

[0118] 실시예 2-3-4: 에스터 화합물로부터 오메가-하이드록시지방산의 생성

[0119] 상기 실시예 2-1에서 수득한 에스터 화합물 150 mg을 5ml의 메탄올에 용해시키고, 디부틸틴산화물(dibutyltin oxide) 20 mg을 가한 다음, 환류조건에서 12시간 동안 가열하여 메탄올 분해반응을 수행하였다. 상기 반응이 종료된 후, 이로부터 얻어진 반응물과 탄산수소나트륨 포화용액을 혼합하여 혼합물을 수득하고, 상기 혼합물에 에틸아세테이트를 가하여 추출함으로써, 추출물을 수득하였다. 상기 추출물을 셀라이트로 여과하여 디부틸틴 화합물을 수득하고, 이에 황산나트륨을 가하여 건조시킨 다음, 다시 여과하였다. 이어, 진공조건을 이용하여 상기 여과물로부터 용매를 제거하고, 감압증류를 통해 메틸 노나노에이트(methyl nonanoate)(110 mg, 80%)와 9-하이드록시노나노익산을 수득하였다.

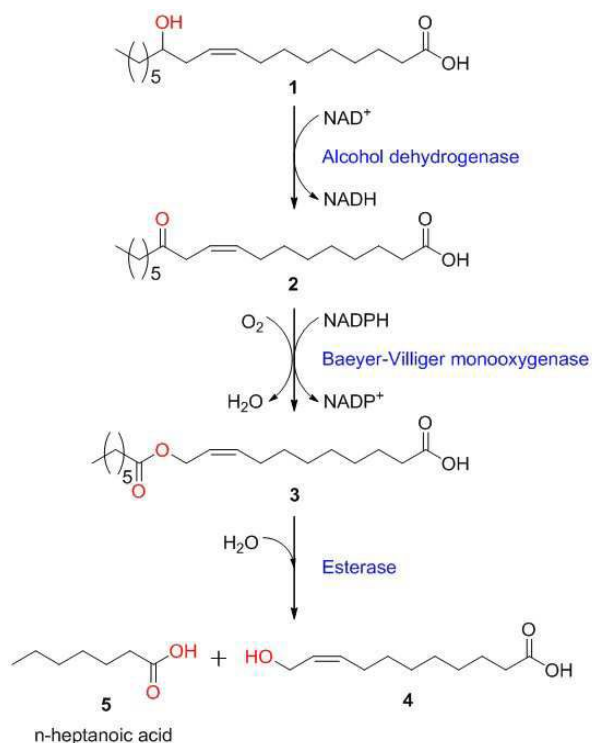
[0120] 상기 9-하이드록시노나노익산의 NMR 분석결과는 실시예 2-3-2-1에 개시된 바와 동일하고, 메틸 노나노에이트의 NMR 분석결과는 다음과 같다.

[0121] 메틸 노나노에이트

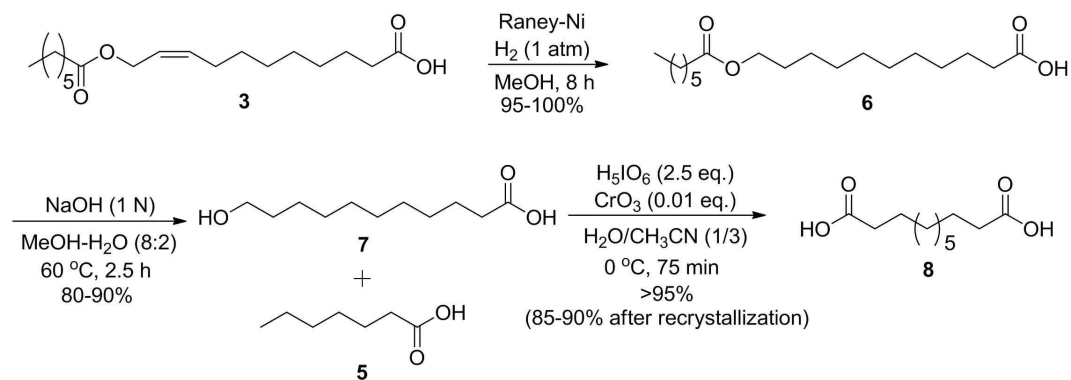
[0122] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 3.62 (s, 3H), 2.26 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.60-1.56 (m, 2H), 1.29-1.20 (m, 10H), 0.84 (t, $J = 6.0$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 173.84, 51.03, 33.83, 31.68, 29.10, 29.02, 29.00, 24.79, 22.49, 13.82.

도면

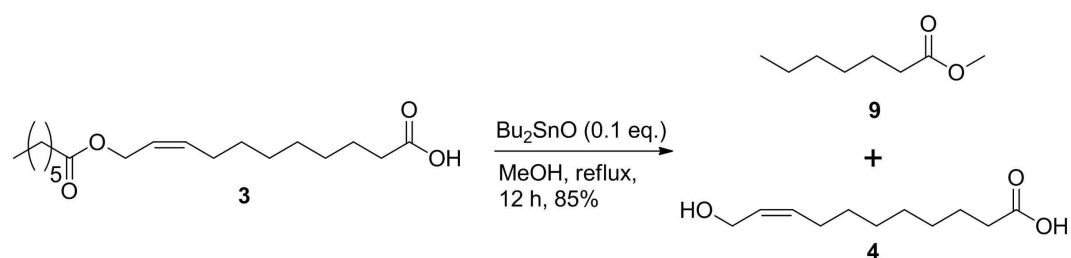
도면1



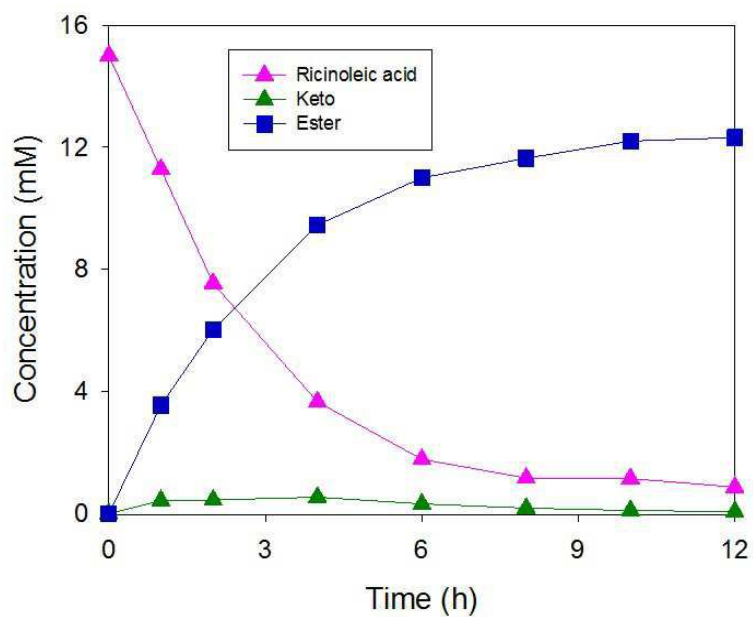
도면2



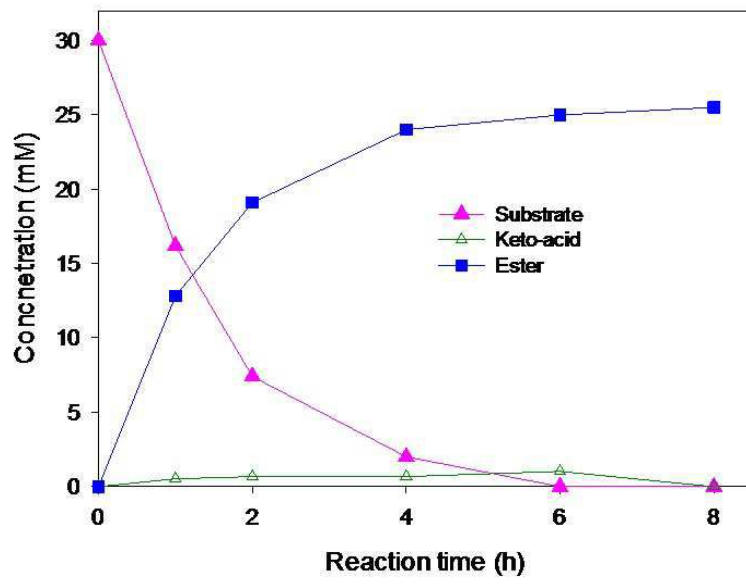
도면3



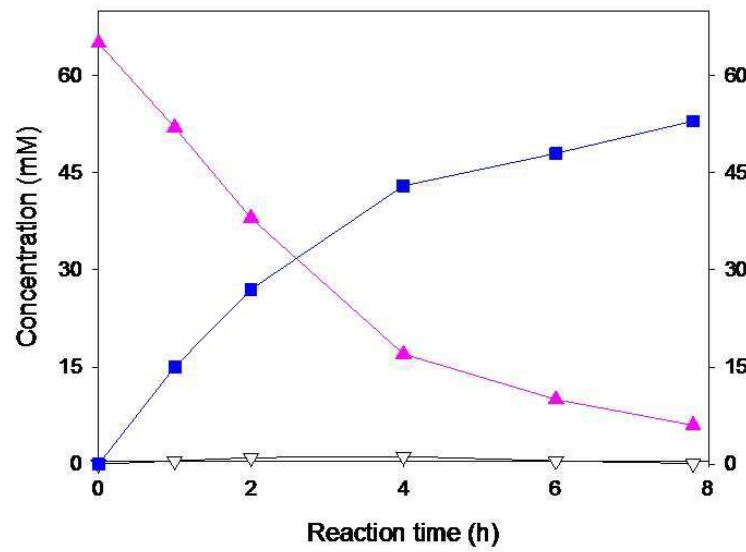
도면4



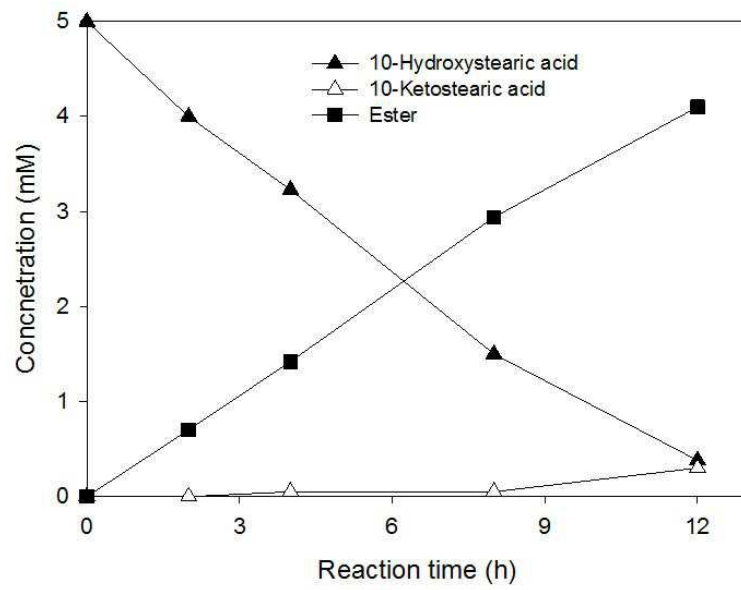
도면5a



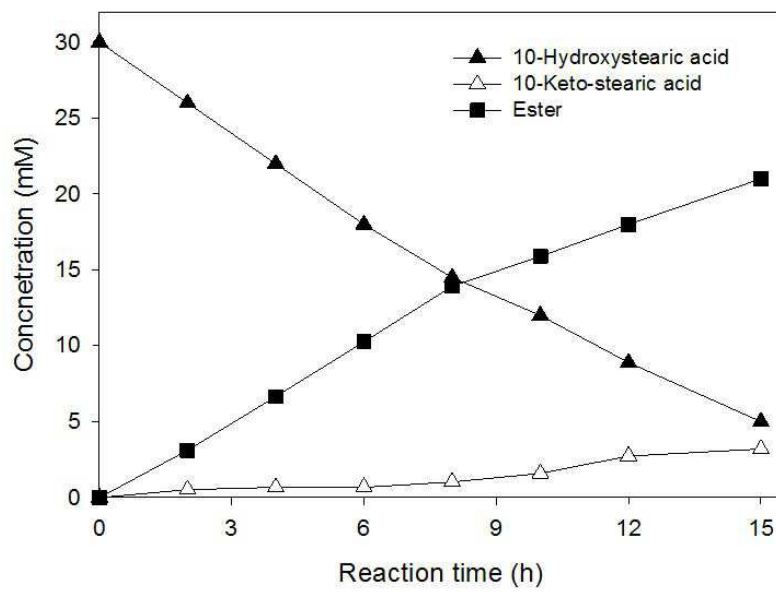
도면5b



도면6a



도면6b



도면7

