(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0061246
(43) 공개일자 2010년06월07일

(51) Int. Cl.
C12P 7/64 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0120170
(22) 출원일자 2008년11월28일
심사청구일자 2008년11월28일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내
(72) 발명자
황광연
서울특별시 용산구 이촌1동 렉스아파트 11동 1209호
지영민
서울특별시 중구 신당3동 남산타운아파트 33동 1403호
김용휘
서울특별시 광진구 화양동 22-1 브라운스톤 508호
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 8 항

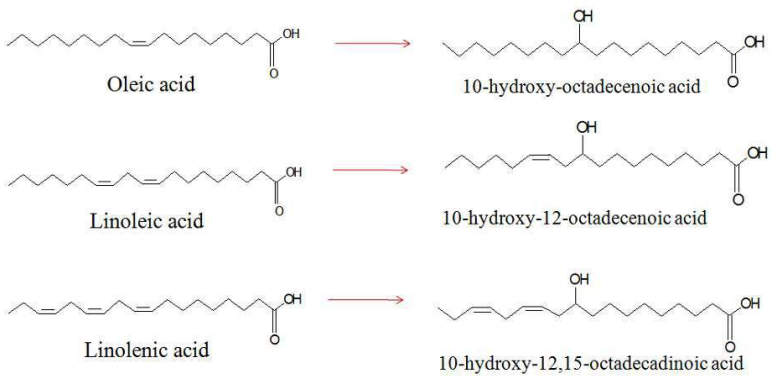
(54) 미생물을 이용한 수산화 지방산의 친환경 생산 공정 방법

(57) 요 약

본 발명은 미생물을 이용한 수산화 지방산의 제조 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 슈도모나스 속 균주 NRRL B-2994를 사용하여 식물유 불포화 지방산으로부터 수산화 지방산을 제조하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제조방법은 종래의 방법에 비하여 상기 미생물을 이용하여 보다 경제적이고 환경 친화적인 수산화 지방산의 효율적인 생산을 가능하게 한다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

슈도모나스 속 NRRL B-2994 균주를 사용하는 것을 특징으로 하는, 식물유 불포화 지방산으로부터 수산화 지방산을 생산하는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 슈도모나스 속 NRRL B-2994는 영양 한천 배지에서 22내지 28℃에서 48시간 이상 배양할 때 발생하는 표현형인 S형 또는 L형인 생산 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 표현형은 L형인 생산 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 식물유 불포화 지방산은 리놀레 산인 생산 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 슈도모나스 속 NRRL B-2994의 전 세포(whole cell)을 이용하는 생물전환공정을 이용하는 것을 특징으로 하는 생산 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 다음 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 생산 방법;

a) 균체량(cell mass)을 확보하기 위한 세포 성장기에 에어레이션하는 단계; 및

b) 수산화 반응이 이루어지도록 언에어레이션 하는 단계를 포함하는 것인 생산 방법;

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 수산화 지방산은 10-하이드록시-12(z)-옥타데세노산 (10-hydroxy-12(z)-octadecenoic acid)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 (b) 단계는 상기 식물유의 성분 중에서 스테아린산(stearic acid) 비율을 낮추어 생산 효율을 높이기 위해 초임계 장치를 사용하는 것을 특징으로 하는 생산 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 NRRL B-2994 균주를 사용하는 것을 특징으로 하는, 식물유 불포화 지방산으로부터 수산화 지방산을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 바이오 오일 시장은 미래 성장 산업으로, 연평균 5% 이상 초고속으로 성장하고 있고 바이오 기술(BT)을 이용한 석유화학 대체 물질의 개발은 초기단계를 현재 화학 산업내 비중을 2% 내외로 산업 바이오 기술(BT)의 비중 증가에 따라 2020년에는 3%로 증가될 것으로 예상되고 있다. 다양한 수산화 지방산(HFA) 생산에 따른 다양한 화학물질의 유도체 및 완제품의 생산은 파급 효과가 커 개별화학 품목의 시장 현황은 파악할 수 없으나 바이오 오일에 관련된 산업 경제적 평가는 2005년도 한국산업기술평가원 "산업기술동향분석" 보고서에 상세히 기술되어 있다.

[0003] 상기 문헌에 따르면 세계 시장은 현재 70,000 억원 규모에서 2010년 80,000 억원 규모로 성장할 것으로 전망되고 있고 국내시장은 현재 2180 억원 규모에서 2010년 3000 억원 규모로 예상되고 있다. 수산화 지방산(Hydroxy Fatty Acid, HFA) 생산 기술은 다양한 수산화 지방산(Hydroxy Fatty Acid, HFA) 응용물질이 개발될 수 있고 생물전환공정이 개발된 후 수산화 지방산(Hydroxy Fatty Acid, HFA) 생산이 석유 산업과 비교하여 적정한 경제성을 가질 경우, 석유화학 산업의 주회사가 적극적으로 참여할 것으로 예상되며 상업적 회사들의 적극적인 기술활용이 기대되고 있다. 따라서 친환경적인 수산화 지방산(Hydroxy Fatty Acid, HFA) 생산 공정 개발은 장기적인 관점에서 아주 중요한 기술 분야로 신규 유기 합성 물질 개발과 함께 중요한 분야로 발전이 기대 된다.

[0004] 최근 석유 공급의 불확실성 및 소비자의 환경 보존에 대한 관심 집중으로 인하여 화학업계의 장기적인 생산성 유지를 위한 기술개발의 노력은, 경제적인 면에서는 단기적으로 경쟁력이 뒤지고 있지만 장기적으로 환경 친화적인 바이오 기술을 접목한 생유기합성(Bio-Organic Synthesis)기술 개발에 초점이 맞춰 지고 있다. 이를 도표로 비교 분석하여 보면 다음과 같다.

표 1

[0005]

	화학 반응(Chemical Reaction)	생유기 합성(Bioorganic Synthesis)
촉매 (Catalysis)	중금속(Heavy Metal)	미생물 효소(Microorganism Enzyme)
반응 조건 (Reaction Condition)	고온(High Temperature) 고압(High Pressure)	실온(Room Temperature) 대기압(Atomosphere Pressure)
HFA(Hydroxy Fatty Acid)	D/L 혼합(Mixture) 멀티플(Multiple) / 비특이적(Non-specifix) 수산화(Hydrolxylation)	D or L-이오머(iomer) 선택 위치상(Selective Positional) 수산화(Hydroxylation)
복원 (Recovery)	증류에 의한 분리의 어려움 폴리머 합성 불가능	OH-위치에 기초한 특정 폴리머 합성

[0006] 본 발명에서 얻고자 하는 불포화 지방산을 매개로 하여 천연 락톤과 같은 향료 및 향장 원료물질(flavor and fragrance chemicals)은 현재 70% 이상이 유기합성(organic synthesis)에 의하여 생산되고 있다. 그런데, 유기합성에 의해 생산되는 향료 및 향장 원료물질의 생산 공정은 대부분 고온, 고압 조건과 중금속 등을 포함한 독성이 강한 촉매를 이용하는 화학공정으로 심각한 환경 문제를 야기하므로, 최근에는 환경보존 노력의 일환으로 새로운 친환경적 화학합성방법의 개발이 요구되어 청정 유기합성에 대한 관심이 증가하고 있는 실정이다. 미생물을 이용한 모노 수산화 지방산(monohydroxy fatty acid)의 생산은 1962년 최초로 보고되었으며 (Wallen L. L. *et al.*, *Arch Biochem Biophys* 99:249-253, (1962)), 슈도모나스 에스피(*Pseudomonas* sp.) NRRL B-3226 (Davis E. N. *et al.*, *Lipids* 4: 356-362, (1969)), 노카르디아 콜레스테리쿰(*Nocardia cholestericum*)(Koritala S. *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 32:299-304 (1989)), 플라보 박테리움 에스

피(*Flavobacterium sp.*)(Hou C. T., *JOACS* 71:975-978 (1994)), 락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum)(Yamada Y. *et al.*, *Biochem and Biophys Recherch Communication* 266:391-395(1996))등의 다양한 미생물에 의한 상업적인 생물전환법 개발이 진행되고 있다. 미생물의 생물전환에 의해 생성된 수산화 지방산은 지방산에 첨가된 수산화기에 의해 다른 비수산화 지방산(non-hydroxylated fatty acid)에 비하여 높은 점성과 반응성 등의 특이한 성질을 가지며, 이러한 특성으로 인해 수지류(resins), 왁스류(waxes), 나일론(nylons), 플라스틱(plastics), 윤활제(lubricants), 화장료(cosmetics)등에 중요한 전구물질로 사용될 수 있고, 코팅제 및 페인트의 첨가물로서도 사용될 수 있다. 이러한 견지에서 본 발명자들은 바이오 기술을 사용하여 수산화 지방산을 제조하는 생산 공정 기술 개발을 위해 예의 연구한 결과, 미생물 중에서 슈도모나스 속 균주, 특히 NRRL B-2994 균주를 이용하는 경우 경제적이고 환경 친화적으로 수산화 지방산을 생산할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0007] 본 발명의 하나의 목적은 슈도모나스 속 NRRL B-2994 균주 및 식물유 불포화 지방산을 이용하는 생물전환공정으로 수산화 지방산을 경제적이고 친환경적으로 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0008] 이하, 본 발명을 상세히 설명하면 다음과 같다.

[0009]

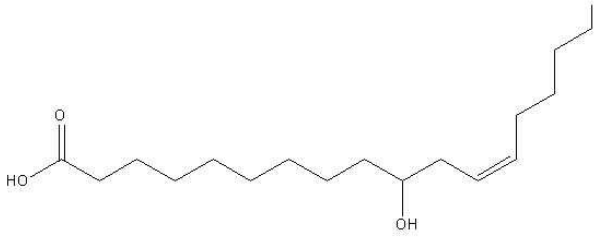
[0010] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 슈도모나스 속 NRRL B-2994 균주를 사용하여, 식물유 불포화 지방산으로부터 수산화 지방산을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0011] 바람직한 일 양태로서, 본 발명의 제조 방법은 슈도모나스 속 NRRL B-2994를 이용하여 수산화 지방산(hydroxy fatty acid, HFA)의 생산을 위한 2-단계(Stage) 미생물 생물전환공정(Microbial Biotransformation Process)에 의해 수행될 수 있다.

[0012] 구체적으로는, a) 균체량(cell mass)을 확보하기 위한 세포 성장기에 에어레이션(aeration)하는 단계; 및 b) 수산화 반응이 이루어지도록 언에어레이션(anaeration) 하는 단계를 포함할 수 있다.

[0013] 본 발명에서 생산되는 "수산화 지방산"은 자연계에서 존재하는 물질이며, 분자식은 $C_{18}H_{34}O_3$이고, 그 구조식은 하기 화학식 1과 같으며, 바람직하게는 10-하이드록시-12(z)-옥타데세노산 (10-hydroxy-12(z)-octadecenoic acid) 이다. 이러한 수산화 지방산은 자연계에서 주로 식물체 내에 소량 존재하며 동물에서는 지방산의 중간 분해 물질로서 존재한다. 그러나 광범위한 사용범위와 사용량의 증가에 비하여 자연계에 존재하는 수산화 지방산의 양은 매우 부족하여 식물성 기름으로부터 미생물의 생물학적 전환 공정을 통해 재구성된 고부가가치의 수산화 지방산은 산업적 응용분야가 매우 다양하다. 이러한 수산화 지방산은 수산기에 따라 크게 세 가지로 모노-, 다이-, 트리-수산화 지방산으로 분류된다. 또한 수산화 지방산은 향신료를 구성하는 락톤 (lactone)의 전구체로서 산업적으로 유용한 물질이며, 수산화 지방산에서 첨가되는 수산기는 일반 형태의 지방산에 높은 점성이나 반응성과 같은 특수한 성질을 새로이 부여하게 만들어, 레진, 왁스, 나일론, 플라스틱, 윤활제 및 코팅제의 출발물질로 사용되고 있다.

화학식 1



[0014]

[0015] 본 발명의 용어 "생물전환(biotransformation)"이란 살아있는 세포, 특히 미생물 세포에 의해 화합물을 대사되는 과정을 가리키는 것이다.

[0016]

[0017] 본 발명의 일 실시예로서 본 발명자들은, 리놀레 산(linoleic acid)으로부터 10-하이드록시-12(z)-옥타데세노산 (10-hydroxy-12(z)-octadecenoic acid)의 생물전환공정을 개발하였다.

[0018]

[0019] 10-히드록시-12(제트)-옥타데세노산 [10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid]은 리시놀레산의 이성질체로서 윤활제로 많이 사용되고 있고, 가소체 및 레진에 사용되는 세바스산을 생산하는 데 중요한 물질이기도 하다. 리시놀레산과 같은 수산화 지방산은 이스트 (yeast)에 의하여 감마-데카락톤 (λ-decalactone)으로 전환된다. 이 감마-데카락톤은 특징적으로 복숭아 또는 살구의 향을 내는 식품 공정에 필수적인 물질로서, 식품 산업에서 그 사용이 점차 증가되고 있다. 그러나 감마-데카락톤은 몇몇 과일에만 소량으로 존재하기 때문에, 유기합성법에 의해 대량으로 생산되는 것이 필요하다. 실제로 국민 소득의 증가, 천연음식 및 향장 소재의 요구 그리고 소비재의 고급화 추세에 따라 천연물질이 안정성과 기호도가 선호되는 경향성이 나타나고 있어, 전 세계적으로 생물전환 방법을 이용한 제조법이 절실히 요구된다.

[0020] 대부분의 기존 연구들에서는 슈도모나스 속(*Pseudomonas. sp.*) NRRL B-2994의 전체 미생물 세포(whole cell)를 이용한 수산화(hydroxylation) 반응이 아닌 세포 추출물을 이용하였으나, 본 연구는 슈도모나스 속(*Pseudomonas. sp.*) NRRL B-2994의 전체 미생물 세포(whole cell)를 이용한 생물전환공정을 개발하였다(실시예 5).

[0021] 구체적으로, 슈도모나스 속(*Pseudomonas sp.*) NRRL B-2994를 이용한 리놀레 산(linoleic acid)의 수산화 지방산(hydroxy fatty acid)으로의 전환은 기존에 연구 보고된 연구 결과와 달리 에어레이션(aeration)을 중단하고 교반(agitation) 속도를 900rpm으로 올려줄 경우에 효과적인 생물 전환율을 보였다(실시예 6).

[0022] 본 발명에서의 상기 미생물은 슈도모나스 속 (*Pseoudomonas.* sp.) 미생물인 NRRL-2994, 또는 구체적으로 NRRL B-2994의 두 가지 표현형 변이체(phenotypic varients)인 S 변이체(Small varient) 또는 L 변이체(Large Varient) 균주를 사용하는 것이 바람직하며, 이들은 영양 한천 배지에서 22내지 28℃에서 48시간 이상 배양할 때 발생하여, L 변이체(Large Varient) 균주를 사용하는 것이 더욱 바람직하다. L형 변이체는 상대적으로 S형보다 더 크고 주변이 뿌옇게 흐려진 평평한 콜로니를 형성하며 뭉침과 흡착성이 없다.

[0023] 구체적인 일 실시예로부터 본 발명자들은 발효조(Fermenter)를 이용한 반복실험을 통해 슈도모나스 속(*Pseoudomonas.* sp.) NRRL B-2994를 사용하여 홍화씨 유에 함유된 불포화 지방산 리놀레 산(linoleic acid)으로부터 10-히드록시-12(제트)-옥타데세노산 (10-hydroxy-12(z)-octadecenoic acid)을 생산하는 생물전환 실험과정에서 15 리터(liter) 발효조(fermenter)를 이용하여 수산화 생물전환(hydroxylation biotransformation)을 할 경우 생산 수율의 차이가 심하다는 (1-20g/l)사실과 슈도모나스 속 (*Pseoudomonas.* sp.) NRRL B-2994의 생

리적 상태(physiological condition)의 변화를 확인하였다.

[0024] 수산화(hydroxylation) 반응 중, 슈도모나스 속 (*Pseoudomonas.* sp.) NRRL B-2994는 두 종류 형태의 콜로니 형(colony type)으로 분리되었는데, 보통 큰 형태의 콜로니(colony)주변이 뿌옇게 흐려진 평평한 콜로니(colony)가 나타났으며, 수산화 반응(hydroxylation reaction)을 반복할 경우, 발효조 내 S 변이체(small variant) 형태의 세포(cell)가 증가함과 동시에 수산화 반응(hydroxylation reaction)의 생성수율이 현저하게 줄어드는 것을 확인하였다. S 변이체(Small variant) 형태의 세포는 동일한 조건으로 배양하였을 때, L 변이체(Large variant)보다 작고 봉긋하며 둥근 불투명한 콜로니(colony)를 나타냈다(도 9).

[0025] 본 발명에 따른 제조 방법에서는 수산화 지방산의 제조를 위해 식물유 불포화 지방산을 사용한다.

[0026] 본 발명의 용어 "불포화 지방산(Unsaturated fatty acids)"이란 한 분자 속에 탄소-탄소의 불포화결합과 카르복시기를 가지는 사슬 모양 화합물로 탄소간 이중결합이 (매우 드물게 삼중결합(triple bond)을 가진 것도 발견됨) 존재하는 지방산을 말한다. 탄소수 12~20 정도의 짝수개로 구성되어 있는 불포화 지방산은 올레산을 비롯한 글리세리드로 동식물 속에 널리 분포한다. 불포화 지방산의 글리세리드는 포화지방산의 글리세리드에 비하여 녹는점이 낮고, 건성유(乾性油)로서 알려져 있다. 이 밖에 저위(低位)의 불포화 지방산인 아크릴산 메타크릴산의 에스테르는 고분자합성의 단위체로서 중요하다한 분자 속에 탄소-탄소의 불포화결합과 카르복시기를 가지는 사슬 모양 화합물로 동식물 속에 널리 분포한다.

[0027] 불포화 지방산 중 대표적인 올레 산(oleic acid)은 탄소수가 18개이며 9번 탄소에 이중결합을 한 개 가지고 있다. 지방산 분자 중에 이중결합이 하나 있을 때마다 시스(*cis)*형과 트랜스(*trans)*형의 두 개의 입체 이성질체(geometrical isomers)가 존재할 수 있다. 예를 들면 올레 산(oleic acid)은 시스(*cis)* 형이고 엘라이드산(elaidic acid)은 트랜스(*trans)*형이다.

[0028] 리놀레 산(linoleic acid)은 탄소수가 18개이며 9, 12의 위치에 2개의 이중결합이 있으며, 리놀렌 산(linolenic acid) 역시 탄소수가 18개이며 9, 12, 15의 위치에 3개의 이중결합이 있다. 아라키도닉 산(arichidonic acid)은 탄소수가 20개이며 5, 8, 11, 14의 위치에 이중결합이 4개 있다.

[0029] 이러한 식물유 불포화 지방산은 공지의 방법에 의해 합성 또는 식물유로부터 추출하여 사용할 수도 있고, 불포화 지방산이 포함된 식물유 자체의 형태로 사용할 수도 있다.

[0030] 상기 식물유의 바람직한 예로서 홍화씨 유 및 아마씨 유(flaxseed oil)를 들수 있는데, 홍화씨 유는 전체지방산의 75% 이하의 리놀레 산(linoleic acid), 15% 올레 산(oleic acid)과 8% 팔미트 산(palmitic acid), 스테아르 산(steraric acid) 2%를 함유하고 있으며, 아마씨 유(flaxseed oil)는 60% 이하의 리놀렌 산(linolenic acid)과 리놀레 산(linoleic acid) 15%, 올레 산(oleic acid) 17%, 스테아르 산(stearic acid) 3%와 팔미트 산(palmitic acid) 5%를 포함하고 있다(v/v %).

[0031] 바람직한 양태로서, 본 발명에 따른 제조방법은 상기 식물유의 성분 중에서 스테아르 산(stearic acid) 비율을 낮추어 생산 효율을 높이기 위해 초임계 장치를 사용할 수 있다(도 7).

[0032]

[0033] 초임계 유체(Supercriticall Fluid)는 임계점(critical point) 즉, 임계 온도, 및 임계 압력 이상의 조건에서 존재하는 물질의 상태로, 물리적인 성질이 기체와 액체의 중간 성격을 갖는 유체로 액체에 상응하는 밀도를 가지며 기체에 해당하는 투과성을 갖는다.

[0034] 초임계 유체 추출은 초임계 상태의 유체가 갖는 여러 장점을 이용하는 기술로서 증류(distillation)와 추출(extraction)의 원리가 동시에 적용되는 복합 기술의 성격을 갖기 때문에 여러가지 독특한 장점을 갖는다. 초임계 유체는 압력 및 온도의 조작에 의하여 고밀도 상태에서 저밀도 상태로의 조건 설정이 가능하기 때문에 분획, 분리 등의 선택성이 뛰어나서 고순도의 제품을 얻을 수 있고, 추출용매를 손실 없이 거의 완전하게 회수

할 수 있으며, 잔존 용매가 없는 정제물을 얻을 수 있다.

[0035] 또한 초임계 유체의 점도가 작아 시료에의 침투성이 좋아 추출효율이 높으며 또한 확산 계수(diffusion coefficient)가 크므로 추출속도가 빠르며, 비교적 저온에서 추출함으로서 열에 의한 시료의 손상을 피할 수 있고, 추출물에 초임계 유체가 잔류하지 않는 등의 많은 장점을 가지고 있다. 그러나, 고압장치를 사용하여야 하므로 시설비 및 유지비가 많이 드는 단점이 있어 초임계 유체를 이용하는 추출은 고효율로 이루어져야 경제성이 있는 것으로 알려져 있다.

[0036] 본 발명에 따른 제조 방법에서는 초임계 유체로서 이산화탄소를 이용하며 이산화탄소는 그 임계 압력이 7.4 MPa이고, 임계 온도는 31℃로 낮아 일반적으로 초임계 조건을 만들기 쉽고, 이산화탄소 자체가 독성이 없고 비용이 저렴하기 때문에 유리하다. 초임계 이산화탄소는 비극성 용매로서 유지와 같이 극성이 낮은 물질의 추출에 활용될 수 있다. 또한 알코올과 같은 극성을 지닌 물질을 일부 첨가함으로서 초임계유체의 극성 변화를 쉽게 유도할 수 있어서 즉, 용해력을 현저하게 바꿀 수 있기 때문에 트리글리세라이드 외의 유지 성분들의 추출에 활용할 수 있는 장점도 가질 수 있다.

[0037] 이하, 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다.

[0038] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

효 과

[0039] 본 발명은 생물전환법으로 미생물을 이용하여 친환경적 생산 공정 개발로 최소한의 환경 오염물질 방출을 목적으로 하고 있으며, 여기에 선택적인 광활성 유기 물질 생산과 신규 유기 합성 물질 개발 및 공정개발 등을 기대할 수 있다. 본 발명에 따른 수산화 지방산을 제조하는 방법은 환경 친화적이고, 기후 변화나 식물의 생산 한계에 영향을 덜 받으며 수산화 지방산을 생산할 수 있는 효과가 있다.

[0040] 또한, 본 발명에 의해 생성된 수산화 지방산은 미생물의 제한된 베타 산화작용에 의하여 분자량이 작은 수산화 지방산으로 전환되므로, 비교적 저가의 식물유를 이용하여 고부가가치의 천연 과일향을 위한 중요한 향료 및 향장 원료물질을 생산할 수 있는 효과가 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0041] **<실시예1> 불포화 지방산 함유 식물유의 선택**

[0042] 실험에 사용된 식물유로서, 홍화씨 유 및 아마씨 유(flaxseed oil)는 국내 생산량이 미비하여 미국에서 수입하여 사용하였다. 수입 식물유의 불포화 지방산의 함량은 메틸화 반응(methylation reaction) 후 가스 크로마토그래피(Gas Chromatography(GC))를 이용하여 검증하였으며 홍화씨 유(safflower oil)는 전제지방산의 75.5% 리놀레 산(linoleic acid), 13.5% 올레 산(oleic acid)과 8.2% 팔미트 산(palmitic acid), 스테아르 산(steraric acid) 1.8%를 함유하고 있으며, 아마씨 유(flaxseed oil)는 58.9% 이하의 리놀렌 산(linolenic acid)과 리놀레 산(linoleic acid) 14.6%, 올레 산(oleic acid) 17.9%, 스테아르 산(stearic acid) 32%와 팔미트 산(palmitic acid) 5.4%를 함유하였다(v/v %). 식물유는 생물반응기에 식물유 20%와 리파아제(lipase) MY(AMANO, Japan)를 오일(oil)양 기준으로 1% 넣고 탈 이온수(d-water)를 함께 넣은 후 37℃에서 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℃에서 30분간 가열하여 정지시켰다. 가수분해 된 식물유는 실온으로 냉각시킨 후, 상층의 오일층을 회수하여 지방산을 분리 수거한 후 생물전환공정에 사용하였다 (도 2).

[0043] **<실시예2> 활성 미생물의 탐색**

[0044] 수산화 반응(Hydroxylation reaction) 활성을 지닌 미생물을 분리하기 위하여 한국생명공학연구원 KCTC (Youseoung, Korea) 에서 분양 받은 슈노모나스(*Pseudomonas*) 균주 및 실험실 내 보유하고 있는 미생물 99종을 사용하였다. 모든 균주는 영양 한천 배지 플레이트(Nutrient Agar Plate(NA))에서 24시간 28°C 에서 배양하여 4°C에서 보관하였다. 장기간 균주를 보관하기 위하여 모든 균주는 영양 배지(Nutrient Broth medium (NB, Difco Laboratories Detroit, USA))에서 24시간 28°C 에서 배양한 후, 급속 동결 후 -70°C에서 보관하였다. 높은 수산화(hydroxylation) 활성을 지닌 균주를 동정하기 위하여 슈도모나스(*Pseudomonas*) 스크리닝 배지(screening medium(PSM, yeast extract 0.5%, K_2HPO_4 0.15%, KH_2PO_4 0.15%, $MgSO_47H_2O$ 0.05%, tween 80 0.02%))를 사용하였다. PSM(*Pseudomonas* screening medium)은 25% NaOH 사용하여 pH 7.0로 조정하였다. 멸균된 배지에 균주를 접종하기 직전에 멸균된 50% 글루코오스(glucose (w/w))를 5 g/l와 미생물 리파아제(microbial lipase)로 가수분해 된 홍화씨 유를 멸균하여 0.14% (v/v) 넣어주고 150 rpm, 28℃ 에서 24시간 배양하였다. 배양액은 50% H_2SO_4를 첨가하여 pH를 4.0으로 하고 에틸 아세테이트(ethyl acetate)로 추출한 후, 시료를 TLC(Thin Layer Chromatography)로 분석하였다.

[0045] 미생물에 의한 수산화(Hydroxylation) 반응은 불포화 지방산의 이중 결합(double bond)의 위치에 따라 하이드록실 그룹(hydroxyl group)을 첨가할 수 있어, 리놀렌 산(linolenic acid)은 6개의 수산화 지방산(Hydroxy Fatty Acid), 리놀레 산(linoleic acid)은 4개의 수산화 지방산(Hydroxy Fatty Acid)과 올레 산(oleic acid)은 2개의 수산화 지방산(Hydroxy Fatty Acid)을 생성할 수 있으며 미생물의 종류 및 옥시게네이즈(oxygenase)의 반응 특수성에 따라 다양한 형태의 수산화 지방산(Hydroxy Fatty Acid)을 생성할 수 있다. 수산화(Hydroxylation)의 위치 및 숫자에 따라 수산화 지방산(Hydroxy Fatty Acid)의 생리적(Physical) 및 화학적(chemical) 특징(Characterization)이 다르게 되어 수산화 지방산(Hydroxy Fatty Acid)을 이용한 다양한 형태의 폴리머(polymer)의 생리적(Physical) 및 화학적(chemical) 특징(Characterization)에 영향을 미치게 된다. 따라서 한국생명공학연구원(KCTC) 및 실험실 내 보관 중이던 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속 균주를 전체 균주 수산화(whole cell hydroxlyation) 반응 후 TLC(Thin Layer Chromatography) 분석(analysis)으로 총 99종의 스크리닝(screening)였으며, 슈도모나스(*Pseudomonas. sp.*) NRRL B-2994를 제외한 대부분 균주에서 수산화(hydroxylation) 활성이 높지 않게 나타났다.

[0046] 슈도모나스(*Pseudomonas. sp.*) NRRL B-2994가 모노옥시게네이즈(monooxygenase)의 활성에 의하여 리놀레 산(linoleic acid)을 가장 효과적으로 수산화(hydroxylation)시켰다. 슈도모나스(*Pseudomonas. sp.*) NRRL B-2994 에 의해 생성된 수산화 지방산(Hydroxy Fatty Acid)의 특성을 규명하기 위하여 하이드록실 그룹(hydroxyl group)의 숫자와 정확한 수산화 위치(hydoxylation site)를 결정하기 위하여 질량(Mass) 분석을 실시하였다.

[0047] **<실시예3> 지방산 함량 분석을 위한 메틸 에스테르화(methyl esterification) 반응**

[0048] 식물유에 포함되어 있는 지방산의 함량을 확인하기 위하여 가수분해된 지방산을 추출하기 위해 시료를 50% H_2SO_4를 사용하여 pH 2.0으로 조절한 후, 시료와 같은 분량의 에틸 아세테이트(ethyl acetate)로 3회 추출하였다. 추출액을 포화 NaCl로 두 번 씻어준 후, 적당량의 무수황산나트륨(anhydrous sodium sulfate)로 수분을 제거하였다. 용매는 감압 농축하여 제거하고 지방산을 회수하였다. 회수된 지방산에 5배의 10% BF_3 메탄올(Methanol)을 첨가하고, 시료는 중탕으로 100℃에서 5분간 열을 가하였다. 반응액이 식으면 1-2배의 탈-이온수(d-water)로 과잉의 BF_3 메탄올(Methanol)제거한 후, 포화 Na_2HCO_3를 이용하여 오일층을 분리하여 상층액을 회수하였다.

[0049] **<실시예4> Gas Chromatography (GC)를 이용한 지방산의 분석**

[0050] **1) Gas Chromatography (GC)의 분석 조건**

[0051] 메틸 에스테르화(Methyl ester)된 지방산은 HP-5 캐필러리 컬럼(Capillary Column(30m, 0.32mmID, Hewlett Packard, USA))이 장착된 가스 크로마토그래피(Gas Chromatography(Model DS 6200, Donam, Korea))를

사용하여 분석하였다. 오븐의 온도는 200℃에서 300℃까지 10℃/min으로 승온 시켰다. 검출기(Detector)는 불꽃 이온화 검출기(flame ionization detector)를 사용하였으며 검출기(detector)의 온도는 275℃, 인젝터(injector)의 온도는 250℃로 하였다. 운반 가스(Carrier Gas)로 헬륨(Helium)을 사용하였다.

[0052] **2) GC/MS(Gas Chromatography / Mass Spectroscopy)를 이용한 생산물의 화학적인 구조 분석**

[0053] 생산물의 화학적인 구조 분석을 위하여 GC-MS를 이용하였다. 전자 충돌 질량 스팩트라(Electron impact mass spectra)는 HP-5MS(30m x 0.25mmID, 0.25㎛, Hewlett Packard, USA) 컬럼(column)이 장착된 휴렛 패커드(Hewlett Packard) HP-6890 시리즈(series)를 사용하였다. 인젝터(Injector)는 HP-7683 시리즈(series)를 검출기(Detector)는 HP-5973 질량-선택적 검출기(mass-selective detector)를 사용하였으며, 인젝터(injector)의 온도는 250℃로 하였다. 컬럼(Column)의 온도는 70℃에서 5분간 유지시킨 후 240℃까지 4℃/min으로 올린 후 20분간 유지하였다. 운반 가스(Carrier gas)로 헬륨(He)을 사용하였다. GC-MS는 230℃의 이온 소스 온도(ion source temperature)로 70eV의 전자 충돌(electron impact)로 작동시켰다.

[0054] **3) TLC (Thin Layer Chromatography)를 이용한 지방산의 분석**

[0055] 실리카 겔(Silica gel) 60 F254 TLC 플레이트(Plate(Merck Co., Germany))를 사용하여 실온에서 확인했다. 실리카 겔 플레이트(Silica gel plate)에 반응(reaction) 물질을 1㎕ 점적하고, 톨루엔(toluene) / 디옥산(dioxane) / 아세트 산(acetic acid) (97:14:7, v/v/v)의 혼합용액을 전개용매로 사용하였다. 전개용매에 의하여 분리된 플레이트(plate)를 건조시킨 후, 메탄(methane) / H_2SO_4 / N-1-나프틸에틸렌디아민 다이히드로클로라이드 (N-1-naphtylethylenediamine dihydrochloride)를(95:5:0.3, v/v/w)의 발색시약을 이용하여 발색시키고, 100℃의 오븐에 5분간 두어 생산물을 확인하였다.

[0056] **<실시예5> 생물전환공정을 위한 공정 개발**

[0057] 슈도모나스 속(*Pseudomonas.* sp.) NRRL B-2994의 전체 미생물 세포(whole cell)를 이용한 생물전환공정을 개발하였는데, 불포화 지방산의 수산화 전체 세포(hydroxylation whole cell) 생물전환공정은, 수산화(hydroxylation) 반응을 위한 충분한 세포 질량(cell mass)을 확보할 수 있는 미생물 세포(cell) 성장기와 전체 미생물 세포(whole cell)의 모노옥시게네이스(monooxygenase)의 활성을 이용한 수산화(hydroxylation) 반응기로 구분된다.

[0058] 접종 균주(Inoculum)는 NB 배지에서 자란 후 동결 보관된 슈도모나스(*Pseoudomonas.* sp.) 접종 배지(Inoculum medium)에 접종하여 24시간 25°C를 자란 배양액을 사용하였으며, 그 조성은 효모 추출액(yeast extract) 0.5%, KH_2PO_4 0.4%, $MgSO_47H_2O$ 0.05%, 트윈(tween) 80 0.02%로 구성되었으며 pH는 25% KOH를 사용하여 멸균 전 7.0으로 조정하였다. 멸균된 접종 배지(Inoculum medium)에 가수분해 된 홍화씨 유 0.14% (멸균), 글루코오스(glucose) 0.25% (멸균)을 첨가한 후 접종하였다. 100 ml 접종 배지(inoculum media)를 넣은 500 ml 삼각 플라스크에 동결 보관된 균주를 1% 접종하고 25℃에서 200 rpm으로 48시간 배양하였다. 수산화(Hydroxylation) 반응은 생산 배지(Production medium)를 사용하였으며, 그 조성은 효모 추출액(yeast extract) 1.0%, 소이펩톤(soypeptone) 0.5%, KH_2PO_4 0.4%, $MgSO_47H_2O$ 0.05%, 트윈(tween) 80 0.02%로 구성되었으며, pH는 25% KOH를 사용하여 멸균 전 6.5로 조정하였다. 멸균 된 생산 배지(production media)에 가수분해 된 홍화씨 유 0.14% (멸균), 글루코오스(glucose) 0.5% (멸균)를 첨가한 후 접종하였다. 2.5 리터 생산 배지(production media)를 넣은 3 리터 lab. 발효조(fermenter)에 접종 균주(inoculums) 1% 접종하고 26℃에서 420 rpm, 0.3 v/v/m 에어레이션(aeration), 24-30시간 배양하였다. 탄소원으로 넣어준 글루코오스(glucose)양이 0이 되고 광도계(spectrophotometer) (Model Spectronic 20D, MILTON ROY Co., USA)를 이용하여 1/10로 희석된 배양액이 광학 밀도(Optical Density) (OD_{660})가 약1이 되었을 때, 에어레이션(aeration)을 멈추고 25% 인산(phosphoric acid)을 사용하여 pH를 6.5로 조절하였다. 리파아제(Lipase) MY를 0.5 g/l로 넣고 홍화씨 유를 10 g/l을 0.52 g/l/hr로 첨가하면서 교반(agitation) 속도를 900 rpm으로 높인다. 홍화씨 유가 완전히 첨가된 후, 생물전환과정을 48시간 동안 지속시킨 후, 25% 인산(phosphoric acid)을 사용하여 pH를 3.0 조절한 후 121℃에

서 15분간 멸균하였다. 발효조의 온도가 50℃에 도달하면 교반(agitation)을 멈추고 오일층을 분리하고 수거하여 메틸화 반응(methylation reaction) 후, GC분석을 통해 HFA(Hydroxy Fatty Acid)함량을 측정하였다. (도 5; a : 메틸 팔미트 산(methyl palmitate), b: 메틸 리놀레 산(methyl linoleate), c: 메틸 10-히드록시-12(제트)-옥타데세노산 (methyl 10-hydroxy-12(z)-octadecenoic acid)).

[0059] 슈도모나스 속(*Pseudomonas*. sp.) NRRL B-2994의 성장 확인과 발효조에 기질 첨가 시점을 알아보기 위해 흡광도(OD) 및 글루코오스(glucose) 농도를 측정하였다. 실험실용 3 리터(liter)발효조에서 충분히 배양한 균체에 가수 분해된 홍화씨 유를 첨가한 후, 24-30시간의 생물전환공정을 거쳐 생산된 지방산을 회수하여 메틸에스테르(methyl ester)로 만들어 10-히드록시-12(제트)-옥타데세노산 (10-hydroxy-12(z)-octadecenoic acid)를 GC로 분석하였으며, 평균 39.2% 의 전환(conversion) 효율을 보였다 (도 6).

[0060] 가수분해된 홍화씨 유는 10 g/l을 0.52 g/l/hr 속도로 발효기에 첨가되었으며, 생물전환율을 높이기 위해 홍화씨 유의 양을 늘리거나 첨가속도를 증가 시킬 경우 생물전환율은 상대적으로 크게 떨어졌다. 이러한 생물전환율의 급감은 가수분해된 홍화씨 유에 함유된 불포화 지방산에 의한 세포 독성(cell toxicity)에 기인하는 것으로 추정된다.

[0061] 스테아르산은 포화지방산으로 본 연구에서의 목적물인 HFA를 생산하는 데에 전혀 의미가 없는 물질이므로, 초임계 장치를 이용하여 원료 중의 스테아르 산(stearic acid)을 제거함으로써 스테아르 산(stearic acid)의 비율을 10%에서 5%로 낮추어, 보다 효율적으로 HFA 함량을 높이고자 하였다 (도 7).

[0062] **<실시예6>. 수산화 지방산의 생산을 위한 2단계 미생물 전환 공정(2-Stage Microbial Biotransformation Process)**

[0063] 슈도모나스 속(*Pseudomonas*. sp.) NRRL B-2994를 이용한 리놀레 산(linoleic acid)의 수산화 지방산의 전환은 기존에 연구 보고된 연구 결과와 달리 에어레이션(aeration)을 중단하고 교반기(agitation) 속도를 900rpm으로 올려줄 경우에 효과적인 생물전환율을 보였다. 이러한 결과는 기존에 보고된 슈도모나스 속(*Pseudomonas*. sp.) NRRL B-2994의 케토 지방산(keto fatty acid) 생산과 달리 수산화 지방산 생산 기작에 대한 차이를 보이는 것으로 추정된다. 현재 생산 수율의 향상 및 확장(scale-up)을 위한 발효 공정의 최적조건에 대한 연구가 15-리터(liter) Lab 발효기를 이용하여 진행되고 있다. 이에 따라 세포 질량(cell mass)을 확보할 수 있는 세포(cell) 성장기의 에어레이션 단계(aeration step)와 수산화(hydroxylation) 반응기의 언에어레이션 단계(anaeration step)으로 이루어진 2단계 생산 공정을 개발하였다 (도 8). 생산 수율 향상을 통한 산업적 공정 개발은 상대적으로 저가의 기능성 식품소재인 홍화씨 유에서 고부가 산업 응용 소재인 수산기를 가진 수산화 지방산을 생산하게 됨으로써 천연 향료 생산 뿐 만 아니라 상대적으로 규모가 큰 다양한 고분자 화학분야에 전구물질로 사용될 수 있다.

[0064] **<실시예7> 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.) NRRL B-2994의 표현형 (Phenotypic variants)에 따른 형태적 특징(morphological character) 과 수산화(hydroxylation)의 상관관계**

[0065] **1). 수산화(Hydroxylation) 생물공정의 안정화: 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.) NRRL B-2994의 변이체(Variation)에 의한 수산화(Hydroxylation) 차이**

[0066] 발효조(Fermenter)를 이용하여 반복된 실험을 통해 슈도모나스 속(*Pseudomonas*. sp.) NRRL B-2994를 사용하여 홍화씨 유에 함유된 불포화 지방산 리놀레 산(linoleic acid)로부터 10-히드록시-12(제트)-옥타데세노산 (10-hydroxy-12(z)-octadecenoic acid)을 생산하는 생물전환 실험의 생산 수율이 1에서 20g/l로 불규칙적으로 나타난다는 사실을 알게 되었다. 이러한 생산 수율의 불규칙성은 산업형 생물공정의 개발에 커다란 장애요인으로, 산업형 수산화(hydroxylation) 반응을 이용한 산업공정의 개발을 위하여 생산 수율의 안정화에 관련된 연구가 필요하였다.

[0067] 이에, 상기와 같은 문제점의 해결을 위한 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0068] **2). 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.) NRRL B-2994의 두 가지 표현형 변이체(phenotypic variants)**

[0069] 15 리터(liter) 발효조(fermenter)를 이용하여 수산화 생물전환(hydroxylation biotransformation)을 할 경우 생산 수율의 차이가 심해 (1-20g/l), 슈도모나스 속(*Pseudomonas*. sp.) NRRL B-2994의 생리적 상태(physiological condition)의 변화를 확인하였다. 수산화(Hydroxylation) 반응 중, 슈도모나스 속(*Pseudomonas*. sp.) NRRL B-2994는 두 종류 형태의 콜로니 형(colony type)으로 분리되었다. 자연형(Wild-type)의 슈도모나스 속(*Pseudomonas*. sp.) NRRL B-2994를 영양 한천 배지(Nutrient agar) 26℃에서 48시간 배양하면, 보통 큰 형태의 콜로니(colony)주변이 뿌옇게 흐려진 평평한 콜로니(colony)가 나타냈으나, 수산화 반응(hydroxylation reaction)을 반복할 경우, 발효조 내 S 변이체(small variant) 형태의 세포(cell)가 증가함과 동시에 수산화 반응(hydroxylation reaction)의 생성수율이 현저하게 줄어드는 것을 확인하였다. S 변이체(Small variant) 형태의 세포는 동일한 조건으로 배양하였을 때, L 변이체(large variant)보다 작고 봉긋하며 둥근 불투명한 콜로니(colony)를 나타냈다(도 9).

[0070] **3). 소수성(Hydrophobicity)의 측정: 탄화수소에 대한 미생물 부착 실험(Microbial adhesion to hydrocarbon (MATH) test)**

[0071] 미생물 세포 표면 소수성(Microbial cell surface hydrophobicity)의 측정은 탄화수소에 대한 미생물 부착 실험(microbial adhesion to hydrocarbon(MATH) test)로 측정하였다. 하룻동안 배양한 균주를 25 mM PBS(phosphate-buffered saline)로 두 번 씻어주고, 25 mM PBS(phosphate-buffered saline)를 이용하여 600 nm에서 광학 밀도(optical density)가 약 0.6이 되도록 한다. 이 세포 현탁액 1.5ml에 다양한 부피(volume)의 헥사데칸(hexadecane (0 내지 900(㎕) 범위(ranging from 0 to 900(㎕)))을 넣고 30초간 볼텍싱(vortexing)하였다. 30분간 평형상태가 되도록 한 후, 수상(aqueous phase)의 흡광도를 측정하고 초기 세포 현탁액의 흡광도와의 차이를 계산하여, 헥사데칸(hexadecane)에 대한 균주 부착(cell adhering)의 백분율로 소수성(hydrophobicity)을 평가한다. 미생물 세포 표면 소수도(Microbial cell surface hydrophobicity)의 측정은 탄화수소에 대한 미생물 부착 실험(microbial adhesion to hydrocarbon(MATH) test)(Rosenberg M., D. Gutnick, and E. Rosenberg. *FEMS Microbiol. Lett.* 9:29-33(1980))에 따라 측정하였다.

[0072] 미생물 부착(Microbial adhesion)(%) = (0.6 - aqueous phase의 흡광도) x 100

[0073] **4). 수산화 반응(Hydroxylation reaction) 과 미생물 세포 표면 소수성(Cell surface hydrophobicity)과의 상관관계**

[0074] 식물성 오일을 이용한 수산화 반응(hydroxylation reaction) 중 가장 중요한 것은 첨가된 오일과 세포 표면(cell surface)의 상관관계에 따라 오일의 세포내 흡수율과 생물 전환 비율(bioconversion rate)에 영향을 미치게된다. 콜로니 형태(Colony morphorogy)와 세포 표면 소수성(cell surface hydrophobicity)을 확인한 결과, S 변이체(variant)의 뭉침과 흡착현상이 나타남으로써, S 변이체 세포 표면 소수성(S varient cell surface hydrophobicity)이 L 변이체(L variant)보다 더 높았다(도 10). S 변이체(variant)는 세포의 응집력이 높아 발효조 내에서 세포 간 소수적 상호작용(hydrophobic interaction)에 의하여 뭉침 현상을 보여 낮은 생물전환 비율(bioconversion rate)을 보였다. L형 변종은 배지 내에 균일하게 퍼지면서 자라는 반면, S형 변종은 배지 표면(계면)이나 시험관 표면에 흡착되는 성질을 나타내었다. 슈도모나스 속 NRRL B-2994 균주를 배양한 플레이트를 1주일간 실온에 방치한 후 관찰한 결과, L형과 S형 변종은 가역적 변화가 가능하여, L형이 S형으로 전환되기도 하고, S형이 L형으로 전환되기도 하는 것으로 나타났다. 특히, L형에서는 크게 달라진 점을 발견할 수 없었으나, S형은 대부분의 콜로니가 L형으로 유사하게 변화되어 감을 관찰할 수 있었으며, 이로써 S형 변종이 상대적으로 L형 변종으로 전환되기 쉬움을 알 수 있었다(도 10).

[0075] **5). 산화적 스트레스에 대한 민감성(Sensitivity to oxidative stress)**

[0076] 이 실험은 산화적 스트레스에 대하여 세포의 살아남는 능력을 보기 위한 실험으로, Hassett et al.의 디스크 어세이(disk assay)를 사용하여 세포의 산화적 스트레스(oxidative stress)에 대한 민감성(sensitivity)을 조사하였다.

[0077] L 변이체(L variant)와 S 변이체(S variant) 각각 후기 대수 증식기(late-log phases)의 미생물 배양(cell culture) 100 ㎕ 를 TSA(tryptic soy ager)와 보통 한천 배지 플레이트(Nutrient agar plates)에 균일하게 깐다. 멸균한 Whatman no. 1 여과 페이퍼 디스크(filter paper disks) (7-mm diameter) 각각의 플레이트(plate)에 놓고 30% H_2O_2 10 ㎕을 흡수시킨다. 26℃에서 24h 배양한 후, 각 디스크(disk) 주변의 성장 억제 영역(growth inhibition zone)의 직경(diameter)을 측정하였다.

[0078] 대수기의 세포를 사용하였을 경우, H_2O_2에 의한 저지환의 크기는 L형 변종이 S형 변종보다 약 30% 작았다. 이 결과로 L 변이체(variants)가 더 민감함을 알 수 있었다. 또한 이러한 결과는 TSA 플레이트(plate)에서 관찰할 수 있었으며, 보통 한천 배지 플레이트(Nutrient agar plate)에서는 관찰할 수 없었다.

[0079] **6). 슈도모나스 속(*Pseudomonas*)에 의한 색소의 생산**

[0080] King et al.의 배지(medium) A 와 배지(medium) B를 변형한 슈도모나스 한천(Pseudomonas agar P(Hi-media, India))와 슈도모나스 한천(Pseudomonas agar F (Hi-media, India))을 사용하여 슈도모나스(Pseudomonas) 속이 생산하는 색소인 피오시아닌(pyocyanin)과 피오버리딘(pyoverdine)의 생산을 알아보았다.

[0081] 피오시아닌(pyocyanin)은 슈도모나스(*Pseudomonas*)의 블루 페나진(blue phenazine) 색소로, 항체 활성(antibiotic activity)을 가지고 있는 세포 외로 분비되는 이차 대사산물(extracellular secondary metabolite)이고, 피오버리딘(pyoverdine)은 수용성의 형광 색소로 슈도모나스 에어로지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)와 다른 슈도모나스(*Pseudomonas*) 에서 나타난다. 그러나 실험에 사용한 균주에서는 어떠한 색소도 발견하지 못했다 (도 12).

산업이용 가능성

[0082] 본 발명에 따른 제조 방법에 의해 수산화 지방산을 제조하는 경우 수산화 반응 활성이 우수한 슈도모나스 속 NRRL B-2994를 이용하여 경제적으로 수산화 지방산을 얻을 수 있고, 환경 친화적 공정을 개발할 수 있는 여러 가지 연구 결과, 이를 토대로 선택적인 광활성 유기 물질 생산과 신규 유기 합성 물질 개발 및 공정개발 등을 기대할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0083] 도 1은 가수분해 된 불포화 지방산으로부터 미생물 생물전환법의해 생성된 다양한 수산화 지방산을 나타낸 도이다.

[0084] 도 2는 가수분해 된 홍화씨 유 및 아마씨 유로부터 두 단계의 미생물 생물전환법에 의한 수산화 지방산 생성과정을 나타낸 도이다.

[0085] 도 3은 홍화씨 유 및 아마씨 유의 지방산 조성을 나타낸 도이다.

[0086] 도 4는 식물유에 함유된 3 종의 불포화 지방산(a : 올레 산, b : 리놀레 산, c : 리놀렌 산)이 수산화 활성을 갖는 미생물 균주의 생물전환 생성물을 분석하는 질량 분석 결과를 나타낸 도이다.

[0087] 도 5는 수산화 활성을 갖는 미생물 균주의 생물전환 생성물을 분석하는 GC 크로마토그램을 나타낸 도이다(a : 메틸 팔미트 산(methyl palmitate), b: 메틸 리놀레 산(methyl linoleate), c: 메틸 10-히드록시-12(제트)-옥타데세노산 (methyl 10-hydroxy-12(z)-octadecenoic acid)).

[0088] 도 6은 24-30시간의 생물전환공정을 거쳐 생산된 지방산의 전환 효율을 나타내는 도이다.

[0089] 도 7은 아마씨 유에서의 지방산 조성이 초임계 장치를 이용한 후의 조성 변화 그래프이다.

[0090] 도 8은 세포 질량(cell mass)을 확보할 수 있는 세포(cell) 성장기의 에어레이션 단계(aeration step)와 수산화(hydroxylation) 반응기의 언에어레이션 단계(anaeration step)로 이루어진 2단계 생산 공정의 조건들을 나타낸 도이다.

[0091] 도 9는 수산화(Hydroxylation) 반응 중, 슈도모나스 속 NRRL B-2994는 두 종류 형태의 콜로니 형(colony type)으로 분리된 사진을 나타낸 도이다.

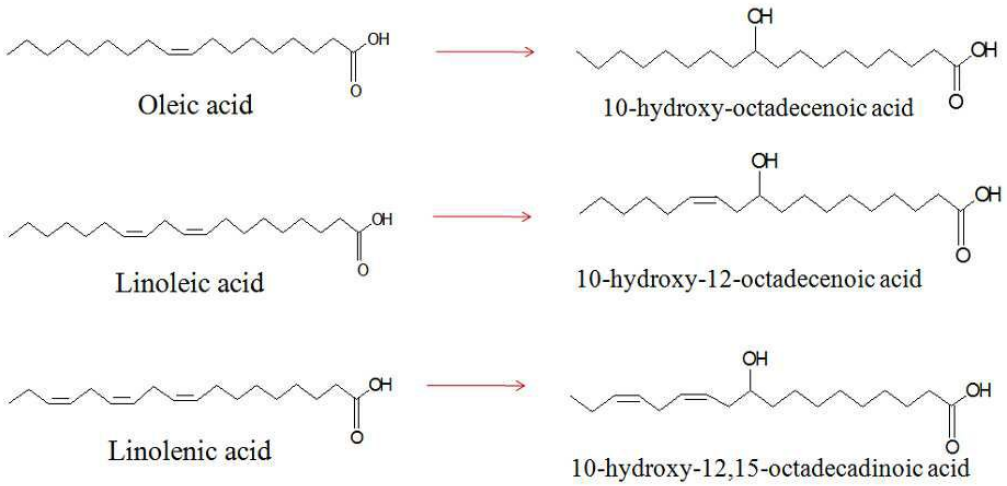
[0092] 도 10은 슈도모나스 속 NRRL B-2994의 생장 표현형(L형 및 S형)의 세포 표면 소수성 및 부착성 평가 결과를 나타내는 그래프이다[L(●) and S(◇) variants].

[0093] 도 11은 표현형에 따른 수산화 지방산의 생산 GC 크로마토그램을 나타낸 도이다 [(A) L variants, (B)S variants].

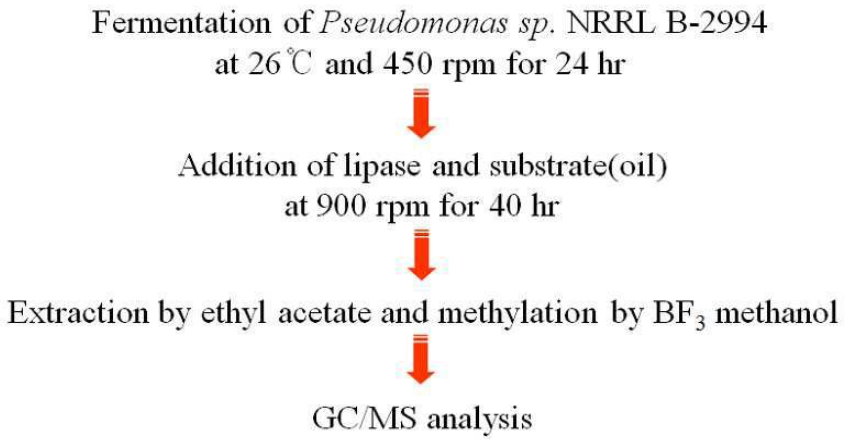
[0094] 도 12는 슈도모나스 속 NRRL B-2994의 생장 표현형(L형 및 S형)의 산화 스트레스에 대한 민감도 및 색소의 생산을 비롯한 두 표현형을 비교한 도이다.

도면

도면1



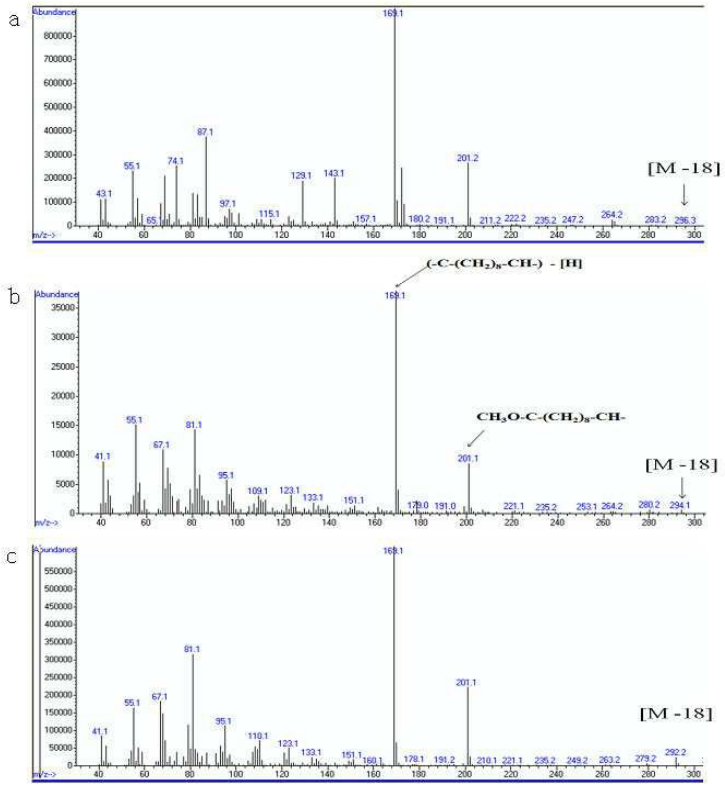
도면2



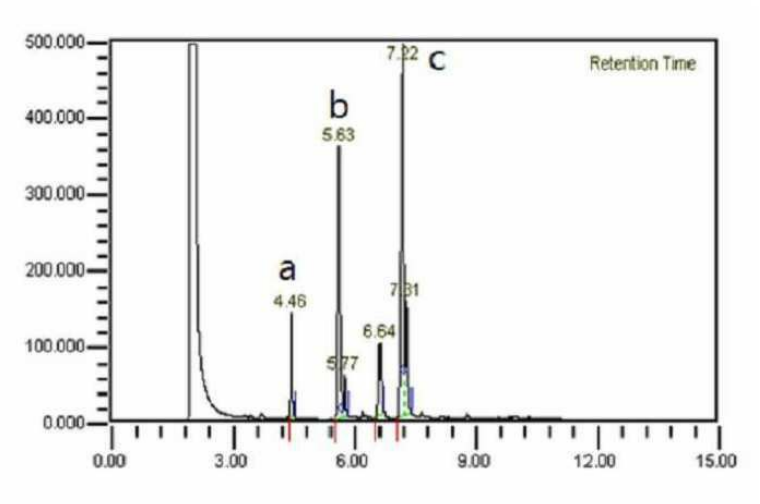
도면3

Composition of fatty acid	Safflower oil (%)	Flaxseed oil (%)
Linoleic acid	75.5	14.6
Oleic acid	13.5	17.9
Palmitic acid	8.1	5.4
Stearic acid	1.8	3.2
Linolenic acid	-	58.9

도면4



도면5



도면6

Incubation time (hr)	Total oil added(g)	Linoleic acid (%)	10-hydroxy-12(z)-octadecenic acid (%)
48	25	25.3	39.2

도면7

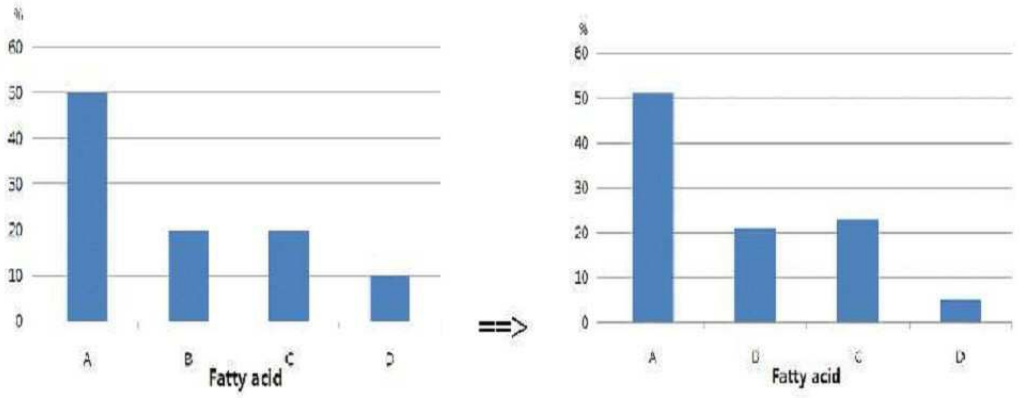


Fig. Composition of fatty acid in Flaxseed oil
A : Linolenic acid (50%)
B : Linoleic acid (20%)
C : Oleic acid (20%)
D : Stearic acid (10%)

==>

Fig. Composition of fatty acid in $SCCO_2$-treated flaxseed oil
A : Linolenic acid (51%)
B : Linoleic acid (21%)
C : Oleic acid (23%)
D : Stearic acid (5%)

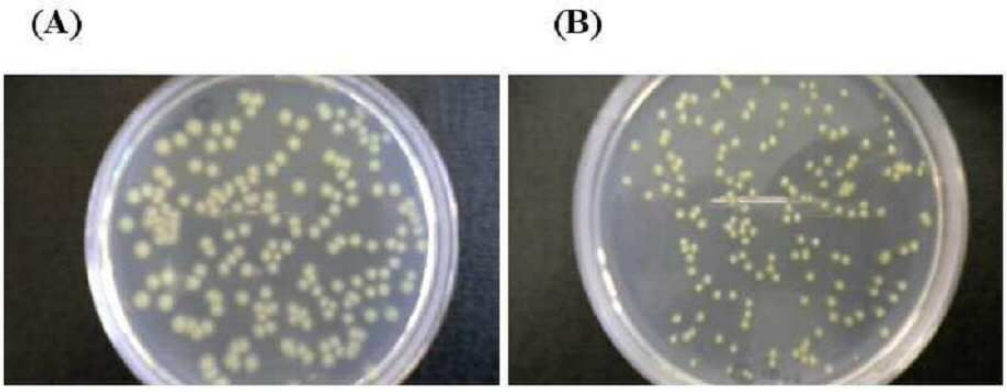
도면8

Table. Condition of hydroxylation in by *Pseudomonas* sp. NRRL B-2994

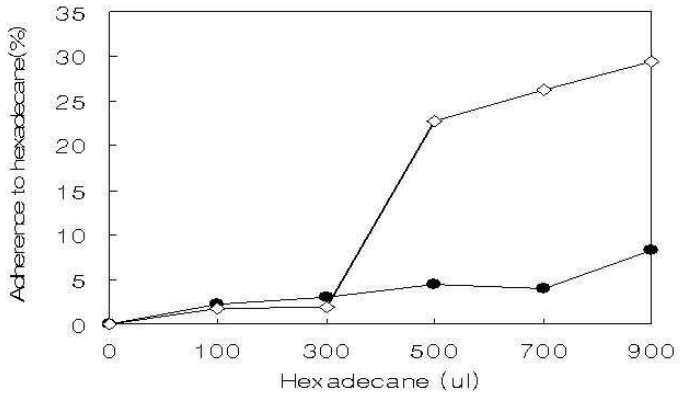
Fermenter parameters	1st (Cell growth)	2nd (Biotrnasformation)
Inoculums	25 ml of imoculums	0
Working volume	2.5 liter in 3 liter vessel	2.5 liter
Temperature	26 ℃	26 ℃
pH	6.5	Controlled at 6.5 with 25%NaOH
Aeration	0.3 v/v/m	0 v/v/m
Agitation	420 rpm (impeller diameter 64mm)	900 rpm (impeller diameter 64mm)
Substrate	0	0.52 g/l/hr
Cultivation time	24 – 30 hr	48 hr

도면9

성장 표현형 시각적 차이 (A) 큰-클론 변이형 (B) 작은-클론 변이형

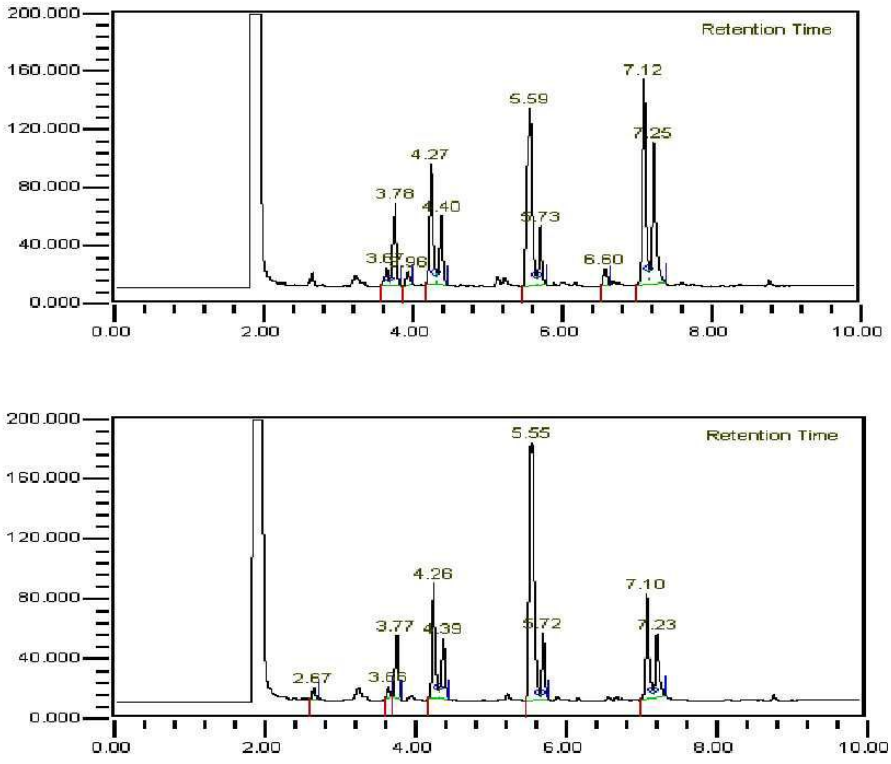


도면10



[L(●) and S(◇) variants]

도면11



도면12

Phenotype	Descriptions	
	L variant	S variant
Colony shape	Large, flat	Small, rounded
Adherence to surface	+	+ +
Hydrophobicity	+	+ +
Sensitivity to H_2O_2 stress	+	+ +
Exoproducts		
Pyoverdine	-	-
Pyocyanin	—	—