

제 3 차 년도
최종 보고서

BSPN 00230-745-7

해양 미생물을 이용한 EPA화합물 개발에 관한 연구

A Study on the EPA Production Using Marine Microorganism

1994. 9.

연구 기관
한국해양연구소

과학기술처

제 출 문

과학기술처 장관 귀하

본 보고서를 “해양 미생물을 이용한 EPA화합물 개발에 관한 연구”
과제의 3 차년도 보고서로 제출합니다.

1994 년 9 월

연구기관: 한국해양연구소

연구책임자 : 조 기 응

연구 원 : 김 상 진

이 홍 금

권 개 경

모 상 준

박 영 욱

요 약 문

I. 제목

해양 미생물을 이용한 EPA화합물 개발에 관한 연구

II. 연구의 목적 및 중요성

어유(魚油)에 많이 포함되어 있는 것으로 알려져 있는 고도 불포화 지방산 (高度 不飽和 脂肪酸) 중 Eicosapentaenoic acid (EPA) 나 Docosahexaenoic acid (DHA) 등 n-3 계열의 지방산들은 혈액내 지질감소, 관상동맥, 심장질환의 억제, 암세포의 선택적 파괴, 류머치스성 관절염 치료등의 효능을 보이고 있는 것으로 보고되어 있다. 이에 따라 고도 불포화 지방산들을 추출, 정제하여 의약 및 건강 식품으로 개발하려는 시도가 이루어져 왔으며 미국, 일본 등지에서 이미 몇년전 부터 시판 단계에 이르고 있고 국내에서도 이러한 추세가 점차 확산되고 있다.

그 원료로 주로 사용되어온 등푸른 생선에서 추출한 어유이외에 EPA를 생산하는 미생물을 이용하여 발효 공정을 통해 대량생산을 꾀하려는 시도가 최근 일본을 중심으로 시작되고 있고 이러한 미생물에서의 EPA 생산은 어유에서의 추출에 비해 Fermentation등의 생물공학적인 공정을 통해 공급원을 안정화 시킬 수 있으며 공정의 규모에 따라 대량생산이 가

능한 이점이 있다. 또한 일반적으로 세균의 경우 고도 불포화 지방산을 거의 포함하고있지 않아 EPA 생산 균주는 EPA 이외의 여타 고도 불포화 지방산이 매우 적게 함유되어 있어 미생물을 이용한 EPA 생산방법은 분리추출 공정이 손쉽다는 장점도 있다. 이러한 추세에 적극적으로 부응하고 EPA 생산 균주를 독자적으로 확보하기 위하여 본 연구실에서도 한국 연근 해역에서 서식하는 해양 동물의 장내에서 EPA생산 균주를 탐색하여 우수 균주를 선발하고 이의 EPA생산의 최적조건을 수립하여 산업화의 기초를 마련하고자 한다.

III. 연구 내용 및 범위

1. 해양세균 균주 확보
2. EPA생산 균주 확보
3. EPA 생산 균주의 동정 및 생리 생화학적 특성 조사
4. EPA생산 최적 조건 확립
5. EPA 분리 정제 방법 개발

IV. 연구 개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 1991년 가을부터 1994년 봄까지 약 이년 반에 걸쳐 한반도 해역에서 채취한 고등어, 멸치, 꽁치, 청어등 어류와 해삼, 가리비, 조개 등 저서 동물 100 여종의 내장에서 약 3,500 여종의 장내세균을 분리 배양하였다.

2. 분리된 세균들로부터 지방산을 추출하여 methyl ester 형태로

전환한후 Thin Layer Chromatography로 EPA 생산 여부를 일차 검정한 후 선별된 120 여종을 대상으로 Gas Chromatography 로 EPA 존재 유무와 그 함량을 확인하였다. 그 결과 23 종의 EPA 생산 해양 미생물을 발견하였다.

3. EPA 생산능이 가장 뛰어난 5 종 (#1513, #2100, #2101, #2778, #3010)을 대상으로 균주의 동정 작업을 완료하였다. Gram 염색, 운동성, 형태학적 특성, 당의 이용능력등 70 여 종의 생화학적 시험 결과 5 종 모두 *Vibriobaceae* 과에 속하며 *Aeromonous* 속임을 확인 하였다.

4. #1513 균주와 #2100 균주를 대상으로 EPA 생산의 최적조건을 수립하였다. 약 50 % 의 숙성 해수를 포함한 Heart infusion 배지에서 성장 및 EPA 생산이 가장 높았고 최적 온도는 18 °C 이며 pH 7.5 근처에서 균체 성장과 EPA 생산이 최적이었고 원활한 산소의 공급이 균체의 성장과 EPA 생산에 필수적이었다. 처음 분리시 5 - 7 %의 EPA함량이 실험실 내에서의 최적 배양 조건에서는 20 -22 % 까지 약 4 배 증가되었고 균체의 회수량도 2 배이상 증가하였다.

5. 본 연구에서 확보한 EPA 생산 균주를 이용하여 간편하고 저렴한 방법으로 EPA를 높은 순도를 분리 정제하는 방법을 개발하였다. 이 방법은 균체내 PLA₂를 이용하고 지방산과 urea의 혼합 결정을 이용하여 EPA만을 분리하는 방법이다.

본 연구결과에 따라 EPA 생산 균주의 특허출원준비 중에 있으며 EPA 생산에 관련된 효소에 관한 연구도 병행하였다. 본 연구는 EPA라고하는 유용물질 생산의 산업화를 궁극적인 목적으로하고 있으며 국내에서 산업화를 위한 준비가 시급히 요구된다. 특히 의약 및 식품업계

의 산업체의 참여가 요망되는데 현재 국내에서 이 관련 분야의 산업체는 중소기업 수준으로 본 연구에 대해 많은 관심을 보이고 있으나 적극적인 투자 보다는 원료를 수입 판매하는 수준에 안주하고 있는 실정이다. 이를 위하여 산학연 합동으로 본 과제를 확충 추진할 필요가 있다.

Summary

I. Title

A Study on the EPA production Using Marine Microorganism

II. Objectives and Significance

Among the polyunsaturated fatty acids usually contained in blue backed fish oil, n-3 series fatty acids such as Eicosapentaenoic acid (EPA) or Docosahexaenoic acid (DHA) show some beneficial effects on human health such as preventing disease in circulating system, decreasing blood lipid content, selective destruction of cancer cells, and curing of some inflammation. Recently, these polyunsaturated fatty acids were purified and marketed as health food as well as curing medicine in United State, Japan and this trend has begun in Korea. To overcome some problems using fish oil for the EPA production such as unstable supply and easy decomposition during transport and storage, an microbial EPA become more promising source as an alternative EPA source other than fish oil. This microbial EPA production will guarantee a stable supplication of source for EPA through biotechnical process such as fermentation,

and eventually mass production can be easily processed. Another advantage of the microbial EPA production is microbial fatty acid source contains very little other polyunsaturated fatty acid than EPA which greatly facilitate the purification process. To follow this trend actively, first of all high EPA producing bacteria must be obtained and the optimal cultivating condition should be established for the eventual industrialization of microbial EPA production.

III. Contents and Scope

1. Marine bacterial strains stocks have been established for this project as well as other screening of biologically active substance or novel compounds
2. 23 EPA producing bacteria have been isolated
3. 5 strains of high EPA production activity have been secured which can be good candidate for microbial mass EPA production
4. Identification and physiological and biochemical characterization of high EPA producing bacteria
5. Establishing the effective and economic process for EPA purification.

IV. Results and Suggestions

1. About 3,500 strains of bacteria were collected from the intestine of 100 kinds of marine animals including sardine, mackerel,

sea cucumber, and so on obtained from the sea around Korea peninsula.

2. 23 strains of EPA producing bacteria were obtained after screening with thin layer chromatography and gas chromatography and stored.

3. 5 strains of high EPA producing bacteria (#1513, #2100, #2101, #2778, #3010) were isolated and identified as *Aeromonas* genera through morphological and standard biochemical tests.

4. Optimal conditions for the growth and EPA production were established for #1513 and #2100 strains. Heart infusion media containing about 50 % aged sea water and incubation temperature of 18 °C, pH 7.5, and high oxygen supply should be employed for the best growth and EPA production. At optimal condition in laboratory scale, about 2 fold increase of cell mass and 4 fold increase of EPA were obtained.

5. An effective and economic process for EPA purification (higher than 95 %) was established from these high EPA producing bacteria.

The strains of high EPA production are ready for application for microbial cell patent, and the enzyme^l involved for the EPA production was studied. For the eventual purpose of this research, industrial mass production of EPA, the active participation of industrial companies is highly required.

목차

요 약 문	3
목 차	11
표 목차	15
그림 목차	19
제 1 장. 총 론	25
제 2 장. EPA 생산 균주의 추가 분리	35
제 1 절. 서론	35
제 2 절. 연구 재료 및 방법	36
제 3 절. 연구 결과 및 토의	41
제 3 장. EPA 분리 정제	67
제 1 절. 서론	67
제 2 절. 연구 재료 및 방법	68
제 3 절. 연구 결과 및 토의	73
제 4 장. EPA 생산 관련 효소	83
제 1 절. 서론	83
제 2 절. 연구 재료 및 방법	84
제 3 절. 연구 결과 및 토의	88
제 5 장. 지질 산패 측정 방법	103
제 1 절. 서론	103
제 2 절. 연구 재료 및 방법	104
제 3 절. 연구 결과 및 토의	106
제 6 장. 결론	111
참고자료	113

Content

Summary.....	7
Content.....	13
List of Tables	17
List of Figures	21
Part 1. Introduction	25
Part 2. Isolation of EPA Producing Bacteria	35
Section 1. Introduction	35
Section 2. Materials and Methods	36
Section 3. Results and Discussion	41
Part 3. Purification of Microbial EPA	67
Section 1. Introduction	67
Section 2. Materials and Methods	68
Section 3. Results and Discussion	73
Part 4. Enzymes involved in EPA production	83
Section 1. Introduction	83
Section 2. Materials and Methods	84
Section 3. Results and Discussion	88
Part 5. Assay Method for lipid Autooxidation	103
Section 1. Introduction	103
Section 2. Materials and Methods	104
Section 3. Results and Discussion	106
Part 4 Discussion in General and Suggestion.....	111
References	113

표 목 차

표 1. Eskimo 와 네덜란드인의 섭취 음식물내의 지방산의 불포화도 비교	26
표 2. EPA의 알려진 약리 작용들	27
표 3. 해양동물 장내 서식세균 분리 및 EPA 생산균주 탐색결과	44
표 4. EPA생산 균주들의 기본적 생리 생화학적 특성	45
표 5. #2100 균주의 지방산 조성에 미치는 배양 압력의 영향	58
표 6. 배지에 함유된 수용성 유기용매가 #2100 균주의 지방산 조성 및 EPA생산에 미치는 영향	60
표 7. #2100 균주의 성장과 EPA생산에 미치는 여러종류의 당의 영향	64
표 8. 저온결정법에 의한 EPA의 정제	74
표 9. Urea 혼합결정법에 의한 EPA의 정제	82
표 10. #2100 균주의 지방산 조성에 미치는 배양 온도의 영향	92
표 11. #2100 균주의 지방균별 함유 지방산 조성	97

List of Table

Table 1. Percentage of Total Fatty acids by Types of Dietary Fat in Eskimo and Danish Diets.....	26
Table 2. Reported Pharmacological Effects of EPA.....	27
Table 3. Isolation of marine bacteria and Screening of EPA Producing bacteria.....	44
Table 4. Basic characterization of EPA producing bacteria.....	45
Table 5. Fatty acid of #2100 grown at different pressure.....	58
Table 6. Effects of water soluble organic solvents on the Fatty acid composition and EPA production of #2100 cell.....	60
Table 7. Effect of sugar on the growth and EPA production of #2100 cell.....	64
Table 8. Purification of EPA by low temperature crystallization.....	74
Table 9. Fatty acid composition (%) of #2100 oil before and after urea crystallization.....	82
Table 10. Fatty acid composition of #3010 grown at different temperatures.....	92
Table 11. Distribution of Major Fatty acid in different lipid class in #2100 strain.....	97

그림 목 차

Figure 1. 해양생물로 부터 분리된 EPA 유도체들.....	32
Figure 2. EPA와 Arachidonic acid에서 유래된 Eicosonoids.....	33
Figure 3. #2778 and #3010 균주의 전자 현미경 사진 (a)과 Fatty acid Methyl ester의 Gas chromatogram (b).	48
Figure 4. #2100 균주의 지방산 메틸에스테르의 catalytic hydrogenation에 의한 이중결합들의 환원	49
Figure 5. #2778 균주의 지방산 조성 gas chromatogram	50
Figure 6. SCRC-2738과 #3010 균주의 지방산 조성 gas chromatogram의 비교.....	51
Figure 7. #2100 균주의 EPA 생산과 성장에 미치는 산소 분압의 영향	59
Figure 8. 균주를 접종하지 않은 HI media의 지방산 조성 (a)과 균주를 키운 후 균체를 제거한 media의 지방산 조성(b).....	61
Figure 9. 정상 HI 배지와 지방 성분이 제거된 HI 배지에서 #2100 균주의 성장과 EPA생산.....	62
Figure 10. #2100 균주를 회수한뒤 0.02 mg/ml의 archidonic acid를 첨가한 50 %의 숙성해수와 archidonic acid를 첨가하지 않은 50 %의 숙성해수에 현탁하여 6 시간 배양후 지방산 조성의 차이.....	63
Figure 11. Iodolactonization 법에 의한 EPA의 정제 과정.....	72

Figure 12. #2100 균주의 지방산 메틸에스테르의 Mercuric acetate adduct형성에 의한 EPA의 정제 결과.....	79
Figure 13. Urea 혼합 결정법에 의해 정제된 EPA-methyl ester시료의 Gas chromatogram	80
Figure 14. HPLC에 의한 EPA 시료의 미량 불순물의 제거.....	81
Figure 15. HPLC에 의한 linolenoyl CoA와 자유 CoA의 분리.....	90
Figure 16. #2100 균주의 acyl-CoA syntetase 활성에 의한 linolenoyl CoA의 형성.....	91
Figure 17. #2100 균주의 6-desaturase 활성도에 의한 linolenic acid로 부터 Octadecatetraenoic acid의 형성.....	93
Figure 18. Myristic acid의 농도에 따른 <i>V. harveyi</i> M-17의 <i>in vivo</i> 발광 강도의 Standard curve	98
Figure 19. #2100 균주의 PLA ₂ 에 의한 Dimyristoyl Phosphatidyl choline으로부터 Myristic acid의 형성.....	99
Figure 20. 0.1 g of #2100 균체에 함유된 PLA ₂ 활성도.....	100
Figure 21. 자체내 PLA ₂ 를 이용한 EPA생산 균주로부터의 EPA 분리 정제 과정.....	101
Figure 22. CoCl ₂ 처리후 soybean oil의 Gas chromatogram	107
Figure 23. Nonyl aldehyde 농도에 따른 생체 발광 강도의 Standard curve	108
Figure 24. AOAC peroxide titration method와 생체 발광을 이용한 산패도 측정법의 비교.....	109

List of Figures

- Figure 1. Structure of oxylipins isolated from marine organisms 32
- Figure 2. Eicosonoids metabolized from EPA and arachidonic acid. ... 33
- Figure 3. Electron microscope picture of #2778 and #3010 (a)
and gas chromatogram of fatty acid methyl ester 48
- Figure 4. Gas chromatogram of fatty acid methyl ester of #2100
before and after a catalytic hydrogenation. 49
- Figure 5. Gas chromatogram of fatty acid methyl ester
isolated from #2778 strain 50
- Figure 6. Comparison of gas chromatograms of fatty acid
methyl esters from SCRC-2738 and #3010 strain 51
- Figure 7. Effect of oxygen tension on the growth
and EPA production of #2100 strain. 59
- Figure 8. Gas chromatogram of fatty acid methyl ester of
Heart Infusion media without cell growing (a)
and with cell growing (b). 61
- Figure 9. The growth and EPA production of #2100 cell
in normal and delipidated Heart Infusion media. 62
- Figure 10. Gas chromatogram of fatty acid methyl ester of #2100
after harvest and washing, and incubation with 0.02 mg
of archidonic acid in 50 % aged sea water. 63
- Figure 11. Diagram of iodolactonization of EPA 72

Figure 12. Purification of EPA by mercuric acetate adduct formation from fatty acid methyl ester of #2100 cell.....	79
Figure 13. Gas chromatogram of EPA purified by urea crystallization.....	80
Figure 14. Final purification EPA using HPLC.....	81
Figure 15. HPLC chromatogram of acyl-CoA and free CoA.....	90
Figure 16. Production of linolenoyl CoA by acyl-CoA syntetase of #2100.....	91
Figure 17. Production of octadecatetraenoic acid from linolenic acid by 6-desaturase of #2100 cell.....	93
Figure 18. Standard curve of myristic acid concentration versus <i>in vivo</i> light intensity of <i>V. harveyi</i> M-17.....	98
Figure 19. Production of myristic acid from dimyristoyl phosphatidyl choline by PLA ₂ from #2100 cell.....	99
Figure 20. Activity of PLA ₂ obtained from 0.1 g of #2100 cell.....	100
Figure 21. Diagram of EPA purification from EPA producing bacteria using endogeneous PLA ₂	101
Figure 22. Gas chromatogram of CoCl ₂ treated soybean oil.....	107
Figure 23. Standard curve of nonyl aldehyde versus initial light intensity.....	108
Figure 24. Comparison of bioluminesent peroxide detection method and AOAC peroxide titration method.....	109

List of Abbreviation

ATP; Adenine triphosphate
AMP; Adenine monophosphate
EPA; Eicosapentaenoic acid (C20:5, n-3)
AA; Arachidonic acid (C20:4, n-6)
DHA; Docosahexaenoic acid (C22:6, n-3)
NADH; Reduced Nicotineamide Adenine Dinucleotide
NAD; Oxidized Nicotineamide Adenine Dinucleotide
FMNH₂; Reduced Flavin Mononucleotide
FMN; Oxidized Flavin Mononucleotide
PPi; Pyrophosphate
Co-A; Coenzyme A
Co-A-COR; Acyl coenzyme A
PLA₂ ; Phospholipase A₂
MA; Myristic acid (C14:0)
BL'ase; Bacterial luciferase

제 1 장. 총 론

제 1 절 연구 개발의 목적과 범위

현재 문명사회 인류의 주된 사망 원인으로서는 전쟁, 사고, 질병, 노쇠등을 들 수있는데 이들중 사망의 원인이 되는 질병은 고혈압, 동맥 경화, 뇌졸중, 심장질환등의 순환기 질병이 간질환, 암, AIDS, 전염병등보다 훨씬 많은 요인이 되고있다. 이러한 현상은 현대 의학의 발전에 따라 과거 주 사망 원인이었던 미생물 감염에 의한 질병의 예방 및 치료에 따른 평균 수명 연장으로 노령인구가 증가함으로써 노화된 생체 기관을 갖는 인구수의 증가에 따른 필연적 귀결이라 할수 있다.

이러한 관점에서 볼 때 Greenland Eskimo 에서 매우 낮은 빈도의 순환기 장애 발생을 주된 동물성 단백질 공급원으로서 주로 등푸른 생선을 섭취해 왔다는 사실과 결부시켜 등푸른 생선에 다량 포함되어 있는 n-3 계열 고도 불포화 지방산 (Polyunsaturated fatty acid, PUFA), 특히 EPA (Eicosapentaenoic acid)의 역할을 밝혀낸 Dyberg 등의 연구 결과는 주목할 만하다 (Bang et al., 1971; Bang and Dyberg, 1972; Dyberg and Bang, 1978; Dyberg et al., 1981). 즉, 추운 지방이므로 동물성 단백질 및 지방질이 다량 필요하나 이를 등푸른 생선으로 부터 주로 섭취하여 일반 육류를 주된 단백질 및 지방 공급원으로 이용해온 인근 유럽인에게서 순환기 장애가 주된 사망 원인을 대비하여 과연 생선의 무엇이 순환기 장애를 감소 시키는가 하는 흥미로운 문제를 제기시켰다. 조사 결과 Eskimo의 경우 순환기 장애의 주된 원인으로 지목되고 있는 cholesterol과 중성 지방 triglyceride의 혈액내 함량에서 혈액 100 ml 당 각각 233 mg과 57 mg인 반면 인접한 덴마크인의 경우 각각 273 mg과 129 mg으로 나타났고 지방성분중 지방산의 불포화도를 나타내는 P/S ratio (Polyunsaturated fatty acid/Saturated fatty

acid)가 Eskimo의 평균적인 식사에는 0.8인 반면 네덜란드인의 경우 25%에 불과한 0.2로 나타났으며 이결과는 그들의 일상 식생활과 밀접한 관련이 있음이 밝혀졌다 (Table 1).

Table 1. Percentage of Total Fatty acids by Types of Dietary Fat in Eskimo and Danish Diets.

Type of fat	% total fatty acids	
	Eskimos	Danes
saturated	22.8	52.7
Monounsaturated	57.3	34.6
Polyunsaturated	19.2	12.7
P/S ratio	0.8	0.2

연구 결과 Eskimo인들의 주된 지방 및 단백질원인 생선의 어유(魚油)에 많이 포함되어 있는 것으로 알려져 있는 고도 불포화 지방산중 Eicosapentaenoic acid (EPA) 나 Docosahexaenoic acid (DHA) 등 n-3 계열의 지방산들은 혈액내 지질감소, 혈전 용해, 관상동맥, 심장질환의 억제, 암세포의 선택적 파괴, 류머치스성 관절염 치료등의 효능을 보이고 있는 것으로 보고되었다 (Table 2). 이에 따라 어유로부터 n-3 계열 고도 불포화 지방산들을 추출, 정제하여 의약 및 건강 식품으로 개발하려는 시도가 선진 각국에서 이루어져 왔다. 어유로부터의 EPA 생산에는 정어리, 고등어, 청어 등의 등푸른 생선에 EPA 의 함량이 10 % 이

상으로 비교적 높고 화학적 합성 보다는 손쉽다는 장점, 또 어류가 전통적으로 많이 이용되어 온 식품이라는 점등에서 EPA 생산의 주된 원료로 사용되어 왔다.

Table 2. Reported Pharmacological Effects of EPA*

Anti-coagulation of platelets (thrombolysis)
Lowering of plasma triglyceride level
Lowering of VLDL and LDL-cholesterol
Increasing of HDL-cholesterol levels in Blood
Lowering of blood viscosity
Lowering of blood pressure
Anti-inflammation
Anti-tumorigenesis
Essential nutrient for marine animals

*: Kinsella et al., 1987

Lands et al., 1986.

그러나 어유로부터의 생산에는 다음과 같은 문제점들이 있는 데 우선 어종에 따른 어획시기에 영향을 크게 받으므로 원료 공급의 안정성이 결여 되어 있고 어획 장소로부터 EPA 생산 장소로 이동이 필요하므로 화학적으로 불안정한 EPA의 함량 유지를 위해 냉동 등의 특수 보관 및 이동 설비가 필요하며 어체 자체의 지방을 포함한 EPA 이외의 불순물이 다량 포함되어 있어 EPA의 분리, 정제에 많은 어려움이 있다.

그런데 어유에 포함된 EPA의 원천은 어류 자체가 다량의 EPA 를 생

산하는 경우는 거의 확인된 바 없고 먹이 사슬에 따라 소형 등푸른 어류의 먹이인 microalgae 등에 다량으로 함유된 EPA를 섭취한 것과 최근 들어 고등어, 정어리등 등푸른 생선들의 장내에 EPA 생산 균주가 서식하고 있는 것으로 밝혀져 (Yazawa, 1989) 이로 부터 EPA를 섭취하였을 가능성이 제시되었고 이러한 미생물들로부터 직접 EPA를 생산하고자 하는데 착안하게 되었다.

이에 따라 선진 제국의 미생물 유래 EPA 생산에 관한 연구는 우선 미국의 경우 Columbia의 Martek사, Michigan의 Henry Ford병원 등 대학과 Scripps 해양 연구소에서 microalgae를 이용 EPA 생산 과제를 수행 중이며 최고 생체량의 6% 까지 도달하였다고 보고되어 있다. 또 이스라엘은 국립해양연구소 및 대학 등에서 역시 Microalgae인 *Nannochloropsis* sp.를 이용하여 EPA 생산의 최적조건 연구중이다. 현재 연구 결과는 microalgae 건조 중량 1g 당 50-60 mg 정도이며 2주일 정도의 비교적 긴 배양 시간을 필요로하는 단점이 있으나 배양시 자연광 혹은 인공 조명을 이용하여 수득율을 증대시킬 수 있다는 장점도 있다. 그러나 전반적으로 microalgae로부터의 EPA생산은 그 배양 조건을 세밀하게 조절해 주어야 한다는 단점을 극복하지 못하고 있다. 일본은 Tosoh사 및 Sagami 화학 연구소, 해양연구소, Ibaraki 대학, Osaka 대학, 동경 대학 등에서 활발히 연구를 수행중이며 이중 Sagami 화학 연구소에서 등푸른 생선 장내세균 20,000 주 이상에서 EPA 생산 균주 500주 획득하였고 이 중 EPA 최고 생산 균주는 SCRC-2738 (*Shewanella putrefaciens*)로서 최적 배양 조건에서 1 당 300 mg 까지 생산하는 것으로 보고되어 있다 (Yazawa et al., 1992).

이러한 미생물에서의 EPA 생산은 어유에서의 추출에 비해 Fermentation등의 생물공학적 공정을 통해 공급원을 안정화 시킬 수 있으며 이에 따라 대량생산이 가능한 이점이 있다. 이는 채집 경제로부터 경작 경제로의 진보라는 개념으로 이해할 수 있다. 또한 Yazawa 등

에 의해 분리된 SCRC-2738 균주등의 경우와 같이 EPA 이외의 여타 고도 불포화 지방산이 매우 적게 함유되어 있어 미생물을 이용한 EPA생산방법은 어유에서의 추출에 비해 분리추출 공정이 손쉽다는 장점도 있다.

이외에도 특히 세균으로 부터의 EPA생산은 짧은 배양기간과 비교적 손쉬운 배양조건 확립도 큰 장점이라 하겠으며 균주 개량 및 생산 조건 개선등 개량의 여지가 많다. 또한 원핵생물인 bacteria의 유전자 조작은 그 genome 크기가 작으므로 genome 크기가 비교가 되지 않게 큰 어류나 algae등에서의 작업에 비해 훨씬 실현 가능성이 크다는 점도 장점으로 작용한다.

제 2 절 해양생물 유래 Eicosanoids

Eicosanoids라고 하는 것들은 육상 생물에서 시작된 것으로 특히 동물들의 체 지방성분중의 하나인 arachidonic acid와 이들의 유도체들을 통칭하는 말이다. Arachidonic acid는 잘 알려진 바와 같이 prostaglandin이나 leukotrien등 유사 hormon 화합물의 전구체로 포유 동물에서의 arachidonic acid의 산화대사는 signal transduction등 세포들의 정상 혹은 비정상 생리 현상을 조절하는 여러가지 다양한 구조와 기능의 대사 산물을 형성하게된다. 이러한 형태의 산화된 고도불포화지방산을 통칭하여 oxylipin이라하며 그 생성 대사과정은 3 종류의 효소들(cyclooxygenase, lipooxygenase, and cytochrome P450)에 의하여 시작된다. 이러한 경로의 생리학적 혹은 약학적 조절은 여러 종류의 질병들 (atherosclerosis, heart disease, cancer, psoriasis, ulcers and other inflammatory disorders)의 새로운 치료법의 가능성을 제시해 주고 있다.

많은 종류의 해양 생물들이 다양한 종류의 oxylipin을 함유하고 있다는 사실은 학문적인 관심이외에도 여러가지 이유에서 실제적인 유익을 가져 올수있다. 우선 많은 종류가 구조상으로 육상 포유류의 oxylipin

과 유사하면서도 고유의 특이한 구조를 갖고 있어 그 의약으로서의 개발 가능성이 높다. 즉, 구조유사체로서 옥상 oxylipin의 세포내 receptor나 생합성 과정을 밝히는데 직접 이용될 수 있다. 해양생물들에 의한 고도불포화지방산의 대사 과정을 밝힘으로써 해당되는 산화효소들의 반응기작에 관한 정보가 얻어지고 있으며 이러한 종류의 해양 생물 유래 효소들이 주요 의약품과 그 구조 유사체들의 새로운 생합성의 중요한 수단으로 이용되고 있다.

최초로 해양환경에서 발견된 oxylipin은 prostaglandin PGF_{2a}로서 Caribbean gorgonian coral *Plexaura homomalla* 에서 분리되었고 그 뒤로 여러종류의 coelentrates (soft and hard corals), sponges (해면), gastropods and crustacea, echinoderms (불가사리류와 성게종류), 그리고 cordates (tunicates and fish)등의 해양동물들로부터 구조적으로 특이한 여러 종류의 oxylipin들이 발견되었다. 해양동물들 뿐 아니라 해양 식물들 역시 고도불포화지방산을 oxylipins으로 전환시키고 있음은 1980년대에 들어 비로소 알려지기 시작했으며 특히 대서양에서 서식하는 조류의 일종인 *Laurencia hybrida*에서 hybridalactone의 발견이래 이 분야에 대한 연구가 활발하게 시작되었다. 그이래로 30 종 이상의 해양 조류(Cyanophyta, Rhodophyta, Phaeophyta, Chlorophyta)에서 oxylipin 화합물들이 발견되었다.

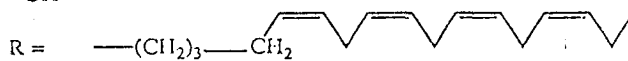
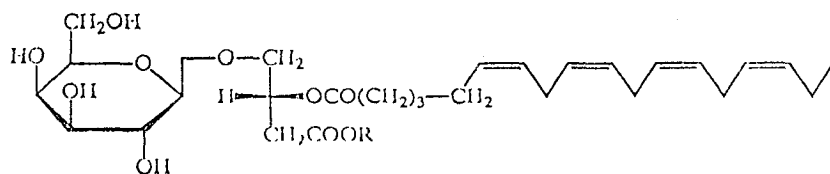
해양 유래 oxylipins에 관한 연구는 주로 algae에 집중되어 왔고 특히 초기 연구는 Oregon연안 해역에서 자라는 *Farlowia mollis* 에 관한 연구가 대부분이었다. 이 조류의 지방 추출물에는 3 종류의 di-hydroxy fatty acid가 매우 풍부하게 들어 있으며 그중 가장 주성분은 12R, 13S-dihydroxyeicosapentaenoic acid로 밝혀졌다. 이 oxylipin은 EPA로부터 12 번과 13 번 탄소에 산화가 일어난 형태로 이와 동일한 물질이 북태평양에서 발견되는 다른 종류의 red alga인 *Gracilariopsis lemaneiformis*에서 유리상태로 혹은 galactolipid에 부

착된 형태로 발견되었다. EPA로부터 이러한 13번 탄소에의 산화는 육사에서는 발견되지 않은 현상으로 性 Hormon인 progesterone의 세포내 농도 제어나 ion transport enzymes에 대한 저해 효과등 의약학적 의미가 높아 이 전한에 관여하는 효소에 대한 연구도 시행되고 있다.

해양의 부영양화의 결과로 야기되어 막대한 피해를 끼치고 있는 적조 현상의 주원인이되고 있는 조류의 일종인 *Heterosigma* 속의 조류에서 발견된 heterosigma glycolipid의 몇종류는 그 glycerol의 sn-2 위치에 octadecatetraenoic acid (18:4)를 그리고 sn-3 위치에 EPA를 함유하고 있다는 보고가 되어있으며 (Fig. 1a,b) *P. flava*등에서는 EPA의 lactone형태의 화합물이 발견되었고 (Fig. 1c,d, and e) diatome의 일종인 *Navicula detognei*는 Phytol group 에 acylation 된 EPA를 함유하고 있는 것이 밝혀졌다 (Fig. 1f). 이외에도 *Ptilota filicina*에서는 EPA의 이중결합 위치가 이동된 EPA 유도체가 발견되었는데 이들의 강력한 혈액 항응고효과도 함께 보고되었다 (Fig. 1g, h). 갈조류의 *Leiopathes*속에서는 EPA 혹은 EPA의 이중결합 (특히 C-10 위치)에 hydroxyl group이 치환된 oxylipin의 일종인 leiophathic acid가 발견되기도 하였다 (Fig. 1i,k). 또한 가리비에서 나타나는 패독의 하나인 okadaic acid의 경우 원래는 okadaic acid의 -OH group이 노출되어 있으나 가리비에 흡수된 뒤에는 EPA로 acylation 되어 가리비에 대한 독성이 중화되는 현상도 보고된 바가 있다.

이들의 정확한 역할에 관하여서는 확실히 알려진 것은 적으나 몇몇 종류는 육상에서 발견되는 eicosanoid들의 기능과 관련하여 유용한 생리활성을 보이고 있음이 판명되었다. 이는 인류를 비롯한 육상동물에서 arachidinoc acid에서 유래된 n-6 계열의 eicosanoids의 강력한 생리활성을 제어하는 역할을 수행하여 약리현상을 보이는 것으로 사료된다 (Fig. 2).

Figure 1. Structure of Oxylipins isolated from Marine organisms



heterosigma-glycolipid I (a) and II (b) (*Heterosigma* sp.)

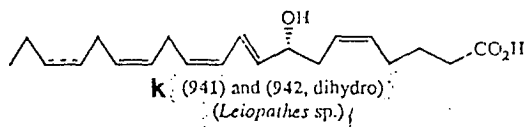
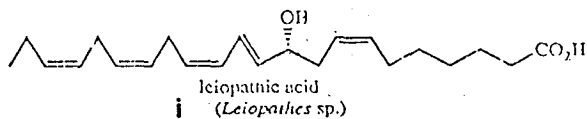
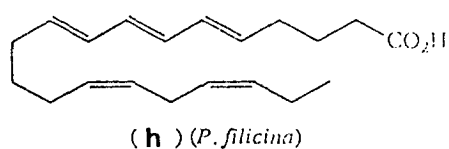
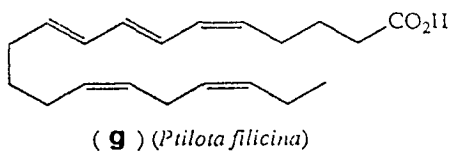
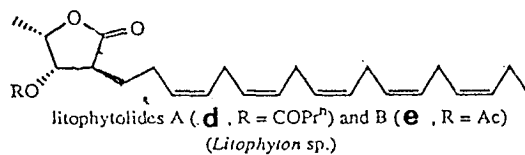
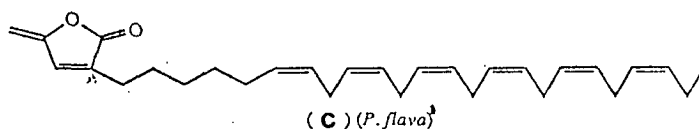
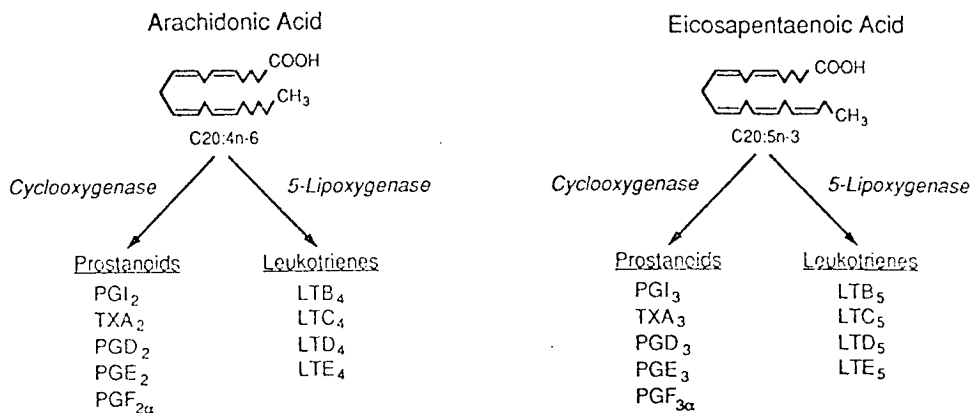


Figure 2. Eicosonoids metabolized from EPA and Arachidonic acid.



제 2 장. EPA 고생산 균주의 분리 및 동정

제 1 절. 서 론

미생물을 이용한 EPA생산에서 가장 중요한 것은 EPA를 다량 생산하는 미생물 균주를 확보하는 일이다. 제 1차 및 2 차 연구보고서에서도 언급했듯이 이러한 미생물 균주는 EPA를 다량 함유하고 있는 해양동물이나 식물들의 공생 세균들에서 탐색하는 것이 효율적으로 특히 아가미나 외피보다는 미생물의 대사물질이 쉽게 숙주에 의하여 흡수되는 창자에서 서식하는 미생물을 대상으로 하는 것이 효과적이다. 이러한 세균들은 순수분리와 이에 따른 순수 배양이 가능하므로 분리된 균주의 지방산 조성 및 여타 생리과정을 집중적으로 연구할 수있고 이에 따라 EPA와 같은 특정 종류의 지방산 생산을 효율적으로 공정화하기에 매우 유리하다. 어유로부터의 EPA 생산에 주로 이용되는 고등어나 정어리의 경우 그 구성 지방산의 종류가 70 여종에 이르고 있고 특히 EPA와 같은 탄소수를 갖는 arachidonic acids나 기타 불포화 지방산의 함량이 매우 높고 특히 탄소수 20 개 이상의 매우 긴 사슬을 갖는 지방산의 함량이 높아 EPA의 분리 정제에 많은 어려움이 있고 이에 따라 생산 단가가 높아지는 문제가 있다 (Iritani et al., 1980). 이를 위하여 본 연구가 시작된 1991 년 9월부터 1994 년 8월까지 국내 연근해 특히 동해를 중심으로 균주 분리를 수행하였고 이들을 대상으로 EPA생산 여부를 탐색하였다.

세균으로 부터의 EPA 생산은 EPA가 세균 세포막의 구성성분이므로 전체 EPA의 함량은 각 균주내의 지방산 조성에서 EPA가 차지하는 함량과 EPA를 생산하는 세균의 균체 (Biomass) 수득율에 직접 영향을 받는다. 즉 산업화를 목적으로 하는 EPA생산 후보 균주는 지방산 조성에서 EPA함량이 높아야하고 동시에 일반적인 배양 조건에서 높은 균체 수득율을 보여야 한다는 두가지 조건을 충족 시켜야한다는 점을 염두에 두고 탐색을

수행하였다. 이에 따라 혐기성 균주는 탐색 대상에서 제외하였고 배양 온도 20 °C 근처에서 최적 성장을 보이는 균주를 우선 대상으로 하였다.

제 2 절. 실험재료 및 방법

1. 균주 분리 및 보존

탐색 균주의 수집은 주로 어류를 비롯한 해양 동물들의 장내 물질을 균질화하여 평판 배지에 접종한 후 형성된 균체 집락을 의견에 따라 분리하여 순수 배양하는 방법을 사용하였고 그 구체적인 방법은 제 2 차년도 연구보고서에서 상세히 기술하였다.

2. Fatty Acid Methyl Ester의 제조

n-Hexane, acetyl chloride, chloroform, methanol, ethanol, diethylether, BHT (Butyl hydroxy toluene) 들은 Merck 사의 제품을 사용했으며 fatty acid 들과 fatty acid methyl ester 표준 시료는 Sigma Chemical Co. 의 제품을 사용하였다. 본 실험에 사용한 모든 용매에는 지방산 조성 분석을 위한 특별한 경우를 제외하고는 항산화제로서 50 - 100 mg/l 의 BHT 를 첨가하였으며 지방산의 methylation 에 사용된 methanolic HCl 의 제조는 acetyl chloride 30 ml을 4 °C 로 식힌 메틸알콜 300 ml에 천천히 부으면서 섞어 형성된 HCl이 메틸알콜에 용해된 용액을 제조하였다.

약 50 mg 가량의 대상 균체를 Eppendorf tube (2.2 ml) 에 들어있는 0.3 ml 의 methanolic HCl 에 옮긴 후 5 초간 Vortex로 흔들어 현탁 시킨다. 현탁된 시료를 55 °C 항온조에서 2 시간 동안 반응시켜

methylation 을 완결한 후 0.4 ml 의 5 % NaCl 용액과 1.5 ml 의 n-hexane 을 가한 후 30 초간 Vortex로 흔들어 형성된 fatty acid methyl ester 를 n-hexane 층으로 추출한다. 깨끗한 층 분리를 위하여 약 1 분간 15,000 rpm 에서 원심분리한 후 n-hexane 층을 pasteur pipet 을 사용하여 새로운 1.5 ml 들이 Eppendorf tube 로 옮긴 후 이를 40 °C 에서 Heto 사의 Speed-Vac 과 aspirator를 사용하여 시료 부피 를 약 0.1 ml 로 감압 농축시킨 후 지방산 조성을 박막 크로마토그래피 와 기체 크로마토그래피로 분석하였다.

EPA에 해당되는 기체 크로마토그래피상의 peak가 EPA인지 확인을 위하여 EPA의 모든 이중결합을 단일결합으로 환원시켜 arachidic acid (20:0)이 형성되는지를 catalytic hydrogenation으로 확인하였다. Septum으로 밀봉 가능한 1 ml들이 vial에 n-Hexane에 녹아있는 지방산 메틸에스테르 시료 0.2 ml에 PtO (platinum oxide) 0.1 mg을 가하고 수 소를 채워 흔들면서 10 분간 방치한 후 걸러서 PtO를 제거하고 기체 크 로마토그래피상에서 EPA peak가 arachidic acid (20:0) peak로의 전환 여부를 확인한다.

3. EPA 검색을 위한 박막 크로마토그래피 (Thin Layer Chromatography)

농축된 n-hexane 추출액 내의 EPA 검색을 일차로 박막 크로마토그 라피 (Thin Layer Chromatography, TLC) 를 사용하여 수행하였다. 사 용된 박막은 Merck 제품인 silica gel 60 F254 를 사용하여 위에서 준 비된 지방산 메틸에스테르 용액 약 10 μ l 의 시료를 점적하여 n-hexane 과 diethylether 의 9:1 혼합 액을 전개 용매로 사용하여 30 분간 전 개시켰다. 결과 검색은 전개 종료 후 박막 판을 말린 후 요오드 (I_2) 증기에 의한 지질의 착색법에 의한 검출하였다. 이 경우는 밀폐된 유리 상자안에 요오드 몇 조각을 넣어 방치하여 요오드 증기로 포화 시킨 후

전개 종료 후 말린 박막판을 넣고 방치하여 요오드가 지질에 짙은 갈색으로 착색되는 반점을 관찰하였다. EPA등 고도불포화 지방산은 포화지방산과 단일 불포화 지방산보다 짧은 전개거리에서 관찰되었다.

4. Gas Chromatography

EPA 이외의 여타 고도불포화 지방산들도 본 TLC 조건하에서는 동일 위치에 반점이 나타나므로 TLC 를 사용한 일차 검색의 결과 EPA methyl ester에 해당되는 위치에 전개 반점이 나타난 100 여 종의 시료를 대상으로 Gas chromatography를 사용하여 EPA 함유 여부를 확인 하였다. Hewlett-Packard gas chromatography (model HP5890IIA) 와 Hewlett-Packard integrator (HP3396A)를 사용했고 SP-2380 capillary column 을 사용하여 195 °C 에서 분리하였고 Flame Ionization Detector 로 검출하였고 carrier gas로는 고순도 질소를 사용하였다. Ultra-1 (Hewlett-Packard Co.) 또는 Omegawax 320 column (Supelco Co.)도 병행하여 사용하였으며 Gas chromatogram 에서 각 peak 는 ECL (Equivalence Chain Length) 값을 구하여 해당되는 fatty acid로 동정 하였다.

chromatography conditions

column head pressure : 7 psi

split ratio: 50:1

column temperature: 195 °C (isothermal mode)

injector temperature : 250 °C

detector temperature : 260 °C

Equivalent Chain Length (ECL)의 결정

Fatty acid의 동정을 ECL 값을 그 retention time 으로 부터 구하는 것은 한종류의 column을 사용하고 동일 조건에서 분석할때 가능한 것으로 여러개의 이중결합들을 갖고 있는 지방산의 분석에 유용한 방법이다. ECL 계산을 위한 표준 물질로는 tetradecanoic acid methyl ester (C14:0)와 hexadecanoic acid methyl ester (C16:0) 을 사용하였다. 그 계산식은 아래와 같다.

$$ECL = 14 + 2 \times \frac{\log(Rt_x - Rt_s) - \log(Rt_{14} - Rt_s)}{\log(Rt_{16} - Rt_s) - \log(Rt_{14} - Rt_s)}$$

Rt_x : Retention time of unknown peak

Rt_s : Retention time of solvent

Rt_{16} : Retention time of hexadecanoic acid methyl ester

Rt_{14} : Retention time of tetradecanoic acid methyl ester

5. EPA생산 균주의 동정을 위한 생리 생화학 실험

본 실험 내용에 관하여서는 제 2 차 년도 연구보고서에 상세히 기술 하였으므로 본 보고서에서는 생략하였다. 단지 DNA함유 [G+C](%) 분석은 HPLC를 사용하여 수행하였는데 그방법은 아래와 같다.

1) Chromosomal DNA 분리 및 [G+C](%) 결정

25 °C 에서 배양되어 plasmid DNA가 자연적으로 제거된 균체 약 20 mg 정도를 1.5 ml eppendorf tube 에 넣고 15 μ l lysozyme 용액 (2 mg/ml in 0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA, pH 8.0)를 가하여 잘 현탁한 후 37

°C 에서 cell lysis가 관찰될 때까지 10 분에서 20 분간 방치한다. Dry-ice/ethanol bath에서 급히 얼린후 여기에 다시 125 μ l 의 SDS (sodium dodecyl sulfate) 용액 (1 % SDS, 0.1 N NaCl, 0.1 M Tris-HCl, pH 9.0)을 가하여 천천히 녹인다. 다시 150 μ l 의 Tris buffer에 충만된 Phenol을 가하고 잘 섞어준 다음 4 °C 에서 3 분간 원심 분리하여 층을 나누고 DNA가 포함된 상층액을 취하여 300 μ l 의 95 % ethanol을 가한후 잘 섞어서 -70 °C 에서 30 분간 방치하여 DNA를 침전시킨다. 다시 4 °C 에서 3 분간 원심 분리하여 DNA pellet을 얻은 뒤 70 % Ethanol로 씻어 준후 DNA pellet을 0.1 ml의 0.1 X SSC buffer에 녹인후 20 X SSC buffer를 5 μ l 가하여 buffer strength를 조절하고 여기에 4 μ l의 DNase free RNase (2 mg/ml)를 가하여 37 °C 에서 30 분간 처리한뒤 phenol extraction하여 단백질을 제거한후 원심 분리하여 층을 나누고 다시 상층액만을 취하여 2 배 부피의 absolute ethanol 을 가하여 DNA를 침전시킨다. 4 °C 에서 10 분간 원심 분리하여 DNA를 얻은후 70 % Ethanol로 씻어 준후 50 μ l 의 Tris buffer 로 녹인다. 전기영동과 염색은 plasmid DNA 와 동일하게 수행하였다.

이들을 nelease로 분해한후 alkaline phosphatase로 인산기를 제거하여 nucleoside형태로 전환한뒤 이를 HPLC로 분석하였다. 사용한 용매는 0.6 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (pH 4.0)와 acetonitrile의 20:1 (v/v) 혼합액을 사용하였고 flow rate는 1 ml/min으로 설정하고 270 nm에서 검출하였다. 사용된 column은 Supegel ODS-RP (250 x 4.5 mm)를 사용하였다.

2) Menaquinone의 분리 및 동정

EPA의 생산능이 가장 우수한 균주중의 하나인 #1513균주 (*Aeromonas* spp)의 경우 Gram negative 균주임에도 불구하고 특이하게

Gram positive 균주 (e.g. Actinomycetes)에서 주로 발견되는 menaquinone이 발견되어 중요한 특징이 되므로 이 menaquinone의 특성을 조사하였다. 2 g의 균체에 영하 20 도로 식힌 acetone을 넣고 균질화한후에 2 분간 초음파로 균체를 분쇄하였다. 원심분리한후 여과하여 nitrogen gas로 용매를 제거한 후 silica gel TLC 판에 점적한후 전개용매로 benzene을 사용하여 전개하였다. Ubiquinone과 menaquinone 동정은 Vitamin K 표준시료와 전개거리로 확인하였다. Menaquinone의 표준시료를 구하기 위하여 몇몇 알려진 방선균으로부터 이들을 분리하였고 #1513균주로 부터도 분리하여 TLC로 정제한후 HPLC를 이용하여 분석하였다. 사용된 HPLC체계는 TSP사의 P1000 isocratic pump와 20 ul Reodyne injector, Variable detector로 구성되어 있으며 column은 Tohso Co.의 TSK gel-120T (0.4 X 150 mm)를 사용하였고 acetonitril:Methanol= 2:1을 용매로 사용하였다 (Itoh et al., 1985).

제 3 절 결 과

1) 균주 분리 및 동정

제 3 차 년도에서도 Gas chromatography에 의해 #2778, #3010 등 추가로 2 종의 균주를 EPA 다량 생산 균주로 확인하여 도합 5 종의 EPA 다량 생산 균주를 포함한 23 종의 EPA생산 균주를 확보하였다 (Table 3, Figure 3). EPA의 구조 확인 및 생리작용에 관하여서는 EPA (eicosapentaenoic acid) 가 신규 활성 물질이 아니라 이미 그 구조와 약리 작용이 잘 알려져 있는 상태이므로 본연구에서 미생물로 부터 분리된 물질의 EPA 여부를 우선 확인하였는데 여러 조건에서의 Thin layer chromatography 와 gas chromatography에서 Retention time 및

Equivalent chain length (ECL) 값이 표준 EPA와 동일하고 catalytic hydrogenation으로 이중결합을 환원시켰을 때 eicosanoic acid (C20:0) 로 전환됨을 gas chromatography로 확인하여 본 화합물을 EPA로 동정하였고 EPA의 이중 결합 위치와 그 configuration은 NMR로 확인하였다 (Fig. 4).

EPA 고 생산 균주로 추가로 밝혀진 B2778FI와 B3010FI 등 2 균주의 동정을 위하여 그 생리, 생화학적 특성을 조사하였다. Table 4에서 Gram 염색에서 음성이었고, 운동성을 갖고 있었으며, 형태학적 특성은 Rod form으로, 당의 이용 능력등 70 여 종의 생화학적 시험 결과 2종 모두 *Vibrionaceae* family에 속함을 알수 있었고 Vibriostat 시약인 0/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropyl pteridine) 검사 결과 음성으로 나타나 *Vibrionaceae* family의 4 종류의 속 (genera)중 이 반응에 양성인 *Vibrio* 속과 *Plesiomonas* 속이 아니었고 생체 발광현상을 보이지 않고 luciferase도 검출되지 않아 생체 발광 (Bioluminescence)의 특징을 갖고 있는 *Photobacterium* 속도 아님을 확인하여 본균주들은 *Aeromonas* 속으로 일차 동정하고 aesculin 가수분해, oxidation/fermentation test, oxidase, catalase test, ornithine decarboxylase 양성, lysine decarboxylase 양성, cystein 배지에서 hydrogen sulfide gas 형성, 특히 DNA의 [G+C](%)에서 약 57%의 [G+C](%) 값을 보임으로써 50% 미만인 여타 species와 다른 *Aeromonas* 속임을 알수 있었다. 그러나 비교균주로 사용된 *Aeromonas hydrophilla*와는 여러면에서 차이를 보여 이 species에 속하지 않음을 알수 있었다. #1513 균주에서 생산되는 menaquinone은 HPLC로 동정한 결과 MK8인 것으로 밝혀졌다.

[G+C](%) 값 결정에는 chromosomal DNA를 분리하여 온도 변화에 따른 denaturation에 따른 흡광도 변화의 관찰과 DNA를 각 nucleotide로 분해한뒤 phosphatase를 이용하여 nucleoside로 전환시켜 HPLC로

정량하는 방법을 병행하였다. 비교를 위한 대조 균주로는 *E. coli*, *Bacillus subtilis*, 일본에서 공여 받은 *Shewanella putrefaciens* SCRC-2738, 그리고 *Aeromonas hydrophilla* 등을 사용하였다. 전자 현미경으로 확인한 결과 2 균주 모두 peritrichous 형태의 flagella를 갖고 있으며 전반적으로 2 년차 보고서에서 보고된 3 종의 균주들과 유사한 성격을 지니고 있었으나 배양액의 점도를 상승시키는 세포의 다당류의 생산이 이들 두 균주에서는 거의 나타나지 않았다. (Table 4).

이점은 fermentor등에서의 대량 배양시 중요한 장점으로 #1513 균주등의 경우 균체의 30 % 가까운 양의 세포의 다당류를 생산하여 배양시 점도가 매우 높아져 농축배양시 교반에 문제가 있었으나 본 #2778 균주와 #3010 균주는 이러한 문제가 적을 것으로 사료된다.

특히 본 연구 기간중 분리된 #3010 균주는 현재 까지 연구된 균주중 최다 EPA 생산 균주로 전체 지방산 조성중 EPA가 최고 35 %로 함유 지방산중 두번째로 많은 palmitoleic acid의 18 % 를 2 배 가까이 상회하는 높은 생산성을 보였다. 이 것은 일본 Sagami연구소의 최다 EPA생산 균주인 SCRC-2738 보다도 우수한 것으로 사료된다. Fig. 5와 6에 SCRC-2738균주와 본 연구소의 #3010의 지방산 조성을 직접 보여주는 gas chromatogram을 비교하였다. 여기서 SCRC-2738의 GC spectrum은 본 연구진이 얻은것이 아니라 Sagami연구소측에서 발표용으로 논문이나 보고서에 항상 사용해온 가장 높은 EPA함량을 보이는 chromatogram이나 #3010의 chromatogram은 이보다 월등히 높은 EPA 함량을 보이고 있다.

Table 3. Isolation of marine bacteria and Screening of EPA Producing bacteria

시 간	장 소	분리균주수	EPA 생산 균주수
90. 3.	남극기지	71	ND
91. 9.	수산시장	272	1
91. 9.	군산수협	144	ND
91. 9.	서포어구	167	ND
91.10.	거문도	29	ND
91.11.	인 천	19	ND
91.10.	팜	143	ND
92. 2.	서 포	289	1
92. 2.	완 도	267	ND
92. 2.	강 룡	590	2
92. 4.	주문진	240	9
92. 6.	주문진	240	1
92. 7.	주문진	311	2
92. 8.	주문진	139	3
92.10 .	주문진	102	ND
92.12.	주문진	144	1
93. 5 .	주문진	82	2
93. 8.	주문진	44	1
94. 4.	주문진	56	ND
총	계	3372	23

Table 4. Basic characterization of EPA producing bacteria

	B2778FI	B3010FI
Colony color	Reddishbrown	Reddishbrown
Flagella type	Peritrichous	Peritrichous
Motility	+	+
Gram staining	-	-
[G+C] (%)	56	57
Growth at 4 °C	+	+
35 °C	-	-
Growth in % NaCl		
0 %	-	-
0.3 %	++	++
3 %	+	+
10 %	-	-
Brown pigment production	+	+
Growth Inhibition test		
O/129 test	-	-
Bile tolerance	+	+
Cetrimide tolerance	-	-
Potassium cyanide tolerance	+	+

Table 4. continued

Production of		
Oxidase	+	+
Catalase	+	+
Urease	-	-
DNase	-	-
Lipase	-	-
Lysin decarboxylase	-	-
ornithine decarboxylase	-	-
Phe. deaminase	-	-
Arg. dehydrolase	-	-
Carbohydrate metabolism		
O/F test	F	F
Methyl red test	-	-
ONPG test	-	-
Esculin hydrolysis	+	+
Starch/Amylase	+	+
Gas Production from		
Glucose	-	-
Arabinose	-	-
Mannitol	-	-
Xylose	-	-

Table 4. continue

Acid Production from		
Glucose	+	+
Fructose	+	-
Sorbitol	-	-
Arabinose	-	-
Galactose	+	+
Sucrose	-	+
Cellobinose	+	+
Mannitol	-	-
Lactose	-	-
p-Hydroxy benzoate	+	-
Gluonate	+	-
Lactate	+	-
Indole utilization	-	-
Citrate utilization	-	-
Gelatine hydrolysis	+	+
H ₂ S production	+	+
production of extracellular polysaccharide	-	-

Figure 3. Electron microscope picture of #2778 and #3010



Figure 4. Gas chromatogram of fatty acid methyl ester of #2100 before (A) and after (B) catalytic hydrogenation.

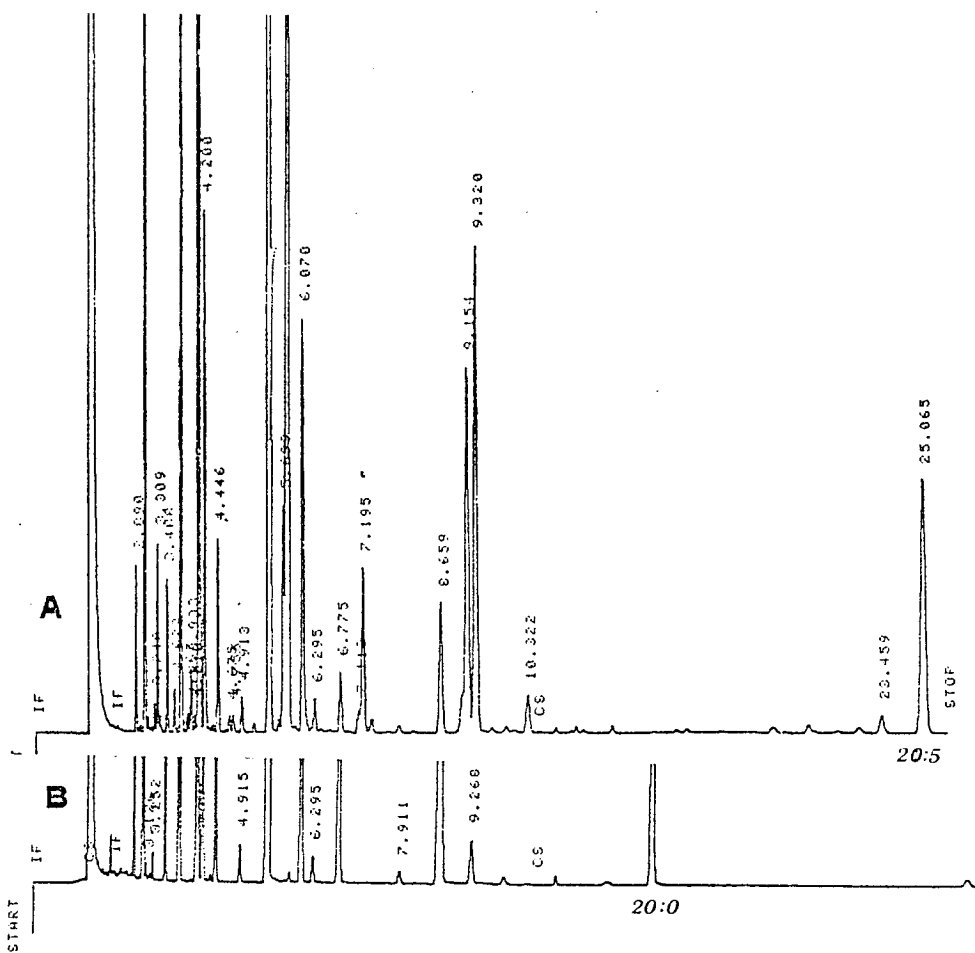


Figure 5. Gas chromatogram of fatty acid methyl esters isolated from #2778 strain

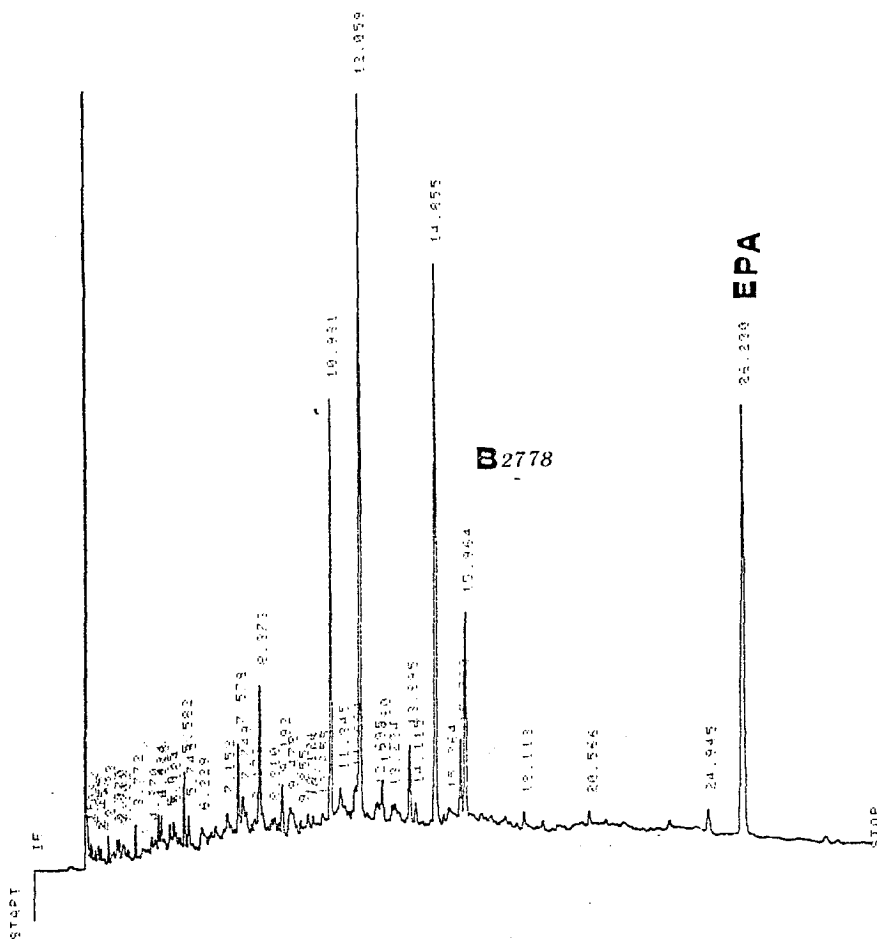
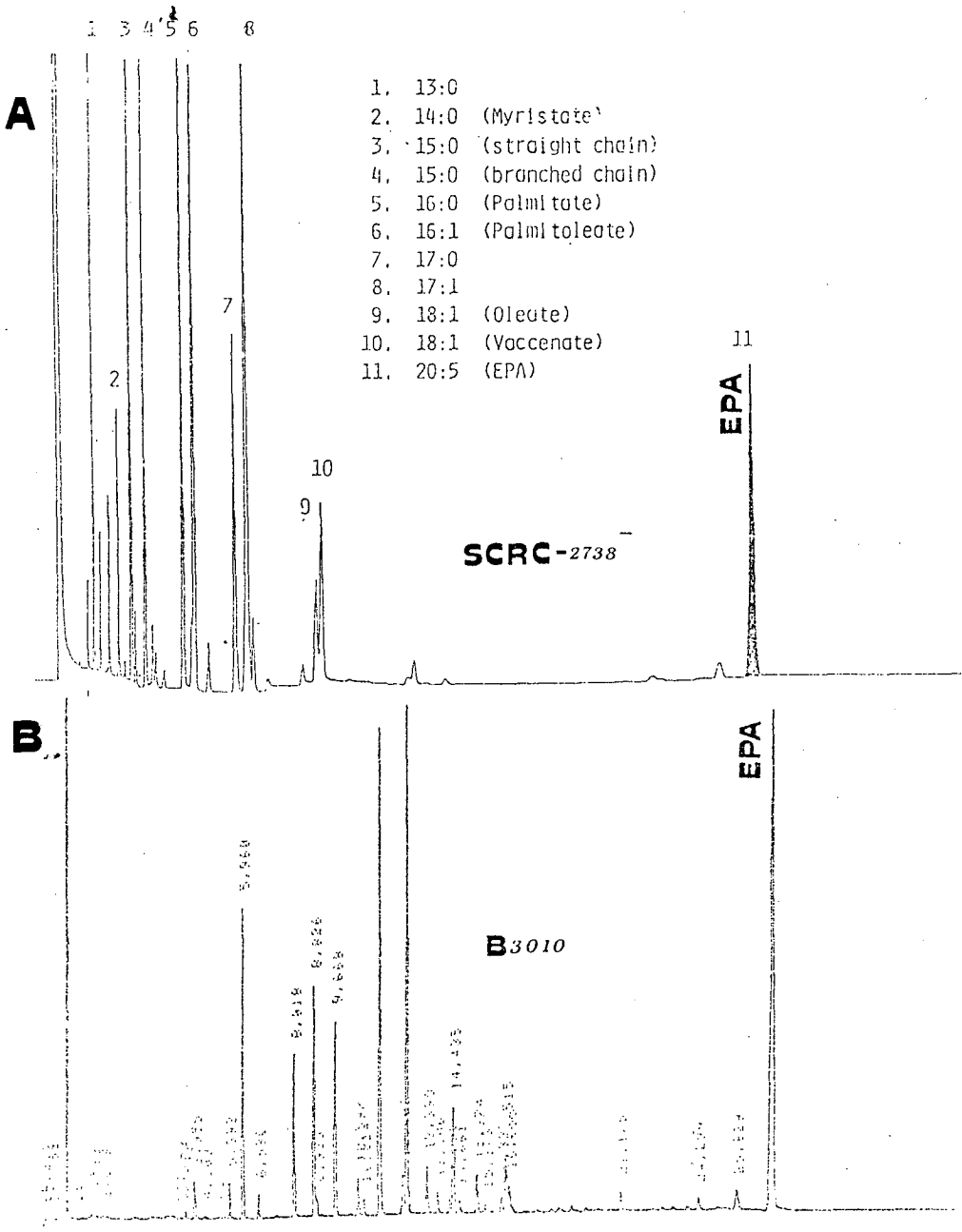


Figure 6. Comparison of gas chromatograms of fatty acid methyl esters from SCRC-2738 (A) of Japan and #3010 strain (B)



2) EPA 함량 증대

세균에서의 지방산은 거의 모두가 세포막의 구성 성분으로 존재하고 저장성 지방의 함량은 거의 존재하지 않는다. 따라서 본 연구에서와 같이 미생물로부터 EPA를 생산하는 경우에는 세포막의 구성 성분에 영향을 주는 모든 조건을 조사하여 이들이 EPA함량에 끼치는 영향을 연구할 필요가 있다. 이러한 것들로써 대표적으로 온도에 의한 영향을 생각할 수 있으며 이와 아울러 2 가 양이온의 영향, pH등 물리 화학적 효과를 지난해 연구에서 고찰 하였다. 본 연구에서는 이와 더불어 압력, 고농도 산소, 유기 용매에 의한 영향도 고찰하고자 하였다. 이와 동시에 Biomass의 증대를 꾀하는 방법도 병행하였다.

1. 압력의 영향

본 연구에서 발견된 EPA생산 세균들은 해양 동물들의 장내 서식 세균들로서 상주 조건이 저온, 고압 (100 m 깊이의 경우 10 기압) 상태이므로 이에 따른 압력의 영향도 조사하였다. 실제로 여러종류의 해양미생물들이 배양 압력차에 의하여 세포막 구성 지방산의 조성이 변화하는 현상이 보고된바 있다 (DeLong et al., 1985; Wirsen et al., 1987). 10 psi 정도의 저압은 밀봉시킨 압력솥을 사용하였고 이보다 높은 고압 조건은 본 해양연구소 기기실의 심해용 기장비 검교정에 사용되는 압력실에서 HI media를 함유한 agar plate에서 배양하였는데 액체 배지를 이용한 실험은 교반에 어려움이 있어 불가능하였다. 실험결과 압력에 기인한 지방산 조성의 변화는 뚜렷이 나타나 고압에서는 16:1의 함량이 25 %에서 16 %로 감소한 반면 isopentadecanoic acid (i-15:0)의 함량이 크게 증가하여 미량에서 9 % 까지 상승하였고 EPA의 함량은 14 %에서 8 %로 오히려 감소하였다 (Table 5). 이는 고압배양조건에서는 세포

막의 구성지방산의 불포화도가 감소하는 현상으로 압력에 견디기 위하여 세포막의 강도를 증대시키려는 적응으로 해석된다.

2. 고농도 산소의 영향

미생물 발효 공정에서 중요한 것 중의 하나가 주어진 부피의 배지에서 가능한 한 높은 균체 회수를 들 수 있는데 대개의 경우 균체 농도가 높아지면 산소 공급이 원활하지 않아 성장이 저해되는 것을 볼수 있다.

이러한 문제점을 해결하기 위하여 대장균의 경우 100 % 산소 하에서 소형 발효조에서 liter 당 125 g 이상의 높은 균체 성장을 얻어낸 결과가 보고되어 있다 (Mori et al., 1979). EPA생성 균주들의 성장과 EPA 생산에는 산소의 원활한 공급이 필수적으로 나타났는데 (2 년차 연구 보고서) 이 것은 균체배양에서 미묘한 문제로 산소의 분압이 높아지면 이에 따라 EPA와 같은 고도불포화 지방산의 산화가 촉진되는 문제가 있다. 실제로 100 % 산소하에서 성장한 균체의 경우 그 성장이 다소 저해되었으며 EPA함량에서 거의 절반이하로 떨어지는 현상이 발견되었다 (Fig. 7). 결국 최적 성장 조건은 공기를 빠른 flow rate로 공급하는 방법이 최선이라고 사료되며 이것이 산소 함량이 높은 혼합 기체를 공급하는 것보다 효과적이라고 여겨진다.

3. 수용성 유기용매의 영향

수용성 유기 용매의 세포막 구성에 미치는 영향 역시 고려되었는데 대표적인 것이 Ethyl alcohol로서 1.6 % Ethyl alcohol 존재하에서 *Tetrahymena pyriformis* 의 인지질내의 hexadecenoic acid (16:1, 16:2) 함량이 23 % 에서 5 % 로 감소한 반면 linoleic acid의 경우 14

%에서 25 %로 증가한 결과를 발견하였다 (Nandini-Kidhore et al., 1979). 본 EPA생산 균주들에 미치는 유기용매의 효과를 알아보기 위하여 methanol 과 ethanol의 영향을 실험하였다. 사용된 유기 용매중 가장 두드러진 효과를 보인것은 1 % (V/V) methanol로서 유기 용매를 첨가하지 않은 대조균주의 경우 약 14 %의 EPA함량을 보인데 반해 약 27 %의 EPA를 함유하고 있었으며 1 % 이상의 methanol에서는 그 함량이 급격히 감소하였다. 1 % (V/V)의 ethanol을 함유한 배지의 경우는 이 보다 크게 떨어져 약 9 % 정도의 함량을 보였다 (Table 6). EPA이외에도 methanol 함유 배지에서는 palmitoleic acid (16:1)의 함량이 다소 감소하는 경향을 보이고 있었고 EPA의 직접 전구체로 사료되는 20:4(n-3)의 함량이 약간 증가하였다. 반면 ethanol에서는 palmitic acid와 palmitoleic acid의 함량이 크게 증가하였고 EPA의 전구물질의 함량이 감소하여 EPA생산 체계의 가동이 둔화되었음을 알수 있었다. 또 하나 특기할 사실은 유기 용매존재하에서는 일반 배양시에 항상 검출되는 iso- 또는 anteiso-form의 지방산의 함량이 크게 감소하여 methanol의 경우 거의 검출되지 않았다. 이는 산업적으로 EPA를 생산하고자 할 때 그 수율등 경제성을 크게 높일수있는 효과가 기대되며 특히 1 % 정도의 methanol이 배지에 함유될 경우 그 배지의 surface tension이 감소하므로 Fermentator등을 이용하여 대량 배양시 거품의 형성이 크게 감소하여 균체의 성장에 저해요인으로 작용하는 antifoam의 사용을 줄일 수 있다는 장점도 있다. 또한 학술적으로도 수용성 유기용매에 의하여 세포막의 구성 지방산의 조성에 미치는 영향을 규명하는데 중요한 단서가 될수 있으리라고 사료된다.

4. Heart infusion 배지의 영향

제 2 년차 연구보고서에서 보고한 바와 같이 본 EPA생산 균주들의

EPA생산 능력은 heart infusion media에서 매우 높은 값을 보였다. 이 Heart infusion media 에서 EPA생산을 촉진하는 성분을 찾기위하여 media의 성분을 분석하였다. 제 2 년차 연구보고서에서는 주로 수용성 성분의 영향을 조사하였는데 EPA생산에 뚜렷한 영향을 미치는 요소를 찾지 못하였다. 본연구에서는 지용성 성분의 영향을 분석하였는데 우선 EPA의 전구체로 이용될 수있는 지방산의 조성을 분석하였는데 HI broth 200 ml를 균주를 접종하지 않은 대조구와 균주를 접종한 비교구로 나누어 48 시간 배양후 Folch 용액으로 추출하여 그 지방산 조성을 분석하였다. Figure 8A 에서 HI broth에서는 linoleic acid (18:2) 가 10 % 그리고 arachidonic acid(20:4)가 약 15 % 정도 함유된 것으로 나타났는데 균주를 배양하여 균체를 제거하고 그 조성을 분석하였을 경우 이 두종류의 지방산이 각각 1.5 % 와 0.9 %로 감소된 사실을 확인하였고 EPA가 약 1 %정도 검출되었다 (Fig. 8B). 배양된 균체에서의 지방산 조성에서는 Fig. 4 나 Fig. 6에서 보듯이 arachidonic acid가 미량으로 존재하여 배지에 원래 함유되었던 arachidonic acid가 거의 90 %이상이 배양된 균주에 의해 이용되어 사라졌음을 알수있다.

배양액내의 EPA는 배양도중 일부 파괴된 균체에서 유리된 것으로 사료되며 arachidonic acid의 소멸은 균체의 성장에 따라 흡수된 후 분해되어 이용되었을 가능성이 있고 아울러 arachidonic acid (20:4, n-6)가 흡수된 후 분해되지 않고 직접 EPA (20:5, n-3)로 전환되었을 가능성도 있다. 왜냐하면 arachidonic acid (20:4, n-6)로 부터 EPA (20:5, n-3)로의 전환은 간단히 17번과 18번 탄소 사이에 desaturase에 의하여 1 개의 2 중결합이 도입되면 가능하기 때문이다 (Gellerman and Schlenk, 1979). 이러한 사실은 EPA생산 균주에서 미량의 arachidonic acid가 균체를 여러차례 세척하여도 미량이나마 항상 검출된다는 사실과 연관지어 arachidonic acid가 EPA생산에 관여하리라고 여겨지게한다.

준비된 HI 배지에서 지방 성분을 제거한 배지를 제조하여 균체의

성장과 EPA생산을 비교한 결과 지방성분이 제거된 배지에서는 균체의 성장과 EPA함량이 대조구에 비하여 약 50 % 수준에 머물러 실제로 HI 배지에서의 성장에는 소심장 추출물이나 tryptose에 함유된 지방성분 특히 arachidonic acid의 역할이 중요하다는 가능성을 시사해 주고 있다 (Figure 9).

이러한 활성을 *in vivo* 조건에서 확인하기 위하여 HI 배지에서 배양한 균체 0.2 g을 50 %의 멸균된 숙성해수 2 ml에 현탁한 후 1 ml 씩 나누어 한쪽은 20 μ l의 methanol을 control로 가하고 (Fig. 10A) 다른 한쪽은 20 μ l의 methanol에 녹인 0.02 mg의 archidonic acid를 가하여 18 °C에서 6 시간 동안 추가 배양하여 균체에 함유된 지방산의 조성을 분석한 결과 arachidonic acid 첨가 시료에서 EPA의 함량이 약 70 % 정도 증가하였음을 확인하였다 (Fig. 10B). 동시에 첨가되었던 arachidonic acid는 상당량 균체에 의해 흡수되었음도 조성 지방산 함량에서 확인 가능하였다. 이 결과는 20:4(n-6)에서 20:5(n-3)를 형성하는 17-desaturase의 존재를 시사해주고 있다.

Δ 17-desaturase

Arachidonic acid (C20:4, n-6) -----> EPA (C20:5, n-3)

이러한 n-6 계열의 지방산이 n-3 계열로 전환되는 효소체계는 아직 식물이나 동물에서는 보고된 바가 없으며 미생물의 경우는 연구가 시도된 바가 없는 실정이다. 보통 oleic acid (18:1, n-9)을 시발점으로 할 때 식물에서는 linoleic acid (18:2, n-6) 그리고 linolenic acid (18:3, n-3)까지 n-terminal 쪽으로 이중결합을 도입하는 desaturase등이 보고된 바가 있고 동물에서는 이러한 계열의 desaturase대신 carboxy terminal 쪽으로 desaturation을 진행시키는 것으로 알려져 있다. 4-desaturase가 본 균주에서 확인되었으므로 이 17-desaturase 활동도를 검색하기 위하여 arachidonyl Co-A를 기질로 하여 실험을 수행하였으나 조효소내에 함유된 세포지방을 완전히 제거할수가 없어 가스크로마토그래프상에서 나타

난 EPA가 세포지방에 의한 것인지 arachidonyl Co-A으로 부터 17-desaturase에 의하여 생성된 것인지 확인이 어려웠다. 본 desaturase들은 모두 세포막 부착 효소이거나 세포막에 연계된 효소로 사료되는데 지방을 함유한 조효소상태에서 지방성분을 제거하면 그 활성도가 사라져 추가 정제는 곤란하였다.

5. 탄소원에 따른 영향

본 EPA생산 균주는 HI 배지에서의 배양시 pH가 급격히 상승하여 pH 8.5 근처에서 안정화되는 현상을 보인다. 이는 HI배지의 사용시 비교적 낮은 C/N ratio에 의해 배지내에 다량의 유리 NH_4^+ ion이 축적되기 때문인 것으로 사료되어 이를 제어하고 탄소원을 공급하기위해 여러 종류의 당을 탄소원으로 공급하여 그 성장 및 EPA함량, 그리고 pH에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 거의 모든종류의 당에서 성장 촉진이 나타났는데 특히 cellobiose와 glucose에서 좋은 효과를 보여 이중 비교적 가격이 저렴한 glucose를 5 % (W/V) 첨가하여 배양하는 것이 효과적으로 사료된다 (Table 7).

6. 온도의 영향

대량 배양시 얻어진 균체의 양에서 최대의 EPA를 얻기 위하여 저온처리하여 그 함량을 증대 시킬수있다. 즉 20 °C에서 균체를 우선 성장 시킨 후 8 °C로 배지 온도를 저하시켜 12 시간 추가 배양시키면 EPA의 함량이 2 배이상 증가 시킬수 있다. 그러나 대량 배양시는 온도를 이렇게 낮추는 것은 비용이 대단히 많이 소요되므로 경제성을 고려할때 실제 응용가능성은 낮다고 사료된다.

Table 5. Fatty acid composition of #2100 grown at different pressure.

Fatty acid	control	10 psi	100 psi
i-13:0	2.25	3.79	3.10
13:0	0.26	0.50	10.08
14:0	1.32	2.29	2.35
i-15:0	0.79	3.56	9.70
a-15:0			21.12
15:0	3.12	6.15	2.47
a-16:0	0.07	0.13	0.14
16:0	8.02	9.47	8.11
16:1(n-9)	25.14	19.22	16.96
a-17:0			2.89
17:0			3.31
a-17:1	1.28	1.71	
17:1	2.82		
i-18:0		0.19	0.11
a-18:0		0.31	1.43
18:0	1.82	1.40	
18:1(n-11)	0.86	1.07	
18:1(n-9)	3.85	2.91	
20:5(n-3)	14.01	11.53	7.96
others	6.57	8.44	10.27

Figure 7. Effect of Oxygen tension on the growth and EPA production of #3010 strain. 50, 100, 150 and 200 ml of media were put into each 300 ml culture flask and incubated with shaking (rpm = 150), and the maximum cell density and EPA content were determined.

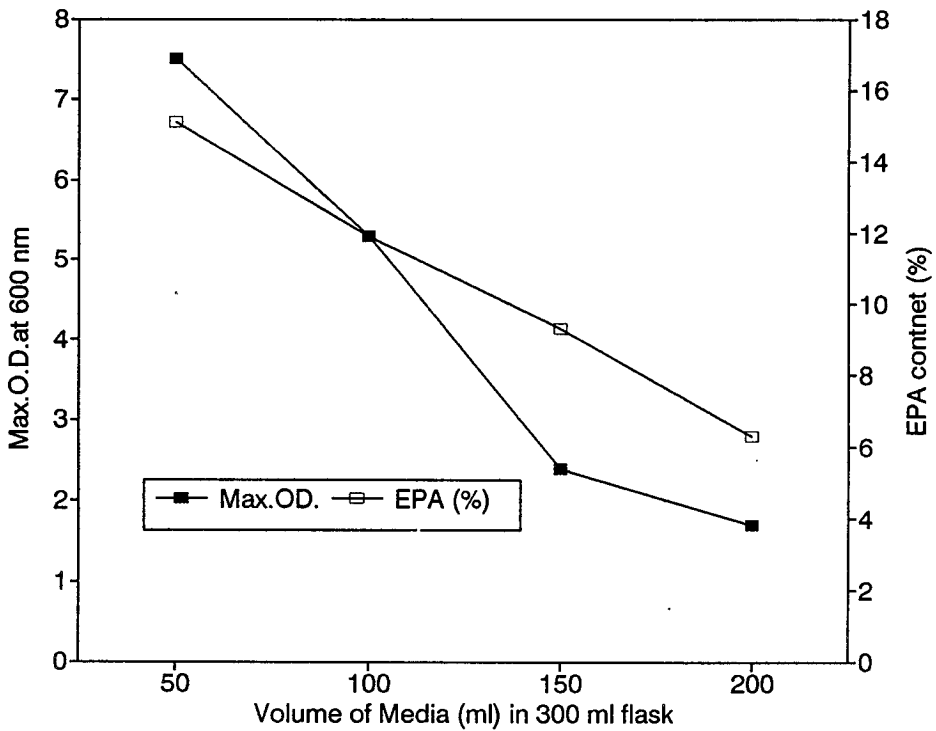


Table 6. Effects of water soluble organic solvents on the Fatty acid composition and EPA production of #2100 cell.

Fatty acid	control	Methanol(1 %)	Ethanol(1 %)
12:0	4.66	0.33	1.43
i-13:0	5.07	ND	5.88
13:0	6.21	2.84	5.95
14:0	5.06	3.55	3.99
15:0	5.64	2.71	4.28
16:0	16.71	16.53	19.21
16:1(n-9)	21.70	19.59	29.38
18:0	2.44	4.24	4.80
18:1	4.11	11.38	6.02
18:2	8.07	9.95	5.58
20:4(n-3)	1.04	1.43	0.40
20:5(n-3)	14.61	27.39	9.17
others	4.68	0.06	3.81

Figure 8. Gas chromatogram of fatty acid methyl ester of Heart Infusion media without cell growing (a) and with cell growing (b).

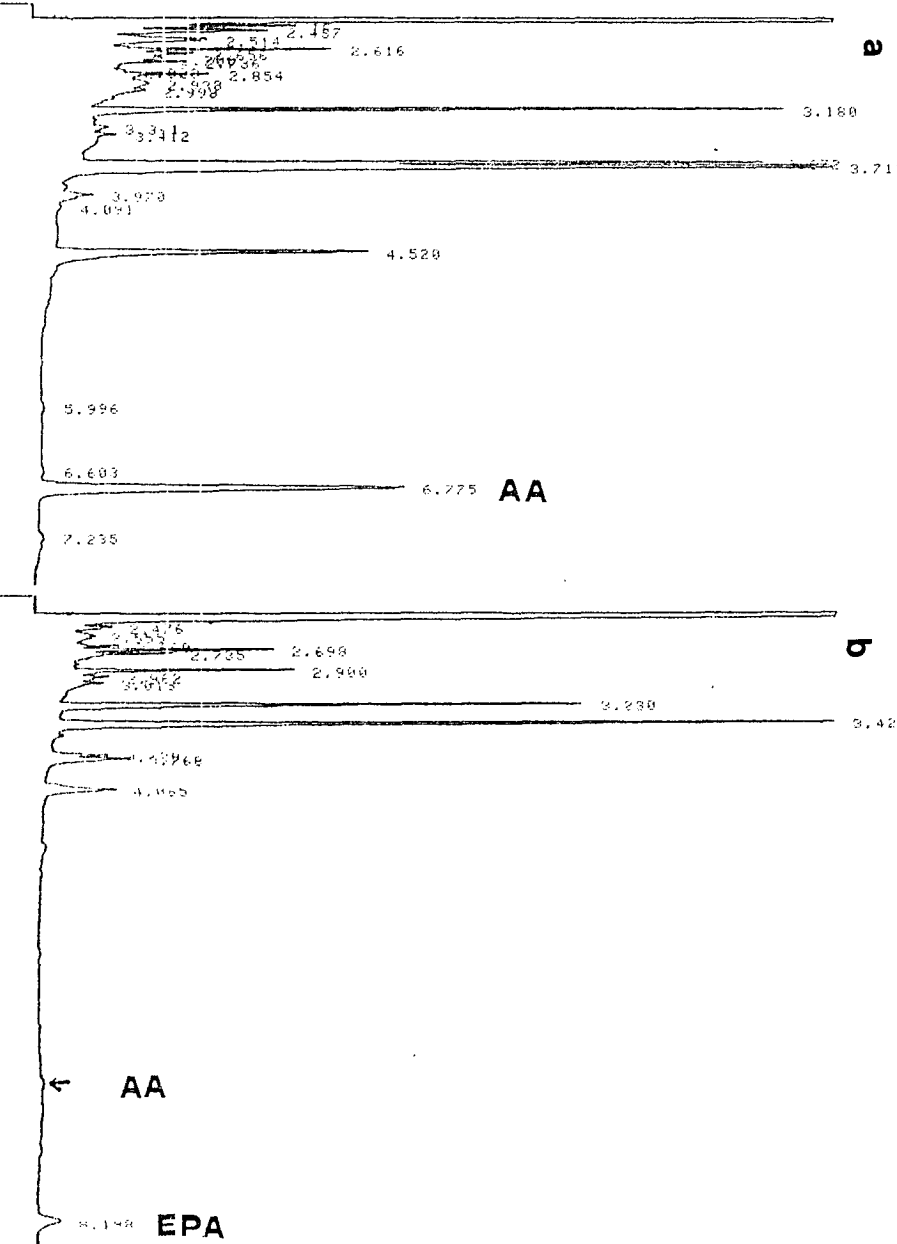


Figure 9. The growth (A) and EPA production (B) of #2100 cell in normal and delipidated Heart Infusion media.

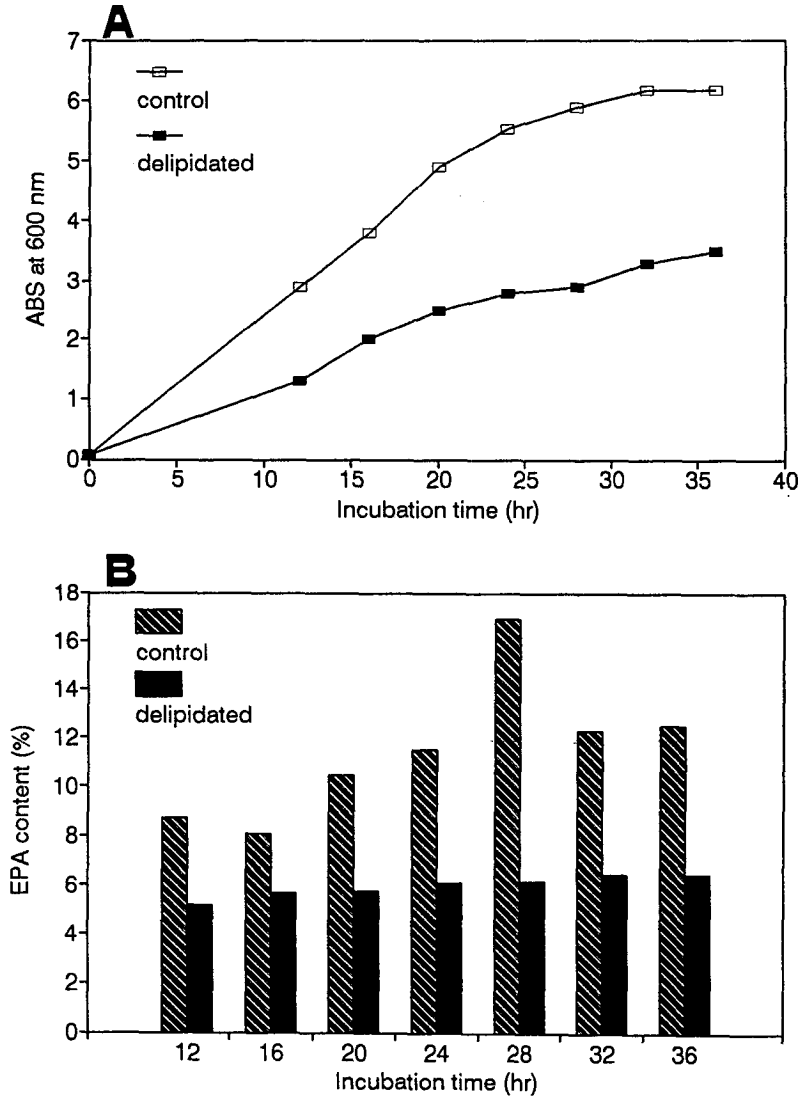


Figure 10. Gas chromatogram of Fatty acid Methyl ester of #2100 after harvest and washing, and incubation with 0.02 mg of arachidonic acid in 50 % Aged Sea Water.

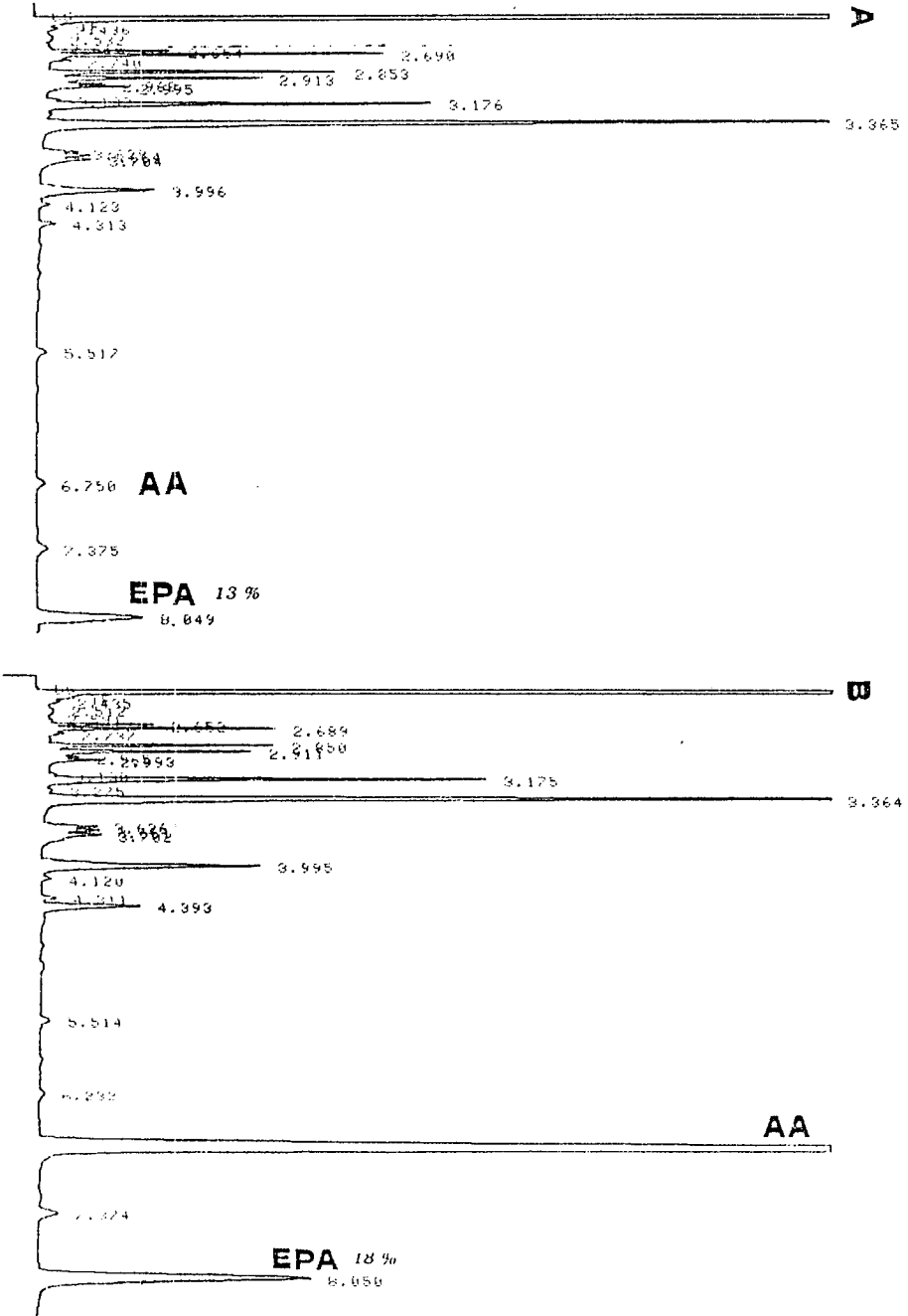


Table 7. Effect of sugar on the growth and EPA production of #2100 cell.

Sugars Included		Incubation time		
		18 hr	24 hr	32 hr
ABS (600 nm)	(5 %)			
	Control	5.53	5.89	6.17
	Glucose	5.25	6.08	6.44
	Galactose	4.3	5.23	5.83
	Cellobinose	5.92	7.16	7.52
	Fructose	4.96	5.46	5.74
EPA (%)				
	Control	11.52	10.91	8.7
	Glucose	7.06	9.47	8.2
	Galactose	5.82	5.43	4.33
	Cellobinose	9.1	7.87	9.31
	Fructose	2.39	7.77	4.81

제 4 절 고찰

보통 어유 추출물 혹은 농축어유등의 이름으로 시판되고 있는 고도 불포화 지방산 화합물은 그 주요 성분이 eicosapentaenoic acid (EPA) 이거나 docosahexaenoic acid (DHA), 또는 스쿠알렌등이며 그 수요는 급격히 증가하여 1992 년 현재 국내에서의 판매량은 540억원에 달하는 것으로 집계되었다. 국내에서 본 제품에 대한 수요는 생활 환경의 개선에 따라 건강 보건에 대한 관심이 높아진 결과로 특히 식생활의 서구화에 따른 육류섭취의 증가로 선진국형 성인병인 순환기 계통의 장애가 국민의 주요 사망원인으로 등장하고 있는 것과 맥락을 같이하고 있다.

이에 따라 원양어업을 주업으로하던 동원산업 (주)에서 참치의 DHA 성분을 강조하며 참치횃집의 체인화에 성공했으며 동원IQ라는 상표명으로 고품질의 참치 통조림을 시판하고 있다. 역시 유사업체인 사조산업에서도 비슷한 시기에 동일한 형태의 제품을 시판하고 있으며 매일유업에서는 모유에는 함유되어있으나 일반 분유에는 전혀들어 있지않은 DHA 를 분유에 70 mg/100g정도 (회사측 주장) 첨가한 맘마 오메가 1,2,3을 시판 호응을 얻고 있다. 이외에도 건강보조 식품 판매회사인 한일 인삼과 태웅식품등이 고려합성 연구소에서 생산하는 DHA를 받아 건강보조 식품으로 판매량을 늘리고 있다. 최근에는 우방(주)와 남양유업이 어류 분말을 사료로 가공하여 젖소에 제공하여 DHA가 함유된 우유를 생산하였다고 보고한바 있고 “아인슈타인”이라는 상표명으로 94년 9월 부터 시판하고 있다. 본제품의 경우 DHA 함량은 최고 0.2 %정도로 매우 낮으나 모유에 근접하는 영양소 함량을 얻어내고자 함에 의미를 찾을수 있다고 하겠다.

본 연구의 결과 확보된 EPA생산 해양미생물들은 체지방의 주요성분으로서 EPA를 생산하여 이들이 향후 어유로부터의 EPA생산을 대체할수 있는 가능성을 제공하였다. 이와 아울러 본 균주들의 특이한 지방산

조성은 EPA를 거의 유일한 고도불포화 지방산으로 함유하고 있어 나머지 포화 지방산이나 단일 불포화지방산들로부터의 분리정제가 대량생산에 적합한 저렴한 비용의 공정을 통하여 대량 생산을 꾀할수 있다는 커다란 잇점도 갖고있어 산업적 EPA의 대량생산의 궁극적 수단이되리라고 여겨진다. 이러한 해양미생물로부터의 EPA생산에 관한 연구는 본 연구이후 국내에서의 유사 연구의 촉진제가 되어 미원 (주)에서는 해양 미세조류를 이용하여 DHA를 생산하고자 연구중이며 (김 등, 1994) 강원대의 발효공학과에서도 EPA를 생산하는 해양세균을 발견 1994년 봄 한국 산업미생물학회에서 발표(홍 등, 1994)한 바 있는등 학계와 산업계에서 해양생물 유래 고도불포화 지방산의 생산에 관한 연구가 시작되고 있으며 이러한 경향은 해양생물공학의 발전과 함께 그 속도를 더해갈 것으로 기대된다.

제 3 장 EPA의 분리 정제

제 1 절 서 론

EPA생산 미생물의 발견 못지않게 중요한 것이 EPA의 순수 분리 공정이다. 이는 산업적인 대량생산에서의 생산비용에 미치는 영향이 크기 때문에 얼마나 효율적인 분리 정제 작업이 가능한가에 따라 본 미생물 유래 EPA의 산업성이 결정된다고 할수있다. 현재 건강 보조식품 등으로 생산 시판되고 있는 대다수의 제품들이 EPA의 실제 함량은 거의 20 - 30 % 수준으로 불순물이 다량 함유되어 있는 실정이며 이는 어유에서의 EPA분리 정제가 대단히 어려운 작업이므로 어유 자체의 가격은 대단히 저렴하나 분리 정제에 많은 비용이 소요되어 최종 제품 가격 상승의 주된 이유가 되고 있다. 실제로 어유에는 40 - 70 여종의 지방산이 존재하며 이는 어유 자체의 지방산 뿐만아니라 먹이로 섭취된 동식물의 지방산 그리고 장내에 서식하고 있는 미생물들의 지방산등이 함께 추출되어 나오므로 피할수 없는 현상이다. 또한 EPA와 구조나 지방산 길이등이 유사한 불포화 지방산이나 그 metabolic products들도 포함되므로 이들의 제거가 큰 문제가 되어 왔다. 이러한 정제상의 어려움으로 인하여 Super critical extraction (SFE) 등의 방법을 사용하여 90 % 정도의 순도를 갖는 EPA제제를 개발하고자 시도하고 있다. 그러나 이 방법은 매우 고가의 SFE 장비를 필요로하며 그 조작 가능 규모가 작기 때문에 산업적인 응용에서는 결정적인 약점이 있다.

반면에 세균으로 부터의 EPA생산은 이에 비해 여러가지 장점을 갖추고 있는데 우선 단일 균주의 순수배양이 가능하므로 추출된 지방성분의 지방산 조성이 어유의 그것에 비해 비교가 안될 정도로 단순하다는 것이 하나이고 본 연구 결과 분리된 EPA생산 균주들의 경우 EPA가 거

의 유일한 고도불포화 지방산 일 뿐만 아니라 탄소수 20 개이상의 지방산으로서도 유일하고 나머지 지방산들은 주로 탄소수 16 이나 18이하의 포화 혹은 단일 불포화 지방산이라는데 있다. 따라서 어유로부터 EPA를 분리하는데는 별로 효과가 없는 고전적인 방법들도 본 세균으로부터의 EPA정제에는 훌륭히 그 목적을 달성할 가능성이 높다.

EPA의 정제를 위하여 4 가지 방법을 사용하여 그 효율을 비교하였다. 우선 분리된 fatty acid methyl ester를 이용하여 acetone 용액내에서 저온처리하여 결정으로 선별하는 방법 (Christie, 1982)과 urea 와 fatty acid methyl ester의 혼합 결정법 (Iverson and Weik, 1967) 그리고 mercuric acetate adduct를 이용하는 방법 (Sterns et al., 1962)을 시도하였다. 또한 EPA의 5번 탄소의 이중결합과 carboxylic acid 그룹을 lactone형태로 전환하여 분리하는 Iodolactonization 법도 사용되었다 (Corey et al., 1987, 1988).

제 2 절 실험방법 및 재료

1. 저온 결정법

0.1 g의 fatty acid methyl ester를 acetone 2 ml에 녹인 후 이 용액을 -70°C 의 초저온 냉동고에서 하룻밤 방치하여 fatty acid methyl ester의 결정을 형성시켰다. 이를 함께 식혀놓은 5 ml들이 주사기 (Pyrex 재질로 테프론 plunger를 갖는 Gas-tight syringe)로 전부를 취하여 pore size 0.43 μm 의 주사기용 filter를 사용하여 여과하여 불포화 지방산이 함유된 여과액과 걸러진 결정을 분리하고 다시 3 ml의 차가운 acetone을 주사기로 취하여 결정을 함유하는 filter를 씻어 준뒤 다시 상온의 acetone 2 ml를 filter를 통하여 빨아들여 결정을 용해 시킨다. 각 분액을 농축하여 기체 크로마토그래피로 분석하였다. 이중결합의 수가

많을 수록 결정을 형성하는 온도가 낮으므로 이 조건에서는 완전 포화지방산과 이중결합수 3 개 까지의 fatty acid methyl ester들을 이중결합수 5 개인 EPA로 부터 선별적으로 결정화 할 수 있다.

다량의 시료의 경우는 식혀놓은 acetone 100 ml와 Buchner funnel을 준비하여 신속히 감압여과하여 결정을 분리하고 걸러진 결정을 차가운 acetone (10 ml)으로 세척하여 여과액에 합하였다. 이과정에서 상당량의 대기중 수분이 acetone-용액에 녹아들어 가므로 이를 decicator에서 상온까지 온도를 높인후 sodium sulfate로 수분을 제거하였다. 이를 다시 걸러 제거한후 질소 가스를 이용하여 1 ml까지 농축 시켰다. 이 농축액의 지방산 조성 및 EPA의 농축도를 gas chromatography를 이용하여 분석하였다.

2. Mercuric acetate adduct 법

불포화 지방산과 같이 이중결합을 갖고 있는 물질들은 mercuric acetate와 선택적으로 adduct를 이루게 되며 이러한 adduct의 각 유기 용매에 대한 용해도의 차이를 이용하여 선택적으로 분리 정제할 수 있다. Screw cap 시험관에 Mercuric acetate 2 g을 넣고 4 ml의 methanol을 가하여 녹인후 지방산 시료 1 g을 가하여 잘 섞어준 후 끓는 물에 담가 1 시간 동안 반응시킨다. 반응이 끝난후 이를 상온에서 식힌후 10 ml의 diethyl ether를 가하여 Mercuric acetate adduct를 침전시킨 후 여과하여 분리한다. 여과액을 rotary evaporator를 이용하여 진공하에서 용매 (methanol과 diethyl ether)를 제거하여 mercuric acetate adduct를 얻은 후 2 ml의 methanol과 2 ml의 pentane을 가하여 녹인다.

별개로 methanol 20 ml 와 pentane 20 ml를 separatory funnel에서 2 분간 잘 흔들어 층을 분리한후 이 adduct 용액을 더하여 2 분간 흔들어

각용매에 선택적으로 용해시킨다. EPA-mercuric acetate adduct는 이들중 methanol층에 녹아 있게되므로 methanol층을 취하여 농축시켜 EPA-mercuric acetate adduct를 얻고 이를 농축 HCl을 이용하여 분해하여 지방산으로 회수한다.

회수 방법은 약 10 g의 adduct를 20 ml의 methanol에 녹인후 50 ml의 진한 HCl가하여 잘 섞어준후 황산과 아연가루를 섞어 HCl 기체를 발생시켜 이 기체로 약 5 분간 bubbling을 시켜준다. 이를 50 ml의 hexane으로 2 차례 추출하여 추출액을 증류수로 세척한후 anhydrous sodium sulfate로 수분을 제거한후 이를 다시 걸러 sodium sulfate를 제거한후 rotary evaporator를 이용하여 진공하에서 용매 (Hexane과 diethyl ether)를 제거하여 10 ml정도 까지 농축한다. 이 농축액의 지방산 조성 및 EPA의 농축도를 gas chromatography를 이용하여 분석하였다.

3. Urea 혼합 결정법

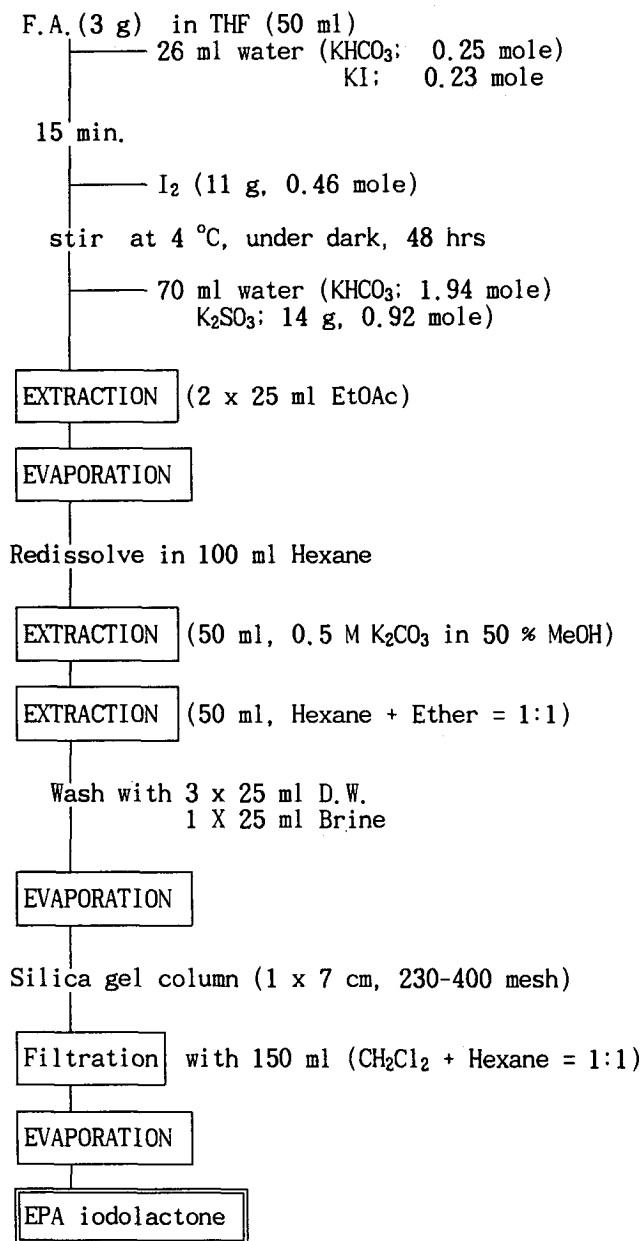
본 실험에서는 적은 양의 지방산 분리를 대상으로 할 경우에는 다음과 같이 실험을 수행하였다. 10 ml들이 용기에 1.5 g의 urea를 넣고 methanol 1 ml를 가하여 적신후 B2100MA 균주 (*Aeromonas spp.*)에서 추출한 0.1 g의 fatty acid methyl ester를 4 ml의 hexane에 녹인 용액을 가하였다. 이 용액을 상온에서 4-5 시간 천천히 흔들어 주면서 방치하여 urea 표면에서 용해와 결정화가 일어나게한후 영하 20 도에서 하룻밤 방치하여 결정화를 완결하였다. 다음날 이를 여과하여 결정을 제거하고 미리 영하 20 도를 식혀놓은 hexane (10 ml)으로 결정을 세척하여 이를 여과액에 합하고 sodium sulfate로 수분을 제거한후 이를 다시 걸러 sodium sulfate를 제거한후 질소 가스를 이용하여 1 ml 까지 농축시켰다. 이 농축액의 지방산 조성 및 EPA의 농축도를 gas chromatography를 이용하여 분석하였다.

이 방법도 약간의 수정을 통하여 쉽게 scale-up 할수 있는 데 실험실 수준에서는 약 100 g의 fatty acid methyl ester를 대상으로 다음과 같이 실험을 수행하였다. B2100MA 균주 (*Aeromonas spp.*)에서 추출한 100 g의 fatty acid methyl ester를 1 l의 methanol에 녹인 후 여기에 200 g의 urea를 가한후 이 용액을 천천히 가열하여 모든 urea를 완전히 녹인 후 천천히 흔들며 주면서 4-5 시간동안 상온에서 식힌다. 이를 다시 영하 20 도로 옮겨 하룻밤 동안 결정화를 완결한후 다음날 Buchner funnel을 이용하여 신속히 여과한후 걸러진 결정을 미리 식혀둔 urea로 포화된 methanol (25 ml)로 2 차례 세척하여 여과액에 합한다. 이 여과액을 600 ml의 1 % HCl 용액에 더하여 잘 섞은후 500 ml의 Hexane 과 역시 500 ml의 diethyl ether로 추출하여 추출액을 50 ml의 증류수로 2 차례 세척하여 잔류 urea를 제거한다. 이 용액을 anhydrous sodium sulfate로 수분을 제거한후 이를 다시 걸러 sodium sulfate를 제거한후 rotary evaporator를 이용하여 진공하에서 용매 (Hexane과 diethyl ether)를 제거하여 100 ml정도 까지 농축한다. 이 농축액의 지방산 조성 및 EPA의 농축도를 gas chromatography를 이용하여 분석하였다.

4. Iodolactonization 법

Iodolactonization 의 과정은 diagram으로 나타내었다. 이 과정은 약 3 g 정도의 소량의 지방산에서 분리하는 것으로 대량의 경우에는 그대로 Scale-up할 수있다. 형성된 EPA iodolactone은 가수분해 시켜 EPA로 전환시킨후 다시 추출 및 농축과정을 거쳐 얻을수있다.

Figure 11. Diagram of Iodolactonization of EPA



제 3 절. 결과 및 토론

1. 저온 선별 결정법

이 방법은 초저온 냉동고가 있을 경우 여타의 장비없이 손쉽게 실행할수 있으며 rotary evaporator를 이용하여 농축시킬수 있어 특별한 준비 없이 대형화할 수 있는 장점이 있다. 특히 본 연구에서와 같이 bacteria에서의 지방산 조성이 이중결합수가 3 개이상인 지방산이 EPA 이외에는 거의 1 % 미만으로 존재하는 경우 매우 경제적인 분리법이라고 사료된다. 또한 본연구에서는 주로 소량의 시료를 -70°C 의 초저온 냉동고에서 선별 결정을 시켰으나 이 온도를 -50°C 까지 올려도 분리 효율에는 큰 지장을 보이지 않았는데 이는 fatty acid methyl ester가 용해되어 있는 acetone용액에 단순히 dry ice를 투여하기만하면 얻을수 있는 온도이므로 대량 생산시 그 생산 단가를 크게 절감할수 있으리라고 사료되며 dry ice의 경우 acetone용액의 온도만 낮추고는 바로 이산화탄소로 기화되어 날아가 버리므로 부피의 증가등 분리에 저해되는 요인이 없어 정제 과정을 효율화할수 있다.

영하 50 도의 초냉동실에서 자동화 장비를 갖춘다면 이 방법이 좋은 결과를 낼수 있으리라고 생각되나 실험실 수준에서는 영하 50 도로 식힌 acetone과 여타 초저 기구에 대기중의 수분이 급속히 응결되어 rotavapor 로 acetone을 제거하여도 상당량의 수분이 남게 되므로 실험에 어려움이 있었다. 결국 소형의 주사기 내에서 반응을 수행하였으나 이보다 큰 규모에서는 응결되는 수분의 제어가 가장 중요한 걸림돌로 작용할 것으로 사료된다. 본실험의 결과 EPA의 함량은 51 % 정도로 약 3 배의 농축 효과를 보였다 (Table 7). 그러나 지방산의 주요성분중의 하나인 palmytoleic acid가 완전히 제거되지는 않았다.

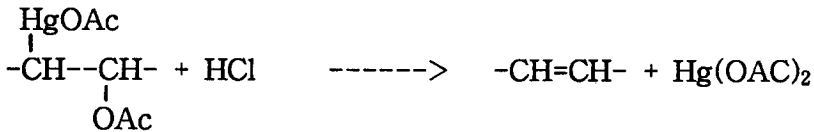
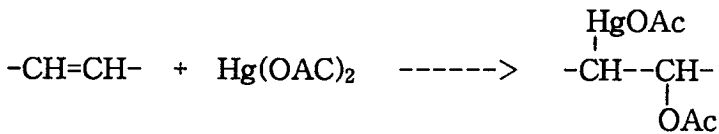
Table 8. Purification of EPA by Low Temperature Crystallization

FAME	before	after
12:0	4.26	0.50
i-13:0	5.25	1.79
13:0	6.26	0.50
14:0	5.32	2.29
i-15:0	3.56	1.70
15:0	3.12	1.15
16:0	16.02	8.47
16:1(n-9)	21.14	13.22
16:2(n-4)	3.02	4.73
a-17:1	1.28	1.71
17:1	2.82	1.14
18:0	1.82	1.40
18:1(n-9)	3.85	3.91
18:2(n-6)	1.26	4.00
20:5(n-3)	16.01	51.53
others	5.01	1.96

*: Fatty acid methyl ester

2. Mercuric acetate Adduct

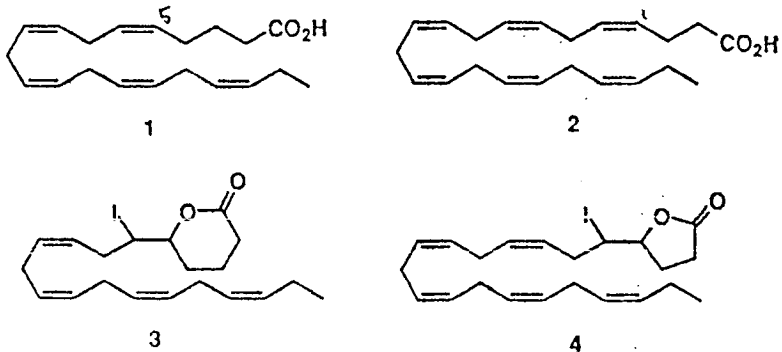
Mercuric acetate 와 불포화 지방산의 이중결합간에 Adduct를 형성시켜 형성된 adduct의 유기용매에 대한 용해도 차이를 이용하여 pentane과 methyl alcohol사이에 분리시켜 그 지방산의 포화도에 따라 분리를 시도하였다.



이 방법도 그 효율이나 분리 정제의 간편성은 비교적 양호하여 EPA합량 11 %의 시료에서 단일 공정을 통하여 40 %정도까지 약 4 배의 농축도를 얻을수 있었다 (Fig. 13). 그러나 그 분리 정제 과정에서 유해 중금속인 수은을 다량 사용하게되고 이들 수은염의 회수 이용이 불가능하여 유해중금속의 폐기물이 다량 발생할 뿐 아니라 본 연구 과제가 EPA가 식용 (건강 보조식품 혹은 고지혈증 치료제)으로 사용된다는 점을 고려할때 문제의 소지가 있다고 사료된다. 물론 사용된 mercuric acetate는 증류수 세척과정을 강화하여 완전히 검출한계미만으로 제거가 가능하나 그 해독이 이미 잘 알려진 중금속을 사용하여 제조된 제품이라면 산업화 후 소비자의 건강관련 정서에 부정적인 영향을 미칠 수있으므로 산업화 과정에서는 심각한 고려가 필요하리라고 생각된다.

3. Iodolactonization 법

Iodolactonization 은 EPA, DHA, arachidonic acid와 같이 지방산의 이중결합이 5번이나 6번 탄소에서 시작되는 지방산들을 이러한 위치에 이중결합을 갖지 않는 지방산으로 부터 분리하는 방법으로 그 원리는 지방산의 carboxylic group과 이중결합이 시작되는 탄소사이에 공유결합을 유도하여 5각구조나 6 각구조의 lactone 고리를 형성시켜 이 lactone 고리를 형성하지 못하는 지방산으로 부터 분리하는 것이다 (Corey et al., 1988). 아래 그림에서 EPA와 DHA의 Iodolactone의 구조를 명시하였다 (1, EPA; 2, DHA; 3, EPA Iodolactone; 4, DHA Iodolactone). 형성된 Iodolactone은 여타 지방산과 유기용매에의 용해도차이를 이용하여 분리 정제할수있다. 그러나 그과정은 농축과 영과과정이 많아 수율에서 다소 손실을 보고있었다. 본 EPA 생산 균주들에서 분리한 지방산들을 Iodolactonization을 시키는데는 약 2 일간의 시간이 소요되며 여러단계의 추출과 세척과정을 필요로한다. 본방법의 농축도는 매우 높아 90% 이상의 고농축 EPA를 얻을수 있으며 어유에서는 arachidonic acid와 DHA가 EPA와 함께 얻어지므로 이를 다시 분리해야하는 점이 약점이었으나 미생물 유래 EPA의 경우는 이러한 문제는 없었다. 그러나 그 과정이 공정화하기에는 지나치게 복잡하고 Iodolactonization 반응 후에 다시 delactonization과정을 거친후 이를 다시 추출, 농축하는등 다량의 유기 용매와 가열 및 냉각과정을 거쳐야하므로 공업적으로 사용하기에는 문제가 있다고 사료된다.



4. Urea혼합 결정법

Urea를 methanol등 용매에 포화 상태로 녹인 용액을 온도차이에 의하여 결정화하면 결정내에서 urea 분자들이 六角구조의 정렬을 이루게 된다. 이 구조의 내부에는 지방산과 같은 사슬형 분자들이 함유되어 함께 결정을 이룰수 있어 이를 이용하여 지방산들을 그 불포화도에 따라 분리할수 있다. 즉, 완전 포화지방산 또는 지방 alcohol, 지방산 ester 들을 urea와 함께 용매에 녹인후 이를 저온 처리하여 결정화하면 이들을 urea와의 complex를 형성하는 데 불포화도가 증가 할수록 이러한 complex를 이루기가 어렵게되며 특히 EPA와 같이 이중결합이 cis-형태로 5 개나되는 경우에는 거의 결정을 이루지 않는다. 이러한 경향은 지방산의 불포화도가 커짐에 따라 점차 심해지므로 이를 이용하면 고도 불포화 지방산을 포화 지방산이나 낮은 불포화도의 지방산으로부터 분리 정제가 가능하다.

Urea를 이용하여 Herring (대구)의 어유의 지방산으로부터 EPA와 DHA를 정제한 결과들이 발표되어 있는데 어유에는 EPA나 DHA 이외의 고도불포화지방산이 다량 함유되어 있으므로 이 Urea 결정법으로는 고작 16.5 % 에서 48.6 %로 약 2.5 배의 농축을 보였다. 그러나 본 연구에서 개발한 미생물에서의 EPA생산은 EPA이외의 고도불포화지방산의 함량이 극히 낮으므로 이 Urea결정법에 의한 단일 공정으로 고순도의 EPA를 얻을수 있다는 장점이 있다.

균주 #2100으로 부터 urea 결정법으로 분리한 EPA시료는 이러한 단일 공정을 통하여 90 %가까운 순도를 갖는 시료를 얻을 수 있었는데 여기에 포함된 불순물들은 주로 세포막 주성분인 palmytoleic acid (16:1) 과 탄소수 14 이하의 짧은 사슬의 지방산들을 함유하고 있다 (Table 8). 보다 효율적인 정제를 위해서는 urea의 결정화를 -20 °C에서 수행하는 것이 1 회 분리에서 88 %로 농축된 EPA용액을 얻을수 있었는데 반해

4 °C에서는 83 % 그리고 상온에서는 이보다 떨어져 70 %의 농축이 가능하였다. 그리고 지방산의 양이 많을 경우에는 계속하여 2 회의 urea 결정법을 수행하면 더 효과적으로 포화지방산들을 제거할수 있었다. 2 차례의 urea 결정법으로 정제된 EPA 농축액에는 주된 불순물이 myristic acid가 주된 성분이었는데 이들은 HPLC용 guard column으로 사용되는 짧은 column (30 X 0.46mm)을 사용하여 HPLC로 용이하게 제거하였다. 사용한 column은 Tosoh co. 에서 구입한 ODS-120 T reverse phase column (150X0.46mm)을 사용하였고 solvent는 100 % methanol을 사용하는 것이 가장 유리하였다. 본 용매 조건하에서는 EPA가 용매와 함께 초기에 용출되며 짧은 사슬의 지방산들은 잘 분리되어 나중에 용출되므로 EPA 분액을 취하고 column을 그냥 세척하면 불순물이 제거된 95 %이상의 EPA를 얻을수있다 (Fig. 14, 15).

본 urea 결정법이 시도된 정제 방법중 가장 우수한 것으로 사료되는데 그 장점은 비교적 소량의 유기용매를 사용하고 그 유기용매도 거의 회수가 가능하여 재사용이 가능하다. 또한 사용된 시료는 urea가 거의 유일한데 이역시 물에 녹인뒤 흡착되어 함께 결정화된 포화지방산들을 추출하여 제거하면 재사용이 가능한 수준으로 재생할수있다. 더군다나 urea는 그 가격이 매우 저렴하고 (\$13.00/kg of 99 % urea) 본 공정에서는 가열이나 냉각과정이 비교적 간편하여 해양미생물로부터 EPA를 대량생산하게 된다면 주된 생산 공정이 될수있으리라고 사료된다.

Figure 12. Purification of EPA by Mercuric acetate adduct formation from Fatty acid Methyl Ester of #2100 cell

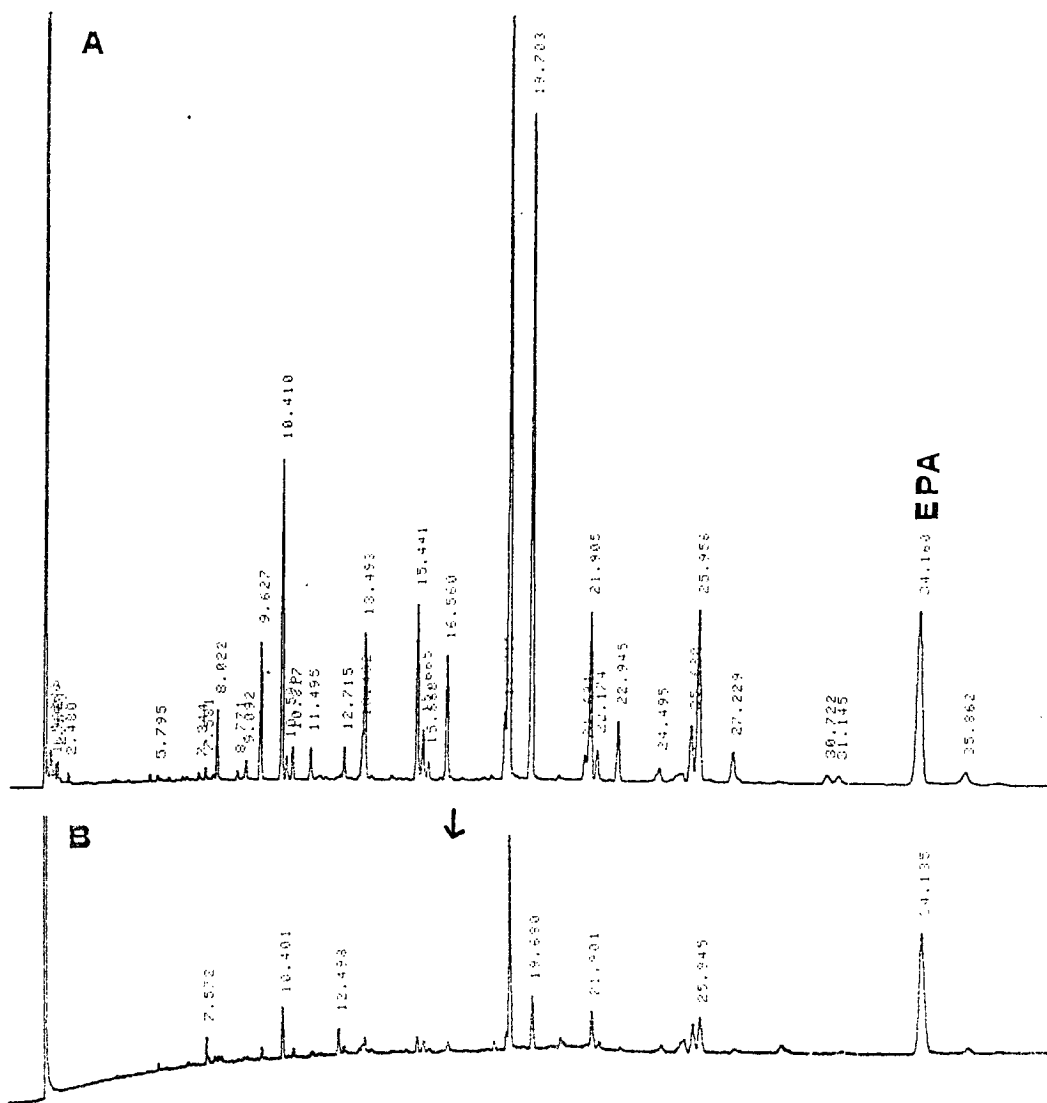


Figure 13. Gas chromatogram of EPA purified by Urea crystallization.

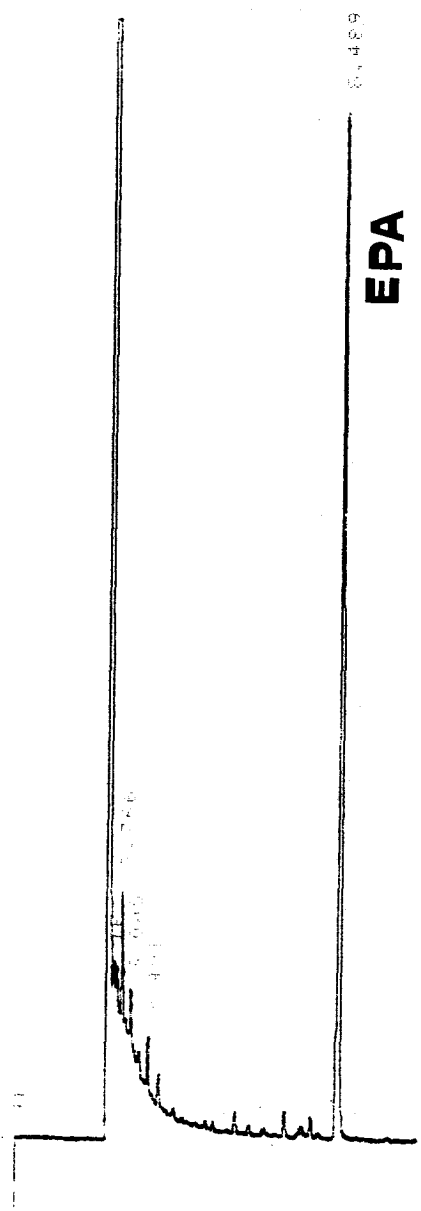


Figure 14. Further Purification of EPA by HPLC. (A) HPLC chromatogram detected at 206 nm and (B) gas chromatogram of the collected fraction

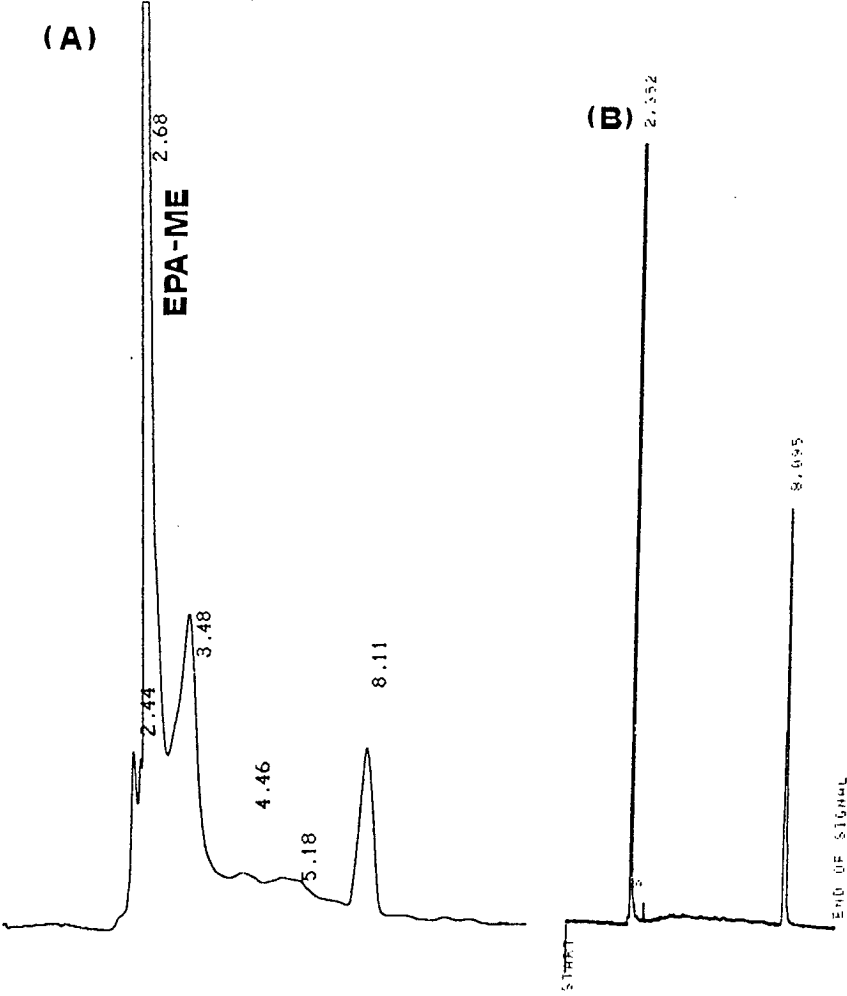


Table 9. Fatty acid composition (%) of #2100 oil
before and after purification by urea crystallization.

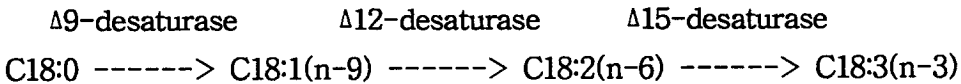
FAME*	Original sample	Crystallized Temperature		
		25 °C	4 °C	-20 °C
13:0	6.75	5.65	6.77	5.10
14:0	5.94			3.22
i-15:0	14.41	10.55		
15:0	10.78			
16:0	11.62	3.10		
16:1(n-3)	22.99	8.44	12.08	3.15
18:1(n-9)	8.77	5.91		
18:2(n-6)	2.64			
20:5(n-3)	16.06	70.45	81.13	88.53
others		1.77		

*: Fatty acid methyl ester

제 4 장. EPA 생산에 관련된 효소

제 1 절. 서 론

EPA의 생산 경로는 acetyl Co-A로부터 생합성되어 형성되는 포화 지방산인 stearic acid (C18:0)을 시점으로 할때 우선 EPA의 직접 전구체로 여겨지는 linolenic acid (C18:3 n-3)까지 3 차례의 desaturation 과정을 거친다. 즉

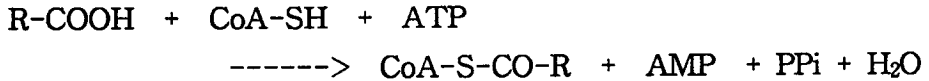


여기서 작용하는 3 종류의 $\Delta 9$ -desaturase, $\Delta 12$ -desaturase 그리고 $\Delta 15$ -desaturase등에 대해서는 식물체계에서와 미생물에서 그 존재가 잘 확립되어 있다. 즉 이러한 9번과 10 번 위치 사이의 이중결합을 중심으로 n-terminal쪽으로 desaturation시키는 효소들은 식물인 미생물 고유의 것으로 동물에서는 linoleic acid (18:2, n-6)가 소위 필수지방산으로 합성은 불가능하고 외부 특히 식물로부터 흡수해야만하는 이유가 된다.

그러나 이보다 더 관심의 초점이 되고 있는 것은 이렇게 형성된 C18:3(n-3) 으로부터 어떻게 EPA (C20:5 n-3)가 형성되는가 하는 것으로 이에 대해서는 전혀 연구된바가 없는 실정이다. 일반적으로 지방산 대사에 관여하는 효소들은 세포막에 부착 또는 연계되어 복합체를 형성하고 있는 경우가 일반적으로 그 반응 중간체들은 외부로 이탈되지않고 최종 산물까지 단일 과정으로 생산되는 경우가 대부분이다.

Fatty acid 관련 대사에는 우선 이들 지방산들을 활성화 시키는 효소가 필요한데 이들중 대표적인것이 자유지방산 혹은 지방의 구성 사슬인 지방산들을 acyl Co-A로 전환시키는 Acyl CoA synthetase이다.

이들은 ATP를 이용하여 지방산을 activation 시켜 desaturase 혹은 elongase 등의 기질로 작용하게 하는데 이들의 활성도를 본 EPA 생산 균주에서 확인하였다.



제 2 절. 실험방법 및 재료

1. 조효소의 제조

4 °C에서 성장한 #2100 균체 1 g을 5 ml의 lysis buffer (1.0 mM NaPi buffer, 10 mM EDTA, 10 mM DTT, pH 7)에 현탁한 후 4 °C에서 30 분간 저어준후 얼음물에 담근 상태에서 5 회 초음파 분쇄 (30 초 sonication + 1 분 cooling)하여 세포벽을 분쇄한후

SE-12 rotor를 사용하여 12,000 rpm에서 20 분간 원심분리하여 상층액을 얻어 이를 조효소로 사용하였다. 반응시에는 통상 0.1 ml를 0.9 ml의 반응 완충액에 첨가하여 실험하였다.

2. Acyl CoA synthetase

가) Acyl CoA synthetase의 부분정제: 지질 대사에 관련된 효소들은 조효소를 사용할 경우 조효소내에 함유된 세포 지질이 나중에 반응을 분석할 때 간섭을 보이므로 지질 성분을 제거하면 활성을 잃어 버리는 membrane bound enzyme이 아니라면 적당한 정제 과정을 거쳐 지질 성분을 제거하는 것이 바람직하다. 본 효소는 membrane bound enzyme

이 아니어서 ammonium sulfate 석출법으로 30 % - 75 % 농도에서 세포지방에 오염되지않은 활성도를 갖는 단백질을 얻을수 있었다.

나) 효소활성도 분석: 0.9 ml의 반응 완충액에 기질로 ATP, MgCl₂, 0.1 mM linolenic acid를 가한 후 0.1 ml의 효소용액을 가하여 상온에서 1 시간동안 반응 시켰다. Linolenoyl Co-A의 형성 여부는 22 mM KH₂PO₄ buffer:20 % acetonitril을 용매로 Tohso TSK 120T reverse phase ODS column (4.3 X 150 mm)을 사용하여 HPLC로 분석하였다. 기질인 linolenic acid와 ATP 그리고 반응후 형성된 ADP는 DEAE-cellulose resin 0.5 g을 반응액 (1 ml)에 첨가한 후 Vortexing하여 10분간 교반한 후 원심분리하면 대부분 제거되고 HPLC상에서는 Co-A peak에 포함되어 함께 나타나므로 linolenoyl Co-A의 peak 에는 영향을 주지 않았다. 이방법으로 Acyl CoA synthetase를 포함한 단백질도 대부분 제거가 가능하였다.

HPLC를 사용하여 자유 Coenzyme A와 acylCoA를 분리하여 분석을 회수하고 이를 10 N HCl 10 % 되게 가하여 80 도에서 반응시켜 자유 지방산을 유리시킨후 이를 hexane으로 추출한후 농축하고 이를 methyl ester 형태로 전환시켜 gas chromatography로 분석하였다.

3. Desaturase activity의 측정

Δ6-desaturase activity의 측정은 reaction buffer (0.9 ml phosphate buffer, pH 7.4, 0.25 M sucrose, 0.15 M KCl, 40mM NaF, 0.7 mM N-acetylcystein)에 NADH (0.8 mM), NAD (0.3 mM), 0.1 mM linolenoyl CoA (C18:3-CoA)을 첨가한 후 EPA생산 균주로 부터 제조된 조효소 0.1 ml 를 첨가하여 25 °C에서 1 시간동안 흔들면서 반응을 진행한후 조효소에 함유된 지방성분을 2 차례의 Folch추출로 제거한후 10 N HCl 0.1 ml를 가하여 70 °C에서 30 분간 반응시켜 반응하지 않은

linolenoyl CoA와 octadecatetraenoyl Co-A의 thioester를 분해한후 protonation된 유리지방산들을 n-hexane (1.5 ml)으로 추출하여 speed-vac으로 농축한뒤 methanolic HCl로 methy ester form으로 전환하여 재차 농축하여 C18:4(n-3)의 형성을 gas chromatography 확인하였다.

Δ 17-desaturase activity의 측정도 linolenoyl CoA 대신 arachidonyl CoA를 기질로 사용하여 Δ 6-desaturase activity의 측정과 동일한 요령으로 수행하여 EPA의 생성 여부를 확인하였다.

Alginated TLC using siver nitrate

2 g 의 siver nitrate를 20 ml의 acetanitril에 녹인 용액을 Silica gel G TLC plate(20 cm x 20 cm)에 고르게 분사하여 alginating 시킨다. Hair dryer로 말려서 100 oC 에서 1 시간동안 activation 시켜 바로 사용하거나 나중사용을 위하여서는 알루미늄 박지로 싸서 decicator에서 보관하였다. 이 방법은 주로 linolenic acid (또는 methyl ester)와 octadecatetraenoic acid (C18:4)를 TLC상에서 분리하기 위한 목적으로 사용되었는데 사용된 전개용매는 n-hexane 과 diethylether 의 2:3 혼합 액을 사용하여 linolenic acid methyl ester의 경우 Rf 값이 0.57 그리고 octadecatetraenoic acid methyl ester의 경우 0.43에서 검출됨을 확인하였다. 이 전개 용매에는 필요에 따라 1 % 의 acetic acid를 첨가하여 각 시료 spot의 꼬리가 생기는 경우를 방지하였다.

4. Phospholipase A₂

Phospholipase A₂ 활성도 측정에는 주로 사용되는 방법이 sn-2위치에 방사성 동위 원소로 표식된 지방산을 갖는 인지질 (주로

phosphatidyl choline 또는 phosphatidyl ethanolamine)을 기질로 사용하여 이로부터 본 효소의 반응 결과 유리된 방사성 동위 원소로 표시된 자유지방산을 박막 크로마토그래피 등의 방법으로 기질과 분리하여 liquid scintillation counter를 이용하여 정량하는 방법이 가장 보편적으로 사용되고 있으며 이외에 유리되는 지방산에 의하여 반응액의 pH가 낮아지는 것을 이용하여 검출하는 pH-Stat 방식등이 사용되고 있다. 그러나 pH-stat의 경우 그 민감도가 그리 높지 않고 방사성 동위 원소 사용법은 환경오염등의 이유로 그 사용에 많은 규제가 따르고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 새로이 개발된 발광법에 의한 분석법을 사용하였다 (Cho, 1994). 이 방법은 해양에 서식하는 발광 세균을 이용하는 것으로 사용된 균주는 발광 세균 *Vibrio harveyi*를 nitrosoguanidine으로 돌연변이를 유도 시켜 얻어진 돌연변이 균주 M-17 을 사용하였다. 본 균주는 항상 빛을 내는 wild-type과는 달리 자연상태에서는 일반 세균들 처럼 빛을 내지 않으나 긴사슬을 갖는 알데히드 (decanal 또는 tetradecanal)나 지방산중의 myristic acid (14:0)를 첨가하였을 경우 wild-type수준의 밝은 빛을 내는 특징을 지니고 있다. 따라서 sn-2 위치에 myristic acid를 갖고 있는 phosphatidyl choline 을 기질로 사용하면 반응 결과 유리된 myristic acid에 의하여 발광 반응이 유도 되며 방출되는 빛의 양은 유리된 myristic acid의 양에 비례한다.

본 실험에서는 균체 0.1 g을 1 ml의 lysis buffer (10 mM phosphate buffer, pH 7.5, 10 mM EDTA, 5 mM DTT)에 현탁한 후 초음파 분쇄하여 (10 초 X 5 회) 이를 4 °C에서 원심분리하여 얻어진 상층액을 조효소로 사용하였다. 반응은 0.9 ml의 reaction buffer (20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5)에 0.1 ml의 Folch solution에 녹인 1-stearoyl-2-myristoyl phosphatidyl choline을 가한 후 Vortex로 현탁하여 suspension을 형성하고 조효소액 10 ul를 가하여 상온에서 반응을 진행하였다. 유리된 myristic acid의 분석은 반응액 50 ul를 취하여 미

리 준비된 발광세균 *Vibrio harveyi* M-17 현탁액에 가하여 5 초간 Vortex하여 빛의 최대 강도값 (I_0)을 luminometer로 측정하였다.

제 3 절. 결과 및 고찰

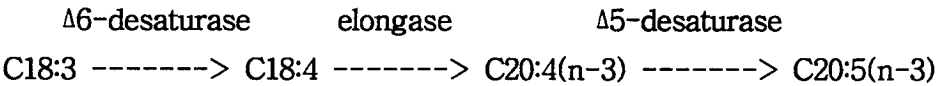
1. Acyl CoA synthetase

Linolenonyl Co-A는 Co-A나 linolenic acid로 부터 reverse phase ODS column으로 잘분리되어 Retention time 2.5 분에서 검출되고 (UV detector, wavelength at 290 nm) Co-A는 5.9분 대에서 기질인 ATP와 반응후 형성된 ADP와 함께 검출되었고 206 nm 에서 linolenic acid를 확인한 결과 이는 8 분 대에서 검출되어 잘 분리되었다. 본 검출 조건에서는 Co-A에 있는 adenosine group의 흡광도만을 선택적으로 검출하는 조건을 사용하여 세포 지질이나 여타 불순물에 의한 간섭을 최소화하였다 (Fig. 16). 본 조건에서는 조효소를 제외한 기질의 농도가 모두 과량이므로 조효소의 양에 따른 Linolenonyl Co-A의 형성을 Fig. 17 에 나타내었다. HPLC에서 Linolenonyl Co-A의 분액을 회수하여 transmethylation시켜 GC로 linolenic acid임을 확인하였다.

2. $\Delta 6$ -Desaturase와 $\Delta 5$ -Desaturase

EPA 생산의 생리 과정에 관여하리라고 여겨지는 효소들의 활성도를 조효소로부터 확인하였다. EPA생산 균주의 EPA함량을 시간에 따라 조사해보면 배양초기에는 EPA함량이 매우 적다가 배양시간이 경과할수록 약 24 시간 까지 증가하는 데 EPA의 전구체로 여겨지는 물질들의 함량도 EPA와 비슷한 연계를 가지고 변화하고 있음을 볼수 있다. 이러한 현상은 저온 배양에서 두드러지는데 저온에서는 일반적으로 효소

의 활성도가 약해지므로 저온에서 성장한 균주의 경우 EPA의 전구체로 작용하는 물질들이 검출될 가능성이 높아진다. 실제로 4 °C에서 배양된 #2100 균주의 경우 linolenic acid, octadecatetraenoic acid, 그리고 eicosatetraenoic acid (20:4, n-3)가 양은 적지만 (1 % 수준)지속적으로 검출되고 이외에 arachidonic acid (20:4, n-6)도 검출되고 있다 (Table 9). 특히 C20:4(n-3)의 경우는 비교적 높은 온도에서도 항상 관찰되었으나 C18:4(n-3)의 경우는 저온 배양한 균체의 지방산에서만 관찰되었다. 이러한 사실은 EPA가 C18:3(n-3)에서 C18:4(n-3)와 C20:4(n-3)를 거쳐 이 C20:4(n-3)에서 5번과 6 번 탄소사이에 1 회의 desaturation에 의해 생성될 가능성을 강력하게 시사하고 있다. 이과정에는 Δ 6-desaturase와 elongase 그리고 Δ 5-desaturase가 연계되어 작용하리라고 여겨진다.



본 연구에서는 위에 언급한 3 종류의 효소를 확인하기 위한 작업을 수행하였고 이들중 특히 Δ 6-desaturase의 활성도를 #2100 균체로부터 제조된 조효소로부터 확인하여 linolenic acid로부터 octadecatetraenoic acid의 합성이 실제로 본 균주에서 가동하고 있음을 확인하였다 (Figure 18).

그러나 Δ 5-desaturase의 활성도는 기질로 사용해야하는 eicosatetraenoic acid (20:4, n-3)가 시약으로 판매되는 것이 없어 그대신으로 eicosatrienoic acid (20:3, n-6)를 사용하고 그 산물인 arachidonic acid를 검색하였으나 eicosatrienoic acid (20:3, n-6)를 acyl Co-A synthetase를 이용하여 eicosatrienoyl Co-A로 전환시켜 기질로 사용해야하는등 어려움이 많아 확인하지 못하였다.

Figure 15. HPLC chromatogram of linolenoyl CoA production with incubation time by acyl coenzyme synthetase partially purified from #2100 strain

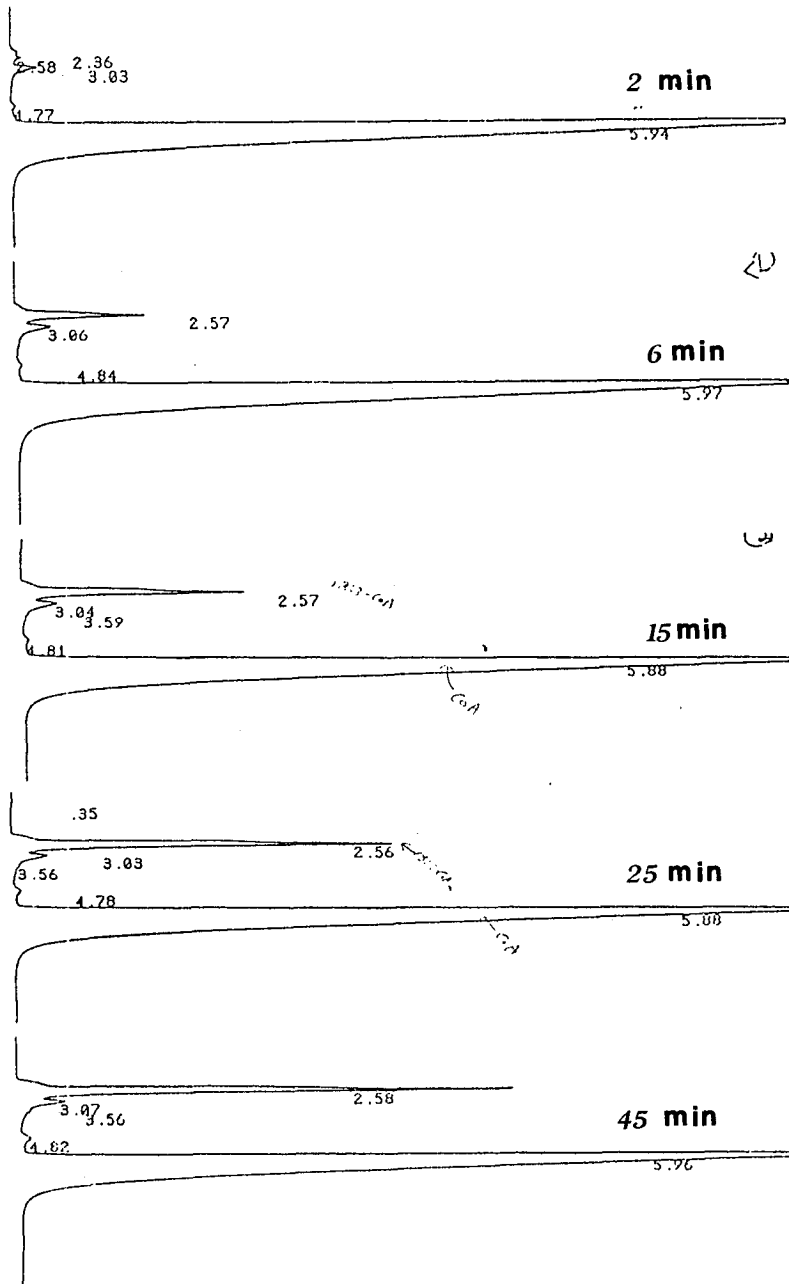


Figure 16. Production of linolenoyl CoA (Lin-CoA) by acyl-CoA syntetase partially purified from #2100 strain

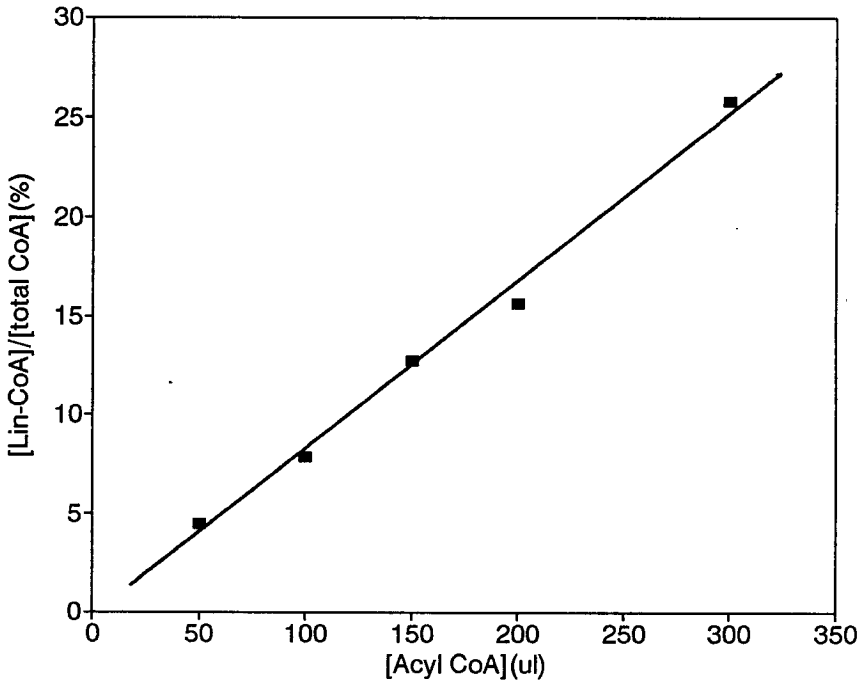
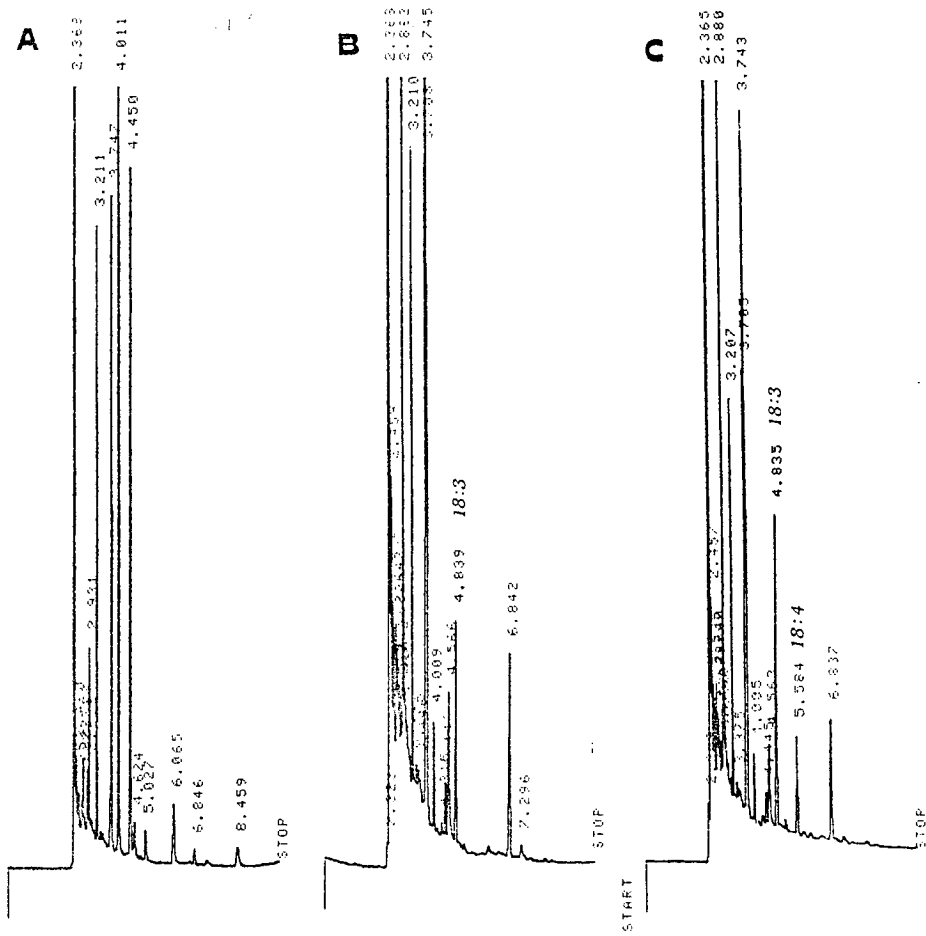


Table 10. Fatty acid composition (%) of #3010 grown at different temperature.

Fatty acid	4 °C	15 °C	25 °C
12:0	0.26	0.77	0.64
i-13:0	2.25	3.79	3.10
13:0	0.26	0.50	10.08
14:0	1.32	2.29	2.48
i-15:0	3.56	10.70	23.12
15:0	3.12	6.15	4.47
a-16:0	0.07	0.13	0.14
16:0	8.02	9.47	10.11
16:1(n-9)	22.14	23.22	25.96
16:2(n-4)	1.02	1.73	
a-17:0			2.89
17:0			3.31
a-17:1	1.28	1.71	
17:1	2.82		
17:1(n-9)		2.96	0.12
18:0	1.82	1.80	1.67
18:1(n-11)	0.86	1.07	
18:1(n-9)	3.85	2.91	
18:3(n-3)	0.64		
18:4(n-3)	0.69	0.47	0.08
20:4(n-6)	0.27	0.22	0.07
20:4(n-3)	0.63	0.35	0.25
20:5(n-3)	31.01	18.53	5.96
Others	3.95	5.03	4.55

Figure 17. Production of Octadecatetraenoic acid from linolenic acid by 6-desaturase of #2100 cell. (A) control with only cell free extract, (B) cell free extract and linolenoyl CoA and (C) cell free extract, linolenoyl CoA and NADH.



3. Phospholipase A₂

각 지방 구성 성분 중에서 유리 지방산으로 존재하는 EPA의 함량이 매우 높았는데 (Table 10) 이것은 일반적으로 불포화 지방산들이 인지질의 sn-2 위치에 존재한다는 사실로 미루어 이를 특이적으로 분해하는 phospholipase A₂의 존재를 시사해 준다. Phospholipase A₂는 여러 종류의 세균이나 고등 동물의 독소의 중요한 부분을 구성하고 있고 sn-2 위치의 지방산을 교체한 새로운 인지질등의 합성에 사용되는 유용한 효소이다. 본 EPA생산 균주에서 이 효소의 활성도를 측정하기 위하여 실험을 수행하였다. Phospholipase A₂의 분석에는 여러가지 방법이 있는데 일반적으로 방사성 동위원소로 표식된 지방산을 sn-2 위치에 갖고 있는 인지질 (주로 phosphatidyl choline 또는 phosphatidyl ethanolamine)을 기질로 이용하여 반응을 수행한 후 유리된 자유지방산을 박막크로마토그래피로 분리한 후 해당위치의 박막을 확인한 후 이를 긁어내어 용매에 용해시킨 후 liquid scintillation counter를 이용하여 정량하는 데 본 연구에서는 해양미생물의 발광 현상을 이용한 새로이 개발된 방법을 사용하였다 (Cho, 1994).

우선 myristic acid의 농도에 따른 빛의 세기를 본 standard curve를 구하였다 (Fig. 19). 약 5 nM부터 10 uM까지의 myristic acid에서 직선 의존도를 보였으며 이보다 높은 농도에서는 포화 현상이 관찰되었다. 본 EPA생산 균주의 경우 0.1 g의 균체(wet weight)에서 약 3.6 Unit의 PLA₂ 활성도가 검출되어 비교적 높은 PLA₂ 생산 균주로 사료된다 (Fig. 20, 21).

본 PLA₂의 존재는 EPA의 분리정제에도 이용될수 있는데 EPA는 다른 불포화 지방산과 동일하게 세포막을 구성하는 인지질의 sn-2 위치에 존재하여 세포내의 PLA₂에 의하여 쉽게 유리지방산으로 전환되므로 우선 균체를 원심분리하여 회수한뒤 이를 20 %의 methanol을 함유한

20 mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.5)에 현탁한후 질소로 충전한 용기에 넣어 상온에서 약 2 시간 교반시키면 대부분의 EPA가 PLA₂에 의해 유리 지방산의 형태로 이탈되어 나오므로 이를 원심분리하여 세포벽등 고형물질을 침전으로 제거하고 상등액의 pH를 낮추어 지방산들을 protonation 시킨 후 Hexane으로 추출하여 농축하면 균체로부터 분리하는 것보다 용이하게 EPA 함유 유기용매층을 얻을수 있다.

자체내 PLA₂를 이용하여 EPA함유 유기용매를 얻은뒤 이를 앞절에서 기술한 Urea 혼합결정법을 이용하면 비교적 용이한 균체로부터 농축 EPA를 얻을수있다. 이 과정을 아래 도식으로 나타내었다 (Fig. 22).

본래의 연구계획에는 EPA생산에 관련되는 효소체계와 함께 관련 유전자에 관한 연구도 병행하고자하는 것이 본 연구자의 희망이었으나 연구의 방향이 산업화를 전제로한 대량 생산 및 분리정제를 우선적으로 수행하게된 이유로 이들 유전자에 관한 연구가 본격적으로 수행되지 못한 점이 아쉬움으로 남으나 이미 균주 확보와 함께 언제든지 수행 가능한 유전자 자원이 확보된 상태이므로 이에 관한 연구가 수행될 수 있게 되기를 기대한다. 미생물에 존재하는 plasmid는 대개 그 미생물 특유의 성격 (항생제에 대한 내성, 난분해성물질의 분해능력 등) 나타내는 유전자를 포함하고 있는데 본 EPA 생산 미생물에서도 약 25 kB 정도 동일한 크기의 plasmid 가 발견되었다 (제 2 년차 연구보고서). 이 plasmid는 각 균주를 25 °C 이상의 온도에서 배양했을 경우는 나타나지 않아 고온 배양에서의 EPA함량 감소와 연관이 있을 가능성이 있어 *E. coli* HB101에 transformation 하였을 때 소량 (1-2 % total fatty acid)의 동정되지 않은 peak 가 검출되었으나 EPA의 생산은 관찰되지 않아 EPA생산 관련 유전자는 plasmid가 아니라 chromosomal DNA에 존재하는 것으로 사료되어 이를 분리하는 연구를 수행하였다.

EPA를 생산하는데 관여하는 유전자를 탐색하기 위하여 약 20 % 이상의 EPA를 생산하는 #2100 균주를 대상으로 EPA를 생산하지 않는

자연적 돌연 변이 균주를 탐색하였다. 그 결과 1 종류의 EPA(-) #2100 균주를 확보하였고 이들의 DNA를 분리하여 제한효소로 절단, 그 DNA 조각들을 전기 영동하여 양상을 비교하여본 결과 동일한 균주임을 확인하였다. 따라서 이들이 EPA를 생산하지 않는 이유는 EPA생산에 관여하는 효소들의 생산이 억제 되어거나 활동이 저해되었다는 결론을 내리고 이들간의 효소 구성을 비교 분석하거나 더 나아가서는 효소 생성에 바로 작용하는 mRNA의 생성에서 차이를 보일것이라는 전제하에 mRNA 분리를 수행하였으나 성공하지 못하였다.

Table 11. Distribution of Major Fatty acid in different lipid class in #2100 strain

FAME*	TL*	FFA*	PE*
i-13:0	3.10	2.60	3.60
14:0	2.20	1.70	2.50
i-15:0	4.10	2.60	5.11
a-15:0	1.90	.70	1.20
16:1(n-7)	25.0	42.50	28.1
16:0	15.70	5.80	16.60
i-17:0	2.10	.40	3.20
a-17:0	1.30	1.90	1.80
18:1(n-9)	8.10	8.10	7.15
18:1(n-7)	4.02	2.50	5.50
18:0	4.10	.60	2.20
20:5(n-3)	8.10	22.70	10.9

*FAME : Fatty Acid Methyl Ester

TL : total lipid,

FFA : free fatty acid,

PE : phosphotidyl ethanolamine.

Figure 18. Standard curve of Myristic acid concentration versus *in vivo* light intensity of *V. hareyi* M-17

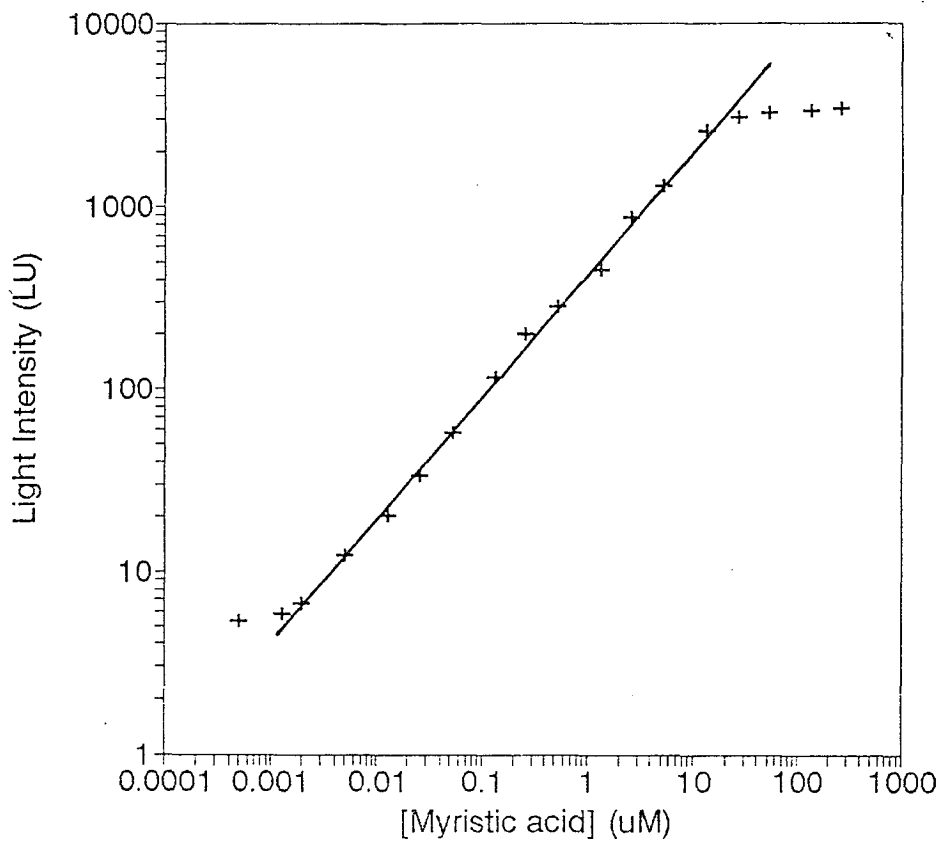


Figure 19. Production of Myristic acid from Dimyristoyl Phosphatidyl choline by PLA₂ from #2100 cell.

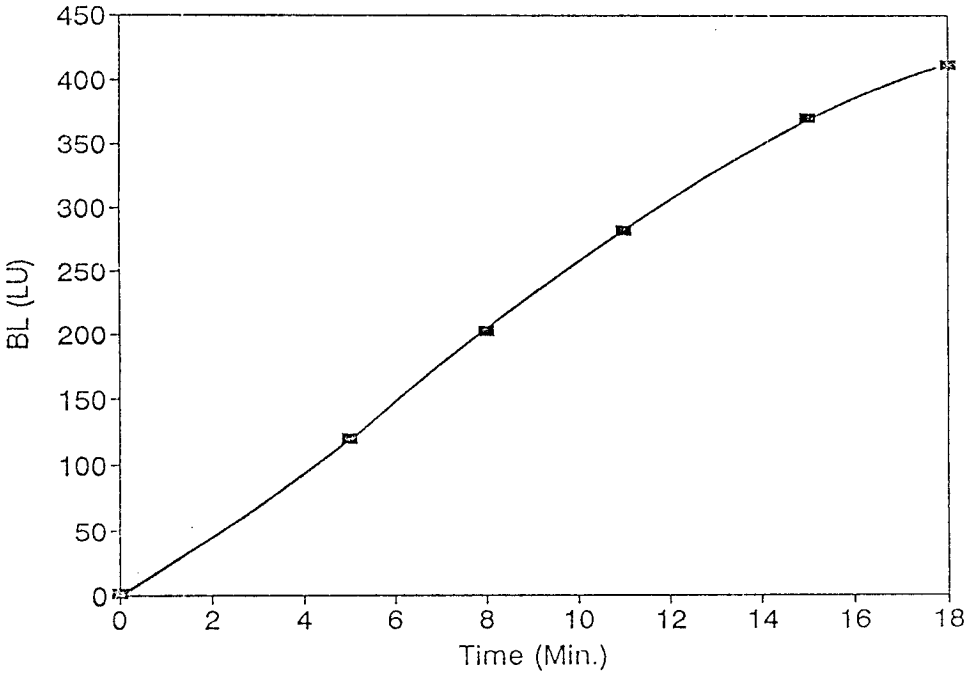


Figure 20. Activity of PLA₂ obtained from 0.1 g of #2100 cell

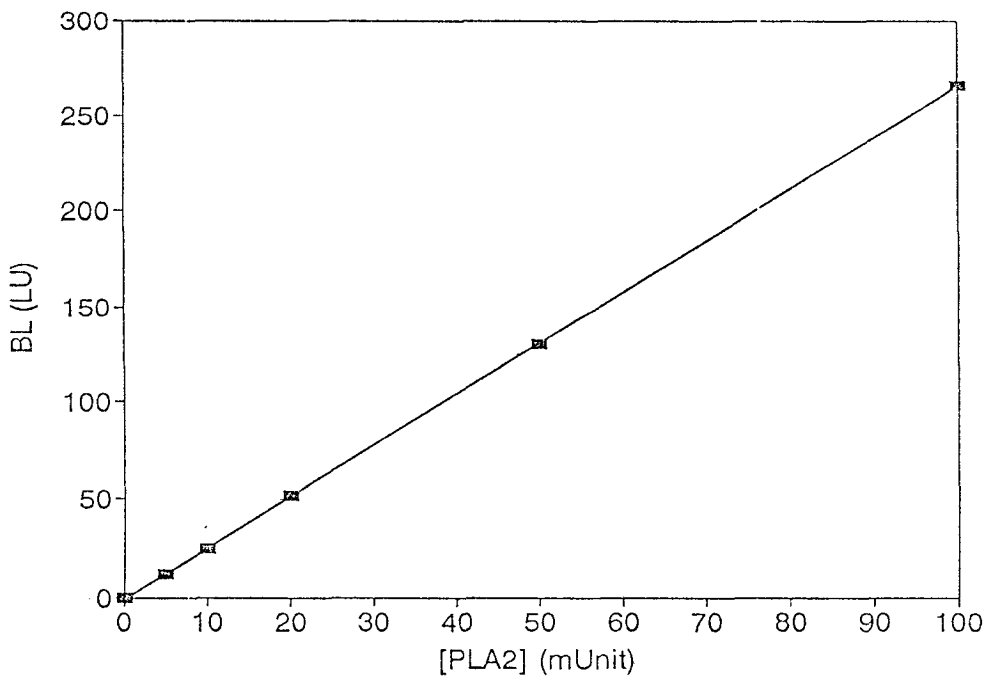
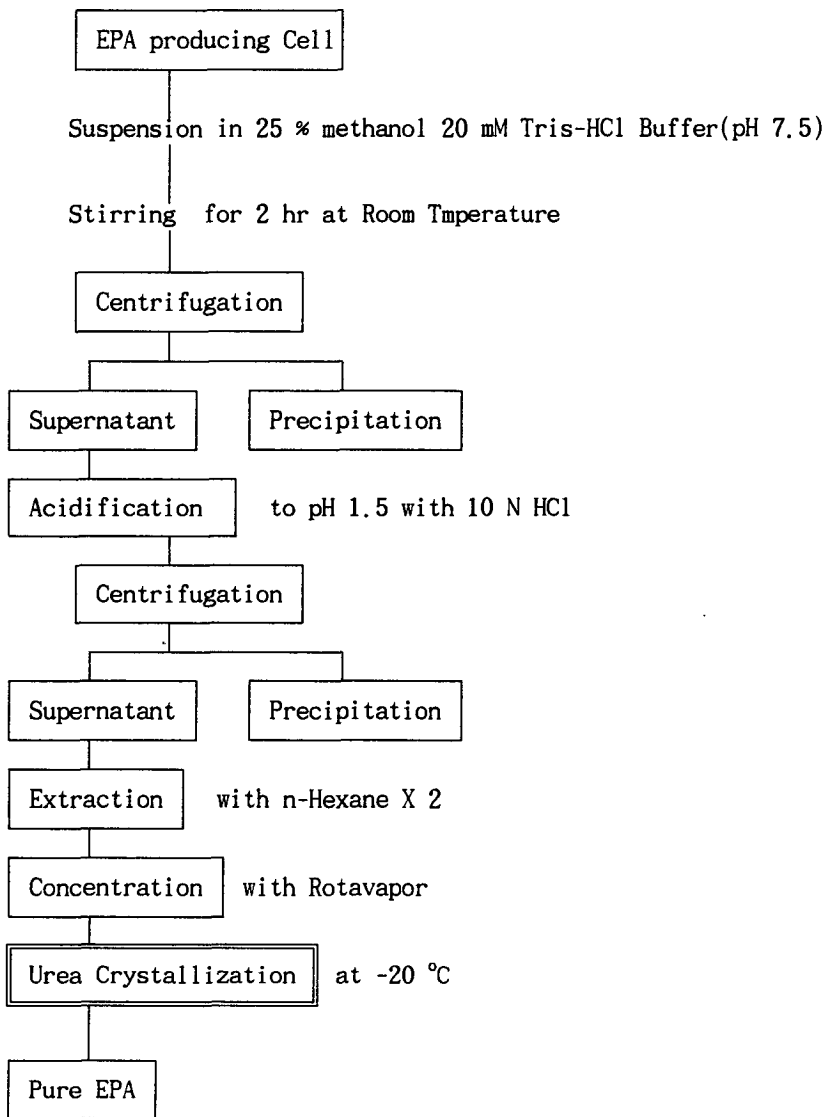


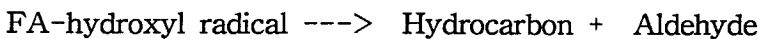
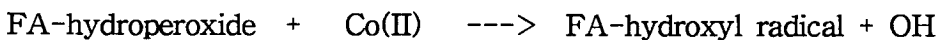
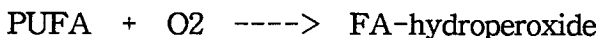
Figure 21. DIAGRAM OF EPA PURIFICATION FROM BACTERIA



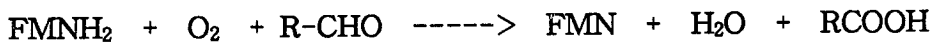
제 5 장. 지방의 산패 측정 방법의 개발

제 1 절 서 론

EPA와 같은 고도불포화 지방산은 산소와 쉽게 반응하여 산화되며 이러한 산화 산물들은 과산화 지질등으로 역겨운 냄새등의 원인이 될 뿐 아니라 실제로 인체에 유해한 현상도 보이고 있다. 즉 arachidonic acid의 산화에 의하여 형성된 hydroperoxide가 분해되면 4-hydroxy-trans-2-nonenal이라는 화합물이 생기는데 이들은 DNA나 RNA 합성을 저해하거나 각종 효소들을 비 선택적으로 무력화 시키기도 한다. EPA와 같이 불포화도가 높을수록 이러한 산화가 촉진되는데 이를 방지하기 위하여 ascorbic acid (Vitamin C), tocopherol, BHT (Butyl hydroxy toluene)등 여러 종류의 항산화제가 사용되고 있다. 이러한 산화의 방지를 위해서는 지방의 보존중 산화 정도를 신속하고 정확하게 검사할 방법이 필요한 데 주로 사용되는 방법은 시료의 전체 peroxide 함량을 정량하는 방법이나 산화 반응의 최종산물인 nonyl aldehyde, 2-nonenal, 4-hydroxy nonenal 등을 HPLC등을 사용하여 정량하는 것인데 이방법을 효율적으로 사용하기 위해서는 TLC등 번거로운 분리 과정이 필요하다. 또 이러한 aldehyde들을 그자체로 분석하기보다는 2,4-Dinitrophenyl hydrazine 등과 발색반응을 유도한후 spectrophotometer를 사용하여 측정하므로 그감도도 그리 높지않다. 본 연구의 일환으로 이러한 복잡하고 번거로운 분리 과정 없이 직접 autooxidation 정도를 정량할수 있는 방법을 개발하였다.



일반적으로 체 지방산의 주성분은 탄소수가 16 또는 18 이고 첫 번째 이중결합이 대개 C9 위치에 존재하므로 형성되는 aldehyde는 octanal, nonanal 또는 decanal 이거나 그 유도체인 경우가 대부분이다. 이러한 aldehyde들은 해양에 존재하는 발광 (發光) 세균의 발광효소 (luciferase)의 좋은 기질로 작용한다.



발광의 초기강도 (Initial light intensity, I_0)는 낮은 농도의 aldehyde에서 aldehyde의 농도에 비례하므로 이를 이용해 적정곡선을 구하고 이에 따라 산화의 결과 생성된 aldehyde의 양을 정량할수 있다.

제 2 절. 실험방법 및 재료

1. Peroxide level 측정법 (AOAC standard method)

준비 시약:

- acetic acid-chloroform solution (3:2)
- saturated potassium iodide (KI) solution
- 1 % starch solution
- 0.1 N and 0.01 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ solution

5 g의 기름 시료를 250 ml 삼각 flask에 넣고 30 ml의 acetic acid-chloroform solution (3:2)을 가하여 흔들어서 잘녹인뒤 0.5 ml의 saturated potassium iodide (KI) 용액을 가하고 다시 증류수 30 ml를 가한후 0.1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ solution으로 노란색이 거의 없어질 때까지 적정한

다. 다시 0.5 ml의 1 % starch solution을 가하고 푸른색이 없어질 때까지 적정한다.

$$\begin{aligned} \text{peroxide value (milliequiv. peroxide/kg sample)} \\ = S \times N \times 1000/\text{g sample,} \end{aligned}$$

S; Volume of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ solution in ml

N; normality $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ solution

2. 생발광을 이용한 peroxide value 측정법

Bacterial luciferase는 해양발광세균 *Vibrio harveyi*에서 분리 정제 하였으며 그 정제 방법은 Hastings 등 (1978)의 방법에 따랐고 분리된 효소의 순도는 약 90 % 정도였다. FMNH₂ 용액은 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)에 용해된 50 uM의 FMN용액에 electron donor로서 EDTA를 10 mM이 되도록 첨가한 후 질소로 용해되어 있는 산소를 제거한 후 3 ml 주사기로 취하여 그상태대로 자외선 Lamp를 쬐어 photochemical reduction이 일어나도록 하여 제조하였다.

측정하고자하는 지방 시료 0.5 ml를 2 ml 들이 screw cap Eppendorf tube에 넣고 ethanol에 녹아 있는 0.1 M CoCl_2 용액을 1 ml 가한후 0.5 N NaOH (in Ethanol) 용액을 0.1 ml 가하여 Vortex로 잘 섞은 후 80 °C 항온조에서 20 분간 반응 시킨다. 반응이 끝난 뒤 상온으로 식힌뒤 10 여초간 원심 분리하여 층을 분리시킨후 윗층 10 ul를 취하여 20 ml 들이 scintillation vial에 있는 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) 1 ml 로 희석한후 여기에 10 ul의 bacterial luciferase를 가하고 이를 luminometer에 넣은후 뚜껑을 닫고 3 ml 주사기에 들어 있는 1 ml의 FMNH₂ 용액 (50 uM in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0)을 재빨리 가하여 방출되는 빛의 양을 측정한다.

제 3 절. 결과 및 고찰

본 시료내에서의 nonyl aldehyde와 decyl aldehyde가 실제로 생성됨을 gas chromatography를 이용하여 확인 하였다 (Fig. 23). Nonyl aldehyde를 대상으로 적정 곡선을 구한 결과 0.1 nM 부터 1 uM 까지 10^4 order에 걸쳐 직선의 반응 의존성을 보임이 확인되었다 (Figure 24).

공기를 잘 통하게 하고 빛에 노출을 극대화하기위한 조건으로 10 ml의 식용유를 petri dish에 넣고 뚜껑을 덮어 형광등 아래에서 일정 시간 배양하면서 약 100 시간 간격으로 형성된 총 aldehyde양을 측정하였다. 비교 실험을 위하여 aluminium foil로 덮은 petri dish에서의 배양과 20 ml scintillation vial에 시료를 넣고 질소로 충전 시킨후 밀봉한 시료를 각각 빛을 쬐인 것과 그렇지 않은 것으로 구별하여 비교하였다. 보통 산패의 측정 지표로 사용되는 peroxide level 검사법과 생체 발광에 의한 검사를 비교 실시하여 peroxide level과 aldehyde의 발광 반응 측정법이 잘 일치하는 것을 확인하였다 (Figure 25). 본 방법을 사용하면 기존의 titration에 의존하는 방법에 비해 소량의 시료 (0.5 - 1 ml)를 사용할 수있고 분석 시간이 신속하다는 장점이 있다. 또한 주어진 시료내의 aldehyde들을 catalytic hydrogenation등으로 이중결합을 환원 시키면 그 감도가 5 배 까지 증가시킬수 있는 장점도 있다. 문제는 그 측정에 사용되는 luminometer가 이직은 널리 보급되어 사용되고 있지 못하다는 점인데 이는 최근들어 점차 발광 반응에 의한 미량 분석법의 사용이 증가하고 있어 널리 보급될 것으로 사료된다. 본 방법은 특히 유지를 함유하고 있는 raw material (식품용 어류 혹은 육류)에 직접 사용이 가능하여 현장에서의 신선도 측정을 위한 지표로도 개발이 가능할 것이다.

Figure 22. Gas chromatogram of CoCl_2 treated soybean oil and the production of nonyl aldehyde (NA) detected with gas chromatography ($R_t = 2.028$).

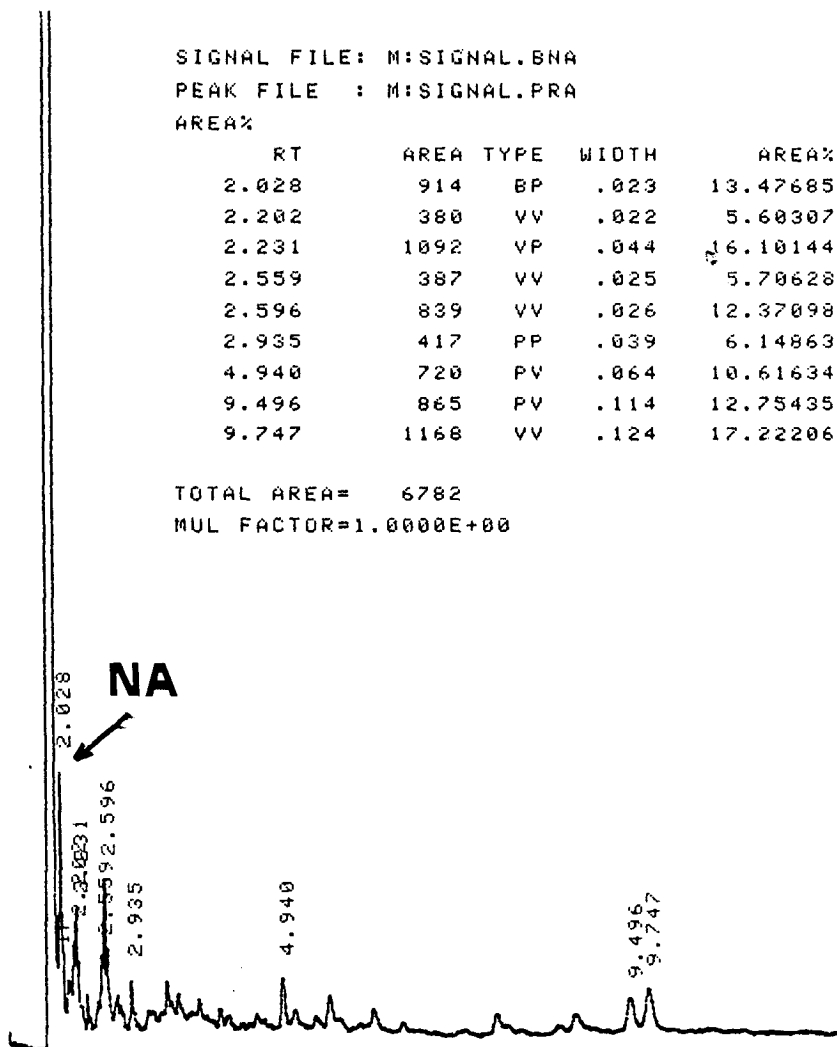
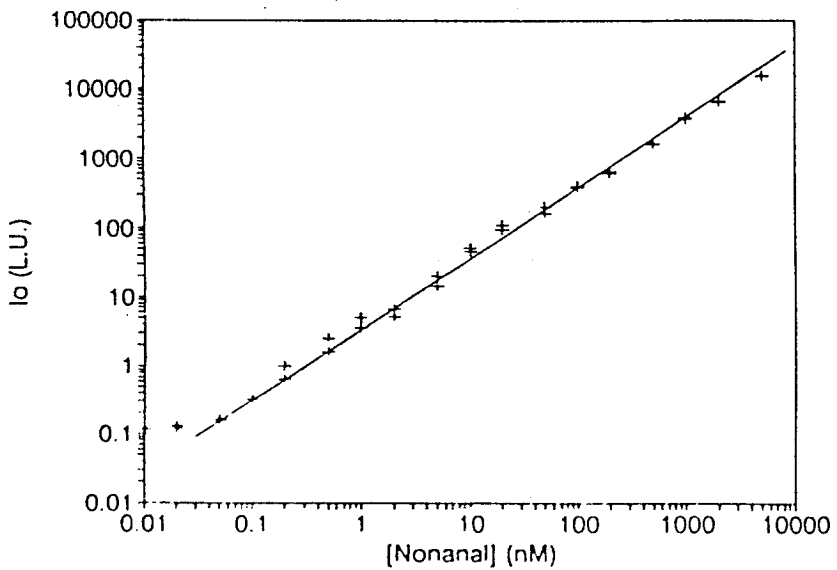
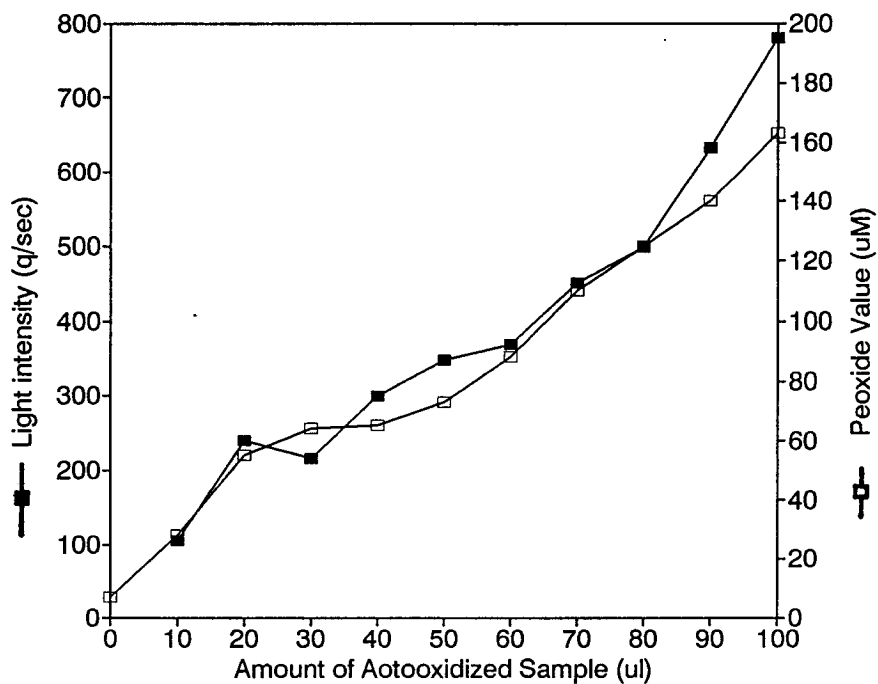


Figure 23. Standard curve of nonyl aldehyde versus initial light intensity (Cho and Shim, 1993, Korean Biochem. J. 26, 61-65).



Standard curve of nonanal concentration and initial light intensity (I_0) using dithionite assay of bacterial luciferase. Various concentration of nonanal standard solution were prepared in absolute ethanol, and add 10 μ l of these solution into 1 ml of 0.1 M phosphate buffer (pH 7) which was then injected into the mixture of luciferase and reduced FMN solution as described in materials and methods section.

Figure 24. Comparison of bioluminescent peroxide detection method and AOAC peroxide titration method.



제 6 장 결 론

본 연구의 결과 미생물 특히 해양 세균으로부터 고부가가치의 지방산 EPA를 대량 생산할 수있는 기반 기술이 확립되었다. 현재 보고되어 있는 세균들 중 가장 많은 EPA를 생산하는 균주를 확보하였으며 이들로부터 EPA의 함량을 극대화시키는 배양조건이 수립되었다. 아울러 이들 EPA생산 균주로부터 경제적으로 EPA를 분리정제하는 방법도 연구되었다. 그러나 본 연구 결과가 산업적으로 이용되기 위해서는 해결되어야 할 몇가지 문제점이 남아있다. 우선은 생산 단가에서 현재 사용되고 있는 어유로부터의 생산과의 경쟁력 문제인데 현재로서는 EPA 함유 어유의 원료인 등푸른 생선들이 매우 저렴한 가격으로 공급이 가능하다는 점이고 이에 따라 농축어유 수준의 고순도로 정제되지 않은 EPA 제제들이 약품이 아니라 건강 식품으로 시장을 형성하고 있다는 점이다. 이점 EPA가 고지혈증 치료제로 FDA공인을 받아 곧 고순도의 EPA가 약품으로 시장을 이루게 되면 해결될 전망이다. 또한 날로 고갈되어가는 어획고에 따라 어류의 공급이 포획에서 양식으로 전환되면 그다지 상품성이 높지않은 등푸른 생선의 경우 EPA를 생산하기위한 양식은 기대하기 어려우므로 궁극적으로는 미생물로부터의 EPA생산이 주된 EPA제제의 원료 공급선이 되리라고 사료된다. 또한가지의 문제점은 EPA가 균체의 세포막 구성 성분이라는데 있다. 즉 항생제등 2 차 대사물질과는 달리 EPA의 생산은 균체의 성장에 직접 연관 되므로 EPA를 생산하기 위해서는 다량의 세균을 배양해야한다는데 있다. 더군다나 일반적으로 세균들은 효모등 고등생물과는 달리 저장형의 지방을 거의 생산하지 않으므로 이러한 문제는 더욱 심각하다. 이를 해결하는 방법은 *Rhodotorula gracilis*와 같은 유지생산 효모를 이용하여 본 EPA균체를 먹이로 제공하거나 나아가서는 EPA생산에 관여하는 효소의 유전자를 이식하여 효모로부터 EPA를 직접 생산하게한다면 이들은 생체량의 최고 60 % 까지의 지방을 생산하

여 저장하므로 보다 높은 효율로 EPA를 생산할 수있으리라고 사료된다. 특히 *Rhodotorula gracilis*의 경우 EPA의 주요 전구체인 linolenic acid(C18:3)의 함량이 25 %에 달하므로 5-desaturase와 6-desaturase 그리고 elongase 등의 유전자의 cloning을 추구해볼 가치가 있다고 사료된다. 본 연구에서도 이를 위하여 기초적인 효소연구와 유전자 분리를 시도하였으나 이러한 연구과제는 보다 많은 시간과 예산으로 수행되어야 결과를 기대할 수 있으리라고 사료된다.

참 고 문 헌

Balows,A., Hausler,W.J. and Truant,J.P. (1980) in Manual of clinical Microbiology, 3rd edition (Lennette E.H. ed.), pp. 303-304.

Bang,H.O. and Dyerberg,J.(1972) Plasma lipids and lipoproteins in Gleenlandic west coast Eakimos. Acta Med. Scand., 192, 85-94.

Bang,H.O., Dyerberg,J. and Nielsen,A.B. (1971) Plasmalipid and lipoprotein pattern in Gleenlandic west-coast Eskimos. Lancer, i, 1143-1146.

Baumann,P., Gauther,M.J., and Baumann,L. (1984) in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 1 (Krieg,N.R. and Holt,J.G., eds.), pp. 343-352.

Christie, W.W., (1982) Lipid Analysis, Pergamon Press

Corey E.J. Wright, S.W. and Kuo, E.Y. (1987), J.Org.Chem. 52, 4399-4403

Corey E.J. and Wright, S.W. (1988). Convient method for the recovery of Eicosapentaenoic acid from Cod Liver Oil, J.Org.Chem. 53, 5980-5981

Delong,E.F. and Yayanos,A.A. (1985) Adaptation of the membrane lipids of a deep-sea bacterium to changes in hydrostatic pressure.

Science, 228, 1101-1102.

Delong, E.F. and Yayanos, A.A. (1986) *Appl. Envir. Microbiol.*, 51, 730-737

Dittmer, J.D. and Lester, R.L. (1964) *J. Lipid Res.*, 5, 126-129.

Dubos, R., Schaedler, R.W., Castello, R., and Hoet, P. (1965) Indigenous, normal, and autochthonous flora of the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.*, 122, 67-76.

Dyeberg, J., Bang, H.O., Stoffersen, E., Moncada, S., and Vane, J.R. (1978) Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? *Lancet*, ii, 117-119.

Dyerberg, J. and Bang, H.O. (1979) Lipid metabolism, atherogenesis, and haemostasis in Eskimos : the role of the prostaglandin-3 family. *Haemostasis*, 8, 227-233.

Folch, J., Lees, M. and Sistanley, G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497-499.

Freter, R. (1974) Interactions between mechanisms controlling the intestinal microflora, *Am. J. Clin. Nutr.*, 27, 1409-1416.

Gellerman, J., and Schlenk, H. (1979) Methyl-directed desaturation of

arachidonic to eicosapentaenoic acid in the fungus, *Saprolegnia parasitica*. *Biochim, Biophys. Acta*, 573, 23-30.

Harris,W.S., Conner,W.E., and McMurry,M.P. (1980) Reduction of Plasma lipids and lipids and lipoproteins By dietary omega-3 fatty acids. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 33, 928-931.

Hasegawa, Y., Kawada,N., and Nosoh,Y. (1980) Change in chemical composition of membrane of *Bacillus caldotenax* after shifting the growth temperature. *Arch. Mikrobiol.*, 126, 103-108.

Iritani,N., Inoguchi,K., Endo,M., Fukuda,E., and Morita,M. (1980) Identification of shellfish fatty acids and their effects on lipogenic enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, 618, 378-382.

Itoh.T., Funabashi,H., Katayama-FuJimura,Y., Iwasaki,S. and Kuraishi,H. (1985) Structure of methylmenaquinone-7 isolated from *Alteromonas putrefaciens*. *Biochim. Biophys. Acta*, 840, 51-55.

Iverson,J.L. and Weik, R.W. (1967), *J. Assoc. off. Analyt. Chem.* 50, 1111-1117

Jones,R.D. and Prahl,F.G. (1985) Lipid composition of a marine ammonium oxidizer growth at 5 and 25 ° C. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 26, 157-159.

Kaneda,T., Arai,K., and Tokuda,S. (1964) Studies on the effects of

Marine products on cholesterol metabolism in rats-II. The comparison of the effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 30, 419-423.

Kayama,M. (1972) Lipids. Suisanzoushoku, 20, 247-262.

Kayama,M., Tsuchiya,Y., and Mead,J.F. (1963) A model experiment of aquatic food chain with special significance in fatty acid conversion. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 29, 452-458.

Kayama,M., Iijima,N., Kuwabara,M, Sado,T., Araki,s. and Sakurai,T. (1985) Effect of water temperature on the fatty acid composition of *Porphyra*. Bull. Japan Soc. Sci. Fish., 51, 687-691.

Kinsella,J.F. (1987) Seafoods and Fish Oils in Human Health and Disease. Marcel Dekker, Inc., New York.

Kroman,N. and Green,A. (1980) Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Acta Med. Scand., 208, 401-406.

Kungsuwan,A., Noguchi,T., Arakawa,O., Simidu,U., Tsukamoto,K., Shida,Y. and Hashimoto,K. (1988) Tetrodotoxin-Producing Bacteria from the Horseshoes Crab *Carcinoscorpius rotundicauda*. Nippon Suisan Gakkaishi, 54, 1799-1802.

Lands,W.E.M. (1986) Fish and human health. Academic Press Inc., London.

MacDonell,M.T. and Colwell,R.R. (1985) Phylogeny of the *Vibrionaceae*, and recommendation for two new genera, *Lisonella* and *Shewanella*. System. Appl. Microbiol, 6, 171-182.

Marr,A.G. and Ingraham,J.L. (1962) Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 84, 1260-1267.

Monteoliva-Sanchez,M. and Ramos-Cormenzana,A. (1987) Cellular fatty acid composition of *Planococcus Halophilus* NRCC14033 as affected by growth temperature and salt concentration. Current Microbiol., 15, 133-136.

Mori, H., T. Yano, T. Kobayashi and S. Shimizu, (1979) High density cultivation of Biomass in fedbatch system with DO-stat. J.Chem.Eng.Japan, 12, 313-319)

Moule,A. and Wilkinson,S.G. (1987) Polar Lipids fatty acids and isoprenoid quinones of *Alteromonas putrefaciens* (*Shewanella putrefaciens*). System. Appl. Microbiol., 9, 192-198.

Murota,S. and Morita,I. (1984) Eicosapentaenoic acid. Igakunoayumi, 130, 787-798.

Nandini-Kidhore, S.G., Mattox, S.M., Martine,C.E. and Rubin E., (1979), Membrane changes during growth of *Tetrahymena pyriformis* in the presence of ethanol, Biochim.Biophy.Acta, 551, 315-327)

Needleman,P., Raz,A., Minkes,M.S., Ferrendelli,J.A., and Sprecher,H. (1979) Triene prostaglandins : Prostacyclins and thromboxane biosynthesis and unique Biological properties. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 76. 944-948.

Nobuo Suzuki, K. Yazawa, K. Watanabe, C. Ishikawa, S. Yano, N. Fukuchika, T. Nakama, and N. Koto, 1993, Nippon Suisan Gakkaishi: 59, 571. Effects of Fish and Molluscan Meat Extracts on the Growth and EPA productivity of a Marine Bacterium Strain SCRC-2738)

Noguchi,T., Hwang,D.F., Arakawa,O., Sugita,H., Deguchi,Y., Shida,Y. and Hashimoto,K. (1987) *Vibrio alginolyticus*, a tetrodotoxin-producing bacterium, in the intestines of the fish *Fuguvermicularis vermicularis*. Marine Biology, 94, 625-630.

Noguchi,T., Joen,J.K., Arakawa,O., Sugita,H., Deguchi,Y., Shida,Y., and Hachimoto,K. (1986) Occurrence of tetrodotoxin and anhydrotetrodotoxin in *Vibrio* sp. isolated from the intestines of a xanthid crab, *Atergratis floridius*. J. Biochem., 99, 311-314.

Oshima,M., and Miyakawa,A. (1974) Comparative studies on the fatty acid composition of moderately and extremely thermophilic bacteria. Lipids, 9, 476-480.

Puska,P., Nissinen,A., Vartiainen,E., Dougherty,R., Mutanen,M., Iacono,J.J., Korhonen,H.J., Pietinen,P., Leino,U., Moisio,S. and Huttunen,J. (1983) Controlled, randomised trial of the effect of dietary

fat on blood pressure. Lancet, i, 1-5.

Sanders,T.A.B., Vickers,M., and Haines,A.P. (1981) Effect on Blood Lipids and haemostasis of a supplement of cod-liver oil, rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids, in healthy young men. Clinical Science, 61, 317-324.

Scherhag,R., Kramer,H.J. and Busing,R. (1982) Dietary administration of eicosapentaenoic and linolenic acid increase arterial Blood pressure and suppresses vascular prostacyclin synthesis in the rat. Prostaglandins, 23, 369-382.

Schoene,N.W. and Fiore,D. (1982) Effect of a diet containing fish oil on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. Prog. Lipid Res., 20, 569-570.

Seto,A., Wang,H.L., and Hasseltine,C.W. (1984) Culture conditions affect eicosapentaenoic acid contents of *Chlorella minutissima*. J. Amer. Oil chem. Soc. 61, 892-894.

Simopoulos,A.P., Kifer,R.R. and Martin,R.E.(1986) Health effects of polyunsaturated fatty acids in seafoods. Academic Press, INC., London.

Singer,P., Jaeger,W., Wirth,M., Voigt,S., Naumann,E., Zimontkowski,S., Hajdu,I., and Goedicke,W. (1983) Lipid and blood pressure-lowering effect of mackerel diet in man. Atherosclerosis, 49, 99-108.

Singer,P., Worth,M., Voigt,s., Zimontkowski,s., Godicke,W., and Heine,H. (1984) Clinical studies on lipid and blood pressure lowering effect of eicosapentaenoic acid-rich diet. Biomed. Biochim. Acta, 43, s421-s425.

Sterns E.M., White, H.B., and Quackenbush, F.W., (1962), J. Am. Oil Chem. Soc. 39, 61-68

Sugita,H., Ueda,R., Noguchi,T., Arakawa,O., Hachimoto,K. and Deguchi,Y. (1987) Identification of a Tetrodotoxin-producing Bacterium Isolated from the Xanthid Crab *Atergatis Floridus*. Nippon Suisan Gakkaishi, 53, 1693.

Terano,Y., Hirai,A., Hamazaki,T., Kobayashi,S., Fujita,T., Tamura,y. and Kumagai,A. (1983) Effect of oral administration of Highly purified eicosapentaenoic acid on platelet function, blood viscosity and red cell deformability in healthy human subjects. Atherosclerosis, 46, 321-331.

Von Rossonczy,T.O., Ruiter,A., Bronsgeest-Schoute,H.C., Van Gent,C.M. and Hermus,R.J. (1978) The effect of a fish diet on serum lipids in healthy human subjects. Amer. J. Clin. Nutr., 31, 1340-1346.

Wirsen,C.O., Jannasch,H.W., Wakeham,S.G. and Cannel,E.A. (1987) Membrane lipids of a Psychrophilic and Barophilic deep-sea bacterium. Current Microbiol., 14, 319-322.