

최 종
연구보고서

농임산물 폐잔재로부터 바이오바닐린
생산공정개발에 관한 연구

Development of Process of Biovanillin Production
from Agricultural and Forest by-products

연구기관

경상대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “농임산물 폐잔재로부터 바이오바닐린 생산공정개발에 관한 연구”
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 11 월 15 일

주관연구기관명 : 경상대학교

총괄연구책임자 : 김 선 원

세부연구책임자 : 최 명 석

연 구 원 : 양 재 경

연 구 원 : 서 원 택

연 구 원 : 윤 상 활

연 구 원 : 이 숙 희

연 구 원 : 강 승 미

연 구 원 : 민 지 윤

요 약 문

I. 제 목

농임산물 폐잔재로부터 바이오바닐린 생산공정개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

바닐린(vanillin)은 식품첨가물 등에 널리 쓰이는 향료의 주요성분으로서 특유의 달콤한 방향을 가지는 백색 또는 담황색의 물질로 그 산업적 용도는 매우 다양하며 그 이용도 또한 매년 늘어가고 있다. 바닐린은 식품첨가물 이외에도 정유 또는 향수 등 방향목적의 제품에 널리 쓰이며 특히 최근에는 향산화, 향돌연변이 및 향균 활성에 관한 연구가 다수 보고되었고, 결핵, 중양, 빈혈, 혈전, 건선, 골다공증, 고혈압 등에도 효과가 있는 것으로 보고되어 의약산업에도 활발히 이용될 것으로 전망하고 있다. 현재 바닐린 소비량은 연간 12,000톤에 이르지만 공급 가능한 천연바닐린의 양은 20톤에 불과하여 대체생산법이 절실히 요구되고 있다. 이 중 가장 효과적인 방법으로 인식되고 있는 것은 생명공학 기술을 이용한 바이오바닐린 생산이다. 바이오바닐린이란 미생물 배양 또는 식물세포배양을 통해 생산되는 바닐린으로 천연 바닐린과 유사한 품질을 가지며 안전성이 있고 친환경적인 제품을 말한다. 현재 이러한 바이오바닐린을 생산하려는 연구가 최근 선진국(미국, 일본, 독일 등)에서 많이 수행되고 있으며 이러한 바이오바닐린은 2000달러/kg으로 판매될 것으로 예상하고 있다. 천연바닐린 원료인 바닐라콩은 국내재배가 불가능하고 화학합성바닐린은 국내 생산기술 및 시설의 미비로 현재 소비되는 바닐린은 전량 수입에 의존하고 있다. 이러한 바닐린 수입량은 매년 10톤정도로 20억원에 달하고 있으며 계속 증가하는 추세이다. 그러므로 국내에서 바닐린을 경제적으로 생산할 수 있는 연구가 성공한다면 막대한 수입 대체효과를 얻을 수 있을 것이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 농산 및 임산부산물인 벚짚 및 간벌재등으로 부터 얻어진 페룰산을 미생물을 이용하여 식품 및 제약 원료인 바닐린으로 전환하는 생물공정기술의 개발을 목표로 하고 있다. 상기 연구목표의 달성을 위해서 제 2 세부과제에서는 농산, 임산원료에 함유된 페놀성 화합물의 물질군 함량을 분석하고, 농산, 임산폐기물로부터 최적의 생산원료를 선발한다. 선발된 원료로부터 저분자 페놀성 화합물 생산을 위한 각종 산 및 알칼리를 사용한 화학적 처리법들을 적용하고, 물리적 전처리법을 구명한다. 페룰산 생산을 위한 물리, 화학적 복합 전처리법의 적용 및 생산의 가능성을 확인하고, 저분자 페놀성 화합물군으로부터 페룰산 등의 precursor의 분리를 위한 최적 조건을 탐색한다. 최종적으로 precursor를 보다 경제적으로 대량 분리할 수 있는 방법을 구명하고, 분리된 precursors들의 바닐린으로 생체변환 효율을 검정한다. 제 1 세부과제에서는 자연계에서 우수한 바닐린 생산균주들을 분리 및 동정하고, 분리된 균주의 돌연변이를 통한 바닐린 생산성의 향상을 도모한다. 기존 바닐린 생산균주로부터 바닐린 대사경로 유전자원들을 확보하고, 대장균에 바닐린 생산 유전자를 도입해서 바닐린 생산 균주로 개발한다. 페룰산에서 바닐린으로 전환되는 반응을 대사공학기술을 도입하여 최적화한다. 아울러 신규 분리된 바닐린 생산 균주로부터 바닐린 대사경로의 신규 유전자원을 확보하고, 기존 유전자들과 바닐린 생산 활성을 비교하여 우수 유전자원을 선발한다. 바닐린 생산경로가 최적화 되고 우수 바닐린 생산 유전자를 함유한 우량 생산균주를 제조한다. 최종산물인 바닐린에 의한 생산균주의 생육 및 생산성 감소를 최소화할 수 있는 새로운 바닐린 생산용 생물 반응기를 개발하고 생산에 적용한다.

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

○ 신규 순환형 생물반응기를 이용한 바닐린 생산공정의 특허출원

바닐린은 최종 목적산물인 동시에 생산균주의 균체생육을 저해하는 물질이다. 따라서 바닐린 생산공정에서 생산된 바닐린을 생물반응기로부터 연속적으로

추출하는 개념이 적용된 생물반응기를 설계해서 개발하였다. 상기 신규 바닐린 생물반응기를 이용한 바닐린 생산공정의 특허를 출원한다. 또한 상기 신규 생물반응기를 이용해서 균체생육을 저해하는 특성을 갖는 유용산물의 고생산 공정 개발에 관한 연구에도 응용한다.

○ 신규 바닐린 생산균주 및 우수 재조합 균주들의 특허 출원

바닐린 생산경로인 Co-A dependent deacetylation pathway에서 feruloyl-CoA가 vanillin으로 전환되면서 생성되는 acetyl-CoA가 균체 내에 축적되면서 enoyl-CoA hydratase/aldolase 효소 반응이 저해를 받는 것을 규명하고 acetyl-CoA의 TCA cycle로의 소모를 유도하는 citrate synthase 유전자 (*gltA*)의 도입으로 바닐린의 생산성이 2배정도 증가된 우수 재조합균주를 개발하였다. 아울러 바닐린 독성에 내성을 갖는 돌연변이주도 개발해서 바닐린 생산성을 증가시켰다. 이들 우수 생산균주들을 특허출원하고 상업적인 바닐린 생산공정에 적용한다.

○ 특허권 매각 등을 통한 산업화

바닐린 원료를 수입하는 식품회사 또는 간벌재의 이용을 원하는 회사들을 탐색하고, 본 연구과제에서 개발한 바이오바닐린 생산공정의 산업화 의사를 타진한 후에 적정 회사를 선별해서 기술이전 및 특허권 매각을 통해서 산업화를 완료한다.

○ 상기의 특허출원 및 산업화를 위한 추가비용의 지원이 필요함.

SUMMARY

(영문 요약문)

Vanillin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde) is one of the most important flavors used in food, pharmaceuticals, and cosmetics industries. Natural vanillin is derived from the vanilla beans. Because of the climate-limited cultivation and labor-intensive process of vanilla flavor, vanillin is mainly of synthetic origin. In recent years, owing to the increasing demand for healthy and natural food, biovanillin produced from natural raw materials by metabolically engineered microorganism or plant tissue culture is expected to substitute for natural vanillin.

The most intensively studied process for producing vanillin by bioconversion, which then can be designated "natural", is based on the substrate ferulic acid (4-hydroxy-3-methoxy-*trans*-cinnamic acid). Ferulic acid is the most abundant hydroxycinnamic acid in the plant world and occurs mainly in cell walls covalently linked to lignin and other polymers. Several different pathways have been proposed for the degradation of ferulic acid. The genes consisting of the CoA-dependent pathway, *fcs* and *ech*, encoding feruloyl-CoA-synthetase and enoyl-CoA-hydratase/aldolase respectively, can catalyze the conversion of ferulic acid to vanillin.

In our study, the *fcs* and *ech* genes were cloned from *Amycolatopsis* sp. HR104 by PCR, transferred to pBAD24 expression vector, and then resulted in pDAHEF. The recombinant *E. coli* harboring pDAHEF was used for vanillin production. In order to optimize induction condition of the recombinant *E. coli*, we investigated the concentration of inducer, arabinose and induction time on vanillin production. The optimum condition of induction was 0.2% arabinose induced at 18 hours of cultivation. Vanillin production was also maximized when 0.1% (w/v) ferulic acid was fed at induction point of 18 hours during cultivation, about 400mg/L of vanillin was obtained. Also, galactose as C-source and less complex media may assist the production of vanillin.

Both of the genes cloned from *Amycolatopsis* sp. HR104, were also transferred to pTrc99A expression vector, which resulted in pTAHEF. The

recombinant *E. coli* harboring pTAHEF converted 0.1% and 0.2% ferulic acid to 650mg/L and 1200mg/L of vanillin, respectively. Because vanillin is a highly toxic substance for most bacteria, it is possible to use some nonionic resins which enable vanillin to be trapped and its concentration to be maintained below the threshold of toxicity. Vanillin production increased with the use of XAD-2 resin, and 18.1g/L of ferulic acid was converted to 9.2g/L of vanillin using 10g XAD-2 resin under mimicking resting cell bioconversion. Citrate synthase gene *gltA* was also proved to increase the production of vanillin.

As mentioned above, vanillin is a highly toxic substance for most bacteria. There was a notable inhibition of *E. coli* at a vanillin concentration of 0.1% and the cell was no longer able to grow at concentrations higher than 0.25%. Therefore, we made the *E. coli* mutant which could grow at a vanillin concentration of 0.2% through NTG mutation increasing the tolerance of cells to vanillin. The highest yield of vanillin was obtained with the *E. coli* mutant harboring pTAHEF when it was cultivated for 48 hours in 2YT media containing ampicillin at 37°C using shaking water bath with agitation of 180rpm. Under this cultivation condition, 1.94g/L of vanillin was produced from 0.3% ferulic acid. While using the normal *E. coli*, only half amount of vanillin was produced from the 0.3% ferulic acid.

In order to minimize the toxicity of vanillin on its producing recombinant *E. coli*, a new bioreactor was developed. It is composed of two vessel for cell growth and continuous extraction of vanillin. When ferulic acid was supplied into the culture using the new bioreactor at concentration of 0.22% every 12 hours, 6.2g/L of vanillin was obtained.

In order to efficient extraction and purification of ferulic acid from agricultural by-products including sweet potato tissues. Among agricultural by products and forest species that are potential sources of ferulic acid, sweet potato is probably one of promising, since it contains the high amount of phenylpropanoid and ferulic acid. Chemical and physical treatment have been tested to improve ferulic acid release.

Qercus variabilis was possess of most abundant of acid insoluble and acid

soluble phenylpropanoid compound among the selected hardwood species. *Q. variabilis* was suitable for this study, because this species was easy of supply in side of actuality.

Vanillin was final product of this study, and to production of vanillin, sweet potato stem thought to the most suitable source because of edible resource. However, amount of phenylpropanoid compound from sweet potato stem was lower than other agricultural by-products. But in Korea, food- and drug-related products or permission and registration of the materials were necessarily limited in the resources which is eatable. But, contents of phenylpropanoid compound from agricultural by-products such as tomato or sesame stem were consisted over 25% of total raw material weight.

Both Extract yield and phenylpropanoid compound yield was risen from sulfuric acid addition reaction, but clear relation was not appear between both yield from acetic acid addition reaction. From the condition which does not consider an economic problem, it was decided that using the alkali for 90 min at room temperature was most profitable. At this time, the yield of phenylpropanoid compound was 403.5 mg, the value was approximately 40% when this changes into dry weight basis of input materials.

Also when using the alkali was react at 120°C, yield of phenylpropanoid compound was higher, approximately 2.5-fold, than reaction by acid. Finally, to optimal production, the condition of alkali treated reaction from sweet potato stem was profitable than pre-treated lignocellulose, and to production of ferulic acid, it was decided that pre-treated lignocellulose material used only distilled water in short time high temperature (120°C) was profitable than sweet potato stem.

In this results, it required about ₩20,000 won for production of 1g ferulic acid from pre-treated lignocellulose. The method with material as pre-treated lignocellulose was reduced approximately 50% of expenditure than production of ferulic acid from sweet potato setm. Most of the cost was reactor which constituted electric charges of room temperature stirrer equipment and collection equipment. Therefore it is thought that scale up is enough to economical

efficiency.

Finally, most of phenylpropanoid compound was 95% exceed the ethyl acetate insoluble fraction. To separate and purify of ferulic acid which is manufacturing material of bio vanillin from sweet potato stem and woody material one of the agricultural and forest product biomass materials, liquid-liquid chromatography and liquid-solid chromatography technology was applied however, it could not get a satisfied results. Thus, in this section, multi-solvent extraction (liquid-liquid chromatography) and silica-gel column chromatography (liquid-solid chromatography) were consecutively applied to separate of ferulic acid.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Summary of Research	15
Session 1. Objectives	15
1. Final Goal	15
2. Yearly Goal	15
Session 2. Necessity	15
Chapter 2. International and Domestic Technology Status	23
Session 1. Production Natural Vanillin	23
Session 2. Chemical Engineering	26
Session 3. Production of Bio-vanillin	28
Session 4. Domestic Researches	34
Session 5. Perspectives	34
Session 6. Introduction of Technology	35

Chapter 3. Methods and Results	36
Session 1. Methods	36
Session 2. A Yearly Research Development	37
Session 3. Research of Design	40
Session 4. Strategy of Research	59
Session 5. Results	60
 Chapter 4. Achievement and Contribution to related fields	 156
Session 1. The Point of Research Evaluation	156
Session 2. Yearly Achievement	157
Session 3. Achievement and Contribution to related fields	161
 Chapter 5. Application of results	 163
 Chapter 6. Information collected from Overseas	 164

Chapter 7. References 165

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	15
제 1 절 연구개발의 목적	15
1. 최종목적	15
2. 단계별 목표	15
제 2 절 연구개발의 필요성	15
1. 기술적 측면	15
2. 경제·산업적 측면	20
3. 사회·문화적 측면	22
제 2 장 국내외 기술개발현황	23
제 1 절 천연바닐린의 생산	23
1. 재배에 의한 바닐린 생산	23
2. 바닐라 꼬투리 가공	26
3. 용매추출	26
제 2 절 화학합성 바닐린의 생산	26
1. Coniferin으로부터 바닐린 생산	27
2. Eugenol로부터 바닐린 생산	27
3. Lignin으로부터 바닐린 생산	27
4. Guaiacol로부터 바닐린 생산	27
제 3 절 바이오 바닐린의 생산	28
1. 식물세포배양에 의한 바닐린 전구체의 생물전환	31
2. 미생물 배양에 의한 바닐린 전구체의 생물전환	31

3.	바닐린 대사경로의 유전자원 및 대사공학에의 응용	31
4.	페룰산 대사능과 바닐린 내성이 큰 돌연변이주의 개발	32
5.	고 생산성 바닐린 생산공정 개발 연구	32
제 4 절	국내 관련기술	34
제 5 절	앞으로 전망	34
제 6 절	기술도입의 타당성	35
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	36
제 1 절	연구개발 목표와 내용	36
1.	총괄목표	36
2.	세부과제별 목표 및 내용	36
제 2 절	연차별 연구개발 목표와 내용	37
제 3 절	연구개발 및 설계	40
1.	제 1 세부과제	40
2.	제 2 세부과제	46
제 4 절	연구개발 추진체계	59
제 5 절	연구수행 결과	60
1.	제 1 세부과제	60
2.	제 2 세부과제	110
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	156

제 1 절	연구평가의 착안점	156
제 2 절	연구개발 목표 측면에서의 달성도 평가	157
1.	제 1 세부과제	157
2.	제 2 세부과제	159
제 3 절	관련분야 및 기술발전예의 기여도	161
1.	기술적 측면	161
2.	경제 · 산업적 측면	161
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	163
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	164
제 7 장	참고문헌	165

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발 목적

1. 최종목적

농산 및 임산부산물 등으로 부터 얻어진 페룰산을 미생물을 이용하여 식품 및 제약원료인 바닐린으로 전환하는 생물공정기술의 개발

2. 단계별 목표

- 가. 자연계에서 우수한 바닐린 생산균주의 분리 및 동정
- 나. 분리된 균주의 돌연변이를 통한 바닐린 생산성 향상
- 다. 기존 바닐린 생산균주로부터 바닐린 대사경로 유전자원들의 확보
- 라. Lignocellulose 원료로부터 바닐린 전구체 생산기술 개발
- 마. 바닐린 대사경로 조절에 의한 바닐린 생산 및 생물반응기 개발
- 바. 페룰산에서 바닐린 전환 반응의 최적화로 바이오바닐린 생산

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

가. 바닐린의 정의 및 이용

바닐린(vanillin)은 식품첨가물 등에 널리 쓰이는 향료의 주요성분으로서 특유의 달콤한 방향을 가지는 백색 또는 담황색의 물질로 그 산업적 용도는 매우 다양하며 그 이용도 또한 매년 늘어가고 있다 (Table 1). 바닐라향은 바닐린을 비롯하여 vanillic acid, vanillyl alcohol 이외에 200여 종류가 넘는 휘발성 화학물질이 관여하고 있으나 그 중 바닐린이 가장 크게 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 바닐린은 식품첨가물 이외에도 정유 또는 향수 등 방향목적의 제품에 널리 쓰이며 특히 최근에는 향산화, 향돌연변이 및 향균 활성에 관한 연구가 다수 보고되었고, 결핵, 종양, 빈혈, 혈전, 건선, 골다공증, 고혈압등에도 효과가 있는 것으로 보고되어 의약산업에도 활발히

이용될 것으로 전망하고 있다.

천연 바닐라 (vanilla)향은 멕시코가 원산인 *Vanilla fragrans*, *V. planifolia*, *V. pompona*, 그리고 *V. tahitensis* 등과 같은 난과 (Orchidaceae) 식물의 꼬투리에서 추출되는데, 이 가운데 *V. planifolia*가 생산하는 바닐라의 품질이 가장 우수하고 식품 첨가제 등의 원료로 사용하기 위해 주로 재배되고 있다 (Fig. 1). 바닐라 식물의 재배는 1500년대 이전에 멕시코 원주민에 의해 재배되고 있었으며 현재에는 인도양의 적도부근 섬 지역, 마다가스카르, 자바, 자메이카, 기타 적도 지역에서 재배되고 있다. 바닐라 식물 성숙 꼬투리에 함유되어 있는 바닐라 향은 주성분으로서 vanillin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde)과 기타 vanillic acid, *p*-hydroxybenzaldehyde, *p*-hydroxybenzyl methyl ether 등을 포함하고 있으며 그 화학적 구조와 함량은 Fig. 2 및 Table 2와 같다. Table 2에 나타난 성분 이외에 미량 함유 성분으로 약 170여 종의 휘발성 방향족화합물이 분리 동정되어 있다.

Table 1. Industrial Application of Vanillin Flavor

용도	제품의 종류
식품	아이스크림, 제과류, 제빵류, 음료수, 주류, 담배, 조미료, 유제품, 이유식, 육가공품 등
향료	향수, 화장품, 방향제, 정유, 탈취제 등
의약	의약착향제, 항산화제, 항암제, 피부질환제, 진통제, 항염, 항혈전제, 항균제, 혈압강하 등

(A)

(B)

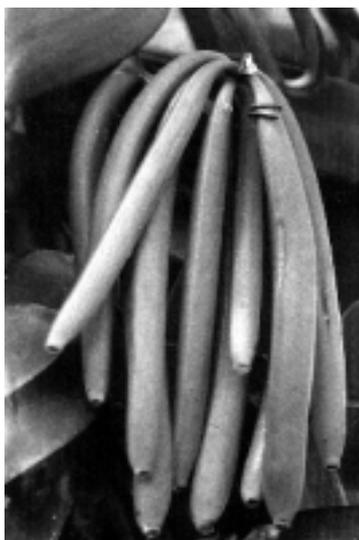


Fig 1. Molecular structure of vanillin (A) and its producer, green vanilla pods (B)

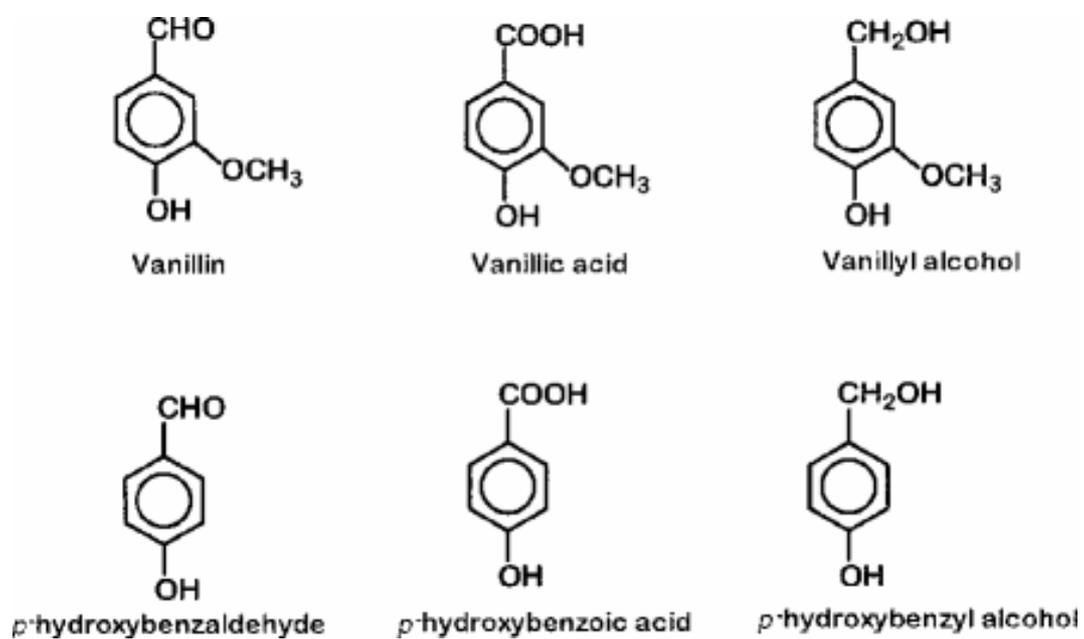


Fig. 2. Chemical structure of major vanilla flavor compounds

Table 2. Major components of cured vanilla pod

Component	Content (g/kg)
Vanillin	20
Vanillic acid	1
<i>p</i> -Hydroxybenzaldehyde	2
<i>p</i> -Hydroxybenzyl methyl ether	0.2
Sugars	250
Fat	150
Cellulose	150-300
Minerals	60
Water	350

나. 바닐린의 생산 및 수요에 따른 문제점

바닐린의 원료인 바닐라콩은 열대성 난초과 덩굴식물이며, 주로 마다가스카르, 인도네시아, 코모로스 및 멕시코 등지에서 재배된다. 바닐라콩의 재배는 기후에 민감하며 손수 수확되어 삶거나 건조하며 여러 달 동안 숙성시킨 후 알코올 등으로 추출하게 되어 많은 시간과 비용이 들게 된다. 이러한 가공과정의 복잡성 때문에 천연 바닐린의 가치는 거의 4,000달러/kg에 이른다. 이에 반하여 화학적으로 합성하는 바닐린은 12달러/kg 정도로 매우 저렴하며, 주로 페놀(phenol)이나 톨루엔(toluene) 등의 석유화학물질 또는 펄프 폐액의 리그닌(lignin) 등에서 합성된 구아이아콜(guaiacol), 유게놀(eugenol)등을 다소 유독한 물질 이용하여 생산하게 된다. 따라서 화학합성은 환경친화적이지 못한 부산물들이 발생하여 소비자들에게 좋은 인식을 받지 못하고 있다. 이러한 이유로 천연 바닐린은 4,000달러/kg이라는 고가임에도 불구하고 소비자들이 선호함에 따라 공급이 수요를 만족시키지 못하고 있다.

다. 바이오바닐린의 정의와 생산공정 개발의 필요성

현재 바닐린 소비량은 연간 12,000톤에 이르지만 공급가능한 천연바닐린의 양은 20톤에 불과하여 대체생산법이 절실히 요구되고 있다. 이 중 가장 효과적인 방법으로 인식되고 있는 것은 생명공학 기술을 이용한 바이오바닐린 생산이다. 바이오바닐린이란 미생물 배양 또는 식물세포배양을 통해 생산되는 바닐린으로 천연 바닐린과 유사한 품질을 가지며 안전성이 있고 친환경적인 제품을 말한다. 현재 이러한 바이오바닐린을 생산하려는 연구가 최근 선진국(미국, 일본, 독일 등)에서 많이 수행되고 있으며 이러한 바이오바닐린은 2000달러/kg으로 판매될 것으로 예상하고 있다.

2. 경제·산업적 측면

가. 바닐린 수입대체 및 수출효과

천연바닐린 원료인 바닐라콩은 국내재배가 불가능하고 화학합성바닐린은 국내 생산기술 및 시설의 미비로 현재 소비되는 바닐린은 전량 수입에 의존하고 있다. 이러한 바닐린 수입량은 매년 10톤정도로 20억원에 달하고 있으며 계속 증가하는 추세이다. 그러므로 국내에서 바닐린을 경제적으로 생산할 수 있는 연구가 성공한다면 막대한 수입대체효과를 얻을 수 있을 것이다. 즉 환경친화적이고 부가가치가 높은 생명공학기술을 이용한 바이오바닐린을 생산하는 공정개발이 절실하다. 이러한 바이오

바닐린은 전세계적으로 그 공급량이 부족한 천연바닐린에 대한 수요를 대체할 수 있을 것이므로 수입대체 뿐만 아니라 해외수출의 이익도 얻을 수 있을 것으로 예상된다.

나. 국내 식품 산업 및 제약 산업의 발전

바닐린으로 대변되는 바닐라 향은 세계적으로 가장 선호하는 향료 가운데 하나다. 바닐라 향은 초콜릿, 아이스크림, 빵, 비스킷, 위스키, 브랜디, 커피, 음료, 기타 제과 등의 식품산업이나 화장품산업에서 향수의 구성성분 등으로서 용도가 매우 다양하다. 또한, 바닐린은 항균활성 뿐만 아니라 항변이원성을 나타내며, 해파리 독을 중화하는 작용이외에 여러 가지 생리활성이 밝혀지고 있어 약학적으로도 중요한 화합물의 하나이다.

고품질의 바이오 바닐린을 저렴한 가격에 공급함으로써 바닐린을 원료로 이용하는 국내 식품산업 및 제약 산업의 발전을 기대할 수 있을 것이다. 현재 국내의 바닐린 소비량은 전세계 연간 소비량인 12,000톤의 0.08%에 불과하다. 이것은 국내 식품 및 제약 산업의 규모로 볼 때 매우 적은 양이라고 할 수 있다. 이런 결과는 국내에서 바닐린이 생산되지 않고 전량 수입에 의존하기 때문이다. 따라서, 바닐린 생산 연구의 성공적인 상업화는 국내 식품산업 및 제약 산업이 진일보하는 계기가 될 것이다.

다. 국내 간벌재 및 폐잔재 이용의 필요성

최근 일본 정부에서 간벌재 사용을 규정화한 그린(green) 구입법을 실행함에 따라 국내에서도 간벌재나 폐잔재의 이용에 대한 구체적인 방안마련이 필요하다고 사료된다. 목재 및 농산폐재는 친환경적이기 때문에 이를 합리적으로 사용한다는 것은 매우 중요한 의미를 내포하고 있다. 우리 나라에서는 매년 약 150만m³의 간벌재가 생산되며, 일부가 표고자목, 펄프재, 톱밥 등에 이용되고 있을 뿐 제도적인 이용은 이루어지지 않고 있다. 또한 많은 농가에서 매년 다량 발생하는 볏짚 등도 특별한 사용방안이 마련되어 있지 않아 일부가 가축 사료로 이용될 뿐 대부분 버려지게 되어 이러한 부산물의 이용을 위한 방안이 필요하리라 생각된다. 목재 및 볏짚 등은 리그닌의 풍부한 보고로서 알카리처리 등의 화학적 방법 및 리그닌 과산화효소를 처리하는 생물학적 방법 등으로 산화시켜 폐를산을 제조하게 된다.

3. 사회·문화적 측면

가. 증가하는 천연물질 선호에 따른 수요 증대 필요

소비자들의 건강에 대한 관심이 증가함에 따라 값이 비싸더라도 천연 식품을 구입하려는 소비자들의 경향이 증가하고 있는 추세이다. 그러나 천연바닐린 공급량의 부족으로 이러한 국내 소비자의 요구를 충족시키지 못하는 실정에서 바이오 바닐린은 천연바닐린에 대한 대체 물질로서 소비자의 욕구 충족 및 국민 생활의 질을 향상시킬 수 있는 대안이 될 것이다.

나. 식품 안정성 확보 필요

식품에 적용시키기 위해 생명공학 기법을 통한 천연과 동일한 화합물의 생산에 대한 중요성이 증가하고 있는데 이는 식품의 안전성 측면에 있어 소비자의 관심이 증가하고 있기 때문이다. 화학적 방법을 통한 바닐라 생산의 경우 독성이 강한 구아니아콜을 사용하게 되는데 이는 환경적으로 안전하지 못하다. 따라서 화학합성 바닐린보다 안전한 바이오 바닐린은 국민 보건 향상에 기여할 수 있을 것이다.

다. 임가 및 농가의 소득원 확보 필요

현재 산촌 및 농촌의 경제상황이 좋지 못하여 인구수가 줄어들고 있어 이들 업종에 대한 대안적 소득원 마련이 필요하다. 이에 따라 대부분 방치되어 버려지고 있는 임가 및 농가의 부산물을 바닐라의 전구체 개발 산업에 이용한다면 이들 재료 공급에 따른 비용을 지불함으로써 임가 및 농가에 소득원이 될 수 있다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 천연바닐린의 생산

바닐라식물은 현재 대략 110종이 동정되었지만, 상업적·재배적 측면에서 3종만이 중요하다고 보고되고 있는 실정이다. 바닐라콩은 연평균 190~230cm의 강우량과 최저 및 최고 평균 기온이 각각 24℃와 30℃인 열대지역에서만 재배되기 때문에 천연 바닐라 공급은 한정되어 있다. 또한 바닐라콩의 재배는 인공수분을 해주어야 하며, 10~12개월 정도 성숙된 열매에서 바닐라를 얻을 수 있기 때문에 시일이 많이 걸려 생산이 비효율적이다. 현재 바닐라 향을 생산하는 회사들은 Table 3과 같고, 바닐라콩 시장의 크기는 Table 4와 같다.

1. 재배에 의한 바닐린 생산

1500년대 초반 바닐라가 유럽에 소개된 후 바닐라 유럽에서는 바닐라를 상업적으로 재배하려는 시도가 있었으나 성공적이지는 못했다. 그 이유는 바닐라 식물이 개화 후 자연적으로는 수분이 어려워 꼬투리를 형성하는 비율이 매우 낮아 이로부터 효과적으로 성숙된 바닐라 꼬투리를 생산하지 못하였다. 이 후 1840년대 이르러 Charles Morren이라는 사람에 의해 인공수분법이 개발되어 상업적으로 바닐라를 재배하여 생산하기 시작하였다. 바닐라 꼬투리를 효과적으로 생산하기 위해서는 바닐라 식물 재배뿐만 아니라 인공수분을 하는데 있어 노동집약적이라는 단점이 있다. 현재 바닐라는 노동력이 풍부한 열대국가에서 재배되고 있다. 바닐라는 개화 후 약 5개월에 걸쳐 꼬투리가 맺히고 성숙된다. 성숙된 바닐라 꼬투리는 수확 후 살청(killing), 발한(sweating), 건조(drying) 그리고 조정(conditioning)에 의해 가공되어 그대로 향신료 등으로 사용되거나 가공된 바닐라 꼬투리를 용매로 추출하여 제품화 한다. 이러한 공정을 간단히 설명하면 다음과 같다.

Table 3. Companies producing vanillin flavor

1	ESC Agenetics Corporation, San Carlos, CA, USA
2	David Michael Co Inc, Philadelphia, PA, USA
3	Nielsen-Massery Vanilas Inc, Waukegan, NJ, USA
4	Premier Vanila Inc, East Brunswick, NJ, USA
5	Viginia Dare, Brooklyn, NY, USA
6	Gernot Katzer, USA
7	Aust and Hachmann Ltd, Montreal, Canada
8	Food Research and Development Centre, Quebec, Canada
9	Haarmann and Reimer (H&R), Holzminden, Germany

Table 4. Market estimation of vanilla pod production from *Vanilla fragrans* and *V. planifolia* for flavor use

Company	Production (t/a)
Madagascar	950 - 1400
Indonesia	150 - 300
Comoros	150 - 200
Tonga	30 - 40
Mexico	20 - 40
Uganda	20 - 40
Fr. Polynesia	20
Reunion	20
India	10 - 30
China	10 - 20
Costa Rica/Guatemala	3 - 5
Others	300 - 800
Worldwide	2200 - 2400

2. 바닐라 꼬투리 가공

살청: 수확한 바닐라 꼬투리의 호흡활성을 정지시키고 세포 구조를 파괴시켜 세포내 바닐린 형과 관계된 여러 가지 효소를 기질과 접촉시켜 바닐린 수율을 높이는 과정이다. 살청방법에는 열수 데치기, 태양열 데치기, 오븐 볶기, 파쇄 (scarification), 동결, 에틸렌 처리 등의 방법이 있는데, 열수 데치기, 태양열 데치기 및 오븐 볶기 등의 방법이 효과적이다.

발한: 7 - 10일간에 걸쳐 부분적으로 수분을 제거함으로써 다음 단계 공정에서 미생물 번식을 막고 꼬투리에 있는 효소 작용으로 바닐라 향 관련 물질을 생성시키는 과정이다. 일반적으로 바닐린은 배당체 형태로 축적되어 있는데 이 과정으로 당쇄 결합이 분해되어 바닐린을 유리시킨다. 이 과정에서 페놀 관련 물질의 산화 등으로 바닐라 꼬투리는 초콜릿과 같은 특유의 암갈색으로 변화한다.

건조: 발한과정을 경과한 바닐라 꼬투리는 60 - 70%의 수분을 함유하고 있어 미생물에 의한 부패를 막고 바람직하지 않은 효소활성을 정지시키기 위해 수분 함량을 25 - 30% 수준으로 낮추는 과정이다.

조정: 수개월 동안 밀폐된 상자에 건조시킨 바닐라 꼬투리를 쌓아두어 에스테르화, 에테르화, 산화적인 분해 등의 과정을 유도하여 여러 가지 방향족 휘발성 향기를 생성시키는 과정이다.

3. 용매추출

35 - 50% ethanol 1 리터에 가공된 바닐라 꼬투리 100 그램의 비율로 침지시켜 바닐라 향을 추출시키고 숙성시키는 방법이다. 상업적으로 천연 바닐린은 ethanol 추출물 형태로 유통된다.

제 2 절 화학합성 바닐린의 생산

합성바닐린을 생산하는 국가는 미국, 일본, 프랑스, 스위스, 독일 등의 정밀화학기술이 발달한 선진국이 대부분이며 최근 중국 및 싱가포르에서도 합성바닐린을 생산하기 시작하였다. 현재 합성바닐린 수요의 대부분은 코니페린, 구아이아콜, 유계놀 및

리그닌을 전구물질로 한 화학적 합성 기법을 통해 충족하고 있으나, 코니페린을 전구체로 하여 합성할 경우 35% 수율의 바닐린을 얻기 위해 약 5,000그루의 전나무와 소나무의 형성층 수액을 필요로하므로 경제성이 없다. 또한 사용되는 구아이아콜과 유계놀등은 페놀과 톨루엔등에서 정밀화학을 통해 합성되는 물질로, 안전성에 문제가 될 수 있을 뿐 아니라 리그닌 또한 대부분 아황산 펄프폐액에서 분리되므로 안전성 문제를 배제할 수 없는 실정이다.

1. Coniferin으로부터 바닐린 생산

소나무 등의 침엽수로부터 추출한 coniferin을 황산에서 촉매로서 potassium dichromate 존재 하에 바닐린으로 산화시키는 방법으로 coniferin 1kg으로부터 바닐린을 350g 수율로 생산이 가능하다. 생산단가가 매우 비싸다.

2. Eugenol로부터 바닐린 생산

현재 화학적인 방법으로 바닐린을 생산하는 방법 가운데 하나로 3가지 방법이 있다. 첫 번째 방법은 eugenol을 diethyleneglycol에서 potassium hydroxide로 isoeugenol로 전환시킨 다음 osmium tetroxide/sodium metaperiodate 시스템으로 산화시켜 바닐린을 생산하는 방법이다. 두 번째 방법은 isoeugenol을 tert-butyl alcohol에서 vanadium pentoxide/H₂O₂ 시스템으로 산화시키는 방법이다. 세 번째 방법은 eugenol을 염기성 DMSO 용액에서 nitrobenzen으로 직접 산화시키는 방법이다.

3. Lignin으로부터 바닐린 생산

종이 산업의 부산물로부터 얻어지는 아황산펄프 폐액에는 다량의 lignin이 존재하는데, lignin을 산화제 존재 하에 고온 고압으로 처리하여 lignin 구성성분을 분해시키고 산화시켜 바닐린을 생산하는 방법이다. 생산된 바닐린은 부산물을 제거하고 추출 결정화 및 재결정화 공정을 거쳐 바닐린을 생산한다.

4. Guaiacol로부터 바닐린 생산

이 방법은 guaiacol에 glyoxylic acid를 붙이고 산화시켜 4-hydroxy-3-methoxymandelic acid로 전환시킨 다음 다시 nitrobenzen이나 copper oxide로 산화시켜 바닐린을 생산하는 방법이다.

제 3 절 바이오 바닐린의 생산

바이오바닐린의 생산기술은 아직은 대부분 연구단계에 있으며 미국 등의 선진국에서는 곧 실용화 할 수 있을 것으로 전망하고 있다. 현재 연구되고 있는 바이오바닐린 생산기술은 미생물배양기술이나 식물조직배양이 대부분을 차지하며 특히 미생물에 대한 연구가 활발하다. 현재까지 활발히 연구되고 있고 또한 우수하다고 평가된 미생물에는 *Pseudomonas sp.*, *Amycolatopsis sp.*, *Streptomyces sp.* 등의 세균을 비롯하여 여러 곰팡이와 효모가 알려져 있으며 그 대사경로와 유전자원이 일부 밝혀져 있다. 알려져 있는 페룰산 (ferulic acid) → 바닐린 간의 대사경로는 nonoxidative decarboxylation, CoA-dependent deacetylation, side chain reduction, CoA-independent deacetylation의 4가지가 있다 (Fig. 3). 바닐린은 phenylalanine을 시발물질로 하여 여러 phenylpropanoid 전구체들로부터 생합성 된다. 여러 가지 phenylpropanoid 구성 대사 중간체 가운데 자연계에 널리 분포하고 있는 물질을 바닐린 생산을 위한 원료로 사용할 수 있다. 자연계에서 그 양이 많으며 리그닌 등의 구성분이기도 한 eugenol 및 ferulic acid로부터 바닐린에 이르는 생합성 경로를 살펴보면 Fig. 4과 같다. Fig. 4에서 나타낸 바닐린 생합성 전구체를 효율적으로 생산하고 바닐린 생합성과 관련된 효소 유전자를 재조합시키면 대사공학적 방법에 의해 보다 효율적으로 바닐린을 생산할 수 있다.

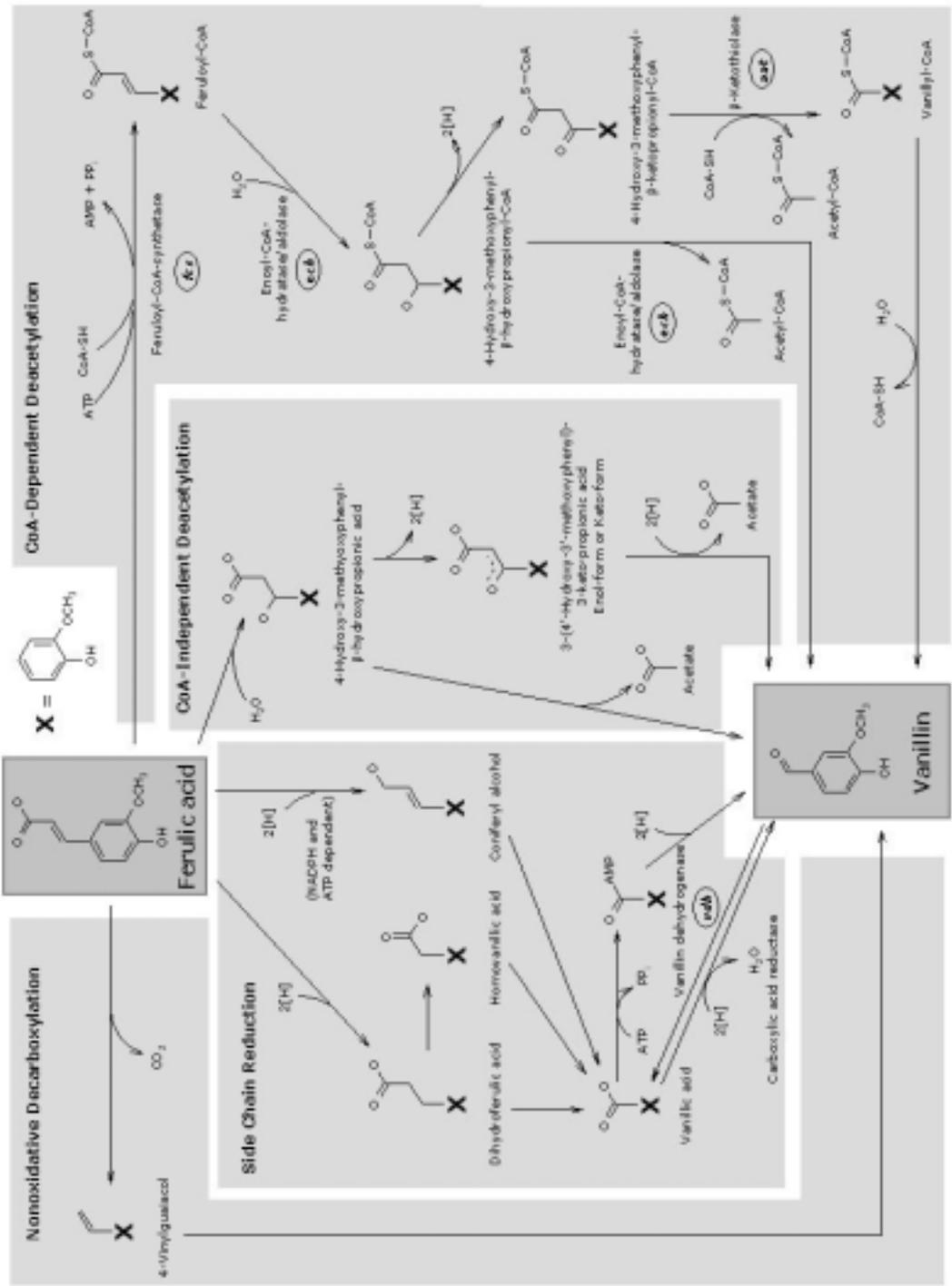


Fig. 3. Four different pathways from ferulic acid to vanillin

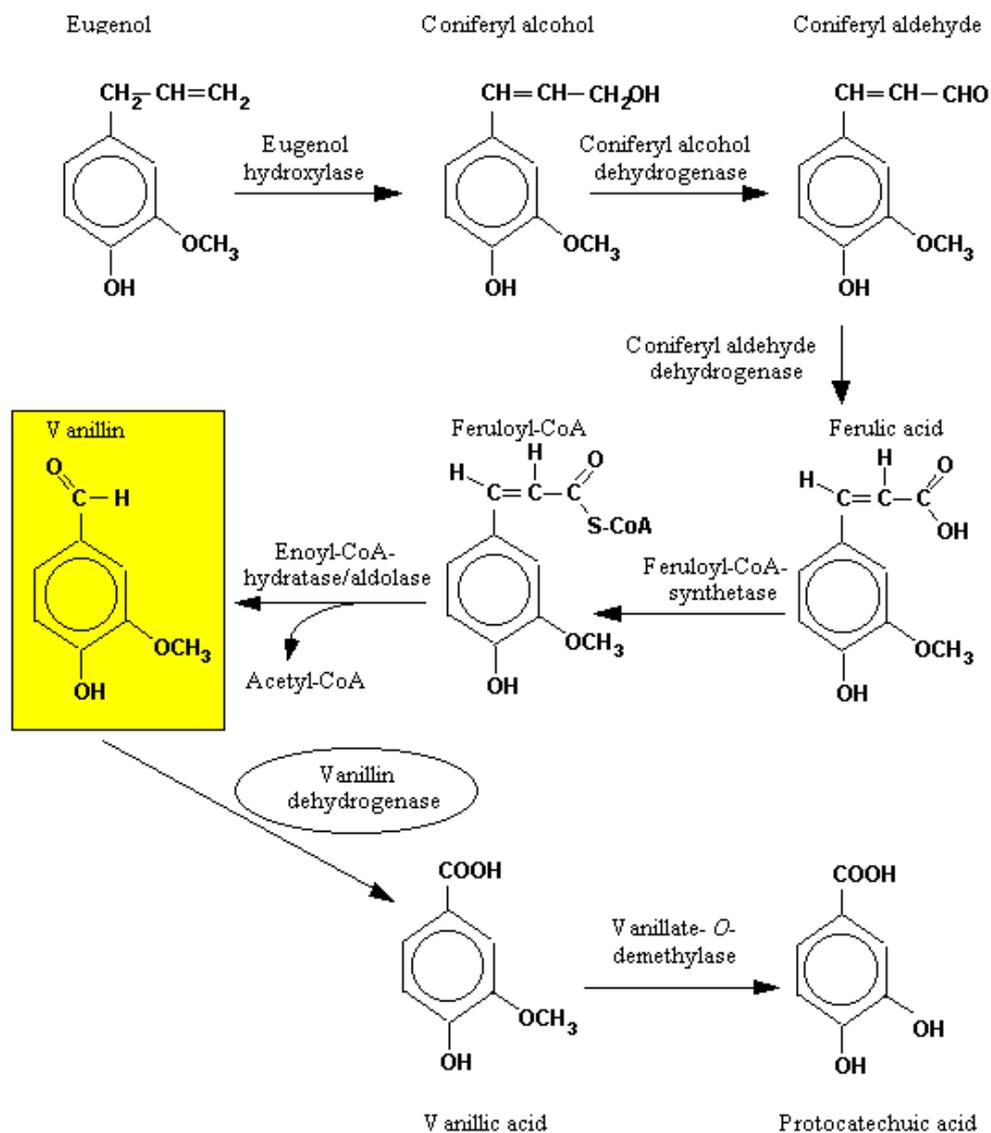


Fig. 4. The route from eugenol to ferulic acid and from ferulic acid to vanillin and its degradation into protocatechuic acid in *Pseudomonas* sp.

1. 식물세포배양에 의한 바닐린 전구체의 생물전환

*V. planifolia*로부터 유도한 세포에 대사전구체를 간헐적으로 첨가하면서 바닐린을 생산하는 방법이다. 이러한 방법은 *V. planifolia*로부터 유도한 세포가 원래의 식물체와 동일한 유전적 구성과 대사의 전능성을 갖고 있기 때문에 가능하다. 바닐라 꼬투리와 비교하여 5 - 10배 높은 농도로 바닐린 생산이 가능한 것으로 보고되고 있다. 이밖에 고추속 식물의 세포배양을 통해 ferulic acid로부터 바닐린 생산이 가능한 것으로 보고되고 있다.

2. 미생물 배양에 의한 바닐린 전구체의 생물전환

다수의 미생물이 ferulic acid, eugenol, isoeugenol 등과 같은 phenylpropanoid 전구체로부터 바닐린을 생산할 수 있는 능력이 있는 것으로 보고되고 있다. Table 5에서 보는바와 같이 다수의 미생물이 ferulic acid 또는 eugenol로부터 바닐린 생산의 예가 있으며, 이 가운데 *Sterptomyces setonii*의 경우 50여 시간 배양으로 68%의 분자수율로 ferulic acid로부터 리터당 6.4g의 바닐린 생산이 가능한 것으로 보고되어 있어 경제성이 매우 높은 것으로 판단된다. 생산된 바닐린은 배지를 산성화한 다음 용매로 추출하거나 XAD-4 등과 같은 Amberlite 흡착제로 흡착 시킨 후 알코올로 용출시켜 농축 및 결정화시켜 회수한다.

3. 바닐린 대사경로의 유전자원 및 대사공학에의 응용

페룰산에서 바닐린으로 전환되는 대사경로는 CoA-dependent deacetylation 경로가 가장 많이 연구되었고, 이 경로에서 페룰산은 feruloyl-CoA synthetase에 의해 feruloyl-CoA를 거쳐 enoyl-CoA-hydratase/aldolase의 촉매를 받아 바닐린으로 전환되며, 이 경로에 관여하는 두 유전자는 각각 fcs, ech 이다. 이들 유전자는 *Pseudomonas sp.* strain HR199, *Amycolatopsis sp.* strain HR167, *Delftia acidovorans* 등에서 클로닝 되어 보고되고 있으나 이들 유전자를 이용한 대사공학 연구는 아직 보고된 바가 없다. 본 연구그룹 (제 1세부과제)에서는 배양이 용이하고 생육속도가 빠른 대장균에 상기 유전자들을 도입해서 페룰산으로부터 바닐린으로 전환시키는 공정시간을 단축하고 바닐린 생산수율과 순도를 높이는 연구를 수행하려고 한

다. 다음으로 분리된 바닐린 생산균주들로부터 새로운 바닐린 유전자원들을 Southern hybridization 방법이나 Shotgun cloning 방법 등을 이용해서 클로닝하고 이들 유전자를 다시 대장균이나 얻어진 우량균주에 도입해서 페룰산에서 바닐린으로 전환속도와 수율이 향상된 재조합 균주를 확보하려고 한다.

4. 페룰산 대사능과 바닐린 내성이 큰 돌연변이주의 개발

바닐린 생산균주를 돌연변이 시켜서 페룰산을 바닐린으로 전환하는 대사능력이 향상되고 또한 생성된 최종 산물인 바닐린의 독성에 내성을 갖는 돌연변이주를 개발하려는 시도는 아직 없었다. 본 연구그룹은 바닐린 생산균주에 NTG 또는 UV를 이용한 돌연변이를 유발시키고 고농도(5%이상)의 페룰산이 포함되어있는 배지에서 생육 및 바닐린 생산성이 우수한 돌연변이주를 선발해서 페룰산 대사능이 향상된 돌연변이주를 개발하려고 한다. 아울러 고농도의 바닐린(5%이상)이 첨가된 배지에서 생육이 왕성한 돌연변이주를 선발함으로써 바닐린 내성을 갖는 균주를 개발할 계획이다.

5. 고 생산성 바닐린 생산공정 개발 연구

바닐린은 미생물에 독성을 가지고 있어서 바닐린 생산균주는 자신이 생성한 바닐린에 의해서 생육과 바닐린 생산이 저해되는 경향이 있다. 그래서 소수성 흡착제(Amberlite XAD-S)를 배양액에 첨가해서 생산된 바닐린을 흡착함으로써 바닐린에 의한 독성을 줄이고 생성된 바닐린이 다른 중간대사 산물들로 분해되는 것을 방지하는 연구가 시도 되었으나 경제성이 없는 것으로 보고되고 있다. 그 이외에 생산공정 개발에 관한 연구는 미미해서 경제성이 있는 생산공정 개발에 관한 연구가 절실하다.

본 연구과제에서는 순환형 생물 반응기를 개발해서 바닐린의 연속적인 회수와 생산을 가능하게 하는 연구를 수행하려고 한다.

Table 5. Biotransformation of phenylpropanoid compounds to vanilla flavor using microorganisms

Microorganisms	Substrate	Product
<i>Aspergillus niger</i>	ferulic acid	vanillin
<i>Pseudomonas acidovorans</i>	ferulic acid	vanillin
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ferulic acid	vanillic acid
<i>Spirulina platensis</i>	ferulic acid	vanillin
<i>Haematococcus pluvialis</i>	ferulic acid	vanillin
<i>Serratia marcescens</i>	ferulic acid	vanillic acid
<i>Streptomyces setonii</i>	ferulic acid	vanillin
<i>Pseudomonas</i> sp.	eugenol	vanillin
<i>Brentanomyces anomalus</i>	ferulic acid caffeic acid coumaric acid	vanillin
<i>Proteus vulgaris</i>	<i>m</i> -methoxytyrosine	vanillin
<i>Arthrobacter globiformis</i>	eugenol	vanillin
<i>Penicillium simplicissimum</i>	vanillyl alcohol	vanillin

제 4 절 국내 관련기술

바닐린의 다양한 용도와 막대한 수요로 인해서 외국에서는 바닐린 생산에 관한 연구들이 방대하게 수행된 반면에 국내에서는 아직 이에 관한 연구가 미비한 상태로 국내에서의 바닐린 생산에 관한 연구가 절실하다. 국내에서는 바닐린으로부터 바닐린산 생산에 관한 연구는 송정화등에 의해서 1994년에 진행되었다. 바닐린산은 주로 리그닌 분해시 생성되는 중간산물로 무색, 무취의 침상 결정체이며, 플라스틱의 자외선 흡수제, 식품보존제, 및 의약품으로 사용되는 ethyl vanillate 유도체와 호흡 및 혈압조절을 위한 강장제로 널리 사용되고 있는 vanillic acid diethyl amide를 생성하는데 있어 전구물질로 사용되고, polyester 합성시의 단량체로 사용되기도 한다. 또한, 바닐린산의 유도체인 5-nitrovanillic acid와 5-aminovanillic acid는 항생작용을 나타내는 것으로 알려져 있다. 미생물에 의한 바닐린산 생산에 대한 연구는 바닐린을 산화할 수 있는 미생물을 토양에서 분리한 이래 바닐린을 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용할 수 있는 *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium* 및 *Serratia*속 등의 여러 미생물에서 활발히 진행되었다.

제 5 절 앞으로 전망

천연 바닐린은 제한된 재배면적과 복잡한 생산과정 때문에 천연 바닐린 수요를 만족시키지 못하고 있다. 따라서 미생물의 배양이나 식물세포조직배양을 통해 생산된 바이오바닐린이 천연바닐린의 대체자원으로써 주목받고 있다. 대부분의 국가에서도 바이오바닐린을 화학합성 바닐린과는 구별하여 천연바닐린과 유사한 원료물질로 인정하고 있기 때문에 바이오바닐린은 합성바닐린에 만족하지 못하는 시장의 수요 상당부분을 대체할 것으로 전망하고 있다. 선발된 우수한 균주 및 유전자원들을 이용해서 바닐린 생산성을 극대화하고, 값싸고 안전한 기질을 이용하며, 대사제어공학기술을 응용한다면 바이오 바닐린 상업화 성공을 확신할 수 있다. 이러한 바이오바닐린 생산공정에 농가 부산물인 간벌재 및 벗짚을 생물 자원화 함으로써 농가소득을 증대시킬 뿐만 아니라 보다 경제적으로 바닐린을 생산할 수 있어 식품 및 의약품 안전성 및 국가 경제에도 큰 도움을 줄 것으로 전망된다.

현재 유통되고 있는 천연 바닐라 향은 원료인 바닐라 식물의 한정된 재배 면

적과 재배기술의 어려움에 기인하여 공급물량이 제한되고 있으며 천연 제품을 선호하는 소비자의 기호에 기인하여 천연 바닐린은 kg당 1200 - 4000달러 정도로 합성 바닐린에 비해 약 300배 이상의 고가로 유통되고 있다. 이러한 소비자의 욕구와 천연 바닐린의 한정된 공급 물량 그리고 높은 가격은 생물공학적인 방법으로 저렴한 가격의 자연친화적인 바이오-바닐린을 생산하려는 동기를 부여하고 있다.

본 과제에서는 농산 폐잔재로부터 바닐린 생산의 기질이 되는 ferulic acid의 효율적인 생산 방법과 바닐린을 ferulic acid로부터 바닐린 생합성과 관련된 feruloyl-CoA ligase와 feruloyl-CoA cleavage enzyme 유전자를 *Escherichia coli*에 재조합시키고 재조합 균주를 사용하여 바닐린을 고효율로 생산하려는 시도를 하였다.

제 6 절 기술도입의 타당성

선진국은 관련 최신기술을 쉽게 이전하지 않을 것이며, 본 연구진만으로도 충분히 본 기술을 개발 할 수 있을 것으로 판단되어 기술도입은 타당성이 없음

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발 목표와 내용

1. 총괄목표

농산 및 임산부산물인 벚꽃 및 간벌재등으로 부터 얻어진 페룰산을 미생물을 이용하여 식품 및 제약 원료인 바닐린으로 전환하는 생물공정기술의 개발

2. 세부과제별 목표 및 내용

가. 제 1세부과제: 대사공학 기술을 통한 바닐린 생산균주의 생산성 개량

- 자연계에서 우수한 바닐린 생산균주의 분리 및 동정
- 분리된 균주의 돌연변이를 통한 바닐린 생산성 향상
- 페룰산 → 바닐린 전환 반응의 최적화
- 새로운 바닐린 생산용 생물 반응기 개발
- 기존 바닐린 생산균주로부터 바닐린 대사경로 유전자원들의 확보
- 대장균에 바닐린 생산 유전자를 도입, 바닐린 생산 균주로 개발
- 바닐린 생산 균주로부터 바닐린 대사경로의 신규 유전자원을 확보하고 기존 유전자들과 바닐린 생산활성의 비교

나. 제 2세부과제: Lignocellulose 원료로부터 바닐린 전구체 생산기술 개발

- 농산, 임산원료에 함유된 페놀성 화합물의 물질군 함량 분석
- 농산, 임산폐기물로부터 최적의 생산원료 선발
- 선발된 원료로부터 저분자 페놀성 화합물 생산을 위한 각종 산 및 알칼리를 사용한 화학적 처리법의 적용
- 물리적 전처리법 구명
- 페룰산 생산을 위한 물리, 화학적 복합 전처리법의 적용 및 생산 가능성 확인
- 저분자 페놀성 화합물군으로부터 페룰산 등 precursor의 분리를 위한 최적조건 탐색

- Precursor를 보다 경제적으로 대량 분리할 수 있는 방법 구명
- 분리된 precursors들의 바닐린으로 생체변환 효율 검정

제 2 절 연차별 연구개발 목표와 내용

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2002)	<p>(제 1세부과제)</p> <ul style="list-style-type: none"> · 바닐린 대사경로 유전자원들의 확보 및 대장균에 도입 <p>(제 2세부과제)</p> <ul style="list-style-type: none"> · Lignocellulose 원료로부터 바닐린 precursors 고함유 원료 선발 	<ul style="list-style-type: none"> · 목본 및 농폐잔재로부터 바닐린 생산균주 분리 · 바닐린 생산성 균주 동정 · 각 미생물 중에 적합한 배양조건 하에서 바닐린 생산성을 측정하고 고생산성 균주 확보 · 페룰산을 바닐린으로 전환시키는 유전자인 <i>fcs</i>와 <i>ech</i>를 PCR기술을 이용해서 cloning · 재조합 대장균을 만들고 도입된 외래 유전자들의 기능적 발현(functional expression) 조사 · 바닐린 유전자를 갖는 재조합 대장균의 페룰산으로부터 바닐린 생산성을 측정하고 바닐린 생산균주로의 이용 가능성을 연구 · UV 및 HPLC를 이용한 페룰산 등 페놀성 물질 분석조건 확립 · 간벌재 및 농산원료에 함유된 페놀성 화합물군의 정량분석 조건 확립 · 간벌재 등 임산물로부터 바닐린 전구체 고함유 원료 탐색 · 볏짚 등 농산부산물로부터 바닐린 전구체 고함유 원료 탐색 · 간벌재 및 농산부산물로부터 바닐린 전구체 생산원료로서의 적합성 평가 · 상기의 결과를 바탕으로 임산 및 농산폐기물로부터 바닐린 전구체 고함유 생산원료 선발

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
2차 년도 (2003)	<p>(제 1세부과제)</p> <ul style="list-style-type: none"> · 우수균주 확보 및 바닐린 대사경로 유전자 원들을 확보하고 기존의 유전자들과 바닐린 생산 활성 비교 <p>(제 2세부과제)</p> <p>효 율 적 인 phenylpropanoid 화합물의 분리를 위한 lignocellulose 원료의 최적 전처리 조건 구 명</p>	<ul style="list-style-type: none"> · 1차년도에 연속해서 우수 바닐린 생산균주 탐색 · 돌연변이에 의한 페룰산을 바닐린로 전환하는 대 사능력이 향상된 돌연변이주를 개발 · 바닐린 생산균주의 genomic DNA library 구축 · 구축된 library로부터 신규 바닐린 생합성 유전자 를 cloning(Southern hybridization 또는 Shotgun method를 사용) · 신규 바닐린 유전자들을 대장균에 도입해서 기능 적 발현을 연구하고 기존 유전자를 갖고 있는 재 조합 대장균과의 바닐린 생산성을 비교 · 재조합 대장균에서 외래 바닐린 유전자들에 의해서 발현되는 바닐린 대사경로 효소들의 활성을 <i>in vitro</i>상에서도 비교 · 상기항의 비교들을 통해서 바닐린 생산활성이 가 장 높은 유전자를 선택 <ul style="list-style-type: none"> · 1차년도에 선발된 최적원료를 유기산, 무기산등으 로 화학적 처리 반응 후 생산된 여과액에 존재하 는 phenylpropanoid 화합물의 함량을 분석. · 다량의 phenylpropanoid 화합물을 생산할 수 있는 최적의 화학반응조건(온도, 시간등)을 구명 · Sodium hydroxide 등의 알칼리 약품을 사용하여 화학적 처리를 실시하여 산처리와 동일하게 phenylpropanoid 화합물 생산을 위한 최적의 알칼 리약품의 선정 및 화학반응 조건을 구명 · 물리·화학적 복합처리법인 고온, 고압 수증기처 리법으로 원료를 처리 한 다음 phenylpropanoid 화합물 생산가능성 확인 · 화학적 처리법과 복합처리법에 있어서 phenyl propanoid 화합물의 생산효율성 비교 및 최적의 처리법 도출 · 최적처리법에 의해 생산된 phenylpropanoid 화합 물에 함유된 페룰산 확인 · 도출된 처리법의 경제성 분석

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
3차 년도 (2004)	<p>(제 1세부과제)</p> <ul style="list-style-type: none"> · 페룰산에서 바닐린으로 전환반응 최적화, 바닐린 생산용 신규 생물 반응기 개발, 대사공학기술을 이용해서 재조합균주들의 바닐린 생산성 극대화 <p>(제 2세부과제)</p> <ul style="list-style-type: none"> · Phenylpropanoid 화합물로부터 미생물 배양용 precursor의 대량 분리기술 개발 	<ul style="list-style-type: none"> · 페룰산에서 바닐린으로 전환되는 반응을 최적화하기 위한 배지조성, 기질(페룰산)농도, 용존산소농도, pH등의 화학적 인자와 배양온도, 교반속도 등의 물리적 인자들을 최적화 · 바닐린 축적으로 야기되는 균체 활성과 산물의 생산성 감소를 방지하기 위하여 최종산물의 연속적 회수가 가능한 소규모 생물반응기를 개발 · 균체 배양에 소요되는 비용과 시간을 줄이기 위한 고정화 균체를 이용한 바닐린 생산 공정개발 · 2차년도에서 확보된 바닐린 생산활성이 가장 높은 유전자를 유전자 진화 기술(DNA shuffling)을 이용해서 더 우수한 유전자를 개량 · 개량된 유전자를 대장균이나 우수 바닐린 생산균주에 도입해서 바닐린 생산성 향상을 추진 · 외래 유전자 도입에 이용되는 vector의 copy number와 promoter strength를 변화시켜가면서 재조합균주에 대사부담을 주지 않으면서 바닐린 생산성은 극대화 · 2차년도에 도출한 최적의 전처리법을 사용하여 phenylpropanoid 화합물 추출조건 검정 · Phenylpropanoid 화합물 중 페룰산의 selectivity 효율을 극대화시키기 위한 liquid-liquid chromatography법 적용 시험 · Silica, PVP, polyamide 등 각종 담체를 이용한 liquid-solid chromatography 법 적용으로 특정 phenylpropanoid 분리 효율 증진 · 분리된 페룰산의 정제순도 분석 · 시판 페룰산과 본 연구의 결과물인 페룰산의 정제성 비교분석

제 3 절 연구개발 방법 및 설계

1. 제 1 세부과제 (대사공학 기술을 이용한 우수 바닐린생산균주 개발)



가. 바닐린 생산균주 탐색 및 우수균주 확보

- 페룰산으로부터 바닐린을 생산하는 균주를 자연계에서 분리하기 위하여 페룰산이 많이 존재하는 썩은 나무나 건초더미에서 시료를 채취한다.
- 세균, 효모, 곰팡이, 방선균 등으로 분리하려는 미생물 균을 나누고, 각 미생물 균에 적합한 enrichment culture와 selection culture 방법을 확립한다.
- 페룰산만이 들어간 고체 배지에서 생육하면서 바닐린 향기를 내는 미생물들을 탐색 및 분리한다.
- 분리된 미생물을 액체 배양을 하고 배양액을 HPLC를 이용해서 분석하여 바닐린의 생성여부와 생성량을 조사한다.
- 고생산성 바닐린 균주가 얻어질 때까지 탐색작업을 계속한다.

나. 돌연변이를 이용한 생산균주의 개량

- 본 과제에서 분리된 신규 바닐린 생산균주 뿐만아니라 기존에 보고된 바닐린 생산균주도 돌연변이를 통해서 바닐린 생산성 향상을 시도한다.
- 돌연변이 방법으로는 물리적 방법인 UV와 화학적 방법인 NTG의 이용을 병행해서 돌연변이율을 가능한 최대화 한다.
- 돌연변이를 통해서 얻고자 하는 형질은 페룰산 대사능력이 향상되고 저해산물인 바닐린이 배양액에 축적되도 저해를 받지 않는 것이다. 이러한 변이는 결국에는 바닐린 생산성 향상으로 이어질 것이기 때문이다. 일반적으로 사용되는 페룰산 농도(2%)보다 높은 페룰산 농도(5%이상)에서 잘 생육하는 돌연변이주를 탐색하고 다음으로 고농도 바닐린(3%이상) 존재 하에서도 생육이 저해를 받지 않는 돌연변이주를 탐색한다.

- 궁극적으로 바닐린 생산량과 전환수율이 모두 향상된 돌연변이주를 확보한다.

다. 바닐린 생산반응 최적화 및 신규 생물반응기 개발

- 페룰산에서 바닐린으로 전환되는 반응을 최적화하기 위해서 물리적 배양인자(배양온도, 교반속도)와 화학적 배양인자(배지조성, 기질농도, 용존산소농도, pH)들을 변화시켜가면서 바닐린 생산균주의 최적 배양조건을 선정한다.
- 바닐린의 연속적인 회수와 생산을 가능하게 하는 순환형 생물반응기를 개발한다. 순환형 생물반응기에서 페룰산은 바닐린으로 전환되고 이 반응액은 냉각기로 이동되고 그 곳에서 바닐린은 결정으로 석출되고 여액(filtrate)은 다시 반응기 안으로 순환된다 (Figure 5). 이 때 냉각기의 온도는 반응액의 바닐린 농도에 의해서 결정되게 된다. 바닐린 농도가 1%인 경우에는 20℃에서 결정으로 석출되고 농도가 낮을 경우에는 냉각기의 온도를 낮춰서 결정으로 석출시킨다. 따라서 반응기내의 바닐린 농도를 세포대사의 저해농도 이하로 유지하면서 산물의 연속적인 회수를 가능하게 할 것이다. 또한 바닐린으로 전환되서 소비되는 양만큼의 페룰산을 연속적으로 공급함으로써 바닐린의 생산성을 조업기간 내내 극대화 할 수 있을 것이다. 다음으로 고정화 균체를 사용함으로써 균체 배양에 소비되는 시간 및 비용을 감소시키려고 한다. 페룰산에서 바닐린이 만들어지는 반응은 2단계의 효소촉매 반응으로 균체의 증식을 요구하지 않는 단순한 생체 전환반응이기 때문이다.

라. 바닐린 대사경로 유전자원의 확보

- 바닐린 대사경로 유전자가 규명된 *Pseudomonas* sp. strain HR199, *Amycolatopsis* sp. strain HR167, *Delftia acidovorans*로부터 feruloyl-CoA synthetase 유전자(*fcs*)와 enoyl-CoA-hydratase/aldolase 유전자(*ech*)를 클로닝함 (Fig. 6).
- 협동과제에서 분리된 신규 바닐린생산균주로부터 바닐린 대사경로에 관련된 신규 유전자들을 클로닝함. 신규 바닐린생산균주의 genomic DNA를 추출하고 genomic DNA library를 구축하고, 이 library부터 바닐린 대사경로 유전자를 탐색한다. 탐색방법으로는 기존에 보고된 유전자인 *fcs*나 *ech*와 homology가 높은 유전자일 경우에는 conserved region에 해당하는 부분에 hybridization될 수 있는 radio-labeled DNA probe를 제작해서 Southern hybridization 방법을 통해

서 유전자를 클로닝한다. 기존에 보고된 유전자들과 homology가 없는 유전자일 경우에는 Shotgun method를 이용해서 원하는 유전자 단편을 포함하는 형질 전환 colony를 바닐린 향기를 감별 기준으로 분리한 후에 이 colony로부터 바닐린 유전자가 포함된 DNA 단편을 추출한다.

마. 유전자 진화기술을 이용한 바닐린 유전자 개량

- 대장균에 위에서 확보된 바닐린 유전자들을 도입하고 바닐린 유전자들이 기능적으로 발현되는가를 확인한다.
- 기능적으로 발현되는 유전자들만을 대상으로 다시 어떤 유전자가 바닐린 생산성을 가장 향상시켰는가를 분석한다.
- 바닐린 생산성이 높은 유전자를 더욱 개량하기 위해서 DNA shuffling을 한다. DNA shuffling은 가장 우수한 바닐린 유전자에 point mutation들을 도입한 것을 이용하거나 homology가 높은 유전자들을 섞어주는 family shuffling을 수행한다. 1차 탐색은 관능적으로 바닐린 향기가 진한 colony들을 선택하고 2차 탐색에서 HPLC를 통해서 바닐린을 정량함으로써 개량된 유전자를 포함하는 형질 전환 colony를 찾아낸다.

바. 대사공학기술로 바닐린 생산경로가 최적화된 재조합 균주 개발

- 생육속도가 빠른 대장균에 개량된 바닐린 유전자들을 도입해서 페룰산으로부터 바닐린으로 전환시키는 공정시간을 단축하고 또한 바닐린을 분해하는 대사경로가 대장균에는 없다는 점을 이용해서 바닐린 생산수율과 순도를 높이는 연구를 수행하려고 한다. 대부분의 바닐린 생산 야생균주는 페룰산으로부터 전환된 바닐린을 다시 분해해서 다양한 유도체들을 만드는 단점이 있다.
- 기질인 페룰산을 최종산물인 바닐린으로 전환시키는 효소들인 feruloyl-CoA synthetase와 enoyl-CoA-hydratase/aldolase 가운데서 rate-limiting인 효소를 효소활성 측정이나 중간대사산물 분석을 통해서 파악하고 rate-limiting 유전자의 발현비율을 mRNA stability engineering을 통해서 높여준다. 그리고, 과도한 유전자의 발현은 재조합균주의 대사부담을 유발해서 세포활성 및 산물 생산성의 감소를 초래하므로 바닐린 유전자 발현량 최적화를 위한 vector의 copy number와 promoter strength를 조절한다. 본 연구에 이용된 숙주균주와 플라스미드는 Table 6과 같다.

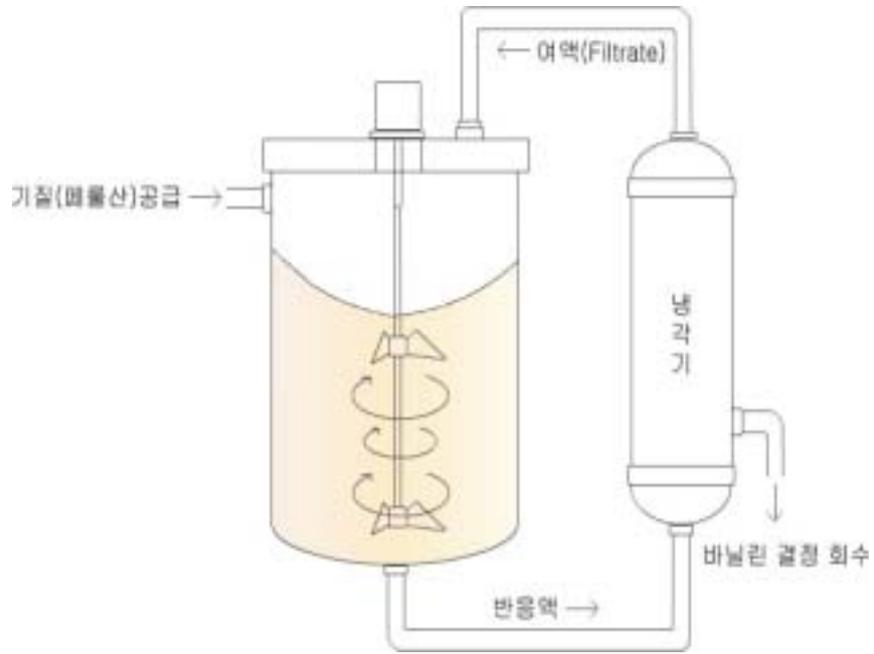


Fig. 5. Schematic representation of recycling bioreactor for Biovanillin production

(A)

(B)

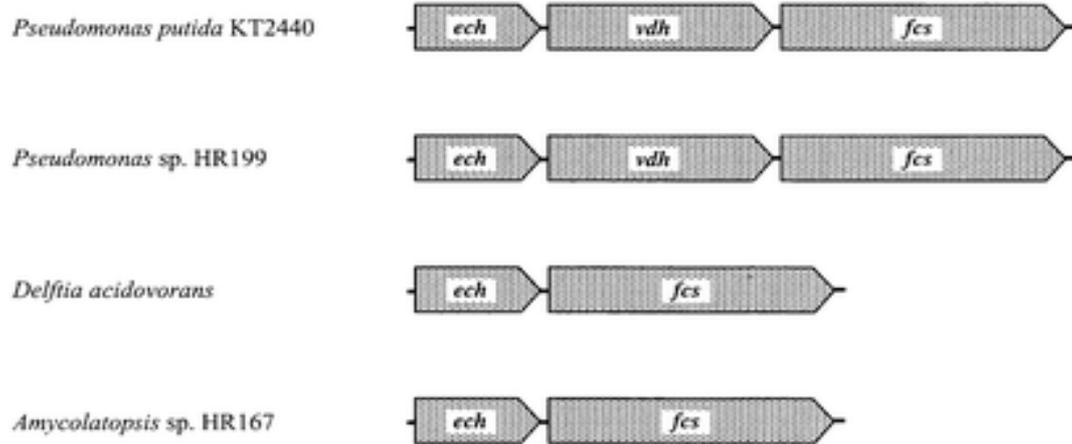


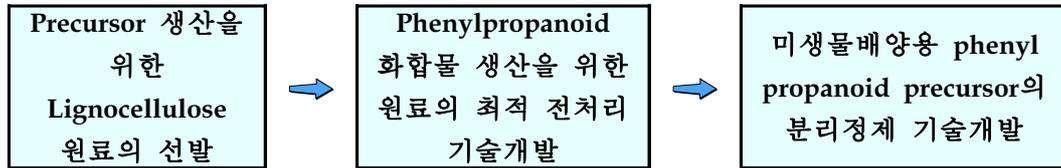
Fig. 6. CoA-dependent deacetylation pathway (A) and its constituent genes (B) used for vanillin production in the project

Table 6. Strains and plasmids used in this study

Strain or Plasmid	Relevant characteristics	Source or Reference
Strains		
<i>Amycolatopsis</i> sp. HR104	Wild type, ferulic acid positive①	DSMZ
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ Φ80d <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) <i>phoA supE441⁻ thi-1 gyrA96 relA1</i>	ATCC
<i>E. coli</i> DH5α mutant	Tolerant to 0.2% vanillin	This study
Plasmids		
pBluescript SKII(+)	Ap ^r <i>lacPOZ</i> , T7 and T3 promoter	Stratagene
pBAD24	Ap ^r , <i>araC</i> promoter	Guzuman et al.
pTrc99A	Ap ^r , <i>trc</i> promoter	Stratagene
pBAHEF	pBluescript SKII(+) harboring PCR product comprising <i>ech</i> and <i>fcs</i> from <i>Amycolatopsis</i> sp. HR104	This study
pDAHEF	pBAD24 harboring <i>ech</i> and <i>fcs</i> as a NheI-EcoRI fragment from pBAHEF	This study
pTAHEF	pTrc99A harboring <i>ech</i> and <i>fcs</i> as a NheI/MungBean-BamHI fragment from pDAHEF inserted into NcoI/MungBean-BamHI restriction sites	This study
pBgltA	pBluescript SKII(+) harboring PCR product comprising <i>gltA</i> from <i>E. coli</i> K12	This study
pTAHEF-gltA	pTAHEF harboring <i>gltA</i> as a XbaI-PstI fragment from pBgltA	This study

* *Amycolatopsis* sp. HR104 is able to utilize ferulic acid as sole carbon source for growth.⁽⁴⁾

2. 제 2 세부과제 (Lignocellulosic 원료로부터 바닐린 전구체 생산기술개발)



가. 전구체 생산을 위한 리그노셀룰로오스 원료의 선발

1) 원료의 선발을 위한 시료 조제

- 미생물 배양용 페닐프로파노이드 화합물을 효율적 및 대량으로 생산하기 위해서는 일차적으로 원료 탐색이 기본적으로 먼저 실시되어야 한다. 이를 위하여 본 과제에서는 원료탐색 범위를 임산 부산물, 농산 부산물로 한정 하였으며, 이들 가운데 현실성이 있으며, 페닐프로파노이드 화합물의 함량이 높은 원료의 선정을 위하여 임산부산물 및 농산부산물을 대상으로 산림 간벌재 및 자원 이용 가능성이 현실적으로 높은 굴참나무 외 11종을 선택하였고, 농산부산물도 고구마 줄기 외 8종을 선택하여 24℃의 실온에서 일주일 이상 기건 시킨 다음, 이를 칩 또는 파티클화하였다. 이를 willey mill로 분쇄하여 40 mesh pass - 80 mesh on의 분말 시료를 조제하여 시료로 하였다.

2) 원료의 선발 기준

- 원료 선발 기준은 시료 중에 함유된 페놀성 화합물의 함량을 기준으로 하였으며, 시료중의 페놀성 화합물 함량측정은 박 등 (1993 a)의 방법에 의거하여 실시하였다. 또한 시료중의 추출물 함량을 분석하기 위하여 유기용매 추출물 정량 (박 등, 1993 b)도 실시하였다.

나. Lignocellulose 원료로부터 바닐린 전구체 생산기술 개발

1) 산에 의한 원료의 전처리 및 페놀성 화합물 수율

가) 원료 및 공시재료

- 최적 원료로 선정된 농산 부산물인 고구마줄기를 농가에서 직접 수집하여 길이 1cm로 자른 다음, 실온에서 충분히 건조하여 사용하였다 (함수율 7.0 - 8.0%). 기건된 고구마 줄기는 Willey mill로 분쇄하여 40 mesh pass - 80 mesh on 부분을 따로 분리하여 공시재료로 사용하였다.

나) 산에 의한 전처리 및 페놀성 화합물 수율

- 고구마줄기 2g (전건중량)을 250 mL 플라스크에 투입하고 0.0125N, 0.025N, 0.05N, 0.1N의 황산 또는 초산용액을 50 mL 첨가하여 120℃에서 각각 15, 30, 60 분간 반응시켰다. 반응 종료 후 2G3 glass filter로 여과한 다음, 증류수로 충분히 세척, 건조하여 추출물 수율을 측정하였으며, 이때 페놀성 화합물 수율을 측정하기 위하여 여과액 총량을 100 mL로 조정 한 다음, UV spectrophotometer (U-3000, Hitachi Ltd. Tokyo, Japan)를 사용하여 208 nm에서 흡광도를 측정하였다. 페놀성 화합물 함량은 미리 작성된 lignosulfonic acid (Sigma co.)검량선 (Fig. 7, 8)을 이용하여 반응 전 투입된 시료의 전건중량을 기준으로 하여 계산하였다.

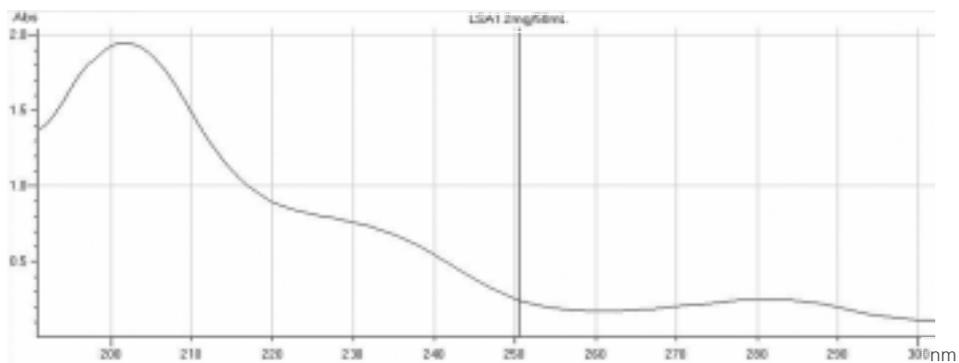


Fig. 7. Ultraviolet (UV) spectra of lignosulfonic acid (LSA)

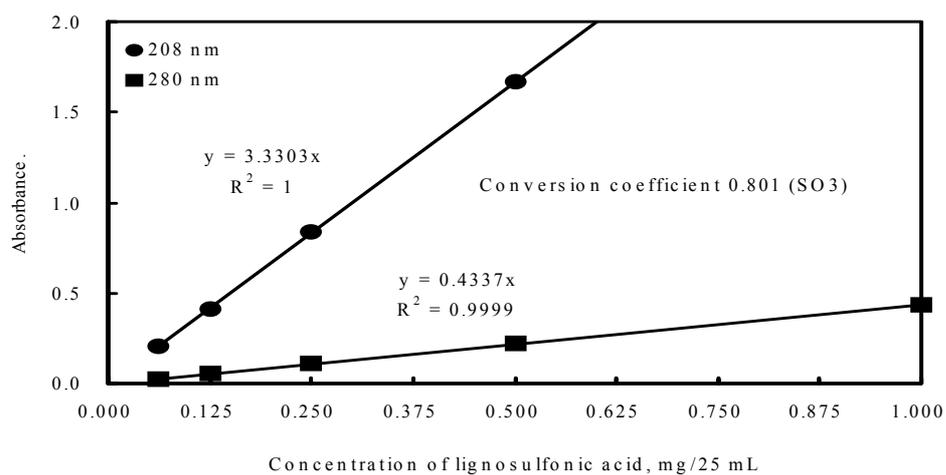


Fig. 8. Calibration curves of lignosulfonic acid (LSA)

2) 알칼리에 의한 원료의 전처리 및 페놀성 화합물 수율

가) 원료 및 공시재료

- 최적 원료로 선정된 농산 부산물인 고구마줄기를 농가에서 직접 수집하여 길이 1cm로 자른 다음, 실온에서 충분히 건조하여 사용하였다 (함수율 7.0 - 8.0%). 기건된 고구마 줄기는 Willey mill로 분쇄하여 40 mesh pass - 80 mesh on 부분을 따로 분리하여 공시재료로 사용하였다.

나) 알칼리 전처리 및 페놀성 화합물 수율

- 고구마 줄기 2g (전건중량)을 250 mL 플라스크에 투입하고 0.0125N, 0.025N, 0.05N, 0.1N의 수산화나트륨 용액 50 mL를 첨가하여 120°C에서 각각 15분, 30분, 60분 동안 반응시켰다. 또한 실온반응을 위하여 1N, 2N, 4N 수산화나트륨 용액을 50 mL 첨가하여 실온에서 1.5시간, 3시간, 6시간 반응시켰다. 이때 추출물 수율 및 페놀성 화합물 수율은 반응 종료 후 2G3 glass filter로 여과한 다음, 증류수로 충분히 세척, 건조하여 추출물 수율을 측정하였으며, 페놀성 화합물 수율을 측정하기 위하여 여과액 총량을 100 mL로 조정 한 다음, UV spectrophotometer (U-3000, Hitachi Ltd. Tokyo, Japan)를 사용하여 208 nm에서 흡광도를 측정하였다. 페놀성 화합물 함량은 미리 작성된 liginosulfonic acid (Sigma co.)검량선 (Fig. 7, 8)을 이용하여 반응 전 투입된 시료의 전건중량을 기준으로 하여 계산하였다.

3) 고압 수증기 전처리 된 원료의 페놀성 화합물 추출

가) 원료 및 공시재료

- Y 기업 (대구시 소재)으로부터 제공받은 고압 수증기 처리된 lignocellulose 원료 (활엽수재)를 실온에서 기건시킨 다음, Willey mill로 분쇄하여 40 mesh on - 80

mesh pass 부분을 분리하여 공시재료로 사용하였다.

나) 페놀성 화합물의 추출 및 페놀성 화합물의 수율

- 시료 2g (전건중량)을 250 mL 삼각플라스크에 투입하고 증류수 50 mL을 첨가하여 고온반응은 120℃에서 각각 15분, 30분, 60분간 실시하였으며, 실온반응은 실온에서 1.5시간, 3시간, 6시간 각각 shaking 하였다. 반응종료 후, 2G3 glass filter로 여과한 다음, 증류수로 충분히 세척, 건조하여 추출물 수율을 측정하였으며, 페놀성 화합물 수율을 측정하기 위하여 여과액 총량을 100 mL로 조정 한 다음, UV spectrophotometer (U-3000, Hitachi Ltd. Tokyo, Japan)를 사용하여 208 nm에서 흡광도를 측정하였다. 페놀성 화합물 함량은 미리 작성된 lignosulfonic acid (Sigma co.)검량선 (Fig. 7, 8)을 이용하여 반응 전 투입된 시료의 전건중량을 기준으로 하여 계산하였다.

4) 추출물에 함유된 페롤산 함량

- 추출물의 일부를 채취하여 pH 6.5 - 7.5 로 조정 한 다음, 4배량의 에탄올을 첨가하여 교반한 다음, 5000 RPM, 10분의 조건으로 원심 분리하였다. 원심분리 후, 상층부 액을 따로 분리하여 HPLC를 사용하여 페롤산 함량을 분석하였다. 이때 분석조건은 TSK gel ODS-80(4.6mm × 25cm, Tosho) column을 사용하였고, UV detector 280nm에서 분석하였다. 이동상으로는 solvent A는 5% glacial acetic acid, solvent B는 methanol을 사용하였다. 또한 표준검량물질로는 vanillin, vanillic acid, ferulic acid와 cinnamic acid를 사용하였으며, 이들 화합물은 Sigma co.로부터 구입하여 사용하였다. 각 표준물질의 검량곡선은 Fig. 9에 나타냈다. 또한 표준물질의 HPLC chromatogram은 Fig. 10에 나타냈다.

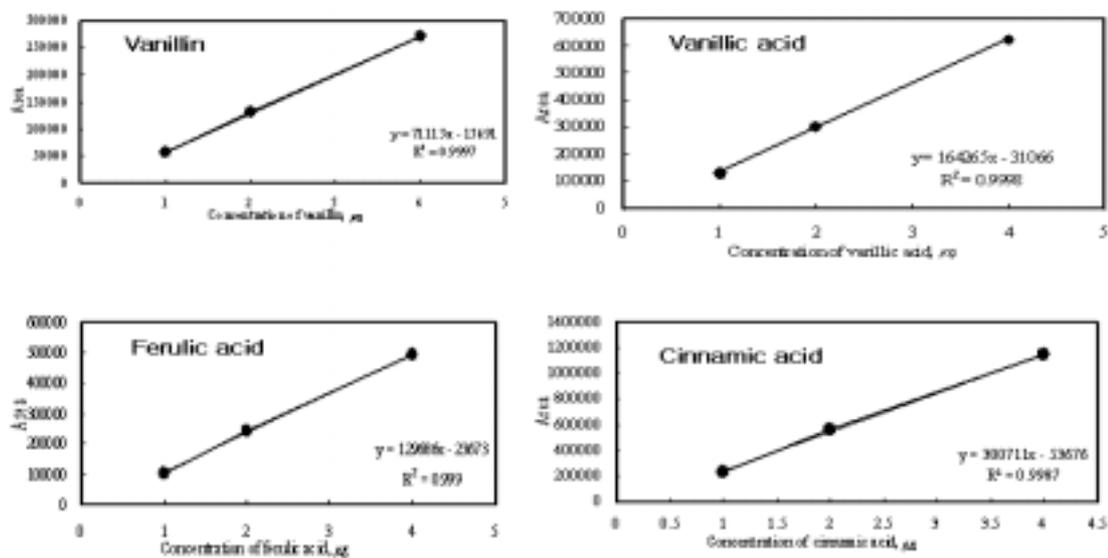


Fig. 9. Calibration of phenolic compounds contents by HPLC analysis

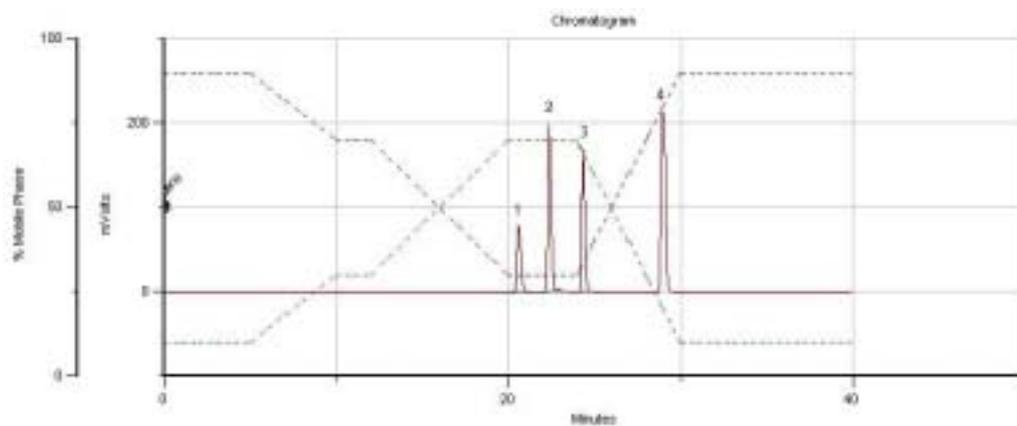


Fig. 10. Standard curves of vanillin, vanillic acid, ferulic acid and cinnamic acid by HPLC 1; vanillin, 20.59 min., 2; vanillic acid, 22.37 min., 3; ferulic acid, 24.32 min., 4; cinnamic acid, 28.93 min.

5) 폐놀성 화합물의 생산경제성 분석

- 고구마 줄기 및 고압 수증기 처리된 원료로부터 페닐프로판 화합물의 생산을 위하여 소요되는 경비는 실험실적 수준에서 모든 경비를 계산하였으며, 각 공정마다 투입되는 인력경비는 계산에 포함하지 않았다. 또한 최초에 투입되는 기기 및 장치의 설비비 또는 구입비는 계상하지 않았으며, 기기 및 장치의 감가상각비는 무시하였다.

가) 원료 구입 및 분쇄 비용

- 원료로 사용된 고구마 줄기와 고압 수증기 처리된 lignocellulose의 구입비용은 산정하지 않았다. 현장에서 원료의 구입비용은 두 가지 모두 부산물임으로 필요치 않으며, 다만 집하 및 운반비용이 소요 될 뿐이다. 또한 원료는 동일한 방법으로 분쇄하였고, 이에 대한 경비도 무시하였다.

나) 시약 및 반응비용

- 반응에 투입된 시약의 원가는 국내 시약업체인 D사의 소비자 가격을 기준으로 계산하였으며, 증류수 생산비용은 포함하지 않았다. 반응에 필요한 기자재의 소요전력량은 한국전력공사 공시가격 기준(산업용 갑)의 고압B 선택 II 요금제로 계산하였으며, 기본요금은 무시하였다. 계절은 여름철 (59.40원)을 기준으로 비용을 산출하였다. 이때 반응기자재로는 오토클레이브 (HB-506-4, Hanhaek co., Korea)와 항온진탕기 (SI-900R, Jeio tech. co., Korea)를 사용하였다.

다) 반응물 회수비용

- 반응 종료 후, 반응물 회수에 필요한 비용은 증류수 투입량을 제외하고는 원료 및 반응조건에 관계없이 동일한 조건으로 회수하였으므로 비용은 동일하게 적용하였다.

8) 페놀성화합물 추출 및 저장기간

가) 고구마 줄기의 페놀성 화합물 추출

- 고구마줄기분말 10g에 0.05N H₂SO₄용액 250 mL을 첨가하여 120℃에서 30분간 처리하였다. 반응물은 17G1 glass filter를 이용하여 잔사와 추출물을 분리하였고 추출물은 50℃에서 50 mL로 감압 농축하였다. 농축물에 150 mL의 ethanol을 첨가하여 충분히 교반한 다음 3000rpm에서 25분간 원심분리하여 침전물을 제거하고 용해부는 40℃에서 30mL로 감압 농축하여 페놀성 화합물을 획득하였다.

나) 목질시료의 페놀성 화합물 추출

- 고압처리된 목질 원료 10g에 증류수 250mL을 첨가하여 120℃에서 15분간 처리하였다. 반응물은 17G1 glass filter를 이용하여 잔사와 추출물을 분리하였고 추출물은 50℃에서 50 mL로 감압 농축하였다. 농축물에 150 mL의 ethanol을 첨가하여 충분히 교반한 다음 3000rpm에서 25분간 원심분리하여 침전물을 제거하고 용해부는 40℃에서 30mL로 감압 농축하여 페놀성 화합물을 획득하였다.

다) pH와 저장기간에 따른 성분 변화

- 고구마 줄기 또는 고압처리된 목질 원료 10g에 전처리 추출용매(고구마줄기: 0.05N H₂SO₄, 목질시료: 증류수) 250mL을 가하여 120℃에서 각각 15분, 30분 처리한 후, 17G1 glass filter를 사용하여 잔사와 여과액을 분리하였다. 여과액은 3배 농축한 다음 1M NaOH와 1M CH₃COOH를 사용하여 각각 pH 3.0과 pH 7로 조절하였다. 그 다음 실온에서 0, 12, 24, 48시간 저장 후, 3배 양의 ethanol을 가하여 ethanol 가용부를 분리하였으며 가용부는 다시 원심분리(5000 rpm, 15분간) 하여 침전물을 제거하여 HPLC 분석 시료로 사용하였다.

9) 액체-액체 크로마토그래피

- 시료(추출된 페놀성 화합물)는 극성에 따라 n-hexane, ethyl ether, chloroform, ethyl acetate를 사용하여 순차적으로 용매 추출(30mL × 3회)하였다. Soluble fraction과 insoluble fraction을 분리하여 n-hexane soluble fraction, ethyl ether soluble fraction, chloroform soluble fraction, ethyl acetate soluble fraction 및 ethyl acetate insoluble fraction을 획득하였다(Fig. 5).

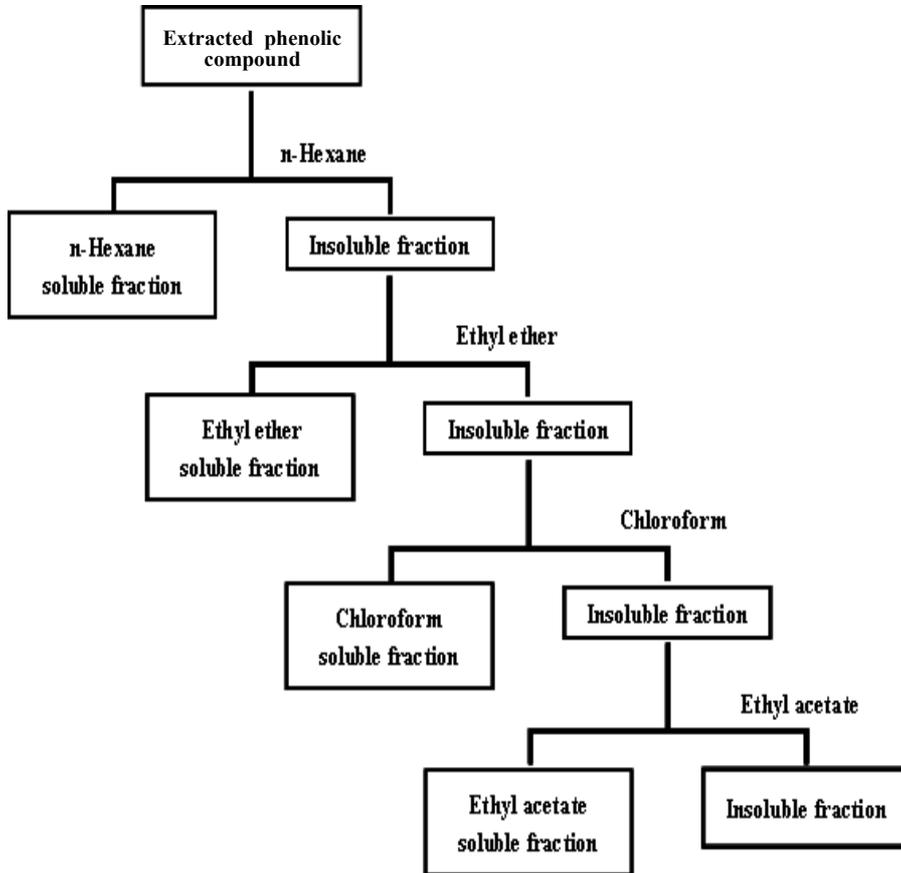


Fig. 11. Fractionation scheme of extracted phenolic compound.

- 각 fraction의 수율은 투입된 추출물의 전건 중량을 기준으로 하여 획득된 fraction의 전건 중량의 비율로서 산출하였으며(식 1), HPLC 분석을 위하여 각 fraction은 50°C에서 농축하였다 (Fig. 11).

$$\text{Yield (\%)} = \frac{S_1 - S_2}{S_1} \times 100 \text{ ----- (식 1)}$$

S_1 : 추출 전 시료의 전건중량 (g)

S_2 : 추출 후 시료의 전건중량 (g)

10) 액체-고체 크로마토그래피

가) TLC를 이용한 전개 용매 탐색

- 전개용매 그룹 A: 페놀성 화합물의 표준물질(vanillin, vanillic acid, ferulic acid, cinnamic acid)의 혼합물 시료, 목질원료로부터 획득된 페놀성 화합물 및 고구마 줄기로부터 획득된 페놀성 화합물을 용매(Ethyl acetate:Methanol=6:4; Ethyl acetate:Methanol=7:3; Ethyl acetate:Methanol=8:2; Ethyl acetate:Methanol=9:1)에 녹인 후 silica-gel TLC plate(silica-gel F₂₅₄, 0.5 mm, Merck, Germany)에서 전개하였다. 전개용매는 Ethyl acetate와 Methanol 혼합용매(Table 7)를 사용하였으며, 크로마토그램은 UV 325nm에서 측정하였다.

Table 7. The mobile phases studied

No.	Solvents
1	Ethyl acetate-Methanol (6:4, v/v)
2	Ethyl acetate-Methanol (7:3, v/v)
3	Ethyl acetate-Methanol (8:2, v/v)
4	Ethyl acetate-Methanol (9:1, v/v)

- 전개용매 그룹 B: 페놀성 화합물의 표준물질(vanillin, vanillic acid, ferulic acid, cinnamic acid)을 혼합하거나 각각을 용매 ethanol에 녹인 후, silica-gel TLC plate(silica-gel F₂₅₄, 0.5 mm, Merck, Germany)를 사용하여 전개하였다. 이때 전개용매는 n-hexane, ethyl acetate 및 formic acid 혼합용매(Table 8)를 사용하였으며, spot의 확인을 위하여 UV-illuminator (325 nm)를 사용하였다.

Table 8. The mobile phases studied

No.	Solvents
1	n-hexane-Ethyl acetate-formic acid (50:50:0.5, v/v/v)
2	n-hexane-Ethyl acetate-formic acid (50:50:0.8, v/v/v)
3	n-hexane-Ethyl acetate-formic acid (80:50:0.3, v/v/v)
4	n-hexane-Ethyl acetate-formic acid (80:50:0.5, v/v/v)
5	n-hexane-Ethyl acetate-formic acid (80:50:0.8, v/v/v)
6	n-hexane-Ethyl acetate-formic acid (100:50:0.5, v/v/v)
7	n-hexane-Ethyl acetate-formic acid (150:50:0.5, v/v/v)
8	n-hexane-Ethyl acetate-formic acid (150:50:0.8, v/v/v)

나) 액체-고체 크로마토그래피

○ 시료(추출된 페놀성 화합물)를 n-hexane:ethyl acetate:formic acid = 100:50:0.5 용매에 녹이고, Silica-gel 60(particle size: 0.063-0.2 mm, Merck, Germany) Column (21 cm ×3 cm)에 로딩 후 n-hexane:ethyl acetate:formic acid = 100:50:0.5 용매를 전개용매로 사용하여 fraction volume 30mL로 분취하였다. 분취된 fraction의 UV 흡광도측정은 U-3000(Hitachi Co, Japan)을 사용하여 측정 과정은 280nm, 325nm로 하였다.

11) Ferulic acid의 분리 및 정제

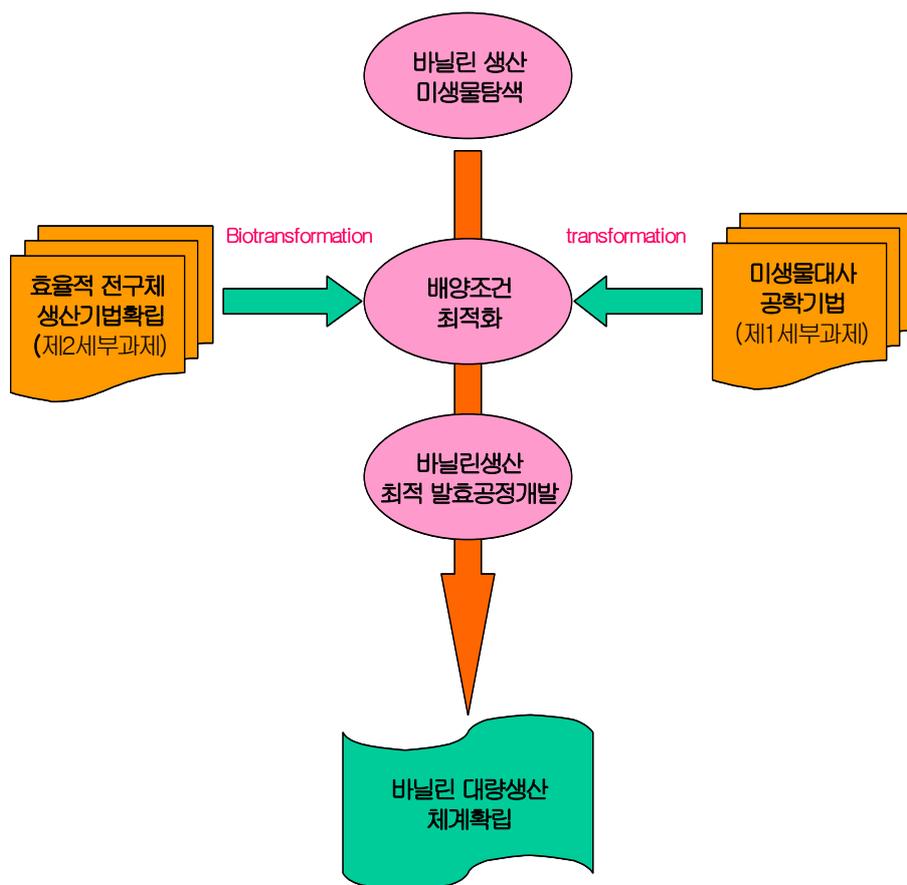
○ 시료(추출된 페놀성 화합물)는 액체-액체 크로마토그래피 (n-hexane, ethyl ether, chloroform, ethyl acetate)를 통하여 ethyl acetate soluble fraction만을 분리하여 40℃에서 감압농축(40℃, 1mL)하였다. 그 다음 농축시료를 n-hexane : ethyl acetate : formic acid = 100:50:0.5 용매에 용해시킨다음, 동일 용매로 Silica-gel 60(particle size: 0.063-0.2 mm, Merck, Germany) column (21×3cm)에 로딩하여 독립 fraction volume을 30 mL로 하여 분취한다. 분취한 fraction은

UV-spectrophotometer를 사용하여 280nm와 325nm에서 각각 흡광도를 측정하였으며, 흡광도를 기준으로 fraction을 그룹별로 구분하였다. 구분된 fraction 그룹들을 HPLC분석하여 ferulic acid의 정제 효율 및 순도를 검정하였다.

12) HPLC 분석

- 시료분석에 사용된 HPLC system은 Gilson사의 operating system, UV3000 검출기 및 Unipoine software를 사용하였고, 분석 칼럼은 TSK gel ODS-80TM (4.6 mm × 250mm, Tosho)을 사용하였다. 분석시료는 시료주입기를 이용하여 10 μ L 주입하였다. 이동상은 acetic acid/water (5/95, v/v) 혼합액을 이동상 A, methanol을 이동상 B로 사용하여 유속 0.8mL/min으로 하였고, 검출기의 파장은 280nm로 하였다.

제 4 절 연구개발 추진체계



<농림산물과 대사공학기술을 활용한 바이오바닐린 생산을 위한 추진체계>

제 5 절 연구수행 결과

1. 제 1세부과제 (대사공학 기술을 이용한 우수 바닐린생산균주 개발)

가. 바닐린 생산균주 탐색 및 우수균주 확보

여러 가지 삼림토양으로부터 페룰산을 자화하는 세균 및 방선균을 다수 분리하였으며, 이로부터 바닐린을 생산하는 세균 균주, 3주와 방선균 균주, 1주를 얻었다. 분리된 균주는 1 g/L의 페룰산으로부터 24시간 경과 시 400 mg/L 이상의 바닐린을 생산 하였다. 분리된 균주에 대하여 균주 동정 및 배양조건 검토에 관한 실험을 진행 하였다.

나. 바닐린 생산 유전자원의 확보 및 재조합 생산균주 구축

바닐린 대사경로 유전자가 규명된 *Amycolatopsis* sp. strain HR167, *Delftia acidovorans*로부터 feruloyl-CoA synthetase 유전자(*fcs*)와 enoyl-CoA-hydratase/aldolase 유전자(*ech*)를 클로닝 하였다. *Pseudomonas* sp. HR199, *Streptomyces setonii*는 바닐린 대사경로 유전자를 가지고 있는 것이 보고되어 있지만, 본 연구팀의 연구결과, 바닐린 생산성이 전자의 균주들에 비해 매우 낮은 것으로 판단되어 바닐린 유전자 클로닝을 시도하지 않았다. 대장균에 위에서 확보된 바닐린 유전자들을 도입하고 바닐린 유전자들이 기능적으로 발현되는가를 확인하였다. *Amycolatopsis* sp. strain HR167의 *fcs*와 *ech* 유전자는 대장균에서 기능적으로 발현이 되어서 바닐린 생산능력이 없는 대장균이 바닐린을 만들 수 있도록 하였다. 반면에 *Delftia acidovorans*의 *fcs*와 *ech* 유전자가 도입된 재조합 대장균에서는 바닐린 생산이 관찰되지 않았다. 따라서, *Delftia acidovorans*의 바닐린 유전자는 대장균에서 기능적으로 발현되지 않는 것을 알았다.

Amycolatopsis sp. strain HR167의 *fcs*와 *ech* 유전자를 복합배지에서도 promoter의 조절이 정교한 발현벡터인 pBAD24에 삽입해서 pBAD-AHEF를 구축하고, pBAD-AEHF가 도입된 재조합 대장균을 이용하여 바닐린 생산 실험을 하였다.

Inducer인 arabinose 농도별 (0-0.2%) 실험에서 inducer의 농도가 증가할수록 바닐린 생산은 증가하였고, 0.2% arabinose에서 150mg/l의 바닐린이 생산되었다. 바닐린 유전자 발현시기 최적화를 위해서 0.2% arabinose를 배양시간 (0, 12, 18, 24 hours)별로 첨가하였다. 균체증식이 충분히 이루어진 대수기 말기인 18 hours에 발현을 유도하는 것이 가장 좋았으며, 500mg/l의 바닐린이 생산되었다. 이것은 바닐린이 균체증식을 억제하는 기능을 가지고 있어서 배양초기에 발현을 유도하는 것은 균체증식량의 감소를 초래하기 때문이다. 따라서, 돌연변이를 통한 고농도 바닐린 존재 하에서도 균체생육이 저해를 받지 않는 재조합 대장균을 개발하는 일도 진행하였다.

기질인 페룰산의 첨가농도 (0-1.0%)별 실험에서는 기질의 첨가량이 증가할수록 바닐린 생산량도 증가해서, 1.0% 페룰산 첨가한 경우에 바닐린은 850mg/l 생산되었다. 그러나, 전환수율은 기질농도가 낮을수록 높은 결과를 보여서 0.05% 페룰산을 첨가한 것이 70%의 바닐린 전환수율을 보였다. 향후 높은 전환수율을 유지하면서 바닐린 생산은 최대화시키는 기질첨가 방식 (유가배양 및 연속배양)을 연구하였다.

다. pBAD24 발현벡터를 이용한 바닐린 생산경로 대사공학

페룰산을 바닐린으로 전환하는 미생물은 *Delftia acidovorans*, *Pseudomonas* sp. strain HR199, *Amycolatopsis* sp. strain HR167(HR104)등이 있으며, 이 외에도 다수종이 보고되어 있다. 그 중 *D. acidovorans*와 *Amycolatopsis* HR104는 CoA-dependent deacetylation 경로를 갖고 있으며, 유전자의 염기서열도 확인되어 있다. CoA-dependent deacetylation 경로는 페룰산이 feruloyl-CoA-synthetase를 코딩하는 *fcs*와 enoyl-CoA-hydratase/aldolase를 코딩하는 *ech*의 두 유전자만으로 바닐린으로 전환되므로 효율적이다.

*D. acidovorans*와 *Amycolatopsis* HR104는 독일의 DSMZ에서 구입하여 바닐린 생산성 여부를 확인한 후, *fcs*와 *ech* 유전자를 클로닝하기 위하여 NCBI의 public database의 염기서열을 근거로 각각의 PCR primer를 제작하였으며, PCR을 이용하여 각 균주들로부터 *fcs*와 *ech* 유전자들을 증폭하였다. 두 유전자는 *ech*의 stop codon이 *fcs*의 start codon과 overlap 되어있는 operon 구조를 형성하고 있으므로 유전자들을

분리하지 않고 함께 증폭하였다. 증폭한 유전자들은 pBluescriptII SK(+) 클로닝 벡터에 옮긴 후 염기서열을 확인하고 다시 pBAD24 발현벡터에 옮겨 pBAD-AHEF (*Amycolatopsis* HR104의 *fcs*와 *ech* 유전자 포함)와 pBAD-DAEF (*D. acidovorans*의 *fcs*와 *ech* 유전자 포함)를 만들었다. pBAD-AHEF와 pBAD-DAEF가 도입된 대장균에 페룰산을 공급하고 바닐린 생산성을 관찰한 결과, pBAD-AHEF가 도입된 재조합 대장균에서는 바닐린이 생산되었으나 pBAD-DAEF가 도입된 재조합 대장균에서는 바닐린이 생산되지 않았다. 이것은 *D. acidovorans*와 *Amycolatopsis* HR104의 바닐린 생산성 확인실험에서 *D. acidovorans*의 배양에서는 바닐린이 생산되지 않았던 결과와 일치한다. *D. acidovorans*의 *fcs*와 *ech* 유전자 염기서열 분석결과에서도 해당 유전자에서 deletion에 의한 frame shift 돌연변이가 발생해 있는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 바닐린 생산균주의 유출을 막기 위한 균주 기탁자의 의도일수도 있다. 페룰산과 바닐린은 HPLC를 이용해서 분석했으며, pBAD-AHEF를 도입한 재조합 대장균의 HPLC chromatogram 결과는 Fig. 12과 같다.

바닐린이 대장균 생육에 미치는 영향을 조사하기 위해서 DMSO에 용해시킨 바닐린을 0 - 1%의 농도별로 배지에 첨가하였다. 균체생육은 0.1% 바닐린에서 약 30% 저해되었고, 0.25% 이상에서는 거의 생육하지 못하였다 (Fig. 13). 따라서, 고농도 바닐린 생산을 위해서는 NTG 또는 UV 돌연변이를 이용한 바닐린에 대한 내성을 갖는 균주의 개발이 필요하다.

pBAD-AHEF는 *ara* promoter를 가지고 있고, inducer로 arabinose를 사용한다. Arabinose 농도를 달리하였을 경우 균체성장과 바닐린 생산양상을 실험하였다 (Fig. 14, Fig. 15). Arabinose와 페룰산 (0.1%)은 배양초기에 투여하였다. 최대 induction 농도인 arabinose 0.2%에서 균체성장은 약간 감소하였으나, 바닐린 생산은 150mg/l로 최대가 되었다. Arabinose 0.0002% 이하에서는 바닐린은 생산되지 않았다. 배양초기의 induction은 균체 성장에 부담이 되고 특히, 저해산물인 바닐린이 배양초기부터 축적되기 시작하므로 전체적인 균체활성의 감소가 예상된다. 따라서, arabinose 0.2%를 첨가하는 시기를 달리하여 균체 성장과 바닐린 생산을 측정하였다 (Fig. 16, Fig. 17). 배양초기에 induction시킨 실험구에서 균체생육 및 바닐린 생산은 최소가 되었으며, 12시간 이후에 induction시킨 실험구들에서는 균체생육과 바닐린 생산이 증가하였다. 특히, 충분한 균체성장이 이루어지고 균체활성도 감소되지 않은 대수기 초기

에 해당하는 18시간째 induction을 한 경우에 바닐린 생산은 450mg/l로 최대가 되었다.

Amycolatopsis HR104는 CoA-dependent deacetylation 경로에서 페룰산이 *fcs*와 *ech*에 의해 4-hydroxy-3-methoxyphenyl-β-hydroxypropionyl-CoA로 되고 *aat* (β-ketothiolase) 유전자에 의해 바닐린으로 전환되는 by-pass경로도 가지고 있다. 따라서, *aat* 유전자를 클로닝하고 *fcs*, *ech*와 함께 operon으로 구성한 pBAD-AHEFA를 만들고 pBAD-AHEF와 비교하였다. 바닐린 생산에서의 둘 사이의 큰 차이는 없었다. 최적 induction 조건인 배양 18시간째에 arabinose 0.2%를 첨가하는 조건에서 배양초기에 공급하는 기질인 페룰산의 공급량을 0.05 - 1.0%로 달리하였다 (Fig 18, Fig. 19). 페룰산을 1.0%로 공급한 경우에 균체생육은 가장 낮았지만 바닐린 생산은 약 850mg/l로 가장 높았다. 페룰산의 공급량에 대한 바닐린 생산량을 전환율로 표시하면 페룰산을 1% 공급한 경우에 바닐린 생산이 최대였지만 대부분의 페룰산이 전환되지 않고 배양액에 남아있어서 전환율은 약 8.5%로 최저이고, 페룰산을 0.05%로 공급한 경우에는 약 70%로 최대가 되었다 (Fig. 20). 따라서, 페룰산 공급량을 증가시켜서 바닐린 생산량을 증가시키면서도 전환율을 높게 유지하기 위한 페룰산의 공급을 분할하는 유가식 배양의 연구가 필요하다.

페룰산 공급시기에 따른 바닐린 생산량과 전환율을 조사하였다 (Fig. 21, Fig. 22). 18시간째에 arabinose 0.2%로 induction하는 배양조건에서 페룰산 공급시기를 0, 18, 24, 36시간으로 하였다. 18시간 즉 induction과 동시에 페룰산을 투여한 배양에서 약 69%로 가장 높은 전환율을 보였으며, 균체의 활성이 감소한 36시간에 페룰산을 공급하는 경우에는 약 20%로 가장 낮은 전환율을 보였다.

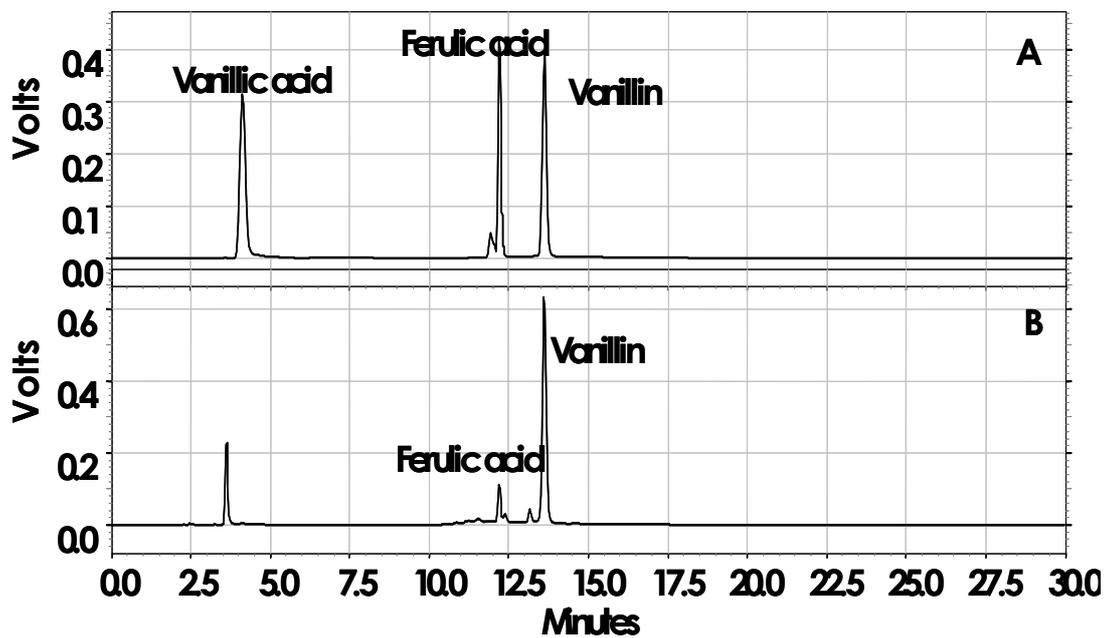


Fig. 12. HPLC chromatogram of vanillin analysis: (A) Standard peak of vanillic acid, ferulic acid, and vanillin, (B) Culture broth of *E. coli* harboring pBAD-AHEF

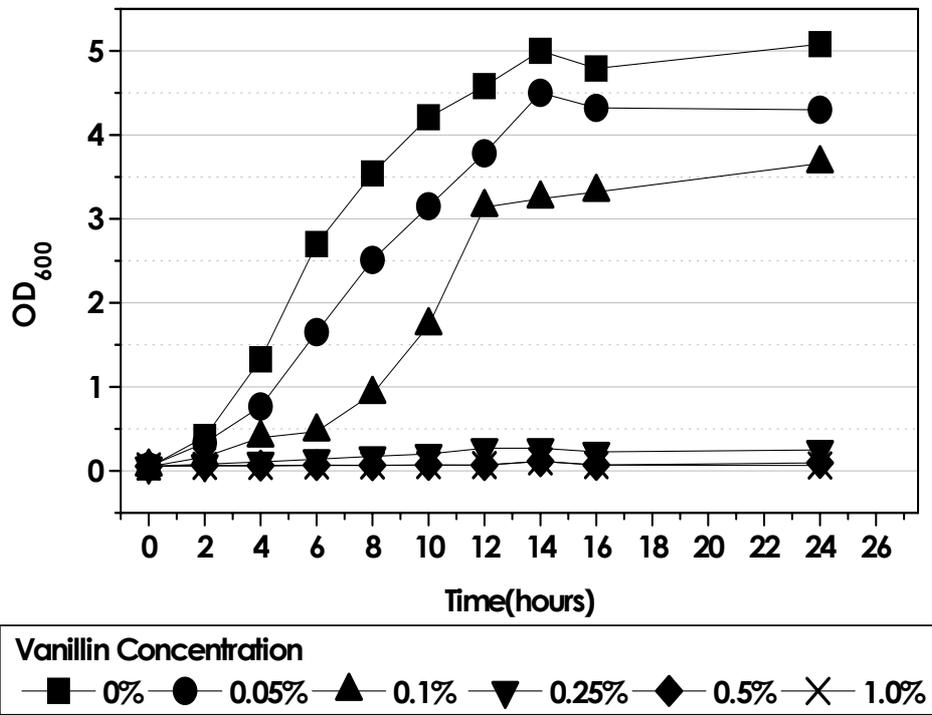


Fig. 13. Growth inhibition of *E. coli* DH5 α by increasing concentration of vanillin, final product.

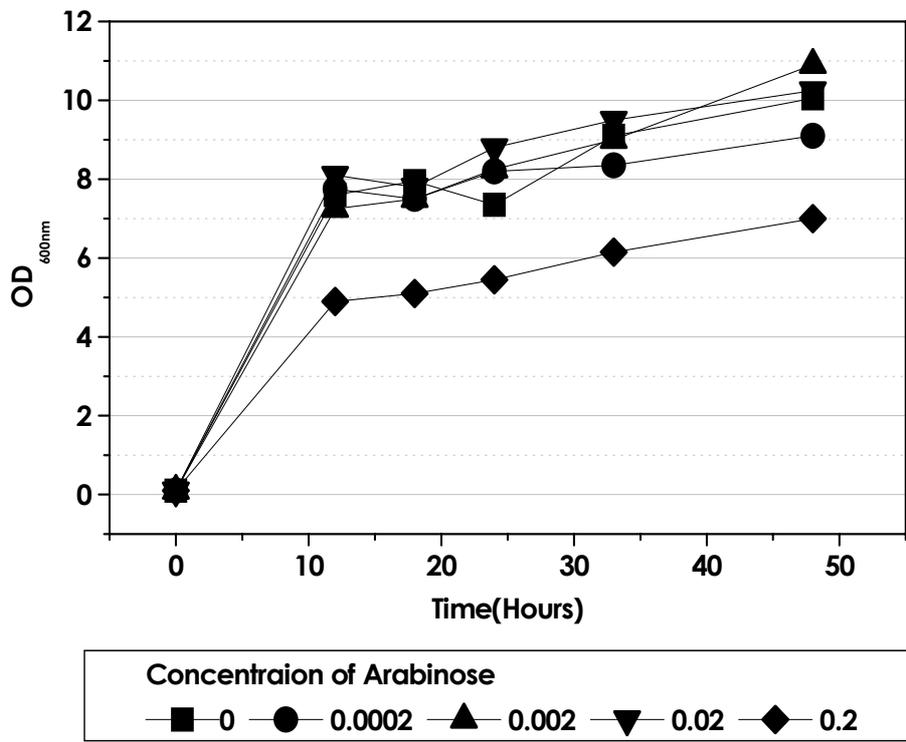


Fig. 14. Effect of arabinose inducer concentration on cell growth of *E. coli* harboring pBAD-AHEF

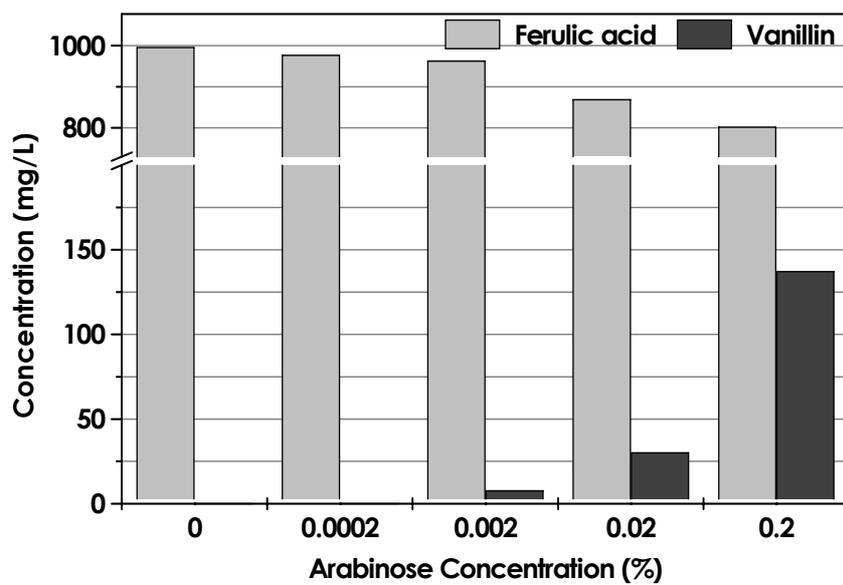


Fig. 15. Effect of arabinose inducer concentration on vanillin production of *E. coli* harboring pBAD-AHEF

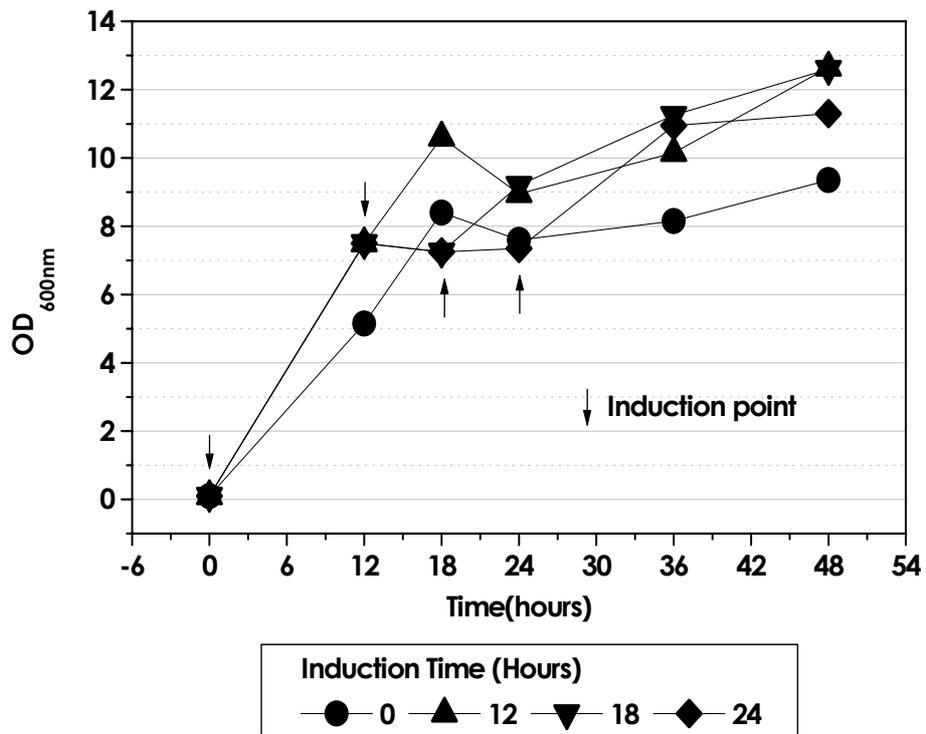


Fig. 16. Effect of arabinose induction time on cell growth of *E. coli* harboring pBAD-AHEF

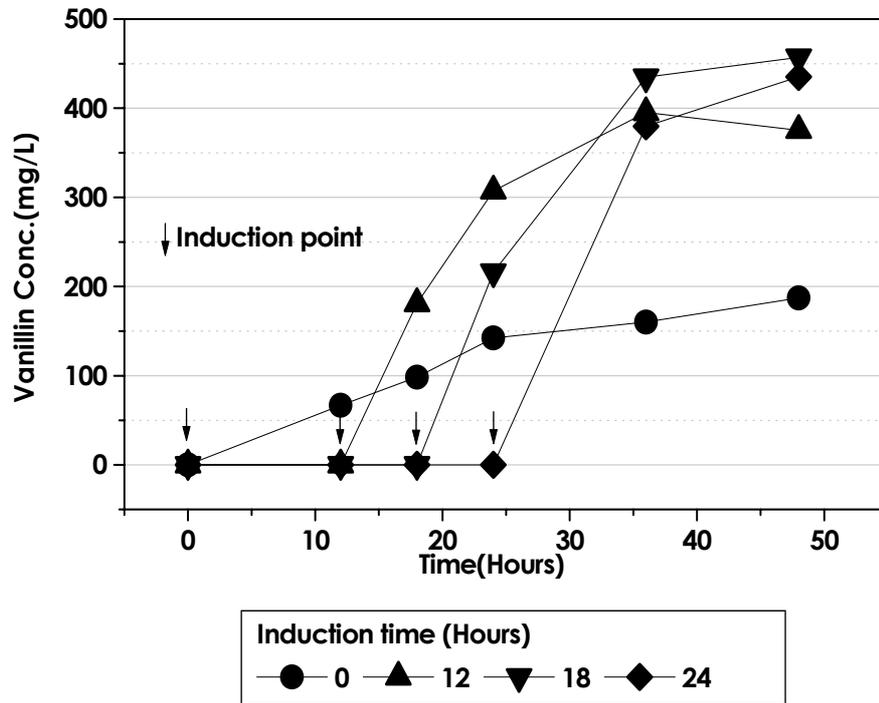


Fig. 17. Effect of arabinose induction time on vanillin production of *E. coli* harboring pBAD-AHEF

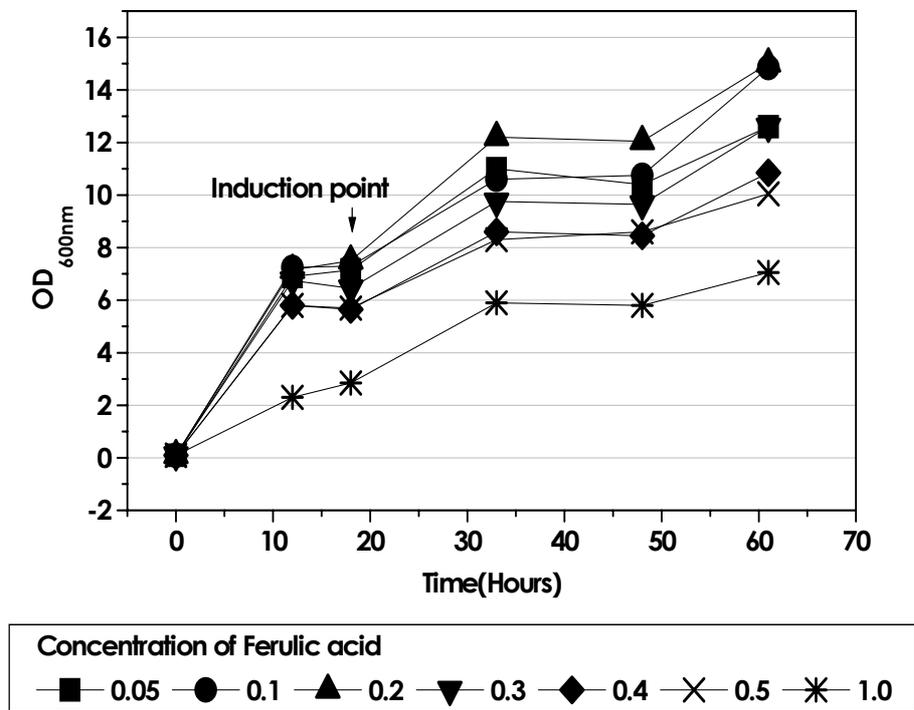


Fig. 18. Effect of ferulic acid concentration on cell growth of *E. coli* harboring pBAD-AHEF

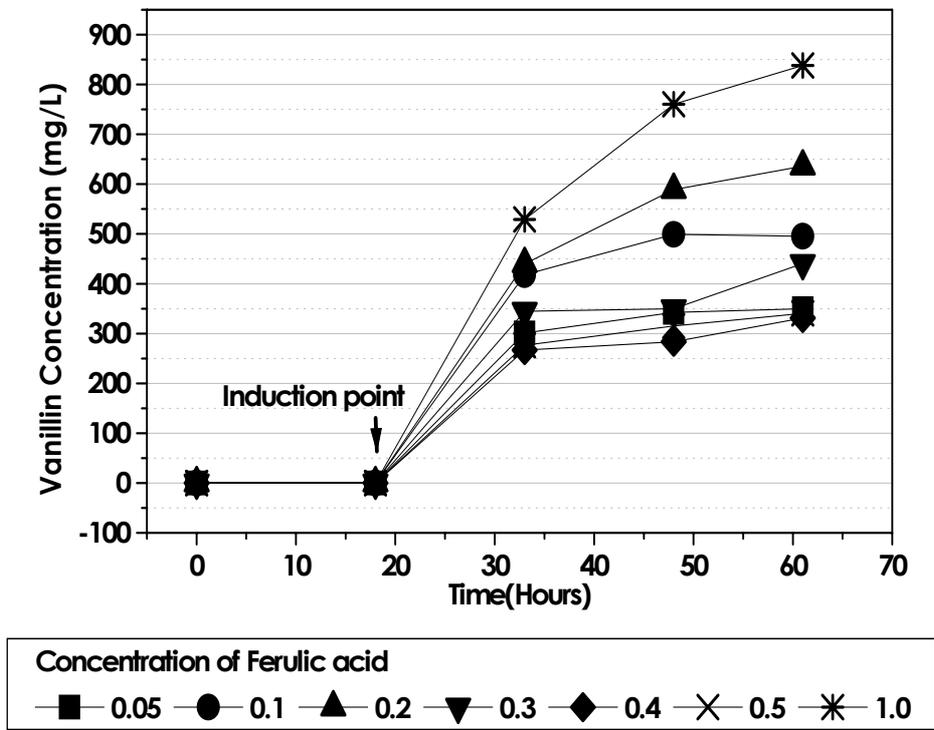


Fig. 19. Effect of ferulic acid concentration on vanillin production of *E. coli* harboring pBAD-AHEF

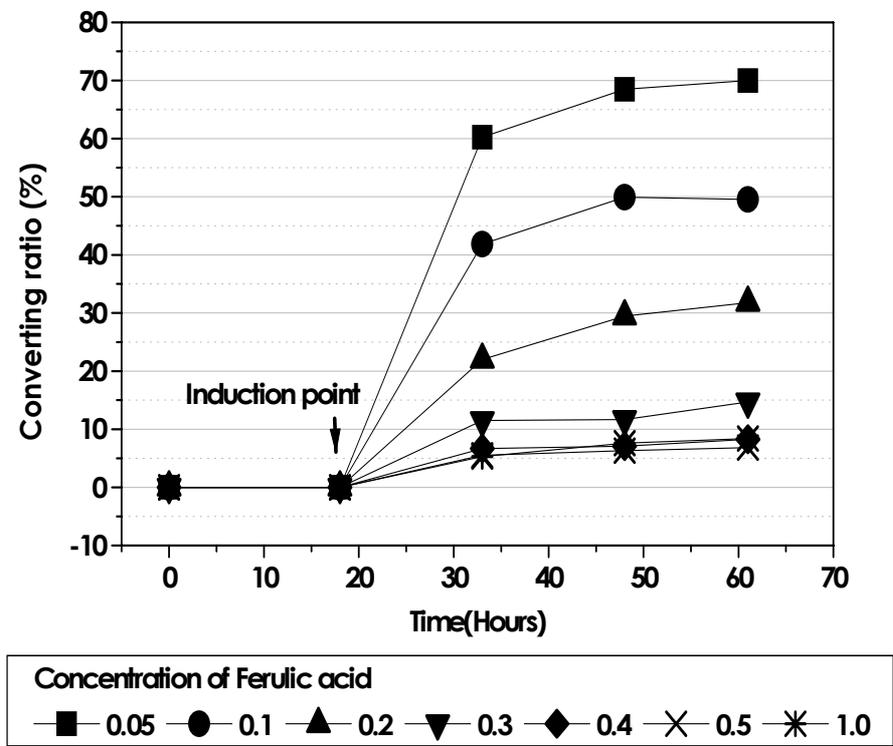


Fig. 20. Effect of ferulic acid concentration on vanillin conversion ratio of *E. coli* harboring pBAD-AHEF

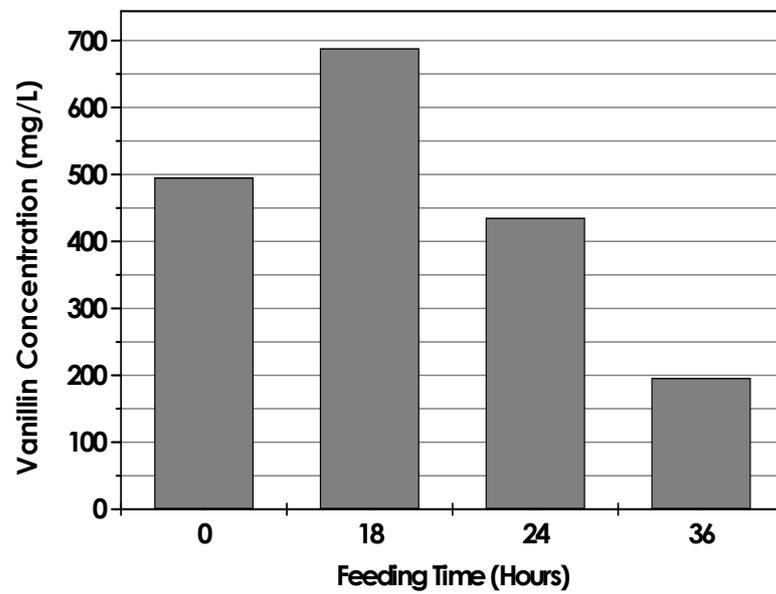


Fig. 21. Effect of feeding time of ferulic acid, 0.1% on vanillin production of *E. coli* harboring pBAD-AHEF

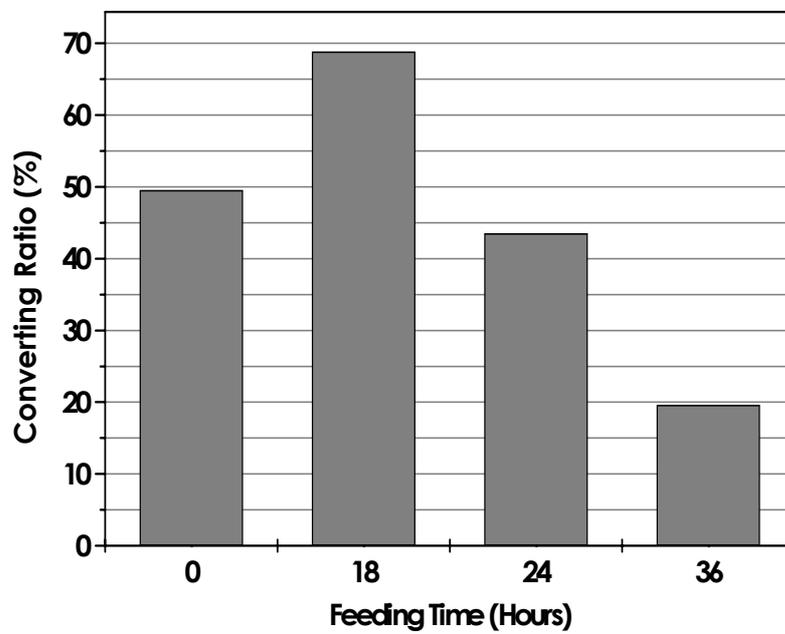


Fig. 21. Effect of feeding time of ferulic acid, 0.1% on vanillin conversion yield of *E. coli* harboring pBAD-AHEF

라. 바닐린 생산균주 탐색 및 우수균주 확보 (제 2 단계)

페룰산으로부터 바닐린을 생산하는 균주를 자연계에서 분리하기 위하여 페룰산이 많이 존재하는 썩은 나무나 건초더미, 삼림토양으로부터 시료를 채취하였다. 세균, 효모, 곰팡이, 방선균 등으로 분리하려는 미생물 군을 나누고, 각 미생물군에 적합한 enrichment culture와 selection culture 방법을 확립하였다. 채취한 시료들을 enrichment culture를 한 후에 탄소원으로 페룰산 만이 존재하는 고체배지에 도달해서 집락을 형성하는 미생물들을 확보하였다. 페룰산만이 들어간 고체 배지에서 생육하면서 바닐린 향기를 내는 미생물들을 탐색 및 분리하였다. 확보한 미생물들을 다시 페룰산이 들어간 액체배지에서 배양하고 바닐린 생성여부를 24, 48, 72시간 배양한 배양액을 HPLC로 분석해서 판단하였다. 이로부터 바닐린을 생산하는 세균, 1 균주와 방선균, 1 균주를 얻었다. 상기의 분리된 균주들은 1 g/L의 페룰산으로부터 24시간 경과 시 400 mg/L 정도의 바닐린을 생산 하였고, 그 이후에 바닐린은 분해되어서 감소하는 결과를 보였다. 상기의 결과는 1차년도에서 얻어진 결과와 유사하였다.

마. 바닐린 고생산성 돌연변이주의 개발

변이원으로는 NTG와 UV를 이용하였다. NTG의 처리농도와 UV의 조사시간은 각각 사멸율이 최소 50%이상과 90% 이상이 되는 범위로 설정하였다. 다양한 돌연변이주를 얻기 위해서 변이기작이 서로 다른 NTG와 UV를 사용하였고, 변이효율이 높은 NTG의 경우에 변이원 처리조건의 기준인 사멸율을 UV보다 낮은 50%이상으로 하였다.

변이대상원으로는 바닐린 생합성 유전자가 도입된 재조합 대장균을 사용하였고, 변이처리 한 균체의 희석액을 페룰산과 바닐린이 각각 고농도로 첨가된 고체배지에 도달하였다. 이것은 페룰산의 대사능력이 높은 돌연변이주와 목적산물인 바닐린에 대한 내성이 큰 돌연변이주를 선별하기 위한 것으로 콜로니 형성이 빠르고 큰 것을 선별의 기준으로 삼았다. 선별된 콜로니들은 액체배양 후, HPLC로 페룰산의 소모속도와 생성속도를 측정해서 검증하였다. 바닐린 고생산성 돌연변이주 개발의 실험결과를 요약하면 변이의 효율은 UV 조사보다는 NTG를 변이원으로 이용하는 것이 좋았

으며, 얻어진 돌연변이주들의 바닐린 생산성의 향상은 주로 목적산물인 바닐린에 대한 저항성의 향상에 기인하는 것으로 판단되었다.

바닐린은 항균활성이 있는 물질로 생산균주로 이용하는 대장균 DH5 α 의 생육도 저해를 하는 것으로 실험결과 밝혀졌다 (Fig. 23). 따라서 돌연변이에 의한 바닐린 생산성 향상은 주로 목적산물이면서도 생산균주의 대사활성을 저해하는 바닐린에 대한 저항성의 증가로 귀결되는 것으로 판단된다. 그림 1은 생산균주인 대장균 DH5 α 의 바닐린에 의한 생육저해도를 보여주고 있다. 바닐린 0.1% 존재 하에서 생육은 심각하게 저해되기 시작해서 0.25%에서는 생육이 완전 저해되는 것을 알 수 있었다. 실험에서 바닐린은 DMSO에 용해시켜 공급하였기 때문에 용매인 DMSO가 생육에 미치는 영향을 조사하기 위해서 0 - 2%의 농도별로 첨가하고 24시간 경과 후의 최종 OD 값을 측정하였다. 실험결과 DMSO는 생육에 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

Fig. 24은 NTG 돌연변이로 얻어진 바닐린 생산성이 향상된 돌연변이주가 모균주 보다 바닐린 저항성이 향상되었음을 보여주고 있다. 모균주인 대장균 DH5 α 는 바닐린 0.2%와 0.3%가 함유된 고체배지에서 생육이 불가능하지만 돌연변이주 “NTG”와 이 돌연변이주에서 다시 돌연연이 과정을 통해서 얻어진 “NTG-1” 돌연변이주는 각각 0.2%와 0.3%의 바닐린이 함유된 고체배지에서도 생육이 가능하였다. 이렇게 지속적인 돌연변이 과정을 통해서 확보된 대장균은 최종적으로 바닐린 생산을 위한 숙주균주로 사용할 것이다.

바. 바닐린 생산균주의 genomic DNA library 구축과 바닐린 생합성 유전자 클로닝

*Streptomyces setonii*는 대표적인 바닐린 생산균주의 하나임에도 불구하고 바닐린 생합성 유전자가 밝혀져 있지 않다. 바닐린 생합성 유전자의 클로닝을 위해서 *Streptomyces setonii*의 genomic DNA library를 구축한다. *Streptomyces setonii* 배양액에서 균체를 회수하고 genomic DNA를 추출한 후에 Sau3 AI으로 random partial digestion을 수행해서 다양한 DNA 단편조각을 얻는다. 이 DNA 단편조각들을 high-copy number vector인 pBluescript II SK(+)의 BamHI site에 도입해서 다양한 유전자들이 포함된 *Streptomyces setonii*의 genomic DNA library를 만든다.

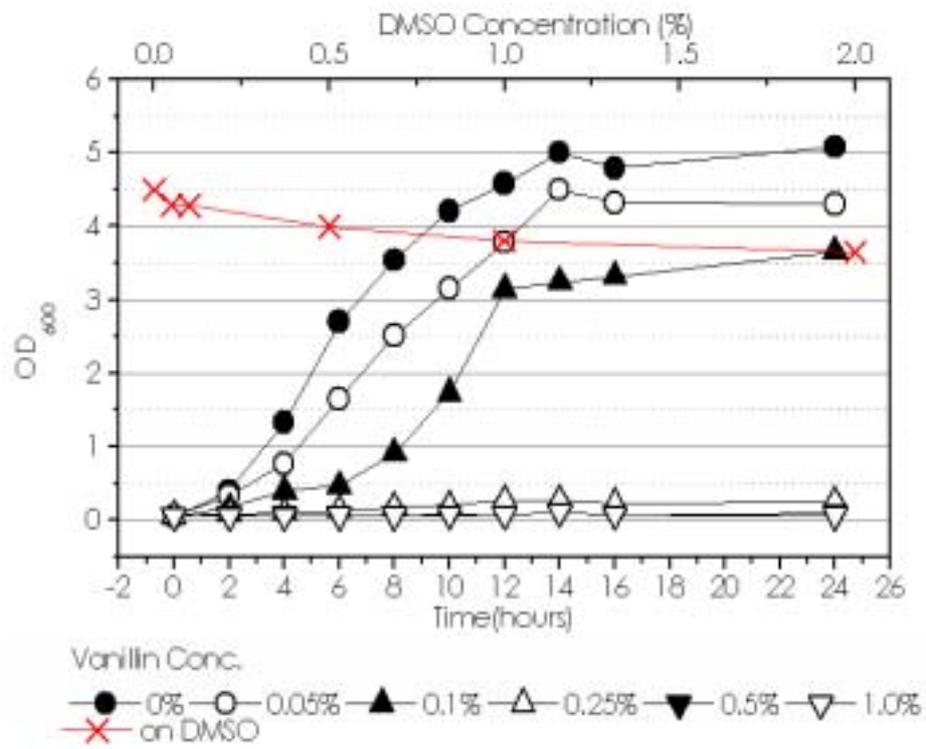


Fig. 23. Vanillin inhibition on cell growth of *E. coli* DH5 α producing vanillin

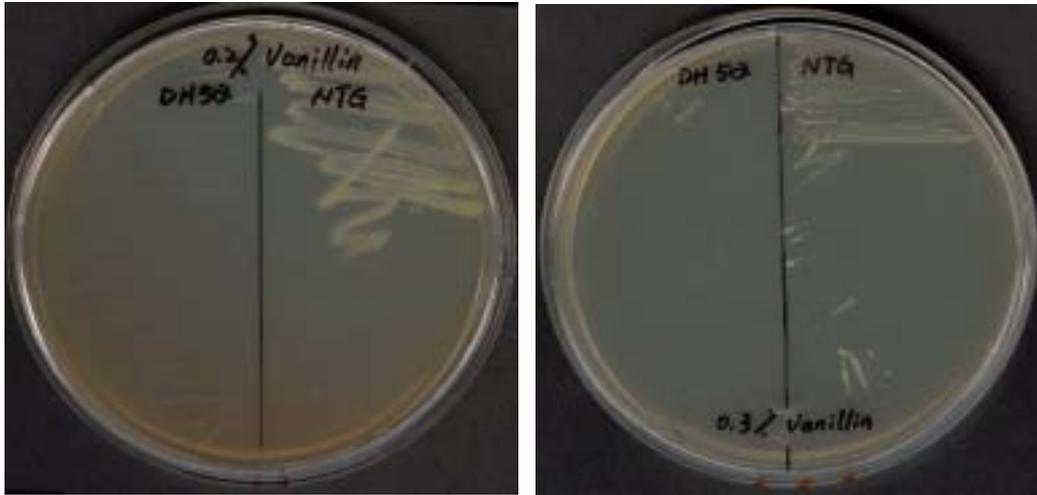


Fig. 24. NTG mutant strain with an increased resistance to vanillin

상기의 구축된 genomic DNA library로부터 신규 바닐린 생합성 유전자를 클로닝 하기위해 Shot-gun method를 이용한다. Shot-gun method는 원하는 유전자가 도입된 클론을 선별하는 시스템이 필요하다. 바닐린 유전자가 도입된 클론을 쉽게 선별할 수 있는 탐색시스템으로 Acetone-NaOH 발색법을 개발하였다. 바닐린은 상기의 발색법에 의해서 노란색으로 변한다. Genomic DNA library를 포함하는 클론들을 96-well plate에서 배양하고 Acetone-NaOH 발색법으로 발색시킨 후에 노란색으로 변한 클론들을 바닐린 생합성 유전자가 포함된 클론으로 추정할 수 있다. 또한, Microplate reader의 430nm 파장에서 흡광도를 측정함으로써 바닐린 생성정도에 관한 정량도 가능하다. Fig. 25에는 *Streptomyces setonii*의 genomic DNA library의 구성에서 shot-gun method를 이용한 클로닝에 이르는 개념이 도식화되어 있다. 현재 genomic DNA library의 구성은 완료되었고, 약 3000개 정도의 클론을 Acetone-NaOH 발색법으로 검색하였다.

Fig. 26에는 본 연구팀이 개발한 Acetone-NaOH 발색법의 바닐린에 대한 선택적인 반응성과 정량 가능성, 정확성 등을 나타내고 있다. Acetone-NaOH 발색법은 1% acetone, 1M NaOH, 시료용액을 동일한 부피로 섞어주고 40℃에서 10분간 반응하면 바닐린이 포함된 시료는 노란색으로 발색되는 것으로 다량의 시료를 단 시간에 고속으로 검색하는 것이 가능하다. 또한 파장 430nm에서 흡광도를 측정함으로써 정량도 가능하다. Fig. 26은 Acetone-NaOH 발색법이 기질인 페룰산, 바닐린의 유도체인 vanillate와 vanillyl alcohol과는 반응하지 않고 바닐린과의 반응만을 통해서 노란색을 발색함을 보여주고 있다. Fig. 26(B)는 실제로 다양한 종류의 배양액에서도 바닐린이 존재하는 경우에만 발색이 되고, 발색의 정도도 바닐린 농도에 비례함을 보여주고 있다.

현재 자연계에 존재하는 미생물의 약99%가 실험실에서는 배양이 불가능한 난배양성 미생물로 알려져 있다. 따라서 실험실에서의 배양과정을 생략하고 자연계의 시료로부터 DNA를 직접 추출해서 metagenome library를 구축하고 유용 유전자원을 검색하는 기술들이 최근 도입되고 있다. 본 연구팀도 난배양성 미생물에 존재할 수도 있는 우수한 바닐린 생합성 유전자원들을 클로닝하기 위해서 산림과 전답 등의 토양에서 구축된 총 36종의 metagenome library를 확보하고 상기한 바닐린 유전자 고효율 탐색 시스템을 사용해서 탐색을 진행하였다.

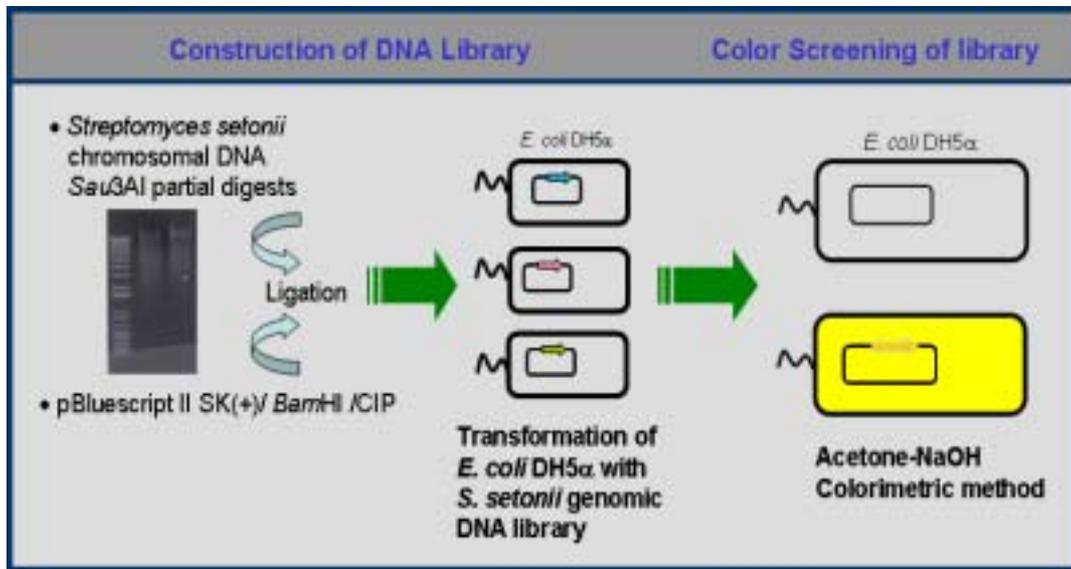


Fig. 25. Scheme of shot-gun cloning of vanillin biosynthetic genes from genomic DNA library of *Streptomyces setonii*

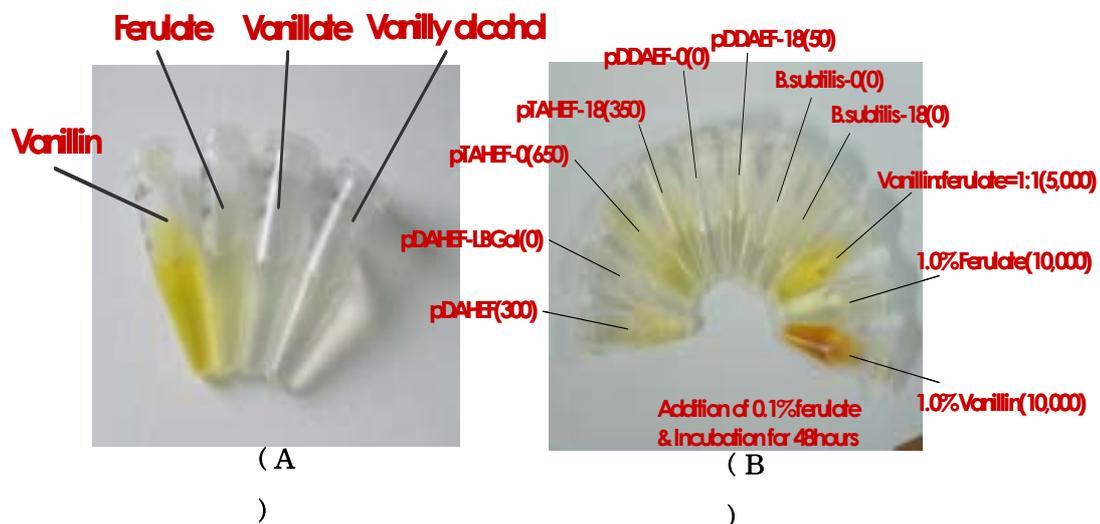


Fig. 26. Selective detection of vanillin and its quantification by using Acetone-NaOH colorimetric method. (A) specific reaction to vanillin, (B) quantitative reaction to vanillin: vanillin concentration in parenthesis.

사. 바닐린 생합성 유전자의 기능적 발현, 유전자간의 활성비교, 우수 유전자 선발

신규 또는 1, 2차 년도에서 확보된 바닐린 생합성 유전자들의 대장균 내에서의 단백질 발현 여부를 SDS-PAGE를 통해서 예상되는 위치에 단백질 밴드의 유무를 확인한다. 1차년도에서는 *Amycolatopsis* sp. strain HR167과 *Delftia acidovorans*로부터 feruloyl-CoA synthetase 유전자(*fcs*)와 enoyl-CoA hydratase/aldolase 유전자(*ech*)를 클로닝 하였고, 2차년도에서는 신규로 *Pseudomonas putida*의 *fcs*와 *ech* 유전자를 클로닝 하였다. 이들 유전자의 단백질 발현 여부를 SDS-PAGE로 확인하였다 (Fig. 27).

전반적으로 *ech* 유전자는 발현량이 충분해서 32 KDa 위치에서 단백질 밴드가 관찰되었으나 *fcs*의 경우에는 예상되는 52 KDa의 위치에서 단백질 밴드가 관찰되지 않았다. 이것은 *fcs*의 발현량이 불충분해서 SDS-PAGE 상에서 관찰이 불가능했기 때문이다. 이들 유전자를 대장균에 도입하고 바닐린 생산여부를 관찰한 결과, *Amycolatopsis* sp. strain HR167의 유전자는 바닐린을 생산했지만 *Delftia acidovorans*와 *Pseudomonas putida*의 유전자들은 바닐린을 생산하지 못했다. 이것은 *Delftia acidovorans*와 *Pseudomonas putida*의 바닐린 생합성 유전자들이 대장균에서 기능적으로 발현이 되지 않는다는 것을 의미한다. 따라서 서로 다른 종류의 유전자들 간의 활성비교는 진행할 수가 없었다.

일반적으로 바닐린 생합성 효소 및 유전자원의 발굴은 바닐린 생합성 가능한 미생물들의 종류가 제한되어 있고 대사경로가 복잡해서 어려운 것으로 보고되어 있다. 현재까지 4종의 유전자만이 보고되고 있는 것이 이를 반증한다. 하지만 *Streptomyces setonii*의 genomic DNA library와 metagenome library로부터 Acetone-NaOH 발색법을 이용해서 대장균에서 기능적으로 발현되는 바닐린 생합성 유전자 클로닝을 시도하였다.

상기 연구결과를 바탕으로 후속연구를 추진하였다. 추진내용은 1) 페룰산에서 바닐린으로 전환되는 반응을 최적화하기 위한 배지조성, 기질(페룰산)농도, 용존산소농도, pH등의 화학적 인자와 배양온도, 교반속도 등의 물리적 인자들의 최적화, 2) 바닐린 축적으로 야기되는 균체 활성과 산물의 생산성 감소를 방지하기 위하여 최종 산물의 연속적 회수가 가능한 소규모 생물반응기의 제작이다.

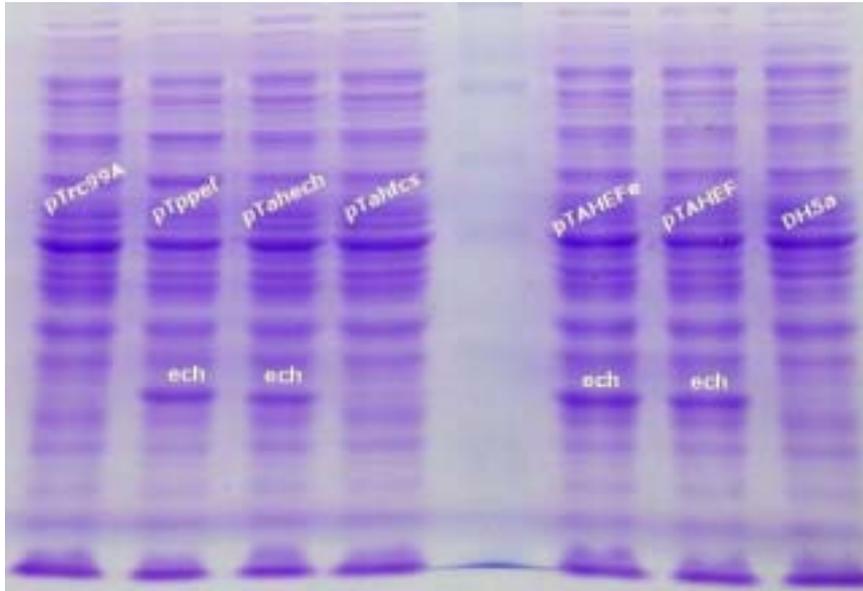


Fig. 27. SDS-PAGE of protein expression of *fcs* and *ech* from *Amycolatopsis* sp. strain HR167 and *Pseudomonas putida*

pTppel (pTrc99A:: *ech* & *fcs* of *P. putida*), pTahech (pTrc99A:: *ech* of *Amycolatopsis* sp.), pTahfcs (pTrc99A:: *fcs* of *Amycolatopsis* sp.), pTAHEFe (pTrc99A:: *ech*, *fcs*, & *ech* of *Amycolatopsis* sp.), pTAHEF (pTrc99A:: *ech* & *fcs* of *Amycolatopsis* sp.)

아. 재조합 대장균을 이용한 바닐린 생합성 반응 최적화

Amycolatopsis sp. strain HR167의 *ech*와 *fcs* 유전자를 *ara promoter*를 갖는 pBAD24 벡터에 도입해서 pBAD-AHEF 플라스미드를 1차년도에서 제조하였다. 이 플라스미드를 포함하는 재조합 대장균에서 바닐린 생산을 극대화하기 위한 배양조건 최적화를 수행하였다.

배지 최적화를 위해서 3종류의 복합배지 (2YT, LB, TB media)와 1종류의 최소배지 (M9 media)를 사용해서 바닐린 생산성을 비교하였다 (Fig. 28). 각각의 배지에 페룰산을 0.1%씩 첨가하고 37°C에서 48시간 배양하였다. 균체생육량은 복합배지 중에서도 가장 영양분의 농도가 높은 TB배지에서 최대값을 보였고, 바닐린은 570mg/l로 LB배지에서 최대가 되었으며, 가장 낮은 바닐린 생산량을 보인 M9 최소 배지에 비해서 약 2배 이상 높았다. 이것은 영양분이 충분한 경우에는 바닐린 생합성보다 균체생육이 주로 발생하고, 반대로 부족한 경우에는 바닐린 생합성이 제한됨을 의미한다. 따라서 적절한 영양분의 공급이 필요하다는 결론을 얻었다.

바닐린 생합성에 최적인 탄소원을 선정하기 위해서 기본 배지인 2YT에 7종의 탄소원을 각각 1%씩 첨가하고 배양하였다 (Fig. 29). Yeast extract와 tryptone으로만 구성되어 있는 2YT배지에 탄소원의 추가가 바닐린 생산을 증가시킬 것이라는 당초의 기대와는 달리 glucose, xylose, glycerol을 첨가한 경우에 바닐린은 전혀 생성되지 않았고, fructose를 첨가한 경우에는 소량 생성되었고, lactose, galactose, sucrose의 경우에는 탄소원을 첨가하지 않은 Fig. 28의 결과와 유사한 결과를 보였다. 이것은 매우 흥미로운 사실로 glucose, xylose, glycerol 같은 탄소원이 바닐린 생합성을 저해하는 요인을 규명하고 그 저해요인을 제거함으로써 바닐린 생산성을 획기적으로 증가시킬 수도 있을 것이다. 현재 상기의 탄소원들에 의한 바닐린 생합성 저해기작을 규명하는 연구를 진행하고 있다.

바닐린 생합성 과정에서의 용존산소 요구도를 연구하기 위해서 배양관내의 배양액의 부피를 3 - 10ml로 변화시킴으로써 용존산소량의 변화를 유도하였다 (Fig. 30). 바닐린 생산은 공기와의 접촉면적이 넓어서 배양액중의 용존산소 농도가 가장 높았던 최소 배양액량인 3ml에서 최대가 되었다. 이것은 바닐린 생합성 반응이 산소를 많이 요구하는 반응으로 발효조 조업시에 용존산소가 제한되지 않도록 하는 것이 중요함을 의미한다.

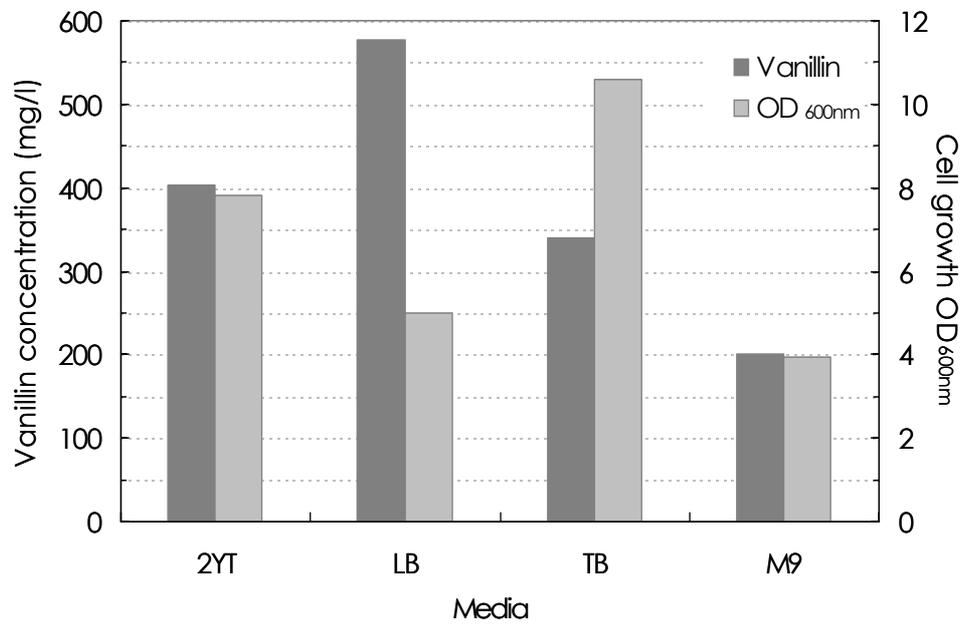


Fig. 28. Optimization of culture media for recombinant *E. coli* harboring pBAD-AHEF

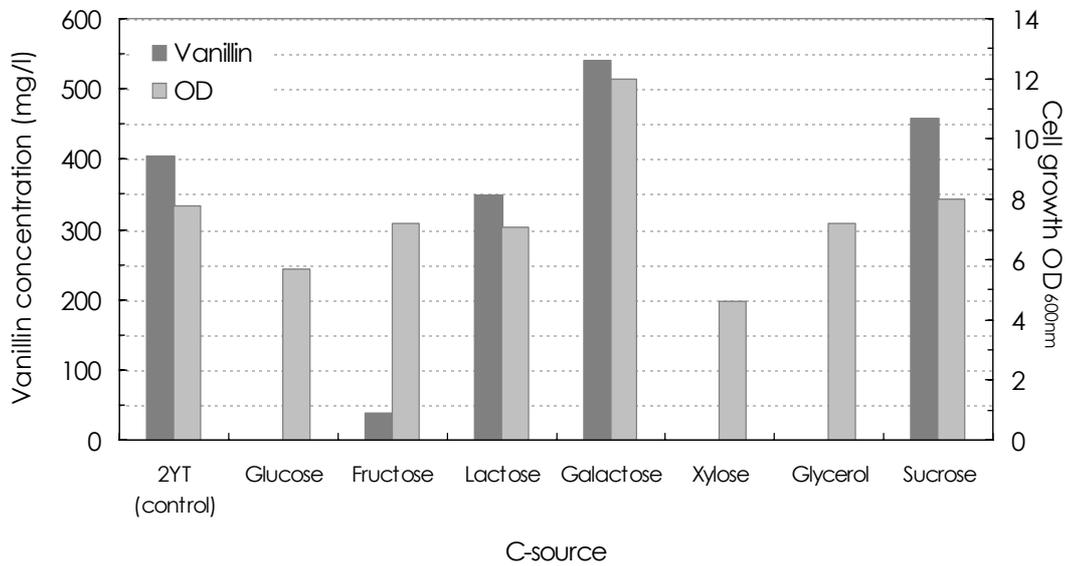


Fig. 29. Optimization of carbon sources for recombinant *E. coli* harboring pBAD-AHEF

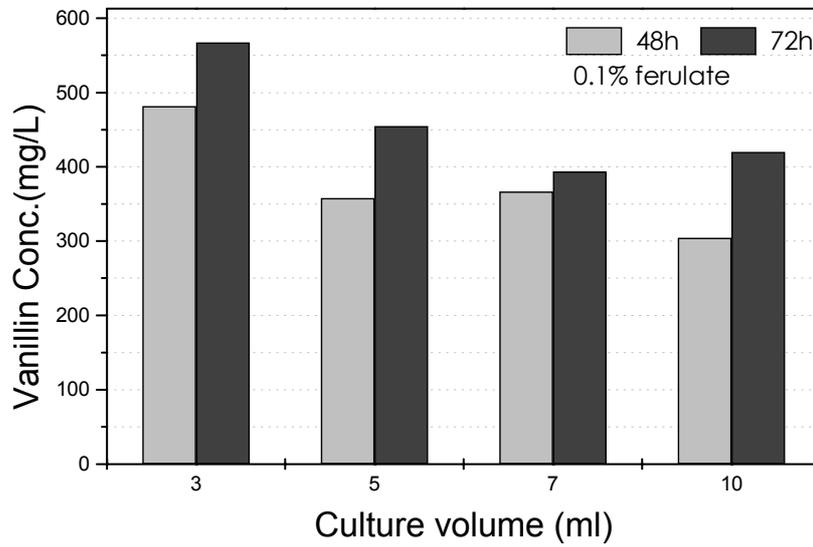


Fig. 30. Optimization of dissolved oxygen concentration for recombinant *E. coli* harboring pBAD-AHEF

Amycolatopsis sp. strain HR167의 *ech*와 *fcs* 유전자를 *trc* promoter를 갖는 pTrc99A 벡터에 도입해서 pTrc-AHEF 플라스미드를 2차년도에서 제조하였다. Trc promoter는 IPTG에 의해 유도되며 ara promoter보다 강력해서 *ech*와 *fcs* 유전자의 발현량을 증가시킬 수 있다. 이 플라스미드를 포함하는 재조합 대장균에서 바닐린 생산을 극대화하기 위한 배양조건 최적화를 수행하였다. pBAD-AHEF (pDAHEF)와 pTrc-AHEF (pTAHEF)의 구조는 Fig. 31과 같다.

바닐린 생산에 적합한 페룰산의 첨가시간은 pBAD-AHEF의 경우에 배양 18시간에서 좋았지만 pTrc-AHEF의 경우에는 배양초기에 첨가하는 것이 18시간에서 첨가하는 것 보다 약 2배정도 높은 바닐린 생산량을 얻을 수 있었다 (Fig. 32). 바닐린 생산성은 역시 pTrc-AHEF가 pBAD-AHEF에 비해서 전반적으로 2배 이상 높았다.

기질인 페룰산의 최적 첨가량 결정을 위해서 0 - 1.0% 범위에 걸쳐서 페룰산의 첨가량을 변화시켰다. 페룰산이 0.2% 이상 첨가되는 경우에 균의 생육은 저해를 받았고, 1.0%에서는 심각한 저해현상이 관찰되었다 (Fig. 33). 바닐린 생산은 페룰산이 0.2% 첨가된 경우에 약 1000mg/l로 가장 높았고, 0.2% 이상에서는 페룰산 첨가량이 높아질수록 바닐린 생산은 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 34). 배양액중의 잔존 페룰산은 0.1%와 0.2% 첨가한 경우에는 거의 고갈되어 0% 수준이었다. 따라서 배양액중에 페룰산이 고갈되지 않으면서 균체생육이 저해 받지 않을 정도로 낮은 농도의 페룰산을 연속적으로 공급하면 더 높은 바닐린 생산성을 얻을 수 있을 것이다.

유전자 발현량을 최적화하기 위해서 발현 유도제인 IPTG 첨가량을 변화시켰다 (Fig. 30). 페룰산의 소모는 모든 IPTG 농도에서 잔존 페룰산양이 100mg/l 이하로 유사하였으나, 바닐린 생산은 IPTG 농도가 0.2mM 이상인 경우에는 감소하기 시작해서 1.0mM IPTG에서는 검출되지 않았으며, 아울러 0.2mM IPTG 이상에서는 바닐산 (vanillic acid)이 다량 검출되었다. 대장균은 바닐린을 바닐산으로 전환하는 vanillin dehydrogenase 유전자 (*vdh*)를 갖고 있지 않음에도 불구하고 고농도의 IPTG 첨가 시에 바닐산이 생성된다는 것은 새로운 발견이다. 결론적으로 바닐린 생합성 유전자들의 과도한 발현은 바닐린 생성을 저해하고 바닐산의 축적을 유도하므로 IPTG를 첨가하지 않고 2YT 복합배지에 존재하는 natural inducer 성분들에 의해서만 유전자가 발현되도록 하는 것 (leaky expression)이 바닐린 생산에 최적임을 알았다.

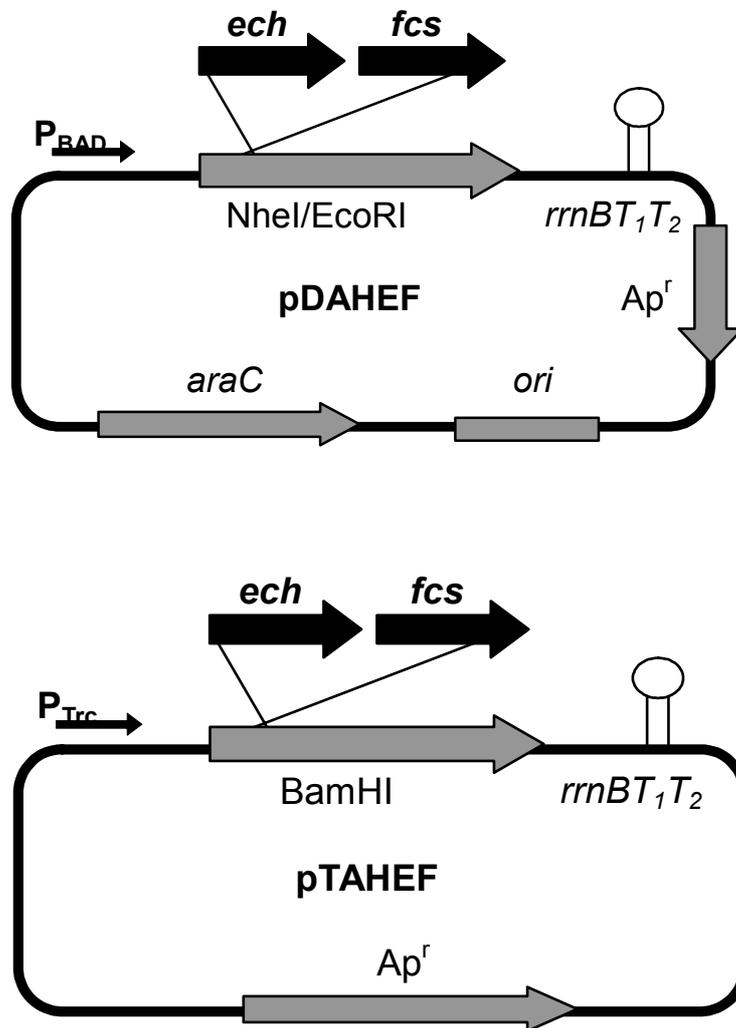


Fig. 31. Structure of recombinant plasmid of pBAD-AHEF (pDAHEF) and pTAHEF

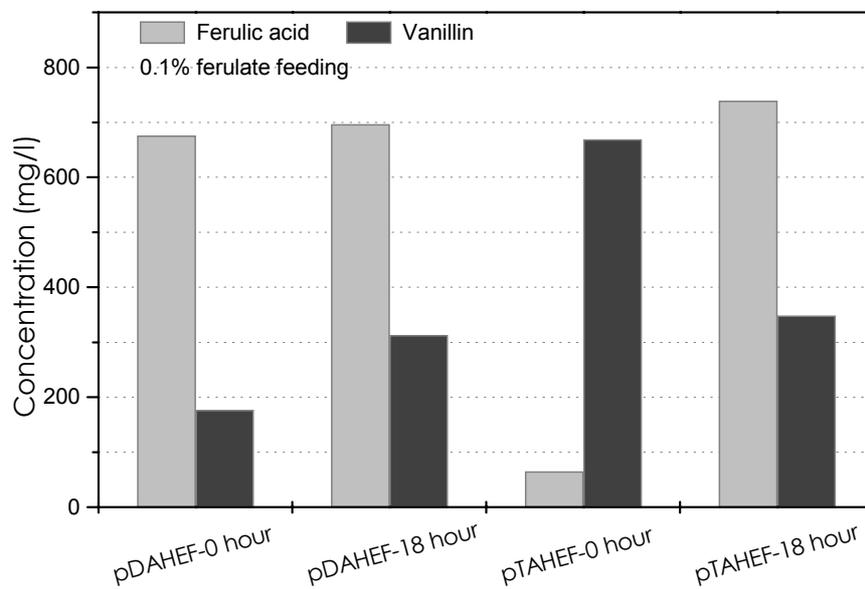


Fig. 32. Comparison of optimal feeding time of ferulic acid between recombinant *E. coli* strains harboring pBAD-AHEF and pTrc-AHEF

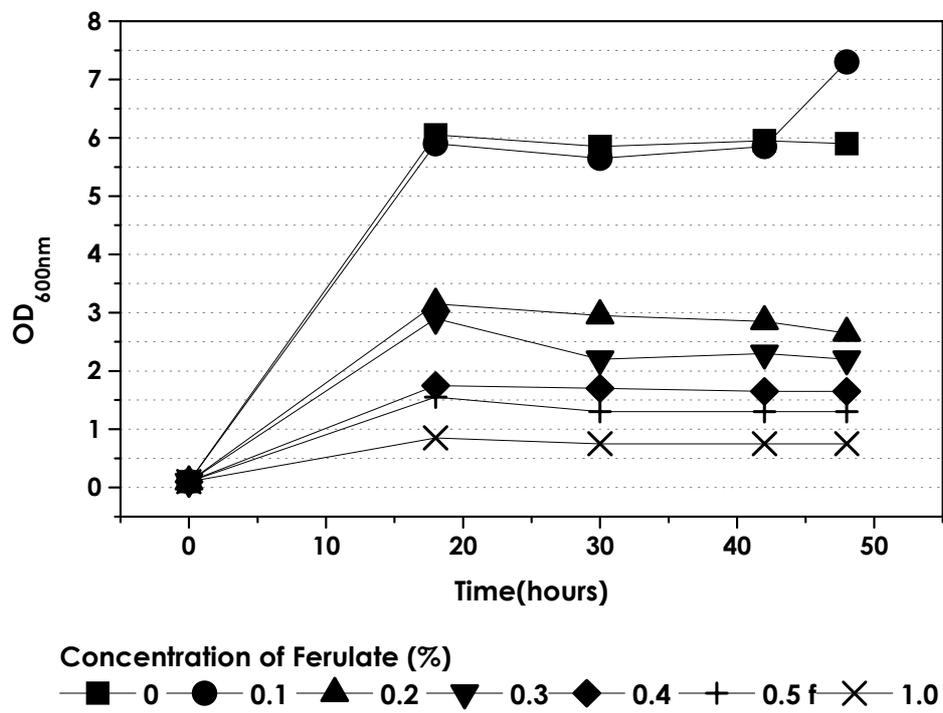


Fig. 33. Effect of ferulic acid concentration on cell growth of *E. coli* harboring pTrec-AHEF

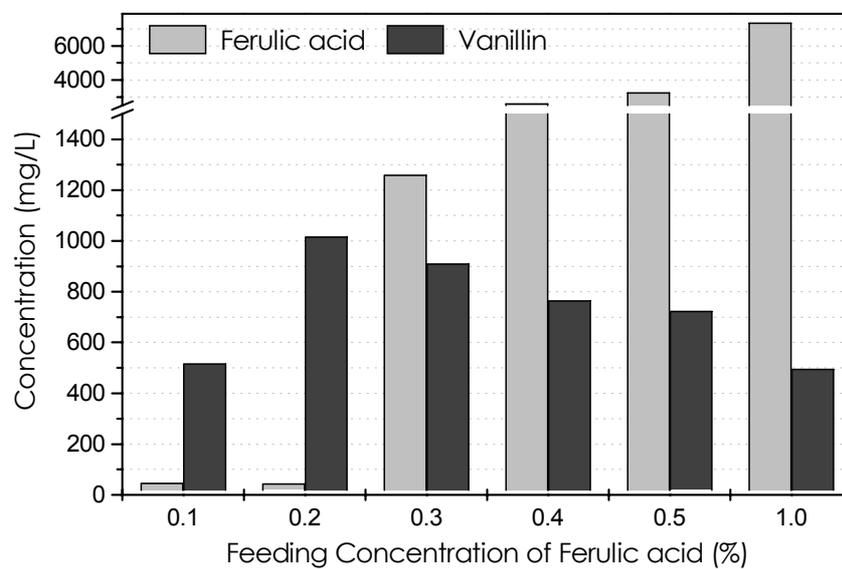


Fig. 34. Effect of ferulic acid concentration on vanillin production of *E. coli* harboring pTrc-AHEF

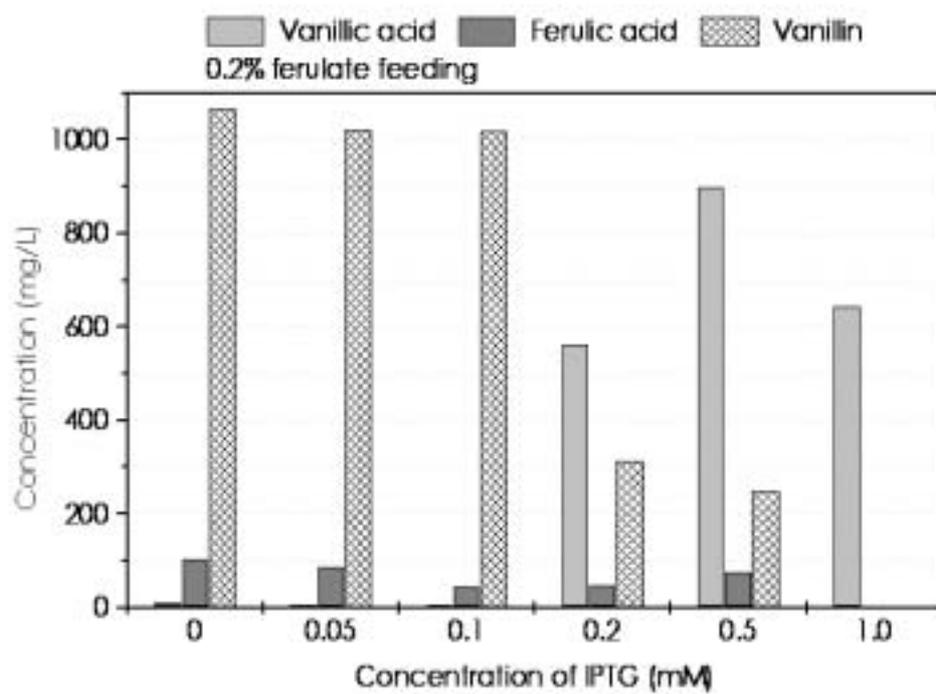


Fig. 35. Effect of IPTG concentration on vanillin production of *E. coli* harboring pTrc-AHEF

고농도 바닐린 생산의 장애요인은 목적산물인 바닐린이 생산균주의 생육을 저해하는 것이다. 따라서 배양액 중에 생산된 바닐린을 선택적으로 흡착해주는 수지를 사용한다면 바닐린 생산균주는 바닐린에 의해 생육이 저해를 받지 않고 고농도로 바닐린을 생산할 수 있을 것이다. 바닐린 흡착수지로 XAD-2, XAD-4, XAD-7, XAD-16을 시험하였고 대부분이 비슷한 바닐린 흡착능을 보였다. Fig. 36과 Table 9에는 XAD-2 수지의 바닐린과 페룰산에 대한 흡착능을 나타내었다. 1% 바닐린 용액에서 XAD-2 수지의 바닐린 흡착률은 97.6%, 1% 페룰산 용액에서 XAD-2 수지의 페룰산 흡착률은 51.6%, 1% 바닐린과 1% 페룰산의 혼합용액에서 XAD-2 수지의 바닐린과 페룰산에 대한 흡착률은 80.4%와 51.8% 이었다. 따라서 XAD-2 수지를 배양액에 첨가하면 배양액내의 80%이상의 바닐린을 이 수지가 흡착해서 실제 배양액의 바닐린 농도는 균체 생육을 저해하지 않는 농도로 유지가 될 것이다. 또한 초기에 페룰산을 고농도로 첨가하더라도 페룰산의 50%가량이 수지에 흡착되어 있다가 서서히 용출되어 나올 것이므로 배양공정을 단순화시킬 수 있을 것이다.

페룰산이 0.5% 첨가된 배지에 XAD-2 수지를 500mg과 1250mg을 첨가하고 배양을 수행하였다 (Fig. 37). 페룰산의 소모와 바닐린의 생산양상은 두 배양에서 유사하였으나, 수지를 500mg 첨가한 배양에서 바닐린의 생산량이 높았다. 이것은 적절한 양의 수지를 첨가하는 것이 바닐린의 생산성 향상에 더 좋다는 것을 의미한다. 그림 11의 페룰산 농도의 영향에 관한 실험에서 XAD-2 수지의 첨가 없이 0.5% 페룰산을 공급한 경우에 페룰산은 약 2000mg/l 소모되었고 바닐린은 약 700mg/l 생산되었다. 그러나 XAD-2 수지를 500mg 첨가한 본 실험에서는 페룰산은 거의 고갈되었고 바닐린은 약 2300mg 생산되었다. 페룰산이 0.7% 첨가된 배지에 XAD-2 수지를 2500mg을 첨가하고 배양을 수행하였다 (Fig. 38). 페룰산은 배양 24시간 만에 거의 소모되었고 바닐린은 3600mg이 생산되었다. 따라서 페룰산 공급량을 더 높이고 적절한 수지량을 첨가한다면 바닐린의 생산성을 더욱 향상시킬 수 있을 것으로 판단된다. 결론적으로 XAD-2 수지를 사용해서 바닐린의 생육저해효과를 감소시킴으로써 페룰산의 대사와 바닐린의 생산을 증가시킬 수 있었다. Fig. 39에는 12시간마다 바닐린이 흡착된 XAD-2수지를 새로운 수지로 교체해 주었을 경우에 바닐린에 의한 생육저해 현상의 제거로 바닐린의 생산이 48시간에 최대 9.2g/L에 도달하는 결과를 보여주고 있다.

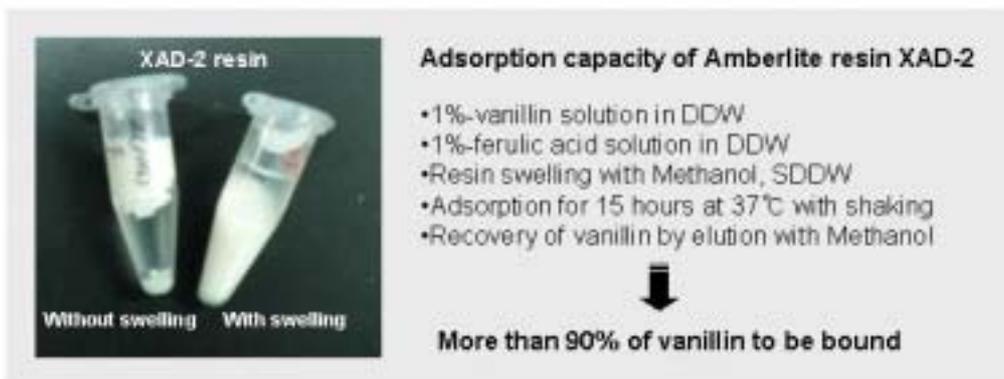


Fig. 36. Adsorption capability of XAD-2 resin for vanillin and ferulic acid

Table 9. Adsorption capability of XAD-2 resin for vanillin and ferulic acid

		흡착률 (%)	비흡착률 (%)
바닐린 1% 용액		97.6	2.4
페룰산 1% 용액		51.6	48.4
바닐린, 1% + 페룰산, 1%	바닐린	80.4	19.6
	페룰산	51.8	48.2

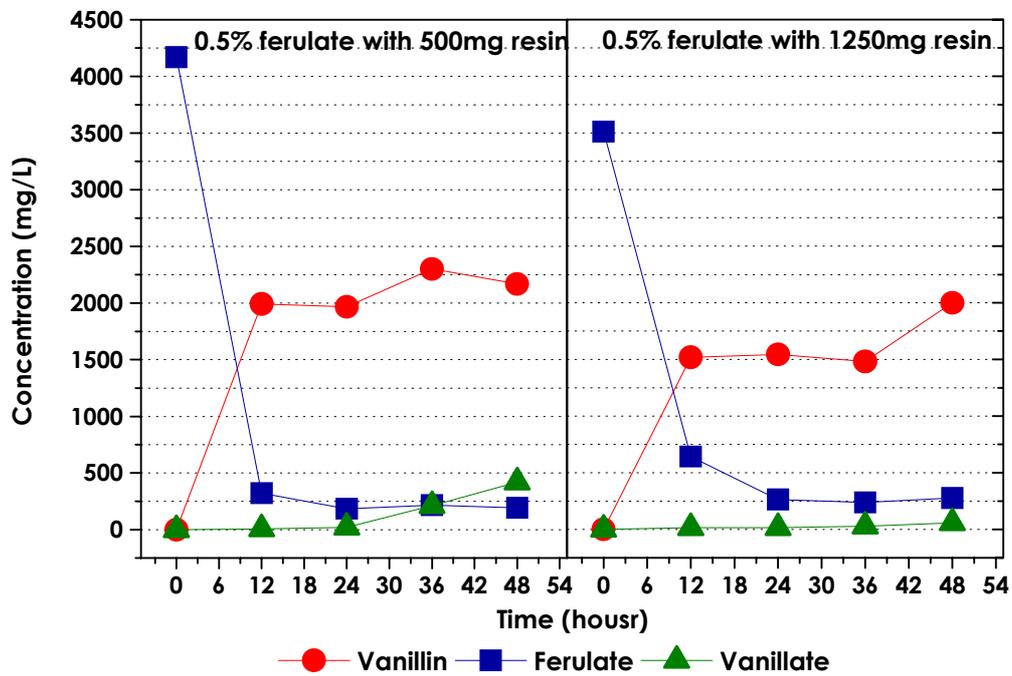


Fig. 37. Effect of XAD-2 resin addition on vanillin production from *E. coli* harboring pTrc-AHEF (I)

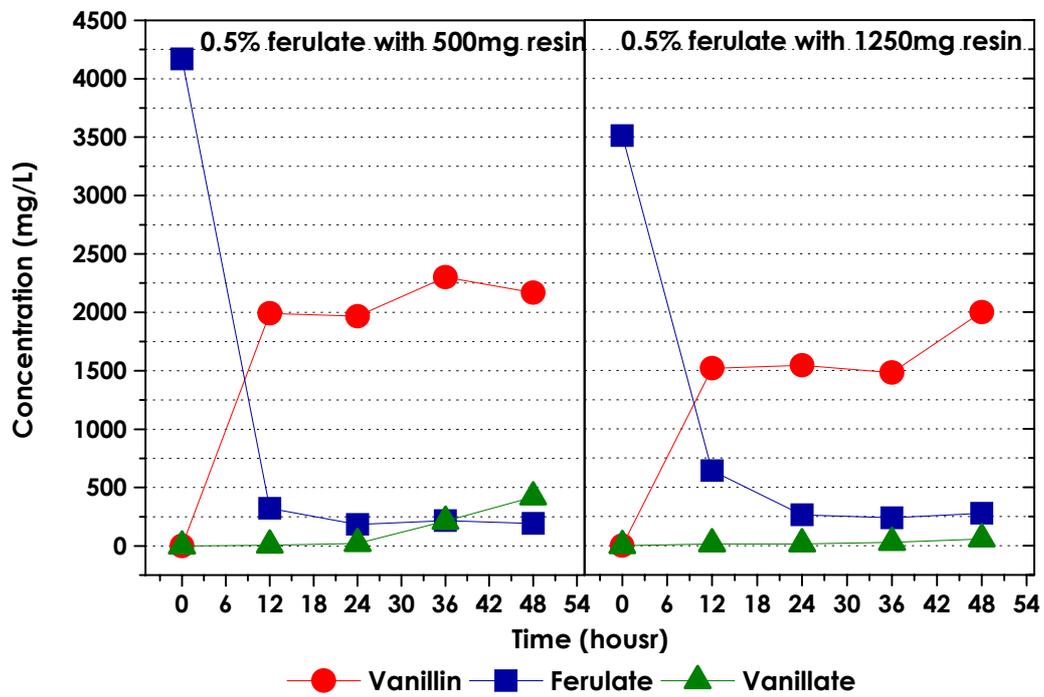


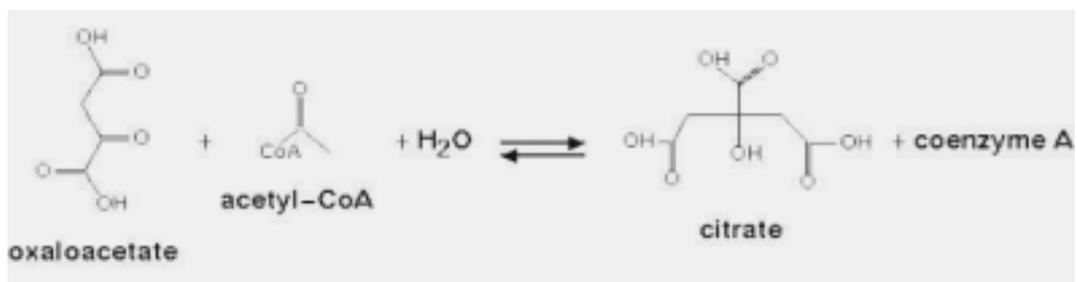
Fig. 38. Effect of XAD-2 resin addition on vanillin production from *E. coli* harboring pTrc-AHEF (II)

Fig. 39. Vanillin production from *E. coli* harboring pTrc-AHEF with replacement of fresh XAD-2 resin

본 연구에 이용된 바닐린 생산경로인 Co-A dependent deacetylation pathway는 Fig 11에 나타난 것처럼 feruloyl-CoA가 vanillin으로 전환되면서 acetyl-CoA가 생성된다. 이렇게 부수적으로 생성되는 acetyl-CoA가 효율적으로 소모되지 않고 균체 내에 축적되면 enoyl-CoA hydratase/aldolase 효소의 반응은 저해를 받을 것이다. 이를 해결하기 위해서 acetyl-CoA의 TCA cycle로의 소모를 유도하는 citrate synthase 유전자 (*gltA*)를 pTAHEF에 도입해서 pTAHEF-*gltA*를 만들고 pTAHEF와 pTAHEF-*gltA*를 각각 포함하는 재조합 대장균의 바닐린 생산성을 비교하였다 (Fig. 40, Fig. 41). 0.3%의 페룰산이 포함된 배지에서 pTAHEF-*gltA*를 함유한 재조합 대장균은 1.3g/L의 바닐린을 생산한 반면에 pTAHEF를 함유한 재조합 대장균은 약 절반 수준인 0.75g/L의 바닐린을 생산하였다. 이로부터 바닐린 생산경로에서 여분의 acetyl-CoA가 발생하고 이를 효율적으로 소모시켰을 때에 바닐린의 생산성이 증가하는 것을 알았다.

화학변이원인 NTG를 처리하고 바닐린이 함유된 고체배지에서 바닐린에 내성을 갖는 것으로 선발된 NTG mutant를 바닐린 생산공정에 적용하기 위한 배양조건의 최적화를 수행하였다. 배지 최적화를 위해서 2YT, TB, LB, M9 배지를 사용하였고, 실험결과 2YT, LB, TB, M9의 순서로 바닐린 생산성이 높았다 (Fig 42). 따라서, 기존의 생산배지와 동일한 배지의 사용이 가능하다. 탄소원 최적화를 위해서 glucose, fructose, lactose, galactose, xylose, glycerol, sucrose등을 0.5% 농도로 2YT 배지에 첨가하였다 (Fig. 43). 탄소원을 첨가한 경우에 lactose를 제외하고 모든 탄소원에서 바닐린의 생산이 크게 감소함을 보였다. 그리고, 탄소원을 첨가하지 않은 경우가 가장 높은 바닐린 생산성을 보임으로써 고농도 바닐린 생산을 위해서는 탄소원을 첨가하지 않는 것이 좋다는 결론을 얻었다. 또한 NTG mutant의 바닐린 생산성을 기존에 이용했던 DH5a 균주와 추가로 DH10 β 와 XL1-Blue 균주를 이용해서 비교하였다 (Fig. 44). NTG mutant의 경우에 0.3% 페룰산이 첨가된 2YT 배지에서 1.9g/L의 바닐린을 생산하였고 이것은 다른 균주들의 생산성에 비해서 2 - 3배 높은 값이다.

(A)



(B)

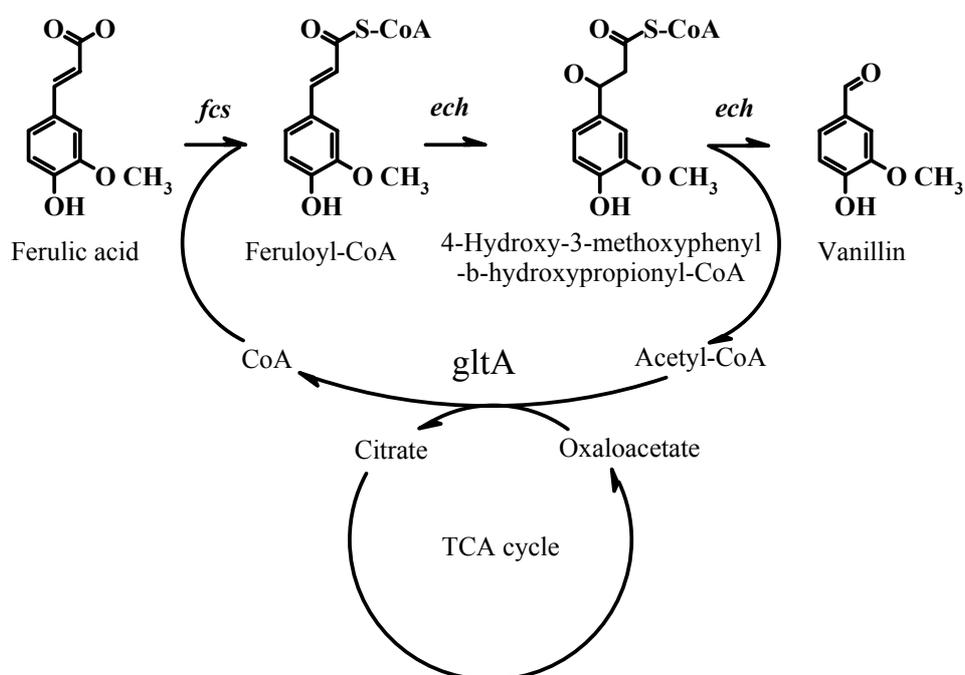


Fig. 40. Role of citrate synthase (A) and its action on maintenance of acetyl-CoA/CoA ratio for vanillin production (B)

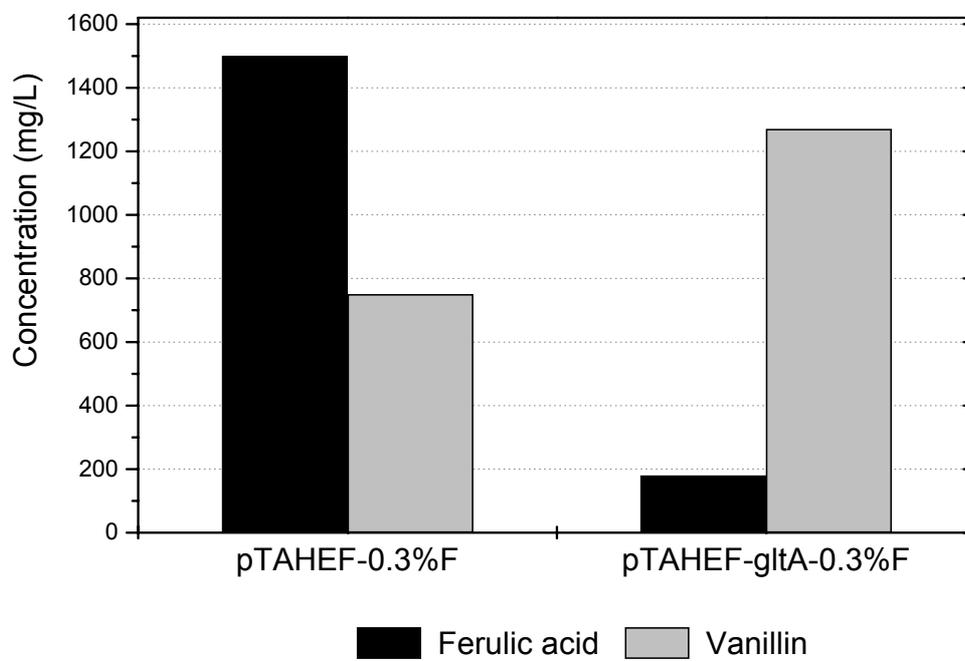


Fig. 41. Comparison of vanillin production between *E. coli* harboring pTAHEF and pTAHEF-gltA (B)

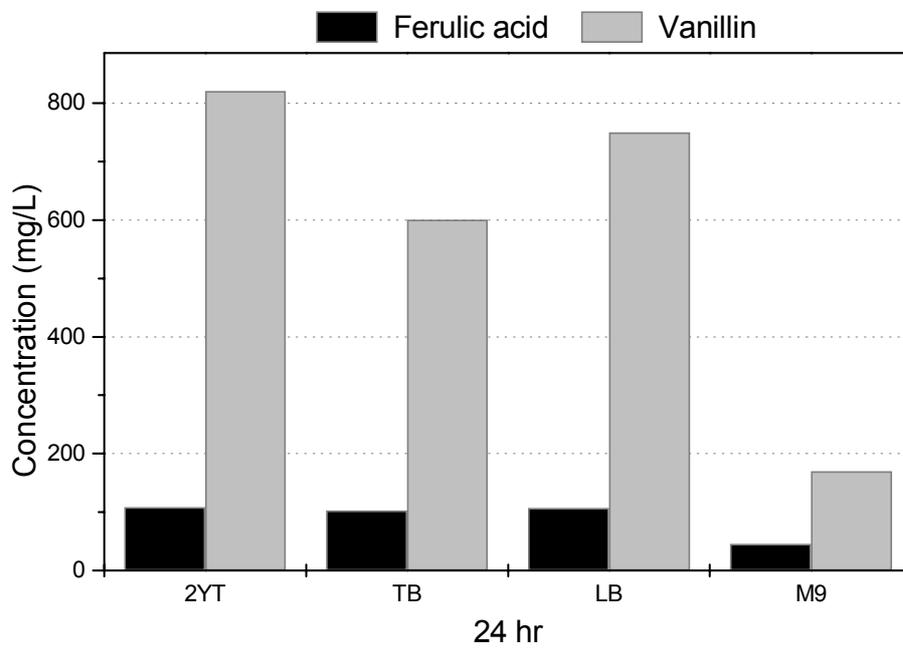


Fig. 42. Effect of different media on vanillin production from *E. coli* NTG mutant harboring pTAHEF

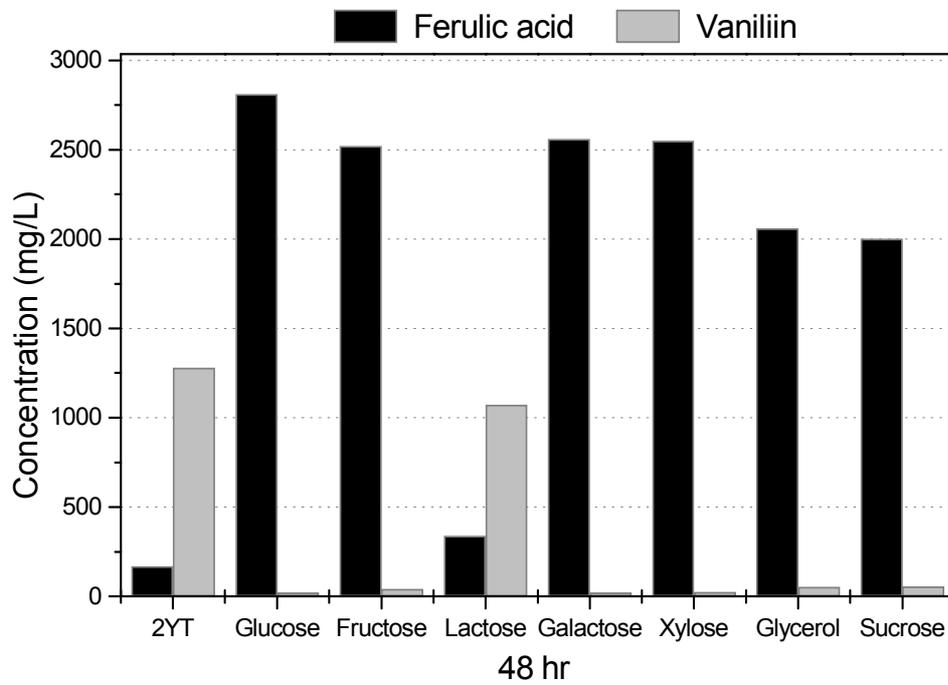


Fig. 43. Effect of carbon sources on vanillin production from *E. coli* NTG mutant harboring pTAHEF

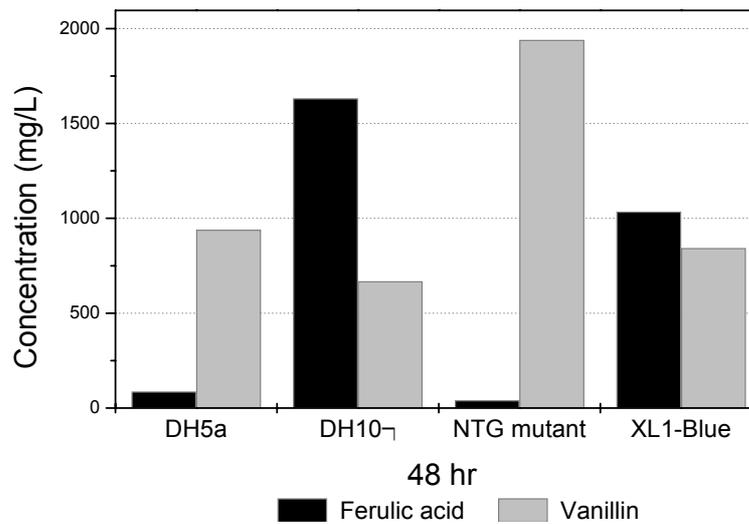
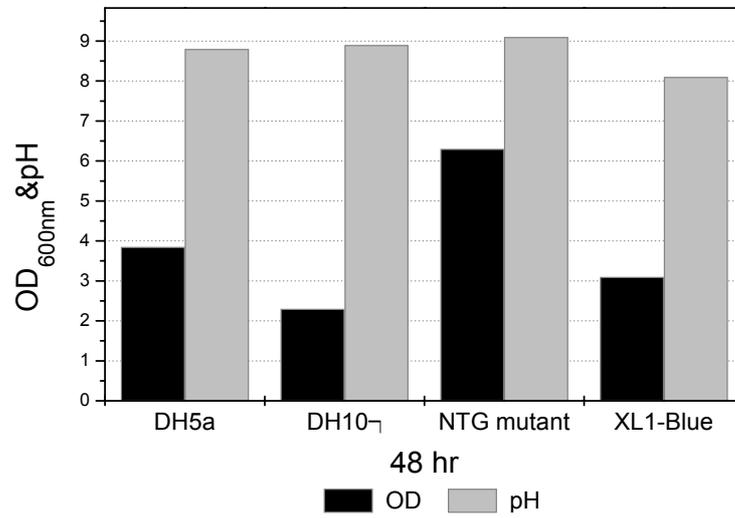


Fig. 44. Comparison of vanillin production among different *E. coli* strains (NTG mutant, DH5a, DH10 β , XL1-Blue) harboring pTAHEF

자. 바닐린 생산용 생물반응기의 개발

페룰산으로부터 바닐린의 생산반응은 feruloyl-CoA synthetase와 enoyl-CoA hydratase/aldolase의 두 가지 효소에 의해서 이루어지는 생물전환반응으로 바닐린의 연속적인 추출이 가능하다면 바닐린에 의한 생육저해 현상 없이 균체의 재사용을 통한 연속적인 조업이 가능하다. 따라서 Fig. 45과 같은 생물반응기를 제작하였다. 본 생물반응기는 크게 2부분으로 구분할 수가 있다. 균체의 생육과 바닐린이 생성되는 발효조와 바닐린을 연속적으로 추출하는 추출조가 있다. 추출조에는 바닐린 흡착을 위한 XAD-2 수지가 충전되어 있으며, 발효조에서 배양액의 일부를 추출조로 순환시키면 배양액중의 바닐린은 수지에 흡착되게 된다. 바닐린이 수지에 흡착되면 균체를 포함한 배양액은 다시 발효조로 순환되게 된다. 다시 추출조에서는 수지에 흡착된 바닐린은 용출하기 위해서 에탄올을 공급하고 추출이 완료되면 에탄올은 추출조에서 회수되고 추출조의 수지는 다시 배양액의 바닐린을 흡착할 수 있는 상태가 된다. 따라서 균체의 재사용을 통해서 균의 증식에 소요되는 시간과 비용을 줄일 수 있고, 발효조 내의 균체를 고농도로 유지함으로써 바닐린 생산성을 향상시킬 수가 있다. 아울러 연속적인 바닐린의 생산도 가능하게 한다. 상기 신규 생물반응기에서 초기에 기질로 10g/L의 페룰산을 공급하고 24시간 배양한 결과 0.83g/L의 바닐린이 생산되었다 (Fig. 46). 그러나 바닐린의 생산이 12시간 이후부터 시작되었고, 초기의 페룰산 공급이 균체생육을 감소시키는 것으로 판단되어서 기질인 페룰산의 공급을 12시간에 한 배양을 수행하였다 (Fig. 47). 배양 12시간에 페룰산을 공급한 경우에는 균체생육속도가 증가하고, 균체량 (OD600nm)도 5.5정도로 초기에 페룰산을 공급한 경우보다 약 2배 정도 높았다. 바닐린의 생산량도 1.8g/L로 약 2배 이상 증가하였다. 따라서 균의 생육이 적절한 수준에 도달한 이후에 기질인 페룰산의 공급을 시작하는 것이 유리함을 알았다. 상기 실험들에서는 기질인 페룰산의 공급을 10g/L의 고농도로 일회적으로 실시함으로써 잔존 페룰산의 농도가 높고 바닐린의 생산성도 감소하는 것으로 판단되어서 기질인 페룰산의 공급을 배양 12시간 이후부터 12시간 간격으로 2.2g/L 농도로 공급하였다 (Fig. 48). 그 결과 잔존 페룰산의 농도는 5배정도 감소한 1.5g/L이고, 바닐린 생산량은 3배 이상 증가한 6.2g/L를 얻었다. 이때의 균체량 (OD600nm)는 5.0정도로 균체량을 더 높여서 바닐린 생산배양을 하면 더 높은 바닐린 생산성을 얻는 것도 가능할 것이다.

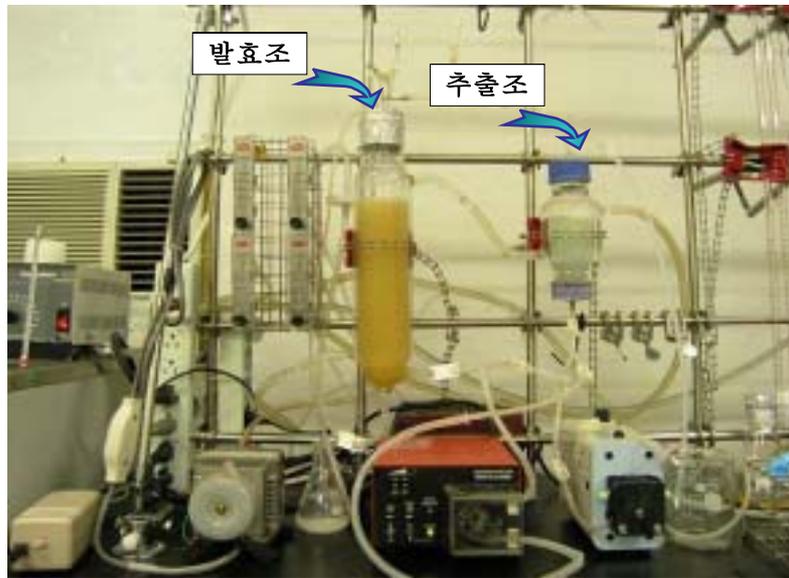


Fig. 45. Bubble column fermenter for vanillin production

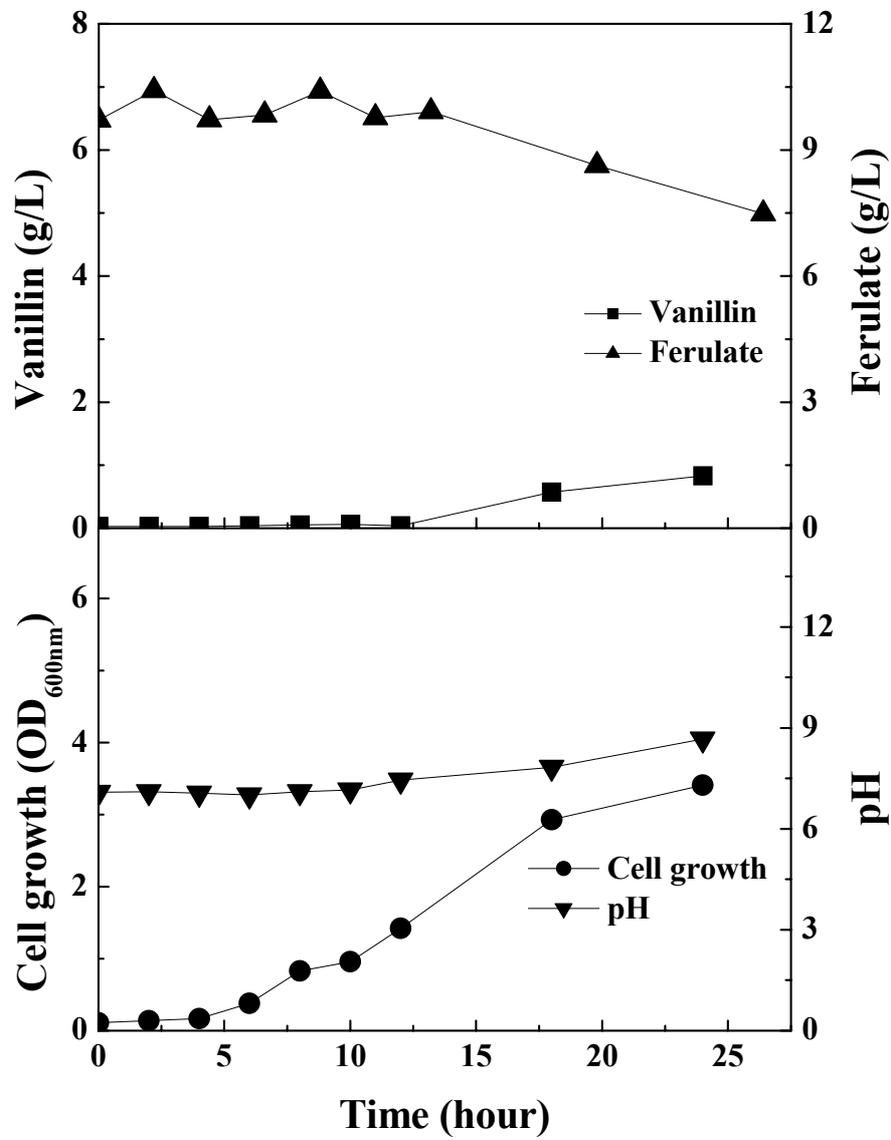


Fig. 46. Vanillin production using the new bubble column fermenter with addition of 10g/L ferulic acid at 0 hours

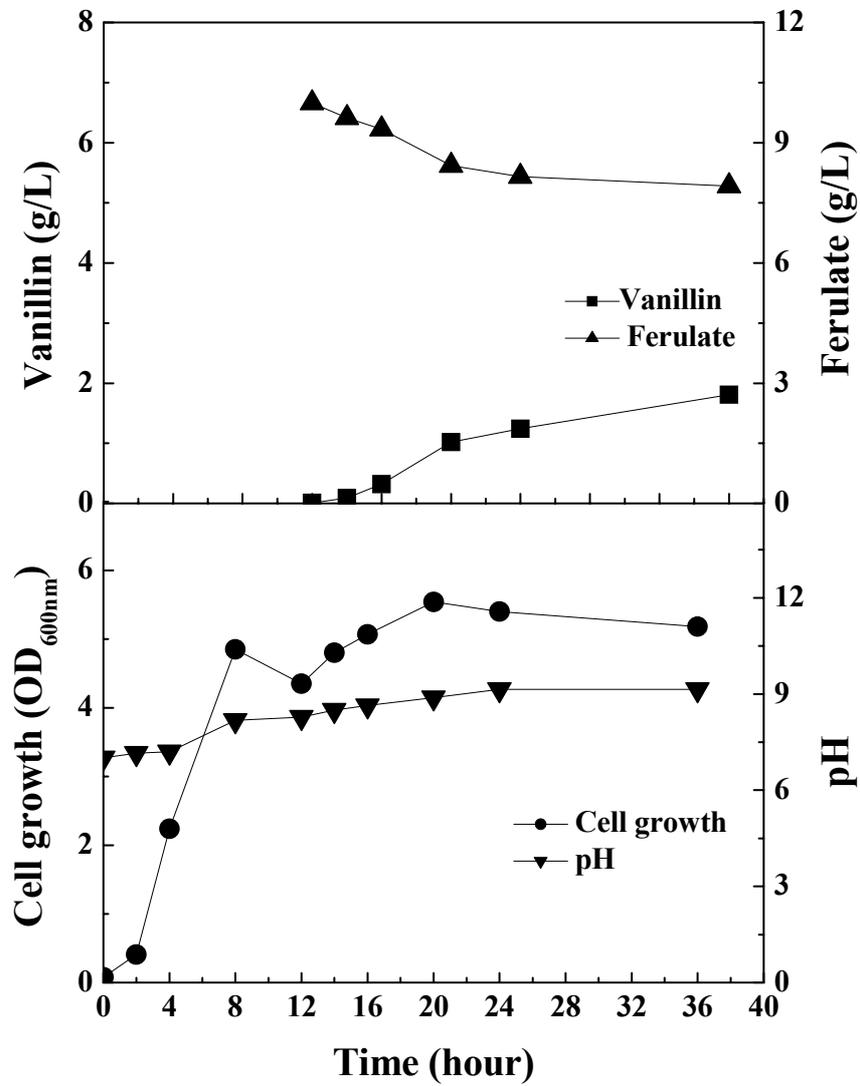


Fig. 47. Vanillin production using the new bubble column fermenter with addition of 10g/L ferulic acid at 12 hours

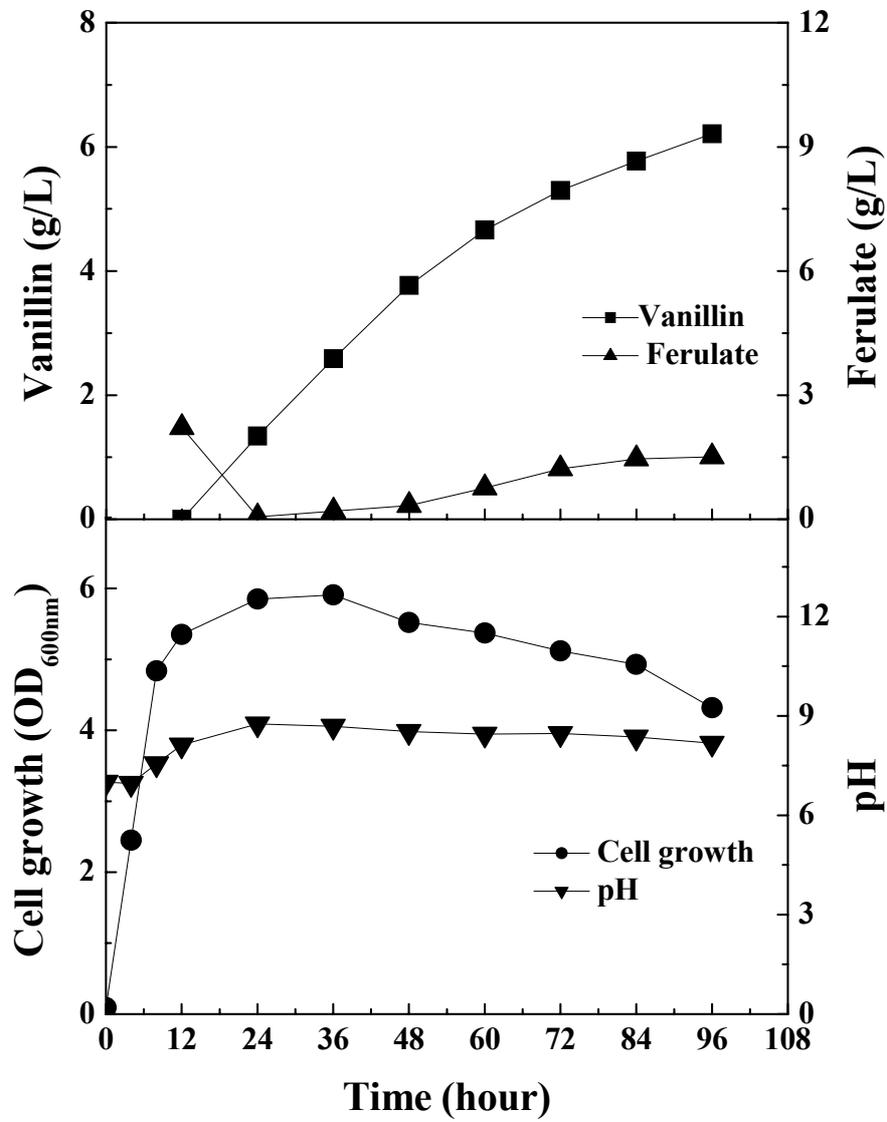


Fig. 48. Vanillin production using the new bubble column fermenter with addition of 2.2g/L ferulic acid at every 12 hours

2. 제 2 세부과제 (Lignocellulosic 원료로부터 바닐린 전구체 생산기술개발)

1) 리그노셀룰로오스 원료에 함유된 페놀성 화합물군

- 원료중에 함유된 페놀성 화합물은 산가용성 그룹과 산불용성 그룹으로 구분되며 산가용성 화합물을 정량하기 위하여 페놀성 화합물 표준품으로 liginosulfonic acid (LSA, sigma)를 사용하여 UV spectrophotometer 분석을 실시하였다. 이 화합물의 최대 유효 흡광도는 280 nm에서 나타났으며, 화합물의 농도에 따른 UV 흡광도는 정량적인 비례곡선을 나타냈으며, R^2 value는 0.9858로 나타났다 (Fig. 49).

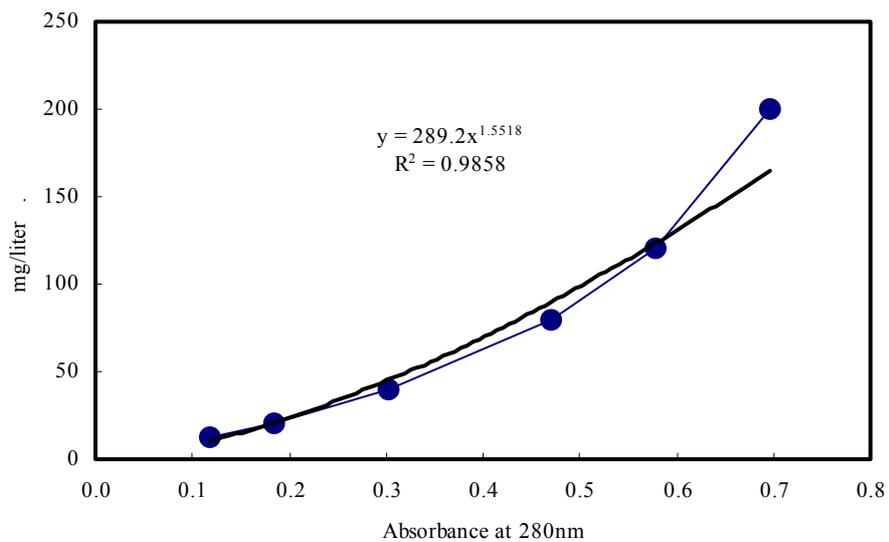


Fig. 49. UV spectrum profile of liginosulfonic acid at 280 nm.

2) 임산부산물로부터 바닐린 전구체 고함유 원료 선정

- 바닐린 생합성 전구체인 페룰산(ferulic acid)을 고함유하는 원료의 탐색을 위하여 굴참나무 외 11종의 간벌재를 시료로 하였다. 추출성분 및 페놀성 화합물 함량을 Table 10에 나타냈다. 수분 함량은 기건 후 수분함량으로서 굴참나무가 8.72%로 가장 높았으며, 타 수종들도 비슷한 수준이었다.
- 산불용성 페놀성 화합물은 전체 시료 중에 약 1/3 이상 차지하였으며, 소나무에서 37.2%로 가장 높았던 반면 층층나무에서 31.35%로 가장 낮게 나타났다. 수분 함량과 산불용성 페놀성 화합물 함량에 있어서는 간벌재간 함량 차이가 그다지 크지 않았던 반면, 산가용성 페놀성 화합물 함량에 있어서는 굴참나무가 다른 간벌재보다 3배 정도 다량 함유하여 0.96%의 함유량을 보였다.
- 이상의 결과를 바탕으로 비록 산불용성 페놀성 화합물 함량이 소나무가 가장 높은 값을 보였으나, 침엽수인 소나무는 바닐린 전구체 생산공정에 있어서 전처리, 후처리 및 생산공정 trouble을 고려했을때활엽수재인 굴참나무에 비해 선택성이 떨어진다고 판단되었다.
- 굴참나무는 선택한 활엽수 원료 수종가운데 가장 많은 양의 산불용성 및 산가용성 페놀성 화합물을 소유하고 있었으며, 현실적인 측면에서 공급이 비교적 쉬운 수종이기 때문에 본 연구의 목적을 위하여 굴참나무가 가장 적합한 원료 수종인 것으로 생각되었다.

Table 10. Contents of phenolic compound in woody biomass.

Species	Korean name	Moisture contents, %	Ethanol extractives, %	Acid insoluble phenolic compound, %	Acid soluble phenolic compound, %
<i>Qercus variabilis</i>	굴참나무	8.72	10.63	35.67	0.96
<i>Lalix leptolepis</i>	낙엽송	8.12	10.95	34.58	0.37
<i>Pinus densiflora</i>	소나무	8.04	10.52	37.20	0.32
<i>Pinus koraiensis</i>	잣나무	8.12	10.14	34.79	0.35
<i>Alnus japonica</i>	오리나무	8.10	10.63	32.3	0.33
<i>Populus euramericana</i>	이태리포플러	8.14	10.05	32.7	0.35
<i>Salix glandulosa</i>	버드나무	8.15	10.04	31.7	0.34
<i>Pinus rigida</i>	리기다소나무	8.12	10.27	31.9	0.37
<i>Clematis paniculata</i>	으와리	7.89	9.99	32.7	0.29
<i>Rosa multiflora</i>	찔레나무	7.90	9.44	33.1	0.34
<i>Rhododendron mucronulatum</i>	진달래	8.12	10.02	31.7	0.32
<i>Cornus controversa</i>	층층나무	8.23	10.35	31.0	0.35

3) 농산부산물부터 바닐린 전구체 고함유 원료 선정

- 대표적인 농산부산물인 고구마, 고추, 들깨, 땅콩, 참깨, 토마토, 콩 줄기 및 볏짚과 옥수수대를 시료로 하여 이들 중에 함유된 페놀성 화합물 함량을 측정함으로써 바닐린 전구체 고 함유 원료를 탐색하였다 (Table 11). 전체적으로 산불용성 페놀성 화합물은 시료중에 약 18 - 29% 범위로 함유되어 있었으며, 추출물의 함유 범

위는 7- 22% 범위로 임산부산물과는 넓은 범위를 나타냈다.

Table 11. Contents of phenolic compound in agro-biomass.

Species	Moisture, %	Ethanol extractives, %	Acid insoluble phenolic compound, %	Acid soluble phenolic compound, %
Sweet potato stem	7.89	10.55	18.38	0.95
Red pepper stem	7.34	9.73	25.30	1.09
<i>Perilla japonica</i> stem	8.20	10.28	23.02	2.20
Peanut stem	9.35	10.89	22.44	1.95
Rice straw	5.38	7.55	25.68	2.39
Corn stem	13.04	21.81	22.28	1.66
Sesame stem	8.64	7.41	26.09	1.20
Tomato stem	7.16	7.97	29.21	0.65
Bean stem	8.32	14.30	25.57	0.84

- 산가용성 페놀성 화합물은 0.6 - 2.4% 범위로 임산부산물과는 다른 경향을 나타냈다. 함수율은 옥수수대가 13.04%로 가장 높았던 반면 벧짚은 5.38%로 가장 낮았다. 추출물 함량은 옥수수대가 다른 농산부산물보다 월등히 그 함량이 높게 나타나 21.81%를 차지하였으며, 가장 작은 함량을 나타낸 참깨 줄기보다 3배가량 높은 수치를 보였다. 산가용성 페놀성 화합물 함량은 벧짚이 2.39%로 들깨 줄기의 2.20%와 함께 높은 수준을 보였고, 오히려 산가용성 페놀 성분이 가장 풍부했던 토마토 줄기에서 0.65%로 가장 낮게 나타났다.
- 본 과제 의 최종 생산 목적물은 vanillin으로써 이의 생산을 위한 원료는 기존에 식용하고 있는 자원이어야 한다는 측면에서 고구마 줄기가 최적의 원료로 생각되지

만, 함유된 페놀성 화합물의 함량은 다른 농산부산물에 비해 낮은 경향을 나타냈다. 식용자원이라는 한정된 제한은 향후 정부의 전문기관으로부터 승인허가 때문이다.

- 특히 국내에서는 식약 관련 제품이나 원료의 허가 및 등록은 반드시 기존의 식용 가능한 자원에 한정되고 있다. 그러나 토마토 줄기나 깨 줄기와 같은 농산부산물이 함유하고 있는 페놀성 화합물의 함량도 전체 시료중량의 25%이상의 차지하고 있었다.

4) 고구마 줄기 전처리와 페놀성 화합물 생성

(1) 산에 의한 전처리

- 고구마 줄기에 황산 또는 초산을 각각 첨가하여 120℃에서 15분, 30분, 60분 반응시켰을 때, 추출물 수율을 Table 12에 나타냈다. 황산 첨가반응에서는 황산농도와 추출물 수율 간에는 유의성이 나타나지 않았으며, 처리시간이 증가할수록 추출물 수율은 증가되는 경향을 나타냈다. 또한 추출물 수율은 황산농도 0.1 N, 60분 반응에서 가장 높은 341 mg의 수율을 나타냈다. 초산 첨가반응에서는 초산농도와 추출물 수율 간에는 유의성이 나타나지 않았으며, 초산농도가 높아질수록 추출물 수율은 낮아지는 경향을 보였다.
- 반응시간에 따른 추출물 수율은 단시간 반응 (15분)이 유리한 것으로 나타났으며, 초산농도 0.0125 N, 반응시간 15분의 반응 조건에서 288 mg의 추출물 수율을 나타냈다. 결과적으로 추출물 수율을 높이기 위해서는 황산 첨가반응의 경우 장시간, 고농도 반응이 유리하며, 초산 첨가반응에서는 단시간, 저농도 반응이 유리하다고 판단되었다.

Table 12. Yield of extracts with acid from sweet potato stem at 120°C

Chemicals	Concentration, N	Extracts ¹⁾ , mg g ⁻¹		
		Reaction time, min		
		15	30	60
Sulfuric acid	0.0125	244.70b ²⁾	280.25bc	311.19b
	0.025	221.94c	267.84c	272.53c
	0.05	233.27bc	287.12ab	301.71b
	0.1	269.51a	295.86a	340.97a
Acetic acid	0.0125	287.91a	257.02a	252.04a
	0.025	271.23b	248.10a	245.59ab
	0.05	260.83bc	232.67b	236.11bc
	0.1	250.19c	228.81b	225.75c

¹⁾ Based on the oven dry weight of the sweet potato stem.

²⁾ Means followed by the same letter within the same column and same acid are not significantly different ($P < 0.05$) according to the Duncan's New Multiple-Range Test.

- 고구마 줄기를 황산 또는 초산을 사용하여 Table 12과 동일한 조건으로 반응 시켰을 때 페놀성화합물 수율을 Table 13에 나타냈다. 황산과 초산 첨가반응 각각에서 산 농도와 페놀성화합물 수율 사이에서는 유의성이 나타났으며, 산의 농도 증가와 페놀성화합물 수율은 비례적인 관계를 나타냈다.
- 황산 첨가반응에서 반응시간이 길어질수록 페놀성화합물 수율은 증가하는 경향을 나타냈으며, 황산농도 0.1 N, 반응시간 60분의 조건에서 27 mg의 페놀성화합물 수율을 나타냈다. 초산 첨가 반응에서는 반응시간에 따른 페놀성화합물 수율은 큰 변화가 없었으며, 초산 농도 0.1 N, 반응시간 60분에서 가장 높은 페놀성화합물 수율, 27 mg을 나타냈다.

- Table 12과 Table 13의 결과에서 나타났듯이 황산 첨가반응에서는 추출물 수율과 페놀성화합물 수율이 함께 거동한다는 것을 확인 할 수 있었고, 초산 첨가 반응에서는 추출물 수율과 페놀성화합물 수율 간에 명확한 연관 관계가 나타나지 않았다. 최종적으로 페놀성화합물 생산 수율을 최대로 얻기 위해서 황산과 초산 중 어느 것을 선택하여도 큰 차이가 없다는 사실을 알 수 있었다.

Table 13. Yield of phenyl propanoids with acid from sweet potato stem at 120°C

Chemicals	Concentration, N	Phenyl propanoids ¹⁾ , mg g ⁻¹		
		Reaction time, min		
		15	30	60
Sulfuric acid	0.0125	12.73b ²⁾	12.37c	14.37b
	0.025	10.36c	11.32c	11.08c
	0.05	13.02b	19.51b	16.63b
	0.1	22.32a	24.03a	26.53a
Acetic acid	0.0125	16.77d	16.82d	16.72c
	0.025	19.94c	18.45c	19.61bc
	0.05	21.48b	21.58b	21.91ab
	0.1	25.76a	26.19a	26.91a

¹⁾ Based on the oven dry weight of the sweet potato stem.

²⁾ Means followed by the same letter within the same column and same acid are not significantly different (P<0.05) according to the Duncan's New Multiple-Range Test.

- 고구마 줄기로부터 산 첨가 반응을 거쳐 추출물을 회수하고, 추출물 중에 함유된 페놀성화합물 화합물의 수율을 측정함과 동시에 최종적으로 본 연구에서 필요로 하는 페놀성화합물 중에 존재하는 ferulic acid의 양이 중요하다. Table 14는 Table 12과 동일한 반응조건으로 고구마 줄기를 처리했을 때, 생산된 ferulic acid의 수율을 나타낸 표이다.

- 황산 첨가 반응에서 ferulic acid 수율은 황산농도와 ferulic acid 수율간에는 15분, 30분 반응에서는 유의성이 나타났지만, 60분 반응에서는 유의성이 나타나지 않았다. 또한 반응시간과 ferulic acid 수율에서도 일정한 경향은 없었고, 황산첨가 반응에서는 황산 농도 0.05N, 반응시간 30분의 조건에서 ferulic acid 최대 수율 (0.3 mg)을 나타냈으며, 초산 첨가 반응에서는 초산농도 0.1N, 반응시간 15분의 조건에서 0.2 mg의 ferulic acid 수율을 나타냈다.

Table 14. Yields of vanillic acid, vanillin, ferulic acid and cinnamic acid with acid from sweet potato stem at 120°C

Chemicals	Con., N	Contents ¹⁾ , mg g ⁻¹											
		Reaction time, min											
		15				30				60			
		Vanillic acid	Vanillin	Ferulic acid	Cinnamic acid	Vanillic acid	Vanillin	Ferulic acid	Cinnamic acid	Vanillic acid	Vanillin	Ferulic acid	Cinnamic acid
Sulfuric acid	0.0125	0.167b ³⁾	- ²⁾	0.112c	0.265a	0.122c	0.306c	0.143c	0.248c	0.133c	0.217a	0.115b	0.165a
	0.025	0.182a	-	-	-	0.252b	0.400a	0.177b	0.257b	0.127c	0.225a	0.114b	0.145b
	0.05	0.111c	-	0.125b	0.237b	0.381a	0.382b	0.320a	0.384a	0.215b	0.179b	0.130a	0.168a
	0.1	0.118c	0.168	0.154a	0.206c	0.112d	0.199d	0.098d	0.144d	0.227a	-	0.120b	0.161a
Acetic acid	0.0125	0.110b	0.179ab	0.096c	0.205a	0.119b	0.212a	0.106ab	0.179a	0.123b	-	0.103b	0.142ab
	0.025	0.117ab	0.174b	0.104c	0.173c	0.124b	0.223a	0.109a	0.144b	0.123b	-	0.101b	0.147a
	0.05	0.120a	0.187a	0.118b	0.195b	0.097c	0.178b	0.101ab	0.106d	0.132a	0.238	0.110a	0.128c
	0.1	0.122a	0.105c	0.207a	0.159d	0.155a	0.109c	0.098b	0.122c	0.132a	-	0.102b	0.135bc

¹⁾ Based on the oven dry weight of the sweet potato stem.

²⁾ Not detected.

³⁾ Means followed by the same letter within the same column and same acid are not significantly different (P<0.05) according to the Duncan's New Multiple-Range Test.

(2) 알칼리에 의한 전처리

- 고구마 줄기에 0.10125 N - 0.1 N 수산화나트륨용액을 각각 첨가하여 120℃에서 15분, 30분, 60분 반응시킨 다음, 추출물 수율을 Table 6에 나타냈다. 알칼리 농도와 추출물 수율 간에는 5% 수준에서 유의성이 나타났으며, 알칼리 농도와 추출물 수율은 비례적인 관계를 나타냈다. 또한 반응시간이 길어짐에 따라 추출물 수율은 증가하는 경향을 나타냈다. 알칼리 농도 0.1N, 반응시간 60분에서 최대 추출물 수율 (481 g)을 나타냈다.
- Table 15과 동일한 조건으로 시료를 반응시켰을 때 phenyl propanoid 수율을 Table 16에 나타냈다. 알칼리 농도와 phenylpropanoids 수율 간에는 유의성이 나타났으며, 알칼리 농도가 높아질수록 phenyl propanoid 수율이 감소하는 경향을 나타냈다. 반응시간이 길어질수록 페놀성화합물 수율은 감소되는 경향을 나타냈다. 알칼리농도 0.0125N, 반응시간 15분의 반응조건에서 최대 phenyl propanoid 수율 (69 mg)이 얻어졌다.
- Table 15과 동일한 조건으로 시료를 반응시켰을 때, ferulic acid 수율을 Table 17에 나타냈다. 알칼리 농도와 ferulic acid 수율 간에는 유의성이 나타나지 않았다. 반응시간과 ferulic acid 수율사이에서도 명확한 경향은 나타나지 않았다. 알칼리 농도 0.0125 N, 반응시간 15분의 반응조건에서 최대 ferulic acid 수율 (0.3 mg)을 얻을 수 있었다.

Table 15. Yield of extracts with alkali from sweet potato stem at 120°C

Chemicals	Concentration, N	Extracts ¹⁾ , mg g ⁻¹		
		Reaction time, min		
		15	30	60
Sodium hydroxide	0.0125	309.93d ²⁾	348.63d	357.14d
	0.025	327.17c	368.80c	385.24c
	0.05	393.84b	426.73b	445.55b
	0.1	442.85a	471.06a	481.14a

¹⁾ Based on the oven dry weight of the sweet potato stem.

²⁾ Mean followed by the same letter within the same column are not significantly different (P<0.05) according to the Duncan's New Multiple-Range Test.

Table 16. Yield of phenyl propanoids with alkali from sweet potato stem at 120°C

Chemicals	Concentration, N	Phenyl propanoids ¹⁾ , mg g ⁻¹		
		Reaction time, min		
		15	30	60
Sodium hydroxide	0.0125	68.98a ²⁾	58.60a	60.33a
	0.025	57.45b	43.97b	49.21b
	0.05	40.80c	29.12c	21.72d
	0.1	41.66c	28.98c	23.50c

¹⁾ Based on the oven dry weight of the sweet potato stem.

²⁾ Mean followed by the same letter within the same column are not significantly different (P<0.05) according to the Duncan's New Multiple-Range Test.

Table 17. Yield of vanillic acid, vanillin, ferulic acid and cinnamic acid with alkali from sweet potato stem at 120°C

Chemicals Con., N	Contents ¹⁾ , mg g ⁻¹												
	Reaction time, min												
	15				30				60				
	Vanillic acid	Vanillin	Ferulic acid	Cinnamic acid	Vanillic acid	Vanillin	Ferulic acid	Cinnamic acid	Vanillic acid	Vanillin	Ferulic acid	Cinnamic acid	
Sodium	0.0125	0.108d ³⁾	- ²⁾	0.274a	0.483d	0.106c	-	0.114c	0.374d	0.121c	-	0.141b	0.558d
hydroxide	0.025	0.120c	0.243c	0.112c	0.811c	0.112c	-	0.112c	0.779c	0.120c	-	0.113c	1.364c
	0.05	0.198b	0.319b	0.104c	3.081b	0.206b	-	0.137b	2.563b	0.263b	-	0.119c	3.497b
	0.1	0.411a	0.415a	0.192b	3.529a	0.327a	-	0.207a	2.902a	0.550a	0.222	0.206a	3.789a

¹⁾ Based on the oven dry weight of the sweet potato stem.

²⁾ Not detected.

³⁾ Means followed by the same letter within the same column are not significantly different (P<0.05) according to the Duncan's New Multiple-Range Test.

○ 고구마 줄기에 1N, 2N, 4N 수산화나트륨 용액을 각각 첨가하여 실온에서 1.5시간, 3시간, 6시간 동안 반응 후, 추출물 수율을 Table 18에 나타냈다. 알칼리농도와 추출물 수율 사이에는 일부의 농도에서 유의성이 나타났으며, 알칼리 농도가 증가할수록 추출물 수율은 증가하는 경향을 나타냈다. 반응시간과 추출물 수율사이에는 명확한 경향은 나타나지 않았다. 알칼리농도 4N, 반응시간 6시간의 조건에서 500 mg의 추출물 수율을 나타냈다.

Table 18. Yield of extracts with alkali from sweet potato stem at room temperature

Chemicals	Concentration, N	Extracts ¹⁾ , mg g ⁻¹		
		Reaction time, hour		
		1.5	3.0	6.0
Sodium hydroxide	1	443.60b ²⁾	390.26b	434.03c
	2	439.51b	436.91a	467.20b
	4	464.64a	448.62a	500.70a

¹⁾ Based on the oven dry weight of the sweet potato stem.

²⁾ Means followed by the same letter within the same column are not significantly different (P<0.05) according to the Duncan's New Multiple-Range Test.

- Table 18와 동일한 조건에서 시료를 반응했을 때, phenyl propanoid 수율을 Table 19에 나타냈다. 알칼리 농도와 phenyl propanoid 수율 사이에는 5% 수준에서 유의성이 나타났으며, 알칼리 농도가 낮을수록 phenyl propanoid 수율은 증가하였다. 반응시간과 phenyl propanoid 수율사이에서는 반응시간이 짧을수록 phenyl propanoid 수율이 증가하는 경향을 나타냈다. 알칼리 농도 1N, 반응시간 1.5시간에서 404 mg의 phenyl propanoid를 얻을 수 있었다.

Table 19. Yield of phenyl propanoids with alkali from sweet potato stem at room temperature

Chemicals	Concentration, N	Phenyl propanoids ¹⁾ , mg g ⁻¹		
		Reaction time, hour		
		1.5	3.0	6.0
Sodium hydroxide	1	403.52a ²⁾	300.39a	318.55a
	2	222.20b	120.09b	177.27b
	4	139.94c	112.74c	103.94c

¹⁾ Based on the oven dry weight of the sweet potato stem.

²⁾ Means followed by the same letter within the same column are not significantly different (P<0.05) according to the Duncan's New Multiple-Range Test.

- 고구마 줄기를 Table 18와 동일한 조건으로 반응시켰을 때 ferulic acid 수율을 Table 20에 나타냈다. 알칼리농도와 ferulic acid 수율사이에는 유의성은 나타나지 않았으며, 반응시간과 ferulic acid 수율 사이에도 명확한 경향은 나타나지 않았다. 알칼리 농도 2 N, 반응시간 6시간에서 0.2 mg의 ferulic acid을 얻을 수 있었다.

Table 20. Yields of vanillic acid, vanillin, ferulic acid and cinnamic acid with alkali from sweet potato stem at room temperature

Chemicals	Con. N	Contents ¹⁾ , mg g ⁻¹											
		Reaction time, hour											
		1.5				3.0				6.0			
		Vanillic acid	Vanillin	Ferulic acid	Cinnamic acid	Vanillic acid	Vanillin	Ferulic acid	Cinnamic acid	Vanillic acid	Vanillin	Ferulic acid	Cinnamic acid
Sodium	1	0.234a	0.249a	0.141b	2.566a	0.213a	0.232a	0.213a	3.253a	- ²⁾	0.219b	0.178b	3.123a
hydroxide	2	0.175b	0.166c	0.094c	2.216b	0.184b	0.266b	0.219b	2.483b	0.237a	0.309a	0.222a	2.417b
	4	0.148c	0.233b	0.215a	1.740c	0.144c	0.211c	0.163c	1.566c	0.134b	-	0.098c	1.648c

¹⁾ Based on the oven dry weight of the sweet potato stem.

²⁾ Not detected.

³⁾ Means followed by the same letter within the same column are not significantly different (P<0.05) according to the Duncan's New Multiple-Range Test.

- 최종적으로 알칼리가 첨가된 반응에서 phenyl propanoid 최대 생산 조건은 실온에서 1N 알칼리의 농도로 1.5시간 반응시키는 조건이 가장 유리하였으며, 최종 목적 화합물인 ferulic acid를 최대로 생산하기 위한 조건은 120°C에서 0.0125 N의 알칼리 농도로 15분 동안 반응시키는 것으로 나타났다.

(3) 최적 페놀성 화합물 생산 조건

- 산 (황산, 초산) 또는 알칼리 (수산화나트륨)를 사용하여 고구마 줄기로부터 생산된 최적의 페놀성 화합물 생산조건을 Table 21에 나타냈다. 경제적인 문제를 고려

하지 않은 상태에서는 알칼리를 사용하여 실온에서 90분 동안 반응시키는 것이 가장 유리하다고 판단되며, 이때 페놀성화합물의 수율은 403.5 mg으로서 투입원료의 건건중량을 기준으로 환산할 때 약 40%를 차지하는 수치이다.

- 또한 알칼리를 사용하여 120℃에서 반응했을 때, 페놀성화합물 수율은 산에 의한 반응보다 약 2.5배 높게 나타났다. 결론적으로 페놀성화합물의 생산을 위해서는 산보다는 알칼리 첨가 반응이 유리하다고 판단되었다.

Table 21. Yield of phenyl propanoids with chemicals from sweet potato stem

Chemicals	Concentration of chemicals, N	Reaction time, min	Reaction temperature, °C	Yield of phenyl propanoids ¹⁾ , mg g ⁻¹
Sulfuric acid	0.1	60	120	26.5
Acetic acid	0.1	60	120	27.0
Sodium hydroxide	0.0125	15	120	69.0
	1	90	room temp.	403.5

¹⁾ Based on the oven dry weight of the sweet potato stem.

- 고구마 줄기로부터 생산된 페놀성화합물에 함유된 ferulic acid는 본 연구과제의 최종목적인 bio-vanillin 생산을 위한 원료 화합물이다. 본 세부과제의 최종 연구목표는 고구마 줄기나 lignocellulose 원료로부터 제공 받은 ferulic acid를 다량으로 생산할 수 있는 반응조건을 도출하는데 있다. Table 21 페놀성화합물 수율과 Table 22의 ferulic acid의 수율을 비교해 볼 때, 반드시 페놀성화합물 수율과 ferulic acid 수율이 상호 비례적인 관계를 가지지 않는다는 사실을 확인 할 수 있었다.

- 고구마 줄기로부터 가장 효율적으로 ferulic acid를 생산 하는 반응은 0.05 N의 황산을 이용하여 120℃에서 30분간 반응하는 공정이다. 본 연구에서는 이러한 반응 조건에서 약 0.32 mg의 ferulic acid 가 얻어졌다. 이러한 양은 실제로 투입된 전건 원료인 고구마 줄기의 전건중량을 기준으로 계산해 볼 때 약 0.00032% 수준이다.

Table 22. Yield of ferulic acid with chemicals from sweet potato stem

Chemicals	Concentration of chemicals, N	Reaction time, min	Reaction temperature, °C	Yield of ferulic acid ¹⁾ , mg g ⁻¹
Sulfuric acid	0.05	30	120	0.32
Acetic acid	0.1	15	120	0.21
Sodium hydroxide	0.0125	15	120	0.27
	2	360	room temp.	0.22

¹⁾ Based on the oven dry weight of the sweet potato stem.

5) 고압 수증기 전처리된 목질원료와 페놀성 화합물 생성

(1) 증류수를 이용한 고온 및 실온 처리

- 기업체로부터 제공받은 전처리 목질원료에 증류수만을 투입하여 120℃에서 15분, 30분, 60분 반응시켰을 때, 추출물 수율을 Table 23에 나타냈다. 목질원료의 전처리 조건과 추출물 수율 간에는 유의성이 인정되었지만, 반응시간과 추출물 수율 간에는 일정한 경향이 없이 거의 유사한 값을 나타냈다. 원료의 전처리 시간이 짧을수록 추출물 수율은 높게 나타났으며, 목질원료 전처리 시간 5분, 반응시간 60분, 반응온도 120℃의 조건에서 207 mg의 최대 추출물 수율을 얻을 수 있었다.

Table 23. Yield of extracts with water from pretreated lignocellulose at 120°C

Pretreated conditions, kg/cm ² · min	Extracts ¹⁾ , mg g ⁻¹		
	Reaction time, min		
	15	30	60
25 · 5	204.66a ²⁾	205.10a	207.42a
25 · 10	170.74b	171.17b	170.89b

¹⁾ Based on the oven dry weight of the pretreated lignocellulose.

²⁾ Mean followed by the same letter within the same column are not significantly different (P<0.05) according to the Duncan's New Multiple-Range Test.

- 전처리 된 목질 원료로부터 증류수를 이용하여 120°C에서 추출했을 때 페놀성화합물의 수율을 Table 24에 나타냈다. 목질원료의 전처리 조건과 페놀성화합물 수율 간에는 유의성이 나타났지만, 반응시간과 페놀성화합물 수율 간에는 일정한 경향이 나타나지 않았다. 목질원료 전처리 10분, 반응온도 120°C, 반응시간 60분의 반응 조건에서 49 mg의 최대 페놀성화합물을 얻을 수 있었다.

Table 24. Yield of phenyl propanoids with water from pretreated lignocellulose at 120°C

Pretreated conditions, kg/cm ² · min	Phenyl propanoids ¹⁾ , mg g ⁻¹		
	Reaction time, min		
	15	30	60
25 · 5	31.86b ²⁾	29.36b	28.40b
25 · 10	48.08a	48.20a	49.11a

¹⁾ Based on the oven dry weight of the pretreated lignocellulose.

²⁾ Means followed by the same letter within the same column are not significantly different (P<0.05) according to the Duncan's New Multiple-Range Test.

- 전처리된 목질원료에 증류수만을 투입하여 120℃에서 반응했을 때, ferulic acid 수율을 Table 25에 나타냈다. 목질원료의 전처리 조건과 ferulic acid 함량사이에는 유의성이 나타났지만, 반응시간과 ferulic acid 수율사이에는 일정한 경향이 나타나지 않았다. Table 24에서 나타난바와 같이 최대의 페놀성화합물 수율을 얻을 수 있는 반응조건과 ferulic acid 수율과는 동일한 경향을 나타내지 않았다. 목질원료 전처리시간 10분, 반응온도 120℃, 반응시간 15분에서 0.6 mg의 ferulic acid를 얻을 수 있었다.

Table 25. Yield of vanillic acid, vanillin, ferulic acid and cinnamic acid with water from pretreated lignocellulose at 120℃

Pretreated conditions, kg/cm ² ·min	Contents ¹⁾ , mg g ⁻¹											
	Reaction time, hour											
	1.5				3.0				6.0			
	Vanillic acid	Vanillin	Ferulic acid	Cinnamic acid	Vanillic acid	Vanillin	Ferulic acid	Cinnamic acid	Vanillic acid	Vanillin	Ferulic acid	Cinnamic acid
25· 5	0.142b	0.136b ²⁾	0.109b	0.105a	0.587b	0.162b	0.124b	0.095b	0.621b	0.196a	0.125a	0.097b
25· 10	0.255a	0.163a	0.570a	0.105a	1.322a	0.192a	0.150a	0.116a	0.731a	0.164b	0.095b	0.154a

¹⁾ Based on the oven dry weight of the sweet potato stem.

²⁾ Means followed by the same letter within the same column are not significantly different (P<0.05) according to the Duncan's New Multiple-Range Test.

- 기업체로부터 제공받은 전처리 lignocellulose 원료에 증류수만을 투입하여 실온에서 1.5시간, 3시간, 6시간 반응했을 때 추출물 수율을 Table 26에 나타냈다. 전처리 조건과 추출물 수율간에는 유의성이 나타났으며, lignocellulose의 전처리 시간이 10분 보다는 5분 처리가 추출물 수율 측면에서 높게 나타났다. 가장 높은 추출물 수율은 전처리 조건 5분, 반응시간 6시간에서 나타났으며, 이때 추출물 수율은 193 mg 이었다.

Table 26. Yield of extracts with water from preterated lignocellulose at room temperature

Pretreated conditions, kg/cm ² · min	Extracts ¹⁾ , mg g ⁻¹		
	Reaction time, hour		
	1.5	3.0	6.0
25 · 5	192.41a ²⁾	192.74a	193.06a
25 · 10	145.92b	144.58b	147.87b

¹⁾ Based on the oven dry weight of the pretreated lignocellulose.

²⁾ Means followed by the same letter within the same column are not significantly different (P<0.05) according to the Duncan's New Multiple-Range Test.

- Table 27에 전처리된 lignocellulose를 실온에서 처리했을 때 페놀성화합물 수율을 나타냈다. 전처리된 lignocellulose의 증류수 투입에 의한 페놀성화합물 수율은 전처리 조건 (5분과 10분)과 페놀성화합물 수율 간에는 유의성이 나타나지 않았다. 또한 반응시간에 따른 페놀성화합물 수율의 변화도 일정한 경향이 나타나지 않았다. 페놀성화합물은 전처리 시간 10분, 반응시간 3시간의 반응조건에서 25 mg을 얻을 수 있었다.

Table 27. Yield of phenyl propanoids with water from pretreated lignocellulose at room temperature

Pretreated conditions, kg/cm ² · min	Phenyl propanoids ¹⁾ , mg g ⁻¹		
	Reaction time, hour		
	1.5	3.0	6.0
25 · 5	22.78a ²⁾	23.84a	23.93a
25 · 10	24.60a	24.75a	23.50a

¹⁾ Based on the oven dry weight of the pretreated lignocellulose.

²⁾ Means followed by the same letter within the same column are not significantly different (P<0.05) according to the Duncan's New Multiple-Range Test.

- 전처리된 lignocellulose를 실온에서 처리했을 때 생산된 ferulic acid 의 수율을 Table 28에 나타냈다. 전처리 조건과 ferulic acid 수율 사이에는 유의성이 나타났으며, 전처리 시간이 짧을수록 ferulic acid 수율은 높았다. 전처리 조건 5분, 반응 시간 6시간의 조건에서 0.16 mg의 ferulic acid를 획득 할 수 있었다.

Table 28. Yield of vanillic acid, vanillin, ferulic acid and cinnamic acid with water from pretreated lignocellulose at room temperature

Pretreated conditions, kg/cm ² ·min	Contents ¹⁾ , mg g ⁻¹											
	Reaction time, hour											
	1.5				3.0				6.0			
	Vanillic acid	Vanillin	Ferulic acid	Cinnamic acid	Vanillic acid	Vanillin	Ferulic acid	Cinnamic acid	Vanillic acid	Vanillin	Ferulic acid	Cinnamic acid
25· 5	0.210b	0.138b ²⁾	0.126a	0.105a	0.230b	0.182b	0.136a	- ³⁾	0.259b	0.263a	0.164a	0.093b
25· 10	0.520a	0.360a	0.099b	0.111a	0.621a	0.634a	0.099b	0.110	0.367a	0.122b	0.095b	0.126a

¹⁾ Based on the oven dry weight of the pretreated lignocellulose.

²⁾ Means followed by the same letter within the same column are not significantly different (P<0.05) according to the Duncan's New Multiple-Range Test.

³⁾ Not detected

(2) 최적 페놀성 화합물 생산조건

- 전처리된 lignocellulose를 120℃와 실온에서 증류수만을 투입하여 각각 반응시간을 변화하면서 추출물 수율, 페놀성화합물 수율 및 ferulic acid 수율을 비교한 결과, 실온에서 장시간 (1.5 - 6시간) 반응 하는 것보다 120℃에서 단시간 (15분 - 60분) 반응시키는 것이 추출물, 페놀성화합물 및 ferulic acid 수율 측면에서 유리하다고 판단되었다.

6) 고구마줄기와 고압수증기처리된 목질원료의 페놀성화합물 생산 효율 비교

- 고구마 줄기를 원료로 하여 산 또는 알칼리를 사용하는 화학적 처리법과 기업체로부터 제공받은 전처리 lignocellulose 원료로 하여 증류수만을 사용하는 복합처리법을 페놀성화합물 생산과 ferulic acid 생산 측면에서 비교한 결과를 Table 29과 Table 30에 나타냈다.

Table 28. Yield of phenyl propanoids with various raw materials and condition from sweet potato stem and lignocellulose.

Raw materials	Pretreatment, kg/cm ² · min	Chemicals	Reaction time, min	Reaction temperature, °C	Yield of phenyl propanoids ¹⁾ , mg g ⁻¹
Sweet potato stem	-	Sodium hydroxide	90	room temp.	403.5
Lignocellulose	25 · 10	Water	30	120	48.2

¹⁾ Based on the oven dry weight of the sweet potato stem.

Table 30. Yield of ferulic acid with various raw materials and condition from sweet potato stem and lignocellulose.

Raw materials	Pretreatment, kg/cm ² · min	Chemicals	Reaction time, min	Reaction temperature, °C	Yield of ferulic acid ¹⁾ , mg g ⁻¹
Sweet potato stem	-	Sulfuric acid	30	120	0.32
Lignocellulose	25 · 10	Water	15	120	0.57

¹⁾ Based on the oven dry weight of the sweet potato stem.

- 페놀성화합물 생산은 고구마 줄기를 알칼리로 실온에서 처리하는 것이 전처리된 lignocellulose 원료보다 생산량 측면에서 높게 나타났다. 그러나 바이오 바닐린의 생산을 위하여 필요한 전구물질인 ferulic acid는 10분동안 전처리된 lignocellulose를 증류수만을 사용하여 15분 동안 120°C에서 복합처리 하는 것이 고구마 줄기 원료보다 유리하였다.

- 최종적으로 페놀성화합물의 최적 생산을 위해서는 전처리 lignocellulose보다 고구마 줄기를 알칼리 처리하는 반응 조건이 유리하고, ferulic acid 생산을 위해서는 고구마 줄기 원료보다는 전처리 lignocellulose 원료를 증류수만으로 단시간 고온 처리 (120℃) 가 유리하다고 판단되었다.

7) 페놀성 화합물 생산방법의 경제성 비교분석

- 고구마 줄기와 기업체로부터 제공 받은 전처리된 lignocellulose로부터 페놀성화합물 최대 생산 반응 조건을 기준으로 하여 소요경비를 Table 31에 나타냈다. 이때 원료구입비 (전처리비용), 증류수 생산비용 및 인력소요경비는 계산에 포함하지 않았다. 또한 반응비용은 반응장치의 작동비용만으로 계산하였으며, 장치의 작동은 최대 전력소비량을 기준으로 하였다.

Table 31. Production charges of phenyl propanoid from sweet potato stem and lignocellulose

Raw materials	Chemical charge, won per raw material, g ¹⁾	Reaction charge, won per raw material, g ¹⁾	Recovery charge, won per raw material, g ¹⁾	Total charge, won per raw material, g ¹⁾	Charge, won per phenylpropanoid, g
Sweet potato stem	6	4.9	4	14.9	36.9
Lignocellulose	0	7.5	4	11.5	238.5

¹⁾ Based on the oven dry weight of the sweet potato stem.

- 고구마 줄기로부터 lignocellulose 원료로부터 생산하는 비용보다는 약 6배 정도 경제적인 비용이다. 결과적으로 페놀성화합물의 생산을 위해서는 고구마 줄기 원료를 사용하는 것이 유리하다고 판단된다. 페놀성화합물 1 g 당 37원의 가격은 경제적이고 효과적인 분리, 정제법만 개발 된다면 충분히 시장성이 있는 가격으로 추정된다.

- 고구마 줄기 및 전처리 lignocellulose로부터 ferulic acid를 생산하는데 필요한 소요경비를 Table 32에 나타냈다. 현재의 연구결과로는 전처리된 lignocellulose로부터 1g의 ferulic acid를 생산하기 위해서는 약 2만원이 소요된다. 전처리된 lignocellulose를 원료로 하는 방법은 고구마 줄기로부터 ferulic acid를 생산하는 것보다 약 50%의 생산경비를 절감할 수 있다. 이 소요경비의 대부분은 반응장치 즉 실온 교반장치의 전기요금과 회수장치의 전기요금으로 구성 되어 있다. 따라서 실질적으로 실험실 수준에서 생산이 아닌 실제 대규모 생산이 수행된다면 이러한 소요경비는 에너지 선택에 따라 충분히 경제성이 있다고 사료된다.

Table 32. Production charges of phenyl propanoid from sweet potato stem and lignocellulose

Raw materials	Chemical charge, won per raw material, g ¹⁾	Reaction charge, won per raw material, g ¹⁾	Recovery charge, won per raw material, g ¹⁾	Total charge, won per raw material, g ¹⁾	Charge, won per phenylpropanoid, g
Sweet potato stem	0.3	12.0	4	16.3	50,937
Lignocellulose	0	9.2	4	13.2	23,157

¹⁾ Based on the oven dry weight of the sweet potato stem.

8) 페놀성 화합물의 추출조건 검토

가) 저장기간과 페놀성 화합물의 함량 변화

- 페놀성 화합물의 추출 후, 저장 및 가공 공정을 완성도를 높이고자 추출된 페놀성 화합물을 pH 3과 pH 7로 각각 조절한 다음 시간경과에 따라 페놀성 화합물의 함량 변화를 측정된 결과를 Table 32과 Table 33에 나타냈다.
- Table 32은 고구마 줄기로부터 획득된 페놀성 화합물로 저장 또는 방치 시간이 길어짐에 따라 각각의 페놀성 화합물 함량이 감소되는 경향을 나타냈다. 특히 ferulic acid는 12시간 경과 후 함량이 약 56% 감소되는 경향을 나타냈으며, 12시간 이후에는 함량 변화가 커지 않았다. pH의 변화에 따른 페놀성 화합물의 함량 변화는 관찰 되지 않았다.

- Table 33는 목질원료로부터 획득한 페놀성 화합물의 결과로 초기의 12시간 동안 ferulic acid의 함량은 28-43%의 감소가 나타났다. 즉 ferulic acid는 Table 34의 고구마 줄기 페놀성 화합물과 마찬가지로 저장 초기에 변질 또는 전이가 발생된다는 사실이 확인 되었다. Vanillic acid, vanillin 및 cinnamic acid는 저장기간에 따라 함량 차이가 분명하게 나타나지 않았다. 이러한 경향은 고구마 줄기 페놀성 화합물의 저장기간 동안의 경향과는 다르게 나타났다.
- 실용화 공정상 ferulic acid를 효율적으로 관리하기 위해서는 페놀성 화합물 추출 후, 12시간 이내에 원료로 사용하여야 하며, 만약 보관이나 지체시간이 장기화 되는 경우에는 ferulic acid의 변질 또는 변환을 억제할 수 있는 새로운 방법을 모색해야 할 것으로 추측된다.

Table 33. Content of phenolic compounds during the storage periods in sweet potato stem extracts

Storage period, hrs.	Contents of phenolic compounds, mg/g ¹⁾							
	Vanillic acid		Vanillin		Ferulic acid		Cinnamic acid	
	pH 3.0	pH 7.0	pH 3.0	pH 7.0	pH 3.0	pH 7.0	pH 3.0	pH 7.0
0	- ³⁾	17.7±0.4 ²⁾	-	-	32.0±1.2b	37.4±0.9a	7.9±0.4a	9.4±0.4a
12	-	-	15.1±0.6a	-	18.0±0.8c	18.8±0.7b	2.3±0.1b	2.2±0.1b
24	-	-	15.0±0.8a	-	18.4±1.5c	16.8±0.4c	2.1±0.1b	1.8±0.1b
48	-	-	15.4±0.7a	-	18.7±0.8c	18.5±0.8b	2.5±0.1b	2.5±0.1b

¹⁾ Based on the oven dry weight of sample.

²⁾ Means followed by the same letter within the same column is not significantly different ($P < 0.05$) according to the Duncan's New Multiple-Range Test.

³⁾ Not detected.

Table 34. Content of phenolic compounds during the storage periods in wood extracts

Storage period, hrs.	Contents of phenolic compounds, mg/g ¹⁾							
	Vanillic acid		Vanillin		Ferulic acid		Cinnamic acid	
	pH 3.0	pH 7.0	pH 3.0	pH 7.0	pH 3.0	pH 7.0	pH 3.0	pH 7.0
0	71.4±3.1bc ²⁾	54.1±2.2c	226.0±10.1c	247.8±11.2a	216.2±8.2a	138.4±6.6a	1.5±0.1b	- ³⁾
12	76.1±3.6b	65.6±2.9b	258.0±11.5b	234.9±5.7a	122.8±4.7c	99.5±2.4b	2.9±0.1a	-
24	65.9±2.5c	64.7±2.9b	242.3±6.0bc	230.9±8.9a	78.0±3.5d	73.2±3.1c	-	-
48	101.8±3.9a	73.1±2.8a	288.0±11.1a	229.7±10.2a	163.1±4.0b	66.6±2.6c	2.8±0.1a	-

¹⁾ Based on the oven dry weight of sample.

²⁾ Means followed by the same letter within the same column is not significantly different (P<0.05) according to the Duncan's New Multiple-Range Test.

³⁾ Not detected.

9) 다단 용제 추출(liquid-liquid)에 의한 화합물의 분리

가) 고구마 줄기 추출물의 다단용제 추출

○ 고구마 줄기로부터 얻어진 페놀성 화합물을 여러 가지 용제로 다단 추출했을 때 각 fraction의 수율을 Fig. 50에 나타냈다. 페놀성 화합물의 대부분은 최종적으로 ethyl acetate 불용 fraction이 95%를 초과하였다. 즉 n-hexane, ethyl ether, chloroform 및 ethyl acetate에 용해되는 부분은 전체의 5%로, 고구마 줄기로부터 얻어진 페놀성 화합물은 저분자 화합물보다는 고분자 화합물이 상대적으로 많은 사실을 알 수 있었다.

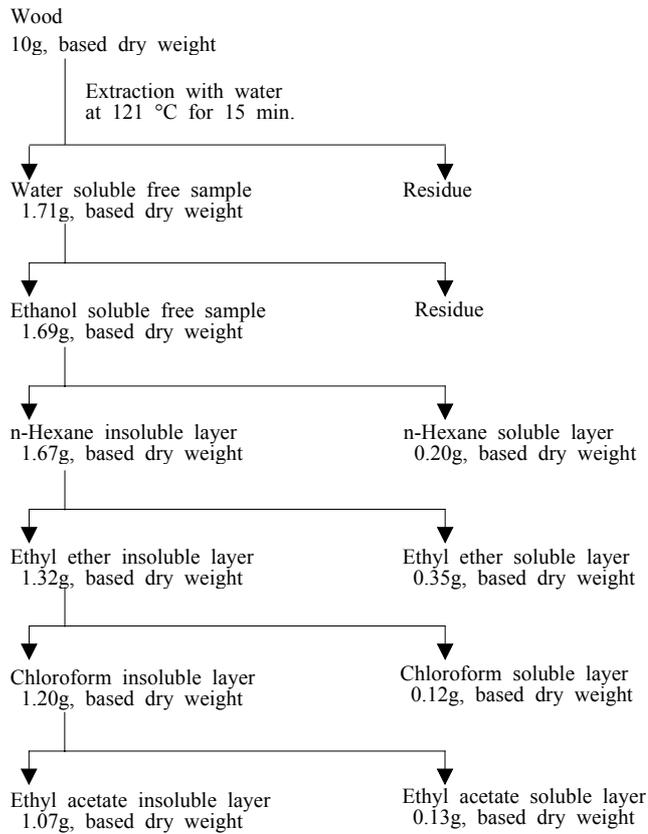


Fig. 50 Yield of fraction of extracted phenolic compound extracted from wood.

나) 고구마 줄기 추출물의 각 fraction에 함유된 페놀성 화합물

- Table 35는 고구마 줄기 추출물을 다단용제 추출하여 얻어진 각 fraction에 함유된 페놀성 화합물의 조성을 나타내고 있다. vanillic acid는 ethyl acetate 가용 fraction에 주로 함유되어 있었으며, 다른 용제 fraction과는 유의성이 인정되었다. Vanillin은 ethyl ether 가용 fraction을 제외하고는 모든 가용 fraction에 나타났으며, 유의성이 인정되는 fraction은 없었다. Ferulic acid는 ethyl acetate 가용 fraction에 주로 함유되어 있었으며, 그 유의성은 인정되는 수준이었다. Cinnamic acid는 ethyl ether, chloroform, ethyl acetate 가용 fraction에 다량 함유되어 있었다. 이때 각 fraction의 유의성은 인정되지 않았다.

Table 35. Content of vanillic acid, vanillin, ferulic acid and cinnamic acid in different organic solvent fractions from the sweet potato stem extracts

Fraction	Phenolic compounds (mg/g ^a)			
	Vanillic acid	Vanillin	Ferulic acid	Cinnamic acid
n-Hexane soluble	1.18 ± 1.01 b ^b	6.81 ± 3.97 a	0.15 ± 0.26 c	9.15 ± 7.99 a
Ethyl ether soluble	0.33 ± 0.57 b	- ^c	2.12 ± 2.07 c	21.49 ± 20.70 a
Chloroform soluble	11.27 ± 10.29 b	10.24 ± 10.44 a	15.25 ± 6.47 b	18.49 ± 6.26 a
Ethyl acetate soluble	59.21 ± 40.75 a	8.36 ± 7.27 a	62.89 ± 19.19 a	10.22 ± 5.10 a
Ethyl acetate insoluble	0.43 ± 0.30 b	0.61 ± 0.53 a	3.03 ± 5.24 c	0.71 ± 1.23 a

^a Milligrams of phenolic compound per grams of pretreated wood

^b Means followed by the same letter within the same column and same compound are not significantly different (P<0.05) according to the Duncan's New Multiple-Range Test.

^c Not detected

다) 목질원료 추출물의 다단용제 추출

○ 목질원료로부터 얻어진 페놀성 화합물을 각종 용제로 다단 추출했을 때, 얻어진 각 fraction의 수율을 Fig. 50에 나타냈다. n-hexane, ethyl ether, chloroform 가용 fraction은 약 24%로서 고구마 줄기 추출물과는 다른 경향을 나타냈다. 즉 목질원료 추출물에 함유된 페놀성 화합물은 고구마 줄기에 비해 약간 저분자 화합물이 상대적으로 많다는 사실을 간접적으로 확인 할 수 있었다. 가용 fraction의 수율은 고구마 줄기와 마찬가지로 ethyl ether 가용 fraction이 약 13%로서 가장 높게 나타났다.

라) 목질원료 추출물의 각 fraction에 함유된 페놀성 화합물

- Vanillic acid는 ethyl ether 가용 fraction에서 가장 높게 나타났지만, fraction간 유의성은 나타나지 않았다. Vanillin 또한 chloroform 가용 fraction에서 가장 높게 나타났지만, fraction간 유의성은 인정되지 않았다. Ferulic acid는 ethyl acetate 가용 fraction에서 가장 높게 나타났으며, 이 fraction의 유의성은 인정되었다. Cinnamic acid는 모든 가용 fraction에서 나타났다(Table 36). 결과적으로 ferulic acid의 효율적으로 분리하기 위해서는 다단추출 가용 fraction 중에서 ethyl acetate 가용 fraction을 이용하는 것이 가장 유리 하다고 판단되었다.

Table 36. Content of vanillic acid, vanillin, ferulic acid and cinnamic acid in different organic solvent fractions from the wood extracts

Fraction	Phenolic compounds (mg/g ^a)			
	Vanillic acid	Vanillin	Ferulic acid	Cinnamic acid
n-Hexane soluble	1.77 ± 2.86 a ^b	4.65 ± 0.72 a	- ^c	5.78 ± 5.16 a
Ethyl ether soluble	72.68 ± 86.87 a	18.56 ± 32.14 a	15.88 ± 18.57 b	5.57 ± 6.39 a
Chloroform soluble	7.80 ± 7.57 a	29.15 ± 23.17 a	12.36 ± 3.06 b	8.20 ± 12.85 a
Ethyl acetate soluble	10.71 ± 18.56 a	4.54 ± 4.98 a	75.64 ± 73.82 a	0.77 ± 1.34 a
Ethyl acetate insoluble	0.04 ± 0.06 a	3.04 ± 5.26 a	1.81 ± 3.14 b	-

^a Milligrams of phenolic compound per grams of pretreated wood

^b Means followed by the same letter within the same column and same compound are not significantly different (P<0.05) according to the Duncan's New Multiple-Range Test.

^c Not detected

10) Column chromatography(liquid-solid)에 의한 화합물의 분리

- 본 세부과제의 최종 목표는 임산 또는 농산원료로부터 ferulic acid를 효율적으로 분리하는 방법을 도출하는 것이다. 특히 원료로부터 전처리, 추출단계를 거쳐 획득한 페놀성 화합물을 효율적으로 분리하는 것이 중요하다. 특히 본 연구에서는 ferulic acid의 순수, 분리가 가장 최종적인 목적이다. Silica-gel을 충전제로 하는 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 액체-고체 크로마토그래피 방식으로 페놀성 화합물로부터 효과적으로 ferulic acid를 분리하고자 시도하였다.

가) Ferulic acid 분리를 위한 전개용매

- Silica-gel 컬럼 크로마토그래피를 사용하여 페놀성 화합물로부터 ferulic acid를 효율적으로 분리하고자 2가지 전개용매 시스템(ethyl acetate- methanol 시스템, n-hexane, ethyl acetate 및 formic acid 시스템)을 적용하였다.

(1) Ethyl acetate 및 methanol 혼합용매

- Fig. 51에서 Fig. 54은 ethyl acetate와 methanol 혼합용매를 사용하여 standard 화합물 혼합시료, 목질원료 페놀성 화합물 및 고구마 줄기 페놀성 화합물에 대한 TLC 사진이다. 시료의 용제 및 전개용제를 각각의 다른 비율로 하여 TLC한 결과로 페놀성 화합물 표준물 및 시료가 각각 plate 상에서 분리, 전개 되지 않았기 때문에 ethyl acetate와 methanol 혼합용매 시스템은 페놀성 화합물 분리를 위한 전개용매로는 부적당 하다고 판단되었다.

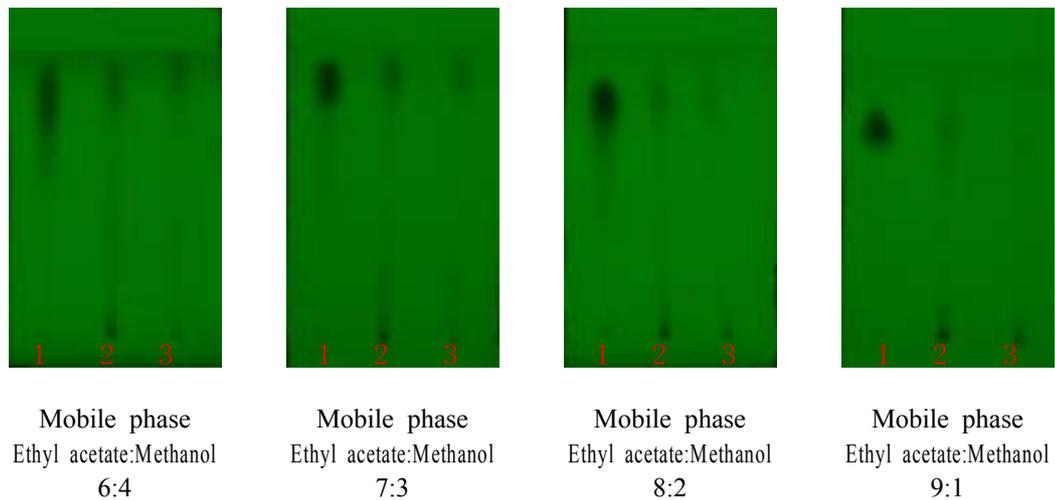


Fig. 51. TLC screening of phenolic compound standards (vanillin, vanillic acid, ferulic acid and cinnamic acid) and phenolic compound extracts from wood and sweet potato stem.

Application: 1: mixed standards, 2: extracts from wood, 3: extracts from sweet potato stem
Solvents : Ethyl acetate/Methanol, 6/4(v/v)

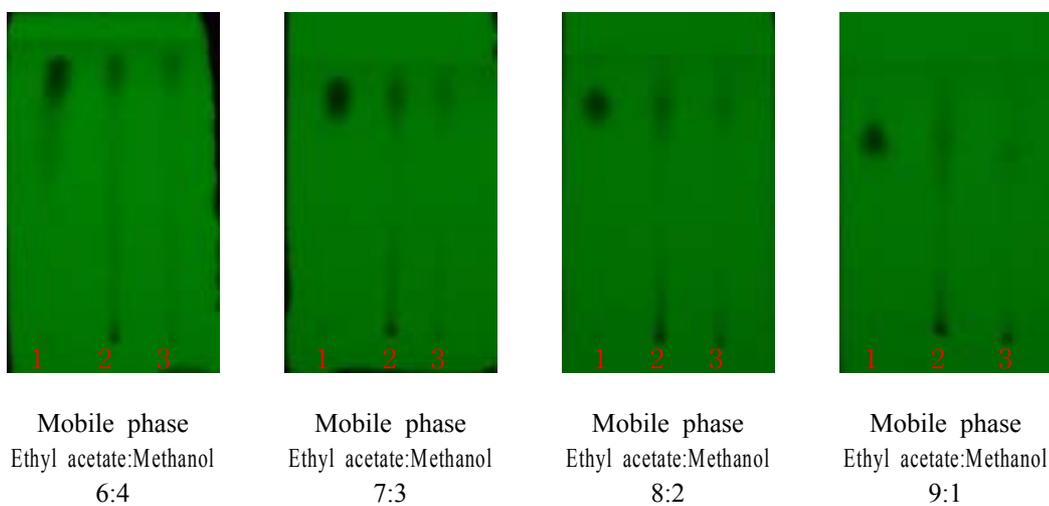


Fig. 52. TLC screening of phenolic compound standards (vanillin, vanillic acid, ferulic acid and cinnamic acid) and phenolic compound extracts from wood and sweet potato stem.

Application: 1: mixed standards, 2: extracts from wood, 3: extracts from sweet potato stem
Solvents : Ethyl acetate/Methanol, 7/3(v/v)

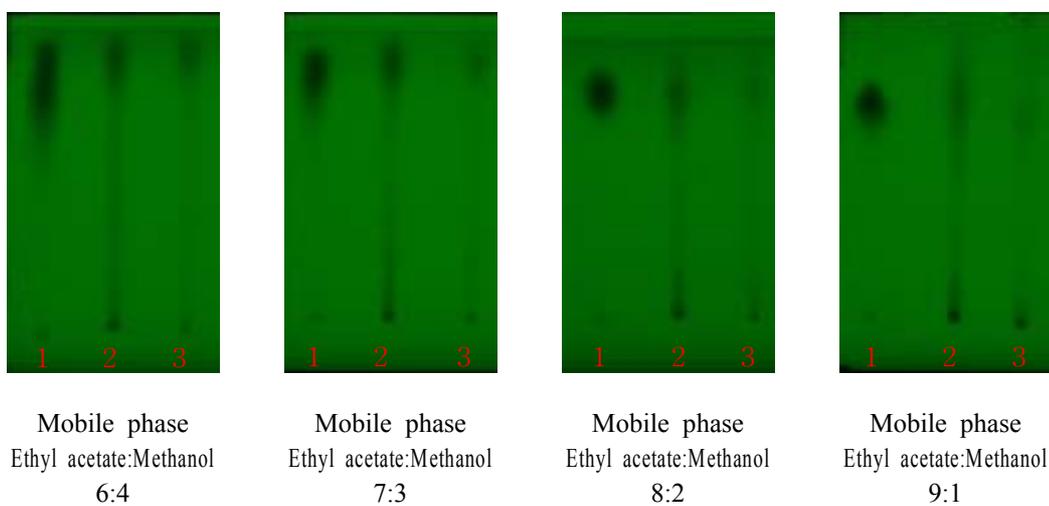


Fig. 53. TLC screening of phenolic compound standards (vanillin, vanillic acid, ferulic acid and cinnamic acid) and phenolic compound extracts from wood and sweet potato stem.

Application: 1: mixed standards, 2: extracts from wood, 3: extracts from sweet potato stem
Solvents : Ethyl acetate/Methanol, 8/2(v/v)

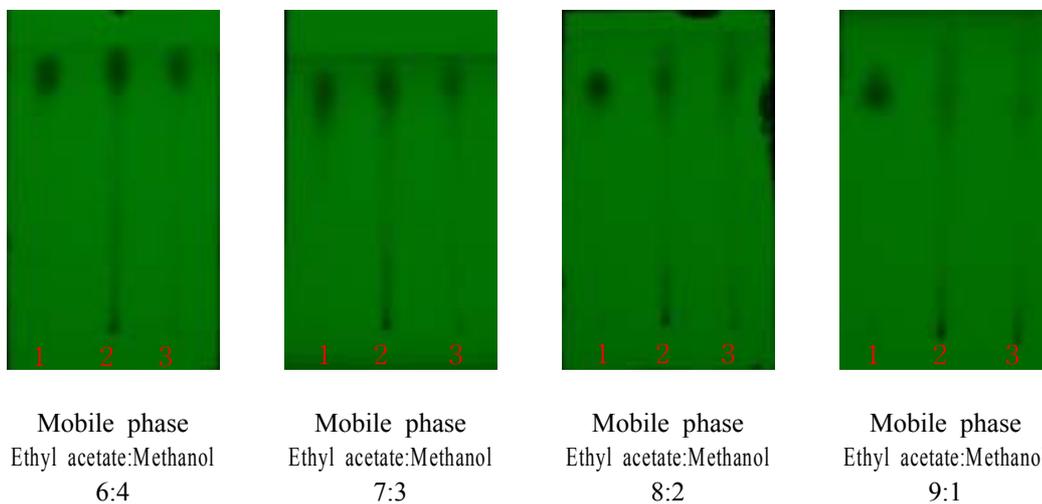


Fig. 54. TLC screening of phenolic compound standards (vanillin, vanillic acid, ferulic acid and cinnamic acid) and phenolic compound extracts from wood and sweet potato stem.

Application: 1: mixed standards, 2: extracts from wood, 3: extracts from sweet potato stem
Solvents : Ethyl acetate/Methanol, 9/1(v/v)

(2) n-hexane, ethyl acetate 및 formic acid 혼합용매

- Table 37은 페놀성화합물의 표준물질을 ethanol에 용해한 다음, n-hexane, ethyl acetate, formic acid 혼합용매로 전개하였을 때 R_F 값을 나타내었다. 표준물질을 혼합비율이 다른 각각의 용매로 전개 했을때, n-hexane:ethyl acetate:formic acid=80:50:0.5의 조건에서 물질의 분리가 훌륭하게 분리되었다. 특히 vanillic acid와 ferulic acid의 분리가 분명하게 되었다. 또한 n-hexane, ethyl acetate, formic acid 혼합용매는 전체적으로 페놀성 화합물의 분리에 유리한 것으로 판단 되었다.
- Fig. 55은 n-hexane, ethyl acetate 및 formic acid 혼합용매를 사용하여 페놀성 화합물 표준물을 TLC plate에 전개하였을 때의 사진이다. n-hexane:ethyl acetate:formic acid = 80:50:0.5과 n-hexane:ethyl acetate:formic acid = 100:50:0.5 전개용매로 전개하였을 때 표준물의 분리가 가장 잘 되는 것으로 나타났다. 또한 vanillic acid와 ferulic acid의 분리도 양호한 수준으로 분리되었다.

Table 37. The mobile phases studied

Mobile phase, v/v/v	Phenolic compounds			
	Vanillic acid	Vanillin	Ferulic acid	Cinnamic acid
	R_F			
n-hexane-ethyl acetate-formic acid, 50:50:0.5	0.31	0.43	0.27	0.39
n-hexane-ethyl acetate-formic acid, 50:50:0.8	0.39	0.47	0.37	0.43
n-hexane-ethyl acetate-formic acid, 80:50:0.3	0.24	0.44	0.22	0.32
n-hexane-ethyl acetate-formic acid, 80:50:0.5	0.18	0.35	0.14	0.24
n-hexane-ethyl acetate-formic acid, 80:50:0.8	0.36	0.52	0.34	0.42
n-hexane-ethyl acetate-formic acid, 100:50:0.5	0.18	0.31	0.16	0.24
n-hexane-ethyl acetate-formic acid, 150:50:0.5	0.16	0.30	0.14	0.22
n-hexane-ethyl acetate-formic acid, 150:50:0.8	0.18	0.28	0.12	0.22

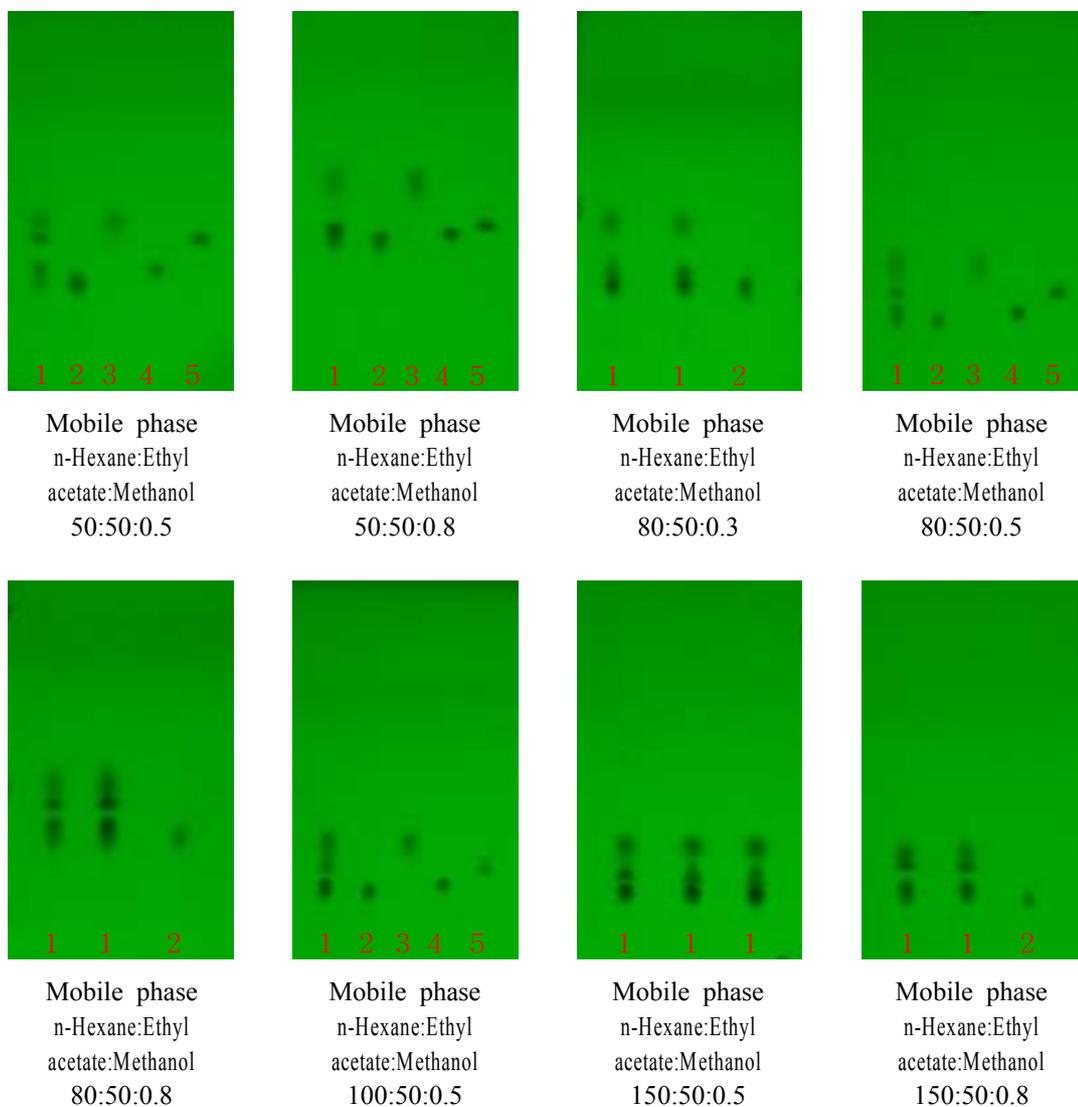


Fig. 55. TLC screening of phenolic compound standards
(vanillin, vanillic acid, ferulic acid and cinnamic acid)

Application: 1: mixed standards, 2: ferulic acid, 3: vanillin, 4: vanillic acid, 5: cinnamic acid
Solvents : Ethanol/Water, 95/5(v/v)

나) silica-gel column chromatography에 의한 화합물의 분리

(1) 고구마 줄기 추출물로부터 분리된 fraction의 UV 흡광도 및 페놀성 화합물의 함량

○ Fig. 56는 고구마줄기로부터 추출된 phenolic compounds를 silica-gel 60 컬럼에서 로딩한다음, 분획되어 얻어진 각 fraction의 UV 흡광도 결과이다. 본 시료에서 분리된 화합물의 대부분은 325nm 보다 280 nm에서 전체적으로 흡광도가 높게 나타났다.

○ 컬럼의 분획물은 280 nm의 UV 파장에서 흡광도를 기준으로 하여 4개의 fraction으로 구분될 수 있었으며, 그 구분은 비교적 명확하게 나타났다. 특히 fraction II에서 흡광도가 높게 나타났다. Fraction II 및 fraction IV는 325nm 파장에서 흡광도를 나타내지 않았다.

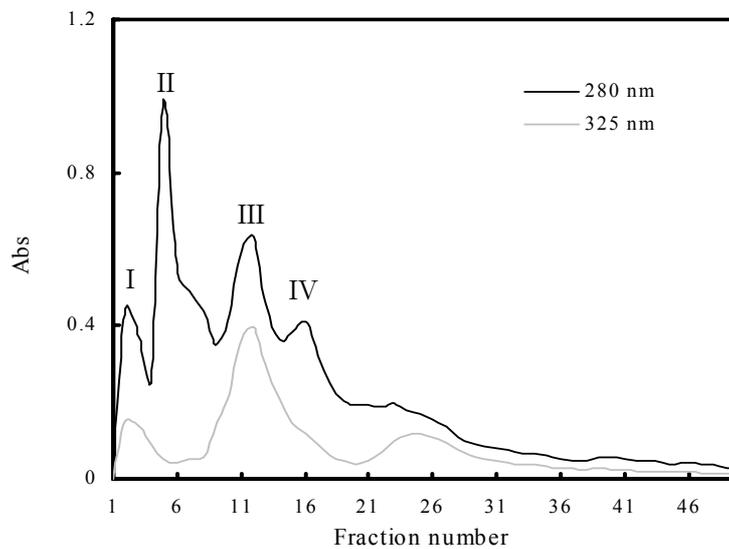


Fig. 52. Column chromatographic fractions profile of phenolic compounds from sweet potato stem extracts.

- 고구마 줄기 페놀성 화합물의 각 fraction을 fig. 56에서 보는바와 같이 280nm에서 동일한 흡광도를 나타내는 fraction을 그룹화하고, 그 fraction을 한데 모아 HPLC 분석을 실시한 결과를 Table 38에 나타냈다. Fraction I는 대부분의 vanillin으로 구성되어 있었으며, 이 fraction은 순수한 vanillin임이 증명되었다.
- Fraction II는 cinnamic acid로 단일물질로 있었으며, fraction III는 vanillic acid와 ferulic acid로 구성되어 있었다. 본 연구에서 목적으로 하는 고구마 줄기의 페놀성 화합물로부터 ferulic acid의 완벽한 분리는 현재의 컬럼크로마토그래피에 의한 분리방법으로는 효율적이지 못하다고 판단되었다.

Table 38. Identification of fractions from sweet potato stem extracts in column chromatography

Fraction	Separated phenolic compounds, mg g ^{-1a}			
	Vanillic acid	Vanillin	Ferulic acid	Cinnamic acid
I	- ^b	0.083	-	-
II	-	-	-	0.023
III	0.195	-	0.217	-
IV	-	-	-	-

^a Micrograms phenolic acid per gram of sweet potato stem.

^b Not detected.

(2) 목질원료 추출물로부터 분취된 fraction의 UV 흡광도 및 페놀성 화합물의 함량

- Fig. 57은 목질원료로부터 추출된 페놀성 화합물의 각 fraction을 UV 흡수도 분석을 한 결과이다. 흡광도는 Fig. 56의 고구마 줄기와 마찬가지로 325 nm보다 280 nm에 대한 흡수가 높고, 민감하게 나타났으며, 고구마 줄기의 경우와 비교할 때 물질의 분리는 약간 저조하게 나타났다. 그러나 거의 같은 fraction에서 물질의 분리를 확인 할 수 있었다. Fraction IV의 경우 fraction III와 거의 분리가 잘 되지 않은 결과를 보여 주었다.

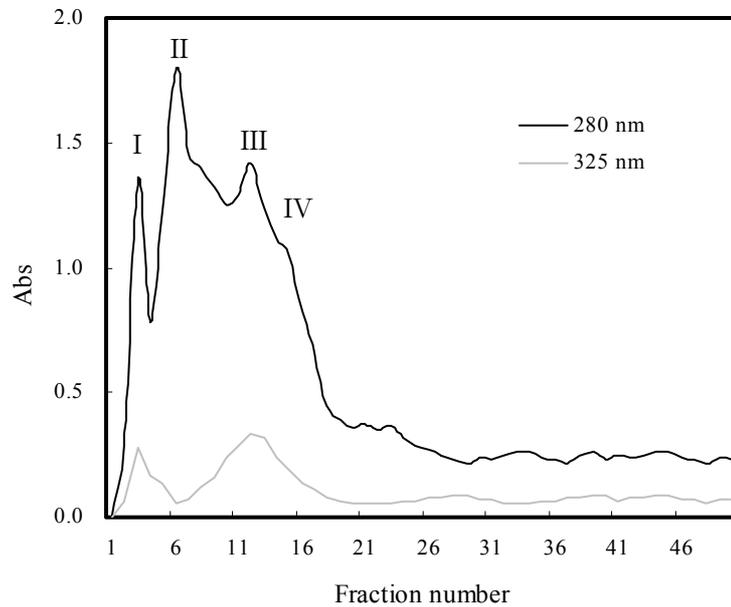


Fig. 57. Column chromatographic fractions profile of phenolic compounds from wood extracts.

- Table 39는 목질원료로부터 획득된 페놀성 화합물의 각 fraction을 Fig. 57에서 보는바와 같이 280nm에서 동일한 흡광도를 나타내는 fraction을 그룹화(fraction I - fraction IV)하고, 그 fraction을 한데 모아 HPLC 분석을 실시한 결과를 Table 30에 나타냈다. Fraction I는 거의 대부분 vanillin으로 구성되어 있었고, fraction II는 cinnamic acid로 대부분 확인되었다. Fraction III는 vanillic acid와 ferulic acid가 혼합되어 있었다.
- Fraction 그룹간의 분리, 분획된 물질의 조성은 고구마 줄기와 거의 동일한 경향을 나타냈고, fraction 또한 거의 일치되었다. 그러나 본 연구의 최종 목적인 ferulic acid의 완전한 분리에 필요한 구체적인 방법으로는 그 효율성이 낮다고 생각된다.

Table 39. Identification of fractions from wood extracts in column chromatography

Fraction	Separated phenolic acid, mg g ^{-1a}			
	Vanillic acid	Vanillin	Ferulic acid	Cinnamic acid
I	- ^b	0.063	-	-
II	-	-	-	0.105
III	0.255	-	0.325	-
IV	-	-	-	-

^a Microgrammes phenolic acid per gram of wood.

^b Not detected.

11) Ferulic acid의 분리 및 정제 (복합분리정제법)

가) 고구마 줄기

- 농산 및 임산 biomass 원료중 하나인 고구마 줄기 및 목질 원료로부터 바이오 바닐린 제조원료인 ferulic acid를 순수, 분리 정제하고자 액체-액체 크로마토그래피 및 액체-고체 크로마토그래피 기술을 적용시켰지만, 만족할 만한 결과를 얻지 못하였다. 그래서 본 항목에서는 다단용제추출법(액체-액체 크로마토그래피법) 및 silica-gel 컬럼크로마토그래피(액체-고체 크로마토그래피)를 동시에 순차적으로 적용시켜 ferulic acid를 분리하고자 하였다.
- 고구마줄기로 부터 획득된 페놀성 화합물을 다단 용제 추출법으로 분리하는 공정 중에서 ethyl acetate 가용 fraction만을 따로 분리하여 이를 silica-gel 크로마토그래피에 의해 각 fraction을 분취하였다. 이때 분취된 fraction 들의 UV 흡수도를 Fig 58에 나타냈다.
- 각 fraction들은 UV 325 nm 파장에서는 흡수도가 거의 없었지만, UV 280 nm에

서는 흡수도가 다르게 나타났다. 이들 fraction들을 UV 흡수도에 근거하여 fraction A부터 fraction I까지 9개의 그룹으로 그룹화 하였다. Fraction 22에서 시작되는 G그룹과 fraction 25에서 시작되는 H 그룹, fraction 28에서 시작되는 I 그룹은 UV 흡수도가 다른 그룹에 비하여 높게 나타났다.

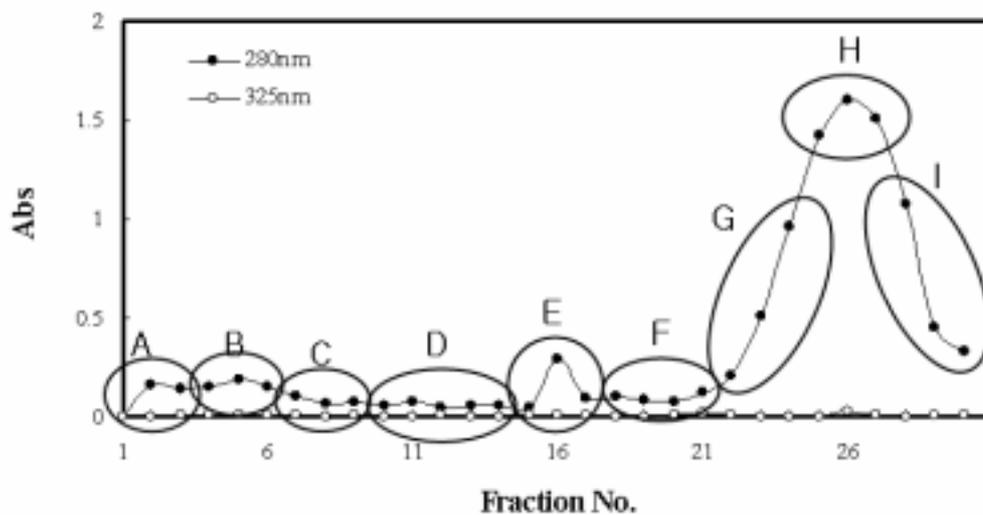


Fig. 58. Separation of ethyl acetate fractions from sweet potato stem extracts by silica gel column

Table 40. Identification of ethyl acetate soluble fraction of sweet potato stem extracts by column chromatography

Fraction group	Phenolic compounds, mg g ^{-1a}			
	Vanillic acid	Vanillin	Ferulic acid	Cinnamic acid
A	- ^b	-	-	-
B	-	-	-	-
C	-	-	-	-
D	-	-	-	-
E	1.29	-	-	-
F	3.61	2.33	-	-
G	2.57	3.98	1.22	-
H	-	-	5.41	-
I	-	-	3.15	1.25

^a Milligrams phenolic acid per gram of sweet potato stem.

^b not detected.

- Table 40은 Fig. 58의 각 fraction 그룹을 HPLC 분석한 결과로, vanillic acid 및 ferulic acid는 3개의 fraction 그룹, vanillin은 2개의 fraction 그룹, cinnamic acid는 1개의 fraction 그룹에서 나타났으며, ferulic acid는 fraction group H에서 순수한 형태로 분리할 수 있음이 증명되었으며, 액체-액체 및 액체-고체 크로마토그래피의 순차 적용은 고구마 줄기로부터 ferulic acid를 분리하는 가장 우수한 방법으로 인정되었다.

나) 목질원료

- 목질원료로부터 획득된 페놀성 화합물을 다단 용제 추출법으로 분리하는 공정 중 ethyl acetate 가용 fraction만을 따로 분리하여 이를 silica-gel 크로마토그래

피에 의해 각 fraction을 분취하였다. 이때 분취된 fraction 들의 UV 흡수도를 Fig 59에 나타냈다.

- Fraction 및 fraction 그룹들은 fig 55의 고구마 줄기 와 동일한 형태를 나타냈으며, fraction 그룹의 개수도 동일하게 나타났다. 또한 fraction 그룹 G, fraction 그룹 H 및 fraction 그룹의 UV 흡수도도 다른 fraction 그룹에 비해 높았다.

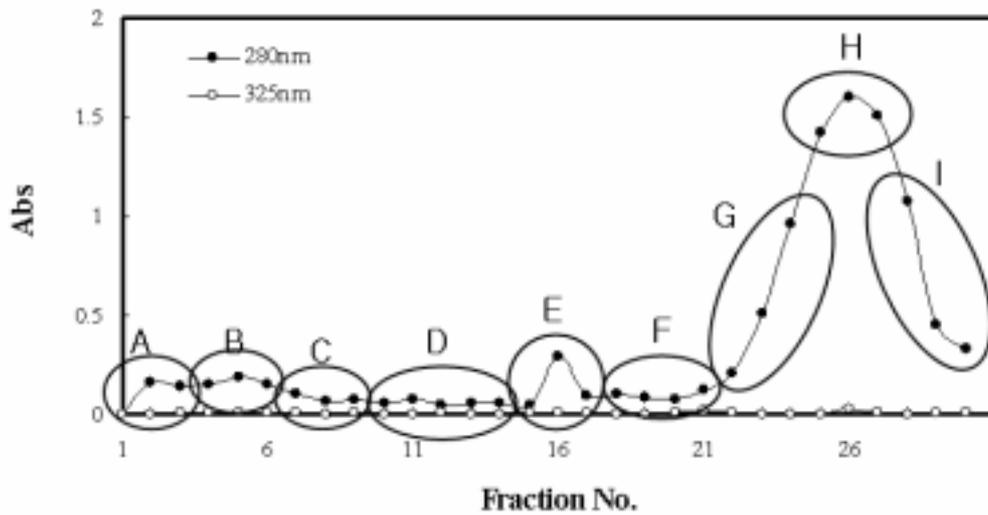


Fig. 59. Separation of ethyl acetate fractions from sweet potato stem extracts by silica gel column

- Table 41은 Fig 59에서 구분된 fraction 그룹들에 존재하는 페놀성 화합물의 분석 결과이다. Ferulic acid는 fraction G그룹, H그룹, I그룹에 존재하였으며, H그룹과 I그룹에서는 순수한 ferulic acid로 구성되어 있었다.
- 결과적으로 목질원료로부터 순수한 ferulic acid까지의 분리는 실험실 수준에서 가능하다고 판단되며, 상기와 같은 공정은 현실적으로 충분한 가능성이 있다고 판단된다.

Table 41. Identification of ethyl acetate soluble fraction of wood extracts by column chromatography

Fraction group	Separated phenolic acid, mg g ^{-1a}			
	Vanillic acid	Vanillin	Ferulic acid	Cinnamic acid
A	- ^b	-	-	-
B	-	-	-	-
C	-	-	-	-
D	-	-	-	-
E	-	-	-	-
F	10.50	5.42	-	-
G	14.34	9.35	10.65	-
H	-	-	12.26	-
I	-	-	12.29	-

^a Milligrams phenolic acid per gram of pretreated wood.

^b not detected.

다) Ferulic acid의 생산을 위한 공정 제안 및 물질 balance

- 그림 60은 본 연구결과를 산업화 및 bench scale 수준까지 up-grade 하기 위하여 바이오매스 원료로부터 ferulic acid정제까지 모든 공정을 나타냈으며, 각 단계마다의 물질 balance를 표시하였다. 전건상태의 바이오매스 원료 10 g 으로 부터 획득될 수 있는 ferulic acid의 중량은 고구마 줄기 원료는 54.1 mg 이었으며, 목질 원료는 245.5 mg이었다.
- bench scale 또는 현장생산수준에서 본 연구에서 도출된 ferulic acid 정제 공정을 적용하게 된다면 더 높은 수율의 ferulic acid가 획득되어 지리라 생각된다.

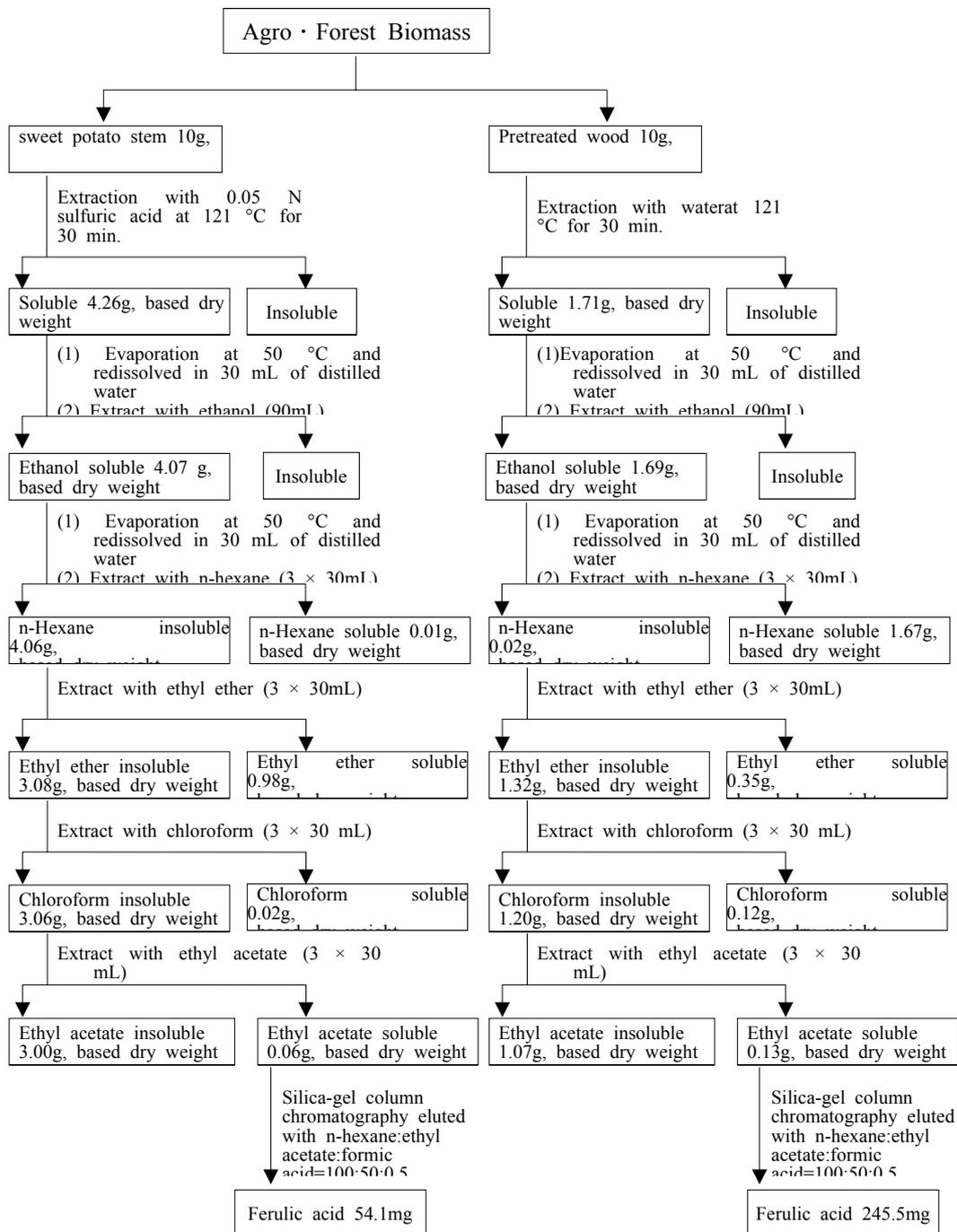


Fig. 60. Efficient extraction procedure of ferulic acid from agro-forest products.

12) 정제된 Ferulic acid의 생체전환

- 고추 세포 배양에서 그들의 생체전환 능력을 알아보기 위해 외생의 ferulic acid를 첨가한 결과, 일부 ferulic acid는 vanillin으로 전환되었고 고추의 주요 이차대사산물인 capsaicin으로 전환하였다. 세포내 vanillin 농도는 capsaicin 농도보다 비교적 높았으며 0.6mM ferulic acid 첨가 후 4일에 최대 2mg/g DW까지 도달하였다. Ferulic acid 첨가는 vanillin과 capsaicin 생산을 증가시킬 뿐만 아니라 다른 phenylpropanoid 대사산물의 함량도 증가시켰다.

Table 42. Changes in cinnamic acid, phenylalanine, vanillic acid and capsaicin levels in *C. annuum* L. cv. P1482 suspension cell cultures upon feeding with various concentrations of ferulic acid.

	Days	Cinnamic acid*	Phenylalanine*	Vanillic acid*	Vanillin*	Ferulic acid*	Capsaicin*
0 mM	1	1.01±0.05 ^d	1.07±0.01 ⁿ	0.25±0.02 ^{kl}	0.17±0.02 ^l	0.2±0.01 ^r	1.62±0.01 ^h
	2	1.14±0.06 ^c	1.07±0.03 ⁿ	0.24±0.02 ^{kl}	0.16±0.01 ^l	0.23±0.01 ^r	1.84±0.01 ^g
	3	1.25±0.02 ^b	1.75±0.02 ⁱ	0.23±0.01 ^l	0.13±0.01 ^m	0.30±0.02 ^f	2.11±0.02 ^a
	4	1.50±0.09 ^a	1.62±0.02 ^j	0.27±0.03 ^k	0.18±0.01 ^l	0.32±0.02 ^f	2.06±0.01 ^{bc}
	5	1.19±0.07 ^c	1.71±0.03 ⁱ	0.26±0.01 ^k	0.13±0.01 ^m	0.30±0.02 ^f	2.05±0.04 ^{cd}
	6	0.87±0.01 ^f	1.19±0.01 ^m	0.23±0.01 ^{kl}	0.12±0.01 ^m	0.21±0.01 ^r	2.02±0.02 ^{cde}
0.6 mM	1	0.67±0.03 ^{ij}	3.43±0.01 ^c	1.67±0.03 ^d	0.38±0.02 ^b	11±0.15 ^q	1.34±0.05 ⁱ
	2	0.60±0.01 ^k	2.40±0.01 ^f	1.52±0.04 ^f	0.39±0.02 ^b	13±0.21 ^p	1.34±0.03 ⁱ
	3	0.52±0.02 ^{lm}	1.60±0.03 ^j	1.57±0.02 ^e	0.48±0.01 ^f	20±0.30 ^o	1.34±0.02 ⁱ
	4	0.56±0.01 ^{kl}	1.82±0.05 ^h	3.64±0.02 ^a	2.00±0.03 ^a	40±0.32 ^k	1.34±0.03 ⁱ
	5	0.72±0.04 ^{hi}	1.40±0.03 ^l	2.11±0.01 ^b	0.62±0.01 ^d	34±0.25 ^m	1.27±0.03 ^j
	6	0.46±0.01 ⁿ	1.04±0.02 ^{no}	2.13±0.02 ^b	0.76±0.01 ^c	37±0.24 ^l	1.34±0.01 ⁱ
1.25 mM	1	0.62±0.02 ^{jk}	0.60±0.05 ^p	0.34±0.04 ^j	0.49±0.02 ^f	49±0.32 ^h	1.34±0.05 ⁱ
	2	0.57±0.02 ^{kl}	1.06±0.03 ⁿ	0.37±0.02 ^j	0.33±0.02 ^{ij}	48±0.35 ⁱ	1.34±0.03 ⁱ
	3	0.50±0.01 ^{mn}	0.99±0.02 ^o	0.68±0.01 ^h	0.52±0.02 ^e	53±0.24 ^g	1.34±0.03 ⁱ
	4	0.61±0.03 ^{jk}	0.49±0.01 ^q	0.37±0.02 ^j	0.35±0.02 ⁱ	47±0.09 ^j	1.66±0.03 ^h
	5	0.62±0.03 ^{jk}	0.53±0.01 ^q	0.37±0.02 ^j	0.30±0.01 ^k	30±0.10 ⁿ	2.10±0.01 ^{ab}
	6	0.67±0.02 ^{ij}	1.72±0.08 ⁱ	1.47±0.02 ^g	0.60±0.01 ^d	68±0.52 ^e	2.00±0.05 ^{de}
2.5 mM	1	0.81±0.02 ^g	3.11±0.08 ^d	0.27±0.01 ^k	0.30±0.01 ^k	75±0.52 ^b	1.99±0.01 ^e
	2	0.93±0.03 ^e	2.65±0.07 ^e	1.97±0.02 ^c	0.92±0.02 ^b	97±0.58 ^a	1.87±0.01 ^g
	3	0.80±0.01 ^g	6.61±0.06 ^a	0.42±0.01 ⁱ	0.74±0.02 ^c	72±0.95 ^c	2.02±0.03 ^{acd}
	4	0.74±0.01 ^h	1.51±0.03 ^k	0.26±0.03 ^k	0.38±0.01 ^h	68±0.92 ^e	2.00±0.03 ^{de}
	5	0.74±0.02 ^h	2.10±0.03 ^g	0.27±0.02 ^k	0.31±0.01 ^{ki}	64±0.82 ^f	1.83±0.02 ^g
	6	0.80±0.01 ^g	3.83±0.02 ^b	0.37±0.02 ^j	0.42±0.01 ^g	69±0.52 ^d	1.94±0.02 ^f

*(mg/g D.W)

□ 기타 계획 외 부가 연구

- 페놀산 추출방법에는 유기용매 추출법이 있지만 안정성 측면에서는 효소에 의한 방법이 보다 효율적이며 빠른 시간내에 추출해 낼 수 있다는 장점을 가지고 있다. 본 연구에서 세 가지 종류의 상업적으로 널리 이용되는 효소를 사용하여 고구마 줄기로부터 시간에 따른 ferulic acid의 추출 결과 Ultraflo L이 가장 효과적이었다.

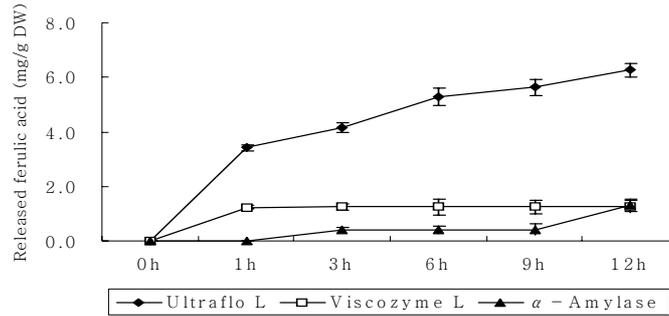


Fig. 61. Release of ferulic acid by three enzymes at various incubation time.

- 효소처리는 페놀산 외 phenolic compound도 동시에 얻었었는데, Ultraflo L 처리가 ferulic acid 생산에 가장 효과적인 반면에 Viscozyme L은 vanillic acid와 vanillin 생산에 효과적이었다. Ferulic acid와 vanillic acid를 전구체로 생성되는 vanillin의 경우 1% Viscozyme L을 처리시 배양 1시간에 최대 14.7 mg/g DW의 수율을 나타내었다.

Table 43. Effect of commercial enzymes on the release of other phenolic compounds from sweet potato stems.

Enzyme	Concentration	Released phenolic compounds (mg/g DW)		
		Vanillic acid	Vanillin	Cinnamic acid
Ultraflo L	0.0 %	<0.2	<0.2	0.55±0.09 ^a
	0.1 %	0.75±0.05 ^j	0.66±0.02 ^e	<0.2
	1.0 %	8.30±0.19 ^c	7.47±0.13 ^b	<0.2
Viscozyme L	0.0 %	<0.2	<0.2	0.54±0.05 ^a
	0.1 %	1.68±0.06 ^g	0.33±0.01 ^f	<0.2
	1.0 %	11.04±0.14 ^a	14.69±0.23 ^a	<0.2
α-Amylase	0.0 mU	<0.2	<0.2	0.52±0.06 ^a
	10 mU	2.57±0.08 ^e	<0.2	<0.2
	100 mU	1.90±0.04 ^f	<0.2	<0.2

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구평가의 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (점수)
1차년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 바닐린 생산균주의 확보여부 ○ 바닐린 전환 관련 유전자확보 여부 ○ 재조합대장균에서 발현가능성 여부 ○ 농임산물로부터 전구체 생산원료 확보 	30 20 15 35
2차년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 미생물균주의 생산성여부 ○ 미생물균주의 신규균주 확보 여부 ○ 생산균주로부터 genomic DNA library 구축 여부 ○ 신규바닐린 생합성 유전자 확보 여부 ○ 저분자 페놀화합물 획득을 위한 화학적 전처리 효율성 ○ 고압, 수증기 전처리법에 따른 최적조건 구명 여부 	15 15 15 15 20 20
3차년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 미생물균주의 생체전환조건 구명 여부 ○ 배양최적 생물반응기 개발여부 ○ 유전자진화기술을 활용한 고생산성 대사공학기술 적용 여부 ○ 바닐린 생산 미생물의 생산성 여부 ○ 전구체 추출법 구명 여부 ○ 전구체 대량추출법 구명 여부 	15 20 15 15 15 20
최종평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 미생물균주의 생산성여부 ○ 대사공학기술로 바닐린 생산경로가 최적화된 재조합 균주개발 여부 ○ 효율적 생산공정 확보 여부 ○ 농임산폐기물로부터 효율적 전구체 추출법 구명 여부 	25 25 25 25

제 2 절 연구개발 목표 측면에서의 달성도 평가

1. 제 1 세부과제: 대사공학 기술을 통한 바닐린 생산균주의 생산성 개량 (목표대비 100% 달성)

- 각종 시료 (목본, 농폐잔재, 부엽토, 산림토양)로부터 페룰산을 대사하는 미생물들을 다수 분리하였으며, 이로부터 바닐린을 생산하는 세균 3주 및 방선균 1주를 확보하였음. (1차년도 목표대비, 100%)
- 확보된 상기 바닐린 생산 미생물들을 동정 중에 있음. (1차년도 목표대비, 100%)
- 상기 바닐린 생산 세균 및 방선균에 적합한 배양조건 (배지, 온도, pH등)들을 선정하고 바닐린 생산성을 비교하였음. (1차년도 목표대비, 100%)
- 페룰산을 바닐린으로 전환시키는 유전자인 *fcs*와 *ech*를 *Delftia acidovorans*와 *Amycolaptosis sp.* HR104로부터 PCR기술을 이용해서 cloning 하였음. (1차년도 목표대비, 100%)
- *Delftia acidovorans*와 *Amycolaptosis sp.* HR104로부터 cloning한 *fcs*와 *ech* 유전자를 대장균에 도입해서 재조합 균주를 만들고 유전자들의 기능적 발현 (functional expression)을 조사하였음. *Amycolaptosis sp.* HR104로부터 cloning한 *fcs*와 *ech* 유전자는 대장균에서 기능적으로 발현되었으나, *Delftia acidovorans*의 *fcs*와 *ech* 유전자는 기능적 발현이 되지 않았음. (1차년도 목표대비, 100%)
- 바닐린 유전자 (*Amycolaptosis sp.* HR104의 *fcs*와 *ech*)를 갖는 재조합 대장균에 페룰산, 1g/1를 기질로 첨가한 결과 바닐린, 약 0.5g/1가 생성되는 것을 확인하였음. (1차년도 목표대비, 100%)
- 1차 년도에 연속해서 우수 바닐린 생산균주의 탐색 ⇨ 각종 시료 (목본, 농폐잔재, 부엽토, 산림토양)로부터 페룰산을 대사하는 미생물들을 다수 분리하였으며, 이로부터 바닐린을 생산하는 세균 1주, 방선균 1주를 확보하였다. (2차년도 목표대비, 100%)
- 돌연변이에 의한 페룰산을 바닐린으로 전환하는 대사능력이 향상된 돌연변이주를 개발 ⇨ NTG 돌연변이 처리 후에 페룰산 대사능력이 향상된 돌연변이주를 탐색하고 분석하였다. 페룰산 대사능력의 향상은 주로 목적산물인 바닐린에 대한 내성의 증가에 기인하는 것으로 추론되며 바닐린에 대한 내성이 약 2배 이상 증가

- 한 돌연변이주를 확보하였다. (2차년도 목표대비, 100%)
- 바닐린 생산균주로부터 genomic DNA library를 구축 ⇨ 대표적인 바닐린 생산균주인 *Streptomyces setonii*의 genomic DNA library를 구축하였다. 추가로 난배양성 미생물로부터 신규 바닐린 생합성 유전자를 확보하기 위해서 총 36종의 metagenome library를 확보하였다. (2차년도 목표대비, 100%)
 - 구축된 library로부터 신규 바닐린 생합성 유전자를 cloning (Southern hybridization 또는 Shotgun method를 사용) ⇨ *Streptomyces setonii*는 대표적인 바닐린 생산균주의 하나임에도 불구하고 바닐린 생합성 유전자가 밝혀져 있지 않다. 현재 Shot-gun method를 이용한 *Streptomyces setonii*의 신규 바닐린 생합성 유전자의 cloning을 진행하였다. Shot-gun method는 원하는 유전자가 도입된 클론을 선별하는 시스템이 필요하다. 본 과제에서는 색깔로 바닐린 유전자가 도입된 클론을 쉽게 선별할 수 있는 탐색시스템을 개발하였다. (2차년도 목표대비, 100%)
 - 신규 바닐린 유전자들을 대장균에 도입해서 기능적 발현을 연구하고 기존 유전자를 갖고 있는 재조합 대장균과의 바닐린 생산성을 비교 ⇨ *Pseudomonas putida*의 *fcs*와 *ech* 유전자를 클로닝하고 대장균에 도입해서 기능적 발현을 연구하였다. SDS-PAGE 결과로부터 단백질의 발현은 확인이 되었으나 상기 유전자가 도입된 대장균의 배양액에서 바닐린은 검출되지 않았다. 따라서 *Pseudomonas putida*의 *fcs*와 *ech* 유전자는 대장균에서 기능적으로 발현이 되지 않음을 알았으며, 1차년도에서 사용했던 *Amycolaptosis sp.* HR104의 *fcs*와 *ech* 유전자를 갖는 재조합 대장균과의 바닐린 생산성을 비교할 수는 없었다. (2차년도 목표대비, 100%)
 - 재조합 대장균에서 외래 바닐린 유전자들에 의해서 발현되는 바닐린 대사경로 효소들의 활성을 *in vitro*상에서도 비교 ⇨ 상기 항의 신규 클로닝한 *Pseudomonas putida*의 *fcs*와 *ech* 유전자가 대장균 내에서 기능적으로 발현이 되지 않는 이유로 *in vitro*상에서의 효소활성의 비교는 진행할 수 없었다.
 - 상기 항의 비교들을 통해서 바닐린 생산 활성이 가장 높은 유전자를 선택 ⇨ 상기 항의 답변과 동일한 이유로 유전자 간의 바닐린 생산 활성의 비교가 불가능하였다.
 - 상기 항에서 제기된 문제점 분석 및 해결 방안 ⇨ 바닐린 생합성 효소 및 유전자원의 발굴은 바닐린 생합성 가능한 미생물들의 종류가 제한되어 있고 대사경로가 복잡해서 어려운 것으로 보고되어 있다. 현재까지 4종의 유전자만이 보고되고 있

는 것이 이를 반증한다. 또한 클로닝 된 유전자들이 *Pseudomonas putida*의 *fcs*와 *ech* 유전자처럼 대장균 내에서 기능적으로 발현이 되지 않을 가능성도 있다.

- 1) 바닐린 축적으로 야기되는 균체 활성화와 산물의 생산성 감소를 방지하기 위하여 최종산물의 연속적 회수가 가능한 소규모 생물반응기의 제작, 2) 페룰산에서 바닐린으로 전환되는 반응을 최적화하기 위한 배지조성, 기질(페룰산)농도, 용존 산소농도, pH등의 화학적 인자와 배양온도, 교반속도 등의 물리적 인자들의 최적화하였다.
- 미생물균주의 생체전환조건 구명 여부 ⇨ 바닐린 생산경로인 Co-A dependent deacetylation pathway에서 feruloyl-CoA가 vanillin으로 전환되면서 생성되는 acetyl-CoA가 균체 내에 축적되면서 enoyl-CoA hydratase/aldolase 효소 반응이 저해를 받는 것을 규명하고 acetyl-CoA의 TCA cycle로의 소모를 유도하는 citrate synthase 유전자 (*gltA*)를 pTAHEF에 도입해서 pTAHEF-gltA를 만들었다. 상기 유전자의 도입으로 바닐린의 생산성은 2배정도 증가하였다. (3차년도 목표대비, 100%)
- 배양최적 생물반응기 개발여부 ⇨ 바닐린의 연속적인 추출이 가능하다면 바닐린에 의한 생육저해 현상 없이 균체의 재사용을 통한 연속적인 조업이 가능하다. 균체의 생육과 바닐린이 생성되는 발효조와 바닐린을 연속적으로 추출하는 추출조를 가지는 바닐린 생산용 신규 생물반응기를 개발해서 연속적인 바닐린의 생산을 가능하게 하였다. (3차년도 목표대비, 100%)
- 바닐린 생산 미생물의 생산성 여부 ⇨ 상기 신규 생물반응기에서 배양조건을 최적화하고 기질인 페룰산의 공급을 배양 12시간 이후부터 12시간 간격으로 2.2g/L 농도로 공급한 경우에 6.2g/L의 바닐린 생산이 가능했다. 이때의 균체량 (OD600nm)은 5.0으로 균체량을 더 높여서 바닐린 생산배양을 하면 더 높은 바닐린 생산성을 얻는 것도 가능할 것이다. (3차년도 목표대비, 100%)

2. 제 2세부과제: Lignocellulose 원료로부터 바닐린 전구체 생산기술 개발 (목표 대비 100% 달성)

- UV 및 HPLC를 이용한 페룰산 등 페놀성 물질 분석조건 확립
TLC, UV, HPLC를 이용한 분석 조건을 확립 (1차년도 목표 대비, 100%)
- 간벌재 및 농산원료에 함유된 페놀성 화합물군의 정량분석 조건 확립
산처리법에 의한 페놀성 물질 추출법 및 정량법을 확립 (1차년도 목표 대비,

100%)

- 간벌재 등 임산물로부터 바닐린 전구체 고함유 원료 탐색
12종의 주간벌재를 대상으로 산불용성, 산용해성 물질 함량이 높은 재료를 선발한 결과 굴참나무와 소나무가 바닐린 전구체 탐색을 위한 원료로 선발됨 (1차년도 목표대비, 100%)
- 벗짚 등 농산부산물부터 바닐린 전구체 고함유 원료 탐색
9종의 농산부산물을 대상으로 산불용성, 산용해성 물질 함량이 높은 재료를 선발한 결과 토마토 줄기 등 바닐린 전구체 탐색을 위한 원료로 선발됨 (1차년도 목표대비 100%)
- 상기의 결과와 원료수급 등을 검토하여 바닐린 전구체 고함유 생산원료 선발 (1차년도 목표대비 100%)
 - 고구마 줄기 원료로부터 phenyl propanoid 및 ferulic acid 생산조건 확립 (25점)
 - 고구마 줄기 및 전처리 lignocellulose 원료로부터 ferulic acid 생산 효율 비교 (25점)
- 산처리 여과액의 phenyl propanoid 함량분석
전년도 연구결과로 부터 도출된 최적 원료인 고구마 줄기를 시료로 하여 저농도 (0.0125N - 0.1N)의 황산(무기산) 과 초산(유기산)을 각각 투입하여 고온 (120℃)에서 반응시간별 (15-30분)로 처리한 다음 반응 후 생산되는 추출물 함량, phenylpropanoid 함량, phenylpropanoid 분석, ferulic acid 함량 측정을 완료하였음 (목표 대비, 100%).
- Phenyl propanoid 생산 최적 화학반응 조건 구명.
고구마 줄기를 원료로 하여 산 및 알칼리처리를 한 결과를 기초로하여 phenyl propanoid 및 ferulic acid 생산을 위한 최적 반응 조건을 도출하였음 (목표대비 100%).
- 알칼리처리를 통한 phenyl propanoid 생산 조건 확인.
고구마 줄기를 원료로 하여 알칼리로서 수산화나트륨 용액을 적용하여 반응시켰음. 이때 알칼리농도는 0.0125 N - 4N 까지 적용하였으며, 실온반응과 고온반응으로 구분하여 처리하였고, 최적의 반응시간도 도출하였음. 최종적인 반응 생산물로부터 phenyl propanoid 및 ferulic acid 함량을 측정 완료하였음. (목표대비 100%).
- 고온, 고압 수증기를 통한 phenyl propanoid 생산 조건 확인

고온, 고압처리된 lignocellulose 원료로 하여 증류수만을 사용하여 실온과 120℃에서 반응시켰으며, 이때 반응시간에 따른 추출물 함량, phenyl propanoid 함량 및 ferulic acid 함량을 측정하였음. 최종적으로 최적 생산조건을 확립하였음 (목표대비 100%).

- 화학처리법과 복합처리법의 phenyl propanoid 생산효율 비교

고구마 줄기 원료로부터 산 또는 알칼리 첨가반응에 의한 phenyl propanoid 및 ferulic acid 화학처리법 생산효율과 전처리된 lignocellulose로부터 증류수만을 사용하여 생산되는 phenyl propanoid 및 ferulic acid 복합처리생산효율을 상호 비교하였음 (목표 대비 100%).

- Phenyl propanoid 생산방법의 경제성 분석

원료인 고구마 줄기 및 전처리된 lignocellulose로부터 phenyl propanoid 및 ferulic acid를 생산할 때 소요되는 소요경비를 실험실 수준에서 분석하였음 (목표 대비 100%).

제 3 절 관련분야 및 기술발전예의 기여도

1. 기술적 측면

- 바닐린과 같은 유용 이차대사산물 생산을 위한 대사공학연구의 토대를 마련할 수 있다
- 페룰산을 이용한 바닐린의 생산처럼, 전구체를 통한 유용물질의 생산과 같은 생체변환기술의 확립에 기여할 수 있다.
- 용도가 없어서 버려지고 있는 간벌재, 폐잔재 등의 부산물의 이용방안을 제시할 수 있다.
- 바닐린 생산성 향상을 위해서 개발된 고생산 세포주 선발 기술 및 배양공학기술은 다른 유용산물들의 생산공정 개발에도 적용될 수가 있다.
- 바닐린 생산용 신규 생물반응기는 바닐린처럼 목적산물이 생산균주의 생육을 저해하는 발효공정에 유용하게 이용될 수 있다.

2. 경제 · 산업적 측면

- 전량수입에 의존하는 바닐라의 수입 대체효과 및 수출효과
- ※ 2001년 수입량은 10톤(20억원)규모

세계 바닐린 시장규모는 12,000톤(3천억원)규모

○ 농림가 소득향상에 기여

※ 연간수익 계산

- 기질(페룰산)가격 : \$100~150/kg
- 생산비용: \$1,000/kg(바닐린 전환수율 50~60%로 가정, 전체발효생산비용)
- 바이오바닐린가격 : \$2,000/kg
- 예상판매수익 : \$1,000/kg
- 생산규모 : 35kg/ton × 10ton 발효조 × 100회 조업/년간 = 35,000kg/년간
- 조업횟수 : 2회/주 × 50주 = 100회
- 생산성 : 0.5kg/ton/시간 × 70시간/조업
- 연간예상판매수익 : 35,000kg/년간 × \$1,000/kg = \$35,000,000/년간
- 농가소득원 : 페룰산이 75톤/년 필요, 추출위해 농림가의 폐자재 필요

○ 식품산업 및 제약 산업 발전

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

○ 신규 순환형 생물반응기를 이용한 바닐린 생산공정의 특허출원

바닐린은 최종 목적산물인 동시에 생산균주의 균체생육을 저해하는 물질이다. 따라서 바닐린 생산공정에서 생산된 바닐린을 생물반응기로부터 연속적으로 추출하는 개념이 적용된 생물반응기를 설계해서 개발하였다. 상기 신규 바닐린 생물반응기를 이용한 바닐린 생산공정의 특허를 출원한다. 또한 상기 신규 생물반응기를 이용해서 균체생육을 저해하는 특성을 갖는 유용산물의 고생산 공정 개발에 관한 연구에도 응용한다.

○ 신규 바닐린 생산균주 및 우수 재조합 균주들의 특허 출원

바닐린 생산경로인 Co-A dependent deacetylation pathway에서 feruloyl-CoA가 vanillin으로 전환되면서 생성되는 acetyl-CoA가 균체 내에 축적되면서 enoyl-CoA hydratase/aldolase 효소 반응이 저해를 받는 것을 규명하고 acetyl-CoA의 TCA cycle로의 소모를 유도하는 citrate synthase 유전자 (*gltA*)의 도입으로 바닐린의 생산성이 2배정도 증가된 우수 재조합균주를 개발하였다. 아울러 바닐린 독성에 내성을 갖는 돌연변이주도 개발해서 바닐린 생산성을 증가시켰다. 이들 우수 생산균주들을 특허출원하고 상업적인 바닐린 생산공정에 적용한다.

○ 특허권 매각 등을 통한 산업화

기 출원된 “고구마줄기로부터 페루릭산을 추출하는 방법” (2005년 6월 15일, 출원번호 10-2005-0051286)을 바닐린 원료를 수입하는 식품회사 또는 간벌재의 이용을 원하는 회사들을 탐색하고, 본 연구과제에서 개발한 바이오바닐린 생산공정의 산업화 의사를 타진한 후에 적정 회사를 선별해서 기술이전 및 특허권 매각을 통해서 산업화를 완료한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 최근 국내를 비롯한 세계 선진국들에서는 웰빙 (Well Being) 열풍이 불고 있다. 이런 추세는 사람들이 섭취하는 식품에서 더욱 두드러지게 나타나고 있다. 따라서 가격이 다소 비싸더라도 화학적으로 합성된 제품보다는 천연제품을 선호하는 경향이 주류를 이루고 있다.
- 바닐린의 경우에도 화학합성 바닐린은 12달러/kg이고, 천연 바닐린은 4,000달러/kg의 고가임에도 불구하고 항상 공급이 수요를 만족시키지 못하고 있다. 천연 바닐린은 제한된 재배면적과 복잡한 생산과정 때문에 공급량을 증가시키는 데에는 한계가 있기 때문이다. 따라서 미생물의 배양이나 식물세포조직배양을 통해 생산된 바이오바닐린이 천연바닐린의 대체자원으로써 주목받고 있다.
- 대부분의 국가에서도 바이오바닐린을 화학합성 바닐린과는 구별하여 천연바닐린과 유사한 원료물질로 인정하고 있기 때문에 바이오바닐린은 합성바닐린에 만족하지 못하는 시장의 수요 상당부분을 대체할 것으로 전망하고 있다.
- 따라서 우수한 생산균주를 선발하고 대사제어공학기술을 이용해서 바이오바닐린 생산하려는 연구가 계속되고 있으며, 영국 Norwich Research Park에 소재한 Institute of Food Research에서 이와 같은 연구가 진행되고 있다. 또한, corn bran 으로부터 얻어진 폐를산을 바이오바닐린 생산에 이용하는 연구가 미국의 Virginia commonwealth university에서 진행되고 있다.
- 특히, 작년 말에는 미국을 중심으로 한 세계 바닐린 연구학회 (The First International Congress on the Future of the Vanilla Business, 2003년 11월 11-12일)가 개최되어서 바이오바닐린에 대한 뜨거운 관심을 보였다. 이 학회에서는 바닐린 산업 관련자, 바이오바닐린 생산 연구자, 바닐린 효능 연구자들이 모여서 바이오바닐린의 필요성과 중요성에 관한 연구결과들을 발표했다.
- 국내에서는 본 연구팀이 바이오바닐린 생산공정 개발연구를 수행하고 있으며, 농가 부산물인 간벌재 및 벗짚등을 바이오바닐린 생산기질로 이용함으로써 농가소득의 증대와 자원재활용의 효율성을 증가시킬 수 있을 것이다. 아울러, 국내·외에서 불고 있는 웰빙에 대한 욕구를 만족시킬 수 있을 것이다.

제 7 장 참 고 문 헌

1. Muheim A and Lerch K (1999) Towards a high yield bioconversion of ferulic acid to vanillin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 456-461.
2. Priefert, H, J Rabenhorst and A Steinbuchel (2001) Biotechnological production of vanillin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 296-314.
3. Ramachandra Rao S and GA Ravishanker (2000) Vanilla flavor: production by conventional and biotechnological routes. *J. Sci. Food Agric.* 80: 289-304.
4. Ranadive AS (1994) Vanilla-cultivation, curing, chemistry, technology and commercial products. In *Spices, Herbs and Edible Fungi*, ed. by Charalmbus G, Elsevier, Amsterdam. pp517-577.
5. Walton NJ, A. Narbad, CB Faulds and G Williamson (2000) Novel approaches to the biosynthesis of vanillin. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11: 490-496.
6. Walton NJ, Melinda JM, and Arjan N (2003) Molecules of Interest; Vanillin, *Phytochemistry* 63: 505-515.
7. 송정화, 이일석, 방원기 (1994) *Pseudomonas sp.* GD-088에 의한 vanillin으로부터 vanillic acid의 생산. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22: 672-678.
8. S. Ramachandra Rao and G.A. Ravishantar. Vanilla flavour: Production by conventional and biotechnological routes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, 80:289-304
9. H. Priefert, J. Rabenhorst, A. Steinbüchel. Biotechnological production of vanillin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, 56:296-314

10. Wilfred F.M. Röling, Josef Kerler, Martin Braster, Anton Apriyantono, Hein Stam and Henk W. van Verseveld. Microorganisms with a Taste for Vanilla: Microbial Ecology of Traditional Indonesian Vanilla Curing. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 1995-2003
11. Nicholas J. Walton, Arjan Narbad, Craig B. Faulds and Gary Williamson. Novel approaches to the biosynthesis of vanillin. *Current Opinion in Biotechnology*. 2000, 11:490-496
12. 대한민국관세청: <http://www.customs.go.kr>; 품목별 국가별 수입실적
13. Jörg Overhage, Horst Priefert, and Alexander Steinbüchel. Biochemical and Genetic Analyses of Catabolism in *Pseudomonas* sp. Strain HR199. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 4837-4847
14. A. Muheim, K. Lerch. Towards a high-yield bioconversion of ferulic acid to vanillin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, 51:456-461
15. Michael J. Gasson, Yoshie Kitamura, W. Russell McLauchlan, Arjan Narbad, Adrian J. Parr, E. Lindsay, H. Parsons, John Payne, Michael J. C. Rhodes, and Nicholas J. Walton. Metabolism of Ferulic Acid to Vanillin: A bacterial gene the enoyl-SCoA hydratase/isomerase superfamily encodes an enzyme for the hydration and cleavage of a hydroxycinnamic acid SCoA thioester. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273:4163-4170
16. Arjan Narbad and Michael J. Gasson. Metabolism of ferulic acid via vanillin using a novel CoA-dependent pathway in a newly isolated strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology*, 1998, 144:1397-1405
17. Rainer Plaggenborg, Alexander Steinbüchel, Horst Priefert. The coenzyme

A-dependent, non- β -oxidation pathway and not direct deacetylation is the major route for ferulic acid degradation in *Delftia acidovorans*. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 205:9-16

18. Lesage-Meessen, L., Delattre, M., Haon, M., Thibault, J.-F., Colonna- Ceccaldi, B., Brunerie, P. & Asther, M. (1996). A two-step bioconversion process for vanillin production from ferulic acid combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *J. Biotechnol.*, 50:107-113.
19. Rainer Plaggenborg, et. al. (2001). The coenzyme A-dependent, non- β -oxidation pathway and not direct deacetylation is the major route for ferulic acid degradation in *Delftia acidovorans*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 205:9-16.
20. Priefert, H., J. Rabenhorst, and A. Steinbüchel. (2001). Biotechnological production of vanillin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56:296-314.
21. Achterholt, S., H. Priefert, and A. Steinbüchel. (2000). Identification of *Amycolatopsis* sp. strain HR167 genes, involved in the bioconversion of ferulic acid to vanillin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54:799-807.
22. Overhage, J., Steinbüchel, A., Priefert, H. (2003). Highly efficient biotransformation of eugenol to ferulic acid and further conversion to vanillin in recombinant strains of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 69.11:6569-6576.
23. Gasson, M. J., Y. Kitamura, W. R. McLauchlan, A. Narbad, A. J. Parr, E. L. Parsons, J. Payne, M. J. Rhodes, and N. J. Walton. (1998). Metabolism of ferulic acid to vanillin. A bacterial gene of the enoyl-SCoA hydratase/isomerase superfamily encodes an enzyme for the hydration and cleavage of a hydroxycinnamic acid SCoA thioester. *J. Biol. Chem.* 273:4163-4170.

24. Overhage, J., H. Priefert, and A. Steinbüchel. (1999). Biochemical and genetic analyses of ferulic acid catabolism in *Pseudomonas sp.* strain HR199. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4837-4847.
25. Priefert, H., J. Rabenhorst, and A. Steinbüchel. (1997). Molecular characterization of genes of *Pseudomonas sp.* strain HR199 involved in bioconversion of vanillin to protocatechuate. *J. Bacteriol.* 179:2595-2607.
26. Achterholt, S., H. Priefert, and A. Steinbüchel. (1998). Purification and characterization of the coniferyl aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas sp.* strain HR199 and molecular characterization of the gene. *J. Bacteriol.* 180:4387-4391.
27. Muheim, A., and K. Lerch. (1999). Towards a high-yield bioconversion of ferulic acid to vanillin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:456-461.
28. Narbad, A., and M. J. Gasson. (1998). Metabolism of ferulic acid via vanillin using a novel CoA dependent pathway in a newly-isolated strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology* 144:1397-1405.
29. Overhage, J., H. Priefert, J. Rabenhorst, and A. Steinbüchel. (1999). Biotransformation of eugenol to vanillin by a mutant of *Pseudomonas sp.* Strain HR199 constructed by disruption of the vanillin dehydrogenase (*vdh*) gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52:820-828.
30. S Ramachandra Rao, G A Ravishankar. (2000). Vanilla flavour: production by conventional and biotechnological routes. *J. Sci. Food Agric.* 80:289-304.
31. Rosazza, J. P. N., Z. Huang, L. Dostal, T. Volm, and B. Rousseau. (1995). Review. Biocatalytic transformations of ferulic acid: an abundant aromatic

- natural product. *J. Ind. Microbiol.* 15:457-471.
32. Sambrook J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
 33. van de Heuvel, R. H., M. W. Fraaije, C. Laane, and W. J. van Berkel. (2001). Enzymatic synthesis of vanillin. *J. Agric. Food Chem.* 49:2954-2958.
 34. Hagedorn, S., and B. Kaphammer. (1994). Microbial biocatalysis in the generation of flavor and fragrance chemicals. *Annu. Rev. Microbiol.* 48:773-800.
 35. Krings, U., and R. G. Berger. (1998). Biotechnological production of flavours and fragrances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49:1-8.
 36. Bonnin, E., Lesage-Meessen, L., Asther, M. & Thibault, J.-F. (2000). A new process using *Aspergillus niger* and its enzymes for the production of vanillin and related compounds from agroindustrial by-products. *AFINIDAD*, 57.
 37. Walton, N.J., Narbad, A., Faulds, C.B. & Williamson, G. (2000). Novel approaches to the biosynthesis of vanillin. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(5):490-496.
 38. Karmakar B, Vohra RM, Nandanwar H, Sharma P, Gupta KG, Sobti RC. (2000). Rapid degradation of ferulic acid via 4-vinylguaiacol and vanillin by a newly isolated strain of *Bacillus coagulans*. *J Biotechnol.* 80(3):195-202.
 39. Walton, N. J, Mayer, M. J., Narbad, A. (2003), Vanillin, *Phytochemistry*, 63:505-515.

40. Claudio Civolani, Paolo Barghini, Anna Rita Roncetti, Maurizio Ruzzi, and Alma Schiesser. (2000). Bioconversion of Ferulic Acid into Vanillic Acid by Means of a Vanillate-Negative Mutant of *Pseudomonas fluorescens* Strain BF13. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6): 2311-2317.
41. Plaggenborg R, Overhage J, Steinbuchel A, Priefert H. (2003). Functional analyses of genes involved in the metabolism of ferulic acid in *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl Microbiol Biotechnol.* 61:528-535.
42. Fitzgerald DJ, Stratford M, Gasson MJ, Ueckert J, Bos A, Narbad A. (2004). Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. *J Appl Microbiol.* 97(1):104-113.
43. Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P_{BAD} promoter. *J Bacteriol.* 177(14):4121-4130.
44. Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *J Mol Biol.* 166:557-580.
45. Cheetham, P. (1993). The use of biotransformation for the production of flavours and fragrances. *Trends Biotechnol.* 11:478-488.
46. Shimoni E, Ravid U, Shoham Y. (2000). Isolation of a *Bacillus* sp. capable of transforming isoeugenol to vanillin. *J Biotechnol.* 28:78(1):1-9.
47. Roling WF, Kerler J, Braster M, Apriyantono A, Stam H, van Verseveld HW. (2001). Microorganisms with a taste for vanilla: microbial ecology of traditional Indonesian vanilla curing. *Appl Environ Microbiol.* 67(5):1995-2003.
48. Ranadive, A. S. (1994). Vanilla cultivation, curing, chemistry, technology and

commercial products, *Developments in food science*, vol. 34:517-577.

49. Dornenburg, H., and D. Knorr. (1996). Production of phenolic flavor compounds with cultured cells and tissues of vanilla species. *Food Biotechnol.* 10:75-92.
50. Thibault, J. F., M. Asther, B. C. Ceccaldi, D. Couteau, M. Delattre, J. C. Duarte, et al. (1998). Fungal bioconversion of agricultural by-products to vanillin. *Food Sci. Technol. Lebensm. Wiss.* 31:530-536.
51. Kanisawa, T., K. Tohoru, and S. Kawakara. (1994). Flavor development in the beans of *Vanilla planifolia*. Proceedings of the 11th International Symposium.: 268-270.
52. Klimes, I., and D. Lamparsky. (1976). Vanilla volatiles comprehensive analysis. *Int. Flavours food Additives* 7:272-291.
53. Fitzgerald DJ, Stratford M, Narbad A. (2003). Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vanillin. *Int J Food Microbiol.* 86(1-2):113-122.
54. Masai E, Harada K, Peng X, Kitayama H, Katayama Y, Fukuda M. (2002). Cloning and characterization of the ferulic acid catabolic genes of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *Appl Environ Microbiol.* 68(9):4416-4424.
55. Lomascolo A, Stentelaire C, Asther M, Lesage-Meessen L. (1999). Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry. *Trends Biotechnol.* 17(7):282-289.
56. Burri, J., Graf, M., Lambelet, P. and L?liger, J., (1989). Vanillin: more than a flavouring agent-a potent antioxidant. *J. Sci. Food Agric.* 48: 49-56.
57. Muheim, Andreas; Muller, Bruno; Munch, Thomas; Wetli, Markus. (2001).

Microbiological process for producing vanillin. United States Patent. Patent No.: 6,235,507 B1.

58. Jurgen Rabenhorst, Alexander Steinbuchel, Horst Priefert. (2003) Sandra Achterholt. Enzymes and genes used for producing vanillin. United States Patent. Patent Application Publication. Pub. No.: US2003/0092143 A1.

60. 박상진, 이종윤, 조남석, 조병묵, 1993 a, 목재과학실험서, 광일문화사, pp. 479-481.

61. 박상진, 이종윤, 조남석, 조병묵, 1993 b, 목재과학실험서, 광일문화사, p. 478.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.