

Pseudomonas sp. GD-088에 의한 Vanillin으로부터 Vanillic Acid의 생산

송정화 · 이일석 · 방원기*
고려대학교 자연자원대학 농화학과

Production of Vanillic Acid from Vanillin by *Pseudomonas* sp. GD-088

Song, Jung-Hwa, Il-Seok Lee and Won-Gi Bang*

Department of Agricultural Chemistry, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Abstract — For production of vanillic acid from vanillin, optimum culture conditions for *Pseudomonas* sp. GD-088, having vanillin-oxidizing activity were investigated. The highest vanillin-oxidizing activity was obtained when this strain was cultured at 30°C for 24 hr in a medium consisting of 3.0 g/l xylose and 0.46 g/l NH₄Cl (pH 7.0). When 18 g/l of whole *Pseudomonas* sp. GD-088 cells as the enzyme source was used in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) containing 3.0 g/l of vanillin, 2.463 g/l of vanillic acid was produced for 40 minutes. This amount of vanillic acid corresponds to a 90% yield, based on vanillin.

Vanillic acid(4-hydroxy-3-benzoic acid)는 주로 lignin 분해시 생성되는 중간산물로 무색, 무취의 침상 결정체이며, 플라스틱의 자외선 흡수제, 식품 보존제 및 의약품으로 사용되는 ethyl vanillate 유도체와 호흡 및 혈압 조절을 위한 강장제로 널리 사용되고 있는 vanillic acid diethylamide를 생산하는데 있어 전구 물질로 사용되고(1), polyester 합성시의 단량체로 사용되기도 한다. 또한, vanillic acid의 유도체인 5-nitrovanillic acid 와 5-aminovanillic acid는 항생 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다(2).

현재, vanillic acid의 생산은 nitrobenzene이 첨가된 NaOH 수용액에서 lignin을 처리하는 방법, lignin을 Cu, Ag, Hg, Co 등의 metal oxide로 염기상에서 산화처리하는 방법 및 중성용액 혹은 수용성 sodium carbonate 용액에서 potassium permanganate와 alkaline hydrogen peroxide로 lignin을 처리하는 방법과 같이 lignin을 화학적으로 분해하는 방법과 vanillin을 염기상에서 AgCl₂로 직접 산화하는 방법에 의해 이루어지고 있다(3). 그러나 lignin 분해공정의 경우 생산 공정이 복잡할 뿐 아니라 많은 부산물의 생성

으로 인해 전체 aromatic acid 생산율은 10~30% 밖에 되지 않기 때문에 비경제적인 것으로 알려져 있다(3).

한편, 미생물에 의한 vanillic acid 생산에 대한 연구는 vanillin을 산화할 수 있는 미생물을 토양에서 분리(4)한 이래 vanillin을 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용할 수 있는 *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium* 및 *Serratia* 속 등의 여러 미생물에서 활발히 진행되어 왔다(2, 5, 6).

Vanillin 산화에 관여하는 효소계의 특성은 정확히 밝혀지지 않았지만 여러가지의 기질을 사용하는 것으로 알려져 있다(7). 또한, 이 효소계는 다양한 aldehyde 화합물의 산화에 이용될 수 있으며(2), polymeric lignin의 분해에는 직접 관여하지 않으나 분해중 lignin으로부터 방출된 aromatic aldehyde의 대사는 관여하는 것으로 보고되었다(1).

본 실험에서는 vanillin을 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용할 수 있는 미생물인 *Pseudomonas* sp. GD-088 균주를 이용하여 vanillin 산화능이 높은 미생물을 얻기 위한 배양 조건을 조사하였다. 그 다음 vanillin 산화능이 최대일 때의 균체를 수확하여 휴지세포에 의한 vanillin으로부터 vanillic acid의 생산을 위한 최적조건을 검토하였다.

Key words: Vanillin, vanillic acid, *Pseudomonas* sp.
*Corresponding author

재료 및 방법

사용균주

본 실험실에서 토양으로부터 분리한 vanillin을 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용할 수 있는 *Pseudomonas* sp. GD-008을 사용하였다(8).

배지

본 배양배지(생산배지)로는 vanillin 0.1 g/l, glucose 1.0 g/l, K₂HPO₄ 1.5 g/l, KH₂PO₄ 1.0 g/l, yeast extract 0.05 g/l, trace element 10 ml/l(CaCl₂ 1.10 g/l, ZnSO₄ 0.40 g/l, FeCl₃·6H₂O 5.40 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.36 g/l, CuSO₄·5H₂O 0.25 g/l, CoCl₂·6H₂O 0.24 g/l, H₃BO₃ 0.06 g/l, HCl 13.0 ml/l)를 함유하는 배지를 사용하였다. 또한 균주의 보관에는 본배양 배지에 2%의 한천이 포함된 평판 및 사면 배지를 사용하였다. 사용한 모든 배지는 121°C에서 15분간 멸균하여 사용하였다.

Vanillin과 vanillic acid의 분석

Vanillin과 vanillic acid의 정성 분석은 gas chromatography(9)를 사용하였으며, vanillin 및 vanillic acid의 정량 분석은 spectrophotometer(9)를 사용하였다. 분석용 시료는 반응액 1 ml을 취하여 원심분리한 후, 상등액을 100배 희석하여 ultraviolet range에서 vanillin(314 nm)과 vanillic acid(251 nm)의 흡광도를 측정하여 정량하였다.

Specific activity

Vanillin 산화능의 specific activity는 단위 균체당 10분간에 생성되는 vanillic acid의 양(μM)으로 나타내었다.

결과 및 고찰

증식 세포의 vanillin 산화능에 미치는 영향

Pseudomonas sp.의 생육과 vanillin 산화능에 미치는 배지 중의 탄소원의 영향 : *Streptomyces* sp.에 의한 vanillin의 산화에서 0.1% 이상의 glucose는 vanillin 산화능을 저해하는 것으로 알려져 있다(7). 따라서, *Pseudomonas* sp. GD-088의 생육과 vanillin 산화능의 활성에 미치는 각종 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 본배양배지의 탄소원을 변화하여 실험을 수행하였다.

Fig. 1에서 볼 수 있는 바와 같이, 탄소원으로 xylose와 glycerol을 이용한 경우는 glucose와 sucrose에 비해 균체의 생육이 비교적 좋았으며, vanillin의 산화능(specific activity)은 glycerol과 xylose가 거의 같은 값을 나타냈으나 xylose가 glycerol에 비해 균체의 생육이 좋았으므로 탄소원으로 xylose를 사용하였다. 이는 Perestero 등(6)의 결과(0.1% glucose)와는 상이함을 나타내었다.

Xylose의 농도변화에 따른 균체의 생육과 vanillin 산화능에 미치는 영향은 Fig. 2에서 볼 수 있는 바와

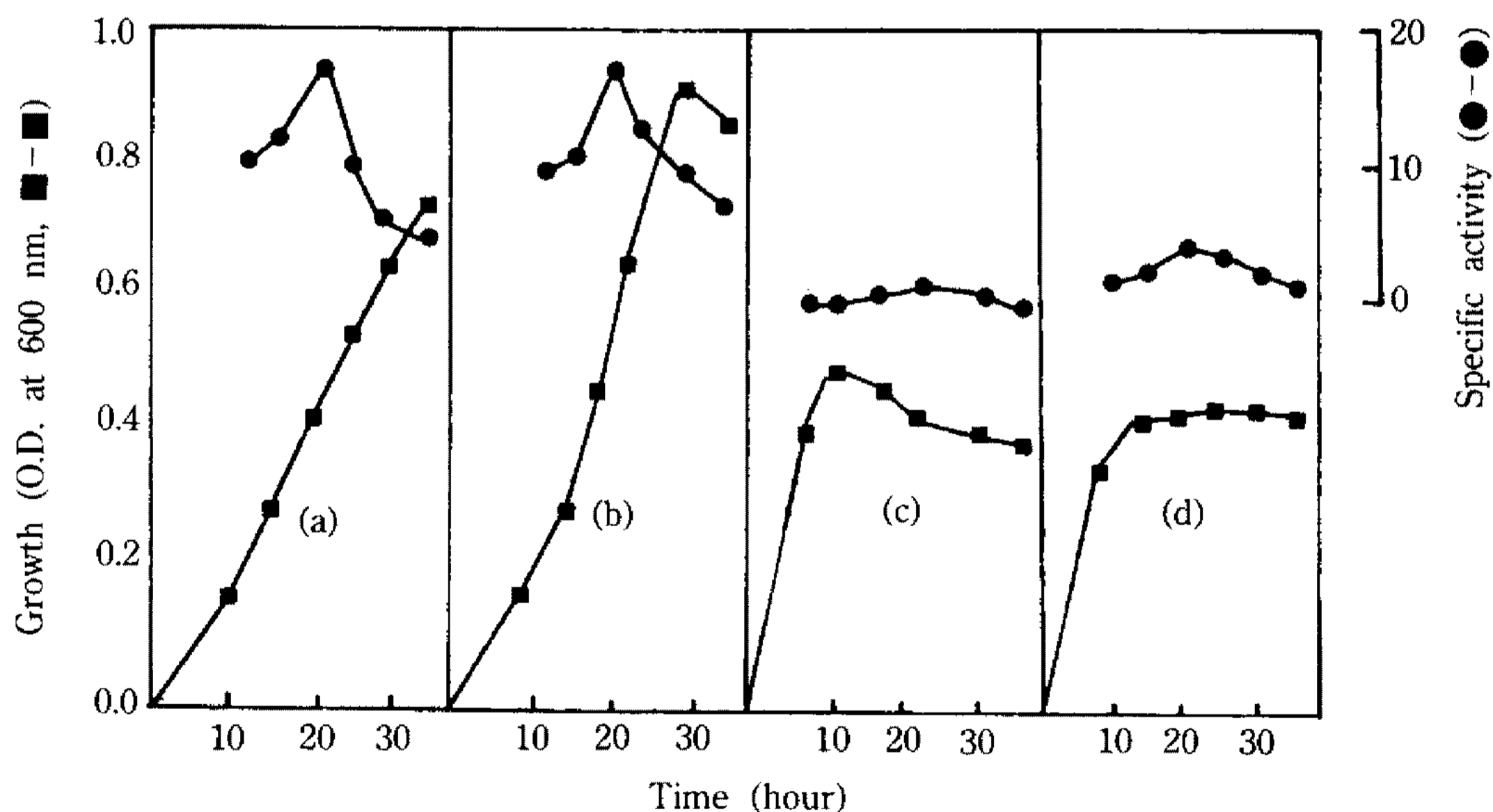


Fig. 1. Effect of carbon sources on the vanillin-oxidizing activity of *Pseudomonas* sp. GD-088.

C/N ratio was 10 and cultivation was carried out at 30°C in culture medium containing (a) 0.1% of glycerol, (b) 0.1% of xylose, (c) 0.1% of glucose, (d) 0.1% of sucrose as a sole carbon source

Specific activity: (μM/10 min./mg cell)

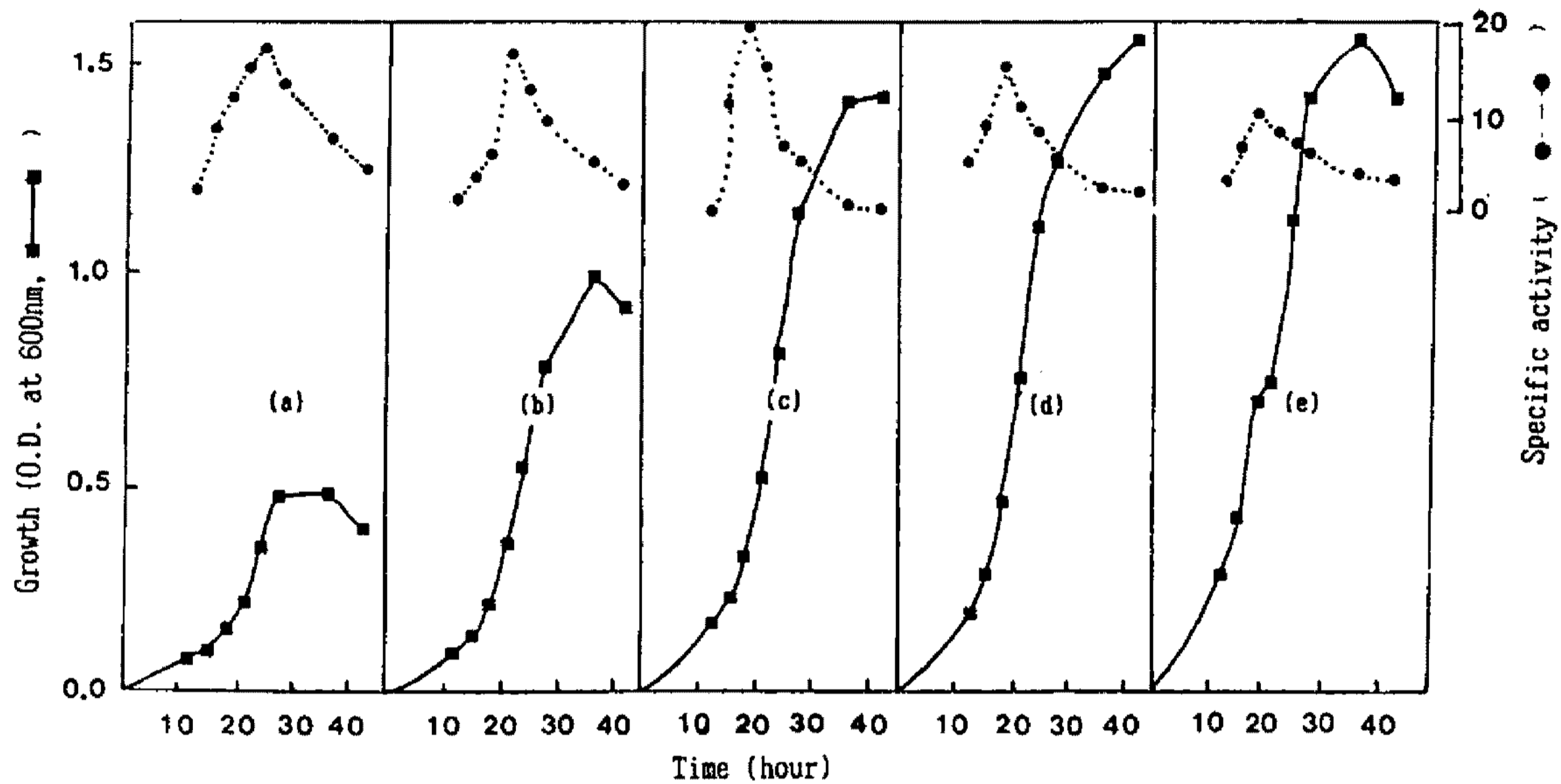


Fig. 2. Effect of xylose concentration in the culture medium on the vanillin-oxidizing activity of *Pseudomonas* sp. GD-088.

Cultivation was carried out at 30°C in culture medium containing (a) 0.5 g/l, (b) 1.0 g/l, (c) 3.0 g/l, (d) 5.0 g/l, (e) 10 g/l of xylose, respectively.

Specific activity: ($\mu\text{M}/10 \text{ min./mg cell}$)

Table 1. Effect of nitrogen source on the vanillin-oxidizing activity of *Pseudomonas* sp. GD-088

Nitrogen sources	Growth (O.D. 600 nm)	Wet weight (g/l)	Specific activity ($\mu\text{M}/10 \text{ min./mg cell}$)
NH_4Cl	0.904	1.260	22.22
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.023	1.400	20.20
NH_4NO_3	0.887	1.240	16.61
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0.856	1.202	16.77

C/N ratio was 30 and cultivation was carried out at 30°C.

같이, xylose의 농도가 증가할수록 균체의 생육속도는 증가하였으나 vanillin의 산화능은 xylose의 농도가 3 g/l 사용되었을 때에 가장 좋았다. 따라서 이후의 실험에서는 배양매지에 3 g/l의 xylose를 사용하였다.

증식 세포의 vanillin 산화능에 미치는 배지 질소원의 영향: Vanillin의 산화에 있어서, 질소원의 종류 및 농도는 큰 영향을 주는 것으로 알려져 있다(9).

따라서, 증식 세포의 vanillin 산화능에 미치는 배지 질소원의 영향을 조사하기 위하여 3 g/l의 xylose를 지닌 본 배양매지에 Table 1과 같이 탄소/질소(C/N) 비를 30으로 고정하여 각종 질소원의 영향을 살펴 보았다.

NH_4NO_3 와 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 는 비슷한 생육속도와 vanil-

lin 산화능을 보였으며 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 경우 생육속도는 가장 우수하였으나 vanillin 산화능은 NH_4Cl 을 사용하였을 때 가장 좋았다. 따라서 이후의 실험에서는 생육속도가 비교적 양호하며 vanillin 산화능이 가장 우수한 것으로 나타난 NH_4Cl 을 질소원으로 사용하였다.

증식 세포의 vanillin 산화능에 미치는 탄소/질소비(C/N ratio)의 영향: 미생물에 의해 lignin과 관련된 물질을 분해할 경우, 질소 결핍이 중요한 요소인 것으로 알려져 있다(9). 따라서 lignin 분해의 중간 산물인 vanillin의 산화능에 미치는 질소원 농도의 효과를 검토하기 위하여 Fig. 3과 같이 탄소/질소비를 변화하여 실험을 수행하였다.

탄소/질소비가 10인 경우 vanillin 산화능이 가장 좋았으며 균체의 생육속도는 27시간까지는 대수적으로 증가하다가 27시간 이후에서는 감소하는 경향을 보였다. 따라서 이후의 실험에서는 탄소/질소비를 10으로 고정하여 사용하였다.

증식 세포의 vanillin 산화능에 미치는 배지 pH의 영향: 증식 세포의 vanillin 산화능에 미치는 배지 pH의 영향을 살펴보기 위하여 배지 pH를 6.0~8.0까지 변화시켜 실험을 수행하였다.

Fig. 4에서 나타나는 바와 같이, 초기 pH의 변화는 균체의 생육 및 vanillin 산화능에 큰 영향을 주어 pH 6.5 이하에서는 균체의 생육 및 vanillin 산화능이

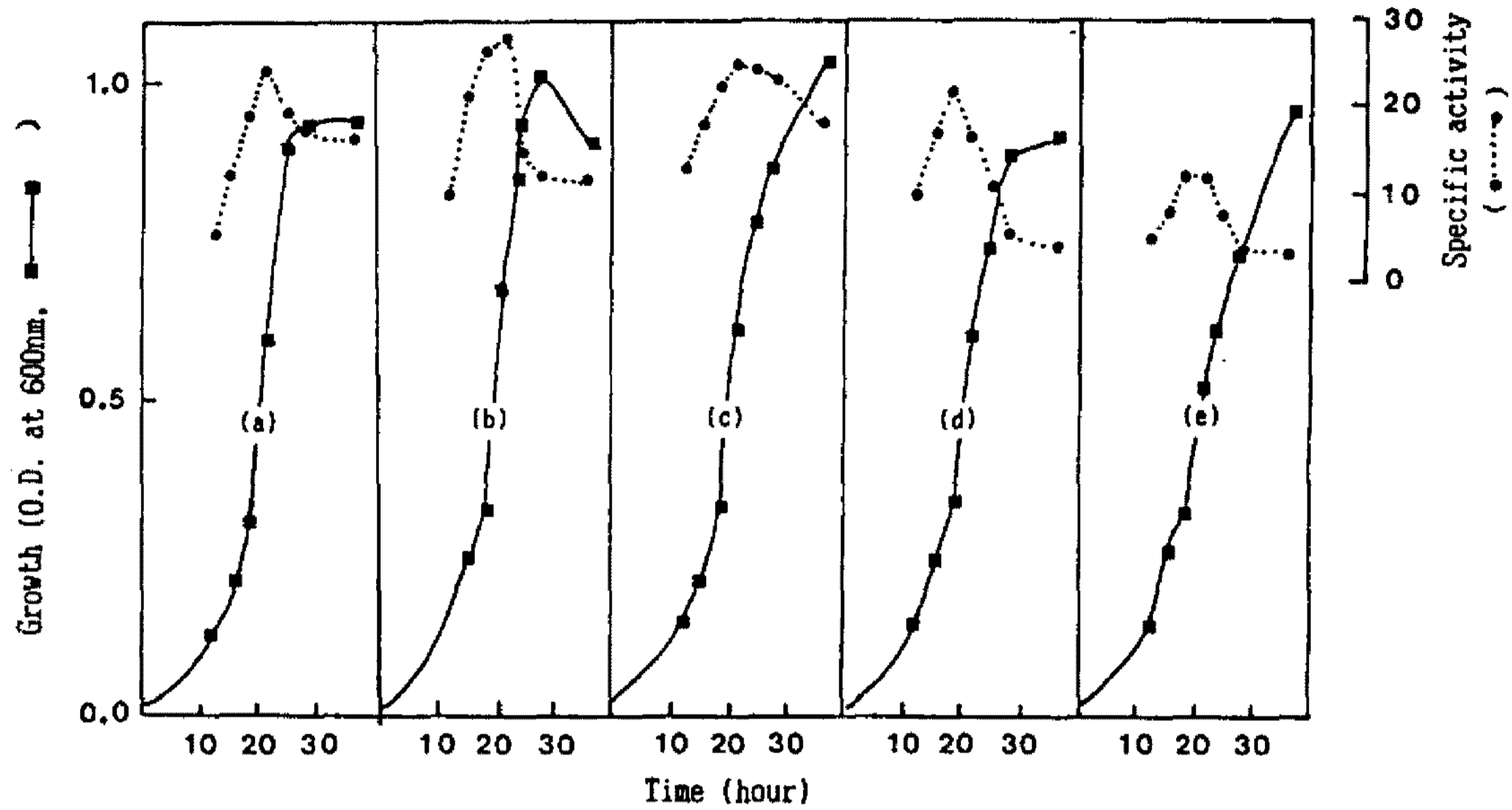


Fig. 3. Effect of C/N ratio on the vanillin-oxidizing activity of *Pseudomonas* sp. GD-088. Cultivation was carried out at 30°C in culture medium. The C/N ratio was (a) 5, (b) 10, (c) 20, (d) 30 and (e) 50, respectively. Specific activity: (μM/10 min./mg cell)

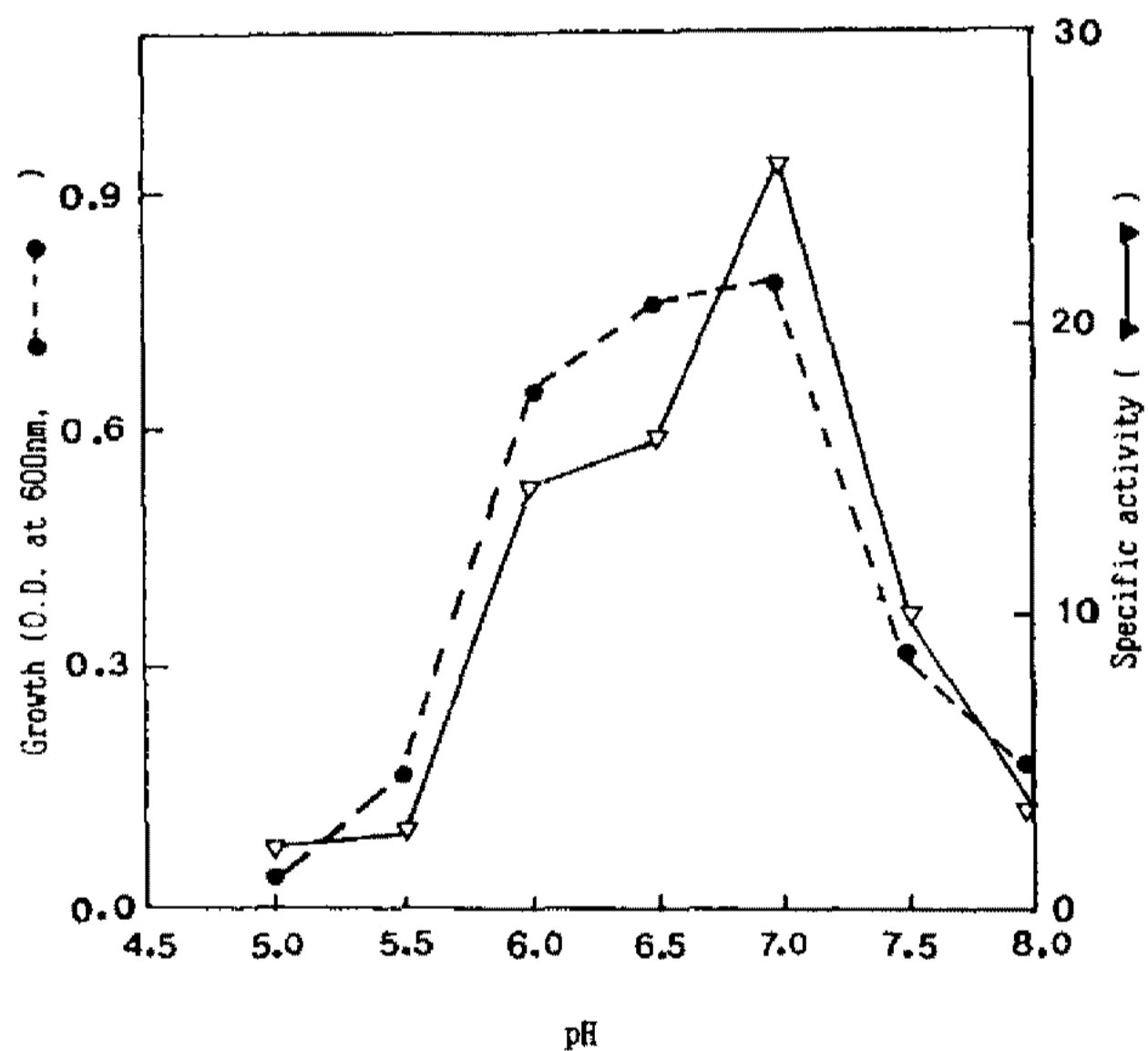


Fig. 4. Effect of medium pH on the vanillin-oxidizing activity of *Pseudomonas* sp. GD-088. Cultivation was carried out for 21 hours at 30°C in culture medium. Specific activity: (μM/10 min./mg cell)

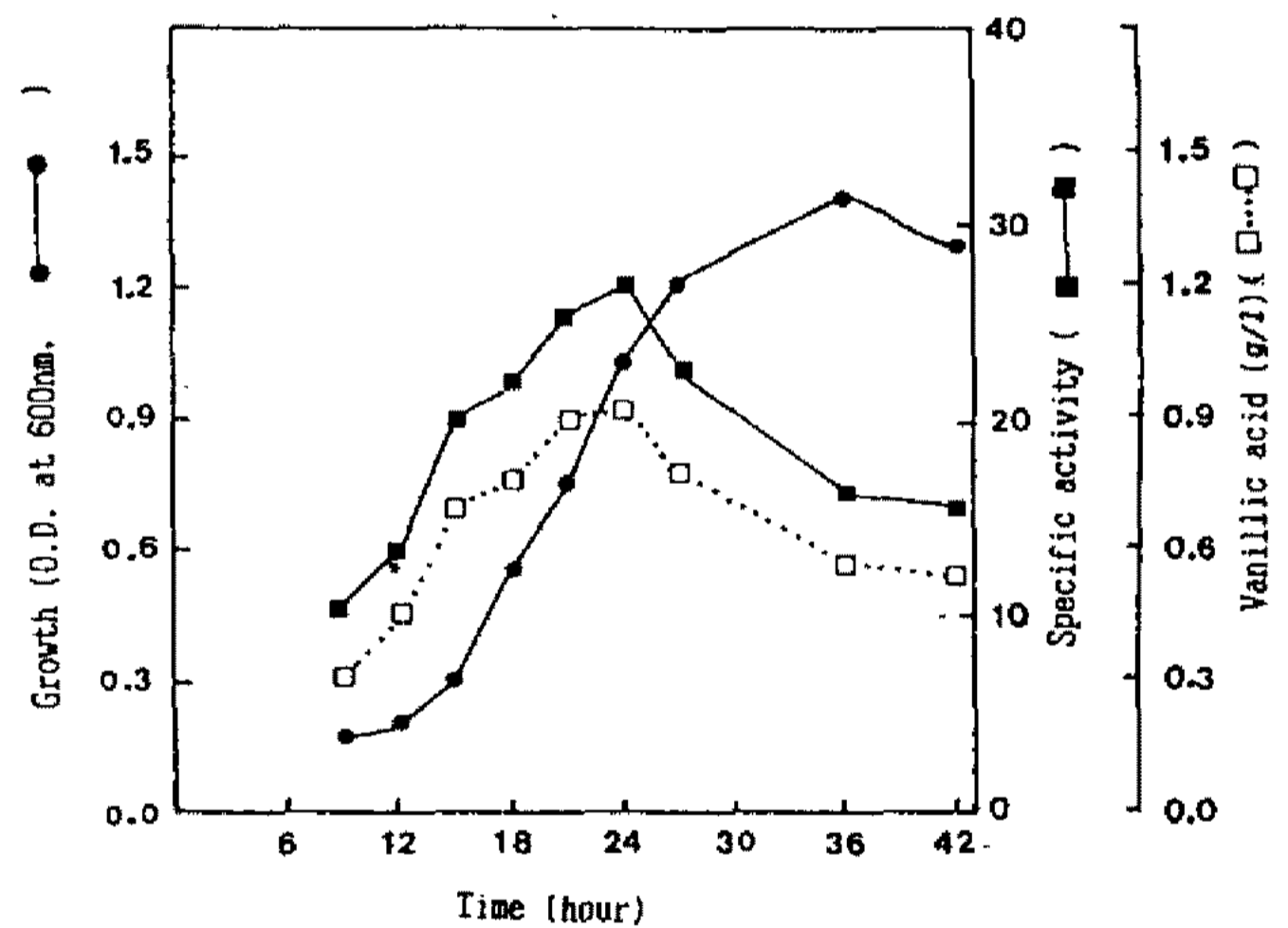


Fig. 5. Time course of the vanillin-oxidizing activity of *Pseudomonas* sp. GD-088. Cultivation was carried out at 30°C in culture medium. Specific activity: (μM/10 min./mg cell)

저조함에 비해, pH 7.0에서는 생육 및 산화능이 가장 좋은 것으로 나타났다.

증식 세포의 vanillin 산화능의 경시적 변화 : Vanillin 산화능이 최대인 균체를 수확하기 위하여 상기의 최적조건 하에서 시간의 경과에 따른 균체량과 vanillin 산화능과의 관계를 조사하였다. Fig. 5는 본 실험의 결과를 나타낸 것이며, 그림에서 볼 수 있는 바와 같이

배양시간이 24시간 되었을 때 균체의 vanillin 산화능이 최대가 되었으며 시간의 경과에 따라 vanillin 산화능은 저하되는 것을 알 수 있었다. 따라서 상기 최적 조건 하에서 수확된 균체를 vanillin으로부터 vanillic acid의 생산을 위한 효소원으로 사용하였다.

휴지세포를 이용한 vanillin에서 vanillic acid의 생산

Vanillic acid의 생산에 미치는 생균체량의 영향 : *Streptomyces* 균주의 경우 0.15%의 vanillin 함유배지

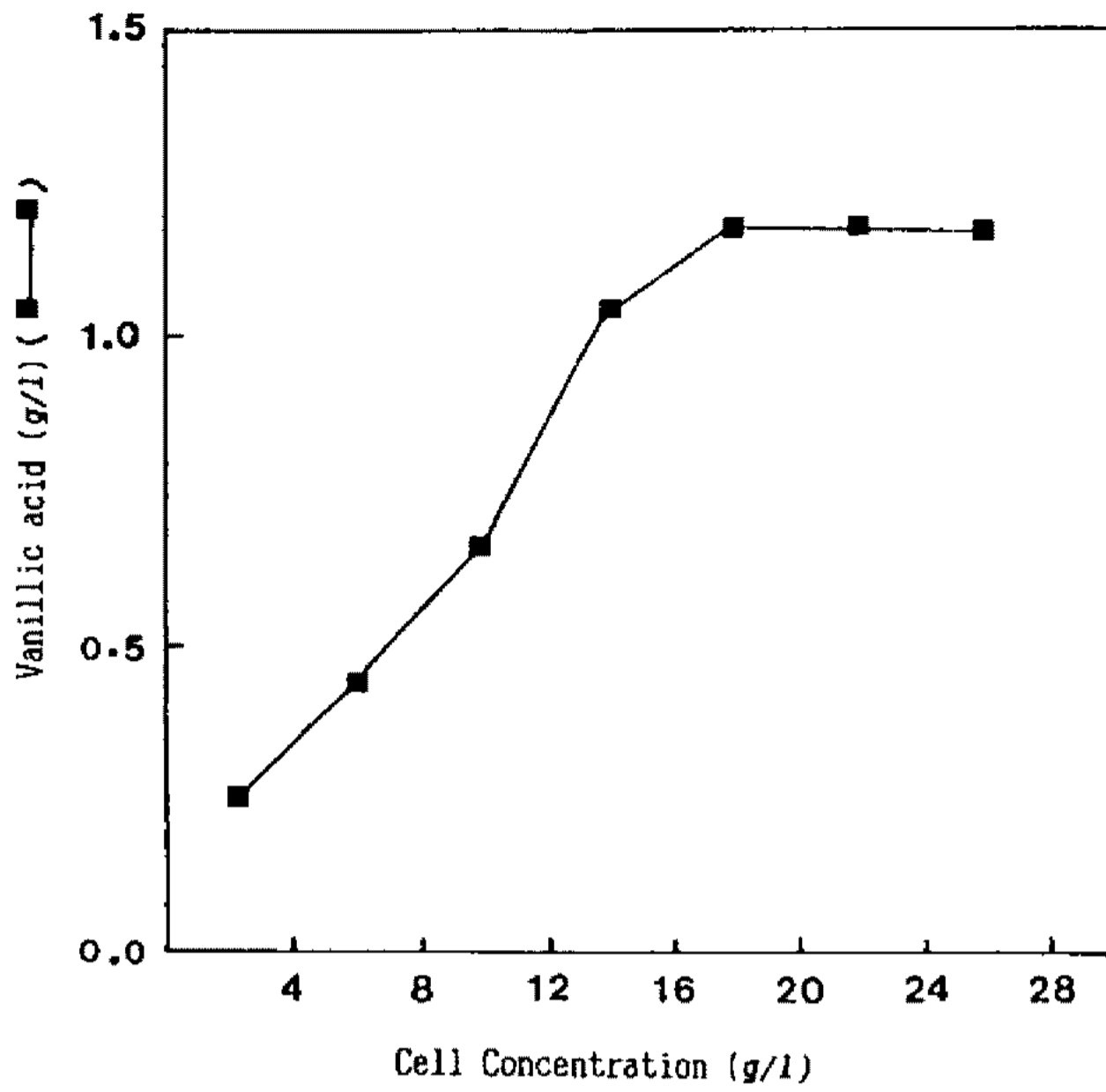


Fig. 6. Effect of cell concentration on vanillic acid production with resting cells.

Reaction was carried out for 30 min. at 30°C in reaction mixture containing 0.3% of vanillin and 100 mM phosphate buffer (pH 7.0).

에서 생균체량의 증가는 vanillin 산화속도를 증가시키며 이는 2.5%(wet wt./vol.)까지 지속되는 것으로 알려져 있다(2).

효소원으로 사용되는 생균체량이 변화함에 따라 기질인 vanillin으로부터 vanillic acid의 생성량이 영향을 받을 것으로 생각되어 생균체량과 vanillic acid의 생성량과의 관계를 검토하였다. Fig. 6에서 볼 수 있듯이 생균체량이 증가함에 따라 vanillic acid의 양도 증가함을 알 수 있었다. 생균체량이 18 g/l에 이를 때까지는 vanillic acid의 양도 거의 직선적인 비례관계를 나타내었으나 생균체량이 20 g/l 이상이 될 때에는 거의 vanillic acid 생성량이 더 이상 변화가 없음을 알 수 있었다. 이 때의 vanillic acid 생성량은 1.173 g/l이었다.

Vanillic acid의 생산에 미치는 vanillin 농도의 영향: 휴지 세포에 의한 vanillic acid의 생산시 vanillin 농도가 vanillic acid의 생성에 미치는 영향을 검토하였다. Fig. 7에서와 같이 vanillin의 농도가 3 g/l이었을 때 vanillic acid의 생성량은 최대치인 1.188 g/l이었으며 다음 실험에 계속적으로 3 g/l의 vanillin을 사용하였다.

Vanillic acid의 생산에 미치는 buffer 및 농도의 영향: 휴지 세포에 의한 vanillic acid의 생산시 buffer 및 농도가 vanillic acid의 생성에 미치는 영향을 검토하였다. Fig. 8에서와 같이 사용한 buffer는 Na-K

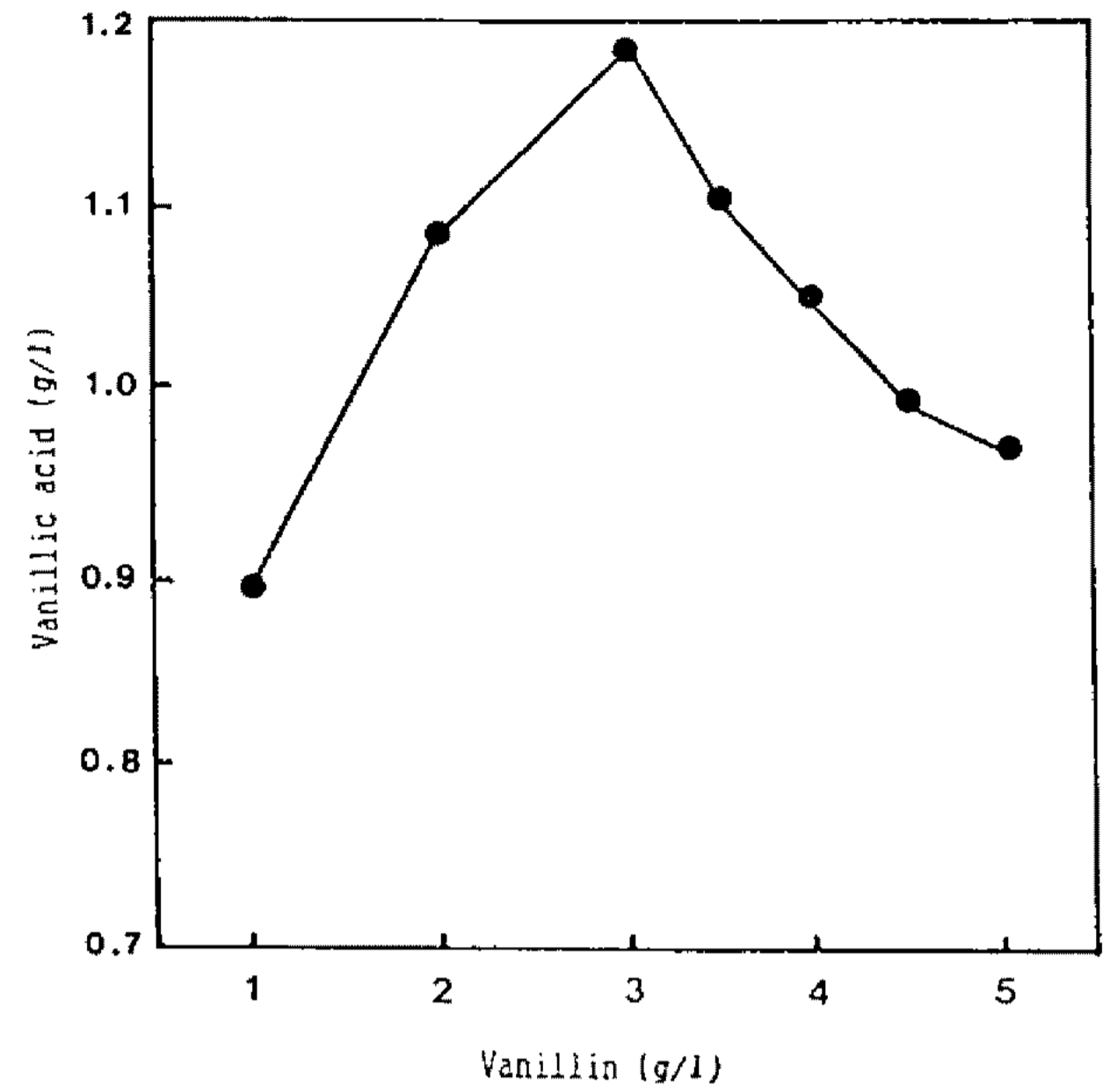


Fig. 7. Effect of vanillin concentration on vanillic acid production with resting cells.

Reaction was carried out for 30 min. at 30°C in reaction mixture containing 18 g/l of cell concentration and 100 mM phosphate buffer (pH 7.0).

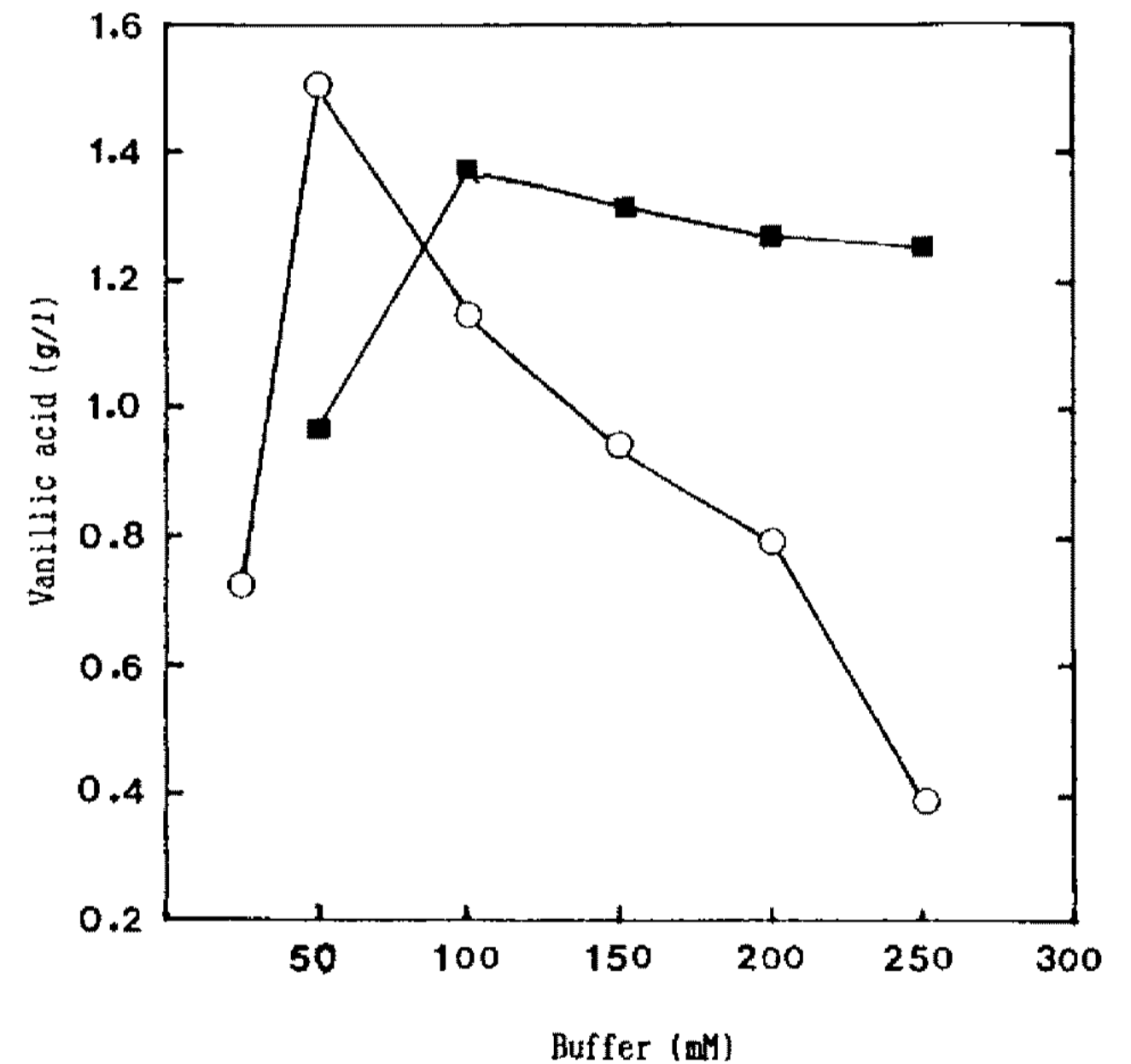


Fig. 8. Effect of buffer sources and concentration on vanillic acid production with resting cells.

Reaction was carried out for 30 min. at 30°C in reaction mixture (pH 7.0) containing 18 g/l of cell concentration and 0.3% of vanillin.

Symbols: Na-K buffer (○-○), Tris-HCl buffer (■-■)

buffer와 Tris-HCl buffer이었으며, Na-K buffer에 있어서 50 mM일 때 vanillic acid의 생성량이 1.56 g/l로 최대가 되어 다음 실험에 계속적으로 50 mM의

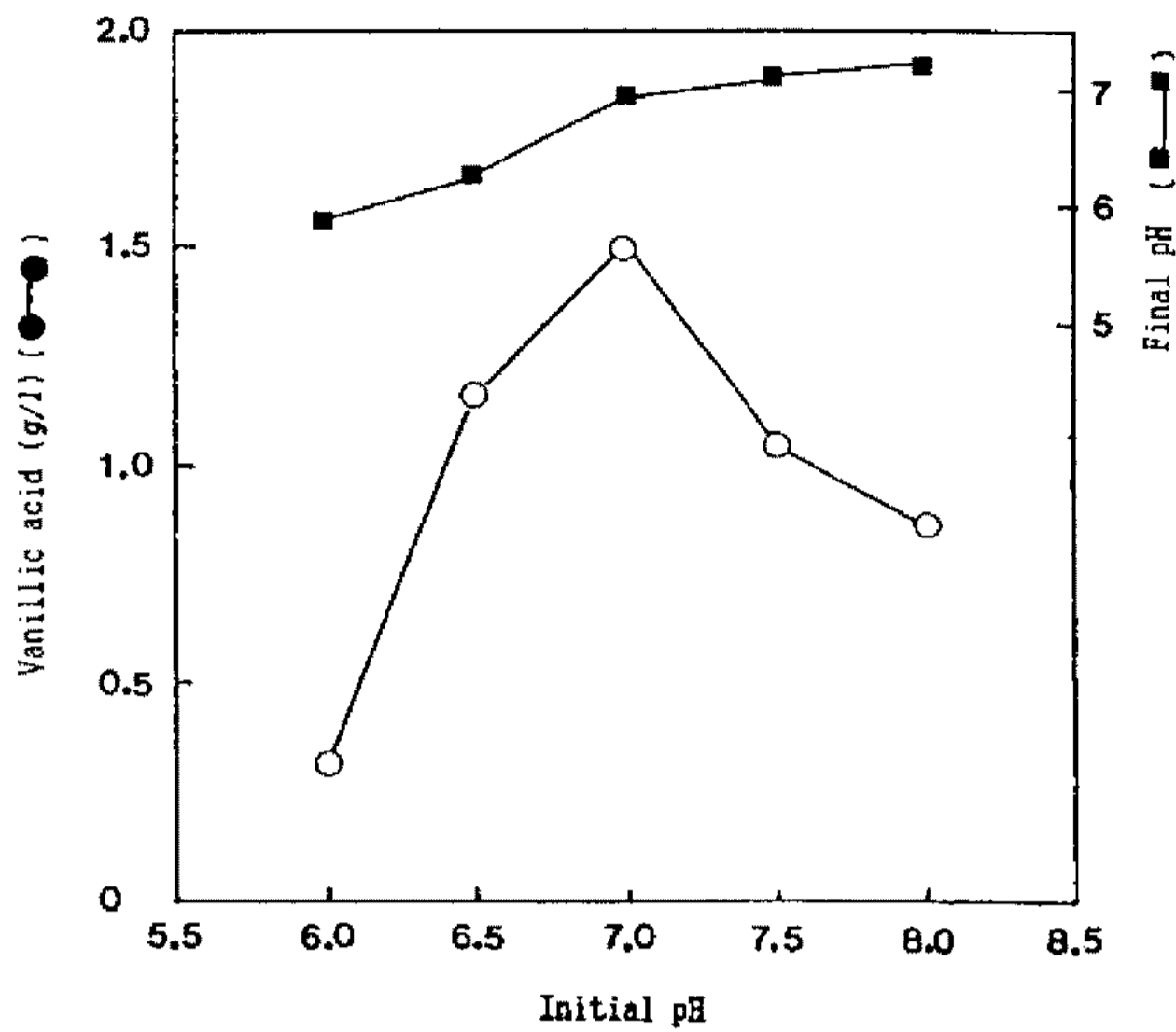


Fig. 9. Effect of pH on vanillic acid production with resting cells.

Reaction was carried out for 30 min. at 30°C in reaction mixture containing 18 g/l of cell concentration, 0.3% of vanillin and 50mM phosphate buffer.

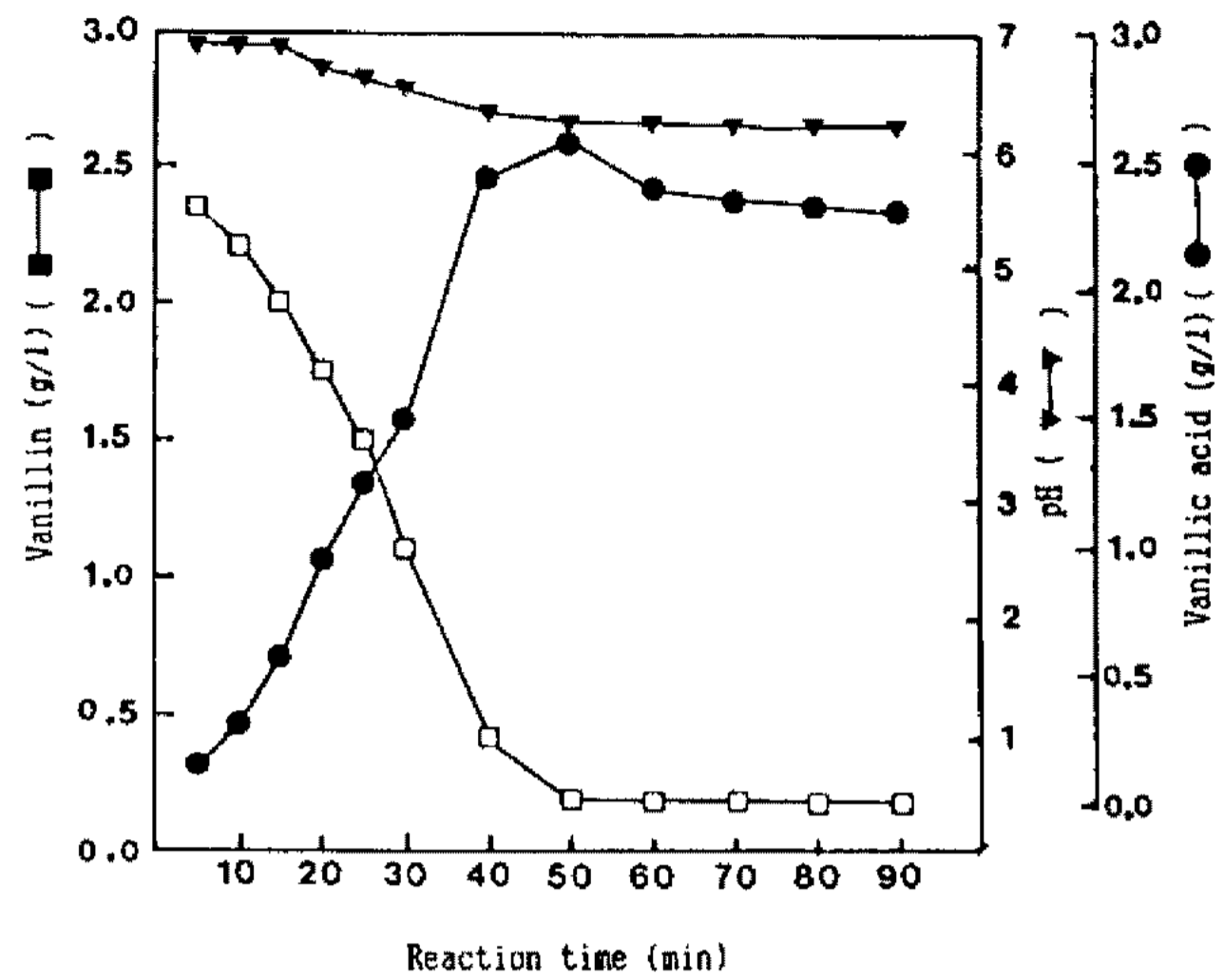


Fig. 11. Time course of vanillic acid production with resting cells.

Reaction was carried out for 30 min. in reaction mixture containing 18 g/l of cell concentration, 0.3% of vanillin and 50 mM phosphate buffer (pH 7.0).

이때 반응 전후의 pH 값의 변화는 거의 없는 것으로 나타났다.

Vanillic acid의 생산에 미치는 온도의 영향: 휴지 세포에 의한 vanillic acid의 생산에 있어서 온도가 미치는 영향을 조사하기 위해 반응액의 반응온도를 25°C 에서 44°C 까지 변화시키면서 vanillic acid의 생산량을 비교, 검토한 결과 Fig. 10에서와 같이 vanillic acid의 생성량은 30°C 에서 가장 좋게 나타났다.

시간 경과에 따른 vanillic acid의 생산: 이상의 결과들로부터 얻어진 최적 조건하에서 *Pseudomonas* sp. GD-088의 휴지 세포에 의한 vanillin으로부터 vanillic acid 생성의 경시적 변화를 Fig. 11에 나타내었다. 반응 후 40분에 이를 때까지는 vanillic acid의 생성량이 계속적으로 증가하지만, 40분 이후로는 일정한 경향을 나타내고 있다. 이때의 최대 vanillic acid의 생성량은 2.463 g/l이었으며, 사용한 vanillin에 대해 90%의 수율을 나타내는 것이었다.

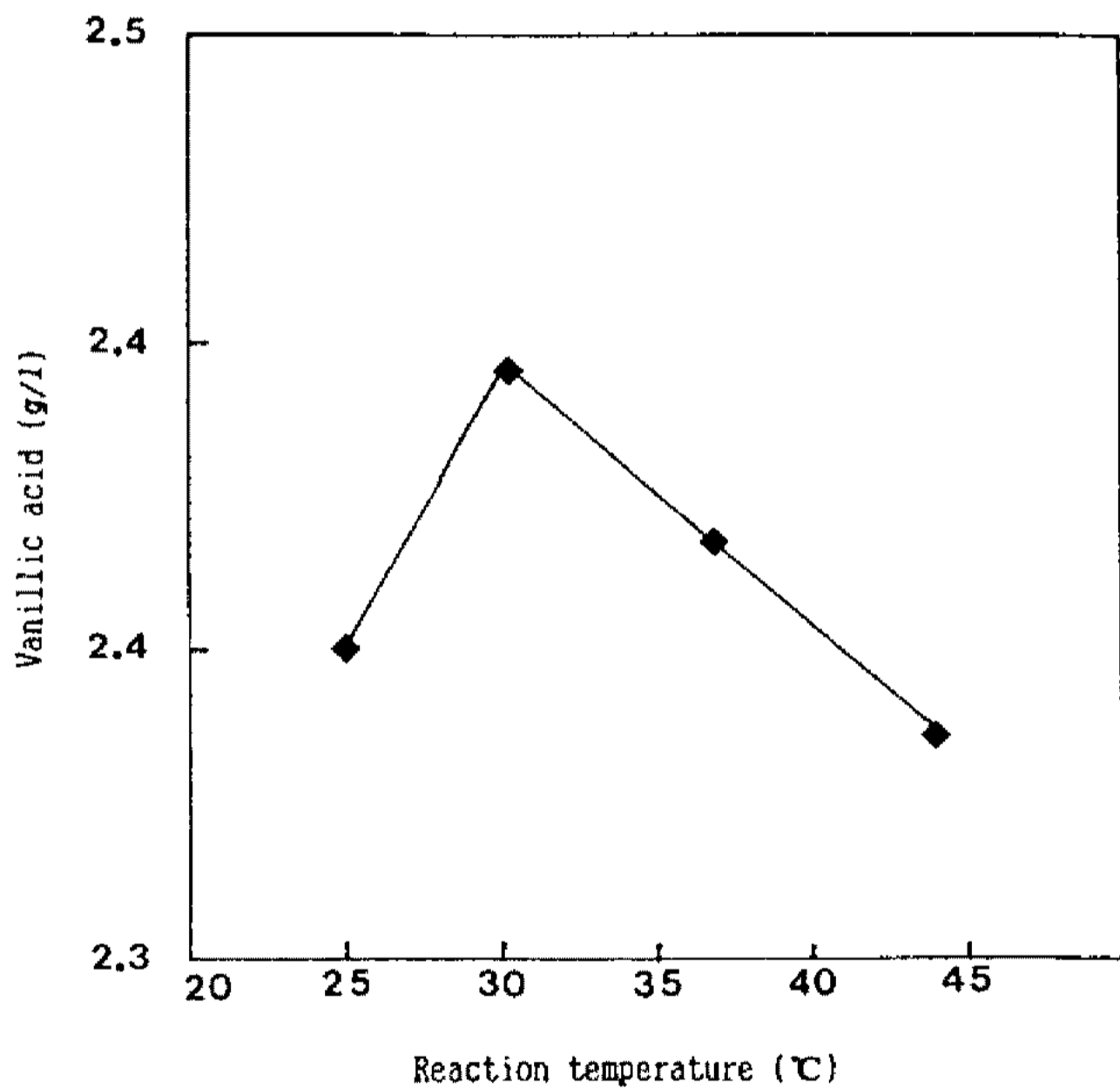


Fig. 10. Effect of temperature on vanillic acid production with resting cells.

Reaction was carried out for 30 min. in reaction mixture containing 18 g/l of cell concentration, 0.3% of vanillin and 50 mM phosphate buffer (pH 7.0).

Na-K buffer를 사용하였다.

Vanillic acid의 생산에 미치는 buffer pH의 영향: 휴지 세포에 의한 vanillic acid의 생산에 미치는 buffer pH의 영향을 조사하기 위해 반응 혼합액 내의 pH 값을 6.0에서 8.0까지 변화시키면서 vanillic acid의 생성량을 비교, 검토한 결과 Fig. 9에서와 같이 pH 7.0의 경우에서 vanillic acid가 가장 많이 생산되었으며,

요 약

미생물에 의하여 vanillin으로부터 vanillic acid를 생산하기 위하여, vanillin 산화능이 있는 *Pseudomonas* sp. GD-088 균주의 최적 배양학적 조건을 검토하였다. 이 균주의 vanillin 산화능은 배지중 3 g/l의 xylose, 0.46 g/l의 NH₄Cl(pH 7.0)을 사용하여 30°C 에서 24시간 배양할 때 가장 높았다. 효소원으로 *Pseudomonas* sp. GD-088 생균체 18 g/l를 3.0 g/l의 vanillin이 함유된 phosphate buffer(pH 7.0)에서 반응시켰

을 때, 40분 반응 후에 2.463 g/l의 vanillic acid가 생산되었다. 이때의 vanillin 전환율은 90%이었다.

참고문헌

1. Dietrich, F. and W. Gerd. 1984. Utilization of technical lignins, Pp. 551-552. *In Wood-Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Walter de Gruyter, Berlin-New York.
2. Anthony, III L.P. and D.L. Crawford. 1983. Whole-cell bioconversion of vanillin to vanillic acid by *Streptomyces viridosporus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 1582-1585.
3. Dietrich, F. and W. Gerd. 1984. Reactions of lignin, Pp. 311-313. *In Wood-Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Walter de Gruyter, Berlin-New York.
4. Lobbins, W.J. and E.C. Lathrop. 1919. The oxidation of vanillin to vanillic acid by certain soil bacteria. *Soil. Sci.* **7**: 475-485.
5. Anne, T. and J.M. Wood. 1970. The degradation of trans-ferulic acid by *Pseudomonas acidovorans*. *Biochemistry* **9**: 337-343.
6. Perestero, F., M.A. Falcon, and G. De la Fuente. 1989. Production of vanillic acid from vanillin by resting cells of *Serratia marcescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1660-1662.
7. Crawford, D.L., J.B. Sutherland, A.L. Pometto III, and J.M. Miller. 1982. Production of an aromatic aldehyde oxidase by *Streptomyces viridosporus*. *Arch. Microbiol.* **131**: 351-355.
8. 송정화. 1991. *Pseudomonas* sp.에 의한 vanillin으로부터 vanillic acid의 생산. 고려대학교 석사학위논문.
9. Paul, A., H. Annele, and E.E. Karl. 1980. Vanillic acid metabolism by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Arch. Microbiol.* **125**: 189-202.

(Received October 19, 1994)