

농산 폐기물을 이용한 xylose, arabinose, cellulose 생산공정

신현승*, 유연우**

*(주) 보락, **아주대학교

요 약

농산 폐자원으로부터 식품 및 의약품 소재로 쓰이는 xylose, arabinose, cellulose를 생산하였다. 농산 폐자원은 우리나라 실정에 적합한 벚짚과 옥수수 껍질을 선택하였으며, 공정수율은 xylose와 arabinose는 약 15~20%(w/w), cellulose는 20%(w/w)로 나타났다. 폐자원을 활용하는 개발된 공정중에는 미생물 유전자 재조합 기술을 응용하여 고역가의 효소생산 system을 개발하여, 생산된 효소를 가수분해 공정 과정에 투입하여 경제성이 높고 친환경적인 기술로 확립하였다. 재조합 미생물과 xylose, arabinose 정제공정은 신뢰 높은 재연성을 나타냈으며 xylose 제조법과 xylitol 발효법은 package 형태로 기술 이전을 준비하고 있다.

1. 서론

전 세계적으로 생산되는 농산 폐기물은 매년 20~30억 톤 이상 생산되고 있으며 아시아에서 생산되는 섬유성 농산폐자원의 양은 연간 약 8억톤 이상으로 이중 60%정도가 벚짚과 같은 non-wood fiber plant이다. 이러한 섬유성 농산폐자원을 국내에서는 일부 가축의 사료로 이용하고 있지만, 대부분이 퇴비나 또는 땀감으로 이용되고 있는 실정이다. 따라서 이러한 섬유성 농산 폐자원을 석유를 대체할 수 있는 화학제품 생산의 원료로 이용한다면 에너지 절약 효과가 클 것을 기대된다. 농산폐자원의 성분은 cellulose, hemicellulose 및 lignin이며, 이중에서 cellulose와 hemicellulose에는 석유를 대체하여 화학제품 및 bio-energy를 생산할 수 있는 원료인 glucose와 고부가가치의 유용한 기능성물질의 생산에 중요한 원료인 xylose 및 arabinose 등이 포함되어 있다. 화학적인 방법으로 고부가가치의 기능성 물질을 생산할 경우 고온·고압을 사용하는 위험성과 폐기물 문제가 존재하기 때문에 최근에는 수율이 높고, 상온·상압에서 생산이 가능한 생물공학적인 방법을 많이 이용하고 있다. 본 연구를 주관하고 있는 (주) 보락에서는 세계 최초로 미생물 발효법에 의해 xylose로 부터 xylitol을 상업적 규모로 생산하고 있다. 현재 xylitol 생산의 원료인 xylose는 중국에서 전량 수입되고 있으며, 중국산 xylose는 옥수수

속대로부터 산 가수분해하여 생산하고 있다. 이 방법은 폐수량이 많아 환경유해 산업으로 지적되고 있으며 이러한 문제점들을 해결하고자 환경친화적인 미생물이 생산하는 효소처리를 상기 공정에 적용하여 단점을 보완하는 제반 공정개발의 필요성이 요구되었고 경제적 가치와 환경적인 평가 가치는 클 것으로 예측되고 있다. 미생물 발효법에 의한 xylitol 생산의 경우 당 성분 중 xylose만을 선택적으로 xylitol로 환원시키므로 원료인 xylose의 순도 (약 85% 이상, w/w)가 그리 높지 않아도 되기 때문에 저순도의 xylose를 생산하여도 되는 잇점이 있다.

L-Arabinose는 양질의 감미를 갖는 5탄당으로서 hemicellulose의 한 성분으로 존재한다. 현재까지 L-arabinose는 hemicellulose의 다른 구성성분인 glucose나 xylose에 비하여 함량이 적고, 추출 및 분리정제에 다단계의 공정이 적용되어야 하므로 관련연구가 미흡하였다. 또한, 당도가 다른 당에 비해 낮기 때문에 식품재료로서 저평가 되어왔다. 그러나, 최근에 L-arabinose가 '혈당치 상승 억제'의 기능을 갖는 것으로 알려진 후, 일본을 중심으로 의약 및 건강식품의 소재로 개발되고 있다. 농산폐자원을 이용하여 L-arabinose를 생산하고자 할 경우 산을 이용하게 되는데 가수분해 할 경우 함량이 많은 glucose나 xylose가 먼저 생성되기 때문에 여러 가지 당이 섞여 있는 생성물을 얻게 되고, 이러한 결과는 정제과정에서의 비용 상승 원인이 된다. 그러므로 산 가수분해의 조건을 최적화하여 arabinose의 수율을 높이는 것과 특이적으로 L-arabinose만을 분리하는 기술의 개발이 요구된다.

2. 본 론

가. 농산폐자원의 선정

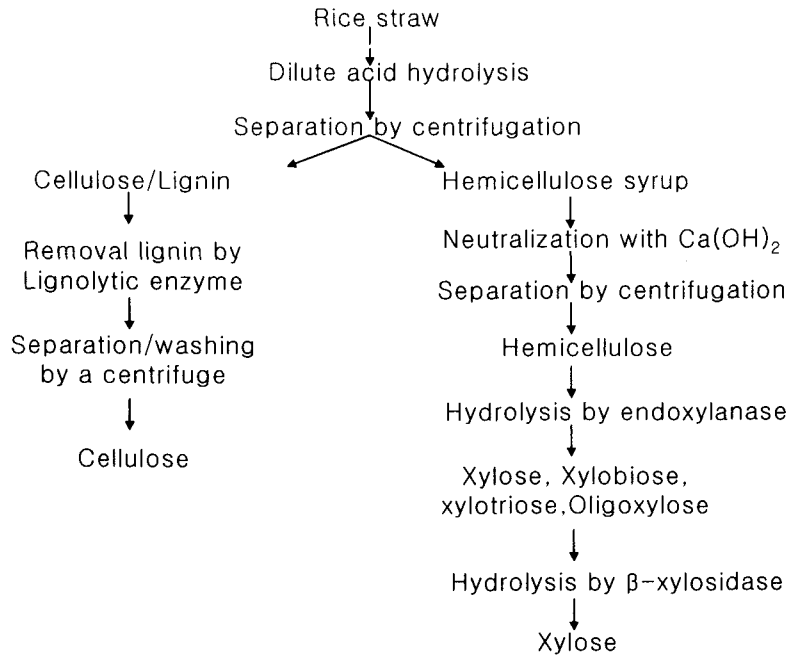
농산폐자원에 대한 당류의 함량을 알아보기 위해 산 가수분해를 수행하였다. 표 1에서와 같이 5탄당은 xylose와 arabinose, 그리고 6탄당으로는 glucose가 대부분 이었고, 극히 일부 galactose나 mannose가 검출되었다. 일반적으로 xylose는 non-wood fiber에서 10~20%의 비율을 보이지만 arabinose의 경우에는 0.2~4.0%의 함량을 보이고 있다. 본 연구에서는 총 당의 함량이 비교적 높은 벃짚(rice straw)과 옥수수 낱알외피(corn fiber)를 선정하였다.

<표 1 : Sugar composition of acid hydrolysates in various agricultural wastes.>

Substrate	Carbohydrates in hydrolysate (%)				
	(w/w, carbohydrate / substrate)				
	Glucose	Xylose	Arabinose	Galactose	Mannose
Corn stalk	5.35	4.73	0.70	0.38	8.63
Corn cob	3.82	18.17	4.83	1.5	1.14
Corn fiber	22.78	12.13	8.00	1.86	0.0
Rice bran	10.05	2.13	3.59	0.78	1.92
Rice staw	11.63	7.28	1.90	1.06	1.08
Rice hulls	17.11	6.36	1.91	0.74	0.00
Gingko nut	7.83	3.59	0.52	0.70	0.78
Peanut shell	1.46	1.03	3.28	0.85	0.46
Coconut shell	0.15	15.78	0.46	0.27	0.0
Acorn shell	0.26	8.95	3.13	1.6	0.0
Walnut shell	0.73	5.64	1.13	1.74	0.08
Chestnut shell	1.17	5.00	2.04	2.46	0.0

나. Xylose 생성을 위한 Hemicellulose 추출공정 확립

Xylose 생성을 위하여 볏짚으로부터 hemicellulose와 cellulose(섬유소) 추출공정은 다음과 같은 사항을 유의하여 실험을 진행하였다. 첫째, cellulose의 분해가 최소로 일어나야 한다. 둘째, 가능한 많은 hemicellulose의 분해가 일어나야 한다. 셋째, 최소한의 chemical reagent를 사용하여 환경친화적인 추출공법을 개발하여야 한다. 이러한 3가지 조건을 기준으로 하여 biomass로부터 xylan을 추출하고 나머지 cellulose와 lignin residue는 insoluble한 상태로 회수하여 효소적으로 lignin을 제거하고 cellulose 생산공정에 사용하였다. Hemicellulose의 측쇄결합과 분자간의 cross-linking을 전처리 공정에서 대부분 제거함으로써 debranching enzyme의 작용 없이도 endoxylanase와 β -xylosidase 만으로 효과적인 xylan 분해를 기대할 수 있을 것으로 예상하였다. 전처리공정 및 cellulose, xylose를 생산하기 위한 flow는 그림 1에 나타냈다.



[그림 1 : Schematic process flow for cellulose and xylose production from rice straw.]

1) 볏짚의 구성성분

건조된 볏짚의 구성성분을 알아보기 위해 수분량을 측정하고, 수분이 제거된 볏짚은 National Renewable Energy Laboratory (NREL)의 Chemical analysis and testing standard procedures에 의해 성분을 분석하여 표 2에 나타냈다.

<표 2 : Chemical composition of rice straw>

Moisture	21%
Cellulose	33%
Hemicellulose	26%
Lignin	7%
Ash	16.5%

2) Rice straw hydrolysis

2 liter hydrolysis reactor를 이용하여 건조된 rice straw 120g을 reactor에 투입한 후 0.1% H₂SO₄ solution 1200ml을 부어 30분간 침지시켰다. 침지가 끝난 후 150rpm으로 교반하면서 120℃에서 시간에 따른 sugar concentration의 변화와 xylan의 추출수율을 표 3에 나타냈다. 30분간 hydrolysis시켰을 때 가장 높은 수율을 나타내었다. 이 결과를 이용하여 1m³의 가수분해용 반응기를 이용하여 pilot scale의 hydrolysis를 진행하였고, 50kg의 기질을 이용하여 crude xylan 9.9kg를 얻을 수 있었다(표 4).

<표 3 : Sugar compositions of rice straw hydrolysate in 2L hydrolysis reactor as a time function>

Time (min)	Xylan (g/L)	Arabinose (g/L)	Glucose (g/L)	Galactose (g/L)	Yield(% /substrate)	Yield(% /total carbohydrate)
10	6.26	0.27	0.26	0.21	7.3	89.4
20	12.72	0.51	0.54	0.38	14.8	89.9
30	16.27	0.71	0.69	0.61	19.0	89.0

<표 4 : Summary of 1m³ pilot scale hydrolysis>

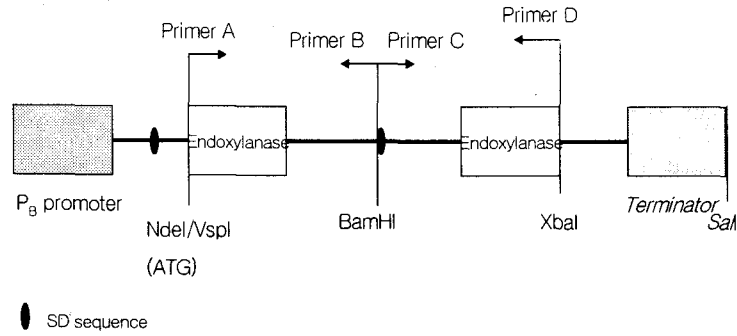
Hydrolysis results	
Hydrolysate	617 ℓ
Xylan Conc.	16.05g/L
Xylan	9.9kg
Yield(% w/w substrate).	19.8%
Purity(% w/w carbohydrate)	88.8%

다. xylose 생산을 위한 효소 system 개발

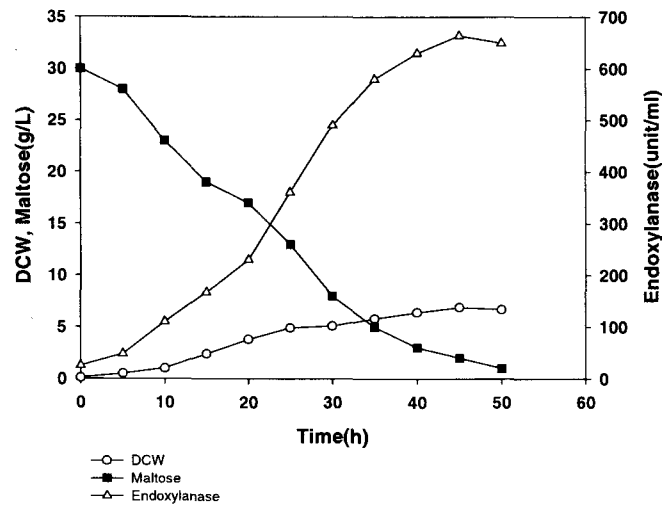
1) Endoxylanase의 생산기술 향상

Endoxylanase의 과발현을 위해 *Bacillus* 유래의 강력한 constitutive promoter인 P_{JH} promoter를 사용하여 dual protein expression system을 구축하였다. 숙주세포로는 *B. subtilis* DB104(*hisH nprR2 nprE18 nprE*)가 사용되었으며 plasmid pSGx는 P_{JH} promoter 하류에 endoxylanase 자체 promoter인 P_B promoter가 있고 그 하류에 dual protein expression을 위해 multicloning sites(MCS)를 가지고 있으며 이를 이용하여 endoxylanase gene이 2회 반복하여 들어간 plasmid pSGx-XX를 제조하였다(그림 2).

배양의 동력학적 특성을 보면 효소의 생성은 균체의 증식과 함께 증가하여, 약 40시간 배양 후에 endoxylanase의 역가는 최대 664 unit/ml에 이르렀다(그림 3). 이는 소규모(3L) 배양에서 얻은 710 unit/ml 보다 약간 낮은 것으로 나타났다. 배양시간이 길어짐에 따라 endoxylanase의 역가는 서서히 감소하였으며, 현미경적인 관찰로는 배양말기에 부분적인 sporulation 현상이 일어났다. 당의 소비 양상은 초기에는 glucose를 이용하여 균체의 증가가 일어난 후에 maltose를 소모하면서 Endoxylanase의 생성이 증가되는 양상을 나타냈다.



[그림 1 : The plasmid map of pSGx]



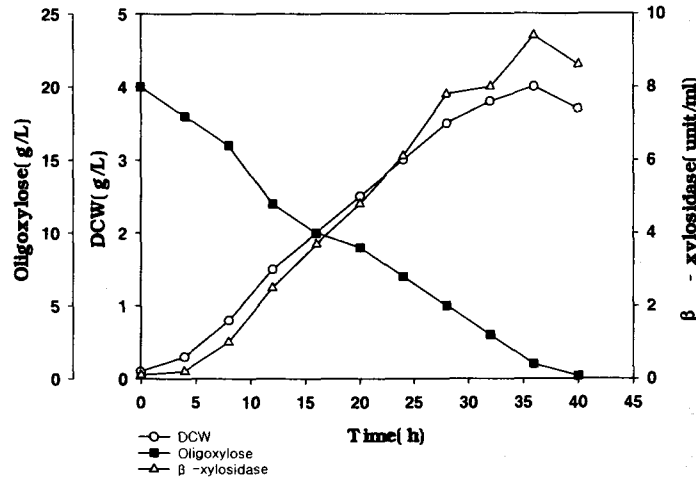
[그림 3 : Time course of *Bacillus subtilis* DB104/pSGx-XX on endoxylanase production]

2) β -xylosidase의 생산기술향상

β -xylosidase를 생산하는 재조합 *E. coli* XL1-Blue/pBLC2로부터 β -xylosidase를 encoding하고 있는 유전자 *xylA*를 분리하여 sequencing을 수행하였다. Site-directed mutagenesis 방법을 활용한 insertion mutation을 실시하여 두 hexamer 사이에 TAAAT의 5개 염기를 삽입하여 거리를 17bp로 연장시키고 promoter strength에 미치는 효과를 효소활성 측정을 통해 비교 분석하였다. 그 결과 spacer region의 길이를 17 bp로 변화시켰을 때 promoter strength에 미치는 효과는 12 bp일 때에 비해 약 1.6배 정도 β -xylosidase의 활성이 증가하였다.

β -Xylosidase를 생산하기 위한 동력학적인 특성은 초기 glucose를 소모하면서 일정 수준으로 균체들이 성장한 후 본 연구에서 제조한 endoxylanase 생성물을 기질로 사용하여 β -Xylosidase의 생성을 측구하였다. 효소의 생합성은 glucose를 소모하면서 균체수 증가와 함께 점진적으로 효소의 역가가 증가되어 배양 32시간 후에 9.4 unit/ml의 역가가 나타났다. β -Xylosidase의 경우에는 생성된 효소가 대

부분 세포내에 존재하는 cytoplasmic enzyme이었으며 배양액내에도 10~15% 세포 외로 방출하는 것으로 관찰되었다. 상기 효소의 역가는 효소가 주로 존재하는 세포내의 역가를 나타냈다.

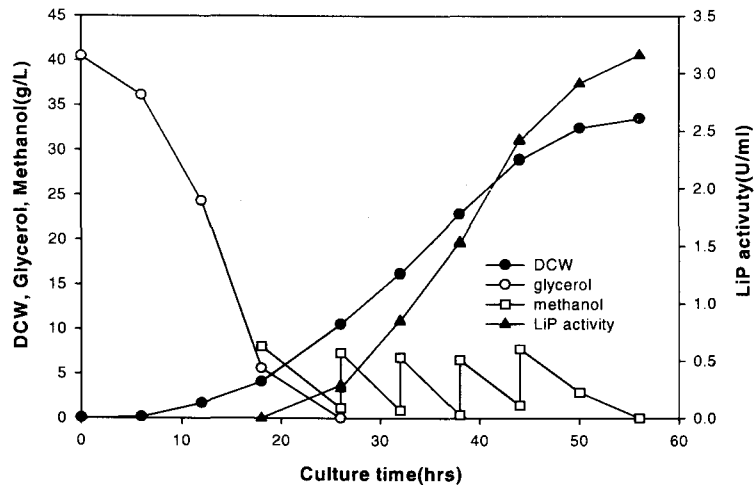


[그림 4 : Time course of *E. coli* X4blue/pBLC2/b on β -xylosidase production media]

3) 분자진화기술을 적용한 Lignin 분해 효소시스템 개발 및 재조합 균주의 개발
Methylophilic 효모인 *Pichia pastoris*의 경우 plasmid loss 문제가 없는 염색체 integrated foreign DNA를 가지고 있고 매우 강한 alcohol oxidase 1 promoter(AOX 1)을 가지고 있다. 이 AOX 1은 매우 강력하여 발현량이 전체 단백질의 30% 이상이며 제어하기 쉽다는 이점을 가지고 있다. 본 연구에서도 *E. coli*를 이용하여 수회 형질전환을 시도하여 LiP gene의 발현을 도모하였으나 발현이 저조하여 결국 이 *P. pastoris* AOX 1 promoter을 사용하여 형질전환 하였다.

4) 유가식 배양

배양시 초기 glycerol의 농도를 높이고 methanol feeding 횟수를 증가시켜 이에 따른 균체 농도 및 lignin peroxidase 발현 양상을 알아보았다. 초기 glycerol 농도를 40g/L로 하고 methanol feeding은 methanol uptake rate에 따라 적당히 조절하였다. 이 조건에서 maximum DCW는 33.5g/L였으며, maximum LiP activity는 3.16unit/ml이었다. Maximum specific growth rate가 1.11g/g · hr로 batch의 결과에 비해서 약 1.77배로 높았으며 LiP의 productivity도 56.4unit/ℓ · hr로 2.1배 높은 것으로 나타났다. 초기 cell 성장이 높음으로 인해 methanol의 uptake rate도 따라서 상승하여 배양시간이 기존 발효방법과 비교하여 매우 단축되었다. 이 결과로 최대 LiP expression을 위하여 지속적인 methanol feeding 방법과 초기 탄소원 농도를 높이는 것이 매우 효과적일 것으로 생각되었다.



[그림 5 : Fermentation time courses with intermittent fed-batch feeding of recombinant *P. pastoris* GS115/pPICSAT-LiP-PT-11-d7]

라. 효소의 고정화

1) Endoxylanase는 silica gel을, β -xylosidase는 Chitosan을 이용하여 고정화하였다.

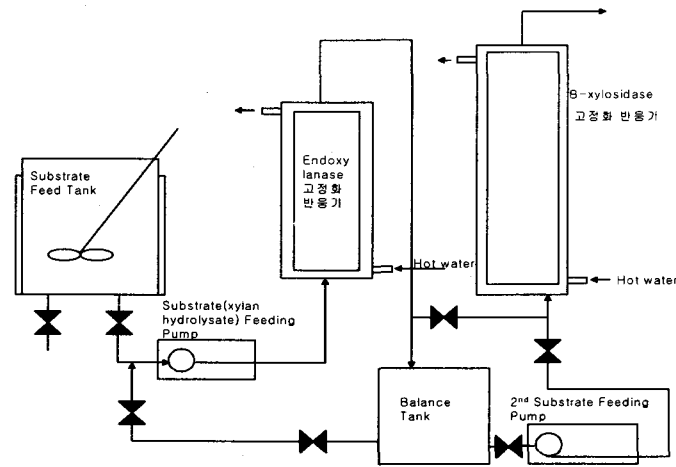
2) PFR을 이용한 xylose 생성

2 stage continuous system을 가동하여 반응이 안정화 되었을 때(약 2일후) 생성되는 산물의 당성분 조성을 보면 아래 표 5와 같았다. Overall conversion yield는 xylose/xylan 대비 82%로 나타났으며 초기 hemicellulose 가수분해 기질에 포함된 glucose와 araban, arabinose는 변화가 거의 없는 것으로 나타났다.

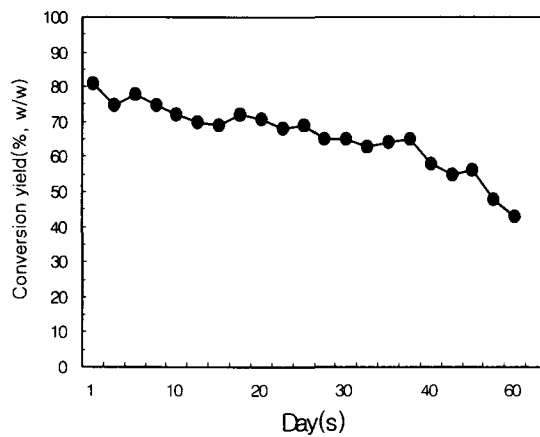
<표 5 : Composition of product with 2 stage Immobilized endoxylanase and β -xylosidase in PFRs>

당류	조성비율(% , w/w)
Xylose	82.1
Glucose	4.0
Oligoxylose	5.4
Arabinose, araban	5.0
Others	3.5

마. PFR System을 이용한 xylose 의 연속 생산



[그림 6 : System Configuration of Plug Flow Reactor(PFR)]



[그림 7 : Conversion yield vs. operation time of immobilized endoxy lanase PFR]

2 stage PFR system(그림 6)을 통하여 xylose 생성은 system이 안정화된 2일부터 20일까지는 대략적으로 70%의 전환 수율을 유지하다가 점차적으로 하락하는 현상을 보이기 시작했다. PFR system의 half life는 약 50일로 나타났다(그림 7). 이러한 전환수율의 하락을 세부적으로 알아보기 위하여 endoxy lanase와 β -xylosidase의 shelf life를 알아보기 위하여 반응기로부터 고정화 효소를 소량 채취하여 초기 대비 잔존여가를 측정하였다. Endoxy lanase의 경우에는 half life가 약 60일로 나타났으며, β -xylosidase의 경우에는 50일 정도로 나타났다.

바. Cellulose 분리 및 정제.

Xylose 생산을 위해 전처리하여 hemicellulose를 얻은 후 남은 잔사를 기질로 하여 lignin peroxidase를 이용하여 lignin을 제거하는 공정을 개발하였다. 이러한 공정 이후 효소처리물로부터 단백질 및 lignin 분해산물을 제거하고 cellulose를 얻는 공정을 개발하였다. Lignin을 가수분해한 후에 lignin 분해산물을 제거하기 위해 hot water washing과 ethanol washing을 수행하였다.

사. Arabinose 생산 및 정제

최적의 corn fiber 가수분해 조건인 0.4% 황산 용액으로 130°C에서 60분간 처리할 때 기질의 농도에 따라 생성되는 당들의 농도를 분석하였다. 기질의 농도 증가에 따라 생성되는 당들의 농도는 증가하였으나 단위 기질에 대하여 각각의 당들이 생성되는 양은 오히려 감소하였다. 따라서 산 가수분해 수율을 증가시키기 위해서는 사용하는 기질의 농도가 낮을수록 증가할 것으로 예측되지만, 반응이내에 원하는 당의 농도를 높이기 위해서는 높은 기질 농도를 사용하는 것이 더 유리할 것으로 사료되었다.

<표 6 : Effect of reaction time on sugar composition of corn fiber hydrolysate with 0.4% sulfuric acid at 130°C for 1hr>

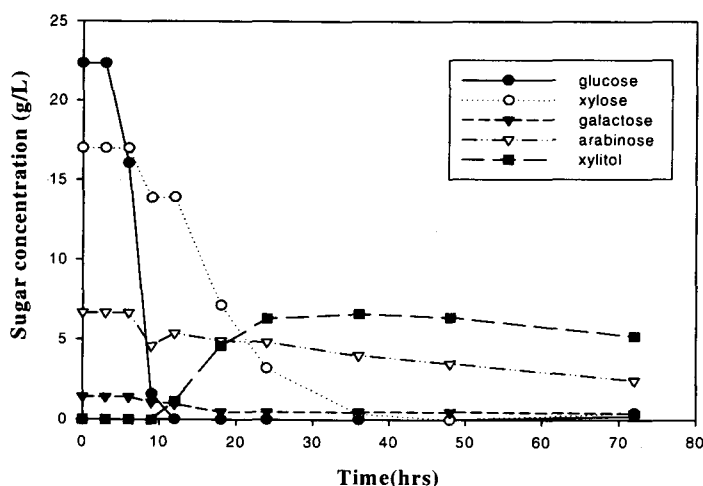
Time (min)	Carbohydrates in hydrolysate (%) (w/w, carbohydrate/substrate)			
	Xylose	Glucose	Arabinose	Other hydrolysates
0*	3.90	6.28	4.15	N.D
30	11.08	12.08	5.39	N.D
60	6.56	26.86	7.53	N.D
90	7.82	21.59	5.67	N.D
120	7.79	21.60	5.59	N.D

아. 가수분해물 배지에서 각 균주별 당 소비경향 분석

Corn fiber의 산 가수분해 용액에는 xylose와 glucose를 포함한 많은 당들이 존재하므로 arabinose만을 분리하기가 매우 어렵다. 따라서, 효모가 가수분해 산물에 존재하는 arabinose는 이용하지 못하고 xylose는 xylitol로 전환시키고, glucose를 포함한 나머지 당들을 모두 이용하도록 하면, 발효액에는 arabinose와 xylitol 만

이 존재하게 된다. Xylitol 생산균주인 *Candida. sp*는 낮은 xylitol 수율이 문제가 되었다. 그 중에서 *C. tropicalis*가 arabinose를 이용하지 못하는 반면 다른 모든 당들을 소모하였고 xylitol 생산 수율이 제일 높은 것으로 나타났다(그림 8). 따라서 최종적으로 *C. tropicalis*를 산 가수분해물의 발효를 위한 균주로 선정하였다.

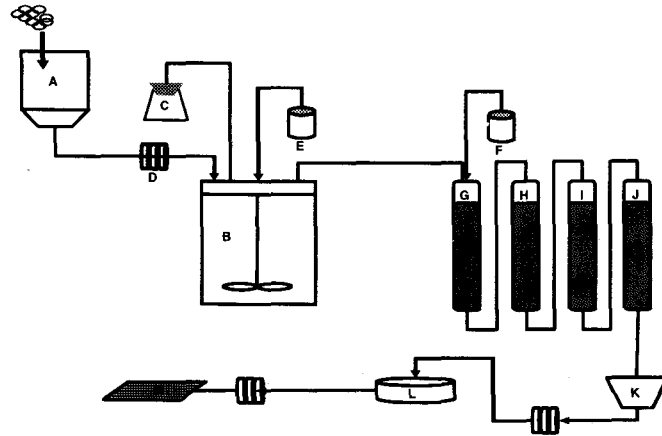
*C. tropicalis*의 배양액으로 사용하여 glucose 및 다른 당을 제거하였다. 배양종료 시 arabinose만 80%이상 배지내에 존재하였다(표 7). 따라서, scale-up에 따른 문제점은 없는 것으로 결정하였다. 결정화에 영향을 주는 색소 및 이온을 제거하기 위하여 활성탄과 ion exchange column을 이용하여 정제하였다. 본 연구에서 수행한 분리·공정의 연속화된 공정도를 그림 9에 나타내었다.



[그림 8 : Time course of sugar concentration during fermentation of *C. tropicalis* in 2.5 L jar fermenter]

<표 7 : Characterization of fermentation broth before and after the treatment of activated carbon and ion-exchange resin>

	Fermented broth	Activated Carbon	Cation resin	Anion resin	Crystallizatio n
Volume	9 L	8.3 L			
pH	4.41	5.1	1.67	8.92	
Color (540 nm)	1.18	0.01			
Amount of sugar (g/L)	53.55	49.25	45.78	46.21	22.19
Yield (%)	100				41.43



[그림 9 : Schematic diagram for separation and purification of L-arabinose]

A. reactor; B. fermentor; C. seed culture; D. filter; E. acid bottle; F. washing buffer; G. activated carbon; H. strong cation exchanger; I. strong anion exchanger; J. weak anion exchanger; K. evaporator; L. crystallization; M. dryer

3. 결 론

목질계 농수산 폐자원으로부터 식품 및 의약품 소재로 사용되고, 석유화학제품을 대처할 수 있는 자원을 얻기 위하여 연구 과제를 실행하였다. 농산폐자원으로는 벧짚, 왕겨, 옥수수 부산물 등을 검토하였는데, 본 연구에서는 주위에서 손쉽게 얻을 수 있는 벧짚으로부터 xylose, cellulose를, 전분제조공정에서 폐기물로 생산되는 옥수수 알맹이 껍질(corn fiber)로부터는 arabinose를 생산하는 실험을 진행했다. 벧짚의 전처리 공정에 순수 효소만 사용하였을 때에는 반응속도가 매우 느린 문제점들이 있기에 산처리법을 일부 도입하여 사용했는데, 사용되는 황산의 농도를 최저 수준(0.1% w/w)으로 사용하여 부반응(side reaction)으로 발생하는 환경오염 물질을 최소화하도록 하였다. 저농도의 산처리를 한 후 연속적으로 효소 반응(endoxylanase, β -xylosidase, lignolytic enzyme)을 하여 효율적인 가수분해공정으로 개발하였다. 본 연구과제에서 괄목할만한 것은 분자 진화적인 유전자 조작으로 고효율의 효소 system을 개발한 것이다. Hemicellulose를 분해하는 key enzyme인 endoxylanase에 관해서는 개량된 균주를 배양하여 발효액 중 효소의 역가를 710unit/ml 수준으로 향상시킨 것을 나타낼 수 있다. Endoxylanase에 의하여 가수분해산물을 β -xylosidase를 이용하여 최종산물인 xylose를 얻는 연속된 공정은, 우선 전처리 공정중 mild한 산처리로 효소로 분해하기 어려운 물질을 제거함으로써 가능하게 하였다. Endoxylanase와 β -xylosidase를 single microorganism 에서 발현할 수 있는 system을 고려하였으나, 효소 특성상 endoxylanase는 세포외로 배출하지만 β -xylosidase는 세포내에 형성되기 때문에 한 종류의 미생물에서 동시에 발현하는 것은 기술상의 어려움이 많으므로, 2가지 미생물 system을 이용하여

추진하였다. 배양액중의 각 효소의 역가는 당초 계획했던 수준을 약간 상회하는 결과를 얻었다. 각각의 미생물을 배양하여 얻는 효소역가는 710unit/ml endoxylanase, 9.1unit/ml β -xylosidase로서 매우 다르지만 β -xylosidase 배양액을 증가하여 효소의 역가를 조정하고 고정화시킨 2 stage system을 응용함으로써 연속생산에서 큰 애로사항 없이 진행할 수 있었다. 최종산물인 Xylose는 2 stage immobilized packed bead reactor를 이용하여 생산할 수 있었다.

Arabinose의 경우에는 현재 일본시장에서부터 국내로 진입하는 단계이기 때문에 구체적인 시장규모를 예상하기 어렵지만, diet sugar로서 의약 및 식품용으로 그 용도가 다양하게 사용되어질 전망이다. 본 연구를 통하여 단순한 농업부자제로 사용되고 있는 벚짚, corn fiber 등과 같은 농산폐자원을 xylose, cellulose, arabinose 등을 만드는 자원으로 이용할 수 있게 되어, 폐자원의 이용도를 높이고 친환경적으로 공정을 개발할 수 있는 계기가 되었다.