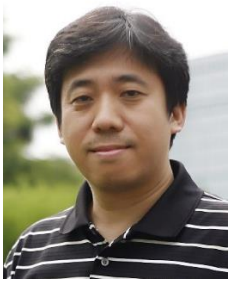
최신 연구동향

방향족 아미노산 및 유래 화합물 생산을 위한 미생물 개량 연구



KAIST 정기준 교수, 방현배 박사과정

1. 개요

산업적으로 고부가가치 물질에 속하는 방향족 아미노산 및 유래 화합물 생산성 증가를 목적으로 전 세계적으로 활발히 연구되고 있다. 특히 방향족 화합물의 경우 석유자원에서 주로 생산되는 거대 시장의 화합물로 naphtha 분해과정에서 생성되는 벤젠 (benzene), 톨루엔 (toluene), 크실렌 (xylene)으로부터 대부분이 생성된다. 그 중에서도 벤젠은 각종 화학원료제품의 합성에 이용되는 매우 중요한 물질이나, 대표적인 발암성 유해물질이라는 치명적인 단점이 존재한다. 따라서 이러한 유해 물질 대신 재생 가능한 (renewable) 합성생물학적 방법을 이용해 생산할 수 있는 기술의 개발이 필요하다.

방향족 화합물의 생합성 대사 경로는 전구 물질 (precursor)인 방향족 아미노산 페닐알라닌 (L-phenylalanine), 트립토판 (L-tryptophan), 티로신 (L-tyrosine)을 생산하는 경로로부터 생성되며, 또한 그 중간 대사물질 (intermediate)인 3-dehydroquinic acid, shikimic acid, chorismic acid 등 역시 의약품, 화장품, 식품, 염료, 농약, 폴리머, 기타 특수소재 등에 직접적/간접적으로 광범위하게 응용될 수 있는 매우 유용한 대사산물이다. 하지만 미생물은 각 아미노산의 생합성을 feedback inhibition을 통해 제어함으로써 특정 아미노산을 대량으로 생산하지 않는다. 따라서 본 보고서에서는 이렇게 미생물을 기반으로 하는 방향족 아미노산 및 유래 화합물의 대량 생산을 위한 합생생물학적 연구 동향에 대해서 고찰해 보고자 한다.

2. 방향족 아미노산 생산 미생물 개발

앞서 언급한 바와 같이 방향족 아미노산인 티로신 (L-tyrosine), 트립토판 (L-tryptophan), 페닐알라닌 (L-phenylalanine)은 모든 생명체의 단백질 합성에 필수적이다. 또한 의약품, 식품첨가제, 사료첨가제, 화장품 원료 등으로 사용될 수 있는 다양한 이차 대사산물들의 전구체로써 사용되기 때문에 산업적으로도 중요하다. 동물을 제외한 식물, 균류, 박테리아에서의 방향족 아미노산의 생합성은 자연적으로 shikimic acid 생산 경로로부터 유래되며 중간 기질로써 chorismate를 공유한다. 이후 chorismate에서 나눠지며 트립토판은 anthranilate를 거쳐 합성되고, 페닐알라닌 및 티로신은 prephenate를 거침으로써 최종적으로 합성된다 [그림 1]. 물론 벤젠과 같은 유기용매로부터의 합성 역시 가능하지만 벤젠은 대표적인 발암성 유해물질이기 때문에, petroleum 기반의 합성 대신 친환경적인 방법인 바이오매스를 원료로 하는 합성생물학적 방법을 이용해 합성하는 기술 개발이 요구된다.

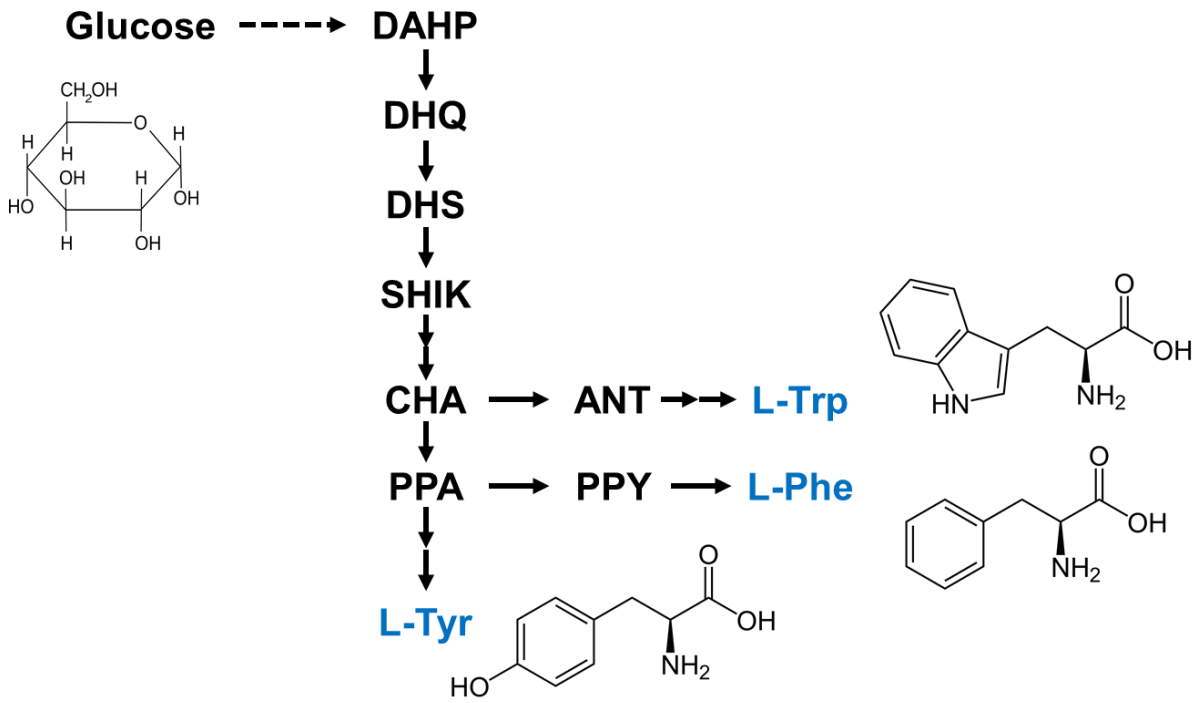


그림 1 방향족 아미노산 생합성 경로

균주 개량은 크게 Random mutagenesis와 rational metabolic engineering으로 크게 나눠진다. 방향족 아미노산을 미생물에서 대량으로 생산하고자 하는 시도는 1980년대부터 시작되어왔으며 전통적으로는 최소배지 (minimal medium)에서 변이주 (mutant)를 선별하는 방법을 통한 고생산 균주 개량 방법이 이용되어 왔다. 하지만 제한된 방법과 시간이 소모된다는 단점과, 합성생물학

(synthetic biology), 생물 정보학 (bioinformatics), 단백질 공학 (protein engineering), 시스템 생물학 (systems biology) 등의 발전으로 유전자 수준에서 보다 정교한 경로 조절이 가능하게 되면서 대장균 (*Escherichia coli*), 코리네박테리움 (*Corynebacterium*), 브레비박테리움 (*Brevibacterium*)을 포함하는 균주의 대사 회로 조작을 통한 생산량 증가 연구가 꾸준히 진행되고 있다.

미생물에서 방향족 아미노산 생합성 대사경로의 첫 단계 효소인 DAHP synthase 및 chorismate에서 각 방향족 아미노산을 생산하는 효소인 TrpE, PheA, TyrA는 각각의 최종 생산물인 트립토판, 페닐알라닌, 티로신에 의해 feedback inhibition을 받는다. 이로 인해 생산물의 생산성 역시 감소하기 때문에 이들 방향족 아미노산을 대량으로 생산하는 연구에 있어, 돌연변이 유전자를 도입함으로써 저해를 받지 않고 생산량을 증가시키는 방법이 공통적으로 사용되고 있다. 또한 전반적으로 TyrR 및 TrpR transcription regulator에 의한 repression을 받는다는 단점이 존재하기 때문에, 이러한 조절 단백질들을 제거하는 방법으로 미생물의 성장에 영향을 주지 않으면서 동시에 생산량을 늘릴 수 있다 [그림 2].

표 1 방향족 아미노산 시장 규모 및 생산 추이

아미노산	연간 생산량(톤)	시장 규모($US)	최고 생산량	출처
L-Phenylalanine	30000	1.0 billion	62 g/L (*E. coli*)	[6]
L-Tryptophan	14000	150 million	49 g/L (*E. coli*)	[7], [8]
L-Tyrosine	200	50 million	55 g/L (*E. coli*)	[9]

이러한 대사공학적 접근 방법과 추가적인 발효 공정의 최적화를 통해, 미생물로부터 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판의 방향족 아미노산을 생산한 연구는 리터당 수십 그람 까지 생합성이 가능한 것으로 보고되어 있으며 이는 화학적인 합성에 비교해서 산업적으로 경쟁력을 가질 수 있다.

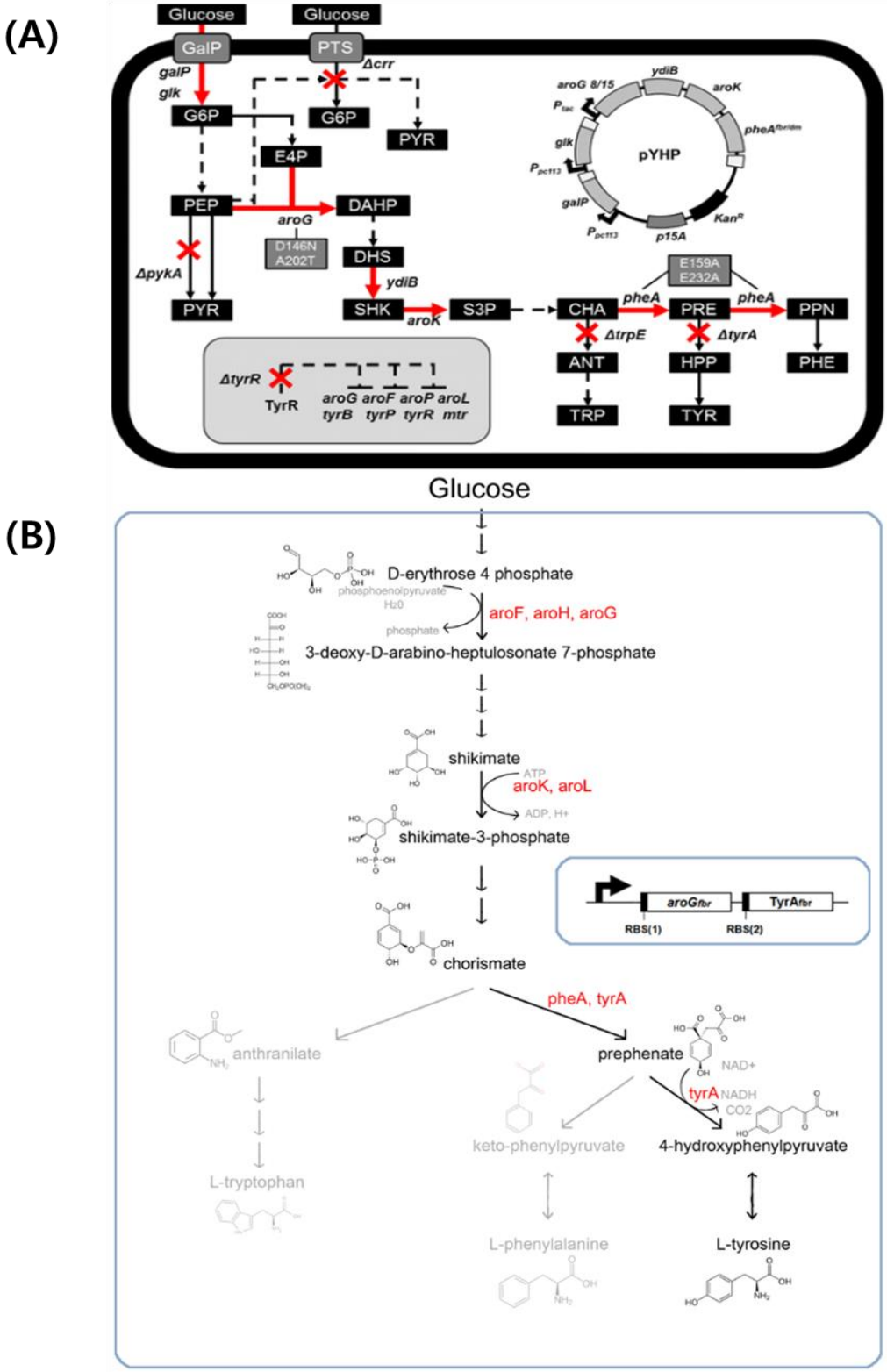


그림 2 포도당 (Glucose)으로부터 (A) 페닐알라닌 및 (B) 티로신의 생합성 경로 및 생산성 증가를 위한 유전자 조작

3. 방향족 아미노산 유래 화합물의 생산을 위한 미생물 개량

앞 단락에서 기술된 바와 같이, 방향족 아미노산은 그 자체로서 식음료 및 의약 산업으로의 적용이 가능하기 때문에 전세계적으로 수요가 증가하고 있다. 또한, 방향족 아미노산은 체내에서 다양한 목적으로 사용될 수 있는 이차 대사물질의 전구물질로서의 중요성을 지니기 때문에, 미생물 내 외래 효소 유전자의 도입 등을 통해 방향족 아미노산이 산업적으로 유용한 물질 생산의 출발점이 될 수 있다는 연구 사례가 증가하면서 그 중요성이 더욱 대두되고 있다. 이러한 연구들의 공통적인 지향점은 미생물 균주를 개량 및 배양하여 고부가가치 유용 물질을 대량 생산하고, 이를 통해 가격 경쟁력 있는 생산 플랫폼을 구축하는 데에 있다. 아래 [표 2]은 방향족 아미노산 유래의 주요 화합물 생산 연구 사례를 정리한 것이다.

표 2 미생물을 이용한 방향족 아미노산 유래 화합물 생산 연구 사례

생산 물질	적용 분야	생산량	참고 문헌
Violacein	항암 치료제, 그람 양성균 항생제 등	1.75 g/L	[15], [16]
Slavianic acid A	항산화 물질, 심혈관 계통 의약품	7.1 g/L	[17]
L-DOPA	파킨슨병 치료제	8.67 g/L	[18]
Hydroxytyrosol	항산화 물질, 피부질환 및 심혈관 질환 치료제	208 mg/L	[19]
Caffeic acid	건강, 의약식품	766.68 mg/L	[20]
Cinnamaldehyde	친환경 선충 퇴치제	75 mg/L	[21]
Styrene	폴리스티렌 단량체 및 석유화학공정	836 mg/L	[22]
Resveratol	건강, 의약식품 (심혈관 질환 및 당뇨)	2.3 g/L	[23]
p-coumaric acid	폴리페놀, 플라보노이드 등의 전구체	1.93 g/L	[24]

위의 사례들을 포함하는 대부분의 연구들은 최종 생산물의 생산성 증대를 고려하여 고농도 배양이 가능한 대장균, 코리네박테리아, 효모 등 다양한 균주를 사용하였다. 생산 물질의 생합성 경로는 일반적으로 이 균주 내에 자연적으로 존재하지 않으며, 따라서 식물 등의 고등 생물의 효소 유전자를

도입하는 시도가 진행되어 왔다. [그림 3]에 표기된 예시들 모두 외래 유전자를 1개 이상 도입함으로써 미생물 내에 새로운 생합성 경로를 구축하였다. 파킨슨병의 치료제로 가능성이 대두되고 있는 L-DOPA의 경우, 티로신 (L-tyrosine)을 L-DOPA로 전환시킬 수 있다고 알려진 쥐 유래 유전자 티로신 하이드록실라아제 (tyrosine hydroxylase)를 도입함으로써 생산에 성공하였다. 신남알데하이드 (cinnamaldehyde)는 농작물의 주된 생산성 저하 요인으로 꼽히는 식물 기생 선충을 친환경적으로 제거할 수 있는 제초제로 각광받고 있으며, 이 역시 애기장대 (*A. thaliana*) 및 방선균 (*Streptomyces sp.*) 유래의 외래 유전자들을 도입함으로써 페닐알라닌 (L-phenylalanine)으로부터 미생물 내 생산이 가능하다고 발표되었다. 마찬가지로 쿠마르산 (*p*-coumaric acid) 역시 페닐알라닌 또는 티로신 유래의 대사 물질로, 그 자체로는 산업적으로 유용한 기능을 갖는다고 보긴 힘들지만, 많은 종류의 폴리페놀, 플라보노이드 등의 전구 물질로 전환될 수 있는 분기점으로 여겨져 미생물 내에서 생산하는 것이 중요한 의미를 갖는다. 트립토판 (L-tryptophan) 유래의 고부가가치 물질로는 항생물질로 잘 알려진 비올라세인 (violacein)이 있다. 트립토판은 *vioA, vioB, vioC, vioD, vioE*의 다섯 유전자에 의해 비올라세인으로 전환되며, 위의 예시들과 유사한 방식으로 대장균에 외래 *vio* 유전자 클러스터를 도입하여 생산할 수 있음이 연구되었다. 미생물을 기반으로 생산할 수 있는 방향족 아미노산 유래 화합물에는 건강, 의약 관련 물질 뿐만 아니라 독성 물질도 있는데, 페닐알라닌으로부터 생산될 수 있는 스티렌 (styrene)이 대표적인 사례이다. 스티렌은 폴리스티렌 중합체의 단위체로서의 수요 및 기타 석유화학 제품의 전구 물질로 사용될 수 있기 때문에 전세계적인 생산량과 수요가 크며, 따라서 기존의 석유화학 기반 생산공정을 대체할 수 있는 미생물 기반 생산이 연구되어 왔다. 특히, 스티렌이 대장균 성장에 미치는 저해 효과를 해소하기 위하여 생적합성 유기용매 (biocompatible organic solvent)를 첨가하여 생산 즉시 유기용매로 추출될 수 있도록 시도함으로써 생산성 증가에 성공한 사례도 보고되었다.

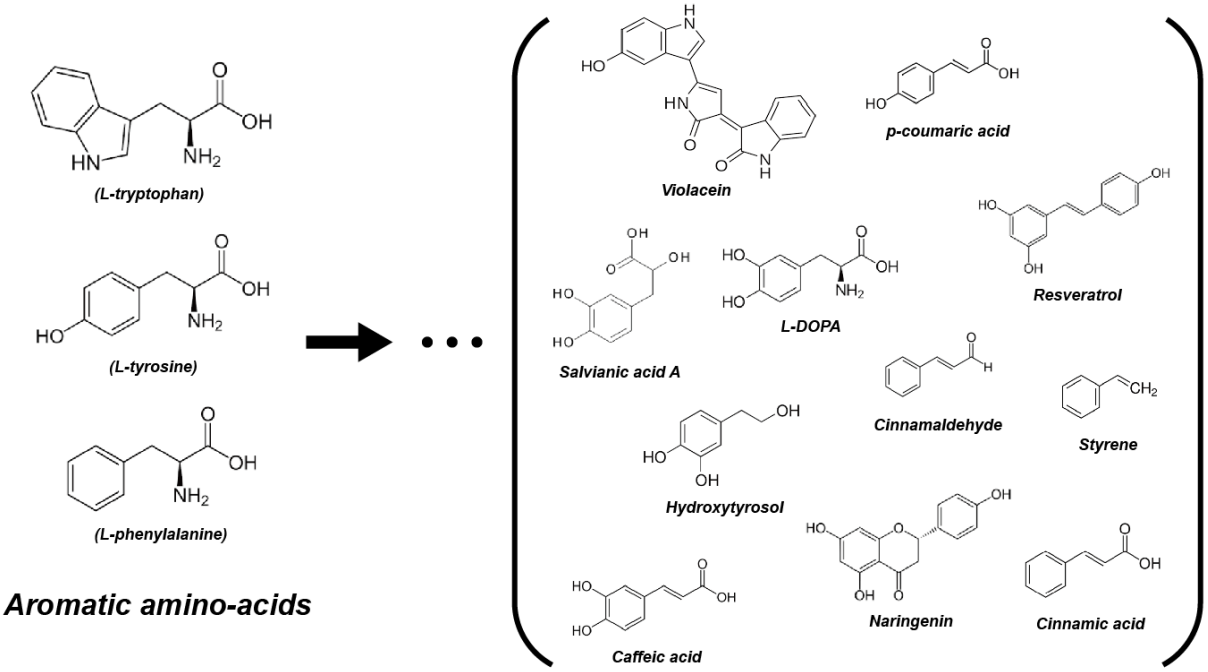


그림 3 방향족 아미노산으로부터 생산 가능한 다양한 물질

방향족 아미노산 유래의 고부가가치 화합물은 세포 내의 이차 대사산물 (secondary metabolite)이다. 이러한 이차 대사산물의 생산성을 증가시키기 위해서는 외래 유전자의 도입 뿐만 아니라 전구 물질을 많은 양으로 확보하는 것이 중요하다. 따라서 타겟 물질의 생합성 경로에 놓인 불필요한 유전자를 제거하거나, 주요 유전자들을 과발현하는 연구가 시도되어 왔다. [그림 4]는 포도당(glucose)으로부터 방향족 아미노산, 더 나아가 최종 생산물인 violacein 또는 L-DOPA를 생산하는 생합성 경로를 최적화하기 위한 시도를 나타낸다. 대장균의 단일 탄소원으로서 포도당이 공급되고, 방향족 아미노산 및 그 유도체의 고생산에 있어 불필요한 유전자는 세포의 성장을 저해하지 않는 선에서 제거되었으며, 일부 핵심 유전자들은 플라스미드를 이용하여 추가적으로 과발현하였다. 이와 같은 대사공학적 접근 (metabolic engineering)을 통해 타겟 물질의 생산성을 극대화할 수 있다.

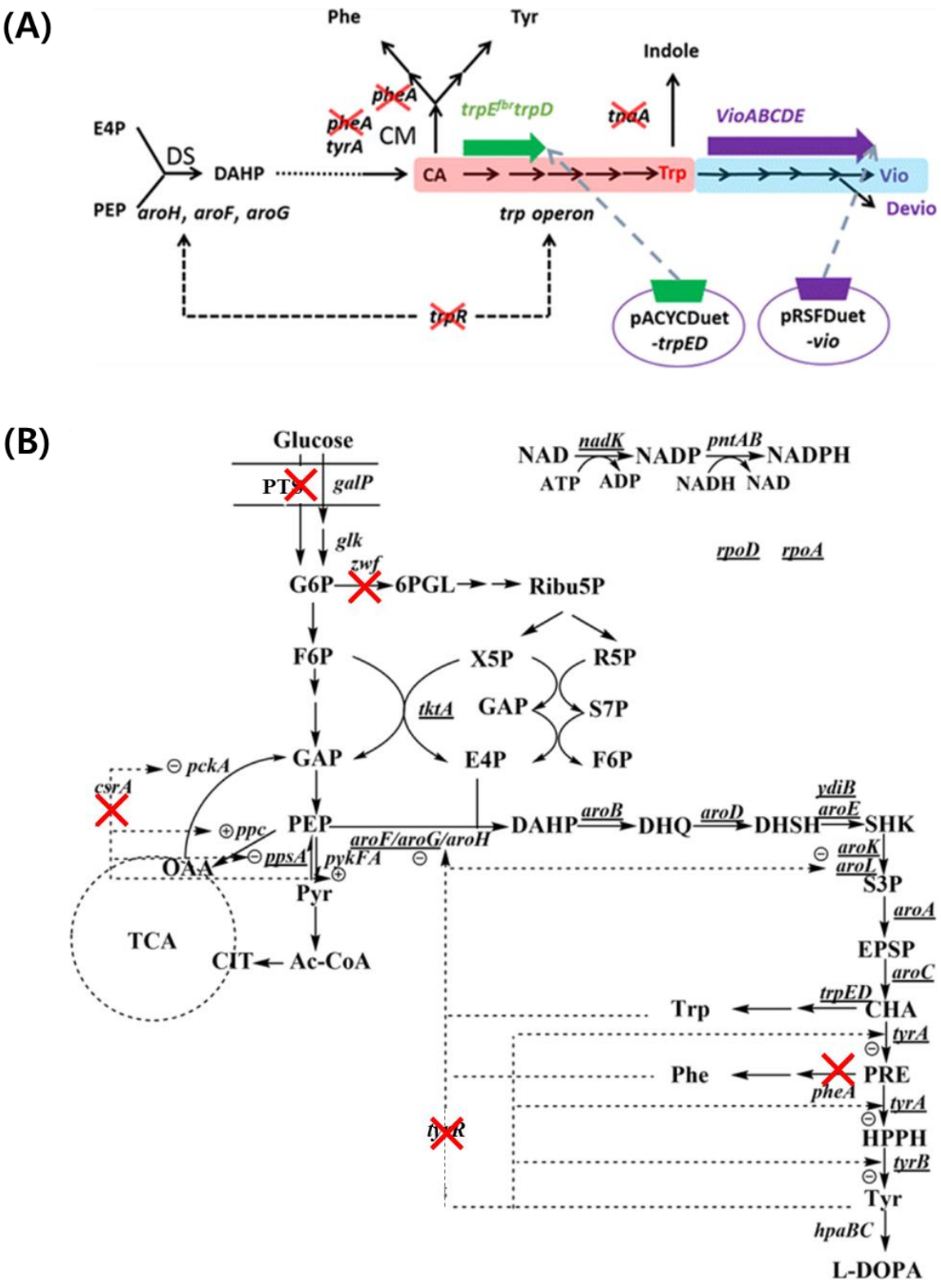


그림 4 방향족 아미노산으로부터 대사공학적 방법을 이용한 방향족 화합물 생산

(A) Violacein (B) L-DOPA

비록 앞선 단락들에 있어서는 불필요하거나 경쟁 경로의 유전자 제거 (knock-out) 및 플라스미드를

통한 강화 (overexpression) 등에 대해서만 언급을 하였다. 하지만 단순히 경로를 제거 및 강화하는 것만이 생산성을 증가시킬 수 있는 것만은 아니다. 예를 들면 중간 물질 (intermediate)의 축적이 미생물에 독성을 나타내거나, 성장에 반드시 필요한 경로이기 때문에 제거할 수 없을 가능성 또한 존재하기 때문이다. 따라서 최근에는 모듈의 조절을 통해 효율을 높이는 방법 또한 사용되고 있다. 합성 프로모터를 사용하거나 biosensor/riboswitch를 사용하여 특정 유전자의 발현을 ON/OFF, 또는 sRNA/ncRNA를 이용하여 유전자의 제거가 아닌 down-regulation을 하는 방법을 통해 fine-tuning 등이 이에 해당한다.

4. 고찰

이렇듯 합성생물학을 기반으로 다양한 방향족 화합물의 합성이 성공적으로 연구되고 있다. 하지만 미생물 기반의 화합물 생산의 가장 큰 쟁점은 가격 경쟁력이다. 초기 연구 사례들은 주로 미생물 내에서 새로운 물질을 생산하는 것 자체에 큰 의미를 두어 국한되어 왔으나, 유기합성 및 석유화학 기반의 기존 생산 시스템을 대체하고자 한다면 추가적인 생산성 증대 및 원가 절감에 대한 고려가 필요하다. 따라서 리그노셀룰로오스 (lignocellulose) 혹은 미세조류 (microalgae) 등의 가수분해물 (hydrolysate) 등을 포함한 값싼 원료 물질을 탄소원으로써 공급하고, 이를 이용한 고부가가치 물질을 생산함으로써 상용화에 한 걸음 더 다가갈 수 있을 것이다.

참고문헌

[1] Lee JH, Research trend about the development of white biotech-based aromatic compounds. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 2009, 37: 306-315.

[2] Bongaerts J, Kramer M, Muller U, Raeven L, Wubbolts M, Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids and derived compounds. *Metab. Eng.* 2001, 3: 289-300.

[3] Lim SH, Park SK, Ha sh, Choi MJ, Kim DH, Lee JY, Kim YM, Biosynthetic pathway of shikimate and aromatic amino acid and its metabolic engineering in plants. *J. Plant Biotechnol.* 2015, 42:

135-153.

[4] Sanchez S, Rodriguez-Sanoja R, Ramos A, Demain AL, Our microbes not only produce antibiotics, they also overproduce amino acids. *J. Antibiot.* 2018, 71: 26-36.

[5] Wang J, Shen X, Rey J, Yuan Q, Yan Y, Recent advances in microbial production of aromatic natural products and their derivatives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018, 102: 47-61.

[6] Ding D, Liu Y, Xu Y, Zheng P, Li H, Zhang D, Sun J, Improving the production of L-phenylalanine by identifying key enzymes through multi-enzyme reaction system *in vitro*. *Sci. Rep.* 2016, 6.

[7] Wang J, Cheng LK, Wang J, Liu Q, Shen T, Chen N, Genetic engineering of *Escherichia coli* to enhance production of L-tryptophan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013, 97: 7587-7596.

[8] Ikeda M, Towards bacterial strains overproducing L-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2006, 69: 615-626.

[9] Patnaik R, Zolandz RR, Green DA, Kraynie DF, L-tyrosine production by recombinant *Escherichia coli*: fermentation optimization and recovery. *Biotechnol. Bioeng.* 2008, 99: 741-752.

[10] Olson MM, Templeton LJ, Suh W, Youderian P, Sariaslani FS, Gatenby AA, Van Dyk TK, Production of tyrosine from sucrose or glucose achieved by rapid genetic changes to phenylalanine-producing *Escherichia coli* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007, 74: 1031–1040.

[11] Santos CNS, Combinatorial Search Strategies for the Metabolic Engineering of Microorganisms. 2010. MIT.

[12] Becker J, Wittmann C, Systems and synthetic metabolic engineering for amino acid production - the heartbeat of industrial strain development. *Curr. Opin. Biotechnol*. 2012, 23: 718-726.

[13] Rodriguez A, Martnez JA, Flores N, Escalante A, Gosset G, Bolivar F, Engineering *Escherichia coli* to overproduce aromatic amino acids and derived compounds. *Microb. Cell Fact*. 2014, 13: 126.

[14] Liu SP, Zhang L, Mao J, Ding ZY, Shi GY, Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of phenylpyruvate derivatives. *Metab. Eng.* 2015, 32:55-65.

[15] Fang MY, Zhang C, Yang S, Cui JY, Jiang PX, Lou K, Wachi M, Xing XH, High crude violacein production from glucose by *Escherichia coli* engineered with interactive control of tryptophan pathway and violacein biosynthetic pathway. *Microb. Cell Fact*. 2015, 14: 8.

[16] Choi SY, Yoon KH, Lee JI, Mitchell RJ, Violacein: properties and production of a versatile bacterial pigment, *Biomed Res. Int*. 2015, 465056.

[17] Yao YF, Wang CS, Qiao J, Zhao GR, Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of salvianic acid A via an artificial biosynthetic pathway, *Metab. Eng*. 2013, 19: 79-87.

[18] Wei T, Cheng BY, Liu JZ, Genome engineering *Escherichia coli* for L-DOPA overproduction from glucose, *Sci. Rep*. 2016, 6: 30080.

[19] Chung D, Kim SY, Ahn JH, Production of three phenylethanoids, tyrosol, hydroxytyrosol, and salidroside, using plant genes expressing in *Escherichia coli*, *Sci. Rep*. 2017, 7: 2578.

[20] Huang Q, Lin Y, Yan Y, Caffeic acid production enhanced by engineering a phenylalanine over-producing Escherichia coli strain, *Biotechnol. Bioeng*. 2013, 110: 3188-3196.

[21] Bang HB, Lee YH, Kim SC, Sung CK, Jeong KJ, Metabolic engineering of *Eshcherichia coli* for the production of cinnamaldehyde, *Microb. Cell Fact*. 2016, 15: 16.

[22] McKenna R, Moya L, McDaniel M, Nielson DR, Comparing in situ removal strategies for improving styrene bioproduction, *Bioprocess Biosyst. Eng*. 2015, 38: 165-174.

[23] Lim CG, Fowler ZL, Hueller T, Schaffer S, Koffas, MAG, High-yield resveratrol production in engineered *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol*. 2011, 77: 3451-3460.

[24] Rodriguez A, Kildegaard KR, Li M, Borodina I, Nielson J, Establishment of a yeast platform strain for production of p-coumaric acid through metabolic engineering of aromatic amino acid biosynthesis, *Metab. Eng*. 2015, 31: 181-188.

[25] Zhang H, Stephanopoulos G, Engineering *E. coli* for caffeic acid biosynthesis from renewable sugars*, Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2013, 97: 3333-3341.

[26] Vargas-Tah A, Martinez LM, Hernandez-Chavez G, Rocha M, Martinez A, Bolivar F, Gosset G, Production of cinnamic and p-hydroxycinnamic acid from sugar mixtures with engineered *Escherichia coli, Microb. Cell Fact*. 2015, 14: 6.

[27] Lian J, McKenna R, Rover MR, Nielson DR, Wen Z, Jarboe LR, Production of biorenewable styrene: utilization of biomass-derived sugars and insights into toxicity*, J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. 2016, 43: 595-604.

[28] Ajikumar PK, Xiao WH, Tyo KE, Wang Y, Simeon F, Leonard E, Mucha O, Phon TH, Pfeifer B, Stephanopoulos G, Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Sci*. 2010, 330: 70-74.

[29] Yadav VG, De Mey M, Lim CG, Ajikumar PK, Stephanopoulos G, The future of metabolic engineering and synthetic biology: towards a systematic practice. *Metab. Eng*. 2012, 14: 233-241.

[30] Wu J, Du G, Zhou J, Chen J, Metabolic engineering of *Escherichia coli* for (2S)-pinocembrin production from glucose by a modular metabolic strategy. *Metab. Eng*. 2013, 16: 48-55.

[31] Chen XF, Xia XX, Lee SY, Qian ZG, Engineering tunable biosensors for monitoring putrescine in *Escherichia coli. Biotechnol. Bioeng.* 2018, 115: 1014-1027.

[32] Noh M, Yoo SM, Kim WJ, Lee SY, Gene expression knockdown by modulating synthetic small RNA expression in *Escherichia coli. Cell Syst*. 2017, 5: 418-426.

[33] Michener JK, Thodey K, Liang JC, Smolke CD, Applications of genetically-encoded biosensors for the construction and control of biosynthetic pathways. *Metab. Eng*. 2012, 14: 212-222.