

미생물에서의 방향족 화합물 생산을 위한 대사공학 연구의 최근 동향



Zi Wei Luo - KAIST Department of Chemical and Biomolecular Engineering PhD candidate

Sang Yup Lee - KAIST Department of Chemical and Biomolecular Engineering Distinguished Professor

1. 개요

심각한 기후 변화와 화석연료의 고갈에 대한 대응책으로 미생물을 이용하여 화석연료로부터 생산되는 화합물을 생합성하기 위한 미생물 대사공학 기술은 지난 몇 년간 큰 성장과 발전을 이뤘다. 대사공학과 합성생물학의 발전으로 바이오 연료, 유기산과 아미노산 등의 화합물을 효율적으로 생산하는 연구가 진행되었고, 그 중 방향족 화합물은 의약품, 향료, 다양한 플라스틱 등을 생산하기 위한 재료로 사용되고 있으며 (그림 1), 최근 미생물의 대사 경로 조작을 위한 목적 화합물로서 많은 연구가 진행되고 있다. 미생물을 이용하여 방향족 화합물을 생산하기 위해서는 일반적으로 두 가지 접근방법을 이용한다. 첫 번째는 식물이나 곰팡이와 같은 고등 생물이 자연적으로 보유하고 있는 방향족 화합물 합성 대사회로를 도입시켜주는 방법이고, 두 번째는 생물 정보학, 시스템 생물학, 합성생물학, 단백질 공학, 오믹스 기술 등의 발전을 통해 얻어진 정보로부터 자연계에서 합성하지

못했던 새로운 방향족화합물을 합성하는 방법이다. 두 번째 접근방법을 이용한 연구는 자연적으로 생산되지 않는 방향족화합물의 생산을 가능케 하기 때문에 이에 대한 관심이 지속적으로 증가하고 있다. 본 글에서는 최근 미생물을 이용한 방향족화합물 생산에 관한 연구의 동향에 대하여 소개하고자 한다.

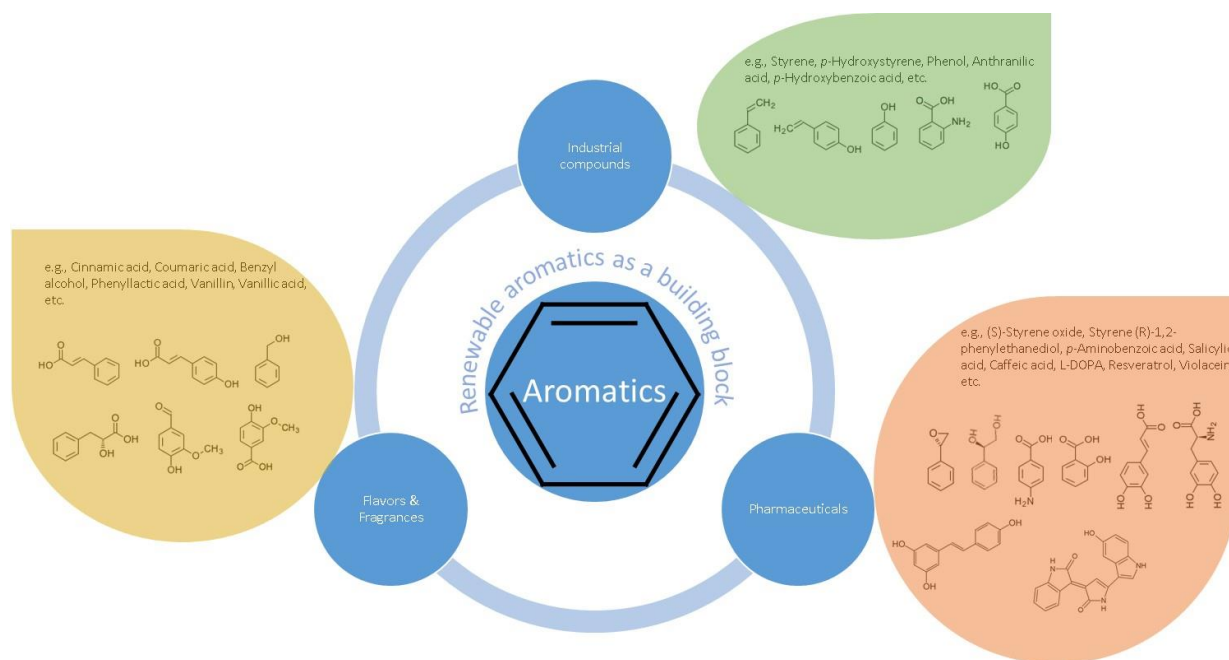


그림 1. 미생물을 통해 바이오매스로부터 생산되는 방향족 화합물

2. 방향족 아미노산 생산을 위한 전략

몇 가지 방향족 화합물들 (예를들어, malonyl-CoA로부터 유도되는 phloroglucinol)을 제외하고, 일반적으로 방향족 화합물은 shikimate 대사회로부터 유도되는 endogenous 전구체를 사용하는 대사회로를 거쳐 생산된다. 다양한 방향족 화합물을 생산하기 위한 대사회로는 일반적으로 aromatic amino acids (AAA) 생산 대사회로를 기반으로 한다. 대장균 내에는 L-tryptophan (L-TRP), L-phenylalanine (L-PHE) 및 L-tyrosine (L-TYR) 생산 대사회로 (그림 2)가 존재하며 최근 방향족 아미노산 생산량을 증가시키기 위한 연구가 많이 진행되고 있다. 방향족 아미노산을 생산하기 위한 대사공학적 전략들은 다음과 같다. (i)

직접적인 전구체인 phosphoenolpyruvate (PEP)과 erythrose-4-phosphate (E4P)의 생산 효율을 증대; (ii) shikimate 대사회로의 첫 효소인 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate (DAHP) synthase 도입, (iii) transcriptional regulation 및 allosteric regulation 제거; (iv) rate-limiting 효소를 탐색하고 해결, (v) 경쟁 대사회로를 결실; (vi) 방향족 화합물 export 강화; (vii) 방향족 화합물 분해 유전자 결실.

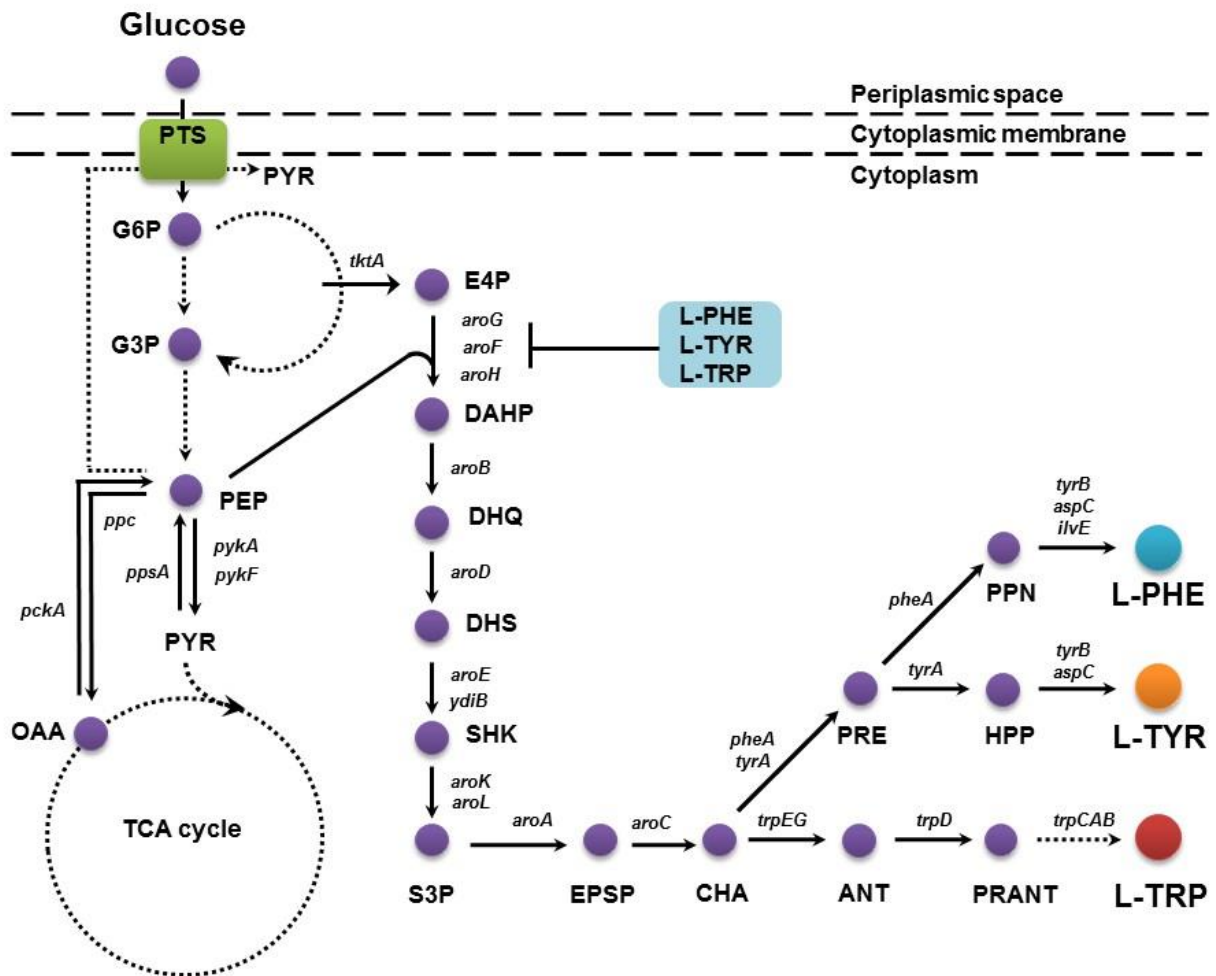


그림 2. 방향족 아미노산 생산 대사회로

3. 다양한 방향족 화합물 생산을 위한 대사경로 제작

대사경로에서 전구체로 쓰이면서도 독특한 기능을 하는 대사체를 다양하게 확보하는 것은 3-dehydroshikimate (3-DHS)에서 말단 AAA 산물에 이르기까지 기존에 생산되고 있거나 생산될 가능성이 있는 넓은 범위의 방향족 화합물의 생산을 가능하게 하는 요소이다. Chorismate는 강력하게 조절되는 대사분기에 포함되어 있어 수많은 방향족 대사경로에서 특히 유용한 전구체로 쓰인다. 4-수산기의 기능성이 보존된 페놀계열의 화합물은 L-TYR 분기에서 유래되며, 페놀, p-수산벤조산, 쿠마르산, 커피산, 페룰산, p-수산스티렌, 티로솔, 수산티로솔 이 이에 포함된다. L-PHE 분기로부터 뻗어나가는 경로로는 2-페닐에탄올, 계피산 스티렌, (S)-산화스티렌, (R)-1,2-페닐에타네디올, (S)-만델산과 (R)-만델산, 벤질알데히드와 같은 화합물을 생산하기 위한 경로가 개발되었다. L-TRP 분기에서는 비교적 그 수는 적지만 AAA경로에서 페닐젓산, 페닐아세트산, L-DOPA, 비올라세인과 디옥시비올라세인, 아베난스라아미드, 레스베라톨과 같이 고부가 가치의 화합물들이 유래되었다. 방향족 화합물의 생산에 관여하는 대사경로 개발에 있어서 최근에 각광받는 효율적인 접근방법으로는 대사경로의 일련의 여러 모듈로 나누는 방법이 있다. 최근에 개발된 주목 받을만한 기법으로는 생물기반 방향족 화합물 생산에 있어서 별개의 다중 경로를 하나의 최종 산물을 생산하기 위해 사용하는 기법이다. 이렇듯 다중 경로를 사용하면 여러 다른 전구체와 생산을 돕는 화학물질들을 사용하여 주요 생산경로가 지나는 한계를 뛰어넘기 위한 효과적인 선택지를 얻을 수 있게 된다.

4. 고찰

이미 알려진 효소의 기질 특이성을 조작하고 합성 생물학 기법을 이용함으로써 다양한 방향족 화합물 생합성 경로의 제작이 용이해졌다. 이와 같은 방법으로 기존에 생물기반으로 생산할 수 없었던 방향족 화합물의 생산이 가능해졌지만 화합물의 독성 및 값 비싼 전구체가 문제점으로 제시되고 있다. 본 문제들을 해결하기 위해 급격한 속도로 성장해 가고 있는 생명공학, 특히 합성 생물학과 시스템 생명공학의 발달이 효율적인 대사회로의 구축과 정제 기술의 발전을 촉진시켜 방향족 화합물 생산에 크게 기여 할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Cho C, Choi SY, Luo ZW, Lee SY: **Recent advances in microbial production of fuels and chemicals using tools and strategies of systems metabolic engineering.** *Biotechnology Advances* 2014.
2. Choi S, Song CW, Shin JH, Lee SY: **Biorefineries for the production of top building block chemicals and their derivatives.** *Metabolic Engineering* 2015, **28**:223-239.
3. Nielsen J, Larsson C, van Maris A, Pronk J: **Metabolic engineering of yeast for production of fuels and chemicals.** *Current Opinion in Biotechnology* 2013, **24**:398-404.
4. Gosset G: **Production of aromatic compounds in bacteria.** *Current Opinion in Biotechnology* 2009, **20**:651-658.
5. Santos CNS, Xiao W, Stephanopoulos G: **Rational, combinatorial, and genomic approaches for engineering L-tyrosine production in Escherichia coli.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012, **109**:13538-13543.
6. Achkar J, Xian M, Zhao H, Frost JW: **Biosynthesis of Phloroglucinol.** *Journal of the American Chemical Society* 2005, **127**:5332-5333.
7. Lütke-Eversloh T, Stephanopoulos G: **L-Tyrosine production by deregulated strains of Escherichia coli.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2007, **75**:103-110.
8. Gosset G: **Improvement of Escherichia coli production strains by modification of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system.** *Microbial Cell Factories* 2005, **4**:1-11.
9. Patnaik R, Liao JC: **Engineering of Escherichia coli central metabolism for aromatic metabolite production with near theoretical yield.** *Applied and Environmental Microbiology* 1994, **60**:3903-3908.
10. Draths KM, Pompliano DL, Conley DL, Frost JW, Berry A, Disbrow GL, Staversky RJ, Lievense JC: **Biocatalytic synthesis of aromatics from D-glucose: the role of transketolase.** *Journal of the American Chemical Society* 1992, **114**:3956-3962.
11. Rodriguez A, Martínez JA, Báez-Viveros JL, Flores N, Hernández-Chávez G, Ramírez OT, Gosset G, Bolivar F: **Constitutive expression of selected genes from the pentose phosphate and aromatic pathways increases the shikimic acid yield in high-glucose batch cultures of an Escherichia coli strain lacking PTS and pykF.** *Microbial Cell Factories* 2013, **12**:1-17.

12. Báez-Viveros JL, Osuna J, Hernández-Chávez G, Soberón X, Bolívar F, Gosset G: **Metabolic engineering and protein directed evolution increase the yield of L-phenylalanine synthesized from glucose in Escherichia coli.** *Biotechnology and Bioengineering* 2004, **87**:516-524.
13. Sprenger GA: **From scratch to value: engineering Escherichia coli wild type cells to the production of l-phenylalanine and other fine chemicals derived from chorismate.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2007, **75**:739-749.
14. Oldiges M, Kunze M, Degenring D, Sprenger GA, Takors R: **Stimulation, Monitoring, and Analysis of Pathway Dynamics by Metabolic Profiling in the Aromatic Amino Acid Pathway.** *Biotechnology Progress* 2004, **20**:1623-1633.
15. Cui Y-Y, Ling C, Zhang Y-Y, Huang J, Liu J-Z: **Production of shikimic acid from Escherichia coli through chemically inducible chromosomal evolution and cofactor metabolic engineering.** *Microbial Cell Factories* 2014, **13**:1-11.
16. Doroshenko VG, Shakulov RS, Kazakova SM, Kivero AD, Yampolskaya TA, Mashko SV: **Construction of an l-phenylalanine-producing tyrosine-prototrophic Escherichia coli strain using tyrA ssrA-like tagged alleles.** *Biotechnology Letters* 2010, **32**:1117-1121.
17. Liu Q, Cheng Y, Xie X, Xu Q, Chen N: **Modification of tryptophan transport system and its impact on production of l-tryptophan in Escherichia coli.** *Bioresource Technology* 2012, **114**:549-554.
18. Gu P, Yang F, Kang J, Wang Q, Qi Q: **One-step of tryptophan attenuator inactivation and promoter swapping to improve the production of L-tryptophan in Escherichia coli.** *Microbial Cell Factories* 2012, **11**:1-9.
19. Kim B, Park H, Na D, Lee SY: **Metabolic engineering of Escherichia coli for the production of phenol from glucose.** *Biotechnol J* 2014, **9**:621-629.
20. Williams TC, Aversch NJH, Winter G, Plan MR, Vickers CE, Nielsen LK, Krömer JO: **Quorum-sensing linked RNA interference for dynamic metabolic pathway control in Saccharomyces cerevisiae.** *Metabolic Engineering* 2015, **29**:124-134.
21. Vargas-Tah A, Martínez LM, Hernández-Chávez G, Rocha M, Martínez A, Bolívar F, Gosset G: **Production of cinnamic and p-hydroxycinnamic acid from sugar mixtures with engineered Escherichia coli.** *Microbial Cell Factories* 2015, **14**:1-12.
22. Zhang H, Stephanopoulos G: **Engineering E. coli for caffeic acid biosynthesis from renewable sugars.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2013, **97**:3333-3341.

23. Kang S-Y, Choi O, Lee JK, Hwang BY, Uhm T-B, Hong Y-S: **Artificial biosynthesis of phenylpropanoic acids in a tyrosine overproducing Escherichia coli strain.** *Microbial Cell Factories* 2012, **11**:1-9.
24. Qi WW, Vannelli T, Breinig S, Ben-Bassat A, Gatenby AA, Haynie SL, Sariaslani FS: **Functional expression of prokaryotic and eukaryotic genes in Escherichia coli for conversion of glucose to -hydroxystyrene.** *Metabolic Engineering* 2007, **9**:268-276.
25. Satoh Y, Tajima K, Munekata M, Keasling JD, Lee TS: **Engineering of a Tyrosol-Producing Pathway, Utilizing Simple Sugar and the Central Metabolic Tyrosine, in Escherichia coli.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2012, **60**:979-984.
26. Satoh Y, Tajima K, Munekata M, Keasling JD, Lee TS: **Engineering of l-tyrosine oxidation in Escherichia coli and microbial production of hydroxytyrosol.** *Metabolic Engineering* 2012, **14**:603-610.
27. Kang Z, Zhang C, Du G, Chen J: **Metabolic Engineering of Escherichia coli for Production of 2-phenylethanol from Renewable Glucose.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2014, **172**:2012-2021.
28. McKenna R, Nielsen DR: **Styrene biosynthesis from glucose by engineered E. coli.** *Metabolic Engineering* 2011, **13**:544-554.
29. McKenna R, Pugh S, Thompson B, Nielsen DR: **Microbial production of the aromatic building-blocks (S)-styrene oxide and (R)-1,2-phenylethanediol from renewable resources.** *Biotechnology Journal* 2013, **8**:1465-1475.
30. Sun Z, Ning Y, Liu L, Liu Y, Sun B, Jiang W, Yang C, Yang S: **Metabolic engineering of the L-phenylalanine pathway in Escherichia coli for the production of S- or R-mandelic acid.** *Microbial Cell Factories* 2011, **10**:1-13.
31. Kunjapur AM, Tarasova Y, Prather KL: **Synthesis and accumulation of aromatic aldehydes in an engineered strain of Escherichia coli.** *J Am Chem Soc* 2014, **136**:11644-11654.
32. A Berry TD, M Pepsin and W Weyler: **Application of metabolic engineering to improve both the production and use of biotech indigo.** *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 2002, **28**:7.
33. Sun X, Lin Y, Huang Q, Yuan Q, Yan Y: **A Novel Muconic Acid Biosynthesis Approach by Shunting Tryptophan Biosynthesis via Anthranilate.** *Applied and Environmental Microbiology* 2013, **79**:4024-4030.
34. Koma D, Yamanaka H, Moriyoshi K, Ohmoto T, Sakai K: **Production of Aromatic Compounds by Metabolically Engineered Escherichia coli with an Expanded Shikimate Pathway.** *Applied and Environmental Microbiology* 2012, **78**:6203-6216.

35. Muñoz AJ, Hernández-Chávez G, de Anda R, Martínez A, Bolívar F, Gosset G: **Metabolic engineering of *Escherichia coli* for improving L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) synthesis from glucose.** *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 2011, **38**:1845-1852.
36. Rodrigues AL, Trachtman N, Becker J, Lohanatha AF, Blotenberg J, Bolten CJ, Korneli C, de Souza Lima AO, Porto LM, Sprenger GA, Wittmann C: **Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of the antitumor drugs violacein and deoxyviolacein.** *Metabolic Engineering* 2013, **20**:29-41.
37. Eudes A, Juminaga D, Baidoo EEK, Collins FW, Keasling JD, Loqué D: **Production of hydroxycinnamoyl anthranilates from glucose in *Escherichia coli*.** *Microbial Cell Factories* 2013, **12**:1-10.
38. Lim CG, Fowler ZL, Hueller T, Schaffer S, Koffas MAG: **High-Yield Resveratrol Production in Engineered *Escherichia coli*.** *Applied and Environmental Microbiology* 2011, **77**:3451-3460.
39. Juminaga D, Baidoo EEK, Redding-Johanson AM, Batth TS, Burd H, Mukhopadhyay A, Petzold CJ, Keasling JD: **Modular Engineering of L-Tyrosine Production in *Escherichia coli*.** *Applied and Environmental Microbiology* 2012, **78**:89-98.
40. Masuo S, Osada L, Zhou S, Fujita T, Takaya N: ***Aspergillus oryzae* pathways that convert phenylalanine into the flavor volatile 2-phenylethanol.** *Fungal Genetics and Biology* 2015, **77**:22-30.