

Production of Biovanillin by Metabolically Engineered *Escherichia coli*.

윤상환, 이영미, 옥소원, 김정현, 김선원

경상대학교 식품영양학과

전화 (055) 751-5974, FAX (055) 751-5971 (김선원)

바닐린은 식·의약품에서 가장 널리 이용되는 풍미물질로서 최근 향산화 및 항균 활성 등의 생리활성이 보고되고 있다. 천연바닐린은 매우 고가이고, 생산량이 제한되어 있어 생물공학기술을 이용한 미생물로부터 바이오바닐린 생산이 주목받고 있다.¹ 미생물의 바닐린 생합성경로는 nonoxidative decarboxylation, side chain reduction, CoA-independent deacetylation, CoA-dependent deacetylation 경로가 보고되어 있다. CoA-dependent deacetylation 경로는 *Delftia acidovorans*, *Amycolatopsis* sp. strain HR167(HR104)등에서 보고되어 있고, 유전자도 일부 확인되어 있다. CoA-dependent deacetylation 경로는 feruloyl-CoA-synthetase를 coding하는 *fcs*와 enoyl-CoA-hydratase/aldolase를 coding하는 *ech*의 두 유전자만으로 페룰산으로부터 바닐린합성이 가능하다.^{2,3} *Amycolatopsis* HR104에서 PCR로 *fcs*와 *ech*유전자를 cloning하고, pDAHEF를 만들고 대장균에 도입하여 바이오바닐린 생산 재조합 대장균을 만들었다. 바닐린의 분석은 HPLC로 하였으며, Shimadzu 10Avp series, Symmetry C₁₈(250×4.6, 5μm, Waters) column, flow rate 1.0mL/min, mobile phase로 20mM NaOAc 및 MeOH를 이용하여 260nm에서 detecting 하였다. *E. coli* 배양조건은 2YT media, 37°C, 250RPM이었으며, pDAHEF의 최적조건을 위하여 inducer인 arabinose 농도와 induction 시기에 따른 배양 결과 fully induction농도인 0.2%에서 18시간 induction이 최적 조건으로 나타났다. 이는 균체가 lag phase에서 항균활성이 있는 바닐린이 생산됨으로서 성장이 저지되는 경향이 있는 것 같으며, 이에 따라 균체가 충분히 성장한 후 induction을 시키는 것이 전환율을 높일 수 있는 방법이라고 판단하였다. 또한 기질공급량에 따른 전환양상을 보기 위하여 0.05%부터 0.1%까지 기질 농도를 다르게 하여 배양한 결과, 기질의 양이 적을수록 높은 전환 수율을 보였으나, 바닐린의 생산은 기질의 공급량이 증가할수록 증가하다가 0.3%부터는 매우 낮은 전환율을 보여서, 많은 양의 바닐린을 생산하기 위해서는 이에 대한 보완이 있어야 할 것으로 생각되고, 약 50%의 전환 수율을 보인 0.1%에서 진행하기로 하였다. *E. coli*는 고농도의 ferulic acid에서 성장이 저해되는 경

향이 있으며, 이에 대하여 기질의 공급시기를 다르게 하여 배양한 결과는 18시간 즉, induction과 동시에 공급할 경우에 약 70%로서 가장 높은 전환양상을 보였다. 이로서, ferulic acid와 바닐린의 향균활성에 기인하여 균체가 충분히 성장한 후 inducer와 기질을 공급할 때 최대의 전환수율을 얻을 수 있는 것으로 결론지었다. 그러나 충분한 바닐린 생산량을 위해서는 기질의 공급을 증가시켜야 하고, 생산물인 바닐린에 대한 내성을 가진 균주를 획득하는 것이 요구되며, 또한 여러 대사 공학적 기법이나 분자진화기술을 이용하여 우수한 전환 능력을 가진 균주를 개발하여야 할 것이다.

References

1. H. Priefert, et. al., "Biotechnological production of vanillin"(2001), Appl. Microbiol. Biotechnol., 56, 296-314
2. Michael J. Gasson, et. al., "Metabolism of Ferulic Acid to Vanillin"(1998), J. Biol. Chem., 273(7), 4163-4170
3. S. Achterholt, et. al., "Identification of Amycolatopsis sp. strain HR167 genes, involved in the bioconversion of ferulic acid to vanillin"(2000), Appl. Microbiol. Biotechnol., 54, 799-807