Kor. J. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 37, No. 4, 306–315(2009)

화이트바이오텍기반 방향족화합물 개발에 관한 연구동향

이진호*
경성대학교 식품생명공학과, 공학기술연구소 겸임연구원

Research Trend about the Development of White Biotech-Based Aromatic Compounds. Lee, Jin-Ho*. *Department of Food Science & Biotechnology, Kyungsung University, Busan 608-736, Korea* – Due to the depleting petroleum reserve, recurring energy crisis, and global warming, it is necessary to study the development of white biotech-based aromatic chemical feedstock from renewable biomass for replacing petroleum-based one. In particular, the production of aromatic intermediates and derivatives in biosynthetic pathway of aromatic amino acids from glucose might be replaced by the production of petrochemical-based aromatic chemical feedstock including benzene-derived aromatic compounds. In this review, I briefly described the production technology for hydroquinone, catechol, adipic acid, shikimic acid, gallic acid, pyrogallol, vanillin, *p*-hydroxycinnamic acid, *p*-hydroxystyrene, *p*-hydroxybenzoic acid, indigo, and indole 3-acetic acid using metabolic engineering, bioconversion, and chemical process. The problems and possible solutions regarding development of production technology for competitive white biotech-based aromatic compounds were also discussed.

Key words: Aromatic compound, industrial biotechnology, petroleum, biomass

서 론

석유자원에서 생산되는 산업의 쌀로서 중요한 역할을 하는 석유화학제품은 원유의 고갈, 국제유가의 지속적인 상승, 화석원료의 사용에 의한 지구 온난화, 국제 환경규제의 강화등의 위협요인에 직면해있다. 최근 미국·유럽등 주요 선진국가들은 이러한 어려움에 대응하여 지속 가능한 산업기반 구축과 21세기 지식기반 바이오경제(knowledge-based bioeconomy)의 초석을 다지기 위해 화학제품 원료인 석유대신 바이오매스(biomass)를 이용하여 화학원료(chemical feedstock)제품, 연료, 플라스틱등을 생산하는 석유화학산업과 산업바이오(industrial or white biotechnology)가 융합된 바이오화학산업을 육성하기 위한 정책을 수립하고 정부의 적극적인 지원하에 이에 필요한 기술개발이 매우 활발히 진행되고 있는 상황이다[15, 16, 17].

석유화학물질 유래의 방향족화합물(aromatic compounds)은 전세계적으로 연간 약 3,500만톤 이상 생산되는 거대시장을 이루는 화합물[18]로서 납사분해과정에서 생기는 벤젠(benzene), 톨루엔(toluene), 크실렌(xylene)으로부터 대부분 만들어진다[20]. 특히, 벤젠은 각종 화학원료제품의 합성에 이용되는 매우 중요한 물질로 에틸벤젠(ethylbenzene), 큐멘(cumene), 페놀(phenol), 사이클로헥산(cyclohexane), 아닐린(aniline), 아디프산(adipic acid), 카프로락탐(caprolactam), 클로로벤젠(chlorobenzene)등의 합성에 사용된다(Fig. 1)[20]. 그러나, 벤젠은 위에서 언급한 거시적인 문제점에 덧붙여 급성골수성 백혈병(acute myeloid leukemia), 비호지킨림프종(non-Hodgkin's lymphoma)과 연관된 건강학적인 문제를 야기시키는 대표적인 발암성 유해물질이다[19]. 따라서, 벤젠등의 유해한 방향족화합물 대신에 재생가능한(renewable) 바이오매스를 원료로 생물공학적 기술을 이용해 화학원료들을 생산하는 기술개발이 필요하다.

방향족화합물 생합성 대사는 트립토판, 페닐알라닌, 티로신, 엽산(folic acid), ubiquinone, menaquinone, bacteriocin과 같은 방향족 아미노산(aromatic amino acid, AAA), 비타민, siderophores 등을 생산하는 중요한 대사경로이며, 또한 중간대사체인 3-deydroquinic acid, 3-dehydroshikimic acid, shikimic acid, chorismic acid, 인돌 및 그 유도체들은 벤젠 유래 화학원료물질, 의약품, 화장품, 식품, 염료, 농약, 폴리머, 기타 특수소재등에 직, 간접적으로 광범위하게 응용될 수 있는 매우 유용한 대사산물이다[2, 7, 21, 27, 41].

본 고는 방향족화합물 생합성 대사산물 중에서 벤젠등으로부터 화학적으로 합성되는 화학원료들 중에서 재생가능한 바이오매스로부터 미생물 및 효소들을 이용한 생물공학적 방법으로 대체할 수 있는 화학원료제품(Fig. 2)들을 중심으로 최근의 방향족화합물 생산 미생물을 어떻게 개발하고 있는지를 소개하고, 그 문제점을 극복하기 위한 방안등을 살펴보고자 한다.

*Corresponding author
Tel: 82-51-663-4716, Fax: 82-51-622-4986
E-mail: jhlee83@ks.ac.kr

본 론

벤젠유래 화학원료물질

납사분해과정에서 생기는 벤젠은 에틸벤젠, 큐멘, 페놀, 사이클로헥산, 아닐린, 아디프산, 카프로락탐, 클로로벤젠등의 합성원료로 사용된다(Fig. 1)[20]. 그 중에서 50% 이상은 폴리머 및 플라스틱의 원료인 스티렌(styrene)에 이용되는 에틸벤젠의 합성에 사용된다. 20%는 큐멘을 거쳐서 페놀의 합성에 사용되며, 약 15%는 나일론의 화학원료인 사이클로헥산의 합성에 사용된다. 한편, 페놀은 bisphenol-A, 페놀수지, 카프로락탐, 아닐린, 알킬페놀, 살리실산, catechol, hydroquinone, *p*-hydroxybenzoic acid등 범용화학, 정밀화학 및 특수화학제품의 원료물질을 생산하는데 사용되며, 합성섬유, 합성고무, 플라스틱, 제약, 살충제, 향신료, 염료, 코팅 등 다양한 분야에 광범위하게 적용된다.

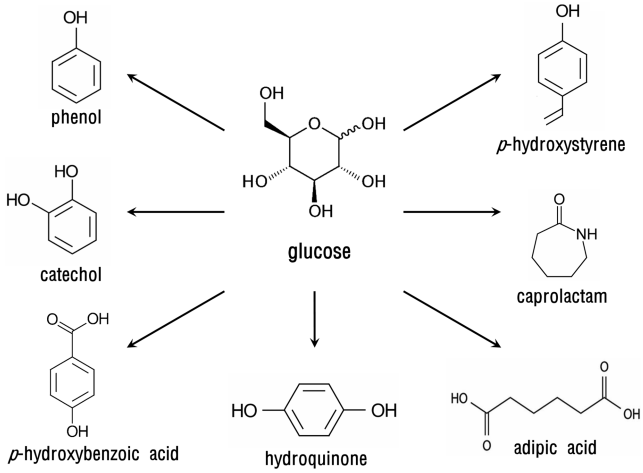

Fig. 2. Bio-based chemical feedstocks derived from glucose [19].

방향족화합물 생합성 대사경로

모든 생명체에서 전체적인 방향족아미노산 생합성 대사경로는 phosphoenolpyruvate(PEP)와 erythrose 4-phosphate (E4P)의 축합반응에 의해 생성되는 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate(DAHP)로부터 시작하여 chorismic acid까지의 공통경로와 chorismic acid로부터 L-tryptophan, L-tyrosine, L-phenylalanine이 생합성되는 분지경로로 구성되어 있다(Fig. 3)[2, 7, 21, 41]. 대장균에서 AAA 생합성 대사경로의 첫단계 효소인 DAHP synthase는 효소활성이 각각 tyrosine, phenylalanine, tryptophan에 의해 feedback inhibition을 받는 AroF, AroG, 및 AroH 3가지가 존재한다. 이들 3가지 아미노산에 의해 저해를 받지 않는 변이 단백질들에 대한 연구가 많이 되었으며, 이러한 변이 유전자를 도입하여 AAA를 생산하는 응용연구가 많이 되고 있다[26, 38, 47]. 분지경로의 경우 TrpE/D(anthranilate synthase), PheA(chorismate mutase/prephenate dehydratase), TyrA(chorismate mutase/prephenate dehydrogenase) 단백질이 각각 tryptophan, phenylalanine, tyrosine에 의해 feedback inhibition을 받는다. AAA 생합성경로의 유전자들은 대표적인 조절단백질인 TyrR 또는 TrpR에 의해서 transcriptional repression을 받는다. TrpR에 의해서 조절은 받는 유전자들은 *aroH, trp* operon, *aroLM, tyrB, aroP, mtr, tyrP* 등이 있으며, TyrR에 의해서 조절을 받는 유전자들은 *aroF-tyrA, aroG, aroLM, tyrB, aroP, mtr, tyrP* 등이 있다. 또한,

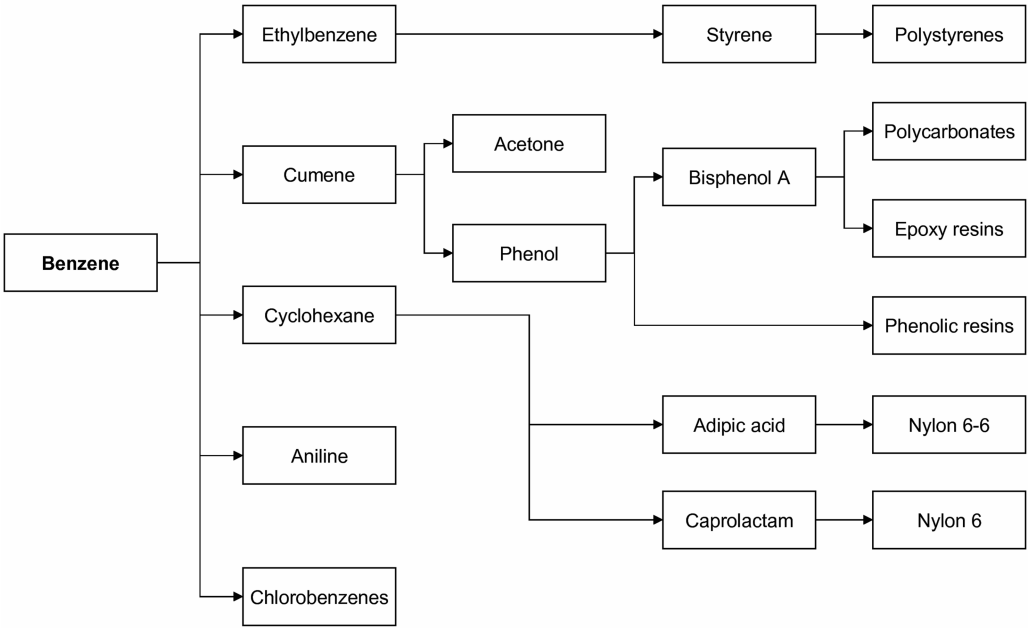

Fig. 1. Major commodity chemicals and polymers derived from benzene [20].

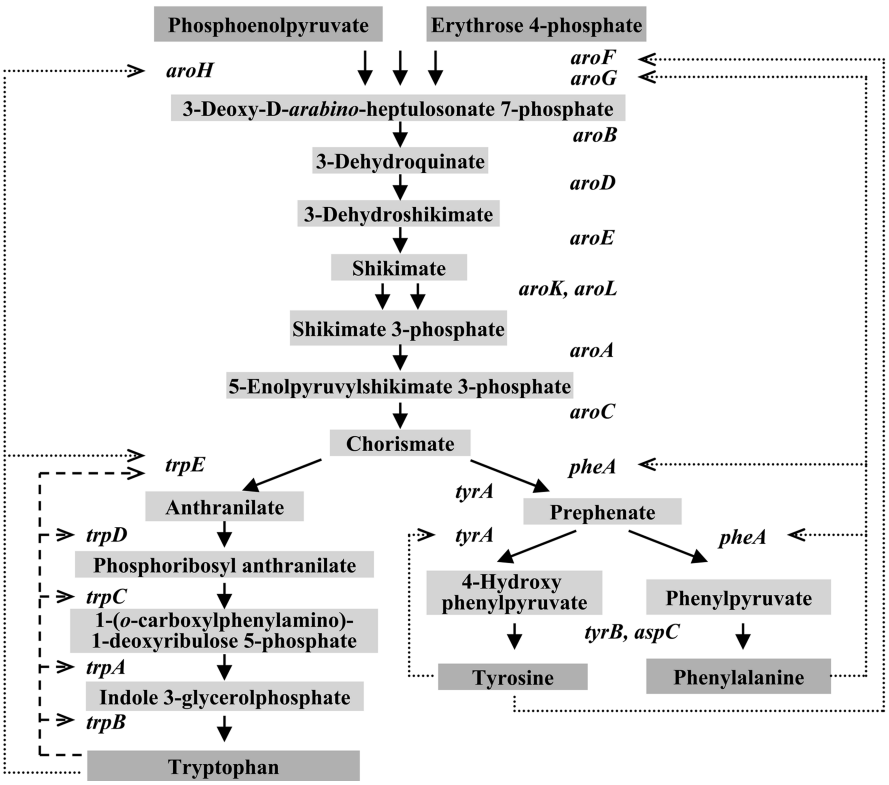

Fig. 3. Biosynthetic pathway and regulations of aromatic amino acids in *Escherichia coli*. The dotted lines and the dashed lines indicate feedback inhibition and repression, respectively. Symbols for genes follow mostly the *E. coli* K-12 linkage map [21].

trp operon과 *pheA*는 attenuation 기작에 의해서 추가적으로 그 유전자 발현이 조절을 받는다[21, 41].

화이트바이오텍기반 방향족화학원료 합성경로

현재 생물학적인 공정으로 대체할 가능성이 있는 방향족 화학원료로는 공통경로에서 유래되는 hydroquinone, catechol, adipic acid, shikimic acid, gallic acid, pyrogallol, vanillin과 chorismic acid 분지경로에서 유래되는 *p*-hydroxycinnamic acid, *p*-hydroxystyrene, *p*-hydroxybenzoic acid, salicyclic acid, *p*-aminobenzoic acid, indigo, indole 3-acetic acid 등이 있다(Fig. 4, 5)[2, 4, 7, 27]. Shikimic acid의 경우 AAA 생합성 대사경로의 중간체로 직접 생산되며, catechol, vanillin, gallic acid, pyrogallol, *p*-hydroxycinnamic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, indigo 및 indole 3-acetic acid 등은 이종 또는 동종의 유전자들을 과발현시켜 생산할 수 있으며, hydroquinone, catechol, adipic aicd의 경우 발효법과 화학적 합성법을 병행하여 이용하며, *p*-hydroxystyrene의 경우 발효법, 효소전환법 및 화학적 합성법을 함께 사용하여 생산될 수 있다.

화이트바이오텍기반 방향족화학원료의 생산

Hydroquinone(Benzene-1,4-diol) **생산**: Hydroquinone(HQ)은 필름현상액, anthraquinone 염료, azo 염료, 암모니아 생산에 사용되는 탈황 혼합용매(desulfurization co-solvent), 고무 산화방지제, 아크릴산(acrylic acid) 및 MMA(methyl methacrylate) 모노머(monomer)의 중합억제제(polymerization inhibitor), 코팅 안정제, 가솔린 산화방지제등에 사용된다[18]. 2004년 세계 HQ 수요는 약 4만4000톤 수준이며, 벤젠에서 유래된 페놀의 peroxide oxidation법 또는 1,4-diisoprppylbenzene의 Hock oxidation법에 의해서 생산되고 있다[37].

재생가능한 자원으로부터 HQ가 합성되는 경로는 재조합 미생물에 의해 포도당에서 quinic acid(QA)가 생합성되는 과정과 화학적 합성과정에 의해 QA로부터 HQ가 합성되는 2단계 과정을 통해서 진행된다(Fig. 4)[37]. 먼저 AAA 생합성 대사경로의 공통경로 중간대사체인 3-dehydroquinate (DHQ)를 축적하기 위해서 염색체상 *aroD* 변이(*aroD352*)에 기인한 3-dehydroquinate dehydratase 효소 활성이 소실된 균주를 제작하고, DAHP로부터 DHQ 합성을 촉매하는 DHQ synthase 활성을 증가시키기 위해서 *aroB*를 추가적으로 1 copy 더 염색체상 *serA* 중간부위에 삽입된 균주를 제작하였다(*E. coli* QP1.1). 한편, 축적된 DHQ는 *Klebsiella pneumoniae* 유래의 dehydroquinate dehydrogenase(유전자 *qad*에 의해 암호화) 촉매에 의해서 QA가 생합성될 수 있다. 또 다른 경로는 대장균 유래의 shikimic acid dehydrogenase가 부반응으로 DHQ를 QA로 환원시키는 활성이 알려져 있

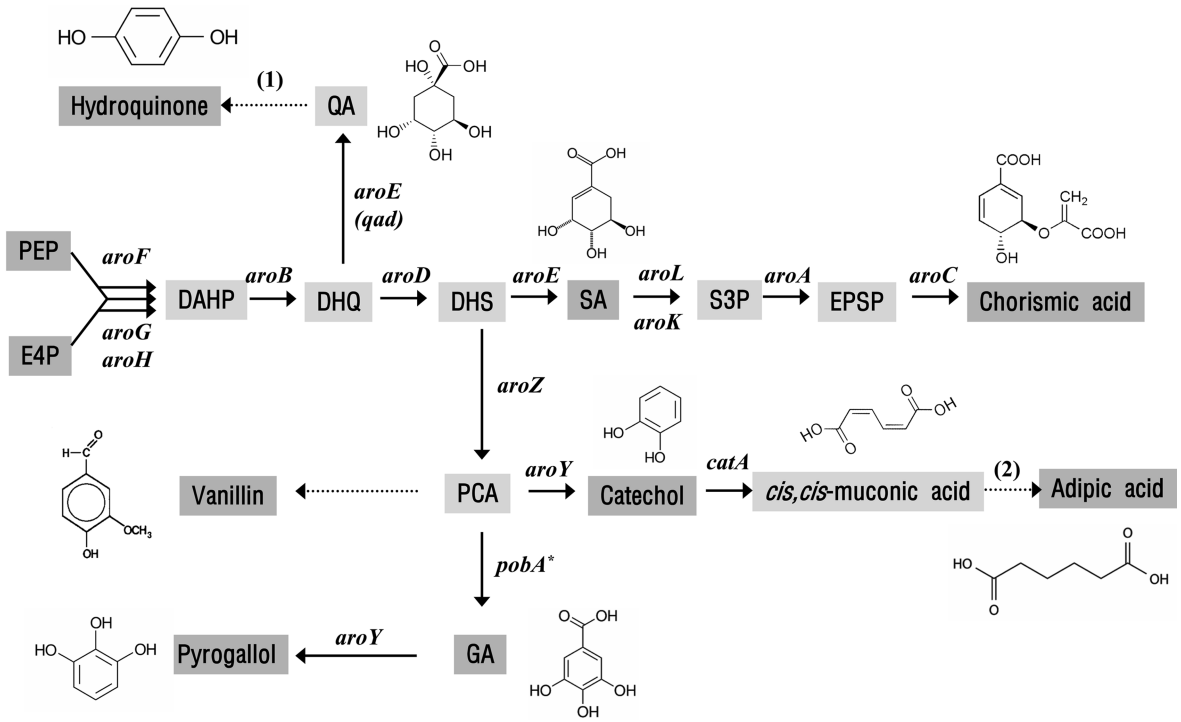

Fig. 4. Pathway of aromatic amino acid biosynthesis to chorismic acid in *E. coli* and heterologous pathways to hydroaromatic and aromatic compounds derived thereof. Abbreviations: E4P, erythrose-4-phosphate; PEP, phosphoenolpyruvate; DAHP, 3-deoxy-d-arabino-heptulosonate-7-phosphate; DHQ, 3-dehydroquinic acid; DHS, 3-dehydroshikimic acid; SA, shikimic acid; S3P, shikmate-3-phosphate; EPSP, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate; QA, quinic acid; PCA, protocatechuate; GA, gallic acid. Genes: *aroF*, DAHP synthase (l-tyr); *aroG*, DAHP synthase (l-phe); *aroH*, DAHP synthase (l-trp); *aroB*, DHQ synthase; *aroD*, DHQ dehydratase; *aroE*, shikimate dehydrogenase; *aroL*, shikimate kinase II; *aroK*, shikimate kinase I; *aroA*, EPSP synthase; *aroC*, chorismate synthase; *qad*, dehydroquinate dehydrogenase; *aroZ*, dehdroshikimate dehydratase; *aroY*, protocatechuate decarboxylase; *pobA**, mutant p-hydroxybenzoate hydroxylase; *catA*, catechol 1,2-dioxygenase. (1) Chemical synthesis of hydroquinone by addition of $(NH_4)_2Ce(SO_4)_3$. (2) Adipic acid synthesis by hydrogenation with 10% Pt on carbon at 3,400 kPa H_2 pressure [27].

는데, Ran과 Frost 등은 *aroE* 유전자를 plasmid에 cloning하여 QA를 축적시키는 결과를 얻었다[37]. 이 재조합 plasmid에 AAA 생합성경로의 첫단계 생성물인 DAHP로의 탄소흐름을 끌어오기 위해서 tyrosine에 의한 feedback inhibition인 해제된 $AroF^{FBR}$의 유전자와 *serA* 유전자를 함께 도입한 벡터 pKD12.138을 제작하고, 이를 *E. coli* QP1.1에 형질전환하여 QA생산 재조합 대장균을 개발하였다. 탄소원으로 포도당을 사용하여 발효를 통해 48시간에 49 g/L QA, 20% mol/mol 수율을 얻었다. 한편, 최종적으로 QA로부터 HQ를 합성할 수 있는 방법은 암모니아 이온이 제거된 발효액으로부터 sodium hypochlorite(NaOCl)를 이용한 산화적 탈탄산화법(oxidative decarboxylation), 전기화학적 산화방법, 금속이온을 이용한 chloride-free oxidative decarboxylation 방법이 보고되었는데, 특히, 금속이온 $(NH_4)_2Ce(SO_4)_3$를 이용한 산화적 탈탄산화 반응을 거쳐 HQ 합성수율 91%를 얻었다.

Catechol(pyrocatechol, 1,2-dihydroxybenzene) **생산**: Catechol은 농약 및 의약품을 생산하는 중간체로 사용될 뿐만 아니라 향수, 염료, 감광성 소재(photosensitiv meaterial), 전기도금제품(electroplating material), 특수잉크, 산화방지제, 살균제, 광안정제(light stabilizer), 방식제(anticorrosive agent) 및 프로모터(promoter)를 생산하는데 사용된다[18]. 2004년 기준으로 세계 catechol 생산량은 2만5000톤 수준이며, 현재 벤젠에서 유래된 페놀로부터 H_2O_2를 사용하여 hydroxylation 시켜 만들어지는 hydroquinone과 catechol의 혼합물에서 증류하여 얻는다[31].

미생물학적 catechol 생산방법은 3-dehydroshikimate(DHS)를 생산하는 대장균에 *Klebsiella pneumoniae* 유래의 각각 3-dehydroshikimate dehydratase와 protocatechuate decarboxylase를 암호화하는 *aroZ* 및 *aroY*를 도입하여 미생물에서 생산될 수 있다(Fig. 4)[31]. 그러나, 세포에 대한 catechol의 강한 독성때문에 직접발효법으로 생산하는 방법은 부적절하여 그 대안으로 배양 과정중에 생합성되는 catechol만을 resin에 흡착/추출하고 세포를 다시 공급하는 in situ resin-based extraction법으로 배양액내 catechol농도를 2.5 g/L 이하로 낮게 유지하는 방법이 개발되었다. 또 다른 방법은, 발효과정에 중간물질로 축적되는 DHQ 또는 DHS는 세포에 대한 독성이 없으며 protocatechuate(PCA)는 catechol에 비해 상대

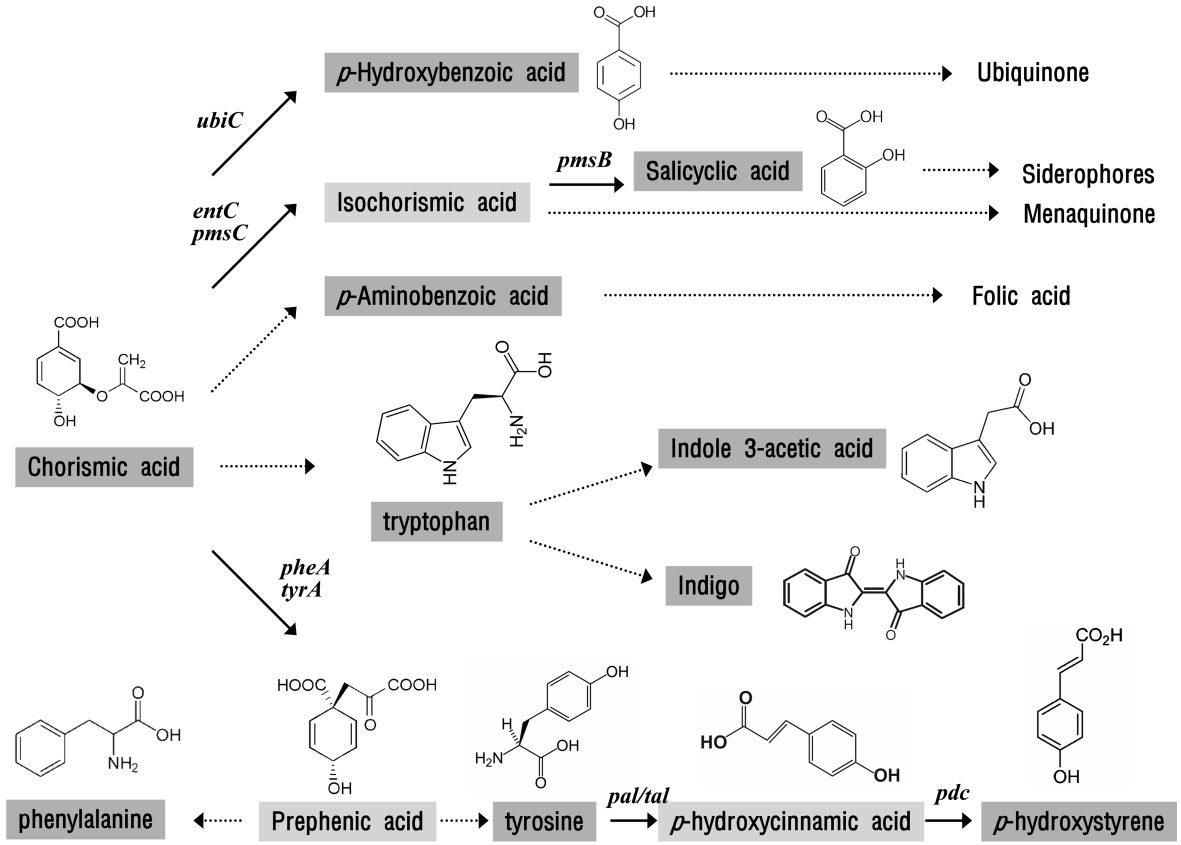

Fig. 5. Pathway of aromatic amino acid biosynthesis from chorismic acid in *E. coli* and heterologous pathways to hydroaromatic and aromatic compounds derived thereof. Abbreviations: *pheA*, chorismate mutase-prephenate dehydratase; *tyrA*, chorismate mutase-prephenate dehydrogenase; *pal/tal*, phenylalanine/tyrosine ammonia lyase; *pdc*, *p*-hydroxystyrene decarboxylase; *ubiC*, chorismate pyruvate-lyase; *entC/pmsC*, isochorismate synthase; *pmsB*, isochorismate pyruvate lyase [41].

적으로 독성이 낮은 물질이기 때문에, 미생물에 대한 독성이 없거나 상대적으로 낮은 DHQ, DHS, PCA를 각각 생산하는 재조합 미생물을 개발하고 이를 화학적인 방법을 이용하여 catechol을 합성하는 방법이 보고되었다[29, 30, 31]. 그 중에서 catechol 생산 효율이 가장 높은 공법은 PCA 생산 경로를 거치는 방법이다. AAA 생합성 공통경로 중간대사체인 DHS를 축적하기 위해서 대장균 염색체상 *aroE* 변이(*aroE353*)에 기인한 shikimate dehydrogenase 효소 활성이 소실된 균주를 제작하고(*E. coli* AB2834), DHQ 합성을 촉진하고 DAHP로부터 탈인산화된 DAP(3-deoxy-D-arabino-heptulosonate)의 생성을 방지하기 위해 *aroB*를 추가적으로 1 copy 더 염색체상 *serA* 중간부위에 삽입된 균주를 제작하였다(*E. coli* KL3). 한편, DHS로부터 PCA의 합성을 촉매하는 3-dehydroshikimate dehydratase 유전자 *aroZ*, PEP, E4P 및 DAHP pool을 증가시키키 위한 목적으로 유전자 *ppsA*, *tktA* 및 $aroF^{FBR}$, plasmid의 안정성 부여 및 염색체상 파괴된 *serA*를 복원하기 위한 목적으로 유전자 *serA*를 모두 한 plasmid에 cloning하여 벡터 pWL2.46B를 만들고, 이를 *E. coli* KL3에 형질전환하여 PCA를 생산하는 재조합 대장균을 개발하였다. 그 결과, 탄소원으로 포도당을 사용하여 발효를 통해 48시간에 41 g/L PCA, 부산물로 DAH 15 g/L을 얻었다. 축적되는 PCA의 독성문제를 해결하기 위해 PCA 추출효율이 높은 AG-1 X8 resin으로 packing된 column을 이용한 resin-based extraction법으로 배양액내 PCA농도를 13 g/L 이하로 유지하면서 발효할 경우 PCA 농도 71 g/L, 발효수율 49%, DAH 16 g/L의 결과를 얻었다. 최종적으로, 수용액상에서 PCA를 290°C 이상으로 가열하면 90%이상의 수율로 catechol이 합성되었다.

Adipic acid(butane-1,4-dicarboxylic acid) **생산**: 아디핀산은 주로 나일론(nylon) 66, 가소제, 그리스(grease), PU (polyurethane) 제조용으로 사용되고 있으며, 2005년 기준 세계시장 규모는 약 250만톤에 이르는 거대품목이다[14, 20]. 현재 benzene으로부터 cyclohexane, cyclohexanol, cyclohexanone을 거쳐서 합성되는데, 환경규제, 건강상의 규제, 지정학적인 문제뿐만 아니라 제조과정에서 부산물로 생기는 N_2O에 의한 오존결핍 및 지구온난화에 기여하는 문제가 발생한다. 따라서, 벤젠대신에 포도당으로부터 adipic acid를 생산하는 기술개발이 필요한 상황이다. Wei와 Frost 등은 재조합 대장균을 이용하여 1단계로 *cis,cis*-muconic acid를 생산하고, 2단계로 화학공정을 통한 adipic acid 생산기술을 개

발하였다(Fig. 4)[34].

AroE 효소활성이 상실된 *E. coli* AB2834의 염색체내에 유전자 *serA* 및 *lacZ*부위 안에 각각 *aroBaroZ* 및 *tktAaroZ* 유전자들을 삽입한 *E. coli* WN1를 제작하였다. 한편, PCA를 catechol로 전환시키는 *K. pneumoniae* 유래의 protocatechuate decarboxylase 유전자 *aroY,* catechol로부터 *cis,cis*-muconic acid의 합성을 촉매하는 *Acinetobacter calcoaceticus* 유래의 catechol 1,2-dioxygenase 유전자 *aroZ,* 그리고 *aroF*^{FBR} 및 *serA*를 모두 한 plasmid에 cloning하여 벡터 pWN2.248을 만들고, 이를 *E. coli* WN1에 형질전환하여 *cis,cis*-muconic acid를 생산하는 재조합 대장균을 개발하였다. 그 결과, 탄소원으로 포도당을 사용하여 발효를 통해 *cis,cis*-muconic acid 36.8 g/L, 수율 22%, 그리고 부산물로 DHS 3 g/L, catechol 1.6 g/L을 얻었다. 발효배양액을 활성탄 및 여과법으로 세포를 제거한 액에 10% 백금촉매(Pt on carbon)를 이용하여 3,400 kPa의 수소가스 압력에서 수소화 반응을 시켜 97% 수율로 adipic acid를 얻었다.

Shikimic acid **생산**: Shikimic acid는 기능성을 가진 6개의 탄소 환상구조와 3개의 비대칭성 중심을 가지기 때문에 생물학적으로 중요한 화합물 합성의 building block으로 사용되고 있다(Fig. 4). 그 예로, 조류독감바이러스 치료제인 Tamiflu 합성의 출발물질로 사용되고 있으며, combinatorial library synthesis의 핵심 골격물질로 이용되며, 또한 수분이 거의 없는 상황에서 고온가열처리하여 phenol 합성에 이용될 수 있다[12]. 과거에는 중국의 전통 향신원료인 팔각(star anise)에서 추출하였는데 원료공급의 부족, 제조공정의 번거러움 및 낮은 수율때문에, 재조합 미생물에 의한 생산 연구가 많이 보고되고 있다[6, 27, 48]. Shikimic acid를 생산하는 미생물을 개발하는 방법은, AAA 생합성 공통경로상에서 축적되는 shikimic acid를 shikimate 3-phosphate(S3P)로 전환시키는 shikimate kinase 유전자를 제거하여 생산하는 방법과 S3P를 EPSP(5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate)로 전환을 촉매하는 EPSP synthase(AroA) 결손 미생물을 제작하고 세포내의 bacterial phosphatases 활성을 이용하여 shikimic acid를 생산하는 2가지 개발방법이 알려져 있다[27]. Shikimate kinase 결손 미생물에 의한 shikimic acid를 생산하는 대표적인 방법은, 대장균 염색체에서 shikimate kinase를 암호화하는 2가지 유전자인 *aroK* 및 *aroL*을 결손하고, *serA*를 결손하면서 *aroB*유전자를 1copy 삽입한 *E. coli* SP1.1을 제작하고, DAHP의 기질인 PEP의 공급을 잘하기 위해서 포도당 phosphoenolpyruvate-phosphotransferase system(PTS)에 관여하는 *ptsH, ptsI, crr*유전자를 결손하여 *E. coli* SP1.1*pts* 균주를 제작하였다. 한편, hydroquinone 생산균주 제작에서 언급된 plasmid pKD12.138에 포도당의 세포내 수송시 facilitated diffusion을 매개하며 PEP를 사용하지 않고 직접 인산화시키는 *Zymomonas mobilis* 유래의 *glf-glk*(glucose facilitator 및 glucose kinase를 암호화하는 유전자)를 cloning하여 최종적으로 pSC6.090B를 제작하고 *E. coli* SP1.1*pts* 균주에 형질전환하여 shikimic acid를 생산하는 재조합대장균을 개발하였다. 그 결과, 10-L 발효조에서 shikimic acid 84 g/L, 수율 33%의 매우 높은 기술수준을 얻었다. 그런데, 생산되는 shikimic acid는 DHQ, DHS와의 평형반응 및 AroE의 부반응에 의해 QA로의 전환이 이루어져서 부산물로 DHS 10 g/L, QA 2 g/L가 생성되는 문제점이 나타나는데, 향후 이러한 부산물을 더 감소시킬 수 있는 연구가 필요한 상황이다.

p-Hydroxybenzoic acid(pHBA) **생산**: pHBA는 방부제 및 보존제로 사용되는 parabens 합성에 사용되며, 타이어의 방부제로의 수요가 증가하는 상황이며, 최근에는 결정과 액체의 성질을 모두 가진 기능성 소재인 액정고분자(liquid crystal polymers)의 major monomer로 사용되는 석유화학원료물질로, 현재 페놀로부터 고온, 고압하에 상당량의 부산물이 생기면서 화학적으로 합성(Kolbe-Schmidt reaction)된다[1, 20].

포도당으로부터 생물학적인 방법으로는 얻는 방법은 *E. coli* 유래의 chorismate pyruvate-lyase(CPL) 유전자 *ubiC*를 *E. coli, Mycobacterium tuberculosis* 또는 식물체인 *Nicotiana tabacum*의 엽록체 게놈에 도입하여 chorismate로부터 pHBA를 생합성하는 방법[1, 33, 40, 46], 유기용매 내성 *Pseudomonas putida* S12에 *Rhodosporium turuloides* 유래의 phenylalanine ammonia lyase 유전자를 도입하여 tyrosine으로부터 pHBA를 생산하는 방법등이 알려져 있다(Fig. 5)[44]. 대장균에서 pHBA를 생산하기 위해서는 먼저 chorismate에서 곁가지로 빠지는 경로를 차단하기 위해 chorismate mutase-prephenate dehydratase를 암호화하는 *pheA*, chorismate mutase-prephenate dehydrogenase를 암호화하는 *tyrA*, anthranilate synthase를 암호화하는 *trpE~C* 유전자들이 결손된 대장균을 제작하고 여기에 방향족 공통경로의 탄소흐름을 증가시키기 위해 *serA* 유전자 부위에 tac promoter에 연결된 *aroA, aroL, aroC, aroB* 유전자를 추가적으로 1copy 더 삽입한 재조합 *E. coli* JB161을 개발하였다[1]. 한편, chorismate로부터 pHBA의 합성을 촉매하는 효소의 유전자 *ubiC*는 *aroF*^{FBR}, *tktA* 및 *serA*와 함께 plasmid에 cloning하여 벡터 pJB2.274을 만들고, 이를 *E. coli* JB161에 형질전환하여 pHBA를 생산하는 재조합 대장균을 개발하였다. 그 결과, 탄소원으로 포도당을 사용하여 발효를 통해 pHBA 12 g/L, 수율 13%, 그리고 부산물로 prephenic acid 6.3 g/L, phenylalanine 4.1 g/L, DHS 1.4 g/L가 축적되었다. 생성되는 pHBA는 세포에 대한 독성이 심하며, 낮은 농도에서도 UbiC 효소의 대한 강한 feedback inhibition을 일으키는 문제점이 나타났다[13, 25]. 또한, chorismate로부터 방향족 아미노산 합성경로를 차단하더라도 비효소적인 반응에 의해서 prephenate가 생기며, 추가적인 효소반응에 의해서 phenylpyruvate, phenylalanine등이 축적되는 문제점도 있어 pHBA

생산효율이 높지 않은 상황이다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서 Suzanne 등은 유기용매 내성 *P. putida* S12 미생물을 이용하여 pHBA를 생산하는 결과를 보고하였다[44]. 즉, 기질로부터 tyrosine을 합성하는 탄소흐름이 증가되어 있으며, 생성되는 pHBA의 분해에 관여하는 *pobA*(p-hydroxybenzoate hydroxylase 유전자)가 결손된 *P. putida* S12palB1 미생물에 phenylalanine ammonia lyase를 과발현하여 tyrosine으로부터 *p*-coumarate(4-hydroxycinnamic acid)로 전환시킨 후 세포내 원래 존재하는 효소들에 의해서 최종적으로 pHBA가 축적되는 재조합 *Pseudomonas*를 개발하였다. 그 결과 glycerol을 탄소원으로 이용하여 pHBA 1.8 g/L, 수율 8.5%의 결과를 보고하였지만, 대장균을 이용한 Barker 등의 연구결과보다는 매우 낮은 수준이다[1]. 한편, Viitanen 등은 식물체인 담배의 엽록체내 게놈에 *E. coli ubiC* 유전자를 삽입/발현하여 건체중량으로 13~18%의 glucose-conjugative form의 pHBA를 생산하는 연구결과를 발표하였다[46]. 비록 현재는 그 수율이 낮지만 향후 추가적인 기술개발로 pHBA 수율을 올릴 수 있다면 재조합 식물기반 화학원료물질을 생산하는 좋은 예가 될 수 있을 것으로 사료된다.

p-Hydroxystyrene(4-vinylphenol) **생산**: 석유기반공정에 의해서 생산되는 *p*-hydroxystyrene(pHS)은 반도체 제조에 중요한 빛에 민감한 감광성 수지(photoresists)의 원료인 poly-4-vinylphenol(PVP)의 제조에 사용되는 중요한 화학원료물질이다[10, 22]. pHS는 tyrosine으로부터 phenylalanine/tyrosine ammonia lyase(PAL/TAL)의 작용에 의해 pHCA로 전환되고 *p*-hydroxystyrene decarboxylase(Pdc)의 촉매에 의해 pHS가 생산되는 결과가 보고되었다[39](Fig. 5). 먼저 *aroF, aroG, aroL, tyrA* 및 *tyrB*의 발현억제에 관여하는 조절유전자인 *tyrR*을 염색체상에서 결손시킨 후 branch pathway인 phenylalanine으로의 탄소흐름을 차단하기 위해서 *pheA* 유전자를 결손하고, tyrosine 생합성을 촉매하는 *tyrA* 유전자를 과발현하여 tyrosine을 생산하는 *E. coli*를 제작하였다. Tyrosine의 탈아미노반응(deamination)에 관여하며, 기존에 보고된 단백질보다 더 tyrosine에 대한 기질친화력이 높은 *Rhodotorula glutinis* 유래의 *pal/tal* 유전자[43] 및 pHCA의 탈탄산화를 촉매하는 *Lactobacillus plantarum* 유래의 *pdc* 유전자[5]를 plasmid에 cloning하여 tyrosine을 생산하는 *E. coli*에 형질전환하여 pHS를 생산하는 재조합 대장균을 개발하였다[39, 43]. 10-L 발효조에서 배양한 결과 약 0.6 g/L의 pHS가 생성되었다. 이는 pHCA와 pHS와 같은 페놀계열의 화합물이 세포에 대한 높은 독성으로 인해 발효과정중에 소량의 축적되는 pHS 및 pHCA에 의해 세포가 쉽게 죽는 문제점, tyrosine ammonia lyase(TAL)가 product인 pHCA에 의해 강한 product inhibition을 받으며 효소 고유의 촉매활성능력이 떨어져서 낮은 catalytic turnover number를 갖는 문제점이 있기 때문에 미생물을 이용하여 포도당에서 pHS를 1단계로 직접 생산하는 공정은 매우 어렵다[39]. 따라서, 공정의 효율성・경제성을 고려해서 1단계로 미생물을 이용한 직접발효법으로 tyrosine을 생산하고, 2단계로 PAL/TAL을 함유한 세포를 고정화하여 bioconversion법으로 pHCA를 생산하고, 최종적으로 화학적인 방법으로 pHS를 생산하는 방법이 개발되었다. TAL 효소활성에 대한 pH와 pHCA의 효과를 조사한 결과에 의하면, pH가 올라가면서 pHCA에 의한 product inhibition이 점점 없어지며 pH 9.5에서 생산성은 최대화, product inhibition은 최소화되었다. 그러나, pH 9.5에서도 효소의 느린 turnover number 때문에 회분식으로 효소를 첨가하는 것보다는 calcium alginate bead에 TAL 과발현 세포를 고정화하여 연속적으로 재사용하는 공정을 개발하여 낮은 효소활성도의 문제점을 극복하였다[42]. 그 결과, 고정화 촉매반응을 통해 pH 9.8에서 50 g/L의 tyrosine으로부터 250시간의 연속된 재사용공정으로 약 39±4 g/L의 pHCA를 생산하는 결과를 얻었다. 화학적 반응을 통해서 pHS를 생산하는 공정(base-catalyzed thermal decarboxylation)은 *N,N*-dimethylacetamide 용매에 pHCA를 녹인 후 촉매제로 1.9 mole%의 potassium acetate를 첨가하여 150°C에서 150분간 열처리하여 98.6%의 pHS 생산수율을 얻었다. 한편, 최근 Verhoef등은 용매내성 *P. putida* S12 유래의 tyrosine을 생산하는 미생물에 유전자 *pal* 및 *pdc*를 발현한 재조합 *Psuedomonas*를 제작하고, pHS에 대한 높은 용해도를 갖는 유기용매인 1-decanol을 첨가한 2상계(two-phase) water-decanol 발효를 수행하여 포도당으로부터 직접 발효법으로 pHS 2.5 g/L(21 mM), 수율 4.1%를 얻었다[45]. 이는 방향족 화합물 독성에 대한 내성이 강한 미생물이 화학원료물질의 생산용 숙주로 사용가치가 높음을 나타내는 결과라고 볼 수 있으며, 방향족 화합물에 대한 내성 미생물의 스크리닝, 내성 기작의 규명등에 대한 연구가 경쟁력있는 화이트바이오텍기반 방향족화합물 생산 기술개발에 크게 기여할 것으로 사료된다.

기타 방향족 화합물 생산: 방향족 대사경로는 gallic acid, pyrogallol, vanillin, salicyclic acid[24], indigo, indole-3-acetic acid, 2,3-*trans*-CHD(*S,S*-2,3-dihydroxy-2,3-dihydrobenzoic acid)[11], D-phenylglycine[32] 등과 같은 산업적으로 유용한 화합물질의 생산에도 이용될 수 있다.

Gallic acid와 pyrogallol은 항생제 trimethoprim, 근육이완제 gallamine triethiodide, 살충제 bendiocarb등의 합성에 사용되는 화합물로 Frost 등은 *P. aeruginosa* 유래의 *p*-hydroxybenzoate hydroxylase 활성이 변이된 *pobA**를 발현시켜 PCA로부터 gallic acid를 생산하는 미생물을 제작하였으며, 추가적으로 *K. pneumoniae* 유래의 PCA decarboxylase 유전자 *aroY*를 과발현하여 pyrogallol을 생산하는 균주를 만들었다(Fig. 4)[8, 9, 23].

청색염색에 널리 사용되는 색소인 indigo는 트립토판을 생산하는 대장균에서 세포내 존재하는 tryptophanse에 의해서 indole로 전환이 된 후 *P. putida* 유래의 naphthalene

dioxygenase 유전자를 과발현하여 18 g/L 수준의 인디고를 생산하는 재조합대장균을 개발하였다(Fig. 5)[3].

Indole 3-acetic acid는 대표적인 식물성장호르몬으로 알려져 있는데 Patten 등은 *P. putida* GR12-2 균주를 사용하여 tryptophan을 첨가한 발효배지에 indolepyruvate decarboxylase 유전자를 과발현하여 indole 3-acetic acid가 생산될 수 있음을 보고하였다(Fig. 5)[35].

바닐라향의 원료인 바닐린은 AAA 생합성경로의 중간물질에서도 만들어질 수 있는데, PCA를 생산하는 대장균에 catechol-*O*-methyltransferase 유전자를 과발현하여 vanillic acid로 전환시키 후 *Neurospora crassa* 유래의 aryl aldehyde dehydrogenase 유전자를 과발현하여 vanillin을 생산하였다(Fig. 4)[28, 36].

화이트바이오텍기반 방향족화합물 개발의 고려사항

방향족화합물의 세포독성: 많은 방향족화합물은 세포에 대한 독성이 강하여 직접 발효법을 통하여 고농도로 생산하는데 어려움이 있다. 세포내 독성문제를 극복하기 위한 방법들로는 생산용 균주를 유기용매에 대한 높은 내성을 갖는 *Psudomonas* 균을 사용하는 방법[44], 방향족화합물에 대한 용해도가 높으면서도 물과 잘 섞이지 않는 유기용매를 사용한 2상계 발효를 수행하는 방법[45], 발효과정 중에 배양액을 방향족화합물에 대한 흡착력이 높은 수지탑을 경유시켜 배양액내 독성농도를 낮추는 방법[31], 독성이 없거나 상대적으로 낮은 전구체를 1단계로 발효법으로 생산하고 2단계로 효소전환법 또는/및 화학적합성법으로 최종 화합물을 생산하는 방법 등이 알려져 있다[31]. 그러나 이러한 방법은 아직까지 경제성이나 효율성 측면에서 여러 문제점을 가지고 있다. 따라서, 개별 유전자에 대한 유전·생리학적 연구 및 전체 유전자에 대한 DNA microarray를 이용한 전사체, 2-D PAGE를 이용한 단백체, 전체 대사물질에 대한 대사체 연구등을 통해 방향족화합물이 세포내 높은 독성을 야기시키는 작용기작을 규명하고, 내성에 관여하는 유전자 또는 내성변이 유전자를 발굴하여 방향족화합물에 대한 내성을 가지는 미생물 개발이 필요한 상황이다.

대사공학: AAA 경로 대사산물과 그 유도체를 생산하는 미생물 개발은 주로 원하는 대사산물 다음단계의 유전자를 결손시키는 방법, 중심대사(central metabolism)로부터 AAA 공통경로로 탄소흐름을 증가시기 위해 동종 또는 이종의 유전자(heterologous gene)를 증폭시키거나 효소를 개량시키는 방법, AAA 공통경로의 유전자를 증폭시키는 방법, 원하는 분지경로의 유전자를 증폭시키는 방법, 이종의 유전자를 도입하는 방법 등 다양한 접근법으로 대사공학을 이용하여 실용화 가능성이 있는 생산균주들이 많이 개발되고 있다[2, 21, 27, 41]. 향후 보다 더 경쟁력을 지닌 생산균주를 개발하기 위해서는 기능유전체 관련기술을 접목한 시스템생물학을 이용하여 총체적인 분석을 통해 대사공학에 접목하는 전략이 필요하다.

근본적으로는 대사특성, 유전자조작·발효·분리의 용이성, 방향족화합물에 대한 내성 등을 고려하여 방향족화합물 생산에 적합한 모균주를 선정한 다음, 기존에 밝혀진 유효한 유전자정보를 토대로 대사공학을 이용하여 중심대사로부터 AAA 경로 초입단계 및 AAA 공통경로로의 탄소흐름이 매우 강화된 기반균주(platform strain)[41]를 제작하고 여기에 각각의 방향족 화합물 합성에 필요한 유전자를 접목하면 보다 더 효율적으로 각종 방향족화합물을 생산하는 균주를 개발할 수 있을 것으로 기대한다.

신규 효소의 발굴 및 개량: 대사공학을 통한 방향족 화합물 생산균주 개량 및 효소전환 공정에 많은 외래 유전자를 도입하여 접목하는 사례가 많다. 그 예로, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodotorula*, *Lactobacillus* 등의 미생물에서 유래된 dehydrogenases, decarboxylases, dioxygenases, ammonia lyase 등의 유전자를 도입하여 quinic acid, protocatechuate, catechol, *cis,cis*-muconic acid, adipic acid, vanillin, indoleacetic acid, indigo, D-phenylglycine, *p*-hydroxystyrene 등을 생산하는 균주개발에 유용하게 이용되고 있다[31, 34, 37, 39]. 그러나, 이러한 효소들은 아직 생산균주에서 발현의 최적화가 필요하거나, intrinsic catalytic activity가 낮거나, product에 의한 강한 inhibition을 받는 등의 문제점들이 있다. 따라서, metagenome 등으로부터 보다 더 다양한 기질 특이성을 갖는 효소들을 발굴하고, directed evolution 등을 통해 효소의 특성을 개량하는 연구가 요구된다.

생물공정과 화학공정의 융합: 방향족 석유화학 원료물질을 미생물에서 AAA 대사 중간체 및 그 유도체들로부터 얻는 방법은 직접발효법/효소전환법으로 생산할 수 있는 물질도 있지만, 화학공정을 병행하여 생산하는 화합물도 많다[34, 37, 39]. 따라서, 미생물 대사·생리·유전학, 생화학, 효소학, 대사공학, 발효학, 유전체학, 기능유전체학을 포함한 생물학적 분야와 유기합성, 무기화학, 화학공정등을 포함한 화학적 분야가 융합된 연구를 통해 친환경적이며 상업적으로 적용 가능한 기술개발이 필요하다.

재생가능한 바이오매스의 이용: 화이트바이오텍기반 범용화학물질이 경쟁력을 가지기 위해서는 저가의 바이오매스를 사용할 수 있는 공정개발이 함께 이루어져야 한다. 즉, 각종 목질계 또는 해조류 자원을 수확한 후 물리·화학적 전처리 공정, 가수분해를 통한 당류의 회수, 각종 당류를 자화할 수 있는 미생물의 개발등의 공정을 함께 연구되어야 할 것으로 보인다.

요 약

원유의 고갈, 반복되는 에너지 위기 및 지구온난화 문제에 기인하여 석유 대신 재생가능한 바이오매스를 사용하여 방향족 화학원료를 개발하는 연구가 광범위하게 진행되고

있다. 특히, 바이오테크놀로지를 이용한 포도당으로부터 방향족아미노산 생합성경로 중간대사체 및 그 유도체 합성기술은 벤젠유래 화합물을 포함한 많은 방향족 석유화학원료를 대체할 가능성이 있는 기술들이 개발되고 있다. 본 고는 미생물 대사공학, 생물전환, 화학공정 기술을 이용하여 hydroquinone, catechol, adipic acid, shikimic acid, gallic acid, pyrogallol, vanillin, *p*-hydroxycinnamic acid, *p*-hydroxystyrene, *p*-hydroxybenzoic acid, indigo, indole 3-acetic acid와 같은 방향족화합물을 어떻게 개발하고 있는지를 논하였다. 또한, 경쟁력있는 화이트바이오텍기반 방향족화합물 생산기술을 개발하기 위한 문제점 및 해결방안등을 논했다.

감사의 글

본 연구는 2008학년도 경성대학교 공학기술연구소 연구지원사업으로 이루어졌습니다.

REFERENCES

1. Barker, J. L. and J. W. Frost. 2001. Microbial synthesis of *p*-hydroxybenzoic acid from glucose. *Biotech. Bioeng.* **76**: 376-390.
2. Berry, A. 1996. Improving production of aromatic compounds in *Escherichia coli* by metabolic engineering. *TIBTECH*. **14**: 250-256.
3. Berry, A., T. C. Dodge, M. Pepsin, and W. Weyler. 2002. Application of metabolic engineering to improve both the production and use of biotech indigo. *J. Indust. Microbiol. Biotech.* **28**: 127 -133.
4. Buss, K., R. Muller, C. Dahm, N. Gaitatzis, E. S. Pietraszek, S. Lohmann, M. Gassen, and E. Leistner. 2001. Clustering of isochorismate synthase genes *menF* and *entC* and channeling of isochorismate in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*. **1522**: 151-157.
5. Cavin, J. F., L. Barthelmebs, and C. Divies. 1997. Molecular characterization of an inducible *p*-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*: gene cloning, transcriptional analysis, overexpression in *Escherichia coli*, purification, and characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1939-1944.
6. Chandran, S. S., J. Yi, K. M. Draths, R. von Daeniken, W. Weber, and J. W. Frost. 2003. Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid. *Biotechnol. Prog.* **19**: 808-814.
7. Dosselaere, F., and J. Vanderleyden. 2001. A Metabolic node in action: chorismate-utilizing enzymes in microorganisms. *Crit. Rev. Micro.* **27**: 75-131
8. Entsch, B., B. A. Palfey, D. P. Ballou, and V. Massey. 1991. Catalytic function of tyrosine residues in para-hydroxybenzoate hydroxylase as determined by the study of site-directed mutants. *J. Bio. Chem.* **266**: 17341-17349.
9. Eschrich, K., J. T. Frank, A.de KOK, and J. H. Willem. 1993. Role of Tyr201 and Tyr385 in substrate activation by *p*-hydroxybenzoate hydroxylase from *Pseudomonas fluorescens*. *Eur. J. Biochem.* **216**: 137-146.
10. Flanaginagin, L. W., V. K. Singh, and C. G. Willson. 1999. Molecular model of phenolic polymer dissolution in photolithography. *J. Pol. Sci.* **37**: 2103-2113.
11. Franke, D., V. Lorbach, S. Esser, C. Dose, G. A. Sprenger, M. Halfar, J. Thommes, R. Muller, R. Takors, and M. Muller. 2003. (S,S)-2,3-Dihydroxy-2,3-dihydrobenzoic acid: microbial access with engineered cells of *Escherichia coli* and application as starting material in natural-product synthesis. *Chem. Eur. J.* **9**: 4188-4196.
12. Gibson, J. M., P. S. Thomas, J. D. Thomas, J. L. Barker, S. S. Chandran, M. K. Harrup, K. M. Draths, and J. W. Frost. 2001. Benzene-free synthesis of phenol. *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**: 1945-1948.
13. Holden, M. J., M. P. Mayhew, D. T. Gallagher, and V. L. Vilker. 2002. Chorismate lyase: kinetics and engineering for stability. *Biochim. Biophys. Acta.* **1594**: 160-167.
14. http://chem.ebn.co.kr/
15. http://www.ebn.co.kr/news/n_view.html?id=373795&kind=rank_code&keys=2
16. http://www.biosafety.or.kr/index.asp
17. http://www.europabio.org/positions/DSM-WB.pdf
18. http://www.chemlocus.co.kr/
19. http://www.frostchemlab.com/index.htm
20. http://www.wikipedia.org/
21. Ikeda, M. 2006. Towards bacterial strains overproducing L-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**: 615-626.
22. Jeong, S. H., C. K. Song, and M. Yi. 2009. Capacitance enhancement in the accumulation region of *C-V* characteristics in metal-insulator-semiconductor capacitors consisting of pentacene and poly-4-vinylphenol. *Appl. Phys. Lett.* **94**: 183302.
23. Kambourakis, S., K. M. Draths, and J. W. Frost. 2000. Synthesis of gallic acid and pyrogallol from glucose: replacing natural product isolation with microbial catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **122**: 9042-9043.
24. Kerbarh, O., A. Ciulli, N. I. Howard, and C. Abell. 2005. Salicylate biosynthesis: overexpression, purification, and characterization of Irp9, a bifunctional salicylate synthase from *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol*. **187**: 5061-5066.
25. Kerbarh, O., E. M. M. Bulloch, R. J. Payne, T. Sahr, F. Rebeille, and C. Abell. 2005. Mechanistic and inhibition studies of chorismate utilizing enzymes. *Biochem. Soc. Trans*. **33**: 763-766.
26. Kikuchi, Y. T. and K. O. Kurahashi. 1997. Mutational analysis of the feedback sites of phenylalanine-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol*. **63**:761-762.
27. Kramer, M., J. Bongaerts, R. Bovenberg, S. Kremer, U. Muller, S. Orf, M. Wubbolts, and L. Raeven. 2003. Metabolic engineering for microbial production of shikimic

acid. *Meta. Eng*. **5**: 277-283.
28. Li, K. and J. W. Frost. 1998. Synthesis of vanillin from glucose. *J. Am. Chem. So.* **120**: 10545-10546.
29. Li, K. and J. W. Frost. 1999. Microbial synthesis of 3-dehydroshikimic acid: a comparative analysis of D-xylose, L-arabinose, and D-glucose carbon sources. *Biotechnol. Prog*. **15**: 876-883.
30. Li, K., M. R. Mikola, K. M. Draths, R. M. Worden, J. W. Frost. 1999. Fed-batch fermentor synthesis of 3-dehydro-shikimic acid using recombinant *Escherichia coli*. *Biotech. Bioeng*. **64**: 61-73.
31. Li, W., D. Xie, and J. W. Frost. 2005. Benzene-free synthesis of catechol: interfacing microbial and chemical catalysis. *J. Am. Cnem. Soc*. **127**: 2874-2882.
32. Mullera, U., F. Assemac, M. Gunsiord, S. Orfa, S. Kremera, D. Schipperb, A. Wagemansc, C. A. Townsendd, T. Sonkec, R. Bovenberga, and M. Wubbolts. 2006. Metabolic engineering of the *E. coli* L-phenylalanine pathway for the production of D-phenylglycine. *Meta. Eng.* **8**: 196-208.
33. Nichols, B. and J. M. Green.1992. Cloning and sequencing of *Escherichia coli ubiC* and purification of chorismate lyase. *J. Bacteriol.* **174**: 5309-5316.
34. Niu, W., K. M. Draths, and J. W. Frost. 2002. Benzene-free synthesis of adipic acid. *Biotechnol. Prog*. **18**: 201-211.
35. Patten, C. L. and B. R. Glick. 2002. Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by tryptophan and the stationary-phase sigma factor RpoS. *Can. J. Microbiol*. **48**: 635-642.
36. Priefert, H., J. Rabenhorst, and A. Steinbüchel. 2001. Biotechnological production of vanillin. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **56**:296-314.
37. Ran, N., D. R. Knop, K. M. Draths, and J. W. Frost. 2001. Benzene-free synthesis of hydroquinone. *J. Am. Chem. Soc*. **123**: 10927-10934.
38. Ray, J. M and B. C. Yanofsky. 1988. Mutational analysis of the catalytic and feedback sites of the tryptophan-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. **170**: 5500-5506.
39. Sariaslani, F. S. 2007. Development of a combined biological and chemical process for production of industrial aromatics from renewable resources. *Annu. Rev. Microbiol*. **61**: 51-69.
40. Stadthagen, G.., J. Kordulakova, R. Griffin, P. Constant, I. Bottova, N. Barilone, B. Gicquel, M. Daffe, and M. Jackson. 2005. *p*-Hydroxybenzoic acid synthesis in *Mycobacterium tuberculosis. J. Biol. Chem*. **280**: 40699-40706.
41. Sprenger, G. A. 2007. From scratch to value: engineering *Escherichia coli* wild type cells to the production of L-phenylalanine and other fine chemicals derived from chorismate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**: 739-749.
42. Trotman, R. J. C. E. Camp, A. B. Bassat, R. DiCosimo, L. Huang, G. A. Crum, F. S. Sariaslani, and S. L. Haynie. 2007. Calcium alginate bead immobilization of cells containing tyrosine ammonia lyase activity for use in the production of *p*-hydroxycinnamic acid. *Biotechnol. Prog*. **23**: 638-644.
43. Qia, W. W., T. Vannellib, S. Breinigc, A. Ben-Bassatd, A. A. Gatenbye, S. L. Hayniee, and F. S. Sariaslani. 2007. Functional expression of prokaryotic and eukaryotic genes in Escherichia coli for conversion of glucose to *p*-hydroxy-styrene. *Meta. Eng.* **9**: 268-276.
44. Verhoef, S., H. J. Ruijssenaars, J. A.M. Bont, and J. Wery. 2007. Bioproduction of *p*-hydroxybenzoate from renewable feedstock by solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12. *J. Biotech*. **132**: 49-56.
45. Verhoef, S., N. Wierckx, R. G. M. Westerhof, J. H. Winde, and H. J. Ruijssenaars. 2009. Bioproduction of *p*-hydroxy-styrene from glucose by the solvent-tolerant bacterium *Pseudomonas putida* S12 in a two-phase water-decanol fermentation. *Appl. Environ. Micribiol.* **75**: 931-936.
46. Viitanen, P. V., A. L. Devine, M. S. Khan, D. L. Deuel, D. E. Dyk, and H. Daniell. 2004. Metabolic engineering of the chloroplast genome using the *Echerichia coli ubiC* gene reveals that chorismate is a readily abundant plant precursor for *p*-hydroxybenzoic acid biosynthesis. *Plant Physiol*. **136**: 4048-4060.
47. Weaver, L. M. and K. M. Herrmann. 1990. Cloning of an *aroF* allele encoding a tyrosine-insensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase. *J. Bacteriol.* **172**:6581-6584.
48. Yi, J., K. M. Draths, K. Li, and J. W. Frost. 2003. Altered glucose transport and shikimate pathway product yields in *E. coli*. *Biotechnol. Prog*. **19**: 1450-1459.

(Received Aug. 29, 2009/Accepted Oct. 27, 2009)