대사공학에 의해 개발된 코리네박테리움 글루타미쿰에 의한 4-히드록시벤질 알코올 생산

김부연¹, 정혜빈², 이지영¹, 페러 레니³, 푸완토 헨리 슈쿠르¹, 이진호^{1*}

¹경성대학교 식품응용공학부 식품생명공학전공

²(주)진켄

³빌레펠트대학교 생물학부

Received: October 16, 2020 / Revised: November 5, 2020 / Accepted: November 5, 2020

Production of 4-Hydroxybenzyl Alcohol Using Metabolically Engineered *Corynebacterium glutamicum*

Bu-Yeon Kim¹, Hye-Bin Jung², Ji-Yeong Lee¹, Lenny Ferrer³, Henry Syukur Purwanto¹, and Jin-Ho Lee^{1*}

¹Major in Food Biotechnology, School of Food Biotechnology and Nutrition, Kyungsoo University, Busan 48434, Republic of Korea

²GeneChem Inc., Daejeon 34025, Republic of Korea

³Faculty of Biology, Bielefeld University, Bielefeld 33615, Germany

4-Hydroxybenzyl alcohol (4-HB alcohol) is one of the major active components of *Gastrodia elata* Blume, with beneficial effects on neurological disorders such as headache, convulsive behavior, and dizziness. Here, we developed a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain able to produce 4-HB alcohol from 4-hydroxybenzoate (4-HBA). First, the strain APS963 was obtained from the APS809 strain via the insertion of *aroK* from *Methanocaldococcus jannaschii* into the *NCgl2922*-deleted locus. As carboxylic acid reductase from *Nocardia iowensis* catalyzes the reduction of 4HBA to 4-hydroxybenzaldehyde (4-HB aldehyde), we then introduced a codon-optimized *car* gene into the genome of APS963, generating the GAS177 strain. Then, we deleted *creG* coding for a putative short-chain dehydrogenase and inserted *ubiC^{pr}* encoding a product-resistant chorismate-pyruvate lyase into the *pcaHG*-deleted locus. The resulting engineered GAS355 strain accumulated 2.3 g/l 4-HB alcohol with 0.32 g/l 4-HBA and 0.3 g/l 4-HB aldehyde as byproducts from 8% glucose after 48 h of culture.

Keywords: 4-hydroxybenzyl alcohol, *Gastrodia elata*, *Corynebacterium glutamicum*, metabolic engineering, carboxylic acid reductase

서론

천마(*Gastrodia elata*)는 두통, 현기증, 경련, 간질, 신경통, 신경장애 등의 치료에 사용되는 전통적인 약초이다[1, 2]. 천마 구근(rhizome)에 존재하는 생리활성 성분은 4-hydroxybenzyl alcohol (4-HB alcohol), gastrodin (4-hydroxybenzyl alcohol glycoside), 4-hydroxybenzaldehyde (4-HB aldehyde), 바닐린(vanillin), vanillyl alcohol, 4-coumaric acid 등의 방향족 화합물이다[3]. 그 중에서 중요

한 생리활성물질인 4-HB alcohol은 동물 모델에서 두통, 경련 행동, 현기증과 같은 신경계 질환에 유익한 효과를 나타내며, 이는 항산화, 항염증, 항흥분, 진정효과 등에 기인되는 것으로 추정된다[2, 4]. 특히 중뇌 동맥 폐색(middle cerebral artery occlusion)과 전체 대뇌 허혈(global cerebral ischemia)과 같은 여러 다양한 뇌졸중 동물 모델에서 그 보호 효과가 입증되었다. 또한, 4-HB alcohol은 DNA 분해를 저해할 수 있으며, TUNEL-양성세포를 감소시키는 효과가 있는 것으로 알려졌다[5]. 4-HB aldehyde는 인슐린 저항성의 개선[6], cholinesterase의 저해, 급성 상처치유[7] 등에 효과가 있는 물질로 알려져 있다. 또한 이들 화합물은 바닐린과 함께 해마 CA1 세포사멸을 억제하여 허혈성 뉴런 세포사멸에 대한 신경 보호효과를 나타낸다[4]. 한편 Gastrodin은

*Corresponding author

Tel: +82-51-663-4716, Fax: +82-51-622-4986

E-mail: jhlee83@ks.ac.kr

© 2020, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

현기증, 마비, 간질, 뇌졸중, 치매 등의 치료에 효과가 있는 천마의 생리활성 성분 중 가장 중요한 물질이다[8].

4-HB alcohol, 4-HB aldehyde, gastrodin은 천마 구근을 사용하여 추출법으로 얻을 수 있지만, 그 양이 매우 소량이며, 천마의 과잉이용 및 복잡한 제조공정 등의 많은 문제점을 가지고 있다[3]. 이들 화합물의 생합성 경로는 shikimate 경로를 경유하여 4-coumaric acid 로 부터 생합성 되는 경로가 식물인 *Vanilla planifolia*에서 알려져 있다[9]. 그러나, 아직 미생물에서는 상세한 생합성 경로가 보고된 바 없다. 최근, 합성생물학이 발달하면서 숙주 미생물에 없는 신규의 인공 대사경로(artificial metabolic pathway)를 설계하고 외래 유전자를 합성 후 도입하여 기존에는 생산할 수 없는 많은 화학물질의 생산이 가능하게 되었다[10]. Bai 등은 *Escherichia coli*를 숙주 미생물로 이용하여 chorismate로부터 4-HB aldehyde, 4-HB alcohol을 경유하여 gastrodin으로 가는 인공 생합성 경로를 설계하였다[3]. *Nocardia iowensis* 유래의 *car* (carboxylic acid reductase를 암호화), *Bacillus subtilis* 유래의 *sfp* (phosphopantetheinyl transferase를 암호화), *ubiC* (chorismate-pyruvate lyase (CPL)를 암호화), *ppsA* (phosphoenolpyruvate synthetase를 암호화), 변이 *aroG* (deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate synthase를 암호화)를 각각 *E. coli*에 발현하여 340 mg/l 4-HB alcohol을 생산하였으며, 여기에 *Rhodiola* 유래의 변이 glycosyltransferase

UGT73B6^{F389S}를 암호화하는 유전자를 발현하여 545 mg/l gastrodin을 생산하는 기술을 보고하였다. 그러나, *E. coli*는 GRAS (generally regarded as safe) 미생물이 아니기 때문에 이러한 화합물을 생산하여 의약품, 건강 기능 보조식품용으로 이용하는 데는 많은 제한 요인과 단점이 있다[11]. 한편, 토양 유래의 그람 양성 세균인 *Corynebacterium glutamicum*은 오랫동안 글루탐산과 라이신을 생산하는데 이용되고 있다. GRAS 미생물, 비교적 적은 영양소의 요구, 빠른 성장, 다양한 종류의 유기물(당류, 당 알코올, 유기산, 방향족 화합물)을 이용하는 능력 등의 특징을 갖고 있어 백색 생명공학(white biotech) 분야에 가장 중요한 대표적인 산업미생물이다[12]. 현재, 시스템 대사공학(systems metabolic engineering)을 기반으로 *Corynebacterium*을 이용한 다양한 화학물질, 바이오 연료, 식물유래 기능성물질, 단백질 등의 생산연구가 매우 광범위하게 진행되고 있다[13]. 따라서, 기존에는 천마 구근에서 매우 소량 생산되는 이들 방향족 화합물을 GRAS 미생물인 *C. glutamicum*을 이용하여 생산하는 연구는 매우 가치가 있다고 사료된다.

최근 본 연구진은 *C. glutamicum* ATCC 13032에 방향족 아미노산 합성경로의 차단, 4-hydroxybenzoate (4-HBA) 분해경로의 차단, *E. coli* 유래의 생산물-저항성(product-resistant) CPL의 도입, shikimate 경로의 유전자 과발현, quinate/shikimate 분해경로의 차단, *Methanocaldococcus*

Fig. 1. Schematic representation of 4-hydroxybenzyl alcohol production in *C. glutamicum*. Crosses indicate the disruption of corresponding genes. Corresponding genes and enzymes are as follows: *ubiC*^{PR}, product-resistant chorismate-pyruvate lyase; *pcaHG*, protocatechuate 3,4-dioxygenase; *car*, carboxylic acid reductase; *creG*, NAD⁺-dependent dehydrogenase. 4-HBA, 4-hydroxybenzoate; 4-HB aldehyde, 4-hydroxybenzaldehyde; 4-HB alcohol, 4-hydroxybenzyl alcohol, respectively.

jannaschii 유래의 shikimate-저항성 AroK 도입을 통해 5-L 발효조에서 19 g/l 4-HBA를 생산하는 APS809를 개발하였다[14]. 본 연구에서는 4-HB alcohol의 전구물질인 4-HBA를 과량 생산하는 APS809에 *N. iowensis* 유래의 carboxylic acid reductase 유전자 *car*를 합성하여 발현을 최적화하여, 천마 구근으로부터 매우 소량 얻을 수 있는 기능성 방향족 화합물인 4-HB alcohol을 생산하는 *C. glutamicum* GAS355를 대사공학 기법으로 개발하여 보고한다(Fig. 1).

재료 및 방법

균주, 플라스미드 및 일반적 DNA 조작 기술

사용한 균주와 플라스미드는 Table 1에 표시하였다. 일반

적인 DNA 재조합 및 유전자 클로닝은 *E. coli* Top10에서 수행하였으며, 4-HB alcohol을 생산하기 위한 출발 균주는 *C. glutamicum* APS809를 사용하였다. 유전자 발현을 위한 플라스미드는 pCXM48 유래의 pCX-series 발현벡터들을 사용하였으며, *C. glutamicum* 염색체 조작은 pK19mobsacB 벡터를 이용하였다[15, 16]. 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 통해 DNA를 증폭하여 EZ-fusion cloning kit (Enzymomics, Korea) 또는 Quick ligation kit (NEB, USA)를 사용하여 플라스미드에 클로닝하였으며, 삽입된 DNA 단편은 염기서열을 분석하여 확인하였다. *C. glutamicum*의 컴피턴트 세포(competent cell) 제조와 전기천공법(electroporation)은 논문에 기술된 방법에 준해 수행하였다[17].

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strain and plasmid	Genotype	Source or References
<i>Escherichia coli</i>		
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>nupG</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galE15</i> <i>galK16</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> λ ⁻	Invitrogen
<i>Corynebacterium glutamicum</i>		
ATCC 13032	Wild type	ATCC
APS809	Δ <i>trpE</i> Δ <i>csm</i> Δ <i>pobA</i> Δ <i>vdh</i> ::P _{ilvC} - <i>aroG</i> ^{FBR} P _{tuf} - <i>aroC</i> Δ <i>qsuABCD</i> ::P _{tuf} - <i>qsuC</i> Δ <i>benABC</i> ::P _{tuf} - <i>aroE</i> -T _{rrnB}	[13]
APS963	APS809 with Δ <i>NCgl2922</i> ::P _{tuf} - <i>aroK</i> -T _{rrnB}	This study
GAS177	APS963with Δ <i>NCgl1112</i> ::P _{ilvC-M1} - <i>car</i> -T _{rrnB}	This study
GAS225	GAS177 with Δ <i>creG</i>	This study
GAS355	GAS225 with Δ <i>pcaHG</i> ::P _{sod} - <i>ubiC</i> ^{Pr} -T _{T7}	This study
Plasmids		
pCXM48	<i>E. coli</i> / <i>C. glutamicum</i> shuttle vector; pXMJ19 derivative, 4.84 kb; Cm ^R	[14]
pCXE50	<i>C. glutamicum</i> expression vector; 5.51 kb, <i>tuf</i> promoter, pGA1 <i>ori</i> _{V_{Cg}} , Cm ^R	[13]
pCES208	<i>E. coli</i> / <i>C. glutamicum</i> shuttle vector, 5.93 kb; Kan ^R	[14]
pUMF29	pCES208 derivative, Kan ^R ; 1.0 kb P _{sod} - <i>ubiC</i> ^{Pr} -T _{T7} and 1.8 kb of P _{ilvC} - <i>aroG</i> ^{FBR} -T _{rrnB}	[13]
pUC57-CAR	pUC57 with a codon-optimized <i>car</i> gene; Amp ^R , 6.2 kb	This study
T-blunt	PCR cloning vector; 3.685 kb, pUC origin; Kan ^R , Amp ^R	SolGent Co.
pICA4335	pCXI43 with <i>car</i> from <i>Nocardia iowensis</i> ; 9 kb	This study
pECreG50	pCXE50 with <i>creG</i> from <i>C. glutamicum</i> ; 6.25 kb	This study
pMSK16	pCXE50 derivative, 6.35 kb; 0.85 kb <i>aroK</i> from <i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	[13]
pK19mobsacB	Vector for allelic exchange in <i>C. glutamicum</i> (pK18 <i>ori</i> _{V_{E. coli}} <i>sacB</i> <i>lacZa</i>); 5.72 kb, Kan ^R	[15]
pK19Δ <i>NCgl2922</i> ::P _{tuf} - <i>aroK</i>	pK19 <i>mobsacB</i> derivative, 8.46 kb; 1.56 kb of P _{tuf} - <i>aroK</i> ORF-T _{rrnB}	This study
pK19-Δ <i>NCgl1112</i>	pK19 <i>mobsacB</i> derivative, 7.7 kb; 2 kb of the up- and downstream regions of <i>NCgl1112</i>	This study
pK19-Δ <i>NCgl1112</i> ::P _{ilvC-M1} - <i>car</i>	pK19-Δ <i>NCgl1112</i> derivative, 11.9 kb; 4.24 kb P _{ilvC-M1} - <i>car</i> ORF-T _{rrnB}	This study
pK19-Δ <i>creG</i>	pK19 <i>mobsacB</i> derivative, 6.52 kb; 0.8 kb of the up- and downstream regions of <i>creG</i>	This study
pK19-Δ <i>pcaHG</i>	pK19 <i>mobsacB</i> derivative, 6.5 kb; 0.4 kb of the upstream region of <i>pcaH</i> and 0.4 kb of the downstream region from 97 th nucleotide of <i>pcaG</i> ORF	This study
pK19-Δ <i>pcaHG</i> ::P _{sod} - <i>ubiC</i> ^{Pr}	pK19- Δ <i>pcaHG</i> derivative, 7.5 kb; 1 kb P _{sod} - <i>ubiC</i> ^{Pr} -T _{T7}	This study

ATCC, American Culture Collection; Cm^R, chloramphenicol resistance; Kan^R, kanamycin resistance; Amp^R, ampicillin resistance.

배지 및 배양 조건

*E. coli*와 *C. glutamicum*은 Luria Bertani (LB) 배지를 사용하여 37℃, 32℃에서 각각 배양하였다. 항생제를 첨가할 경우, *E. coli*는 50 µg/ml kanamycin, 25 µg/ml chloramphenicol을 첨가하였으며, *C. glutamicum*은 25 µg/ml kanamycin, 4.5 µg/ml chloramphenicol을 첨가하였다. 4-HB alcohol 생산을 위한 플라스크 발효배지는 이전 논문에서 기술된 방법에 준하여 제조하였다[11, 14]. 항생제가 첨가된 LB 한천배지에서 밤새 키운 균을 25 ml 발효배지를 함유한 250 ml 삼각플라스크에 백금으로 접종한 다음 진탕 배양기에서 32℃, 240 rpm으로 42-48시간 배양하였으며, 모든 실험은 3회 반복 실시하였다.

유전자 발현벡터 제작

PCR에 사용된 프라이머(primer) 서열은 Table S1에 표시하였다. *Nocardia iowensis* 유래의 *car* 유전자는 GenScript (USA)에 의뢰하여 *C. glutamicum*에서 발현에 적합한 최적의 코돈(codon)을 선정하여 유전자를 합성 후 pUC57 벡터에 클로닝된 형태로 입수하였다(Table 1; Table S2). pUC57-CAR을 주형 DNA로 하고 프라이머 P1과 P2를 이용하여 PCR하여 얻은 단편을 정제한 뒤 *EcoRI*와 *HindIII* 효소로 처리하여 약 3.5 kb의 *car* 단편을 얻었다. 발현 벡터인 pCXS30, pCXS35, pCXI40, pCXI43, pCXI45를 *EcoRI*/*HindIII*로 절단한 후 *car* 단편과 각각 DNA 접합(ligation)하여, 최종적으로 pSCA3035, pSCA3535, pICA4035, pICA4335, pICA4535를 제작하였다(Fig. S1A). *creG* 유전자는 *C. glutamicum* ATCC 13032를 주형 DNA로 사용하여 프라이머 P3-P4로 PCR하여 0.75 kb의 단편을 얻어 T-blunt 벡터에 도입하였다. 염기서열을 확인 후 *EcoRI*와 *HindIII*로 처리하고 pCX-series 벡터와 접합하여, 최종적으로 pSCreG35, pICreG43, pECreG50를 제작하였다(Supplementary Fig. S1B).

염색체내 *aroK* 유전자 삽입균주 제작

M. jannaschii 유래의 *aroK* 유전자를 *C. glutamicum* 염색체에 삽입하기 위한 벡터를 제작하기 위해 P23-P24, P25-P26을 이용하여 *NCgl2922* 유전자의 상류 부위(upstream region)와 하류 부위(downstream region)의 0.6 kb DNA를 각각 PCR하여 얻은 단편과, *aroK* 유전자를 함유한 pMSK16을 *XbaI/KpnI*으로 절단하고 정제하여 얻은 1.57 kb 단편과, pK19mobsacB/*HindIII/EcoRI*을 혼합하고 Gibson assembly법으로 클로닝하여, 최종적으로 pK19-*ANCgl2922::P_{tuf}-aroK*를 제작하였다(Fig. S1C) [18]. 이 벡터를 *C. glutamicum* APS809에 형질전환하여 1단계로 상동성 재조합(homologous recombination)을 통해 염색체에 삽입된 kanamycin (Kn)

내성주를 선별한 후, LB액체배지에 접종하여 밤새 배양한 다음 생리식염수로 10-100배 희석하여 10% sucrose를 함유한 LB한천배지에 도말하여 sucrose 내성균을 얻었다. LB한천배지와 Kn을 함유한 LB한천배지에 이주시개로 각각 100개의 콜로니를 접종하여 Kn 감수성 콜로니를 취하여 프라이머 P28-P29, P27-P29로 PCR하여 *NCgl2922*가 결손된 부위에 *P_{tuf}-aroK-T_{rrn}*이 삽입된 APS963을 최종적으로 선별하였다.

염색체내 *car* 유전자 삽입균주 제작

car 유전자를 *C. glutamicum* 염색체에 삽입하기 위한 벡터를 제작하기 위해 P5-P6, P7-P8을 이용해 *NCgl1112* 유전자의 291번째 염기의 상류 부위와 772번째 염기의 하류 부위 1 kb DNA를 각각 PCR하여 얻은 단편과 pK19mobsacB/*HindIII/EcoRI* DNA를 Gibson assembly법으로 클로닝하여 *NCgl1112* 1,071 염기 쌍 중에서 480 염기 쌍이 제거된 pK19-*ANCgl1112*를 제작하였다. *car*를 함유한 pICA4335를 *NotI/NheI*으로 절단하고 정제하여 얻은 4.235 kb 단편과 pK19-*ANCgl1112/NotI/XbaI*과 접합하여 최종적으로 pK19-*ANCgl1112::P_{ilvC-M1}-car*를 제작하였다(Fig. S1D). 이를 APS963에 형질전환하고 얻어진 colony를 PCR하여 *NCgl1112*의 일부가 결손된 부위에 *P_{ilvC-M1}-car* ORF-T_{rrnB}가 삽입된 GAS177을 최종적으로 선별하였다.

염색체내 *creG* 결손균주 제작

GAS177균주로부터 *creG* 유전자를 결손하기 위한 벡터를 제작하기 위해 P11-P12, P13-P14를 이용해 *creG* (*NCgl0527*) 유전자의 상류 부위와 하류 부위의 단편 0.4 kb를 각각 PCR하여 얻은 다음, Gibson assembly법으로 pK19mobsacB/*HindIII/EcoRI*에 삽입하여 pK19-*ΔcreG*를 제작하였다(Fig. S1E). 이를 GAS177에 형질전환하고 *creG* 결손을 P15-P16로 PCR하여 확인하였으며, 최종적으로 선별된 균은 GAS225로 명명하였다.

염색체내 변이 *ubiC* 삽입균주 제작

변이 CPL을 암호화하는 유전자 *ubiC^{Pr}*을 GAS225 염색체에 도입하기 위한 벡터를 제작하기 위해 P17-P18, P19-P20을 이용해 *pcaH* 유전자의 상류 부위 0.4 kb와 *pcaG* 유전자의 97번째 염기부터 하류 부위 0.4 kb를 각각 PCR하여 얻은 다음, Gibson assembly법으로 pK19mobsacB/*HindIII/EcoRI*에 삽입하여 pK19-*ΔpcaHG*를 제작하였다. 변이 *ubiC* 유전자를 함유한 플라스미드 pUMF29를 *XbaI/EcoRV*로 절단하고 정제하여 얻은 1 kb 단편과 pK19-*ΔpcaHG/XbaI/EcoRV*와 접합하여 최종적으로 pK19-*ΔpcaHG::P_{sod}-ubiC^{Pr}*를 제작하였다(Fig. S1F). 이를 사용하여 GAS225에 도입하

고 P21-P22를 사용하여 PCR하여 *pcaHG* 영역에서 0.82 kb 결손된 부위에 1 kb의 *P_{sod-ubiC}-T₇₇*이 삽입된 것을 확인하여 GAS355를 선별하였다.

효소활성 측정

creG 유전자를 발현하는 플라스미드를 함유한 재조합 *C. glutamicum*을 32°C, LB 액체배지에서 배양한 액을 원심 분리하여 침전물을 PBS 완충액(phosphate buffered saline)으로 2회 세척한 후 PBS buffer 500 µl을 첨가하여 현탁시켰다. Bead와 PBS buffer 500 µl를 더 첨가하고 bead beater를 사용하여 세포를 파쇄한 다음 4°C에서 30분간 원심분리 후 상등액을 효소분석에 사용하였다. CreG 효소활성 측정용 조성은 1 ml 반응액에 기질 1 mM 4-hydroxybenzyl alcohol 또는 1 mM vanillyl alcohol, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8), 0.2 mM NAD⁺, 조효소액 100 µl를 사용하였다. 조효소액을 첨가한 후 환원되는 NADH를 UV 분광광도계(Shimadzu UV-1800, Japan)를 사용하여 340 nm에서 30초 간격으로 3분간 측정하였다[19].

분석 방법

세포 OD는 분광광도계(UV-2550, Shimadzu)를 사용하여 600 nm에서 측정하였으며, 포도당은 ACCU-CHEK (Korea)을 사용하여 측정하였다. 발효 배양액에 존재하는 4-HBA, 4-HB aldehyde, 4-HB alcohol은 HPLC (high performance liquid chromatography)로 분석하였다. 발효 배양액 1 ml을 10분간 원심 분리하여 상등액을 얻은 후, 100 µl 상등액과 900 µl acid-methanol (1 ml methanol, 4 µl 5 N HCl)을 섞

어 10분간 흔들어준 후 15분 동안 11,400 ×g에서 원심 분리한 다음 상등액을 0.45 µm 필터로 여과하여 분석하였다. Column은 Eclipse XDB-C18 (4.6 × 250 mm, 5 µm, Agilent)를 사용하였으며, 이동상은 25 mM potassium phosphate 완충액(pH 2.8)과 acetonitrile을 9:1 [vol:vol] 비율로 혼합하여 사용하였으며, 50°C, 210 nm 파장에서 0.6 ml/min 유속으로 분석하였다. 세포의 파쇄 및 단백질 농도분석은 이전 논문에 기술된 방법으로 수행하였다[20].

결과 및 고찰

염색체내 *aroK* 유전자 삽입 *C. glutamicum* 개발

모균주인 4-HBA 생산 APS809를 이용하여 4-HB alcohol을 생산하는 균을 개발하기 이전에 플라스미드에 존재하는 *aroK* 유전자를 염색체에 삽입할 필요가 있다. 벡터 pK19- Δ NCgl2922::P_{tuf}-*aroK*를 APS809에 도입하여 APS963을 선별하였다. Fig. 2A에서 보는 것처럼 P28-P29로 PCR하여 확인한 결과 NCgl2922가 결손 안된 APS809의 경우 약 2.72 kb에 위치하며(A, lane 1), NCgl2922의 결손 및 P_{tuf}-*aroK*-T_{mn}이 삽입된 APS963의 경우 약 2.98 kb에 위치함을 확인하였다(A, 2). 추가적 확인을 위해 *aroK* 유전자와 연결된 *tuf* promoter 중간 프라이머 P27과 NCgl2922 하위부위에 위치한 프라이머 P29로 PCR하여 확인한 결과, APS809의 경우 삽입이 안되었기 때문에 DNA band가 보이지 않았으며(A, 3), APS963은 약 2 kb 단편이 확인되어 P_{tuf}-*aroK*-T_{mn}의 삽입을 확인하였다(A, 4). 삼각 플라스크에서 배양한 결과 모균주인 APS809/pUMF29/pSMK16은 4.66 g/l 4-HBA,

Fig. 2. Verification of the constructed strains APS963 (A), GAS177 (B), GAS225 (C), and GAS 355 by PCR analysis. (A) Confirmation of the NCgl2922 deletion and *aroK* insertion into the strain APS809. Lane 1 and 2, respectively, showed the PCR fragments of APS809 and APS963 using primers P28 and P29. Lane 3 and 4, respectively, showed the PCR fragments of APS809 and APS963 using primers P27 and P29. (B) Confirmation of the partial deletion of NCgl1112 and *car* insertion into the strain APS963. Lane 1 and 2, respectively, showed the PCR fragments of APS963 and GAS177 using primers P9 and P10. (C) Confirmation of the *creG* deletion in the strain GAS225. Lane 1 and 2, respectively, showed the PCR fragments of GAS177 and GAS225 using primers P15 and P16. (D) Confirmation of the *pcaHG* deletion and *ubiC^{Pr}* insertion into the strain GAS225. Lane 1 and 2, respectively, showed the PCR fragments of GAS225 and GAS355 using primers P21 and P22.

Table 2. Production of 4-hydroxybenzoate, 4-hydroxybenzaldehyde, and 4-hydroxybenzyl alcohol in recombinant *C. glutamicum* at baffled flasks.

Strain	Plasmid	OD _{600nm}	4-HBA (g/l)	4-HB aldehyde (g/l)	4-HB alcohol (g/l)
APS809	pUMF29/pSMK16	49.7 ± 1.5	4.66 ± 0.33	-	-
APS963	pUMF29	55.8 ± 2.3	4.02 ± 0.32	-	-
GAS177	pUMF29	62.9 ± 7.3	0.80 ± 0.01	0.21 ± 0.03	2.19 ± 0.34
GAS225	pUMF29	66.8 ± 7.8	0.85 ± 0.06	0.23 ± 0.11	2.27 ± 0.42
GAS355	-	69.0 ± 4.4	0.32 ± 0.02	0.30 ± 0.03	2.30 ± 0.15

Cells were harvested and analyzed after 42-48 h cultivation in flasks. Values represent means and standard deviations of triplicate cultivations.

0.22 g/l shikimate, 0.11 g/l dehydroshikimate를 생산하였으며, 개발된 균주인 APS963/pUMF29는 4.02 g/l 4-HBA, 0.23 g/l shikimate, 0.2 g/l dehydroshikimate를 생산하였다(Table 2). 비록 4-HBA는 약 13% 감소하였지만, shikimate에 대한 효소의 활성 저해가 해제된 *M. jannaschii* 유래의 *aroK*가 염색체에 삽입됨에 따라 모균주와 마찬가지로 부산물인 shikimate와 dehydroshikimate의 농도가 낮음을 확인하였다[14].

car 유전자의 합성 및 *C. glutamicum*내 발현

Carboxylic acid reductase (CAR)는 4-HBA, PCA, vanillic acid와 같은 산성 방향족 화합물을 방향족 aldehyde로 환원시키는 반응을 촉매하는 효소로, 관련 유전정보와 효소의 기능이 잘 밝혀져 있는 것은 *N. iowensis* 유래의 CAR이다 [21, 22]. 4-HBA로부터 4-HB aldehyde를 생산하는 *C. glutamicum*을 개발하기 위해 *N. iowensis* 유래의 *car* 유전

자를 *Corynebacterium*에서 잘 작동하는 pCX-series 발현 벡터에 클로닝 후, ATCC 13032에 형질전환하고 조효소액을 제조하여 SDS-PAGE를 수행하여 단백질 발현을 분석하였다. 그 결과, 분자량이 약 130 kDa 위치에서 *P_{ilvC}*, *P_{ilvC-M1}*, *P_{ilvC-M2}* promoter에서 CAR 단백질이 상대적으로 잘 생산되었으며, 특히 *P_{ilvC-M1}*을 함유한 pICA4335에서 가장 높은 발현을 확인하였다(Fig. 3A). *car* 유전자를 염색체에 삽입하기 위해 pK19- Δ *NCgl1112*::*P_{ilvC-M1}*-*car*를 사용하여 APS963에 도입하여 GAS177을 개발하였다. *NCgl1112* 유전자 중에서 0.48 kb 단편의 결손과 4.24 kb 단편의 *P_{ilvC-M1}*-*car*-*T_{rrn}*의 삽입에 의해 GAS177 균주는 대조균주 대비 DNA 단편이 약 3.76 kb 증가한 것을 PCR을 통해 확인하였다(Fig. 2B).

염색체내 *creG* 결손, 변이 *ubiC* 발현 *C. glutamicum* 개발

*C. glutamicum*에는 4-HB alcohol을 4-HB aldehyde로 산화를 촉매하는 효소인 CreG (NAD⁺-dependent dehydrogenase,

Fig. 3. Production of carboxylic acid reductase (CAR; A) and NAD⁺-dependent dehydrogenase (CreG; B) in *C. glutamicum* ATCC 13032. Proteins are separated by 10% SDS-PAGE. (A) Lanes 1, 2, 3, 4, and 5 represent crude extracts of cells harboring pSCA3035, pSCA3535, pICA4035, pICA4335, and pICA4535. (B) Lanes 1, 2, 3, and 4 represent crude extracts of cells harboring pCXM48, pSCreG35, pICreG43, and pECreG50, respectively. The arrows (a) and (b) indicate the estimated CAR and CreG production bands, respectively.

Table 3. Specific activity of CreG on substrates by *C. glutamicum* with different CreG-expression vectors.

Substrate	Specific activity (nmol/min/mg protein)			
	pCXM48 (control)	pSCreG35	pICreG43	pECreG50
4-Hydroxybenzyl alcohol	1.30 ± 0.07	3.28 ± 0.21	9.67 ± 0.44	23.45 ± 1.05
Vanillyl alcohol	1.52 ± 0.11	3.94 ± 0.18	5.99 ± 0.39	15.07 ± 1.26

NCgl0527)가 알려져 있다[19]. 효소 활성을 확인하기 위해 *creG* 유전자를 pCX-series 발현 벡터에 각각 클로닝하고 *C. glutamicum*에서 단백질의 발현 정도를 분석한 결과, 예측된 분자량인 25.7 kDa 보다 약간 낮은 위치에서 단백질 band를 확인하였다(Fig. 3B). 대조균과 비교하였을 때, *tuf* 프로모터에 연결된 pECreG50에서 CreG 단백질의 생산이 가장 우수하였다. 기질로 4-HB alcohol과 vanillyl alcohol을 사용하여 효소활성을 측정한 결과, 4-HB alcohol과 vanillyl alcohol을 모두 산화하는 활성을 가지며, 4-HB alcohol을 더 잘 산화하는 것을 확인하였다(Table 3). 따라서, 4-HB alcohol을 더 많이 생산하는 균을 개발하기 위해 염색체상에서 *creG* 유전자를 결손하는 것이 바람직하다고 판단된다. 제작된 벡터 pK19- $\Delta creG$ 를 GAS177에 도입하여 *creG*가 결손된 GAS225를 개발하였다. Fig. 2C에서 보는 것처럼 *creG* 결손에 의해 GAS225에서 약 0.8 kb 정도 DNA 크기가 감소하는 것을 확인하였다. 한편, 변이 *ubiC* 유전자 발현을 플라스미드 형태로 하는 것보다는 염색체에 삽입하여 발현하여 세포에 대한 부담을 줄이고 4-HB alcohol 생산을 안정적으로 하기 위한 목적으로, pK19- $\Delta pcaHG::P_{sod-ubiC}^{Pr}$ 를 GAS225에 형질전환하여 0.82 kb *pcaHG*의 결손 (*pcaH* 전체 유전자 결손 및 *pcaG* 96 염기 쌍의 결손) 및 1 kb $P_{sod-ubiC}^{Pr}$ -T₇₇ 삽입을 PCR로 확인하여 최종적으로 GAS355를 개발하였다(Fig. 2D).

재조합 *C. glutamicum*에서 4-hydroxybenzyl alcohol 생산

염색체에 *car* 유전자가 삽입된 GAS177 균주와 모균주인 APS963에 *ubiC*^{Pr}를 함유한 pUMF29 플라스미드를 각각 도입한 후 삼각 플라스크에서 42–48시간 발효하여 첨가된 포도당을 모두 소비하면서 생산농도를 비교하였다(Table 2) [14, 23]. GAS177/pUMF29의 경우, 0.8 g/l 4-HBA, 0.21 g/l 4-HB aldehyde, 2.19 g/l 4-HB alcohol이 생산되었다. APS963/pUMF29와 비교하여 4-HBA 생산이 크게 감소하면서 4-HB aldehyde와 4-HB alcohol이 많이 축적된 것은 GAS177 균주에서 발현된 CAR 효소가 잘 기능하기 때문인 것으로 판단된다. 한편, *E. coli*의 경우, 지방족 알데히드(aliphatic aldehyde)가 알코올로 환원되는 것을 90–99% 차단하기 위해 13개의 유전자 결손(*adhE*, *yqhD*, *adhP*, *eutG*,

yiaY, *ahr*, *betA*, *fucO*, *yahK*, *dkgA*, *gldA*, *ybbO*, *yghA*)이 필요한 것으로 알려졌다[24]. 따라서, 4-HB aldehyde 농도는 매우 낮고 4-HB alcohol이 많이 축적되는 것은 *C. glutamicum* 세포 안에 존재하는 다양한 종류의 alcohol dehydrogenases (ADHs), oxidoreductases, putative aromatic aldehyde reductases (AARs) 등의 작용 때문인 것으로 추정된다. 4-HB alcohol을 더 많이 생산하기 위한 목적으로 *creG*가 결손된 GAS225/pUMF29균주와 모균주인 GAS177/pUMF29를 플라스크에서 배양하며 평가한 결과, 3가지 화합물의 생산농도는 두 균주 모두 거의 유사하여 4HB alcohol의 농도가 향상되지 않았다(Table 2). 이는 위에서 언급한 다양한 ADHs 및 관련 효소들이 일반적으로 정반응인 환원반응뿐만 아니라 효소역가는 약하지만 역반응인 산화반응도 촉매하기 때문에, GAS225에 CreG 효소가 없더라도 역반응이 일어날 수 있어 4-HB alcohol의 산화가 일정 수준 진행되기 때문에 4-HB alcohol의 생산 농도가 더 향상되지 않는 것으로 사료된다[24]. 마지막으로, *ubiC*^{Pr}가 *pcaHG*에 도입된 GAS355를 발효한 결과, 0.32 g/l 4-HBA, 0.3 g/l 4-HB aldehyde, 2.3 g/l 4-HB alcohol을 생산하였다. 이는 대조균인 GAS225/pUMF29와 비교하여 4-HBA는 약간 저하되며 4-HB aldehyde 및 alcohol은 거의 유사한 수준으로, *ubiC*^{Pr}를 플라스미드 대신 염색체에 삽입하더라도 4-HB aldehyde 및 alcohol의 생산이 저하되지 않음을 보여주었다. 지금까지 미생물을 이용한 4-HB alcohol의 생물학적 생산에 관한 연구는 극히 제한적이며, 대사공학적으로 개발된 *E. coli*에서 340 mg/l 생산된 것이 가장 높은 수준이다[3]. 따라서 본 연구를 통해 2.3 g/l 4-HB alcohol이 생산된 것은 매우 높은 수준으로, 향후 대사공학기법을 통해 더 우수한 균을 개발할 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 4-HB aldehyde의 환원에 직접적으로 관련된 유전자를 찾아 결손하면 기능성 물질인 4-HB aldehyde도 높은 수준으로 생산할 수 있는 균주를 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

4-Hydroxybenzyl alcohol (4-HB alcohol)은 두통, 경련 행동, 현기증과 같은 신경계 질환에 유익한 효과를 나타내며 천마의 주요 생리활성 성분 중의 하나이다. 대사공학을 통해

4-hydroxybenzoate (4-HBA)를 생산하는 균주로부터 4-HB alcohol을 생산하는 재조합 *Corynebacterium glutamicum*을 개발하였다. 먼저 4-HBA를 생산하는 APS809로부터 염색체 내 *NCgl2922* 유전자에 *Methanocaldococcus jannaschii* 유래의 *aroK* 유전자를 삽입한 APS963을 개발하였다. 4-HBA의 카로복실 산을 4-hydroxybenzaldehyde (4-HB aldehyde)로의 환원을 촉매하는 *Nocardia iowensis* 유래의 *car* 유전자를 염색체에서 발현하는 균주를 개발하기 위해 *NCgl1112* 유전자 일부 단편에 *car* 유전자가 삽입된 GAS177를 개발하였다. 더 높은 농도의 4-HB alcohol을 생산하기 위해 4-HB alcohol을 aldehyde로 산화를 촉매하는데 관여하는 *creG* 유전자를 염색체상에서 제거된 GAS255를 개발하였다. 최종적으로 chorismate를 4-HBA로 전환하는 효소의 유전자 *ubiC^{pr}*을 *pcaHG*에 삽입된 GAS355를 개발하였으며, 80 g/l 포도당을 함유한 삼각플라스크에서 발효하여 생산성을 평가한 결과, 2.3 g/l 4-HB alcohol이 생산되었으며 부산물로 0.32 g/l 4-HBA, 0.3 g/l 4-HB aldehyde가 축적되었다.

Acknowledgments

This work was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF-2018R1D1A1B07047207) and the BB21+ Project in 2020.

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Liu Y, Gao J, Peng M, Meng H, Ma H, Cai P, et al. 2018. A review on central nervous system effects of gastrodin. *Front. Pharmacol.* **9**: 24.
- Luo L, Kim SW, Lee HK, Kim ID, Lee H, Lee JK. 2017. Anti-oxidative effects of 4-hydroxybenzyl alcohol in astrocytes confer protective effects in autocrine and paracrine manners. *PLoS One* **12**: e0177322.
- Bai Y, Yin H, Bi H, Zhuang Y, Liu T, Ma Y. 2016. De novo biosynthesis of gastrodin in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* **35**: 138-147.
- Kim HJ, Hwang IK, Won MH. 2007. Vanillin, 4-hydroxybenzyl aldehyde and 4-hydroxybenzyl alcohol prevent hippocampal CA1 cell death following global ischemia. *Brain Res.* **1181**: 130-141.
- Yu SS, Zhao J, Lei SP, Lin XM, Wang LL, Zhao Y. 2011. 4-Hydroxybenzyl alcohol ameliorates cerebral injury in rats by antioxidant action. *Neurochem. Res.* **36**: 339-346.
- Park S, Kim DS, Kang S. 2010. *Gastrodia elata* Blume water extracts improve insulin resistance by decreasing body fat in diet-induced obese rats: vanillin and 4-hydroxybenzaldehyde are the bioactive candidates. *Eur. J. Nutr.* **50**: 107-118.
- Kang CW, Han YE, Kim J, Oh YH, Lee EJ. 2017. 4-Hydroxybenzaldehyde accelerates acute wound healing through activation of focal adhesion signalling in keratinocytes. *Sci. Rep.* **7**: 14192.
- Song C, Fang S, Lv G, Mei X. 2013. Gastrodin promotes the secretion of brain-derived neurotrophic factor in the injured spinal cord. *Neural Regen. Res.* **8**: 1383-1389.
- Podstolski A, Havkin-Frenkel D, Malinowski J, Blount JW, Kourteva G, Dixon RA. 2002. Unusual 4-hydroxybenzaldehyde synthase activity from tissue cultures of the vanilla orchid *Vanilla planifolia*. *Photochemistry* **61**: 611-620.
- Lee JH, Wendisch VF. 2017a. Production of amino acids - Genetic and metabolic engineering approaches. *Bioresour. Technol.* **245**: 1575-1587.
- Kim JY, Kim BY, Moon KH, Lee JH. 2019. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for N-acetylglucosamine production. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **47**: 78-86.
- Lee JH, Wendisch VF. 2017b. Biotechnological production of aromatic compounds of the extended shikimate pathway from renewable biomass. *J. Biotechnol.* **257**: 211-221.
- Wendisch VF, Lee JH. 2020. *Metabolic Engineering in Corynebacterium glutamicum*, pp. 287-322. In Inui M, Toyoda K (eds.), *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology Monographs*, Vol 23, Springer, Cham.
- Purwanto HS, Kang MS, Ferrer L, Han SS, Lee JY, Kim HS, et al. 2018. Rational engineering of the shikimate and related pathways in *Corynebacterium glutamicum* for 4-hydroxybenzoate production. *J. Biotechnol.* **282**: 92-100.
- Lee JH. 2014. Development and characterization of expression vectors for *Corynebacterium glutamicum*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 70-79.
- Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A. 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.
- Eggeling L, Bott M. 2005. *Handbook of Corynebacterium glutamicum*, pp. 540-544. 1st Ed. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CA 3rd, Smith HO. 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* **6**: 343-345.
- Li T, Chen X, Chaudhry MT, Zhang B, Jiang CY, Liu SJ. 2014. Genetic characterization of 4-cresol catabolism in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **192**: 355-365.
- Kim YM, Kwak MH, Kim HS, Lee JH. 2019. Production of indole-3-acetate in *Corynebacterium glutamicum* by heterologous expression of the indole-3-pyruvate pathway genes. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **47**: 242-249.
- He A, Li T, Daniels L, Fotheringham I, Rosazza JP. 2004. *Nocardia* sp. carboxylic acid reductase: cloning, expression, and characterization of a new aldehyde oxidoreductase family. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1874-1881.

22. Gahloth D, Aleku GA, Leys D. 2020. Carboxylic acid reductase: Structure and mechanism. *J. Biotechnol.* **307**: 107-113.
23. Han SS, Kyeong HH, Choi JM, Sohn YK, Lee JH, Kim HS. 2016. Engineering of the conformational dynamics of an enzyme for relieving the product inhibition. *ACS Catal.* **6**: 8440-8445.
24. Rodriguez GM, Atsumi S. 2014. Toward aldehyde and alkane production by removing aldehyde reductase activity in *Escherichia coli*. *Metab Eng.* **25**: 227-237.