

## Recent Advances in the Biotechnological Production of Natural Vanillin

Hyun-Song Kim<sup>1</sup>, Young-Ok Kim<sup>2</sup> and Jin-Ho Lee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science & Biotechnology, Kyungsoo University, Busan 48434, Korea

<sup>2</sup>Biotechnology Research Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

Received October 1, 2021 / Revised October 29, 2021 / Accepted October 29, 2021

Vanillin is the primary flavor and fragrance compound of natural vanilla and is extensively used in the food, beverage, perfumery, pharmaceutical industries, and other applications. Vanillin can be produced by chemical synthesis, extraction from vanilla plants, microbial bioconversion of natural precursors to vanillin, and direct fermentation using glucose. Currently, most commercially available vanillin is produced by extraction from cured vanilla pods and by chemical synthesis using guaiacol and glyoxylic acid as starting raw materials. Due to environmental issues, health complaints, preference for natural sources, and the limited supply and soaring price of natural vanilla, biotechnology-based vanillin production is regarded as a promising alternative. As many microorganisms that are able to metabolize several natural precursors, including ferulic acid, eugenol, isoeugenol, and lignin, and accumulate vanillin, have been screened and evaluated, myriad strategies and efforts have been employed for the development of commercially viable production technology. This review outlines the recent advances in the biotechnological production of natural vanillin with the use of these natural precursors. Moreover, it highlights the recent engineering approaches for the production of natural vanillin from renewable carbon sources based on the de novo biosynthetic pathway of vanillin from glucose, together with appropriate solution strategies to overcome the challenges posed to increase production titers.

**Key words** : Bioconversion, biotechnology, direct fermentation, natural vanillin, vanilla

### 서 론

바닐린(vanillin, 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde; Fig. 1B)은 바닐라 콩(vanilla bean)에서 추출한 달콤하며 크림성의 강렬한 향을 지닌 흰색 바늘 모양의 결정성 분말로, 대표적인 향미를 부여하는 방향족 알데히드(aromatic aldehyde) 중의 하나이다[6, 23]. 가장 선호하는 향미(flavor), 향료(fragrance) 특성을 가지고 있어 식품, 음료, 화장품, 의약품 등에 널리 사용되며, 향균/항산화 활성을 가지고 있어 생물보존제(biopreservative)로 이용된다[12]. 또한 aldomet, dopamine, piperine, L-DOPA와 같은 의약품 생산을 위한 중요 원료물질이며, 생활용품, 탈취제, 공기 청향제(air fresheners), 바닥 광택제 등에 사용되고 있다.

현재 전세계적으로 바닐린의 수요는 약 20,000 톤에 이르며, 화학합성법, 식물추출법, 미생물을 이용한 생물전환법 또는 직접발효법 등에 의해 생산되고 있다[3, 6, 17]. 거의 대부분(~85%)의 바닐린은 석유-기반 페놀(phenol)과 글리옥살산

(glyoxylic acid)을 이용한 화학합성법으로 생산(합성 바닐린, synthetic vanillin)되고 있으며, 가장 값싸게 생산할 수 있는 장점이 있지만, 환경 오염의 유발, 기질 선택성의 결여에 따른 공정 효율의 감소 및 하루 공정 비용의 상승 등의 단점이 있다 [3, 12]. 바닐라 콩에서 추출하여 생산되는 천연 바닐라(natural vanilla)는 생산지역의 환경적/정치적 요인, 재배의 어려움, 노동 집약적인 큐어링(curing) 공정, 범 세계적인 천연품에 대한 선호도 등의 요인으로 인해 가격이 급등(~11,000 \$/kg)하고 공급이 절대적으로 부족하여 전체 수요의 1% 미만을 공급하고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 미생물 생명공학기술을 활용한 천연 바닐린(natural vanillin or bio-vanillin) 생산 방법이 새로운 대안으로 부상하고 있다. 먼저 적절한 미생물을 선별하고, 관련 유전자들을 도입 또는 결손한 미생물을 개발하여, 전구체인 페룰산(ferulic acid), 유제놀(eugenol), 또는 이소유제놀(isoeugenol)을 사용하여 생물전환법으로 천연 바닐린(바이오 바닐린)을 생산하는 방법이다[6]. 그러나, 전구체가 매우 고가이거나, 중간 독성물질의 축적, 부산물 형성 등의 문제로 저 비용으로 생산하기 어려운 단점이 있다. 한편, 시스템 대사공학을 기반으로 바닐린을 생합성하는 인공 대사 경로를 효모에 도입한 미생물을 개발하여 포도당으로부터 직접 천연 바닐린을 생산하는 기술이 보고되었다[9]. 또한, 축적된 바닐린은 세포에 존재하는 다양한 aromatic aldehyde reductases 촉매반응을 통해 빨리, 쉽게 바닐릴알코올(vanillyl alcohol)로 전환되는 문제점을 해결하기 위해 관련 유전자들

#### \*Corresponding author

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

E-mail : [jhlee83@ks.ac.kr](mailto:jhlee83@ks.ac.kr)

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

탐색, 결손, 평가하는 연구가 진행되고 있다[14, 25].

본 논문은 향료 중에서 전 세계적으로 수요가 가장 많은 바닐린의 특징과 기존 생산방법 및 문제점을 파악하고, 재생 가능한 자원을 활용한 생물공학 기법으로 천연 바닐린을 생산하는 최신의 연구 동향, 개발 기술, 농도 향상에 장애가 되는 요인과 해결 방안 등을 정리하여 보고한다.

## 본 론

### 바닐라와 바닐린의 특징과 용도

바닐라 식물은 열대와 아열대 지역에 자생하는 난초(*Orchidaceae*)과의 다년생 덩굴로, 상업적으로 *Vanilla planifolia*, *V. tahitensis*, *V. pompona* 3종이 제일 중요하며, 특히 *V. planifolia*는 향미 측면에서 우수하여 널리 재배되는 종이다[6, 24, 29]. 천연 바닐라는 수확한 바닐라 꼬투리를 큐어링 공정을 거쳐 숙성한 후 추출하여 얻어지는 향료로, 주요 향미 성분은 바닐린, 바닐산(vanillic acid), 바닐릴알코올, 프로토타테추산(proto-catechuic acid), 프로토타테추알코올(protocatechuic alcohol), 프로토타테추알데히드(protocatechuic aldehyde), 4-히드록시벤조산(4-hydroxybenzoic acid), 4-히드록시벤즈알데히드(4-hydroxybenzaldehyde), 4-히드록시벤질알코올(4-hydroxybenzyl alcohol) 등과 같은 200 가지 이상의 휘발성 화합물로 구성되어 있으며(Fig. 1), 이들 혼합물에 의해 바닐라 향료 고유의 향, 풍미, 맛을 부여한다[8, 24, 27]. 바닐라의 주성분인 바닐린은 숙성된 바닐라 콩에 약 1-2% 존재하며, 아로마 향

은 꽃, 자두/견포도, 매콤한 나무, 담배의 향으로 묘사된다[17]. 분리된 바닐린은 흰색 또는 약간의 노란색을 띠며, 알코올, 아세톤과 같은 유기용매에 잘 녹는 물리적인 특징을 갖는다.

바닐린은 아이스크림, 제과, 음료 등의 다양한 가공식품에 약 60%, 향수, 화장품용으로 약 33%, 제약용으로 약 7% 사용된다[23]. Papaverine, L-DOPA, L-methyl dopa, trimethoprim 과 같은 의약품, hydrazones와 같은 제초제, 소포제의 원료물질로 사용되는 중요한 전구체이다[10]. 한편, 바닐린은 항산화 효과, 세균, 효모, 곰팡이에 대한 항균효과, 항 돌연변이 효과 등 다양한 생물학적 생리 활성 기능을 가지고 있어 향후 더 많은 용도에 적용할 수 있는 물질이다.

### 기존 방법에 의한 바닐린 생산

#### 천연 바닐라 생산

오늘날 바닐라는 마다가스카라, 인도네시아, 중국, 통가, 코모레 등지에서 재배/생산되고 있으며[17], 기후조건은 강우량이 적고, 고온(평균 27°C) 다습한 고지대 환경에서 잘 자란다. 바닐라 식물은 식재(植栽, planting) 후 2-3년이 지나야 꽃이 피며 그 모양이 닫힌 형태이기 때문에 24시간 내에 사람이 직접 인공수분을 시켜야 하며, 10-12개월 후 성숙한 형태의 꼬투리(pod)를 수확할 수 있는 등 재배상의 어려움과 노동집약적인 문제점이 있다[24]. 또한, 1 kg의 천연 바닐라를 얻기 위해서는 500 kg의 바닐라 콩이 필요하며 이는 약 40,000개의 수분된 꽃이 필요해, 매우 넓은 면적에 오랜 기간 재배를 해야 소량 얻을 수 있다. 수확한 꼬투리 안의 초록색 바닐라 콩에

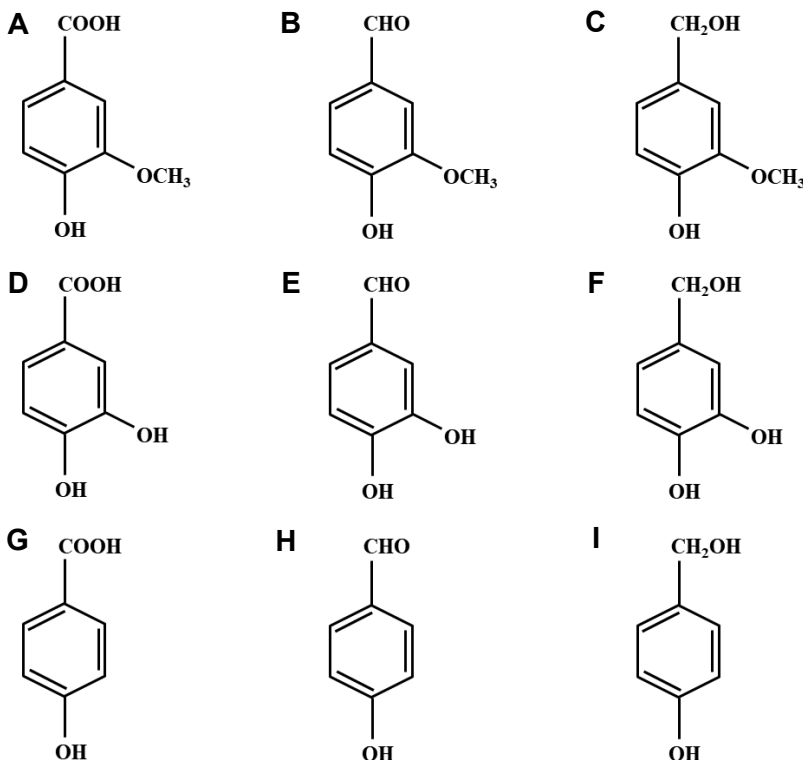


Fig. 1. Chemical structure of vanillin and related compounds in natural vanilla. (A) Vanillic acid; (B) vanillin; (C) vanillyl alcohol; (D) protocatechuic acid; (E) protocatechuic aldehyde; (F) protocatechuic alcohol; (G) 4-hydroxybenzoic acid; (H) 4-hydroxybenzaldehyde; (I) 4-hydroxybenzyl alcohol.

존재하는 바닐린은 포도당과 결합한 배당체인 글루코바닐린 (glucovanillin)으로 존재하기 때문에 바닐라 향은 없으며, 불 유쾌한 쓴맛이 난다. 따라서 꼬투리에 있는 글루코바닐린을  $\beta$ -글루코시다아제 ( $\beta$ -glucosidase) 효소를 이용하여 다시 바닐린으로 전환하는 일련의 큐어링(curing) 공정을 거쳐 바닐라 향이 만들어진다.

큐어링 공정은 살청(殺靑, killing), 발한(發汗, sweating), 건조(drying), 조정(conditioning)의 4단계 가공과정으로 거친다 [24]. 1단계 살청은 꼬투리를 열탕에서 수 분간 침지(浸漬, soaking)시켜 세포의 호흡기능을 중단시키고 조직의 구조를 파괴하여 다음 단계에서 여러 분해효소가 잘 용출되어 기질과 잘 접촉할 수 있도록 도와주는 과정이다. 2단계는 꼬투리를 모포 등으로 덮어 발한시켜 꼬투리에 있는 수분을 증발시켜 미생물의 오염을 감소시키며, 콩에 있는 큐어링에 관여하는 효소가 가장 높은 활성을 유지할 수 있도록 해준다. 이 과정에서 많은 배당체가 분해되어 바닐린으로 전환되며, 폴리페놀성 화합물이 산화되면서 콩은 초코렛-갈색을 띠며 바닐라 향이 생성된다. 발한이 끝난 콩에는 약 60-70%의 수분이 남아있어 미생물의 오염방지와 바람직하지 않은 효소활성과 생화학적 변화를 방지하기 위해 건조를 통해 수분함량을 25-30%로 낮춘다. 마지막으로 건조된 콩은 밀폐된 상자에서 수 개월간 보관하는 조정과정을 거쳐 에스테르화, 에테르화, 산화적 분해 등의 화학적, 생화학적 반응이 일어나면서 여러 휘발성 아로마 성분들이 형성된다. 이러한 가공을 거친 바닐라는 그대로 향신료 등으로 사용되거나 가공된 바닐라 꼬투리를 용매로 추출하여 제품화한다. 천연 바닐라는 퍼콜레이션(percolation)법과 울레오레진(oleoresin)법으로 추출한다. 퍼콜레이션법은 35-50% 알코올 용매를 바닐라 콩에 투입하여 진공상태에서 48-72 시간 순환시키면서 약 4배 강도의 바닐라 추출액을 얻는다. 울레오레진법은 분쇄된 콩을 약 45°C의 진공 상태에서 에탄올을 순환시키면서 8-9일간 추출하여 약 10배의 강도의 바닐라 추출액을 제조한다.

### 합성 바닐린 생산

합성 바닐린은 코니페린(coniferin), 유제놀(eugenol), 리그닌(lignin), 구아이아콜(guaiacol) 등의 원료물질을 사용하여 화학합성법으로 생산될 수 있다. 첫째, 코니페린으로부터 바닐린을 제조하기 위해 약 5,000 그루의 전나무 또는 소나무에서 채취한 수액(cambial sap)에서 코니페릴 알코올(coniferyl alcohol)의 배당체인 코니페린(coniferin)을 얻는다. 중크롬산 칼륨(potassium dichromate,  $K_2Cr_2O_7$ )과 황산 혼합물을 첨가하면 코니페린은 산화되어 약 350 g/kg의 수율로 바닐린을 얻을 수 있다[24]. 그러나 이 공정은 매우 비싸 경제성이 없는 문제점이 있다. 둘째, 유제놀로부터 바닐린을 제조하기 위해 정향(clove), 육두구(nutmeg), 계피(cinnamon)에서 얻어지는 유제놀을 원료물질로 사용하여 먼저 디에틸렌 글리콜(diethylene glycol)을 함유한 수산화칼륨(KOH) 용액에서 이성

화반응을 통해 이소유제놀(isoeugenol)로 전환시킨다. 2단계로 사산화오스뮴(osmium tetroxide,  $OsO_4$ )/메타과요오드산나트륨(sodium metaperiodate,  $NaIO_4$ ), 오산화바나듐/과산화수소(vanadium pentoxide  $V_2O_5/H_2O_2$ ), 염기성 니트로벤젠(nitrobenzene)과 같은 산화제를 처리하면 이소유제놀은 바닐린으로 산화된다. 리그닌은 화학물질, 생물연료 등을 생산할 수 있는 높은 잠재력을 지닌 복합 방향족 이종중합체(aromatic heteropolymer)로, 다양한 산화적 탈중합화(oxidative depolymerization) 과정을 통해 리그닌에서 바닐린이 만들어진다 [31]. 일반적으로 온도, pH, 압력, 산화제, 촉매제, 나무 종류, 바이오매스 전처리 과정 등의 여러 변수가 생산 수율에 많은 영향을 미치며, 특히 산소, 과산화산소, 니트로벤젠, 귀금속(noble metals), 전이 금속염(transition metal salts), 페로브스카이트형 산화물(perovskite-type oxides)과 같은 촉매제가 리그닌으로부터 바닐린 생산수율 향상에 큰 기여를 하는 것으로 확인되었다. 상업적으로는 목재의 아황산염 펄프화 공정(sulfite pulping)에서 부산물로 얻어지는 리그노설포산(lignosulfonate)이 풍부한 아황산페액을 사용하여 바닐린을 제조한다 [4]. 한편, 전세계적으로 공급되는 바닐린의 약 85%는 대부분 페놀에서 얻어지는 구아이아콜을 원료로 Riedel 공법을 통해 합성된다[4]. 첫 단계로 글리옥살산을 구아이아콜에 축합(condensation)시켜 바닐릴만델산(vanillylmandelic acid)을 합성하는데, 이 반응은 글리옥살산 축합이 파라(para) 위치에 선택적으로 일어나 부산물의 생성을 최소화할 수 있는 이점이 있다. 2단계로 구리(II) 수산화물/산소 시스템을 사용하여 80-130°C에서 산화적 탈탄산 반응을 거쳐 바닐린이 생산된다.

### 생물전환법에 의한 천연 바닐린 생산

페룰산, 유제놀, 이소유제놀, 리그닌 등의 다양한 전구체를 사용하여 생물전환법으로 바닐린을 생산할 수 있는 기술이 보고되었다[6]. 천연 바닐린을 생산하는데 있어 해결해야 할 중요한 현안은 (1) 전구체들과 바닐린의 세포 내 독성, (2) 비효율적인 대사 흐름, (3) 바람직하지 않은 부산물의 형성, (4) 기질과 바닐린의 물리화학적 특성에 기인하는 하류 공정 비용의 증대, (5) 선택된 미생물에서의 바닐린의 추가적인 대사 등이 있다[6]. 이러한 문제들은 변이-기반 균주선별, 효소/균주 개발을 위한 유전공학, 비용절감을 위한 하류공정 개발 등을 통해 해결하는 연구가 진행되고 있다.

### 페룰산을 이용한 바닐린 생산

일반적으로 페룰산은 식물 세포벽에 존재하는 단백질 또는 다당류와 에스테르 결합(ester bond)이나 이량체(homodimer) 형태로 존재한다. 곡류의 경우, 페룰산은 아라비노스(arabinose), 포도당, 자일로스(xylose), 또는 갈락토스(galactose)와 에스테르 결합한 형태로 세포벽의 펙틴 또는 헤미셀룰로스(hemicellulose)의 구성성분을 이룬다. 농산물 폐기물을 이용하여 화학적 또는 효소 처리를 통해 페룰산을 생산할 수 있다.

효소원으로는 *Aspergillus niger*, *Lactobacillus fermentum* 등의 곰팡이 또는 세균 유래의 feruloyl esterase가 알려져 있다. 상업적으로 바닐린 생산을 위한 페룰산은 쌀겨(rice bran)를 원료로 효소 처리하여 얻기 때문에 매우 고가인 약 180 \$/kg에 생산된다[6].

페룰산에서 바닐린으로 가는 대사경로는 CoA-의존형 비-β-산화 탈아세틸화(non-β-oxidative deacetylation), CoA-의존형 β-산화 탈아세틸화(β-oxidative deacetylation), 비-산화 탈아세틸화(non-oxidative deacetylation), CoA-비의존형 탈아세틸화, 측쇄 환원경로(side-chain reductive pathway)의 5가지가 알려져 있다[20]. 그 중에서 feruloyl-CoA synthetase (유전자 *fcs*)와 enoyl-CoA hydratase/aldolase (유전자 *ech*) 효소 촉매 반응에 의한 CoA-의존형 비-β-산화 탈아세틸화 경로가 가장 많이 연구되어 있으며(Fig. 2), 대표적으로 *Amycolatopsis* sp. HR167, *Delftia acidovorans*, *Pediococcus acidilactici* BD16, *Pseudomonas fluorescens* AN103, *Rhodococcus* sp., *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6, *Streptomyces* sp. V-1 등의 미생물에서 그 경로가 보고되어 있다. *P. fluorescens*, *Pseudomonas* sp. HR 199, *Rhodococcus*, *Pycnoporus cinnabarinus* 등의 미생물을 이용하여 생물전환을 통해 페룰산에서 바닐린이 생산될 수 있음이

보고되었다[18, 19, 21, 22, 30]. 특히, *P. cinnabarinus*에서 수율 54%, 농도 126 mg/l의 바닐린이 생산되었다[30](Table 1). 그러나 많은 경우 바닐린 대사경로를 거쳐 분해되기 때문에 바닐린이 많이 축적되기 어려운 문제가 있다. 바닐린에 대한 높은 내성을 갖는 방선균인 *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116을 이용하여 바닐산으로의 산화에 관여하는 vanillin dehydrogenase 유전자인 *vdh*를 결손한 균주를 개발하고 페룰산을 첨가한 생물반응기에서 평가한 결과, 모균주 대비 바닐산의 축적은 크게 감소하면서 1 g/l 바닐린이 생산되었다[5](Fig. 2). 또한, 추가적으로 유전자 *fcs*와 *ech*를 항시 발현하여 전환수율 94.9%, 22.3 g/l 바닐린을 생산하였다[5](Table 1). Hua 등[11]은 바닐린의 독성과 생산물 저해 문제를 해결하기 위해 생물전환 공정에서 바닐린을 흡착할 수 있는 다공성 레진을 이용하여 55 시간 운전한 결과, 45 g/l 페룰산을 투입하여 19.2 g/l 바닐린을 생산하였다. 한편, *Amycolatopsis* 유래의 *fcs*와 *ech* 유전자를 *Escherichia coli*에서 발현하여, LB 배지에서 1 g/l 페룰산을 투입한 조건에서 최대 580 mg/l 바닐린이 축적되었다[35]. 더욱이 바닐린의 독성문제를 해결하기 위해 바닐린 내성 *E. coli*를 개발하여 상기의 유전자를 도입하고 흡착용 레진이 장착된 생물반응기에서 운전한 결과, 10 g/l 페룰산으로부터 2.9 g/l

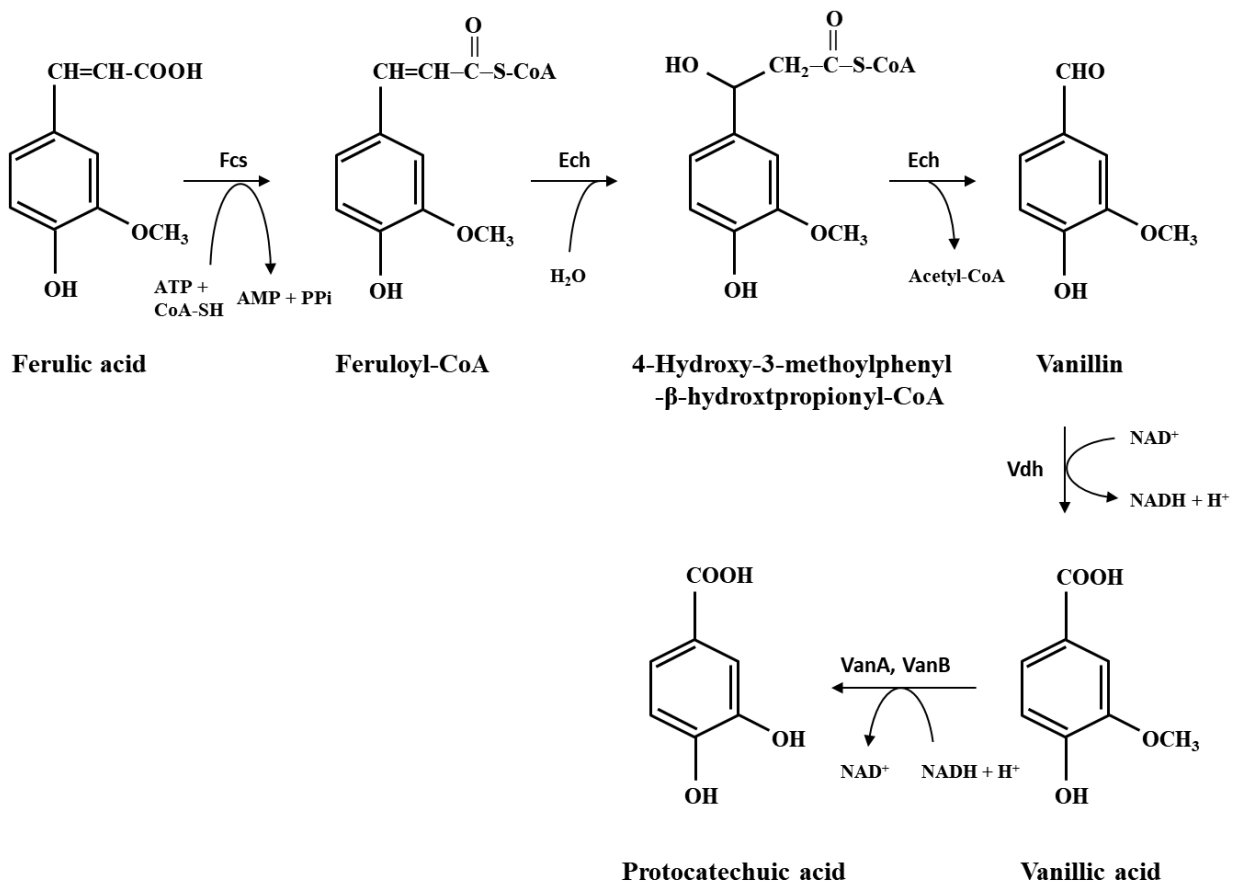


Fig. 2. Metabolic pathway for the synthesis of vanillin from ferulic acid. Fcs, feruloyl-CoA synthetase; Ech, enoyl-CoA hydratase/aldolase; Vdh, vanillin dehydrogenase; VanA and VanB, vanillate O-demethylase.

바닐린을 얻었다[34](Table 1).

**유제놀 및 이소유제놀을 이용한 바닐린 생산**

유제놀은 정향나무 *Syzygium aromaticum*에서 추출한 기름에 약 80% 존재하는 주성분이다. 분리된 유제놀은 약 50 \$/kg으로 페롤산에 비해 싼 가격으로 얻을 수 있으며, GRAS 화합물

이기 때문에 바닐린 생산 원료로 페롤산에 비해 많은 장점을 갖고 있다. 유제놀은 vanillyl alcohol oxidase (EC 1.1.3.38, *vaoA* 유전자) 또는 eugenol hydroxylase (EC 1.14.15.-, *ehyA*, *ehyB* 유전자) 효소 촉매에 의해 coniferyl alcohol로 전환되며, coniferyl alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.94, *calA* 유전자)에 의해 coniferyl aldehyde로 산화되고, coniferyl aldehyde de-

Table 1. Biotechnological production of natural vanillin from precursor substrates or renewable carbon source

Precursor or Carbon source	Microorganism	Characteristics	Vanillin titer	Yield	References
Ferulic acid	<i>Pseudomonas cinnabarinus</i>	-	0.13 g/l	54%	30
	<i>Amycolatopsis</i> sp. ATCC 39116	$\Delta vdh$ Expression of <i>fcs</i> and <i>ech</i>	1 g/l 22.3 g/l	- 94.9%	5
	<i>Streptomyces</i> sp. V-1	Using adsorbent resin DM11	19.2 g/l	42.7%	11
	<i>Escherichia coli</i>	Expression of <i>fcs</i> and <i>ech</i> from <i>Amycolatopsis</i>	0.58 g/l	58%	35
	<i>Escherichia coli</i>	Using vanillin-resistant strain and adsorbent resin XAD-2	2.9 g/l	29%	34
	Eugenol	<i>Pseudomonas resinovorans</i> SPR1	-	0.24 g/l	26%
<i>Rhodococcus jostii</i>		Immobilization of eugenol oxidase	2.9 g/l/hr	-	7
Isoeugenol	<i>Bacillus fusiformis</i>	-	32.5 g/l	-	36
	<i>Pseudomonas putida</i> IE27	-	16.1 g/l	-	32
	<i>Escherichia coli</i>	Expression of isoeugenol monooxygenase gene	28.3 g/l	81%	33
Lignin	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Solid culture	52.5 $\mu$ g/g	-	2
	<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	$\Delta vdh$	96 mg/l	-	26
Glucose	<i>Escherichia coli</i> KL7	$\Delta aroE$ , Expression of <i>aroZ</i> from <i>Podospira anserina</i> and <i>comt</i> from <i>Homo sapiens</i>	5 g/l vanillic acid	-	16
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	$\Delta ADH6$ , Expression of genes encoding ACAR transferase from <i>Nocardia iowensis</i> , phosphopantetheinyl transferase from <i>Corynebacterium glutamicum</i> , 3-dehydroshikimate dehydratase, and catechol O-methyltransferase from <i>Homo sapiens</i> .	45-65 mg/l	-	9

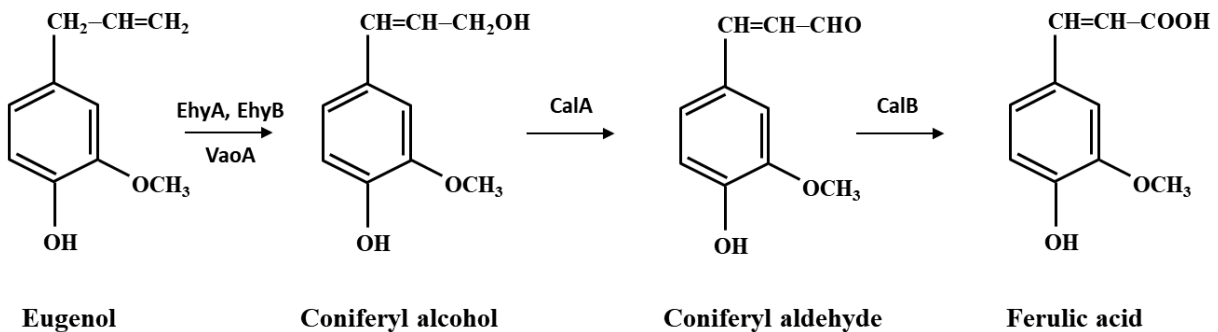


Fig. 3. Metabolic pathway for the synthesis of ferulic acid from eugenol. EhyA and EhyB, eugenol hydroxylase; VaoA, vanillyl alcohol oxidase; CalA, coniferyl alcohol dehydrogenase; CalB, coniferyl aldehyde dehydrogenase.

hydrogenase (EC 1.2.1.68, *calB* 유전자)에 의해 페룰산이 생성된다[20](Fig. 3). 페룰산은 위에서 언급한 효소에 의해 바닐린으로 전환되며, 추가적으로 바닐산, 프로토키테추산으로 전환되어 대사된다. *Corynebacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *P. resinovorans*, *Bacillus safensis*와 같은 미생물은 유제놀을 대사하여 중간체, 바닐린, 그리고 추가적 분해산물을 생산할 수 있다. *P. resinovorans* SPR1을 사용하여 전환 수율 10%, 바닐린 0.24 g/l를 얻었으며[1], *B. safensis* SMS1003의 경우 전환 수율 26%, 바닐린 0.12 g/l를 얻었다[28]. 한편 *Rhodococcus jostii* 유래의 eugenol oxidase를 여러 지지체에 고정화하여 2.9 g/l/hr의 바닐린을 생산하였다[7](Table 1).

또 다른 전구체인 이소유제놀은 정향유에 소량 존재하는 화합물로, 에폭사이드-디올(epoxide-diol) 대사경로를 통해 분해되어 바닐린이 생산된다. Isoeugenol monooxygenase 촉매에 의해 이소유제놀은 이소유제놀 에폭사이드(isoeugenol epoxide)로 전환되고, 가수분해되어 이소유제놀 디올(isoeugenol diol)을 형성한 후 바닐린과 바닐릴알코올을 생산한다[20](Fig. 4). *Aspergillus niger*, *Bacillus* sp., *B. fusiformis*, *B. pumillus*, *B. subtilis*, *P. putida* 등의 미생물은 효율적으로 이소유제놀을 바닐린으로 전환할 수 있음이 알려졌다. 그 중에서 특히 *B. fusiformis*는 이소유제놀로부터 32.5 g/l 바닐린을 생산하였으며[36], *P. putida* IE27은 24시간 후 16.1 g/l 바닐린을 생산하였다[32]. 더욱이 Yamada 등[33]은 *P. putida* 유래의 isoeuge-

nol monooxygenase의 유전자를 *E. coli*에서 발현하여 230 mM 이소유제놀을 전구체로 사용하여 바닐산과 아세트알데히드 등의 부산물의 축적없이 전환수율 81%, 28.3 g/l 바닐린을 생산하였다(Table 1).

**리그닌을 이용한 바닐린 생산**

리그닌은 자연계에 가장 풍부한 복잡한 방향족 이종 중합체로 바닐린 생산의 중요한 원료물질이다. 리그닌 분해에 관여하는 효소는 laccase (EC 1.10.3.2), manganese peroxidase (EC 1.11.1.13), lignin peroxidase (EC 1.11.1.14), 여러 peroxidase (EC 1.11.1.16), dye-decolorizing peroxidase (EC 1.11.1.19) 등이 알려져 있다[20]. 햇빛에 건조된 녹색 코코넛 껍질질을 리그닌 원료로 사용하여 24시간 동안 담자균류 *Phanerochaete chrysosporium* 를 고체 발효한 결과, 바닐린 52.5 µg/g를 생산하였다[2]. *Rhodococcus jostii* RHA1에서 vanillin dehydrogenase를 암호화하는 유전자를 결손한 결과, 2.5% 밀짚 리그노셀룰로스를 함유한 배지에서 96 mg/l 바닐린을 생산하였다[26] (Table 1).

**미생물 직접 발효법에 의한 천연 바닐린 생산**

**포도당을 이용한 바닐린 생산**

생물전환법을 통한 바닐린 생산용 전구체로 사용되는 페룰산, 유제놀, 이소유제놀, 리그닌 등과 비교하면, 포도당과 같은 재생 가능한 자원(sustainable resource)은 매우 값싼 원재료이

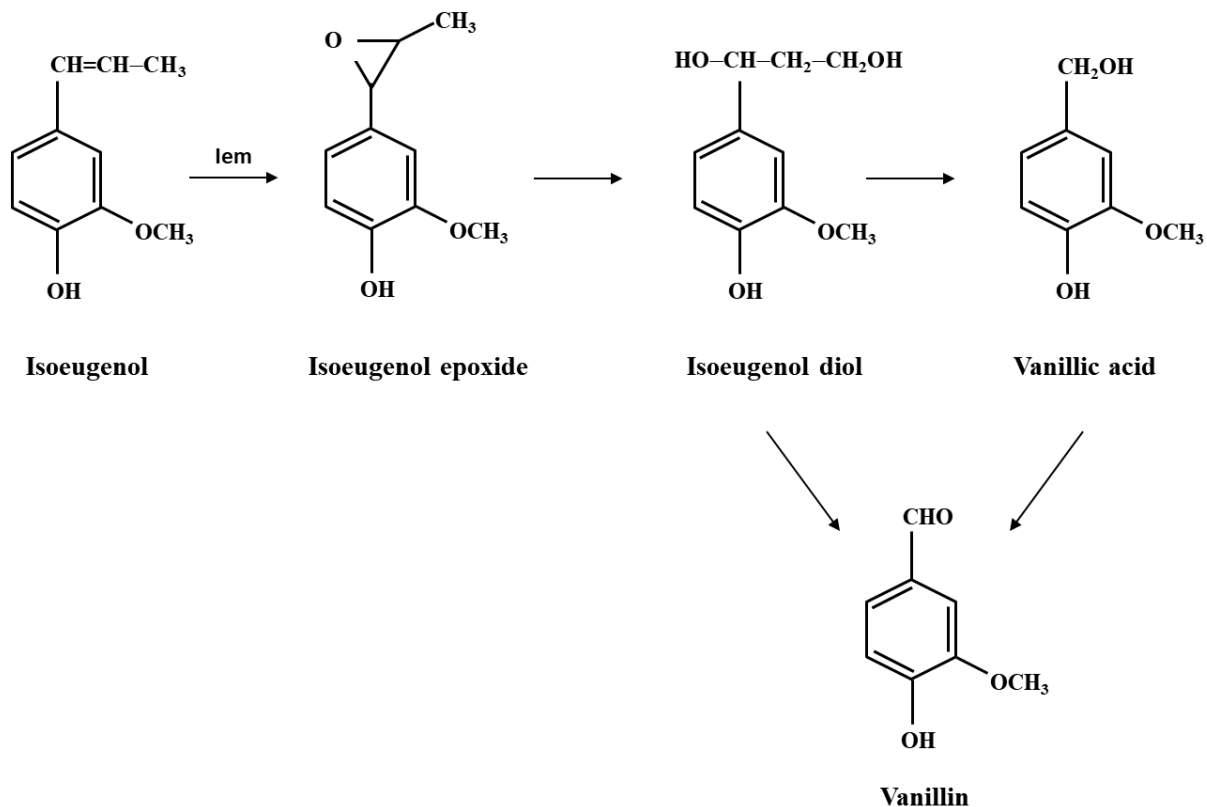


Fig. 4. Metabolic pathway for the synthesis of vanillin from isoeugenol. Ism, isoeugenol monooxygenase.

며, 미생물에 독성을 부여하지 않는 가장 선호하는 탄소원이다. 따라서 미생물을 이용하여 포도당으로부터 발효를 통해 직접 바닐린을 생산하는 것은 가장 경제적인 대안으로 여겨진다. Li와 Frost [16]는 *E. coli*에서 포도당에서 바닐산을 생산하고, 바닐산에서 효소촉매로 바닐린으로 전환하는 방법을 결합하여 포도당에서 바닐린을 생산하는 새로운 방법을 개발하였다. 1단계로 *aroE* 결손, *Podospora anserina* 유래 *aroZ* 발현(3-dehydroshikimate dehydratase), 인간유래 *comt* 발현(catechol-O-methyltransferase, COMT)을 통해 바닐산을 생산하는 *E. coli* KL7을 개발하였다. 2단계로 *in vitro* 상에서 *Neurospora crassa* 유래의 aromatic carboxylic acid reductase (ACAR, EC 1.2.1.30) 효소 추출물을 사용하여 바닐산으로부터 바닐린을 생산하였다. 미생물에서 포도당으로부터 직접발효법으로 바닐린을 생산하는 기술은 Hansen 등[9]이 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Schizosaccharomyces pombe*를 이용하여 개발하였다. *Nocardia iowensis* 유래의 ACAR, *Corynebacterium glutamicum* 유래의 phosphopantetheinyl transferase, *Podospora pauciseta* 유래의 3-dehydroshikimate dehydratase, 인간 유래

의 COMT를 *ADH6*가 결손된 효모에 도입하여 45-65 mg/l 바닐린을 생산하였다(Fig. 5; Table 1). 바닐린의 세포 내 독성 문제는 *Arabidopsis thaliana* 유래의 UDP-glycosyltransferase를 도입하여 글루코바닐린으로 전환하여 해결하였다.

**고농도 천연 바닐린 생산 문제점과 해결방안**

알데히드 화합물은 아민류와 Schiff bases를 형성하여 효소의 활성을 저해하는 등의 높은 반응성에 기인한 독성으로 인해 세포가 쉽게 죽는 문제가 있다[15]. 바닐린 또한 방향족 알데히드 화합물로 세포에 강한 독성물질로 작용하여 높은 농도로 축적되기 어렵다[13]. 이를 해결하기 위한 방안으로 배양 또는 생물전환 과정에서 바닐린에 대한 흡착성이 뛰어난 레진을 이용하는 방법[11, 34], 인공변이를 유도하여 바닐린에 대한 내성을 갖는 변이균주를 선별하는 방법[34], 상대적 독성이 매우 낮은 바닐린 배당체인 글루코바닐린을 생산하는 방법[9] 등을 통해 바닐린 독성 문제를 해결하는 기술이 보고되었다.

한편, 많은 미생물에서 바닐린은 추가적인 대사를 통해 다른 물질로 전환되기 때문에 바닐린이 고농도로 축적되기 어려

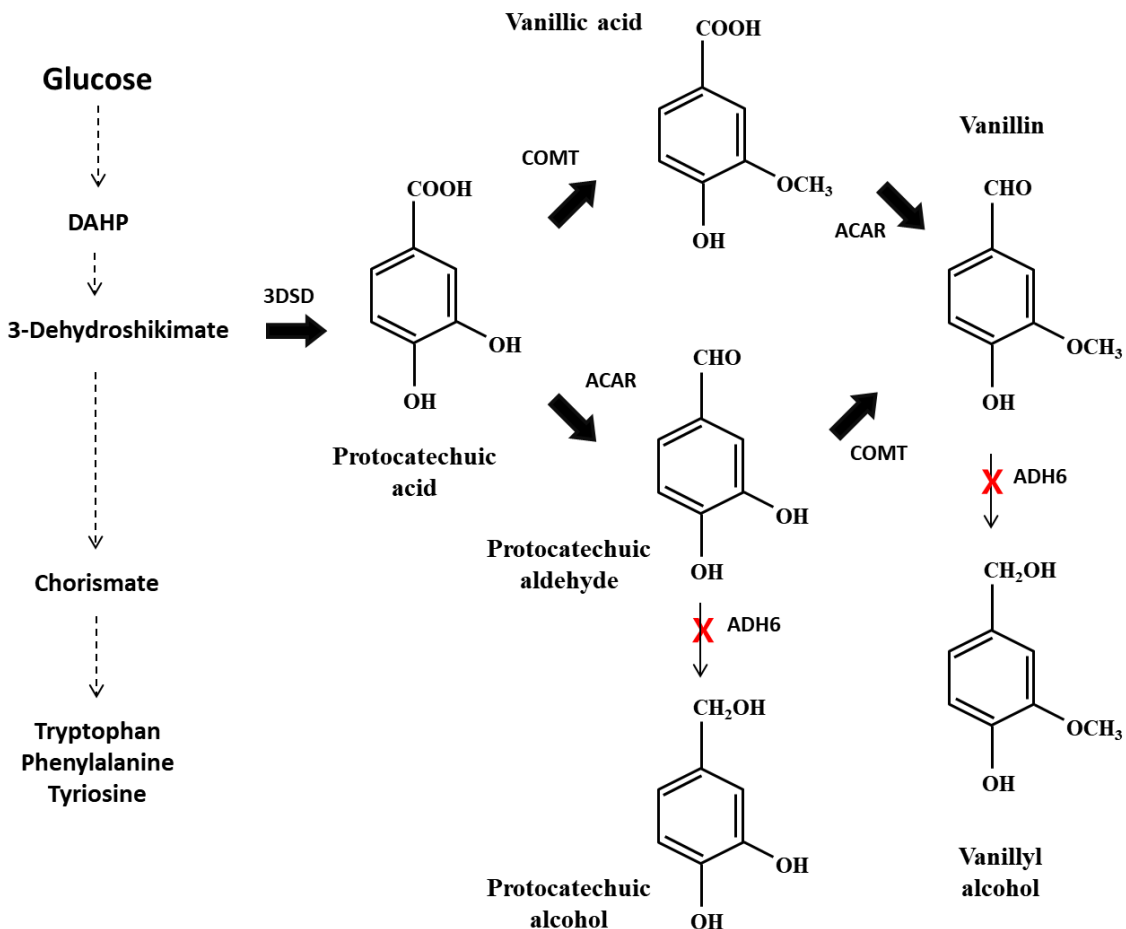


Fig. 5. Artificial biosynthetic pathway for the synthesis of vanillin from glucose in yeast. 3DSD, 3-dehydroshikimate dehydratase; COMT, catechol-O-methyltransferase; ACAR, aromatic carboxylic acid reductase, ADH6, alcohol dehydrogenase 6. X means deletion of a corresponding gene.

운 점이 있다. 대표적인 바닐린 대사경로는 (1) vanillin dehydrogenase 촉매에 의한 바닐산으로의 산화, (2) 다양한 aromatic aldehyde reductase (AAR), alcohol dehydrogenase (ADH) 촉매에 의한 바닐릴알코올로의 환원이다(Fig. 2, Fig. 5). *Amycolatopsis* sp. 및 *Rhodococcus jostii* 균주에서 vanillin dehydrogenase를 암호화하는 *vdh*의 결손을 통해 바닐린의 농도가 증가됨을 확인하였다[5, 26]. 효모 및 *E. coli*에 존재하는 다양한 AAR, ADH, 또는 미확인된 oxidoreductase의 효소 촉매반응에 의해 바닐린은 쉽게, 빨리 바닐릴알코올로 전환된다. Hansen 등[9]은 효모에서 총 29개의 관련 유전자를 결손하는 실험을 통해 바닐릴알코올로의 전환이 약 50% 감소된 균주를 개발하였다. Kunjapur 등[14]은 *E. coli*에서 *dkgA*, *dkgB*, *yeaE*, *yahK*, *yjgB*, *yqhD* 6개의 유전자 결손 균주를 개발하여 벤질알코올, 프로토키테유알코올, 바닐릴알코올의 생산을 감소시키면서 벤즈알데히드, 프로토키테유알데히드, 바닐린의 생산을 향상시킨 결과를 얻었다. Rodriguez와 Atsumi [25]는 *E. coli*에서 총 13개의 유전자 결손(*adhE*, *yqhD*, *adhP*, *cutG*, *yiaY*, *ahr*, *betA*, *fucO*, *yahK*, *dkgA*, *gldA*, *ybbO*, *yghA*)을 통해 알데히드 환원 활성을 90~99% 감소시킨 결과를 얻었다. 따라서, 포도당으로부터 바닐린을 생산하는 미생물을 개발하는 데 있어 바닐린의 산화경로뿐만 아니라 환원경로를 동시에 차단하면 고농도 바닐린 생산향상에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

## 결론

바닐린은 천연 바닐라의 주요 향미 화합물이며 식품, 음료, 향수, 제약 산업 및 기타 응용 분야에서 광범위하게 사용된다. 현재 대부분의 바닐린은 바닐라 식물을 이용한 추출법과 화학 합성법으로 생산되지만, 환경문제, 천연품에 대한 소비자의 선호, 천연 바닐라의 제한된 공급 및 치솟는 가격으로 인해 생명공학에 기반한 천연 바닐린의 생산은 유망한 대안으로 간주된다. 페룰산, 유제놀, 이소유제놀, 리그닌을 포함한 여러 천연 전구체를 대사하고 바닐린을 축적할 수 있는 미생물을 선별/평가하면서, 상업적으로 실행 가능한 생물전환법에 의한 생산기술 개발을 위해 많은 노력을 했다. 또한, 포도당에서 바닐린의 새로운 생합성 경로를 기반으로 천연 바닐린을 생산할 수 있는 새로운 기술이 도출되었다. 이러한 접근법을 통해 보다 더 경제성 있는 고농도 바닐린 생산기술을 개발하기 위해서 전구체 및 바닐린 독성문제에 대한 해결, 부산물 및 추가적인 대사경로의 차단 등에 대한 다양한 기술개발을 통한 해결방안을 제시하였다. 특히, 미생물을 이용하여 재생 가능한 탄소원으로부터 직접 합성법을 통해 바닐린을 생산하는 기술은 기존 생산법을 대체할 수 있는 유망한 기술이라 사료된다.

## 감사의 글

본 논문은 한국연구재단 이공분야기초연구사업(NRF-2018 R1D1A1B07047207) 및 부산광역시 2021년도 BB21<sup>+</sup> 사업의 지원을 받아 수행되었습니다.

## The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

## References

- Ashengroph, M., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H. and Momenbeik, F. 2011. *Pseudomonas resinovorans* SPR1, a newly isolated strain with potential of transforming eugenol to vanillin and vanillic acid. *N. Biotechnol.* **28**, 656-664.
- Barbosa, E. d. S., Perrone, D., Vendramini, A. L. d. A. and Leite, S. G. F. 2008. Vanillin production by *Phanerochaete chrysosporium* grown on green coconut agro-industrial husk in solid state fermentation. *BioResources* **3**, 1042-1050.
- Ciriminna, R., Fidalgo, A., Meneguzzo, F., Parrino, F., Ilharco, L. M. and Pagliaro, M. 2019. Vanillin: The case for greener production driven by sustainability megatrend. *Chemistry Open* **8**, 660-667.
- Fache, M., Boutevin, B. and Caillol, S. 2016. Vanillin production from lignin and its use as a renewable chemical. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **4**, 35-46.
- Fleige, C., Meyer, F. and Steinbüchel, A. 2016. Metabolic engineering of the Actinomycete *Amycolatopsis* sp. strain ATCC 39116 towards enhanced production of natural vanillin. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**, 3410-3419.
- Gallage, N. J. and Møller, B. L. 2015. Vanillin-bioconversion and bioengineering of the most popular plant flavor and its de novo biosynthesis in the vanilla orchid. *Mol. Plant* **8**, 40-57.
- García-Bofill, M., Sutton, P. W., Guillén, M. and Álvaro, G. 2019. Enzymatic synthesis of vanillin catalysed by an eugenol oxidase. *Appl. Catal. A Gen.* **582**, 117117.
- Gu, F., Chen, Y., Hong, Y., Fang, Y. and Tan, L. 2017. Comparative metabolomics in vanilla pod and vanilla bean revealing the biosynthesis of vanillin during the curing process of vanilla. *AMB Express* **7**, 116.
- Hansen, E. H., Møller, B. L., Kock, G. R., Büchner, C. M., Kristensen, C., Jensen, O. R., Okkels, F. T., Olsen, C. E., Motawia, M. S. and Hansen, J. 2009. De novo biosynthesis of vanillin in fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) and baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 2765-2774.
- Hocking, M. B. 1997. Vanillin: Synthetic flavoring from spent sulfite liquor. *J. Chem. Educ.* **74**, 1055-1059.
- Hua, D., Ma, C., Song, L., Lin, S., Zhang, Z., Deng, Z. and Xu, P. 2007. Enhanced vanillin production from ferulic acid



- using adsorbent resin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**, 783-790.
12. Kaur, B. and Chakraborty, D. 2013. Biotechnological and molecular approaches for vanillin production: a review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **169**, 1353-1372.
  13. Kunjapur, A. M. and Prather, K. L. 2015. Microbial engineering for aldehyde synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 1892-1901.
  14. Kunjapur, A. M., Tarasova, Y. and Prather, K. L. 2014. Synthesis and accumulation of aromatic aldehydes in an engineered strain of *Escherichia coli*. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 11644-11654.
  15. Lee, J. H. and Wendisch, V. F. 2017. Biotechnological production of aromatic compounds of the extended shikimate pathway from renewable biomass. *J. Biotechnol.* **257**, 211-221.
  16. Li, K. and Frost, J. W. 1998. Synthesis of vanillin from glucose. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 10545-10546.
  17. Martău, G. A., Călinoiu, L. F. and Vodnar, D. C. 2021. Bio-vanillin: Towards a sustainable industrial production. *Trends Food Sci. Technol.* **109**, 579-592.
  18. Narbad, A. and Gasson, M. J. 1998. Metabolism of ferulic acid via vanillin using a novel CoA-dependent pathway in a newly-isolated strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology (Reading)* **144**, 1397-1405.
  19. Overhage, J., Priefert, H., Rabenhorst, J. and Steinbüchel, A. 1999. Biotransformation of eugenol to vanillin by a mutant of *Pseudomonas* sp. strain HR199 constructed by disruption of the vanillin dehydrogenase (vdh) gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 820-828.
  20. Paul, V., Rai, D. C., Lakshmi, T. S. R., Srivastava, S. K. and Tripathi, A. D. 2021. A comprehensive review on vanillin: its microbial synthesis, isolation and recovery. *Food Biotech.* **35**, 22-49.
  21. Plaggenborg, R., Overhage, J., Loos, A., Archer, J. A., Lessard, P., Sinskey, A. J., Steinbüchel, A. and Priefert, H. 2006. Potential of *Rhodococcus* strains for biotechnological vanillin production from ferulic acid and eugenol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 745-755.
  22. Plaggenborg, R., Overhage, J., Steinbüchel, A. and Priefert, H. 2003. Functional analyses of genes involved in the metabolism of ferulic acid in *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**, 528-535.
  23. Priefert, H., Rabenhorst, J. and Steinbüchel, A. 2001. Biotechnological production of vanillin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 296-314.
  24. Rao, S. R. and Ravishankar, G. A. 2000. Vanilla flavour: Production by conventional and biotechnological routes. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 289-304.
  25. Rodriguez, G. M. and Atsumi, S. 2014. Toward aldehyde and alkane production by removing aldehyde reductase activity in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* **25**, 227-237.
  26. Sainsbury, P. D., Hardiman, E. M., Ahmad, M., Otani, H., Seghezzi, N., Eltis, L. D. and Bugg, T. D. 2013. Breaking down lignin to high-value chemicals: the conversion of lignocellulose to vanillin in a gene deletion mutant of *Rhodococcus jostii* RHA1. *ACS Chem. Biol.* **8**, 2151-2156.
  27. Sharp, M. D., Kocaoglu-Vurma, N. A., Langford, V., Rodriguez-Saona, L. E. and Harper, W. J. 2012. Rapid discrimination and characterization of vanilla bean extracts by attenuated total reflection infrared spectroscopy and selected ion flow tube mass spectrometry. *J. Food Sci.* **77**, C284-292.
  28. Singh, A., Mukhopadhyay, K. and Sachan, S. G. 2019. Biotransformation of eugenol to vanillin by a novel strain *Bacillus safensis* SMS1003. *Biocatal. Biotransform.* **37**, 292-303.
  29. Sun, R., Sacalis, J. N., Chin, C. K. and Still, C. C. 2001. Bioactive aromatic compounds from leaves and stems of Vanilla fragrans. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5161-5164.
  30. Tilay, A., Bule, M. and Annature, U. 2010. Production of biovanillin by one-step biotransformation using fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 4401-4405.
  31. Wendisch, V. F., Kim, Y. and Lee, J. H. 2018. Chemicals from lignin: Recent depolymerization techniques and upgrading extended pathways. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **14**, 33-39.
  32. Yamada, M., Okada, Y., Yoshida, T. and Nagasawa, T. 2007. Biotransformation of isoeugenol to vanillin by *Pseudomonas putida* IE27 cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**, 1025-1030.
  33. Yamada, M., Okada, Y., Yoshida, T. and Nagasawa, T. 2008. Vanillin production using *Escherichia coli* cells over-expressing isoeugenol monooxygenase of *Pseudomonas putida*. *Biotechnol. Lett.* **30**, 665-670.
  34. Yoon, S. H., Lee, E. G., Das, A., Lee, S. H., Li, C., Ryu, H. K., Choi, M. S., Seo, W. T. and Kim, S. W. 2007. Enhanced vanillin production from recombinant *E. coli* using NTG mutagenesis and adsorbent resin. *Biotechnol. Prog.* **23**, 1143-1148.
  35. Yoon, S. H., Li, C., Kim, J. E., Lee, S. H., Yoon, J. Y., Choi, M. S., Seo, W. T., Yang, J. K., Kim, J. Y. and Kim, S. W. 2005. Production of vanillin by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* **27**, 1829-1832.
  36. Zhao, L. Q., Sun, Z. H., Zheng, P. and Zhu, L. L. 2005. Biotransformation of isoeugenol to vanillin by a novel strain of *Bacillus fusiformis*. *Biotechnol. Lett.* **27**, 1505-1509.

**초록 : 생물공학에 기반한 천연 바닐린 생산에 관한 최근 연구**김현승<sup>1</sup> · 김영옥<sup>2</sup> · 이진호<sup>1\*</sup>(<sup>1</sup>경성대학교 식품생명공학과, <sup>2</sup>국립수산과학원 생명공학과)

바닐린은 천연 바닐라의 주요 향미 화합물이며 식품, 음료, 향수, 제약 산업 및 기타 응용 분야에서 광범위하게 사용된다. 바닐린은 화학합성법, 바닐라 꼬투리를 이용한 식물추출법, 천연 전구체를 이용한 생물전환법, 그리고 포도당을 사용한 직접 발효법에 의해 생산될 수 있다. 현재 상업적으로 이용 가능한 대부분의 바닐린은 큐어링 공정을 거쳐 얻어진 바닐라 꼬투리에서 추출하는 방법과 구아이아콜과 글리옥실산을 원료로 사용하여 화학적 합성법에 의해 생산된다. 환경 문제, 건강 준수, 천연 원료에 대한 선호, 천연 바닐라의 제한된 공급 및 치솟는 가격으로 인해 생명 공학 기반 바닐린 생산은 유망한 대안으로 간주된다. 페룰산, 유제놀, 이소유제놀, 리그닌을 포함한 여러 천연 전구체를 대사하고 바닐린을 축적할 수 있는 많은 미생물이 선별되고 평가되면서, 상업적으로 실행 가능한 생산 기술 개발을 위해 많은 노력을 기울였다. 본 총설은 이러한 천연 전구체를 사용하여 천연 바닐린의 생물공학적 생산에 대한 최근의 발전을 간략하게 설명한다. 또한, 포도당에서 바닐린의 새로운 생합성 경로를 기반으로 재생 가능한 탄소원에서 천연 바닐린을 생산하기 위한 최신의 개발 전략과 생산 농도를 높이는 데 발생하는 문제를 극복하기 위한 적절한 해결방안을 소개한다.