총 설

대사공학 : 그 방법 및 이용

오 덕 근
우석대학교 식품공학과

현재 산업체에서 대부분 사용하고 있는 대사물질을 생산하는 미생물 개량 기술은 돌연변이 방법으로 원하는 미생물의 특성을 얻는데 매우 중요한 역할을 한다. 돌연변이 방법은 경험적인 방식에 의해 나타난 최종산물의 생산량에만 초점을 두고 있어 어떠한 경로로 조절되고 변형되어 생산성이 증가되었는가에 대한 과학적인 접근 방법이 아니므로 미생물의 특성을 정확히 파악할 수 없는 단점이 있다. 분자생물학의 발전으로 과학적인 접근 방법인 유전공학 기술이 도입되어 대사경로에 있어서 특정 효소반응의 변형이 가능하게 되었다. 그러나, 대사물질의 생산을 위한 미생물 개량에 유전공학 기술을 적용하는 것은 미생물의 복잡한 대사체계(metabolic networks)에 대한 전체적인 인식 부족으로 매우 느리게 진행되고 있다. 대사의 부분적인 면을 치중하는 유전공학에 비하여 대사의 전체적인 면을 강조하는 대사공학은 미생물 내의 대사 흐름(flux)을 측정하고 해석하고 조절하는 방법에 집중하고 있다. 대사공학 기술로 세포 내의 흐름 분포의 변화의 조절하여 세포 기능의 최적화와 대사산물 생합성의 최대화를 할 수 있다[64,65].

대사공학은 최근 새롭게 주목받고 있는 연구분야로 대사흐름을 정량적으로 분석한 후 세포특성을 향상시키기 위하여 유전공학 기술을 사용하여 세포의 효소 활성, 조절 능력 및 운반능력을 변화시키는 것이다[63]. 대사흐름을 분석하고 원하는 생물학적 변화를 일으키기 위해서는 대사와 세포기능에 대하여 잘 알아야 한다. 대사와 세포기능은 대사의 각각의 반응이나 부분대사의 이해를 통하여 이루어지는 것이 아니라 전체 대사체계의 개념의 이해를 통하여 가능하다[66]. 대사산물의 증대를 위하여 원하는 생합성을 조절하려면 전체 대사체계의 정확한 개념을 가지고 대사에 대한 분석이 필수적이다. 대사의 정량적인 분석에 사용되는 방법으로는 대사흐름 분석(metabolic flux analysis; MFA), 대사조절 분석(metabolic control analysis; MCA), 대사체계 흐름 분석(flux analysis of metabolic networks) 등이 있다[51,65].

세균 같은 작은 세포도 1000개 이상 되는 효소반응이 정교하게 조절되고 상호 연결된 대사체계로 구성되어 있다. 이러한 대사체계는 유전적으로 최적 상태가 아니기 때문에 산업적 목적을 위해서는 대사공학 기술을 통하여 미생물의 대사체계를 재구성하여 대사의 흐름을 조절하고 변화시켜 여러 분야에 적용이 가능하다. 대사공학의 응용을 통하여 대사물질의 생산 수율 및 생산성을 향상시킬 수 있으며, 유전자 재조합 방법에 의해 외래 유전자의 도입, 발현으로 기존의 대사경로를 연장 혹은 바꾸어 줌으로써 기질의 이용 범위을 확대할 수 있으며, host에게 새로운 대사물질을 생성하도록 조절할 수 있으며, 세포의 특성을 변화할 수도 있다. 또한, 대사공학을 생물환경복원(bioremediation) 기술에 적용하여 유전공학 미생물(genetically engineered microorganism; GEM)을 만들어, 이 미생물로 지하수 및 토양의 유기 화학 폐기물, 화학공장과 식품제조과정 중에 발생되는 유해 방출물 및 석유 정제과정 중에 발생되는 기름 슬러지와 같은 공해물질들을 분해에 사용할 수 있다[11].

대사공학은 대사물질 생산경로의 최적화, 새로운 물질 및 신약 합성, 환경 오염물질의 분해에 응용될 뿐만 아니라 영양분 공급과 목표 유전자의 변형을 통한 치료 설계 같은 의약 분야에도 응용될 수 있다. 또한, 현재까지는 유전학적으로 많이 알려져 있고 유전자 조작이 용이한 미생물을 주요한 대상으로 대사공학이 발전되어 왔으나 최근에는 동물 및 식물을 대상으로 대사공학의 영역이 넓어지고 있다[67]. 본 소고에서는 최근 새로운 연구분야로 주목받고 있는 대사공학에 대하여 정의하고 대사공학에서 사용되고 있는 일반적인 방법에 대하여 알아보고 대사공학이 응용되는 여러 가지 실제 경우에 대하여 살펴보고자 한다.

대사공학의 정의

비교적 최근인 과거 10년 전에 나타난 대사공학은 생물공학, 생물화학공학, 반응공학과 같은 공학부분과 세포 생리학, 응용미생물학, 분자생물학과 같은 생명과학 분야의 원리 및 기술이 유기체의 대사를 중심으로 합쳐져 상호연관성을 지닌 기초 및 응용 학문이다[64]. 대사경로의 변형에 대한 개념은 이전에도 있어 왔지만 학문의 분야로 대사공학를 정의한 것은 1991년에 Bailey에 의해서 처음이었다[4]. 대사공학은 그 후 대사 연구에 의해서 얻어진 다른 정보와 결과들로 계속 보강되어 공학자와 생명과학자에 채택되어 일반화되었다.

유전자 재조합에 대한 분자생물학 기술의 발전으로 대사경

표 1. 대사공학과 관계된 용어 및 정의[11,50,64]

용어	정의	참고문헌
대사공학 (Metabolic engineering)	유전자 재조합 기술을 사용하여 세포의 효소, 전달 및 조절 기능들을 조작하여 세포의 활성을 증가시키는 분야	Bailey, 1991 [4]
	유전자 재조합 기술을 사용하여 세포내의 특정한 생화학 반응을 변형하거나 또는 새로운 생화학 반응을 도입시켜 세포의 특성이나 대사물질의 생산을 의도적으로 증가시키는 분야	Stephanopoulos, 1999 [64]
세포공학 (Cellular engineering)	세포생물학 및 분자생물학에 존재하는 문제점을 공학적 원리와 방법을 적용하여 설명하는 분야	Nerem, 1991 [49]
생리공학 (Physiological engineering)	세포대사에 대하여 전통적인 세포생리학과 정량분석방법이 결합한 분야	Nielsen, 1994 [50]
미생물 경로 공학 (Microbial pathway engineering)	유전자 재조합 기술을 사용하여 특정 대사물질의 생산을 증가시키거나 생물이 고유로 갖고있지 않은 대사경로를 포함시키기 위해 대사 경로를 변형하는 분야	MacQuitty, 1988 [40]
대사경로 공학 (Metabolic pathway engineering)	생화학 경로를 변형, 디자인 및 구성하는 분야	Tong et al., 1991 [71]
생체 외 진화 (*In vitro* evolution)	새로운 대사경로를 진화시키기 위하여 복제되고 잘 규명된 유전자를 다른 유기체로 선택적으로 전달시키는 분야	Timmis et al., 1988 [69]
분자육종 (Molecular breeding)	분자수준에서 유전자의 직접적인 변형에 의해서 새로운 유기체의 종을 육종하는 분야	Kellogg et al., 1981 [33]

로의 변형에 대한 새로운 차원이 도입되어 유전자 재조합이 용이하게 되었고 대사경로에 있어서 특정 효소반응을 조절할 수 있어 대사경로를 의도하는 데로 변형이 가능하게 되었다. 이러한 응용기술은 대사공학[4], 세포공학[49], 생리공학[50], (미생물)경로공학[40], 대사경로공학[71], 생체 외 진화[69] 및 분자육종[33] 등 여러 가지 용어로 정의되었다(표 1). 비록 정의는 저자들에 따라 다르지만 대사공학의 목적과 의미에 대하여는 비슷하게 시사한다. 현재까지 가장 보편적인 대사공학의 정의는 Stepanopoulos가 제안한 "유전자 재조합 기술을 사용하여 세포내의 특정한 생화학 반응을 변형하거나 또는 새로운 생화학 반응을 도입시켜 세포의 특성이나 대사물질의 생산을 의도적으로 증가시키는 분야"로 생각된다[64].

대사공학의 방법

대사공학은 다른 전통적인 공학처럼 분석과 합성이라는 중요한 두 부분이 있다. 대사공학의 합성부분에는 여러 가지 host 균주에서 새로운 유전자의 발현, 외래 효소의 증폭, 효소활성의 삭제 또는 변형, 대사관여 효소의 조절 해제 등이 있다. 이러한 내용은 공학적인 개념이 거의 없는 응용 분자생물학의 기술적인 부분이다. 이에 비하여, 공학적인 개념이 많이 존재하는 분석부분에서는 분석화학적인 측정 방법과 수학과 컴퓨터를 사용하는 방법이 있다[11]. 최근 분석기술의 발달로 생체 내와 생체 외 측정 모두의 세포기능의 상세한 분석이 가능해졌다[62]. 또한, 효소의 속도론적 특성을 나타내는 대사조절분석(Metabolic control analysis; MCA)과 같은 인자가 도입되어 대사에 대한 수학적인 표현이 가능해졌고[31] 대사 경로의 복잡한 반응들을 처리할 수 있는 MIST(Metabolic Interactive Simulation Tool), Gepasi, METACON과 같은 컴퓨터 프로그램도 개발되었다[16]. 분석 부분의 급속한 발달로 대사공학은 독자적인 영역을 지내게 되었고 생물화학공학의 중심적인 위치를 차지하게 되었다.

1. 대사흐름 분석 (Metabolic flux analysis; MFA)

대사과정에 있어서 세포의 생리적 상태를 측정하는 인자로는 대사흐름을 사용한다. 흐름은 대사경로를 통하여 진행되는 물질의 속도이다. 기질을 가능하면 유용한 산물로 전환하는 것이 목적인 대사물질 생산에서 대사의 흐름을 정확히 정량화하는 것은 중요하다. 대사경로의 흐름을 결정하는 방법에는 대사흐름 분석이 있다. 대사흐름 분석에서는 세포 내의 흐름은 세포 내 대사물질 주위의 물질수지(material balance)와 주요한 세포 내의 반응들에 대한 양론(stoichiometry)을 사용하여 계산한다. 세포 외의 흐름은 기질의 흡착속도와 대사산물의 분비속도로부터 계산한다. 대사흐름의 계산으로부터 대사경로에서 각각의 생화학반응이 모두 포함되고 대사속도의 값이 나타난 대사흐름 지도를 완성한다[72].

대사흐름은 ^{13}C로 표시된 화합물을 사용하여 세포 내와 세포 외의 대사물질을 측정하고[42] 모든 가능한 동위원소의 이성질체(isotopomer)를 면밀히 조사하여 특정 대사물질의 동위원소가 표시된 정도와 위치를 정확한 결정하고 특정 대사물질의 분자량 분포의 평가로부터 알 수 있다[60].

대사흐름 분석은 세포 생리적 특성에 관한 중요한 정보를

제공한다. 자세히 설명하면 다음과 같다.

1) 대사경로에서 분지점의 견고성(rigidity)의 확인 : 다른 돌연변이주와 다른 배양조건에서의 흐름 분포의 비교를 통하여 대사경로의 분지점이 유연한가(flexible) 견고한가(rigid)를 확인할 수 있다[68]. 예를 들면, *Corynebacterium glutamicum*에 의한 lysine 생산 과정 중에 여러 가지 돌연변이주의 대사흐름 분석을 통하여 glucose-6-phosphate 분지점은 유연하고 pyruvate 분지점은 견고하다는 것을 알았다[73,74].

2) 다른 대사경로 존재의 확인 : 다른 set의 대사경로에서 대사흐름을 계산하면 다른 대사경로 또는 동위효소(isoenzyme) 존재의 유무를 확인 가능하다. 예를 들면, *Saccharomyces cerevisiae*의 혐기적 배양에 대해서 대사흐름을 분석한 결과로 alcohol dehydrogenase III를 발견하였다[53].

3) 측정할 수 없는 세포 외의 대사물질 흐름의 계산 : 일반적으로 세포 내의 대사흐름의 계산을 위해 필요한 흐름의 수 보다 측정할 수 있는 흐름의 수가 더 크다. 이 경우에는 양론과 측정된 흐름으로부터 여러 부산물의 생산속도와 같은 세포 외의 대사흐름을 계산하는 것이 가능하다[51].

4) 여러 생합성 경로에서 대사흐름 분포의 조사하여 최적 경로를 선정 : 대사산물 생산의 최적화와 연결하여 새로운 대사경로 또는 동위효소를 도입하거나 삭제하는 등의 여러 가지 경우를 시도하여 기질에 대한 대사산물의 수율 또는 원하는 대사산물로 진행하는 흐름을 증가를 유도 할 수 있다. 예를 들면, penicillin 생산에서 전구체인 cystein을 첨가하면 대사경로가 전환되어 포도당에 대한 penicillin의 수율이 증가한다는 것을 대사흐름 분포로 확인하였다[29].

5) 최대 이론 수율의 계산 : 양론을 기초로 하여 사용된 기질에 대한 생산된 대사산물의 최대 이론 수율의 계산이 가능하다. 이러한 방법으로 *Corynebacterium glutamicum*에 의한 lysine 생산 과정[72]과 *Penicillium chrysogenum*에 의한 penicillin 생산 과정에서 최대 이론 수율을 계산하였다[29].

2. 대사조절 분석 (Metabolic control analysis; MCA)

대사공학에서 가장 중요한 점 중 하나는 흐름의 조절이다. 위에서 언급했듯이, 대사흐름 분석의 개념은 분지경로에서 흐름의 분포를 정량화하고 다른 대사경로간의 상호작용을 연구하는데 유용하다. 그러나, 대사흐름 분석으로는 흐름을 어떻게 조절해야 하는가에 대해서는 알 수 없다. 그러므로, 원하는 대사물질의 합성속도를 증가시키고 흐름을 변형하기 위해서는 흐름조절을 파악하는 것이 중요하다. 흐름조절을 정량적으로 알기 위해서 도입된 것이 대사조절 분석이다. 대사조절 분석은 전체대사에서 각 효소가 맡고 있는 기여정도를 수학적으로 표현한 것으로 이것을 통해 대사경로의 율속단계(rate-limiting step)를 알 수 있다.

대사조절 분석은 Kacser와 Burns[30] 및 Heinrich와 Rapoport[24]에 의해서 개발된 것으로 흐름 조절 계수(flux control coefficient; FCC)에 근거하고 있다. 흐름 조절 계수를 측정하는 방법으로는 직접법으로는 유전자조작, 효소 적정 및 저해제 적정이 있고 간접법으로는 단 변조(single modulation), 이중 변조(double modulation), 상하 접근(top-down approach) 및 동력학적 모사(kinetic model)가 있다[51,65]. 흐름 조절 계수는 정상상태(steady state)에서 흐름의 변화를 효소활성의 변화로 나눈 것으로 정의한다. 즉, 흐름 조절 계수가 '0'에 가까우면 효소활성을 크게 증가시켜도 흐름이 거의 증가하지 않고 흐름 조절 계수가 '1'에 가까우면 효소활성을 조금만 증가시켜도 흐름이 많이 증가한다. 즉, 효소의 흐름 조절 계수가 클수록 전체대사에서 효소가 맡고 있는 기여정도가 크고 이 효소의 활성을 선택적으로 증가시키면 전체대사가 크게 증폭된다[65].

그러나, 대사관여 효소들의 활성을 선택적으로 증폭시키는 것이 어려워 실제 응용에 많은 어려움이 존재한다. 또한, 대사조절 분석에서 나타난 주요 율속단계들은 배양조건이나 성장단계에 따라 크게 달라질 뿐만 아니라[52] 한 단계의 율속단계에 관여하는 유전자를 증폭시키면 다른 효소단계로 율속단계가 옮겨가는 현상도 존재한다[4,81].

3. 대사체계 흐름 분석(Flux analysis of metabolic networks)

대사조절 분석은 대사경로에서 모든 단일 반응 대해서는 정확한 정보를 주지만 많은 수의 반응들이 존재하는 복잡한 실제 대사체계에는 잘 맞지 않는다. 복잡한 대사체계을 해석하기 위한 방법으로는 대사체계 흐름 분석을 사용한다. 대사체계 흐름 분석은 반응들을 분지점을 중심으로 group화하고 전체 대사경로 흐름에서 각각의 group이 기여하고 있는 조절 정도를 분석하는 것이다. 이때, group의 조절 정도를 나타내는 것으로 group 흐름 조절 계수(group flux control coefficient; gFCC)를 사용한다[64]. 반응을 group화하는 것은 group 내에서 많은 흐름 조절 계수들(FCCs)을 group 흐름 조절 계수(gFCC)로 대체함으로 쉽게 율속단계를 알기 위해서다[66].

Group 흐름 조절 계수를 측정하는 방법은 유전적 및 환경적 변화(perturbation)와 각 group의 흐름 측정에 기초로 하고 있고 bottom-up 접근 방법과 top-down 접근 방법이 있다[66]. Bottom-up 접근 방법은 각각의 흐름 조절 계수들을 사용하여 group 흐름 조절 계수를 결정하는 것이고, top-down 접근 방법은 다른 group 흐름 조절 계수들의 크기를 비교하여 각각의 흐름 조절 계수를 결정하는 것이다[9].

관심 있는 흐름을 최적화하기 위해서 생합성 체계에서 특정 반응속도를 증폭하는 것은 매우 어렵다. 이러한 어려움은 세포 내의 중간 대사산물의 농도가 허용 범위에 지니기 때문에 생긴다. 대사산물의 농도를 허용범위 이상으로 급격히 변화시키면 대사체계의 안정에 영향을 주기 때문에 흐름의 증폭은 허

용된 대사산물의 농도 범위 내에서 변화만 가능하고 흐름도 정상상태(steady state) 가까이 유지시키는 것이 바람직하다[65]. 정상상태에서 특정 대사경로에서 전체 흐름을 증폭시키기 위해서는 그 대사 경로의 모든 단계를 증폭해야만 하지만 이것은 실제적으로 거의 불가능하다. 그러므로, 세포 내의 대사농도의 변화가 일어나지 않는 견고한 분지점에 관여된 효소만을 선택하여 유연하게 변화시켜 적당한 대사물질의 농도 내에서 전체 흐름을 증폭하는 것이 바람직하다. 이때, 대사산물의 농도의 변화를 나타내는 변수로는 group 농도 조절 계수(group concentration control coeffient; gCCC)를 사용한다[66].

대사공학의 이용

대부분의 미생물이 산업체에서 사용하기 위해서는 유전적인 향상이 요구된다. 이러한 향상은 미생물 대사와 분자 유전학의 도움을 받고 분자생물학 기술과 재조합 DNA 기술로 보강되어 가능하게 되었다. 대사경로를 합리적으로 변경하여 새로운 바람직한 기능들을 세포에 부여하였고 그 결과 미생물을 사용하는 제약, 농업, 식품, 화학 및 환경분야에서 발전이 이루어졌다.

대사경로의 변경을 통한 세포기능의 향상된 예를 살펴보면 1) 에탄올, 아미노산, 용제와 같은 대사물질 생산의 수율 및 생산성 향상, 2) xylose, 반섬유소(hemicellulose), 섬유소(celluose), whey, 유당, 전분과 같은 이용 가능한 기질의 확대, 3) host 미생물에게 항생제, 비타민, 생물고분자, 색소, 수소, xylitol과 같은 새로운 대사산물의 생산, 4) 균체 대사의 증가, 산소 이용의 증가, 부산물 생성의 억제, 기질 수송방법의 전환, 유전자 안정성의 부여와 같은 세포 특성의 향상, 5) 유전공학 미생물을 사용한 공해물질들을 분해 등의 5분야로 나누어 살펴보았다[11].

1. 대사물질 생산의 수율 및 생산성 향상

대사공학의 많은 산업적인 응용은 주로 대사물질 생산의 수율 및 생산성 향상 분야에서 일어난다. 수율과 생산성은 개념의 차이가 있으므로 각각의 향상을 위해서는 다른 전략이 필요하다. 수율은 주로 원재료의 가격에 영향을 주고 원하는 산물의 형성에 대한 대사흐름의 방향 정도에 의해서 결정된다. 반면에 생산성은 생물공정의 생산설비와 인건비에 의해서 영향을 받고 대사흐름의 증폭에 의해서 향상될 수 있다. 경우에 따라서 두 개념이 상충되더라도 총괄 공정의 최적화에는 수율과 생산성 개념 모두 포함되어야만 한다[65]. 대사공학에 의한 수율 증가는 부산물의 생산을 최소화하여 대사흐름의 방향을 집중하여 가능하고 생산성 증가는 율속단계의 효소들을 증폭시키고 대사흐름을 조절하고 가속하여 가능하다. 또한, 배양초기에는 생산성이 주로 기질의 비 소비속도(specific uptake rate of substrate)에 의존하므로 기질전달 system을 증폭시켜 기질의 비 소비속도를 증가시켜 생산성을 증가시킬 수 있다[24].

수율과 생산성은 가격 낮은 제품의 대량생산 산업에서 더 중요하다. 대사공학을 이용하여 수율과 생산성을 향상시킨 예는 에탄올, 아미노산 및 유기용매의 등이 있다.

에탄올 생산에서 주목받고 있는 host 미생물로서는 기질 이용성이 넓고 유전자 조작이 쉬운 *Escherichia coli*와 *Klebsiella oxytoca*이다[27]. 이 미생물들은 자연에서 당으로부터 적은 양의 에탄올을 생성하지만 *Zymomonas mobilis*의 pyruvate decarboxylase와 alcohol dehydrogenase의 유전자를 받으면 뛰어난 에탄올 생성균으로 전환되어 glucose, xylose, lactose를 이용할 수 있다. *Escherichia coli*의 재조합 균주의 경우 100 g/l glucose와 80 g/l xylose로부터 각각 54.4 g/l, 41.6 g/l 에탄올을 얻었고 최대이론 수율 50%에 근접한 결과를 얻었다[54]. *Klebsiella oxytoca*의 재조합 균주를 사용하여 생산성 2 g/l-h 이상, 수율 50% 및 최종 에탄올 농도 45 g/l를 얻었다[55].

대사공학 기술이 가장 많이 적용된 것은 아미노산 중 *Corynebacterium*의한 lysine의 생산이다. 균주의 생산성을 높이기 위한 첫 시도는 아미노산의 생합성과 조절에 대한 대사경로의 이해를 통하여 영양 요구성 균주를 선별하는 것이었다. 대사과정을 살펴보면 aspartate로부터 threonine과 lysine이 생성되는데 야생의 *Corynebacterium*은 threonine과 lysine이 합동 feedback 저해하여 lysine이 축척 되지 않는다. 그러므로, threonine 생합성 할 수 없는 threonine 영양요구성 균주를 얻으면 lysine의 생산이 증가한다. 생산성을 더 높이려면 lysine 유사물질 저항성 균주를 선별해야 한다. Lysine 유사물질 저항성 균주는 고농도의 lysine에 의한 feedback 저해효과가 제거되어 높은 농도의 lysine을 얻을 수 있다[6]. 그 다음은 탄소의 양을 증가시키는 시도로 생합성의 중간산물을 공급하는 경로(anaplerotic pathway)인 중심탄소 대사(central carbon metabolism; CCM)를 강화하는 것이다[43]. 최근에는 최종산물의 배출을 촉진하기 위해서 세포의 투과성을 증진시키거나 또는 최종산물을 분해시키는 세포의 자체효소를 제거하는 것과 같은 대사조절에 의해서 생산성이 높은 균을 얻고 있다. 여러 연구팀에서 *Corynebacterium*을 위한 대사공학 기법의 개발에 주력하여 새롭고 효과적인 형질전환 기술들이 개발되었고 *Corynebacterium*로부터 약 50개 정도가 되는 아미노산 생합성에 관여되는 유전자를 분리할 수 있었다. 이러한 유전자들은 각각 또는 결합되어 특정 효소들의 feedback 조절을 제거하거나 효소의 활성을 증가시켜 생산성을 향상시켰고 중심탄소대사와 아미노산의 생화학을 설명하는 특정 정보들을 제공하였다[28].

Acetone, butanol 및 ethanol을 생산하는 *Clostridium acetobutylicum*의 acetoacetate decarboxylase와 phosphotrans-

butyrylase의 유전자가 *Bacillus subtilis*에 발현된 것은 1992년 처음 보고되었다[46]. Acetoacetate decarboxylase는 acetone 생산의 마지막 효소로 acetoacetate를 acetone과 CO_2로 전환해주는 효소이고 phosphotransbutyrylase는 butyrate 생산의 분지점 효소로 butyryl-CoA과 무기 phosphate를 butyryl phosphate로 전환해주는 효소이다. 재조합 균주 *B. subtilis*를 사용하여 acetone, butanol 및 ethanol 역가를 각각 5, 37, 90% 증가시켰다[78].

2. 기질 범위의 확대

기질 범위의 확대의 연구는 반섬유소의 가수분해로 생기는 물질의 주성분인 xylose와 유가공 과정에서 가장 많이 생기는 부산물인 유당에 집중되고 있다. 또한, whey, 전분 및 섬유소와 같은 풍부한 탄소원의 이용에 대한 연구도 행해지고 있다. 대부분의 미생물은 많은 대사경로를 지니고 있기 때문에 탄소원의 범위를 확대하려면 몇 개의 효소 단계만 첨가하면 가능하다. 그러나, 이런 단계는 대사경로의 다음 반응들과 조화가 필요하므로 대사공학의 기술을 매우 유용하게 사용할 수 있다[67].

대사공학기술을 사용하여 반섬유소의 주성분인 오탄당 xylose로부터 에탄올이 생산되는 과정에는 효모나 세균인 *Zymomonas mobilis*이 사용된다. Xylose를 이용하는 *Pachysolen tannophilus, Pichia stipitis* 또는 *Candida shehatae*와 같은 효모는 에탄올의 수율과 내성이 낮고 반대로 xylose를 이용 못하는 *Saccharomyces cerevisiae*는 에탄올의 수율과 내성이 높다. 그러므로, *Pachysolen tannophilus, Pichia stipitis* 또는 *Candida shehatae*와 같은 효모의 xylose 이용 관련 유전자를 S. cerevisiae에 발현시키면 xylose에서 에탄올을 생산한다[37,70]. *Z. mobilis*는 에탄올을 120 g/l까지 생산할 수 있고 수율도 이론 수율의 97%까지 생산하므로 좋은 host로 사용된다. *Z. mobilis*를 host로 하여 *Klebsiella* 또는 *Xanthomonas*의 xylose를 이용 효소인 xylose isomerase와 xylulokinase의 유전자를 발현시켜 xylose와 glucose로부터 에탄올의 전환을 각각 이론수율의 86%와 94%로 얻은 보고가 있다[79].

섬유소와 반섬유소로부터의 에탄올 생성은 *Erwinia carotovora*와 *Erwinia chrysanthemi*와 같은 식물 기생 세균을 사용한다. 유전자 조작된 *Erwinia*를 사용하여 100 g/l cellobiose로부터 48시간 이내에 50 g/l 에탄올을 생산하여 생산성 1.5 g/l-h의 결과를 보여주었다[61]. 이러한 결과는 cellobiose를 이용하여 에탄올을 생성하는 효모의 생산성보다 2배나 높은 것이다[5]. *Clostridium thermocellum*의 xylan 분해효소의 유전자를 *Klebsiella oxytoca*에서 발현시켜 반섬유소의 주성분인 xylan으로부터 에탄올이 생산되었고 100 g/l xylose기준으로 하여 48 g/l 이상의 에탄올이 생산되었다[10].

Whey는 유가공의 주요 부산물로 약 75%의 유당, 12-14%의 단백질 및 작은 양의 유기산, 무기염과 비타민으로 구성되어있다. 단백질은 분리 후 농축하여 식품공정에 쓰이지만 유당은 버려진다. 유당으로부터 *E. coli*의 유당 이용 관련 효소를 *Pseudomonas aeruginosa*에서 발현시켜 계면활성제인 rhamnolipid를 생산하였고[35], *Xanthomonas campestris*에서 발현시켜 다당류인 xanthan gum을 생산하였고[19], *Corynebacterium glutamicum*에서 발현시켜 아미노산을 생산하였다[8].

탄소원으로 포도당 대신 전분을 사용한다면 발효원가를 줄일 수 있을 뿐만 아니라 포도당과 연관된 catabolite repression와 같은 생리적 저해현상을 제거할 수 있다. 전분을 사용한 예는 효모 *Schwanniomyces occidentalis*의 α-amylase와 glucoamylase 유전자를 *Saccharomyces cerevisiae*에 발현시켜 에탄올을 생산한 것이다[25]. 이때, 생산성은 효소처리 후 발효하는 보통의 생산방법과 같은 생산성으로 나타냈다.

3. Host 미생물의 신규 대사산물 생산

새로운 항생물질을 생산하거나 기존 항생제를 변형하기 위하여 대사공학 기술이 사용된다. 다른 미생물들의 여러 생합성 단계의 유전자들을 같은 미생물에서 발현시켜 새로운 항생제를 만드는데 그 대표적인 예가 *Streptomyces coelicitor*의 actinorhodin이 경로의 유전자를 medermycin 생산하는 *Streptomyces*에서 발현시켜 신규 항생제 mederrhodin을 생산한 것이다[26].

항생제와 약물로 사용되는 polyketide의 생산과정은 대사공학에서 많은 관심의 대상이다. 그 이유는 polyketide의 단순한 기본단위가 다양한 방법으로 합쳐져 복합한 구조를 구성하므로 polyketide 합성 관여 효소의 유전자를 조절하면 polyketide 구조를 다양하게 변형할 수 있기 때문이다[44]. Polyketide의 합성 과정은 지방산의 합성 대사경로와 매우 유사하기 때문에 polyketide의 구조는 기본단위의 다양한 조합과 순열과 특정부위의 돌연변이로 만들어진다. 자연에서는 이미 다양한 polyketide가 이러한 방법으로 만들어지고 있다. 이 분야에서 대사공학의 주된 기여는 중요하고 유용한 분자의 화학구조를 디자인하는 '유전 디자인'의 도입에 있다[45].

자연계에 알려진 대사경로를 적절히 선택하여 조합함으로써 목표물질을 효율적으로 생산할 수 있는데 예로서 vitamin C 합성의 최종 전구물질인 2-keto-L-gulonic acid의 생산에 *Erwinia herbicola*와 *Corynebacterium*을 사용하는 2단계 발효과정이 있다. 포도당을 *Erwinia herbicola*을 사용하여 2,5-diketo-D-gulonic acid로 전환시키고, 그 다음 반응으로 *Corynebacterium*을 사용하여 2-keto-L-gulonic acid로 전환시킨다. 대사공학기술을 사용하여 후자의 반응에 관한 효소 유전자를 전자의 균주에 도입함으로써 2단계 발효를 1단계의 효율적 전환공정으로 바꾸었다[2].

새로운 고분자의 생산은 대사공학의 또 다른 주요 응용분야이다. Peoples와 Sinskey는 이러한 분야를 생물고분자공학(Bioploymer Engineering)이라고 명명하였다[57]. 생분해성 플라스틱인 생물고분자인 polyhydroxybutyrate(PHB)와 그 유도체를 생산하기 위한 대사공학은 활발하게 진행되고 있다. 대사공학에 의한 PHB 생산을 살펴보면 *Alcaligenes eutrophus*의 PHB 합성 유전자를 *E. coli*에 발현시켜 건조 균체의 90%에 이르는 높은 수준의 PHB를 얻은 예가 있다[38]. 최근에는 유전자 재조합 기술을 사용하여 식물체에서 PHB를 건조 무게 기준으로 14%까지 생산하였는데 이것은 기존 식물을 사용한 것보다 100배 증가한 것이다[48]. 다른 주요 분야로 다당류의 유전적 변형을 통한 생산성 증가와 구조의 변화이다. 다당류 xanthan gum의 경우 몇 개의 xanthan gum 생합성 유전자를 지닌 plasmid를 이용하여 xanthan gum 생산량을 10%로 증가시킨 예가 있다. 또한, pyruvate의 함량은 xanthan gum의 점도와 비례관계가 있으므로 pyruvate 합성에 관여하는 특정효소를 발현시켜 xanthan gum 중의 pyruvate의 함양이 45%까지 증가된 고점도의 xanthan gum을 얻은 보고도 있다[23].

Pseudomonas putida 균주의 naphthalene dioxygenase 유전자 도입에 의한 *E. coli*에서의 색소 indigo 생산의 경우와 같이 새로운 반응 중간 물질을 공급한 경우도 있다. 이 경우에서는 indole 합성 능력을 증가시키고 naphthalene dioxygenase 유전자 도입에 의하여 indole이 indigo로 전환되게 하여 indole에서 생산되던 indigo를 포도당으로부터 직접 생합성하였다[47].

수소는 공해가 발생되고 향후 고갈되는 화석 원료를 대체할 수 있다. 물로부터 수소를 얻는 방법은 많은 에너지가 요구되므로, 발효에 의한 수소 생산법에 대하여 많은 연구가 진행되고 있다. 대사공학기술을 사용하여 세포 대사를 재조절하여 수소 생산을 향상시킨 예로 *Citrobacter freudii*의 수소생산 관여 유전자를 *E. coli*에 발현시켜 수소를 생산한 것이 있다[32].

충치균의 생육을 저해하는 당알코올 xylitol은 xylose로부터 생산된다. Xylose를 이용할 수 없는 *Saccharomyces cerevisiae*에 *Pichia stipitis*의 xylose 이용 유전자를 발현시켜 포도당으로 성장시키고 xylose을 xylitol로 전환시켜 xylitol을 이론 수율의 97%까지 얻었다[70].

4. 세포 특성의 향상

대사공학 기술을 세포 특성에 적용하여 비 성장속도(specific growth rate)와 균체수율를 향상시키고, 저해 부산물의 생성을 제거하고, 독성물질에 대한 저항성을 부여하고, 특정 산물의 분비를 촉진하고, 염에 대한 저항력을 향상시킬 수 있다.

대사공학의 기술을 이용하여 메탄올 자화세균인 *Methylophilus methylotrophus*의 질소 이용대사를 변형하여 균체수율을 증가시켰다. *M. methylotrophus*는 탄소 전환수율이 높고 메탄을 내성이 크기 때문에 산업적으로 메탄올로부터 단세포 단백질(single cell protein; SCP) 생산에 사용된다. 그러나, 질소원 이용과정 중에 ATP가 사용되는 단점이 있다. 이와 대조적으로 *E. coli.*는 질소원 이용과정에 ATP가 사용되지 않으므로 *E. coli.*의 질소원 이용에 관련된 유전자를 *M. methylotrophus*에 발현시켜 메탄올에서 균체로 전환되는 탄소 전환수율을 높였다[77].

대규모의 호기적 발효에서 고농도의 균체를 얻기 위해서는 충분한 산소 수준을 유지시켜야만 한다. 그러나, 고농도 균체의 배양에서는 많은 양의 산소 요구로 산소 수준를 충분히 유지하는 것은 매우 어렵다. 배양 중에 산소 수준을 높이기 위하여 산소이용 효율을 증진시키는 세균 *Vitreoscilla*의 hemoglobin 유전자를 사용할 수 있다. 이 유전자를 여러 산업적으로 중요한 미생물들에 발현시키면 산소 결핍이 줄고 세포 성장이 향상되고 산물생성을 증가된다[14,34]. Hemoglobin 유전자를 *Streptomyces*에 발현시켜 항생제 생산은 1.3배 증가시켰고[41] *Xanthomonas maltophilia*에 발현시켜 benzoic acid에서 균체 성장으로 전환효율을 증가시켰다[39].

대사산물 생산 과정 중에 고농도의 균체에서 세포 내의 중간산물 높은 수준을 유지하는 것은 저해 부산물의 축척으로 어렵다. 세포는 성장 과정 동안 탄소 흐름과 환원력 흐름의 균형을 유지하기 위해 초산과 같은 산성 부산물이 분비한다. 분비된 초산은 균체 성장을 저해하고 산물생성에 대한 균체 효율을 감소시킨다. 그러므로, 고농도의 균체를 얻기 위해서는 초산의 생성을 없애야한다. 대사공학적인 초산 제거 방법은 1) 초산 생성효소인 phosphotransacetylase의 활성을 억제하거나 또는 생성를 차단하거나, 2) 초산을 독성이 약한 에탄올, acetoacetate, 2,3-butandiol과 같은 대사산물로 전환시키거나, 3) 낮은 농도의 산소에서 세포 성장을 향상시키고 초산 생성을 줄이기 위하여 세균의 hemoglobin 유전자를 발현시키거나, 4) 기질 수송 단백질의 효율을 낮추기 위하여 glucose permease와 같은 기질 수송 단백질을 변이시켜 기질 소모 속도를 낮추거나, 5) 생산된 초산을 소모하면서 성장하도록 하는 것이다[80]. 초산의 생성을 억제한 예를 살펴보면 *Bacillus subtilis*의 acetoacetate 합성 효소를 *E. coli*에 발현시켜 탄소 흐름을 초산으로부터 비저해 부산물인 acetoacetate로 방향을 전환시켜 고농도의 포도당의 배지에서도 초산의 농도를 20 mM 이하로 유지시킨 것이 있다[3].

포도당 및 과당과 같은 육탄당은 phosphoenolpyruvate (PEP)가 pyruvate로 전환되어 에너지가 소비되면서 세포 내로 수송된다. 포도당 수송에 관련된 유전자를 제거하면 에너지의 소비 없이 포도당을 세포 내에 수송이 가능하고 그 결과 에너지 절약 효과로 대사산물의 생산수율을 높였다[18].

유전적 불안정성은 재조합 미생물의 산업적 이용에 주요한 장애이다. 유전적으로 안정한 plasmid를 얻기 위해 여러 가지

방법을 사용하고 있다. 가장 일반적인 방법은 생산균에게 항생제 내성을 지닌 plasmid를 부여한 후 항생제가 첨가된 성장배지 배양하여 생산균만 선별하는 것이다. 이 방법은 큰 규모에서는 가격 비싼 단점을 지녔다. 다른 방법으로는 특정 염색체를 돌연변이시켜 영양요구성 균주를 만들고 요구하는 영양 성분을 공급해주는 유전자를 지닌 plasmid를 부여시켜 그 plasmid를 지닌 생산균만 선별한다[15]. 이 방법은 강력하지만 특수한 host에게만 제한되어 응용성이 떨어진다. 넓은 응용성을 지닌 기술은 plasmid R1의 *hok/sok* 유전자를 생산균주에 포함시키는 것이다. Gram(-) 세균의 많은 plasmid를 효과적으로 안정시키는 것으로 알려진 이 유전자는 plasmid R1이 없어진 분리 균주들을 제거함으로서 유전적으로 안정성을 부여한다[22].

5. 생물환경복원 기술

미생물의 탄소순환 능력을 이용하여 오염환경으로부터 유해화합물을 무독화하거나 분해할 수 있는 생물환경복원 기술은 1940년대에 원유산업시설로 오염된 지역의 정화에 이용되기 시작하였고, 미국 환경보호청에서 1989년 Alaska에서 Exon Valdez 유조선 사고로 유출된 원유로 인해 오염된 방대한 해안지역을 생물학적 처리를 통하여 정화함으로써 그 효능을 입증받았다. 그 이후 생물환경복원 기술의 상업적 이용과 기술개발에 대한 본격적인 연구가 수행되기 시작하였으며 최근에는 오염된 토양이나 지하수를 주요대상으로 하는 생물환경복원 기술이 연구되고 있고 이 분야에서는 대사공학 기술이 많이 응용되고 있다[1].

대표적인 오염물질로는 석유화학공업의 산물에서 흔히 발견되는 polycyclic aromatic hydrocarbon(PAH)과 같은 방향족 화합물, 대부분의 농약이나 용매로 사용되는 polychlorinated biphenyl(PCB), pentachlorophenol(PCP)과 같은 halogen 화합물, azo와 aniline계 제초제, 폭약(trinitrotoluene; TNT)과 같은 질소함유화합물, 계면활성제로 사용되는 alkylsulfonate와 arylsulfonate 및 세척제로 사용되는 alkylbenzene sulfonate과 같은 황함유 화합물 등이 있다. 이러한 오염물질은 모두 생분해 가능한 것으로 알려져 있다[12,58,75]. 그러나, 생분해는 한 종류의 미생물에 의해 분해되기보다는 두 종류 이상의 미생물들의 상호보완적인 작용에 의해 완전 분해되거나, 다른 기질과의 협동대사(cometabolism)에 의해 분해가 되는 경우가 많다[17,36,76]. 협동대사는 미생물의 성장에 이용되지 못하는 기질이 성장에 이용되는 기질이나 다른 변환 가능한 기질이 있을 때에 변환되는 것을 말한다. 생분해 방법은 하나의 오염물질을 분해하기 위해 두 종류 이상의 미생물을 사용하여야 한다는 불편함이 있어서 최근에는 유전공학기술을 바탕으로 한 대사공학 기술을 적용하여 하나의 미생물에서 다양한 오염물질의 분해가 가능한 우수 균주의 개발이 많이 이루어지고 있다. 유전자 조작은 polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH), polychlorinated biphenyl(PCB)의 분해에 관련된 효소들인 oxygenase, dioxygenase, dehalogenase를 발현하는 유전자들을 대상으로 주로 수행되었고, 이들 유전자를 *Pseudomonas, E. coli* 등의 균주에 도입 또는 증폭시켜 독성 오염물질의 분해능을 증가시켰다[13,20,59]. 또한, 오염물질 분해효소의 성질을 유전자 수준에서 변화시킴으로써 분해능이 향상된 효소를 만들기도 하였다. 예를 들면, 유전공학 기술을 이용하여 만든 hybrid aromatic ring dioxygenase를 사용하여 효율적으로 trichloroethane(TCE)을 분해하였고 보고되었다[20].

최근에는 환경오염물질 분해능이 우수한 유전공학 미생물의 개발을 위한 많은 유전자 조작기술들이 새롭게 등장하고 있다. 이들 기술은 1) 외래 유전자를 효율적으로 재조합 균주에 도입해 주는 새로운 vector, 2) 유전자 발현정도를 조절해 주는 기작, 3) 자연환경에서의 유전공학 미생물의 지속성을 조절하는 봉쇄기작(containment mechanism), 4) 분해효소의 활성과 이용기질 범위를 증가시키는 유전자 돌연변이 기술, 5) 오염환경에서 유전공학 미생물의 확산을 추적하는 기술 개발 등에 관한 것이다[7,56].

결론

대사공학은 생긴지 10년 밖에 안된 새로운 연구분야로 대사흐름의 측정과 이해 및 조절에 그 기본을 두고있다. 대사흐름 분석은 세포 내의 대사물질의 물질수지와 양론을 사용하여 계산하고 그 계산으로부터 대사경로에서 분지점의 견고성(rigidity)의 확인하고, 다른 대사경로 존재의 확인하고, 측정할 수 없는 세포 외의 대사물질 흐름의 계산하고, 여러 생합성 경로에서 대사흐름 분포의 조사하여 최적 경로를 선정한다. 대사흐름 분석 수행한 후 원하는 대사물질 합성속도를 증가시키고 흐름을 변형하기 위해서는 대사조절 분석을 시도한다. 대사조절 분석을 통하여 전체대사에서 각 효소가 맡고 있는 기여정도를 알 수 있다. 복잡한 실제 대사체계에는 잘 맞게 하기 위해서 분지점을 중심으로 group화하고 전체 대사경로 흐름에서 각각의 group이 기여하고 있는 조절 정도를 나타내는 group 흐름 조절 계수를 도입하고 율속단계를 파악한다. 율속단계의 견고한 분지점의 효소를 선택하여 유연하게 변화시켜 전체 흐름을 증폭시켜 원하는 대사산물의 생산을 증가시킨다. 그러나, 아직까지 대사관여 효소들의 활성을 선택적으로 증폭시키는 것이 어려워 실제 응용에 많은 어려움이 존재한다.

대사공학은 많은 분야에서 응용되고 있다. 대사공학을 통하여 생산 수율 및 생산성을 향상시켰으며, 기질의 이용 범위를 확대하였으며, host 미생물에 의해서 새로운 대사물질을 생성해왔고, 세포의 특성을 변화시켰으며 환경에도 적용하여 공해

물질들을 분해하는 데도 응용되어 왔다. 또한, 제약품 합성에서 중간물질인 chiral 화합물 생산에 적용할 수도 있다. 향후에는 의약 분야에도 응용하여 기관과 조직의 대사를 분석할 수 있고 영양분 공급과 목표 유전자의 변형을 통한 치료 설계 할 수 있을 것이다. 대사공학의 영역도 동물과 식물뿐만 아니라 인체까지 확장되어 인체질병에 대한 유전자 치료에도 응용될 수 있을 것이다.

대사공학은 최종 산물이 어떠한 경로로 조절되고 변형되어 생산성이 증가되었는가에 대한 원인을 과학적으로 규명하고 유전자 조작에 의한 새로운 생화학 반응을 도입시켜 대사산물의 생산을 증가시키는 새로운 분야이다. 그러나, 아직까지 미생물 개량기술에서는 대부분의 경우 대사공학 방법보다 돌연변이 방법이 생산성 증가에 더 효과적이고 그 방법도 용이하다. 그러므로, 대사공학 기술이 산업체에서 일반화되기 위해서는 더욱 정확하고 용이한 미생물의 생리 상태를 분석하는 방법이 개발되어야 하고 대사에 직접 관계된 효소들을 선택적으로 증폭하는 효과적인 방법이 개발되어야 한다.

참고 문헌

1. Alexander M. 1981. Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science* **211**: 132-138.
2. Anderson, S. Marks, C. B., Lazarus, R., Miller, J., Stafford, K., Seymour, J., Light, D., Rastetter, W., and Estell, D. 1985. Production of 2-keto-L-gluconate, an intermediate in L-ascorbate synthesis by a genetically modified *Erwinia herbicola. Science* **230**: 144-149.
3. Aristidou, A. A., Bennett, G. N., and San, K. Y. 1994. Modification of the central metabolic pathways of *Esherichia coli* to reduce acetate accumulation by heterologous expression of the *Bacillus subtilis* acetoacetate synthase gene. *Biotechnol. Bioeng.* **44**: 944-951.
4. Bailey, J. E. 1991. Towards a science of metabolic engineering. *Science* **252**: 1668-1674.
5. Beall, D. S. and Ingram, L. O. 1993. Genetic engineering of soft-rot bacteria for ethanol production for lignocellulose. *J. Ind. Microbiol.* **11**: 151-155.
6. Berry A. 1996. Improving production of aromatic compounds in *Escherichia coli* by metabolic engineering. *Trends in Biotechnol.* **11**: 393-396.
7. Blanty J. M., Brautaset T., Winther-Larsen H. C., Haugan K., and Valla S. 1997. Construction and use of versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 370-379.
8. Brabetz, W., Liebl, W., and Schleifer, K. H. 1991. Studies on the utilization of lactose by *Corynebacterium glutamicum,* bearing the lactose operon of *Escherichia coli. Arch. Microbiol.* **155**: 607-612.
9. Brown, G. C., Hanfner, R. P., and Brand, M. D. 1990. A 'top-down' approach to the determination of control coefficients by metabolic control theory. *Eur. J. Biochem.* **188**: 321-325.
10. Burchhardt, G. and Ingram, L. O. 1992. Conversion of xylan to ethanol by ethanologenic strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca. Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1128-1133.
11. Cameron, D. C. and Tong, I. T. 1993. Cellular and metabolic engineering: An overview. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **38**: 105-140.
12. Chen S. and Wilson D. B. 1997. Construction and characterization of *Escherichia coli* genetically engineered for bioremediation of Hg^{2+}-contaminated sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2442-2445.
13. Cerniglia C. E. 1984. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Adv. Appl. Microbiol.* **30**: 31-71.
14. DeModena, J. A., Gutierrez, S., Velasco, J., Fernandez, F. J., Fachini, R. A., and Galazzo, J. L. 1993. The production of cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum* is improved by the intracellular expression of a bacterial hemoglobin. *Bio/Technology* **11**: 926-929.
15. Diderichsen, B. A genetic system for stabilization of cloned genes in *Bacillus subtilis,* pp. 35-46. *In* A. T. Ganesan and J. A. Hoch (ed.), *Bacillus Molecular Genetics and Biotechnology Applications,* Orlando, FL, Academic Press.
16. Ehlde, M. 1995. *Dynamic and steady state models of metabolic pathway,* PhD thesis, University of Lund, Denmark.
17. Ensley B. D. 1991. Biochemical diversity of trichloroethylene metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 283-299.
18. Flores, N., Xiao, J., Berry, A., Bolivar, F., and Valle, F. 1996. Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Esherichia coli. Nature Biotechnol.* **14**: 620-623.
19. Fu, J. F. and Tseng, Y. H. 1990. Construction of lactose-utilizing *Xanthomonas campestris* and production of xanthan gum from whey. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 919-923.
20. Furukawa K., Hirose J., Hayashida S., and Nakamura K. 1994. Efficient degradation of trichloroethane by a hybrid aromatic ring dioxygenase. *J. Bacteriol.* **176**: 2121-2123.
21. Gallardo M. E., Ferrandez A., de Lorenzo V., Garcia J. L., and Diaz E. 1997. Designing recombinant *Pseudomonas* strains to enhance biodesulfurization. *J. Bacteriol.* **179**: 7156-7160.
22. Gerdes, K. 1988. The *par*B (*hok/sok*) locus of plasmid R1: A general purpose plasmid stabilization system. *Bio/Technology* **6**: 1402-1405.

23. Harding, N. E., Cleary, J. M., Cabana, D. K., Rosen, I. G., and Kang, K. S. 1987. Genetic and physical analyses of a cluster of genes essential for xanthan gum biosynthesis in *Xanthomonas campestris*. *J. Appl. Bacter.* **169**: 2854-2861.
24. Heinrich, R. and Rapoport, T. A. 1974. A linear steady-state treatment of enzyme chains. *Eur. J. Biochem.* **42**: 89-95.
25. Hollenberg, C. P. and Strasser, A. W. M. 1990. Improvement of baker's and brewer's yeast by gene technology. *Food Biotechnol.* **4**: 527-534.
26. Hopwood, D. A., Malpartida, F., Kieser, H. M., Ikeda, H., Duncan, J., Fujii, I., Rudd, B. A. M., Floss, H. G., and Omura, S. 1985. Production of hybrid antibiotics by genetic engineering. *Nature* **314**: 642-646.
27. Ingram, L. O., Gomez, P. F., Lai, X., Moniruzzaman, M., Wood, B. E., Yomano, L. P., and York, S. W. 1998. Metabolic engineering of bacteria for ethanol production. *Biotechnol. Bioeng.* **58**: 204-214.
28. Jetten, M. S. M. and Sinskey, A. J. 1995. Recent advances in the physiology and genetics of amino acid-producing bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* **36**: 1-11.
29. J rgensen, H. S., Nielsen, J., Villadsen, J., and Mollgaard, H. 1995. Metabolic flux distributions in *Penicillium chrysogenum* during fed-batch cultivation. *Biotechnol. Bioeng.* **46**: 117-131.
30. Kacser, H. and Acerenza, L. 1993. A universal method for achieving increases in metabolite production. *Eur. J. Biochem.* **216**: 361-367.
31. Kacser, H. and Burns, J. A. 1973. The control of flux. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **27**: 65-104.
32. Kanamayia, H., Sode, K., and Kurube I. 1988. Production of hydrogen gas by fermentation. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **6**: 379-401.
33. Kellogg, S. T., Chatterjee, D. K., and Chakrabarty, A. M. 1981. Plasmid-assisted molecular breeding: new technique for enhanced biodegradation of persistent toxic chemicals. *Science* **214**: 1133-1135.
34. Khosla, C. and Bailey, J. E. 1988. Heterologous expression of a bacterial hemoglobin improves the growth properties of recombinant *Esherichia coli*. *Nature* **331**: 633-635.
35. Koch, A. K., Reiser, J., K ppeli, O., and Firchter, A. 1988. Genetic construction of lactose-utilizing strains of Pseudomonas aeruginosa and their application in biosurfactant production. *Bio/Technology* **6**: 1335-1339.
36. Kohler H. P. E., Kohler D., and Focht D. D. 1988. Cometabolism of polychlorinated biphenyls: Enhanced transformation of Aroclor 1254 by growing bacterial cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1940-1945.
37. K tter, P., Amore, R., Hollenberg, C. P., and Ciriacy, M. 1990. Isolation and characterization of the *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase gene, XYL2, and construction of a xylose-utilizing *Sacharomyces cerevisiae* transformant. *Cur. Genet.* **18**: 493-500.
38. Lee, S. Y., Yim, K. S., Chang, H. N., and Chang, Y. K. 1994. Construction of plasmids, estimation of plsmid stability, and use of stable plasmids for the production of poly(3-hyroxybutyric acid) in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **32**: 203-211.
39. Liu, S. C., Webster, D. A., Wei, M. L., and Stark, B. C. 1996. Genetic engineering to contain the *Vitreoscilla* hemoglobin gene enhances degradation of benzoic acid by *Xanthomonas maltophilia*. *Biotechnol. Bioeng.* **49**: 101-105.
40. MacQuitty, J. J. 1988. Impact of biotechnology on the chemical industry. *ACS Sympos. Ser.* **362**: 11-29.
41. Magnolo, S. K., Leenutaphong, D. L., DeModena, J. A., Curtis, J. E., Bailey, J. E., and Galazzo, J. L. 1991. Actinorhodin production by *Streptomyces coelicitor* and growth of *Streptomyces lividans* are improved by expression of a bacterial hemoglobin. *Bio/Technology* **9**: 473-476.
42. Marx, A., de Graaf, A. A., Wiechert, W., Eggeling, L., and Sahm, H. 1996. Dermination of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with metabolite balancing. *Biotechnol. Bioeng.* **49**: 111-129.
43. Marx, A., Striegel, K., de Graaf, A. A., Sahm, H., and Eggeling, L. 1997. Response of the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* to different flux burdens. *Biotechnol. Bioeng.* **49**: 111-129.
44. McDaniel, R., Ebert-Khosla, S., Hopwood, D. A. and Khosla, C. 1993. Engineering biosynthesis of novel polyketides. *Science* **262**: 1546-1550.
45. McDaniel, R., Ebert-Khosla, S., Hopwood, D. A. and Khosla, C. 1994. Engineering biosynthesis of novel polyketides: Influence of a downstream enzyme on the catalytic specificity of a minimal aromatic polyketide synthase. *Pro. of the national Academy of Science of the USA* **91**: 11542-11546.
46. Mermelstein, L. D., Welker, N. E., Bennett, G. N., and Papoutsakis, E. T. 1992. Expression of cloned homogous fermentative genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Bio/Technology* **10**: 190-195.
47. Murdock, D., Ensley, B. D., Serdar, C., and Thalen, M. 1993. Construction of metabolic operons catalyzing the *de novo* biosynthesis if indigo in *Escherichia coli*. *Bio/Technology* **11**: 381-386.
48. Nawrath, C., Poirier, Y., and Somerville, C. 1994. Targeting of the polyhydroxybutyrate biosythetic pathway to the plastids of *Arabidopsis thaliana* results in high levels of polymer accumulation. *Pro. of the national Academy of Science of the USA* **91**: 12760.

49. Nerem, R. M. 1991. Cellular engineering. *Ann. Biomed. Eng.* **19**: 529-545.
50. Nielsen, J. 1994. Physiological engineering-towards a new science. *Pro. the 1994 IChemE Research Evant,* London, pp. 30-38.
51. Nielsen, J. 1998. Metabolic engineering: Techniques for analysis of targets for genetic manipulations. *Biotechnol. Bioeng.* **58**: 125-132.
52. Nissen, T. L. and J rgensen, H. S. 1995. Metatabolic control analysis of the penicillin biochemical pathway in a high yield strain of *Penicillium chrysogenum. Biotechnol. Prog.* **11**: 299-305.
53. Nissen, T. L., Schulze, U., Nielsen, J., and Villadsen, J. 1997. Flux distributions in anarobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae. Microbiol.* **143**: 203-218.
54. Ohta, K., Beall, D. S., Mejia, J. P., Shanmugam, K. T., and Ingram, L. O. 1991. Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: Chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 893-900.
55. Ohta, K., Beall, D. S., Mejia, J. P., Shanmugam, K. T., and Ingram, L. O. 1991. Metabolic engineering of *Klebsiella oxytoca* M5A1 for ethanol production from xylose and glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2810-2815.
56. Perez-Martin J. and de Lorenzo, V. 1996. VTR expression cassettes for engineering conditional phenotypes in *Pseudomonas*: Activity of the Pu promotor of the TOL plasmid under limiting concentrations of the XylR activator protein. *Gene* **172**: 81-86.
57. Peoples, O. P. and Sinskey, A. J. 1990. *In* E. A. Dawes (ed.), Novel Biodegradable Microbial Polymer, pp. 191-202. *Pro. of NATO Advanced Research Workshop on New Biosythetic, Biodegradable Polymers of Industrial Interest from Microorganism,* Kluwe Academic Publishers, Netherlands.
58. Reinecke W. and Knackmuss H. J. 1988. Microbial degradation of haloaromatics. *Annu. Rev. Microbiol.* **42**: 263-287.
59. Rishi S. and William M. A. 1996. Luciferase-dependent cytochrome P-450-catalyzed dehalogenation in genetically engineered *Pseudomonas. Biotechnol. Prog.* **12**: 474-479.
60. Schmit, K., Carlsen, M., Nielsen, J., and Villadsen, J. 1997. Modeling isotopomer distributions in biochemical networks using isotopomer mapping matrices. *Biotechnol. Bioeng.* **55**: 831-840.
61. Spindler, D. D., Wyman C. E., Grohmann, K., and Philippidis, G. P. 1992. Evaluation of the cellobiose-fermenting yeast *Brettanomyces custersii* in the simultaneous saccharification and fermentation of cellulose. *Biotechnol.* Lett. **14**: 403-407.
62. Stepanopoulos, G. 1994. Metabolic engineering. *Curr. Opinion Biotechnol.* **5**: 196-200.
63. Stepanopoulos, G. 1998. Metabolic engineering. *Biotechnol. Bioeng.* **58**: 119-120.
64. Stepanopoulos, G. 1999. Metabolic fluxes and metabolic engineering. *Metab. Eng.* **1**: 1-11.
65. Stepanopoulos, G., Aristidou, A. A., and Nielsen, J. 1998. *Metabolic engineering: Principles and methodologies.* Academic Press, New York.
66. Stepanopoulos, G. and Simpson, T. W. 1997. Flux amplication in complex metabolic networks. *Chem. Eng. Sci.* **52**: 2607-2627.
67. Stepanopoulos, G. and Sinskey A. J. 1993. Metabolic engineering: Methodologies and future prospects. *Trends in Biotechnol.* **11**: 393-396.
68. Stepanopoulos, G. and Vallino, J. J. 1991. Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. *Science* **252**: 1675-1681.
69. Timmis, K. N., Rojo, F., and Ramos, J. L. 1988. Prospects for laboratory engineering of bacteria to degrade pollutants. *Basic Life Sci.* **45**: 61-79
70. Tantirungkij. M., Nakashima, N., Seki, T., and Yoshida, T. 1993. Construction of xylose-assimilating *Saccharomyces cerevisae. J. Ferment. Bioeng.* **75**: 83-85.
71. Tong, I. T., Liao, H. H., and Cameron, D. C. 1991. Propandiol production by *Escherichia coli* expression genes from the *Klebsiella pneumonia dha* regulon. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 3541-3546.
72. Vallino, J. J. and Stepanopoulos, G. 1993. Metabolic flux distribution in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction. *Biotechnol. Bioeng.* **41**: 633-646.
73. Vallino, J. J. and Stepanopoulos, G. 1994. Carbon flux distribution at the pyruvate branch point in *Corynebacterium glutamicum* during lysine overproduction. *Biotechnol. Prog.* **10**: 320-326.
74. Vallino, J. J. and Stepanopoulos, G. 1994. Carbon flux distribution at the glucose-6-phosphate branch point in *Corynebacterium glutamicum* during lysine overproduction. *Biotechnol. Prog.* **10**: 327-334.
75. Weightman A. J. and Slater J. H. 1988. The problem of xenobiotics and recalcitrance. p. 322-347. *In* J. M. Lynch and J. E. Hobbie (ed.), *Microorganisms in action: Concepts and application in microbial ecology,* Blackwell scientific, Oxford.
76. Wilson J. T. and Wilson B. H. 1985. Biotransformation of trichloroethylene in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 242-243.
77. Windass, J. D., Worsey, M. J., Pioli, E. M., Pioli, D., Barth, P. T., Atherton, K. T., and Dart, E. C. 1980. Improved conversion of methanol to single-cell protein by

Methylophilus methylotrophus. Nature **287**: 396-401.
78. Woods, D. R. 1995. The genetic engineering of microbial solvent production. *Trends in Biotechnol.* **11**: 393-396.
79. Zhang, M., Eddy, C., Deandra, K., Finkelstein, M., and Picataggio, S. 1995. Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis. Science* **267**: 240-243.
80. 반재구 1994. 대장균의 배양생리와 대사공학. 생명공학동향 **2**(4): 66-77.
81. 반재구 1996. 대장균의 대사공학: 대장균을 유용케미칼의 생산 호스트로 만들기. 미생물과 산업 **22**: 281-287.