

## Analysis of metabolic pathways and amino acid production in *Corynebacterium glutamicum*

Heung-Shick Lee (이흥식)  
고려대학교 생명공학원

### 서론

*Corynebacterium* 속의 미생물에 의한 아미노산의 공업적인 생산은 1957년 일본의 Kyowa Hakko Kogyo의 Udaka와 Kinoshita에 의하여 L-glutamate 생산균이 분리된 시점(Kinoshita *et al.*, 1985)에서 기원한다. 그 이전의 아미노산의 산업적인 생산은, 1908년 일본의 Ikeda 박사에 의해 다시마와 가다랭이의 맛 성분이 L-glutamate에 의한 것이라는 것이 밝혀진 이후, 일본의 Ajinomoto사에 의해 gluten이나 대두단백질로부터 monosodium glutamate를 대량생산하는 방법에 의해 이루어졌다. 이 경우 원료의 90%가 폐기물로 남는 것과, 화학적인 합성법에 의한 생산시에는 산물의 50%를 차지하는 D-isomer가 맛을 띄지 않는 것이 문제점으로 남아 있었는데, 미생물에 의한 L-glutamate의 생산은 이들 문제점을 극복한 새로운 방법이며서 동시에 전환점으로서 받아들여졌다. Udaka와 Kinoshita에 의해 분리된 다수의 미생물은 현재 *Corynebacterium glutamicum*으로서 알려져 있는 것으로서 이 균의 발견과 이를 이용한 글루탐산의 공업적인 생산은 그 이후 아미노산 산업의 급속한 발전을 초래하였고 *C. glutamicum*외에도 *Escherichia coli* 등도 아미노산의 공업적인 생산에 이용될 수 있는 발판을 마련하는 계기가 되었다. 1970년대에 들어서는 유사균인 *C. ammoniagenes*를 이용한 핵산조미료의 성분인 핵산의 생산으로 말미암아 *Corynebacterium*의 유용성은 한층 증가하였으며, 동시에 미생물 유전학의 발달에 힘입어 자연에서 균을 분리하던 단계를 넘어 돌연변이법을 적용해 원하는 균을 개량하는 단계에 이르렀다. 근래는 유전자 재조합 기술과 대사경로분석기술 및 이를 미생물의 균주개량에 응용한 대사공학(metabolic engineering)기술에 의해 목표 지향적인 균주개량법으로 전환되는 추세이다.

*Corynebacterium*에서의 분자유전학적 연구 및 균주개발은 glutamate와 lysine 등의 생합성을 중심으로 이루어져 왔기 때문에 본 난에서는 이들 아미노산 생산을 위한 최근의 연구동향을 대사경로분석 측면에서 살펴본다. 또한 이들 아미노산 생산 균의 주요한 특징과 아미노산 생산공정에 관한 간단한 소개를 하고자 한다. 유전자 재조합기술과 아미노산 분비에 관한 구체적인 정보의 일부는 이미 기술된 바 있으므로 (Eggeling and Sahn, 2001; Jetten *et al.*, 1993; Jetten and Sinskey, 1995; Lee, 1994, 1995; Malumbres and Martin, 1996; Nampoothiri

and Pandey, 1998; Sahn *et al.*, 1995; Sahn *et al.*, 2000; Wohlleben *et al.*, 1992) 본 란에서는 생략하도록 한다.

### *Corynebacterium*

*Corynebacterium*은 분류학적 측면에서 볼 때 그람양성균 중의 Actinomycetes subdivision에 속하며 포자를 형성하지 못하고 형태적으로는 짧은 막대형 또는 성장조건에 따라 “V”자형 등의 불규칙적 모습을 보이는 종류로 정의된다 (Fig. 1; Liebl, 1991). 호기성 또는 통성혐기성(facultative anaerobic)의 호흡 특성을 보이며 세포벽에 탄소 22-36개로 구성된 mycolic acid가 함유되어 있다. 유전물질내의 GC함량은 약 51-65%로서 약간 높은 편에 속한다. *Corynebacterium*은 자연에 널리 분포하며 깊게 연관된 종으로는 “CMN group”에 속하는 *Mycobacterium*, *Nocardia* 및 *Rhodococcus* 등이 있다(Barksdale, 1970). “Coryneform” bacteria는 다양한 종류의 균들을 포함하는 포괄적인 개념으로서 생화학적 생리학적 특성에 기초해 group A로부터 F까지 여섯 집단으로 분류되는데 *Corynebacterium*은 이들 중 group E와 F에 속한다(Seiler, 1983). 같은 집단에 속하는 종으로는 *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Cellulomonas*, *Nocardia*, 및 *Micrococcus* 등이 있다. 근래의 DNA hybridization에 의한 관계연구와 생화학적 생리학적 특성 및 세포벽 구조 등에 기초를 둔 종합적인 분석에 의해 미국의 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에



Fig. 1. *Corynebacterium glutamicum*의 전자 현미경 사진. V 형태의 전형적인 coryne form이 관찰된다(Courtesy of Lothar Eggeling).

**Table 1.** 주요 아미노산의 생산량, 용도 및 생산방법

Production scale (tons/y)	Amino acid	Preferred production method	Main use
800,000	L-Glutamic acid	Fermentation	Flavor enhancer
350,000	L-Lysine	Fermentation	Feed additive
300,000	D,L-Methionine	Chemical synthesis	Feed additive
8000-100,000	L-Aspartate	Enzymatic catalysis	Aspartame
	L-Phenylalanine	Fermentation	Aspartame
	L-Threonine	Fermentation	Feed additive
	Glycine	Chemical synthesis	Food additive, sweetener
1000-8000	L-Tryptophan	Fermentation	Feed additive
	L-Arginine	Fermentation, extraction	Pharmaceuticals
	L-Cysteine	Reduction of cystine	Food additive, pharmaceuticals

Adapted from Leuchtenberger, 1996.

서는 새로운 분류표를 제안했는데 (Wheeler *et al.*, 2000), 이 경우 지금까지 glutamate 생산균으로서 잘 알려진 *Brevibacterium lactofermentum* 등 일부 균은 그 유사성으로 인해 *Corynebacterium*로 재분류된 바 있다(Fig. 2).

*Corynebacterium*은 기존의 아미노산의 공업적 생산균으로서의 용도외에도 외부 유전자 발현을 위한 host균으로서의 기능성도 높게 평가받는다 (Billman-Jacobe *et al.*, 1994, 1995). 특

히 아미노산의 공업적 생산에서 이미 인정된 높은 대사효율과 대사경로의 단순성과 효율성이 장점으로 인식되고 있으며, endotoxin 등을 생산하지 않아 인체에의 위험성이 상대적으로 적은 것과 protease를 포함해 외부로 유출되는 단백질이 거의 존재하지 않는 것도 *Corynebacterium*의 유용성을 한층 높여주고 있다. 또한 아미노산 생산성 향상을 위한 과정 중에 개발된 일련의 분자유전학적 도구 및 균주 개량기술은 *Corynebacterium*의 조작성을 높이는데 일조하고 있다. 지난 2000년에 TIGR(The Institute for Genomic Research)에 보고된 바에 따르면 *C. glutamicum*의 3.3 Mb에 이르는 염기서열이 거의 완전히 해독되었는데, 이는 앞으로 균의 개량에 일대 전환점을 의미하고, 미래에는 genomics, proteomics, 및 metabolic engineering 기술을 통한 새로운 차원의 균주개량이 시도될 것으로 예상된다.

## Eubacteria

### Firmicutes (Gm+)

#### Actinomycetes (high GC)

:

#### Nocardioform

#### Mycobacteria

#### Coryneform bacteria

##### Arcanobacterium

##### Brevibacterium

##### Curtobacterium

##### Dermabacter

##### Corynebacterium

##### C. ammoniagenes

##### C. diphtheriae

##### C. glutamicum

##### C. lactofermentum

**Fig. 2.** 미국의 NCBI(National Center for Biotechnology Information) 분류표에 기초한 *Corynebacterium glutamicum*의 분류.

## Amino acid

아미노산은 다양한 용도로 이용되는데 식품산업에서는 L-glutamate를 조미료의 원료로서, glycine을 과일쥬스의 감미료로서 이용한다(Table. 1). 화학산업에서는 아미노산을 다양한 물질의 합성을 위한 원료물질로서, 제약업에서는 필수아미노산을 중심으로 주사용 수액제나 다이어트제의 성분으로서 이용한다. 아미노산은 또한 사료의 영양성 개선을 위한 사료첨가제로서도 이용되는데, 이는 닭과 돼지의 사료로서 이용되는 식물성사료는 일부 필수아미노산의 함량이 낮아 이에 의해 가축의 성장이 제한되는 문제점을 갖기 때문이다. Soybean meal 160kg이나 fish meal 56kg의 첨가에 의해 해결될 수 있는 사료의 영양상의 문제가 단지 10kg의 methionine의 첨가에 의해 해결될 수 있음은 아미노산의 경제성과 유용성을 나타내는 단편적인 한 예이다

(Eggeling *et al.*, 2001). Methionine 외에도 lysine, phenylalanine, valine, tryptophan, isoleucine, threonine 등이 사료의 영양성 개선을 위해 효율적으로 이용될 수 있으며, 이들이 첨가되는 경우 가축분뇨의 질소함량을 낮추어 환경적인 측면에도 도움을 주는 것으로 알려져 있다.

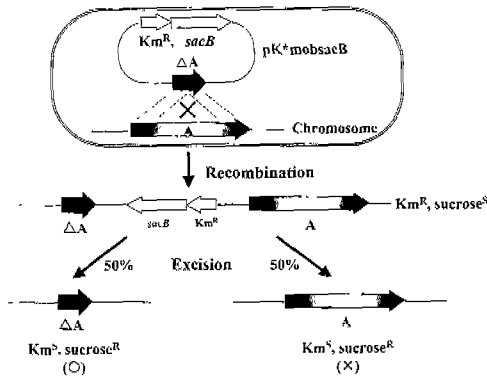
아미노산시장은 매년 5-10% 성장해 왔는데 특히 사료첨가제로서 이용되는 L-lysine의 경우 지난 20년간 거의 20배에 가까운 성장을 하였다. 이 기간 중 L-threonine 같은 새로운 아미노산 시장의 창출도 일어났으며 특히 L-aspartate와 L-phenylalanine을 이용한 저칼로리 감미료인 aspartame은 기존의 물질로부터 한 단계 더 나아가 새로운 시장을 개척한 측면에서 주목할 만 하다. 양적인 측면으로는 역사적인 전환점이 되었던 L-glutamic acid가 연간 생산량 80만톤에 이르러 수위를 차지하고 있고 이를 L-lysine과 D,L-methionine이 뒤따르고 있다 (Leuchtenberger, 1996; Table 1). 이들 아미노산의 생산량과 가격은 거의 반비례적인 관계를 갖는데, 다른 표현으로는 가격이 낮춰지는 경우 아미노산 소비가 증대될 수 있다는 것으로 표현될 수 있다. 이러한 사실은 아미노산 시장의 무한함을 의미하며 동시에 아미노산 생산성 향상을 위한 균주개발을 더욱 촉진하는 계기가 되고 있다. L-lysine의 가격은 대체사료인 soybean meal의 작황에 의해서도 크게 영향을 받으며, 동시에 발효시 공급되는 탄소원의 수급과 아미노산의 지역별 시장성에 의해서도 영향을 받는다. L-glutamate의 생산설비는 전세계에서도 특히 아시아에 집중되어 있으며 L-lysine의 경우 세계 시장의 30%가 북미에 위치한 연유로 생산 또한 이에 해당되는 만큼 북미에서 이루어지고 있다. 발효원료로서 이용되는 탄소원도 지역적인 특성을 나타내는데 동남아시아의 경우 사탕수수나 사탕무에서 설탕을 추출하고 남은 것(당밀)을 탄소원으로 이용하고 북미의 경우 옥수수로부터 전분을 추출한 후 남은 액(corn steep liquor)을 질소원 등의 발효원료로서 사용한다. 이러한 연유에서 아미노산 생산업체는 직접 또는 간접으로 전분당산업(starch and sugar industry)과 연계되어 있으며, 최근에는 아미노산 시장과 가격의 예측하기 어려운 역동성, 저렴하고 원활한 원료의 공급, 연구비용의 증가 및 이에 따른 기업의 자금력 등과 맞물려 아미노산 시장이 전세계적인 상호작용을 필요로 하는 global business화 하는 추세이다. 최근의 규제역과 광우병에 따른 L-lysine의 급격한 가격상승과 시장의 확대는 아미노산 시장과 가격의 역동성을 보여주는 한 예이다.

### Strain development

시장성이 적은 아미노산은 단백질의 가수분해에 의해 쉽게 생산될 수 있으며 아미노산의 D와 L 형태가 문제되지 않는 경우 화학합성법에 의해 생산될 수 있지만 대량생산이 필요한 경우라면 발효법이 가장 좋은 선택이 될 수 있다. *Corynebacterium*은 발효에 의한 아미노산 생산에 중추적인 역할을 담당해온 산업 미생물로서 아미노산의 생산량 및 생성속도의 최적화를 위해

이 균의 개량에 현재까지 많은 노력이 기울여졌다. 일반적으로 균주개발은 화학약품이나 자외선조사 등의 방법에 의해 무작위적으로 변이를 유발시킨 후 각 용도에 알맞은 선별법을 적용하여 이루어졌다(Rowlands, 1984). 아미노산의 세포내 생산량은 다양한 기작에 의해 필요량만 생산되도록 조절을 받기 때문에 이들 조절기작을 해제하는 것이 필요하고, 한 예로서 aspartate kinase가 lysine에 의해 feedback inhibition을 받는 것을 해제하면 일정량의 L-lysine을 생산하는 균을 얻을 수 있다(Liebl, 1991). 그러나 아미노산의 대량생산균을 얻기 위해서는 생산된 세포내 아미노산의 효율적인 분비를 포함한 추가적인 돌연변이가 필수적이다. 현재 산업현장에서 이용되고 있는 생산균은 대부분 이러한 방법에 의해 개발된 것으로서 균주 측면 외에도 생산공정의 효율성개선에 의해 현재에 이르는 뛰어난 생산균으로 변모하였다. 무작위적인 돌연변이에 의한 접근방법은 비교적 빠르고 손쉽게 원하는 균주를 얻을 수 있는 장점 때문에 균주개발에 광범위하게 이용되었지만 동시에 많은 수의 2차변이의 축적으로 말미암아 생산균주들에 대한 생화학적, 생리학적 연구와 각 대사경로의 대사산물 생산에의 기여도 측정을 어렵게 하여 더 이상의 균주개발을 어렵게 하는 단점도 갖는다.

근래의 유전자 재조합 기술은 균주개발에도 새로운 가능성을 제시하게 되었다. 일련의 분자유전학적 도구들의 개발에 힘입어 *Corynebacterium*의 아미노산 대사경로에 관해 분자유전학 수준에서 많은 연구가 진행되어 왔으며 최근에는 이러한 정보에 근거한 균주육종이 시도되기 시작하였다(Jetten and Sinskey, 1995; Sahm *et al.*, 1995). 유전자 재조합기술을 이용한 균주육종은 1) 유전자적인 증폭에 의한 rate-limiting step의 일차적인 제거, 2) 목적성 돌연변이의 도입에 의한 flux의 전환, 3) flux 분석에 활용될 수 있다. 유전자 재조합기술이 그 유용성을 발하기 위해서는 세포내 flux의 정확한 분석에 따른 병목지점의 인지가 필수적이데 최근의  $^{13}\text{C}$ -NMR 과 metabolic balancing을 이용한 flux 분석은 이러한 측면에서 큰 진전을 이루게 하였다(Eggeling *et al.*, 1996; Sahm *et al.*, 2000). 이들 방법을 이용해 central carbon metabolism에서의 기본적인 flux data가 제공된 바 있는데, 유전적인 분석법에 의한 결과와  $^{13}\text{C}$ -NMR 과 metabolic balancing을 이용한 flux 분석결과는 서로 보완적임이 확인된 바 있다(Park *et al.*, 1997; Peters-Wendisch *et al.*, 1996, 1997). 최근의 marker-free double deletion 방법은 다수의 돌연변이를 한 균에 도입할 수 있게 해 이와 같은 유전적인 접근을 가능하게 하였다(Schäfer *et al.*, 1994; Fig. 3). Central carbon metabolism의 분석은 생산균의 생리적인 특성을 파악할 수 있게 함과 동시에 아미노산의 생산성 향상을 위한 균주개발에 새로운 지평을 열게 하였으며 대사공학(metabolic engineering)이 새로운 분야로 자리매김하는데도 일조하였다. 대사공학의 궁극적 목표는 세포내 대사경로를 정확하게 조절 및 통제하여 병목현상을 제거함과 동시에 중간물질의 공급을 원활하게 하여 원하는 대사산물의 생산량 및 속도를 극대화 하는 것



**Fig. 3.** Marker free deletion 과정. 내부 단편의 일부가 제거된 유전자  $\Delta A$ 를  $pK^*mobsacB$ 에 클로닝 후 도입하여 homologous recombination을 유발한다. Homologous recombination에 의해 chromosome내로 벡터가 도입된 균은 kanamycin에 대한 내성과 sucrose에 대한 민감성으로 인해 구분될 수 있다. Secondary crossover에 의해 50%의 가능성으로 변이균이 얻어질 수 있으며 변이의 확인은 PCR에 의한 것이다. Plasmid  $pK^*mobsacB$ 는 *Corynebacterium*에서 자체적인 복제가 불가능하다.

이고 이는 분자유전학적인 도구의 활용에 의해 달성될 수 있다 (Bailey, 1991). 최근의 *C. glutamicum* 균 염기서열의 완전해독은 균주개발에도 새로운 가능성을 열 것으로 기대되는데, DNA chip을 이용한 생산균의 유전자 발현 양상의 분석은 flux 분석에 의해서는 파악될 수 없는 정보를 제공할 것이다. 그 예로서 global regulatory control, 에너지 대사, 및 secretory component가 아미노산 대사에 관여하는 정도 및 역할에 관한 정보를 제공할 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 아미노산 대량생산의 대부분이 다양한 point mutation에 의해 이루어지고 유전자 발현량은 실질적인 변화를 보이지 않는 점에 비추어 functional genomics에 의한 접근법이 모든 것을 해결해 줄 수 있는 것은 아니고 하나의 새로운 도구와 시작점에 불과한 것임을 염두에 두어야 할 것이다.

**대사경로의 분석법**

대사경로분석을 위해서는 다양한 방법이 사용될 수 있고 특별히 어떠한 한 방법이 최고라고 말하기는 어렵지만 근래에는 metabolic balancing과 isotopic tracer experiment( $^{13}C$ -NMR)가 많이 활용되고 이들 방법들의 통합적인 적용에 의해 central carbon metabolism이 분석된 바 있다(Sahm *et al.*, 2000).

과거의 kinetic model(Vallino and Stephanopoulos, 1993), control theory(Kacser and Burns, 1981; Joshi and Palsson, 1990), 및 enzymatic analysis의 경우 *in vitro*에서 측정된 수치에 기초를 두고 *in vivo*의 상황을 유추하는 이유로 말미암아 *in vivo* flux의 분석에 적용하기에는 너무 큰 결점을 갖는다고 할 수 있다. Genetic analysis는 대사경로의 정량적인 분석에는 부적절하지만 나름대로 돌연변이의 도입에 의해 대사경로의 반응과 조절양상을 살필 수 있는 측면에서는 높게 평가를 받는다.

*In vivo* NMR(Brindle, 1988; Schoberth *et al.*, 1996)은 반응속도를 *in vivo*에서 정량적으로 측정할 수 있는 면에서는 바람직하지만 감도가 상대적으로 낮아 측정물질이 고농도로 존재해 세포농도를 높게 유지할 필요성이 적은 경우에 한해 유리할 수 있다.

Metabolite balancing에 의한 방법은 extracellular flux(기질의 흡수와 신물의 배출속도 같은 세포와 주변환경과의 flux)와 intracellular metabolite(세포의 성장을 위한 단백질, DNA, RNA, lipid 등의 고분자물질의 합성을 위한 것)의 농도를 측정하여 구한다. 따라서 사용되는 균의 biomass composition과 성장속도가 알려진 상황이라면 precursor metabolite가 biomass의 합성에 쓰이는 withdrawal flux를 구할 수 있게 된다. 이러한 방법에 의해 모든 product와 byproduct(cell mass 포함)에 대한 flux를 구할 수 있게 된다. 그러나 이 방법도 pentose phosphate pathway(PPP)와 TCA에서 각각 방출되는  $CO_2$ 를 구분할 수 없기 때문에 각각의 경로에 대한  $CO_2$ 의 개별적인 flux는 구할 수 없게 된다. 또한 정반응과 역반응이 함께 존재하는 경로의 경우 전체 flux는 구할 수 있지만 각각에 대한 flux는 구하기 어렵게 된다. 이러한 예가  $PEP \leftrightarrow OAA$ ,  $pyruvate \leftrightarrow OAA$ 이다. 때로는 문제의 해결을 위해 ATP와 NADP에 관한 flux를 포함시키기도 하는데 많은 경우 이들의 농도에 영향을 주는 세포내 반응들이 모두 알려져 있는 것은 아니기 때문에 이러한 측면에서도 문제를 갖는다고 볼 수 있다.

Isotopic tracer method( $^{13}C$ -NMR)는 branch point에서 split flux ratio를 결정할 수 있게 하는 점에서 metabolite balancing method가 제공하지 못하는 정보를 제공할 수 있다(Marx *et al.*, 1996, 1997). 이 방법의 경우 labeling된 탄소로부터 생성된 아미노산이나 metabolite에서의 label의 위치를 NMR에 의해 분석함으로써 각 경로의 사용량을 유추할 수 있다. 아미노산의 탄소골격은 precursor metabolite로부터 생성된 것이므로 역으로 precursor metabolite의 농도를 구할 수 있게 되고 이에 기초해 central carbon metabolism의 정량적인 분석이 가능해진다. 이 방법은 정반응과 역반응이 동시에 존재하는 경우에도 그 양적인 분석이 가능하다는 점에서 metabolic balancing method의 단점을 극복한다. 이 방법의 결정적인 단점은 세포내에 연속적으로 머무르는 metabolite는 분석될 수 있지만 순간적으로 나타났다가 사라지는 종류라면 분석이 불가능하다는데 있다. 이의 해결책으로는 batch culture에서 시간대별로의 분석인데, 이 경우 단백질 등의 고분자물질들은 천천히 labeling이 되는 연유로 인해 이들은 labeling data의 분석에 쓰일 수 없게 된다. 따라서 단백질내의 아미노산에 대한 정보는 쓸 수 없게 되고, 농도가 10-10,000배가 낮은 세포내 아미노산의 농도만을 쓸 수 있게 된다. Glutamate 처럼 세포내 농도가 높은 아미노산은 NMR에 의해 별 문제없이 분석될 수 있지만, 세포내 농도가 낮은 아미노산은 보다 민감한 방법인 GC-MS에 의존해야 할 것이다.

### L-Lysine 생산에서의 pentose phosphate pathway의 역할

아미노산의 생합성을 위하여는 환원력의 원활한 공급이 필수적이며 이는 NADPH의 원활한 공급에 의해 이루어질 수 있다. L-lysine은 L-methionine과 L-cysteine과 더불어 생합성시 가장 많은 양의 환원력을 필요로하는 아미노산의 하나이며 이때 필요한 NADPH는 pentose phosphate pathway(PPP)에 의해 공급된다. L-Glutamate 1mol의 생합성을 위해 1mol의 NADPH가 필요한데 비해 L-lysine 1 mol의 생합성을 위해서는 4 mol의 NADPH를 필요로 하며 이는 곧 NADPH가 limiting factor로서 작용할 가능성이 있음을 암시한다. 이를 뒷받침하듯 L-lysine의 생산 조건에서 PPP의 활성이 증가하는 것이 관찰된 바 있으며 같은 균에서 L-lysine의 생산량이 증가할수록 PPP의 활성이 증가하는 것으로 보고되었다(Marx *et al.*, 1996, 1997). 생화학분석, isotope를 이용한 분석 및 세포내 metabolite의 농도를 이용한 metabolite balancing 분석결과, PPP로의 flux는 세포내 NADPH/NADP 비율과 PPP의 첫 번째 효소인 glucose-6-phosphate dehydrogenase의 활성에 의해 조절되는 것으로 확인되었다. PPP는 carbon-limited chemostat 조건에서 15-25% 정도의 포화수준에서 작용하는 것으로 확인된 바 있는데(Moritz *et al.*, 2000) 이는 실질적으로 PPP가 limiting pathway로서 작용하지 않는다는 것을 의미하지만 보다 엄격한 L-lysine 생산조건에서는 상황이 달라질 수도 있을 것이다.

### Anaplerotic node의 분석

L-Lysine을 포함한 여러 아미노산의 생산에 있어서 anaplerotic reaction은 큰 중요성을 갖는데 그 이유는 전구물질인 oxaloacetate의 공급을 담당하기 때문이다. Metabolite balancing분석에 의해 L-lysine의 생산속도는 oxaloacetate의 생성속도와 동일한 것으로 보고된 바 있다(Simpson *et al.*, 1998). *C. glutamicum*은 anaplerotic reaction에서 큰 특징을 보이는데 2개의 C3-carboxylation 효소(phosphoenolpyruvate carboxylase, pyruvate carboxylase)와 3개의 C4-decarboxylation 효소(phosphoenolpyruvate carboxykinase, oxaloacetate decarboxylase, malic enzyme)를 함유하는 것으로 알려져 있다(Fig. 4). Anaplerotic enzyme으로서 phosphoenolpyruvate carboxylase는 그 존재가 오랜 기간에 걸쳐 알려져 왔지만 pyruvate carboxylase는 비교적 최근에 permeabilized cell을 이용한 방법에 의해 비로서 그 존재가 확인된 바 있다(Peters-Wendisch *et al.*, 1997, 1998). 이 효소의 존재는 <sup>13</sup>C-labelling 실험에서도 암시된 바 있으며(Peters-Wendisch *et al.*, 1996), phosphoenolpyruvate carboxylase와는 달리(Gubler *et al.*, 1994. Peters-Wendisch *et al.*, 1993) 이 효소의 유전자적인 증폭은 L-lysine의 생산량을 증가시키는데 기여할 수 있는 것으로 보고되었다. *C. glutamicum*은 상당한 양의 C4-decarboxylation 활성을 갖으며 활성의 정도는 배양조건에 많이 지배를 받는데(Sonntag *et*

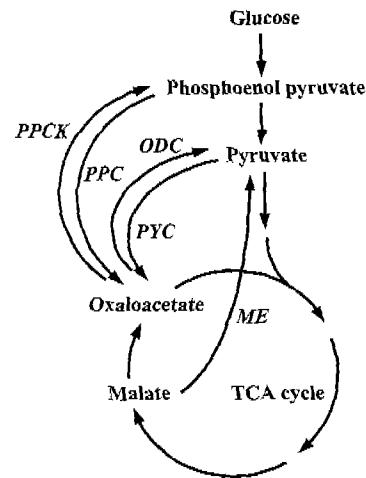


Fig. 4. Anaplerotic pathway. Fluxes are shown in mmol/gDW·h. 약어: PPC, phosphoenolpyruvate carboxylase; PPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; PYC, pyruvate carboxylase; ODC, oxaloacetate decarboxylase; ME, malic enzyme.

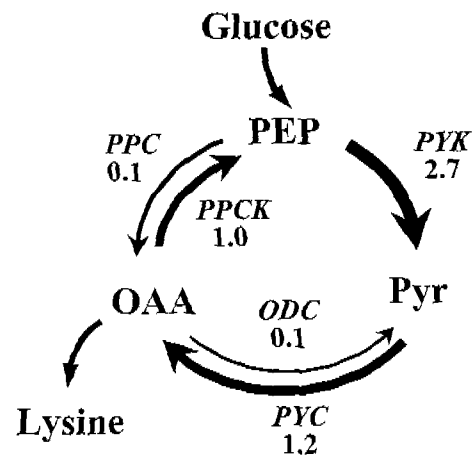


Fig. 5. Phosphoenol pyruvate(PEP)-Pyruvate(Pyr)-Oxaloacetate(OAA) 삼각점에서의 carbon flux. 약어: PYK, pyruvate kinase; PYC, pyruvate carboxylase; PPC, phosphoenolpyruvate carboxylase; PPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; ODC, oxaloacetate decarboxylase.(Adapted from Sahn *et al.*, 2000)

*et al.*, 1995; Marx *et al.*, 1996, 1997, 1999), 특히 이 활성이 증가할수록 L-lysine의 생산량은 감소하는 것으로 알려져 있다. 이러한 사실은 C4-decarboxylation 활성을 제거하는 경우 L-lysine의 생산량을 증가시킬 수 있음을 의미하고 이들 C3와 C4-decarboxylation 반응에 대한 flux를 분석한 결과 pyruvate carboxylase와 phosphoenolpyruvate carboxykinase가 flux의 90% 이상을 차지하는 주요한 반응인 것으로 판명되었다(Fig. 5). 이들 반응이 연속적으로 진행해 회전하는 경우 ATP를 연속적으로 소모하는 futile cycle을 형성할 것으로 여겨지며, 이 둘 반응의 생리적인 의미 및 L-lysine 생산에서의 중요성이 파악되기 위해서는 더 많은 연구가 필요한 상황이다.

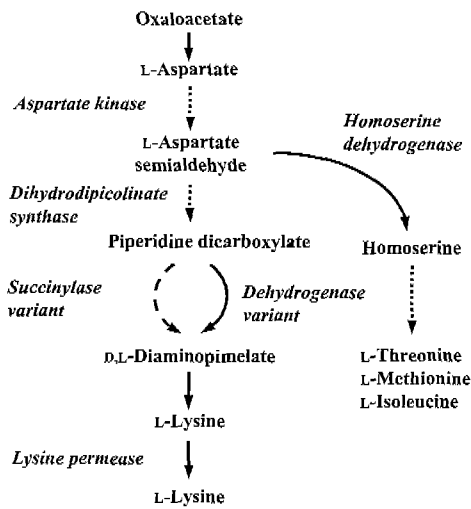


Fig. 6. L-Lysine의 개략적인 생합성경로.

L-Lysine의 생산

L-Lysine의 탄소골격은 oxaloacetate와 pyruvate로부터 유래한다(Fig. 6). 생합성 첫 단계는 aspartate kinase에 의해 매개되는데 이 효소는 대부분의 생합성에서 관찰되듯이 최종산물인 L-lysine과 L-threonine에 의해 concerted feedback inhibition을 받는다. 이 효소는 *lysC* 유전자에 의해 발현되는데 mutation에 의해 deregulation시켜 feedback inhibition을 해제하는 경우 일정량의 L-lysine의 생산이 관찰된다. L-lysine 생산에 중요한 다음 단계는 aspartate semialdehyde branch point인데 이곳에서의 탄소의 흐름은 일차적으로 threonine 생합성방향이 되는데 이는 homoserine dehydrogenase가 경쟁효소인 dihydrodipicolinate synthase 보다 공통의 기질인 aspartate semialdehyde에 대해 더 높은 기질친화력을 갖기 때문이다. 충분한 생성된 threonine은 순차적으로 homoserine dehydrogenase를 feedback inhibition하며 이에 의해 탄소의 흐름은 lysine 생합성 방향으로 전환된다. *E. coli*의 dihydrodipicolinate synthase는 feedback inhibition에 의해 그 활성이 조절되는데 비해 *C. glutamicum*의 효소는 드물게도 발현량을 조절해 lysine 생합성 경로로의 flux를 조절한다. 따라서 이 경우 dihydrodipicolinate synthase를 발현하는 유전자 *dapA*를 다량 발현시키는 경우 lysine 생합성경로로의 flux를 증가시킬 수 있게 된다. 이 경우 homoserine의 양적인 감소로 인해 threonine, methionine, 및 isoleucine 등의 생합성이 일정 수준 지장을 받게 되고 그 결과 세포 성장이 둔화되는 특성이 있는데, 이는 오히려 lysine의 생산에는 바람직한 현상이다. 왜냐하면 세포성장의 둔화로 인해 축적된 세포내 precursor metabolite가 lysine 생합성을 위해 쓰일 수 있기 때문이다(Eggeling *et al.*, 1998).

*Corynebacterium*에 의한 lysine 생합성과정에서 보이는 또 다른 특징은 piperidine-2,6-dicarboxylate에서 생합성 경로가 두 부분으로 나뉘어 4단계로 구성된 succinylase 경로나 1단계의

dehydrogenase 경로를 사용하는 것이다(Wehrmann *et al.*, 1994, 1995, 1998). *E. coli*의 경우 succinylase 경로만이 존재하고 *Bacillus*의 경우 dehydrogenase 경로만이 존재하는 것으로 알려져 있다. 두 경로의 존재는 *C. glutamicum* 균의 뛰어난 대사능력과 적응력을 증명하는 한 예로서, 동화되는 ammonium의 농도가 높은 배양초기에는 dehydrogenase 경로가 관여하고 배양후기에 ammonium의 농도가 낮아지게 되면 succinylase 경로가 관여하게 된다. 이는 dehydrogenase가 기질인 ammonium에 대해 갖는 기질 친화력이 매우 낮기 때문인데 이와 같이 생리적인 상태에 따라 이용하는 생합성 경로를 통제함으로써 주어진 여건에 적절하고 에너지 효율이 높은 경로를 택할 수 있게 된다(Sahm *et al.*, 2000). Dehydrogenase 경로에 비해 succinylase 경로는 암모니아의 농도가 매우 낮은 상황에서도 작용할 수 있는 기질 친화력이 높은 경로인 만큼 에너지의 소모가 많은 고비용의 경로일 것으로 여겨진다. L-lysine은 약 33%가 dehydrogenase 경로에 의하고 약 66%가 succinylase 경로에 의해 생성되는 것으로 보고된 바 있지만, 배양조건에 따라 그 비율이 변할 가능성도 있다(Sonntag *et al.*, 1993).

L-Lysine의 효율적인 생산을 위한 마지막 단계는 생성된 세포내 L-lysine의 효율적인 분비인데 이는 *lysE*에 의해 발현되는 lysine exporter에 의해 이루어진다(Vrljic *et al.*, 1996, 1999). 변이균의 경우 축적된 세포내 L-lysine에 의해 세포성장이 정지되는 것에 비추어 특성의 환경에서 이 유전자의 발현은 필수적인 것으로 여겨지며, 생산균의 경우 이 유전자의 다량발현에 의해 L-lysine의 생산을 증가시킬 수 있다고 보고된 바 있다.

이미 기술된 것처럼 유전자 재조합 기술이 균의 개량에 새로운 지평을 열고 있지만 현재 널리 사용되는 L-lysine 생산균은 고전적인 돌연변이법에 의해 획득된 균이고 이들을 이용해 리터당 170g 이상의 L-lysine이 생산되고 있다. 이들 균은 L-lysine analog에 대해 내성을 갖고며 그 결과 L-lysine에 의한 조절이 불가능해진 균이다. 예로서 S-(2-aminoethyl)-L-cysteine에 대한 내성균은 변형된 모습의 aspartokinase를 갖고있어서 L-lysine에 의한 feedback inhibition이 불가능하다. Pyruvate의 analog인 fluoropyruvate를 이용해 pyruvate dehydrogenase의 활성이 감소된 변이균을 얻을 수 있는데 이 경우 TCA회로 내로의 flux를 감소시켜 균체의 성장을 감소시킨 만큼 lysine의 생산량을 증가시킬 수 있게 된다. 같은 원리에서 citrate synthase의 활성을 감소시켜 lysine의 생산량을 증가시킬 수 있다.

L-Lysine 발효에서 가장 널리 사용되는 탄소원은 당밀(molasses), sucrose, 및 starch hydrolysate이다. Acetate와 ethanol을 이용하는 공정도 개발된 바 있으며 최근에는 당밀이 갖는 지역적(계절적인 문제점으로 인해 hydrolyzed starch 등으로 전환되는 추세이다. 질소원으로는 ammonium sulfate, gaseous ammonia, 및 ammonia water 등이 사용되며 때로는 corn steep liquor를 첨가해 질소원의 일부를 공급하면서 동시에 growth factor를 공급하기도 한다. 생산된 L-lysine은 배지내에 sulfate이

온과 결합된 상태로 존재하며 수율은 원가와 직접적인 관련이 있기 때문에 매우 중요한 사항이다. 일반적으로 탄소원 100g 당 45-50g의 L-lysine이 얻어지는데 이는 포도당을 탄소원으로 이용하는 경우 얻어지는 이론적인 최대값인 74%에는(Vallino and Stephanopolous, 1993) 못 미치며 아직도 개선의 여지가 있음을 나타낸다. 정제법은 용도에 따라 달라지게 되는데 사료용의 경우 다음의 3가지 중 한 형태이다. Crystalline preparation(98.5%)의 경우 이온교환수지에 의해 정제한 후 spray drying 등의 방법을 이용해 건조 및 결정화 하여 마무리하고, L-lysine의 농축 알카리용액(alkaline solution of concentrated L-lysine)은 50% L-lysine을 함유하는 용액으로서 배지에서 균체를 제거한 후 evaporation과 filtration에 의해 제조한다. Granulated lysine sulfate는 47%의 L-lysine을 함유하며 전체 발효액을 spray drying에 의해 제조한 것이다. 이들 각각은 설비투자비, 회수율, 폐기물의 양, 및 공정의 용이성 등에서 차이를 나타내 최종산물의 가격 차이를 유발한다.

### L-Glutamate의 생산

*C. glutamicum*의 가장 널리 알려진 공업적인 용도는 L-glutamate를 생산하는 것이며 이의 효율적인 생산은 TCA 회로 구성분이면서 전구물질인  $\alpha$ -ketoglutarate의 원활한 공급에 있다. TCA 회로의 원활한 수행과  $\alpha$ -ketoglutarate의 원활한 공급을 위해서는 anaplerotic reaction이 특히 중요한 역할을 하게 되는데 이러한 측면에서 *C. glutamicum*은 *E. coli*나 *Bacillus* 등과 차이를 보인다. Oxaloacetate를 공급하는 anaplerotic reaction으로서 *E. coli*는 phosphoenol pyruvate로부터 oxaloacetate를 생성하는 phosphoenolpyruvate carboxylase를 갖는 반면에 *Bacillus*는 pyruvate로부터 oxaloacetate를 생성하는 pyruvate carboxylase를 갖는다. 이에 비해 *C. glutamicum*은 이들 두 효소를 모두 함유하며(Fig. 7) 그 결과 L-glutamate의 생산 때문에 감소한 TCA 회로상의 전구물질들을 효율적으로 보충할 수 있으며 이런 면에서 이 균의 뛰어난 대사능력을 엿볼 수 있다. 또한 L-glutamate는 다른 아미노산의 생합성에 비해 전구물질, 에너지, 및 환원력의 소모량이 매우 낮는데, 이러한 측면에서 볼 때 균 내에서 이 아미노산의 생합성에 관한 조절 필요성이 낮아 균주조작에 의한 생산이 쉬운 아미노산으로 볼 수 있고, 그러한 연유에서 생산균이 쉽게 분리될 수 있는 특성을 갖는다고 할 수 있다.

세포내의 L-glutamate의 농도는 다른 아미노산에 비해 매우 높게 유지되는데 이는  $\alpha$ -ketoglutarate로부터 L-glutamate를 생성하는 glutamate dehydrogenase의 높은 활성때문이다. 세포내 아미노기의 70%가 L-glutamate에서 유래하는 것에 비추어볼 때 아미노기의 공급원으로서의 L-glutamate의 특별한 역할을 수행하기 위해서는 세포내 농도를 높게 유지하는 것이 필수적임을 알 수 있다. 많은 양의 세포내 L-glutamate를 세포밖으로 방출시키는 간단한 방법은 배지의 biotin의 양을 제한하는 것인데,

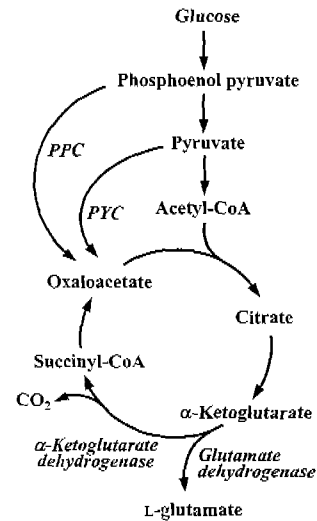


Fig. 7. L-Glutamate의 개략적인 생합성경로. 약어: PPC, phosphoenolpyruvate carboxylase; PYC, pyruvate carboxylase.

이 경우 세포막에 물리적인 변화가 초래되어 L-glutamate가 분비되게 된다. Biotin은 acetyl-CoA carboxylase의 cofactor로서 작용하며 결핍시 효소의 기능저하에 따라 세포막의 phospholipid의 양이 감소하며, 동시에 unsaturated fatty acid인 oleic acid의 양이 saturated fatty acid인 palmitic acid에 비해 상대적으로 증가하게 된다. 이와 같은 원리에서 biotin결핍에 의한 효과를 다른 방법에 의해서도 유도할 수 있는데 이에 1) 페니실린 첨가, 2) 계면활성제의 첨가, 3) oleic acid auxotroph의 이용, 4) glycerol auxotroph의 이용 등이 있다. L-Glutamate의 분비기작은 아직 완전히 이해된 상태는 아닌데 예로서 세포내의 L-glutamate의 농도(150 mM)보다 세포밖의 농도(1 M 이상)가 더 높은 것에 비추어 특이적이며 에너지 의존성의 carrier system이 관여할 가능성이 높다(Eggeling *et al.*, 2001). 또한 biotin의 결핍에 의한 세포막의 약화에 의해 L-glutamate가 방출된다면 다른 세포내 필수적인 이온들도 외부로 유출될 것이며 이 경우 세포의 생존에 큰 위협을 가하게 되는 것도 이와 같은 가능성을 뒷받침한다. L-Glutamate의 생산균은 낮은  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase 활성을 갖는데 이 경우 TCA 회로로의 flux를 감소시켜 균의 성장을 억제하게 되고 그 결과 여분의 전구물질인  $\alpha$ -ketoglutarate를 L-glutamate의 합성에 이용할 수 있게 된다. 균을 페니실린이나 surfactant에 노출하거나 biotin의 양을 제한하는 경우 glutamate dehydrogenase의 활성은 영향을 받지 않는데 비해  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase의 활성은 90% 감소하는 것으로 알려져 있다.

L-glutamate의 발효공정에서 가장 중요한 인자는 암모니아의 농도, 용존산소, 및 pH이다. 너무 높은 암모니아 농도는 균의 성장과 L-glutamate의 생성을 저해하기 때문에 초기 농도는 낮게 유지하며 발효과정중에 일정량을 연속적으로 첨가한다. 산소의 경우도 결핍시 발효대사로 진행해 lactic acid와 succinic acid

등의 acid의 생성이 증가하고, 너무 높게 유지되는 경우 지나친 호기적인 대사로 인한 TCA회로의 과도한 이용으로 말미암아  $\alpha$ -ketoglutarate가 배지로 유출되게 된다. 배양은 일반적으로 500m<sup>3</sup>의 발효조를 이용하며 L-glutamate의 분비는 일정시간 배양후 Tween 40(polyethylene sorbitan monopalmitate) 등의 surfactant를 첨가하여 유도한다. Glucose를 탄소원으로 이용하는 경우 yield는 60-70%에 달하는 것으로 보고된 바 있다. 발효액 중의 L-glutamate는 ammonium salt 형태로 존재하며 균체를 제거한 후 basic anion exchange resin를 이용해 L-glutamate는 결합시키고 ammonia는 방출한다. 암모니아는 증류에 의해 회수 후 재사용한다. NaOH를 resin에 통과시키면 L-glutamate는 MSG 형태로 방출되며 결정화와 탈색과정등을 거쳐 상품화 된다.

### 결론

현재까지 *C. glutamicum*의 아미노산 생산에 대한 많은 연구 결과에 기초해 볼 때, 이 균의 대사경로는 *E. coli*에서보다 단순하고, 또한 변화에 적응하는 능력이 큰 측면에서 분명한 차이를 보이는데 바로 이런 점 때문에 이 균이 우수한 아미노산 생산균으로서 역할을 할 수 있는 것으로 여겨진다. Isotope과 metabolic balancing에 의한 flux 분석과 유전적인 분석에 의해 아미노산 생산에 중요한 경로들이 파악되었고 동시에 이들 경로의 아미노산 생산에의 기여도도 알려지게 되었다. 이러한 종합적인 결과는 향후 아미노산 생산성 향상을 위한 이 균의 개량방안을 새로운 각도에서 제시할 것으로 기대된다. 최근의 *C. glutamicum* 균 염기서열의 완전해독은 균주개량에도 새로운 지평을 열 것으로 기대되며, DNA chip을 이용한 생산균의 유전자 발현 양상의 분석은 flux 분석에 의해서는 파악될 수 없는 정보를 제공할 것으로 여겨진다. 그 예로서 global regulatory control, 에너지 대사, 및 secretory component가 아미노산 대사에서 차지하는 중요성에 관한 정보를 제공할 것으로 기대되며 새로운 차원의 균주개량과 분석시대를 열 것으로 여겨진다.

### 참고문헌

1. Bailey, J. E., 1991. Towards a science of metabolic engineering. *Science* 252:1668.
2. Barksdale, L. 1970. *Corynebacterium diphtheriae* and its relatives. *Bacteriol. Rev.* 34:378-422.
3. Billman-Jacobe, H., A. L. M. Hodgson, M. Lightowers, P. R. Wood, and A. J. Radford. 1994. Expression of ovine gamma interferon in *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1641-1645.
4. Billman-Jacobe, H., L. Wang, A. Kortt, D. Stewart, and A. Radford. 1995. Expression and secretion of heterologous protease by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1610-1613.
5. Brindle, K. M. 1988. NMR methods for measuring enzyme kinetics in vivo. *Progr. Spectr.* 20:257-293.
6. Eggeling, I., H. Sahm, and A. A. de Graaf. 1996. Quantifying and directing metabolite flux: Application to amino acid overproduction. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 54:1-30.
7. Eggeling, L. and H. Sahm. 2001. The wall barrier of *Corynebacterium glutamicum* and amino acid efflux. *J. Biosci. Bioeng.* 92:201-213.
8. Eggeling, L., S. Oberle, and H. Sahm. 1998. Improved L-lysine yield with *Corynebacterium glutamicum*: use of *dapA* resulting in increased flux combined with growth limitation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49:24-30.
9. Eggeling L., W. Pfefferle, and H. Sahm. 2001. Amino acids. In C. Ratledge, B. Kristiansen(ed.), *Basic Biotechnology*. Cambridge Press.
10. Gubler, M., M. Jetten, S. H. Lee, and A. J. Sinskey. 1994. Cloning of the pyruvate kinase gene(*pyk*) of *Corynebacterium glutamicum* and site-specific inactivation of *pyk* in a lysine producing *Corynebacterium lactofermentum* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2494-2500.
11. Gubler, M., S. M. Park, M. Jetten, G. Stephanopoulos, and A. J. Sinskey. 1993. Effect of phosphoenolpyruvate carboxylase deficiency on metabolism and lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Micro. Biotechnol.* 40:409-416.
12. Jetten, M. S. M., M. E. Gubler, M. M. McCormick, G. E. Colon, M. T. Follettie, and A. J. Sinskey. 1993. p. 97-104. In R. H. Baltz, G. D. Hegeman, and P. L. Skatrud(ed.), *Industrial microorganisms: Basic and applied molecular genetics*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
13. Jetten, M. S. M. and A. J. Sinskey. 1995. Recent advances in the physiology and genetics of amino acid-producing bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* 15:73-103.
14. Joshi, A. and B. O. Palsson. 1990. Metabolic dynamics in the human red cell. Part IV: Data prediction and some model computations. *J. Theor. Biol.* 142:69-85.
15. Kacser, H. and J. A. Burns. 1981. The molecular basis of dominance. *Genetics* 97:639-666.
16. Kinoshita, S. 1985. Glutamic acid bacteria, p. 115-142. In A. L. Demain, N. A. Solomon(ed.), *Biology of industrial microorganisms*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, London.



17. Lee, H.-S. 1994. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*. The microorganisms and industry. 20(2):2-8. The Microbiological Society of Korea.
18. Lee, H.-S. 1995. *Corynebacterium*의 분자육종과 산업적 이용. The microorganisms and industry. 21(2):196-202. The Microbiological Society of Korea.
19. Leuchtenberger, W. 1996. Amino acids-technical production and use, p. 465-502. In H. J. Rehm, A. Pühler, G. Reed, and P. J. W. Stadler(ed.), *Biotechnology*, Vol. 6. Weinheim, Germany: VCH Verlagsgesellschaft.
20. Liebl, W. 1991. p. 1157-1171. In A. Balows, H. G. Trer, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer(ed.), *The Prokaryotes*. Springer-Verlag, Berlin, FRG.
21. Malumbres, M and J. F. Martin. 1996. Molecular control mechanisms of lysine and threonine biosynthesis in amino acid-producing corynebacteria: Redirecting carbon flow. *FEMS Microbiol Lett.* 143:103-114.
22. Marx, A., A. A. de Graaf, W. Wiechert, L. Eggeling, and H. Sahm. 1996. Determination of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by NMR spectroscopy combined with metabolic balancing. *Biotechnol. Bioeng.* 49:111-129.
23. Marx, A., K. Striegel, A. A. de Graaf, H. Sahm, and L. Eggeling. 1997. Response of the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* to different flux burdens. *Biotechnol. Bioeng.* 56:168-180.
24. Marx, A., B. J. Eikmanns, H. Sahm, A. A. de Graaf, and L. Eggeling. 1999. Response of the central metabolism in *Corynebacterium glutamicum* to the used of an NADH-dependent glutamate dehydrogenase. *Metabol. Eng.* 1:5-48.
25. Moritz, B., K. Striegel, A. A. de Graaf, and H. Sahm. 2000. Kinetic characterization of the glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases from *Corynebacterium glutamicum* enables to predict pentose phosphate pathway flux in vivo from metabolite pool measurements. *Eur. J. Biochem.* 267:3443-3452.
26. Nampoothiri, M. and A. Pandey. 1998. Genetic tuning of coryneform bacteria for the overproduction of amino acids. *Process Biochem.* 33:147-161.
27. Park, S. M., A. J. Sinskey, and G. Stephanopoulos. 1997. Metabolic and physiological studies of *Corynebacterium glutamicum* mutants. *Biotechnol. Bioeng.* 55:864-879.
28. Park, S. M., C. Shaw-Reid, A. J. Sinskey, and G. Stephanopoulos. 1997. Elucidation of anaplerotic pathways in *Corynebacterium glutamicum* via <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy and GC-MS. *Appl. Microbiol. biotechnol.* 47:430-440.
29. Peters-Wendisch, P. G., B. J. Eikmanns, G. Thierbach, B. Bachmann, and H. Sahm. 1993. Phosphoenolpyruvate carboxylase in *Corynebacterium glutamicum* is dispensable for growth and lysine production. *FEMS Microbiol. Lett.* 112:269-274.
30. Peters-Wendisch, P. G., V. F. Wendisch, A. A. de Graaf, B. J. Eikmanns, and H. Sahm. 1996. C3-Carboxylation as an anaplerotic reaction in phosphoenolpyruvate carboxylase-deficient *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* 165:387-396.
31. Peters-Wendisch, P. G., V. F. Wendisch, S. Paul, B. J. Eikmanns, and H. Sahm. 1997. Pyruvate carboxylase as an anaplerotic enzyme in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* 143:1095-1103.
32. Peters-Wendisch, P. G., C. Kreutzer, J. Kalinowski, P. Patek, H. Sahm, and B. J. Eikmanns. 1998. Pyruvate carboxylase from *Corynebacterium glutamicum*: characterization, expression and inactivation of the *pyc* gene. *Microbiology* 144:915-927.
33. Rowlands, R. T. 1984. Industrial strain improvement: Mutagenesis and random screening procedures. *Enzyme Microb. Technol.* 6:3-10.
34. Sahm, H., L. Eggeling, B. Eikmanns, and R. Kromer. 1995. Metabolic design in amino acid producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Rev.* 16:243-252.
35. Sahm, H., L. Eggeling, and A. A. de Graaf. 2000. Pathway analysis and metabolic engineering in *Corynebacterium glutamicum*. *Biol. Chem.* 381:899-910.
36. Schäfer, A., A. Tauch, W. Jager, J. Kalinowski, G. Thierbach, and A. Puhler. 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.
37. Schoberth, S. M., B. E. Chapman, P. W. Kuchel, R. M. Wittig, J. Grotendorst, P. Jansen, and A. A. de Graaf. 1996. Ethanol transport in *Zymomonas mobilis* measured using in vivo NMR spin transfer. *J. Bacteriol.*

- 178:1756-1761.
38. Seiler, H. 1983. Identification key for coryneform bacteria derived by numerical taxonomic studies, *J. Gen. Microbiol.* 129:1433-1471.
39. Simpson, T. W., H. Shimizu, and G. Stephanopoulos. 1998. Experimental determination of group flux control coefficients in metabolic networks. *Biotechnol. Bioeng.* 58:149-153.
40. Sonntag, K., L. Eggeling, A. de Graaf, and H. Sahm. 1993. Flux partitioning in the split pathway of lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: Quantitation by <sup>13</sup>C- and <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* 213:1325-1331.
41. Sonntag, K., J. Schwinde, A. A. de Graaf, A. Marx, B. J. Eikmanns, W. Wiechert, and H. Sahm. 1995. <sup>13</sup>C NMR studies of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* during growth and overproduction of amino acids in batch cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44:489-495.
42. Vallino, J., and G. Stephanopoulos. 1993. Metabolic flux distributions in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction. *Biotechnol. Bioeng.* 41:633-646.
43. Vrljic, M., L. Eggeling, and H. Sahm. 1996. A new family of transporter with a new type of cellular function: L-lysine export from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol.* 22:815-826.
44. Vrljic, M., J. Garg, A. Bellmann, S. Wach, R. Freudi, M. J. Malecki, H. Sahm, V. J. Konzina, L. Eggeling, and M. H. Saier Jr. 1999. The LysE superfamily: Topology of the lysine exporter LysE of *Corynebacterium glutamicum*, a paradigm for a novel superfamily of transmembrane solute translocators. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1:327-336.
45. Wehrmann, A., L. Eggeling, and H. Sahm. 1994. Analysis of different DNA fragments of *Corynebacterium glutamicum* complementing *dapE* of *Escherichia coli*. *Microbiology* 140:3349-3356.
46. Wehrmann, A., S. Morakkabati, R. Krämer, L. Eggeling, and H. Sahm. 1995. Functional analysis of sequences adjacent to *dapE* of *Corynebacterium glutamicum* reveals the presence of *aroP*, which encodes the aromatic amino acid transporter. *J. Bacteriol.* 177:5991-5993.
47. Wehrmann, A., B. Philipp, H. Sahm, and L. Eggeling. 1998. Different modes of diaminopimelate synthesis and their role in cell wall integrity: A study with *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 180:3159-3165.
48. Wheeler D. L., C. Chappey, A. E. Lash, D. D. Leipe, T. L. Madden, G. D. Schuler, T. A. Tatusova, B. A. Rapp. 2000. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 28:10-4.
49. Wohlleben, W., G. Muth., and J. Kalinowski. 1992. p. 455-505. In H.-J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, and P. Stadler(ed.), *Biotechnology: vol 2, Genetic fundamentals and genetic engineering*. VCH, Weinheim, FRG.



이 흥 식 (李興植)

1978-1985년 고려대학교 식품공학과

1985-1990년 University of California, Davis, Ph.D. in Microbiology

1990-1993년 Postdoctoral Fellow

University of California, Berkeley

1993-1994년 Postdoctoral Associate, MIT  
지도교수: Anthony J. Sinskey2000년 독일 FZ-Jülich 국립연구소,  
Institute of Biotechnology,  
아미노산생산에 관한 방문연구  
수행1994년-현재 고려대학교 생명공학원(전임)  
부교수고려대학교 자연과학대학 생물  
공학과(겸임) 부교수