

# 미생물 대사공학을 이용한 식품첨가물 생산

## Microbial Metabolic Engineering for Producing Food Ingredients

김수린, 최진호, 하석진, 진용수\*  
Soo Rin Kim, Jin-Ho Choi, Suk-Jin Ha, Yong-Su Jin\*

미국 일리노이주립대, 식품과학과  
Department of Food Science and Human Nutrition, University of Illinois at Urbana-Champaign

### I. 서론

미생물은 아주 오랜 기간 동안 식품가공 및 저장의 도구로 사용되어져 왔다. 식품의 변패와 식품의 오염을 야기시키는 것도 대부분 미생물이지만, 식품의 관능, 기능성, 저장성을 향상시키는 유용한 미생물도 존재한다. 우리 인류는 의도적이라기 보다는 오랜 기간 동안의 경험을 통해서 미생물을 이용하여 식품의 품질을 향상시키는 방법을 터득해 왔다고 하겠다.

파스퇴르의 실험에 의하여 미생물이 자연생성 되는 것이 아니라 오염에 의하여 식품에서 생육한다는 사실이 알려진 이후로 초기의 미생물학 및 식품과학은 유해한 식품 미생물의 분리 및 동정 그리고 살균방법에 초점을 맞추어 왔다. Nicholas Appert(1)의 canning process 및 sterilization을 위한 열처리 공정(autoclave)의 개발이 그 예이다. 이후 미생물을 이용한 항생물질의 생산이 성공적으로 확립된 후에 식품과학자들은 미생물을 이용한 유용물질의 생산에 관해서 많은 관심을 가지게 되었다. 초기의 연구는 발효식품을 오랜 기간 동안 섭취해온 유럽 및 아시아

권 국가의 과학자들에 의해서 많은 연구가 이루어져 왔다. 이들 과학자들은 미생물 돌연변이주를 이용하면 아미노산과 핵산 같은 식품첨가물의 생산을 혁신적으로 증대시킬 수 있다는 사실을 입증해 보임으로써, 미생물 대사공학의 토대를 마련하였다. 이후 많은 식품 소재 및 첨가물들이 다양한 돌연변이 미생물 균주를 이용한 발효공정을 통해서 생산이 가능하게 되었다. 나아가, 최근에는 유전자 재조합 기법을 이용하여 개발된 미생물 균주를 이용한 식품첨가물의 생산이 시도되고 있다. 기존의 자연계에 존재하는 미생물과 그 돌연변이주를 이용한 식품첨가물 생산연구가 경험과 관찰의 과학에 근거를 둔 수동적인 연구였다면, 유전자 재조합 기법을 이용한 대사공학 연구는 보다 능동적인 미생물 개량연구라고 할 수 있겠다.

대한민국 식품위생법 제 2조의 식품첨가물은 “식품을 제조·가공 또는 보존하는 과정에서 식품에 넣거나 섞는 물질 또는 식품을 적시는 등에 사용되는 물질을 말한다. 이 경우 기구·용기·포장을 살균·소독하는데 사용되어 간접적으로 식품으로 옮겨갈 수 있는 물질을 포함한다”로 매우 광범위하게 정의되어 있다. 현재 미생물을 이용

\*Corresponding author: Yong-Su Jin  
Department of Food Science and Human Nutrition, University of Illinois at Urbana-Champaign,  
3402 Institute for Genomic Biology, MC-195  
1206 West Gregory Drive, Urbana, IL 61801, USA  
Tel: +217-333-7981  
Fax: +217-333-0508  
e-mail: ysjin@illinois.edu

하여 생산되고 있는 식품첨가물은 유기산, 아미노산, 핵산관련 물질, 비타민, 다당류, 효소, 미생물 균체, 알코올, 글리세롤, 등 그 종류가 매우 다양하다. 본 논문에서는 최근 시도되고 있는 식품소재 및 첨가물 생산을 위한 미생물 대사공학 연구방법론 및 식품첨가물 생산을 위한 미생물 대사공학 연구의 응용 사례에 관하여 소개하고자 한다.

## II. 미생물을 이용한 식품소재 생산

### 1. 대사공학을 이용한 균주개량 방법

산업적으로 유용한 독특한 특성(목적물질의 고효율/고생산성 생산능)을 가지는 균주의 개발은 기존의 유전공학 및 발효공정 최적화 기술과 함께 재조합 미생물을 이용한 식품첨가물 생산 공정을 구현하는 주요 기술이라고 하겠다. 균주개량을 위한 고전적인 방법은 대상 미생물 균주를 확립하고 다양한 돌연변이 유도방법을 이용하여 다수의 미생물 돌연변이주를 획득한 후, 목적하는 대사산물을 과량 생산하는 돌연변이주를 선별하는 방식이다. 나아가, 이와 같은 돌연변이주 유도-우수균주 선별의 실험과정을 반복하여 지속적으로 시행함으로써, 목적하는 대사산물의 생산이 증대된 균주를 최종 선별하게 된다. 현재 많은 종류의 향생물질, 핵산, 아미노산등을 생산하는 산업용 균주가 고전적인 균주개량 방법을 통하여 개발되어왔다. 이와 같은 식품 첨가물 생산을 위한 산업용 균주 개발 전략은 목적하는 생산물질을 이미 생산하는 대사능력을 가진 미생물 균주를 확보하고 있는 경우에는 매우 효과적이지만, 그렇지 않은 경우에는 적용이 어렵다. 특히, 목적하는 물질을 생산하는 미생물 균주가 대용량 발효에 적합하지 않거나, 목적하는 물질을 생산하는 미생물 균주가 확립되지 않은 경우에는 적용하기가 수월하지 않다. 이러한 단점들을 극복하기 위해서, 유전자 재조합 기법을 이용한 균주개량 방법인 대사공학 연구방법이 시도되어 왔다. 대사공학 연구방법을 정의하면 목적하는 대사산물을 과량 생산하기 위하여, 대사산물의 생산과 관련이 있는 다수의 유전자들(효소 및 전사인자를 암호화 하는)을 발굴하고, 최적의 대사산물 생산을 위하여 발굴된 유전자들의 발현을 조절하는 일련의 연구노력이라고 할 수 있겠다. 대사공학적인 연구방법을 이용한 미생물 균주개발의 예로서, 재조합 대장균을 이용한 1,3-propanediol 생산을 들 수 있다(2). 자연계에 존재

하는 1,3-propanediol 생산 미생물 균주들은 혐기 미생물들로 대용량 발효가 용이하지 않고, 다른 대사물질들을 부산물로 생성하기 때문에 산업용으로 이용하는데 한계가 있다. 따라서 이미 재조합 단백질 생산을 위한 고농도 배양 경험이 많은 대장균에 1,3-propanediol의 생합성에 필요한 유전자들을 클로닝 하여 도입하고, 나아가 수율 및 생산성 향상을 위하여 대장균 유전자들을 추가로 knockout 하고 과발현함으로써 기존 생산균주들에 비하여 향상된 1,3-propanediol 생산능을 보이는 재조합 대장균이 제작되어 현재 대량생산에 도입되어 사용되고 있다. 이 외에도 많은 식품 첨가제로 사용될 수 있는 유용 대사물질들이 대사공학을 연구방법을 통해서 개발 되고 있다.

### 2. 시스템 생물공학을 이용한 대사공학 연구방법의 진화

최근 들어 많은 미생물과 심지어는 인간의 유전체 서열까지도 밝혀짐에 따라, 기존에는 알지 못했던 많은 양의 생물학적 정보들(genomics, proteomics, transcriptomics, metabolomics)을 이용하여 세포내에서 일어나는 현상들을 더욱 정확하고 빠르게 감지할 수 있게 되었다. 이와 같이 다양한 생물학적 정보들을 효과적으로 통합(integration)하고 해석(analysis)함으로써, 기존의 생물공학 연구를 한 단계 업그레이드 하려는 일련의 노력의 한 갈래로서 시스템 생물공학(systems biotechnology)적 접근이 시도되고 있다. 따라서 세포내 현상들의 통합적 이해를 바탕으로 한 시스템 생물공학적 기법을 이용한 산업용 균주의 개량이 가능할 것으로 기대된다(3, 4).

시스템 생물공학적 접근은 세포내에서 일어나는 현상들을 하나의 독립된 사건으로 인식하기보다는 그와 관련된 여러 인자들의 직간접(direct/indirect) 상호작용들(interactions)의 결과로서 해석하고자 한다. 물론 이미 훌륭한 연구 성과들이 나오고는 있지만, 다음과 같은 이유들이 시스템 생물공학적 접근을 힘들게 하고 있다. 첫째, 완벽한 시스템의 구성요소들의 정의가 되지 못하고 있다. 예를 들면, 대장균의 경우 유전체 염기서열이 끝난 지가 15년이 되어가지만, 아직도 유전자의 기능(function)을 알지 못하는 미지의 유전자들이 무려 30% 이상이다. 이와 같이 가장 많이 연구된 대장균에서조차 완벽한 시스템의 구성요소의 파악이 힘들다는 것을 의미한다. 둘째, 고속 세포기능탐색

기술(high-throughput measurement of cellular molecules)에 의한 정보들의 통합이 매우 현재로서는 어렵다. 수없이 방대한 양의 transcriptomics, proteomics, metabolomics, 및 단백질 상호작용(protein interaction) 연구결과들이 나오고는 있으나, 아직까지 효과적으로 이러한 정보들을 통합할 수 있는 이론적 및 실험적 토대는 마련되지 못했다. 셋째, 많은 노력에도 불구하고 세포내에서 대사 및 유전자 네트워크와 표현형(phenotype)의 상호관계 분석을 위한 통합적 전산모델(*in silico* model)이 아직 완성되지 못하였다는 것이다. 세포내 대사의 화학양론(stoichiometry)에 기초한 정적(static)인 모델의 구축은 어느 정도 성과를 내고 있지만, 완벽하게 세포내 현상들의 동력학적(kinetic 및 regulatory)인 정보를 포함하는 진정한 의미의 *in silico* model의 구축을 위해서는 지속적인 연구가 필요하다고 하겠다. 이와 같이 우리가 이상적으로 생각하는 systematic한 접근방식의 systems biotechnology 연구 방법은 현재로서는 좀 더 많은 연구가 필요하다고 하겠다. 하지만, 또 다른 접근 방식인 조합적 접근방법 (combinatorial approach)은 앞서 기술한 systematic 접근방식으로부터 도출되는 문제점들을 제한적이거나 매우 효과적으로 해결할 수 있는 장점을 가지고 있다(그림 1).

### 3. Combinatorial 접근방법을 통한 시스템 생명공학 연구방법

조합적 접근방법은 이미 알고 있는 지식에 근거하기 보

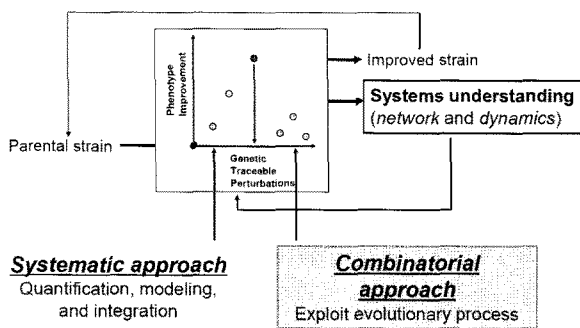


그림 1. 시스템 생명공학기법을 이용한 균주개량 방법은 크게 Systematic 및 combinatorial 연구전략이 사용된다. 제한적인 정보의 효율적 이용과 신속한 최적균주의 제작을 위해서는 두 전략의 병행이 필수적이다.

다는 생물학적 다양성(diversity)과 진화적 선택과정(evolutionary process)을 이용하여 문제에 접근하는 방식이다. 예를 들면 대장균에서 초산(acetate)의 생합성에 관련된 대사 및 유전자 조절 네트워크를 규명하고 싶다면, 많은 종류의 돌연변이(mutants)를 random하게 만들어서, 그 돌연변이들 중 초산 생성의 패턴과 양이 돌연변이의 모체가 되는 균주(parental strain)와 다른 양상을 보이는 돌연변이를 선별 (selection/screening)하여 그 돌연변이가 어떠한 유전자의 변화에 기인한 것인지를 추적(trace)함으로써 초산의 생합성에 관련된 대사 및 유전자의 조절 네트워크의 구성인자를 발굴하는 것이다. 방법은 비슷하지만 조합적인 접근방식과 그동안 많은 성공을 거두어 온 전통적인 균주개량 방법(traditional strain improvement by chemical mutagenesis)과는 다음과 같은 점에서 크게 구별된다. 시스템 생물공학을 위한 조합적 접근방식은 돌연변이를 유도하는 방법으로서, 추적 가능한 유전학적인 방법(traceable genetic perturbation methods)을 쓰는 반면 전통적인 균주개량 방법에서는 화학물질을 이용한 돌연변이(chemical mutagenesis) 유도를 사용하였다. 또한 돌연변이 균주 선별의 조건(selection/screening criteria)으로 조합적 접근방식은 우리가 관심 있어 하는 형질(phenotype of interest)이 모균주에 비해 향상 및 감소를 모두를 고려하는 반면, 전통적인 균주개량 방식은 형질의 향상을 추구한다. 이와 같이 조합적인 접근방식의 연구의 목적은 알지 못하는 유전적 변이(uncharacterized mutation)로 인한 관심형질(phenotype of interest)의 직접적인 향상보다는, 관심 형질의 변화와 관련된 유전자의 발굴(target identification)과 특성화(characterization)라고 할 수 있다. 이런 조합적인 방식은 많은 돌연변이의 선별과 선별된 균주의 특성화를 위한 기술적인 문제를 가지고 있었으나, 최근 급속도로 발달한 고속세포탐색기능 장치와 유전체 염기서열해독 그리고 생물정보공학 기술들의 덕택으로 해결되었다. 앞으로의 연구의 방향은, 조합적인 방법을 통한 대사 및 유전자 네트워크에 관련된 유전자의 발굴과 특성화에 초점을 맞추게 될 것으로 사료된다.

### 4. 대사공학 방법을 이용한 식품소재 생산의 장단점

앞서 간략히 기술한 바와 같이, 대사공학적으로 개량된 미생물 균주를 이용한 식품 첨가물의 생산방식은 기존의

자연계에 존재하는 미생물을 이용하거나 고전적 균주 개량 기술을 이용하여 수율 및 생산성을 향상 시키는 방법보다 다양한 장점을 지닌다. 첫째로, 대사공학적인 방법을 이용함으로써, 수율과 생산성을 극대화 시킬 수 있다. 자연계에 이미 존재하는 미생물을 사용하는 경우에는 대부분의 경우 목적 대사물질 외의 다른 대사물질들이 부산물로 생성되는 경우가 대부분이지만, 대사공학적인 방법을 사용하는 경우에는 유전자 조작을 통하여 부산물 생성 대사경로를 최소화할 수가 있으므로 목적 대사물질의 생산 수율의 향상이 용이하다. 둘째로, 대사공학의 주된 호스트인 대장균 및 효모의 경우에는 축적된 대용량 발효기법의 활용이 용이하므로 목적 대사물질의 생산성을 향상시키는 것이 용이하다. 셋째로, 대사공학적인 방법을 사용한 균주개량의 경우에는 목적 대사물질의 유도체를 만들기가 수월하다고 하겠다. 기존에 자연계에 존재하는 미생물이 생산하는 물질이 A라는 대사물질만을 생성한다고 가정할 때, A물질의 유도체인 A' (예를 들어 목적 대사물질의 알데하이드 그룹이 산화된 형태) 혹은 a (목적 대사물질의 알데하이드 그룹이 환원된 형태)가 식품의 기능성 및 관능을 향상시키는데 더 유효하다면 대사공학적인 방법을 이용하면 수월하다. 넷째로, 대사공학적인 방법을 이용하면 앞서 기술한 바와 같이 부산물의 생산을 최소화 할 수 있기 때문에 발효공정후에 목적 산물의 분리 정제가 용이하다. 이와 같이 대사공학을 이용한 균주 개량 방법은 많은 장점을 지니지만, 또한 다음과 같은 측면에서 성공적 적용이 쉽지 않다. 기존에 목적하는 대사물질을 생산하는 균주의 생산 대사경로가 상세하게 규명되지 않았다면 대상 유전자의 클로닝이 어렵기 때문에 대사공학적인 방법을 사용하기가 쉽지 않다. 예를 들면, 다양한 2차 대사물질(flavonoids 혹은 phenolic compounds)의 경우에는 아직도 그 대사경로가 정확하게 규명되지 않았기 때문에 매우 제한적인 성공 사례가 보고되고 있다. 또한 재조합 미생물을 사용하는 경우에는 GMO에 대한 규제 및 비우호적인 시장 및 소비자의 인식으로 인해서 철저한 분리정제가 필요하게 된다. 많은 경우에 있어서 식품에 많이 사용되는 미생물들이 특별한 정제 공정 없이 식품과 같이 섭취되는데, 재조합 미생물을 사용하는 경우에는 이런 측면에서 불리하다고 하겠다. 식품 및 사료 산업에 의미를 가지는 대사공학을 이용한 균주 개량 예들을 기술하면 다음과 같다.

## 5. 미생물 대사공학을 이용한 식품첨가물의 생산현황

### 5.1 에탄올

주정이라고도 불리는 에탄올은 술의 주성분일 뿐만 아니라 조미료, 전분가공식품 등의 식품 첨가물로 사용되며, 그 외에도 식품 보존용, 추출용, 살균용으로 사용되는 등 식품 산업에서 높은 비중을 차지하고 있다. 쌀, 보리, 옥수수, 고구마, 타피오카 등을 원료로, 전분의 효소 당화, 당액의 발효, 에탄올 증류 과정을 거쳐서 에탄올을 생산한다. 우리나라에서는 그 원료들을 대부분 수입에 의존하고 있어, 세계 곡물 가격의 인상은 주정 가격에 직접적인 영향을 미치고, 또한 소주 등 관련 식음료 가격 인상의 주요 원인이 되고 있다.

양조용 효모인 *S. cerevisiae*의 대사공학은 최근 30년간 바이오에탄올 관련 산업의 성장과 함께 새로운 국면을 맞이하고 있다. 저렴한 가격의 원료를 이용해 높은 수율과 생산성을 가진 에탄올 생산공정 개발을 위한 핵심 기술은, 곡물이 아닌 섬유소 바이오매스(cellulosic biomass)의 가수분해물을 효율적으로 발효할 수 있는 균주의 개량이다. 목재나 농업 부산물 등 식량자원으로 이용되지 않는 식물 또는 식물의 일부분을 섬유소 바이오매스로 분류할 수 있으며, 그 가수분해물은 포도당 이외에 자일로스와 같은 오탄당을 약 30% 가량 함유하고 있는 것이 특징이다. 이를 위한 미생물의 대사공학은 자연계에 존재하는 자일로스 대사 균주에 에탄올 생합성 경로를 도입하거나, *S. cerevisiae*에 자일로스 대사경로를 도입하는 양 방향으로 진행되어 왔다. 이 중 많은 대사공학 연구들이 *S. cerevisiae*에 도입된 자일로스 대사 경로와 기존의 대사 경로(오탄당 인산화로, 해당과정, 에탄올 생합성 경로, 산화환원 조절 경로등)를 조절해 에탄올 생산을 최적화하는데 집중되어 있다. 그 밖에 당 트랜스포터와 그 조절기작에 관한 몇몇의 흥미로운 연구가 최근 진행되고 있는데, 이는 *S. cerevisiae*가 발효액을 구성하고 있는 당의 성분에 따라 다르게 신호하여 트랜스포터들의 활성을 조절하기 때문에, 일련의 순서에 따라 혼합당의 구성성분들을 발효한다는 이론에 근거한다. 트랜스포터의 퀴럼 신호기작(quorum sensing signal transduction), 역학적 특징 및 조절기작 등을 규명하기 위한 분자수준에서의 연구를 통해, 섬유소 바이오매스로부터 가수분해

한 혼합당을 효율적으로 에탄올로 전환할 수 있을 것으로 기대 된다(5).

## 5.2. 글리세롤

처음 글리세롤을 미생물로부터 대량생산하기 시작한 것은 1차 세계대전 당시 다이너마이트 생산을 위한 글리세롤의 수요가 비누제조 공장에서 부산물로 생산된 글리세롤의 양을 초과했을 때였다. 그러나 전쟁 후에는, 발효로부터 생산된 글리세롤의 수율이 화학적 생산 수율보다 낮고, 발효액으로부터 분리하기 위한 증류과정이 효율적이지 못했기 때문에 주로 화학적으로 생산되어, 제약, 담배, 식품, 염료 산업 등에 이용되어 왔다. 그러나 최근에는 비누의 수요가 세제로 대체되고, 또 다른 화학적 방법을 통한 글리세롤의 생산이 환경적 우려와 원료 가격의 상승에 의해 제약을 받음으로서, 미생물 발효를 통해 글리세롤을 생산하는 것이 새롭게 조명되고 있다.

식품 산업에서 글리세롤(또는 글리세린)은 식품의 조직감을 향상시키기 위한 식품첨가제로 사용되고, 습윤제나 보존제등으로도 활용된다. 설탕의 60% 당도를 가지고 있어 대체 감미료로 활용될 수도 있다. 글리세롤은 또한 모노글리세라이드 또는 디글리세라이드 등을 합성하는 원료로서 유화제(emulsifier)등의 기능성 유지를 가공하는데 중요한 역할을 한다. 최근에는 바이오디젤 생산 과정에서 부산물로 생성된 글리세롤을 동물 사료로 응용하는 연구가 진행되고 있다.

효모는 당을 에탄올로 발효하면서 생성된 NADH의 일부를 글리세롤 생합성 경로를 통해 산화시킴으로서 세포 내 산화환원 균형을 유지한다. 또한 높은 삼투압으로부터 세포가 용혈 되는 것을 막기 위해 세포 내에 글리세롤을 축적한다. 이러한 대사 특성을 이용해 글리세롤 수율을 높이기 위해 기존에 시도된 방법으로는 첫째, *S. cerevisiae* 발효액에 bisulfite를 첨가하여, 아세트알데하이드를 통한 에탄올의 생합성 경로를 차단하는 대신 글리세롤을 합성하도록 하는 방법과 둘째, *S. cerevisiae*를 pH 7 또는 이상의 배양액에서 키우는 것, 마지막으로 삼투압에 내성을 지닌 다른 종류의 효모로 발효하는 것이다(6).

글리세롤의 수율과 생산성을 높이기 위한 최근 20년의 대사공학방법들은 *S. cerevisiae*에서 글리세롤을 생합성하는데 관련된 *GPD1/2*등의 유전자 발현을 증가시키고,

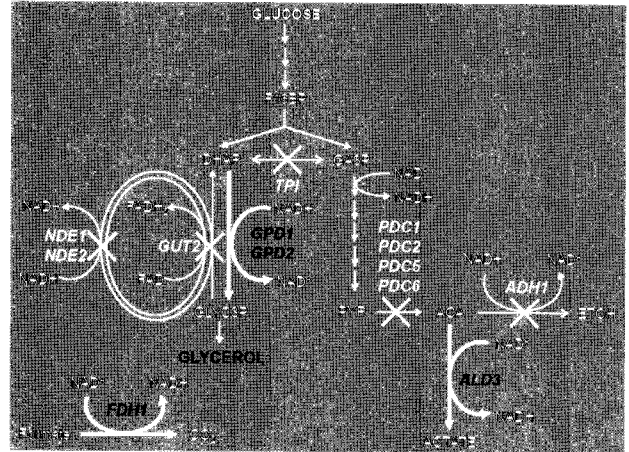


그림 2. 미생물의 글리세롤 생합성 경로 및 최적 생산을 위해 과발현(overexpression, 파란색) 또는 제거(knockout, 회색) 대상이 되는 유전자들

NADH의 산화와 관련된 *PDC/ADH1/NDE/GUT2* 등의 유전자들을 제거하거나 NAD의 환원과 관련된 *FDH1/ALD3*등의 유전자들을 과발현시켜 세포 내의 환원력을 증가시키는데 집중되었다(7, 8). 그 밖에 흥미로운 연구들이 *TPI* (the triose phosphate isomerase)와 관련하여 진행되었는데, 이 효소는 해당과정 중에 fructose-1,6-bisphosphate로부터 갈라진 두 대사산물의 이성화효소로서, dihydroxyacetone phosphite(DHAP)를 glyceraldehyde-3-phosphate(GA3P)로 전환해 주는 역할을 한다(그림 2 참조). DHAP는 글리세롤의 전구체로서, *TPI*가 제거된 균주는 이론 수율의 90%가량의 글리세롤을 sulfite 첨가 없이 생산할 수 있었다. 그러나 이 균주의 경우 세포 성장을 위한 에너지를 충분히 만들어내지 못하기 때문에 글리세롤의 생산성이 낮고, 유전적으로 불안정하다는 단점이 있었다(9, 10). 그러나 최근의 연구에서 그 균주의 성장 결핍은 축적된 DHAP가 myo-inositol의 생합성을 억제하여, 해당과정을 통한 에너지 생산 대신에 myo-inositol 생합성 경로가 활성화되기 때문으로 밝혀졌고(11), 배양액에 inositol을 첨가하는 간단한 방법으로 글리세롤의 수율과 생산성을 동시에 향상시킬 수 있었다(12).

## 5.3. 당알콜(자일리톨, 솔비톨, 만니톨, 에리트리톨)

건강기능성 식품 첨가물 중 당알콜은 일반적으로 단당의 환원된 형태로서 대표적인 예로서 자일리톨, 솔비톨,

에리트리트, 만니톨 등을 들 수 있다. 이들 당알콜은 설탕과 유사한 당도를 갖지만, 칼로리와 glycemic index, low-insulinemic index 등이 낮으며, 충치유발감소 효과를 갖는다. 또한 최근 발표에 따르면 당알콜은 소장에서 흡수되지 못하고 (또는 소량 흡수되고) 대부분 대장까지 운반되어 박테리아에 의해 발효됨으로써 인체 건강에 도움을 준다(13-15). 건강 증진 효과 외에도 당알콜은 비효소적 갈변반응(Maillard reaction)에 참여하지 않음으로 인해 식품의 색상안정제, 수분유지제 및 물성유지제로 사용될 수 있다. 자연계에서 당알콜은 과일이나 식품에 존재하며 곰팡이, 효모 및 박테리아등도 삼투압에 스트레스에 대한 방어 또는 탄소원의 확보 등의 목적을 위해 당알콜을 생산한다. 산업적인 당알콜의 생산은 당류에 니켈 촉매와 수소를 이용한 환원 반응을 이용해 생산되지만 높은 온도와 압력 그리고 고순도의 원료, 분리정제의 추가비용등의 문제점을 갖고 있다. 따라서 미생물을 이용한 발효 공학적 당알콜의 생산은 화학촉매반응을 대체할 수 있는 저에너지 공정이 될 수 있을 것이다.

### 5.3.1. 자일리톨

자일리톨은 자일로오스의 환원형 당알콜로서 야채나 과일에도 존재하며 설탕과 유사한 당도를 갖고 용해될 때 주변으로부터 열을 빼앗아 감으로써 입안에서 청량감을 주는 효과가 있다. 자일리톨은 충치유발을 저해하며(16) 인슐린 대사를 유발하지 않으므로 당뇨병 환자에게도 사용할 수 있는 효과적인 물질이다.

미생물 전환공정을 이용한 자일리톨의 생산은 효모 중 *Candida* 속의 야생균주와 *S. cerevisiae*의 재조합균주를 통해 이루어졌다. 유전자 조작을 하지 않은 야생균주 중에서 *C. guilliermondii*와 *C. tropicalis*가 자일리톨 생산에 주로 사용되었으며 제한적 산소 발효 조건과 유가식 배양(fed-batch fermentation) 또는 셀 재사용(cell recycling) 기술을 적용함으로써  $3.9 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (유가식 배양) 또는  $4.94 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (셀 재사용)의 단위시간당 생산성을 얻을 수 있었다(17)(18). 한편, *S. cerevisiae*는 자일로오스를 대사할 수 있는 자체 xylose reductase가 없으므로 *Pichia stipitis*로부터 *XYL1* 유전자를 도입하여 자일리톨을 생산할 수 있다. 이 접근 방법은 자일리톨/자일로오스의 수율 (g/g)이 거의 100%에 가깝다는 장점을 가지고 있으며 생산공정의 최적화와 유가식 배양 방법을 이용하

여 최종 자일리톨 생산농도가  $200 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  이상이 되었다 (19). 또한 *XYL1* 유전자를 유산균 *Lactobacillus lactis*에 도입하여 자일리톨을 만드는 연구도 수행되었으며 이때 생산성은  $2.72 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  이었다 (20).

그러나 자일로오스는 기질로 사용하기에 값이 비싸고 흔치 않은 원료이기 때문에 Onishi와 Suzuki는 1966년에 포도당으로부터 자일리톨을 만드는 연구를 수행하였다. 그들은 *Debamyoryces hanseni*, *Acetobacter suboxydans* 및 *C. guilliermondii*의 세 종류의 미생물을 이용하여 순차적으로 포도당을 아라비톨과 자일룰로오스(xylulose)로 바꾼 뒤 최종적으로 자일리톨을 생산하였다 (21). 그러나 여러 균주를 사용하는 문제가 있어서 최근에는 유전자 조작된 *Bacillus subtilis* 또는 *S. cerevisiae*를 이용해 포도당으로부터 자일리톨 생산에 관한 연구가 보고되어 있다(22, 23).

### 5.3.2. 솔비톨

솔비톨 (glucitol로도 불림)은 딸기, 체리, 자두 및 사과 등의 과일에서 발견할 수 있는 당알콜로서 포도당의 환원형물질이다. 이것은 설탕의 60%의 당도를 가지며 사탕, 잼, 아이스크림 등의 여러 식품의 감미제로서 사용될 뿐만 아니라 습도 및 조직감 유지를 위해 다양하게 사용되며 비타민 C 및 propylene glycol, alkyd resins 등 합성 전구체로서 사용된다. 산업적으로는 포도당용액을 촉매와 함께 환원시킴으로써 이루어지며 이후 이온교환 수지와 활성탄 정제를 거쳐 솔비톨 용액을 만든다.

미생물을 이용한 솔비톨의 생산은 자당 또는 포도당과 과당의 혼합물로부터 *Zymomonas mobilis*를 이용하여 생산할 수 있다. *Z. mobilis*가 과당으로부터 솔비톨을 생산하는 반응은 포도당이 glucono- $\delta$ -lactone으로 전환되는 탈수소화반응과 병합되어 있으며 NADP 의존적인 glucose-fructose oxidoreductase (GFOR; EC 1.1.1.99) 효소에 의해 촉매된다(24, 25).

알려진 바와 같이 *Z. mobilis*를 이용하여 포도당과 과당을 발효할 경우 주된 발효산물은 ethanol이며 소모된 당의 약 11%만이 솔비톨로 변환되며 또 다른 부산물인 글루콘산은 Entner-Doudoroff pathway를 통해 이산화탄소와 에탄올로 변환 된다. 솔비톨의 생산효율을 높이고 에탄올 생산량을 낮추기 위해 Chun과 Rogers는 10%(v/v) 툴루엔을 이용하여 세포에 구멍을 내었고 이것으로 처리

된 세포는 글루콘산을 에탄올로 변환하는데 필요한 조효소를 잃게 됨으로써 에탄올생산량을 낮출 수 있었으며, 최종 술비톨 농도는  $290 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ , 글루콘산 농도는  $283 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  이었다(26). 다른 접근법으로 계면활성제인 cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)를 이용한 경우에도 전환수율 98-99%, 술비톨 생산성  $1.8 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , 글루콘산 생산성  $2.1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 을 얻을 수 있었다. 한편, 술비톨의 시장가격이 비교적 저렴하고 과당의 가격이 기질로서 비싼 것을 감안하여 자당으로부터 술비톨을 invertase와 툴루엔 처리된 세포를 함께 고정화하여 생산한 보고에 따르면, 이때 자당의 최적 농도는  $200 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ 이었으며 recycle packed-bed reactor를 이용한 최대 생산성은  $5.1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  전환수율은 92%이었다(27).

### 5.3.3. 에리트리톨

에리트리톨은 설탕의 60-70%의 감미를 갖으며 칼로리가 매우 낮고 혈중 당농도를 높이지 않으며 치아우식을 유발하지 않는 대체 감미료이다. 용해열을 가짐으로써 청량감을 주며 소장 내에서 흡수되기 때문에 다른 당알콜(자일리톨 또는 만니톨)과 달리 대장내 부작용을 일으키지 않는다. 에리트리톨의 생산경로는 박테리아의 경우, fructose-6-phosphate로부터 phosphoketolase 효소에 의해 erythrose-4-phosphate가 생성되고 생성된 erythrose-4-phosphate는 erythrose-4-phosphate dehydrogenase에 의해 erythritol-4-phosphate가 된 뒤 phosphatase에 의해 탈인산화 됨으로써 에리트리톨이 생성된다. 한편 Yeast의 경우 glucose-6-phosphate가 pentose phosphate pathway로 들어간 뒤 erythrose-4-phosphate로부터 erythrose-4-phosphate kinase에 의해 erythrose가 생성되고 이것은 최종적으로 erythrose reductase에 의해 에리트리톨로 전환된다. 에리트리톨을 생산하는 균주로는 *C. magnoliae*, *T. coralina*, *Ustilaginomycetes* 등이 알려져 있으며 이들의 변이주로서 에리트리톨을 생산할 경우 포도당으로부터 40%이상의 수율로 에리트리톨을 생산할 수 있다. 이중 *Candida magnoliae*의 mutant 균주를 이용하여 50L scale-up 실험을 진행한 결과 최대 생산량은  $200 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ , 생산성  $1.2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , 수율  $0.43 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ 의 값을 보였다(28).

### 5.3.4. 만니톨

만니톨을 만노오즈(mannose)의 환원형 물질로서 자연

계에서 가장 흔하게 발견되는 당알콜중 하나이며 특별히 *Argaricus bisporus* 버섯의 주요 저장 탄소원이다. 만니톨은 glycemic index와 insulinemic index가 0으로 혈중 당농도를 상승시키지 않으며, 사람 몸에서 대사되지 않고 25%는 직접 뇨로 배출되고 75%는 장내 미생물에 의해 대사된다. 산업적인 만니톨의 생산은 해조류로부터 alginate와 iodine을 생산할 때 부산물로 생산되는 경우가 전체의 70%에 해당되고, 나머지 부분은 50% 포도당과 50% 자당시럽을 Raney nickel 촉매법으로 수소첨가하여 얻어진다. 이 반응에서 포도당은 술비톨로 전환되고 과당은 만니톨과 술비톨의 혼합물로 전환된다. 반응 후 chromatography 방법으로 nickel 촉매를 제거한 뒤 저온 결정화 법으로서 만니톨을 분리해 낸다. 이 방법은 높은 순도의 기질 확보, 고온 고압의 반응조건, 고비용 분리정제, 낮은 만니톨 수율 등의 문제를 갖는다. 따라서 생물공정을 이용할 경우 포도당 또는 글리세롤로부터 50-52%의 수율을 얻을 수 있기 때문에 만니톨 생산공정이 각광을 받고 있으며, 효모와 곰팡이를 이용하여 수율 50-52%의 결과를 얻을 수 있었다(29, 30). 또한 일부 유산균 (*Leuconostoc* 및 *Lactobacilli* 속 group III, obligatory heterofermentative)의 경우 과당을 환원함으로써 만니톨을 생산할 수 있다.

### 5.4. Coenzyme Q<sub>10</sub>

Coenzyme Q<sub>10</sub>은 생물이 산화적 인산화를 통해 ATP를 생산할 때 전자를 전달하는 물질로서 quinone ring과 긴 isoprenoid chain을 가진 친유성 물질이다. Quinone ring은 두 개의 전자를 이동시키는 역할을, 긴 isoprenoid chain은 이 물질이 mitochondrial 또는 세포막에 자리할 수 있게 하는 역할을 한다. 사람의 경우 mevalonate pathway를 통해 coenzyme Q<sub>10</sub>을 합성할 수 있으나 유전적 원인, 노화 또는 소위 Statin 계열의 약물 사용 등의 이유로 생체 내 생합성량이 감소할 수 있다. 생물공학적인 coenzyme Q<sub>10</sub> 생산을 위해 *Agrobacterium*, *Rhodobacter* 속의 야생균주 또는 그것들의 변이주 등이 이용되어왔다. 또한 최근에는 외부로부터 coenzyme Q<sub>10</sub> 생산을 위한 핵심 유전자 (decaprenyl diphosphate synthase 및 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase)를 발현함으로써 재조합 대장균으로부터 coenzyme Q<sub>10</sub>의 생산이 가능하게

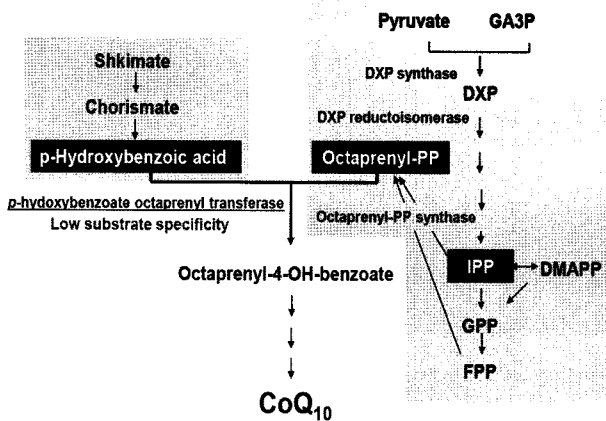


그림 3. 미생물의 Coenzyme Q<sub>10</sub> 생합성 경로

다. 이들 미생물들을 이용한 coenzyme Q<sub>10</sub>의 생합성 경로를 그림 3에 나타내었다.

*A. tumefaciens*의 변이균주를 사용하고 fed-batch fermentation 기술을 조합한 경우 최종농도 626.5 mg · l<sup>-1</sup>, 9.25 mg · gcell<sup>-1</sup>의 단위 균체당 수율로 생산할 수 있었다(31). 발효 공정 최적화에 있어서, oxidation-reduction potential을 조절하여 준 경우 *R. sphaeroides* 균주를 이용하여 단위 균체당 8.7 mg · g<sup>-1</sup>의 coenzyme Q<sub>10</sub>을 생산할 수 있었다(32). 또한 세포 내 산소공급의 조절을 통해 단위 세포당 coenzyme Q<sub>10</sub>의 함량을 변화시킬 수 있다(33). 한편 재조합 대장균을 이용할 경우 야생의 대장균이 생산하는 coenzyme Q<sub>8</sub> 대사경로를 제거한 뒤 외래 decaprenyl diphosphate synthase의 발현, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase의 동시발현을 통해 최대 99.4 mg · l<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup> 생산성을 얻을 수 있었다. Coenzyme Q<sub>10</sub> 생산에 관한 연구는 새로운 변이 균주의 개발 뿐만 아니라 대사공학적인 핵심 유전자의 발굴과 과발현 효과들을 연구함으로써 다만 coenzyme Q<sub>10</sub>의 생합성량을 증가시킬 뿐만 아니라, coenzyme Q<sub>10</sub>이 생체 내에서 갖는 역할 또한 규명할 수 있을 것이다.

### 5.5. 카로티노이드

카로티노이드는 식물체에서 유래하며 식품산업에서는 색소 및 비타민 전구체로서 사용되고 있다. 당근유래의 베타카로틴, 토마토 유래의 라이코펜이 대표적인 경우라고

하겠다. 재조합 균주를 이용한 카로티노이드의 생산은 대장균, 효모등에서 시도되었는데, 크게 다음의 두가지 연구방향으로 진행되었다. 첫째는 미생물내에 축적되는 카로티노이드의 함량을 높이기 위한 전략이고 둘째는 대사공학 연구전략의 장점을 활용하여 기존에 자연계에 극소량으로 존재하는 다양한 카로티노이드를 생산하는 시도다. 미생물 세포막에 축적되는 카로티노이드의 함량을 증대시키기 위해서는 카로티노이드 생합성에 전구물질로 쓰이는 대사산물의 생산을 증대시키는 유전자들의 overexpression 및 knockout이 시도되었다. 한 예로 재조합 대장균을 이용하여 라이코펜의 생합성을 촉진시키기 위하여 *in silico* model을 이용한 유전자의 발굴 연구사례에 대하여 설명하고자 한다.

라이코펜의 생합성을 증진시키는 다수의 유전자를 발굴하기 위하여 sequential-iterative search 방법을 이용하여 multiple knockout targets을 발굴한 사례인데(34), 먼저 간략하게 sequential-iterative search 방법에 관해 소개하면, 최초의 유전자 교란조건 중에서 목적하는 대사형질에 큰 영향을 미치는 유전자 교란조건을 선택하여 채택하고 다시 채택된 유전자 교란조건을 parental genotype으로 하여 다시 목적 대사형질에 영향을 미치는 교란조건을 찾아가는 것이다. 예를 들면, 재조합 대장균을 이용한 라이코펜의 생산 연구에서 보이는 것과 같이 라이코펜의 생합성이 가장 큰 영향을 미치는 유전자인 *gdhA*를 최초의 knockout target으로 선별하고, 다시 *gdhA*가 결손된 유전체 환경에서 라이코펜의 생합성에 가장 큰 영향을 미치는 *aceE*를 선별하고, 그 다음에는 *gdhA*와 *aceE*가 결손된 유전체 환경에서는 *fdhF*와 *talB* 유전자가 라이코펜의

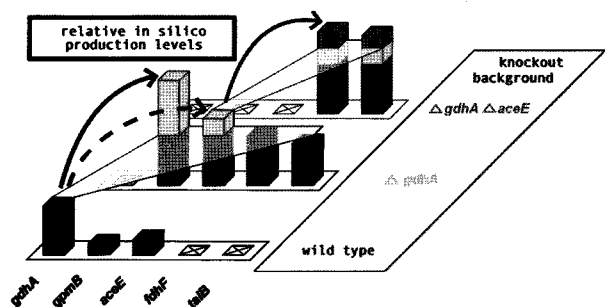


그림 4. Sequential-iterative search 방법에 의한 재조합 대장균에서 lycopene의 생합성을 증진시키는 knockout 유전자의 발굴의 도식도 (34)



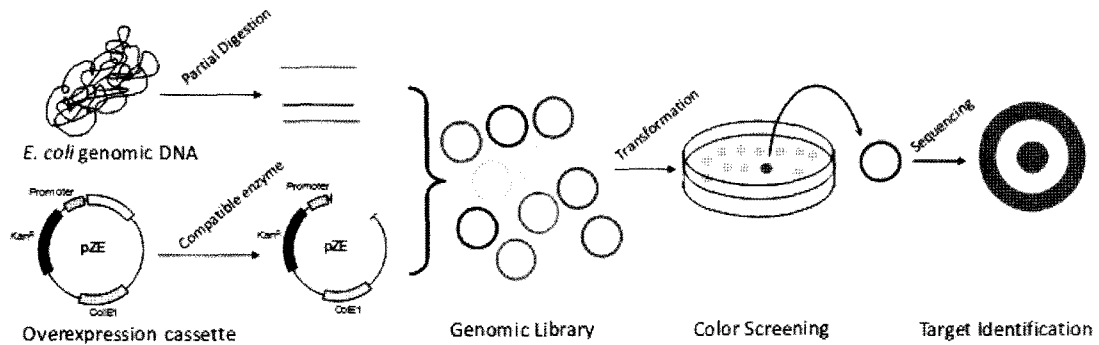


그림 5. 대장균 라이브러리 선별을 통한 과발현 유전자 표적 발굴

생합성을 향상시키는 knockout targets으로 선별하게 된다(그림 4). 물론 이와 같이 gradient 차이에 근거한 최적점 발굴 전략은 진정한 최적점에 도달하지 못할 수 있다는 단점은 있지만, 현재의 experimental 및 computational 실험이 가지는 한계 내에서 실용적으로 목적 대사형질을 유도하는 knockout 유전자의 발굴에 쓰일 수 있다. 이러한 실험 결과는 궁극적으로 목적하는 대사산물을 생산하는 형질 (metabolic phenotype) 과, 유전자형(genotype)의 상관관계를 밝혀낼 수 있기 때문에 균주 최적화에 매우 유용하다고 하겠다.

재조합 대장균체내에 라이코펜의 생합성을 증대시키는

knockout targets 뿐만 아니라 overexpression target을 선별하기 위한 실험이 대장균 유전자 library를 이용하여 시도되었다. 이와같이 선별된 overexpression targets은 *in silico* modeling을 통하여 선별된 knockout targets과 상승적으로 상호작용하여 라이코펜의 생산을 촉진하기도 한다. 그림 5에서 보여지는 바와 같이 대장균 library를 이용하여 발굴된 과발현 유전자들이 *in-silico* modeling을 통해서 발굴된 knockout target 유전자들과 상호 작용을 통하여 다양한 라이코펜 생합성능을 지니는 재조합 균주들을 제작함으로써, 최적 생산능을 지닌 재조합 균주를 선별할 수 있다(그림 6)(35).

### 5.6. 아미노산

아미노산은 이제까지 식품첨가제로 주로 사용되어왔으며 의약품이나 동물사료, 화장품의 첨가제로 사용되어 왔으나 최근 그 사용이 biofuel이나 항생제의 중간 대사물질로 그 사용이 확대되면서 수요가 증가되고 있는 상황이다. 전통적으로 다양한 미생물을 이용하여 여러 종류의 아미노산을 생산하기위한 연구가 수행되었으며 또한 실제 생산에 적용된 사례도 적지 않다. 하지만 대부분의 경우 균주 개량은 random mutation을 이용하므로 목적으로 하는 아미노산의 생산량 증가 뿐 아니라 예상치 못한 유전자의 변화를 초래할 수도 있으며 이로 인해 다양한 균주의 형질 변화를 일으키기도 한다. 이러한 비의도적인 유전자의 변화를 줄이기 위해 system and synthetic biology에 근거한 대사공학이 그 대안으로 대두되고 있다.

Ohnishi *et al.*의 연구 보도에 따르면 L-lysine 생산 균주인 *C. glutamicum*을 각각 모균주와 random mutation

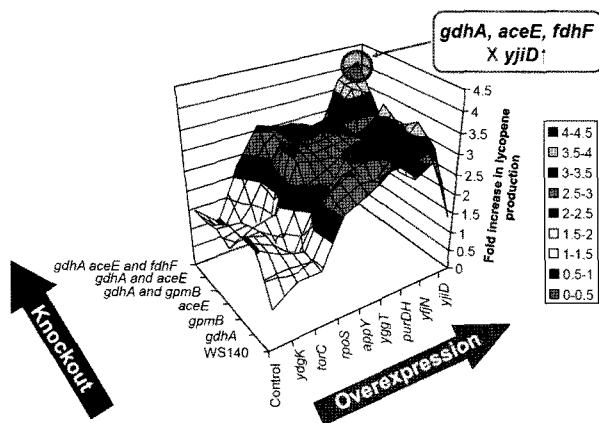


그림 6. 라이코펜의 생합성을 촉진시키는 overexpression targets과 knockout targets간의 상호작용. *In silico* modeling을 통해서 발굴된 knockout 유전자 표적들과 genomic library screening을 통해서 발굴된 과발현 표적 유전자들 간의 상호 작용을 조사하여 최종적으로 *gdhA, aceE, fdhF* 유전자의 knockout과 *yjiD* 유전자의 과발현 조합이 재조합 대장균에서 라이코펜의 생합성을 최대화 하는것을 확인할 수 있었다(35).

에 의해 선별된 돌연변이 균주의 전체 유전자를 비교한 후 lysine 생산에 영향을 미칠 것으로 예상되는 특정 유전자들의 돌연변이를 확인하고 이 돌연변이들을 모균주에 다시 도입한 결과 같은 생산 증가 효과를 확인하였다. 또한 돌연변이 *gnd* (6-phosphogluconate dehydrogenase) 또는 돌연변이 *mgo* (malate:quinone oxidoreductase)를 도입시켜 L-lysine의 생산량을 증대시켰다(36-38).

최근 국내 이상엽 박사팀의 일련의 연구 보도에 따르면 효과적인 L-valine 생산 대장균을 개발하기 위해 transcriptome 분석과 genome-scale metabolic network 분석을 이용한 방법을 적용하였다(39). 먼저 L-valine 생산을 억제하는 feedback inhibition 요인(그림 7)을 제거하고 L-valine 생산의 경쟁적인 대사경로를 억제하였다. 그 후 transcriptome profiling combined with in silico gene knockout simulation을 이용한 대사공학을 통해 *ilvCED*, *lrp*, *ygaZH* (L-valine biosynthetic enzymes, a global regulator leucine responsive protein, and an L-valine exporter)를 과발현 하였으며 또한 새로 확인된 L-valine exporter (*ygaZH*)의 도입과 knockout (*DaceF*, *Dmdh*, *DpfkA*) 돌연변이를 통해 L-valine의 생산량을 5 배 이상 증가시켰다. 또한 비슷한 방법을 이용하여 고농도 L-threonine 생산 대장균을 개량하였다(40).

### 5.7. 비타민

사람과 동물에게 필수 영양분으로 알려져 있는 riboflavin (비타민 B2)은 주로 식품뿐만 아니라 의약품분야나 사료,

화장품 등에 첨가제로 주로 사용되어 오고 있다. 최근 Shuobo *et al.*의 발표에 따르면 comparative transcriptome profiling 방법을 통해 riboflavin 생산 균주인 *B. subtilis*를 모균주와 함께 비교하여 발현 정도가 증대된 유전자를 확인하였으며 이들 중 riboflavin 전구물질의 합성을 조절하는 유전자를 과발현하여 riboflavin의 생산량을 증대시켰다(41). 또한 riboflavin의 전구물질인 purine nucleotides를 증대시키기 위해 purine pathway를 강화시켜 riboflavin의 생산량을 증가시켰다(42).

Jeffrey *et al.*은 *R. palustris*로부터 cyclohexane carboxylate (CHC)의 분해 대사경로를 대장균에 도입시킴으로써 biotin의 생산을 증대시켰다. 이때 생산되는 분해산물은 대장균에서 biotin을 생산하는데 있어서 가장 중요한 대사물질로 작용하였다(43). 비타민 B5 (D-pantothenate)는 Coenzyme A의 전구물질로써 식물이나 미생물에서는 합성이 가능하지만 사람과 같은 동물에서는 불가능하므로 의약품이나 사료 또는 식품 등에 주로 첨가제로 사용된다. 기존에는 화학적 합성방법을 사용하였으나 최근에는 대사공학을 바탕으로한 미생물을 (대장균, *C. glutamicum*) 이용한 방법이 제시되고 있다. 또한 *C. glutamicum*에서 비타민 B5를 대량 생산하기 위해 metabolic network analysis를 통한 다양한 방법들이 제시되기도 하였다(44).

### III. 결론

앞서 기술한 바와 같이 재조합 미생물을 이용한 식품소재의 혹은 첨가물의 생산은 자원의 효율적 이용과 경제적인 측면에서 많은 장점을 지닌다고 하겠다. 또한 이미 많은 식품첨가물이 대사공학적으로 제조된 미생물에 효율적/경제적으로 생산이 가능할뿐더러, 식품의 관능, 영양, 및 기능성을 획기적으로 향상시키는 신물질의 발굴 및 생산에도 사용될 것으로 기대된다. 현재로서는 재조합 미생물 나아가 유전자 재조합 식품의 안전성에 대한 원칙이 확립되는 못했지만, 유전자 재조합 미생물을 사용하여 제조된 식품 첨가물의 경우에는, 식품공전의 기준과 규격을 충족하도록 목적하는 물질을 분리/정제한 경우에는 식품첨가물로 사용이 가능할 것으로 사료된다. 따라서 지속적으로 새로운 기능성을 가지는 천연물질이 발굴되어 기능성 식품 혹은 건강기능식품이 개발되고 있는 상황에서, 미생

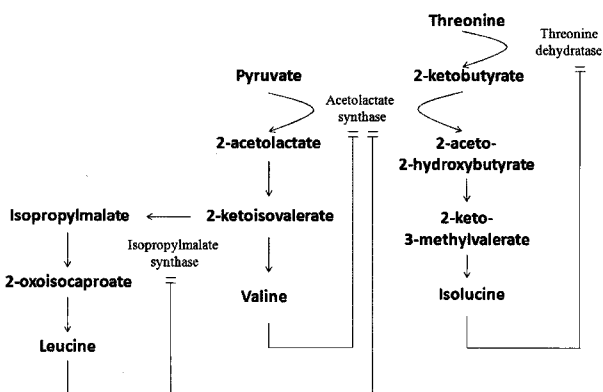


그림 7. 대사공학적 균주개량에서 주요 표적이 되는 valine, leucine, isoleucine의 생합성 경로 및 feedback inhibition

물 대사공학을 이용한 식품소재의 생산은 효율성과 안정성 두 가지 측면에서 보다 심도 깊은 연구가 필요하다고 하겠다.

### 참고문헌

- (1) [http://en.wikipedia.org/wiki/Nicolas\\_Apert](http://en.wikipedia.org/wiki/Nicolas_Apert)
- (2) Nakamura CE, Whited GM. Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Current Opinion in Biotechnology* 14: 454-459 (2003)
- (3) Lee SY, Lee DY, Kim TY. Systems biotechnology for strain improvement. *Trends Biotechnol.* 23:349-358 (2005)
- (4) Stephanopoulos G, Alper H, Moxley J. Exploiting biological complexity for strain improvement through systems biology. *Nat. Biotechnol.* 22: 1261-1267 (2004)
- (5) Stephanopoulos G. Challenges in Engineering Microbes for Bio-fuels Production. *Science* 315: 801-804 (2007)
- (6) Wang ZX, Zhuge J, Fang HY, Prior BA. Glycerol production by microbial fermentation: A review. *Biotechnology Advances* 19(3): 201-223 (2001)
- (7) Geertman JMA, van Maris AJA, van Dijken JP, Pronk JT. Physiological and genetic engineering of cytosolic redox metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved glycerol production. *Metabolic Engineering* 8(6): 532-542 (2006)
- (8) Nevoigt E, Stahl U. Reduced pyruvate decarboxylase and increased glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)] levels enhance glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 12(13): 1331-1337 (1996)
- (9) Compagno C, Boschi F, Ranzi BM. Glycerol production in a triose phosphate isomerase deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Progress* 12(5): 591-595 (1996)
- (10) Overkamp KM, Bakker BM, Kotter P, Luttik MAH, van Dijken JP, Pronk JT. Metabolic engineering of glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 68(6): 2814-2821 (2002)
- (11) Shi YH, Vaden DL, Ju SL, Greenberg ML. Genetic perturbation of glycolysis results in inhibition of de novo inositol biosynthesis. *Faseb Journal* 19(4): A826-A826 (2005)
- (12) Cordier H, Mendes F, Vasconcelos I, Francois JM. A metabolic and genomic study of engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains for high glycerol production. *Metabolic Engineering* 9(4): 364-378 (2007)
- (13) Arrigoni E, Brouns F, Amadò R. Human gut microbiota does not ferment erythritol. *Br. J. Nutr.* 94:643-646 (2005)
- (14) Finney M, Smullen J, Foster HA, Brokx S, Storey DM. Effects of low doses of lactitol on faecal microflora, pH, short chain fatty acids and gastrointestinal symptomology. *Eur. J. Nutr.* 46:307-314 (2007)
- (15) Sarmiento-Rubiano LA, Zúñiga M, Pérez-Martínez G, Yebra MJ. Dietary supplementation with sorbitol results in selective enrichment of lactobacilli in rat intestine. *Res Microbiol* 158:694-701 (2007)
- (16) Burt BA. The use of sorbitol- and xylitol-sweetened chewing gum in caries control. *J. Am. Dent. Assoc.* 137(2):190-6 (2006)
- (17) Kim JH, Han KC, Koh YH, Ryu YW, Seo JH. Optimization of fed-batch fermentation for xylitol production by *Candida tropicalis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29(1):16-9 (2002)
- (18) Choi JH, Moon KH, Ryu YW, Seo JH. Production of xylitol in cell recycle fermentations of *Candida tropicalis*. *Biotechnol. Lett.* 22:1625-1628 (2000)
- (19) Oh YJ, Lee TH, Lee SH, Oh EJ, Ryu YW, Kim MD, Seo JH. Dual modulation of glucose 6-phosphate metabolism to increase NADPH-dependent xylitol production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. 47:37-42 (2007)
- (20) Nyyssola A, Pihlajaniemi A, Palva A, von Weymarn N, Leisola M. Production of xylitol from D-xylose by recombinant *Lactococcus lactis*. *J. Biotechnol.* 118:55-66 (2005)
- (21) Onishi H, Suzuki T. The production of xylitol, l-arabinitol and ribitol by yeasts. *Agric. Biol. Chem.* 30:1139-1144 (1966)
- (22) Povelainen M and Miasnikov AN. Production of xylitol by metabolically engineered strains of *Bacillus subtilis*. *J. Biotechnol.* 1:214-219 (2006)
- (23) Toivari MH, Ruohonen L, Miasnikov AN, Richard P, L, Penttilä M. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for conversion of d-glucose to xylitol and other five-carbon sugars and sugar alcohols. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(17): 5471-5476 (2007)
- (24) Leigh D, Scopes RK, Rogers PL. A proposed pathway for sorbitol production by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20:413-415 (1984)
- (25) Zachariou M, Scopes RK. Glucose-fructose oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production. *J. Bacteriol.* 167:863-869 (1986)
- (26) Chun UH, Rogers PL. The simultaneous production of sorbitol and gluconic acid by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29:19-24 (1988)
- (27) Ro H, Kim H. Continuous production of gluconic acid and sorbitol from sucrose using invertase and an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*. *Enzyme. Microb. Technol.* 13:920-924 (1991)
- (28) Koh ES, Lee TH, Lee DY, Kim HJ, Ryu YW, Seo JH. Scale-up of erythritol production by an osmophilic mutant of *Candida magnoliae*. *Biotechnol. Lett.* 25(24):2103-2105
- (29) Jennings DH. Polyol metabolism in fungi. *Adv. Microbiol. Physiol.* 25:149-193 (1984)
- (30) Soetaert W, Vanhooren P, Vandamme EJ. The production of mannitol by fermentation. In: Bucke C (ed) *Carbohydrate biotechnology protocols*. Humana, Totowa, pp 261-275 (1999)

- (31) Ha SJ, Kim SY, Seo JH, Moon HJ, Lee KM, Lee JK. Controlling the 과당 concentration increases coenzyme Q<sub>10</sub> production in fed-batch culture of *Agrobacterium tumefaciens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76:109-116 (2007)
- (32) Yoshida H, Kotani Y, Ochiai K, Araki K. Production of ubiquinone-10 using bacteria. *J Gen Appl Microbiol* 44:19-26 (1998)
- (33) Choi JH, Ryu YW, Park YC, Seo JH. Synergistic effects of chromosomal *ispB* deletion and *dxs* overexpression on coenzyme Q<sub>10</sub> production in recombinant *Escherichia coli* expressing *Agrobacterium tumefaciens* *dps* gene. *J Biotechnol* 144(1):64-69 (2009)
- (34) Alper H, Jin YS, Moxley JF, Stephanopoulos G. Identifying gene targets for the metabolic engineering of lycopene biosynthesis in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* 7: 155-64. (2005)
- (35) Jin YS, Stephanopoulos G. Multi-dimensional gene target search for improving lycopene biosynthesis in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* 9:337-347 (2007)
- (36) Ohnishi J, Mitsuhashi S, Hayashi M, Ando S, Yokoi H, Ochiai K, Ikeda M. A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant. *Appl Microbiol Biotechnol* 58:217-223 (2002)
- (37) Ohnishi J, Katahira R, Mitsuhashi S, Kakita S, Ikeda M. A novel *gnd* mutation leading to increased L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett* 242:265-274 (2005)
- (38) Ikeda M, Ohnishi J, Hayashi M, Mitsuhashi S. A genome-based approach to create a minimally mutated *Corynebacterium glutamicum* strain for efficient L-lysine production. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33:610-615 (2006)
- (39) Park JH, Lee KH, Kim TY, Lee SY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of L-valine based on transcriptome analysis and in silico gene knockout simulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:7797-7802 (2007)
- (40) Lee KH, Park JH, Kim TY, Kim HU, Lee SY. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production. *Mol Syst Biol* 3:149 (2007)
- (41) Shi S, Chen T, Zhang Z, Chen X, Zhao X. Transcriptome analysis guided metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for riboflavin production *Metabolic Engineering*, 11:243-252 (2009)
- (42) Shi S, Shen Z, Chen X, Chen T, Zhao X. Increased production of riboflavin by metabolic engineering of the purine pathway in *Bacillus subtilis* *Biochem. Eng. J.* 46:28-33 (2009)
- (43) Bernstein J.R, Bulter T, Liao JC. Transfer of the high-GC cyclohexane carboxylate degradation pathway from *Rhodospseudomonas palustris* to *Escherichia coli* for production of biotin *Metabolic Engineering.* 10:131-140 (2008)
- (44) Chassagnole C, Diano A, Letisse F, Lindley ND. Metabolic network analysis during fed-batch cultivation of *Corynebacterium glutamicum* for pantothenic acid production: First quantitative data and analysis of by-product formation *Journal of Biotechnology*, 104:261-272 (2003)