

# 코리네형 세균에서 유전체 기반의 아미노산 생산균주 개발 동향

글 \_ 김성준 \_ CJ(주) 바이오 연구소

## 1. 서 론

아미노산은 생체내 단백질을 구성하는 대사물질로서 다양한 용도로 사용된다. 글루탐산 나트륨(MSG)과 알라닌은 식품의 풍미제로 사용되며, 밀과 같은 곡류에서는 상대적으로 함량이 부족한 메치오닌, 라이신, 스레오닌, 그리고 트립토판 같은 필수 아미노산은 사료의 영양학적 가치를 증진시키기 위해 가축의 사료 첨가물로 사용되고 있다. 또한 페닐알라닌과 아스파르트산은 인공 감미료의 생산에 사용되며, 다른 여러 아미노산은 영양적인 측면에서 아미노산 건강 음료 또는 수액제, 그리고 일부 아미노산은 대사질환의 치료제 및 화장품 등에 사용된다. 아미노산은 단백질의 가수분해, 화학적 합성, 또는 미생물을 이용한 발효에 의해 생산되고 있으나, 최근 미생물 육종기술 및 관련 생물공학 분야의 발전으로 인해 직접 발효법에 의한 생산이 주를 이루고 있다. 아미노산 발효에 주로 이용되는 미생물은 대장균과 코리네형 세균이다. 대장균의 경우 축적된 유전학적 정보와 비교적 잘 개발된 숙주-벡터 시스템을 활용한 재조합 DNA 기술을 바탕으로 코리네형 세균에 비해 생산균주의 개발 및 개량이 용이하다는 장점이 있다. 실제로 페닐알라닌, 스레오닌, 트립토판 등은 대장균을 이

용하여 대량 생산이 이루어지고 있다.

그러나 산업적으로 아미노산 생산에 가장 많이 이용되는 미생물은 코리네형 세균의 일종인 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속이다. 1950년대 중반에 글루탐산을 효율적으로 생산하는 *C. glutamicum*이 발견되어 산업화가 이루어 지면서부터 이 미생물은 아미노산 생산균주로서 각광을 받게 되었다. 그 후 *C. glutamicum*의 영양 요구성 변이주를 이용하여 발효법에 의한 라이신 대량 생산이 시작되었다. 현재 이 세균에 의해 산업적으로 생산되는 주요 아미노산으로 글루탐산 및 라이신

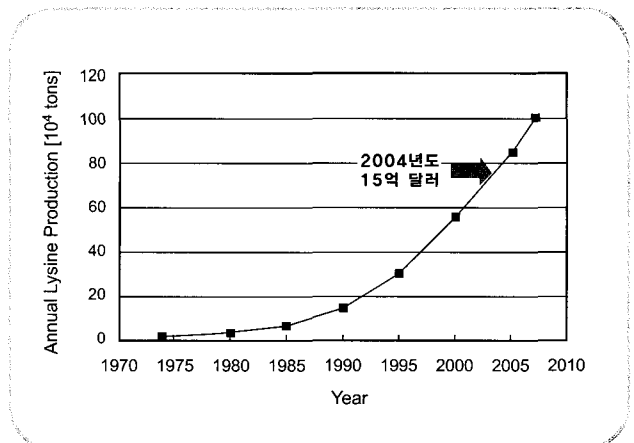
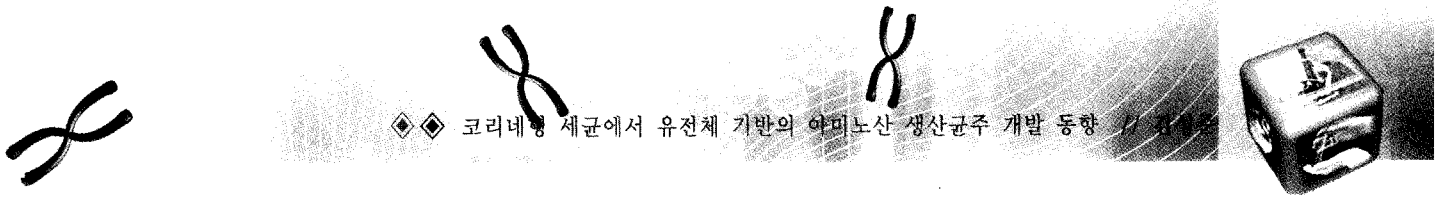


그림 1. 사료 첨가용 L-라이신의 연도별 생산량



을 비롯하여 페닐알라닌, 글루타민, 알지닌, 트립토판, 루이신, 이소루이신, 그리고 히스티딘 등이 있다. 2004년도에 *Corynebacterium*에 의해 생산되는 풍미제인 MSG와 사료 첨가제인 라이신 염산염의 세계 생산량은 각각 약 1,500,000 톤과 750,000 톤(그림 1)으로 추정되고 있다. 아미노산을 생산하는 균주육종은 1980년대 이전까지 반복적인 무작위 변이유도와 선별에 의해 주도되었다. 전통적인 변이유도 방법으로 유용한 유전적 형질을 단계적으로 부여함으로써, 영양요구주, 대사물 유사체 내성주, 막수송 변이주 등 다수의 산업용 아미노산 생산균주를 확보할 수 있었으며, 이러한 변이주들이 산업적 아미노산 생산에 사용되어 왔다. 그러나 반복적인 변이유도는 원하지 않은 부위에서 무작위적 변이를 발생시켜 영양요구성을 증가시키거나 발효속도를 지연시키는 결과를 초래하였다. 이러한 문제점을 해결하고자 원형질체 융합기술이 도입됨으로써 균체내에서 유전자의 재조합이 가능하게 되었고(Karasawa *et al*, 1986), 이에 따라 생산균주에 유전적 특이형질을 보다 전략적으로 부여할 수 있었다. 1980년대는 코리네형 세균을 위한 숙주-벡터 시스템이 개발됨으로써(Santamaria *et al*, 1984) 보다 합리적으로 균주개발을 전개할 수 있었다. 1990년대는 다양한 대사공학 기술이 개발되어(Schwarzer and Puhler, 1991) 코리네박테리움에 대한 분자 생물학 및 생리학이 집중적으로 조명 받았다. 또한 대사흐름분석 및 대사조절분석과 같은 신기술이 목표 유전자를 선정하는데 적용되었으며(Marx *et al*, 1999), 이러한 복합적인 연구로부터 획득한 다양한 정보가 보다 우수한 생산균주 개발에 접목되었다(Peters-Wendisch, 2001).

그러나, 코리네박테리움에 대한 지식이 증가되었음에도 불구하고 획기적인 아미노산 생산균주는 예상외로 부상하지 않았다. 따라서, 1990년대 중반 이후 이 미생물에 대한 총체적 유전자 발현을 이해하고자 *C. glutamicum* 전체 유전체의 염기서열분석 및 해석에 대한 연구가 본격적으로 시작되었다(Tauch *et al*, 2002;

Nakagawa, 2002). 최근에는 이러한 코리네박테리움의 유전체 정보를 이용하여 아미노산 생산균주 개발을 위한 새로운 시도가 이루어지고 있다.

## 2. 본 론

### 2.1. 유전체 염기서열 분석 및 유전자 기능 예측

코리네형 세균은 포자를 형성하지 않는 pleomorphic 그람 양성균으로 자연계에 널리 분포되어 있다. 이중 일부는 식물과 동물의 질병을 일으키지만 아미노산 생산에 사용하고 있는 균주는 비병원성 세균인 코리네박테리움 속의 *C. glutamicum*이다. 1996년 독일 Bielefeld 대학의 Puhler 등은 펄스-필드 전기영동법을 이용하여 야생주인 *C. glutamicum* ATCC13032의 염색체 지도를 제작하였고(Bathe *et al*, 1996), 염색체의 제한효소 조각을 취합하여 전체 유전체 크기를 3,082 kb로 추정하였다. 1998년 독일의 Degussa는 LION Bioscience와 협력하여 코스미드 라이브러리를 사용한 *C. glutamicum* ATCC13032의 유전체 염기서열 분석에 착수하였으며, 이 미생물의 유전체 크기가 3.28 Mb임을 밝혔다. 같은 시기에 일본의 Kyowa Hakko도 *C.*

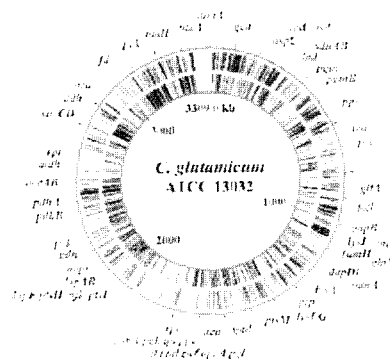
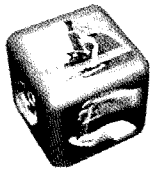


그림 2. *Corynebacterium glutamicum*의 유전체 지도 (Ikeda and Nakagawa, 2003). 포도당으로부터 L-라이신 생합성 대사경로에 관련된 기능이 예측된 모든 유전자의 위치를 유전체 지도 위에 표기하였다.



## ◆ 총 설



*glutamicum* ATCC13032 의 유전체 염기서열 분석에 착수하여, 전체 유전체 크기가 3.31 Mb임을 밝히고 3,099 개의 유전자를 포함하고 있음을 보고하였다 (Nakagawa, 2002). 또한 해독된 유전체 염기서열을 바탕으로 아미노산 서열분석을 수행함으로써 전체 유전자의 약 60 %에 대해 기능을 예측할 수 있었고, 이러한 기능 예측은 이전의 생화학적 또는 생리학적 연구로부터 얻은 이 미생물에 대한 특성을 검증하는데 도움을 주었다(그림 2). 코리네박테리움은 대장균에 비해 아미노산 분해에 관련된 효소가 적다고 알려졌다. 실제로 대장균에서 알려진 아미노산 분해 유전자에 대한 상동성 비교를 수행한 결과에 의하면 lysine decarboxylase 유전자인 *cadA*와 *ldc*, tryptophanase 유전자인 *tnaA*, 그리고 glycine cleavage system 유전자인 *gcv*가 *C. glutamicum*에서 확인되지 않았다(Ikeda and Nakagawa, 2003). 최근에 *C. glutamicum*에서 가장 흥미있는 연구 토픽중 하나로 아미노산의 막수송 과정에 대한 생리 및 생화학적 유의성과 분자생물학적 연구를 꼽을 수 있다. 유전체 분석을 통하여 전체 단백질의 22 %가 막 단백질인 것으로 밝혀졌는데(표 1), 이 단백질들은 아미노산 생산을 개선하기 위한 대사공학의 새로운 타겟이 될 것

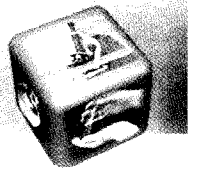
표 1. 산업 미생물인 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 염색체의 일반적 특성 (Kalinowski *et al.*, 2003)

Features of the chromosome	Property
Total size	3,282,708 bp
G+C content	53.8 %
Coding sequence (total)	3002 (100%)
CDS (annotated proteins)	2489 (83%)
CDS (putative cytosolic proteins)	1518 (51%)
CDS (putative membrane proteins)	660 (22%)
CDS (putative secreted proteins)	311 (10%)
CDS (conserved hypothetical proteins)	250 (8%)
CDS (hypothetical proteins)	263 (9%)
Coding density	87%
Average gene length	952 bp
Ribosomal RNAs (16S-23S-5S)	6 operons
Transfer RNAs	42 different/60 genes
Other stable RNAs	2

으로 예상된다.

## 2.2. 개별분석에서 총체적 분석으로 전환

유전체 서열분석의 목적은 생산균주의 대사와 생리적 특성에 대해 충분한 정보를 얻고 궁극적으로는 이러한 정보를 효율적인 생산균주의 육종에 활용하는 것이다. 그러나 서열 또는 유전자 기능예측에 대한 단독 정보만으로는 이러한 목적을 달성하기 어려울 것으로 보인다. *C. glutamicum*의 유전체에 대한 총체적인 이해를 위해서 접근할 수 있는 방법은 최근 빠르게 발전하고 있는 DNA 마이크로어레이 기술과 단백질체 분석 기술의 활용이다. 세균에서 DNA 마이크로어레이를 사용한 최근 연구논문은 이 기술이 유전체 수준에서 대사 및 유전자 조절에 대해 총체적 유전자 발현이 어떻게 적용될 수 있는지를 보여주고 있다. 그러나, 이 기술이 유전자 발현 연구에 강력한 해결책을 제시할 수 있음에도 불구하고 *C. glutamicum*에서의 실용화는 초기단계에 있다. 미국 MIT 대학의 Sinskey 등은 *C. glutamicum*의 대사에서 중요한 52 개의 유전자를 집적한 시험용 DNA 마이크로어레이를 제작하여 이 미생물의 유전체 발현에 대한 DNA 마이크로어레이 기술의 활용 가능성을 충분히 보여주었다(Loos *et al.*, 2001). 어레이 기술의 적용을 위해 여러 그룹들이 자체적으로 DNA 마이크로어레이를 제작하여 *C. glutamicum*의 전사체 분석을 수행하였다. Muffer 등(2002)은 2 가지 형태의 DNA 마이크로어레이를 제작하였는데, 하나는 유전체내에 포함되어 있는 대부분의 ORFs를 커버하는 shotgun 라이브러리에서 유래하는 DNA 마이크로어레이였으며, 다른 하나는 2,804 개의 ORFs에 대한 DNA 마이크로어레이였다. 이들 마이크로어레이를 이용하여 heat shock response에 관련된 유전자 세트들의 변화를 효과적으로 확인할 수 있었고, 초산과 포도당 배지에서 성장하는 동안에 전사체의 발현양상도 모니터링할 수 있었다(Muffer *et al.*, 2002). Hayashi 등은 중앙탄소 대사망 및 아미노산 생합성 경로 그리고 막수송 시스템에 관련된 유전자를 선



별하여 'metabolic array'를 제작하였고, 이를 사용하여 glycolysis와 gluconeogenesis 사이의 탄소흐름이 glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)에 의해서 조절된다는 흥미있는 결과를 보고한 바 있다 (Hayashi *et al.*, 2002). 향후 DNA 마이크로어레이 기술은 *C. glutamicum*의 탄소대사에서 미지의 조절 메커니즘 또는 시스템을 스크리닝하는데 도움을 줄 것으로 기대하며, 이는 우수한 산업용 균주개발 전략을 수립하는데 기여할 것으로 전망된다.

DNA 마이크로어레이 분석처럼 프로테옴 분석도 상호 연관되어 조절을 받는 단백질 세트에 의해 나타나는 글로벌 조절망의 연구에 유용하다. 또한, 단백질이 분포하는 구역, 정량, 그리고 modification에 대한 분석도 가능하게 한다. Hermann 등은 프로테옴 분석 기술을 활용하여 *C. glutamicum*의 2D 단백질 지도를 작성하였다. 세포질내 단백질을 등전위점과 분자량에 따라 약 1,000 개의 단백질, 그리고 막 단백질의 경우 약 700 개의 단백질을 분리할 수 있었다. 2D gel 결과에 의하면 질소가 고갈될 경우, glycolysis에 관련된 여러 효소와 ATP synthase의 발현이 유도됨을 알 수 있었다(Hermann *et al.*, 2001). 또한 질소가 고갈될 경우 산소 소모가 증가되었는데, 이는 질소가 고갈될 경우 막을 통한 능동적 암모니움의 유입과 glutamine synthase에 의한 암모니움의 고정화를 위해 많은 에너지가 요구되기 때문이라고 제안하였다(Schmid *et al.*, 2000). 이와 같이 질소와 탄소 그리고 에너지 대사 사이의 cross-talk는 위와 같이 총체적인 접근 방식이 아니면 밝히기 어려운 것임을 알 수 있다. 따라서 이 결과는 *C. glutamicum*의 글로벌 조절망에 대한 연구에서 프로테옴 기술이 적용된 좋은 예이다. 또한 동정된 단백질에 대한 예측 및 실측된 자료를 비교하면 인산화 등과 같은 post-translational modification을 중앙탄소대사에 관련된 특정 효소에서 확인할 수 있다. Post-translational modification은 일반적으로 탄소대사의 조절에 중요한 역할을 수행하므로 이 미생물의 새로운 대사공학적 타겟으로 부상할 수 있

다. 이러한 modification에 대한 확인은 DNA 마이크로어레이로는 접근할 수 없기 때문에 산업용 균주육종 전략에서 프로테옴 기술만이 제공할 수 있는 장점이다.

### 2.3. 개별분석에서 통합적 분석으로 전환

산업적으로 보다 유용한 아미노산 생산 균주의 개발을 위해 대사흐름에 대한 정량적 정보의 필요성이 요구되어 왔다. 그래서 라이신을 생산하는 다양한 *C. glutamicum* 변이주를 이용하여 <sup>13</sup>C 동위원소 추적 실험을 통해 대사흐름의 정량 비교분석이 보고된 바 있다 (Kiefer *et al.*, 2004). 최근 라이신을 생산하는 *C. glutamicum*에서 서로 다른 성장구간의 균체내 생리적 특성을 밝히기 위해 유전자 발현, 대사흐름, 그리고 세포내 대사산물 농도에 대한 변화를 동시에 분석한 후, 조합하여 대사과정 중에 전사체 수준, 대사산물 농도 그리고 대사활성 사이의 연관성을 조사하였다(Kromer *et al.*, 2004). 이들의 연구결과 중 흥미로운 사실은 라이신 생산이 시작되는 배양구간에서 라이신 생합성 쪽으로 대사흐름이 3~7 배 정도 증가함에도 불구하고, 라이신 생합성 경로에 관련된 유전자들의 대부분은 발현수준에서 거의 변화가 없었으며 일부 유전자의 경우 오히려 발현이 감소하였다는 것이다. 따라서, 효율적인 아미노산 생산균주의 디자인을 위하여 가능한 모든 구성인자들(비교 유전체, 전사체, 단백질체, 대사물체, 대사흐름체 등)에 대한 분석과 해석이 이루어질 때, 신뢰도가 높은 강력한 세포재설계의 밑그림이 제공될 수 있을 것이다.

### 2.4. 유전체 기반의 아미노산 생산균주 개발 동향

지난 10년간 대사공학 분야에서 기술이 빠르게 발전하였다. 이에 따라 유용한 대사산물의 생산에 대사공학이 접목되어 성공적으로 수율 향상을 이룬 예가 여러 번 보고되었다. 또한 대사공학의 기반 및 방법론에 대한 폭 넓은 예도 발표되었다(Shimizu, 2002). 그러나 이러한 이론적인 방법의 실용화에는 많은 어려움이 있



## 총설

는데 특히, genetic background가 크게 변화되었거나 상대적으로 유전적 정보가 불확실한 산업용 균주의 경우 더 심각하다. 산업용 균주의 이러한 유전적 불투명성을 극복하기 위해 유전체 정보를 도입한 새로운 숙주의 개발 또는 기존의 생산균주를 재설계하려는 시도가 이루어지고 있다.

### 2.5. Minimum genome factory (MGF)

미생물 유전체 연구가 진전됨에 따라 우리의 관심이 유전체 기반의 새로운 균주육종 방법으로 전환되고 있다. 이중 하나는 특별한 목적을 위해 최소 유전자 세트를 갖는 균주의 제작이다. 이러한 아이디어는 미생물이 실험실이나 생산공정의 적용단계와 같은 극히 제한된 환경에서 사용될 경우 많은 유전적 기능이 불필요하다는 가정으로부터 출발하였다. 따라서 이 아이디어는 최근에 일부 연구기관에서 수행중인 생물학적 관점에서 세포가 생명을 유지하는데 요구되는 최소 유전자 세트를 정의하는 연구(Gil *et al.*, 2004)와는 거리가 있다. 2001년도 일본에서 “Development of Basic Technologies for Industrial Process based on Biological Functions”이라는 그린 바이오 프로젝트가 착수된 바 있다. 이 프로젝트의 목적은 화학자원을 원료로 하여 산업적으로 중요한 화학물질의 생산에 적용되는 화학공정을 효율적인 환경 친화적 생물공정으로 전환하는데 있다. 특히, “Host Cell Creation Technology Development” 프로그램은 생물산업의 모델 미생물인 *E. coli*, *B. subtilis*, *C. glutamicum* 을 포함한 수 종의 미생물에서 불필요한 유전자를 제거하여 최소 유전체를 보유하는 산업용 숙주세포인 “Minimum Genome Factory” (MGF)를 제작하는 것이다. 이상적인 최소 유전체를 지닌 균주는 적은 maintenance 에너지를 사용하면서 동시에 적은 부산물을 생성하므로 기존의 생산균주에 비해 생물산업적 공정에서 유리할 것으로 기대된다(그림 3).

### 2.6. 유전체 육종 (Genome Breeding)

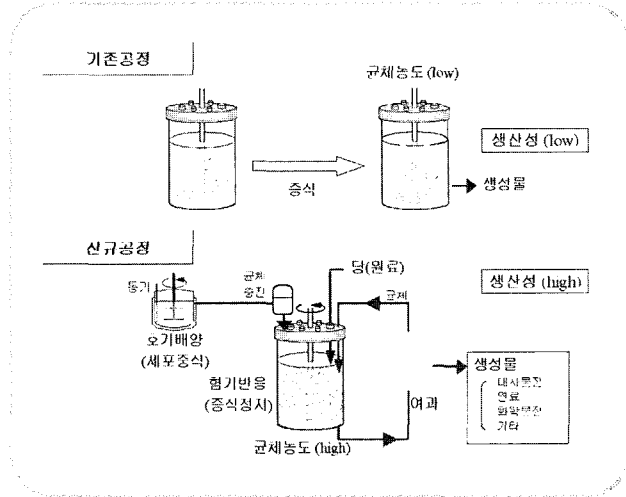


그림 3. Minimum genome factory (MGF)를 이용한 신규 발효공정 (Inui *et al.*, 2004)

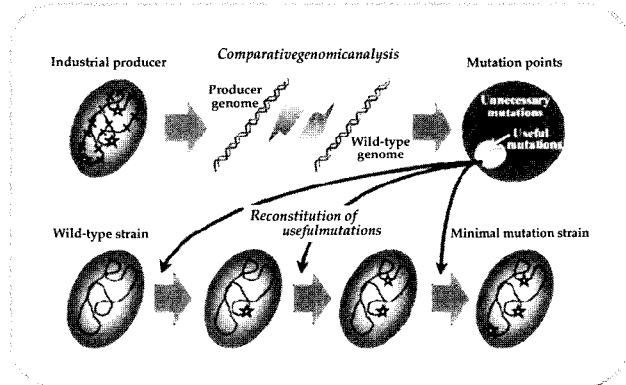


그림 4. 유전체 육종에 의한 세포재설계 (Ikeda and Nakagawa, 2003).

일반적으로 널리 사용되는 화학적 돌연변이 유도물질인 NTG(N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아니딘)를 처리하여 변이를 유도할 경우 1 회당 약 50~100 개의 염기에서 변이가 일어나는 것으로 유추된다. 따라서, 무작위적 변이유도와 선별을 반복하여 얻어진 산업용 균주는 목적 대사산물의 생합성에 문제를 일으키거나 불필요한 변이를 유전체에 축적시킨다. Ikeda 등이 명명한 유전체 육종은 라이신 생산주와 야생주사이의 유전체 비교 분석에 의해 라이신 생산에 유용한 유전자의 변이를 결정하고, 이를 야생주에 단계적으로 도입함으로써 라이

신을 생산하는 “최소 변이 균주”를 개발하는 전략으로부터 출발하였다(그림 4). 이들은 L-라이신 생합성에 관련된 유전자에 특별한 관심을 갖고, 전통적인 변이법에 의해 개발된 라이신 생산균주의 유전체 염기서열 분석을 수행하고 야생주와 유전체 비교를 수행한 결과 많은 변이를 확인할 수 있었다. 이 변이 중에서 라이신 생산에 유용한 3 점의 특이 변이 즉, homoserine dehydrogenase (*hom*)의 Val59 → Ala 변이, aspartokinase gene (*lysC*)의 The311 → Ile 변이, pyruvate carboxylase gene (*pyc*)의 Pro458 → Ser 변이를 선별하였다. 위의 3 점 변이를 야생주에 도입한 결과 이 유전적 특성을 제공한 모균주에 비해 배양시간이 반으로 단축되었으며 라이신은 모균주와 동일한 농도인 80 g/l를 배양액에 축적시켰다(Ikeda and Nakagawa, 2003). 이

러한 생산성의 향상은 모균주에서 불필요한 변이에 의해 유발되는 성장 지연 문제가 해결되어 3 점 변이주가 야생주와 같은 속도로 성장하면서 포도당을 소모시키기 때문이다.

따라서 향후 게놈브리딩이 전통적인 발효공정을 혁신적으로 개선시킬 수 있을 것이며, 동시에 유전체 정보를 바탕으로 한 아미노산 생산균주의 육종에 대한 합리적인 디자인 전략을 제시하며, 아미노산 생산 메커니즘을 투명하게 밝혀 줄 것으로 기대한다.

## 2.7. 신규 대사경로의 구축

비교 유전체 분석을 통한 신규 대사경로의 재구축은 아미노산 대사경로의 효율적인 디자인을 가능하게 하며, 향후 아미노산을 포함한 대사산물 생산 균주의 육종에 크게 이바지 할 것이다. 최근 방향족 대사경로의 재구축에 의해 방향족 대사산물에 대한 이른수율을 획기적으로 개선한 사례는 다음과 같다(그림 5). 방향족 아미노산의 공통 대사경로인 시키메이트 (*shikimate*) 대사

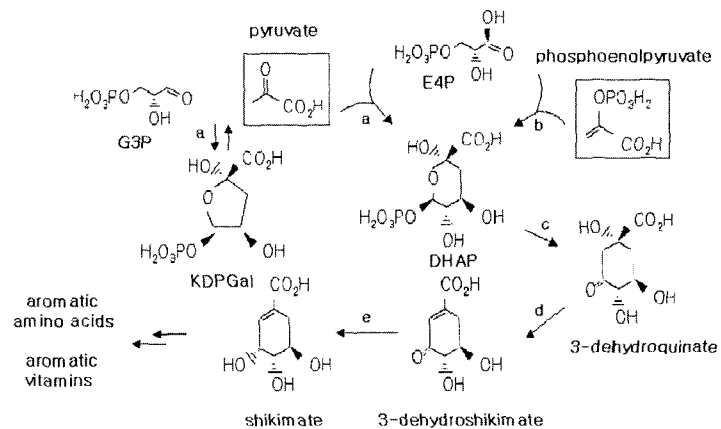
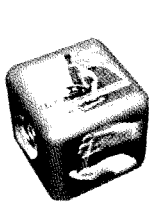


그림 5. 시키메이트 대사경로의 구축 (Ran *et al.*, 2004). 대사산물 3P, D-glyceraldehyde 3-phosphate; E4P, D-erythrose 4-phosphate; KDPGal, 2-keto-3-deoxy-6-phosphogalactonate; DAHP, 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phosphate; 효소(a) KDPGal aldolase (*agoA*); (b) DAHP synthase (*aroF*, *aroG*, *aroH*); (c) 3-dehydroshikimate synthase (*aroB*); (d) 3-dehydroshikimate dehydratase (*aroD*); (e) shikimate dehydrogenase (*aroE*).

경로의 첫 번째 효소반응의 기질인 포스포에놀피루브산 (phosphoenolpyruvate)은 미생물에서 당 수송과 포도당의 인산화를 담당하는 carbohydrate phosphotransferase system(PTS)에도 사용된다. 세포질내 포스포에놀 피루브산 농도는 시키메이트 대사경로와 PTS가 관여하는 포도당 수송 시스템 사이의 경쟁으로 인해 시키메이트 대사경로에 의해 생산되는 방향족 대사산물의 생합성을 제한하는 요인이 된다. 이러한 관점에서 Ran 등은 포스포에놀피루브산 대신 피루브산이 D-erythrose-4-phosphate와 효소반응에 의해 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phosphate (DAHP)를 생성할 수 있는가에 대해 관심을 갖게 되었고, 이를 2-keto-3-deoxy-6-phosphogalactonate (KDPGal) aldolase를 directed evolution시켜 새로운 시키메이트 대사경로를 구축함으로써 완성되었다(Ran *et al.*, 2004). Directed evolution된 KDPGal aldolase는 시키메이트 대사경로의 첫 번째 반응을 촉매하며, PEP 대신에 PTS 막수송에서 부산물로 생성되는 피루브산을 기질로 사용하였다. 이러



## ◆ 총 설



한 대사경로의 재구성은 미생물에서 PEP 활용도를 증가시키기 위한 이전의 연구전략과는 출발점에서부터 확연한 차이가 있었고, 이에 따라 3-dehydroshikimate 합성에 대한 최대 이론수율은 43 %에서 86 % (mol/mol)로 증가되었다.

### 3. 결론 및 전망

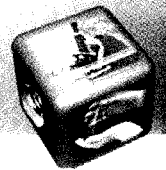
*C. glutamicum* 유전체 서열 분석이 완료됨에 따라 아직 알려지지 않았던 새로운 대사경로, 유전자 발현에 대한 조절 네트워크, 그리고 미지 유전자의 기능이 포스트 게놈 연구로 속속 밝혀지고 있다(Mitshuhashi *et al.*, 2004). 이와 같은 연구 활동은 향후 대사경로 및 조절에 대해 보다 세부적이면서 총체적 유전체 설계도에 반영됨으로써 산업적으로 우수한 균주개발에 크게 기여할 것이다. 유전체 기반의 아미노산 생산균주 개발은 일반적인 균주개발의 방법을 탈피하여 새로운 전략이 지속적으로 접목될 것이다. 예를들면, 야생주에 유전적으로 유용한 기존 생산균주의 변이만을 부여하거나, 최소한의 게놈으로 재설계된 숙주에 관심있는 유전자 세트를 도입하는 전략이 실용화 될 것이다. 특히, *in-silico* 상에서 대사경로를 효율적으로 재구축한 후 외래 유전자를 도입 하거나 목적유전자를 directed-evolution 시킴으로써 기존의 이론수율은 지속적으로 상향 조정될 것으로 예상된다.

지난 반세기 동안 *C. glutamicum*에 대한 균주육종으로 산업적으로 다양성을 지닌 많은 균주를 확보할 수 있었다. 그러나, 다양성을 갖는 이들 변이균주의 유용한 유전적 특성은 개개의 변이주에 사장되어 활발한 연구가 진행되지 못 하였다. 근래에 와서 유전체 관련 기술의 발전으로 각각의 개놈으로부터 유용한 변이를 추출하여 유전적 특성을 대사공학적으로 통합할 수 있게 되었다. 현대의 유전체 기반 기술과 기존 변이주의 유용한 유전적 특성 및 축적된 여러 학문적 지식이 융합되면 생물산업 측면에서 보다 경쟁력을 지닌 아미노산 생

산균주의 개발이 이루어 질 것이다.

### 참고문헌

- Bathé, B., J. Kalinowski, and A. Puhler. 1996. A physical and genetic map of the *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 chromosome. *Mol. Gen. Genet.* 252: 255-265
- Gil, R., F. J. Silva, J. Petro, and A. Moya. 2004. Determination of the core of a minimal bacterial gene set, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 518-537
- Hayashi, M., H. Mizoguchi, N. Shiraishi, M. Obayashi, S. Nakagawa, J. Imai, S. Watanabe, T. Ota, and M. Ikeda. 2002. Transcriptome analysis of acetate metabolism in *Corynebacterium glutamicum* using a newly developed metabolic array. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 1337-1344
- Hermann T., W. Pfefferle, C. Baumann, E. Busker, S. Schaffer, M. Bott, H. Sahm, N. Dusch, J. Kalinowski, A. Pühler, A. K. Bendt, R. Krämer, and A. Burkovski. 2001. Proteome analysis of *Corynebacterium glutamicum*. *Electrophoresis.* 22: 1712-1723
- Ikeda M., and S. Nakagawa. 2003. The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62: 99-109
- Inui M., S. Murakami, S. Okino, H. Kawaguichi, A. A. Vertes, and H. Yukawa. 2004. Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 7: 182-196
- Kalinowski J., B. Bathé, D. Nartels, N. Bischoff, M. Bott, A. Burkovski, N. Dusch, L. Eggeling, B. J. Eikmanns, L. Gaigalat, A. Goesmann, M. Hartmann, K. Huthmacher, R. Krämer, B. Linke, A. C. Mchardy, F. Meyer, B. Möckel, W. Pfefferle, A. Pühler, D. A. Rey, C. Rückert, O. Rupp, H. Sahm, V. F. Wendisch, I. Wiegräbe, and A. Tauch. 2003. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins, *J. Biotechnol.* 104: 5-25
- Karasawa, M., O. Tosaka, S. Ikeda, and H. Yoshii. 1986. Application of protoplast fusion to the development of L-threonine and L-lysine producers. *Agric. Bio. Chem.* 50: 339-346
- Kiefer, P., E. Heinzle, O. Zelder, and C. Wittmann. 2004. Comparative metabolic flux analysis of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* on glucose and fructose. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:229-239
- Krömer, J., O. Sorgenfrei, K. Klopprogge, E. Heinzle, and C. Wittmann. 2004. In-depth profiling of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* by combined analysis of the transcriptome, metabolome, and fluxome. *J. Bacteriol.* 186: 1769-1784
- Loos, A., C. Glanemann, L. B. Willis, X. M. O' Brien, P.A. Lessard, R. Gerstmeir, S. Guillouet, and A. J. Sinskey. 2001. Development and validation of *Corynebacterium* DNA microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2310-2318
- Marx A., B. J. Eikmanns, H. Sahm, A. A. de Graaf, L. Eggeling.



1999. Response of the central metabolism in *Corynebacterium glutamicum* to the use of an NADH-dependent glutamate dehydrogenase. *Metabol Eng.* 1: 35-48

Mitsuhashi, S., J. Ohnishi, M. Hayashi, and M. Ikeda. 2004. A gene homologous to  $\beta$ -type carbonic anhydrase is essential for the growth of *Corynebacterium glutamicum* under atmospheric conditions, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63:592-601

Muffer A., S. Bettermann, M. Haushalter, A. Hölein, U. Neveling, M. Schramm, O. Sorgenfrei. 2002. Genome-wide transcription profiling of *Corynebacterium glutamicum* after heat shock and during growth on acetate and glucose. *J. Biotechnol.* 98: 255-268

Nakagawa S., 2002. The complete genome sequencing of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. In: Proceedings of the 9<sup>th</sup> International symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, Gyeongju, Korea, 1-5 July 2002, p 21

Peters-Wendisch P. G., B. Schiel, V. F. Wendisch, E. Katsoulidis, B. Mockel, H. Sahm, B. J. Eikmanns. 2001. Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3: 295-300

Ran, N., K. M. Draths, J. W. Frost. 2004. Creation of a shikimate pathway variant, *J. Am. Chem. Soc.* 126: 6856-6857

Santamaria R., J. A. Gil, J. M. Mesas, and J. F. Martin. 1984. Characterization of an endogenous plasmid and development of cloning vectors and transformation system in *Brevibacterium lactofermentum*. *J. Gen Microbiol.* 130: 2237-2246

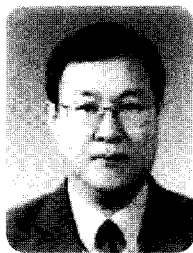
Schmid, R., E-M. Uhlemann, L. Nolden, G. Wersch, R. Hecker, T. Hermann, A. Marx, and A. Burkovski. 2000. Response to nitrogen starvation in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett.* 187: 83-88

Schwarzer, A., and A. Puhler. 1991. Manipulation of *Corynebacterium glutamicum* by gene disruption and replacement. *Biotechnology.* 9: 84-87

Shimizu H., 2002, Metabolic engineering integrating methodologies of molecular breeding and bioprocess systems engineering. *J. Biosci. Bioeng.* 94: 563-573

Tauch, A., I. Homann, S. Mormann, S. Rüberg, A. Billault, B. Bathe, S. Brand, O. Brockmann-Gretza, C. Rücker, N. Schischka, C. Wrenger, J. Hoheisel, B. Möckel, K. Huthmacher, W. Pfefferle, A. Pühler, and J. Kalinowski. 2002. Strategy to sequence the genome of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032: use of a cosmid and a bacterial artificial chromosome library. *J. Biotechnol.* 95: 25-38

## 약 력



### 김성준

- 1976. 3. - 1980. 2. 서강대학교 생물학과 (이학사)
- 1984. 3. - 1986. 2. 연세대학교 생화학과 (이학석사)
- 1995. 3. - 현재 연세대학교 생화학과 (박사과정)
- 1986. 9. - 현재 CJ(주) Bio연구소 (수석연구원)