

국내 · 외 미생물 대사공학기술의 현황 분석보고서

A Status Report on the Global Research in Microbial
Metabolic Engineering

KAERI

제 출 문

한국원자력연구원장 귀하

본 보고서를 2008년도 ‘방사선저항성 미생물 활용기술개발’ 과제의 기술현황분석 보고서로 제출합니다.

2008. 9. 10

주 저 자 : 조 민 호

공 저 자 : 임 상 용
김 동 호



요약문

I. 제목

-미생물 대사공학기술의 국내·외 연구 현황 분석보고서

II. 대사공학의 개념 및 생물 산업에서의 위치

- 대사공학이란 분자생물학적 기술을 이용하여 대사경로와 다른 경로들의 전체적인 분석을 결합하여 최적의 유전적 변형을 설계하고 도입하여 세포의 특성을 개선시키는 과학임
- 현재 수많은 일·이차 대사산물, 재조합 단백질, 그리고 여러 생체고분자물질이 미생물 대사를 조작하여 생산되고 있으나 자연의 야생 미생물들은 이러한 임무를 수행하기에 적합하지 않음
- 따라서 미생물들은 주어진 대사산물을 대량생산하기 적합하도록 대사공학이란 기술을 경유하게 됨
- 무작위 돌연변이법에 의존하는 고전적인 유전학적 균주개량법은 과거에 널리 사용되어 왔으며, 그중에서도 항생제, 비타민, 그리고 용제 생산 분야에 이용됨
- 지난 수십 년간 이루어진 재조합 DNA 기술의 발전은 독창적이고 유익한 특성을 갖는 특정 대사환경을 구축할 수 있는 능력을 제공하여 대사경로조작을 새로운 시각으로 볼 수 있게 함
- 목적하는 특성을 도입하거나 증폭시키기 위한 세포대사의 재설정은 다양한 기술을 사용하여 완성되어지고 수많은 목적을 달성하기 위하여 응용됨
- 따라서 대사공학을 통하여 만들어진 집적된 대사의 총괄적 이해는 생명공학기술의 응용, 목적 물질 생산을 위한 합리적인 전략 고안과 약제 후보 탐색 혹은 유전자치료 설계 등의 연구·개발에 중요한 위치를 차지함

III. 미생물 대사공학의 연구 동향

- 의약과 화학공업 분야 중심으로 유용물질을 생산하는 여러 미생물들의 대사능력이 현재까지 많은 연구가 진행되어 왔음
- 최근에는 석유자원의 제한성과 인류의 환경문제에 대한 재인식으로 인해 화학물질 생산 과정을 대사공학기술을 경유하는 미생물 발효를 통해 생산하려는 경향이 증가되고 있음

- 국·내외를 막론하고 초기의 대사공학은 막대한 시간과 노동력이 소요되는 ‘trial and error’ 방식의 연구였으며, 이러한 전략들은 미생물의 복잡한 대사 네트워크는 단일 경로 수준의 변화에 대한 저항성 때문에 종종 실패를 함
- 최근에는 생명체 전체 대사 네트워크를 조절하여 목적 산물을 효과적으로 생산할 수 있는 재조합 미생물을 구축하는 방법을 모색하고 있음
- 게놈서열이 밝혀짐에 따라 많은 새로운 유전자들의 기능과 생물학적 역할이 밝혀졌고, 이를 통해 세포대사의 이해를 한 층 더 높일 수 있었으며, 발현체학, 단백질체학, 그리고 대사체학 등의 omics 기술은 생명체 단위 수준에서 세포대사의 이해를 넓히는데 널리 사용되고 있음
- Omics 기술을 이용한 대사공학은 아미노산, 재조합 단백질, 의약품, 비타민, 그리고 범용 화합물 등 다양한 산물들을 목표로 연구가 진행되고 있으며, 최근에는 ‘시스템 수준 대사공학(System level metabolic engineering)’이라는 다양한 omic 기술을 집적한 새로운 대사공학 전략이 시도 되고 있음

IV. 대사공학기술의 활용 동향

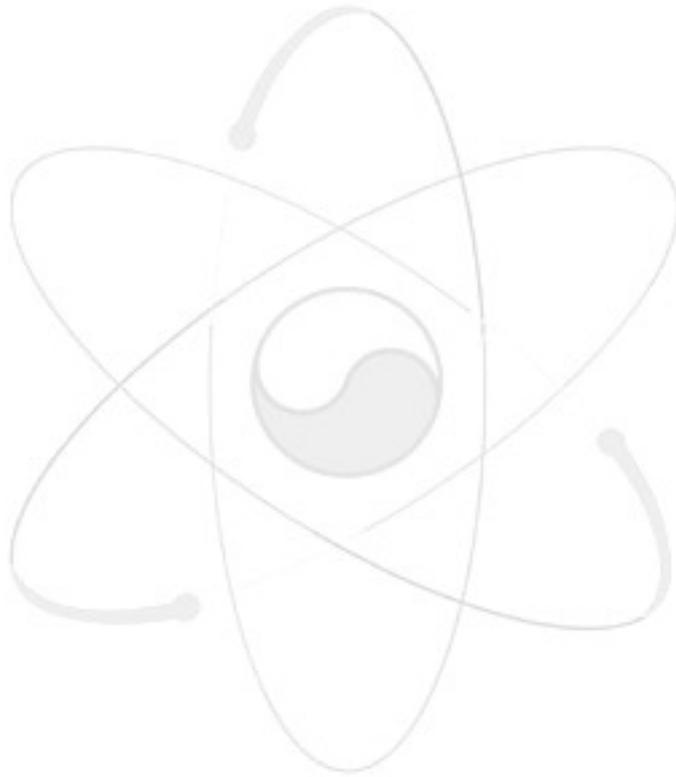
- 현재 우리나라에서 대사공학기술을 이용한 생물 산업은 대부분 바이오식품에 국한되어 있다고 할 수 있음
- 국내 2006년도 8개 대분야별 생물 산업 통계에 따른 생산 비중을 살펴보면 바이오의약과 바이오식품 대부분을 차지함
- 2003년도 국내 생물 산업 실태조사에 따른 국내 주요 바이오산업제품 현황에 따르면 7개 품목 중 5개 품목이 미생물 대사공학을 통해 생산된 제품임
- 사료첨가제 라이신(24%)과 식품첨가물 핵산(9%)로 가장 많은 생산금액과 수출금액을 차지하였고, 그 이외에도 B형 간염백신(3%), 항생제 중간체 7-ACA(3%), 그리고 감미제 아스파탐(3%)이 차지함
- 그러나 위의 제품을 생산하는 기업들의 연구개발 전략은 아직까지 초기의 대사공학기술에 머물러 있으며, 좀 더 정교하고, 신속하고, 효율적으로 물질을 생산하기 위해서는 omics 기술 등의 연구를 통한 균주개발이 필요한 실정임

V. 결론

- 바이오산업(Biotechnology industry)은 현재 세계적인 Mega-Trend이며, 그

중심에 대사공학기술이 있음

- 세계 각국은 미생물 유래 유용산물 연구개발과 상업화를 위하여 국가적인 차원에서 많은 노력을 경주하고 있으며, 국내에서는 한국생명공학연구원을 주축으로 대학, 그리고 기업들의 연구가 활발히 진행되고 있음
- 본 연구에서 작성된 기술현황보고서는 향후 미생물을 활용한 고부가가치 산물 대량생산 연구에 활용될 수 있을 것이며, 기존의 방사선생명공학기술을 접목하여 미생물 대사공학을 통한 유용산물 생산에 활용 가능할 것으로 기대됨



SUMMARY

I. Title

- A Status Report on the Global Research in Microbial Metabolic Engineering

II. Concept of metabolic engineering and its status in bio-industry

- Metabolism is the set of chemical reactions that occur in living organisms in order to maintain life and numerous bioproducts including primary and secondary metabolites, recombinant proteins, and other biopolymers are being produced by microbial fermentation
- Metabolic engineering has come far in the past decade and the main goals of metabolic engineering can be summarized in the following four categories; (1) improvement of yield, productivity and overall cellular physiology, (2) extension of the substrate range, (3) deletion or reduction of by-product formation and (4) introduction of pathways leading to new products
- The redirection of cellular metabolism to create or enhance desirable attributes has been accomplished with a variety of novel techniques and applied towards an even greater variety of goals
- Therefore, the insights of the integrated view of metabolism generated by metabolic engineering will have profound implications in biotechnological applications, as well as in devising rational strategies for target selection for production and screening candidate drugs or designing gene therapies

III. Current research status on microbial metabolic engineering

- Early metabolic engineering has mostly been carried out by “trial and error” type approaches
- However, most of these attempts, did not yield successful results, and furthermore various side effects were observed
- Recently, with the rapid advances in the development of new analytical,

cloning, and mathematical tools for the analysis of biological data, metabolic engineering strategies have become more rational

- Whole genome sequences have allowed researchers to identify genes and use homologous comparisons to assess their biological roles, thus providing new and important data for an increased understanding of cellular metabolism
- In addition, the so-called ‘-omics’ technologies, mainly functional genomics, proteomics and metabolomics contribute significantly towards metabolic engineering as large amounts of data are produced, which can be used to gain a better understanding of flux control and consequently lead to improved models of metabolic pathways
- A new strategy, generally called “Systems Biotechnology”, which uses data from organism-wide metabolic networks to modify the metabolic pathways toward efficient production of target bioproducts, has ushered in a new era in modern metabolic engineering
- Recent experimental advances in high throughput technologies have enabled wholesale generation of new genomic, transcriptomic, proteomic, and metabolomic data

IV. Application of microbial metabolic engineering technology

- Metabolic engineering has found many applications, especially in microbial fermentation
- It has been applied to increase the production of chemicals that are already produced by the host organism, to produce desired chemical substances from less expensive feedstock, and to generate products that are new to the host organism
- Other challenges associated with metabolic engineering are the biosynthesis of secondary metabolites, the generation of organisms with desirable growth characteristics, and the manipulation of pathways for the production of chiral compounds as intermediates in the synthesis of pharmaceutical products
- The first successful genetic engineering of *Escherichia coli* by Cohen,

Boyer and co-workers in 1973 and shortly afterwards followed many successes in the production of recombinant proteins, e.g. the production of human insulin by a recombinant *E. coli*

- The first breakthrough in genetic engineering paved the way for a completely new route for production of pharmaceutical proteins such as human growth hormone(hGH) and human insulin, as well as opening the possibility to produce many other pharmaceuticals
- Today there are more than 55 protein drugs, largely recombinant proteins and monoclonal antibodies, which are often referred to as biotech drugs, and the top-selling drugs represent sales of billions of US dollars

V. Conclusion

- This report describes the current research status of the microbial metabolic engineering technology
- Biotechnology industry is now a global 'Mega-Trend' and metabolic engineering technology has important role in this area
- Therefore, many countries have made efforts in this field to produce top value added bio-products efficiently using microorganisms
- Information in this report will be useful for designing and fulfilling a research using microbial genetic engineering
- Additionally, it will be also practical for successful metabolic engineering and to understand basic concepts of metabolic engineering and examples of applications in the production of primary and secondary metabolites, improving cellular properties, and biomedical engineering.

CONTENTS

1. Introduction	1
2. Research status of microbial metabolic engineering	5
3. Status of industrial applications	17
4. Representative applications	23
5. Perspectives of microbial metabolic engineering	32
6. References	34

목 차

제 1 장 개 요	1
제 2 장 미생물 대사공학기술의 국내·외 연구 동향 . . . 5	5
제 3 장 미생물 대사공학 활용 국내·외 산업 동향 . . . 17	17
제 4 장 미생물 대사공학의 대표적 연구 사례 23	23
제 5 장 미생물 대사공학의 향후 전망 32	32
제 6 장 참고문헌	34

제 1 장 서론

제 1 절 대사공학의 개요

1. 대사의 정의

- 가. 대사(metabolism)란 에너지를 외부로부터 흡수하고, 이를 생명체가 이용하기 가장 용이한 형태의 에너지로 바꾸는 소화 작용을 거쳐서 생명체의 활동에 필요한 여러 가지 대사산물을 다양한 생합성을 통하여 합성하는 일련의 활동이 모두 대사 작용에 포함됨
- 나. 인류가 생명체로부터 활용하고 있는 대부분의 생산물들은 대사산물이므로, 원하는 생산물의 효율적인 대량생산을 위해서는 대사흐름(metabolic flux)의 조절이 필수적임
- 다. 기존에는 이런 작업을 무작위적인 돌연변이방법을 사용하여서 수행하였으나, 최근에는 발달한 유전자 재조합기술을 이용하여 수행하고 있으며, 이러한 대사흐름조절의 필요성이 증가함에 따라서 1990년대에 대사공학이라는 새로운 학문이 탄생하게 되었음

2. 대사공학의 정의 및 활용

- 가. 대사공학(metabolic engineering)이란 유전자 재조합기술과 관련 분자생물학 및 화학공학적 기술을 이용하여 새로운 대사회로를 도입하거나 기존의 대사회로를 제거·증폭·변경시켜 세포나 균주의 대사특성을 우리가 원하는 방향으로 바꾸는 일련의 기술을 일컫음
- 나. 대사공학기술을 이용함으로써 기존에 생산하던 유용한 대사산물을 대량생산하도록 조작할 수 있으며, 새로운 유전자 및 대사회로를 도입함으로써 기존 대사산물의 대량생산, 신규 대사산물의 생산, 원하지 않는 부산물의 생산저해, 다양하고 값싼 기질의 이용, 난분해성 화합물의 분해능력 등의

특성을 갖도록 생명체의 특성을 개량할 수 있음

제 2 절 대사공학 연구의 필요성

1. 대사공학 연구의 기술·경제·사회적 중요성

가. 기술적 측면

- (1) 미생물을 이용한 화학물질의 생산은 생산물의 안전성, 환경 친화적 성격 등의 이유로 선호되어져 왔으나 대부분의 경우 미생물의 생산능력은 기대를 충족시켜주지 못하였으며 원하는 물질 이외에도 많은 부산물을 생산하므로 생산물의 분리·정제에 많은 어려움이 있어왔음
- (2) 이를 개선하기 위한 많은 시도가 이루어졌으며, 주로 효율적인 생산 공정 개발이나 분리공정의 개발이 중심이 되었으나 이러한 방법은 균주의 대사특성 자체를 조작하는 것이 아니므로 어느 정도 이상의 성과는 기대하기 어려움
- (3) 특히 최근에는 공정 및 분리기술이 안정화 단계에 다다랐으므로 이의 개선을 통한 생산능의 향상은 크게 기대하기 힘든 실정임
- (4) 미생물의 대사회로를 조작함으로써 균주의 생산능 및 특성을 근본적으로 개선하는 작업이 필요하며, 최근에는 재조합 유전자기술의 급격한 발달에 힘입어 선택적인 돌연변이화가 가능하여졌으며 이에 따라 대사공학 기술이 발달됨
- (5) 제한적이긴 했지만 대사공학을 통하여 균주의 대사회로의 조작이나 새로운 대사회로의 도입이 가능해졌으며, 몇몇 생산균주들의 특성이 획기적으로 개선되었음 [18,20,24,34]
- (6) 개량된 균주들은 화학 (정밀 화학물질, 범용 화학물질), 의약·의료 (광학 활성 의약품, 신규 항생제), 환경 (난분해성 화합물 분해, 생분해성 고분자), 농업 (질소고정화, 해충내성) 등 거의 모든 분야에 응용되고 있음 [15,16,17,22,25]

나. 경제·산업적 측면

- (1) 현재 순수생명공학 제품의 시장은 연 30%의 높은 증가율을 보이고 있으며 5년 후의 세계시장의 규모는 약 740억불이 될 것으로 예상되고 이에

따라 국내시장의 규모도 약 3조원이 될 것이라고 예상됨 [19]

- (2) 대사공학을 이용한 제품은 앞으로 5년 후 세계시장 약 2,000억불, 국내시장 6조원의 막대한 규모를 형성하게 되어, 경쟁력확보를 위하여 필수적인 대사흐름분석 및 최적화기술에 대한 수요가 폭증할 것으로 예상됨 [19]
- (3) 이러한 막대한 규모의 시장을 놓고, 소위 WTO하에서 전 세계적으로 국경 없는 경쟁이 있을 것이며, 이 경쟁에서의 승리를 통한 우리나라 경제적 이익을 위해서는 경쟁력 우위 확보를 위한 핵심 기반기술의 확보가 필수적임
- (4) 따라서 화학·의료보건·식품·환경·농업 등의 분야에서 기존 생산물질의 효율적인 생산 및 신규화합물의 생산 및 분해를 최적으로 행할 수 있게 하여 바이오텍 분야에서 경제·산업적 경쟁력 위위를 확보하게끔 해 줄 수 있는 대사공학은 반드시 보유해야할 기반기술이라 할 수 있음
- (5) 미시적으로는 대사공학의 핵심기술인 대사흐름분석, 예측 및 최적화기술의 개발을 통해 최적화된 대사회로를 갖는 균주의 개발이 가능하고, 이는 곧바로 ① 생산물 분리·정제 비용의 감소, ②공정시간 단축에 따른 공정 비용 감소, ③설비비 감소, ④원료비 감소 등 생산비 감축효과를 가져올 수 있음
- (6) 또한, 이는 바로 제품의 경쟁력을 갖게 하는 것을 의미하며, 위에서 기술한 거시적인 경제·산업적인 파급효과를 가져다 줄 수 있음
- (7) 즉, 향후 생명공학·제약·화학 관련 산업의 발전, 혹은 더 나아가 그 분야에서의 생존을 위해서는 신규물질의 창출이나 기존 유용물질의 보다 효율적인 생산에 의한 가격경쟁력 확보가 필수적인데, 이를 위하여 반드시 개발되어야 할 기술은 「대사공학기술」 임

다. 사회·문화적 측면

- (1) 최근 전 세계적으로 지구환경에 대한 관심이 높아짐에 따라 기존의 석유 화학기반의 화학 산업을 재생 가능한(renewable) 원료를 사용하는 생물학적 생산방법으로 대체해 나가고자하는 움직임이 거세게 일고 있음
- (2) 이의 한 예로 세계 최고의 화학회사인 미국 듀폰(DuPont) 사가 향후 10년 내에 생물공학에 기반을 둔 화학회사로 바뀌겠다는 야심찬 계획을 발표한 것을 들 수 있으며, 이는 사회·문화적 요인이 바뀔에 따른 산업계의 변신임을 알 수 있는데, 이러한 변화에 빠르게 대응하지 않을 경우 국

제적인 경쟁에서 뒤쳐질 수밖에 없음

- (3) 그 예로서 굴지의 농업생명공학회사인 미국 몬산토(Monsanto) 사는 형질 전환식물(GM crops)에 대한 안정성 검증 여부에 따른 사회·문화적 문제점을 전혀 고려치 않고 계속 사업추진을 하다가 결국 최근에 경영난에 직면하고 있음
- (4) 대사공학적으로 개량된 미생물의 이용은 그 효용성이 높아 산업경쟁력을 갖추게 할 수 있고, 제한된 구역에서의 이용이 가능하여 소위 GMO 누출에 대한 사회적 염려가 거의 없으며 공정 전체가 환경 친화적이기 때문에 일반인들도 쉽게 수긍을 하는 기반기술로서 자리 잡아 가고 있음
- (5) 즉, 사회·문화적으로 대사공학적으로 개량된 미생물을 이용한 유용물질의 생산기술은 인류의 풍요로운 삶과 건강, 그리고 더 나아가 생존을 위한 필수기술이라고 공감대를 형성할 것임



제 2 장 대사공학기술의 국내·외 활용 현황

제 1 절 대사공학기술의 이해

1. 대사공학 연구의 전략과 기술

가. 유전체 서열 분석

- (1) 미생물의 유전체 수준의 염기 서열 비교분석은 비교적 간단한 방법이지만, 우리가 원하는 형질을 얻기 위해서 대사공학적으로 어떠한 유전자를 조작해야 하는 지를 판단하는데 매우 효과적인 방법임
- (2) 그러나 유전체 서열분석을 통하여 불필요한 유전자를 제거함으로써 고효율의 균주를 만들 수도 있지만, 안정성이 떨어질 수 있다는 점에 유의해야 함
- (3) 유전체 염기서열의 비교 분석의 예로서, Ohnishi 등은 라이신을 대량생산하는 *Corynebacterium* 균주와 그 야생형 균주의 유전체 염기서열을 비교 분석하여 라이신의 대량생산과 관련이 있는 유전자의 변이를 발견할 수 있었음 [29]
- (4) 유전체서열 정보는 우리에게 대상 미생물이 어떠한 대사경로를 가지고 있는지 그리고 나아가 이 미생물이 궁극적으로 어떤 형질들을 가질 수 있는지 보여줌
- (5) 현재로서는, 유전체 전부를 우리가 원하는 대로 조작하는 일은 불가능하지만, 유전체 정보를 효과적으로 이용하면 원하는 형질과 관련이 있는 유전자를 발견하고 조작하는 일은 현실적으로 가능하며, 이를 기반으로 *in silico* 대사 모델을 구축하여, 대상 미생물의 대사능을 예측함으로써 대사공학 전략을 수립하는 데에도 도움이 됨

나. 전사체 분석

- (1) DNA microarray의 개발은 세포내에 존재하는 모든 mRNA의 양을 정량적으로 비교 분석할 수 있게 하였음
- (2) 균주 간 또는 동일 균주의 다른 조건에서 채취한 시료의 mRNA의 양을 비교 분석함으로써, 대사공학의 목적이 될 수 있는 조절 회로 또는 유전

자의 발굴이 가능함

- (3) 이를 통하여 얻어진 정보는 유전공학적인 방법을 통해 균주의 효율을 향상시키는데 쓰일 수 있음
- (4) 예를 들면, 재조합 단백질을 고발현하는 대장균의 고농도 배양시의 mRNA 양을 분석하여 억제되는 유전자를 확인하고, 억제되는 두 가지 유전자를 고발현 시킴으로써 재조합 단백질의 생산을 향상시킨 예가 있음 [4]

다. 단백질체 분석

- (1) 대부분의 세포내 대사를 담당하는 효소가 단백질이므로, 단백질체학은 우리에게 세포내 대사 상태에 관한 더욱 상세한 정보를 제공할 수 있음 [9]
- (2) 그러나 이차원 전기영동상의 분리된 모든 단백질이 동정이 가능한 것은 아니기 때문에 얻어지는 정보는 전사체 분석에 비해서 양적으로는 적을 수 있음
- (3) 그러나 적절한 대조구를 예로 들어 유전자 변형전과 후, 각기 다른 발효 조건에서 얻은 시료를 가지고 수행 한다면 각기 시료에서 특징적으로 발견되는 단백질을 찾아냄으로써 대사공학의 목적 발굴에 쓰일 수 있음
- (4) 예를 들면, 생분해성 고분자인 PHB를 축적하는 대장균과 대조 균주의 단백질체를 비교함으로써 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase 효소가 PHB의 생합성에 중요한 효소라는 것을 규명할 수 있었음 [10]
- (5) 또 다른 예로, leptin을 대량생산하는 대장균의 단백질체를 조사한 결과, 아미노산 세린의 생합성에 관련된 효소의 양이 감소하는 것을 발견하였으며, 감소한 효소 중의 하나인 시스테인 합성효소 유전자를 고발현하여 leptin의 생산을 2배 이상 증가 시킬 수 있었음 [8]

라. 대사체 및 대사량체 분석

- (1) 더욱 정교해진 NMR, GC-MS, GC-TOF 그리고 LC-MS 등의 분석 장비의 개발로 말미암아, 대사체를 high-throughput으로 분석할 수 있게 되었음
- (2) 이러한 분석 장비를 이용하여 각기 다른 유전자 또는 환경에서 분리한 시료의 대사체의 상을 비교 분석함으로써 세포의 생리적인 상태에 관한 정보를 얻을 수 있음

- (3) 물론 아직 알려지지 않은 많은 대사물질들이 존재하지만, 일반적으로 세포내의 대사 물질의 숫자는 유전자의 숫자보다 적다고 할 수 있겠음
- (4) 양적인 복잡성 측면에서는 전사체나 단백질체에 비해 단순하며, 어떤 경우에는 첨단 분석 장비로도 검출이 되지 않는 대사물질이 존재할 수도 있기 때문에 아직도 완벽한 대사체 분석은 어렵다고 볼 수 있음
- (5) 그러나 대사체학과 전사체학 방법을 동시에 이용하여, 효과적으로 lovastatin의 생산을 촉진시킨 연구의 예가 있고, 또한 대사체학 정보를 이용하여 대사량을 분석하는 방법은 이제 아주 유용한 생명공학 연구 방법의 하나가 되었음 [32]
- (6) 대사체의 양뿐만이 아니라 대사경로를 따라 흐르는 대사량을 전체적으로 파악하는 대사량체 분석 (fluxome analysis) 법도 최근 가능해졌으며, 대사모델을 가지고 전산모사를 이용하거나, C^{13} 으로 표지된 탄소원을 이용하여 세포내에 대사물 또는 단백질 중에 함유된 C^{13} 동위원소 함량 분포를 가지고 대사 모델을 활용하여 대사량을 역추적 하는 방법이 쓰임 [35]

마. 시스템 생명공학

- (1) High-throughput 분석 방법과 더불어, 대사모델을 이용한 전산모사는 대사공학의 중요한 구성요소임
- (2) 유전자 수준에서의 변화 또는 발효 조건의 변화가 어떻게 세포의 대사에 영향을 미치는지를 예측하는데 *in silico* modeling의 방법이 쓰이며, 나아가 얻어진 결과는 새로운 균주 개발의 전략을 제시하는데 유용하게 쓰일 수 있음
- (3) 유전체 염기서열 분석에 의한 시스템레벨의 미생물의 유전자 발굴은 유전체레벨의 *in silico* 모델을 구축할 수 있게 하였으며, 이러한 모델들은 대사반응의 정적 상태를 가정한 후 대사반응의 화학양론에 근거하여 얻어진 정적인 모델이므로 속도론적인 정보는 얻을 수가 없음
- (4) 물론 보다 포괄적인 동적 모델의 생성도 가능하겠지만, 정보의 부족으로 아직은 실현이 여의치 않으며, 이러한 포괄적인 모델을 구축하려는 노력으로 E-Cell 시스템의 개발을 들 수 있겠지만, 현재로서는 정적인 모델들이 균주 개발을 위해 사용되고 있음
- (5) 일단 *in silico* 대사 모델이 구축되어지면 다양한 조건에서의 대사량의 분

포를 계산할 수가 있으며, 나아가 어떠한 유전자의 조절이 전체적으로 대
사량의 분포에 어떠한 영향을 미치는지도 분석이 가능함

- (6) 예를 들면, constrained based flux analysis를 통하면, 각종 최적화 알고
리즘을 이용하여 세포내 각 유전자들의 돌연변이가 목적 산물의 생성에
미치는 영향을 조사할 수 있음 [6]

[표 1] 시스템 생명공학 데이터베이스와 대사체학에 쓰이는 소프트웨어 [6]

Database	Description	Availability
Primary sequence and genomics databases		
DDBJ	DNA Database of Japan	http://www.ddbj.nig.ac.jp
EMBL	Europe's primary nucleotide sequence resource	http://www.ebi.ac.uk/embl.html
Entrez Genomes	NCBI's collection of databases for the analysis of viral, prokaryotic and eukaryotic genomes	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Genome
GOLD	Information regarding complete and ongoing genome projects	http://www.genomesonline.org/
MBGD	Microbial genome database for comparative analysis	http://mbgd.genome.ad.jp/
TIGR	Microbial genomes and chromosomes	http://www.tigr.org/tdb/mdb/complete.html
Microarray databases		
ArrayExpress	Public repository for microarray data by EMBL	http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress
GEO	High-throughput gene expression, molecular abundance data repository by NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/
SMD	A microarray research database for Stanford investigators and their collaborators	http://genome-www.stanford.edu/microarray
Protein sequence and proteomics databases		
COG	Clusters of orthologous groups of proteins	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG
MIPS	Protein and genomic sequence database	http://mips.gsf.de/
PAD	A database for statistical and comparative analyses of the predicted proteomes of fully sequenced organisms	http://www.ebi.ac.uk/proteome/
SWISS-PROT	Curated protein sequence database with a high level of annotation	http://www.expasy.org/sprot
STRING	Predicted functional associations between proteins	http://www.bork.embl-heidelberg.de/STRING
GELBANK	A database of two-dimensional gel electrophoresis (2DE) gel images of proteomes	http://gelbank.anl.gov
SWISS-2DPAGE	A database containing ~1200 entries in 36 reference maps	http://www.expasy.org/ch2d/
Metabolic pathways database		
BioCarta	Online maps of metabolic and signaling pathways	http://www.biocarta.com/genes/allPathways.asp
BioSilico	Integrated metabolic database system	http://biosilico.kaist.ac.kr
BRENDA	Enzyme names and properties: sequence, structure, specificity, stability, reaction parameters	http://www.brenda.uni-koeln.de/
Klortho	Biochemical Compounds Declarative Database	http://www.biocheminfo.org/klortho/
LIGAND	A composite database consisting of COMPOUND, GLYCAN, REACTION, and ENZYME databases	http://www.genome.ad.jp/ligand/
MetaCyc	A database of nonredundant, experimentally elucidated metabolic pathways from more than 240 different organisms.	http://metacyc.org/
PathDB	A rational database for metabolic information accessed through a Java client program.	http://www.ncgr.org/pathdb/
UM-BBD	A database containing information on microbial biocatalytic reactions and biodegradation pathways	http://umbbd.ahc.umn.edu/
Program Characteristics Availability		
FBA	Flux balance analysis, phase plane analysis, robustness analysis	http://systemsbiology.ucsd.edu/downloads/fba.html
FluxAnalyzer*	Metabolic flux analysis, flux balance analysis, structural pathway analysis, Static graphical representation, SBML support	http://www.mpi-magdeburg.mpg.de/projects/fluxanalyzer
Fluxor	Flux balance analysis, MOMA implementation SBML support	http://arep.med.harvard.edu/moma/biospicefluxor.html
SimPheny ^b	Flux balance analysis, phase plane analysis, structural pathway analysis, static graphical representation	http://www.genomatics.com/
INSILICO Discovery ^b	Metabolic flux analysis, flux balance analysis, structural pathway analysis, dynamic simulation, dynamic and static graphical representation, interface to database (KEGG)	http://www.insilico-biotechnology.com/
Metabologica*	Flux balance analysis, isotope flux analysis, structural pathway analysis, dynamic simulation, static graphical representation, SBML support	http://www.svizsystem.com/metabologica.htm
MetaFluxNet	Metabolic flux analysis, flux balance analysis, comparative flux analysis, dynamic graphical representation, SBML support, interface to database (BioSilico)	http://mbel.kaist.ac.kr/

*Flux calculation under MATLAB environment.

^bCommercial software.

- (7) 대사량의 분석과 예측을 위해서 다양한 도구들이 개발되고 있음
- (8) Gapesi는 가장 많이 쓰이는 프로그램으로 동역학적인 분석과 대사 조절 분석 (metabolic control analysis) 을 할 수 있고, DBsolve는 미분방정식과 비선형 방정식을 풀 수 있으며 Jarnac/SCAMP는 동역학적 및 정적 모사가 가능하며, BioSPICE는 최근에 개발된 도구로서 대사계 뿐만 아니라 유전자 조절 네트워크의 모델링에도 쓰일 수 있음 [23] (표 1)

2. 대사공학의 응용

- 다양한 균주에서의 대사공학을 적용한 사례는 다섯 가지 면에서 볼 수 있다 [28]. ①원균주에 의해 기존 생산되는 대사물질의 생산성 향상 ②균체성장과 대사물질 합성에 필요한 기질의 이용범위 확대 ③세포에 유해한 대사물질에 대한 저항성 향상 ④원균주에서 생산되지 않는 신규물질의 생산능력 부여 ⑤기타 세포 특성의 변화 (세포공학)
- 대사공학의 응용은 위의 범주중 하나에 속하는 것보다 여러 가지 범주가 복합되는 경우가 대부분임
- 예를 들어 섬유소 자원의 주성분인 자일로스로부터 에탄올이 생산되는 과정에는 *S. cerevisiae*나 *Zymomonas mobilis*가 사용되며, 자일로스를 이용할 수 있는 야생효모는 에탄올의 수율과 내성이 낮고 반대로 자일로스를 이용 못하는 *S. cerevisiae*는 에탄올의 수율과 내성이 높으므로 자일로스 이용 효모에서 자일로스 대사 관련 유전자를 *S. cerevisiae*에 발현시키면 자일로스에서 에탄올을 고농도로 생산할 수 있음
- 따라서 좋은 아이디어로 복합적이고 체계적인 대사공학 전략을 수립하는 것이 중요함

가. 야생균주에 의해 기존 생산되는 대사물질의 생산성 향상

- (1) 새로운 유전물질의 도입이나 생물체 내에 존재하는 유전자를 변형시켜 특정 대사물질의 대량발현을 유도함
- (2) 목표 대사물질로는 항생제, 비타민, 아미노산, 생체고분자 등 모든 일차대사산물과 이차대사산물이 포함될 수 있음
- (3) *Corynebacterium glutamicum*에서 라이신 생합성은 중간 대사산물로 생성되는 threonine에 의해 저해를 받으나, *C. glutamicum*에서 threonine 합성유전자를 무력화시켜 저해과정을 제거함으로써 라이신의 생산성과

수율을 향상시킨 것이 좋은 예이고, 그리고 대장균을 이용하여 숙신산을 효율적으로 생산하게끔 대사회로를 재배치한 것 등이 해당된다고 볼 수 있음 [11,27]

나. 균체성장과 대사물질 합성에 필요한 기질의 이용범위 확대

- (1) 생물체의 생육이나 대사물질의 생산에 이용할 수 있는 기질의 범위를 대사공학적 방법으로 확대할 수 있음
- (2) 대표적인 예는 치즈산업 부산물인 유당과 펄프산업 부산물인 자일로스의 이용률을 높이기 위한 연구로, 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*는 자일로스를 이용할 수 없지만 자일로스를 자일리톨로 환원시키는 xylose reductase 유전자를 세포내로 도입함으로써 자일로스를 이용하여 자일리톨을 생산할 수 있음 [7]
- (3) 미생물을 공장으로 이용하여 다양한 제품을 생산하는데 있어 소위 ‘먹이’가 항상 있어야하고, 그 ‘먹이’의 값이 공정의 경제성에 미치는 영향이 크면 클수록 저가의 기질을 원료로 사용하는 것이 중요하다는 점에서 꼭 검토되어야 함

다. 제노바이오틱(xenobiotic)의 분해 및 환경 분야 응용

- (1) 미생물을 이용한 유해물질의 분해는 화학적인 처리나 연소 등 기존의 방법들을 대체할 수 있는 새로운 대안으로 부각되고 있음
- (2) 벤젠, 톨루엔, 자일렌 등을 분해하는 합성경로를 응용하여 신규의 방향족 화합물 오염을 제거하는 연구도 진행되었고, TNT 등의 화합물을 분해하는 대사경로도 제작되었음
- (3) 그 외에도 다양한 제노바이오틱 분해경로가 환경문제 해결과 맞물려 활발히 연구되고 있으며, 대장균의 세포벽에 중금속 흡착 단백질인 metallothionins를 발현시키거나 polyhisididine을 발현시켜 니켈 이온의 제거율을 높일 수 있다는 연구결과도 좋은 예임 [5]

라. 야생형에서 생산되지 않는 신규물질의 생산능력 부여

- (1) 이 분야는 대사공학의 연구 분야 중 가장 광범위하게 연구되고 있음
- (2) 야생형에서 생합성할 수 없는 물질을 생산하기 위해 외래 유전자를 세포내로 도입하여 원균주의 생합성 기구들을 이용하여 신규물질을 고농도로

생산

- (3) 목포 대사물질로는 항생제, 자일리톨과 같은 당알콜, 생체고분자를 비롯한 여러 가지 유기물질의 생산에 응용되고 있음
- (4) 대장균은 styrene을 styrene oxide로 전환시키지 못하지만 *Pseudomonas* sp. 유래의 styrene monooxygenase 유전자를 세포내로 도입함으로써 styrene oxide를 효과적으로 생산할 수 있으며, 이 방법은 화학적인 합성 방법의 대체 공정으로 활발히 연구되고 있음 [30]
- (5) 또한 대장균을 이용해 완전 생분해성 고분자인 polyhydroxyalkanoates를 생산하게끔 대사회로를 조작한 것, 식물 이차대사 산물인 isoprenoids를 생산하게끔 한 것들이 좋은 예라할 수 있음 [21,36]

마. 기타 세포 특성의 변화

- (1) 균체 생육속도, 목포 대사물질의 생합성 속도, 내삼투압성, 내열성 등을 향상시키기 위해 세포의 생리적 특성 변화가 시도되고 있음
- (2) 이러한 기술들은 세포내의 중간대사 과정의 존절이 수반되지 않기 때문에 대사공학이라기보다는 세포공학에 가깝다고 할 수 있음
- (3) 세포공학이란 재조합 유전자 기술을 이용하여 세포의 생리적 특성을 우리가 원하는 방향으로 변경시키는 과정으로 정의됨
- (4) 메탄을 자화균인 *Methylophilus methylotrophus*는 glutamate dehydrogenase 유전자가 없어 암모니아를 자화하기 위해 ATP를 필요로 하는 glutamine synthase와 glutamate synthase system을 이용하며, 대장균에서 분리된 glutamate dehydrogenase 유전자를 *M. methylotrophus*에 도입하면 암모니아 자화능이 높아져 균체 생육속도가 현저하게 증가됨

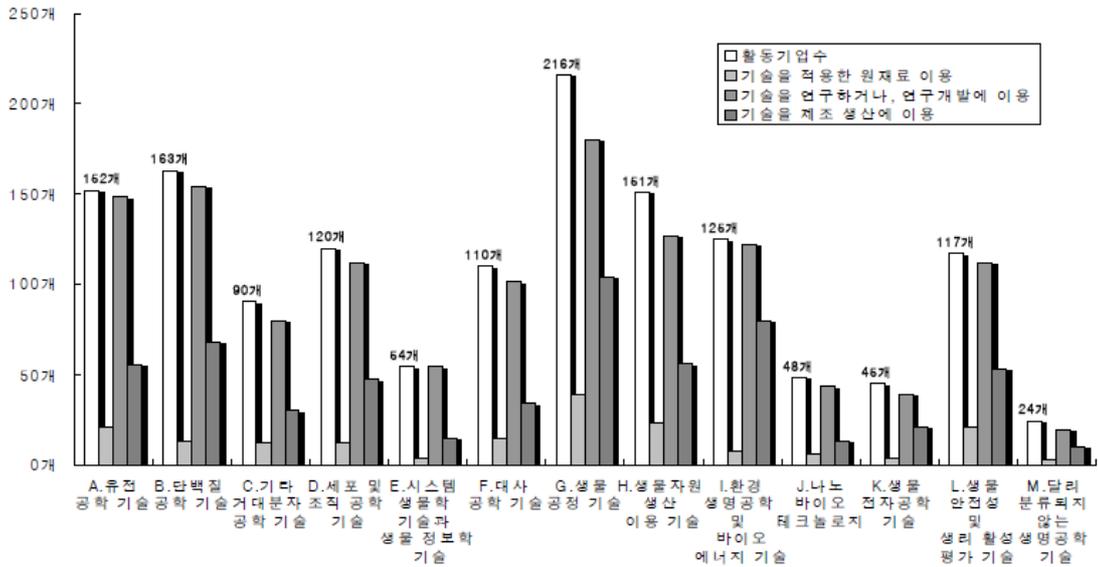
제 2 절 대사공학기술의 국내·외 활용 현황

1. 국내 대사공학기술 활용 현황

- 2005년도 산업자원부 기술표준원 보고에 따르면 2004년 국내에서 이용 기업 수 기준에서 볼 때 가장 보편적으로 사용되는 생명공학기술을 분석한 결과 '생물 공정기술'의 활용 비중이 가장 높아 전체 응답기업의 31.1%를 차지함 [2] (그림 1)
- 그 다음으로 이용 비중이 높은 기술은 '단백질 공학 기술'(23.5%), '유전공학

기술’(21.9%), ‘생물자원 생산 이용 기술’(21.8%) 순이었음

- 그러나 위 상위 3가지 기술도 횡적으로 볼 때 모두 대사공학기술의 범주에 포함된다고 할 수 있으며, 그 외에도 시스템 생명공학기술과 환경생명공학 기술을 포함하면 거의 모든 생명공학기술과 연계되어 있음을 알 수 있음



[그림 1] 2004년도 국내 생명공학기술 이용 분포 [2]

2. 국내 대사공학기술을 활용한 산업 현황

- 2005년도 국내 생물 산업 생산규모는 2조 7,714억 원(2003년 2조 791억 원)으로 전년대비 14.5%가 증가함 [2]
- 또한, 2004년 국내 생물 산업의 총공급(생산 및 수입) 규모는 3조 929억 원으로 2003년의 2조 5,923억에 비해 19.3%가 증가하였음
- 분야별 생산 비중을 살펴보면, ‘바이오식품’(41%)과 ‘생물의약’ (40%)이 대부분 차지하고 있으며, 생물화학(7%), 생물환경(5%), 생물검정, 정보서비스 및 연구개발(3%), 생물공정 및 기기(2%)의 순임
- 이 중에서 바이오식품과 생물의약산업 부분이 86%의 생산 비중을 보였고, 바이오식품산업이 가장 큰 비중을 차지한 것은 국내 아미노산 생산업체의 라이신 생산에 의한 것이며, 수출 비중을 보더라도 바이오식품산업이 가장 큰 부분을 차지하였는데 이 역시 미생물대사공학기술을 활용한 라이신 단일품목에 의한 것임 [2] (표 2)

[표 2] 2004년도 생물 산업 분야별 국내 판매액, 수출액 및 수입액 [2]

(단위 : 백만원, %)

대분류	생산				계	수입	계
	국내판매액		수출액				
	금액	비중	금액	비중			
생물의약산업	802,051	71.9	313,012	28.1	1,115,063	573,027	1,688,090
생물화학산업	149,747	81.1	34,852	18.9	184,599	51,629	236,228
바이오식품산업	297,055	25.9	848,204	74.1	1,145,259	7,752	1,153,011
생물환경산업	138,985	96.3	5,388	3.7	144,373	2,370	146,743
생물전자산업	10,472	55.2	8,509	44.8	18,981	700	19,681
생물공정 및 기기산업	43,914	77.8	12,540	22.2	56,454	152,781	209,235
바이오에너지 및 자원산업	14,705	95.1	756	4.9	15,461	2,880	18,341
생물검정, 정보서비스 및 연구개발업	83,387	91.4	7,809	8.6	91,196	20	91,216
전체	1,540,316	55.6	1,231,070	44.4	2,771,386	791,159	3,562,545

3. 국내 생물 산업에서 대사공학기술의 위상

- 생물 산업이란 생물공학기술을 바탕으로 생물체의 기능 및 정보를 활용하여 인류가 필요로 하는 유용물질을 생산하는 횡적 산업으로 관련 주요 기관들에서 정의하고 있음
- 현재 수많은 일·이차 대사산물, 재조합 단백질, 그리고 여러 생체고분자물질들이 미생물 대사를 통한 발효에 의해서 생산되고 있으며, 생물 산업의 중앙에서 대사공학기술이 활용되고 있음을 알 수 있음 (그림 1)
- 대사공학기술은 바이오산업 중에서도 바이오의약, 바이오화학, 바이오환경, 바이오공정 등 많은 분야에 지대한 영향을 미칠 수 있는 기술임
- 미생물대사공학기술은 정밀 화학제품, 범용 화학제품, 고분자, 의약품, 에너지 등을 생산하는 기술이며, 재생 가능한 식물자원과 생축매를 사용함에 따라 환경 친화적이며 에너지 소비가 적은 청정기술로 평가됨
- 미생물은 각각의 유전체에 있는 유전자 정보를 활용하여 효소와 같은 단백질 등을 생산하여 약 2,000여개의 화학반응을 일으키면서 번식과 생명을 유지하고 있는 일종의 미세공장(microfactory) 이라고 할 수 있음
- 인간은 이러한 미생물이 가지고 있는 다양한 화학반응에 대한 메카니즘을 응용하여 인간이 필요로 하는 유용한 물질을 생산 할 수 있으며, 식물과 같

이 재생 가능한 자원이 가지고 있는 당이나 전분을 효소 등과 같은 바이오 촉매를 사용하여 작은 분자로 분해하거나 발효에 의한 에탄올 등과 같은 바이오 연료, 의약품 중간체 등과 같은 바이오 화학소재, 바이오 고분자 등을 생산하는 것이 가능함

- 특히 산소가 포함된 화합물의 경우에는 화학적 공정에 의해 생산하는 것보다 생물학적 공정에 의해 생산하는 것이 훨씬 경제적이라 할 수 있음
- 대사공학 제품군은 크게 대체원료, 특수기능물질, 바이오폴리머, 바이오에너지로 분류됨
- 대체원료는 주로 미생물의 일차 대사산물이며, 글리세롤, 젖산, 아세트, 프로피온산, 부틸산, 부탄디올, 프로판디올, 구연산, 숙신산, 각종 아미노산 등을 포함
- 특수기능물질은 미생물의 2차 대사산물이며, 항생제, 의약품 중간체, 다당류, 미생물농약, 생리활성물질 등과 같은 생촉매, 바이오 식품소재 등이 있음
- 바이오폴리머는 미생물의 일차 대사산물로 얻어지는 유기산을 원료로 얻어지는 고분자 물질 등이 있음
- 바이오에너지는 바이오매스(biomass)를 전환하여 얻어지는 에탄올, 바이오디젤 등이 있음
- 대사공학기술은 제조업에서 사용하는 원료와 공정을 모두 바꿀 수 있는 잠재력을 가지고 있으며, 비용 절감과 환경보호, 그리고 품질 향상이라는 21세기 기업들이 추구하는 목표들을 달성할 수 있게 하여 기업경쟁력을 확보하는 중요한 기술임
- 더욱이 현재와 같은 고유가 시대에 있어 바이오촉매 기술에 의한 원유 의존도 저감은 필연적이라 할 수 있음
- 또한 대사공학기술은 인류가 영위하는 모든 제조업에서 가까운 미래에 나타날 것이며, 결국에는 기존산업의 지식 및 기술의 혁명을 일으켜 산업의 패러다임을 바꿀 것임
- 산업자원부의 발표에 따르면 2003년도 주용 국내 바이오산업제품 현황의 최상위 7개 품목 중 사료첨가제 라이신을 비롯하여 미생물대사공학기술을 활용한 5개 품목이 선정되었음 [1]
- 이들 제품들의 국내 바이오산업 생산금액 비중이 42%로 거의 절반에 가까운 비중을 차지하고 있으며, 비록 빈혈치료제와 같은 블록버스터 급의 제품은 현재 없지만, 이는 대사공학기술의 중요성을 다시 한 번 부각시키고 있

음

- 그리고 품목이 다양하지 못하다는 점은 아직까지 국내에서 대사공학연구의 필요성을 의미함 [1] (표 3)

[표 3] 2003년도 주요 국내 바이오산업제품 현황 [1]

(단위 : 백만 원, %)

No.	제품	생산금액(비중)	내수금액	수출금액
1	사료첨가제 라이신	5,060(24)	280	4,800
2	식품첨가물 핵산	1,840(9)	90	1,750
3	혈액 증강제 알부민	794(4)	644	150
4	B형 간염백신	633(3)	183	450
5	항생제 중간체 7-ACA	544(3)	72	472
6	감미제 아스파탐	525(3)	25	500
7	혈우병 치료제	409(2)	407	2

4. 국외 대사공학기술 활용 현황

- 세계 각국은 대사공학기술 특히 범용 화합물의 연구개발과 상업화를 위하여 국가적인 차원에서 많은 노력을 경주하고 있음
- 미국의 경우 각각 2020년과 2050년 화학원료의 20% 및 50%를 바이오매스에서 생산하려는 목표를 설정하고 DOE, USDA 등을 중심으로 대사공학 연구 개발을 집중지원하고 있으며, 일본은 경제 산업성이 중심이 되어 바이오 프로세스실용화사업과 바이오플라스틱활용사업을 진행하고 있음 [33]
- 산업계의 움직임도 매우 활발한데, 세계적인 화학/생명공학 기업인 DuPont, Monsanto, Cargill, Dow, Genencor, DSM, BASF 등은 젓산, 프로판디올, 구연산, 숙신산, 각종 다당류 등을 대사공학을 이용하여 생산하고 있으며, 그 종류와 양은 급속한 증가 추세에 있음
- OECD 과학기술회의는 2004년 “Biotechnology for Sustainable Growth and Development”에 대한 결의안에서, 생명과학의 발전이 건강, 환경, 산업, 농업, 에너지 전반에 새로운 해결책임을 제시하며, 지속 가능한 성장 및 경제 개발을 위하여 재생가능자원에 대한 생물공학 연구가 촉진되어야 함을 결의하였고, 공적·사적 부문에서의 회원국 간 적극적인 협력을 촉구함
- 이에 따라 EU는 ‘EuropaBio’를 통하여 “Bio-based Economy”를 실현하기 위한 촉진정책을 발굴 및 지원하고 있으며, 이와 관련된 재생 가능한 바이오자원 활용, 화학원료·무공해 바이오에너지·친환경 바이오합성기술 개발

에 박차를 가하고 있음

- 또한 2003년 McKinsey사의 예측에 의하면 대사공학기술을 핵심으로 혁신적으로 발전할 것으로 예측하였음
- 대표적인 대사공학기술 제품으로는 비타민 B₂ 생산 (Hoffmann La-Roche, 독일), 7-Amino-Cephalosporanic acid 생산 (Blochemie, 독일/오스트리아), Cephalexin 생산 (DSM, 네덜란드), Amino acids 생산 (Tanabe, 일본), S-chloropropionic acid 생산 (Avecia, 영국), Acrylamide (Mitsubishi Rayon, 일본), 바이오폴리머 (Cargill Dow, 미국), 식물성 기름 분해효소 (Cereol, 독일), 재생가능 연료 (Iogen, 캐나다) 등이 있음
- 또한 DuPont, Monsanto, Cargill, Dow, Genencor, Maxygen, Diversa, DSM 등 기업들이 젖산, 프로판디올, 구연산, 숙신산, 각종 아미노산, 비타민, 항생제, 다당류, 미생물 농약, 생리활성물질 등을 대사공학을 통해 생산하고 있음



제 3 장 대사공학 이용 국내·외 산업계 동향

제 1 절 국내의 기술개발 동향 및 지원 정책

1. 국내 산업계 동향

- LG 화학, SK, CJ를 포함한 대사공학 분야의 대기업을 필두로, 정밀화학회사를 비롯하여, 다수의 대사공학 기반 바이오벤처기업들이 관련기술 및 제품개발에 본격적인 관심을 기울이고 있음
- (주)CJ는 아미노산, 핵산 부문에서는 고생산성 균주 및 신 공정을 독자적으로 개발하여, 세계 1위 수준의 기술력을 확보하였고, 친환경소재 등 미래 지향적 바이오제품 개발에 노력하고 있음
- (주)대상은 환경사업의 일환으로 전분을 이용한 생분해성 소재를 개발 완료하고 이를 이용한 생분해성 쓰레기봉투, 전자제품 포장용 완충재, 컵라면 용기 등 1회용 제품을 개발하여 공급중임
- (주)한국 BASF는 대상으로부터 인수한 라이신 공장을 운영하고 있으며, 리보플라빈을 생산하는 곰팡이 생산균주인 *Ashbya gossypii*의 대사공학적 연구를 통해 식물성 기름으로부터 비타민 B₂를 한 단계의 반응으로 생산하는 것을 진행 중임
- (주)엘비엘코프는 바이오메스에서 바이오에탄올을 생산하는 기술을 개발하여 동남아 국가에 관련 기술을 수출함
- (유)다산엔지니어링은 바이오메스에서 바이오디젤 생산 공정을 개발하려는 노력을 하고 있음
- (주)인바이오넷은 한국생명공학연구원과 공동으로 팜유부산물에서 고부가가치 생물소재를 개발하고 있음

2. 정부 지원 정책 및 기술개발 과제

- 국내에서는 범국가 차원의 지원정책은 없는 실정으로, 체계적인 기술개발이나 인프라 구축, 인력 양성, 산업화 지원이 이루어진 바가 없으나 개별적으로 진행된 연구과제에 의해 일부 요소기술은 상당 수준에 도달함
- 미생물 프론티어 사업단 (미생물 Genome-scale 연구 및 시스템 생명공학)은 20여종의 산업 미생물의 유전체 정보 및 기능 정보를 바탕으로 세포대

사 재구성과 관련된 유용균주 육종연구, 게놈 크기를 최소화하기 위한 연구 및 게놈 단위 분석 및 엔지니어링, 또한 시스템 생물학 연구프로그램 내에서 *in silico* modeling에 대한 연구가 진행 중에 있음

- 효소자원 확보를 위해 자연에서 분리한 다양한 미생물로부터 유용한 산업 효소의 유전자를 분리하여 재조합단백질의 형태로 대량 생산하고 구조를 밝히는 연구가 진행되고 있으며, 최근 극한환경미생물의 메타게놈 유전자를 확보하여 신기능성 생물 촉매를 개발하기 위한 연구가 진행되고 있음
- 몇몇 벤처기업에서 combinatorial 단백질 공학기술을 적용하여 바이오 촉매 특성 개선 연구를 수행하고 있고, IT와 융합하여 *in silico* 단백질 구조분석과 안정성 예측과 같은 분야는 기반이 비교적 취약하지만 태동기에 있는 실정임
- 유전체 단위로 대규모의 단백질을 동시에 발현하고 대량 생산하는 시스템에 대한 연구가 진행 중이다. 항시발현시스템, 혼합발현시스템, 장동발현 시스템, 효모를 활용한 대량생산 시스템 등이 개발 중임
- 산업자원부 등의 지원과 청정공정 과제의 지원 등으로 생물 촉매를 활용한 청정공정과 정밀화학 중간체를 만드는 등의 프로젝트를 개별과제 형태로 수행하고 있음
- 화학공정을 연구하는 화학공학자들이 효소를 활용한 화학공정의 재구성을 통해 새로운 제품 창출을 연구 중임

2절 해외 주요국의 기술개발 동향 및 지원정책

1. 주요 경쟁국의 기술개발 프로그램

가. 미국

- (1) “Biomass R&D Act 2000”에 의해 미국 에너지성 (DOE)과 농림부 (USDA)에서는 바이오매스 프로그램에만 2005년 8천만 불의 연구비를 지원하였고, ATP (Advanced Technology Program)은 바이오매스로부터 유용 화학제품을 제조하는 과제인 1,3-propandiol 과제에 3천만 불을 지원함 [33]
- (2) “2020 로드맵”을 통해 2020년까지 원료의 20%, 2050년에는 50%, 2099년에는 100%를 재생 가능한 생물자원(Renewable biochemicals)으로 대체

하는 로드맵을 실현하기 위한 정책을 수행 중에 있음

- (3) GTL(Genome-to-life) 내의 Microbial cell project를 중심으로 대사공학 관련 원천기술을 개발하고 있으며, NSF는 재생가능한 자원인 바이오매스로부터 근본적으로 석유자원을 대체할 수 있는 biorefinery 연구에 많은 노력을 경주하고 있음
- (4) 미국의 Bio-ethanol은 세금혜택과 정부기관의 구매지원을 통해 매년 10%씩 성장하였고, 옥수수로부터 2003년 7백만 톤을 생산하여 92%를 연료로 사용하고 있음

나. 일본

- (1) 경제산업성은 2004년 “바이오프로세스실용화사업”과 “바이오플라스틱활용사업”에 26억 엔을 투자하여 관련 기술을 확보하고 있으며, 2007년까지 투자를 2배로 확대할 계획임
- (2) 2001년 “Development of basic technologies for industrial process based on biological functions” 이라는 GreenBio Project를 통해 화학공정을 고효율/환경친화적 생물공정으로 전환을 추진 중임
- (3) 특히 “Host cell creation technology development” 프로그램을 통해서 *E. coli* 등 주용 산업미생물에서 불필요한 유전자를 제거한 “Minimum genome factory (MGF)” 균주를 제작하여 적은 에너지 사용과 부산물 생성을 통해 목적물의 생산증대를 위한 연구를 진행 중임

다. 유럽

- (1) ‘EuropaBio’를 통하여 “Bio-based Economy”을 촉진하기 위해 관련 부문을 규정하고 재생 가능한 바이오자원 활용 및 화학원료·바이오에너지·바이오합성기술 개발을 추진 중임
- (2) EuropaBio는 2050년경 화학산업에서 BT가 약 50%를 차지할 것으로 예상하며, 특히 정밀화학분야에서는 2010년까지 생산물의 60%를 산업 BT가 담당할 것으로 예상하였음
- (3) 생물체의 세포기능을 원하는 방향으로 조작하여 세포공장으로 활용하자는 “Cell factory” 프로그램으로 다양한 연구를 진행 중임
- (4) 네덜란드의 경우, 우선분야로 “Bio-based polymers”를 설정하여 폴리머 연구소 (Dutch polymer institute)와 산업미생물계놈연구센터 (Kluywer

center for genomics of industrial microorganisms)를 중심으로 구성된 Public private partnership 프로그램인 B-BASIC (Bio-based sustainable industrial chemistry)과의 협력을 통해 화학공정과 바이오촉매의 융합을 촉진하여 지속성을 위한 촉매기술 (Advanced catalytic technologies for sustainability, ACTS)을 육성 중에 있음

라. 중국

- (1) 과학기술부를 통해 구연산, 아스코빅산 등 범용 화학제품 생산시설을 확충하고 연간 150만 톤 규모의 Bio-ethanol 생산설비를 구축하는 등 대사공학 관련 인프라 구축을 급속히 추진 중임

2. 주요국의 관련 연구기관 현황

가. 독일은 Julich 소재 핵물리 연구소 내에 대사공학을 담당하는 두 개의 국립 생명공학연구소를 설립하여 운영 중이며, 아미노산과 재생화학원료를 주로 연구하고 있음

나. 핀란드는 국립연구소 VTT 내에 대사공학연구를 전담하는 Industrial biotechnology section을 두고 대사공학을 연구하고 있음

다. 네덜란드는 TNO 산하 바이오연구부와 Kluywer center for genomics of industrial microorganisms 등을 운영

라. 일본은 AIST 산하의 Biotech 연구소, 지구과학연구소, Keio 대학 내의 metabolomics 및 MGF 연구 네트워크 등 다차원의 연구소를 운영

마. 미국의 LLNL synthetic biology group, berkeley LNL synthetic biology를 한 section으로 두고 있는 Berkeley center는 대사경로, 유전적 조절경로, bio-nanostructure, molecular motors, biomembranes 등을 연구하고 있음

3. 해외 산업계의 발전 현황

- 가. 세계적인 화학업체인 듀폰은 7년 전 5% 수준이었던 BT를 이용한 화학소재 생산비율을 최근 25% 수준으로 상승시켰으며, 2010년 매출의 25%를 대사공학을 기반으로 할 것을 계획하고 있다. MIT와 연구 협력을 추진하고 Diversa 등과 연구 과제를 공동 수행하고 있음
- 나. Mitsubishi chemical은 Ajinomoto와 공동으로 숙신산 생산 기술을 개발하고 있으며, 생분해성 고분자인 PBS (polybutylene succinate)를 생산하여 Cargill의 PLA 시장에서 경쟁할 것으로 예상됨
- 다. Genencor는 Bio-ethanol 생산을 위한 cellulase 개량, 1,3-propandiol 생산을 통한 재생가능 biopolymer building-block을 생산하며, 또한 비타민 C 공정등을 개발하는 등 활발한 활동을 전개하고 있음
- 라. Niho shokubai는 포도당에서 1,3-propandiol 생산공정의 생산성 향상을 위해 기술을 개발 중임
- 마. BASF의 비타민 B₂ 생산시 기존의 화학합성대신 1단계의 발효공정을 도입하여 환경영향력 40% 감소, 원가 40% 감소의 효과를 거두었고, 대상의 아미노산 발효공장을 인수하고 Novozyme과 아미노산, 비타민, 광학활성 물질 생산에 협력 중임
- 바. Cargill-Dow는 석유원료에서 추출하여 제조하던 중합체들 대신 옥수수원료로 한 바이오폴리머를 생산하고 있으며, 석유가격이 상승할수록 경쟁력이 점차 높아질 것으로 예상됨
- 사. Cargill은 Dow와 전략적 제휴를 바이오폴리머 사업을 추진하였으며, 곡물 Major가 아닌 에너지 회사로 변신 중임
- 아. 바이오폴리머인 PLA (polylactic acid)의 현재 시장규모가 필름, 수축라벨, 카페트 등에서 45억 파운드이며, 향후 플라스틱 병과 같은 신규 수요에 의해 95억 파운드 시장으로 성장하여 market opportunity를 100억 불로 예상하고 있음

- 자. DSM은 'Plug-bug' system을 개발하고, 자연계의 유전자를 찾으면 개량하고 바로 생산하여 바이오촉매로 빠른 시간 내에 활용할 수 있는 프로그램을 내부적으로 운영, 25% 이상의 화학물질을 바이오 기반으로 제조한다는 방향으로 적용하고 있음
- 차. 항생제 Cephalexin 생산시 기존의 10단계 생·화학적 합성대신 발효와 효소반응으로 대체하여, 원료와 에너지에서 각각 65%의 환경적 효율 증가와, 기타 원가 50% 감소의 효과를 거두었음
- 카. Genencor 등의 바이오 기업뿐만 아니라 Toyota, Sony 등 바이오 비관련 기업도 대사공학기술을 미래 산업경쟁력의 핵심으로 평가하고, 기반 구축 및 활용 증대로 경쟁력 강화에 총력을 기울이고 있으며, 대표적인 대사공학 제품으로는 비타민 B₂ 생산 (Hoffmann La-Roche, 독일), 7-amino-cephalosporanic acid 생산 (Blochemie, 독일/오스트리아), Amino acids 생산 (Tanabe, 일본), S-chloropropionic acid 생산 (Avecia, 영국) 등이 있음

4. 해외 벤처기업의 발전 전략

- 가. Post-genome 연구역량의 확대와 함께 광범위한 신규 바이오 촉매 유전자원을 확보하고 구조기반 단백질공학과 조합기술-기반 단백질공학을 통해 다양한 바이오촉매 (Maxygen, Xencor, Applied molecular evolution 등)를 생산하고 있음
- 나. 바이오촉매로 중요하게 사용되는 단백질의 대량 발현 및 정제기술을 통해 다수의 생명체 유래의 바이오촉매를 발현하여 산업적으로 유용한 바이오촉매 (Diversa, BioTrove, Fluidigm 등)의 라이브러리를 구성하고 있다 .
- 다. 유전체, 전사체, 단백질체, 대사체 등을 통합하여 상호 작용을 연계한 시스템화하여 맞춤형 산업 균주를 개발하여 유용 신소재의 대량 생산을 실현하고자 함

제 4 장 대사공학의 대표적 연구 사례

1절 방향족 아미노산 및 유래 물질 생산

1. 방향족 아미노산의 종류 및 활용

- 가. 방향족 아미노산인 phenylalanine, tryptophan, tyrosine 그리고 그 유래 물질은 산업적으로 상당한 market volume을 구성하고 있음
- 나. Tryptophan은 제약과 식품 분야 활용에 많은 이점을 갖고 있음에도 불구하고 발효공정 중 발생하는 대량의 부산물에 의한 부작용으로 인해 수백만 톤의 단위로 사료 첨가제 용도로 생산되어짐
- 다. Phenylalanine은 주로 Nutrasweet 공정에 의한 저칼로리 감미제 아스파탐 생산을 위해 생산되며, 일부 식품 첨가제나 다른 화합물을 중간체로 활용됨
- 라. Tyrosine은 작은 단위로 생산되며 항-파킨스 질병의 치료제인 DOPA와 Basedow 질병 치료와 식이보충제로 활용됨 [12] (표 4)

표 4. 방향족 아미노산의 용도 및 시장 [12]

	Use	Main producers	Market volume (tpa) ^a	Listed price (USD/kg)	
				Feed/chemical	Pharma
L-Tryptophan	Feed additive, food additive, infusion liquids, injectables, antidepressant, treatment of pellagra, sleep induction (5-hydroxytryptophan, serotonin), nutritional therapy	Ajinomoto Co., Mitsui Chemicals, Tanabe Seiyaku Co., Kyowa Hakko Kogyo, Archer Daniels Midland, Amino GmbH	500-600	48-54	116-133
L-Phenylalanine	Aspartame precursor, infusion fluids, diet aids, nutraceutical, intermediate for synthesis of pharmaceuticals (HIV protease inhibitor, anti-inflammatory drugs, rennin inhibitors, etc.), flavor enhancer	Nutrasweet Kelco, Ajinomoto Co., Tanabe Seiyaku Co., Yoneyama Yakugin Kogyo Co., Daesang, Amino GmbH, Rexim/Degussa	11000-12000	20-24	30-40
L-Tyrosine	Raw material for L-DOPA production, treatment of Basedow's disease, dietary supplement	Ajinomoto Co., Kyowa Hakko Kogyo, Tanabe Seiyaku Co., Yoneyama Yakuhin Kogyo Co., Amino GmbH, Rexim/Degussa	150+	18-20	34-35

^a tpa, metric tons per annum in 1997 (source: Chemical Economics Handbook, SRI International, 1999).

2. 대량 생산을 위한 대사공학적 연구

가. 선도물질 (erythrose-4-phosphate, phosphoenolpyruvate)의 공급량 증가

- (1) 대장균에서 erythrose-4-phosphate의 공급을 증가시키기 위해 중심 효소인 transketolase의 유전자인 *tktA*를 과발현 시키고 경로 첫 단계를 증계하는 효소를 과발현시켜 생산성을 두 배 가량 증가시킴 [12]
- (2) Transketolase의 과발현은 대표적인 아미노산 생산 균주인 *Corynebacterium glutamicum*에서도 방향족 아미노산의 생산을 증가시킴
- (3) 그러나 transketolase의 과발현은 균주의 성장 속도가 느려지는 부작용도 생김

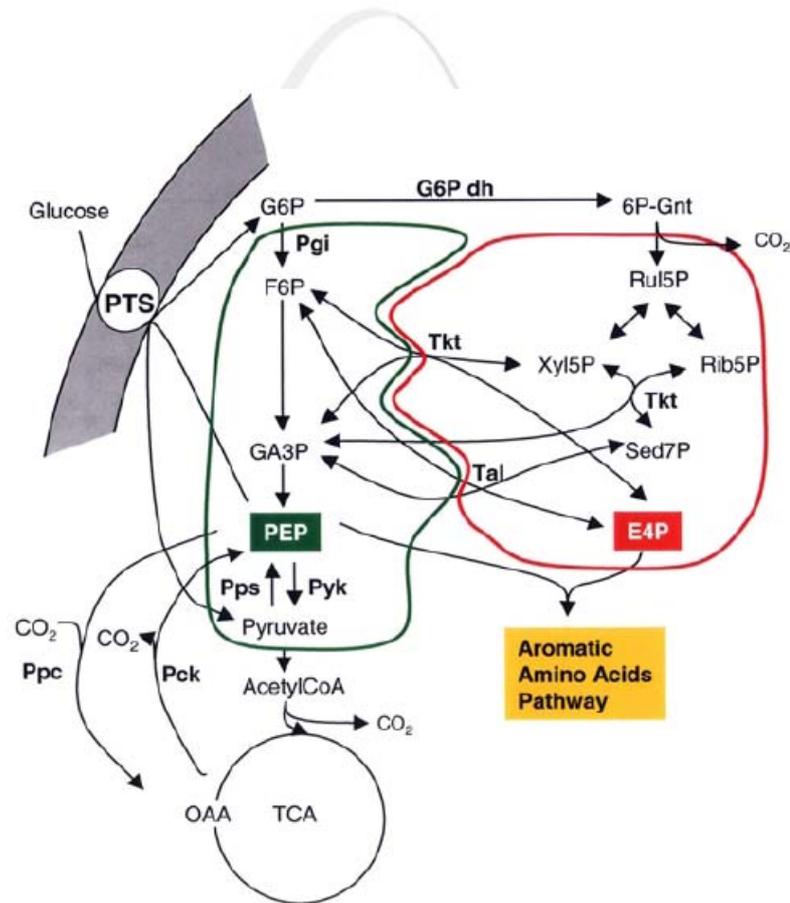


그림 2. *E. coli* 중심대사와 방향족 아미노산 선도물질 생합성 경로의 개략적 도식 [12]

- (4) Transaldolase의 과발현은 phenylalanine의 상당한 생산 증가를 가져왔고, transketolase와 동시에 과발현 할 경우 phenylalanine의 생산성이 더욱 증가하였음

- (5) 해당경로에 있는 phosphoglucose isomerase의 유전자를 제거할 경우 대장균에서 tryptophan의 생산을 거의 두 배 가량 향상시킴
- (6) 또 다른 선도물질인 phosphoenolpyruvate (PEP)의 공급 증가를 위한 연구도 많은 연구가 진행되었음
- (7) PEP는 일부 세포 대사의 중심 중간체이며, 대장균에서 PEP carboxylase를 불활성화 시켜 phenylalanine의 생산을 상당 수준 증가시켰고, pyruvate kinase의 불활성화를 통해서도 phenylalanine의 생산이 증가된 연구도 있음

나. Feedback 저해의 경감

- (1) 방향족 아미노산 생합성 경로에는 다양한 feedback 저해가 존재함
- (2) Tyrosine은 경로 첫 번째 효소인 DAHP synthase의 활성을 20% 정도 저하시키며, phenylalanine은 80%까지 저하 시키므로 생산균주들은 이들 산물에 의해 DAHP synthase 활성의 강력하게 감소며, allosteric 저해를 극복하기 위해 아미노산 유사체를 사용한 feedback 저해가 경감된 다양한 돌연변이 균주들이 제작되었음

3. 3-Dehydroshikimic acid 생산

- 가. 3-Dehydroshikimic acid는 방향족 아미노산 생합성 경로의 중간체로 catechol, vanillic acid, 그리고 adipic acid 등 다양한 산업 화합물 생산의 선도물질이며, 최근에는 조류독감 예방제인 oseltamivir (Tamiflu)의 선도물질로 두루 사용되어지고 있음
- 나. Shikimate에서 다음 단계로 내려가는 shikimate kinase 유전자가 제거된 대장균에서 shikimate의 생산량이 급격히 증가하였고, feedback 저해가 경감되어 DAHP synthase를 갖는 대장균 역시 증가된 shikimate 생산을 보고되었음

2절 *Corynebacterium glutamicum*에 의한 라이신 생산

1. *C. glutamicum*의 특성 및 활용

- 가. 1950년대에 Kinoshita에 의해 글루탐산 과량 분비 세균으로 동정된 이래 현재까지 아미노산 및 비타민 생산균주로 많이 이용되고 있음 [13]
- 나. 이 세균은 여러 가지 탄소원을 이용할 수 있으며, 최적 조건하에서 며칠 이내에 최고의 수율로 포도당을 글루탐산으로 전환시킬 수 있음
- 다. 현재 매년 약 백만 톤의 글루탐산이 이 세균으로부터 생산되고 있으며, 지난 40여 년 동안 이 다양한 아미노산을 생산하는 돌연변이 균주들이 제작되었고, 오늘날에는 연간 45만 톤의 라이신이 생산되어 주로 사료 첨가제로 사용되고 있음

2. 라이신 대량 생산을 위한 대사공학적 연구

- 가. 그림 3에서와 같이 *C. glutamicum*은 aspartate와 pyruvate를 사용하여 아미노산과 비타민 대량생산에 중요한 생합성경로와 수송경로를 갖고 있음 [13]

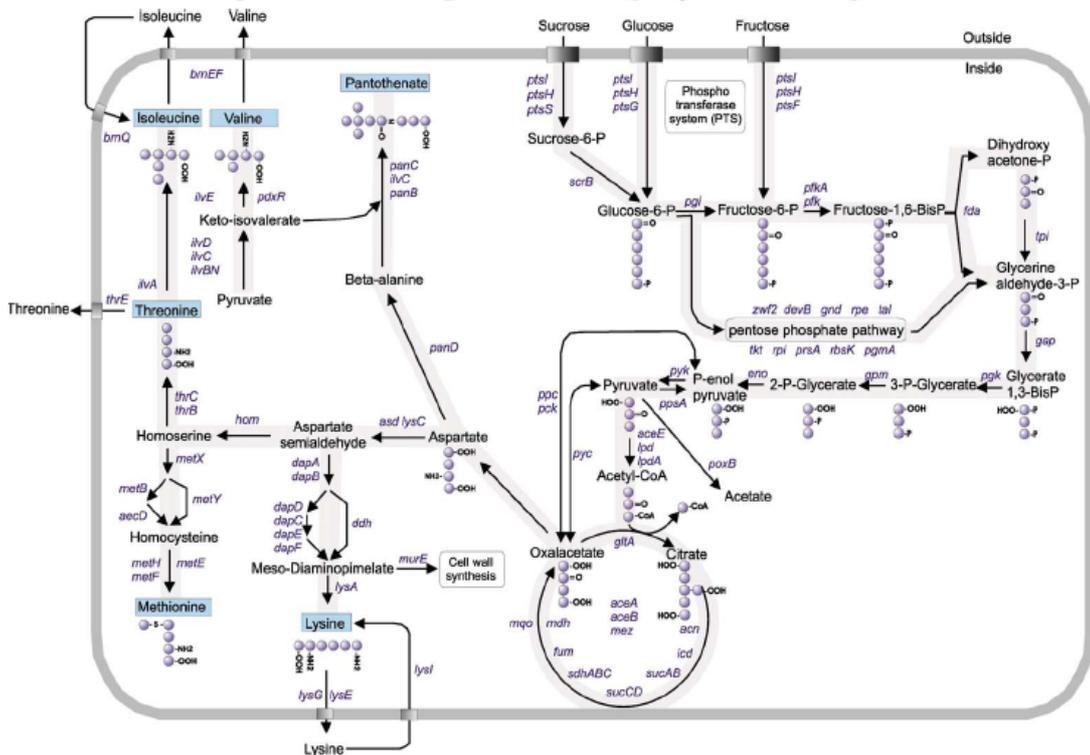


그림 3. *C. glutamicum*의 아미노산 및 비타민 생합성 경로

- 나. 대표적인 연구 사례로는 라이신의 전구체인 aspartate는 중심대사경로의

- oxaloacetate를 선도물질로 합성되어지며, oxaloacetate의 유입을 증가시키기 위하여 pyruvate로 전환되는 것을 저해
- 다. Aspartate에서 aspartate semialdehyde로 전환시키는 효소의 feedback 저해 경감
- 라. 분지경로의 단순화
- 마. 라이신 수송체의 발현조절을 하는 조절 유전자의 증폭
- 바. 합성된 aspartate semialdehyde가 다른 아미노산을 합성하는 경쟁회로의 유입 차단 등이 연구 되어있음 [26]
- 사. 현재는 *C. glutamicum*의 전체 염색체 서열이 밝혀졌고, 다양한 최신 분자생물학 기술과 오믹스 기술을 활용한 시스템 생명공학으로의 접근이 시도되고 있음 [26]

3절 Carotenoid의 생산

1. Carotenoid의 중요성 및 활용

- 가. Carotenoid는 다수의 미생물과 식물에서 생산되는 중요한 천연색소이며, 전통적으로 carotenoid는 음식, 첨가물 등의 영양보조제 산업에 많이 이용되어 왔음
- 나. 최근 발견된 건강관련 이로운 특성들로 인해 큰 관심을 갖고 다양한 종류의 carotenoid의 의약적 활용에 대해 연구되고 있음
- 다. 이종숙주에서 발현 가능한 상당한 수의 미생물과 식물의 carotenoid 생합성 관련 유전자들의 활용이 증가함에 따라 다양한 숙주 계에서 다양한 종류의 carotenoid 생산 연구 중임 [14]
- 라. 구조적으로 다양한 이들 색소는 종 특이적 색상, 광보호, 광흡수, 호르몬 전구체 등 매우 다양한 생물학적 기능을 나타냄
- 마. Carotenoid는 상업적으로는 식용색소, 사료첨가제, 최근 들어서는 화장품과 의학적 목적으로 이용되고 있음
- 바. 그러나 현재까지 β -carotene, lycopene, astaxanthin, canthaxanthin, capsanthin, lutein, annatto, β -apo-*carotenal* 등만이 화학합성, 발효 등을 통해서 상업적으로 이용 되고 있음
- 사. 식품, 의약, 사료산업에 중요성이 증가되면서 다양한 종류의 carotenoid를

대량생산하러 연구가 진행되고 있음

2. Carotenoid 대량생산을 위한 대사공학적 연구

- 가. 생합성경로의 생화학적 분석, 분자유전학, 그리고 최근에 발달된 유전체학의 도움으로 많은 환형 및 비환형 carotenoid의 합성경로에 대한 분자수준의 연구가 진행되었음
- 나. 현재까지 150여개의 생합성관련 효소를 암호화하는 유전자가 세균, 곰팡이, 효모, 식물로부터 동정되었음
- 다. 모든 carotenoid는 isoprenoid 경로로부터 출발되며, 두 종류의 경로가 밝혀졌으며, 이 경로로부터 첫 번째 isoprene (IPP)이 생성된다. IPP가 합성된 후 다양한 terpenoid가 합성되고 다양한 carotenoid가 합성 됨 (그림 4)

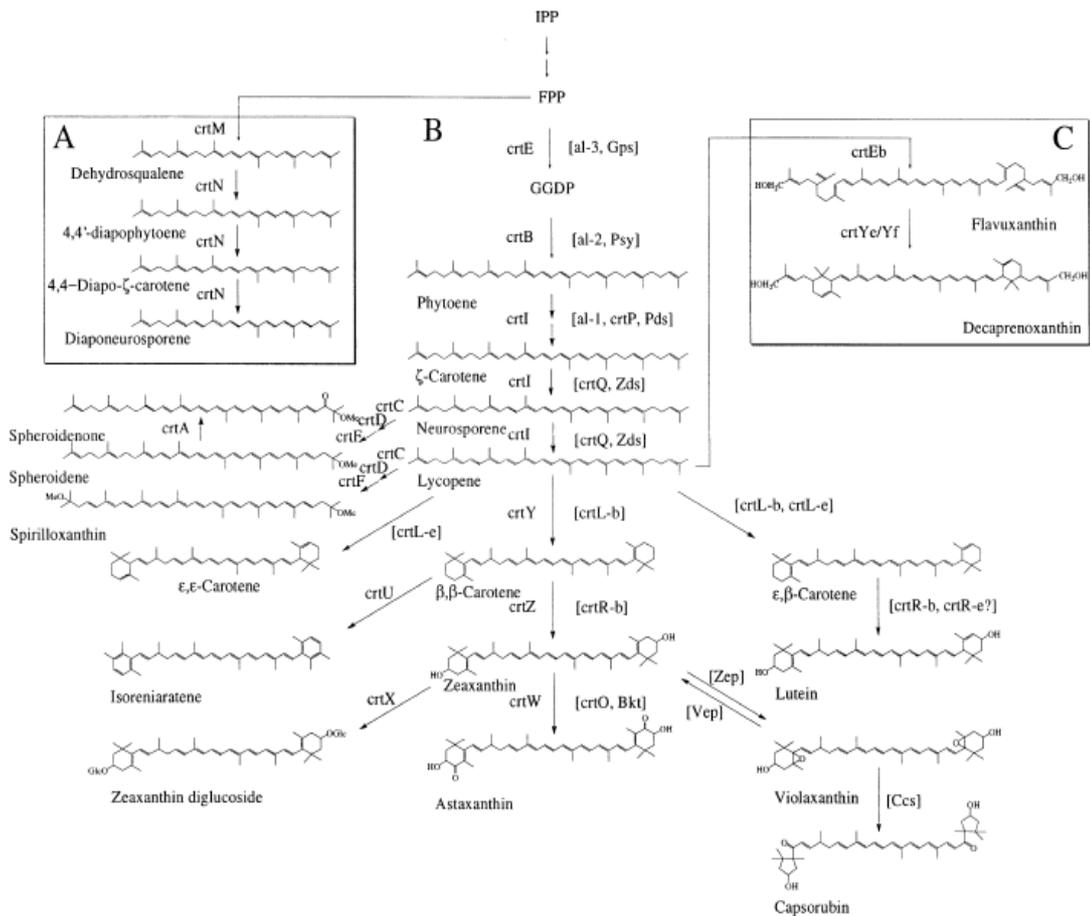


그림 4. 미생물과 식물의 carotenoid 생합성경로 [14]

표 5. 이종숙주 (*E. coli*, *S. cerevisiae*)에서의 조합적 carotenoid 생합성 [36]

Gene combination ^a	Major carotenoid	Reference
<i>E. coli</i>		
<i>crtM_{SA}</i> + <i>crtN_{SA}</i>	4,4'-Diaponeurosporene ^a	Wieland et al. 1994
<i>crtM_{SA}</i> + <i>crtN_{SA}</i> + <i>crtI_{EU}</i>	Diapolycopene ^a	Raisig and Sandmann 2001
<i>crtM_{SA}</i> + <i>crtN_{SA}</i> + <i>crtQ_{AN}</i>	Diapolycopene ^a	Raisig and Sandmann 2001
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{EU}</i>	Lycopene	Misawa et al. 1990
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{XD}</i> + <i>crtX_{EU}</i>	Lycopene	Verdoes et al. 1999
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{EU}</i> + <i>crtY_{EU}</i>	β-Carotene	Misawa et al. 1990
<i>crtE_{BEH}</i> + <i>crtI_{EH}</i> + <i>crtL-b_{AT}</i>	β-Carotene	Cunningham et al. 1996
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{EU}</i> + <i>crtY_{EU}</i> + <i>crtC_{RC}</i>	β-Carotene	Albrecht et al. 1997
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{SY}</i> + <i>crtY_{EU}</i>	ζ-Carotene	Takaichi et al. 1996
<i>crtE_{BEH}</i> + <i>crtI_{EH}</i> + <i>crtL-b_{AT}</i> or <i>crtL-e_{AT}</i>	ζ-Carotene	Cunningham et al. 1996
<i>crtE_{BEH}</i> + <i>crtI_{EH}</i> + <i>crtL-e_{AT}</i>	ε,ψ-Carotene	Cunningham et al. 1996
<i>crtE_{BEH}</i> + <i>crtI_{EH}</i> + <i>crtL-b_{AT}</i> + <i>crtL-e_{AT}</i>	ε,ψ-Carotene	Cunningham et al. 1996
<i>crtE_{BEH}</i> + <i>crtI_{RC}</i> + <i>crtL-b_{AT}</i>	β-Zeacarotene	Cunningham et al. 1996
<i>crtE_{BEH}</i> + <i>crtI_{RC}</i> + <i>crtL-e_{AT}</i>	Neurosporene	Cunningham et al. 1996
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{RC}</i> + <i>crtY_{EU}</i> or <i>crtL-b_{CA}</i>	Dihydro-β-carotene	Takaichi et al. 1996
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{EU}</i> + <i>crtY_{EU}</i> + <i>crtZ_{EU}</i>	Zeaxanthin	Misawa et al. 1990
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{EU}</i> + <i>crtY_{EU}</i> + <i>crtZ_{AA}</i>	Zeaxanthin	Misawa et al. 1995b
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{EU}</i> + <i>crtY_{EU}</i> + <i>crtZ_{HP}</i>	Zeaxanthin	Linden 1999
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{XD}</i> + <i>crtY_{EU}</i> + <i>crtX_{EU}</i> + <i>crtZ_{EU}</i>	Zeaxanthin	Verdoes et al. 1999
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{EU}</i> + <i>crtC_{RS}</i> + <i>crtY_{EU}</i> + <i>crtZ_{AA}</i>	Zeaxanthin	Albrecht et al. 2000
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{EU}</i> + <i>crtY_{EU}</i> + <i>crtZ_{EU}</i> + <i>crtX_{EU}</i>	Zeaxanthin-β-diglucoside	Misawa et al. 1990
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{RC}</i> + <i>crtY_{EU}</i> + <i>crtZ_{EU}</i>	Dihydrozeaxanthin	Takaichi et al. 1996
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{RC}</i> + <i>crtY_{EU}</i> + <i>crtZ_{EU}</i>	7,8-Dihydrozeaxanthin	Albrecht et al. 1997
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{EU}</i> + <i>crtY_{EU}</i> + <i>crtO_{SY}</i>	Echinonone	Fernandez-Gonzalez et al. 1997
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{EU}</i> + <i>crtY_{EU}</i> + <i>bkt_{HP}</i>	Canthaxanthin	Lotan and Hirschberg 1995
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{EU}</i> + <i>crtY_{EU}</i> + <i>crtW_{AA}</i> or <i>crtW_{EU}</i>	Canthaxanthin	Misawa et al. 1995a
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{EU}</i> + <i>crtY_{EU}</i> + <i>crtW_{AA}</i>	Canthaxanthin	Misawa et al. 1995b
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{EU}</i> + <i>crtY_{EU}</i> + <i>crtZ_{HP}</i> + <i>bkt_{HP}</i>	Canthaxanthin	Linden 1999
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{EU}</i> + <i>crtY_{EU}</i> + <i>crtZ_{EU}</i> + <i>crtX_{EU}</i> + <i>crtW_{AA}</i>	Astaxanthin-β-glucoside	Yokoyama et al. 1998
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{EU}</i> + <i>crtY_{EU}</i> + <i>crtZ_{AA}</i> + <i>crtX_{EU}</i> + <i>crtW_{AA}</i>	Astaxanthin	Yokoyama et al. 1998
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{EU}</i> + <i>crtY_{EU}</i> + <i>crtZ_{EU}</i> + <i>bkt_{HP}</i>	Astaxanthin	Kajiwara et al. 1995
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{EU}</i> + <i>crtY_{EU}</i> + <i>crtZ_{EU}</i> + <i>crtW_{AA}</i>	Astaxanthin	Misawa et al. 1995b
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{EU}</i> + <i>crtY_{EU}</i> + <i>crtZ_{AA}</i> + <i>crtW_{AA}</i>	Adonixanthin	Misawa et al. 1995b
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>Al-1</i> + <i>crtC_{RS}</i>	1-HO-3',4'-Didehydrolycopene	Albrecht et al. 2000
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{EU}</i> + <i>crtC_{RS}</i> + <i>crtD_{RS}</i>	1,1'-(HO) ₂ -Tetrahydro lycopene	Albrecht et al. 2000
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{EU}</i> + <i>crtC_{RC}</i>	1,1'-Dihydroxylycopene	Albrecht et al. 1997
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{RC}</i> + <i>crtC_{RC}</i>	Hydroxyneurosporene	Albrecht et al. 1997;
		Fernandez-Gonzalez et al. 1997
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{RC}</i> + <i>crtC_{RC}</i> + <i>crtD_{RS}</i>	Demethylspheroidene	Albrecht et al. 1997
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{EU}</i> + <i>crtEb_{CG}</i>	Flavuxanthin ^b	Krubasik et al. 2001a
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{EU}</i> + <i>crtEb_{CG}</i> + <i>crtYe_{CG}</i> + <i>crtYf_{CG}</i>	Decaprenoxanthin ^b	Krubasik et al. 2001a
<i>Yeasts</i>		
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{EU}</i>	Lycopene ^c	Miura et al. 1998b
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{EU}</i> + <i>crtY_{EU}</i>	β-Carotene ^c	Miura et al. 1998b
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{EU}</i> + <i>crtY_{EU}</i> + <i>crtZ_{AA}</i> + <i>crtW_{AA}</i>	Astaxanthin ^c	Miura et al. 1998b
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{EU}</i>	Lycopene ^d	Miura et al. 1998a
<i>crtE_{BEU}</i> + <i>crtI_{EU}</i> + <i>crtY_{EU}</i>	β-Carotene ^d	Miura et al. 1998a

^a C30 carotenoids

^b C50 carotenoids

^c *Candida utilis* as a host

^d *Saccharomyces cerevisiae* as a host

라. 특이하게도 이 물질은 일부를 제외하고 대부분의 유전자들이 이종숙주에서 발현이 가능하며, 이종숙주 주로 대장균에서 동정된 150개 유전자의 다양한 조합을 통해 대량생산하는 연구가 주를 이루었음 (표 5) [14]

마. 그리고 전구체인 isoprenoid 공급의 증가를 위한 IPP 생합성경로의 조작, 재조합 유전자 조합의 발현과 발현 조절, 그리고 세포막에 있는 성분이기 때문에 합성된 carotenoid 저장 공간의 확보에 대한 연구가 많이 이루어졌음

4절 Polyhydroxyalkanoate의 생산

1. Polyhydroxyalkanoate의 특성 및 활용

- 가. Polyhydroxyalkanoate (PHA)는 썩는 플라스틱의 원료로 잘 알려져 있으며, 다양한 생명체에 의해서 합성되는 천연 폴리에스테르를 형성한다.
- 나. 비록 가장 잘 연구된 PHA는 poly(3-hydroxybutyrate)이지만 140개 이상의 단량체가 존재함
- 다. PHA는 상업적으로 각종 용기, 가열접착제, 심혈관 등에 이용되며, 앞으로 상업적 플라스틱 생산에 주를 이룰 것임 [3]

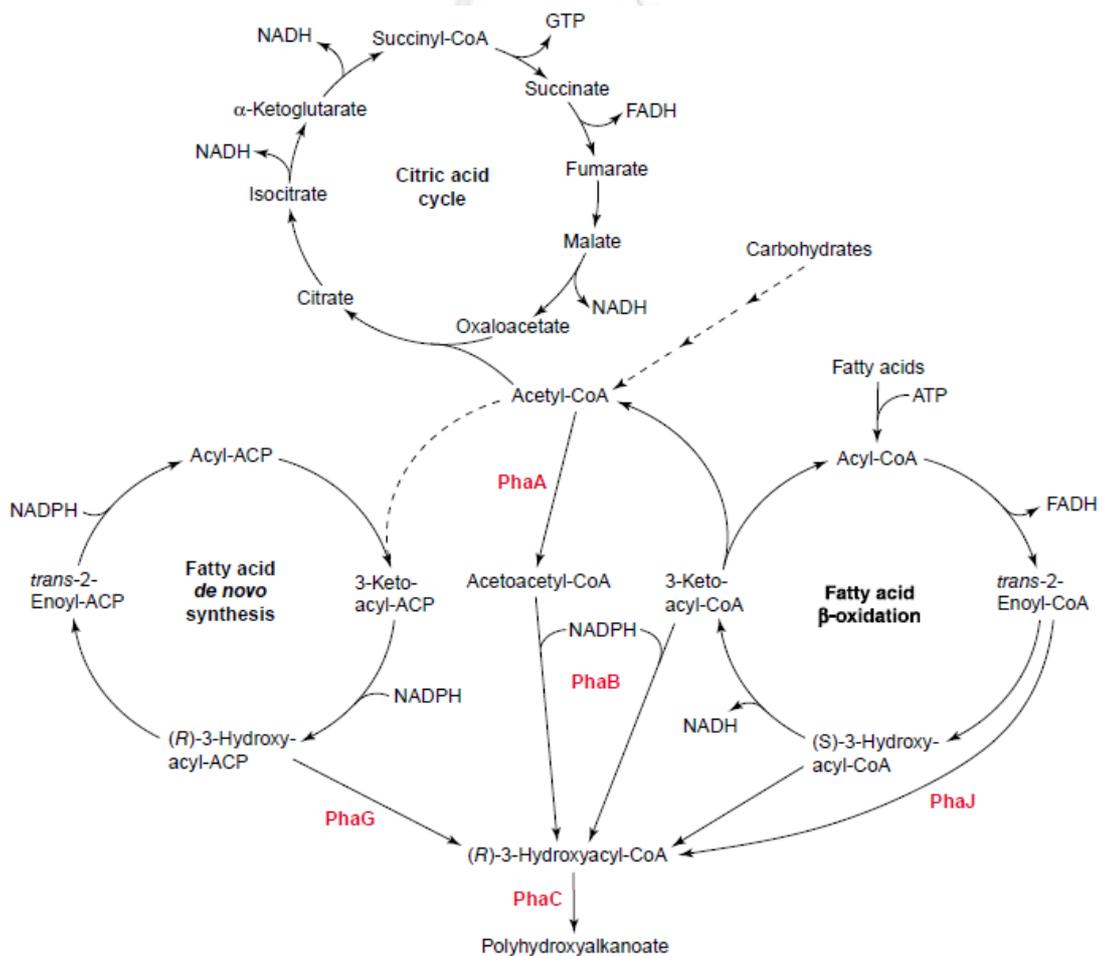


그림 5. 미생물 대사를 이용한 PHA 생합성 경로 [37]

- 라. 생분해 가능하고 재생가능 자원으로부터 만들어지는 생플라스틱으로서의

상업적 적용이외에도 학술적으로 PHA 생합성경로는 대사공학연구의 본보기가 되고 있음

- 마. 화학적으로 합성되는 polylactic acid와 같은 다른 생물 기초 폴리에스테르와는 다르게 PHA는 다량체 합성, 세포내 축적, 그리고 대사공학적으로 조작 가능하다는 것이 장점임

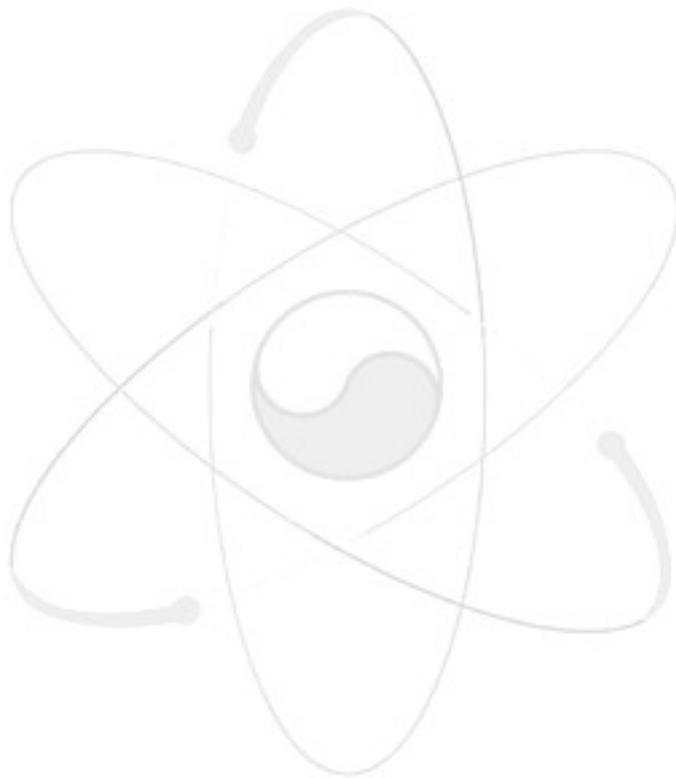
2. 대량생산을 위한 연구 결과

- 가. PHA 생합성 경로의 중심 유전자는 *phaABCGJ* 다섯 개로 이루어져 있으나, 중심대사경로와 지방산 생합성 및 분해 경로와 아주 밀접한 관계를 갖고 있기 때문에 대사회로의 조작은 매우 복잡함 [3] (그림 5)
- 나. 주요 연구는 발효 과정에 있어서의 기질 조작, 저해제를 사용한 경쟁적 관계에 있는 생합성 경로의 차단, 생합성경로 유전자들의 대장균과 같은 이종숙주에서의 발현, 이종숙주내의 경쟁적회로의 저해 및 제거, 숙주의 조절 유전자 조작 그리고 중심효소인 PHA synthase 효소의 재조합을 통한 역가 조작 등이 보고되었음

제 5 장 대사공학의 향후 전망

- 가. 비록 대사흐름분석 등의 최신기법보다는 ‘trial-and-error’식의 대사공학 접근에 의한 거의 대부분이었기는 하지만, 현재 대사공학 기법을 응용하여 상업화에 성공한 제품들이 속속 출시되고 있음
- 나. 현재 시장에 출시되어있는 제품 중에 대사공학이 응용되어진 대표적인 것은 생명공학관련 제품과 의약품으로써 1998년도 현재 생명공학제품의 시장규모는 세계적으로 약 300억불에 이르며 의약품의 시장규모는 약 1,800억 달러에 이르고 있음
- 다. 대사공학기술을 이용해 생산하는 아미노산의 경우 식품·사료·의약품을 합쳐 시장규모가 50억불에 달하고 있으며, 비타민 C의 전구체인 2-keto-L-gluconic acid의 경우 세계시장이 10억불을 육박하고 있고, polyketide 및 β -lactam계 항생제가 15억불, 에탄올, 숙신산, 젖산 등이 1억불을 넘어서고 있음 [19]
- 라. 현재 많은 수요가 있는 광학활성 화합물, 항생제, 생물고분자 및 그 전구체 등만 고려하여도 현재 대사공학기술을 필요로 하는 바이오텍 관련 산업은 최소 500억불에 달하는 것으로 예상됨
- 마. 향후 생물학적인 방법에 의한 제품생산에 있어서는 대사흐름 분석기술의 도입을 통한 합리적인 대사공학적 균주개발이 필수적일 것임
- 바. 특히 이렇게 대사공학적으로 개량된 super-bug의 이용으로 생산성 및 생산효율이 급격히 증가할 것으로 예상되고, 이제까지 존재하지 않던 신물질의 창출도 가능해질 것임
- 사. 따라서 앞으로 시장에 등장하는 거의 모든 생명공학 제품은 생산 및 개발 과정에서 대사공학기술의 도움을 받아야만 경쟁력이 있게 될 것임
- 아. 생명공학 제품의 시장규모와 대사흐름 분석기술 관련제품의 시장규모는 향후 거의 동일해 지리라 예상됨
- 자. 현재 순수생명공학제품의 시장은 연 30%의 높은 증가율을 보이고 있으며 5년 후의 세계시장의 규모는 약 740억불이 될 것으로 예상되고 있으며, 이에 따라 국내시장의 규모도 약 3조원이 될 것이라고 예상됨
- 차. 최근 신드롬으로써 자리 잡은 소위 오믹스 기술들도 대사공학에 활용될 수 있음
- 카. Genomics, transcriptomics, proteomics, metabolomics, fluxomics 그리고

physiomics 등 다양한 high throughput 기술들을 이용하여 얻어지는 무수한 데이터를 시스템 수준에서 이해하고 응용함으로써 보다 효율적인 대사공학이 가능할 것임 [31]



제 6 장 참고문헌

1. 산업자원부 기술표준원. 2004. 2003년도 국내 생물 산업 실태조사. 한국.
2. 산업자원부 기술표준원. 2005. 2004년도 국내 생물 산업 통계. 한국.
3. Aldor I.S. and J.D. Keasling. 2003. Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**(5):475-83.
4. Choi J.H., S.J. Lee, S.J. Lee, and S.Y. Lee. 2003. Enhanced production of insulin-like growth factor I fusion protein in *Escherichia coli* by co-expression of the down regulated genes identified by transcriptome profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:4737-4742.
5. Deng X., Q.B. Li, Y.H. Lu, D.H. Sun, Y.L. Huang, X.R. Chen. 2003. Bioaccumulation of nickel from aqueous solutions by genetically engineered *Escherichia coli*. *Water Res.* **37**(10):2505-11.
6. Fong S.S., B.O. Palsson. 2004. Metabolic gene-deletion strains of *Escherichia coli* evolve to computationally predicted growth phenotypes. *Nat. Genet.* **36**:1056-1058.
7. Hallborn J., M. Walfridsson, U. Airaksinen, H. Ojamo, B. Hahn-Hägerdal, M. Penttilä, S. Keränen. 1991. Xylitol production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology* **9**:1090 - 095.
8. Han M.J., K.J. Jeong, J.S. Yoo, S.Y. Lee. 2003. Engineering *Escherichia coli* for increased production of serine-rich proteins based on proteome profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5772-5781.
9. Han, M.J. and S.Y. Lee. 2003. Proteome profiling and its use in metabolic and cellular engineering. *Proteomics.* **3**:2317-2324.
10. Han M.J., S.S.Yoon, S.Y. Lee. 2001. Proteome analysis of metabolically engineered *Escherichia coli* cells producing poly(3-hydroxybutyrate). *J. Bacteriol.* **183**:301-308.
11. Hong, S.H. and S.Y. Lee. 2000. Metabolic Flux distribution in metabolically engineered *Escherichia coli* strain producing succinic acid. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**(4):496-501.
12. Johannes B., K. Marco, M. Ulrike, R. Leon, and W. Marcel. 2001.

- Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids and derived compounds. *Metabolic Engineering* **3**:289–300.
13. Kalinowski J., B. Bathe, D. Bartels, N. Bischoff, M. Bott, A. Burkovski, N. Dusch, L. Eggeling, B.J. Eikmanns, L. Gaigalat, A. Goesmann, M. Hartmann, K. Huthmacher, R. Kramer, B. Linke, A.C. McHardy, F. Meyer, B. Mockel, W. Pfefferle, A. Puhler, D.A. Rey, C. Ruckert, O. Rupp, H. Sahl, V.F. Wendisch, I. Wiegrabe, 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.* **4**:5–25.
 14. Lee P.C. and C. Schmidt-Dannert. 2002. Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1–11.
 15. Lee S.Y. 1994. Suppression of filamentation in recombinant *Escherichia coli* by amplified FtsZ activity. *Biotechnol. Lett.* **16**: 1247–1252.
 16. Lee S.Y. 1996. High cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* **14**:98–105.
 17. Lee S.Y. 1996. Plastic bacteria?: Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends Biotechnol.* **14**:431–438.
 18. Lee S.Y., H.N. Chang, and Y.K. Chang. 1994. Production of poly(β -hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli*. *Ann. NY Acad. Sci.* **721**:43–53.
 19. Lee S.Y., H.S. Choi, and T.Y. Kim. 2004. "Metabolic Engineering", *News & Information for Chemical Engineers* **22**(4):436–444.
 20. Lee S.Y. and J. Choi. 1999. Production and degradation of polyhydroxyalkanoate in waste environment. *Waste Management* **19**:133–139.
 21. Lee S.Y., J. Choi, and S.H. Lee. 2001. Production of polyhydroxyalkanoates by fermentation of bacteria. *Macromol. Symp.* **159**:259–266.
 22. Lee S.Y., J. Choi, K. Han, and J.Y. Song. 1999. Removal of endotoxin

- during the purification of poly(3-hydroxybutyrate) from gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(6):2762-2764.
23. Lee S.Y., D.Y. Lee, and T.Y. Kim. 2005. Systems biotechnology for strain improvement. *Trends. Biotechnol.* **23**:331-379.
 24. Lee S.Y., K.M. Lee, H.N. Chang, and Steinbuchel. 1994. Comparison of *Escherichia coli* strains for synthesis and accumulation of poly-(3-hydroxybutyric acid), and morphological changes. *Biotechnol. Bioeng.* **44**:1337-1347.
 25. Lee Y., I.T. Lim, K. Han, and S.Y. Lee. 2000. Preparation of alkyl (R)-(-)-3-hydroxybutyrate by acidic alcoholysis of poly-(R)-(-)-3-hydroxybutyrate. *Enzyme. Microb. Technol.* **27**(1-2):33-36.
 26. Mattheos K. and S. Gregory. 2005. Strain improvement by metabolic engineering: lysine production as a case study for systems biology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**:361-366.
 27. Morbach S., H. Sahn, and L. Eggeling. 1996. L-Isoleucine production with *Corynebacterium glutamicum*: Further flux increase and limitation of export. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:4345 - 351.
 28. Nielsen, J. 2001. Metabolic engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:263-283.
 29. Ohnishi J., S. Mitsuhashi, M. Hayashi, S. Ando, H. Yokoi, K. Ochiai, M. Ikeda. 2002. A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine producing mutant. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**:217-223.
 30. Panke S., B. Witholt, A. Schmid, and M.G. Wubbolts. 1998. Towards a biocatalyst for (S)-styrene oxide production: Characterization of the styrene degradation pathway of *Pseudomonas sp.* Strain VLB120. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(9):3546.
 31. Park, S.J., S.Y. Lee, J. Cho, T.Y. Kim, J.W. Lee, J.H. Park, and M.J. Han. 2005. Global physiological understanding and metabolic engineering of microorganisms based on omics studies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**:567-579.

32. Sanford K., P. Soucaille, G. Whited, and G. Chotani. 2002. Genomics to fluxomics and physiomics – pathway engineering. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**:318-322.
33. U.S. Department of Energy. 2003. Biomass Program–Multi year technical plan. USA.
34. Wang F. and S.Y. Lee. 1997. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of filamentation-suppressed recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(12):4765-4769.
35. Wittmann C. and E. Heinzle. 2001. Modeling and experimental design for metabolic flux analysis of lysine-producing *Corynebacteria* by mass spectrometry. *Metab. Eng.* **3**:173-191.
36. Zepeck F., T. Grawert, J. Kaiser, N. Schramek, W. Eisenreich, A. Bacher, and F. Rohdich. 2005. Biosynthesis of isoprenoids. purification and properties of IspG protein from *Escherichia coli*. *J. Org. Chem.* **11**:70(23):9168-74.

서 지 정 보 양 식

서 지 정 보 양 식					
수행기관보고서번호		위탁기관보고서번호		표준보고서번호	
KAERI/AR-807/2008					
제목 / 부제		국내·외 미생물 대사공학기술의 현황 분석보고서			
연구책임자 및 부서명 (AR,TR 등의 경우 주저자)		조민호 (방사선생명공학연구부)			
연구자 및 부서명		임상용, 김동호 (방사선생명공학연구부)			
출판지	정읍	발행기관	한국원자력연구원	발행년	2008
페이지	p.	도표	있음(√), 없음()	크기	A4
참고사항					
공개여부	공개(√), 비공개()		보고서종류	기술현황분석보고서	
비밀여부	대외비(), __ 급비밀				
연구위탁기관			계약번호		
초록 (15-20줄내외)					
<p>바이오산업(Biotechnology industry)은 현재 세계적인 Mega-Trend이며, 그 중심에 대사공학기술이 있음. 현재 수많은 일·이차 대사산물, 재조합 단백질, 그리고 여러 생체고분자물질이 미생물 대사를 조작하여 생산되고 있으며, 세계 각국은 미생물 유래 유용산물 연구개발과 상업화를 위하여 국가적인 차원에서 많은 노력을 경주하고 있음. 게놈서열이 밝혀짐에 따라 많은 새로운 유전자들의 기능과 생물학적 역할이 밝혀졌고, 이를 통해 세포대사의 이해를 한 층 더 높일 수 있었으며, 발현체학, 단백질체학, 그리고 대사체학 등의 omics 기술을 통한 균주 개량이 폭넓게 시도되고 있음. 대사공학을 통하여 만들어진 집적된 대사의 총괄적 이해는 생명공학기술의 응용, 목적 물질 생산을 위한 합리적인 전략 고안과 약제 후보 탐색 혹은 유전자치료 설계 등의 연구·개발에 중요한 위치를 차지하며, 이를 위하여 미생물 대사공학을 통한 유용산물 생산을 위한 국내·외 연구 동향과 기술현황을 분석하였음.</p>					
주제명키워드 (10단어내외)		바이오산업, 대사공학, 미생물, omics 기술			

BIBLIOGRAPHIC INFORMATION SHEET					
Performing Org. Report No.		Sponsoring Org. Report No.		Standard Report No. INIS Subject Code	
KAERI/AR-807/2008					
Title / Subtitle		A Status Report on the Global Research in Microbial Metabolic Engineering			
Project Manager and Department (or Main Author)		Joe Min Ho (Radiation Research Center for Biotechnology)			
Researcher and Department		Lim Sang Yong and Kim Dong Ho (Radiation Research Center for Biotechnology)			
Publication Place	Jeongeup	Publisher	KAERI	Publication Date	2008
Page	p.	Ill. & Tab.	Yes(<input checked="" type="checkbox"/>), No (<input type="checkbox"/>)	Size	A4
Note					
Open	Open(<input checked="" type="checkbox"/>), Closed(<input type="checkbox"/>)				
Classified Document	Restricted(<input type="checkbox"/>), <input type="checkbox"/> Class		Report Type	State of the Art Report	
Sponsoring Org.			Contract No.		
Abstract (15-20 Lines)		<p>Biotechnology industry is now a global 'Mega-Trend' and metabolic engineering technology has important role in this area. Therefore, many countries have made efforts in this field to produce top value added bio-products efficiently using microorganisms. It has been applied to increase the production of chemicals that are already produced by the host organism, to produce desired chemical substances from less expensive feedstock, and to generate products that are new to the host organism. Recent experimental advances, the so-called '-omics' technologies, mainly functional genomics, proteomics and metabolomics, have enabled wholesale generation of new genomic, transcriptomic, proteomic, and metabolomic data. This report provides the insights of the integrated view of metabolism generated by metabolic engineering for biotechnological applications of microbial metabolic engineering.</p>			
Subject Keywords (About 10 words)		Biotechnology industry, metabolic engineering, microorganisms, '-omics' technologies			