

숙신산 생합성을 위한 *Enterococcus* sp. RKY1의 분리와 특성

류화원* · 윤종선¹ · 강귀현²

전남대학교 생물화학공학과, ¹공업화학과, ²화학공학과

Isolation and Characterization of the *Enterococcus* sp. RKY1 for Biosynthesis of Succinic Acid. Ryu, Hwa-Won*, Jong-Sun Yun¹, and Kui-Hyun Kang². *Department of Biochemical Engineering, ¹Department of Chemical Technology, ²Department of Chemical Engineering, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea - Succinic acid, valuable C₄-dicarboxylic acid as a renewable alternative feedstock, is currently produced commercially by the petrochemical process, but extensive efforts have been devoted to establish the biological process for mass production of succinic acid. In this study, the bioconversion of fumaric acid to succinic acid was investigated. We isolated an *Enterococcus* sp. RKY1 KCTC 8890P, facultative bacterium, capable of the bioconversion of fumaric acid to succinic acid very rapidly and efficiently. At batch fermentation, the amount of succinic acid production increased with increase in initial fumaric acid from 40 to 100 g/L. With fumaric acid of 70 g/L, the average specific and volumetric production rate, molar yield were reached up to 0.64 g/g · h, 4.87g/L · h, and 96.5%, respectively. Maximum concentration of succinic acid of 88.9 g/L was achieved with molar yield of 89% with fumaric acid of 100 g/L in less than 20 hours.

Key words: *Enterococcus* sp. RKY1, bioconversion, fumaric acid, succinic acid

숙신산과 그 유도체는 식품, 의약, 화장품, 직물, 도금과 폐가스세정 등에 이용되는 매우 폭 넓은 용도를 가지며[2, 6], 더 나아가 1,4-butanediol, γ -butyrolactone, 2-pyrrolidone, n-methyl-2-pyrrolidone, adipic acid, maleic anhydride 등과 같은 공업적으로 중요한 화합물을 합성하는 중간체로서 매우 가치있는 C₄-dicarboxylic acid이다[7, 21].

현재 숙신산은 n-butane을 maleic anhydride로 산화시켜 이 maleic anhydride를 maleic acid로 가수화시킨 후 수소화반응을 거쳐 숙신산이 합성되는 석유화학공정에 의해서만 상업적으로 생산되고 있다[4, 11]. 그러나 현재 매장된 원유의 가용량이 약 40년 정도로 밖에 예상되지 않고 있어 숙신산은 물론 숙신산으로 합성이 가능한 공업적으로 중요한 여러 화합물이 석유화학공정에 의존하고 있기 때문에 재생가능한 대체원료(renewable alternative feedstocks)로서 숙신산 생합성 공정의 개발은 매우 중요하다. 실제 석유화학공정에 의한 숙신산 생산 단가는 0.60 \$/kg인 반면 생물화학공정에 의해서는 0.51 \$/kg으로서 더 경제성을 가지고 있으며[11, 20], 앞으로 더 효율적인 생산 및 분리정제 공정과 우수한 미생물의 개발로 생물화학공정에 의한 숙신산 생산이 더 큰 경제성을 가질 것으로 기대된다.

1976년 C. P. Davis 등[3]에 의해 TCA회로의 최종 대사산물로서 숙신산을 가장 높은 수율로 대사하는 *Anaer-*

*obiospirillum succiniciproducens*가 개의 목과 분변으로부터 최초로 분리된 후 1980년 후반에 들어 옥수수로부터 유도되는 포도당과 같은 저가의 탄소원을 이용한 숙신산의 생합성이 세계적으로 관심을 끌면서 본격적인 연구가 시작되었다. 특히 미국에서 집중적으로 숙신산 생합성이 연구되고 있는데 Michigan Biotechnology Institute[8, 17, 24], Oak Ridge National Laboratory[14-16]와 National Renewable Energy Laboratory[5, 7, 21] 등이 미국 에너지성의 'Succinic Acid Project'에 참여하여 *A. succiniciproducens*에 의한 숙신산 생합성 공정에 대한 연구가 꾸준히 진행중이다.

현재 연구가 집중되고 있는 혐기적 박테리아 *A. succiniciproducens*에 의한 숙신산 생합성은 몇가지 문제점을 안고 있다. 첫째 이산화탄소 고정효소인 phosphoenolpyruvate carboxykinase에 의해 Embden-Meyerhof-Parnas(EMP)해당경로의 중간 대사물질인 phosphoenolpyruvate(C₃, CH₂COP₃H₂COO⁻)를 oxaloacetate(C₄, 'OCCCOCH₂COO⁻)로 전환시키는데 고순도의 이산화탄소(C₁, CO₂)를 공급해 주어야 하고[15, 19], 둘째 발효종료후 숙신산과 부산물인 초산이 2:1로 생성[12, 19]될 뿐만 아니라 기질 및 생성물 저해에 의해 고농도의 숙신산 생산이 곤란하여 상대적으로 분리정제 비용이 증가한다. 마지막으로 이 미생물은 엄격한 혐기성 박테리아이기 때문에 다루기가 힘들어 실제 산업화시 발효공정의 불안정을 초래할 수도 있다.

따라서 생물화학공정에 의한 숙신산 생산의 다른 방법

*Corresponding author
Tel. 82-62-530-1842, Fax. 82-62-530-1849
E-mail: hwryu@chonnam.chonnam.ac.kr

으로서 푸마르산으로부터 숙신산으로의 생물전환(bio-conversion)이 최근에 X. Wang 등[23]에 의해 fumarate reductase 활성이 증폭된 재조합 *E. coli*를 배양하여 발효 24시간만에 푸마르산으로부터 약 73%의 수율로 숙신산 30 g/L를 생산하였다고 보고하였다. 이 생물전환반응은 전자공여체로 글리세롤이나 포도당 등을 사용하여 최종전자전달효소인 fumarate reductase에 의해 전자수용체로서 푸마르산이 숙신산으로 환원된다. Fumarate reductase는 4개의 subunit로 세포막에 결합되어 있으며, 69 kd의 knob와 27 kd의 stalk로 구성된 촉매활성을 갖는 이량체와 분자량 15, 13 kd으로 된 anchor부분의 이량체로 구성되어 있다[9, 10, 22].

푸마르산은 *Rhizopus*속의 곰팡이에 의해 비교적 고농도로 생산되는데 R. H. Rhodes 등[18]은 발효 72시간 후에 포도당 130 g/L로부터 푸마르산 88 g/L를 얻었으며, N. Cao 등[1]은 회전식 생물막 접촉기를 이용하여 발효 24시간만에 포도당 107 g/L로부터 푸마르산 93 g/L를 생산하였다고 보고한 바 있다. 이 푸마르산 발효액을 숙신산 생합성에 이용하기 위해서는 고농도의 푸마르산을 숙신산으로 생물전환하는 미생물이 요구된다. 즉, *Rhizopus*속 곰팡이에 의해 포도당으로부터 고농도의 푸마르산을 호기적으로 생성하여, 이 발효액을 통성 박테리아의 기질로 하여 고농도의 숙신산을 생산하다면 고순도 이산화탄소가 불필요하고, 발효액 부피당 생성물의 농도가 높아 분리정제 비용의 절감이 예상되어 더 경제성있는 숙신산 생합성 공정을 제공할 것으로 기대된다.

본 연구팀은 X. Wang 등[23]의 fumarate reductase 활성이 증폭된 재조합 *E. coli*외에는 아직까지 보고된 바 없는 고농도의 푸마르산을 숙신산으로 생물전환하는 통성 박테리아인 *Enterococcus* sp. RKY1을 분리하였으며, 이 미생물에 의한 푸마르산으로부터 숙신산으로의 생물전환을 연구하였다.

재료 및 방법

균주의 분리

본 연구에 사용된 균주는 탄소원 및 질소원이 제한된 균주분리배지(fumarate 5 g/L, yeast extract 1 g/L, K_2HPO_4 0.1 g/L, NaCl 0.1 g/L) 4 ml이 들어있는 6 ml 혈청병에 실험실내의 혐기균주를 진탕배양기에서 38℃, 200 rpm으로 48시간동안 배양하여 이 배양액을 HPLC로 분석하여 푸마르산을 숙신산으로 생물전환하는 균주를 1차 선별한 후 같은 방법으로 3회 반복하여 푸마르산을 숙신산으로의 전환능력이 우수한 균주를 분리하여 본 연구에 사용하였다.

배지 및 배양방법

전배양은 글리세롤 냉동보관균주 0.5 ml을 성장배지(fumarate 15 g/L, glucose 15 g/L, yeast extract 15 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, NaCl 1 g/L) 14 ml이 들어있는 20 ml 혈청병에 주사기로 접종하여 진탕배양기에서 38℃, 200 rpm로 6시간 동안 배양하고 같은 조건으로 1회 더 배양한 후, 이 배양액 2 ml을 성장배지 40 ml이 들어있는 50 ml 혈청병에 접종하여 같은 조건으로 4시간 동안 배양하여 접종균으로 사용하였다.

발효배지(fumarate 0~40 g/L, glucose 0~35 g/L, yeast extract 15 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, NaCl 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/L) 14 ml이 들어있는 20 ml 혈청병에 접종균 0.5 ml을 주사기로 접종하여 진탕배양기에서 38℃, 200 rpm으로 18시간 동안 배양하였다.

발효조 실험은 2.5 L 발효조(KF-2.5L, 한국발효기)에 1 L의 발효배지를 넣어 121℃에서 20분동안 고압멸균한 후 약 80℃로 냉각되었을 때 CO_2 를 20 ml/min으로 pH가 더 이상 떨어지지 않을 때까지 공급하여 발효조 내부의 산소를 CO_2 로 치환하고 발효중에는 CO_2 를 공급하지 않았다. 접종액 30 ml을 접종하여 38℃, 200 rpm, pH는 3N Na_2CO_3 를 첨가하여 7.0으로 조절하였고 탄소원 및 전자공여체로서 포도당(200 g/L)을 13 ml/hr의 유속으로 정량펌프를 이용하여 일정하게 발효조에 공급하였다.

분석방법

세포농도는 660 nm에서 분광광도계(UV-160A, Shimadzu Co., Japan)로 흡광도를 측정하였으며 시료는 분광광도계의 직선 영역 흡광도가 0.8이하가 되도록 10배 희석하여 측정하였으며 흡광도 0.5는 건조세포중량 0.55 g/L에 해당된다. Glucose농도는 G. L. Miller의 DNS법[13]을 사용하여 측정하였다. 유기산의 분석은 HPX-87H컬럼(Bio-Rad Co., USA)이 장착된 HPLC(Waters Ltd., USA)를 사용하여 정량하였으며, 분석조건은 다음과 같다. 이동상은 0.008N H_2SO_4 , 유량은 0.6 ml/min, 검출기는 UV 210 nm, 컬럼온도는 35℃였다. 전자수용체인 푸마르산염($^{\ominus}OOCCH=CHCOO^{\ominus}$)으로부터 숙신산염($^{\ominus}OOCCH_2CH_2COO^{\ominus}$)으로의 생물전환시 용이한 수율비교를 위하여 disodium fumarate와 disodium succinate($6H_2O$ 을 제외한 숙신산염)를 표준물질로 하여 보정하였다.

결과 및 고찰

생물전환균주의 분리 및 동정

탄소원 및 질소원이 제한된 푸마르산배지를 사용하여 푸마르산으로부터 숙신산으로 생물전환하는 활성이 높은 균주를 분리하였다. 이 균주를 생명공학연구소 유전자원센터 유전자은행(KCTC)에서 동정한 결과 그림양성

Table 1. Morphological and physiological characteristics of isolated *Enterococcus* sp. RKY1 KCTC 8890P.

1. Morphology	
Gram positive	
Cocci (spherical to ovoid shape)	
Present in pairs and short chains	
Colonies on solid media smooth, white	
2. Oxygen response for growth	
Aerobic growth	
Anaerobic growth	
3. Cellular fatty acids	
C _{18:1}	w9c/w12t/w7c 43.94%
C _{16:1}	w7c/c15:0 iso 2OH 13.42%
C _{19:0}	cyclo w8c 15.26%
C _{16:0}	21.25%, C14:0 6.13%

구균으로서 몇 개의 쌍으로 존재하는 통성박테리아 *Enterococcus*속으로 분류되어 *Enterococcus* sp. RKY1으로 명명하였으며, 현재 생명공학연구소 유전자원은행 유전자센터에 *Enterococcus* sp. RKY1 KCTC 8890P로 기탁되어 있다. Table 1에 분리균주의 형태학 및 생리학적 특성을 나타내었다.

포도당 및 푸마르산 농도의 영향

본 연구에서 분리한 *Enterococcus* sp. RKY1에 의한 푸마르산으로부터 숙신산 생물전환에 대한 전자공여체로서 포도당 농도의 영향을 살펴보기 위하여 푸마르산 20 g/L가 포함된 발효배지에 포도당 0, 5, 10, 15, 20, 25 g/L를 가하여 배양한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 이 미생물에 의한 숙신산 생물전환은 포도당 농도에 크게 의존하고 있으며 포도당이 없으면 세포성장 및 숙신산 생산이 거의 없으며, 포도당 농도가 커질수록 세포성장, 숙신산 생산량 및 푸마르산 소모량은 증가하였다. 포도당 15

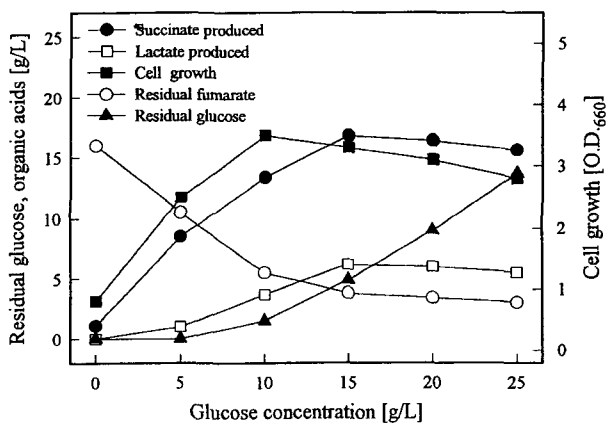


Fig. 1. Effect of glucose as an electron donor on the bioconversion of fumaric acid to succinic acid and cell growth by *Enterococcus* sp. RKY1 KCTC 8890P.
[Initial fumarate=20 g/L]

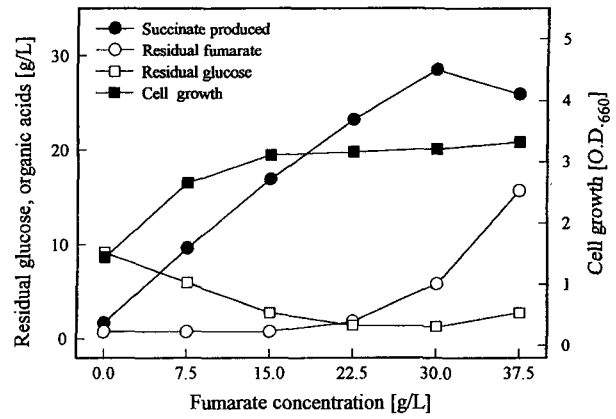


Fig. 2. Effect of fumaric acid as an electron acceptor on the bioconversion of fumaric acid to succinic acid and cell growth by *Enterococcus* sp. RKY1 KCTC 8890P.
[Initial glucose=20 g/L]

g/L에서 숙신산을 16.8 g/L를 생산하였으며 그 이상의 농도에서는 세포성장 및 숙신산 생산량이 거의 비슷하였다. 이는 혈청병 배양의 경우 배양후 약 12시간이 지나면 pH가 3.6~4.2까지 떨어져 매우 낮은 pH 때문에 세포생장이 거의 멈추어 포도당의 대사에 의한 전자공여작용이 거의 일어나지 않았기 때문으로 고려된다.

전자수용체로서 푸마르산 농도의 영향을 살펴보기 위하여 포도당 20 g/L를 포함한 발효배지에 푸마르산 0, 7.5, 15, 22.5, 30, 37.5 g/L를 가하여 배양한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 푸마르산이 없으면 세포생장이 O.D. 1.9로 상당히 낮았으며 숙신산 생산이 거의 일어나지 않았다. 푸마르산 농도가 증가할수록 세포성장 및 숙신산 생산량이 증가하여 푸마르산 30 g/L에서 숙신산을 28.5 g/L를 생산하였으며 그 이상의 농도에서는 숙신산 생산량이 약간 감소하였다. 이는 발효액의 낮은 pH와 고농도의 푸마르산이 *Enterococcus* sp. RKY1의 성장을 저해하는 것으로 고려된다. 따라서 이 *Enterococcus* sp. RKY1에 의한 푸마르산으로부터 숙신산으로의 생물전환은 전자공여체로서 포도당과 전자수용체로서 푸마르산의 농도에 크게 의존함을 보였다.

질소원의 영향

Enterococcus sp. RKY1에 의한 푸마르산으로부터 숙신산으로의 생물전환에 대한 질소원의 영향을 살펴보기 위하여 포도당 25 g/L, 푸마르산 30 g/L를 포함한 발효배지에 yeast extract, bactopectone, polypeptone, corn steep liquor(CSL)를 각각 15 g/L를 가하여 질소원에 따른 유기산, 세포성장, 포도당 및 푸마르산 소모량과 숙신산 생산량을 Table 2에 나타내었다. 발효 18시간 후 yeast extract 15 g/L에서 세포생장은 O.D. 3.7, 잔여 포도당은 3.1 g/L, 잔여 푸마르산은 6.4 g/L이었고, 숙신산

Table 2. Effect of nitrogen sources on the bioconversion of fumarate to succinate by *Enterococcus* sp. RKY1 KCTC 8890P.*

Nitrogen source [15 g/L]	Succinate [g/L]	Lactate [g/L]	Cell growth [O.D. ₆₆₀]	Residual glucose	Residual fumarate
Corn steep liquor	2.1	5.7	0.85	11.7	24.6
Bacto-peptone	4.4	5.5	1.97	12.3	23.1
Polypeptone	4.4	6.4	2.18	7.2	21.4
Yeast extract	20.6	6.3	3.71	3.1	6.4

*Cultivation was carried out for 18 hours at 38°C with aluminium-capped 20 ml serum bottle.

*Medium : glucose 15 g/L, fumarate 30 g/L, yeast extract 15 g/L, K₂HPO₄ 1 g/L, NaCl 1 g/L, MgCl₂ · 7H₂O 0.2 g/L.

생산량은 20.6 g/L로서 가장 우수하였다. 반면에 poly-peptone, bacto-peptone은 세포성장은 O.D. 2.0정도로 세포성장은 있었으나 잔여 포도당은 8~12 g/L, 잔여 푸마르산은 21~23 g/L이었고 숙신산 생산량이 4.3 g/L정도로서 yeast extract에 비해 숙신산 생합성에 부적합한 질소원이었다. CSL은 세포성장 및 숙신산 생합성이 거의 일어나지 않았다.

푸마르산으로부터 숙신산으로의 생물전환 수율이 가장 높았던 yeast extract 농도의 영향을 살펴보기 위하여 포도당 15 g/L와 푸마르산 30 g/L가 들어있는 발효배지에 0, 5, 10, 15, 20, 25 g/L을 각각 가하여 배양한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Yeast extract 농도가 증가할수록 세포성장 및 숙신산 생산량이 증가하다가 20 g/L이상

서는 그 증가량이 둔화되었다. 따라서 본 연구에서 분리한 *Enterococcus* sp. RKY1에 의한 푸마르산으로부터 숙신산 생물전환의 최적질소원은 yeast extract이었다.

인산염, 다른 유기산 첨가의 영향

인산염(K₂HPO₄)의 영향을 살펴보기 위하여 포도당 30 g/L, 푸마르산 30 g/L를 포함한 발효배지에 K₂HPO₄ 농도를 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 g/L를 가하여 38°C에서 18시간 동안 배양한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 숙신산 생산량은 인산염 농도에 거의 영향을 받지 않았으나 인산염 농도가 증가할수록 세포성장 및 포도당 소모량이 증가하였고 배양액중에 부산물인 젖산 생성량이 크게 증가함을 보였다.

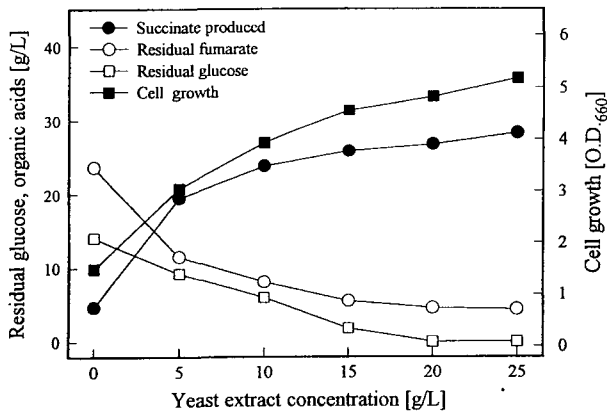


Fig. 3. Effect of yeast extract as a nitrogen source on the bioconversion of fumaric acid to succinic acid and cell growth by *Enterococcus* sp. RKY1 KCTC 8890P.

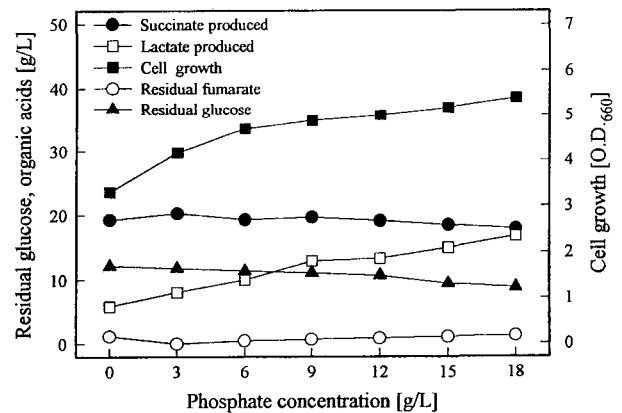


Fig. 4. Effect of K₂HPO₄ as a phosphate source on the bioconversion of fumaric acid to succinic acid and cell growth by *Enterococcus* sp. RKY1 KCTC 8890P.

Table 3. Effect of TCA cycle acids on the bioconversion of fumarate to succinate by *Enterococcus* sp. RKY1 KCTC 8890P.*

Organic acid [5 g/L]	Succinate [g/L]	Lactate** [g/L]	Formate** [g/L]	Cell growth [O.D. ₆₆₀]	Residual fumarate
Pyruvate	21.0	6.9	0.2	4.10	12.5
Acetate	20.0	7.2	0	3.97	13.8
Lactate	22.1	6.7	0.2	3.66	10.7
Propionate	11.6	8.9	0	2.96	18.3
Formate	18.9	6.4	0	2.97	12.8

*Cultivation was carried out for 18 hours at 38°C with aluminium-capped 20ml serum bottle.

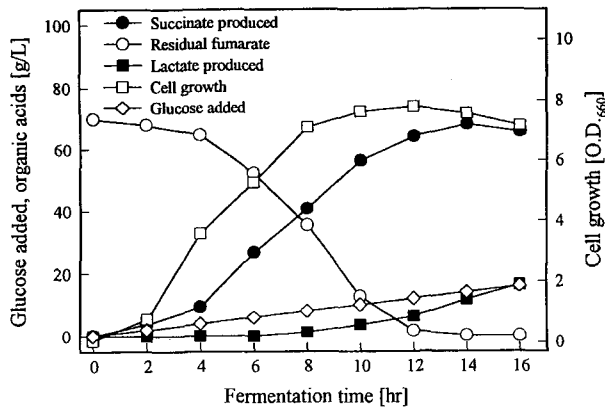
*Medium : glucose 15 g/L, fumarate 30 g/L, yeast extract 15 g/L, K₂HPO₄ 1 g/L, NaCl 1g/L, MgCl₂ · 7H₂O 0.2 g/L

**Concentration of organic acid produced.

Table 4. Effect of fumarate concentration as an electron acceptor on the bioconversion of fumarate to succinate by *Enterococcus* sp. RKY1 KCTC 8890P

Initial fumarate [g/L]	Fermentation time [h]	Succinate [g/L]	Cell growth [O.D. ₆₆₀]	Molar yield [%]	VP* [g/L · h]	SP** [g/g · h]
40	10	37.5	6.8	92.8	3.75	0.55
70	14	68.1	7.5	96.5	4.87	0.64
100	20	88.9	7.8	87.8	4.45	0.57

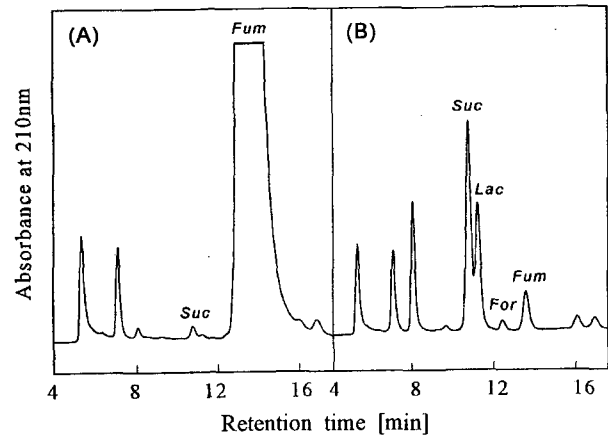
*VP: Average volumetric production rate [g-succinate/L · hr], **SP: Average specific production rate [g-succinate/g-cells · hr]

**Fig. 5.** Time course of the bioconversion of fumaric acid to succinic acid during a fermentor culture of *Enterococcus* sp. RKY1 KCTC 8890P.

TCA회로상의 다른 유기산의 첨가에 따른 숙신산 생합성의 상승 및 저해작용을 살펴보기 위하여 포도당 15 g/L, 푸마르산 30 g/L를 포함한 발효배지에 pyruvate, acetate, lactate, propionate, formate를 각각 5 g/L를 첨가하여 배양한 결과를 Table 3에 나타내었다. 세포성장은 pyruvate 5 g/L를 첨가한 경우에 가장 우수하였고 lactate 5 g/L를 첨가한 경우 세포성장은 약간 저해되었으나 숙신산 생합성 22.1 g/L로 가장 우수하였다. 반면에 propionate는 5 g/L 첨가한 경우 세포성장을 상당히 저해하였으며 숙신산 생산량이 11.6 g/L로 *Enterococcus* sp. RKY1에 의한 푸마르산으로부터 숙신산 생합성을 저해하였다.

푸마르산으로부터 숙신산으로의 생물전환 특성

최종전자전달효소인 fumarate reductase에 의해 전자수용체인 푸마르산이 숙신산으로 전환된다. 발효조실험을 통하여 최종전자수용체인 푸마르산 농도에 따른 숙신산 생합성에 미치는 영향을 연구하였다. 발효조 실험은 40, 70, 100 g/L의 푸마르산을 함유한 1L의 발효배지에 접종액 30 mL을 접종하여 38°C, 200 rpm, pH 7.0으로 배양한 결과를 Table 4에 나타내었다. 푸마르산 40 g/L에서는 발효초기에 푸마르산이 거의 고갈되어 더 이상의 생물전환이 진행되지 않아 숙신산 생산성이 낮았고, 푸마르산 100 g/L에서는 푸마르산에 의한 저해에 의해 발

**Fig. 6.** HPLC chromatograms of metabolites by *Enterococcus* sp. RKY1 KCTC 8890P.

(a) After 2 hours : fumarate, 68 g/L; succinate, 3.9 g/L

(b) After 14 hours : succinate, 68 g/L; lactate, 12 g/L; fumarate, 0.2 g/L; formate 1.2 g/L

효가 상당히 지연되어 숙신산 생산성이 낮았다. 이에 비해 푸마르산 70 g/L에서 평균 비생산속도 0.64 g/g · h, 평균 부피생산속도 4.87 g/L · h로 배양 14시간만에 몰수율 96.5%에 해당하는 숙신산 68.2 g/L를 생산한 결과는 Fig. 5와 같고, 이 발효과정중 2, 14시간 후 발효대사산물의 HPLC분석 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 이 연구결과는 X. Wang 등[23]이 푸마르산 40 g/L를 함유한 발효배지에서 fumarate reductase활성이 증폭된 재조합 *E. coli*를 배양하여 발효 24시간 후에 숙신산 30 g/L를 생산하였다고 보고하였으나 본 연구에서 분리한 *Enterococcus* sp. RKY1 KCTC 8890P는 이보다 훨씬 빠른 반응속도와 높은 수율로 고농도의 푸마르산으로부터 숙신산으로 생물전환하는 우수한 미생물임이 밝혀졌다.

요 약

재생가능한 대체원료로서 가치있는 탄소 4개의 디카르복실산인 숙신산은 현재 석유화학공정에 의해 상업적으로 생산되고 있으나, 최근 생물화학공정에 의한 숙신산 대량생산 공정개발을 위한 연구가 집중되고 있다. 본 연구에서는 전자공여체로 포도당과 전자수용체로서 푸마

르산을 이용하여 숙신산으로의 생물전환을 연구하였다. 먼저 고수율로 푸마르산을 숙신산으로 생물전환하는 통성박테리아 *Enterococcus* sp. RKY1 KCTC 8890P를 분리하여 그 특성을 조사하였다. 초기 푸마르산 농도 40, 70, 100 g/L으로 회분식배양한 결과 푸마르산의 농도가 증가함에 따라 숙신산 생성량이 증가하였다. 초기 푸마르산 농도 70 g/L에서 평균비생산속도, 평균부피생산속도 및 몰수율은 각각 0.64 g/g · h, 4.87 g/L · h, 96.5%이었고 최대 숙신산 농도는 초기 푸마르산 농도 100 g/L에서 발효 20시간에 89%의 몰 수율로 88.9 g/L가 얻어졌다.

감 사

본 연구는 1995년도 교육부 학술연구조성비(유전공학 연구)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Cao, N., J. Du, C. Chen, C. S. Gong, and G. T. Tsao. 1997. Production of fumaric acid by immobilized *Rhizopus* using Rotary Biofilm Contactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **63-65**: 387-394.
- Datta, R. 1992. Process for the production of succinic acid by anaerobic fermentation. *U. S. Pat.* No. 5, 143, 833.
- Davis, C. P., D. Cleven, J. Brown, and E. Balish. 1976. *Anaerobiospirillum*, a new genus of spiral-shaped bacteria. *Int. J. Syst. Bacteria.* **26**: 498-504.
- Davison, B. and G. Kulesa. 1995. Biologically produced succinic acid: A new route to chemical intermediates. *Alternative Feedstocks Program*. U. S. department of Energy.
- Glassner, D. A., P. Elankovan, D. R. Beacom, and K. A. Berglund. 1995. Purification for succinic acid produced by fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **51/52**: 73-82.
- Glassner, D. A., and R. Datta. 1992. Process for the production and purification of succinic acid. *U. S. Pat.* No. 5, 143, 834.
- Glassner, D. A., R. Datta, M. K. Jain, and J. R. V. Roy. 1991. Fermentation and purification process for succinic acid. *Eur. Pat.* No. 405, 707.
- Laivenieks, M., C. Vieille, and J. G. Zeikus. 1997. Cloning, sequencing, and overexpression of the *Anaerobiospirillum succiniciproducens* phosphoenolpyruvate carboxykinase (*pckA*) gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2273-2280.
- Lemire, B. D. and J. H. Robinson, R. D. Bradley, D. G. Scraba, and J. H. Weiner. 1983. Structure of fumarate reductase on the cytoplasmic membrane of *Escherchia coli*. *J. Bacteriol.* **155**: 391-397.
- Lemire, B. D. and J. H. Weiner. 1986. Fumarate reductase of *Escherchia coli*. *Methods Enzymol.* **126**: 377-386.
- Landucci, R. L., B. Goodman, and C. Wyman. 1994. Methodology for evaluating the economics of biologically producing chemicals and materials from alternative feeds-tocks. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **45/46**: 677-696.
- Millard, C. S., Y. P. Chao, J. C. Liao, and M. I. Donnelly. 1996. Enhanced production of succinic acid by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Escherchia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1808-1810.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 420-422.
- Nghiem, N. P., B. H. Davison, J. E. Thompson, B. E. Suttle, and G. R. Richardson. 1995. Fermentation process for the production of succinic acid. *17th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Colorado. USA.
- Nghiem, N. P., B. H. Davison, J. E. Thompson, B. E. Suttle, and G. R. Richardson. 1996. The effect of biotin on the production of succinic acid by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **57/58**: 633-638.
- Nghiem, N. P., B. H. Davison, J. E. Thompson, B. E. Suttle, and G. R. Richardson. 1997. Production of succinic acid by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **63-65**: 565-576.
- Podkovyrov, S. M. and J. G. Zeikus. 1993. Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxykinase, a catabolic CO₂-fixing enzyme, from *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 223-228.
- Rhodes, R. A., A. A. Lagoda, T. J. Misenheimer, and M. L. Smith. 1962. Production of fumaric acid by *Rhizopus arrizus*. *Appl. Microbiol.* **10**: 9-14.
- Samuelov, N. S., R. Lamed, S. Lowe, and J. G. Zeikus. 1991. Influence of CO₂-HCO₃ levels and pH on growth, succinate production, and enzyme activity of *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 3013-3019.
- Schilling, L. B. 1995. Chemicals from alternative feeds-tocks in the United States. *FEMS Microbiol. Lett.* **16**: 101-110.
- Stols, L., and M. I. Donnelly. 1997. Production of succinic acid through overexpression of NAD⁺-dependent maleic enzyme in an *Escherichia coli* mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2695-2701.
- Stouthamer, A. H. 1989. Bioenergetics and yields with electron acceptors other than oxygen. p. 384-397. In L. E. Erickson, and D. Y. C. Fung(ed.). Handbook on anaerobic fermentations. Merceel Dekker, Inc., NewYork.
- Wang, X., C. S. Gong, and G. T. Tsao. 1997. Bioconversion of fumaric acid to succinic acid by recombinant *E. coli*. *19th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Colorado. USA.
- Yoo, J. Y., and J. G. Zeikus. 1996. Modulation of phosphoenolpyruvate metabolism of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* ATCC 29305. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 43-49.

(Received July 23, 1998)