

반추위 미생물이 가진 Phosphoenolpyruvate에서 Oxaloacetate 경로 조절기작의 대장균에서의 모사와 C4대사의 영향

권영덕¹ · 권오희² · 이흥식³ · 김 필^{2*}

가톨릭대학교 ¹생명과학과, ²생명공학과, ³고려대학교 생명정보공학과

Imitation of Phosphoenolpyruvate to Oxaloacetate Pathway Regulation of Rumen Bacteria in Enteric *Escherichia coli* and Effect on C4 Metabolism. Kwon, Yeong-Deok¹, Oh-Hee Kwon², Heung-Shick Lee³, and Pil Kim^{2*}. ^{1,2}Department of Life Science and Department of Biotechnology, The Catholic University of Korea, Bucheon 420-743, ¹Department of Biotechnology, Korea University, Chungcheongnam-do 339-700, Korea - One of the fermentative metabolism of enteric *Escherichia coli* was imitated after rumen bacteria, which have high C4 metabolism. *E. coli* expresses phosphoenolpyruvate carboxylase (PPC) for the pathway between phosphoenolpyruvate (PEP) and oxaloacetate (OAA) during glycolytic condition while expresses phosphoenolpyruvate carboxykinase (PCK) during gluconeogenic condition. In contrast to enteric *E. coli*, rumen bacteria express the PEP-OAA pathway only by PCK. To verify the effect of the regulation imitation on the C4 metabolism of *E. coli*, PPC-deficient *E. coli* strain with PCK expression in glycolytic condition was constructed. The PEP-OAA regulation modified *E. coli* strain increased 2.5-folds higher C4 metabolite than the wild type strain. The potential use of C4 metabolism by regulation control is discussed.

Key words: Phosphoenolpyruvate (PEP), oxaloacetate (OAA), phosphoenolpyruvate carboxykinase (PCK), phosphoenolpyruvate carboxylase (PPC), *Escherichia coli* physiology, regulation

미생물의 중심대사인 해당작용(glycolysis), 구연산회로(TCA cycle), 오탄당경로(pentose phosphate pathway) 등의 조절을 통하여 다양한 탄소대사물을 생산하기 위한 연구들이 많은 생명공학자들에 의해 수행되어왔다. 대표적으로 탄소중심대사에서 유래하여 산업화까지 성공한 대사물들은 C2 대사물(ex. ethanol)[2, 12, 15], C3 대사물(ex. lactate, pyruvate)[1, 3, 18, 22], C6 대사물(ex. glutamate)[5, 10] 등을 예로 들 수 있다. 그러나 C4 대사물(ex. succinate, fumarate, malate)의 생물학적 생산과 완벽한 이해는 아직 연구가 진행중인 과제이며, 현재까지 산업화에 이르지 못하고 있다[14, 20]. 숙신산으로 대표되는 이러한 C4 대사물의 생물학적 생산은 최근들어 여러 가지 이유들로 인해 관심의 대상이 되고 있다. 첫 번째 이유는 2005년 현재 배럴당 60달러 부근까지 치솟은 세계유가의 상승이다. 숙신산은 현재 석유화학공정의 maleic acid를 수소치환하여 산업적으로 생산되고 있으나, 지속된 유가상승으로 인해 2001년 대비 현재 약 2.5배 이상의 원재료가격의 상승요인이 발생하였다. 따라서 상대적으로 안정적인 가격을 보이는 국제곡물로부터 생산될 수 있는 생물학적 C4 대사물의 생산이 관심의 대상이 되고 있다. 두 번째 이유는 교토의정서(Kyoto protocol)의 발

효이다. 세계적으로 이산화탄소는 산업혁명 이후 석유 등 화석연료의 사용증가로 인해 기하급수적으로 배출량이 증대되었으며, 이러한 세계 이산화탄소 배출량의 증대로 인해 지구표면의 복사열증가로 인한 온실효과를 방지하기 위해 2005년 1월에 발효된 도쿄의정서에 따라 세계 각국은 이산화탄소 배출량을 제한받게 되었거나 제한압력을 받게 될 예정이다. 숙신산을 포함하는 C4 대사물은 탄소 중심대사의 특성상 해당작용의 결과물인 C3 대사물(i.e. pyruvic acid)의 탄소고정화(CO₂ fixation) 경로를 통해 생성되므로[21], 이론적으로는 생성되는 C4 대사물과 동일수의 이산화탄소가 반응물로 소비되어, 이산화탄소 소비를 공업적으로 촉진할 수 있기 때문이다. 세 번째는 급격한 생명과학의 발달을 들 수 있다. 인간유전체사업을 시작으로 한 각종 생물자원의 유전정보가 밝혀지면서 이를 이용한 여러 가지 생물정보 활용기술들(genomics, proteomics, transcriptomics, metabolomics 등)이 속속 등장하고 있다. 이러한 생물정보 활용기술은 생물의 대사조절을 보다 체계적으로 접근할 수 있도록 하여 C4 대사물의 과량생산을 위한 대사조절의 가능성을 높이고 있다. C4 대사물의 생산연구는 단순히 숙신산 생산에 그치지 않고, 다른 대사와 연계된 생체물질의 생산에도 추가적으로 응용될 수 있다. 예를 들어 포르피린의 전구체이며 피부암 치료제로 사용될 수 있는 aminolevulinic acid(ALA)는 glycine과 succinyl-CoA의 중합에 의해 생성된다[19]. 이때 glycine은 반응물로서 배지로 첨가되고, succinyl-CoA는 세

*Corresponding author

Tel: 82-2-2164-4922, Fax: 82-2-2164-4865

E-mail: kimp@catholic.ac.kr

포도당에 의해 형성되어야 한다. Succinyl-CoA의 세포내 농도 또는 회전율은 결국 숙신산과 연결된 동일 C4 대사활성화에 의해 촉진될 수 있다.

Mannheimia succiniciproducens[8], *Anaerobiospirillum succiniciproducens*[11], *Actinobacillus succinogenes*[7] 등의 반추위 미생물들은 자연적으로 C4대사가 강력하며 숙신산을 주요한 대사산물로 생산할 수 있다고 알려져 있다. 이들의 중심대사 조절양식과 장내세균인 대장균의 중심대사 조절양식간의 차이점 가운데 한 가지는 포도당의 glycolysis와 TCA를 연결해 주는 PEP ↔ OAA경로의 조절을 들 수 있다. 반추위 미생물에서의 혐기적 포도당 대사에는 Phosphoenolpyruvate carboxykinase(PCK)를 통해 PEP ↔ OAA 경로를 촉매하는 것으로 알려져 있다[9]. 반면에 대장균에서는 혐기적 포도당 대사에서 PEP ↔ OAA 경로를 촉매하는 효소는 phosphoenolpyruvate carboxylase(PPC)이다[4, 13]. 대장균의 유전체에도 반추위 미생물과 같은 *pck*

유전자가 존재하나 이들은 혐기적 포도당 대사가 아닌 gluconeogenesis조건에서만 발현되도록 조절되며, 이때 PPC의 발현은 억제된다(Fig. 1). 이러한 조절양식의 차이로 인해 반추위미생물과 대장균간의 C4 대사조절의 차이가 생길 수도 있다. 따라서 본 보에서는 포도당이 존재하는 혐기조건에서 반추위미생물의 PEP ↔ OAA 경로 조절양식처럼 PPC대신에 PCK에 의해 대사가 조절되도록 조작된 대장균을 제조하여 그때의 C4 대사 변화에 관하여 보고한다.

재료 및 방법

돌연변이체와 플라스미드의 제조

본 실험에 사용된 대장균 균주들은 Table 1에 표시하였다. 통상적인 분자생물학적 기술은 Sambrook 등에 의한 방법을 따랐다[16]. 대장균 *ppc* 돌연변이체 제조를 위하여 JCL1242에서 유래한 *ppc-5::kan* 유전자를 P1 transduction 방법[17]에 의하여 야생형 K12에 도입, 선별하였다. 유전자 *pck*는 K12균주의 유전체를 바탕으로 PCR 증폭을 통하여 분리하였다. PCR 증폭된 *pck* 단편은 최종적으로 발현벡터인 pTrc99A에 클로닝하였다.

배지 및 배양조건

균주와 플라스미드 제조과정에 필요한 모든 배지는 LB medium을 사용하였다. C4 대사생리를 조사하는 실험에 사용한 A-medium은 LB medium에 glucose 20 g/L와 NaHCO₃ 20 g/L, 0.1 mM IPTG를 첨가하여 사용하였다. 단일콜로니를 5 mL LB medium을 포함하는 15 mL test tube에 접종하고 37°C의 진탕배양기에서 12시간 동안 200 rpm으로 진탕하여 전배양하였다. 전배양액 120 mL(1% v/v)를 취하여 12 mL의 A-medium을 포함하는 15 mL PTFE/silicon rubber septa tubes(ACE과학, 한국)에 접종하였다. 완벽한 혐기조건을 구현하기 위하여 15 mL PTFE/silicon rubber septa tubes는 anaerobic jar(GasPak 150 system, BD, NJ)에 위치하여 밀봉한 후 촉매(GasPak CO₂

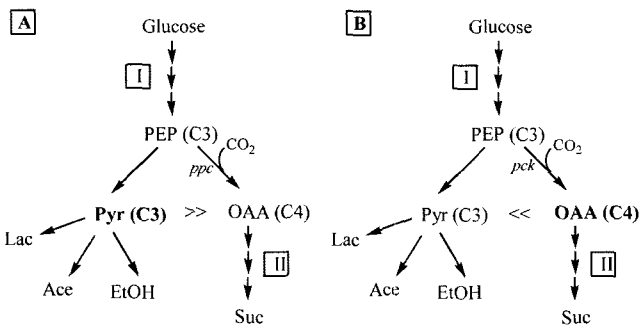


Fig. 1. Comparison of anaerobic glucose fermentation between enteric *E. coli* and typical rumen bacteria. The glucose fermentation metabolisms of *E. coli* (A), which has higher C3 metabolism (>>) and typical rumen bacteria (B), which have higher C4 metabolism (<<). Symbol I and II indicate the glycolysis and C4 metabolism, respectively. Enzyme abbreviations are *ppc* for PEP carboxylase and *pck* for PEP carboxykinase. Metabolite abbreviations are PEP: phosphoenolpyruvate; Pyr: pyruvate; Lac: lactate; Ace: acetate; EtOH: ethanol; OAA: oxaloacetate; Suc: succinate, respectively.

Table 1. Strains and plasmids.

		Characteristics	Source
Strain			
TOP10		F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 endA1 ara</i> Δ139 Δ(<i>ara, leu</i>) 7697 <i>galU galK λ- rpsL</i> (Str ^R) <i>nupG</i>	Invitrogen
K12		Wild-type <i>E. coli</i> strain	KCTC 2223
K12 <i>ppc</i> -		<i>E. coli</i> K12 <i>ppc-5::kan</i>	This study
JCL1242		<i>ppc-5::kan DE(argF-lac)169 λ-</i>	CGSC 7728
Plasmid			
pGEM-T		PCR cloning vector	Promega
pT-pck		pGEM-T with PCR fragment (1.6 kb) from <i>pck</i> of <i>E. coli</i>	This study
pTrc99A		Expression vector	AP Biotech
pTrc-pck		pTrc99A with <i>EcoRI-PstI</i> digested fragment (1.6 kb) from pT-pck	This study

system envelope, BD)를 이용하여 산소를 제거하였다. 이 anaerobic jar는 37°C 정치배양기에 넣고 24시간 동안 혐기 조건에서 배양하였다.

분석방법

세포농도는 분광광도계를 사용하여 600 nm에서 측정하였고, 발효산물들은 Aminex-87H ion-exchange column(Bio-Rad, Hercules, CA)와 refractive index(RI) detector를 장착한 HPLC(Waters, Milford, MA)를 사용하여 분석하였다. 이때 이동상은 0.5 mM H₂SO₄ 용액을 0.6 mL/min의 속도로 흘러주었고 column은 60°C로 유지하였다. 잔존 포도당은 dinitrosalicylic acid(DNS) 방법(Miller *et al.*, 1958)으로, 숙신산 농도는 효소를 이용한 숙신산 정량 kit(Boehringer Mannheim Roche, Basel, Switzerland)를 사용하여 각각 재 확인하였다.

결과 및 고찰

반추위미생물 PEP ↔ OAA 조절양식을 구현한 대장균의 구축

대장균 *ppc* 돌연변이체 제조를 위하여 CGSC(*E. coli* genetic stock center, Yale Univerity)로부터 분양받은 JCL1242[6]를 P1 phage를 이용하여 용균시켜 P1 lysate를 얻었고, 이를 다시 대장균 K-12(KCTC 2223)에 접종하였다. JCL1242에서 유래한 *ppc-5::kan* 유전자중 K12에 도입되어 상보적 재조합(homologous recombination)이 일어난 균주는 kanamycin(20 µg/ml)에 내성을 보이는 특성을 이용하여 선별하였다. 선별된 균주는 K12 *ppc*-로 명명하여 사용하였다. PCK의 인위적인 발현조절을 위해서 K12 유전체를 바탕으로 하여 *pck* 유전자를 PCR 증폭을 하였다. PCR 증폭에는 forward oligonucleotide인 5-GAATTCATGCGCGTTAAC-AATGGTTTGACCCC(*EcoRI* site: underlined)와 backward oligonucleotide인 5-CTGCAGTTACAGTTTCGGACCAGC-CGCTAC(*PstI* site: underlined)를 사용하였다. PCR 산물은 gel 정제 후 pGEM-T easy vector(Promega, Medison, USA)에 클로닝하였다. 이 벡터는 *EcoRI-PstI* 제한효소로 이중절단한 후 *pck* 크기인 1.6 kb 단편을 발현벡터인 pTrc99A에 클로닝하였다. 최종적으로 제조된 pTrc-*pck*는 sequencing을 확인하여 PCR과 그 이후의 재조합과정에서 돌연변이가 없음을 확인하였다(data not shown). 재조합된 pTrc-*pck* 벡터는 K12 *ppc*- 균주에 도입한 후 0.1 mM IPTG에 의해 인위적으로 발현이 가능함을 SDS-PAGE로 확인하였다(Fig. 2).

이렇게 구축된 대장균 K12 *ppc*-/*pck*+ 균주는 야생형 K12가 포도당 발효조건에서 *ppc*를 통하여 PEP ↔ OAA 반응을 촉매하는 대신에 반추위미생물의 조절양식처럼 *pck*를 통하여 동일 반응을 촉매하도록 인위적으로 조절되었다(Fig. 3).

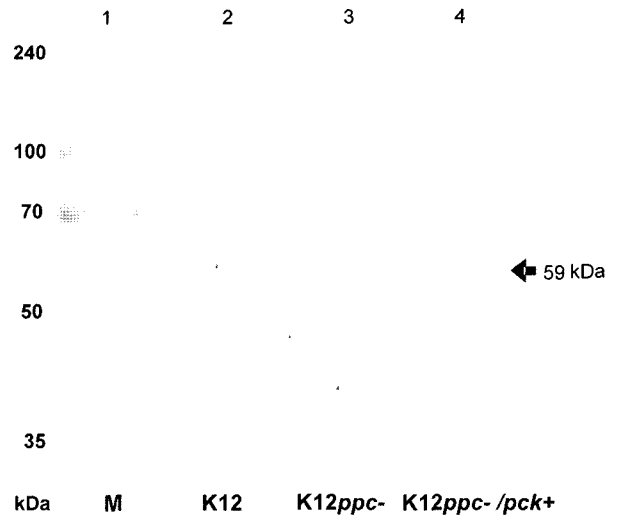


Fig. 2. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of cell extract. Lane 1: molecular size marker; Lane 2: wild type K12; Lane 3: K12 *ppc* knockout; Lane 4, K12 *ppc* knockout strain with *pck* gene expression. The arrow is the size of Pck proteins.

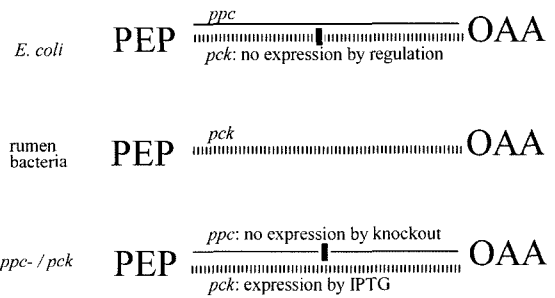


Fig. 3. Regulations of enzyme expression between PEP and OAA under glucose fermentation condition in *E. coli*, typical rumen bacteria, and recombinant *E. coli*. Line indicates the pathway mediated by PPC, dotted line indicates the pathway mediated by PCK. Vertical bar represents the blockage of the pathway.

PEP ↔ OAA 조절양식이 변화된 대장균에서의 C4대사생리의 변화

상기한 것처럼 반추위미생물의 조절양식을 갖게된 대장균 K12 *ppc*-/*pck*+ 균주와 야생형 K12 균주간의 포도당 혐기 발효조건에서의 C4 대사생리의 변화를 조사하였다. Table 2는 혐기적 배양 24시간 이후에 소비된 포도당 대비 생성된 유기산들의 몰비를 나타낸 것이다. PPC를 통한 PEP의 탄소 고정율을 하는 야생형(숙신산 0.09 mol/mol-glucose)에 비하여 반추위미생물처럼 PCK를 통한 탄소고정을 하는 K12 *ppc*-/*pck*+ 균주에서는 약 2.5배의 C4대사물(숙신산 0.26 mol/mol-glucose)이 생성되었다. PPC가 돌연변이된 K12 *ppc*- 균주에서는 매우 낮은 C4 대사물(숙신산 0.03 mol/mol-glucose)만이 생성되었다. 이러한 결과로 미루어볼 때 PEP ↔ OAA간의 대사활성, 즉 CO₂ 고정활성이 높을수록 C4대사가 활발해 질 수 있다는 사실을 추론할 수 있다. 또한 동일

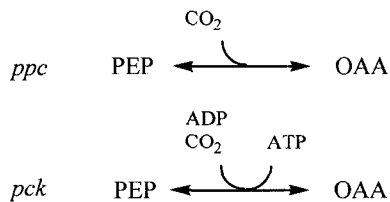
Table 2. Molar yield of C4 metabolite during anaerobic cultivation in *E. coli* strains.

Strain	C4 metabolite (mole succinate produced / mole glucose consumed)	Growth (OD _{600 nm})
K12	0.09 ± 0.01	1.40 ± 0.01
K12 <i>ppc</i> -	0.03 ± 0.00	1.32 ± 0.03
K12 <i>ppc</i> -/ <i>pck</i> +	0.23 ± 0.01	1.56 ± 0.02

Experiments were performed at least duplicate. Subscript represents the standard deviation.

한 PEP ↔ OAA간의 반응이라고 할 지라도 반추위미생물처럼 PCK를 이용한 반응이 야생형 대장균의 PPC를 이용한 반응조절양식보다 C4대사에 더 유리함을 알 수 있다. Kim 등이 대장균에서 rumen bacteria인 *Actinobacillus succinogenes*에서 유래한 PCK를 대장균에서 발현하여 C4대사를 증진시킨 것과 마찬가지로 대장균 자체에서 유래한 PCK 역시 조절양식에 따라서 C4 대사증진에 기여할 수 있음을 확인하였다[9].

이러한 가설은 PPC와 PCK의 효소반응 차이로도 설명될 수 있다. 즉, PPC는 PEP에 이산화탄소를 고정하여 C4인 OAA를 생성하는 반응을 촉매하는 반면, PCK는 동일반응을 수행하는 동시에 한분자의 고에너지물질(ATP 또는 GTP)을 생성한다.



호기조건에 비해 상대적으로 에너지가 부족한 상태인 혐기발효조건에서는 이렇게 PCK를 통한 에너지생성이 세포의 생존에 도움을 줄 수 있을 것이다. Table 2에서 세포의 성장상태를 보면 PPC를 이용한 K12보다(OD₆₀₀ = 1.40) PCK를 이용한 K12 *ppc*-/*pck*+ 균주에서 더 높은 세포성장(OD₆₀₀ = 1.56)을 보인 것은 PCK에 의해 보다 많은 에너지를 생성한 이유 때문인 것으로 생각된다. 저자들은 이러한 가정을 증명하기 위하여 연속배양을 통한 대사변화를 추적하고 있다.

요 약

높은 C4 대사활성을 보이는 반추위미생물이 가지는 포도당 발효대사 조절양식의 한가지를 대장균에서 모사하였다. 대장균은 glycolytic condition에서는 phosphoenolpyruvate (PEP) ↔ oxaloacetate(OAA)간 반응을 phosphoenolpyruvate carboxylase(PPC)에 의해, gluconeogenetic condition에서는 phosphoenolpyruvate carboxykinase(PCK)에 의해 촉매하도록 조절한다. 반면 반추위미생물은 glycolytic condition에서

PCK를 통하여 반응이 촉매된다. 이러한 조절양식의 차이점이 C4 대사활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 *ppc*가 돌연변이되고 대신 인위적으로 PCK를 발현할 수 있는 대장균을 제조하였다. 이렇게 PEP-OAA간 대사조절이 변이된 대장균 K12 *ppc*-/*pck*+)는 야생형 K12보다 2.5배의 높은 C4 대사활성을 보였다. 대장균에서의 C4 대사생리를 증가시키는 연구는 대사공학을 이용한 여러가지 유용물질(i.e. 숙신산, ALA) 생산에 응용하기 위한 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단의 연구비지원(R01-2004-000-10093-0)으로 수행되었기에 감사 드립니다.

REFERENCES

- Aarnikunnas, J., N. Von Weymar, K. Ronnholm, M. Leisola, and A. Palva. 2003. Metabolic engineering of *Lactobacillus fermentum* for production of mannitol and pure L-lactic acid or pyruvate. *Biotechnol. Bioeng.* **82**: 653-663.
- Bai, F. W., L. J. Chen, Z. Zhang, W. A. Anderson, and M. Moo-Young. 2004. Continuous ethanol production and evaluation of yeast cell lysis and viability loss under very high gravity medium conditions. *J. Biotechnol.* **110**: 287-293.
- Bonanni, E., L. Pasquali, M. L. Manca, M. Maestri, C. Prontera, M. Fabbri, S. Berrettini, G. Zucchelli, G. Siciliano, and L. Murri. 2004. Lactate production and catecholamine profile during aerobic exercise in normotensive OSAS patients. *Sleep Med.* **5**: 137-145.
- Chao, Y. P. and J. C. Liao. 1994. Metabolic responses to substrate futile cycling in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**: 5122-5126.
- Georgi, T., D. Rittmann, and V. F. Wendisch. 2005. Lysine and glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* on glucose, fructose and sucrose: roles of malic enzyme and fructose-1,6-bisphosphatase. *Metab. Eng.* **7**: 291-301.
- Gokarn, R. R., M. A. Eiteman, and E. Altman. 2000. Metabolic analysis of *Escherichia coli* in the presence and absence of the carboxylating enzymes phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate carboxylase. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1844-1850.
- Guettler, M. V., D. Rumler, and M. K. Jain. 1999. *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49** Pt 1: 207-216.
- Hong, S. H., J. S. Kim, S. Y. Lee, Y. H. In, S. S. Choi, J. K. Rih, C. H. Kim, H. Jeong, C. G. Hur, and J. J. Kim. 2004. The genome sequence of the capnophilic rumen bacterium *Mannheimia succiniciproducens*. *Nat. Biotechnol.* **22**: 1275-1281.
- Kim, P., M. Laivenieks, C. Vieille, and J. G. Zeikus. 2004.

- Effect of overexpression of *Actinobacillus succinogenes* phosphoenolpyruvate carboxykinase on succinate production in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1238-1241.
10. Kimura, E. 2003. Metabolic engineering of glutamate production. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **79**: 37-57.
 11. Lee, P. C., W. G. Lee, S. Y. Lee, and H. N. Chang. 2001. Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using glycerol as a carbon source. *Biotechnol. Bioeng.* **72**: 41-48.
 12. Lee, W. G., J. S. Lee, C. S. Shin, S. C. Park, H. N. Chang, and Y. K. Chang. 1999. Ethanol production using concentrated oak wood hydrolysates and methods to detoxify. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **77-79**: 547-559.
 13. Liao, J. C., Y. P. Chao, and R. Patnaik. 1994. Alteration of the biochemical valves in the central metabolism of *Escherichia coli*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **745**: 21-34.
 14. Lin, H., G. N. Bennett, and K. Y. San. 2005. Metabolic engineering of aerobic succinate production systems in *Escherichia coli* to improve process productivity and achieve the maximum theoretical succinate yield. *Metab. Eng.* **7**: 116-127.
 15. Palmarola-Adrados, B., P. Choteborska, M. Galbe, and G. Zacchi. 2005. Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran. *Bioresour. Technol.* **96**: 843-850.
 16. Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. *Molecular Cloning* 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
 17. Sandri, R. M. and H. Berger. 1980. Bacteriophage P1-mediated generalized transduction in *Escherichia coli*: structure of abortively transduced DNA. *Virology* **106**: 30-40.
 18. Skory, C. D. 2004. Lactic acid production by *Rhizopus oryzae* transformants with modified lactate dehydrogenase activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**: 237-242.
 19. van der Werf, M. J. and J. G. Zeikus. 1996. 5-Aminolevulinate production by *Escherichia coli* containing the *Rhodobacter sphaeroides hema* gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3560-3566.
 20. Vemuri, G. N., M. A. Eiteman, and E. Altman. 2002. Succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations depends on the time of transition from aerobic to anaerobic conditions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 325-332.
 21. Yang, C., Q. Hua, T. Baba, H. Mori, and K. Shimizu. 2003. Analysis of *Escherichia coli* anaerobic metabolism and its regulation mechanisms from the metabolic responses to altered dilution rates and phosphoenolpyruvate carboxykinase knockout. *Biotechnol. Bioeng.* **84**: 129-144.
 22. Zelic, B., D. Vasic-Racki, C. Wandrey, and R. Takors. 2004. Modeling of the pyruvate production with *Escherichia coli* in a fed-batch bioreactor. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **26**: 249-258.

(Received Jan. 18, 2006/Accepted Mar. 16, 2006)