

재조합 탄산무수화 효소 첨가 생산배지를 이용한 *Actinobacillus succinogenes* 유래의 숙신산 생산성 향상

박상민[†], 엄규리[†], 김상용¹, 정용섭², 이도훈^{1*}, 전계택^{*}

Enhanced Production of Succinic Acid by *Actinobacillus succinogenes* using the Production Medium Supplemented with Recombinant Carbonic Anhydrases

Sang-Min Park[†], Kyuri Eum[†], Sangyong Kim¹, Yong-Seob Jeong², Dohoon Lee^{1*}, and Gie-Taek Chun^{*}

접수: 2014년 5월 1일 / 게재승인: 2014년 5월 22일
© 2014 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Succinic acid, a representative biomass-derived platform chemical, is a major fermentation product of *Actinobacillus succinogenes*. It is well known that carbon dioxide is consumed during the succinate fermentation, but the biochemical mechanism behind this phenomenon is not yet understood well. In this study, it was found that the addition of carbonic anhydrase (CA)s into media significantly enhances the succinic acid production by *A. succinogenes* during the fermentation supplied with carbon dioxide. It is likely that the (bi) carbonate produced by the CA activity from gaseous carbon dioxide is favoured by *A. succinogenes* for consumption and utilization. Therefore, the MgCO₃ requirement could be

significantly reduced without compromising the succinate productivity. Furthermore, because of too high price of the commercial carbonic anhydrase, it was undertaken to economically overproduce a cyanobacterial carbonic anhydrase by the use of a recombinant *Pichia pastoris*. An expression vector system was constructed with the carbonic anhydrase gene PCR-cloned from Cyanobacterium *Synechocystis* sp., and introduced into *P. pastoris* for fermentation studies. About 95.9 g/L of succinic acid was produced in the production medium with 30 ppm of carbonic anhydrase, approximately 2 fold higher productivity compared to the parallel process with no supplementation of the enzyme. It is expected that this method can provide a valuable way of overcoming inefficiencies inherent in gas supply during CO₂-based bioprocesses like succinic acid fermentation.

강원대학교 의생명과학대학 분자생명과학과
College of Biomedical Science, Kangwon National University,
Korea
Tel: +82-33-250-8547, Fax: +82-33-241-4627
e-mail: gtchun8547@gmail.com

¹한국생산기술연구원
Korea Institute of Industrial Technology, Korea
Tel: +82-41-589-8349, Fax: +82-41-589-8580
e-mail: david@kitech.re.kr

²전북대학교 식품공학과
²Department of Food Science and Technology, Chunbuk National
University, Korea

[†]These authors contributed equally to this work.

Keywords: Succinic acid, *Actinobacillus succinogenes*, Carbonic anhydrase, Carbon dioxide, Carbonate

1. INTRODUCTION

숙신산은 C4계열의 화합물로 식물, 동물 그리고 미생물들에

의해 생합성 되는 공통 대사산물이다. 많은 혐기성 미생물들이 그들의 에너지 대사활동의 주요 최종산물로 숙신산을 생산하는 것으로 알려져 있다 [1]. 숙신산은 식품의 감미료, 의약품, 계면활성제, 생분해 플라스틱, 사료첨가제와 같이 넓은 범위에 사용되는 물질로 최근에는 1,4-butanediol, tetrahydrofuran, γ -butyrolactone, adipic acid, n-methylpyrrolidone 등과 같은 기존 석유화학 제품의 전구 화합물로 주목받고 있다. 석유자원의 고갈과 온실가스 배출량 증가의 문제가 크게 대두되는 현 시점에서 재생가능 자원을 원료로 사용하며 이산화탄소를 고정하는 미생물발효를 통한 숙신산의 생산 공정은 친환경 화학제품 생산 공정으로 주목받고 있다 [1,2].

자연적으로 숙신산을 생산하는 균주로는 *Mannheimia succiniciproducens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens* 등이 잘 알려져 있다 [3-9]. 본 연구에서 사용한 균주는 통성혐기성세균인 *Actinobacillus succinogenes*로서, 호기성 환경에서는 전형적인 해당과정과 TCA cycle 및 전자전달계를 통해 에너지 합성과 균체의 증식이 이루어진다. 반면에 혐기성과 이산화탄소 존재 하의 환경에서는 phosphoenol pyruvate에서 이산화탄소의 고정에 의해 에너지를 생합성하는 경로로 대사과정이 전환되는데, 이 때 최종 산물로서 숙신산이 생합성된다 [1]. 특히 *Actinobacillus succinogenes*의 경우 균체의 성장이 빠르고, 비교적 고농도의 탄소원 농도 하에서도 고밀도 배양이 가능하며, 이산화탄소의 공급이 풍부한 혐기성 조건에서 고농도로 숙신산을 생합성할 수 있는 능력이 있는 것으로 알려져 있다 [1,2]. *Actinobacillus succinogenes*는 숙신산 이외에도, acetic acid, formic acid, ethanol 등 다양한 유기산들을 생합성하는데, 이 유기산들은 숙신산 경로와는 달리, acetyl-CoA로부터 생합성 되는 것으로 알려져 있다 [1]. 이와 같이 *Actinobacillus succinogenes*에 의한 숙신산 생산을 위해서는 이산화탄소의 공급이 필수적임을 알 수 있는데 [11-13], 이 생산균주의 이산화탄소 활용에 관련된 생화학적 기작 및 이에 관여하는 transporter에 대해서는 거의 알려진 바가 없다. 그러나 고농도 숙신산 발효를 위해서는 이산화탄소와 함께 다량의 carbonate 공급이 필요하다는 사실은 이산화탄소가 기체 CO₂와 더불어 (bi) carbonate 형태로도 세포 내부로 전달될 수 있음을 암시한다 [14-17]. 따라서 CO₂와 (bi)carbonate의 상호 전환을 활성화시킬 경우 total carbonate 전달의 효율 향상을 통해 숙신산 생산성이 향상되리라 예측할 수 있다.

이와 같은 가정 하에서, 본 연구에서는 숙신산 생산을 위한 *Actinobacillus succinogenes*의 발효조 배양 시, 이산화탄소의 bicarbonate로의 상호 전환을 촉진시키는 촉매인 탄산무수화효소 (carbonic anhydrase)를 배지성분으로 첨가하는 실험을 수행하였다. 즉 탄산무수화 효소가 숙신산 발효 배지에 존재하는 상태에서 기체 이산화탄소를 공급할 경우 bicarbonate의 생성이 촉진되고, 이는 CO₂와는 별개일 것으로 예상되는 기작을 통해 세포 내로 전달되어 숙신산 생합성에 활용될 수 있을 것으로 판단하였다. 탄산무수화 효소는 아연이 결합된 metalloenzyme으로 다양한 유기체에서 발견되며 사람이나

소의 적혈구에서 발견되는 α 그룹, 시안세균이나 남조류에서 발견되는 β 그룹 등 5개의 family로 구성되어 있다 [18-20]. 탄산무수화 효소는 식물이나 조류 (algae) 등에서 이산화탄소의 고정과 광합성 작용에 관여하고 동물이나 사람의 조직 내에서 pH homeostasis, calcification, bone resorption에 관여하는 것으로 알려져 있다 [21-23]. 우선적으로 탄산무수화 효소를 경제적으로 충분히 확보하고자, 시안세균 (cyanobacterium) 유래의 탄산무수화 효소를 cloning한 후, 형질전환 된 *Pichia pastoris* 균주를 이용해서 이 효소를 과발현시키는 연구를 수행하였다. 궁극적으로 *Pichia pastoris*의 배양액으로 분비된 시안세균 유래의 탄산무수화 효소를 UF-공정을 통해 농축시킨 후, 이를 숙신산 생산배지의 한 성분으로 첨가하는 배양실험을 수행하였다. 이와 같이 탄산무수화 효소를 이용하여 생물학적 숙신산 생산성을 향상시키는 배양전략에 대해서는 현재까지 거의 보고된 바 없다. 시안세균 유래의 탄산무수화 효소를 재조합 대장균에서 과다 발현시켜 숙신산 생산성을 향상시킨 연구 결과가 발표된 바 있으나, 이는 해당 대사경로의 활성화를 통해 이미 세포 내로 섭취된 이산화탄소의 활용을 증가시키는 연구로서, 세포외에서 이산화탄소 및 탄산염의 섭취 효율을 향상시키고자하는 본 연구의 내용과는 상이한 것이다 [24].

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 시약 및 재료

본 실험에 사용된 시약 및 벡터는 아래와 같다: Corn steep solid (C8160), MgCO₃ (M7179), yeast nitrogen base (51483), biotin (B4501), histidine (H0750000), carbonic anhydrase (C2624) 및 NH₄OH (320145)는 Sigma-aldrich (USA)에서 구입하여 사용하였다. 또한 yeast extract (3254027), TSA (1074969), TSB (1296840) 및 peptone (2019985)은 BD Difco (USA)에서 구입하였다. 이 외 glucose (3020-4460)는 Daejung (South Korea), NaHCO₃ (D9A561)와 KH₂PO₄ (CBC531)는 Duksan (South Korea)에서 각각 구입하였다. 유전자 조작 실험을 위한 pGEM T vector (A3600)는 Promega (USA), pPICZa B vector (V19520)는 Invitrogen (USA)에서 각각 구입하여 사용하였다.

2.2. 균주 및 배지

본 연구에서 사용한 균주는 *Actinobacillus succinogenes* UK13 (KCTC 12233BP) 변이주이다. 이 균주는 본 연구실에서 EMS mutation 및 rational screening을 통해 개발한 숙신산 고생산성 변이주이다. 이 균주를 통상적으로 고체배지인 TSA (tryptic soy agar: 15 g/L pancreatic digest of casein, 5 g/L papaic digest of soybean, 5 g/L sodium chloride, 15 g/L agar) plate에 접종하여 38°C에서 solid stock으로 보관하였으며, 장기 보관을 위해서는 20% glycerol이 함유된 증류수로 liquid stock을 제조하여 -80°C에서 보관하였다 (고체배양은 SGM으로 명

명함). *Actinobacillus succinogenes*의 액상 성장 배양에서 사용된 배지 (LGM)는 TSB (tryptic soy broth: 15 g/L pancreatic digest of casein, 5 g/L papaic digest of soybean, 2.5 g/L dextrose, 5 g/L sodium chloride, 2.5 g/L dipotassium phosphate)를 사용하였다. 숙신산 생산용 생산배지 (PM)는 109 g/L glucose, 13 g/L yeast extract, 19 g/L corn steep solid, 10 g/L sodium bicarbonate의 조성으로 구성되었다. 배지 멸균은 침전과 Maillard reaction을 방지하기 위해 당, 질소원, 무기염류를 분리하여 121°C에서 15분간 수행하였으며, 경우에 따라 0.45 (μm)의 filter를 사용하였다.

2.3. 액상 성장 배양

*A. succinogenes*를 SGM에 접종한 후 38°C에서 24시간 배양하여 seed로 사용하였다. 액상 종균 배양은 LGM을 사용하여 38°C에서 9시간 동안 수행하였으며 필요 시 이를 생산배양의 seed로 이용하였다. 플라스크 성장배양은 30 mL working volume의 LGM을 사용하여 수행하였으며 접종량은 1% (v/v)로 접종하였다. 해당 배양은 진탕 배양기에서 38°C, 150~200 rpm의 조건으로 2일간 수행하였다.

2.4. 숙신산 생산을 위한 *A. succinogenes*의 발효조 배양

발효조의 기본적인 배양은 1차, 2차 성장배양과 생산배양을 기본으로 하여 수행하였다. 배지는 앞서 언급한 성장배지와 생산배지를 이용하였으며, 모든 배양은 1% (v/v)으로 접종하여 배양하였다. 교반속도는 100~300 (rpm)으로 조정해 주었으며 gas purging rate는 0.1 (vvm)으로 고정시켰다. 발효조 생산배양은 2일간 수행하였으며, 발효기는 5L KF5 (Kobitech, South Korea) 발효기를 사용하였다. 교반기는 rushtone disc turbine impeller를 사용하였고 nine hole sparger를 통해 이산화탄소 가스를 폭기시켰다.

2.5. 숙신산, 당, Glycerol, Methanol 및 균체 농도 측정

배양액 내 숙신산 농도 측정을 위해 적당한 농도로 희석한 시료를 0.45 μm 여과지를 이용하여 2번 여과한 후 HPLC (HPLC 9500 system, Younglin, Korea)를 이용하여 분석하였다. 검출기는 UV detector (UV7255, Younglin, Korea)를 사용하였고 Organic acid column (Aminex HPX 87H) (Bio-Rad, USA)을 사용하였다. 20 μL의 시료를 투입시킨 후, 25°C에서 0.01 N H₂SO₄를 0.8 mL/min의 속도로 이동시키며 분석하였다.

배양액 내 당, glycerol 및 methanol도 HPLC를 이용하여 분석하였다. 분석하기 전에 시료를 12,000 rpm (12074.4 g, RCF)에서 10분간 3회 원심분리 (VS 15000CFN II, Vision,

Korea)하였다. 채취한 상등액을 0.45 μm 여과지를 이용하여 여과한 후 HPLC에 주입하였다. 검출기는 RI detector (Younglin, Korea)를 사용하였고 Amine column (250 mm × 46 mm) (RS Tech, Korea)을 이용하여 분석하였다. 40°C 온도에 아세토니트릴 : 물 = 75:25 (v/v)로 조합된 이동상을 유속 1.2 mL/min의 속도로 이동시켰으며 시료 20 μL를 투입하여 분석하였다.

세포 건조중량 (Dry cell weight, DCW) 측정에 앞서 발효액 20 ml를 4,000 rpm (1341.6 g, RCF)에서 10분간 원심분리 하였다. 상등액을 제거한 후 증류수로 3회 세척 후 90°C에서 무게 변화가 없을 때까지 건조하여 DCW를 결정하였다.

2.6. 시안세균 (cyanobacterium) 유래의 탄산무수화 효소 (carbonic anhydrase) 생산

2.6.1. 시안세균(*Synechocystis sp. PCC 6803*) 배양

Cyanobacterium *Synechocystis sp. PCC 6803*을 ATCC에서 구입하여 BG-11 (C3061, Sigma)배지에 agar를 첨가한 배지를 사용하였고 종균을 접종한 후 30°C의 온도에서 배양하였으며 LED전구를 이용하여 12시간 동안 4000 lux 이상의 광량으로 조사시켰으며 12시간은 광 조사를 하지 않았다. 균체의 성장속도가 매우 느리므로 균체가 자라면 액상배양으로 곧바로 transfer 하였고 일반적으로, 7일에서 14일 배양기간을 두었으며 그 이상 배양이 수행될 때도 있어, humidity air를 공급함으로써 agar를 마르지 않게 유지하여 주었다.

2.6.2. 탄산무수화 효소 cloning

탄산무수화 효소 cloning에 앞서 *Synechocystis PCC 6803*의 액상배양을 수행하였다. 이를 위해 액체 배지 (BG-11)에 1% (v/v) seed 접종 후 30°C, 200 rpm 조건에서 16~18시간 동안 배양하였다. 원심분리를 통해 회수한 균체로부터 kit (i-genome BYF, Intron)를 이용하여 염색체 DNA를 회수하였다. 아가로스 젤 전기영동을 통해 회수된 염색체 DNA의 존재를 확인하였다. 탄산무수화 효소의 유전자 서열 (GenBank ID: U45962.1)을 바탕으로 primer를 제작하고 (Table 1, Macrogen, Korea) 이를 이용하여 탄산무수화 효소 유전자를 증폭한 후 전기영동을 통해 그 존재를 확인하였다 (825 bp). 이후 증폭된 유전자를 pGEM T vector에 ligation 하여 cloning vector와 결합시켰다.

2.6.3. Carbonic anhydrase의 cloning vector를 갖는 *E. coli* stock 개발

Cloning vector를 *Pichia pastoris*에 직접 transformation을 수행하기 전에 cloning vector를 갖고 있는 stock 확보를 위하여

Table 1. Primers used for the amplification of the cyanobacterial carbonic anhydrase (CA)

	Sequence ¹	Restriction enzyme
Forward	AAGAGAGGCTGAAGCTGCAGGAATGCAAAGACTCATCGAGGGAC	<i>Pst</i> I
Reverse	GAGTTTTTGTCTAGAAAACGGGAGCCTCGATAAATGCGCTC	<i>Xba</i> I

¹Underscore: restriction sites.

*E. coli*에 transformation 실험을 수행하였다. Cloning 된 CA 유전자를 갖는 *E. coli* 균주를 확보함으로써, 탄산무수화 효소 유전자의 보관 및 이후 최종 발현균주인 *Pichia pastoris*에 transformation할 탄산무수화 효소 유전자를 충분히 확보할 수 있었다.

제작한 pGEM T vector를 이용한 형질전환을 위해 CaCl_2 방법을 이용하여 *E. coli* DH5a의 competent cell을 제작하였다 [25]. 형질전환을 위해 벡터 DNA 10 μL 와 competent cell 200 μL 를 혼합한 후 30분간 저온에서 cell-DNA 접합을 유도하였다. 이후 미리 준비된 42°C 항온수조에서 90초간 열 충격을 가하여 주었다. 저온에서의 2분간 안정화를 거친 후 LB (Luria-Bertani) 배지 800 μL 를 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 배양하였다. 배양 후 배양액 50~200 μL 를 암피실린 (ampicillin)이 포함된 고체 LB 배지에 도말하여 12~16시간 후 colony를 확인하였다. 마지막으로 형질전환 여부를 colony PCR을 통해 확인하였다.

2.6.4. *Pichia pastoris*의 형질 전환

최종 발현 벡터인 pPICZa B 벡터의 multiple cloning site (MCS)를 확인하여 적합한 제한효소를 선택하였고, DNA 염기배열인 open reading frame (ORF)이 올바른 방향으로 정확하게 들어갔는지 확인할 수 있도록 forward primer와 reverse primer의 제한효소를 다르게 준비하였다. 준비된 탄산무수화 효소의 유전자와 pPICZa B 벡터에 각각 제한효소를 처리한 후 ligation하였으며 이후 transformation을 수행하였다.

P. pastoris X-33의 최종 electroporation을 위하여 균체 확보 과정은 다음과 같다: 먼저 고체배양을 위해 YPDA 배지 (yeast extract 10 g/L, peptone 20 g/L, glucose 20 g/L, agar 15 g/L)를 이용하였다. 액상 성장배양을 위해서는 YPDA에서 agar을 제외한 YPD 배지를 사용하였다.

Competent cell을 제작하기 위해 YPD 배지에서 30°C, 250 rpm 조건에서 2시간 동안 배양한 후 세포의 밀도가 $5 \sim 7 \times 10^7$ cells/mL에 이를 때까지 12~16시간 2차 배양하였다. 원심분리를 통해 균체를 회수한 후 1 M DTT (dithiothreitol)을 첨가하고 30°C에서 15분간 배양하였다. 그 후 1 M sorbitol를 첨가하여 혼합한 뒤 원심분리를 통해 상등액을 제거했으며 이 과정을 3회 더 반복 수행하였다. 최종 세포 농도가 $\sim 1 \times 10^9$ cells/mL가 되도록 조심스럽게 현탁하였다.

Electroporation을 통한 형질전환에 앞서 준비된 competent cell 40 μL 와 pPICa-B vector 10 μg 을 혼합한 뒤 0.2 cm cuvette에 넣고 2.0 kV 전압을 가하여 (Micropulser, Bio-RAD) 형질전환을 유도하였다. 형질전환체를 선별하기 위해 지오신 (zeocin)이 포함된 YPDA 배지에 도말하였으며 colony PCR을 수행하였다. Zeocin이 포함된 고체 선별배지에서 서열 확인 과정 및 ORF (Open reading frame) 방향 등 올바르게 cloning 된 균주를 선별하였다. 이후, putative transformant는 플라스크 배양을 통해 methanol로 induction한 후, 배양액 일부를 취해 RNA를 추출하고 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 중합효소 연쇄반응을 통해 원하는 유전자의 삽입 및 발현

여부를 확인하였다. 실험 결과, carbonic anhydrase 유전자 825 bp를 포함한 *Pichia pastoris* 염색체 내로 삽입된 벡터의 MCS를 나타내는 1476 bp에 상응하는 밴드가 나타나는 것을 확인할 수 있었으며, 이에 연속적인 계대가 가능하고 지속적인 계대에도 불구하고 형질이 변하지 않는 안정된 생산균주를 확보할 수 있었다 (*P. pastoris* X-33 PCA4 로 명명함).

2.6.5. 시안세균 유래의 탄산무수화 효소의 생산을 위한 재조합 *P. pastoris* X-33 PCA4 균주의 발효 조건의 배양 및 배양 조건

본 연구에서 자체 개발된 *P. pastoris* X-33 PCA4 균주를 zeocin이 포함된 고체배지 (YPDA: 20 g/L glucose, 20 g/L peptone, 10 g/L yeast extract, 20 g/L agar)에서 3일간 배양 (30°C)한 뒤 단일 colony를 회수하여 50 mL test tube (working volume = 5 mL)에 접종하였다 (YPD배지). 30°C, 180 rpm 조건에서 OD₆₀₀ 값이 0.3에 이르도록 1차 성장 배양을 수행하였으며 동일 조건하 500 mL flask (working volume = 50 mL)에서 OD₆₀₀ 값이 5.0에 이를 때까지 2차 성장배양을 진행하였다. 이를 seed 로 사용하여 5 L 발효기에 10% (v/v) 비율로 접종하였다.

효소 생산 배양에 사용된 배지의 조성은 다음과 같다 (1 L 당): 40 g glycerol, 10 g yeast extract, 20 g peptone, 13.4 g yeast nitrogen base, 100 mM potassium phosphate (KH_2PO_4), 4×10^{-5} % biotin, 1 g histidine. 배양 중 pH (Mettler-Toledo, Switzerland), DO probe (Mettler-Toledo, Switzerland)를 컴퓨터에 연결하여 온라인 모니터링 하였으며 배양 시작 전 충분한 산소 공급을 통해 DO를 saturation 시켰으며 배양 중에는 DO level에 따라서 교반속도를 180~300 rpm 범위에서 조정하였다. 15% NH_4OH 를 이용하여 pH를 6.0으로 유지하였으며 산소 공급 속도는 1 vvm이었다. pH와 DO 값이 증가하는 시점부터 50% (w/v) glycerol을 feeding을 시작하였으며 induction 전 histidine이 결핍되지 않도록 5% histidine 5 mL를 추가 공급하였다. Glycerol의 feeding 종료 후 탄산무수화 효소 발현 유도를 위해 methanol feeding을 시작하였다. Methanol은 아래 Eq. 1에 표현된 바와 같이 exponential feeding 형태로 공급하였다 [34-37].

$$F(t) = F_0 e^{\mu t} \quad (1)$$

여기서 F 는 공급 속도로 단위는 mL/h이며 F_0 는 초기 공급 속도이다. t 는 induction 후의 시간이며 시간 (h) 단위로 계산하였고 μ 는 세포의 비성장속도를 나타내고 단위는 h^{-1} 이다.

2.6.6. RT-PCR을 이용한 유전자 발현 확인

선별된 형질전환체의 탄산무수화 효소 유전자 발현 여부를 확인하고자 RT-PCR을 수행하였다. 우선 RNeasy mini kit (Qiagen)을 이용하여 균체로부터 total RNA를 회수하였다. cDNA를 합성하고자 PCR tube에서 total RNA 3 μL , RT용 primer (20 pmol) 1 μL , dNTP (10 mM) 1 μL , DNase free water 7 μL 를 혼합하고 65°C에서 5분간 반응시킨 후 ice로 옮겼다. 이 반응액에 5X RTase buffer 4 μL 와 0.1 M DTT 2 μL , RNase

inhibitor 1 μL를 첨가하고 다시 42°C에서 2분간 반응시켰다. 이후 Superscript TMII RTase 1 μL를 첨가하고 42°C에서 60분간 반응시킨 후 70°C에서 15분간 RTase를 불활성화하여 cDNA 합성을 종료하였다.

합성된 cDNA 3 μL에 10X buffer 5 μL, 2.5 mM dNTP 5 μL, 10 pmol specific primer 각 2 μL, Taq polymerase 5 Unit, 그리고 최종 부피가 50 μL가 되도록 증류수를 첨가한 후 PCR을 수행하였다.

2.6.7. 시안세균 유래의 탄산무수화 효소의 분리 정제 및 활성 측정

P. pastoris X-33 PCA4에서 발현된 후, 세포외로 분비된 탄산무수화 효소의 확인을 위해 정제공정을 진행하였다. 효소 정제를 위해 단백질 C-terminal에 위치한 6×His tag을 이용하였다. 보다 구체적으로 탄산무수화 효소를 포함한 배양액을 원심 분리하여 상등액을 확보하고 이를 UF membrane (lab-scale TFF system, Millipore)을 이용하여 5배 농축하였다. 이후 Ni-NTA column을 이용한 affinity chromatography (Pro Bond TM Purification System, Invitrogen)를 통해 효소를 정제하였다. 정제된 효소는 사용 전까지 4°C에서 보관하였다.

pNPA (p-nitrophenyl acetate) 가수분해 반응에 수반되는 흡광도 변화를 통해 탄산무수화 효소의 활성을 측정하였다 [26-29]. 반응을 위해 buffer (15 mM Tris sulfate, pH 7.6, 1.9 mL)와 3 mM pNPA (1.0 mL) 혼합 용액을 준비하고 효소를 추가하며 (0.1 mL) 반응개시 후 5분 간의 348 nm 파장에서의 흡광도 변화를 측정하였다 (Spectronic 200, Thermo scientific). 효소의 활성은 아래 식을 이용하여 계산하였다.

여기서 5.0은 pH 7.6, 0에서의 p-Nitrophenol의 흡광계수이다 [26-29]. 자가 반응에 의한 흡광도 변화 기여부분을 배제하기 위해 buffer 및 pNPA 혼합용액으로만 구성된 blank 실험 결과를 이용한 보정을 수행하였다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 순수 정제된 소 적혈구 유래의 탄산무수화 효소를 첨가한 생산배지에서의 숙신산 생산

충분한 이산화탄소의 공급은 *A. succinogenes*를 이용한 고농도 숙신산 생산의 필수적인 요소이다. 이산화탄소가 풍부한 배양환경에서, phosphoenol pyruvate에서 oxaloacetate로 전환되는 대사 흐름이 강하게 유도하여 결과적으로 숙신산 생합성이 크게 증가하는 것으로 보고된 바 있다 [10,13,34]. *A. succinogenes*의 이산화탄소 섭취에 관련된 생화학적 기작에 대해서는 잘 알려져 있지 않으나 일반적으로 고농도 숙신산 생산을 위해서는 CO₂ 및 다량의 carbonate 공급이 요구됨을 고려할 때, *A. succinogenes*에는 CO₂와 더불어 carbonate를 섭취, 활용하는 시스템이 존재할 가능성이 높다. 따라서 숙신산 생산과 관련된 total carbonate 공급의 효율성을 고려할 필요가 있다고 판단되었다.

본 연구에서는 탄산무수화 효소 (carbonic anhydrase, CA)의 발효 배지 내 첨가가 *A. succinogenes*의 숙신산 생산성에 미치는 영향을 조사하였다. 탄산무수화 효소는 이산화탄소와 carbonate의 상호 전환을 매개하는 효소로 배지에 첨가 시 공급된 CO₂를 bicarbonate (HCO₃⁻)로 전환하는 역할을 수행하리라 예상된다. 탄산무수화 효소의 효과를 확인하기 위해 이산화탄소를 공급하는 조건에서 생산배지 (PM) 및 순수 정제된 탄산무수화 효소 (소 적혈구 유래, Sigma C3934)가 추가된 PM을 이용한 숙신산 발효를 수행하였다. 그 결과 탄산무수화 효소 추가 시 숙신산 최종 생산농도 (76.3 g/L)가 탄산무수화 효소가 비첨가된 대조군에 비해 약 1.3배 이상 증가되는 고무적인 결과를 얻을 수 있었다 (Fig. 1). 본 실험결과는 시안세균이나 여타 미생물과 유사하게, *A. succinogenes*에도 CO₂와 더불어 (bi) carbonate를 섭취, 활용하는 시스템이 존재함을 암시해준다 [15-17]. 일반적으로 고농도 숙신산 발효를 위해서는 다량의 (bi) carbonate 공급이 필요하다는 사실도 이를 뒷받침한다 [10,11,14,35]. 또한 (bi) carbonate의 섭취 효율이 CO₂의 그것 보다 더 높을 가능성도 존재한다.

숙신산 발효 시 지수성장기가 시작되면 세포는 숙신산을 합성하여 에너지대사를 하게 되므로 다량의 이산화탄소를 요구한다 [35]. 본 실험 결과는 배지 내의 충분하지 않은 total carbonate가 숙신산 생산을 제한할 수 있으며, 탄산무수화 효소를 이용하여 CO₂보다 효과적인 섭취 및 활용이 가능한 (bi) carbonate로 전환시킬 경우 숙신산의 생산성 향상이 가능함을 제시해주고 있다 (Fig. 1). (Bi) carbonate형태로 섭취된 이산화탄소가 숙신산 생합성 대사로 이용되는 기작에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 보이나, 식물류의 광합성에서 관찰되는 CO₂-concentration mechanism [19,22]과 유사한 기작의 존재 및 그 장점으로 인해 *A. succinogenes*는 (bi) carbonate 형태로의 이산화탄소 섭취를 보다 선호할 가능성도 존재한다.

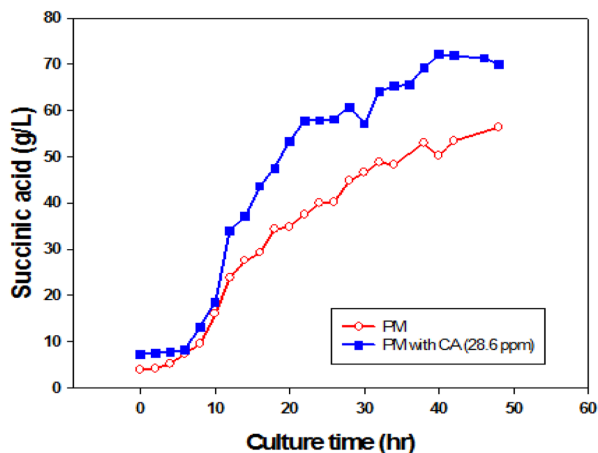


Fig. 1. Succinic acid production in the production medium supplemented with 28.6 ppm of bovine carbonic anhydrase (CA) as compared to the parallel medium with no supplementation of the CA enzyme.

Table 2. Results of the succinic acid fermentations by *A. succinogenes* using the production media containing bovine carbonic anhydrase (CA)

Media	P _f (g/L) ¹	S _f (g/L) ²	Q _p (g/L/hr) ³	Y _{OT} (%) ⁴
PM with CA (30 ppm) added at 0 hr*	70.0	76.6	1.5	49
PM with CA (30 ppm) added at 12 hr	65.2	103.9	1.4	46
PM with CA (30 ppm) added at 24 hr	35.4	103.5	0.7	25
PM with MgCO ₃ (10 g/L) and CA (30 ppm)*	96.5*	81.0	2.3	68
PM with MgCO ₃ (20 g/L) and CA (30 ppm)	77.2	87.5	1.8	54
PM with MgCO ₃ (30 g/L) and CA (30 ppm)	77.2	83.3	1.8	54

¹Final succinic acid concentration. ²Consumed glucose concentration. ³Volumetric productivity of succinic acid.

⁴The ratio (%) of observed yield to theoretical yield based on glucose consumption (observed/theoretical).

3.2. 순수 정제된 소 적혈구 유래의 탄산무수화 효소 및 carbonate를 복합사용한 배지조건에서의 숙신산 생산

숙신산 발효 조건에서 탄산무수화 효소의 역할 및 활성을 보다 명확하게 확인하기 위해 추가적인 실험을 진행하였다. 우선 탄산무수화 효소 (소 적혈구 유래의 순수 정제된 탄산무수화 효소) (Sigma C3934)의 배지 내 추가 시점 변화가 *A. succinogenes*의 숙신산 생산성에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위해 탄산무수화 효소 추가 시점을 발효 시작 후 0, 12, 24 시간으로 변화시키며 실험을 수행하였다. 발효 시작 후 12, 24시간은 각각 지수성장기가 시작 및 유지되는 시점으로 볼 수 있다. 실험 결과는 지수성장기 이전에 탄산무수화 효소를 투입했을 경우, 보다 높은 농도의 숙신산 생산이 가능함을 보여준다 (Table 2). 이는 앞서 언급한 바와 같이 숙신산 생산이 활발한 지수성장기의 높은 이산화탄소 요구량을 충족하는데 있어 탄산무수화 효소가 중요한 역할을 담당하고 있음을 보여준다. 결과적으로 지수성장기 후반 탄산무수화 효소 투입 시 최종 생산된 숙신산 농도는 탄산무수화 효소를 사용하지 않는 발효 결과와 유사한 수준을 보여주었다 (Table 2, Fig. 2). 지수성장기 시작 시점에 탄산무수화 효소를 투입한 경우 배양 시작 시 투입한 경우와 비교하여 다소 낮은 최종 숙신산 생산 농도를 보여주는데, 이는 탄산무수화 효소의 활

성으로 생성되는 (bi) carbonate가 *A. succinogenes*의 carbonate 섭취 및 활용 기작을 활성화하는 역할을 수행할 가능성도 있음을 보여준다. 또한 발효 중 교반, 기체 공급 등 효소의 활성에 부정적인 영향을 미칠 수 있는 인자들이 존재함에도 불구하고 탄산무수화 효소는 장시간 활성을 유지할 수 있는 것으로 보이며 이는 본 기술의 실용적 측면에서 중요한 사항이다.

상기의 결과에 근거하여 이후의 실험에서는 30 ppm의 탄산무수화 효소를 배양 초기부터 투입하며 진행하였다. 앞서 기술한 탄산무수화 효소의 역할을 고려할 때 탄산무수화 효소와 (bi) carbonate를 동시에 공급할 경우 보다 높은 농도의 숙신산 생산이 가능할 것으로 예상된다. 실제로 10 g/L의 MgCO₃를 추가적으로 공급할 경우, 최종 숙신산 생산 농도가 96.5 g/L 수준으로 증가하는 것을 확인하였다 (Table 2). 이는 탄산무수화 효소를 사용하더라도 *A. succinogenes*의 지수성장기에 total carbonate 요구량을 모두 충족할 수는 없음을 의미한다. 더불어 충분한 total carbonate 공급이 고농도 숙신산 발효를 위한 필수적 사항을 다시 한 번 제시해 준다. Fig. 2의 결과에서 주목할 점은 30 ppm의 탄산무수화 효소와 함께 MgCO₃를 10 g/L만 공급했는지라도, 이 경우의 숙신산의 생산량이, MgCO₃만 (탄산무수화 효소는 비첨가)을 100 g/L 첨가했을 경우 (109.24 g/L (데이터 미제시))에 비해 약 88% (96.49 g/L) 정도에 달했다는 점이다. 이 결과는 탄산무수화 효소를 배지성분으로 소량 첨가함으로써, 고농도로 첨가되는 비교적 고가의 (bi) carbonate 원료의 양을 상당량 절감할 수 있음을 제시해 준다.

한편 탄산무수화 효소와 함께 보다 많은 양의 MgCO₃를 투입하는 경우 오히려 최종 숙신산 농도는 감소하는 것으로 나타났다 (Table 2). 일반적으로 과량 (약 100 g/L)의 MgCO₃가 존재하여도 *A. succinogenes*의 숙신산 생산에는 부정적인 영향을 미치지 않는다는 사실을 고려할 때, 이 결과는 매우 흥미로운 현상이다. 따라서 carbonate 투입에 수반되는 다량의 Mg²⁺ 존재, MgCO₃의 낮은 용해도로 인해 발효기 내에 존재하는 고체상의 입자가 미치는 전단응력 등이 탄산무수화 효소의 활성에 부정적인 영향을 미치는 것으로 보인다. 배지 내 yeast extract 양을 증가시킨 경우에도 유사한 숙신산 생산성 저하가 나타났는데 (Fig. 2), 이는 해당 성분 내에 존재하는 잠재적 inhibitor들이 탄산무수화 효소 활성에 미친 부정적 영향의 결과로 추측된다. 또한 탄산무수화 효소가 가역적

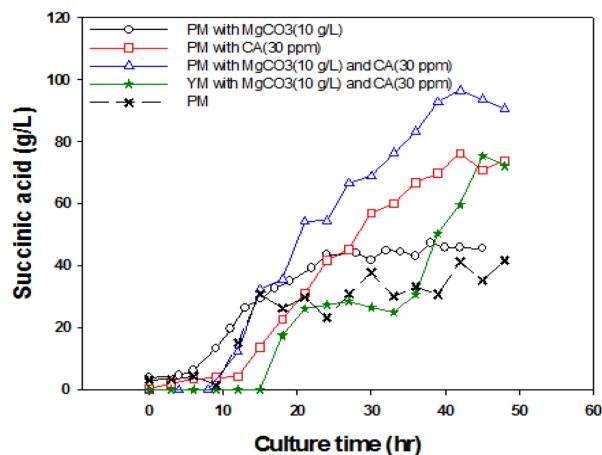


Fig. 2. Succinic acid production by *A. succinogenes* using the production media supplemented with various amounts of bovine carbonic anhydrase (CA) and MgCO₃.

인 반응을 촉매 함을 고려할 때 다량의 (bi) carbonate 존재는 CO₂로의 전환반응을 촉진할 가능성도 있다 [20].

결론적으로 *A. succinogenes*를 이용한 숙신산 생산 시 탄산무수화 효소의 투입이 이산화탄소 활용 효율을 향상시키며, 적당량의 carbonate와 복합 투입 시 숙신산 생산과정에서 관찰되는 높은 total carbonate 요구 조건을 만족시키면서 고농도 숙신산 발효 (96.5 g/L로서 이탄수율 대비 68% 달성)를 가능하게 함을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

3.3. 재조합 *Pichia pastoris* 균주의 5리터 발효조 배양을 통한 시안세균 유래의 탄산무수화 효소 생산

앞서 기술한 탄산무수화 효소 (소 적혈구 유래)에 의한 숙신산 생산성 향상이 특정 종류 효소의 작용에 국한되지 않으며 이산화탄소 활용 효율 증대를 통한 일반적인 원리에 기반을 둔다는 사실을 증명하기 위해 다른 종류의 탄산무수화 효소를 이용한 추가 실험을 진행하였다. 또한 소 적혈구 유래의 순수 정제된 탄산무수화 효소는 높은 가격대를 형성하고 있어, 산업화로의 적용을 목적하는 숙신산 생산 공정에 그대로 이용하기엔 경제성의 문제점이 발생한다. 따라서 경제적으로 자체 생산한 탄산무수화 효소를 숙신산 대량 생산 공정에 적용함으로써 경제성의 문제를 해결하고자 하였다. 실험 대상 탄산무수화 효소로는 시안세균인 *Synechosystis* sp. PCC 6803의 효소를 선택하였는데, 이 효소는 시안세균의 광합성 및 CO₂ 고정에 관여하는 필수적인 효소이다 [36-38]. 따라서 본 연구에서는 해당 탄산무수화 효소 유전자를 *Synechosystis* sp.로부터 cloning하고, 이 유전자를 숙주세포인 *Pichia pastoris*에서 발현시켜 효소를 생산, 정제하는 연구를 수행하였다 (전체의 공정을 Fig. 3에 제시).

우선 탄산무수화 효소의 cloning 작업을 위해 시안세균의 염색체 DNA를 추출하고 탄산무수화 효소 유전자를 증폭시키기 위해 PCR을 수행하였으며, 증폭된 탄산무수화 유전자 염기서열을 sequencing하여 본래의 유전자와 100% 일치하는

것을 확인하였다 (Blast 결과 100% 일치). 이 유전자를 pPICZa B vector에 ligation하고 숙주세포인 *Pichia pastoris* X-33에 transformation한 후, 형질전환 균주들을 selectable marker인 zeocin에 의해 선별하였다. 그 후 RT-PCR과 colony PCR을 통하여 탄산무수화 효소의 유전자가 숙주세포의 염색체 내로 안정적으로 integration된 재조합 *Pichia pastoris* 균주 (PCA4 균주로 명명)를 개발할 수 있었다.

상기의 유전자 재조합 기술을 통해 최종 선별된 PCA4 균주를 이용해서 methanol로 induction 시 탄산무수화 효소의 유전자가 발현되는지 확인하기 위해, 5 L 발효조 배양 실험을 수행하였다. Glycerol과 methanol을 배지 내로 feeding시켜가며 배양한 결과를 Fig. 4에 제시하였다. 생산균주가 최종 약 15 g/L 정도까지 안정적으로 성장하는 것으로 관찰되었다. 탄소원이자 에너지원으로 첨가된 glycerol의 경우, 24시간 경에 추가 feeding으로 인해 그 양이 일시적으로 증가하지만, 배양 후반에는 모두 소모하는 것으로 나타났다. pH는 산과 염기로 정밀 조절해 준 결과 배양기간 내내 6.2로 유지되었다. 한편, 용존 산소의 경우, 생산균주가 지수기 성장단계로의 진입에 따른 산소흡수율의 급격한 증가로 인해, 약 22시간 경에 배양액 중의 용존산소농도가 거의 0 (zero)에 도달하였다. 이 시점에서부터 교반속도를 180 rpm에서 420 rpm으로 점차로 증가시켜가며 (단 공기공급량은 1 vvm 으로 일정) 배양을 수행하였는데, 그 이유는 배양액 내로 용존 산소 전달률을 증가시켜 줌으로써, 생산균주의 용존 산소 결핍현상을 극복하기 위함이다. 또한 높은 교반속도 (300 rpm 이상)로 인해 발생하는 전단응력에 대해 재조합 생산균주가 안정적으로 적응하는 배양특성을 갖고 있는 것으로 파악되었다. 한편 배양 65시간 경에 배지 내의 영양분이 모두 고갈됨에 따라 공급되는 산소를 생산균주가 이용하지 못하게 되어, 배양액 내의 용존 산소 농도가 최종 포화용해도 수준까지 급격히 증가하는 것으로 관찰되었다.

최종적으로, 발현된 시안세균 유래의 탄산무수화 효소가

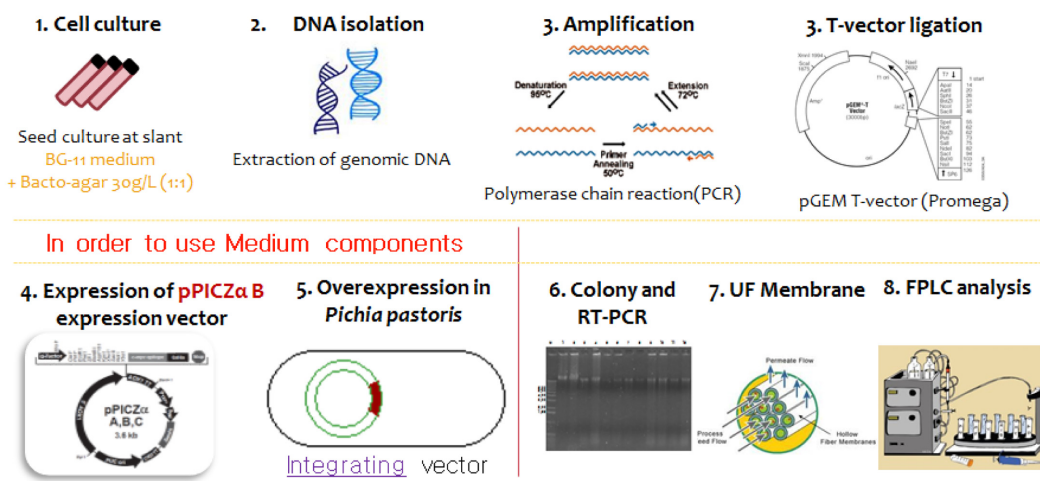


Fig. 3. The Schematic procedure for the development of the recombinant cells of *Pichia pastoris* X-33 for the production of cyanobacterial carbonic anhydrase (CA).

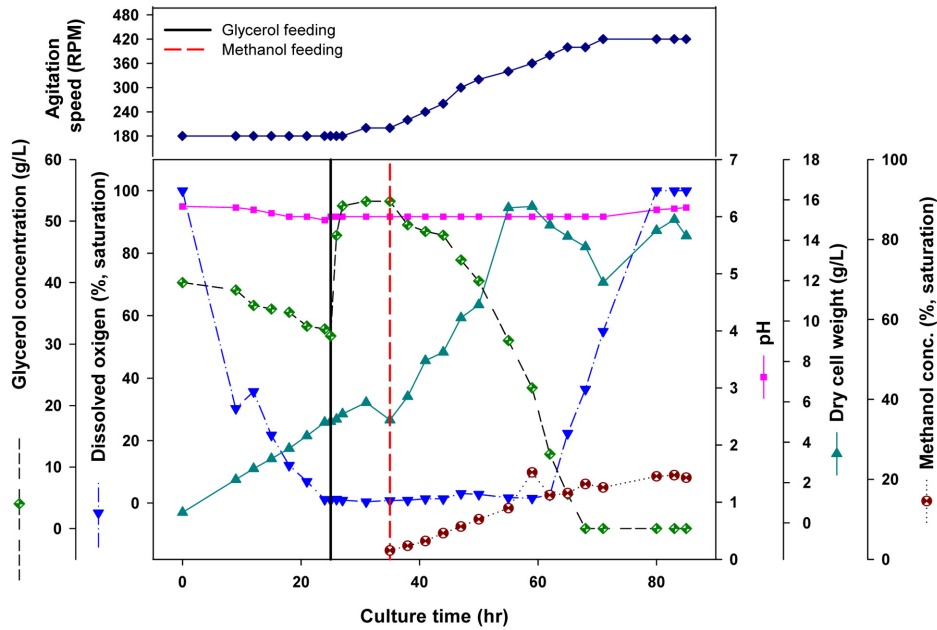


Fig. 4. Time-course profiles of cell growth, dissolved oxygen (DO), pH, glycerol and methanol concentrations in the fermentations performed with the recombinant cells of *Pichia pastoris* X-33 PCA4 (This transformant produces cyanobacterial carbonic anhydrase (CA) through methanol-induction process).

*Pichia pastoris*의 세포 외로 제대로 분비되는지 확인하기 위해서 배양액을 UF membrane을 통해 5배 농축한 후, nickel 수지가 포함된 column을 이용해서 탄산무수화 효소의 분리정제 공정을 수행하였다. 그 후 이 과정을 통해 얻은 샘플에 대해 탄산무수화 효소의 활성 여부를 조사하였다. pNPA (p-nitrophenyl acetate)를 기질로 이용한 활성 측정 결과, 주목할 만한 계도 소 적혈구 유래의 순수 정제된 탄산무수화 효소 (Sigma C2624) (대조군)는 224.56 units/mg의 활성을, 반면에 발효조 배양을 통해 얻은 샘플의 탄산무수화 효소는 대조군에 비해 약 1.2배 더 높은 276.54 units/mg의 활성을 보여주는 것으로 확인되었다 (Table 3).

3.4. 시안세균 유래의 재조합 탄산무수화 효소를 첨가한 생산배지에서의 Actinobacillus succinogenes 균주에 의한 숙신산 생산

상기 발효조 실험을 통해 활성 있는 시안세균 유래의 재조합 탄산무수화 효소를 확보할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 이와 같이 획득한 탄산무수화 효소를 *Actinobacillus succinogenes*을 이용한 숙신산 생산 공정의 배지성분으로 첨가하였

을 때, 숙신산의 생산성에 어떠한 영향을 미치는지 조사하고자 하였다. 대조군으로 소 적혈구 유래의 순수 정제된 탄산무수화 효소 (Sigma C2624)를 배지성분으로 첨가한 5리터 발효조 배양실험도 병행하였다. Fig. 5에 제시한 바대로, 시안세균 유래의 재조합 탄산무수화 효소의 경우, 대조군의 경우에 얻은 숙신산의 생산성 (96.5 g/L)과 거의 유사한 수준인 95.9 g/L의 생산성을 보여주는 것으로 나타났다. 이 주목할 만한 결과는 *A. succinogenes* 발효 시 관찰되는 탄산무수화 효소에 의한 숙신산의 생산성 증가 현상이 앞서 기술한 특정 종류의 효소 (소 적혈구 유래의 탄산무수화 효소)의 작용에 국한되지 않으며, *A. succinogenes*의 이산화탄소 활용 효율 향상에서 비롯된 현상임을 보여준다. 궁극적으로는 숙신산 생산성을 증가시키기 위하여 경제적으로 자체 생산한 시안세균 유래의 탄산무수화 효소를 배지성분으로 소량 첨가함으로써, 고농도로 첨가되는 비교적 고가의 (bi) carbonate 성분을 상당량 대체할 수 있을 것으로 예상되며, 그 결과 숙신산 발효공정의 경제성도 개선될 수 있을 것으로 판단된다.

숙신산 발효와 같이 기체 상태의 원료를 사용하는 공정에서 이산화탄소를 비롯한 기체 활용 효율을 높이는 기술은 제한적이며 대부분의 경우 높은 에너지 소모를 동반한다. 실용적 측면에서 본 연구결과는 이산화탄소 이용 발효공정의 효율을 향상시킬 수 있는 기술을 제시하고 있다. 본 실험 결과는 탄산무수화 효소 사용 시 숙신산 발효를 위해 투입되는 carbonate 원료의 양을 상당량 절감할 수 있음을 보여준다. 이를 통해 산업에서 배출되는 이산화탄소의 활용 가능성을 높여 진정한 의미의 공정의 친환경성을 확보하는 것이 가능하며 원료 및 공정의 단순화에 따른 에너지 소모량 및 비용

Table 3. Activities of the carbonic anhydrases (CAs) used in this study

Enzyme source	Specific activity ¹ (U/mg)
Bovine erythrocyte (Sigma C2624)	224.6
<i>Synechosystis</i> sp. PCC 6803 (produced by the recombinant <i>Pichia pastoris</i>)	276.5

¹See experimental section for the activity unit definition.

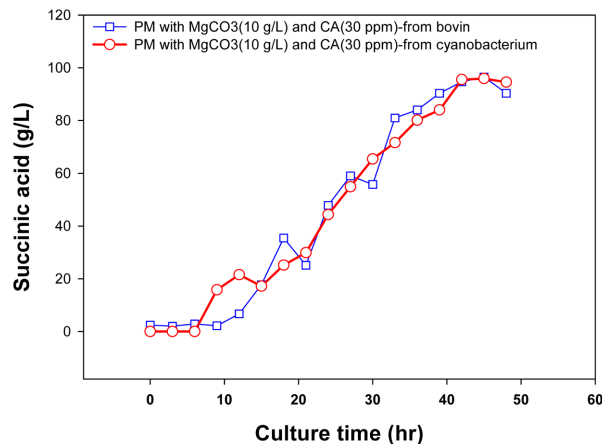


Fig. 5. Succinic acid production in the production medium supplemented with 30 ppm of bovine carbonic anhydrase (CA) as compared to the parallel medium with 30 ppm of cyanobacterial CA.

절감의 효과도 기대할 수 있을 것이다. 적절한 배지 및 발효 조건 적용 시 탄산무수화 효소의 현저한 활성저하는 나타나지 않았으나 필요 시 효소 고정화를 통한 안정화 및 재사용, 비정제 효소의 이용, 고효성 효소의 추가적인 개발을 통해 경제성 확보가 더욱 가능할 것으로 판단된다.

4. CONCLUSION

본 연구에서는 CO₂ 및 bicarbonate의 상호전환 반응을 매개하는 효소인 탄산무수화 효소 (carbonic anhydrase, CA)의 배지 내 첨가가 *A. succinogenes*의 숙신산 생산성에 미치는 영향을 분석하였다. 기체 CO₂를 공급하는 *A. succinogenes* 숙신산 발효 시 배지에 순수 정제된 탄산무수화 효소 (소 적혈구 유래)를 추가할 경우, 숙신산 최종 생산농도 (76.3 g/L)가 탄산무수화 효소가 비첨가 된 대조군에 비해 약 1.3배 이상 증가되는 고무적인 결과를 얻을 수 있었다. 또한 정제된 탄산무수화 효소와 10 g/L의 MgCO₃를 추가적으로 배지에 공급할 경우, 최종 숙신산 생산농도가 96.5 g/L에 달하는 수준까지 증가하는 것으로 나타났는데, 이로부터 탄산무수화 효소와 더불어 충분한 total carbonate 공급이 고농도 숙신산 발효를 위한 필수적 사항임을 확인할 수 있었다. 이와 같은 효능의 탄산무수화 효소를 경제적으로 자체 생산하여 숙신산 생산 공정에 이용하기 위해, 시안세균인 *Synechosystis* sp.로부터 탄산무수화 효소 유전자를 cloning하고, 이 효소를 재조합균주인 *Pichia pastoris*에서 생산하고자 5리터 발효조 배양실험을 수행하였다. UF membrane과 nickel column을 이용한 affinity chromatography를 통해 준비된 시료에 대해 pNPA (p-nitrophenyl acetate)를 기질로 이용한 효소활성 측정 결과, 주목할 만하게도 발효조 배양을 통해 얻은 재조합 탄산무수화 효소가 소 적혈구 유래의 순수 정제된 탄산무수화 효소에 비해 1.2배 더 높은 활성을 보여주는 것으로 확인되었다. 이와 같이 준비된 시안세균 유래의 탄산무수화 효소를 *Actinobacillus succinogenes*을 이용한 숙신산 생산 공정의 배지성분으로 첨가하였

을 경우 숙신산의 생산성이 95.9 g/L로서, 소 적혈구 유래의 순수 정제된 탄산무수화 효소 (Sigma C2624)가 첨가된 경우의 생산성 (96.5 g/L)과 거의 유사한 수준에 도달하는 것으로 관찰되었다. 이 주목할 만한 결과는 *A. succinogenes* 발효 시 관찰되는 탄산무수화 효소에 의한 숙신산의 생산성 증가 현상이 앞서 기술한 특정 종류의 효소 (소 적혈구 유래의 탄산무수화 효소)의 작용에 국한되지 않으며, *A. succinogenes*의 이산화탄소 활용 효율 향상에서 비롯된 현상임을 제시해 준다. 궁극적으로는 숙신산 생산성을 증가시키기 위하여 경제적으로 자체 생산한 시안세균 유래의 탄산무수화 효소를 배지성분으로 소량 첨가함으로써, 고농도로 첨가되는 비교적 고가의 (bi) carbonate 원료의 양을 상당량 절감할 수 있을 것으로 예상되며, 그 결과 경제적인 숙신산 발효공정의 개발이 가능해질 것으로 판단된다.

Acknowledgements

본 연구는 대한민국 산업통상자원부의 산업소재핵심기술개발사업 (과제번호: 10031912), 한국생산기술연구원 기관 고유사업 및 강원대학교 생명공학연구소의 지원을 받아 수행되었습니다.

REFERENCES

1. Zeikus, J. G., M. K. Jain, and P. Elankovan (1999) Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *APPL. Microbiol. Biotechnol.* 51: 545-552.
2. McKinlay, J. B., C. Vieille, and J. G. Zeikus (2007) Prospects for a bio-based succinate industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76: 727-740.
3. 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: 207-216.
4. Lee, P. C., S. Y. Lee, S. H. Hong, and H. N. Chang (2002) Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 663-668.
5. Lin, H., G. N. Bennett, and K. Y. San (2005) Genetic reconstruction of the aerobic central metabolism in *Escherichia coli* for the absolute aerobic production of succinate. *Biotechnol. Bioeng.* 89: 148-156.
6. 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.
7. Nghiem, N. P., B. H. Davison, B. E. Suttle, and G. R. Richardson (1997) Production of succinic acid by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 63: 565-576.
8. Oh, I. J., H. W. Lee, C. H. Park, S. Y. Lee, and J. Lee (2008) Succinic acid production by continuous fermentation process using

- Mannheimia succiniciproducens* LPK7. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 908-912.
9. Wu, H., Z. M. Li, L. Zhou, and Q. Ye (2007) Improved succinic acid production in the anaerobic culture of an *Escherichia coli* PflB LdhA double mutant as a result of enhanced anaerobic activities in the preceding aerobic culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 7837-7843.
 10. McKinlay, J. B., Y. S. Hill, J. G. Zeikus, and C. Vieille (2007) Determining *Actinobacillus succinogenes* metabolic pathways and fluxes by NMR and GC-MS analyses of 13 C-labeled metabolic product isotopomers. *Metabolic Engineering* 9: 177-192.
 11. Lu, S. Y., M. A. Eiteman, and E. Altman (2009) Effect of CO₂ on succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations. *J. Biotechnol.* 143: 213-223.
 12. McKinlay, J. B., J. G. Zeikus, and C. Vieille (2005) Insights into *Actinobacillus succinogenes* fermentative metabolism in a chemically defined growth medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 6651-6656.
 13. VanderWerf, M. J., M. V. Guettler, M. K. Jain, and J. G. Zeikus (1997) Environmental and physiological factors affecting the succinate product ratio during carbohydrate fermentation by *Actinobacillus* sp. 130Z. *Arch. Microbiol.* 167: 332-342.
 14. Xi, Y. L., K. Q. Chen, J. Li, X. I. Fang, X. Y. Zheng, S. S. Sui, M. Jiang, and P. Wei (2011) Optimization of culture conditions in CO₂ fixation for succinic acid production using *Actinobacillus succinogenes*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38: 1605-1612.
 15. Koropatkin, N. M., D. W. Koppelaar, H. B. Pakrasi, and T. J. Smith (2007) The Structure of a Cyanobacterial Bicarbonate Transport Protein, CmpA. *J. Biological Chem.* 282: 2606-2614.
 16. Shibata, M., H. Katoh, M. Sonoda, H. Ohkawa, M. Shimoyama, H. Fukuzawa, A. Kaplan, and T. Ogawa (2002) Genes Essential to Sodium-dependent Bicarbonate Transport in Cyanobacteria. *J. Biological Chem.* 277: 18658-18664.
 17. Siiltemeyer, D., G. D. Price, D. A. Bryant, and M. R. Badger (1997) PsaE- and NdhF-mediated electron transport affect bicarbonate transport rather than carbon dioxide uptake in the *Cyanobacterium Synechococcus* sp. PCC7002. *Planta.* 201: 36-42.
 18. Lindskog, S. (1997) Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol. Ther.* 74: 1-20.
 19. Badger, M. R. and G. D. Price (1994) The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 369-392.
 20. Silverman, D. N. (1991) The catalytic mechanism of carbonic anhydrase. *Can. J. Bot.* 69: 1070-1078.
 21. Sultemeyer, D., C. Schmidt, and H. P. Fock (1993) Carbonic anhydrase in higher plants and aquatic microorganisms. *Physiol. Plant.* 88: 179-190.
 22. Suzuki, E., Y. Shiraiwa, and S. Miyachi (1994) The cellular and molecular aspects of carbonic anhydrase in photosynthetic microorganisms. *Prog. Phycol. Res.* 10: 2-54.
 23. Tashian, R. E. (1989) The carbonic anhydrase: widening perspectives on their evolution, expression and function. *Bioessays.* 10: 186-192.
 24. Wang, D., Q. Lia, W. Lia, J. Xinga, and Z. Su (2009) Improvement of succinate production by overexpression of a cyanobacterial carbonic anhydrase in *Escherichia coli*. *Enzyme Microb. Technol.* 45: 491-497.
 25. Dagert, M. and S. Ehrlich (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* 6: 23-28.
 26. Li, P., A. Anumanthan, X. G. Gao, K. Ilangovan, V. V. Suzara, N. Düzgünes, and V. Renugopalakrishnan (2007) Expression of Recombinant Proteins in *Pichia Pastoris*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 142: 105-124.
 27. Arjmand, S., E. Bidram, A. S. Lotfi, M. Shamsara, and S. J. Mowla (2011) Expression and Purification of Functionally Active Recombinant Human Alpha 1-Antitrypsin in Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*. *J. Med. Biotechnol.* 3: 127-134.
 28. Jahic, M., A. Veide, T. Charoenrat, T. Teeri, and S. O. Enfors (2006) Process Technology for Production and Recovery of Heterologous Proteins with *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Prog.* 22: 1465-1473.
 29. Siegel, R. S. and R. A. Brierley (1989) Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris* Produced in High-Cell-Density Fermentations with High Cell Yields as Vehicle for Recombinant Protein Production. *Biotechnol. Bioeng.* 34: 403-404.
 30. Tashian, R. E., D. P. Douglas, and Y. L. Yu (1964) Esterase and hydrolase activity of carbonic anhydrase-I from primate erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 14: 256-261.
 31. Gibbons, B. H. and J. T. Edsall (1963) Rate of hydration of carbon dioxide and dehydration of carbonic acid at 25 degrees. *J. Biol. Chem.* 238: 3502-3507.
 32. Bergmann, F., S. Rimón, and R. Segal (1958) Effect of pH on the activity of eel esterase towards different substrates. *J. Biochem.* 68: 493-499.
 33. Wilbur, K. M. and N. G. Anderson (1948) Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.* 176: 147-154.
 34. McKinlay, J. B., J. G. Zeikus, and C. Vieille (2005) Insights into *Actinobacillus succinogenes* fermentative metabolism in a chemically defined growth medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 6651-6656.
 35. Song, H. and S. Y. Lee (2006) Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 39: 352-361.
 36. So, A. K. C. and G. S. Espie (1998) Cloning, characterization and expression of carbonic anhydrase from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Mol. Biol.* 37: 205-215.
 37. Schmetterer, G. (1994) Cyanobacterial respiration. In The molecular biology of cyanobacteria. Springer Netherlands. *The Mol. Biol. of Cyanobacteria* 1: 409-435.
 38. Kupriyanova, E. V., M. A. Sinetova, A. G. Markelova, S. I. Allakhverdiev, D. A. Los, and N. A. Pronina (2011) Extracellular β -class carbonic anhydrase of the alkaliphilic cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*. *J. Photochem. Photobiol.* 103: 78-86.