(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0090463
(43) 공개일자 2011년08월10일

(51) Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01) *C12P 7/40* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0010248
(22) 출원일자 2010년02월04일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울 마포구 신수동 1-1 서강대학교
한국과학기술원
대전 유성구 구성동 373-1
(72) 발명자
이진원
서울특별시 송파구 방이동 89올림픽선수,기자촌아파트201-1601호
오영훈
서울특별시 마포구 연남동 229-62번지 4층
이상엽
대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 212동 702호
(74) 대리인
양부현

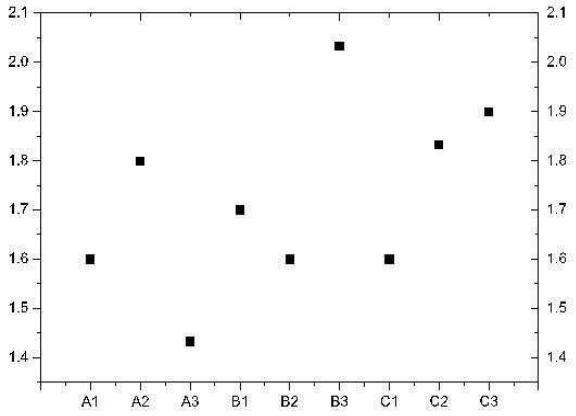
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 숙신산 생산 균주의 배양배지 제조 방법

(57) 요 약

본 발명은 숙신산 발효 균주의 숙신산 생산 수율을 증가시키기 위한 배양배지의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명은 배지의 최적 조성 비율을 결정함에 있어 실험 통계학적 기법인 다구치 방법을 적용함으로써 배지 조성 비율 결정 실험에 소모되는 시간, 노력 및 비용을 최소화하고, 궁극적으로 다양한 화합물의 핵심 전구체인 숙신산을 친환경적이면서도 효율적인 공정을 통하여 대량생산할 수 있는 새로운 미생물 발효공정에 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20090065580
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관
연구사업명 미래기반기술개발사업
연구과제명 고효율 맨하이미아 균주를 이용한 숙신산 생산 공정의 생산성 극대화 기술 개발
기여율
주관기관 서강대학교 산학협력단
연구기간 2008년 04월 01일 ~ 2011년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

다구치(Taguchi) 실험계획법을 이용하여 (a)마그네슘 이온 공급원, (b)칼슘 이온 공급원 및 (c)제이인산칼륨(K_2HPO_4)의 함량비를 결정하는 단계를 포함하는 숙신산 생산 균주의 배양배지 제조 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 마그네슘 이온 공급원은 마그네슘 하이드록사이드($Mg(OH)_2$), 마그네슘 보레이트($Mg_2B_2O_5$), 마그네슘 설페이트($MgSO_4$), 마그네슘 브로마이드($MgBr_2$), 마그네슘 카보네이트($MgCO_3$), 마그네슘 포스페이트($Mg(H_2PO_4)_2$), 마그네슘 헥사플루오로실리케이트($MgSiF_6 \cdot 6H_2O$) 및 마그네슘 클로라이드($MgCl_2$)로 구성된 군우로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 마그네슘 이온 공급원은 마그네슘 클로라이드($MgCl_2$)인 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 칼슘 이온 공급원은 칼슘 카보네이트($CaCO_3$), 칼슘 하이드록사이드($Ca(OH)_2$), 칼슘 클로라이드($CaCl_2$), 칼슘 사이클라메이트($Ca(C_6H_{11}NHSO_3)_2$, 칼슘 글루코네이트($Ca(C_6H_{11}O_7)_2$), 칼슘 포스페이트($Ca_3(PO_4)_2$), 칼슘 스테아레이트($Ca(C_{18}H_{35}O_2)_2$로 구성된 군우로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 칼슘 이온 공급원은 칼슘 클로라이드($CaCl_2$)인 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 다구치(Taguchi) 실험계획법은 마그네슘 이온 공급원의 함량(A1, A2, A3), 칼슘 이온 공급원의 함량(B1, B2, B3) 및 제이인산칼륨(K_2HPO_4)의 함량(C1, C2, C3)을 각각 3가지 검증 가능한 레벨(Level)로 선정하고, 직교 배열표(orthogonal array)의 순서(A1B1C1, A1B2C2, A1B3C3, A2B1C2, A2B2C3, A2B3C1, A3B1C3, A3B2C1, A3B3C2)에 따라 실험을 실시하여 각 인자별로 평균 숙신산 수율이 가장 높은 조합을 선정하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 숙신산 생산 균주는 맨하이미아 속(*Mannheimia* genus) 균주인 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 8

다구치(Taguchi) 실험계획법으로 선정된 함량비를 가지는 (a)마그네슘 이온 공급원, (b)칼슘 이온 공급원 및 (c)제이인산칼륨(K_2HPO_4)을 유효성분으로 포함하는 숙신산 생산 균주의 배양배지.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 마그네슘 이온 공급원은 마그네슘 클로라이드($MgCl_2$)이고, 칼슘 이온 공급원은 칼슘 클로라이드($CaCl_2$)인 것을 특징으로 하는 배양배지.

청구항 10

제 8 항에 있어서, 상기 숙신산 생산 균주는 맨하이미아 속(*Mannheimia* genus) 균주인 것을 특징으로 하는 배양배지.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 통계학적인 방법을 통해 숙신산 생산 균주의 최적의 배양 조건을 결정함으로서 숙신산 생산 균주의 배양배지를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 4개의 탄소원으로 이뤄져있고 2개의 카르복실기를 갖는 숙신산(succinic acid)은 호박으로부터 얻었다고 하여 호박산이라고도 불린다. 숙신산은 계면활성제, 의약품 및 음식 첨가제, 산업적으로 중요한 여러 가지 화합물의 전구체로써 널리 이용되고 있다. 1,4-부탄디올, N-메틸 피롤리딘, 숙신산염, 테트라하이드로퓨란, PBS(polybutyrate succinate)와 폴리아마이드 등과 같은 화합물이 숙신산으로부터 생산되는 대표적인 물질들이다. 또한 청정용매의 원료로도 각광받으면서 막대한 시장 규모를 이룰 것으로 기대되고 있다.

[0003] 숙신산을 생산하는 방법은 크게 전통적인 석유화학기반 공정과 미생물 발효 공정을 이용하는 두 가지 방법이 있으며, 현재 산업적으로 이용되는 대부분의 숙신산은 거대 화학회사에서 전통적인 화학공정을 통해 생산되고 있다. 그러나 화석 연료가 고갈되고 있고 화학공정에서 발생하는 온실 가스를 비롯한 여러 가지 환경 오염 물질 등으로 인해 생물 공정으로 숙신산을 생산하기 위한 많은 연구가 진행되었다. 지난 연구와 노력의 결과로 현재는 미생물 발효 공정을 통한 숙신산의 생산이 전통적인 화학공정에 대해 경쟁력을 가질 정도로 발전되었다.

[0004] 숙신산 발효 공정에서 달성하고자 하는 궁극적인 목표는 경제적 친환경적인 생물 공정을 통해 많은 양의 숙신산을 생산하는 것이다. 일반적으로 미생물 발효 공정에서 생산 수율과 생산량을 증대시키기 위해 두 가지 접근법이 가능하다. 그 첫번째는 하나의 작은 생산 공장이라고 할 수 있는 미생물 자체의 목적물질 생산능을 증대시키는 것이다. 미생물의 생산능을 증대시키기 위해 대사공학적, 시스템 생물학적, 유전공학적인 연구와 실험이 수행되고 있으며 이러한 기술은 이미 전세계적으로 상당한 수준에 도달해 있다. 두 번째는 미생물이 목표물질을 보다 많이 생산할 수 있는 환경을 조성해주는 것으로 배지 최적화, 공정적인 개선법 등이 사용된다.

[0005] 그러나 현재까지 미생물 발효공정을 이용하여 목적물질의 산업적 대량생산의 효율적인 시스템을 구축한 예는 아직 없다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 기존의 유기화학적 공법을 대체하는 미생물 발효공법을 이용하면서도 높은 수율로 숙신산을 대량 생산할 수 있는 신규한 숙신산 생산방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과 균주의 배양 배지의 필수성분 간의 최적 조성비를 직교 배열법(orthogonal array method)을 통한 통계학적인 방법을 이용하여 단시간 내에 설정할 수 있음을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 따라서 본 발명의 목적은 숙신산 생산 균주의 배양배지 제조 방법을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 숙신산 생산 균주의 배양배지를 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다구치(Taguchi) 실험계획법을 이용하여 (a)마그네슘 이온 공급원, (b)칼슘 이온 공급원 및 (c)제이인산칼륨(K_2HPO_4)의 함량비를 결정하는 단계를 포함하는 숙신산 생산 균주의 배양배지 제조 방법을 제공한다.

[0012] 본 발명자들은 기존의 유기화학적 공법을 대체하는 미생물 발효공법을 이용하면서도 높은 수율로 숙신산을 대량 생산할 수 있는 신규한 숙신산 생산방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과 균주의 배양 배지의 필수성분 간의 최적 조성비를 직교 배열법(orthogonal array method)을 통한 통계학적인 방법을 이용하여 단시간 내에 설정할 수 있음을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0013] 본 명세서에서 용어 "다구치(Taguchi) 실험계획법"은 결과를 결정하는 복수의 요소들 간의 최적의 조합을 도출하기 위해 직교배열표를 이용하는 부분실시법을 말한다. 즉, 전조합 실시법(full-factorial experiment)과 부분 실시법(fractional factorial experiment)의 장점 만을 결합하여, 단순화된 실험계획으로 인하여 시간, 노력 및 비용을 크게 절약하면서도 한 번에 많은 인자들을 고려하는 직접적인 방법으로서 주 효과 분석만으로도 최적 조건과 우수한 재현성을 보장하게 된다.

[0014] 이를 구체적으로 설명하면, 예를 들어 본 발명에서 인자로 "K_2HPO_4, $CaCl_2.2H_2O$ 및 $MgCl_2.6H_2O$"의 세 가지 화합물을 설정한다고 가정했을 때, 하기 표 1과 같이 각각의 인자를 세 개의 수준(Level)으로 조합해줄 경우 가장 적합한 조성 비율을 결정하기 위해서는 전조합 실시법(full-factorial experiment)에 의할 때 3^3=27번의 실험이 필요하다. 그러나 실험 설계에 다구치 방법의 직교배열법을 적용할 경우 필요한 실험의 횟수는 총 9회가 된다. 인자 "K_2HPO_4, $CaCl_2.2H_2O$ 및 $MgCl_2.6H_2O$"를 각각 A, B, C라 하면 실험 설계를 위한 인자와 수준을 하기 표1과 같이 나타낼 수 있으며, 표 1의 조합으로 직교 배열법을 적용할 경우 각 실험은 하기 표 2와 같이 구성된다.

표 1

[0015] 예시적인 다구치 방법에서의 각 인자 및 이들의 수준

인자	수준1	수준2	수준3
A: K_2HPO_4	5.22 g/l	10.44 g/l	20.88 g/l
B: $CaCl_22H_2O$	0.01 g/l	0.02 g/l	0.04 g/l
C: $MgCl_26H_2O$	0.1 g/l	0.2 g/l	0.4 g/l

[0016]

표 2

[0017] 직교배열법을 적용한 실험의 조합

실험	A	B	C	숙신산 수율
1	수준1	수준1	수준1	결과1
2	수준1	수준2	수준2	결과2
3	수준1	수준3	수준3	결과3
4	수준2	수준1	수준2	결과4
5	수준2	수준2	수준3	결과5
6	수준2	수준3	수준1	결과6
7	수준3	수준1	수준3	결과7
8	수준3	수준2	수준1	결과8
9	수준3	수준3	수준2	결과9

[0018] 상기 표 2의 실험 결과로 얻은 배지내 숙신산 수율을 통해 각 인자의 수준별 평균 결과 값을 얻을 수 있다. 인자 A의 수준1에서의 평균 결과 값을 "$\overline{A_1}$" 이라고 하면, 각 인자의 수준별 평균 결과는 아래와 같다.

[0019] $$\overline{A_1}=\frac{결과1+결과2+결과3}{3},\quad \overline{A_2}=\frac{결과4+결과5+결과6}{3},\quad \overline{A_3}=\frac{결과7+결과8+결과9}{3}$$

$$\overline{B_1}=\frac{결과1+결과4+결과7}{3},\quad \overline{B_2}=\frac{결과2+결과5+결과8}{3},\quad \overline{B_3}=\frac{결과3+결과6+결과9}{3}$$

$$\overline{C_1}=\frac{결과1+결과6+결과8}{3},\quad \overline{C_2}=\frac{결과2+결과4+결과9}{3},\quad \overline{C_3}=\frac{결과3+결과5+결과7}{3}$$

[0020] 각 결과 값을 하기 표 3과 같이 가정하고 평균 결과 값을 그래프로 나타내면 도 1과 같다.

표 3

[0021] 각 실험별 숙신산 수율의 가정값

실험 결과	숙신산 수율(g/l)
결과1	1.4
결과2	1.5
결과3	1.9
결과4	1.7
결과5	1.8
결과6	1.9
결과7	2.0
결과8	1.5
결과9	2.3

[0022] 도 1의 결과로부터 각 인자 별로 평균 값이 가장 높은 $\overline{A_2}$, $\overline{B_3}$, $\overline{C_3}$의 경우, 즉 인자 A의 경우 수준 2, 인자 B의 경우 수준 3, 인자 C의 경우 수준 3이 최적의 조성 비율임을 추정할 수 있다. 이로부터 설정해준 인자와 수준 내에서 최대의 숙신산 수율을 위한 최적의 배지 조성 조건은 K_2HPO_4, $CaCl_2.2H_2O$ 및 $MgCl_2.6H_2O$가 각각 10.44 g/l, 0.04 g/l, 0.4 g/l 인 조합으로 추정할 수 있다.

[0023] 본 발명은, 상기 예시적으로 기술한 단계를 통해 시간과 비용이 절약되면서도 신뢰성있는 결과가 보장되는 실험 계획을 설립함으로서 최적의 배지 조성 비율을 가진 숙신산 생산 균주의 배양배지 제조에 이용될 수 있다.

[0024] 본 명세서에서 용어 "숙신산 생산 균주"는 스스로의 효소를 이용한 발효(fermentation) 과정을 통하여 최종

대사산물로써 숙신산을 생산하는 균주로서 아나이로비오스피릴룸 숙시니키프로두켄스(*Anaerobiospirillum succiniciproducens*), 액티노바실러스 숙시노겐(*Actinobacillus succinogenes*) 및 맨하이미아 숙시니키프로두켄스(*Mannheimia succiniciproducens*)와 같은 혐기성 박테리아(anaerobic bacteria)를 포함하나, 이에 제한되지 않고 대사산물로서 숙신산을 생산하는 균주로써 당업계에 알려진 모든 균주를 포함한다.

[0025] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 마그네슘 이온 공급원은 마그네슘 하이드록사이드($Mg(OH)_2$), 마그네슘 보레이트($Mg_2B_2O_5$), 마그네슘 설페이트($MgSO_4$), 마그네슘 브로마이드($MgBr_2$), 마그네슘 카보네이트($MgCO_3$), 마그네슘 포스페이트($Mg(H_2PO_4)_2$), 마그네슘 헥사플루오로실리케이트($MgSiF_6 \cdot 6H_2O$) 및 마그네슘 클로라이드($MgCl_2$)로 구성된 군우로부터 선택된다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 마그네슘 이온 공급원은 마그네슘 클로라이드($MgCl_2$)이다.

[0026] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 칼슘 이온 공급원은 칼슘 카보네이트($CaCO_3$), 칼슘 하이드록사이드($Ca(OH)_2$), 칼슘 클로라이드($CaCl_2$), 칼슘 사이클라메이트($Ca(C_6H_{11}NHSO_3)_2$, 칼슘 클루코네이트($Ca(C_6H_{11}O_7)_2$), 칼슘 포스페이트($Ca_3(PO_4)_2$), 칼슘 스테아레이트($Ca(C_{18}H_{35}O_2)_2$로 구성된 군우로부터 선택된다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 칼슘 이온 공급원은 칼슘 클로라이드($CaCl_2$)이다.

[0027] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 다구치(Taguchi) 실험계획법은 마그네슘 이온 공급원의 함량(A1, A2, A3), 칼슘 이온 공급원의 함량(B1, B2, B3) 및 제이인산칼륨(K_2HPO_4)의 함량(C1, C2, C3)을 각각 3가지 검증 가능한 레벨(Level)로 선정하고, 직교 배열표(orthogonal array)의 순서(A1B1C1, A1B2C2, A1B3C3, A2B1C2, A2B2C3, A2B3C1, A3B1C3, A3B2C1, A3B3C2)에 따라 실험을 실시하여 각 인자별로 평균 숙신산 수율이 가장 높은 조합을 선정하여 이루어진다.

[0028] 본 명세서에서 용어 “검증 가능한 레벨”은 각 인자들에 대한 수준 값이 반복 실시하여 동일한 통계학적 결론(statistical conclusion)에 이를 수 있을 만큼 객관적인 것을 의미한다.

[0029] 본 발명에 따르면, 마그네슘 이온 공급원의 함량, 칼슘 이온 공급원의 함량 및 제이인산칼륨(K_2HPO_4)의 함량을 3가지 인자로 하여 각각의 수준을 검증 가능한 3 단계의 레벨로 설정하게 된다. 즉, 마그네슘 이온 공급원의 함량은 A1, A2 및 A3의 3 단계로, 칼슘 이온 공급원의 함량은 B1, B2 및 B3의 3 단계로, 제이인산칼륨(K_2HPO_4)의 함량을 C1, C2 및 C3의 3 단계로 설정하여 이후 이들 간의 9가지 경우의 조합을 설정한 직교배열표에 따라 실험을 수행한다. 그 후 상기에서 기술한 과정에 따라, 각 인자 별로 최고값을 가지는 수준 값을 선정하여 최적의 조합비를 정하게 된다.

[0030] 각각의 인자의 검증 가능한 레벨은 당업계에 알려진 당해 인자의 일반적인 배양 배지 내의 조성 범위를 크게 벗어나지 않는 범위 내에서 다양하게 설정될 수 있다. 예를 들어, 마그네슘 이온 공급원의 함량은 0.10-1.00 g/l의 범위 내에서, 칼슘 이온 공급원의 함량은 0.01- 0.10 g/l의 범위 내에서, 제이인산칼륨(K_2HPO_4)의 함량은 1.00-30.00 g/l의 범위 내에서 3 단계의 레벨로 설정될 수 있다.

[0031] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 숙신산 생산 균주는 맨하이미아 속(*Mannheimia* genus) 균주이다. 보다 바람직하게는 본 발명의 숙신산 생산 균주는 맨하이미아 숙시니키프로두켄스(*Mannheimia succiniciproducens*) 또는 상기 박테리아와 동일한 RFLP DNA 프로파일을 갖는 그의 자손 박테리아이다.

[0032] 본 발명의 맨하이미아 속 균주는 혐기성 그람-음성 균으로, 파스퇴렐라 과(Pasteurellaceae family)의 막대형(rod-shaped) 박테리아이며, *M. haemolytica, M. glucosida, M. granulomatis, M. ruminalis* 및 *M. varigena* 등의 종(species)을 포함한다. 본 발명에 따르면, 맨하이미아 속 균주인 맨하이미아 숙시니키프로두켄스(*Mannheimia succiniciproducens*)는 한우의 반추위에서 분리 동정된 루멘 박테리아의 변이균주로서, CO_2 존재하의 혐기성 상황 하에서 주요 발효 산물로서 숙신산을 대량으로 생산한다.

[0033] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다구치(Taguchi) 실험계획법으로 선정된 함량비를 가지는 (a)마그네슘 이온 공급원, (b)칼슘 이온 공급원 및 (c)제이인산칼륨(K_2HPO_4)을 유효성분으로 포함하는 숙신산 생산 균주의 배양배지를 제공한다.

[0034] 본 발명에 이용 가능한 배지는 숙신산 생산 균주의 배양에 이용되는 어떠한 배지도 포함하나, 바람직하게는 MH3 배지, MRS(deMan Rogosa Sharpe) 브로스 배지, APT(All Purpose with Tween) 배지 또는 BHI(Brain Heart Infusion) 배지이며, 가장 바람직하게는 MH3 배지이다. 본 발명의 배양 배지는 상기의 무기염류 이외에도 균주의 생장에 필수적인 탄소원 또는 질소원을 포함할 수 있다.

[0035] 본 명세서에서 용어 "질소원(nitrogen source)"은 미생물의 생장에 있어서 단백질, 퓨린(purine), 피리미딘(pyrimidine) 및 다당류 키틴(chitin) 등의 합성에 필수적인 질소원자를 포함하는 유기 또는 무기물을 말한다. 무기태 질소원으로는 KNO_3, $(NH_4)_2SO_4$, $NH_4H_2PO_4$, $(NH_4)_2HPO_4$, NH_4NO_3, $NaNO_3$, $NaNO_2$ 및 NH_4Cl이 있으며, 유기태 질소원으로는 아스파라긴, 글루타민산, 우레아(Urea), 펩톤(Peptone) 등이 있다. 미생물은 암모니움염이나 질산염 등의 무기태 질소를 이용할 수 있으나, 미생물의 종류에 따라 아미노산이나 펩톤 등의 유기태 질소를 요구하는 것도 있다.

[0036] 본 명세서에서 용어 "탄소원(carbon source)"은 미생물의 생장에 있어서 세포구조와 에너지원으로 사용되는 탄소를 포함하는 고분자 또는 저분자 물질을 의미하며, 다당류(polysaccharides), 단당류(monosaccharides), 유기산(organic acid), 아미노산(amino acid), 알콜(alcohol), 다환식 함유물(polycyclic compounds), 세루로오스(cellurose), 헤미셀루로오스(hemicellurose), 리그닌(lignin) 등이 포함된다. 통상적으로 배양 배지에 첨가되는 탄소원의 농도는 1-5 % 정도이나, 실제 배양 미생물에 따른 구체적인 탄소원의 최적 농도는 알려져 있지 않다. 그밖에 미생물의 배양 및 발효를 위한 배양 배지에 관한 상세한 내용은 Kubitschek, H. E., *Introduction to Research with Continuous Cultures*. Englewood Cliffs, N.J.:Prentice-Hall, Inc., 1970; Mandelstam, J., et al., *Biochemistry of Bacterial Growth*, 3rd ed. Oxford:Blackwell, 1982; Meynell, G.G., et al., *Theory and Practice in Experimental Bacteriology*, 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1970; Gerhardt, P., ed., *Manual of Methods for General Bacteriology*, Washington: Am. Soc. Microbiol, 1981에 개시되어 있다.

[0037] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 배양배지의 마그네슘 이온 공급원은 마그네슘 클로라이드($MgCl_2$)이고, 칼슘 이온 공급원은 칼슘 크로라이드($CaCl_2$)이다.

[0038] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 숙신산 생산 균주는 맨하이미아 속(*Mannheimia* genus) 균주이다.

발명의 효과

[0039] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0040] (a) 본 발명은 숙신산 발효 균주의 숙신산 생산 수율을 증가시키기 위한 배양배지의 제조방법을 제공한다.

[0041] (b) 본 발명은 다양한 화합물의 핵심 전구체인 숙신산을 친환경적이면서도 효율적인 공정을 통하여 대량생산할 수 있는 새로운 미생물 발효공정에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1은 다구치 방법의 직교 배열표 상의 각 결과 값을 하기 상기 표 3과 같이 가정하였을 때, 이의 평균 결과 값을 그래프로 나타낸 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는

것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0044] **실시예**

[0045] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1

