

## 재조합 대장균의 세포 성장에 대한 포도당과 맥아당 농도의 영향

\*김 종 수 · \*\*신 주 연 · †차 월 석

조선대학교 공과대학 화학공학과

\*이리농공전문대학 화학공업과

\*\*조선대학교 산업대학 식품영양학과

### Effects of Concentrations of Glucose and Maltose on the Growth of Recombinant *E. coli*

Jong-Soo Kim\*, Ju-Yun Shin\*\*, and Wol-Suk Cha†

Dept. of Chemical Engineering, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

\*Dept. of Chemical Engineering, Iri National College of Agriculture & Technology, Iksan, Chonbuk 570-110, Korea

\*\*Dept. of Food Nutrition, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

#### ABSTRACT

The growth of recombinant *E. coli* and formation of the by-products were investigated. Glucose was consumed in approximately 8 hours of cultivation when initial glucose concentration was 5g/l. When higher initial glucose concentrations were employed, it took approximately 16 to 20 hours for the glucose to be consumed. When maltose or glucose was used as a carbon source, lactic acid and acetic acid were main by-products, while propionic acid and methanol production was not significant. Much by-products were formed at the higher initial carbon source concentrations. Higher concentration of lactic acid was observed when glucose was used, while higher concentration of acetic acid was observed when maltose was used. Lactic acid production affected the cell yield while acetic acid production affected the growth rate.

#### 서 론

재조합 미생물 배양을 최적화 하기 위해서는 재조합 미생물의 유전자적인 인자에 대한 고찰과, 환경 조건 조절을 통한 배양과 분리공정의 개선으로 재조합 유전자의 발현율을 향상시키기 위한 연구가 진행되고 있다(1-4). 또한 재조합 미생물 공정의 생산성을 최대화하기 위해서는 외부에서 주입한 유전자와

숙주 세포 사이의 상호작용, 유전자의 발현 특성과 염색체 사이의 생합성기구, 에너지, 전구체를 둘러싼 경쟁으로 인하여 재조합 유전자의 발현과 세포의 성장과는 반비례 관계를 가진다(5).

이러한 연구들로서 재조합 대장균을 이용하여 fed-batch 배양법에서 phenylalanine의 생산을 위한 일련의 최적화 연구가 행해졌다(6, 7). 또 phenylalanine 생산에 미치는 tyrosine, 산소와 glucose의 첨가 방법에 대한 실험 결과를 기초로 하여 phenyl-

† Corresponding Author

alanine 농도와 생산성의 향상을 위한 제어방법을 개발하여 적용하였다(8). 이 결과로서는 용존 산소와 glucose 공급을 조절하여 acetic acid의 생산을 최소화하였고 tyrosine의 양은 균체 증식과 phenylalanine 생산에 적합한 정도로 유지하였다.

또한 재조합 효모의 고농도 배양을 위한 최적화 방법으로 glucose 농도를 조절하여 "Crabtree" 효과에 의한 ethanol 생성을 억제하며 세포 성장을 유도시켜야 한다고 발표된 바 있다(9).

한편 재조합 단백질의 생산에 가장 많이 사용되고 있는 숙주로서 *E. coli*(10), *Bacillus*(11), *Streptomyces*(12), *yeast*(13) 및 *Aspergillus*(14) 등이며, 이들 중 *Bacillus*(15)는 *E. coli*에 비해 질소나 탄소 등의 영양소가 제한되었을 때 많은 양의 다양한 프로티아제를 생산하기 때문에 이의 제거 및 프로티아제의 생산과 함께 수반되는 내생포자 형성을 차단하는 좋은 숙주 개발이 된다고 발표된 바 있다. 또한 *Bacillus*에서 프로티아제로서는 neutral, alkaline, extracellular, metallo, intracellular serine, bacillopeptidase 등이 proteolysis에 관여하고 있다.

한편 *Bacillus*는 non-pathogenic인 gram-positive bacteria로 산업적으로 널리 이용되고 있으며, 이 미생물은 단지 하나의 cell membrane만 갖고 있고 많은 종류의 단백질을 체외로 분비하고 있다. 그리고 cloned protein의 세포의 분비가 protein의 안정성과 분리정제의 용이성을 증가시키는 바람직한 현상이므로, *Bacillus*종을 이용하여 cloned protein을 생산하려는 연구가 활발하다. 그러나, *B. subtilis*를 이용한 유전자 재조합 단백질 생산을 위한 숙주로 이용하는데 큰 장애가 되는 것은 plasmid의 불안정성이다.

이러한 plasmid의 불안정성은 삽입되는 유전자의 크기가 클수록 더 커진다(16). 그리고 plasmid의 안정도와 함께 많이 연구되고 있는 부분이 *B. subtilis*에서의 cloned protein의 부분이며 현재까지 널리 쓰이는 signal sequence로는 *B. amyloliquefaciens*의 neutral protease 유전자이다(17-19).

또 *B. amyloliquefaciens*에서  $\alpha$ -amylase 형성에 대한 기질로 glucose 및 maltose를 이용함으로써 증가시킬 수 있다고도 한다(20). Welker 등(21)은 *B. stearothermophilus*에서  $\alpha$ -amylase 형성에 대한 탄소원의 영향으로부터 세포막  $\alpha$ -amylase를 발견했고, 화학적으로  $\alpha$ -amylase 연구에 적용 규명하였으며, 탄소원 종류로부터 cell의 유도기를 감소시키고 성장율과 총 효소 생산물을 증가시켰다. 그리고  $\alpha$ -

amylase는 대수기에 생산됐고 생산량은 성장물에 반비례함과 탄소원이 부족할수록 효소 생산이 증가했다고 보고한 바 있다.

Kobayashi(22)는 lactose와 glucose의 공급에 따른 세포성장 및 효소 생성에서 lactose공급시에 효소 생성은 높게 되지만 세포 성장은 광학적 밀도치로서 660이면 저지되고, glucose공급시에는 세포 성장은 높은 농도의 결과이지만 효소의 농도는 lactose에 비해 절반이라 했고 또 이 두 기질을 바꾸면서 세포와 효소의 농도 방법을 제안했다.

최근 재조합된 *E. coli* 등의 미생물들의 배양형식과 조건에서 고농도 세포배양에 관한 연구들이 진행되고 있다. Lee 등(23)은 연속 배양 세포막에서 penicillin acylase를 생산하는 재조합된 *E. coli*의 고농도 세포 배양 조건으로서, cell 성장의 저해제로서는 acetic acid이고 세포밀도를 145g/L(건조 질량)까지 증가시켰으며, acetic acid를 최소화하는데는 glucose와 용존 산소량의 제한을 받고 반응의 생산성은 batch식보다 재순환식이 10배 더 높다고 제시한 바도 있다.

$\alpha$ -Amylase는 전분 분해 효소로서 동물, 식물 및 미생물로부터 얻어지며, 특히 미생물에 의한  $\alpha$ -amylase는 대량 생산과 정제가 쉽기 때문에 많이 연구되고 있으며, 열적으로 안정하여 산업적으로 유용하게 적용되고 있고, 특히 열안정성  $\alpha$ -amylase는 *Bacillus* 종류에서 생산되고 있다(24, 25).

또 *Bacillus* 종의 환경 조건의 영향(26, 27)과  $\alpha$ -amylase 생산 및 합성기작에 대하여서도 연구되어 왔다(28, 29).

이상과 같이 일반 미생물을 비롯하여 재조합 미생물에 대한 배양 조건들이 다양하게 연구되어지고 있으나, *Bacillus*류의  $\alpha$ -amylase 생성 및 균체 고농도 배양에 따른 반응기 제어에 대한 연구는 더욱 발전되어야 하며, 재조합 미생물을 이용시에 유용한 산물의 생산성 향상에 대해 더욱 연구되어야 한다고 본다.

그러므로 본 연구에서는 재조합 대장균을 효율적으로 배양하기 위하여 탄소원의 종류와 농도를 변화시켜 주면서 세포 성장 상태와 그 부산물 생성량 관계를 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 균주

본 실험에 사용된 균주는 *B. licheniformis*(ATCC

Table 1. Nutrient composition of the Standard Medium [*S. P*(Spizizen Potato) medium]

Component	Quantity (g/L)
Carbon Source	10.0
Yeast Extract	1.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1
Sodium Citrate	0.5
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5
CaCl <sub>2</sub>	0.1
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.1
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0.1

27811)  $\alpha$ -amylase 유전자를 *E. coli*에 clone한 것을 서울대학교 화학과로부터 분양 받아 사용하였으며, nutrient agar 배지를 사용한 agar slant상에서 4°C의 냉장고에 보관하였다가 LB 배지를 사용하여 종균을 배양 하였으며 필요에 따라 *S. P* 배지를 사용하여 배양하였다.

#### 배지 및 배양

균체의 배양에 사용된 표준 배지는 Table 1과 같으며 탄소원으로는 포도당을 사용하였다.

Nutrient agar slant에서 보관한 재조합 대장균 1백균이를 접종하여 shaking incubator에서 37°C, 170rpm으로 48시간 배양후 4 °C 냉장고로 옮겨 보관하여 사용하였다.

#### 회분식 배양

5L Jar Fermentor(한국발효기)에 LB 배지를 3L 사용하였으며, 그 성분중 탄소원인 포도당 초기 농도를 각각 5g/L, 10g/L, 20g/L, 30g/L, 40g/L로 하고, 맥아당 초기 농도를 각각 5g/L, 10g/L, 20g/L, 40g/L로 변화시킨 후 균주 배양액 25mL를 각각 접종하여 37°C, 170rpm, pH 7, 통기속도는 1vvm을 유지하면서 발효를 시켰으며, pH 7로 유지하기 위해서 1M-NaOH 용액을 사용하였다.

#### 세포농도

세포농도는 분광광도계(Bausch & Lomb, Spectronic 20)를 이용하여 발효액 시료의 흡광도를 650nm에서 측정하여 미리 구한 표준곡선에 의하여 건조세포농도를 환산하였으며, 표준곡선은 시료를 100mL씩 채취하여 원심분리 한 후 상등액을 제거하고 증류수로 침전물을 세 차례 씻은뒤 건조오븐에서

107 ± 2°C로 24시간 건조한뒤 측정하였다.

#### 탄소원 및 생성물 농도측정

Glucose, maltose, acetic acid, lactic acid, propionic acid, methanol, ethanol의 농도는 fermentation monitoring column(BIO-RAD)이 부착된 HPLC(Waters 440)를 사용하여 측정하였으며, 용리액은 0.001M-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, column의 온도는 65°C, 유량은 0.8mL/min, 시료는 20 $\mu$ L를 주입하여 RI detector를 이용하여 분석하였다.

#### Lactic acid 농도측정

HPLC와 Barker(30)-Summerson(31)방법을 이용하여 측정하여 비교하였다.

Barker-Summerson법에 의하여 20% CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 4% CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, Ca(OH)<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.5% p-hydroxybiphenyl과 0.5% NaOH를 이용하여 흡광도 560nm에서 표준곡선 구한 후 발효액을 희석하여 200 $\mu$ L를 취한 후 20% CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 1mL, H<sub>2</sub>O 9mL, Ca(OH)<sub>2</sub> 1g 가하여 교반하고, 상온에서 30분간 방치 후 원심분리한 다음 상등액 200 $\mu$ L과 4% CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.05mL와 c-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6mL을 가한 후 70°C 정도에서 교반하고 수욕상에서 5분간 방치한 후 20°C 이하의 찬물로 냉각시킨다. 이 용액에 1.5% p-hydroxybiphenyl과 0.5% NaOH 용액 0.1mL 가한 후 30°C의 물에서 30분간 반응시키고, 수욕상에서 90초 동안 반응시킨 후 냉각시켜 흡광도를 측정하였다.

#### 결과 및 고찰

*B. licheniformis*  $\alpha$ -amylase 유전자를 함유하고 있는 재조합된 *E. coli* NM 522를 회분식 배양으로 세포의 성장과 부산물의 생성량을 알기위하여 탄소원으로서 포도당과 맥아당의 초기농도를 변화시키면서 LB 배지를 사용하여 배양하였다.

#### 포도당 농도가 세포 성장에 미치는 영향

포도당 초기농도를 각각 5g/L, 10g/L, 20g/L, 30g/L, 40g/L로 하고 LB 배지를 사용하여 배양시키면서 세포의 성장과 부산물의 생성을 관찰한 결과를 Fig. 1, 2, 3, 4, 5와 Table 2에 나타내었다. 포도당 초기농도가 10g/L인 경우 세포는 배양 실시 후 12시간 전후에서 최대값 3.99g/L을 나타내었으며, 세포 최대 비생산 속도는 0.39g/g · hr을 나타내

Table 2. Effects of glucose on the cell production and by-products production

Initial glucose concentration(g/L)	X <sub>m</sub> (g/L)	Y <sub>X/S</sub> (g/g)	L <sub>m</sub> (g/L)	A <sub>m</sub> (g/L)	P <sub>m</sub> (g/L)	M <sub>m</sub> (g/L)	E <sub>m</sub> (g/L)	$\mu_n = \frac{1}{x} \left( \frac{\Delta x}{\Delta t} \right)$ (g/g · hr) <sup>max</sup>
5	3.05	0.84	0.09	0.9	0.10	0.09	0.30	0.23
10	3.99	0.79	3.96	1.98	0.61	0.87	1.00	0.26
20	6.16	0.41	8.52	5.09	0.69	0.20	3.76	0.27
30	8.40	0.31	8.04	4.96	0.96	0.98	4.28	0.35
40	10.52	0.27	9.96	5.45	0.96	0.44	11.25	0.39

※ X<sub>m</sub>=max. cell density, L<sub>m</sub>=max. lactic acid concentration, A<sub>m</sub>=max. acetic acid concentration, P<sub>m</sub>=max. propionic acid concentration, M<sub>m</sub>=max. methanol concentration, E<sub>m</sub>=max. ethanol concentration, Y<sub>X/S</sub>=cell yield.

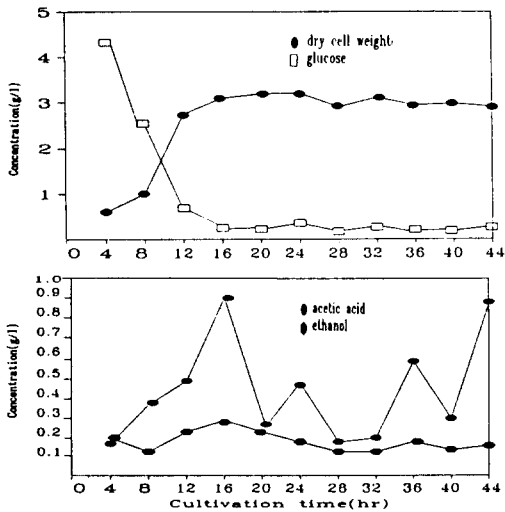


Fig. 1. Cell growth and products of recombinent *E. coli* in batch culture at 5g/L of initial glucose concentration in LB medium.

었다. 그리고 부생성물인 lactic acid의 최대치가 배양 실시 후 20시간 전후에서 3.96g/L이고 acetic acid의 최대치는 배양 실시 후 28시간 전후에서 1.98g/L이고, propionic acid는 배양실시 후 4시간 전후에서 0.61g/L이고 최대치는 0.87g/L이었다. Ethanol은 28시간 전후에서 0.10g/L가 얻어졌다.

세포의 최대치는 포도당 40g/L 일때 10.52g/L이고 lactic acid, acetic acid의 최고치도 포도당 40.0g/L 일때 각각 9.96g/L와 5.46g/L이며, propionic acid의 최고치는 초기 포도당 농도 30g/L 일때 0.96g/L이었고 ethanol의 최대치는 초기농도 포도당 40`g/L 일때 11.25g/L이다. 결과적으로 포도당

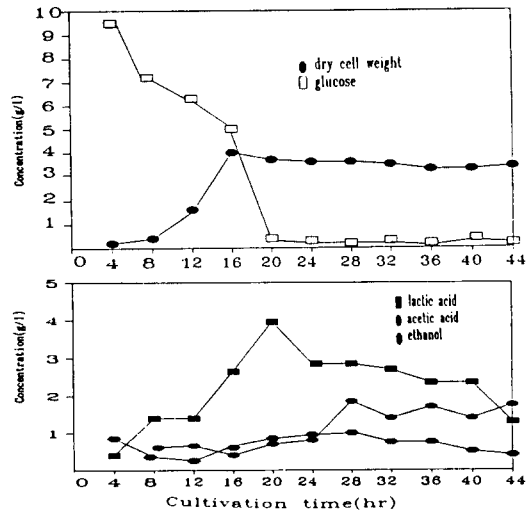


Fig. 2. Cell growth and products of recombinent *E. coli* in batch culture at 10g/L of initial glucose concentration in LB medium.

농도가 증가할수록 세포 최고 농도치는 증가하였으며, 수율은 그와 반대로 포도당 농도가 적을수록 증가하였다. 세포 최대비생산속도는 포도당 농도가 40g/L 일때가 최대치로서 0.39g/L · hr이며 역시 포도당의 농도가 증가함에 따라 증가함을 알 수 있다.

탄소원의 농도가 증가할수록 부산물인 lactic acid 과 acetic acid, ethanol의 농도가 증가하였는데 역시 이런값도 Snay 등(32)이 제시한 바와 같이 일반적으로 배양 부산물의 생성은 비성장 속도의 증가에 기인하고 탄소원의 농도 증가에 기인된다는 것과 일치한다. 이 결과에서 보면 부산물의 생성을 적게 하여 기질에 대한 세포 수율을 높게 하려면 탄소원의

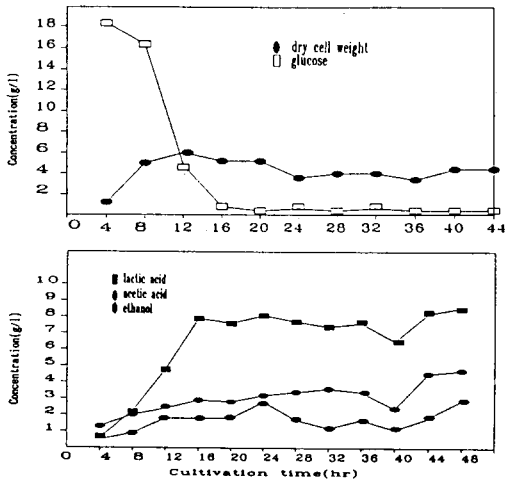


Fig. 3. Cell growth and products of recombinant *E. coli* in batch culture at 20g/L of initial glucose concentration in LB medium.

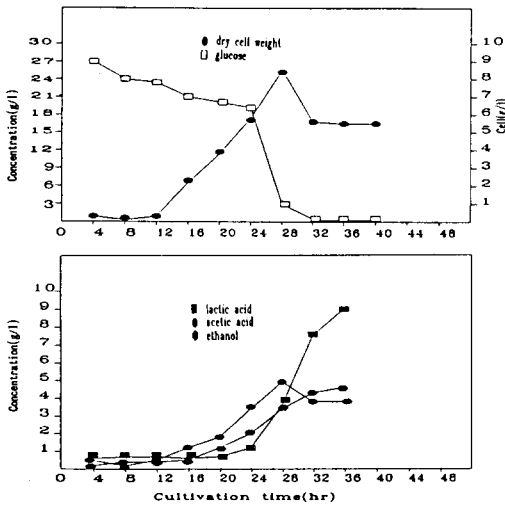


Fig. 4. Cell growth and products of recombinant *E. coli* in batch culture at 30g/L of initial glucose concentration in LB medium.

농도를 적은상태에서 배양시킴이 적합하다고 할 수 있다.

맥아당 농도가 세포 성장에 미치는 영향  
 맥아당 초기농도를 각각 5g/L, 10g/L, 20g/L, 40g/L로 변화시킨 LB 배지를 사용하여 배양시키면서 세포의 성장과 부산물의 생성을 관찰한 결과를

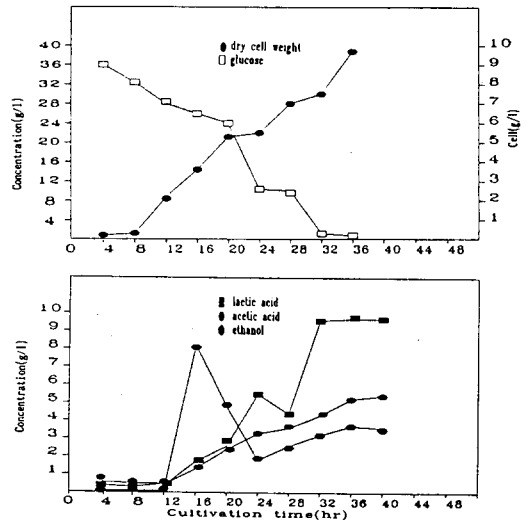


Fig. 5. Cell growth and products of recombinant *E. coli* in batch culture at 40g/l of initial glucose concentration in LB medium.

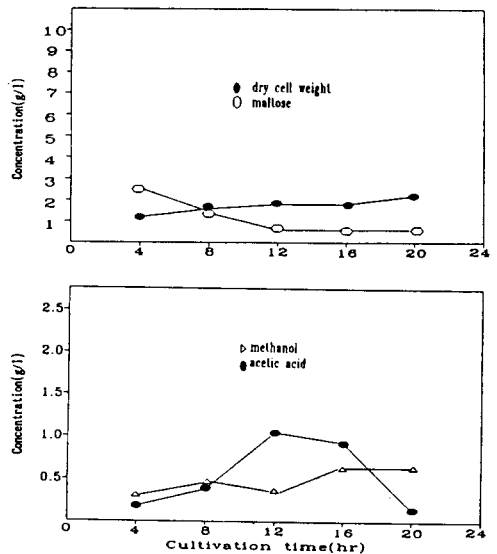


Fig. 6. Cell growth and products of recombinant *E. coli* in batch culture at 5g/l of initial maltose concentration in LB medium.

Fig. 6, 7, 8, 9와 Table 3에 나타내었다. 세포의 최대값은 초기 맥아당 농도가 10g/L 일때 배양실시 후 28시간 전후에서 4.06g/L이었으며, lactic acid 의 최고값은 36시간 전후에서 1.80g/L이고, acetic

Table 3. Effects of maltose on the cell productions and by-products production

Initial glucose concentration(g/L)	X <sub>m</sub> (g/L)	Y <sub>X/S</sub> (g/g)	L <sub>m</sub> (g/L)	A <sub>m</sub> (g/L)	P <sub>m</sub> (g/L)	M <sub>m</sub> (g/L)	E <sub>m</sub> (g/L)	$\mu_m = \frac{1}{x} \left( \frac{\Delta x}{\Delta t} \right)$ (g/g · hr) <sup>max</sup>
5	2.10	0.47	0.23	1.00	0.14	0.78	1.00	0.08
10	4.06	0.42	1.79	3.12	0.65	0.69	1.49	0.39
20	7.0	0.37	2.63	4.70	0.74	1.30	4.91	0.39
40	6.44	0.17	7.95	4.93	1.12	—	2.92	0.34

\* X<sub>m</sub>=max. cell density, L<sub>m</sub>=max. lactic acid concentration, A<sub>m</sub>=max. acetic acid concentration, P<sub>m</sub>=max. propionic acid concentration, M<sub>m</sub>=max. methanol concentration, E<sub>m</sub>=max. ethanol concentration, Y<sub>X/S</sub>=cell yield.

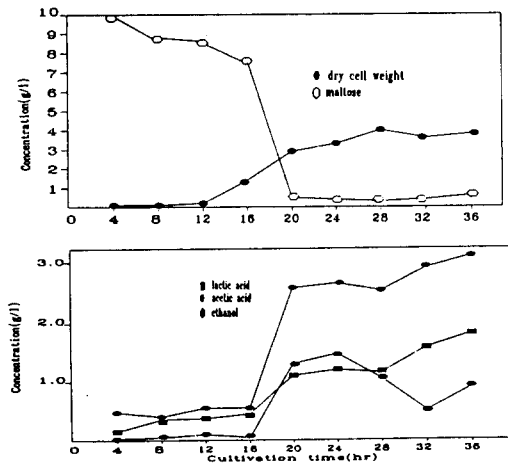


Fig. 7. Cell growth and products of recombinant *E. coli* in batch culture at 10g/L of initial maltose concentration in LB medium.

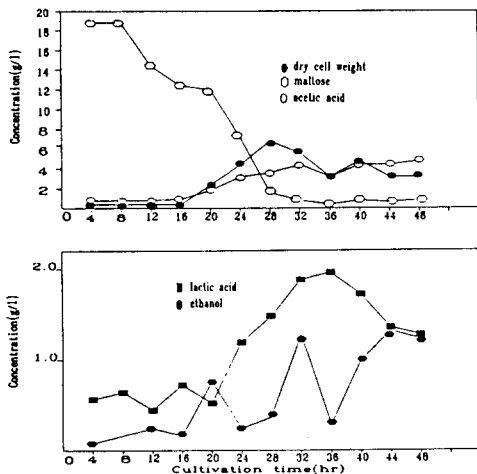


Fig. 8. Cell growth and products of recombinant *E. coli* in batch culture at 20g/L of initial maltose concentration in LB medium.

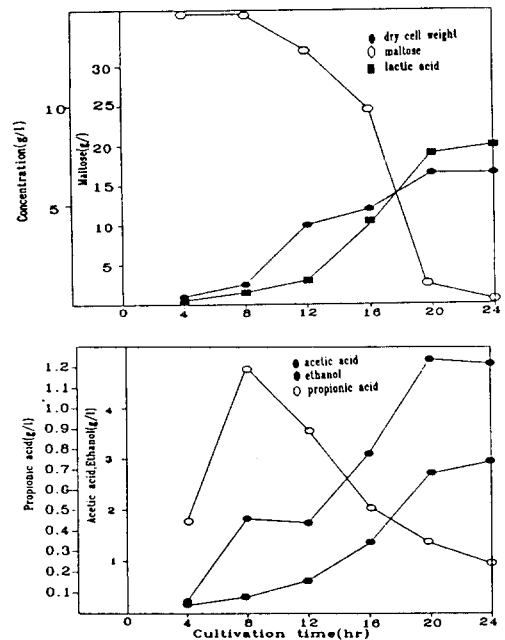


Fig. 9. Cell growth and products of recombinant *E. coli* in batch culture at 40g/L of initial maltose concentration in LB medium.

acid의 최고값은 36시간 전후에서 3.12g/L이고 propionic acid도 36시간 전후에서 0.50g/L이며, methanol은 24시간 전후에서 0.70g/L이고, ethanol은 24시간 전후에서 1.49g/L가 얻어졌다.

또 세포 최대 비생산속도의 최대치는 초기 맥아당 농도가 20g/L 일때 0.40g/L · hr이었다. 세포의 최대 농도는 맥아당 농도가 높아짐에 따라 증가하였고 수율은 맥아당농도가 낮을수록 높았다. 부산물 중 lactic acid, acetic acid, propionic acid는 초기 맥아당 농도가 높을수록 많이 생산되었고 methanol과 ethanol은 초기 맥아당 농도가 20g/L 일때 최고치

를 나타내었다. 이러한 경향은 탄소원으로써 포도당을 첨가했을 경우와 비슷한 현상이며 Shinji 등(22)이나 Suay 등(32)의 제안과 비슷한 결과임을 알 수 있다.

그리고 Table 2와 3에서 탄소원 포도당 농도 변화와 맥아당 농도변화의 세포 최대비생산속도값을 보면 초기 탄소원 농도가 높을 때 큰값을 나타내었고 세포 수율의 최대치는 초기 탄소원 농도가 낮은 값일때 큰 값으로 얻어졌다. 그리고 부산물들의 생성을 보면 포도당, 맥아당 두가지 마찬가지로 lactic acid와 acetic acid가 많이 생성되었고 propionic acid와 methanol은 적은 양이었으나 ethanol의 경우는 초기 포도당 농도가 40.0g/L 일때 11.25g/L 까지 생성되었고 초기 맥아당 농도가 20.0g/L 일때 4.90g/L까지 얻어졌다. 또한 이러한 부산물들은 초기 탄소원 농도가 높을 때 큰값이 얻어졌다. 특히 맥아당으로 배양할 때는 포도당으로 배양 할때보다 acetic acid가 lactic acid 보다 많이 생성된 경향을 얻었다. 이 현상은 이 균주의 대사적 특성이 아닌가 생각하나 반응 기작에 대해서는 더 연구 되어져야 할 것으로 생각한다. 이상으로 포도당과 맥아당 두 물질 중 탄소원 선택을 고려한다면 특별한 차이는 없으나 세포 수율상으로 볼때 초기 저농도의 포도당을 사용함이 타당하다고 보며 세포 최대비생산속도 치로서는 거의 비슷함을 알 수 있고 부산물들의 생성량값도 비슷한 값이 보였다.

## 요 약

재조합 대장균의 성장과 그 부산물 생성 관계를 알기위하여 탄소원인 포도당의 농도 변화와 맥아당의 농도 변화에 따른 각각의 영향들을 검토하였다. 포도당 감소 시간은 초기 포도당 농도 5g/L에서 배양 실시후 8시간 전후이었고 나머지는 배양 실시후 16시간부터 20시간이면 거의 흡수되었다. 이 결과로서 탄소원의 농도는 배양 초기에 많이 흡수되고 세포가 짧은 시간에 성장됨을 알 수 있다.

포도당 농도변화와 맥아당 농도 변화에서 보면 세포 최대비생산속도값이 초기 탄소원 농도가 감소됨에 따라 반대로 높은 값으로 증가되었다.

세포 생성 최대 농도치는 탄소원 초기 농도 10.0g/L에서 포도당은 3.33g/L이고, 맥아당은 4.06g/L임을 볼때 비슷한 값이고 탄소원 초기농도 5.00g/L에서 포도당은 3.05g/L이고, 맥아당은 2.10g/L임을 보면 탄소원 저농도에서는 탄소원이 포도당 일때

더 양호하게 세포가 성장되었다.

탄소원 종류에 따른 부산물 생성으로서는 포도당과 맥아당이 마찬가지로 lactic acid와 acetic acid가 많이 생성되었고 propionic acid, methanol은 적은 양으로 생성되었다. 특이하게 ethanol의 경우는 초기 포도당 농도가 40.0g/L 일때 11.25g/L이 생성되었고, 초기 맥아당 농도가 20.0g/L 일때 4.90g/L까지 얻어짐을 보였는데 이 현상은 균주의 활성및 대사적 특성에서 형성된 것으로 이상 발표라 할 수 있다.

그리고 탄소원 두 가지 다 그 초기 농도가 높을 때 부산물 생성이 많이 생성되었고 탄소원 농도가 낮으면 적은 양이 생성되었다. Lactic acid는 포도당에서 더 많이 생성되었고 acetic acid는 맥아당에서 더 많이 생성되었다. 이 현상은 균주의 대사적 특성으로 생각되고 이 반응 기작은 더욱 연구되어야 할 것으로 사료된다.

## 감 사

본 연구는 1994년도 교육부, 한국 학술진흥재단의 지방대 육성 기반 조성 연구 지원비에 의해 수행된 연구 결과의 일부이며, 본 연구를 지원하여 주신 한국 학술진흥 재단에 깊은 감사를 드립니다.

## 참고 문헌

1. D. W. Zabriskie and E. T. Arcuri(1986), *Enz. Microbiol. Technol.*, **8**, 706.
2. C. G. Kurland(1987), *Trend in Biol. S*, **12**, 126.
3. D. Y. Ryu and S. B. Lee(1988), in S. Aiba (ed.), *Horizons of Biochemical Engineering*, p. 97. Oxford Univ. Press.
4. S. J. Coppella, G. F. Payne, and N. Dela Cruz (1981), *Secondary Concerns of Recombinant Microorganism Processing*, p.1 in R. T. Hatch et al.(ed), "Expession Systems and Processes for rDNA products" ACS sym.ser. 477, *American Chem. Soc.*
5. J. E. Bailey, N. A. Da Silva, S. W. Peretti, J. H. Seo, and F. Srienc(1986), *Annals N. Y. Acad. Sci.*, **469**, 194.
6. C. Forberg and L. Haggstrom(1988), *J. Bacteriol.*, **8**, 291.

7. K. B. Konstantinov, N. Nishio, and T. Yoshida(1990), *J. Ferment. Bioeng.*, **70**, 253.
8. K. B. Konstantinov, N. Nishio, T. Seki, and T. Yoshida(1991), *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 350.
9. J. C. Fieschko, K. M. Egan, T. Ritch, R. A. Koski, M. Jones, and G. A. Bitter(1987), *Biotech. Bioeng.*, **293**, 1113.
10. J. Buchner and R. Rudolph(1991), *Bio. Technology*, **9**, 157.
11. R. W. Van Leen, J. G. Bakhuis, R. F. W. C. Van Beckhoven, H. Burger, L. C. J. Dorssers, R. W. J. Hommes, P. J. Lemson, B. Nodrdam, N. L. M. Persoon, and G. Wagemaker(1991), *Bio. Technology*, **9**, 47.
12. S. K. Magnolo, D. L. Leenutaphong, J. A. De Modena, J. E. Curtis, J. E. Bailey, J. L. Galazzo, and D. E. Hughes(1991), *Bio. Technology*, **9**, 473.
13. E. A. Sabin, C. T. Lee-Ng, J. R. Shuster, and P. J. Barr(1989), *Bio. Technology*, **7**, 705.
14. A. De Baetselier, A. Vasavada, P. Dehet, V. HaiThi, M. De Beukelaer, T. Erpicum, L. De Clerck, J. Hanotier, and S. Rosenberg(1991), *Bio. Technology*, **9**, 559.
15. A. Nakayama, K. Ando, K. Kawamura, I. Mita, K. Fukazawa, M. Hori, H. Honjo, and Y. Furutani(1988), *J. Biotechnol.*, **8**, 123.
16. S. D. Ehrlich, P. Noirot, M. A. Petit, L. Janniere, B. Michel, and H. Te Riele(1986), Structural Instability of *B. subtilis* Plasmids, In: J. K. Setlowm and A. Hollaender, (Eds.) Genetic Engineering, 8, 71, Plenum, New York.
17. A. Nakayama, K. Kawamura, H. Shimada, A. Akaoka, I. Mita, M. Honjo, and Y. Furutani(1987), *J. Biotech.*, **5**, 171.
18. M. Honjo, A. Nakayama, A. Iio, I. Mita, K. Kawamura, A. Sawakura, and Y. Furutani (1987), *J. Biotech.*, **6**, 191.
19. C. W. Saunders, B. J. Schmidt, R. L. Mal-lonee, and M. S. Guyer(1987), *J. Bacteriol.*, **169**, 2917.
20. A. Wiseman(1975), Handbook of Enzyme Technology, p.114, Wiley, New York.
21. N. E. Welker and L. L. Campbell(1963), *J. Bacteriol.*, **86**, 681.
22. Shinji Iijima, Konghua Lin, and Takeshi Kobayashi(1991), *J. Fermentation and Bioengi-neering*, **71**, 69.
23. Y. L. Lee and H. N. Chang(1990), *Biotechnol-ogy and Bioengineering*, **36**, 330.
24. A. Wiesman(1975), Handbook of Enzyme Technology, p.114, John Wiely, New York.
25. F. G. Priest(1977), *Bacteriol. Rev.*, **41**, 711.
26. G. B. Manning and L. L. Campbell(1961), *J. Biol. Chem.*, **236**, 2952.
27. K. Ogahasara, A. Imanishi, and T. Tsuma (1979), *J. Biochem.*, **67**, 65.
28. F. G. Priest and K. Toda(1981), *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **31**, 775.
29. N. E. Welker and L. L. Campbell(1966), *J. Bacteriol.*, **86**, 681.
30. S. B. Barker(1940), *Am. J. Physiol.*, **129**, 305.
31. W. H. Summerson(1939), *J. Biol. Chem.*, **130**, 149.
32. J. Snay, J. W. Jeong, and M. M. Ataa (1971), *Can. J. Rev.*, **25**, 56.