

## *Escherichia coli*에서 발현된 재조합 인간 상피세포 증식인자의 정제 및 특성

박세철 · 유광현\*

(주)유한양행 중앙연구소 생물제품연구실

**Purification and Characterization of Recombinant Human Epidermal Growth Factor in *Escherichia coli*.** Se-Cheol Park and Kwang-Hyun You\*. Laboratory of Biotechnology, Yuhan Research Center, Yuhan Corporation, Kunpo-si 435-030, Korea - Recombinant human epidermal growth factor (rhEGF) was produced by *E. coli* BL21 harboring a plasmid pYHB101. The maximum production was 68.7 mg/l when the *E. coli* strain was cultured at 25°C for 48 hours in the modified MBL medium containing 10 g/l glucose with 1 mM IPTG induction at 2 hours after inoculation. The rhEGF was purified upto 267 folds by Amberlite XAD-7 chromatography, ultrafiltration, and DEAE Sepharose fast flow ion exchange chromatography with an overall yield of 66.6%. The purified rhEGF was further separated into two fractions by HPLC. The N-terminal amino acid sequence of the second fraction was Asn-Ser-Asp-Ser-Glu-Cys-Pro-Leu-Ser-His. The effect of rhEGF on the DNA synthesis was examined using in vitro biological assay based on the incorporation of 5'-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU). The purified rhEGF shows no difference with natural human epidermal growth factor (nhEGF) in N-terminal amino acids residues and biological activity. From the results, we concluded that rhEGF produced from *E. coli* harboring the plasmid pYHB101 was apparently the same as nhEGF.

hEGF(human epidermal growth factor)는 사람의 노증에서 처음으로 Cohen 등(1)에 의해서 확인되었으며 그 생리적 작용(2)을 기초로 하여 세포 생물학 분야에서 주목받는 성장 인자의 하나가 되었다. 이러한 생물학적, 약리학적 중요성에도 불구하고 사람의 노 등으로부터 얻을 수 있는 양은 한정되어 있으므로 hEGF를 유전자 재조합 기술에 의해 대량생산하려는 연구가 시도되어 왔다. 즉, 합성된 hEGF 유전자를 대장균 발현체계(3)를 이용하여 hEGF를 발현시킨 연구는 1982년에 John 등(4)에 의하여 hEGF 유전자가 합성된 이래로 hEGF 유전자를 signal peptide와 결합하여 phoA promoter에 의하여 periplasm으로 발현시키는 연구(5)와 tac promoter를 사용한 시도(6)가 있었다. 1990년대에 들어와서야 비로소 Hitachi 사에 의하여 trp promoter를 사용한 산업적인 접근이 시도되어 유가식 배양으로 60 mg/l까지 발현되었다(7).

대장균의 고농도 성장과 재조합 단백질의 생성량을 높이기 위하여 배지에 탄소원과 에너지원으로서 포도당을 과량 첨가하게 되는데 공급되는 탄소원이 세포의 생합성 이용성보다 더 높게 공급되면 탄소원을 대사하는데 필요한 산소 공급량이 부족하여 혐기적 대사를 하게되고 그 결과로서 acetate와 같은 유기산이 축적되는 Crabtree 효과(8)를 보이게 된다. 특히 중성 pH 이하에서 lipophilic 상태의 acetate가 세포벽의 lipid membrane 내로 들어가서 균체내부의 pH를 저하시킴

으로서 균체의 농도, plasmid의 안정성, 그리고 product의 안정성에 변화를 주게 되는 여러 배양상의 문제점이 Luri 등에 의하여 지적되었다(9-11). 이러한 문제점을 해결하기 위하여는 유기산 억제 균주개발을 통하여 재조합 단백질 생성을 늘리는 유전적인 측면에서의 접근(12)과 배양상의 조건을 검토하여 유기산에 의한 저해효과를 극복하려는 시도(13, 14)가 있어 왔다. 최근에는 재조합 미생물의 배양 온도나 유도 물질의 농도를 저하시킴으로서 inclusion body 형성을 억제하거나 leader sequence를 삽입하여 product가 분비 발현되는 경우에도 온도나 유도물질의 변화에 의하여 유기산에 의한 저해를 완화시킴으로서 단백질의 발현량, 순도 및 세포의 viability, plasmid의 안정성 등을 증가시키는 방향으로 연구가 진행되고 있다(15-18).

따라서 본 연구에서는 저자등이 개발한 rhEGF 생성 재조합 균주의 최적 발현조건을 찾기 위하여 물리화학적 영향등을 고려한 배양 조건과 대량 생산을 위한 정제 조건을 확립하였고 아울러 생물학적인 활성을 검토하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주 및 시약

실험에 사용된 균주는 rhEGF 발현 plasmid인 pYHB101을 포함하는 *E. coli* BL21(DE3)을 사용하였고 rhEGF *in vitro* bioassay에 사용한 세포주는 한국 세포주은행(KCLB)으로부터 분양 받은 NIH 3T3이었다. 5-bromo-2'-deoxy-uridine labeling and detection kit

\*Corresponding author.

Key words: Recombinant human epidermal growth factor, pYHB101, purification

III와 recombinant human epidermal growth factor (rhEGF)는 Boehringer Mannheim 사에서 Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside(IPTG)는 Sigma 사에서 EGF의 RIA kit는 Amersham 사로부터 각각 구입하였다. Natural human epidermal growth factor(nhEGF)는 임신부 뇨로부터 분리하여 사용하였다.

#### 배지

배양조건 검토를 위하여 변형된 MBL 배지(12, 13)로서 조성은 yeast extract, 10 g/l ; acid hydrolyzed casein, 20 g/l ;  $K_2HPO_4$ , 6 g/l ;  $(NH_4)_2HPO_4$ , 1 g/l ; NaCl, 5 g/l ;  $CaCl_2$ , 0.015 g/l이었으며 pH 7.0이 되도록 제조하여 멸균 후 사용하였다.

#### 배양조건에 따른 rhEGF 발현

각 배양 및 유도조건이 rhEGF의 발현 및 균체 성장에 주는 영향을 알아보기 위해서 MBL 배지를 기초배지로 하여 37°C/150 rpm으로 16시간 진탕 배양된 *E. coli* BL 21(DE3, pYHB101)을 동일한 배지 50 ml이 들어있는 250 ml 진탕 flask에 각각 2%씩 접종하였다. 각 온도 및 유도 시간에 따라 150 rpm으로 최대 48시간까지 배양하면서 각 조건에 따른 발현량 및 균체의 성장을 조사하였다.

#### Plasmid 안정성

plasmid의 배양 시간에 따른 유지정도는 배양액 1 ml을 pour plate method에 의하여 연속 희석한 후 LB agar plate와 LB-Ap agar plate(ampicillin 100  $\mu$ g/ml)에 각각 도말하고 37°C에서 1일간 배양하여 형성된 colony 수를 계수하여 백분율로 표시하였다.

#### rhEGF의 확인

배양액을 10,000 $\times$ g에서 15분간 원심분리하여 균체를 회수하고 TE buffer(10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)로 현탁한 다음 초음파 분쇄기(model 300, Fisher 사)로 60초간 파쇄하였다. 그런 다음 파쇄된 균체를 10,000 $\times$ g에서 20분간 원심분리하여 상등액과 침전물을 분리하였다. SDS PAGE를 위하여 각 시료를 30  $\mu$ l씩 취하여 2 $\times$ sample buffer(0.125M Tris-HCl(pH 6.2) ; 4% SDS ; 20% glycerol ; 10% 2-mercaptoethanol)에 현탁한 후, 15%의 SDS polyacrylamide gel에서 30 mA로 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 후에 gel은 Coomassie blue로 염색하고 Scanning Densitometer(Image Quant, Molecular Dynamics, USA)를 이용하여 발현된 rhEGF를 정량하였다.

#### rhEGF의 정제

배양이 끝난 후 배양액으로부터 상등액을 회수하여 정제에 사용하였다. Amberlite XAD-7을 사용하여 15%

ACN(acetonitrile)/0.1M sodium acetate buffer(pH 5.0)로 resin을 평형시킨 후 동일한 조건으로 평형되어 있는 시료를 loading 하였다. 280 nm에서 흡광도가 0.05 이하가 될 때까지 충분히 평형 buffer로 세척하여 30% ACN을 포함하는 20 mM Tris buffer(pH 8.2)로 rhEGF를 용출하였다. 용출액은 Amicon YM3 membrane(molecular weight cut off : 3,000 dalton)을 이용하여 농축시킨 다음 ammonium acetate buffer(pH 5.5)로 diafiltration하여 용매 및 염성분을 제거하였다. DEAE-Sepharose fast flow resin을 20 mM ammonium acetate buffer(pH 5.5)로 평형한 후 농축액을 loading 하고 동일 buffer로 충분히 세척한 후 흡착된 rhEGF는 ammonium acetate buffer(pH 5.5)를 20에서 600 mM로 점차 변화시키면서 용출시켰다. Ion exchange chromatography로 분획시킨 시료중 rhEGF 활성을 갖는 시료를 1/100 부피로 농축한 후 HPLC를 위한 분석시료로 사용하였다.

#### HPLC 분석

Hitachi HPLC system(L-7400)을 이용하여 75% solvent A(0.1% trifluoroacetic acid)와 25% solvent B(0.1% trifluoroacetic acid, 88% acetonitrile, 2% isopropanol)로 평형화되어 있는  $\mu$  Bonda C<sub>18</sub> column(Waters, 4 $\times$ 250 mm)에 sample 200  $\mu$ l을 loading한 후 평형화 용매로 column 부피만큼 세척하고 25% solvent A와 75% solvent B로 분당 1% 씩 증가시키는 linear gradient로 C<sub>18</sub> resin에 결합되어 있는 rhEGF를 용출하고 speed vac. concentrator에서 용매를 완전히 제거한 후 증류수에 녹여 사용하였다.

#### N-말단 아미노산 서열 결정

HPLC에서 분리된 rhEGF는 아미노산 분석기(476A, ABI)를 사용하여 아미노산 서열을 분석하였다.

#### Radioimmuno assay

rhEGF 표준 물질과 시료를 assay buffer(10 mM sodium phosphate(pH 7.2), 0.9% NaCl, 0.1% bovine serum albumin)에 희석하여 100  $\mu$ l의 표준액과 시료액을 각각 제조하고 여기에 I<sup>125</sup>-EGF 용액(200 cpm/ $\mu$ l)을 100  $\mu$ l씩 가한 다음 rhEGF에 대한 IgG 용액을 1 : 1,000으로 희석하여 200  $\mu$ l씩 첨가하였다. 37°C에서 2시간 반응시킨 후 Amerlex-M donkey anti-rabbit reagent (Amersham 사)를 500  $\mu$ l 첨가하여 20분간 반응시킨 다음 magnetic separator를 이용하여 donkey anti-rabbit reagent와 결합된 부분만을 회수하고  $\gamma$ -counter(LB 951G, Berthold 사)로 rhEGF를 정량하였다.

BrdU(5-Bromo-2'-deoxy uridine) *in vitro* assay  
24 well의 cell culture cluster(Costa 사)를 사용하여

10% FCS가 포함되어 있는 1 ml의 DMEM에 well당  $5 \times 10^4$  cell이 되도록 NIH 3T3 세포주를 접종하고 37°C, 5.0% CO<sub>2</sub> 조건하에서 이틀간 배양하였다. 2% FCS가 포함되어 있는 1 ml의 DMEM으로 배지를 교환한 후 이틀간 더 배양하였다. 각 well에서 500 µl씩의 세포배양액을 제거하고 생물학적 활성을 측정하고자 하는 hEGF 시료 용액 500 µl씩을 첨가하여 18시간 배양하였다. 100 µl의 BrdU labeling solution(10 nM)을 첨가하여 37°C, 5.0% CO<sub>2</sub> 조건하에서 8시간 배양하고 DMEM 배지로 3회 세척한 후 pre-cooled fixing solution(70% ethanol, 1.6% HCl)을 가하여 -25°C에서 30분간 방치하였다. Fixing solution을 제거하고 DMEM으로 3회 세척한 후 1 ml의 nuclease S1(Boehringer Mannheim 사) 10 unit를 가하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 상기의 세척 과정을 거친 후 peroxidase가 결합된 anti-BrdU 항체용액 1 ml을 가하여 37°C에서 2시간 동안 반응시키고 peroxidase substrate를 이용하여 발색하였다. OD<sub>405nm</sub>에서 흡광도를 측정하여 시료액을 넣지 않은 blank와의 비교로서 각 시료의 활성을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 최적 탄소원 농도

MBL 배지를 기본 조성으로 하여 glucose를 0, 5, 10, 20, 30, 40 g/l의 농도로 첨가하여 37°C에서 배양 1시간 후, 1 mM IPTG를 유도물질로 첨가하여 24, 48시간 동안 배양하였을 때, glucose 5~30 g/l의 농도에서는 glucose의 농도에 비례하여 균체량이 증가하였지만 30 g/l 이상의 농도에서는 오히려 성장이 저하되었다. 이러한 결과는 glucose의 분해산물인 여러 유기산에 의하여 균체의 성장이 저해된다는 Landwall 등의 보고(14)와 일치된다. Fig. 1에서와 같이 glucose 농도를 20 g/l 이상 첨가하여 24시간 배양한 경우 glucose의 대사산물인 유기산이 생성됨에 따라서 균체의 pH가 5.0 이하로 낮아졌으며 이때에는 거의 rhEGF가 생성되지 않았다. 그러나 48시간 이상 배양하여 배양액의 pH가 중성이상이 되면 glucose 첨가농도에 관계없이 모두 rhEGF가 발현되었으며 glucose가 10 g/l로 첨가한 경우 34 mg/l로 최대의 발현량을 보였다.

### 유도시간에 따른 발현 및 plasmid 안정성

Botterman 등의 보고(23)에 따르면 대장균을 이용한 유전자 재조합 산물의 발현에 있어서 배양 초기에 induction을 하였을 때 생성된 product의 양이 전체 단백질의 22%인데 비하여 배양 말기에 induction한 경우에는 3~4%에 불과하다고 하였다. 각 유도시간에 따른 rhEGF의 생성 및 plasmid의 안정성을 조사하기 위하여 MBL 배지를 기본조성으로 하여 glucose를 5 g/l

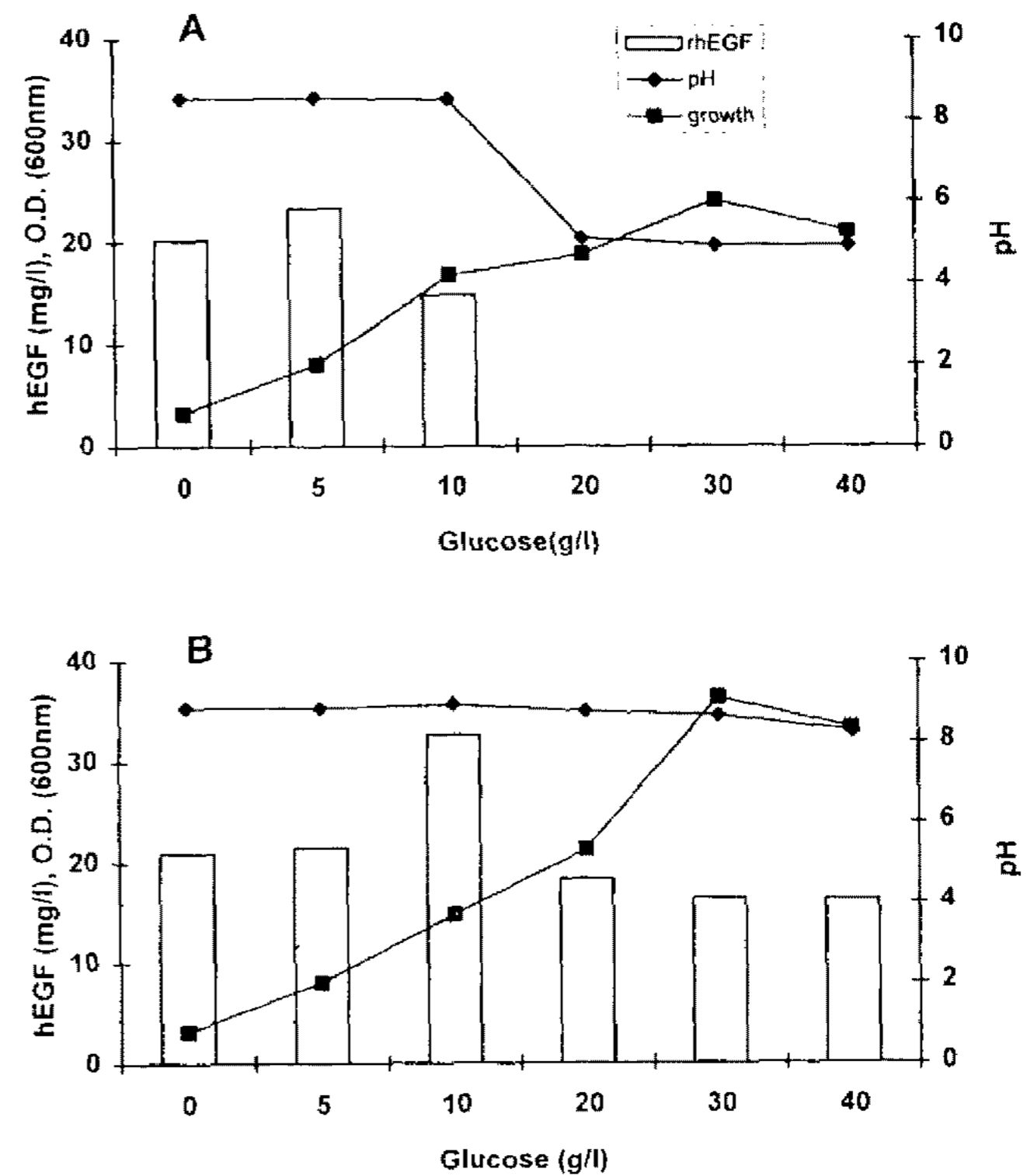


Fig. 1. Effect of glucose concentration on cell growth and rhEGF expression during the 24 hrs (A) and 48 hrs (B) culture of *E. coli* BL21 harboring pYHB101 after 1 mM IPTG induction at 37°C.

첨가한 배지를 제조하고 37°C에서 배양 1, 2, 3시간 후에 각각 1 mM IPTG로 유도 발현하고 24시간까지 배양하였다. Fig. 2에서와같이 세포성장에서는 배양 3시간 후에 induction한 경우가 A<sub>600</sub>이 11 이상으로 가장 활발한 균체성장을 보였고 rhEGF의 생성량은 각각 22, 45, 33 mg/l로서 배양 2시간 후에 induction한 경우가 45 mg/l로 최대이었다. 배양 1시간 후에 유도 발현한 경우 불균등분배(segregational instability)에 의하여 plasmid stability가 배양 5시간 만에 50% 내외로 급격하게 감소하였고 rhEGF의 생성량이 상대적으로 낮았는데 이것은 plasmid의 안정성에 기인한 문제로 사료된다(10, 22). 3시간 후에 유도발현한 경우에는 균체의 성장은 가장 활발하였지만 전체적인 단백질 생성량의 감소로 rhEGF의 발현량은 2시간 배양 후에 발현한 것에 미치지 못하였다. 상기의 결과를 종합하여 볼 때, 배양 2시간 후에 유도발현한 경우가 초기유도 발현(배양 후 1시간)으로 인한 plasmid의 불안정성과 배양 3시간 이상이 지난 후 발현유도에 따른 단백질 생성의 감소를 최소화할 수 있는 유도시간으로 판단되며 plasmid의 stability도 배양 5시간 이후까지 80% 선을 유지하였다.

### 최적 배양온도

rhEGF의 발현량을 높이기 위하여 37°C 이하의 온도에서 배양하여 최적 배양온도를 검토하였다. 유도

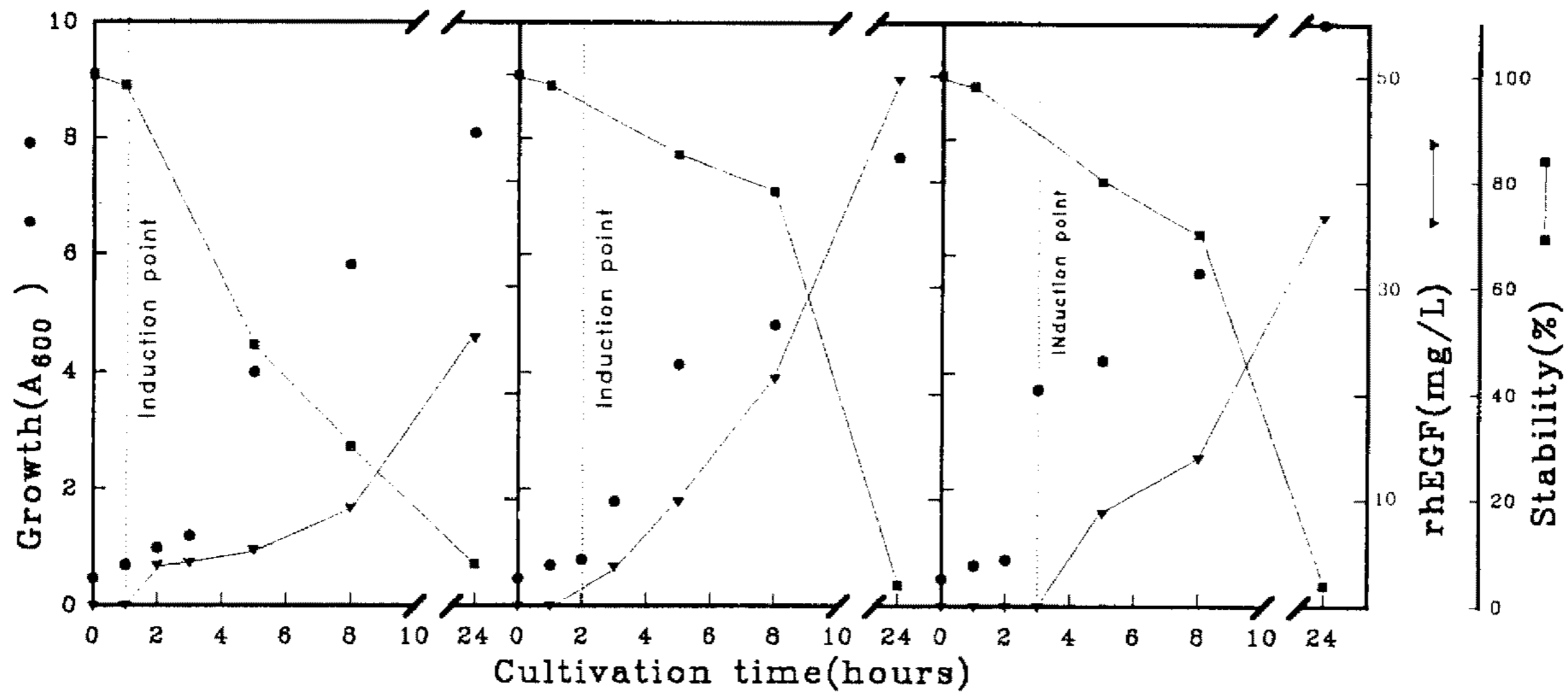


Fig. 2. Effect of induction time on cell growth, plasmid stability and rhEGF expression in *E. coli* BL21 harboring pYHB101 at 37°C.

(A) 1 hr, (B) 2 hr, (C) 3 hr

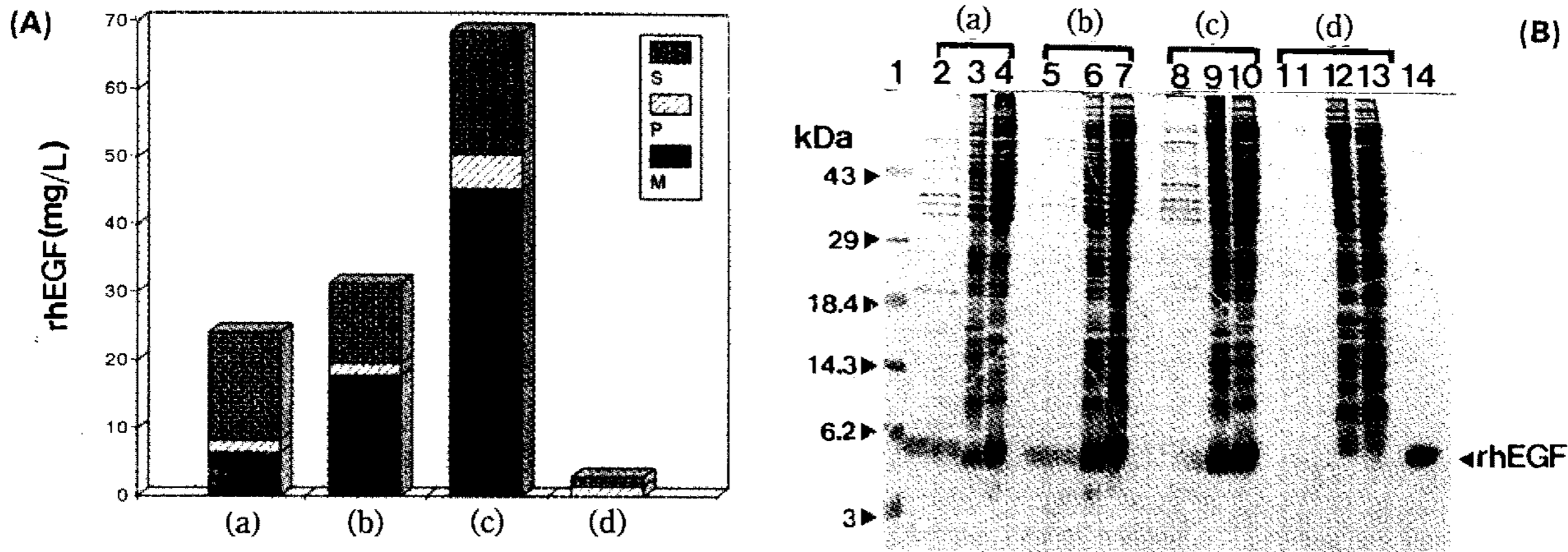


Fig. 3. Effect of growth temperature on rhEGF expression in *E. coli* BL21 harboring pYHB101 during 48 hrs culture with 1 mM IPTG.

(A) Comparison of cellular localization of expressed rhEGF at each temperature, 20°C (d), 25°C (c), 30°C (b), 37°C (a)  
 (B) SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of the cellular proteins. In all cases, samples applied to the gel are equivalent to 35  $\mu$ l cultures. Lanes 1, low range marker; 2, 5, 8, 11, pYHB101 M; 3, 6, 9, 12; pYHB101 S; 4, 7, 10, 13; pYHB101 P. Abbreviation: M, medium; S, supernatant; P, pellets.

물질인 IPTG의 농도를 1 mM, 배양 2시간 후에 induction하는 조건으로 배양온도를 20°C, 25°C, 30°C, 37°C에서 각각 배양하여 전체적인 발현량과 배양온도의 관계를 Fig. 3에 나타내었다. 각 배양 온도에 의하여 발현량에 변화를 보였으며 25°C에서 68.7 mg/l로 최대이었고 37°C에서 발현량이 15.9 mg/l로 급감하였다. 조사된 모든 온도에서 발현된 soluble form(배지와 periplasm으로 발현된 양)과 insoluble form으로 발현된 양을 비교하였을 때 90% 이상이 soluble form으로 발현되었다. 최적 배양 온도조건은 25°C로 판단되며 20°C 이하나 30°C 이상에서는 오히려 전체적인 발현량이 감소함을 알 수 있었다. 상기의 결과는 배양온도에 의하여 재조합 단백질의 발현량에 커다란 변화를 보인다는 Hi-

roshi 등(21)의 결과와 일치하였다.

### rhEGF의 정제

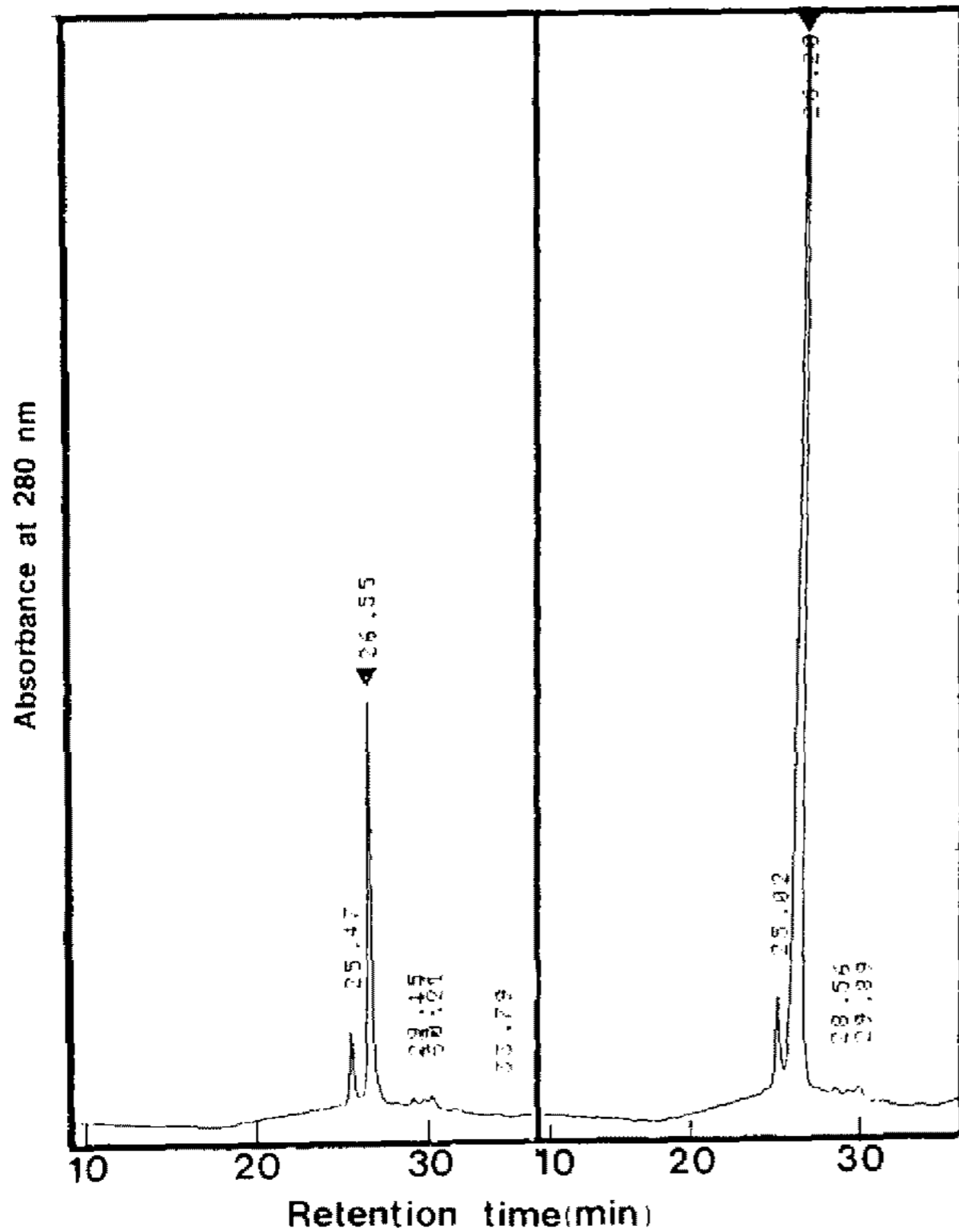
*PelB* leader sequence에 의하여 분비 발현되는 rhEGF는 48시간 이상 배양시 cell이 거의 lysis 되어 대부분이 배지로 분비 발현됨으로 배양액만을 회수하여 0.2  $\mu$ m membrane filtration으로 제균한 후 전처리 없이 그대로 정제에 활용하였다. hydrophobic한 특성을 갖는 resin 중에서 acrylic ester polymer인 Amberlite XAD-7 resin을 이용하여 acetonitrile 용매의 polarity 증가에 의한 용출을 시도하였다. Table 1에 나열한 바와 같이 XAD-7 chromatography 과정에 이어 DEAE Sepharose chromatography를 수행한 후에 rhEGF 활성을 측정



**Table 1. Purification of rhEGF from culture broth of *E. coli* BL 21 carrying pYHB101**

Purification steps	Total protein (mg)	<sup>125</sup> I Total rhEGF (U)	Specific activity [rhEGF (U) <sup>125</sup> /total protein (mg)]	Yield (%)	Purification fold
Culture broth	4997	359.7	0.08	100	1
XAD-7 chromatography	168.15	316.5	1.88	88	23.5
DEAE-sepharose chromatography	11.21	239.5	21.37	66.6	267.1

<sup>125</sup>I: Radioimmunoassay Unit



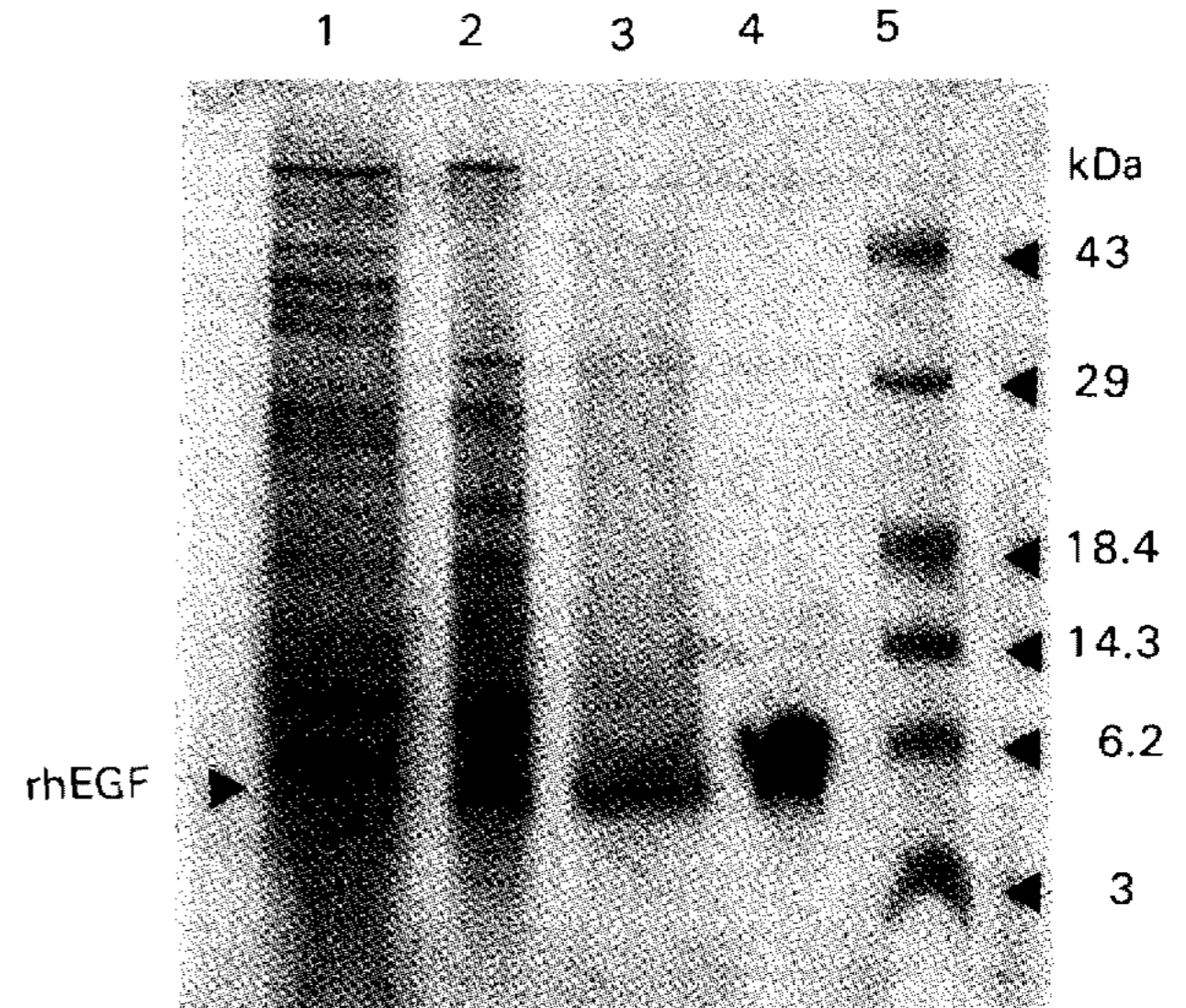
**Fig. 4. Chromatography of the purified hEGF (A), and co-chromatography of the purified hEGF and rhEGF standard (B) on a Bondapak C<sub>18</sub> column.**

Solvent system: the column was eluted with a linear gradient of 22~66% acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid. The flow rate was 1 ml/min and each fraction was collected.

결과 267배 정제되었으며 정제수율은 66.6%이었다.

#### rhEGF의 생물학적 특성

정제된 rhEGF가 천연형의 53개의 아미노산과 일치되는지 여부를 확인하기 위하여 rhEGF 표준물질을 이용하여 spiking test를 실시하였다. Fig. 4의 HPLC 분석결과에서와 같이 26.5분대의 물질이 표준 물질과 정확히 일치되어 26.5분대의 물질이 53개의 아미노산으로 구성된 hEGF임을 알 수 있었다. Fig. 5에서와 같이 각 정제단계를 거쳐 정제된 분획이 SDS-polyacrylamide gel 전기영동상으로 표준물질과 동일한 분자량 6,000 dalton 위치에서 단일 band로 확인되었고 정제된 rhEGF의 순도는 95% 이상이었다. 발현에 활용된



**Fig. 5. SDS-PAGE analysis of rhEGF from each purification steps.**

Lanes 1, culture broth; 2, Amberlite XAD-7 fraction; 3, DEAE Sepharose fraction; 4, RP-HPLC purified rhEGF fraction; 5, low range marker.

pYHB101 plasmid는 제조시에 전사 개시 염기 서열인 ATG를 제거시키고 *pelB* leader sequence 다음에 rhEGF가 발현되도록 고안되었으므로 N-말단 잔기를 결정하여 실제 hEGF와 동일한 아미노산 서열을 갖는지 확인하였다. N-말단으로부터 10개의 잔기를 판독하였을 때 Asn-Ser-Asp-Ser-Glu-Cys-Pro-Leu-Ser-His로 나타나 정확하게 천연형의 hEGF와 아미노산 염기 서열이 일치하고 N-말단에 methionine이 제거된 rhEGF만이 정확히 발현된 것을 확신할 수 있었다. hEGF에 의하여 생물학적 반응성을 보이는 mouse 유래의 NIH 3T3 세포주를 이용하여 노로부터 정제된 hEGF, rhEGF 표준 물질, *E. coli* BL21(DE3, pYHB101) 균주로부터 정제된 rhEGF 등의 생물학적인 활성을 BrdU labelling을 이용한 system으로 비교하여 Fig. 6에 나타내었다. Well당 세포 수를 50,000개로 하여 1일 배양하고 BrdU labelling을 8시간하여 각 생물학적인 활성을 비교하여 본 결과 rhEGF를 첨가하지 않은 대조구와 비교하여서는 OD<sub>405nm</sub> 흡광도로 0.15 이상의 차이를 보였으며 rhEGF 표준물질과 노로부터 정제된 천연의

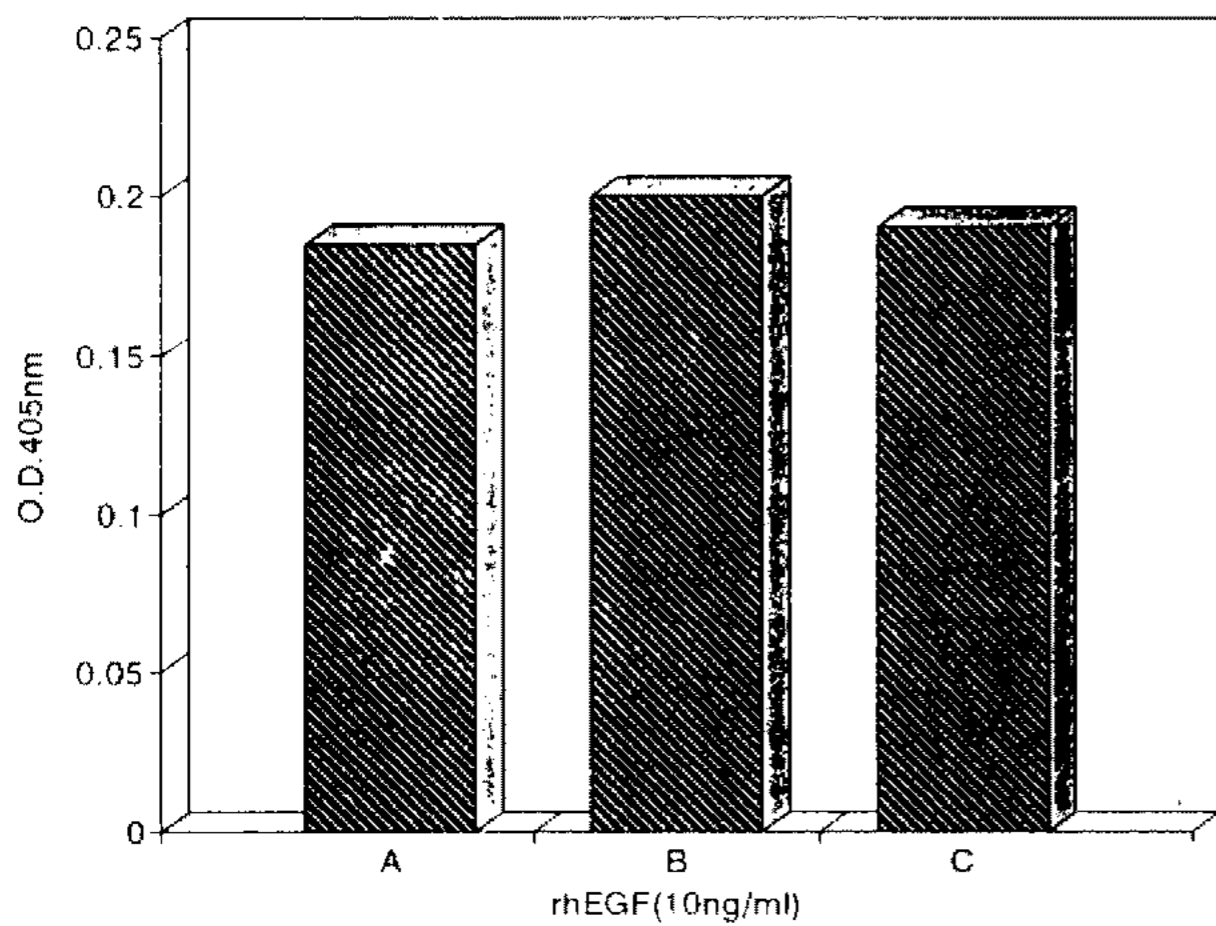


Fig. 6. Comparison of Biological activity of purified-rhEGF (A) with natural hEGF (B) and rhEGF (C) on the DNA synthesis in NIH 3T3 cells.

hEGF, 그리고 *E. coli* BL21(DE3, pYHB101)로부터 정제된 rhEGF 모두 생물학적으로 유사한 활성을 갖고 있음을 확인하였다. 따라서 본 재조합 균주에 의하여 분리, 정제된 rhEGF는 천연의 hEGF와 아미노산 서열과 생물학적 활성이 동등하였고 본 연구에 덧붙여 plamid의 안정성을 지속적으로 유지시킬 수 있는 par, cer gene의 도입등이 검토(24)된다면 rhEGF의 경제적 대량 생산이 가능하리라 사료된다.

### 요 약

*E. coli* BL21(DE3, pYHB101)을 이용한 rhEGF의 최적 생산조건은 25°C, 48시간 배양에서 변형된 MBL 배지에 glucose를 10 g/l 첨가한 배지로 배양한 경우였고 유도물질로 1 mM IPTG를 사용하여 2시간 배양 후에 유도 배양하였을 때 최대 rhEGF가 68.7 mg/l가 발현되었다. 배양액으로 부터 Amberlite XAD-7, ultrafiltration, DEAE Sepharose column chromatography 정제 과정을 거쳐 rhEGF가 정제되었으며 이때 정제도는 267배이었으며 66.6%의 회수율을 보였다. 정제된 rhEGF는 HPLC 분석 결과 2개의 분획으로 나누어졌으며 두번째 분획을 회수하여 N말단 아미노산 서열 분석결과 Asn-Ser-Asp-Ser-Glu-Cys-Pro-Leu-Ser-His로 나타났다. 또한 5'-bromo-2'-deoxy-uridine(BrdU)의 삽입에 의한 DNA 생성능을 조사하였다. 상기의 결과로 *E. coli* BL21(DE3, pYHB101)에 의하여 생산된 rhEGF는 nhEGF와 동일한 것으로 추정되었다.

### 감사의 말

본 연구는 1995년도 통산산업부의 공업기반기술 개발사업의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

1. Cohen, S. and G. Carpenter. 1975. Human Epidermal Growth Factor: Isolation and Chemical and Biological Properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**: 1317-1321.
2. Fumio, A. 1992. Epidermal Growth Factor. *Chiryogaku* **25**: 1045-1048.
3. Yoshio, T.O., Miyashita, T. Fukuda, and T. Hamana. 1986. Direct Expression of a Chemically Synthesized Human Epidermal Growth Factor Gene in *E. coli*. *J. Takeda Res. Lab.* **45**: 136-147.
4. Smith, J., E. Cook, I. Fotheringham, S. Pheby, R. Derbyshire, M.A.W. Eaton, M. Doel, D.M.J. Lilley, J.F. pardon, T. Patel, H. Lewis, and L.D. Bell. 1982. Chemical synthesis and cloning of a gene for human  $\beta$ -urogastrone. *Nuc. Acids. Resear.* **10**(15): 4467-4482.
5. Takanori, O., S. Sakamoto, K. Miyoshi, T. Fuwa, K. Yoda, M. Yamasaki, G. Tamura, and T. Miyake. 1985. Synthesis and secretion of human epidermal growth factor by *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 7212-7216.
6. Engler, D.A., R.K. Matsunami, S.R. Campion, C.D. Stringer, A. Stevens, and S.K. Niyogi. 1988. Cloning of authentic human epidermal growth factor as a bacterial secretory protein and its initial structure function analysis by site-directed mutagenesis. *J. Bio. Chem.* **263** (25): 12384-12390.
7. Shimizu, N., S. Fukuzono, Y. Harada, and K. Fujimori. 1989. Mass production of human epidermal growth factor using fed-batch cultures of recombinant *E. coli*. *Biotech. Bioen.* **38**: 37-42.
8. Doelle, H.W., K.N.W. Ewings, and N.W. Hollywood. 1992. Regulation of glucose metabolism in bacterial systems. *Adv. Biochem. Eng.* **23**: 1-35.
9. Zavriskie, D.W. and E.J. Arcuri. 1986. Factors influencing productivity of fermentations employing recombinant microorganisms. *Enzyme Microb. Technol.* **8**: 706-717.
10. Burstyn, D.G., T. Copmann, M. Dinowitz, R. Garnick, and A. Losikoff. 1991. Assessment of genetic stability for biotechnology products. *Pharma. Tech.* 34-42.
11. Luri, G.W. and W.R. Strohl. 1990. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *E. coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *App. Environ. Microbiol.* **56**: 1004-1011.
12. Guest, J.R. 1979. Anaerobic growth of *E. coli* K12 with fumarate as terminal electron acceptor. Genetic studies with menaquinone and fluoroacetate-resistant mutants. *J. Gen. Microbiol.* **115**: 259-271.
13. Yadwad, V.B., S. Wilson, and O.P. Ward. 1994. Production of human epidermal growth factor by an ampicillin resistant recombinant *E. coli* strain. *Biotech. lett.* **16**: 885-890.
14. Landwall, P. and T. Holme. 1977. Influence of glucose and dissolved oxygen concentrations on yields of *E. coli* B in dialysis culture. *J. Gen. Micro.* **103**: 353-358.
15. Jefferey, J.C., E. Kim, J.N. Telford, E.Y. Wong, W.C.

- Tacon, M.L. Shuler, and D.B. Wilson. 1990. Effects of temperature on *E. coli* overproducing  $\beta$ -lactamase or human epidermal growth factor. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 104-111.
16. Catherine, H.S. 1989. Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Bio/tech.* **7**: 1141-1149.
17. Kopetzki, E., G. Schumacher, and P. Buckel. 1989. Control of formation of active or inactive baker's yeast  $\alpha$ -glucosidase PI in *E. coli* by induction and growth conditions. *Mol. Gen. Genet.* **216**: 149-155.
18. Miyake, T., T. Oka, and T. Nishizawa. 1985. Secretion of Human Interferon-induced by using secretion vectors containing a promoter and signal sequence of alkaline phosphatase gene of *E. coli*. *J. Biochem.* **97**: 1429-1436.
19. Gram, H., P. Ramage, K. Memmert, R. Gamse, and H.P. Kocher. 1994. A novel approach for high level production of a recombinant human parathyroid hormone fragment in *E. coli*. *Bio/tech.* **12**: 1017-1023.
20. Yee, L. and H.W. Blanch. 1993. Defined media optimization for growth of recombinant *E. coli* X. *Biotech. Bioeng.* **41**: 211-230.
21. Hiroshi, T., Y. Morinaga, M. Tsuchiya, H. Ikemura, and M. Inouye. 1988. Control of folding of proteins secreted a high expression secretion vector, pIN-III-ompA: 16-fold increase in production of active subtilisin E in *E. coli*. *Bio/Tech.* **6**: 948-950.
22. Nugent, M.F., S.B. Primrose, and W.C.A. Tacon. 1983. The stability of recombinant DNA. *Dev. Ind. Microbiol.* **24**: 271-285.
23. Botterman, J.H., D.R. De Buyser, J.A. Spriet, and M. Zabeau. 1985. Fermentation and recovery of the *EcoRI* restriction enzyme with a genetically modified *E. coli* strain. *Biotech. Bioeng.* **27**: 1320-1327.
24. W.T. Tucker, C.A. Miller, and S.N. Cohen. 1984. Structural and functional analysis of the *par*<sup>+</sup> region of the pSC101 plasmid. *Cell* **38**: 191-201.

(Received 19 March 1996)