

동물세포 대량배양에 의한 Erythropoietin(EPO) 생산에 관한 고찰

이 현 용
강원대학교 식품공학과

System Analysis for Mass Cultivation of Mammalian Cells to Produce Erythropoietin(EPO)

Hyeon Y. Lee

Dept. of Food Eng. Kangweon National University Chuncheon Korea

ABSTRACT

Growth kinetics of mammalian cell, Chinese Hamster Ovary(CHO) was investigated to effectively produce pharmaceutically important Erythropoietin under perfusion chemostat conditions. Perfusion rate, D is correlated with total viable is to be an essential factor in controlling growth kinetic parameters under this kind of operations. It is also found that the measurement of oxygen uptake rates is a relatively accurate method to understand cell growth, in case that the traditional cell count method is no longer useful due to heavy cell clumpings. True growth yield, Y_{max} and maintenance coefficient, m_e associated with mammalian cell growth were estimated as 2.86×10^8 cells / g of glucose and 0.0063 g of glucose / cells / hr, respectively.

서 론

세계적으로 과거 수년간 동물세포의 배양에 대해 많은 연구가 급진적으로 추진되고 있는데, 그 주된 이유는 동물세포에서 나오는 특수한 의약품들이 유전자 조작에 의해 bacteria나 yeast에서 나올 수 있는 물질과 비교할 수 없는 장점을 가지고 있기 때문이다₁ (1-15).

첫째로, 동물세포에서 나오는 대부분의 protein들은 세포外로 저항없이 나오며 나오는 과정에서 protein의 구조 변형에 따른 문제가 없다는 것이며, 둘째는 prokaryotes 內에서 생성된 물질은 물질의 activity를 결정짓는데 중요한 post-Transformation이 안된다는 것이다. 마지막으로, Glycosylation에는 다음과 같은 문제가 있다. 동물세포에서 생성되는 의약적 성질을 가진 Protein들은 생합성되는 과정에서 여러 종류의 당류와 결합되어, 이것이 체내의 Antibody-Antigen 기능의 결정적 역할을 하게 된다. 하지만 세포內 조건이 틀린 bacteria나 yeast에서는 이 Gly-

cosylation이 안되며 구조가 같게 생성된다 할 지라도 activity가 다르게 된다(5). 또한 ADBF같은 의약품은 하등동물에서는 유전자 조작에 의해서도 생합성 시킬 수 없다.

이와 같은 동물세포를 대량으로 배양해 상업화하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 주된 이유중의 하나는 이런 제약품은 수익성이 다른 생화학 제품들 보다 3배이상 높기 때문이다 (6). 그러나 이 동물세포는 상당히 Shear stress에 약하고, 여러 특성들이 bacteria나 yeast와는 다르므로 이에 따른 생물학적 이론과 실험 및 결과가 뒷받침되어야 할것임에도 불구하고 현재로서는 이런 동물세포의 대량배양에 대한 자료가 상당히 부족한 상태이다. 따라서 이 논문에서는 의약적으로 중요한 조혈성능을 갖고 있는 Erythropoietin(EPO)의 생산에 대해 동력적, 수율적 결과를 보고하고자 한다. 또한, 이 결과들을 통해 효율적인 동물세포 배양기술 및 산업화를 위한 생물공학 적 접근 방법을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

Cell Line과 배양조건

Erythropoietin 생산 유전자(150kb, Amgen Patent, U.S.A.)를 Transformation시킨 Chinese Hamster Ovary(C.H.O.) ATCC-KI(7)를 다음과 같은 배지에 배양시킨다; Rubb's Essential Media(GIBCO, U.S.A.)에 5% FBS, 6 μ M Glutamine과 75nM Methylothreaxate를 첨가시킨 배지(weight / volume percentage)150ml T-flask에 CHO cell을 접종시켜 37 $^{\circ}$ C로 항온 CO₂ 배양기에 배양시키면서, 매 24시간마다 300ml T-flask에 scale-up시켰다.

Scale-up때마다 Total Cell수와 생균정도를 측정한다. 그 후 1L Spinner Vessel로 옮긴다. (이 Cell은 anchorage-dependent 혹은 independent로 자라는데 이 실험에서는 suspenseem 상태로 배양시켰다.) 그 후 2일 동안 CO₂-enriched된 공기를 Vessel의 head space에 purge시켰다. 그 다음 단계로 5L spinner vessel (Bellca Co., U.S.A.)에 2개의 1L 배양액과 1L 새 배지를 혼합해 3L로 만들어 3일동안 1L Spinner Vessel과 같은 방법으로 배양했다. Scale-up의 마지막 단계로써 이 5L Vessel에서 14L Sailing Vessel로 옮겨진다. 이 배양조의 교반은 Shear를 최소화하기 위해 Sailing type의 교반기를 사용한다. 이 14L Vessel에서 3일간 5L와 같은 방법으로 배양시켜 Total Cell수가 1x10⁶ Cell S / ml 이상되면 100L Perfusion system으로 옮겨진다. 이 장치의 자세한 구조와 배양조건은 이 외 논문에 자세히 수록되어 있으므로 생략한다 (8).

위에 언급된 모든 Scale-up은 무균적으로 Laminar Flow Hood에서 행해졌으며 배지는 0.2 ~ 0.4 μ pore size filter에서 4번 연속 여과시킨 무균적인 것으로 Penicillin 같은 항생제들을 사용할 필요가 없었다. 이 antibiotic-free media는 세포의 배양과 product recovery가 용이한 큰 장점이 있다. 또한 모든 배양은 computer로 자동온도 조절이 되는 항온실(100m²)에서 37 \pm 0.1 $^{\circ}$ C로 배양되었다.

전체 세포수와 생균도 측정.

1% Trypsin용액(GIBCO, U.S.A.) 5ml를 150ml T-flask에 섞어 흔들어 flask Spinner Vessel에 Suspension상태로 된 cell을 무균적으로 pipette를 사용해 20ml를 채취한다. 이 Sample 5ml를 5% NaCl용액에 희석시켜 Hemato Slide로 세균수를 센 후, 희석배율을 곱해 측정했다. 또 나머지 15ml에 5ml의 0.5% Tryptophan-blue용액 (Biotech, Co., U.S.A.)을 시험관에 섞어 잘 흔든 후 15분간 방치해 두었

다. 다음 이 용액을 Hemato Slide에서 보면 죽은 세포들은 blue(dye)에 염색이 되어서 살아있는 세포와 구분이 되어진다. 이때 희석율을 알고 있으므로 생균수의 비율을 계산할 수 있었다.

산소 소비 속도의 측정

On-line Process Gas Chromatograph(GC) (Applied Automation, U.S.A.)를 사용해 Perfusion System內로 들어가는 기체와 나오는 기체의 조성을 분석해 산소양을 mole Percentage로 바꿔 material balance를 통해 산소 소비속도를 계산했다. 이때 용존 산소양은 electrode형식의 D.O. Probe의 결점을 보완하기 위해 특별히 제작된 Silicone tube에 압력을 가해진 He와 media內의 액체상태로 존재하는 산소와의 평형상태에서 기체상태로 전환시켜 GC로 잰다. 용존산소양의 측정오차는 \pm 0.5%로 나타났다. 산소의 material balance를 보면 Oxygen In-Oxygen Out Consumed Oxygen by Cell Growth 즉, $[F_i X_{O_2} - F_o X_{O_2}]g + [F_i' k X_{O_2} P_{air} / H \cdot F_o' X_{O_2}'] \ell = OUR(1)$

여기서 Subscript g와 i는 각각 기체, 액체상태를 의미하고, i와 o는 inlet, outlet stream을 말한다. F는 기체속도로써 ml / min로 측정되고, F_o 즉, outlet stream의 속도는 기체內의 N₂양에 의해 교정된다. 즉, $F_o = X_{N_2i} / X_{N_2o} F_i$ (ml / min) X_{N₂o}는 Outlet Stream의 N₂ mole이고 X_{N₂i}는 inlet Stream의 N₂ mole이다. 또 X는 산소의 mole fraction으로써 GC에 의해 측정되며, X_{O₂}는 용기內의 산소압, 즉 0.219atm이다. 배양기內로 들어가는 배지는 대기압과 평형을 이룬다고 가정되기 때문이다. 이때 대기압은 latm으로 간주된다. H는 Henry상수로써 37 $^{\circ}$ C에서 51800mole of H₂O.Q tm / mole of O₂로 결정된다. (9)

OUR은 Oxygen Uptake Rate로서 ml of O₂ Consumed per minute로써 계산되었다. 이 산소balance는 매 시간마다 자동으로 GC에서 측정되어 host computer(PDP-11 / 23, DEC, Canada)로 전달된 후 위 식 (1)에 의해 계산되어 자동출력된다. 도표 1의 5번째 Column의 data가 이렇게 각 media flow rate에 따라 계산된 값들이다.

D. Glucose와 EPO양의 측정

30ml Sample을 reactor에서 매일 무균적으로 추출해 0.5 μ 여과지에 진공여과 시킨 후 alcohol solvent로 처리해 HPLC(Waters, U.S.A.)를 통과해 glucose양을 g / L단위로 측정했다. EPO양은 매일 30ml를 배양기에서 추출해 알칼리용액으로 희석처리 한후(0.5 μ 으로 여과시켰음) optical density를 재서(spectronic 20, U.S.A.) 미리 5% FBS용액에서 만든 Standard Curve와 비교하여 측정했다.

결과 및 고찰

도표 I은 100L Perfusion System에서 CHO Cell을 10 일간 연속 배양시킨 결과를 정리한 것이다. Perfusion 속도 즉 신선한 배지를 Bioreactor에 6ml/min에서 37ml/min까지 세포수와 산소소비속도에 따라 변화시켰다. 이 System은 완전한 chemostat조건이 아닌 pseudo-continuous system이다. 그 이유는 세포들이 마지막 Product line에 따라 가는 것이 아니고 filter에 의해 다시 배양기로 되돌아가 세포수가 계속 증가되고 있기 때문이다. 또한 이것은 기존의 batch system보다도 더 높은 전체 세포수와 좋은 생균도를 유지할 수 있다. Product line으로 나가는 conditioned media에는 생성된 EPO뿐만 아니라 세포가 자라면서 내는 lactic acid 그외, 유독물질이 함께 나가므로 세포들이 오랫동안 높은 생균율로 살 수 있다 (8). 산소소비속도는 on-line Gas Chromatograph로 매 시간 측정된 것을 computer에서 계산해 24시간 평균을 낸 값이다. 전체 세포수가 1×10^6 cells/ml까지 도달했는데 이 숫자는 종래의 대량 배양에서 지금까지 얻을 수 없었던 최대 세포수일 것이다. 생균도와 전체 세포수가 7일 후에 감소해서 10일째 다시 증가되었는데 이는 실제 세포가 죽은 것이 아니라 이 CHO세포가 어느 정도 이상이 되면 서로 세포끼리 Clumping이 되어서 앞에서 기술한 세포측정방법으로 정확히 잴 수 없기 때문이다. 이를 뒷

받침 하는 것이 산소소비속도의 지속적인 증가이다. 이 산소소비속도는 bioreactor 내에서 on-line으로 측정된 것으로 mass balance에 의한 것으로 세포수 측정오차가 있을 수 없다. 즉, 산소소비가 증가한다는 것은 비례적으로 세포수도 증가함을 의미하며, 마지막 column의 EPO양도 증가하고 있음을 의미한다. 이와 같이 이런 CHO Cell에서는 산소소비속도의 관측이 중요하며 세포성장의 척도가 되는 것이다.

도표 I의 4번째 Column은 Perfusion속도를 continuous culture system에서의 dilution rate개념으로 변환시켜, 단위 속도당의 배지의 flow rate을 본 것이다. 이 dilution rate이 위 Perfusion system에서의 세포성장을 조절할 수 있는 최적의 변수인 것이다. 그래서 그림 2에서 볼 수 있듯이 이 Perfusion rate에 따라 세포수와 산소소비속도가 비례적으로 증가함을 볼 수 있다. 또한 높은 Perfusion 속도에서의 반비례 현상은 앞에서 언급한 바와 같이 세포끼리의 clumping현상 때문이다. 이 자료로써 세포증식과 산소소비속도와의 관계를 연가시킬 수 있으며 이 model로써 on-line세포수를 직접 재지 않고 측정할 수 있게 된다 (10). 또한 도표 II의 6번째 Column인 Specific oxygen uptake Rate은 세포의 동력학의 연구에 매우 중요한 자료로써 그 단위는 mole of O_2 /cell/hr다. 이 CHO세포는 hybridomas 및 HeLa와 같은 다른 animal cell들과 비교해 볼 때 높은 산소소비속도를 갖고 있다(일반적으로 $G_{O_2} =$

Table I. Results of Cultivating Chinese Hamster Ovary (CHO-K1) under Perfusion Chemostat Operationst (8).

Days	Total Viable Cell *10E-5 (cell/ml)	Viability (%)	Perfusion Rate, D (1/hr)	Oxygen uptake Rate μ # (mL/min)	Residual Glucose Conc.* (g/L)	DPO* (μ g/mL)
1	2.40	93	0.0041	2.57	1.93	—
2	3.90	—	0.0097	3.45	1.88	0.72
3	3.70	92	0.0096	4.57	1.87	—
4	4.20	88	0.0098	6.57	1.72	—
5	5.20	97	0.0101	8.39	1.69	—
6	9.30	95	0.0196	12.46	1.63	1.80
7	8.70	76	0.0159	21.86	1.29	8.40
8	5.10	76	0.0226	22.65	1.17	—
9	4.30	73	0.0222	22.65	1.17	—
10	7.40	92	0.0202	38.59	1.14	8.30

+ Basal media was added by 5% FBS and 6 M Glutamine, and working liquid volume was 100L.

++ Tryptophan-blue dye exclusion method was used.

* Samples were analyzed by HPLC everyday.

** Actual concentrations were calculated from standard curve.

+++ Oxygen conc. in inlet and outlet gases and liquid phase were measured by on-line gas chromatograph.

Table II. Results of Estimating Growth Yield and Specific Oxygen Consumption Rate from Table I.

Prefusion Rate, D (1/hr)	Total Viable Cell *10E-5 (cells/mL)	Consumed Glucose Conc.* ΔS (g/L)	Growth Yield Y *10E-B (cell/g)	Oxygen Uptake Rate (mL/min)	Specific Oxygen Uptake *10E10	Specific Production (g/cell/h)
0.0041	2.40	1.12	2.14	2.57	2.87	
0.0097	3.90	1.22	3.20	3.45	2.37	1.77
0.0096	3.70	1.19	3.11	4.57	3.31	—
0.0098	4.20	1.48	2.84	6.57	4.21	—
0.0101	5.20	1.39	3.74	8.39	4.32	—
0.0196	9.30	1.48	6.23	12.5	3.59	3.74
0.0159	8.70	1.71	5.09	21.9	6.73	15.4
0.0026	5.10	2.06	2.48	20.0	10.5	35.4
0.0222	4.30	1.85	2.32	22.7	14.1	
0.0202	7.40	1.94	3.81	38.6	14.0	22.7

*Initial glucose concentration was 3.05 g/L (3 g/L from basal media and 0.05 g/L from 5% FBS), and actually consumed glucose concentration was corrected by subtracting amounts of unused glucose in the perfused media from residual glucose concentrations.

0.5 ~ 5 × 10⁻¹⁰ mmole O₂/cells/hr(11)).

그림 1은 dilution rate에 따른 세포수 증가와 생존도의 관계를 잘 설명해 주고 있다. 높은 Perfusion 속도에서는 생존도를 90%이상 유지시킬 수 있으며 전체 세포수와 Perfusion rate의 직선 관계를 암시하고 있다. 하지만 이 Perfusion rate의 모든 경우에서 다 직선 관계가 아닐 수 있으며 서서히 자라는 세포(예를 들면, Colon Cells)에서는 Cytostatic Culture를 해야 된다. 이럼으로

써, 단계적으로 세포가 주위 조건에 adaptation되 feed back inhibition을 막을 수가 있다.

그림 2는 위에서 언급한 바와 같이 dilution rate과 산소 소비량과의 관계를 연관시킬 수 있고 이중 점선으로 나타낸 것이 Least square Method로써 linear regression을 한 결과이다. 이 CHO Cell에서의 관계식은 4.3 × 10⁻⁸ mmole of O₂/cells의 기울기를 가진 직선이다. 그리하여 이 System을 배양시킬때 예측할 수 있으므로 Oxygen de-

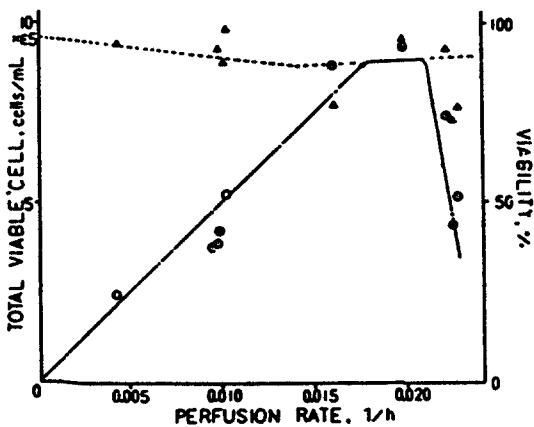


Fig. 1 Relationship between perfusion rates and total viability along with total cells from Table I; ○, total viable cell; △, viability. Lines are drawn by least Square Regression method.

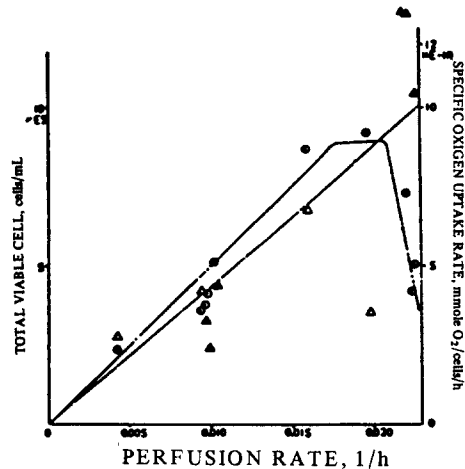


Fig. 2 Comparison of total viable cells and oxygen uptake rates according to perfusion rates; ○ and —, total viable cell; △ and —, —, spcialeast Square Regression method.

mand가 계산되어서 필요산소를 공급해 산소 부족현상이 일어날 수 없으며 그림 3에서 볼 수 있듯이 전체 세포수와와의 관계가 성립되어 on-line 간접 세포 측정이 가능해진다.

도표 II는 도표 I의 data를 다르게 처리한 것으로서 EPO생산과 산소소비량을 동역학적면에서 접근한 것이다. 그림2와 3이 이들의 관계를 Plotting했으며 특히 그림 3에서는 세포수가 산소소비속도와 EPO 생성속도에 직접의 관계가 있음을 나타내고 있다. 그림 3에서 원형이 산소소비속도이며 삼각형이 EPO생성속도를 나타낸다. 앞에서 언급한 바와 같이 전체 세포수의 특징이 정확하지 않다고 가정할 지라도 산소소비속도와 EPO생성속도는 밀접한 즉, Growth-associated product formation의 관계가 있음을 시사해 주고 있다. 왜냐하면 산소소비속도가 증가하면 세포증식속도가 빠르고, 이에 따라 EPO생성도 증가하며, 그와 반대 경우는 EPO생산이 감소되기 때문이다.

이와 같이 EPO생산속도를 조절하기 위해 Perfusion System에서 최적합한 변수인 Perfusion rate과의 상관 관계를 그림 4에서 잘 보여 주고 있다. 즉, 신선한 배지의 투입속도를 빠르게 하면 세포성장 조건이 좋아지므로 EPO생성이 기하급수의으로 생성된다. 이 그림 4는 세포의 대량 배양과 Product형성의 밀접에 중요한 기본 자료가 된다. 또한 도표 II의 4번째 Column의 Growth Yield, Y_{O_2} 는 이제까지 동물 세포에 관한 논문들에서 찾아볼 수 없었던 개념을 도입한 것이다. 또한 이 Yield Model은

이제까지 대부분의 bacteria, yeast등과 같은 발효 공학에서 흔히 사용되던 것이었다(12, 13). 기본 개념은 Pirt의 Yield Model(14) $1/Y_{O_2} = 1/Y_{max} + Me/D$ (2)에서 Y_{O_2} 는 산소소비에 대한 세포의 수율이고 Y_{max} 는 maximum growth yield이며 Me 는 maintenance에 필요한 최소 산소 양이다. 이들은 그 system에서 dilution rate과 관계있음을 나타낸다. 이것을 좀 더 통계학적으로 하기 위해 dilution rate을 양면에 곱해 $D/Y_{O_2} = D/Y_{max} + me(3)$ 으로써 각각을 Form I, II로 정의했다. 여기서 앞서 기술한 바와 같이 Product와 명백한 상관성이 있지만 간단화를 위해 EPO Product에 대한 maximum yield를 Form I, II에서 생략했다. 즉, 도표 II에서 계산한 산소yield와 Perfusion rate이 상호 직선 관계를 갖고 있으며 기울기와 절편에서 수율 변수인 Y_{max} 와 me 를 구할 수 있다. 도표 III위 Form I, II의 도표 II에 있는 Data를 사용해 Least Square Method에 의해 95% Confidence Interval을 계산한 것이다.

도표 III은 식 2와 3의 linear regression의 결과로써 각 point에서의 값과 95% 확률 변수의 범위를 정한것이다. 이 통계학의 처리는 North Carolina State University의 Statistical Analysis System(SAS)를 사용해서 얻은 값들이다. 좀 더 자세한 방법은 이외 다른 논문에 기술되어 있다(15). Form I에 의해 얻은 maintenance coefficient가 음수가 나왔는데, 이론적으로 이 값이 음수가 될 수 없으므로 이는 실험값들이 직선에서 너무 떨어졌기 때문에 이것을 이차적인 통계 처리로써 보완할 수 있는 것이

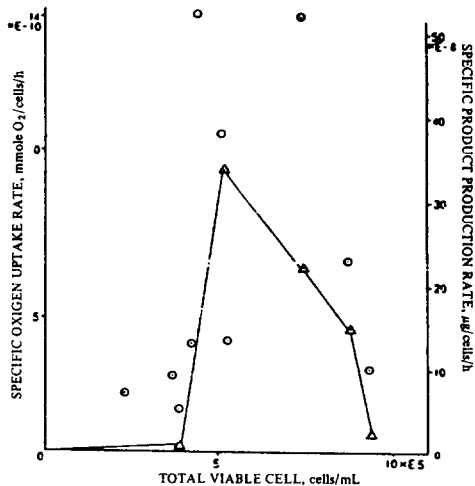


Fig. 3. Relationships among total viable cell and specific oxygen uptake rate and specific production rate from Table II; ○, specific oxygen uptake rate; △, specific product production rate.

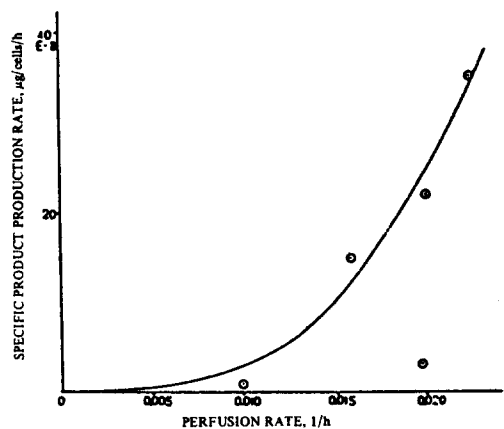


Fig. 4. Rates of EPO productions related to media perfusion rates from data of table II.

Table III. Results of Estimating True Growth Yield and Maintenance Coefficient under Perfusion Chemostat Operations from Table II.

	True Growth Yield, Y_{max} *10E-8 (cells/g)		Maintenance Coefficient, m_e (g/cells/hr)	
	Point Estimate	95% Confidence Interval	Point Estimate	95% Confidence Interval
Form I	2.86	1.88, 9.90	-1.1651	0, 0.0041
Form II	1.92	1.37, 3.18	0.0063	0.0025, 0.0101

Form II로써 이것에 의해 나온 값은 0.0063으로 다른 동물 세포들과 비교해 유사한 값이다. 또한 True growth yield, Y_{max} 는 2.86×10^8 Cells/g of glucose로써 이 PC system으로 glucose 1g소비당 2.8×10^8 세포까지 증식시킬 수 있다는 결론을 얻을 수 있다. 이 값은 지금까지 large Scale 배양에서의 최대 세포수임을 알 수 있다. 또한 Form I과 II에서 95% 최적 변수 범위가 상당히 좁은 것을 알 수 있다. 이것은 각 Data Point들이 직선 관계를 성립하고 위에서 설정된 model이 적합함을 의미한다. 지금까지 위의 model들은 미생물 광합성 균들의 경우에 적용된 것으로(15), 동물 세포 성장에 적합한 model임을 증명했다.

요 약

본 논문은 동물 세포의 대량 배양을 위해 연속 공법 방식인 Perfusion Continuous System을 도입해 의약적으로 중요한 EPO의 생산을 위한 생물 공학적인 자료들을 제공하고 있다. 이 system은 세포 증식 속도를 배지의 Perfusion 속도로 변화시킴으로써 조절시킬 수 있는 산소 소비속도와 밀접한 상관관계가 있음을 입증하며 이는 세포수의 직접 측정에 따른 오차 및 방법상의 문제를 정확히 측정할 수 있는 간접 변수, 즉 산소소비속도를 이용함으로써 제거할 수 있다. 특히 이 산소소비속도와 세포 성장 관계 model로써 세포 증식을 예측함과 동시에 동물 세포 대량 배양을 위한 scale-up의 중요한 기초 자료가 될 것이다.

지금까지 발표되지 않았던 동물 세포의 glucose에 대한 True growth yield와 maintenance coefficient 값들의 측정 은 동물 세포 성장과 유용 물질 생산을 위한 중요한 수율 적 자료가 된다. 한편 이 결과는 지금까지 미생물이나 광합성에서만 적용되었던 yield model이 Eukaryotes에서도 응용될 수 있음을 증명하고 있다. 이와 같이 perfusion system이 많은 장점을 갖고 있지만, 세포 성장에 따른 동역학적인 연구의 수행이 좀 더 요구되는 실정이며, 특히 Perfusion system을 설명할 수 있는 이론 및 cytostatic model의 정립이 선행되어야 할 것이다.

감 사

이 논문을 작성하는데 도움을 주신 이 상명 박사님, 변 유량 박사님 및 손 명례양에게 감사의 뜻을 포함합니다.

참고 문헌

1. M. Ratafia(1987), *Biotechnology*, **5**, 692.
2. R.J. Von Wedel(1986), *Genetic Eng. News*, **3**, 16.
3. R. Fontanges, Y. Beaudry and G. Matot(1974), *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **4**, 859.
4. K. Ku, M.J. Kuo, J. Deleute, B.S. Wildi and J. Feder(1981), *Biotechnol. Bioeng.* **23**, 79.
5. J. Van Brunt(1986), *Biotechnol. Bioeng.* **4**, 505.
6. H.Y. Lee(1988), *Korean J. Applied Microbiol. Bioeng.* (Submitted for Publication).
7. R. Hay, M. Macy, T.R. Chen and P. Mc Clintock(1985). *ATCC*, 5th ed. p.34, ATCC, Press, M.A.
8. H.Y. Lee (1987), *Symp. Korean Scientist and Engineers in America*, **10**, 127.
9. R.C. Weart(1982), *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 63rd ed., CRC Press Fl.
10. R.P. Jefferis (1977), *Workshop for Computer Applications in Fermentation. Technology*, p. 59, GBF, N.Y.
11. R.C. Telling and P.J. Randlett(1970), *Adv. Appl. Microbiol.* **13**, 91.
12. L.E. Erikson(1979), *Biotechnol. Bioeng.* **21**, 725.
13. I.G. Minkevich and V.K. Eroshin(1973), *Folia Microbiol.* **18**, 376.
14. S.J. Pirt(1975), *Principles of Microbe and Cell Cultivation* p. 87, Academic Press, N.Y.
15. H.Y. Lee, L.E. Erikson and, S.S. Yang(1984), *J. Ferment. Technol.* **4**, 341.

(Received January 21, 1989)