

농축배지에서 Glucose와 Glutamine 농도가 하이브리도마 증식과  
간염표면항원에 대한 단일클론항체 생산에 미치는 영향

전 복 환 · 조 의 철 · 김 동 일

목암생명공학연구소

생물화학실, 경기도 용인군 구성면 보정리 341

Effects of Glucose and Glutamine Concentrations on Hybridoma Growth  
and Anti-HBsAg MAb Production in Enriched Medium

Bok Hwan Chun, Eui Cheol Jo and Dong Il Kim

MOGAM Biotechnology Research Institute

Biochemical Engineering Laboratory

341 Pojung-Ri, Koosung-Myon, Yongin-Kun, Kyonggi-Do, Korea

ABSTRACT

To improve the growth of mouse hybridoma 2c3.1 secreting anti-Hepatitis B surface antigen monoclonal antibody (anti-HBsAg MAb), we had constructed an enriched medium and observed the effects of fetal bovine serum and serum-free supplements including human serum albumin, 'insulin and transferrin', and monoethanolamine. For further enhancement of growth, the concentrations of two major energy sources, glucose and glutamine, were strengthened with various ratios in the enriched medium. Maximum cell growth and monoclonal antibody production obtained in various ratios of glucose/glutamine with an inoculation concentration of  $2 \times 10^5$  cells/ml were  $0.73 \times 10^6 - 4.62 \times 10^6$  cells/ml and 65.1-422.6  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. Glutamine was found to be a major energy source and a limiting nutrient in comparison to glucose for 2c3.1 cell cultivation in enriched media with low serum.

서 론

하이브리도마 세포 증식에 영향을 미치는 여러인자들에 대해서 많은 연구 결과가 보고 되어왔다(1-7). 이들 인자들은 배지에 용존산소 농도와 배양 온도등의 환경적 인자와 배지 성분, 영양분의 고갈, 부산물의 축적, 세포의 배양 방법등의 배양적 인자들로 나누어 진다. 그 중에서 하이브리도마 세포의 배양에서 주된 에너지 원으로서 이용되는 glucose와 glutamine은 세포 증식과 단일클론항체 생산을 고려하는데 매우 중요한 요소로

알려져 있다. 이러한 사실은 하이브리도마 세포증식, 세포 생활성도 및 항체 생산에 미치는 glucose와 glutamine 비율의 영향에 대한 최근의 연구에서도 그 중요성을 볼 수 있다(2). 세포 배양시 동물세포는 세포 증식에 필요한 에너지를 얻기 위하여 탄수화물을 lactate로 분해하는 해당작용(Glycolysis)과 TCA cycle을 통해 glutamine을  $\text{CO}_2$ 로 산화하는 두개의 일차적 대사과정을 가지고 있다. Glucose는 보통 대부분의 동물세포 배양에 요구되는 탄수화물로서 이용되고 있고, 특히 glutamine은 다른 아미노산에 비하여 5-20배 더 높은 농도를

요하며 glucose와 함께 배양된 세포의 증식에 필수적인 역할을 하고 있다(8-9).

하이브리도마로부터의 경제적인 단일클론항체의 생산을 위하여 대규모 고농도 배양이 연구되었고, 세포 증식과 항체 생산의 증가를 위하여 여러 배양 기술들도 적용되어 왔다(10-13). 전 모에서는 (14-15)는 이미 간염표면항원에 대한 단일클론항체(anti-HBsAg MAb)를 생산하는 쥐유래 하이브리도마 세포증식과 항체 생산을 증가시키기 위한 무혈청배지의 개발 및 이 무혈청배지에 낮은 농도의 혈청 첨가의 영향을 살펴 보았으며 또한 무혈청배지의 기본 배지와 영양강화배지를 혼합하여 제조한 농축배지에서 무혈청첨가물들과 혈청의 영향을 조사하여, 이 농축배지에서의 고농도배양의 가능성을 분 바 있다.

본 연구에서는 하이브리도마 2c3.1 세포의 증식과 단일클론항체 생산을 더욱 증가시키고 항체를 경제적으로 생산하기 위하여 세포 배양에서 주된 에너지원으로 알려진 glucose와 glutamine을 여러 농도의 조합으로 첨가시킨 농축배지에서 세포 증식 및 단일클론항체 생산에 미치는 glucose와 glutamine의 농도 영향을 조사하고, 고농도 배양의 가능성을 알아 보았다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 배지

인혈청 알부민(Albumin<sup>®</sup>)은 (주) 녹십자로부터 받았고, insulin, transferrin, monoethanolamine, glutaminase, glutamate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, glucose, glutamine 등은 Sigma(St. Louis, MO)로 부터 구입하였다. RPMI 1640배지와 Ham's F12 배지는 Gibco Laboratories(Grand Island, NY)에서 구입하였고, FBS는 Hyclone Laboratories (Logan, UT)에서 구입하였다.

### Cell Line

본 실험에 사용한 cell line은 쥐 유래의 하이브리도마 2c3.1세포이다. 이 cell line은 본 연구소에서, 정제된 human HBsAg(200  $\mu$ g/ml, 녹십자)를 가지고 면역시킨 balb c mouse의 spleen 세포에 CRL 1580 myeloma 세포(P3 $\times$ 63, Ag, 8(V653))를 융합시켜 클론하였다. 이 하이브리도마는 간염표면항원에 대한 단일클론항체(subtype, IgG1)를 생산한다. 이 세포는 5% CO<sub>2</sub>가 유지되는 CO<sub>2</sub> incubator에서 5% FBS를 첨가한 RPMI 1640배지에서 배양하였으며 배양온도는 37 $^{\circ}$ C이었다.

### 농축배지의 제조와 세포배양

세포 배양에 사용되는 혈청 농도를 줄이고 세포 증식 및 항체 생산을 증가시키기 위하여 배양 배지의 영양 성분들을 강화시킨 농축배지를 제조하였다(15). 이 농축배지는 기본 무혈청배지(RPMI 1640 배지와 Ham's F12 배지의 5 : 1(v/v) 혼합 배지)와 RPMI 1640배지의 영양강화 배지를 2 : 1 부피비로 혼합한 배지이다. RPMI 1640배지의 영양강화 배지는 Jo 등의 방법으로 제조하였다(16). 본 실험에 사용한 농축배지는 glutamine을 제외한 아미노산, glutathione, 그리고 vitamin 등의 농도가 RPMI 1640 배지에서의 농도보다 약 두배정도 증가되고, glucose와 glutamine의 농도는 약 두배만 정도 증가된 배지이다. 농축배지에서의 glucose와 glutamine의 농도는 각각 5.05 mg/ml과 0.704 mg/ml(glucose / glutamine 몰비율로 5.82)이었다. 농축배지에서의 glucose와 glutamine의 초기 농도가 세포 증식과 항체 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 glucose와 glutamine의 고농도 용액을 이용하여 여러 농도로 농축배지에 가하여 각각의 초기 농도를 결정하였다(Table 1). 무기염류의 농도는 RPMI 1640배지보다 다소 낮으며, sodium chloride의 농도를 6 g / l에서 4 g / l로 낮추었다. 동물세포 배양에서 임 성분이 배양 배지의 삼투압을 유지시키며 약한 세포막을 견고하게 하므로 농축배지에서의 초기 삼투압을 140 mOs / kg water로 시작하여, 배양 후의 마지막 삼투압은 270 mOs / kg water로 조절되었다. 세포 증식을 증가시키기 위해 농축배지에 무혈청 첨가물(HIT: 2 mg / ml human serum albumin, 5  $\mu$ g/ml insulin, 5  $\mu$ g/ml transferrin, 10  $\mu$ M monoethanolamine)을 첨가하였다. 하이브리도마 2c3.1 세포를 0.5% FBS와 무혈청 첨가물을 첨가한 100 ml의 농축배지가 들어있는 spinner flasks(Bellco, NJ)에 2 $\times$ 10<sup>6</sup> cells / ml의 세포농도로 접종하고, 37 $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub> incubator안의 교반기(Techne, Cambridge, England)에서 40 rpm의 속도로 교반하면서 배양하였다. 배지의 pH는 멸균된 0.5 N sodium hydroxide 용액을 사용하여 배양 동안 7.0이상으로 유지하였다.

### 항체의 ELISA 분석

배양 배지에서 간염표면항원에 대한 단일클론항체(anti-HBsAg MAb)의 양은 아래에 기술된 효소 표지 면역흡착분석(ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay) 방법에 의하여 결정하였다. 표준 anti HBs를 37 $^{\circ}$ C에서 두시간동안 HBsAg-coated polystyrene strips 안에서 incubation 한다. Affinity 방법으로 정제된 표준 anti-HBs를 4.5에서 300 I.U. / ml의 표준 용액을 준비하기 위해서 1% bovine serum albumin을 함유한 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)으로 희석하였다. 이 표준

Table 1. List of various glucose / glutamine ratios used for the cultivation of hybridoma 2c3.1 cells

Culture No.	Glucose, mM(mg / l)	Glutamine, mM(mg / l)	Glucose / Glutamine (molar ratio)
1*	28.06(5050)	1.37 (200)	20.48
2	28.06(5050)	2.26 (330)	12.41
3*	28.06(5050)	3.15 (460)	8.91
4*	28.06(5050)	4.82 (704)	5.82
5	28.06(5050)	6.71 (980)	4.18
6*	28.06(5050)	8.48(1240)	3.31
7	28.06(5050)	10.26(1500)	2.73
8*	28.06(5050)	12.93(1890)	2.17
9*	3.28 (590)	4.82(704)	0.68
10	7.40(1300)	4.82(704)	1.54
11*	15.55(2800)	4.82(704)	3.28
12	23.89(4300)	4.82(704)	4.96
13*	28.06(5050)	4.82(704)	5.82
14	33.60(6050)	4.82(704)	6.97
15*	40.56(7300)	4.82(704)	8.41
16*	48.89(8800)	4.82(704)	10.14

\*Selected Data

용액과 적절히 희석된 배양액의 상등액을 plate의 strips에 100 $\mu$ 씩 넣어 두시간동안 방치 한후 polystyrene strips를 0.1% PBST(phosphate buffered saline tween 20)로 세번 세척하고, 혈청으로 희석된 100ng의 HBsAg-HRP conjugate를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 한시간동안 방치하고 0.1% PBST로 다섯번 세척하였다. Chromogenic substrate 용액을 상온에서 100 $\mu$  / well씩 가한후, 한시간후 100 $\mu$ 의 정지액을 가하여 각 well에서 발색된 정도를 405 nm에서 plate reader(EAR 300, SLT Lab.)로 분석하였다. 생산된 형태의 정량을 위해 사용한 표준 anti-HBs는 하이브리도마 2c3.1 세포의 대량배양으로부터 정제하여 얻은 것이며, 한 시료에 대한 정량분석은 세가지의 희석배율로 세번씩 실험한후 평균하여 얻었다.

#### 기타 분석

하이브리도마 2c3.1 생존 세포의 농도는 trypan blue exclusion 방법에 의하여 측정하였다. 배양액의 glucose 농도는 Industrial analyzer(YSI model 27, Yellow springs, OH)를 이용하여 분석하였다. Glutamine 농도는 glutaminase 와 glutamate dehydrogenase의 효소를 이용한 UV 방법을 이용하여 339 nm에서 분석하였고 (17), lactate 농도는 lactate dehydrogenase를 이용한 UV방법으로

340 nm에서 정량하였다(18).

### 결과 및 고찰

#### 농축배지에서 초기 Glucose와 Glutamine 농도가 2c3.1 세포 증식에 미치는 영향

하이브리도마 2c3.1 세포의 증식에 미치는 glucose와 glutamine의 영향을 조사하기 위하여 Table 1에 나타난 농도로 농축배지를 제조하여 2c3.1 세포를 농축배지가 들어있는 spinner flasks에  $2 \times 10^5$  cells / ml로 접종하여 배양하였다. Glucose와 glutamine의 여러 초기 농도중 몇가지를 선택하여 각 조합에서의 세포 증식을 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 1A에서 보여주듯이 glucose농도를 28.06 mM로 고정된 농축배지에서의 세포증식은 glutamine 농도가 4.82 mM (glucose / glutamine 몰비율로 5.82)에서 최대가 되었고, glutamine의 농도가 4.82 mM 이상으로 증가되면 오히려 세포 증식이 감소함을 보여주었다. 이것은 glucose농도가 고정된 농축배지에서의 세포 증식은 glucose와 glutamine몰비율이 5.82에서 최적임을 보여 준다. Glutamine농도를 4.82 mM로 고정하고 glucose농도를 변화시킨 농축배지에서는(Fig. 1B), 2c3.1 세포농도가 glucose농도의 증가에 따라 증가하고 glucose농도가

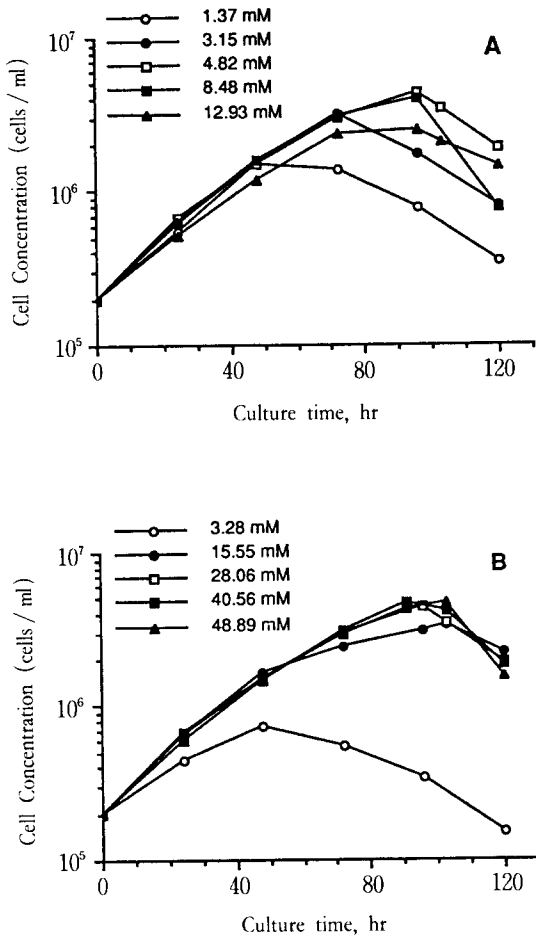


Fig. 1. Growth of hybridoma 2c3.1 cells at various glucose / glutamine ratios in enriched medium: A) fixed glucose concentration at 28.06 mM; symbols show glutamine concentrations, B) fixed glutamine concentration at 4.82 mM; symbols show glucose concentrations.

28.06 mM 이상에서는 세포증식속도와 최대 세포농도는 큰 차이가 없었다. 즉 고농도의 glucose에서도 세포 증식이 저해되지 않고 증가함을 보여주며, glucose농도가 48.89 mM(glucose / glutamine 몰비율로 10.14)에서 세포 성장은  $4.62 \times 10^6$  cells / ml로 최대치를 보였다. 이 결과는 농축배지에서 2c3.1 세포증식에 초기의 glucose와 glutamine 농도가 중요하며 glucose와 glutamine의 적절한

농도 조합으로 세포의 증식을 크게 증가시킬 수 있음을 보여준다.

**Glucose와 Glutamine의 초기 농도에 따른 Glucose 와 Glutamine의 소비 비교**

농축배지에서 glucose와 glutamine의 초기 농도를 변화시켜 하이브리도마를 배양하였을 때 배지내의 glucose와 glutamine의 소비를 조사하기 위하여, 부형청침가물과 0.5% FBS를 첨가한 농축배지에 2c3.1 세포를 배양한 전술한 실험에 따른 glucose와 glutamine농도의 시간에 따른 변화를 조사하였다(Fig. 2). 일반적으로 하이브리도마의 성장을 위해 사용하는 배지조건(배양 온도 37°C)에서 glutamine은 다른 아미노산과는 달리 화학적으로 불안정하다. 배지내의 glutamine소모는 세포에 의해 흡수될 뿐만 아니라 glutamine 자체의 분해에 의해 이루어짐이 보고되어 왔다(19-21). Ozturk 등은 배지의 pH가 glutamine 분해에 강한 영향을 미쳐 pH 증가에 따라 glutamine 자체 분해가 증가하고, 혈청 농도에 영향을 받지 않음을 보여주었다(19). 따라서 본 실험에서의 glutamine 분석은 배지의 pH, 배양시간, 배지 성분 등에 따른 glutamine 자체의 분해를 고려하지 않은 것이다. Glucose 농도를 28.06 mM로 고정하고 glutamine농도를 변화시킨 농축배지에서 (Fig. 2 A1, A2), 세포에 의하여 이용된 glucose 농도는 초기 농도에 비하여 약 20-32% 정도이었으나, glutamine은 배양에 따라 계속해서 소비되어 초기 농도의 약 82-95% 정도가 이용되었다. 결국 이들 농축배지에서는 배양 후 많은 양의 glucose가 세포에 의해 이용되지 못하고 남아있는데 비하여, glutamine은 초기의 농도에 무관하게 배양동안 거의 모두 소비되었다. 2c3.1 세포에 의한 glucose와 glutamine의 소비형태와 세포의 증식을 고려해보면 세포 증식이 가장 좋은 glucose / glutamine 몰비율 5.82에서 glutamine이 가장 많이 소비되어졌으며, 세포증식이 가장 낮은 20.48의 몰비율에서는 glucose가 가장 많이 소비되고 glutamine 소비는 가장 적었다. 이상의 결과로부터 glutamine은 glucose에 비해 2c3.1 세포의 증식에 보다 밀접한 연관을 갖고 있다고 할 수 있다.

Glutamine초기 농도를 4.82 mM로 고정한 농축배지 (Fig.2 B1, B2)에서 glucose 농도의 증가는 배양된 세포에 의한 glutamine 이용을 저해하지 않았으며, 세포에 의하여 이용된 glucose 농도는 초기 농도에 비하여 약 19-44% 정도이었으나, glutamine은 배양에 따라 계속해서 소비되어 초기 농도의 약 84-95% 정도가 이용되었고, 이 경향은 앞의 결과와 비슷하였다. 이들 농축배지에서도 배양 후 약 60-80%의 glucose가 세포에 의해

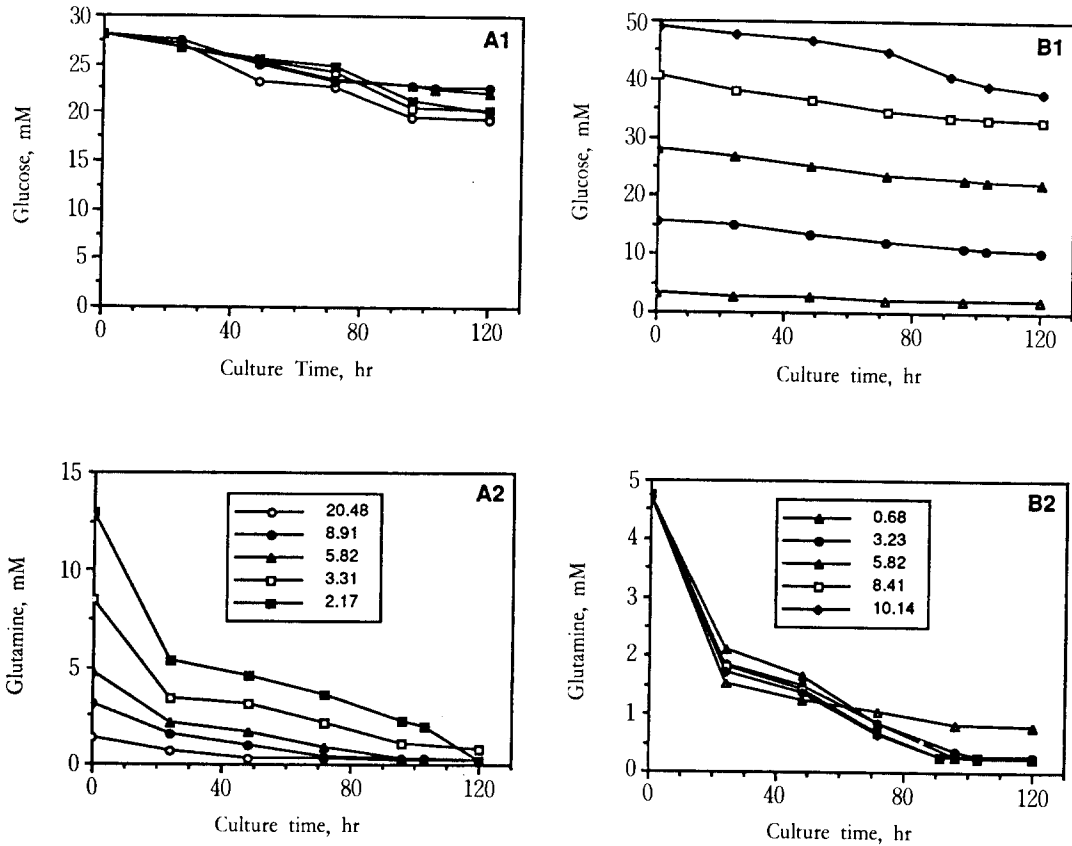


Fig. 2. Glucose and glutamine consumption curves at various glucose / glutamine ratios in enriched medium with low serum: A) fixed glucose concentration at 28.06 mM; symbols show glucose / glutamine molar ratios, B) fixed glutamine concentration at 4.82 mM; symbols show glucose / glutamine molar ratios.

이용되지 못하고 남아있는데 비하여 glutamine은 초기 glucose 농도에 관계없이 배양동안 거의 소비되었다. Glucose 농도를 증가시키에 따라 증가되는 lactate 농도로 부터 glucose 농도가 세포의 lactate 생산에 중요한 영향을 미치고 있음을 알 수 있다(Table 2). 이들 농축배지에서 glucose / glutamine 몰비율이 5.82 이상인 농축배지에서 최대 세포농도가 크게 증가하지 못하고 있는 것은 에너지원인 glutamine의 고갈로 인한 glucose와 glutamine간의 불균형이나 또는 생산된 lactate가 세포증식을 저해하는 한 요소로 작용한다고 추측할 수 있다.

결론적으로, 이 결과들은 저혈청과 무혈청첨가물을 사용한 농축배지에서 하이브리도마 2c3.1세포의 증식에 주된 에너지원으로서 glutamine이 glucose에 비하여 보다

영향을 미치고 있으며, 세포 증식에 대해 제한 영양소로 작용하고 있다고 할 수 있다.

**단일클론항체 생산에 미치는 Glucose와 Glutamine의 초기 농도의 영향**

전 보에서 보고한 바에 의하면, 10% FBS를 첨가한 RPMI 1640 배지와 무혈청배지에서 생산된 간염표면항원에 대한 단일클론항체는 각각 43 μg/ml과 50 μg/ml이었고, 저혈청과 무혈청첨가물을 첨가한 농축배지에서의 항체 생산은 159.7 μg/ml이었다(14-15). 여기서는 초기 glucose와 glutamine의 농도를 변화시킴으로써 얻어지는 세포 증식의 증가에 따른 고농도의 단일클론항체 생산을 보고하고자 한다. Fig. 1에서 표시한 각각의 세포

Table 2. A summary on growth and MAb production characteristics of 2c3.1 cells at various initial glucose and glutamine concentrations in enriched medium with low serum

Culture No.	Glucose / Glutamine (molar ratio)	Maximum Cell Density ( $\times 10^6$ / ml)	Specific Growth Rate (1 / hr)	Glucose Consumption (%)	Glutamine Consumption (%)	Lactate Conc. (mM)	Maximum MAb Conc. ( $\mu$ g / ml)
1	20.48	1.49	0.042	31.49	82.35	8.9	128.0
3	8.91	3.15	0.038	19.41	92.22	11.6	251.7
4	5.82	4.37	0.037	20.40	95.08	11.0	368.7
6	3.31	3.80	0.038	27.24	91.18	9.65	279.2
8	2.17	2.50	0.034	28.68	86.82	11.0	187.5
9	0.68	0.73	0.027	44.07	83.66	5.0	65.1
11	3.23	3.36	0.035	32.14	94.84	9.8	303.7
13	5.82	4.37	0.037	20.40	95.08	11.0	368.7
15	8.41	4.60	0.039	19.19	94.77	14.55	414.8
16	10.14	4.62	0.030	22.75	95.27	15.75	422.6

증식곡선에 따른 단일클론항체 생산을 Fig. 3에 나타내었다. 모든 glucose / glutamine 몰비율에서 항체 생산은 10% 혈청 첨가 RPMI 배지에서의 결과를 크게 증가하고 있으며, 항체 생산은 생존 세포의 농도가 감소하기 시작하는 사멸기에서조차 계속해서 증가하는 경향을 보이고 있다. Glucose 농도를 고정된 농축배지에서의 항체 생산은 glucose / glutamine 몰비율이 5.82에서 극대화(368.7  $\mu$ g / ml) 되었으며, 이 결과는 이들 농축배지에서의 항체생산이 세포의 증식과 밀접한 관련이 있으나 세포 증식 곡선과 반드시 일치하지 않음을 보여주는 것이라 할 수 있다. Glutamine 농도를 고정된 농축배지 (Fig. 3 B)에서의 항체 생산은 glucose 농도를 증가시키기에 따라 증가하며 glucose / glutamine 몰비율이 10.14에서 최대(422.6  $\mu$ g / ml)가 되었다. 이 몰비율에서 세포성장은 10% FBS를 첨가한 RPMI 1640 배지에 비하여 약 2.4 배정도 증가하였으며 항체 생산은 약 10배까지 증가되었다. 이상에서 설명한 여러가지 glucose와 glutamine 농도를 가진 농축배지에서의 세포 증식과 항체 생산을 Table 2에 요약하였다.

결론적으로 0.5%의 저혈청 및 무혈청첨가물을 첨가한 농축배지에서의 세포 증식과 항체 생산은 glucose / glutamine 몰비율이 0.68-20.48일때, 각각  $2.5 \times 10^6 - 4.62 \times 10^6$  cells / ml과 65.08-422.63  $\mu$ g / ml이었다. 이 결과는 하이브리도마의 2c3.1 세포 증식과 단일클론항체 생산을 증가시키는데 있어서, 초기의 glucose와 glutamine 농도가 중요하며, glucose와 glutamine 농도의 여러 조합으로부터 농축배지에서의 세포 증식과 항체 생산을 증가시

켜 하이브리도마 세포의 고농도 대량 배양 가능성도 보여주었다.

## 요 약

하이브리도마 2c3.1 세포주의 증식과 단일클론항체에 대한 단일클론항체 생산을 증가시키기 위하여 낮은 농도의 혈청과 인혈청 알부민(HSA, human serum albumin), 'insulin and transferrin', monoethanolamine 등의 무혈청 첨가물들을 첨가한 농축배지를 제조하였다. 제조된 농축배지에 주된 에너지원으로 알려진 glucose와 glutamine을 여러 농도로 첨가하고 2c3.1세포를 배양하여 초기의 glucose와 glutamine 농도가 세포 증식과 단일클론항체 생산에 미치는 영향을 조사하였다.  $2 \times 10^6$  cells / ml의 초기 세포농도로부터 얻은 최대 세포농도와 항체 생산은 넓은 범위의 초기 glucose와 glutamine 농도의 농축배지에서 각각  $2.5 \times 10^6 - 4.62 \times 10^6$  cells / ml과 65.08-422.63  $\mu$ g / ml이었다. Glutamine은 이 저혈청 및 무혈청첨가물을 사용한 농축배지에서 하이브리도마 2c3.1세포의 배양에 주된 에너지원으로 이용되어졌으며, glucose에 비하여 세포 증식에 보다 제한적인 영양소로 작용하는 가능성을 보였고, 적절한 농도에서 고농도 배양이 가능함을 알 수 있었다.

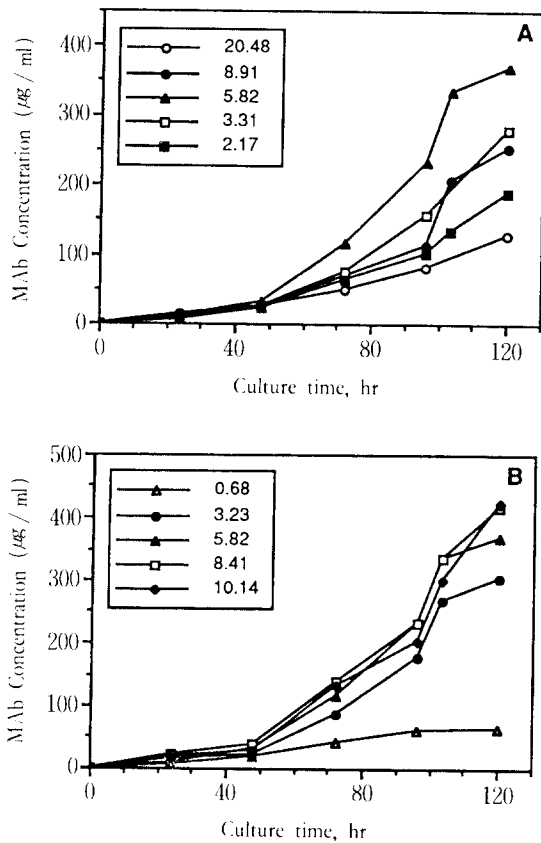


Fig. 3. Comparison of anti-HBsAg MAb production of 2c3.1 cells at various glucose / glutamine ratios in enriched medium: A) fixed glucose concentration at 28.06 mM: symbols show glucose / glutamine molar ratios, B) fixed glutamine concentration at 4.82 mM: symbols show glucose / glutamine molar ratios.

### 참 고 문 헌

1. Y. T. Luan, R. Mutharasan and W. E. Magee (1987), *Biotechnol. Lett.*, **9**, 535.
2. Y. T. Luan, R. Mutharasan and W. E. Magee (1987), *Biotechnol. Lett.*, **9**, 691.
3. H. A. Phillips, J. M. Scharer, N. C. Bols and M. Moo Young (1987), *Biotechnol. Lett.*, **9**, 745.
4. W. J. Long, A. Palombo, T. L. Schofield and E. A.

- Emini (1988), *Hybridoma*, **7**, 69.
5. G. M. Lee, T. K. Huard, and B. O. Palsson (1989), *Hybridoma*, **8**, 369.
6. G. M. Lee, J. M. Savinell and B. O. Palsson (1989), *Hybridoma*, **8**, 639.
7. S. Reuveny, D. Velez, J. D. Macmillan and L. Miller (1986), *J. Immunol. Methods*, **86**, 53.
8. L. J. Reitzer, B. M. Wice and D. Kennell (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 2669.
9. H. R. Zielke, C. L. Zielke and P. T. Ozand (1984), *Fed. Proc.*, **43**, 121.
10. Y. Takazawa, M. Tokashiki, H. Murakami, K. Yamada and H. Omura (1988), *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 168.
11. A. H. Heifetz, J. A. Braatz, R. A. Wolfe, R. M. Barry, D. A. Miller and B. H. Solomon (1989), *BioTechniques*, **7**, 192.
12. G. J. MacMichael (1989), *Hybridoma*, **8**, 117.
13. Y. Shirai and K. Hashimoto (1989), *J. Ferment. Bioeng.*, **68**, 264.
14. 전복환, 조의철, 김동일, 백승복(1990), *한국산업미생물학회지*, **18**, 175.
15. 전복환, 조의철, 김동일, 백승복(1990), *한국생물공학회지*, **4**, 271.
16. E. C. Jo, H.-J. Park, J.-M. Park and K.-H. Kim (1990), *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 717.
17. P. Lund(1985), *Methods of Enzymatic Analysis* (L. Bergmeyer, ed.), Vol. **3**, 357, 3rd ed. V. C. H., Weinheim.
18. Sigma Chem. Co. (1984), Sigma Diagnostics, *Lactate Procedure* No. 826-UV.
19. S. S. Ozturk and B. O. Palsson (1990), *Biotechnol. Prog.*, **6**, 121.
20. A. Lin. and P. Agrawal (1988), *Biotechnol. Lett.*, **10**, 695.
21. M. Dalili, G. D. Sayles and D. F. Ollis (1990), *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 74.

(Received; November 29, 1990, Accepted; December 27, 1990)