

재조합 *Saccharomyces cerevisiae*의 Invertase 발현에 미치는 아미노산과 용존산소의 영향

신해헌 · 조정섭 · 박혜영 · 변유량*
연세대학교 식품공학과

Effect of Amino Acids and Dissolved Oxygen on Expression of Invertase in Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*

Shin, Hae-Hun, Jeong-Sub Cho, Hei-Young Park and Yu-Ryang Pyun*
Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

Abstract — In order to improve the productivity of invertase by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing SUC2 gene, the effect of amino acids and dissolved oxygen concentration on the gene expression was investigated. Optimal concentrations of leucine and histidine for cell growth and cloned gene expression were 0.03 g/g and 0.04 g/g, respectively, expressed as the ratio of amino acid/glucose. The lack or excess of leucine and histidine has inhibitory effect on cell growth and invertase expression. In batch culture, the less aeration was, the higher invertase activity was. In continuous culture at a dilution rate of 0.09 h^{-1} with controlled dissolved oxygen tension, invertase activity increased dramatically at DOT levels below 5% air saturation, and a maximum activity of 215.54 KU/g cell was obtained under unaerated condition.

최근 유전자 조작기술이 발전함에 따라 재조합 미생물을 이용하여 의학적으로 중요한 단백질 및 화합물과 기존의 발효법에 의하여 생산되던 효소, 항생제, 아미노산 등의 유용한 유전자 산물을 생산하고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있다(1). 재조합 미생물을 이용하여 유용산물을 경제적으로 생산하기 위해서는 발효수율과 목적하는 유전자 산물의 생산성을 극대화시켜야 하며, 이를 위하여 생체 촉매인 균체농도를 가능한 높일 수 있는 고농도 배양과 환경 인자의 조절로 유전자 발현을 원하는 시기에 최대로 발현시킬 수 있는 연구가 필수적이다.

효모의 SUC2 gene은 invertase의 구조유전자로서 유전자산물의 공업적 생산을 위한 재조합 플라스미드의 제조에 널리 이용되고 있다(2). SUC2 promoter의 발현은 배지중 포도당 농도에 의하여 조절을 받아 고농도에서는 발현이 억제되나 저농도에서는 해제되어 invertase 활성이 현저히 증가된다(3). 정

(4)과 Jang(5)의 보고에 의하면 호기적인 조건에서 보다 혐기적인 조건에서 invertase 비활성이 더 높게 나타나 SUC2 gene의 발현은 포도당 농도 이외에도 용존산소농도에 의해서도 현저히 영향을 받는다.

한편 재조합 미생물의 고농도 배양을 위해서는 balanced nutrient medium의 설계가 중요하다(6). Balanced nutrient medium은 균체생육에 필요한 모든 성분을 함유하고 있어서 부주의에 의해 어떤 영양성분의 결핍으로 생육과 목적 생산물의 생산이 제한받지 않도록 하기 위한 것이다. 특히 고농도 배양의 경우에는 균체농도가 높기 때문에 배지 성분의 일부가 부족되기 쉬우며, 재조합 균주의 경우 배지 성분이 유전자 발현에 영향을 미치므로 주의깊게 배지 조성을 설계하지 않으면 안된다.

본 연구에서 모델균주로 사용한 *S. cerevisiae* SEY 2102는 leucine과 histidine 영양요구성 균주이므로 사용하는 기질량에 따라 적정 농도를 첨가해주는 것이 매우 중요하다. 따라서 다른 영양원은 충분한 양을 첨가하고 균체생육과 invertase 발현에 미치는 leucine과 histidine 농도 및 용존산소의 영향을 각각

Key words: SUC2 gene, *Saccharomyces cerevisiae*, dissolved oxygen effect, amino acid effect

*Corresponding author

검토하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 플라스미드

본 연구에서 사용한 균주는 chromosomal DNA의 SUC2 gene을 제거시킨(*suc2-Δ9*) *Saccharomyces cerevisiae* SEY 2102(MAT α , *ura* 3-52, *leu* 2-3, -112 *his* 4-519, *sup-am*)를 숙주로 사용하고 amber mutation된 invertase 구조 유전자 SUC2를 yeast shuttle vector YEp24에 재조합시킨 pRB58을 vector로 사용하였다(2).

배지

본 실험에 사용한 선택배지는 포도당 이외에 1l당 YNB 6.56g, succinic acid 10g, NaOH 6g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g 및 leucine과 histidine을 함유하고 있다. 비선택배지는 상술한 선택배지에 uracil 30 mg/l를 첨가하여 사용하였다.

배양방법

접종균의 농도 및 생리적 상태를 동일하게 유지하기 위하여 모든 실험에서 접종균은 48시간 배양한 사면배지로부터 5백금이를 2% glucose를 포함하는 100 ml 선택배지가 든 500 ml 삼각 플라스크에 접종한 후 30°C에서 배양하였다. Invertase activity가 나타나지 않는 대수 증식기의 중간이 되는 21시간 배양한 후 60 ml를 취하여 원심분리하여 상등액을 제거하고, 살균 생리식염수로 3번 세척하여 전배양액의 포도당을 제거한 후 약 10.4 mg/6 ml 정도되도록 재현탁한 후 모든 실험의 접종량으로 사용하였다. 회분 및 연속 배양은 2l jar fermentor(Marubishi Co., Model MD-250)에서 working volume 1l, 배양온도 30°C, pH 5.4, 교반속도 300 rpm에서 행하였다.

분석방법

균체량은 비탁법에 의하여 spectrophotometer (Shimadzu Co.)로 640 nm에서 측정된 후 미리 작성하여 둔 검량곡선으로부터 건조 균체량을 구하였다. Glucose의 정량은 2365 glucose membrane kit이 내장된 Yellow Spring Instrument(YSI; Model 27)을 사용하여 측정하였다. Ethanol의 정량은 gas chromatography(Varian 1440)과 2386 alcohol membrane kit을 내장한 YSI로 측정하였다.

Invertase 활성측정

배양액 2 ml를 4,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 균체를 회수한 후 증류수로 세척하였다. 세척균체를 적당히 희석한 후 1.5 ml에 pH 4.7의 acetate buffer 0.5 ml를 혼합한 후 30°C water bath에서 10% sucrose 용액(w/v) 1 ml를 넣고 3분간 반응시킨 다음 DNS 시약 1.5 ml를 첨가하여 끓는 물속에서 5분간 반응시킨 후 흐르는 물에 냉각시킨 다음 증류수 10 ml를 혼합한 뒤 540 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선에 의하여 invertase activity로 환산하였다. Invertase activity 1 unit는 30°C, pH 4.7에서 10% sucrose와 3분간 반응하여 생성된 1 μmol 의 glucose로 정의하였다.

결과 및 고찰

Leucine 첨가량에 의한 영향

Leucine 첨가량이 균체생육과 invertase의 발현에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 포도당을 10 g/l 첨가한 배지에 leucine 농도를 0, 0.03, 0.15, 0.3, 0.6 및 1.5 g/l로 각각 첨가한 배지에서 플라스크배양하였다. Histidine에 의한 영향을 배제하기 위하여 모든 배지에 0.3 g/l로 충분히 넣어주었다. Fig. 1에서 leucine 농도에 따른 균체생육을 살펴보면 leucine을 첨가하지 않은 경우 균체가 전혀 생육을 하지 못하였

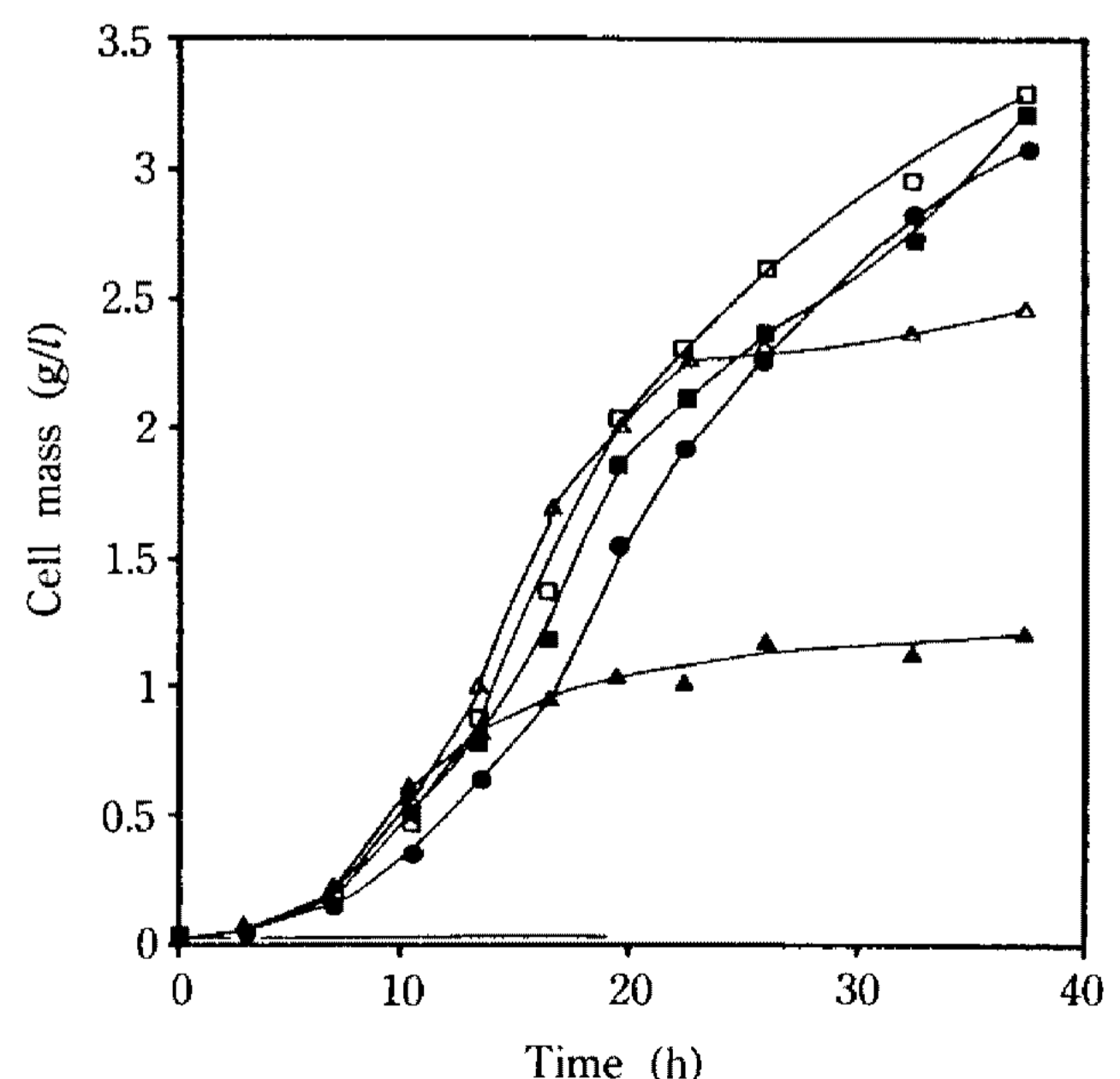


Fig. 1. Effect of leucine concentration on the growth of recombinant *S. cerevisiae*.

Leucine concentration (g/l); —: 0, ▲: 0.03, △: 0.15, □: 0.3, ■: 0.6, ●: 1.5

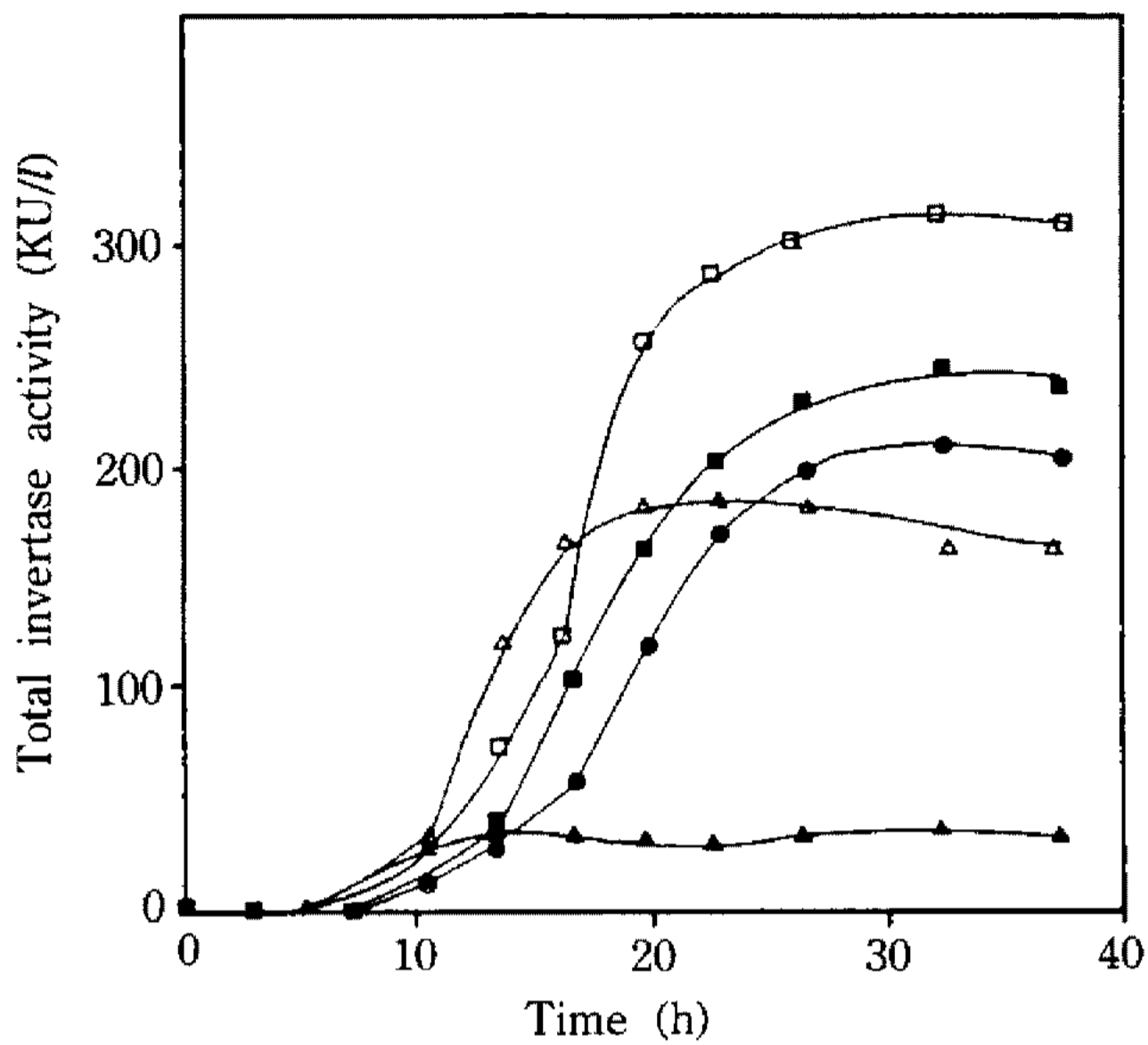


Fig. 2. Effect of leucine concentration on total invertase activity of recombinant *S. cerevisiae*.
Leucine concentration (g/l); ▲: 0.03, △: 0.15, □: 0.3, ■: 0.6, ●: 1.5

으며, 0.03 및 0.15 g/l를 첨가한 경우는 leucine이 제한기질로 작용하여 포도당이 상당량 남아있는 배양도중에 생육이 정지되었다. Leucine 0.3 g/l 이상을 첨가한 배지에서는 계속 생육하여 포도당을 완전히 소비한 후 배양액에 축적된 에탄올을 자화한 후 정지기에 도달하였으며 균체량은 모두 비슷하였다.

한편, leucine 첨가량이 invertase 총활성에 미치는 영향은 Fig. 2에 비교하였다. leucine 0.03 및 0.15 g/l를 함유한 배지에 배양한 경우 총활성이 낮았고, leucine 0.3 g/l를 첨가한 배양의 총활성이 가장 높게 나오므로 invertase의 발현에 가장 적합함을 알 수 있다. 그러나 균체생육의 경우와는 달리 leucine 0.6 g/l 이상 과량 첨가된 경우 invertase 활성이 오히려 저하되는 경향을 나타내었다. 이와같은 결과로 미루어 볼 때 leucine의 첨가량이 부족하거나 과다하게 되면 invertase 발현에 큰 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다.

전술한 포도당 10 g/l 배지에서 최적 leucine 농도는 0.3 g/l였으므로 단위 포도당을 기준으로 leucine 요구량은 0.03 g leucine/g glucose이다. 이와같은 leucine 요구량이 당 농도를 달리했을 때에도 성립되는지 여부와 leucine/glucose 비율이 균체생육과 invertase 활성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 배지중 포도당 농도를 각기 달리하여 leucine 첨가량의 영향을 살펴보았다. 각 포도당 농도에서 균체생육과 invertase 비활성에 미치는 leucine 농도의 영향을 Fig. 3에 나

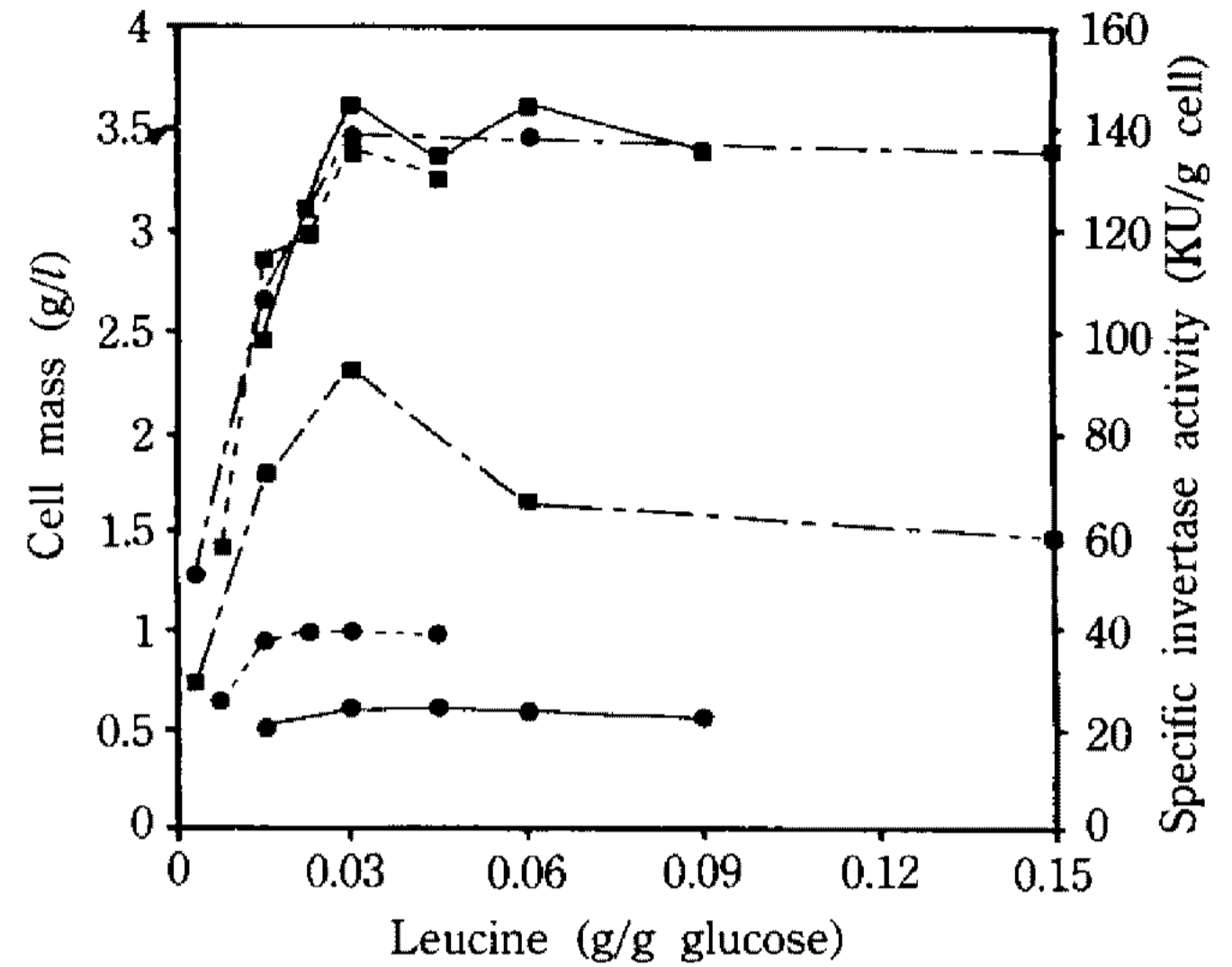


Fig. 3. Effect of leucine/glucose on the growth and specific invertase activity of recombinant *S. cerevisiae*.

● : cell mass ■ : specific activity
— : 1g glucose/l — : 1g glucose/l
--- : 2g glucose/l --- : 2g glucose/l
- - - : 10g glucose/l - - - : 10g glucose/l

타내었으며 이때 균체량과 비활성 값은 각 배양에서의 최고값을 취하였다. Fig. 3를 살펴보면 균체 농도는 포도당 농도에 따라 절대량은 차이가 있으나 각 포도당 농도에서 0.03 g leucine/g glucose로 배지에 첨가되었을 때 최대가 되었으며 그 이상 과량 첨가에서는 거의 영향을 받지 않고 일정하였다. 한편 invertase 비활성은 1 g/l 및 2 g/l 포도당 배지에서는 농도에 관계없이 일정한 경향으로 절대값의 크기는 다르지만 0.03 g leucine/g glucose에서 최대 활성을 나타내었다. 포도당 10 g/l 배지에서는 포도당 저해로 전반적으로 invertase 비활성이 저농도의 포도당 배지에서보다 낮았으나 역시 0.03 g leucine/g glucose에서 최대 활성을 나타내었고 그 이상의 농도에서는 약간 감소하였다.

Histidine 첨가량에 의한 영향

Leucine의 최적 농도는 앞서 실험에서 leucine 0.03 g/g glucose로 밝혀졌으므로 포도당 1 g/l 배지에 leucine 0.03 g/l를 첨가하고 histidine 농도를 0, 0.01, 0.02, 0.04 및 0.1 g/l로 각각 첨가한 배지에 플라스크 배양하여 histidine의 첨가량이 균체생육과 invertase 발현에 미치는 영향을 살펴보았다. Fig. 4에서 살펴보면 histidine을 첨가하지 않은 경우에는 균체가 생육하지 못하였으나 leucine을 첨가하지 않았을 때보다는 많이 생육된 것으로 보아서 균체생육에 leucine이

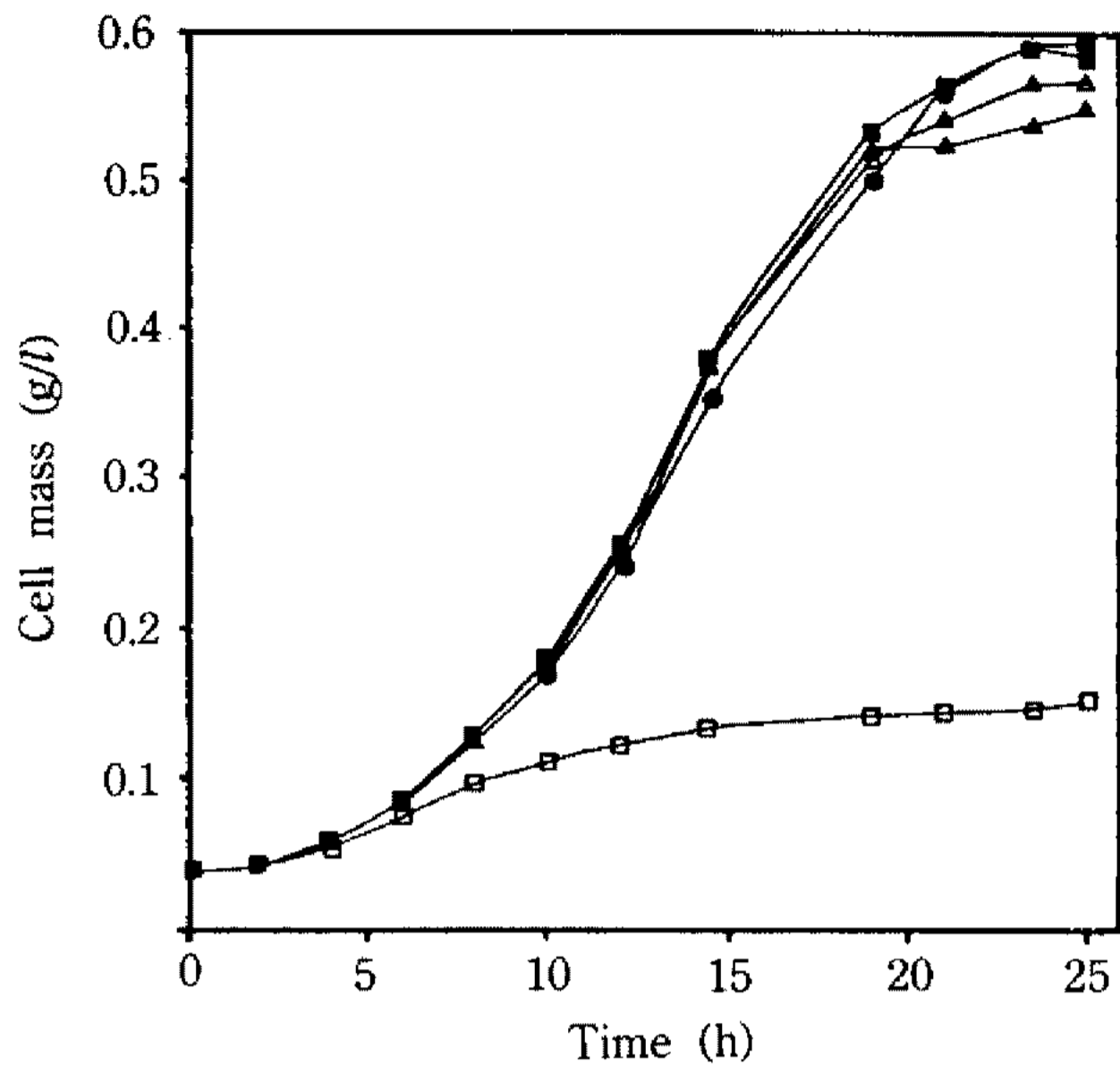


Fig. 4. Effect of histidine concentration on the growth of recombinant *S. cerevisiae*.

Histidine concentration (g/l); □: 0, ▲: 0.01, △: 0.02, ■: 0.04, ●: 0.1

영향이 더 큰 것으로 판단되었다. Histidine 0.01 g/l 이상 첨가한 경우들은 모두 우수한 생육을 나타내었다.

Invertase 활성에 미치는 영향을 Fig. 5에서 살펴 보면 histidine을 0.01 g/g glucose 이상 첨가한 경우 모두 총활성이 우수하였으나, 0.04 g/g glucose를 함유한 배지에 배양했을 때 최고의 총활성을 나타내었으며 그 이상의 농도에서는 증가되지 않았다. 따라서 histidine 0.04 g/g glucose를 첨가했을 때 균체 생육 및 invertase 발현에 가장 적합한 것으로 생각되었다. 재조합 *E. coli*의 아미노산 영향에서도 아미노산의 과다한 첨가는 균체생육과 생산물인 β -IPM dehydrogenase의 발현에도 저해효과를 나타냈고 그 중에서도 특히 leucine의 영향이 가장 큰 것으로 보고되었다 (6).

이상의 실험으로 균체의 생육과 invertase 발현에 leucine의 최적 농도는 0.03 g/g glucose이고 histidine의 경우 0.04 g/g glucose인 것으로 판단되었고, 앞으로의 모든 실험에 적용하였다.

회분배양에서 통기량의 영향

통기량이 재조합 효모의 생육과 invertase 발현에 미치는 영향을 검토하기 위하여 2l jar fermentor에서 working volume 1l로 하고 초기 포도당 농도 1 g/l인 조건에서 통기량을 0~0.6 vvm으로 변화시키면서 균

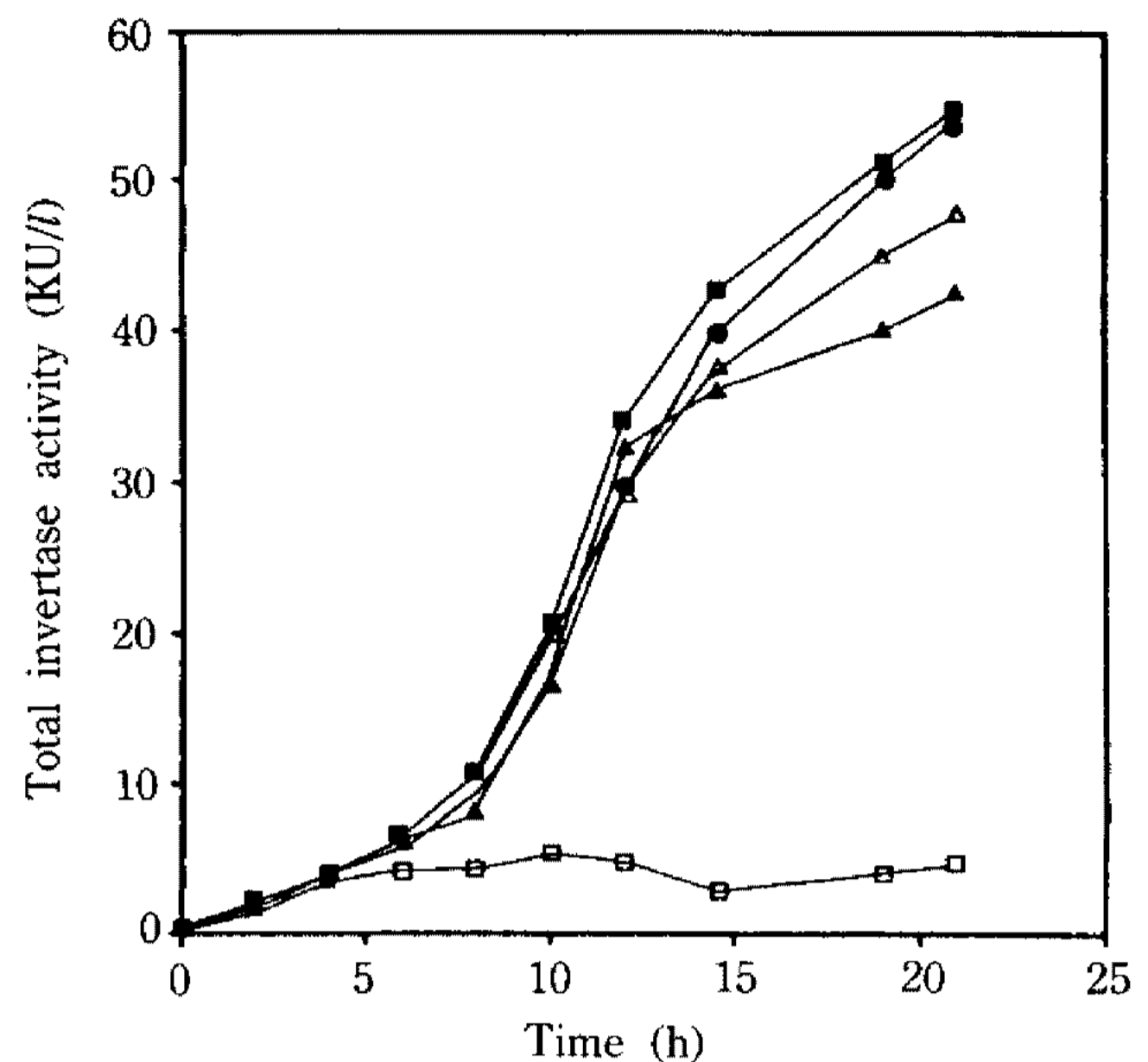


Fig. 5. Effect of histidine concentration on total invertase activity of recombinant *S. cerevisiae*.

Histidine concentration (g/l); □: 0, ▲: 0.01, △: 0.02, ■: 0.04, ●: 0.1

체생육과 포도당 소비, 에탄올의 생성양상을 측정하였다. 이때 교반속도는 호기적 조건에서는 600 rpm, 비호기적 조건에서는 300 rpm으로 하였다. 각 통기 조건에서 모두 전보(4)에서와 같이 발효 초기에 배양액에 에탄올이 축적되었으며, 포도당이 고갈되는 10 시간 때부터 축적된 에탄올을 자화하여 균체가 계속 증식하는 biphasic growth 현상을 보였다.

본 실험에 사용한 재조합 효모의 비증식 속도는 통기량에 따라 큰 영향을 받지 않고 $0.206 \sim 0.286 \text{ h}^{-1}$ 의 범위였다. 일반적으로 숙주로 사용된 *Saccharomyces cerevisiae*는 포도당을 기질로 한 경우 $0.4 \sim 0.45 \text{ h}^{-1}$ 의 비증식 속도를 갖는다고 보고하고 있다(7). 한편 에탄올을 기질로 하여 생육하는 배양후기의 비증식 속도(μ_A)값은 $0.030 \sim 0.063 \text{ h}^{-1}$ 의 낮은 값을 보였으며, 통기량이 감소할수록 μ_A 값은 약간씩 증가하는 경향을 보였다.

각 통기량에 따른 invertase 비활성을 Table 1에서 비교하면, 통기량이 감소할수록 invertase 비활성은 증가하여 공기를 공급하지 않은 비통기 조건일 때 119.45 KU/g cell로 최대값을 보였으며 0.6 vvm에 비해 1.47배 증가된 결과이다. 한편 최종 균체량은 통기량이 감소할수록 서서히 감소하였으나 비활성의 증가로 총활성은 0.1 vvm까지 증가되었으며, 0.1 vvm과 0 vvm에서는 거의 차이가 없었다.

Table 1. Invertase activity of recombinant *S. cerevisiae* under various aeration conditions

Aeration (vvm)	X (g/l)	E (KU/l)	E/X (KU/g cell)
0.0	0.460	55.92	119.45
0.1	0.505	55.88	108.49
0.2	0.553	47.00	88.19
0.6	0.560	48.68	81.11

X=dry cell weight
E=total invertase activity
E/X=specific invertase activity

Table 2. Steady state data of chemostat culture of recombinant *S. cerevisiae* under various dissolved oxygen tension (DOT)

	DOT (%)				
	0	0.8	4.8	22.4	51.8
X(g/l)	1.393	1.478	1.647	2.066	2.184
E(KU/l)	450.38	285.67	181.92	71.33	62.55
E/X(KU/g cell)	215.54	128.85	73.64	23.02	19.09
Glucose (g/l)	0.14	0.54	0.14	0.68	1.49
Ethanol (g/l)	3.44	2.65	2.13	1.61	0.73
$Y_{X/S}$	0.141	0.156	0.167	0.222	0.257
$Y_{A/S}$	0.349	0.280	0.216	0.164	0.086

X=dry cell weight
E=total invertase activity
E/X=specific invertase activity
 $Y_{X/S}$ =growth yield
 $Y_{A/S}$ =ethanol yield

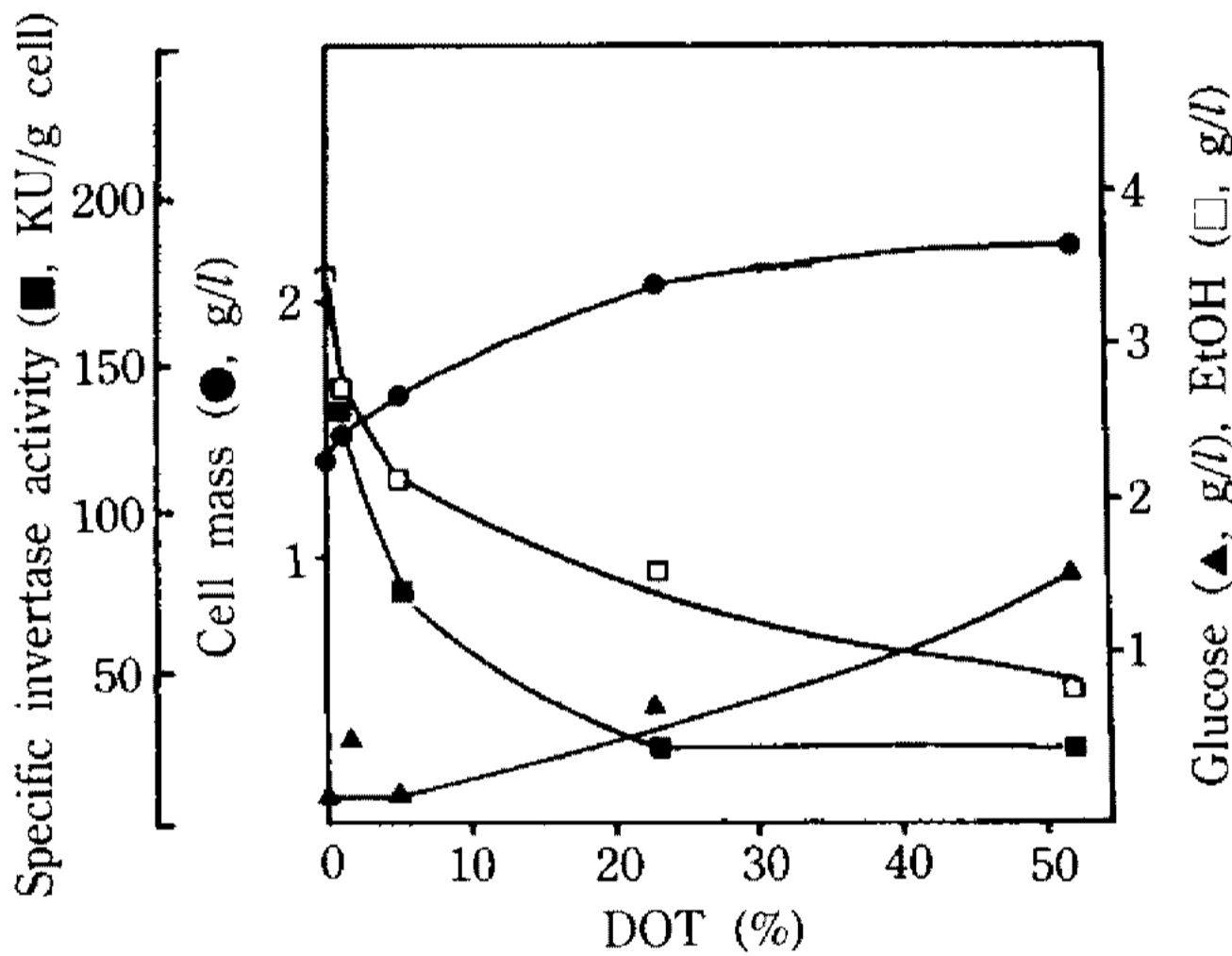


Fig. 6. Effect of DOT on steady state enzyme activity in chemostat culture ($S_0=10$ g/l, $D=0.09$ h⁻¹).

용존산소 제어에 의한 연속배양

회분배양 결과 통기량이 감소할수록 유전자 발현이 증대되는 현상이 관찰되었으므로 invertase 유전자 발현에 미치는 용존산소농도(dissolved oxygen tension, DOT)의 효과를 자세히 검토하기 위하여 포도당을 제한기질로 하여 용존산소농도를 조절하면서 연속배양 실험을 하였다. 선택배지의 초기 포도당 농도 10 g/l, 희석율 0.09 h⁻¹인 조건에서 통기량과 교반속도를 조절하여 DOT가 일정하게 유지되도록 조절하였으며 각 DOT에서 정상상태의 배양결과를 Fig.6 및 Table 2에 나타내었다.

균체수율은 용존산소농도 20%까지는 0.20~0.26 범위로 거의 일정하였으나 그 이하에서는 급격히 감소하였으며, 에탄올 생산량은 현저히 증가하는 경향을 나타내었다. 한편 invertase 활성은 용존산소농도 20% 정도까지는 약 20 KU/g cell로 낮은 활성을 보였지만 5% 이하의 용존산소농도에서는 급격히 증가하여 0%

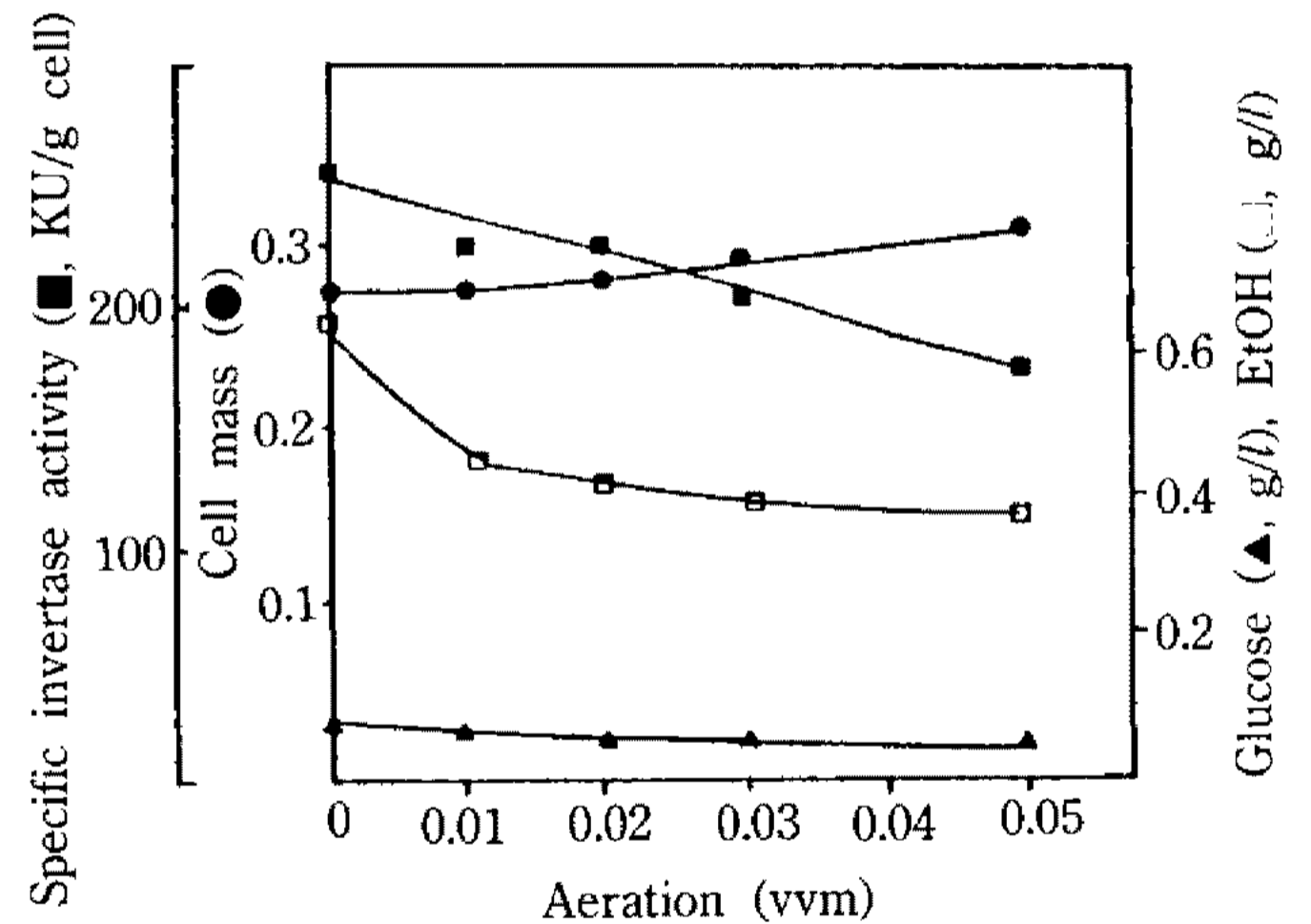


Fig. 7. Chemostat culture of recombinant *S. cerevisiae* under microaerobic conditions ($S_0=2$ g/l, $D=0.2$ h⁻¹, 0% DOT).

DOT에서는 215.54 KU/g cell로 약 10배 증가된 결과를 보였다.

전반적으로 정상상태에서 잔존 포도당의 농도가 약간 높으며 특히 용존산소농도 20% 이상에서는 잔존 포도당 농도가 0.68 g/l 이상으로 나타나 용존산소의 영향 이외에 glucose repression을 일부 받기 때문에 이중효과에 의하여 invertase 활성이 아주 낮게 나타난 것으로 생각된다.

용존산소농도에 따른 연속배양 결과 낮은 용존산소농도 부근에서 invertase 활성이 높은 것이 확인되었다. 그러나 세포의 활성을 유지하기 위하여 미량의 통기가 필요할 것으로 생각되어 아주 낮은 통

Table 3. Steady state data of chemostat culture of recombinant *S. cerevisiae* under microaerobic condition

	Aeration (vvm)				
	0	0.01	0.02	0.03	0.05
X(g/l)	0.272	0.270	0.280	0.291	0.309
E(KU/l)	105.74	90.08	93.41	88.35	79.75
E/X(KU/g cell)	259.16	222.41	222.40	202.42	172.07
Glucose (g/l)	0.078	0.074	0.054	0.049	0.051
Ethanol (g/l)	0.650	0.444	0.433	0.400	0.329
Stability (%)	99	99	99	100	99
$Y_{X/S}$	0.142	0.141	0.144	0.149	0.158
$Y_{A/S}$	0.066	0.045	0.044	0.020	0.016

X=dry cell weight

E=total invertase activity

E/X=specific invertase activity

$Y_{X/S}$ =growth yield

$Y_{A/S}$ =ethanol yield

기량 부근에서 유전자 발현정도를 검토하였다. 초기 포도당 농도 2 g/l, 희석율 0.2 h⁻¹, 교반속도 200 rpm으로 고정시키고 통기량을 0.0~0.05 vvm으로 변화시키면서 연속배양하였다. 이와같이 낮은 통기량에서는 산소공급이 부족한 상태이므로 용존산소 계기상의 용존산소농도는 0%를 유지하였으며 각 정상상태에서의 균체, invertase 활성 등을 Fig. 7과 Table 3에 나타내었다.

균체농도는 통기량이 감소함에 따라 약간 감소하는 경향이었으며 0.02 vvm 이하에서는 거의 일정하였다. 잔존 포도당 농도는 통기량에 큰 영향을 받지 않고 0.078에서 0.051 g/l로 낮은 값을 보였다. 에탄올은 0.01 vvm까지는 0.4 g/l 범위로 큰 변화가 없었으나 0 vvm에서는 0.650 g/l로 급격히 증가하는 현상을 나타내었다. 한편 invertase 비활성은 통기량이 감소함에 따라 거의 직선적으로 증가하여 0 vvm에서 259.16 KU/g cell로 가장 높은 활성을 보였다.

효모에 대한 에탄올 발효에서는 혐기적 상태보다 미량의 산소를 소량공급하는 것이 일반적으로 cell viability와 에탄올 생산에 더욱 효과적인 것으로 보고있다(8). Porro 등(9)은 *Saccharomyces cerevisiae*의 β -galactosidase 생산에 관한 DOT의 영향을 알아보았으며, Chen 등(10)도 *Azotobacter vinelandii*와 *E. coli*의 critical oxygen concentration은 매우 낮은 0.35 \pm 0.03 mg/l, 0.12 \pm 0.03 mg/l이라고 보고하고 있다.

이와같은 보고와는 달리 미량의 공기를 공급하는

것보다 공기를 전혀 공급하지 않은 상태에서 invertase 활성이 가장 높아 SUC2에 있어 invertase 발현에 미치는 용존산소의 영향에 대해서는 좀더 깊이 검토하여야 할 것으로 생각된다.

요 약

SUC2 유전자를 가진 재조합 *Saccharomyces cerevisiae*의 invertase 생산성을 향상시키기 위하여 균체 생육과 유전자 발현에 미치는 아미노산과 용존산소 농도의 영향을 연구하였다. 균체생육과 invertase 발현에 적합한 leucine과 histidine의 최적 첨가량은 탄소원인 포도당에 대한 비율로서 나타내어 0.03 g/g glucose와 0.04 g/g glucose였다. 희분배양에서는 통기량이 적을수록 invertase 비활성이 증가하였다. 희석율 0.09 h⁻¹에서 용존산소농도를 조절한 연속배양에서는 용존산소농도가 감소함에 따라 유전자 발현이 잘되어 5% 포화 이하일때 invertase 비활성이 급격히 증가하여 통기를 하지 않은 조건에서 215.54 KU/g cell의 최고 비활성을 얻었다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단의 90년도 목적기초 연구비 지원에 의하여 수행된 연구의 일부이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 김정희. 1985. 유전자 재조합 미생물의 대량 배양에 관련된 발효기술. 식품과학 18(1): 12-19.
2. Emr, S.D., R. Schekman, M.C. Flessel and J. Thorner. 1983. An MFa2-SUC2(α -factor-invertase) gene fusion for study of protein localization and gene expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 7080-7084.
3. Carlson, M. and D. Bostein. 1982. Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. *Cell* 28: 145-154.
4. 정상철, 장재권, 김인규, 변유량. 1989. SUC2 gene을 갖는 재조합 *Saccharomyces cerevisiae*의 invertase 발현특성. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 17: 263-268.
5. Jang, J.K., Y.R. Pyun, R.K. Shin and J.H. Seo. 1990. Analysis of cloned SUC2 gene expression

- in continuous culture of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. Bioeng.* **36**: 960-964.
6. Mizutani, S., H. Mori, S. Shimizu, K. Sakaguchi, and T. Kobayashi. 1986. Effect of amino acid supplement on cell yield and gene product in *Escherichia coli* harboring plasmid. *Biotech. Bioeng.* **28**: 204-209.
 7. Bijkert, A.H.E. and R.J. Hall. 1977. A mechanistic model of the aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. Bioeng.* **19**: 267-296.
 8. Ryu, D.D., Y.J. Kim and J.H. Kim. 1984. Effect of air supplement on the performance of continuous ethanol fermentation system. *Biotech. Bioeng.* **26**: 12-16.
 9. Porro, D., E. Martegani, B.M. Ranzi and L. Alberghina. 1991. Heterologous gene expression in continuous cultures of budding yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 632-636.
 10. Chen, J., A.L. Tannahill and M.L. Shuler. 1985. Design of system for the control of low dissolved oxygen concentrations: critical oxygen concentrations for *Azotobacter vineiandii* and *Escherichia coli*. *Biotech. Bioeng.* **27**: 151-155.

(Received March 16, 1992)