

Bacillus amyloliquefaciens 성장과 α -amylase 생합성에 미치는 저해제의 영향

*김 종 균 · **김 종 수 · †차 월 석

조선대학교 공과대학 화학공학과 · *이리농공전문대학 식품공업과
**이리농공전문대학 화학공업과

Effects of Concentration of Inhibitor on the Production of α -amylase and Growth of *Bacillus amyloliquefaciens*

Chong-Kyun Kim*, Jong-Soo Kim**, and Wol-Suk Cha†

Dept. of Chemical Engineering, Chosun University, Kwangju 501-709, Korea

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

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

ABSTRACT

In this study, *Bacillus amyloliquefaciens* was adopted as bacterial source to investigate the concentration of carbon source by adding inhibitors in the batch culture. By adding acetic acid at 10g/ℓ of initial glucose concentration, maximum dry cell density was obtained with the highest value of 3.9g/ℓ at 1.0g/ℓ of initial acetic acid concentration. By adding acetic acid at 10g/ℓ of initial glucose concentration, maximum α -amylase production was obtained with 331.55unit/ml at 2.0g/ℓ of initial acetic acid concentration. α -Amylase production was decreased with the increase of initial acetic acid concentration. By adding acetic acid to the medium, cell growth and α -amylase production was higher in glucose than in maltose. By adding lactic acid to the medium, cell growth was decreased.

서 론

*Bacteria*류인 *Bacillus*는 그람 양성균의 특성을 갖고 있기 때문에 효소를 생산하여 세포 밖으로 분비하는 특성이 있어 최근 α -amylase, protease, α -galactosidase 등의 효소 및 치료제 목적의 재조합 단백질의 생산에 많이 이용되고 있다(1). *Bacillus sp.*들의 탄수화물 대사과정에서 생성되는 부산물들이

여러 가지로 생성된다. 이러한 부산물들 중 acetic acid가 세포성장의 저해제로 작용한다고 알려져 있다. Yoo등(1)은 acetate, lactate, propionate가 저해성을 갖는다고 제시했고, Zyle등(2)은 acetic acid와 ethanol저해농도를 제시하였고, Pampulha등(3)은 acetic acid는 독소 작용 물질로 배양을 억제한다고 했다.

Narimasa등(4)은 *B. licheniformis*내에 α -amylase 생성 영향에서 합성을 규정하는 인자로서는 이 화학적 생성물 억제, 온도, 유도, glucose의 첨가와

† Corresponding Author

낮은 분자량의 신진 대사에 필요한 물질이 첨가되면 억제된다고 하였으며, cyclic adenosine 3,5-mono-phosphate (cAMP) 첨가는 배양물이 자랄때 α -amylase 생성을 활발하게 한다고 했으며, 유전적 기원에 따라 돌연변이된 유전자들은 α -amylase 합성을 다양하게 한다고 하였다.

또한 Chandra 등(5)은 *B. licheniformis*에 의한 세포질 밖의 내열성 α -amylase 생성에서 α -amylase 생성최적조건은 pH 6.5, 온도 48°C 이고, 아미노산과 비타민의 사용으로 효소 생산을 증가시켰으며, phosphate과 galactose도 효소생성에 좋은 효과를 주고, Na⁺ 등 금속 이온들은 α -amylase 생성에 억제 작용을 하며, 계면활성제는 효소를 방출하는데 효과가 있다고 했다. Vega 등(6)은 배양액에 acetic acid를 첨가하여 세포가 과다하게 자라는 것을 방지할 수 있는 고정화 반응기에 대하여 보고 하였다. Pampulha 등(7)에 의하면 *S. cerevisiae* 성장에 미치는 acetic acid와 ethanol의 영향에 관한 연구를 하였다. 이들에 의하면 ethanol 존재하에서 acetic acid는 *S. cerevisiae*의 배양에 해롭다고 보고 하였다. Viegas 등(8)은 *S. cerevisiae*와 *Kluyveromyces marxianus*를 이용한 에탄올 배양에서 부산물로 생성되는 octanoic acid와 decanoic acid에 의한 세포성장의 저해작용에 관하여 보고 하였는데 세포성장의 저해효과에 있어서 decanoic acid의 경우 octanoic acid의 경우보다 더 심하게 나타났다. 또한 *E. coli*의 경우에는 배양 도중 acetate가 축적되고 이 acetate에 의하여 *E. coli*의 농도를 증가시킬 수 있는 배양 방법이 보고 되었다(9). 최근 재조합된 *E. coli* 등 미생물들의 고농도 세포 배양에 관한 연구가 진행되고 있는데, Lee 등(10)은 연속 배양 세포막에서 penicilline acylase를 생산하는 재조합 *E. coli*의 고농도 세포 배양시 cell 성장의 저해제로서는 acetic acid이지만 건조 세포밀도를 145g/l 까지 증가시켰다.

이상과 같이 효모와 대장균의 성장에 저해제가 미치는 영향을 검토한 정도가 비교적 적은 편이고 특히 *Bacillus*류에 대해서는 매우 미비하므로 탄소원으로서 maltose, glucose를 이용한 기질에서 저해제로서 acetic acid를 사용하여 생성물과 세포 성장에 미치는 영향을 검토한다.

실험재료 및 방법

균주

본 실험에 사용된 균주는 한국과학기술원 부설 유

Table 1. Composition of the media used throughout the study

| Agar medium(g/l) | Growth medium(g/l) | Production medium(g/l) |
|--------------------|--|--|
| Nutrient agar 23.5 | Glucose 10.0 | Carbon source 10.0 |
| | Yeast extract 1.0 | Yeast extract 1.0 |
| | K ₂ HPO ₄ 0.1 | K ₂ HPO ₄ 0.1 |
| | NH ₄ H ₂ PO ₄ 0.1 | NH ₄ H ₂ PO ₄ 0.1 |
| | Sodium citrate 0.5 | Sodium citrate 0.5 |
| | MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 | MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 |
| | CaCl ₂ 0.1 | CaCl ₂ 0.1 |
| | FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.1 | FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.1 |
| | MnSO ₄ ·H ₂ O 0.1 | MnSO ₄ ·H ₂ O 0.1 |

*pH=7.0

전공학센터에 있는 균주보관기관으로부터 분양 받은 *Bacillus amyloliquefaciens*(ATCC 23350)를 사용하였으며, nutrient agar 배지를 사용한 agar slant 상에서 4°C의 냉장고에 보관하여 사용하였고, 1개월마다 1회씩 계대 배양 하였다.

배지 및 배양

균체의 배양에 사용된 표준배지의 조성은 Table 1과 같으며 탄소원으로는 glucose를 사용하였고 포자 상태인 균주의 발아를 돕기위하여 유기질소원으로 yeast extract를 사용하였다.

질소원과 탄소원은 고농도에서 갈색반응을 일으켜 미생물의 성장을 저해하고 또한 고농도의 인산염은 금속염들과 침전을 형성하므로 glucose와 yeast extract, NH₄H₂PO₄를 서로 분리하여 250ml용량 삼각 플라스크에 200ml을 취한 후 121°C, 15psig, 30min간 멸균한 뒤 clean bench내에서 충분히 식힌 후에 nutrient agar slant에서 보관한 *Bacillus amyloliquefaciens* 1백균이를 접종하여 shaking incubator에서 37°C, 170rpm으로 48시간 배양후 4°C 냉장고로 옮겨 보관하여 사용하였다.

배지에 사용된 시약은 maltose, glucose, yeast extract는 Difco Co.를 K₂HPO₄, NH₄H₂PO₄, sodium citrate, MgSO₄·7H₂O, CaCl₂, FeSO₄·7H₂O, MnSO₄·H₂O 등은 Junsei Co.의 것을 사용하였다.

회분식 배양

5L Jar Fermentor(한국발효기)에 Table 1의 배지를 3ℓ 사용하였으며, 배지 성분중 탄소원인 maltose 농도 10g/l로 하여 저해제로 acetic acid를 0.5g/l, 1.0g/l, 2.0g/l 가하고, glucose 농도 10g/l 에

Table 2. Effects of maltose and acetic acid on the cell growth and product production

| maltose 10g/l, HAc(g/l) | X _m (g/l) | α _m (unit/ml) | L _m (g/l) | A _m (g/l) | P _m (g/l) | M _m (g/l) | E _m (g/l) | Y _{αs} (unit/mg) | Y _{xs} (g/g) | μ _m = $\frac{1}{X} \left(\frac{\Delta X}{\Delta t} \right)_{\max}$ (g/g-hr) | υ _m = $\frac{1}{X} \left(\frac{\Delta \alpha}{\Delta t} \right)_{\max}$ (unit/mg-hr) |
|-------------------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------------|--------------------------|--|---|
| 0.5 | 1.94 | 125.00 | 0.76 | 3.71 | 0.01 | 0.10 | 0.02 | 22.12 | 0.34 | 0.31 | 10.78 |
| 1.0 | 1.38 | 81.71 | 1.69 | 4.24 | 0.05 | 0.16 | 0.05 | 20.50 | 0.26 | 0.21 | 5.39 |
| 2.0 | 0.11 | 20.00 | 0.30 | 10.44 | • | • | • | 19.80 | 0.10 | 0.03 | 50.00 |

X_m=maximum dry cell density, L_m=maximum lactic acid concentration, α_m= maximum α-amylase activity, A_m=maximum acetic acid concentration, P_m=maximum propionic acid concentration, M_m=maximum methanol concentration, E_m=maximum ethanol concentration, Y_{αx}=maximum α-amylase yield, Y_{xs}=maximum cell yield, μ_m=maximum cell specific production rate, υ_m=maximum enzyme specific production rate.

저해제로 acetic acid를 1g/l, 2g/l, 3g/l 씩 가한 후 균주 배양액 25ml를 각각 접종하여 37°C, 180rpm, 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 원심분리하여 상등액을 제하고 증류수로 침전물을 세 차례 씻은뒤 건조오븐에서 107±2°C로 24시간 건조한 뒤 측정하였다.

α-Amylase 활성(activity)

α-Amylase 활성은 starch-iodine method(11)에 의하여 측정하였다. 배양액을 10,000rpm으로 10분간 원심 분리한 후 상등액 0.5ml를 채취하여 0.04M pH 5.9 potassium phosphate 완충 용액과 전분 기질 용액을 1:1로 혼합한 용액 5ml에 첨가하여 25°C에서 25분간 반응시켰다. 0.1M HCl용액 5ml를 가하여 반응을 정지시킨 후 이 혼합물 5ml에 5ml의 iodine 용액을 첨가하여 발색시킨 후 660nm에서 흡광도를 측정하여 활성을 구하였다. 여기서 α-amylase의 활성은 다음 식에 의하여 구하였다.

$$\text{Activity}(\text{unit/ml}) = D \frac{R_0 - R}{R_0} \times 100$$

여기서 R₀는 효소에 존재하지 않는 substrate-iodine complex의 흡광도이며, R은 시료 혼합물의 흡광도이고, D는 시료의 희석 비율이다.

탄소원 및 생성물 농도측정

Glucose, maltose, acetic acid, lactic acid의 농도는 fermentation monitoring column(BIO-RAD)이 부착된 HPLC(Waters 440)를 사용하여 측정하였으며, 용리액은 0.001M-H₂SO₄, column의 온도는 65°C, 유량은 0.8ml/min, 시료는 20μl를 주입하여 RI detector를 이용하여 분석 하였다.

Lactic acid 농도측정

HPLC와 Barker(12)-Summerson(13)방법을 이용하여 측정하여 비교하였다.

Barker-Summerson법에 의하여 20% CuSO₄·5H₂O, 4% CuSO₄·5H₂O, Ca(OH)₂, H₂SO₄, 1.5% p-hydroxybiphenyl과 0.5% NaOH를 이용하여 흡광도 560nm에서 표준곡선 구한 후 발효액을 희석하여 200μl를 취한 후 20% CuSO₄·5H₂O 1ml, H₂O 9ml, Ca(OH)₂ 1g 가하여 교반하고, 상온에서 30분간 방치 후 원심분리한 다음 상등액 200μl과 4% CuSO₄·5H₂O 0.05ml와 H₂SO₄ 6ml을 가한 후 70°C 정도에서 교반하고 수욕상에서 5분간 방치 한 후 20°C 이하의 찬물로 냉각시킨다. 이 용액에 1.5% p-hydroxybiphenyl과 0.5% NaOH 용액 0.1ml가한 후 30°C의 물에서 30분간 반응 시키고, 수욕상에서 90초 동안 반응 시킨 후 냉각 시켜 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

Maltose 배지에서 acetic acid가 세포 성장과 생성물 생성에 미치는 영향

Bacillus amyloliquefaciens 이용하여 회분식 배양 시 탄소원인 maltose배지에서 저해제 acetic acid

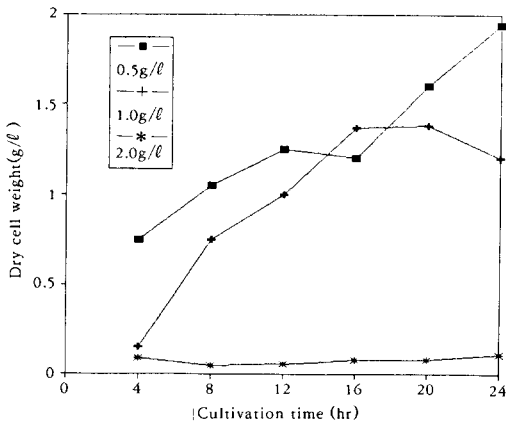


Fig. 1. Cell growth formation in batch culture at 10g/l of initial maltose by adding acetic acid solutions.

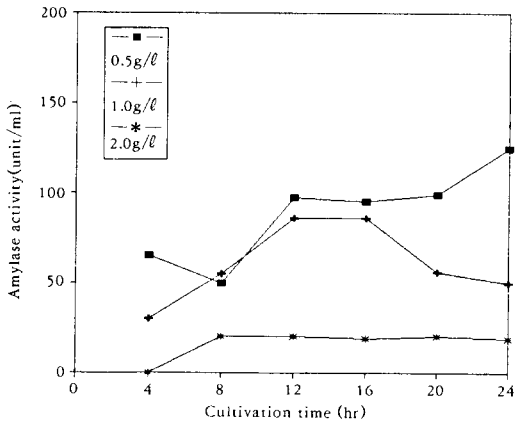


Fig. 2. α -Amylase formation in batch culture at 10g/l of initial maltose by adding acetic acid solutions.

가 세포성장과 α -amylase 생성과 부산물인 lactic acid와 acetic 생성 및 다른 물질의 생성을 알기 위하여 탄소원 maltose 초기농도 10g/l 에 acetic acid 초기농도를 0.5g/l, 1.0g/l, 2.0g/l 을 각각 첨가하여 배양한 결과를 Table 2와 Fig. 1, 2, 3, 4 에 나타냈다. 건조 최대세포 농도는 acetic acid 초기농도 0.5g/l 일때 시간이 증가 함에 증가 하여 24 시간 배양시에 1.94g/l 로 가장 높았고, acetic acid의 첨가 초기 농도가 증가 할 수록 건조 세포 농도가 감소 하였는데, 이는 첨가량과 배양중에 생성 되는 양에 의해 acetic acid의 농도가 증가되었기

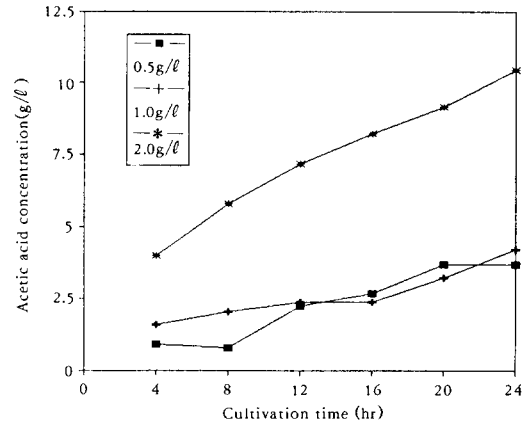


Fig. 3. Acetic acid formation in batch culture at 10g/l of initial maltose by adding acetic acid solutions.

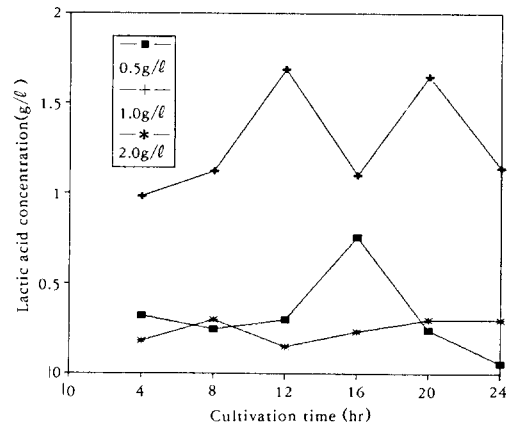


Fig. 4. Lactic acid formation in batch culture at 10g/l of initial maltose by adding acetic acid solutions.

때문으로 생각된다. 이와 같이 저해제로 acetic acid 를 첨가하였을때 건조 세포농도가 낮은 것은 Maiorella(14)에 의하면 acetic acid가 세포막을 통한 phosphate 전달을 화학적 간섭에 의해 방해하여 세포성장을 저해 한다고 하였다. α -Amylase 생성 최대치는 acetic acid 초기 농도 0.5g/l 일때 8시간 후부터 증가하여 24시간 배양시에 125unit/ml로 가장 높았다. 최대 비세포 성장속도는 acetic acid 초기농도 0.5g/l 일때 0.31g/g-hr이고, α -amylase 최대 비생성속도도 acetic acid 초기농도 0.5g/l 에서 10.78unit/mg-hr이다. Table 2에 나타냈것 처

Table 3. Effects of glucose and acetic acid on the cell growth and product production

| Glucose 10g/l, HAc(g/l) | X _m (g/l) | α _m (unit/ml) | L _m (g/l) | A _m (g/l) | P _m (g/l) | M _m (g/l) | E _m (g/l) | Y _{a/s} (unit/mg) | Y _{x/s} (g/g) | μ _m = $\frac{1}{X} \left(\frac{\Delta X}{\Delta t} \right)_{\max}$ (g/g-hr) | θ _m = $\frac{1}{X} \left(\frac{\Delta \alpha}{\Delta t} \right)_{\max}$ (unit/mg-hr) |
|-------------------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------------|---------------------------|--|---|
| 1.0 | 3.90 | 95.52 | 2.45 | 1.00 | 0.26 | 1.79 | 1.79 | 23.64 | 0.40 | 0.18 | 0.74 |
| 2.0 | 3.38 | 331.55 | 2.12 | 1.38 | 0.28 | 1.21 | • | 51.48 | 0.43 | 0.19 | 1.57 |
| 3.0 | 3.10 | 128.50 | 1.10 | 1.96 | 0.43 | 0.94 | • | 21.53 | 0.41 | 0.19 | 2.66 |

X_m = maximum dry cell density, L_m = maximum lactic acid concentration, α_m = maximum α-amylase activity, A_m = maximum acetic acid concentration, P_m = maximum propionic acid concentration, M_m = maximum methanol concentration, E_m = maximum ethanol concentration, Y_{a/s} = maximum α-amylase yield, Y_{x/s} = maximum cell yield, μ_m = maximum cell specific production rate, θ_m = maximum enzyme specific production rate.

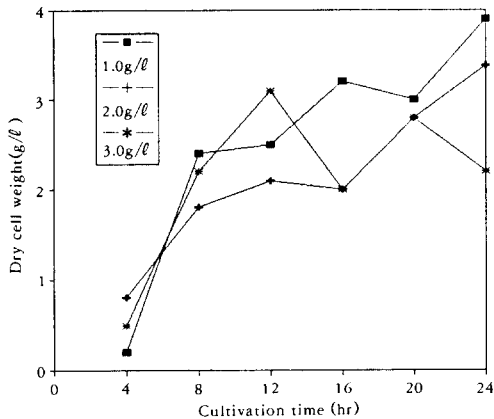


Fig. 5. Cell growth formation in batch culture at 10g/l of initial glucose by adding acetic acid solutions.

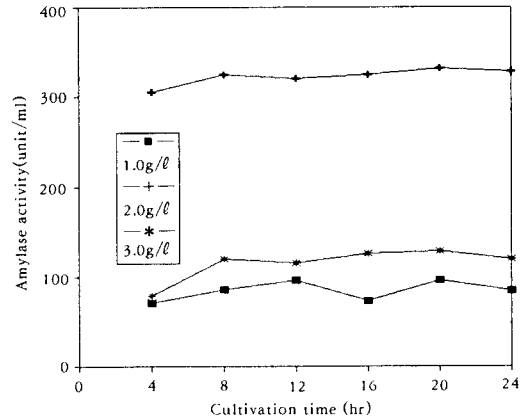


Fig. 6. α-Amylase formation in batch culture at 10g/l of initial glucose by adding acetic acid solutions.

럼 acetic acid 초기농도가 높으면 세포 성장이 현저히 저하됨을 알수있어 acetic acid가 저해 작용을 한것으로 판단되고, 부산물인 lactic acid는 저해제를 첨가하면 현저히 적게 생성됨을 알수 있다. 이러한 결과는 문헌에서 보고한바로서 E. Coli 배양에서 (15) 세포 성장에 저해 작용을 주는 물질을 acetic acid라는 것과 일치하며, 또한 효모류의(16) 발효시에 부산물로서 acetic acid가 현저하게 생성되고 이 물질은 세포성장에 저해 작용을 한다는 것에도 일치한다.

또한 배양시 생성되는 부산물로서는 lactic acid가 acetic acid 초기농도 1.0g/l에서 1.69g/l로 가장 많이 생성되었고, 전체적으로는 lactic acid, methanol, ethanol, propionic acid 순으로 나타났다.

Glucose배지에서 acetic acid가 세포 성장과 생성물 생성에 미치는 영향

탄소원인 glucose 배지에서 저해제 acetic acid가 세포성장과 α-amylase 생성과 부산물인 lactic acid와 acetic acid 등의 생성에 미치는 영향을 알기위하여 탄소원인 glucose 초기농도를 10g/l로 하고 acetic acid 초기농도를 1.0g/l, 2.0g/l, 3.0g/l를 각각 첨가하여 배양한 결과를 Table 3과 Fig. 5, 6, 7, 8에 나타냈다. 이 결과 건조 최대세포 농도는 acetic acid 초기 농도 1.0g/l일때 4시간 후부터 증가하여 24시간 배양시에 3.9g/l로 가장 높았으며, acetic acid의 첨가 초기 농도가 증가 할 수록 건조 세포농도는 감소하는 것으로 보아 acetic acid의 저해 작용에 의한 것으로 생각된다. α-Amylase 생성 최대치는 acetic acid 초기농도 2.0g/l일때

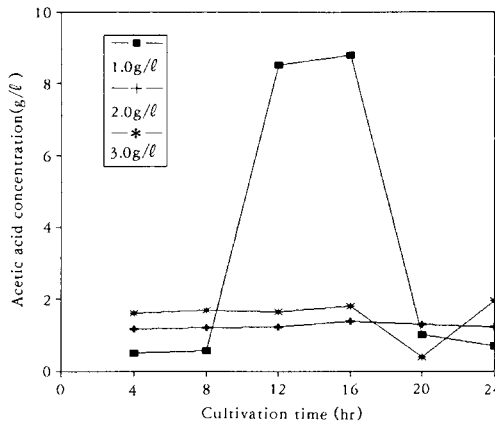


Fig. 7. Acetic acid formation in batch culture at 10g/l of initial glucose by adding acetic acid solutions.

20시간 배양시에 331.55unit/ml로 가장 높았고, 이 값은 Table 2의 maltose에서 acetic acid가 작용한 결과치에서 오는 현저하게 다른 값을 보였다. 저해제 첨가시 세포성장은 탄소원으로 glucose를 사용할때가 maltose를 사용 할때 보다 25배 정도가 많은 양으로 성장되었고, α -amylase 역시 월등히 많이 생성된 특이한 현상으로 나타났다. 부산물인 lactic acid의 최대치는 acetic acid 초기 농도 1.0g/l에서 2.45g/l로 생성되었고, acetic acid 초기 농도 3.0g/l 일때 최대 비세포성장 속도는 0.19g/g-hr이며, α -amylase 최대 비생성속도는 2.66 unit/mg-hr를 나타냈다.

그리고 glucose에서도 maltose에서와 마찬가지로 acetic acid가 높은 농도일때 세포성장을 저해한 것으로 나타났지만, 미생물의 특수한 경우와 탄소원의 기질종류에 따라서 acetic acid 일부가 세포성장을 촉진한다는 이론과 일치한다. 즉 탄소원 호기적대사에서 EMP 경로는 변화하지 않으나 glyceroldehyde-3-phosphate 탈수소, 효소는 pyruvate에 대한 견인상태를 제안하고 phospho-enolpyruvate를 공급하게되면 TCA cycle 을 통한 탄소 흐름이 제한되어 acetate에 대한 pyruvate 이용이 바뀌진 것이라 했다(17, 18). 또한 이 실험과정에서 lactic acid가 상당히 생성됨은 Snay 등(19)이 보고한 바로서 *B. Subtilis*를 이용한 실험에서 유기산 생성으로 lactic acid가 15g/l 까지 생성한다는 내용에 비추어 볼때 본실험과정에서 Table 2, 3에 나타낸 값은 문헌과

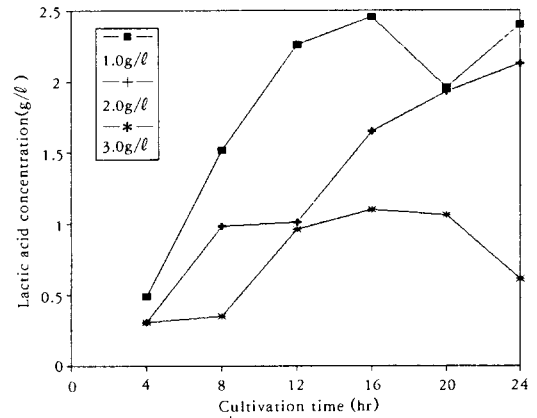


Fig. 8. Lactic acid formation in batch culture at 10g/l of initial glucose by adding acetic acid solutions.

일치하다고 본다.

또한 배양시 생성되는 부산물로서는 lactic acid가 acetic acid 초기농도 1.0g/l에서 2.45g/l로 가장 많이 생성되었고, 전체적으로는 lactic acid, methanol, ethanol, propionic acid 순으로 나타났다. 저해제로서 acetic acid를 첨가하여 배양 할때 부산물 생성량은 glucose를 배지로 사용한 경우가 maltose를 사용한 경우 보다 2배 정도 더 생성되었다.

요 약

Bacillus amyloliquefaciens 이용한 회분식 배양시 탄소원인 maltose와 glucose에서 저해제 acetic acid, lactic acid가 세포성장과 생성물 생성에 미치는 영향에 대해 검토한 결과, acetic acid가 저해제로 작용함을 확인하였고, acetic acid 첨가시 초기농도가 증가할수록 세포성장은 현저하게 감소되었다. α -Amylase 생성 최대치는 maltose 10g/l의 경우 acetic acid 초기농도 0.5g/l 일때 24시간 배양시에 125unit/ml로 가장 높았고, glucose 10g/l의 경우 acetic acid 초기농도 2.0g/l 일때 20시간 배양시에 331.55unit/ml로 가장 높았다. Acetic acid 초기농도가 과량 일때는 세포의 성장이 최저 상태이고, α -amylase 생성도 급격히 감소하였다. 저해제로 acetic acid 첨가시 탄소원인 maltose와 glucose를 비교하면 glucose에서 maltose 보다는 세포가 더 성장되었고, α -amylase의 생성도 더 많게 나타났으며,

두 가지 탄소원에 다같이 저해 작용을 나타냈다.

감 사

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

참고문헌

1. Y. H. Yoo, T. W. Cadman, J. Hong, and R. T. Hatch(1988), *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 426.
2. C. van Zyle and A. Bernard Prior et al. (1991), *Enzyme Microb. Technol.*, **13**, 82.
3. M. E. Pampullha and V. Loureiro(1989), *Biotechnol. Letters*, **11**(4), 269.
4. S. Narimasa and K. Yamamoto(1975), *J. Bacteriol., American Society for Microbiology*, **121**(3), 849.
5. A. K. Chandra, S. Medda, and A. K. Bhadra (1980), *J. Ferment. Technol.*, **58**, 1.
6. J. L. Vega, E. C. Clausen, and J. L. Gaddy (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 429.
7. M. E. Pampulha and V. Loureriro(1989), *Biotechnol. Lett.*, **11**, 269.
8. C. A. Vieagas and M. F. Rosa, et al.(1989), *Appl. Environm. Microbiol.*, **55**, 21.
9. N. Shimizu. et al. (1988), *J. Ferment, Technol.*, **66**, 187.
10. Y. L. Lee and H. N. Chang(1990), *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 330.
11. Y. J. Yoo, J. Hong, and R. T. Hatch(1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 147.
12. S. B. Barker(1940), *Am. J. Physiol.*, **129**, 305.
13. W. H. Summerson(1939), *J. Biol. Chem.*, **130**, 149.
14. B. Maiorella, H. W. Blanch, and C. R. Wilke (1984), *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 1115.
15. M. Graber and D. Combes(1990), *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 12.
16. B. Maiolella and C. R. Wike(1983), *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 103.
17. W. Horst, W. Hollywood et al.(1977), *Advances in Biochem. Eng.*, **23**, 1.
18. H. W. Doelle(1980). Proc. VIth Int'l Ferm. Symp., London.
19. J. Sany, J. W. Jeng, and M. Ataa(1971), *Can. J. Rev.*, **25**, 56.