

재조합된 대장균의 세포 성장에 미치는 저해제의 영향

†차 월 석 · *나 재 운 · 이 동 병

조선대학교 공과대학 화학공학과 · *순천대학교 공과대학 고분자공학과

Effects of Inhibitor Concentrations on the Growth of Recombinant *E. coli*

Wol-Suk Cha †, Jae-Woon Na*, and Dong-Byung Lee

Dept. of Chemical Engineering, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

*Dept. of Polymer Science and Engineering, Suncheon Nat'l University, Suncheon, Chonnam 540-742, Korea

ABSTRACT

The growth of recombinant *E. coli* and by-product production were investigated. D-cycloserine was added to increase the secretion of α -amylase from recombinant *E. coli*. Even though cell growth was increased for optimal d-cycloserine concentration 0.1g/l, extracellular α -amylase activity remained almost the same as the case without d-cycloserine. It is important to achieve the high cell density for commercial production of methabolites including α -amylase. To achieve this goal, culture conditions should be selected carefully and optimized considering cell growth and by-products production. In cultivating recombinant *E. coli*, lactic acid and acetic acid turned out to be important by-product which affected cell yield and growth rate.

서 론

미생물(재조합 미생물 포함)을 이용하여 경제성있게 생물공학 제품을 생산하기 위해서는 미생물을 고농도 배양하는 것과 미생물에 의한 제품의 비생산속도(specific production rate)를 향상시키는 것이 필요하다.

미생물을 고농도로 배양시키기 위해서는 많은 연구가 수행되고 있는데 현재까지 Yeast 및 *E. coli*에 대해서는 많은 연구 결과가 보고되고 있다.

Yeast의 경우에는 산소부족 및 glucose 농도가 높은 경우 대사산물로서 ethanol이 생성 되어 이때 생성된 ethanol이 Yeast의 성장을 저해함으로 glu-

cose를 적절하게 주입하며 산소를 충분히 공급함으로써 yeast의 세포농도를 증가시키는 배양 방법이 보고되고 있다(1-3).

그리고 재조합 미생물 배양을 최적화 하기 위해서는 재조합 미생물의 유전자적인 인자에 대한 고찰과 환경 조건 조절을 통한 배양과 분리공정의 개선으로 재조합 유전자의 발현율을 향상시키기 위한 연구가 진행되고 있다(4-7). 또한 재조합 미생물 공정의 생산성을 최대화하기 위해서는 외부에서 주입한 유전자와 숙주 세포 사이의 상호작용, 유전자의 발현 특성과 염색체 사이의 생합성기구, 에너지, 전구체를 둘러싼 경쟁으로 인하여 재조합 유전자의 발현과 세포의 성장과는 반비례 관계를 가진다(8).

이러한 연구들을 보면 재조합 대장균을 이용하여 fed-batch 배양기에서 phenylalanine의 생산을 위

† Corresponding Author

한 일련의 최적화 연구가 행해졌다(9, 10). 또 phenylalanine 생산에 미치는 tyrosine, 산소와 glucose의 첨가 방법에 대한 실험 결과를 기초로하여 phenylalanine 농도와 생산성의 향상을 위한 제어방법을 개발하여 적용하였다(11). 이 결과로서는 용존 산소와 glucose 공급을 조절하여 acetic acid의 생산을 최소화하였고, tyrosine의 양은 균체 증식과 phenylalanine 생산에 적합한 정도로 유지하였다.

재조합 단백질의 생산에 가장 많이 사용되고 있는 숙주로서 *E. coli*(12), *Bacillus*(13), *Streptomyces*(14), yeast(15) 및 *Aspergillus*(16) 등이며, 이들 중 *Bacillus*(17)는 *E. coli*에 비해 질소나 탄소 등의 영양소가 제한되었을 때 많은 양의 다양한 프로티아제를 생산하기 때문에 이의 제거 및 프로티아제의 생산과 함께 수반되는 내세포자 형성을 차단하는 좋은 숙주 개발이 된다고 발표된 바 있다.

그리고 *Bacillus*(18, 19)는 고형의 단백질 집합체와 같은 총단백질 집합체가 inclusion body 생기지 않고, extracellular로 되는 장단점을 개선하기에 적합하며, inclusion body의 생성은 변이주나 재조합 단백질에만 국한한 것이 아니고 *E. coli*에서 얻은 단백질 유전자의 발현시에도 조건을 바꿔주면 inclusion body가 생성됨을 제시하고 있다.

*B. subtilis*를 이용한 유전자 재조합 단백질 생산을 위한 숙주로 이용하는데 큰 장애가 되는 것은 plasmid의 불안정성이다.

이러한 plasmid의 불안정성은 삽입되는 유전자의 크기가 클수록 더 커진다(20). 이와 같은 작은 plasmid로부터 유도된 plasmid와는 달리, 보다 큰 plasmid(26.5Kb)로부터 유도된 vector들은 33Kb까지의 유전자도 안정하게 유지할 수 있다고 보고하고 있다(21). 그리고 plasmid의 안정도와 함께 많이 연구되고 있는 부분이 *B. subtilis*에서의 cloned protein의 부분이며 현재까지 널리 쓰이는 signal sequence로는 *B. amyloliquefaciens*의 neutral protease 유전자이다(22-24).

또 α -amylase 생합성을 *B. amyloliquefaciens*의 경우 기질로 glucose 및 maltose를 이용함으로써 증가시킬 수 있다고도 한다(25). 뿐만 아니라 이 α -amylase는 열에 안정하며 공업적으로 유용하게 응용되고 있다(26).

*Bacillus*류의 부산물 중 가장 중요한 α -amylase 생성의 기작에 대해서는 여러 방향으로 연구되고 있다. 즉 효과적인 생산 및 그 수율을 높이기 위한 기본조건, 합성 및 분비를 조절하는 효소의 생합성 기

구에 대해 연구가 되어지고 있으며(27, 28), 저해제에 관해서는 Yoo등(29)은 acetate, lactate, propionate가 저해성을 갖는다고 제시했고, Zyle등(30)은 acetic acid와 ethanol 저해 농도를 제시하였고, Pampulha등(31)은 acetic acid는 독소 작용 물질로 배양을 억제한다고 했다.

최근 재조합된 *E. coli* 등의 미생물들의 배양형식과 조건에서 고농도 세포배양에 관한 연구들이 진행되고 있다. 이 연구를 보면, Lee등(32)은 연속 배양 세포막에서 penicillin acylase를 생산하는 재조합된 *E. coli*의 고농도 세포 배양 조건으로서, cell 성장의 저해체로서는 acetic acid이고, acetic acid를 최소화하는 데는 glucose와 용존 산소량의 제한을 받고 반응의 생산성은 batch식보다 재순환식이 10배 더 높다고 제시한 바도 있다. 또한 Graber(33)는 medium 농도에 대해 *Asp.oryzae*로부터 α -amylase의 활성 pattern에서 기질농도 500g/l 까지 효소가 억제 되지 않고 생성되고 변형-glycosylation의 반응은 기질 농도가 증가하면 증가되며, oligosaccharides의 중합정도는 maltotetraose 보다 높았음을 밝힌 바 있다.

이상과 같이 일반 미생물을 비롯하여 재조합 미생물에 대한 배양 조건들이 다양하게 연구되어지고 있으나, *Bacillus*류의 α -amylase 생성 및 균체 고농도 배양에 따른 반응기 제어에 대한 연구는 더욱 발전되어야 하며, 재조합 미생물을 이용시에 유용한 산물의 생산성 향상에 대해 더욱 연구되어야 한다고 본다.

그러므로 본 연구에서는 재조합 대장균을 이용하여 저해제에 대한 세포성장억제제와 d-cycloserine 첨가에 따른 세포막의 α -amylase 생성량 및 부산물 생성량 관계를 검토하였다.

재료 및 방법

균주

본 실험에 사용된 균주는 *B. licheniformis*(ATCC 27811)의 α -amylase gene를 *E. coli*에 clone한 것을 서울대학교 화학과 양철학 박사님으로부터 분양받아 사용하였으며, nutrient agar 배지를 사용한 agar slant상에서 4°C의 냉장고에 보관하였다가 L. B medium를 사용하여 종균을 배양 하였으며 필요에 따라 S.P medium을 사용하여 배양 하였다.

배지 및 배양

균체의 배양에 사용된 표준배지의 조성은 Table

Table 1. Nutrient composition of the Standard Medium. [S. P(Spizizen Potato) medium]

Component	Quantity(g/l)
Carbon Source(glucose)	10.0
Yeast Extract	1.0
K ₂ HPO ₄	0.1
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.1
Sodium Citrate	0.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
CaCl ₂	0.1
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.1

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 취한후 121℃, 15psi, 30min간 멸균한 뒤 clean bench내에서 충분히 식힌후에 nutrient agar slant에서 보관한 Bacillus amyloliquefaciens 1 백균이를 접종하여 shaking incubator에서 37℃, 170rpm으로 48시간 배양후 4℃ 냉장고로 옮겨 보관하여 사용하였다.

배지에 사용된 시약은 glucose, yeast extract는 Difco제를 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, 그 성분중 탄소원인 glucose 초기농도 10g/l에 α-amylase를 증가 시킬 목적으로 세포벽에 자극을 주는 d-cycloserine을 0.1g/l과 0.2g/l을 가하고, 저해제로 알려진 acetic acid가 세포의 성장과 부산물 생성에 미치는 영향을 알기위해 glucose 초기농도 10g/l에 acetic acid 농도를 0.25ml/l, 0.5ml/l, 1.0ml/l, 2.0ml/l을 각각 가한 후 균주 배양액 25ml를 각각 접종하여 37℃, 170rpm, pH7, 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 원심분리 한 후 상등액을 제거하고 증류수로 침전물을 세 차례 씻은뒤 건조오븐에서 107±2℃로 24시간 건조한뒤 측정하였다.

α-Amylase 활성(activity)

α-Amylase 활성은 starch-iodine method(29)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℃에서 25분간 반응시켰다. 0.1M HCl용액 5ml를 가하여 반응을 정지시킨 후 이 혼합물 0.5ml에 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 생물 농도측정

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

Lactic acid 농도측정

HPLC와 Barker(34)-Summerson(35)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 30분

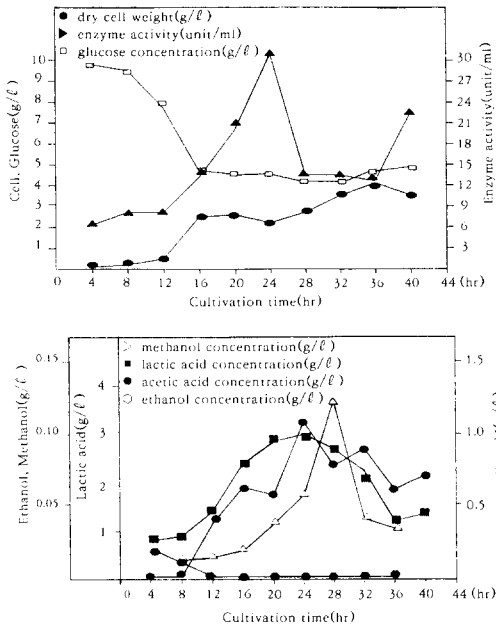


Fig. 1. Cell growth and products of recombinent *E.coli* in batch culture at 10g/l of initial glucose and 0.1g/l of d-cycloserine concentration in S. P medium.

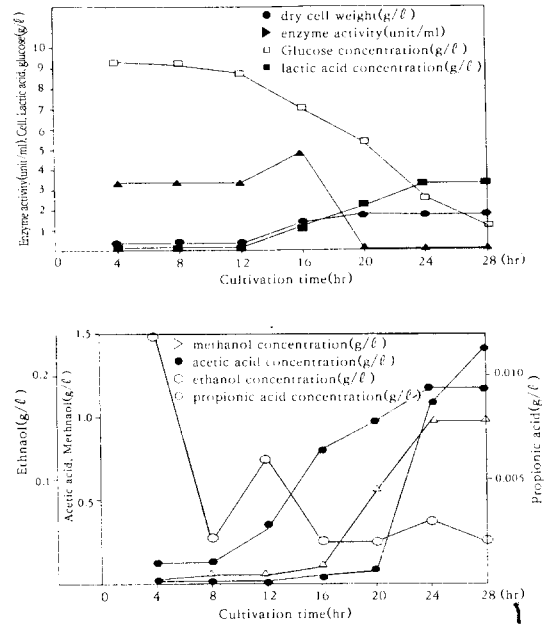


Fig. 2. Cell growth and products of recombinent *E.coli* in batch culture at 10g/l of initial glucose and 0.2g/l of d-cycloserine concentration in S. P medium.

간 방치 후 원심분리한 다음 상등액 200 μ l과 4% CuSO₄·5H₂O 0.05ml와 c-H₂SO₄ 6ml을 가한 후 70℃ 정도에서 교반하고 수욕상에서 5분간 방치한 후 20℃ 이하의 찬물로 냉각시킨다. 이 용액에 1.5% p-hydroxybiphenyl과 0.5% NaOH 용액 0.1ml가한 후 30℃의 물에서 30분간 반응 시키고, 수욕상에서 90초 동안 반응 시킨 후 냉각 시켜 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

B. licheniformis α -amylase를 함유하고 있는 재조합된 *E. coli* NM 522를 회분식 배양으로 세포의 성장과 α -amylase 생산과 부산물의 생성량에 관한것을 알기위하여 탄소원으로는 glucose를 사용하고, d-cycloserine를 첨가하여 세포의 농도와 α -amylase 관계를 검토하였고, 저해제로서 acetic acid의 농도 변화를 주면서 배양 하였다.

D-cycloserine의 α -amylase와 세포 생성에 대한 영향
B. licheniformis α -amylase를 함유하고 있는 재조합된 *E. coli* NM 522가 배지 내로 분비 시키는 α

-amylase를 증가 시킬 목적으로 세포벽에 자극을 주는 d-cycloserine을 glucose 초기농도 10g/l에 0.1g/l과 0.2g/l을 각각 가하여 배양 시킨 결과를 Fig. 1, 2, 3과 Table 2에 나타냈다. 최대 세포의 농도는 d-cycloserine을 초기농도 0.1g/l을 첨가 할때 배양 실시후 36시간 전후에서 4.06g/l로 얻어졌으며 α -amylase 최대치는 d-cycloserine을 초기농도 0.1g/l로 첨가 할때 24시간 전후에서 31.37unit/ml이었다.

그리고 d-cycloserine을 0.2g/l 첨가할 때는 세포 최대치와 α -amylase 최대치가 현저하게 적게 측정 되었음을 알 수 있다. 이 결과는 Chanadra 등(36)이 제시한바와 같이 아미노산류를 첨가했을때 serine 등의 아미노산은 효소 생성에 필수적인 요소로 중요하여 세포 성장을 높인다는 내용과 일치 하지만 과량일때는 d-cycloserine의 부작용으로 세포의 성장이 현저히 저해됨을 알 수 있다. 즉 적당량의 첨가시에는 배양액에 α -amylase 축적과 세포 성장을 촉진 한다고 볼 수 있다.

또한 Narimasa 등(37)이 제시한 바와 같이 복합인산염이나 복합 아미노산류 첨가는 유전적 배양물

Table 2. Effects of D-cycloserine on the α -amylase production and by-products production.

Initial d-cycloserine concentration (g/l)	Xm (g/l)	Y _{vs} (g/g)	α m (unit/ml)	Y _{as} (g/mg)	Lm (g/l)	Am (g/l)	Pm (g/l)	Mm (g/l)	Em (g/l)	μ m = $\frac{1}{X} \left(\frac{\Delta X}{\Delta t} \right)_{\max}$ (g/g-hr)	ν m = $\frac{1}{X} \left(\frac{\Delta X}{\Delta t} \right)_{\max}$ (unit/mg-hr)
0.1(Gluc=10)	4.06	0.80	31.38	7.30	3.05	1.07	-	0.13	0.06	0.30	0.47
0.2(Gluc=10)	1.98	0.43	4.839	1.62	3.32	1.33	0.01	0.95	0.19	0.37	0.57
0.0(Gluc=10)	2.10	0.42	30.0	3.02	6.78	1.92	-	--	0.14	0.24	1.88

※ Xm=max. cell density, α m=max. α -amylase, Y_{vs}=cell yield, Y_{as}= α -amylase yield, Lm=max. lactic acid concentration, Am=max. acetic acid concentration, Pm=max. propionic acid concentration, Mm=max methanol concentration, Em=max. ethanol concentration, Gluc=glucose.

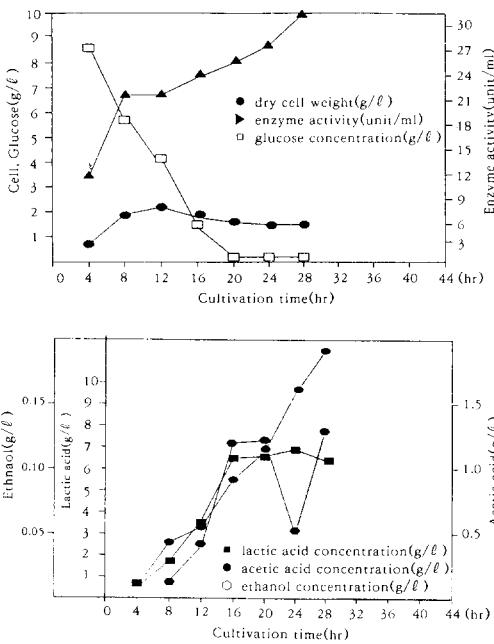


Fig. 3. Cell growth and products of recombinent *E.coli* in batch culture at 10g/l of initial glucose and exclusion d-cycloserine concentration in S. P medium.

들이 자랄때 α -amylase 생성을 활발하게 해준다는 내용과도 유사한 결과라고 생각된다. 즉 d-cycloserine을 첨가 하지않는 상태의 Fig. 3에서 보면 세포 성장과 α -amylase 생성이 d-cycloserine 0.1g/l를 첨가하는것보다 적은 값을 알 수 있다.

그리고 d-cycloserine 0.1g/l을 첨가하지 않는 경우에 비해 첨가하는 경우 세포 성장은 93% 증가했고, α -amylase는 5% 정도 분비가 촉진 되었다.

세포 수율은 d-cycloserine 0.1g/l 첨가할때가

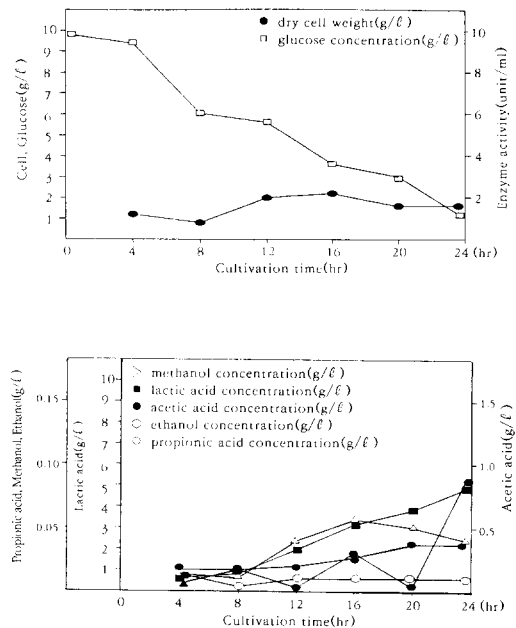


Fig. 4. Cell growth and products of recombinent *E.coli* in batch culture at 10g/l of initial glucose and 0.25ml/l of acetic acid concentration in S. P medium.

0.8g/g이고 α -amylase 수율은 7.3unit/mg이다. 그리고 부산물인 lactic acid의 경우는 d-cycloserine 0.1g/l과 0.2g/l을 첨가할때 두 가지가 비슷하였고 첨가하지 않고 배양시킬때가 높은 값을 나타내었다.

저해제 acetic acid가 세포 성장에 미치는 영향 세포 성장에 저해제로 알려진 acetic acid가 세포의 성장과 부산물 생성에 미치는 영향을 알기위해 초기 glucose 농도가 10g/l에 acetic acid 농도를 0.25ml/l,

Table 3. Effects of acetic acid on the cell growth and by-products production.

Initial acetic acid concentration (ml/l)	Xm (g/l)	Yx/s (g/g)	Lm (g/l)	Am (g/l)	Pm (g/l)	Mm (g/l)	Em (g/l)	$\mu_m = \frac{1}{X} \left(\frac{\Delta X}{\Delta t} \right)_{max}$ (g/g-hr)
0.25	2.10	0.33	4.86	2.26	0.02	0.06	0.09	0.12
0.5	1.96	0.33	3.56	3.72	0.01	0.05	0.07	0.28
1.0	1.89	0.24	3.63	4.15	0.01	0.17	0.02	0.17
2.0	1.68	0.38	0.88	4.52	--	0.08	0.06	0.23

* Xm=max. cell density, Lm=max. lactic acid concentration, Am=max. acetic acid concentration, Pm=max. propionic acid concentration, Mm=max. methanol concentration, Em=max. ethanol concentration.

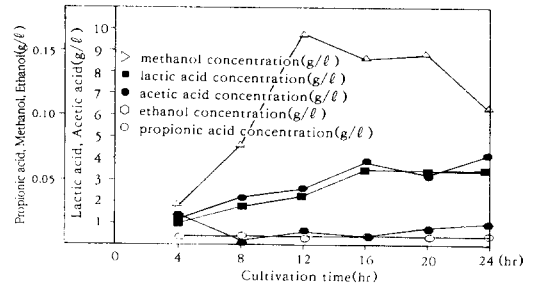
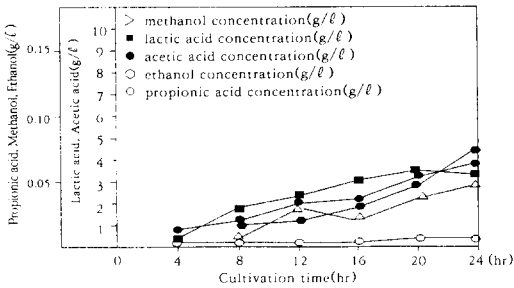
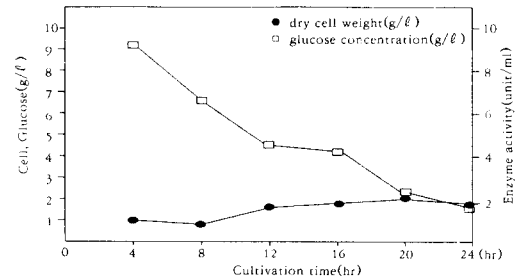
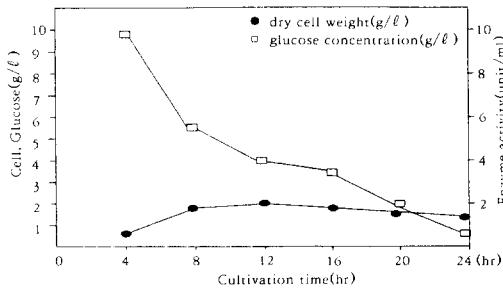


Fig. 5. Cell growth and products of recombinant *E.coli* in batch culture at 10g/l of initial glucose and 0.50ml/l of acetic acid concentration in S. P medium.

Fig. 6. Cell growth and products of recombinant *E.coli* in batch culture at 10g/l of initial glucose and 1.0ml/l of acetic acid concentration in S. P medium.

0.5ml/l, 1.0ml/l, 2.0ml/l 을 각각 가하여 배양시 키면서 세포의 성장과 그 부산물들의 생성에 대하여 검토한 결과를 Fig.4, 5, 6, 7과 Table 3에 나타냈다. 최대 세포의 농도는 acetic acid 0.25ml/l 일때 2.10g/l로서 제일 높고 이때의 세포 수율은 0.33g/g이며 수율의 최고치는 acetic acid 2.0ml/l 일때지만 Table 3에서 보면 비슷한 현상이고 acetic acid 가 적은 농도일수록 세포의 생성 최고치는 크다. 즉 acetic acid가 세포의 성장에 저해를 일으킨

다고 볼 수 있다.

이 결과는 Lee등(32)이 제시한 바와 같이 재조합 *E. coli* 배양에서 세포 성장에 방해하는 물질은 주로 acetic acid라고한 내용과 일치한다. 또한 Maiorella 등(38)이 제시한 내용에서도 효모류의 부산물중 acetic acid가 현저하게 존재하며 이것은 세포 성장에 저해작용을 한다고 하는 내용과도 일치한다.

그리고 여기의 부산물들로서는 주로 lactic acid가 현저하게 많이 생성 되었고 acetic acid의 농도가

요 약

재조합 대장균의 성장과 그 부산물 생성 관계를 알기 위하여 탄소원을 glucose로 하여 d-cycloserine, acetic acid 첨가에 따른 각각의 영향들을 검토하였다.

세포 벽에 자극을 주는 d-cycloserine을 초기 농도 0.1g/l로 첨가 하면 첨가 하지 않는 경우에 비해 세포 성장이 93% 증가 했고 α -amylase 생성은 5%정도 분비가 촉진 되었다. 그러나 d-cycloserine 초기 농도 0.2g/l로 첨가 하면 세포와 α -amylase가 아주 적게 생성 되었다. 또한 d-cycloserine을 첨가하면 부산물에 lactic acid 생성에는 영향이 없으나 acetic acid는 적게 생성되었다. 그러므로 d-cycloserine과 같은 자극제를 적당히 첨가하면 세포 성장 및 α -amylase 분비가 촉진되지만 너무 많이 첨가 되면 저해 작용이 일어남을 알 수 있다.

저해제 acetic acid는 세포 성장에 작용을 주는 결과를 보였고 acetic acid의 농도가 높지 않는 상태에서 lactic acid의 생성은 높은 양으로 생성 되었다. 이상의 결과에서 lactic acid를 적게 나오게 하는 것은 세포 수율에 큰 영향을 주며 acetic acid가 적게 생성되면 성장에 좋은 영향을 주고 있다.

이상의 전체적인 결과는 세포 성장과 부산물 생성 상태를 고려할때 d-cycloserine은 초기 농도 0.1g/l 정도 첨가하고 저해제 acetic acid의 생성을 적게 하는 배양방법을 검토 할 필요가 있다고 생각 된다.

감 사

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

참고 문헌

1. S. S. Aiba and Y. Nishizawa(1976), *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 1001.
2. Williams(1986), *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 631.
3. J. C. Fieschko(1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 1113.
4. D. W. Zabriskie and E. T. Arcuri(1986), *Enz. Microbiol. Technol.*, **8**, 706.
5. C. G. Kurland(1987), *Tronde in Biol*, **S, 12**, 126.

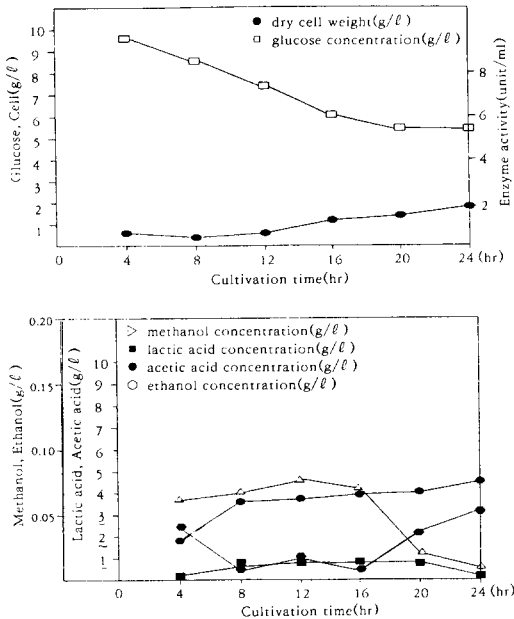


Fig. 7. Cell growth and products of recombinant *E. coli* in batch culture at 10g/l of initial glucose and 2.0ml/l of acetic acid concentration in S. P medium.

낮을수록 증가 했으며 acetic acid 0.25ml/l 일때는 4.86g/l로 최대치이다. 이 값은 Park 등(39)이 제시한 바와 같이 *B. subtilis*로 glucose 탄소원 이용의 배양에서 배양액내에서 다량의 propionic acid와 lactic acid 그외에 acetic acid 등이 축적되고 이들은 대사물로서 세포 성장을 감소하고 효소 활성을 감소하는 원인의 물질이라 고한 내용과 일치하다고 볼 수 있다.

특히 과량의 lactic acid 생성은 Snay등(40)이 제안한 *B. subtilis* 유기물질 생성에서 lactic acid가 15g/l 까지 생성된다고 한 것 보다는 적게 생성되었다. 또 다른 부산물인 propionic acid와 methanol, ethanol 등은 적은 양씩 축적되었음을 알 수 있다. 이상의 결과를 보면 acetic acid가 적게 생성되는 것은 세포 성장에 중요하고, lactic acid가 적게 생성되는 것은 세포 수율에 영향이 큰 것을 알 수 있다. 이러한 문제점을 참고 하여 acetic acid와 lactic acid의 생성이 적게되는 방법이 더욱 연구 되어져야 한다.

6. D. Y. Ryu and S. B. Lee(1988), in S. Aiba (ed.), "Horizons of Biochemical Engineering" oxford univ. press, p. 97.
7. S. J. Coppella, G. F. Payne, and N. D. Cruz, secondary concerns of recombinant microorganism processing, p. 1-17 in R. T. Hatch et al.(ed), "Expression Systems and Processes for rDNA products" ACS sym.ser. **477**, *American Chem. Soc.*, (1991).
8. J. E. Bailey, N. A. Da Silva, S. W. Peretti, J. H. Seo, and F. Srienc(1986), *Annals N. Y. Acad. Sci.*, **469**, 194.
9. C. Forberg and L. Haggstrom(1988), *J. Bacteriol.*, **8**, 291.
10. K. B. Konstantinov, N. Nishio, and T. Yoshida(1990), *J. Ferment. Bioeng.*, **70**, 253.
11. K. B. Konstantinov, N. Nishio, T. Seki, and T. Yoshida(1991), *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 350.
12. J. Buchner and R. Rudolph(1991), *Bio. Technology*, **9**, 157.
13. R. W. Van Leen, J. G. Bakhuis, R. F. W. C. Van Beckhoven, H. Burger, L. C. J. Dorssers, R. W. J. Hommes, P. J. Lemson, B. Nodrdam, N. L. M. Persoon, and G. Wagemaker(1991), *Bio. Technology*, **9**, 47.
14. S. K. Magnolo, D. L. Leenutaphong, J. A. DeModena, J. E.Curtis, J. E. Bailey, J. L. Galazzo, and D. E. Hughes(1991), *Bio. Technology*, **9**, 473.
15. E. A. Sabin, C. T. Lee-Ng, J. R. Shuster, and P. J. Barr(1989), *Bio. Technology*, **7**, 705.
16. A. De Baetselier, A. Vasavada, P. Dehet, V. HaiThi, M.De Beukelaer, T. Erpicum, L. De Clerck, J. Hanotier, and S. Rosenberg(1991), *Bio. Technology*, **9**, 559.
17. A. Nakayama, K. Ando, K. Kawamura, I. Mita, K. Fukazawa, M. Hori, H. Honjo, and Y. Furutani(1988), *J. Biotechnol.*, **8**, 123.
18. J. Botterman and M. Zabeau(1985), *Gene*, **37**, 229.
19. M. Gribstov and R. R. Burgess(1983), *Gene*, **26**, 109.
20. S. D. Ehrlich, P. Noirot, M. A. Petit, L. Janniere, B. Michel, and H. T. Riele(1986), Structural instability of *B. subtilis* plasmids, In: J. K. Setlowm and A. Hollaender, (Eds.) Genetic Engineering, Plenum, New York, **8**, 71.
21. L. Janniere, C. Bruand, and S. D. Ehrlich (1990), *Gene*, **87**, 53.
22. A. Nakayama, K. Kawamura, H. Shimada, A. Akaoka, I. Mita, M. Honjo, and Y. Furutani(1987), *J. Biotech.*, **5**, 171.
23. M. Honjo, A. Nakayama, A. Iio, I. Mita, K. Kawamura, A. Sawakura, and Y. Furutani (1987), *J. Biotech.*, **6**, 191.
24. C. W. Saunders, B. J. Schmidt, R. L. Mallonee, and M. S. Guyer (1987), *J. Bacteriol.*, **169**, 2917.
25. A. Wiseman(1975), "Handbook of Enzyme Technology", Wiley, New York p. 114.
26. K. L. Kindle(1983), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **8**, 153.
27. N. E. Welker and L. L. Campbell(1963), *J. Bactriol.*, **86**, 1202.
28. S. Yuki and Y. Ueda(1968), *Jpn. J. Genet.*, **43**, 21.
29. Y. J. Yoo, T. W. Cadman, J. Hong, and R. T. Hatch(1988), *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 357.
30. C. V. Zyle, B. A. Prior, and J. C. du Preez (1991), *Enzyme Microb. Technol.*, **13**, 82.
31. M. E. Pampullha and V. Loureiro(1989), *Biotechnol. Letters*, **11**, 269.
32. Y. L. Lee and H. N. Chang(1990), *Biotech. Bioeng.*, **36**, 330.
33. M. Graber and D. Combes(1990), *Biotech. Bioeng.*, **36**, 12.
34. S. B. Barker(1940), *Am. J. Physiol.*, **129**, 305.
35. W. H. Summerson(1939), *J. Biol. Chem.*, **130**, 149.
36. A. K. Chandra, S. Medda, and A. K. Bhadra (1980), *J. Ferment. Technol.*, **58**, 1.
37. S. Narimasa and K. Yamamoto(1975), *J. Bacteriol.*, Mar. p. 848; *American Society for Microbiology*, **121**, 849.
38. B. Maiorella, H. W. Blanch, and C. R. Wike (1983), *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 103.
39. Y. S. Park, K. Kaw, S. Irjima, and T. Kobayshi(1992), *Biotech. Bioeng.*, **38**, 948.
40. J. Snay, J. W. Jeong, and M. M. Ataa (1971), *Can. J. Rev.*, **25**, 56.