

再組合 菌株의 醱酵工程 設計

李 先 馥

韓國科學技術院 遺傳工學센터
先任研究員 · 工博

目 次

- I. 緒 言
- II. 再組合 菌株의 生産性 決定 因子
- III. 再組合 菌株 設計
- IV. 醱酵工程 設計
- V. 結 言
- VI. 參考文獻

I. 緒 言

最近의 유전공학 기술은 再組合 微生物 細胞를 이용하여 재조합 유전자에 의한 단백질 생산 및 기존 발효공정의 수율향상, 代謝經路 變異에 의한 미생물 공정의 효율성 향상 등의 약품, 화학품등을 보다 경제적으로 생산할 수 있는 새로운 길을 열어놓았다. 1973년 처음으로 유전자 재조합 대장균을 이용한 外來 단백질 생산 가능성이 제시된지 불과 십여년만에 인슐린을 비롯 成長 호르몬, 인터페론, 인터루킨-2 등의 의약품은 이미 제품화 되었거나 최종 임상 실험단계에 있으며(表 1), 기존 발효법에 의해 생산되던 각종 효소류나 아미노산 등의 생산성 증가에 대한 연구도 매우 활발히 진행되고 있다.¹⁻³⁾

그러나 유전공학 기술을 이용하여 제품을 생산하기 까지는 그림 1에 도시한 바와 같이 여러단계의 공정개발 단계를 거쳐야 하며 여기에 필요한 기술은 유전자 재조합 기술(recombinant DNA technology)과 생물공정 기술(bioprocess technology)로 나눌 수 있다. 遺傳子 再組合 技術은 목적하는 물질을 생산하는 유전자를 다른 생물체로부터 분리하거나 화학적으로 합성하여 이를 독자적인 복제능력이 있는 유전자 운반체, 즉 벡터에 클로닝 하여 재조합 유전자를 만든 후 적절한 숙주세포에 도입시켜 목표 유전자 산물을 효율적으로 생산하도록 유전자 발현을 시키는 데 필요한 여러가지 기술을 말하며, 이렇게 해서 얻어진 생산균주로부터 醱酵 및 分離·精製工程을 거쳐 大量生産에 이르기까지 필요한 기술을 생물공학技術이라 일컫고 있다.

本稿에서는 유전자 재조합 미생물의 전 생물공정 단계중 가장 중요 단계인 발효공정에

表 1. 美國에서의 遺傳工學 製品 商品化 現況

商品化 段階	製 品	會社 (共同開發會社)
판매중	Human insulin Human growth hormone	Lilly (Genentech) Genentech
허가 신청중	α -Interferon	Roche (Genentech) Schering-Plough (Biogen)
임상시험중 (phase III)	α -Interferon Hepatitis B vaccine	Exovir Merck (Chiron)
임상시험중 (phase II)	α -Interferon β -Interferon γ -Interferon Hepatitis B vaccine Immunotoxin-melanoma Interleukin-2 Proinsulin Retrovirus vaccine Tissue plasminogen activator	Enzo Biochem Shell Oil (Cetus) Shionogi (Biogen) Boehringer Ingelheim (Genentech) Smithkline Beckman Xoma Cetus Shionogi (Biogen) Lilly Smithkline Beckman Boehringer Ingelheim (Genentech)
임상시험중 (phase I)	Anticancer antibody (pancreatic, colorectal cancer) Epidermal growth factor γ -Interferon Immunoagent (B-cell lymphoma) Immunoagent (lung cancer) Immunoagent (skin cancer) Immunoagent (bone marrow) Immunoradiotherapeutic (hepatocellular cancer) Interleukin-2 Malaria vaccine Tumor necrosis factor	Centocor (Roche) Chiron Amgen Schering-Plough (Suntory) Damon Biotech (Biotherapy Systems) Damon Biotech (Scripps) Damon Biotech (undisclosed) Hybritech Hybritech Roche (Immunex) Smithkline Beckman Genentech

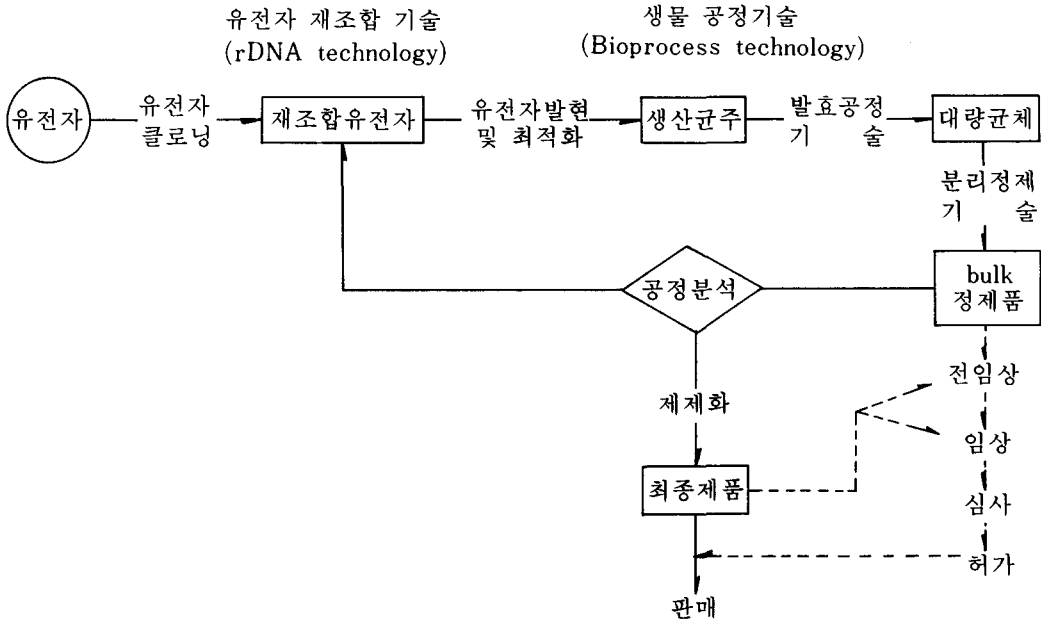


그림 1. 遺傳子 再組合 技術에 의한 製品 生産 및 工程分析 經路

촉점을 맞추어 재조합 미생물의 발효에 영향을 미치는 여러 工程變數들을 분석하고 이를 이용한 발효공정의 최적화 및 scale-up 문제 등 再組合 菌株의 醱酵工程技術에 대해 고찰해 보고자 한다.

II. 再組合 菌株의 生産性 決定 因子

미생물의 成長과 生産物 生成에 영향을 주는 因子들은 크게 細胞內的 요인과 細胞外的 인 요인으로 구별할 수 있다.⁴⁾ 세포내적 요인은 미생물 자체의 고유성능을 결정짓는 遺傳子와 단백질 생산 또는 代謝產物 생산에 필요한 세가지 공정, 즉 複制, 轉寫, 轉移에 관여하는 여러 인자들로서 유전학적 형질에 기인하기 때문에 흔히 遺傳因子(genetic factor)로 불리운다. 세포외적 요인은 미생물이 가지

고 있는 고유 성질에 영향을 미치는 環境因子(environmental factor)를 말하는 데, 유전자의 발현은 유전정보 자체뿐만 아니라 세포외적 환경인자들에 의해서도 큰 영향을 받게 된다. 그리고 이러한 유전인자와 환경인자는 그림 2에 나타낸 바와같이 상호작용에 의해 미생물의 성장 및 생산물 생성속도를 결정하게 되며 유전자 재조합 미생물의 경우도 같은 원리를 적용할 수 있다.⁵⁾

再組合 微生物을 이용하여 목적하는 생산물을 효율적으로 생산하기 위하여는 유전자 발현을 최대화 하는 것이 매우 중요한 데 再組合 微生物의 醱酵工程 開發에 있어서 종래의 미생물발효와 다른 점은 재조합 미생물의 경우 培養 環境因子 변화뿐만 아니라 유전자 조작에 의한 遺傳因子의 변화도 쉽게 가능하다는 점을 들 수 있다. 그러면 유전자 재조합 세포의 설계와 발효공정 개발에 필요한 공정 변

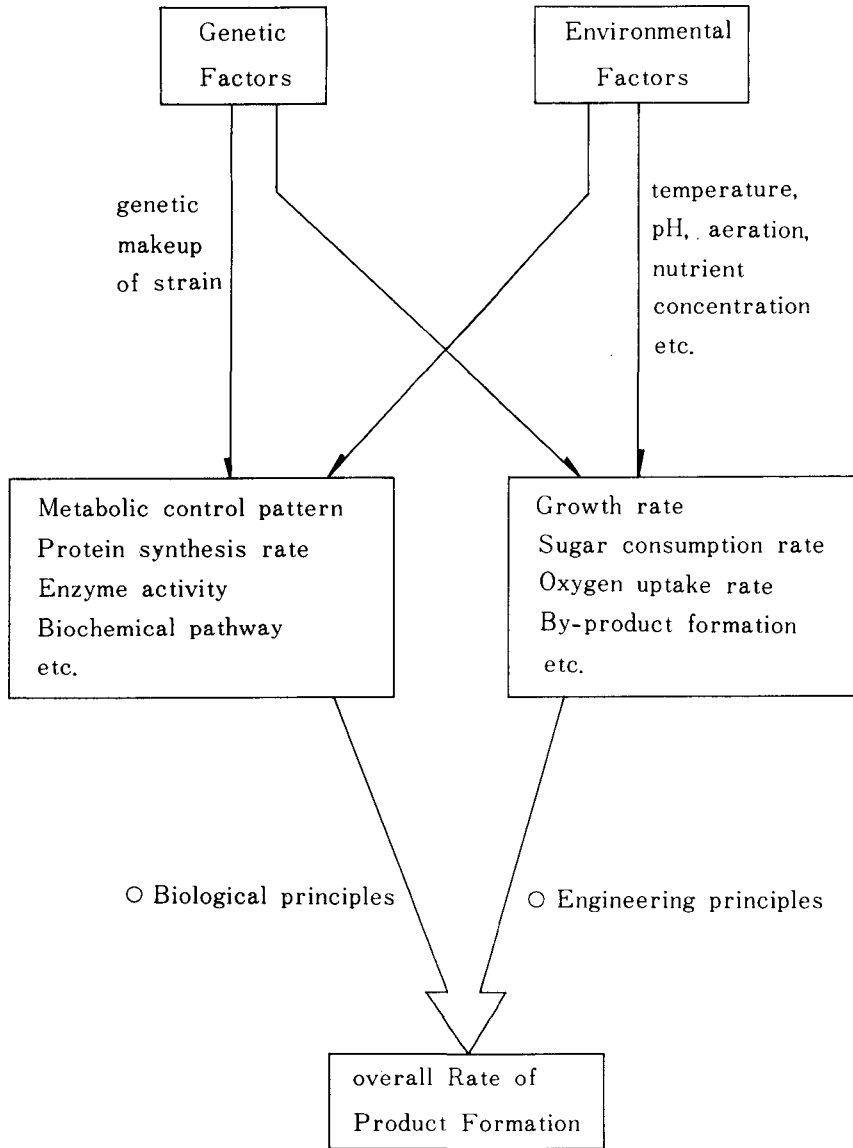


그림 2. 遺傳因子와 環境因子가 生成物 合成에 주는 영향에 대한 模式圖

수들을 微生物 工程設計變數 (microbiological process design parameter) 와 醱酵工程 設計變數 (fermentation process design parameter) 로 나누어 각각에 대하여 살펴 보기로 한다.

Ⅲ. 再組合 菌株 設計

再組合 微生物에 의한 生成物 생산을 極大化하기 위해서는 初期의 클로닝 및 재조합

表2. 再組合 菌株의 設計 變數

1. 宿主細胞의 選定
2. 遺傳子의 數 (gene dosage)
3. 轉寫 效率
4. 轉移 效率
5. 再組合 DNA의 安定性
6. mRNA의 安定性
7. 生成 蛋白質의 安定性
8. 生成 蛋白質의 分泌效率
9. 기타 轉寫 終結 效率 等

DNA 제조 단계에서 부터 세심한 설계를 하여 클론된 유전자의 발현에 필수적인 複製, 轉寫 및 轉移 工程의 각 단계별 공정효율을 최적화 하여야 하는데 이에 필요한 주요 미생물 공정 설계변수는 表2에 요약한 바와 같다. 매우 여러 인자들이 영향을 주는데 종합하여 보면 클론된 유전자의 복제, 전사 및 전이 공정의 효율을 최대화 하고 높은 효율이 오랫동안 유지 될 수 있도록 하는데 필요한 것임을 알 수 있다. 각각의 변수에 대해 다음에 간략히 설명하기로 한다.

1. 宿主 細胞의 選定

재조합 DNA 生産物을 생산하는데 가장 중요시 되는 것 중의 하나가 바로 숙주세포의 선택 및 개발이다. 이는 클론된 유전자 발현에 필요한 모든 생합성 기구들을 숙주세포가 제공하므로 숙주세포에 의해 재조합 유전자의 발현 정도가 좌우될 뿐 아니라 숙주의 특성에 따라 발효배지의 설계 등 발효공정에 큰 영향을 미칠 수 있기 때문이다.

재조합 DNA에 사용되는 숙주세포 중 가장 다양하게 개발되어 있는 것은 대장균(*E. coli*)으로서 대장균이 널리 쓰이고 있는 것은 재조

합 유전자의 설계가 용이하며 숙주의 형질을 쉽게 변형시킬 수 있기 때문이다. 한편 대장균을 숙주세포로 사용하여 재조합 DNA에 의해 醫藥用 단백질을 생산하는 경우 많은 問題點이 있는데, (1) 세포내 毒素을 정제과정시 제거하여야 하며, (2) 글리코실화가 일어나지 않고, (3) 경우에 따라서는 메티오닌이 제거되지 않는데 예를 들면 人 成長호르몬(hGH)의 경우 methGH의 형태로 생산되며, (4) 생성된 단백질을 세포 밖으로 배출시키기 어렵다는 점 등을 들 수 있다.

한편, 대장균 이외에 表3에 나타난 바와 같이 여러 菌株를 숙주로 사용 가능한데 숙주의 선택에 따라 생성 단백질의 細胞外 分泌能力, 글리코실화, mRNA 및 단백질의 분해 정도 등이 크게 영향을 받게 되며 세포의 성장속도, 배지 조성 등 醱酵因子들도 숙주에 따라 달라지게 된다.⁶⁾

2. 遺傳子의 數

클론된 유전자의 갯수는 벡터로 사용되는 플라스미드의 數에 의해 결정되어 지는데 플라스미드의 복제조절 기능에 따라 copy 數가 1~2개인 low copy 플라스미드로 부터 50~100개인 high copy 플라스미드가 있으며 가장 널리 쓰이고 있는 벡터는 multicopy 플라스미드인 PBR322나 ColE1 등이다.⁷⁾ 특이한 것으로 높은 온도에서는 복제 조절기능이 次失되어 無制限 복제가 일어나는 runaway 플라스미드가 있으며,⁸⁾ 최근에는 ColE1 플라스미드의 copy 數 조절에 관여하는 RNA II 유전자를 *P_L*, *trp*, 또는 *lac promoter*에 연결하여 플라스미드의 copy 數를 인위적으로 배양온도나 유도물질에 의해 조절할 수 있는 벡터가 Cel-itech社에 의해 개발되었다.⁹⁾

一般的으로 유전자의 數에 비례하여 재조합

表 3. 再組合 菌株用 宿主細胞의 特徵

Organism	Growth form	Vectors	RNA intron splicing	Glycosylation	Export to medium	Special features
<i>Escherichia coli</i>	Prokaryotic single cell	Numerous high-and low-copy plasmids and lambda phage derivatives	No	No	No, but potential for accumulation in periplasmic space	Outer membrane pyrogens need to be rigorously removed from pharmaceutical products
<i>Bacillus subtilis</i>	Prokaryotic single cell	Numerous plasmids and several phages	No	No	Yes	Possibility of developmentally regulated expression
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Eukaryotic single cell	Integrating (Yip), autonomous (Yep) or minichromosomal (Yep) vectors, all combined with <i>E. coli</i> replicon	Yes, but not faithful to higher eukaryote signals	Yes, but may not conform to higher eukaryotic pattern	Yes	
<i>Methylophilus methylotrophus</i> (ASI)	Prokaryotic single cell	P1 and Q group plasmids	Presumably not	Presumably not	?	Large-scale inexpensive culture on methanol and ammonia
<i>Streptomyces lividans</i>	Prokaryotic mycelium	High-and low-copy plasmids and phage derivatives	Presumably not	Presumably not	Probably	Possibility of developmentally regulated expression
<i>Penicillium Penicillium chrysogenum</i>	Eukaryotic mycelium	Under development	?	?	Probably	
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Prokaryotic single cell	?	Presumably not	Presumably not	Probably	Thermophilic growth should reduce cooling costs

DNA 생산물이 증가하나 어느 한도 이상에서는 미생물 세포의 대사기능의 저해 및 안정성 감소 등에 의해 더 이상 증가하지 않거나 감소하므로 유전자 수의 최적화가 필요하게 된다.¹⁰⁾ 한편 최근에 재조합 균주의 불안정성 방지를 위해 유전자를 Chromosome에 삽입시켜 생산하는 방법도 연구되고 있다.¹¹⁾

3. 轉寫 效率性

클론된 유전자의 전사 효율성은 프로모터의 강도와 轉寫 調節機能에 의해 결정 되며, 이상적인 프로모터는 (1) 클론된 유전자의 발현이 강력하고, (2) 전사기능의 on-off 조절이 용이하며, (3) 誘導條件에서만 작용하는 것이

바람직 하다.

재조합 DNA 생산물의 생성량을 극대화 시키기 위하여는 強力하면서 調節될 수 있는 프로모터이어야 하는데, 유전자 발현이 잘 조절될 수 있어야 하는 이유는 (1) 조절되지 않는 강력 프로모터를 함유하는 플라스미드는 안정성이 낮고, (2) 外來 단백질이 과량 생산될 경우 숙주세포에 有害하며, (3) 短時間에 高率로 단백질을 생산하는 것이 계속적인 유전자 발현보다 단백질의 분해를 감소시킬 수 있기 때문이다. 여러종류의 프로모터 중 강력하며 조절이 잘 되는 *lac*, *trp*, *P_L* 프로모터 등이 가장 널리 사용되고 있으며, (7) 최근에는 *trp*과 *lac* 프로모터를 결합하여 만든 *tac* 프로모터,¹²⁾

recA 프로모터¹³⁾ 등 새로운 portable promoter가 등장하고 있다.

한편, 유전자 발현을 높이기 위하여 강력한 프로모터를 사용하는 경우 흔히 벡터의 다른 유전자, 특히 replicon 등의 轉寫에 영향을 주어 오히려 낮은 경우가 있는데 이런 경우 클론된 유전자의 轉寫終結을 위해 강한 terminator를 삽입하여 클론된 유전자와 벡터의 다른 유전자간의 상호작용이 없도록 하는 것도 중요하다.¹⁴⁾

4. 轉移 效率性

전이 공정의 효율은 리보솜 結合部位의 塩基序列, 이와 단백질 合成 始作 코돈인 ATG (또는 GTG)와의 간격, mRNA의 二次構造 및 유전자의 코돈使用 (codon usage) 등 여러 인자에 의해 결정 되어진다.^{15, 16)}

흔히 Shine-Dalgarno(SD) 염기 서열이라고 불리는 리보솜 결합부위는 단백질 합성 코돈에서 7~10염기 앞에 있으며 16S rRNA의 3' 말단 염기서열과 Complementary 한 부분이다. 최근 Roche社에서는 재조합 미생물의 유전자 발현을 증대시키기 위하여 컴퓨터를 이용한 분석결과 얻어진 理想的인 리보솜 결합부위의 염기서열(T T A A A A T T A A G G A G G ; 윗줄친 부분은 SD 염기서열)을 합성하여 유전자 발현 벡터를 만들어 인터페론, 인터루킨-2 등 여러 재조합 DNA 제품을 세포내 단백질 양의 10~20%까지 만들 수 있었다고 발표하였다.¹⁷⁾

한편 SD염기서열과 ATG사이의 간격에 의해 유전자 발현 정도가 매우 크게 영향을 받음은 잘 알려진 사실인데, 대표적인 예로 *trp* 프로모터를 이용한 알파 및 베타 인터페론 생산의 경우 최적 기간은 9 base pair로서¹⁸⁾ 대장균의 경우 대부분 6~12 bp 사이에 최적 간격

이 존재한다. 그러나 같은 간격을 갖는 경우에도 SD-ATG 간의 DNA Sequence에 따라 큰 차이를 나타내어,¹⁹⁾ 전이효율을 극대화 하기 위해서는 mRNA의 이차구조등의 영향도 고려하여야 하는 데 mRNA가 Stem-loop 구조를 형성하여 SD염기 서열 부분이 single strand가 아닌 경우 전이효율이 크게 감소하는 것으로 알려져 있다.¹⁶⁾

5. 再組合 DNA, mRNA 및 단백질의 安定性

클론된 유전자 및 운반체인 벡터로 구성된 재조합 DNA 그리고 이로부터 생성된 mRNA와 단백질이 안정하게 유지될 수 있어야만 재조합 균주의 생산성을 높일 수 있다. 재조합 DNA의 安定性은 생산성에 큰 영향을 주기 때문에 다음의 발효공정 설계변수 항목에서 상세히 설명하기로 하겠다.

일반적으로 mRNA나 단백질의 안정도는 미생물의 배양 환경조건이 나쁠수록 분해속도가 높으며 온도가 높을수록 반감기가 짧아지는 것으로 알려져 있다.^{20, 21)} 또한 단백질의 안정성은 세포내의 위치에 의해서도 달라지는 데 인슐린의 경우 cytoplasm에 존재하는 경우에는 반감기가 2분인데 반해 periplasm으로 분비 시켰을 경우 10배 이상 안정한 것으로 보고되고 있다.²²⁾ 또한 숙주세포의 유전형질, protease의 존재 유무등에도 영향을 받으며,²³⁾ 단백질이 不溶性인 상태로 존재하는 경우에는 단백질의 분해가 크게 감소되는 것으로 알려져 있다.²⁴⁾

6. 단백질 分泌效率

재조합 DNA 단백질이 세포내에 과잉 축적되는 경우 불용성으로 인하여 분리 정제에 큰 어려움이 있을 뿐만 아니라 단백질의 活性度

가 크게 감소되어 최근들어 생성된 단백질의 細胞外 分泌에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으나 아직 배양액 중의 생성 단백질 농도는 數+mg/l 정도로 아직은 만족스러운 수준에 도달하지 못하고 있다.²⁵⁾ 한편 단백질을 세포외로 분비시킬 경우 (1) 분리·정제 공정이 용이해져 생산비를 절감시킬 수 있으며, (2) 分泌된 단백질의 N-말단 아미노산 잔기가 자연형과 같게 되며, (3) 미생물에 toxic 한 단백질의 경우도 세포내의 축적이 적으므로 과량 생산이 가능하다는 장점이 있다. 현재 secretion system 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 재조합 DNA 단백질을 배양액에 효율적으로 분비시킨 예로 表4에 예시한 대장균 외에 *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Saccharomyces Cerevisiae* 등을 이용한 경우를 들 수 있다.^{25, 26)}

IV. 醱酵工程 設計

再組合 菌株을 이용한 발효의 경우에도 기본적으로 지금까지의 미생물 발효에 일반적으로 적용되어 왔던 여러 발효공정 설계변수 모두를 고려하여야 한다. 일반적인 발효공정 설계변수로는 表5에 정리한 바와 같이 배지 설계, 생물반응기 설계, 기타 배양조건에 관련된 변수들로 크게 구분할 수 있다. 또한 生産規模의 발효공정을 설계하는 경우에는 醱酵槽의 크기, 醱酵槽 형태(교반형, 기거형, 관형, 유동층형等) 및 운전방식(회분식, 流加式, 연속식等)을 선정해야 하며, 최적 조업을 위한 醱酵工程 制御 裝置의 설비가 필요하다.

재조합 미생물을 이용하여 대량 생산을 하는 경우 가장 문제가 되는 것은 재조합 균주

表4. 再組合 大腸菌을 利用 細胞外 分泌에 의해 生産된 蛋白質의 例²⁵⁾

단 백 질	방 법	연 구 자
Human growth hormone	osmotic shock	W. Roskam (SANOFI)
Mouse interleukin-2	osmotic shock	R. Kastelein (DNAX)
Human interleukin-2	osmotic shock	R. Kastelein (DNAX)
<i>E. coli</i> alkaline phosphatase	<i>lky</i> mutant host	Lazzaroni and Portalier (1982) Atlan and Portalier (1984)
<i>E. coli</i> β -lactamase	<i>lky</i> mutant host	Fognini-Lefebvre and Portalier (1984)
<i>E. chrysanthemi</i> pectinases	<i>lky</i> mutant host	Portalier et al. (pers. commun.)
Rat proinsulin	<i>lky</i> mutant host	Mosbach et al. (1983)
<i>Cellulomonas fimi</i> cellulase	<i>lky</i> mutant host	Gilkes et al. (1984)
<i>Bacillus subtilis</i> penicillinase	'Secretion gene'	Kato et al. (1983) Kudo et al. (1983)
Human γ -interferon	'Secretion gene'	(Mitsui Toatsu Chemicals)
<i>Streptococcus equisimilis</i> streptokina	'Self secretion'	Malke and Ferreti (1984)
<i>Bacillus subtilis</i> endo- β -1, 3-1, 4-glucanase	'Self secretion'	B. Cantwell (pers. commun.)
<i>Thermomonospora</i> cellulase	'Self secretion'	B. Wilson (Meeting report, Biotechnology April, 1983)
<i>Serratia marcescens</i> nuclease	'Self secretion'	Clegg and Allen (1985)

表5. 醱酵工程 設計 變數

1. 培地 設計
(1) 탄소원의 종류 및 농도
(2) 질소원의 종류 및 농도
(3) 미량원소의 종류 및 농도
(4) 기타 유도물질, 전구물질 등의 농도
2. 培養 條件 設計
(1) pH
(2) 배양온도
(3) 용존 산소
3. 醱酵工程 設計
(1) 발효조 형태
(2) 발효조 조업방식
(3) 발효 프로세스 제어 장치
4. 醱酵槽 設計
(1) 교반속도
(2) 통기량
(3) 동력
(4) 기질 유가속도, 희석율 등

의 안정성인 데, 안정성 유지를 위해 종균 배양, 배지설계등에 세심한 주의가 필요하다. 또한 재조합 미생물의 경우 일반적으로 환경인자의 변화에 매우 민감하여 환경인자들 특히 온도, pH, 용존산소 농도 등의 정밀제어가 요구되어 지고 있으며²⁹⁾ 유전자 발현이 배양온도나 유도물질에 의해 조절되는 경우는 이러한 유전자 발현시기의 최적화가 필요하다. 한편 단백질을 세포외로 분비시키는 경우 배지로 배출된 단백질이 교반등에 의한 剪斷應力에 의해 불활성화가 일어나지 않도록 하여야 하며 biosafety지침에 따른 발효후의 재조합 미생물의 멸균처리등도 고려 하여야만 한다.²⁹⁾

이상에서 재조합 미생물의 발효공정 설계를 위해 고려되어야 할 사항들을 소개하였는 데

다음에 각 공정변수들의 영향에 대해 좀 더 상세히 살펴 보기로 한다.

1. 再組合 菌株의 安定性

이미 언급한 바와 같이 재조합 균주의 안정성은 유전공학 기술을 이용한 제품 생산에서 매우 중요한 위치를 차지하고 있다. 재조합 DNA의 불안정성은 두가지로 구분되는 데 클론된 유전자의 變形에서 비롯되는 불안정성을 構造的 不安定性 (Structural instability) 이라고 하고 벡터로 사용되는 플라스미드가 세포 분열시 不均等 分배에 의해 소실되는 현상을 分配的 不安定性 (segregational instability) 이라 하는 데 어느 경우나 재조합 균주의 生成能 이 없어지게 된다.

재조합 미생물의 안정성에 영향을 미치는 遺傳因子로서는 (1) 플라스미드 벡터의 성질 및 구성, (2) 숙주 세포의 유전적 형질, (3) 유전자 發現 정도 및 copy數 등이 있으며, 이외에 (4) 배양온도, (5) 제한 영양소의 종류, (6) 稀釋率, (7) 반응기 조업방식 등과 같은 環境因子들에 의해서도 영향을 받는다.³¹⁻³³⁾

一般的으로 재조합 균주는 클론된 遺傳子의 發現으로 인해 세포성장의 저해를 받기 때문에 일단 재조합 DNA를 함유하지 않은 세포가 생기게 되면 이 세포의 빠른 증식으로 인해 재조합 균주의 비율이 감소 生産性이 크게 떨어지게 된다. 그림 3에 나타낸 실험결과로부터 유전자 발현이 재조합 균주의 比成長速度와 安定性에 미치는 영향을 알 수 있는데 이 실험에서는 유전자 발현이 배양온도에 의해서 조절되는 P_L 프로모터를 사용하였다.⁵³⁾

사용된 재조합 균주의 경우 배양온도가 증가하여 유전자 발현이 증가 할수록 비성장속도가 급속히 감소하며 또한 재조합 균주의 안정성도 크게 저해됨을 보여주고 있다. 또한 연

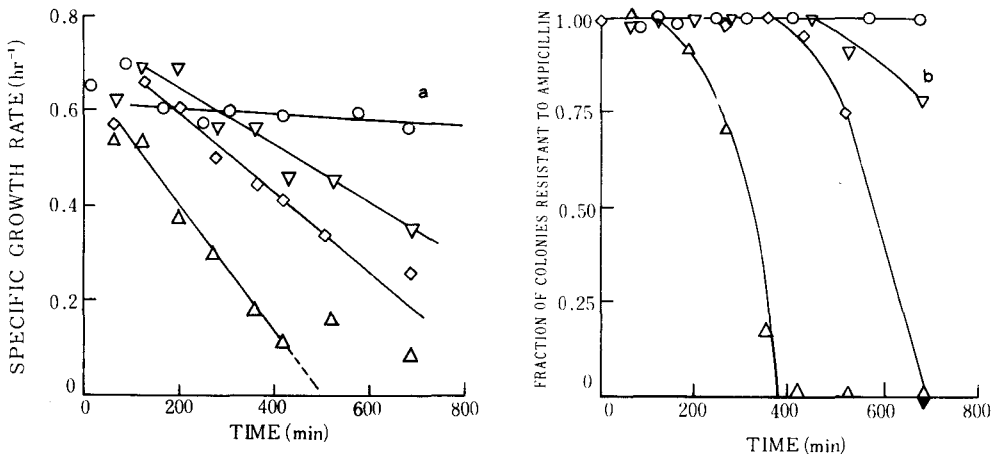


그림 3. 유전자 발현에 따른 比增殖速度的 감소 및 不安定性 증가 현상

(*E. coli* K12/pPLC23 *trp A1* ; (○)38.2°C, (▽)38.6°C, (◇)39.0°C, (△)39.5°C)

속배양의 경우 회분배양에 의해 재조합 균주의 안정성 유지가 더욱 어려운 데 최근 2 단 연속배양 시스템을 이용 成長段階 (growth stage) 와 生産段階 (production stage) 를 분리하여 유전자 발현을 조절하는 경우 안정성을 높게 유지시킬 수 있음이 밝혀져 연속배양에서 발생하는 불안정성 문제를 해결할 수 있을 것으로 전망되고 있다.³⁴⁾

한편 재조합 미생물의 安定化를 위하여는 환경조건을 플라스미드가 소실된 미생물이 증식할 수 없도록 Selection pressure 를 추가하거나 유전학적 변이에 의해 재조합 균주의 안정성을 유지시킬 수 있도록 하여야 하는데 재조합 미생물의 안정화 방법을 열거하면 표6에 정리한 바와 같다. 이들 중 가장 널리 쓰이는 방법중의 하나인 항생제 첨가법은 대규모 산업적 발효의 경우 다량의 항생제가 필요하여 생산비의 추가 부담이 되며 의약품 생산시는 첨가된 항생제를 제거해 주어야 하는 단점이 있다. 최근에는 숙주세포에 영양 요구성을 도입하여 요구 영양물질의 생성에 필요한 유전자

表6. 再組合 菌株의 安定化 方法

1. 化學的 selection pressure 를 加하는 方法
 - (1) 항생제 첨가
 - (2) 영양 요구성 변이 균주의 사용
2. 物理的 selection pressure 를 加하는 方法
 - (1) 온도의존성 플라스미드의 사용
3. 細胞內的 selection pressure 를 加하는 方法
 - (1) λ lysogen 이용 (Lilly社 개발)
 - (2) streptomycin 의존성 이용 (Ajinomoto社 개발)
4. 遺傳學的 方法
 - (1) *par*, *cer* 유전자의 사용
 - (2) *rec⁻* 숙주의 사용
5. 遺傳子 發現 調節 方法
 - (1) induction/repression 의 조절
 - (2) 2 단 연속 배양법

를 플라스미드에 함유시켜 플라스미드가 유실되면 미생물이 증식하지 못하도록 하는 방법

이 널리 쓰이고 있으나³⁵⁾ 이 경우 배지 설계 시 defined media를 사용해야 하므로 배지 선택이 어려운 점이 있다.

한편 자연계에 존재하는 플라즈미드의 안정성 유지 메카니즘의 연구로 플라즈미드의 안정화에 관여하는 유전자를 밝혀내었는데 현재 알려진 것으로는 pSC101 플라즈미드의 *par* 유전자와 ColE1 플라즈미드의 *cer* 유전자를 들 수 있으며^{36, 37)} *par* 부위를 재조합 DNA에 함유시켜 안정성을 향상시킨 보고도 있으나³⁸⁾ 모든 경우에 안정화 현상을 나타내지는 않아 이 방법도 완전한 해결책은 되지 못하고 있다.³⁹⁾ 그밖의 유전학적 안정화 방법은 Lilly社와 Ajinomoto社에서 개발한 internal selection pressure를 사용하여 플라즈미드 함유 미생물 균주를 선택적으로 남게 하는 방법이 있으며,^{40, 41)} 그 이외에 *rec⁻* 형질을 갖는 숙주를 사용하여 안정성을 향상시킬 수 있다.

재조합 미생물의 불안정화를 감소시키는 방법으로서 비교적 쉽게 행할 수 있으며 앞에서 언급한 바와 같이 영양 요구성 도입이나 별도의 유전자 조작 등이 필요하지 않은 산업적으로 가장 實用的인 방법은 유전자 발현의 조절을 이용하는 방법이다. 즉, 유전자 발현의 유도와 억제가 조절 가능한 프로모터를 사용 세포의 성장시기와 생산물 생성시기를 분리하여 세포내의 대사 활성이 충분할 때 까지는 유전자 발현을 억제시킨 후 비교적 짧은 시간에 유전자 발현을 시킴으로서 재조합 DNA 생산물의 과량 생산에 따른 재조합 균주의 불안정성 유발을 감소시키는 방법이다. 이미 언급한 바 있는 2 단식 연속 배양 시스템을 사용하여 재조합 미생물을 장시간 안정하게 유지시키는 방법도 유사한 원리를 응용한 것이다.

재조합 미생물의 안정성 문제는 특히 scale-up 과정에서 주의하여야 하는 데, 재조합 균

주가 high expression인 경우 초기 Slant에서는 모두 플라즈미드를 함유하고 있었다 하더라도 생산 발효조까지 transfer 되는 과정에서 전체 미생물의 일부만이 재조합 DNA를 가지고 있어 생산성이 크게 저하될 수 있기 때문이다.⁴²⁻⁴⁴⁾

2. 醱酵培地の 設計

일반적으로 발효배지의 비용이 生産費(production cost)의 40~70%를 차지 발효공정의 경제성 결정에 큰 비중을 차지하는 것중의 하나로서, 재조합 균주의 발효시 특히 배지 설계에 세심한 주의가 필요하다.⁴⁵⁾ 재조합 미생물의 배지 선택은 사용되는 숙주 및 생산물질에 따라 결정되어 지어야 하나 적어도 다음과 같은 사항을 고려하여야 한다.⁴⁶⁾

(1) 재조합 균주의 안정성 유지를 위한 영양 요구성 또는 selection pressure의 필요성 유무.

(2) 생산물 합성에 필요한 전구물질 또는 유도물질의 요구성 및 최적농도 결정.

(3) 분리·정제를 저해하는 물질의 존재 유무.

(4) 상업적 복합배지로의 대체 가능성 여부.

처음의 재조합 균주의 안정성과 배지 설계의 관계에 대해서는 이미 앞에서 설명하였으므로 再組合 菌株의 安定性 부분을 참조 바라며, 두번째의 경우 유전자 발현의 조절을 위해 誘導物質(inducer)을 사용하는 경우에는 최적 농도의 결정 또한 매우 중요하다. 예를 들어 *trp* 프로모터를 사용하여 haemagglutinin⁴⁷⁾ 과 면역 글로블린 단백질¹⁹⁾을 생산한 경우 유도물질로 indoleacrylic acid (IAA)를 사용하였는데 두 경우 모두 최적의 유도물질의 농도가 존재하며 같은 *trp* 프로모터를 사용한 경우에도 생성된 단백질의 종류에 따라 최적

IAA의 농도가 다르게 나타나고 있다. 또 다른 예로 *recA* 프로모터를 이용 배타-인터페론을 생산한 경우에도 유도물질인 nalidixic acid의 최적 농도가 존재하고 있다.⁴⁸⁾

한편, 분리 정제 공정과 배지설계와의 관계는 우선 생성된 단백질의 축적 장소에 따라 다른데 세포내에 축적되는 경우에는 crude complex media의 사용이 가능하나 細胞外로 分泌되어 배지내에 축적되는 경우 complex media 사용에 따른 정제 과정에서의 어려움이 따르게 된다. 일반적으로 defined media를 사용하는 경우 재조합 균주의 안정성 유지 및 분리 정제 과정을 용이하게 하는 장점이 있으나 비용이 많이 드는데 비해 complex media의 경우 경제적이라는 이점이 있어, 産業的인 再組合 菌株의 醱酵 경우 여러가지 사항을 종합적으로 분석하여 배지를 설계하여야 한다. 가장 널리 사용되고 있는 재조합 대장균의 경우를 보면 실험실 규모에서는 흔히 L-broth (yeast extract, tryptone, NaCl)를 사용하나 산업용

으로는 매우 비경제적이므로 합성배지 또는 복합배지의 개발이 바람직하다. 참고로 표 7에 재조합 대장균을 이용한 알파-인터페론의 pilot scale (2,000리터 규모)에 사용된 Corn Steep liquor 培地⁴⁹⁾ 소개하였다.

3. 培養 溫度

재조합 미생물의 숙주세포로 가장 널리 사용되고 있는 대장균의 경우 최적 배양온도는 37°C로 알려져 있으나 재조합 DNA 단백질 생산의 경우는 이보다 낮은 온도에서 조업하는 경우가 많은데 인터페론과 인슐린의 경우 생산을 극대화하는 최적 배양온도가 30°C인 것으로 보고되고 있다.^{49, 50)} 인슐린 생산의 경우 배양온도가 증가함에 따라 인슐린의 단백질 반감속도가 크게 증가, 생성된 인슐린의 분해속도를 줄이기 위해 배양온도를 37°C에서 30°C로 낮춘 결과 인슐린 생성을 약 3배 증가시킬 수 있었다고 발표하였다. 또한 재조합 대장균을 이용한 human epidermal growth factor 생산의 경우도 30°C의 경우가 37°C에서 보다 2배 이상 증가하는 것으로 나타나고 있다.⁵¹⁾

배양온도는 재조합 균주의 여러가지 대사기능에 영향을 미칠 수 있는 데 단백질의 분해속도 외에도 재조합 균주의 안정성에도 큰 영향을 미치므로 배양 온도 변화에 따른 여러 발효 공정변수의 영향을 조사 분석하여 최적 배양온도를 결정하여야 할 것이다.

4. 稀釋率 (dilution rate)

재조합 미생물을 연속적으로 배양하는 경우 희석율이 재조합 DNA 생산물의 생성에 큰 영향을 미치는 데 연속배양에서의 희석율은 바로 미생물의 比增殖速度 (specific growth rate)와 같기 때문에 결국은 미생물 성장속도가 생성물 생산에 주는 영향과 같은 의미를 갖게

表 7. 再組合 大腸菌 醱酵用 corn steep liquor 培地の 組成

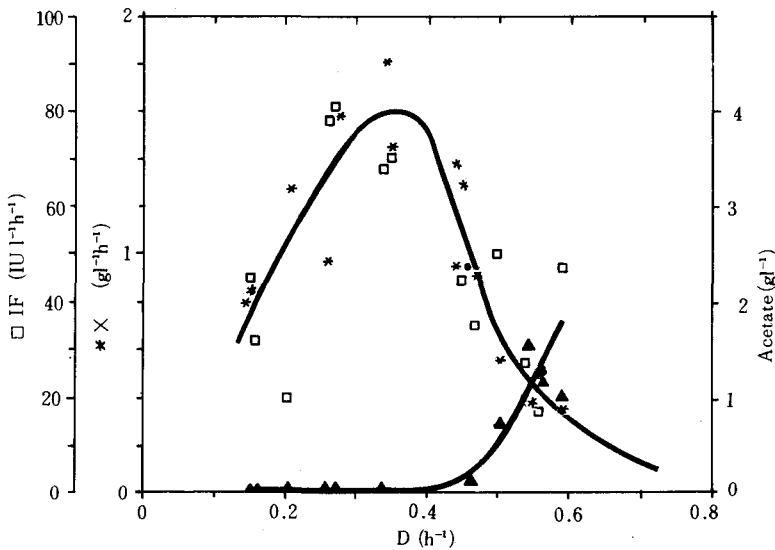
培地成分	含量 (liter當)
Corn steep liquor	80g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.98g
KH ₂ PO ₄	0.2g
Trace element solution	1ml
Antifoam PPG	1ml
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.03g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.0003g
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.0003g
Glucose	8g
Tetracycline-HCl	0.01g

된다. 미생물의 성장속도는 앞서 설명한 바와 같이 미생물의 고유한 유전형질과 주어진 환경 조건에 의해 결정되어 지므로 성장속도에 의한 영향은 결국 배지 조성의 설계등 발효공정 설계변수의 영향을 간접적으로 시사할 수 있다.

일반적으로 성장속도의 증가에 따라 Chromosomal DNA의 양은 증가하는 데 반해 R1, ColE1, pBR322 등 대부분의 플라스미드 DNA의 경우는 성장속도가 빠를수록 세포당 DNA의 수 즉 copy number가 감소하는 것으로 밝혀져 있다.^{52, 53)} 그러나 최근 *Bacillus Stearothermophilus*에 함유된 penicillinase 생산 pLP11 플라스미드의 경우는 성장속도의 증가에 따라 플라스미드의 양이 증가하거나 거의 변화하지 않는 것으로 보고되어,⁵⁴⁾ 플라스미드 또는 숙주의 종류에 따라 성장속도에 따른 플

라스미드 copy number의 변화가 다를 수 있음을 보여주고 있다.

재조합 미생물의 성장속도에 따라 플라스미드의 數, 즉 클론된 유전자의 농도가 변하게 되므로 재조합 DNA 생산물의 생성량도 성장속도 또는 회석율에 의해 영향을 받게된다. 앞서 인용한 pLP11 플라스미드의 경우 생성된 penicillinase의 활성을 최대로 하는 최적 회석율이 존재하는 데 최적 회석율은 배양 온도에 따라 다르게 나타나고 있다.⁵⁴⁾ 이밖에도 재조합 대장균을 이용한 알파-인터페론 생산의 경우에도 최적 회석율이 존재하는 것으로 보고되어 있는 데⁴⁹⁾ 이 경우 높은 회석율에서는 배지내 acetate의 축적이 증가 이로 인한 세포성장 저해에 의해 최적 회석율이 존재하는 것으로 해석 되어진다. (그림 4 참조)



Interferon and biomass productivity in the first stage. Acetate formation.

그림 4. 再組合 大腸菌의 連續 培養에 의한 interferon 生産時 稀釋率에 따른 interferon 및 acetate 生成관계

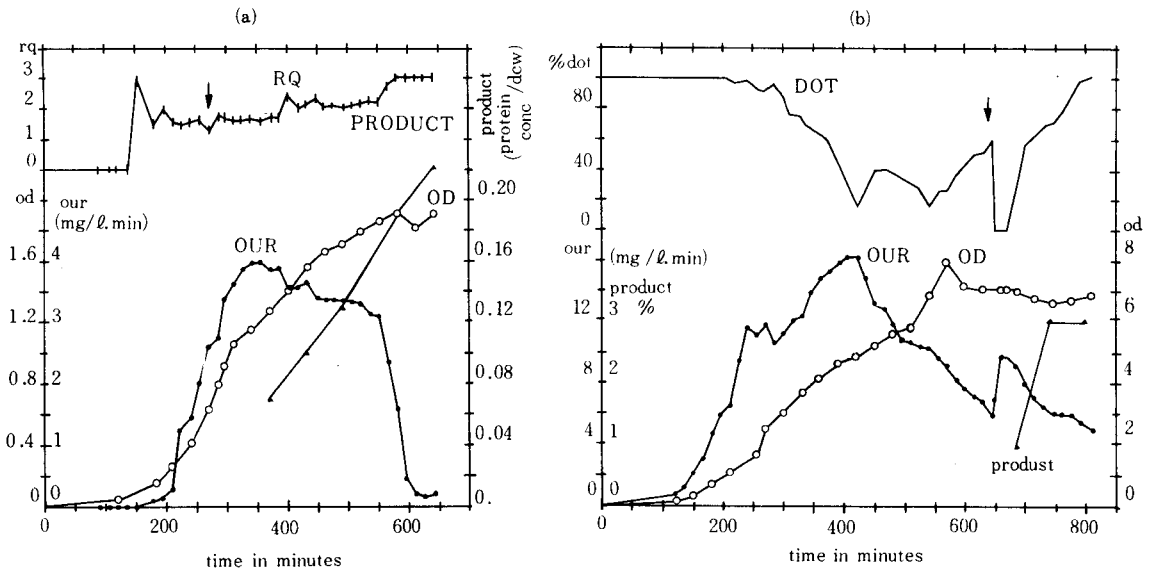


그림 5. 再組合 大腸菌을 이용한 EcoRI 制限酵素 生産(화살표는 誘導時期를 表示)

(a) early induction (b) late induction

(註: OUR: oxygen uptake rate, RQ: respiratory quotient, OD: optical density, DOT: dissolved oxygen tension)

5. 遺傳子 發現의 誘導時期 및 酸素 要求量

재조합 미생물의 유전자 발현의 조절이 매우 중요하며 다량의 재조합 DNA 생산물을 생성하는 경우 산소요구량이 증가함은 앞에서 이미 언급하였는데 유전자 발현의 유도시기의 결정과 산소의 원활한 공급은 재조합 균주의 발효에 있어 매우 중요한 위치를 차지하고 있다. 최근 연구된 EcoRI 제한효소의 생산 예가 이들의 중요성을 가장 잘 보여 주고 있다.⁵⁵⁾ 사용된 재조합 플라스미드 pEcoR312는 P_L 프로모터에 의해 배양 온도에 따라 유전자 발현이 조절되는데 pEcoR312를 함유한 재조합 대장균을 20ℓ 발효조에 배양시키면서 발효도

중 배양온도를 30℃에서 42℃로 바꾸어 주어 유전자 발현을 유도시킨 실험 결과를 그림5에 도시하였다. 첫번째 그림은 logarithmic phase에서 발현을 유도한 경우이며, 두번째는 stationary phase에 들어간 후에 유전자 발현을 유도한 경우이다. 유전자 발현의 유도시기에 따라 여러가지 발효 변수의 변화양상이 크게 다를 수 있는데 early induction의 경우 생성된 효소의 양이 총 단백질의 22%인데 비해 late induction인 경우는 단지 3~4%에 불과하며, 유전자 발현이 유도되어 효소생산이 증대되는 시점에서의 산소 요구량이 매우 높음을 알 수 있다. 특히 late induction의 경우에는 용존산소가 급격히 감소되어 용존산소의 부족현상이 일어남을 보여주고 있다.

6. 醱酵槽 運轉方式

재조합 균주의 발효의 경우도 일반 발효의 경우와 같이 (1) 回分式 (2) 流加式 (3) 連續式, 그리고 (4) 固定化 充填式이 현재 사용되고 있는데 재조합 미생물의 생산성 향상을 위한 발효공정 개발 연구로서 재조합 미생물의 高濃度 培養과 固定化 재조합 세포를 이용한 연속식 생산이 주목을 받고 있다.

최근 流加式 培養法 (fed-batch operation) 에 의해 플라즈미드를 함유한 大腸菌 및 枯草菌의 세포농도를 60~80g/l 까지 증가시킬 수 있었다는 발표가 있었으며,^{56, 57)} 인슐린 유전자를 함유하는 *B. Subtilis* 를 고정화시켜 연속 생산을 한 보고가 있는데 이 경우 細胞外 分泌를 위해 *B. Subtilis* 의 penicillinase signal sequence 를 사용하였다.⁵⁸⁾ 또한 leaky mutant 를 이용한 재조합 대장균의 고정화 및 연속식 생산에 대한 연구도 최근 활발히 진행되고 있

으나⁵⁹⁾ 상업적으로의 성공 여부는 좀 더 시간을 두고 기다려 보아야 할 것으로 전망된다.

이상에서 재조합 균주의 醱酵時 고려하여야 할 주요 발효공정 변수의 영향에 대하여 살펴 보았는데, 日本로슈社에서 재조합 대장균을 이용하여 알파-인터페론을 生産한 醱酵 例를⁶⁰⁾ 보면 여러 공정변수의 영향을 종합적으로 알 수 있어 마지막으로 소개하고자 한다.

그림 6 에 실험결과를 나타내었는데 실험에 대한 설명이 전혀 없으나 이 data로 부터, 다음과 같은 사항을 알 수 있다. (1) 화살표로 표시된 시점에서 induction 을 시켰는데 이른바 early induction 형태를 취했으며, 誘導時期를 기점으로 하여 (2) 포도당을 feeding 하고, (3) 교반속도를 300rpm에서 600rpm으로 점차 증가시켰으며, (4) 배양온도를 37°C에서 29°C, 25°C로 낮추면서 조업하고 있다. 이러한 조업방식을 취한 이유에 대해서는 앞서 살펴본 재조합 균주의 발효공정 변수의 영향으로 부터 다음과

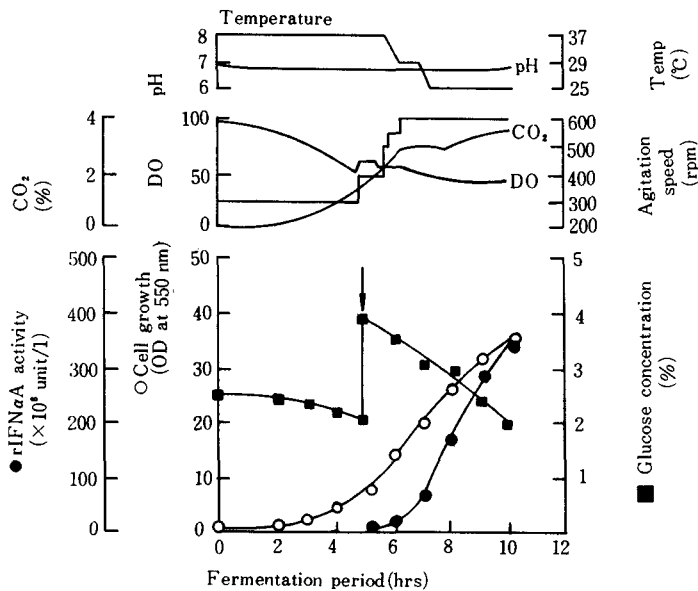


그림 6. 再組合 大腸菌을 利用한 α -interferon 醱酵生産 例

같이 유추 할 수 있다. 재조합 균주의 對數增殖期 도입 시점에서 유전자 發現을 誘導하는 early induction을 시킨 것은 앞에서 예를 들은 EcoRI 제한효소 생산의 경우와 같은 이유로 설명될 수 있으며, 유전자 발현에 따른 탄소원의 수요 증가 및 산소 요구량 증가를 충족시키기 위하여 流加式으로 포도당을 공급하는 한편 산소 공급 속도를 늘이기 위해 발효조의 교반속도를 증가시켰으며 또한 생성된 단백질의 安定性 유지를 위해 배양온도를 점차 낮추어 가며 조업한 것으로 해석되어 진다. 인용한 실험 예로부터 再組合 菌株의 醱酵工程 最適化를 위해서는 生産性에 관계되는 여러 공정 변수의 영향을 종합적으로 분석, 조업조건 또는 조업방식의 결정이 이루어져야 함을 단적으로 알 수 있으며 이를 위해서는 경험적적과 아울러 기본 원리의 이해가 중요하다 하겠다.

V. 結 言

遺傳子 再組合 技術을 이용하기 시작하던 초기에는 유전자 클로닝이 이루어지면 재조합 DNA 제품을 大量生産하는 것이 용이하게 이루어 지리라 많은 사람들이 생각하였으나 그후 개발연구 과정을 통해 클로닝 및 유전자 발현 단계와 생산단계에서 상업화를 위해 넘어야 할 큰 장애물이 生産工程 開發이라는 것을 깨닫게 되었는데 生産공정 개발과정은 醱酵工程 開發을 비롯하여 分離·精製工程 및 Scale-up (그리고 좀 더 넓게는 製品化 과정과 의약품의 경우 임상실험 과정等)까지를 포함한다. 全工程의 開發을 위해서는 再組合 菌株의 개발과 生産工程 개발간의 理想的인 조합이 필요한 바 이는 재조합 유전자의 설계에 따라서 발효공정이나 분리·정제공정等 後方工程 (downstream process)에 큰 영향을 줄 수 있기 때문

이다. 결국, 목적하는 물질을 遺傳工學技術에 의하여 효율적으로 생산하기 위하여는 초기 유전자 클로닝 및 發現 단계에서 부터 후방공정을 고려한 設計가 요구되어지며 工程分析을 통하여 再組合 細胞의 設計에서 부터 醱酵 및 정제에 이르기까지 全 工程의 最適化가 필요하게 되는 것이다.

本 總說에서는 生産工程의 核心이라 할 수 있는 醱酵工程에 필요한 공정 변수들의 영향을 분석함으로써 再組合 菌株의 醱酵技術에 대하여 고찰하였는 바 특히 재조합 균주 설계에 필요한 微生物 工程變數와 발효 설계를 위한 醱酵工程變數와의 상호관계에 역점을 두어 기술하였다. 이는 재조합 균주의 특성을 잘 理解 함으로서 보다 효율적인 발효를 수행할 수 있을 것으로 생각되었기 때문이다.

끝으로, 조그만 努力으로 이루어진 本 總說이 많은 분들께 도움이 되어 줄 수 있기를 바라며 좀 더 상세한 자료를 필요로 하시는 분을 위해 참고문헌 하나를¹⁾ 더 소개하면서 이 글을 마치고자 한다.

VI. 參考文獻

1. Chemical Week, December 18, p. 26, 1985.
2. Chemical & Engineering News, November 18, p. 25, 1985.
3. 「Commercial Biotechnology」, Office of Technology Assessment, 1984.
4. A. Fiechter, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 30, 7 (1984)
5. J. E. Bailey, M. Hjortso, S. B. Lee, and F. Srienc, Ann. New York Acad. Sci., 413 71 (1983)
6. D. A. Hopwood and A. W. B. Johnston,

- Symp. Soc. Gen. Microb, 36, 257 (1984).
7. R. Thompson, In 「Genetic Engineering3」 (Ed. R. Williamson) p. 1, Academic Press, 1982.
 8. B. E. Uhlin, S. Molin, P. Gustafsson, and K. Nordström, *Gene*, 6, 91 (1979).
 9. G. T. Yarranton, E. Wright, M. K. Robinson, and G. O. Humphreys, *Gene*, 28, 293 (1984).
 10. S. B. Lee, A. Seressiotis, and J. E. Bailey, *Biotechnol. Bioeng*, 27, 1699 (1985)
 11. O. Makino, T. Sato, T. Shibata, and T. Ando, *Agric. Biol. Chem.*, 50, 501 (1986).
 12. H. A. Deboer, L. Comstock, and M. Vasser, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 80, 21 (1983)
 13. M. Shirakawa, T. Tsurimoto, and K. Matsubara, *Gene*, 28, 127 (1984)
 14. G. Simons, E. Remaut, B. Allet, R. Devos, and W. Fiers, *Gene*, 28, 55 (1984); R. Gentz, A. Langer, A. C. Y. Chang, S. N. Cohen, and H. Bujard, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78, 4936 (1981)
 15. L. Gold, D. Pribnow, T. Schneider, S. Shinedling, B. S. Singer, and G. Stormo, *Ann. Rev. Microbiol.* 35, 365 (1981).
 16. M. Gouy and C. Gautier, *Nucleic Acids Res.* 10, 7055 (1982); J. L. Schottel, J. J. Sninsky, and S. N. Cohen, *Gene*, 28, 177 (1984)
 17. R. Crowl, C. Seamans, P. Lomedico, and S. McAndrew, *Gene*, 38, 31 (1985).
 18. H. M. Shepard, E. Yelverton, and D. V. Goeddel, *DNA*, 1, 125 (1982).
 19. T. Kurokawa et al., *Nucleic Acids Res.* 11, 3077 (1983).
 20. G. Nilsson, J. G. Belasco, S. N. Cohen, and A. von Gabain, *Nature*, 312, 75 (1984).
 21. N. M. Fish and M. D. Lilly, *Bio/Technol.*, 2, 623 (1984).
 22. K. Talmadge and W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79, 1980 (1982).
 23. S. A. Goff, L. P. Casson, and A. L. Goldberg, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81, 6647 (1984).
 24. S-H. Shen, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81, 4627 (1984)
 25. J-M. Nicaud, N. Mackman, and I. B. Holland, *J. Biotechnol.*, 3, 255 (1986).
 26. I. Palva et al., *Gene*, 22, 229 (1983).
 27. G. L. Gray et al., *Biol/Technol.*, 2, 161 (1984).
 28. R. A. Smith, M. J. Duncan, and D. T. Moir, *Science* 229, 1219 (1985).
 29. D. J. Hopkins et al, paper presented at the annual meeting of AIChE (1985); M. J. Betenbaugh and P. Dhurjati, paper presented at the 190th ACS meeting (1985); W. L. Muth, *CHEMTECH*, June, p. 356, 1985.
 30. M. J. Carrier et al., *Trends in Biotechnol.*, 1, 109 (1983).
 31. D. Noack et al, *Mol Gen. Genet.*, 181, 121 (1981).
 32. M. Roth, D. Noack, and R. Geuther, *J. Basic Microb.*, 25, 265 (1985).
 33. D. D. Y. Ryu, *Proc. Bio Expo* 85, p. 351, 1985.
 34. D. D. Y. Ryu, R. Siegel, and S. B. Lee, paper presented at the annual meeting of AIChE (1985).
 35. D. M. Anderson, K. M. Herrman, and

- R. L. Somerville, U. S. Patent 4, 371, 614 (1983)
36. P. A. Meacock and S. N. Cohen, *Cell*, 20, 529 (1980).
37. D. K. Summers and D. J. Sherratt, *Cell*, 36, 1097 (1984).
38. G. Skogman, J. Nilsson, and P. Gustafsson, *Gene*, 23, 105 (1983).
39. E. Hinchliff, P. L. Kuempel, and M. Masters, *Plasmid*, 9, 286 (1983).
40. P. R. Rostek, Jr. and C. L. Hersherberger, *Gene*, 25, 29 (1983).
41. M. Kiyoshi, S. Nakamori, K. Sano, and H. Momose, *Gene*, 31, 275 (1984); U. S. Patent 4, 371, 615 (1983).
42. T. Imanaka, and S. Aiba, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 369, 1 (1981)
43. D. F. Ollis, *phil. Trans, Roy. Soc. Lond.* B297, 617 (1982).
44. K. Miwa, S. Nakamori, K. Sano, and H. Momose, *Agric Biol. Chem.* 48, 2233 (1984):
45. J. van Brunt, *Biol Technol*, 4, 395 (1986).
46. D. E. Pitt, in "University of Queensland Biotechnology Unit Biotechnology Training Course" Chap. 3, 1984.
47. J. S. Emtage et al., *Nature*, 283, 171 (1980)
48. S. I. Feinstein et al., *Nucleic Acids Res* 11, 2927 (1983).
49. H.-P. Meyer, H.-J. Kuhn, S. W. Brown, and A. Fiechter 3rd. *Eur. Congr. Biotechnol. Vol I* p. 499 (1984).
50. A. W. Emerik et al., *Bio/Technol*, 2, 165 (1984).
51. T. Oka et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82, 7212 (1985).
52. B. Engberg and K. Nordström, *J. Bacteriol.*, 123, 179 (1975); D. Stueber and H. Bujard, *EMBO J.*, 1, 1399 (1982)
53. R. Siegel and D. D. Y. Ryu, *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 28 (1985).
54. J.-I. Koizumi, Y. Monden, and S. Aiba, *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 721 (1985).
55. J. H. Botterman et al., *Biotechnol. Bioeng.* 27, 1320 (1985).
56. B. R. Allen and G. W. Luli, paper presented at the 190th ACS meeting (1985)
57. S. Mizutani et al., *Biotechnol. Bioeng.* 28, 204 (1986).
58. K. Mosbach et al., *Nature*, 302, 543 (1983).
59. M. Shuler, personal communication
60. 丸山 博巳, 「遺傳子 組換之 實用化 技術」 第4集 p. 151, サイエンスフォーラム, 1983.
61. 李先馥, 「韓國科學技術院 産學協同 公開講座-生物工學技術의 原理와 産業的 應用」 第Ⅶ-2章, 1986.