

재조합 대장균의 세포성장에 대한 인산암모늄 농도의 영향

*김 종 수 · 석 근 영 · 차 월 석

조선대학교 공과대학 화학공학과, *이리농공전문대학 화학공학과

Effect of Ammonium Phosphate Concentration on the Growth of Recombinant *E. coli*

Jong-Soo Kim*, Keun-Young Seok, and Wol-Suk Cha†

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

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

ABSTRACT

The growth of recombinant *E. coli* and formation of the by-products were investigated. Ammonium phosphate is known to affect the cell growth as well as the enzyme formation. When initial ammonium phosphate concentration was 0.5g/L, cell mass was 4.1g/L. By adding tryptone to the medium, acetic acid formation increased while lactic acid formation decreased. In cultivating recombinant *E. coli*, lactic acid and acetic acid turned out to be important by-products which affected cell yield and growth rate. Initial ammonium phosphate and tryptone concentration were optimized in our research and can be applied for other culture of recombinant *E. coli*.

서 론

재조합 미생물 배양을 최적화하기 위해서 재조합 미생물의 유전자적인 인자에 대한 고찰과 환경 조건 조절을 통한 배양과 분리공정의 개선으로 재조합 유전자의 발현율을 향상시키기 위한 연구가 진행되고 있고(1-4), 재조합 대장균을 이용하여 유가 배양 방법에서 phenylalanine의 생산을 위한 일련의 최적화 연구가 행해졌다(5, 6). 또 phenylalanine 생산에 미치는 tyrosine, 산소와 포도당의 첨가 방법에 대한 실험 결과를 기초로하여 phenylalanine 농도와 생산성의 향상을 위한 제어방법을 개발하여 적용하였다(7). 이 결과로서는 용존 산소와 포도당 공급을 조

절하여 acetic acid의 생산을 최소화하였고, tyrosine의 양은 균체 증식과 phenylalanine 생산에 적합한 정도로 유지하였다.

재조합 단백질의 생산에 가장 많이 사용되고 있는 숙주로서 *E. coli*(8), *Bacillus*(9), *Streptomyces*(10), yeast(11) 및 *Aspergillus*(12) 등이며, 이들 중 *Bacillus*(13)는 *E. coli*에 비해 질소나 탄소 등의 영양소가 제한되었을 때 많은 양의 다양한 프로티아제를 생산하기 때문에 이의 제거 및 프로티아제의 생산과 함께 수반되는 내생포자 형성을 차단하는 좋은 숙주 개발이 필요하다고 발표된 바 있다.

한편 *Bacillus*는 non-pathogene인 그램 양성균으로 산업적으로 널리 이용되고 있으며, 이 미생물은 단지 하나의 세포막만 갖고 있고 많은 종류의 단백질질을 체외로 분비하고 있다. 그리고 cloned 단백질

† Corresponding Author

의 세포의 분비가 단백질의 안정성과 분리정제의 용이성을 증가시키는 장점이 있으므로, *Bacillus*종을 이용하여 cloned 단백질을 생산하려는 연구가 활발하다.

Yoo 등(14)에 의한 보고의하면 *Bacillus*는 효소를 생산하며 세포 밖으로 분비하는 특성이 있어 최근 α -amylase, protease, α -galactosidase 등의 효소 및 치료제 목적의 재조합 단백질의 생산이 많이 이용된다고 했다.

Welker 등(15)은 *B. stearothermophilus*에서 α -amylase 형성에 대한 탄소원의 영향으로부터 세포 밖 α -amylase를 발견했고, 화학적으로 α -amylase 연구에 적용 규명하였으며, 탄소원 종류로부터 cell의 유도기를 감소시키고 성장율과, 총 효소 생산물을 증가시켰다. 그리고 α -amylase는 대수기에 생산됐고, 생산량은 성장률에 반비례함과 탄소원이 부족할수록 효소 생산이 증가했다고 보고한 바 있다. 이 α -amylase는 열에 안정(16)하며 공업적으로 유용하게 응용되고 있는데, α -amylase는 전분 분해 효소로서 동물, 식물 및 미생물로부터 얻어지며, 특히 미생물에 의한 α -amylase는 대량 생산과 정제가 쉽기 때문에 많이 연구되고 있으며, 열적으로 안정하여 산업적으로 유용하게 적용되고 있고, 특히 열안정성 α -amylase는 *Bacillus* 종류에서 생산되고 있다(17, 18).

*Bacillus*류의 부산물 중 가장 중요한 α -amylase 생성의 그 기작에 대해서는 여러 방향으로 연구되고 있다. 즉, 효과적인 생산 및 그 수율을 높이기 위한 기본조건, 합성 및 분비를 조절하는 효소의 생합성 기구에 대해 연구가 되어지고 있다(19, 20). 일반적으로 미생물의 성장 조건에 영향을 주는 요인들은 탄소원의 농도와 종류, pH, 온도, 인산염 등이다.

인산염은 DNA, RNA, 단백질 합성, 탄수화물 대사, 세포호흡, ATP 수준 등을 조절한다(21). Wienberg(22), Hostalek(23) 등에 의하면 인산염은 지질의 소모 속도, 산소 흡수 속도를 증가시키므로 세포의 성장을 자극시켜 일차 대사를 자극한다고 했다. 인산염은 핵산, 인지질, 뉴클레오타이드, 보조 효소의 주요 구성 성분으로서 비성장 속도의 증가에 따라 그 수요가 증가하는 것으로 보아 RNA, DNA, 단백질 합성 등에 쓰이는 것으로 알려졌다(24).

Demain(25)은 인산염은 그램 양성균의 세포벽의 주요 구성으로 보고하였으며, 항생제, 알카로이드 등의 이차 대사물의 합성을 조절하는 화합물로 최근 많은 연구가 진행되고 있다. Tempest 등(26)은 인

산염이 부족한 경우 미생물 세포벽은 심한 변화를 보이며 구성 성분은 teichoic acid에서 teichuronic acid라 불리는 다당류로 대체된다고 했다. 또 세포벽의 양분 흡수 능력은 달라지며, 인산염에 의해 영향 받는 가수분해 효소의 분비도 변하게 된다고 했다. Mertz 등(27)은 성장 배지 내에 인산염을 첨가하는 것은 세포내로 축적되는 탄수화물의 큰 증가를 가져온다고 보고했다. 그리고 일차 대사에서 이차 대사로의 전이는 인산염과 밀접한 관계를 갖는다는 것은 확실한 것으로 보여진다. 최근의 연구 결과들은 유도, 이화억제, 최종 생성물에 의한 조절 등은 allosteric 효소의 저분자량의 대사물 사이의 직접적인 작용을 수반한다는 것을 보고한 바 있다(25).

인산염이 α -amylase 생산에 미치는 영향에 대해서 Fukumoto(28)는 인산염이 α -amylase 생산을 자극한다고 보고하였고, Chandra 등(29)은 배지 내 0.2% 정도의 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 가 α -amylase 생산에 적합하다는 결과를 보고하였으며, Saito 등(30)은 *B. licheniformis*의 성장 배지 중에 cyclic adenosine 3,5-monophosphate(cAMP)을 여러 시간에 걸쳐 첨가함으로써, α -amylase의 생산을 40%~70% 정도 증가시켰다고 보고하였다.

Narimasa 등(31)은 *B. licheniformis* 내에 α -amylase 생성 영향을 규정하는 인자에서 효소가 변하면서 생성될 때, 합성을 규정하는 인자로서는 이 화학적 생성물 억제, 온도, 유도 그리고 cell의 배양 부분에 연구되었던 바 단백질은 세균이 변하지 않는 크기에서 생성되고 glucose의 첨가와 낮은 분자량의 신진 대사에 필요한 물질이 첨가되면 억제된다고 했으며, cyclic adenosine 3-5-mono phosphate 첨가는 배양물이 자랄 때 α -amylase 생성을 활발하게 한다고 했으며, 유전적 기원에 따라 돌연변이된 유전자들은 α -amylase 합성을 다양하게 한다고 하였다.

최근 재조합된 *E. coli* 등의 미생물들의 배양형식과 조건에서 고농도 세포배양에 관한 연구들이 진행되고 있다. 이 연구를 보면, Lee 등(32)은 연속 배양 세포막에서 penicillin acylase를 생산하는 재조합된 *E. coli*의 고농도 세포 배양 조건으로서, cell 성장의 저해제로서는 acetic acid이고 세포밀도를 145g/L(건조 질량)까지 증가시켰으며, acetic acid를 최소화하는데는 glucose와 용존 산소량의 제한을 받고 반응의 생산성은 batch식보다 재순환식이 10배 더 높다고 제시한 바도 있다.

이상과 같이 일반 미생물을 비롯하여 재조합 미생

물에 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.

본 연구에서는 재조합 대장균을 효율적으로 배양하기 위하여 인산염의 농도 변화에 따른 세포 성장과 부산물 생성에 대해 조사하였다.

재료 및 방법

균 주

본 실험에 사용된 균주는 *B. licheniformis*(ATCC 27811) α -amylase 유전자를 *E. coli*에 clone한 것을 서울대학교 화학과에서 분양받아 사용하였으며, nutrient agar 배지를 사용한 agar slant 상에서 4 °C의 냉장고에 보관하였다가 Table 1의 LB 배지를 사용하여 종균을 배양 하였으며 필요에 따라 SP 배지를 사용하였고 그 조성은 Table 2와 같다.

배지 및 배양

균체의 배양에 사용된 표준배지의 조성은 Table 2과 같으며 탄소원으로는 포도당을 사용하였다.

Nutrient agar slant에서 보관된 재조합 대장균 1백균이를 접종하여 shaking incubator에서 37 °C, 170 rpm으로 48시간 배양후 4 °C 냉장고로 옮겨 보관하여 접종원으로 사용하였다.

미생물의 성장은 인산염 농도 0.1~500mM에서 가능한 반면, 이차 대사물은 10mM보다 큰 범위에서는 억제된다는 일반적인 결과(33)에 근거하여 1~50mM 정도의 범위에서 초기 인산염 농도를 변화시켰다. Potassium을 공급하기 위하여 K_2HPO_4 를 일정하게 0.1g/L의 농도로 첨가 하였다. $NH_4H_2PO_4$ 농도 변화에 의한 질소 양의 영향을 상쇄시켜 주기 위하여, NH_4NO_3 로 그 차이를 보정해 주었다. pH 조절은 0.1M-Tris-Maleate 완충 용액을 사용하였다(34). 인산염의 초기 농도 변화에 따른 pH는 0.1M NaOH 용액을 사용하여 일정하게 pH 7.0으로 조절하였다.

회분식 배양

5L Jar Fermentor(한국발효기)에 Table 1의 배지 LB 배지를 3L 사용하였으며, 탄소원으로 포도당 초기농도를 10g/L로 하여 인산 칼륨을 0.1g/L로

Table 1. Nutrient composition of the LB medium.

Component	Quantity(g/L)/H ₂ O
Trypton	10.00
Yeast extract	5.00
NaCl	5.00
Ampiciline	0.04
Starch	10.00

Table 2. Nutrient composition of the Standard Medium [SP(Spizzen Potato) medium].

Component	Quantity(g/L)
Carbon Source(glucose)	10.0
Yeast Extract	1.0
K_2HPO_4	0.1
$NH_4H_2PO_4$	0.1
Sodium Citrate	0.5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5
$CaCl_2$	0.1
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.1

고정하고 인산 암염 농도를 0.1g/L, 0.5g/L, 1.0g/L로 변화시켰고, LB 배지에 trypton이 없는 상태에서 인산암모늄이 세포 성장에 미치는 영향을 알기 위한 목적으로 초기 포도당 농도를 10g/L로 하고 인산 칼륨을 0.1g/L로 고정하고 trypton을 첨가하지 않는 상태에서 인산 암모늄의 농도를 0.1g/L, 0.5g/L, 1.0g/L, 2.5g/L, 5.0g/L으로 변화시키면서 균주 배양액 25ml를 각각 접종하여 37 °C, 170 rpm, pH 7, 통기속도는 1vvm을 유지하면서 발효를 시켰다.

세포농도

세포농도는 분광광도계(Bausch & Lomb, Spectronic 20)를 이용하여 발효액 시료의 흡광도를 650 nm에서 측정하였다.

탄소원 및 생성물 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 0.001 M- H_2SO_4 , column의 온도는 65 °C, 유량은 0.8ml/min, 시료는 20 μ L를 주입하여 RI detector를 이용하여 분석하였다.

Table 3. Effects of ammonium phosphate on the cell growth and by-products formation.

NH ₄ H ₂ PO ₄ (g/L)	X _m (g/L)	Y _{X/S} (g/g)	L _m (g/L)	A _m (g/L)	P _m (g/L)	M _m (g/L)	E _m (g/L)	$\mu_m = \frac{1}{x} \left(\frac{\Delta x}{\Delta t} \right)_{max}$ (g/g-hr)
0.1	3.36	0.77	4.33	1.82	0.33	0.58	0.40	0.41
0.5	4.2	0.45	3.82	1.62	0.17	0.55	0.54	0.43
1.0	3.64	0.39	4.46	1.57	0.16	0.67	0.42	0.28

* X_m=max. cell density, L_m=max. lactic acid concentration, A_m=max. acetic acid concentration, P_m=max. propionic acid concentration, M_m=max. methanol concentration, E_m=max. ethanol concentration.

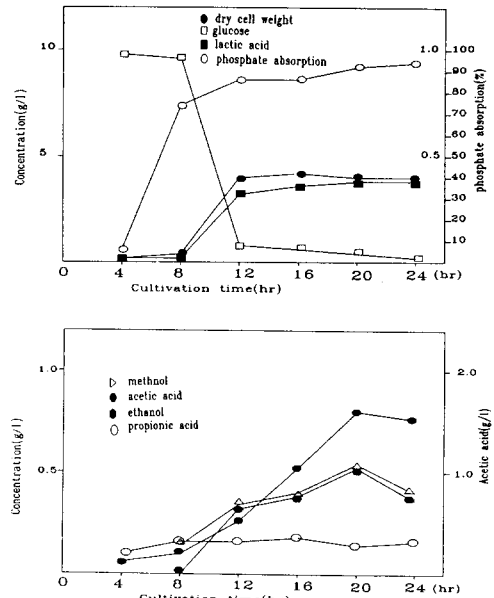
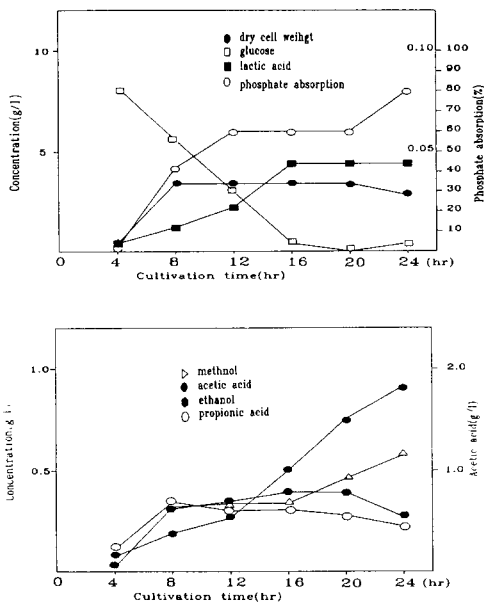


Fig. 1. Cell growth and products of recombinant *E. coli* in batch culture at 10g/L of glucose and initial phosphate concentration of LB medium(0.1g/L NH₄H₂PO₄ and 0.1g/L K₂HPO₄).

Fig. 2. Cell growth and products of recombinant *E. coli* in batch culture at 10g/L of glucose and initial phosphate concentration of LB medium(0.5g/L NH₄H₂PO₄ and 0.1g/L K₂HPO₄).

Lactic acid 농도 측정

HPLC와 Barker(35)-Summerson(36)방법을 이용하여 측정하여 비교하였다.

단백질에 의한 분석의 방해를 막기 위해 단백질을 원심 분리하여 제거한 뒤 Fiske and Subbarow method로 측정하였다(37).

인산염 농도 측정

인산염은 orthophosphate, codensed phosphate (pyro-, meta-, polyphos-), organic phosphate로 분류되는데 orthophosphate는 시료의 사전 가수 분해(hydrolysis)없이 색깔 시험(colorimetric test)에 반응하는 인산염으로서 무기 인산염은 여기에 속한

결과 및 고찰

인산 암모늄이 세포 성장에 미치는 영향

*B. licheniformis*의 α-amylase를 함유하고 있는 재조합된 *E. coli* NM 522를 회분식 배양으로 세포의 성장과 α-amylase 생산과 부산물의 생성량을 알

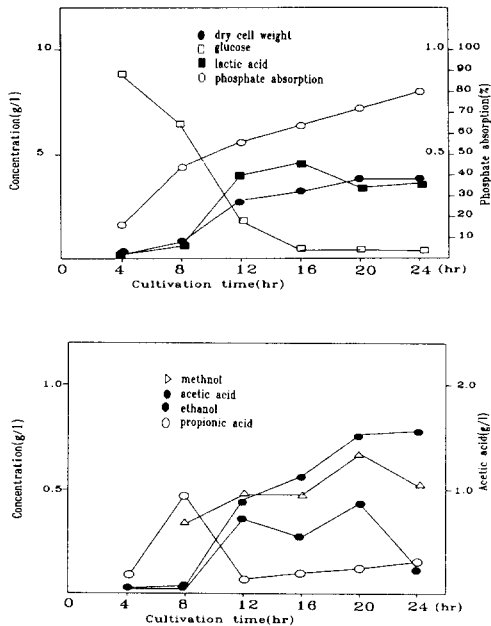


Fig. 3. Cell growth and products of recombinant *E. coli* in batch culture at 10g/L of glucose and initial phosphate concentration of LB medium(1.0g/L $NH_4H_2PO_4$ and 0.1g/L K_2HPO_4).

기 위하여 포도당 초기농도를 10g/L로 하고 LB 배지를 사용하고 인산칼륨농도를 0.1g/L로 하고 통기를 1 vvm 해주면서, 재조합된 *E. coli* NM 522에 인산 암모늄 농도를 0.1g/L, 0.5g/L, 1.0g/L로 변화시키면서 배양시킨 결과를 Fig. 1, 2, 3과 Table 3에 나타내었다. 초기 인산암모늄 농도의 0.5g/L일 때 최대 세포농도는 배양 실시후 16시간 전후에서 4.2g/L이고, 부산물중 lactic acid 최대치는 초기 인산암모늄 농도 1.0g/L일 때 배양 실시후 16시간 전후에서 4.46g/L로서 다량 생산되었고, 다른 부산물로서 acetic acid 최대치는 1.82g/L이고 propionic acid 최대치는 0.33g/L이고 methanol 최대치는 0.67g/L이고 ethanol 최대치는 0.54g/L이다. 그리고 인산염 0.1g/L일 때 세포의 수율 최대치는 0.77g/L이다. 세포 최대 비생산속도 값은 인산염 0.5g/L일 때 0.43g/g·L다.

이와 같이 인산염의 농도 증가에 대하여 세포 최대 비생산속도 값은 인산염 0.5g/L일 때임을 알 수 있고, 인산암모늄의 흡수량을 보면 초기 인산염 0.1g/L일 때 8시간대에서 41.0%이고 초기 인산염

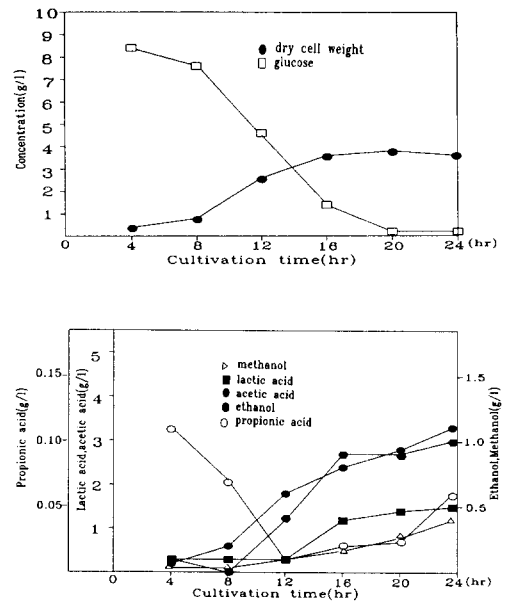


Fig. 4. Cell growth and products of recombinant *E. coli* in batch culture at 10g/L of glucose and initial phosphate concentration of LB medium(0.1g/L $NH_4H_2PO_4$, 0.1g/L K_2HPO_4 , and exclusion trypton).

0.5g/L일 때 8시간대에서 72.2%이고 초기 인산염 1.0g/L일 때 8시간대에서 44.3%로 각각 흡수되었다.

이같은 결과에서 볼 때 인산암모늄이 배양실시후 초기 8시간 또는 12시간 전후에서 흡수가 거의 되었음을 알 수 있다. 이 결과는 Mertz 등(27)이 제안한 바와 같이 미생물이 성장 초기에 RNA 합성에 쓰인다는 것과 일부의 세포 내에 polyphosphate로 축적 된다는 내용과 비슷한 결과이고 또 포도당 감소 속도와 인산 암모늄 흡수 증가 속도가 배양 실시후 8시간대에서 거의 같은 속도로 진행됨을 알 수 있고 초기 인산 암모늄의 농도가 0.1g/L과 0.5g/L에서는 같은 현상으로 흡수되나 1.0g/L일 때는 서서히 흡수된 현상이다.

이 결과는 Hostalek(23)가 제시한 것과 같이 과량의 인산염이 미생물의 성장과 탄수화물의 흡수 속도를 증가시킨다는 내용과 비슷한 경향이다.

또한 Yoo 등(38)이 제시한 바와 같이 인산염이 탄소원을 자극하며 미생물의 성장 α -amylase 생산을 자극하나 어느 정도 이상에서는 미생물내에 유도

Table 4. Effects of ammonium phosphate in LB medium of exclusion trypton on the cell growth and by-products formation.

NH ₄ H ₂ PO ₄ (g/L)	X _m (g/L)	Y _{X/S} (g/g)	L _m (g/L)	A _m (g/L)	P _m (g/L)	M _m (g/L)	E _m (g/L)	$\mu_m = \frac{1}{x} \left(\frac{\Delta x}{\Delta t} \right)_{max}$ (g/g-hr)
* 0.1	3.50	0.40	1.40	3.34	0.11	0.36	0.97	0.26
* 0.5	3.50	0.35	1.22	2.98	0.90	0.30	1.20	0.40
* 1.0	3.92	0.40	0.92	3.45	0.21	0.25	1.12	0.36
* 2.5	4.48	0.45	1.93	3.26	0.16	0.31	0.96	0.28
* 5.0	3.92	0.40	1.31	3.29	0.22	0.23	1.30	0.26

* X_m=max. cell density, L_m=max. lactic acid concentration, A_m=max. acetic acid concentration, P_m=max. propionic acid concentration, M_m=max. methanol concentration, E_m=max. ethanol concentration.

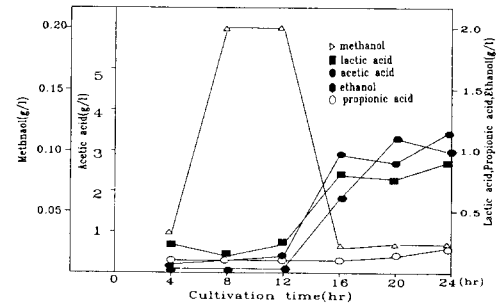
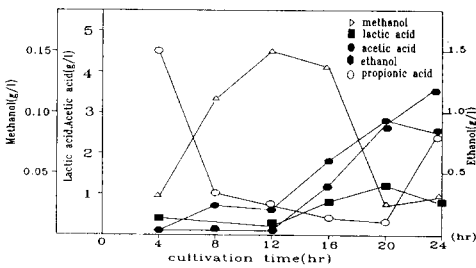
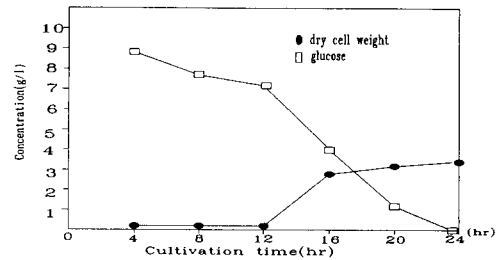
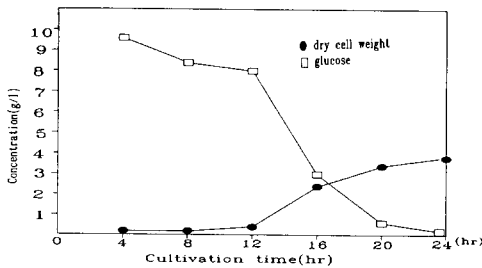


Fig. 5. Cell growth and products of recombinant *E. coli* in batch culture at 10g/L of glucose and initial phosphate concentration of LB medium(0.5g/L NH₄H₂PO₄, 0.1g/L K₂HPO₄ and exclusion trypton).

Fig. 6. Cell growth and products of recombinant *E. coli* in batch culture at 10g/L of glucose and initial phosphate concentration of LB medium(1.0g/L NH₄H₂PO₄, 0.1g/L K₂HPO₄ and exclusion trypton).

물질로 인하여 억제된다는 내용이 뒷받침한다. 즉 이 실험 내용에서 보면 인산 암모늄의 초기 농도를 0.5g/L로 사용할 때 최대 세포농도가 4.2g/L인 결과이므로 인산암모늄 초기 농도를 0.5g/L로 사용함이 적합하다고 사료된다.

높이 세포 성장에 미치는 영향을 알기 위한 목적으로 초기 glucose 농도를 10g/L로 하고 인산 칼륨을 0.1g/L로 고정하고 trypton을 첨가하지 않는 상태에서 1 vvm으로 통기하고 인산 암모늄의 농도를 0.1g/L, 0.5g/L, 1.0g/L, 2.5g/L, 5.0g/L으로 변화시키면서 배양을 실시하여 세포와 탄소원의 관계 및 부산물 생성만을 검토한 결과를 Fig. 4, 5, 6, 7, 8과 Table 4에서 나타내었으며 최대 세포농도는 인산염

LB 배지에서 인산암모늄과 trypton의 영향
LB 배지에 trypton이 없는 상태에서 인산암모

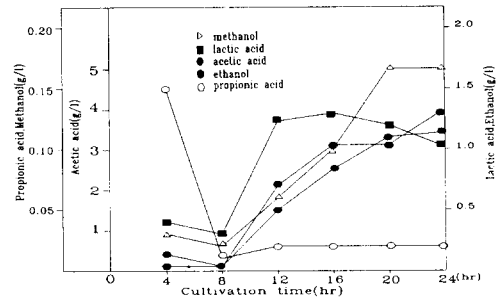
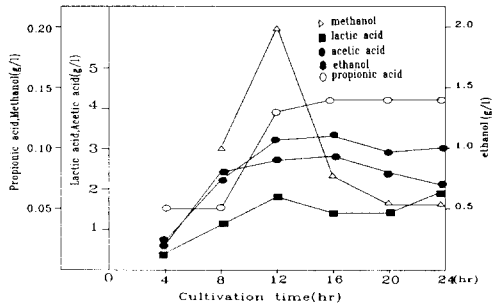
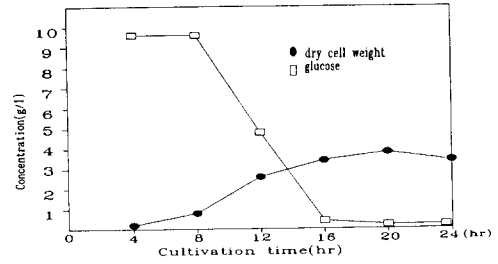
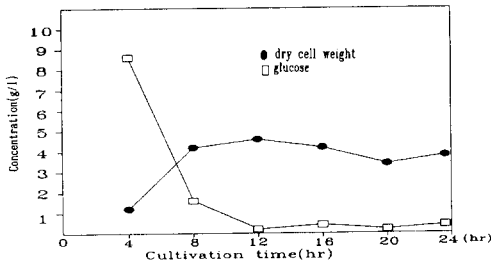


Fig. 7. Cell growth and products of recombinant *E. coli* in batch culture at 10g/L of glucose and initial phosphate concentration of LB medium(2.5g/L $NH_4H_2PO_4$, 0.1g/L K_2HPO_4 and exclusion trypton).

Fig. 8. Cell growth and products of recombinant *E. coli* in batch culture at 10g/L of glucose and initial phosphate concentration of LB medium(5.0g/L $NH_4H_2PO_4$, 0.1g/L K_2HPO_4 and exclusion trypton).

2.5g/L일 때 배양실시후 12시간 전후에서 4.48g/L 이고, 세포의 최대 수율값은 인산염 2.5g/L일 때 0.45g/L으로 되어 있다. 그리고 세포최대비생산 속도는 인산염 0.5g/L일 때 0.41g/g·h이다. 그리고 부산물에서 lactic acid의 최대 농도는 인산염 2.5g/L일 때 1.93g/L이고, acetic acid는 인산염 1.0g/L일 때 3.45g/L이며 propionic acid는 인산염 0.5g/L일 때 0.89g/L으로 최대 농도이고 methanol의 최대 농도는 인산염 0.1g/L일 때 0.36g/L이며 ethanol의 최대 농도는 인산염 5.0g/L일 때 1.30g/L임을 알 수 있다.

이상에서는 Trypton이 첨가 되지 않는 상태로서 lactic acid가 acetic acid보다 적게 생성됨을 알 수 있고 인산염의 농도 증가에 따라 세포의 최대 농도가 비례적으로 증가되지 않았고, 세포 최대 비생산 속도 값은 인산염 0.1g/L, 0.5g/L까지는 증가하였으나 그 이상의 농도에서는 감소한 현상을 보였다. 이 값은 문헌(23, 27)과 비슷한 현상이라고 하겠다.

최대 세포농도의 경우도 인산염이 0.1g/L, 0.5g/L, 1.0g/L, 2.50g/L까지는 증가 현상을 보였으나

5.0g/L에서는 감소 현상을 보였다. 이 경우도 문헌(23, 27)과 같은 현상이다. 부산물 농도는 일정한 경향을 보이지 않았다. 그리고 탄소원 감소와 세포의 성장관계를 보면 배양 실시후 12시간에서 16시간 사이에 교차점이 이루어지고, 세포가 최대로 생산됨을 알 수 있다. 마찬가지로 부산물들도 적은 양인 methanol은 12시간대가 최대치였고 나머지는 16시간대에서 최대로 생성됨을 알 수 있다. 이 원인은 세포의 활성과 대사적 관계인 것으로 생각된다.

그리고 Table 3, 4에서 볼 때 세포의 최대치는 비슷한 값들을 알 수 있고 부산물 생성으로서는 Trypton을 첨가하지 않으면 acetic acid가 월등히 많이 생성됨을 보였다. 세포 수율도 비슷한 값들이고 다만 trypton 첨가된 인산 암모늄 초기 농도 0.1g/L일 때가 수율이 배로 높은 값을 보였다.

그러므로 저해제 부산물인 acetic acid을 적게 생성하려면 Trypton을 첨가함이 좋고, lactic acid 생성을 적게 하기 위한 조건을 규명함이 다음 연구 과제로 사료된다.

요 약

인산암모늄의 첨가에 따른 재조합 대장균의 성장과 그 부산물 생성 관계를 알기 위하여 인산암모늄의 첨가 상태에 따른 영향을 검토하였다. 인산암모늄은 세포 성장에 중요한 작용을 하고 있다. 배양 실험 시후 8시간에서 12시간 전후에서 인산 암모늄이 거의 흡수되었고 탄소원이 세포에 흡수되는 속도와 인산암모늄이 세포에 흡수되는 속도가 거의 비슷한 현상으로 진행되었다. 인산암모늄의 초기농도를 0.5g/L로 사용할 때 세포 최대 농도는 4.2g/L로 최고를 보였다. 그러므로 세포 성장에 필요한 인산 암모늄의 첨가를 초기 인산암모늄 농도 0.5g/L 전후로 첨가함이 적당하다. 그리고 인산암모늄에 trypton을 첨가하지 않는 LB 배지와 trypton을 첨가할 LB 배지에서 세포 성장은 비슷한 결과로 성장되었으며 부산물들의 생성은 acetic acid의 경우는 Trypton을 첨가하지 않으면 많이 생성되고 lactic acid의 경우는 trypton을 첨가할 때 매우 높게 축적되어졌다. 그러므로 trypton은 세포성장에 그렇게 중요하지 않는 결과를 보였으며 저해제인 부산물을 적게 나오게 하려면 trypton을 첨가함이 좋고 lactic acid 생성 관계는 더욱 연구되어야 한다.

감 사

본 연구는 1994년도 교육부, 한국학술진흥재단의 지방대 육성 기반 조성 연구 지원비에 의해 수행된 연구 결과의 일부이며, 본 연구를 지원하여 주신 한국학술진흥재단에 깊은 감사사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. D. W. Zabriskie and E. T. Arcuri(1986), *Enz. Microbiol. Technol.*, **8**, 706.
2. C. G. Kurland(1987), *Trend in Biol*, **12**, 126.
3. D. Y. Ryu and S. B. Lee(1988), in S. Aiba (ed.), *Horizons of Biochemical Engineering*, p. 97, Oxford univ. press.
4. S. J. Coppella, G. F. Paynem, and N. Dela Cruz(1981), *Secondary concerns of recombinant microorganism processing*, p. 17 in R. T. Hatch et al.(ed), "Expession Systems and Processes for rDNA products", ACS sym.ser. 477, American Chem. Soc.
5. C. Forberg and L. Haggstrom(1988), *J. Bacteriol.*, **8**, 291.
6. K. B. Konstantinov, N. Nishio, and T. Yoshida(1990), *J. Ferment. Bioeng.*, **70**, 253.
7. K. B. Konstantinov, N. Nishio, T. Seki, and T. Yoshida(1991), *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 350.
8. J. Buchner and R. Rudolph(1991), *Bio. Technology*, **9**, 157.
9. 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. No-Drdam, N. L. M. Persoon, and G. Wagemaker (1991), *Bio. Technology*, **9**, 47.
10. 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.
11. E. A. Sabin, C. T. Lee-Ng, J. R. Shuster, and P. J. Barr(1989), *Bio. Technology*, **7**, 705.
12. 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.
13. A. Nakayama, K. Ando, K. Kawamura, I. Mita, K. Fukazawa, M. Hori, H. Honjo, and Y. Furutani(1988), *J. Biotechnol.*, **8**, 123.
14. Y. H. Yoo, et al.(1988), *Biotech. Bioeng.*, **31**, 426.
15. N. E. Welker and L. L. Campbell(1963), *J. Bacteriol.*, **86**, 681.
16. K. L. Kindle(1983), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **8**, 153.
17. A. Wiesman(1975), *Handbook of Enzyme Technology*, 114, John Wiely, New York.
18. F. G. Priest(1977), *Bacteriol. Rev.*, **41**, 711.
19. N. E. Welker and L. L. Campbell(1963), *J. Bactriol.*, **86**, 1202.
20. S. Yuki and Y. Ueda(1968), *Jpn. J. Genet.*, **43**, 21.
21. J. F. Martin(1977), *Advances in biochemical engineering*, 6, p. 10, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
22. E. D. Wienberg(1974), *Dev. Ind. Microbiol.*, **15**, 70.

23. Z. Hostalek(1961), *Folia. Microbiol.*, **2**, 285.
24. J. F. Martin(1977), *Ann. Rev. Microbiol.*, **31**, 13.
25. A. C. R. Demain(1972), *J. Appl. Chem., Biotechnol.*, **22**, 245.
26. D. W. Tempest and T. M. Woulters(1981), *Enzyme. Microb. Technol.*, **3**, 283.
27. F. P. Mertz and L. E. Doolin(1973), *J. Microbiol.*, **19**, 263.
28. J. Fukumoto, D. Yamamoto, and K. Ichikawa (1957), "Some problems on bacterial amylase and proteinase production", In : Proc. Intern. Symp., *Enz. Chem.*, Tokyo and Kyoto, **2**, 479.
29. A. K. Chandra, S. Medda, and A. K. Bhadra (1980), *J. Ferment. Technol.*, **58**, 1.
30. N. Saito and K. Yamamoto(1975), *J. Bacteriol.*, **121**, 848.
31. S. Narimasa and Katsuji Yamamoto(1975), *J. Bacteriol.*, pp. 848 ; *American society for microbiology*, **121**, 849.
32. Y. L. Lee and H. N. Chang(1990), *Biotech. Bioeng.*, **36**, 330.
33. E. D. Wienberg(1974), *Dev. Ind. Microbiol.*, **15**, 70.
34. Gomori(1985), *Meth. Enzymol.*, **1**, 138.
35. S. B. Barker(1940), *AM. J. Physiol.*, **129**, 305.
36. W. H. Summerson(1939), *J. Biol. Chem.*, **130**, 149.
37. C. H. Fiske and Y. Subbarow(1925), *Biol. Chem.*, **66**, 375.
38. Y. J. Yoo, W. Theodre, and R. T. Hatch (1988), *Biotech. Bioeng.*, **31**, 357.