

자외선에 의한 *E. coli* Double-Lysogen의 용해에 대한 수학적 모델

박순석 · 구윤모[†]

인하대학교 공과대학 생물공학과
(1994년 11월 16일 접수, 1995년 2월 20일 채택)

Mathematical Model for the Cell Lysis of *E. coli* Double-lysogen by UV-irradiation

Soon-Suk Park and Yoon-Mo Koo[†]

Department of Biological Engineering, Inha University
(Received 16 November 1994; accepted 20 February 1995)

요 약

자외선에 의한 *E. coli* double-lysogen[P90c/(λHL1,434)]의 세포용해율과 자외선 조사량과의 관계를 나타내기 위한 수학적 모델을 제안하였다. Double-lysogen이 조사 받는 자외선량을 정규분포로 나타내었으며, 이로부터 lysogen의 생존율, 용해율, 사멸률을 자외선 조사량에 대한 함수식으로 표현하였다. 이 모델을 이용하여 자외선에 조사된 lysogen의 단백질 생산과 세포용해 특성을 고찰하였으며, 각 매개변수 값을 변화시킴으로서 세포용해에 대한 최적 조건을 예측하였다.

Abstract—A mathematical model was proposed in order to explain the lytic behaviors of the UV-irradiated *E. coli* double-lysogen[P90c/(λHL1,434)]. The UV dosage that lysogen had received was represented by the normal distribution, so that the survival, lysis and death fractions of the irradiated lysogen were described by the function of UV dosage. Using this model, the characteristics of the protein production and the cell lysis of the irradiated double-lysogen were studied. Finally, the optimum conditions for the cell lysis were predicted by changing the related parameters.

1. 서 론

세포파괴는 발효에 의해 생산된 세포 내 생물물질을 회수하는 공정 중에서 필수적인 기술로서 세포파괴의 효율적 수행은 생물공학 제품의 산업화에 큰 영향을 미치게 된다[1]. 전통적으로는 여과나 원심분리 등의 기술을 사용하여 세포를 분리한 후 볼밀(ball mill)이나 homogenizer 등을 사용하여 세포를 파괴함으로써 세포 내 목적 물질을 회수하게 된다. 그러나 이러한 방법들은 공정이 단속적이고 복잡하여 그 비용이 높고, 목적물질의 유실 등 여러 가지 단점이 수반된다.

이전의 연구[2]에서 새로운 세포파괴 방법으로서 *E. coli* double-lysogen[P90c/(λHL1,434)]을 이용한 동일 반응기 내에서의 단백질 생산과 세포파괴가 본 연구자들에 의하여 수행되었다. 이 연구에서는 단백질 생산을 위한 재조합 균주인 single-lysogen[P90c/λHL1]에 세포파괴를 위한 야생형 phage 434를 재감염시켜 새로 합성한 double-lysogen[P90c/(λHL1,434)]을 사용하였다. 단백질 생산을 위하여 온도를 증가시켜 첫번째 prophage, λHL1을 유도(induction)하여 다량의 β-galactosidase를 생산하고, 그 후 자외선을 조사하여 두번째 prophage, 434를 유도함으로써 세포파괴를 수행하였다.

이 때 사용된 물리적 유도체로서의 자외선은 prophage 434를 유도하는 것 이외에 숙주세포의 DNA에 손상을 입혀 숙주세포를 죽게(death) 하기도 하며, 세포가 죽게 되면 세포 내에 축적되어 있는 목적 생물물질을 회수할 수 없다.

광합성 박테리아를 제외한 대부분의 박테리아들은 자외선 조사에 대하여 저해효과를 나타낸다. 이러한 저해효과 때문에 자외선은 돌연변이 유발(mutagenesis)과 멸균을 위하여 많이 사용된다[3]. 자외선이 박테리아 등에 조사되었을 때 자외선의 주된 작용은 DNA에 손상을 주는 것이다[4]. 그러나 대부분의 박테리아들은 이러한 DNA 손상을 복구하기 위한 시스템을 가지고 있다. DNA가 손상되면 세포 내의 *Rec A* 단백질은 단백질 분해 효소로서의 활성을 가지게 되어 복구시스템을 억제하고 있던 *Rex A* repressor를 분해한다. 그 결과로 복구 시스템이 발현되어 손상된 DNA가 복구되면 자외선에 조사된 박테리아는 생존하게 되며, 이러한 복구과정에서 돌연변이가 발생하기도 한다[5, 6]. 그러나 자외선 조사량이 증가하여 DNA의 손상이 많아지게 되면 박테리아는 DNA복구에 실패하고 결국은 죽게 된다. 자외선은 lysogenic cell에 잠복되어져 있는 prophage를 유도하기 위한 agent로서도 사용되는 데, 그 이유는 DNA손상에 의해 활성화된 *Rec A* 단백질이 *Rex A* repressor를 분해함과 동시에 phage repressor도 함께 분해할 수 있기 때문이다. 일단 phage repressor가 분해되면 잠복상태에 있던 prophage는 자기 복제를 시작하고 결국은 숙주세포의 세포벽을 용해하고 밖으로 방출된다[7, 8]. *Rec A* 단백질의 단백질 분해 효소로서의 활성은 DNA의 손상되어진 정도에 비례하는 것으로 알려져 있으며, 따라서 *Rec A* 단백질이 prophage를 유도할 수 있을 만큼의 활성을 갖기 위해서는 일정 수준 이상의 손상된 DNA를 필요로 한다[9].

Fig. 1에서는 자외선에 조사된 lysogenic cell이 따라게 되는 생존(survival), 용해(lysis), 사멸(death)의 경로를 도표로 나타내었다. 결국 자외선에 조사된 double-lysogen은 조사받은 자외선량에 따라 생존, 용해, 사멸 중 한 가지 경로를 따르게 된다. 따라서 자외선을 사용하여 효과적 세포용해물 수행하기 위해서는 세포의 생존율과 사멸률을 최소화하고 용해율을 최대화할 수 있는 적정량의 자외선을 사용하여야 한다.

이러한 최적의 자외선량을 구하기 위해서는 자외선 조사량과 세포용해율과의 상관관계를 알아야 한다. 본 연구에서는 세포가 조사 받는 자외선량을 확률적으로 모델화함으로써 자외선 조사량과 세포용해율과의 관계를 얻었으며, 이로부터 자외선이 조사된 double-lysogen의 세포용해 특성과 세포용해 효율을 증가시킬 수 있는

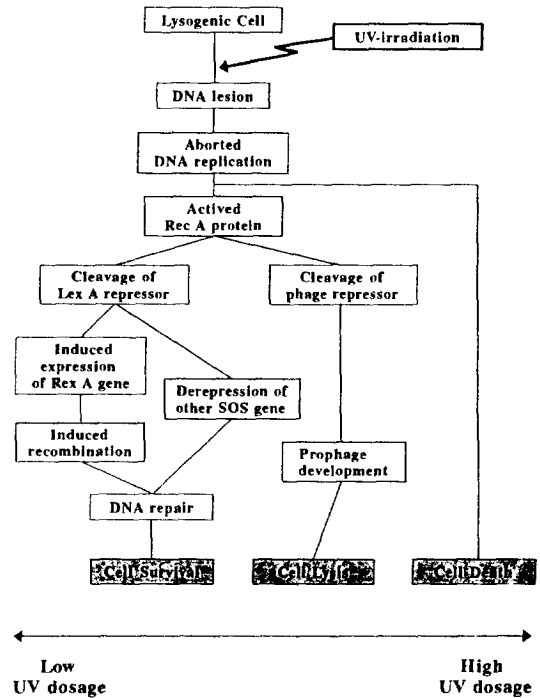


Fig. 1. Lysis of lysogen by UV-irradiation.

조건에 대하여 고찰하였다.

2. 이 론

이전의 연구[2]에서는 자외선을 거의 투과시키지 않는 복합배지(LB배지)에서도 교반상태에서 자외선을 조사함으로써 세포용해가 이루어짐을 관찰하였으며, 또한 jar fermentor에서 수행한 상당액(700 ml)의 LB배지에 대한 실험에서도 동일한 결과를 얻었다. 위와 같은 시스템에서 자외선 조사량과 세포용해율과의 관계를 알아보기 위하여 다음과 같은 가정에 의거하여 수학적 모델을 검토하였다.

- (1) 자외선에 의한 세포나 생명체의 변화는 조사에 의한 DNA손상의 축적에 의해 이루어진다.
- (2) 자외선은 이상혼합(ideal mixing)상태의 발효액에 대하여 조사되며, 따라서 발효액 내의 각 세포들이 자외선에 노출될 가능성은 모두 동일하다.

미량 또는 과량의 UV조사의 경우와는 달리 본 연구에서는 가정 (1)에 합당한 범위의 조사량을 사용하였다.

세포가 K개의 입자에 노출되고, 이 중에서 하나의 특정입자가 세포의 DNA에 적중할 확률이 p로서 매우 작다고 가정한다[10, 11]. 이 때 K개의 입자 중 x개의 입자가 세포의 DNA에 적중될 확률은 이항 분포로서

다음과 같이 표현된다.

$$f(x) = {}_K C_x p^x (1-p)^{K-x} \quad (x=0, 1, 2, \dots, n) \quad (1)$$

이 때, ${}_K C_x = \frac{x!}{K!(K-x)!}$ 이다.

De Moivre와 Laplace의 극한정리[12]를 이용하면 (1)식을 연속함수이며 평균이 Kp 이고 분산이 $Kp(1-p)$ 인 정규분포로 근사화시킬 수 있으며, 이러한 근사화에 의해 다음과 같은 식을 얻을 수 있다.

$$F(X \leq x) = \frac{1}{\sqrt{Kp(1-p)}\sqrt{2\pi}} \times \int_{-\infty}^{x+0.5} \exp\left[-\frac{(v-Kp)^2}{2Kp(1-p)}\right] dv \quad (0 \leq x) \quad (2)$$

또한 위의 근사화에 의해 (1)식에서의 입자 조사량 K 를 (2)식에서는 연속적 물리량인 자외선 조사량으로 바꾸어 생각할 수 있다. 따라서 (2)식은 조사량 K 의 자외선을 조사하였을 때 세포가 받는 자외선량이 x 이하일 확률을 의미한다. 예를 들면, 세포가 자외선에 조사될 확률(p)이 0.1이고 조사량(K) 100 mJ/cm²의 자외선을 세포에 조사하였을 때 그 세포가 조사 받을 수 있는 자외선량은 평균 10 mJ/cm², 분산 9인 정규분포로 나타나며, 5 mJ/cm² 이하의 자외선량을 조사 받을 확률은 (2)식에서 $F(X \leq 5)$ 로부터 얻는다. 또한 가정 (1)에 의하여 자외선에 조사된 lysogenic cell의 경로는 다음과 같이 세포가 조사 받은 자외선량 X 로서 표현된다.

생존: $0 \leq X \leq x_L$

용해: $x_L < X \leq x_D$

사멸: $x_D < X$

위의 식은 lysogenic cell이 x_L 이하의 자외선량을 받을 경우에는 생존하며, x_D 보다 많은 자외선량을 받을 경우에는 사멸하고, x_L 보다 많고 x_D 보다 적은 자외선량을 조사받았을 경우에는 용해됨을 의미한다. 따라서 자외선에 조사된 세포의 생존, 용해, 사멸의 비율은 (2)식에 의하여 다음과 같이 조사한 자외선량 K 에 대한 함수로 표현된다.

$$R_S = F(0 \leq X \leq x_L) = \frac{1}{\sqrt{Kp(1-p)}\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{x_L+0.5} e^{-(v-Kp)^2/2Kp(1-p)} dv \quad (3)$$

$$R_L = F(x_L < X \leq x_D) = \frac{1}{\sqrt{Kp(1-p)}\sqrt{2\pi}} \int_{x_L+0.5}^{x_D+0.5} e^{-(v-Kp)^2/2Kp(1-p)} dv \quad (4)$$

$$R_D = F(x_D < X) = \frac{1}{\sqrt{Kp(1-p)}\sqrt{2\pi}} \int_{x_D+0.5}^{\infty} e^{-(v-Kp)^2/2Kp(1-p)} dv \quad (5)$$

$$R_S + R_L + R_D = 1 \quad (6)$$

이 때, R_S 는 생존율, R_L 은 용해율, R_D 는 사멸률이며, K 가 0일 때 $R_S=1$, $R_L=0$, $R_D=0$ 이다.

위의 (3), (4), (5)식에서 자외선에 조사된 double-lysogen[P90c/(λHL1,434)]의 생존율, 용해율, 사멸률을 자외선 조사량에 대한 수식으로 표현하기 위해서는 매개변수 x_L , x_D , p 의 값을 구해야 한다. 매개변수 x_L 과 p 는 (3)식으로부터 자외선 조사량(K)과 double-lysogen의 생존율(R_S)과의 관계로부터 구할 수 있다. 그러나 double-lysogen을 이용하였을 경우에는 이들의 사멸률과 용해율을 따로 구별하여 얻을 수 없기 때문에 x_D 값을 직접 구할 수 없다. 이러한 이유로 세포용해 과정을 진행시키지 못하며[14], 결국 자외선에 조사된 single-lysogen은 생존 또는 사멸의 두 가지 선택만이 있게 된다. 따라서,

$$R_{S,S} + R_{D,S} = 1 \quad (7)$$

로서 나타낼 수 있으며, 이 때 $R_{S,S}$ 와 $R_{D,S}$ 는 single-lysogen의 생존율과 사멸률을 의미한다. 그리고 잠복상태로서 존재하는 prophage 434는 숙주세포(P90c)의 대사작용에 영향을 미치지 않으므로 동일한 조사량에 대하여 single-lysogen과 double-lysogen의 사멸률은 동일하다고 가정한다.

$$R_{D,S} = R_D \quad (8)$$

위의 (3)-(8)식으로부터 single-lysogen의 생존율은 다음과 같이 표현된다.

$$R_{S,S} = R_S + R_L = \frac{1}{\sqrt{Kp(1-p)}\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{x_D+0.5} e^{-(v-Kp)^2/2Kp(1-p)} dv \quad (9)$$

따라서 x_D 값은 (9)식의 single-lysogen의 생존율($R_{S,S}$)과 자외선 조사량(K)과의 관계로부터 구할 수 있다.

위에 나타나 있는 각 매개변수들은 다음과 같은 물리적 의미를 부여할 수 있다. Phage가 유도되기 위해 조사받아야 하는 최소의 자외선량은 x_L 로서 lysogenic cell이 받은 자외선량이 x_L 이하이면 phage가 유도되지

않으므로 그 세포는 생존할 것이다. 따라서, x_L 은 phage 고유의 자외선에 대한 민감성의 척도가 된다. 숙주세포가 사멸되기 위해서 조사 받아야 하는 최소의 자외선량은 x_D 로서 lysogenic cell이 받은 자외선량이 x_D 이상이면 숙주세포는 DNA복구에 실패하고 죽게 된다. 따라서 x_D 는 숙주세포(박테리아) 고유의 자외선에 대한 내성의 척도가 된다. 그리고 lysogenic cell이 받은 자외선량이 x_L 보다 많고 x_D 보다 적은 양일 경우에는 숙주세포는 생존할 수 있으나 파아지는 유도되며, 결국 세포용해가 진행된다. 또한 p 는 세포가 자외선을 조사 받을 수 있는 확률이며 배지의 자외선 투과도 등과 같은 환경적 요인에 영향을 받게 된다.

그러나 과도한 자외선량에 의해 숙주세포가 죽더라도 phage가 생존하여 유도된다면 세포용해가 진행될 수 있다. 우리가 유도한 (4), (5)식에는 이에 대한 고려를 하지 않았기 때문에 R_L 은 실제의 용해율보다 다소 작은 값을 가지고, R_D 은 실제의 세포용해율보다 다소 높은 값을 갖으리라 생각된다.

3. 결과 및 고찰

Single-lysogen과 double-lysogen의 생존율을 구하기 위한 실험은 다음과 같이 수행하였다. Single-lysogen과 double-lysogen을 25 ml의 배양액(250 ml 플라스크)에서 세포농도가 OD₆₀₀ 0.5정도까지 32°C에서 배양한 후 온도를 42°C로 증가시켜 20분 동안 유지하여 온도유도를 시도하였다. 온도유도후 자외선 램프를 배양액 1cm위에 위치하도록 삽입한 후 300 rpm에서 여러 조사량의 자외선을 조사하였다. 자외선 조사 직전과 직후 얻어진 각각의 시료들을 여러 희석배수로 희석하여 한천배지에 도말한 후 32°C에서 배양하였다[2]. 이 때 동일한 자외선량에 의해 조사된 자외선 조사 직전과 직후의 시료들로부터 얻은 콜로니수를 비교함으로써 각 균주의 생존율을 구하였다. 상기 실험을 통하여 얻어진 자외선 조사량에 대한 single-lysogen과 double-lysogen의 생존율을 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Survival fraction of single- and double-lysogen by UV-irradiation

UV dosage [mJ/cm ²]	P90c/λHL1	UV dosage [mJ/cm ²]	P90c/(λHL1/434)
0	1	0	1
24	0.759	24	0.272
48	0.382	36	0.099
72	0.0297	48	0.0324
96	0.00181	60	0.00183
120	0.00016	72	0.00042

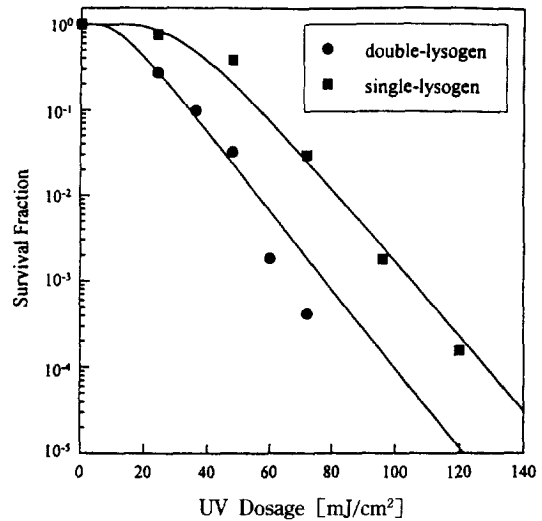


Fig. 2. Survival curves of single- and double-lysogen upon UV-irradiation; $x_L = 2.5$, $x_D = 5.5$, $p = 0.17$.

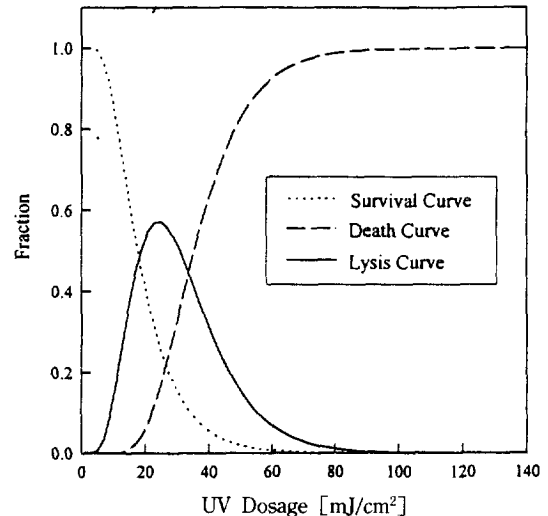


Fig. 3. Fate of lysogen with different UV dosage; $x_L = 2.5$, $x_D = 5.5$, $p = 0.17$.

이들 data들과 (3), (9) 식으로부터 수치해석적인 방법 (최소자승법)에 의하여 double-lysogen의 매개변수값 $x_L = 2.5$, $x_D = 5.5$, $p = 0.17$ 을 구하였다. 이 매개변수들을 사용하여 얻은 (3), (9)식의 생장곡선이 Fig. 2에서 Table 1의 data들을 잘 표현하고 있다.

앞에서 얻은 매개변수값들을 (3), (4), (5)식에 적용함으로써 자외선 조사량에 대한 double-lysogen[P90 c/(λHL1.434)]의 생존율, 용해율, 사멸율을 얻었다. 이를 Fig. 3에 나타내었고, 또한 이를 이용하여 이전의 연구

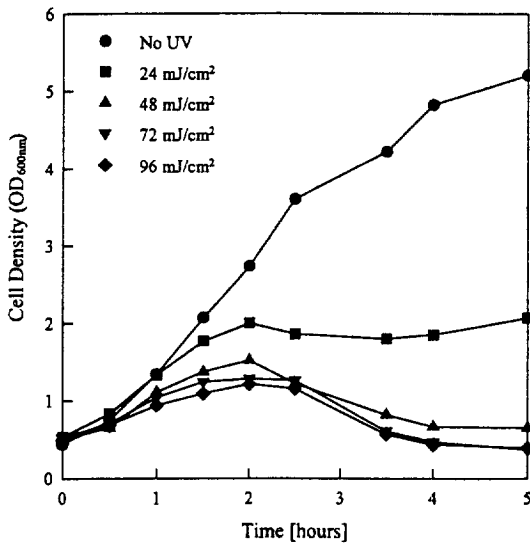


Fig. 4. Effect of UV dosage on the cell growth.

[2]에서의 실험결과들에 대하여 고찰하였다.

Fig. 3은 가장 높은 세포용해율을 얻기 위한 최적의 자외선 조사량이 약 24 mJ/cm²임을 보여주고 있다. 그러나 이러한 조사량에서는 생존율 역시 높은 수준을 유지하고 있기 때문에 Fig. 4[2]에서 볼 수 있듯이 효과적인 세포용해를 얻을 수 없다. Fig. 4에서 효과적인 세포용해를 얻을 수 있는 72 mJ/cm²의 조사량에 대하여 Fig. 3에서 고찰하여 보면, 이 때의 조사량에서는 세포의 95%는 사멸하고 5% 정도의 세포가 용해되며 생존율은 거의 0%에 가깝다. 이 사실로부터 효율적 세포용해를 수행하기 위해서는 세포의 생존율을 최대한 적게 하는 자외선량을 조사해야 함을 알 수 있다. 그러나, 72 mJ/cm²의 조사량에서의 사멸율은 상당히 높으며, 이것은 대부분의 double-lysogenic cell이 단백질 생산을 수행하지 못하고 죽게 됨을 의미한다. 그럼에도 불구하고 Fig. 5[2]에서는 P90c/(λHL1,434)의 온도유도 직후 72 mJ/cm²의 자외선을 조사함으로써 충분한 단백질 생산과 세포용해가 이루어짐을 보여주고 있다. 이것은 자외선 조사 시점이 세포가 가장 높은 생물학적 활성을 가지고 있는 대수증식기이며, 또한 일단 온도유도가 되면 짧은 시간에 많은 단백질을 생산할 수 있는 vector λHL1의 특성[14] 때문에 얻을 수 있는 결과로 사료된다.

세포용해 효율을 증대시키기 위한 방법으로서 세포용해를 위한 파장이 적은 자외선량에서도 쉽게 유도되고, 숙주세포가 자외선에 대해 더 큰 내성을 가지고 있는 또다른 double-lysogen을 사용하였을 경우를 고찰하였다. 실제로 λind⁺와 같은 돌연변이 파아지는 아

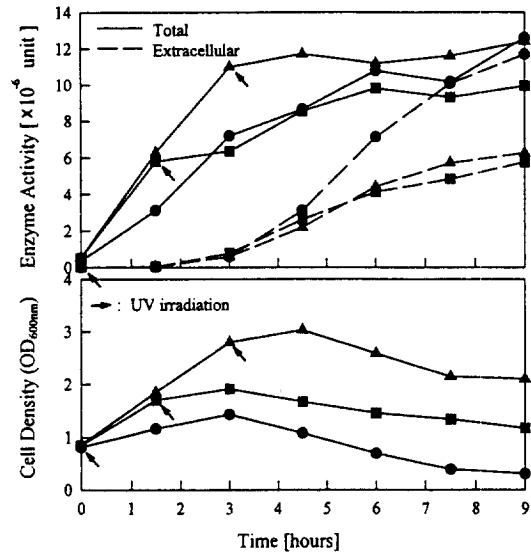


Fig. 5. Effect of UV-irradiation time on the cell lysis.

생형 λ보다 1/10에 해당하는 적은 자외선량에 의해 유도된다[15]. 현재 λind⁺에 대한 수배가 진행 중에 있으며, 이러한 가상적인 double-lysogen에 대한 용해효율을 상기 모델에 의해 각 매개변수값을 변화시킴으로써 예측할 수 있었다. 가상의 double-lysogen은 본 연구에서 사용되어진 P90c/(λHL1,434)보다 더 적은 x_L 값과 더 큰 x_D 값을 가지며, 이것은 이러한 double-lysogen이 더 적은 자외선량에 의해 prophage가 유도되어 세포용해가 진행되며, 과량의 자외선량에도 숙주세포가 사멸되지 않음을 의미한다.

Fig. 6에서는 $x_L=1$, $x_D=6.5$ 의 매개변수값을 갖는 double-lysogen을 동일한 배지($p=0.17$)와 동일한 조건에서 실험을 수행하였을 때 얻을 수 있는 결과를 보여주고 있다. 이로부터 이 double-lysogen에 40-50 mJ/cm²의 자외선을 조사하면 생존율은 여전히 0%에 가까운 수준을 유지하는 반면 세포용해율을 30-50%까지 증가시킬 수 있음을 알 수 있다. 또한 이러한 double-lysogen에 대한 실험을 M9a 배지[7]와 같이 자외선 투과도가 큰 최소배지에서 수행하였을 때 얻을 수 있는 결과를 예측하였다.

배지의 자외선에 대한 투과도가 커지면 세포가 자외선에 의해 조사될 확률이 증가하므로 매개변수 p 값도 증가하게 되며, $p=0.3$ 을 가정하였을 때의 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 이 경우에 조사량 20 mJ/cm²의 자외선을 조사하면 $R_S=0.02$, $R_L=0.6$, $R_D=0.38$ 의 결과를 얻을 수 있으며, 이로부터 자외선에 대한 투과도가 큰 배지를 사용하면 세포용해 효율을 증가시킬 수 있고, 또한 적은

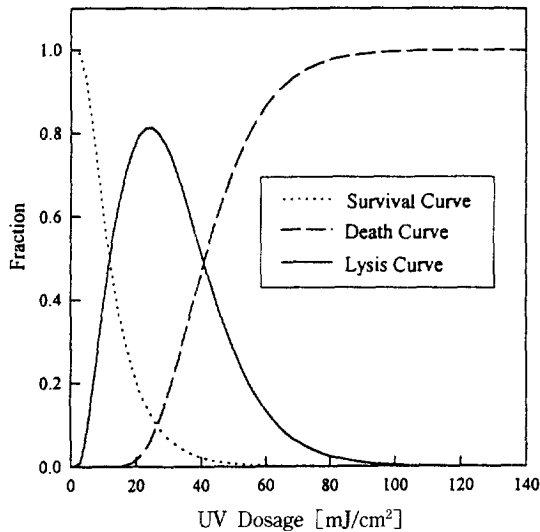


Fig. 6. Fate of lysogen with different UV dosage; $x_L = 1$, $x_D = 6.5$, $p = 0.17$.

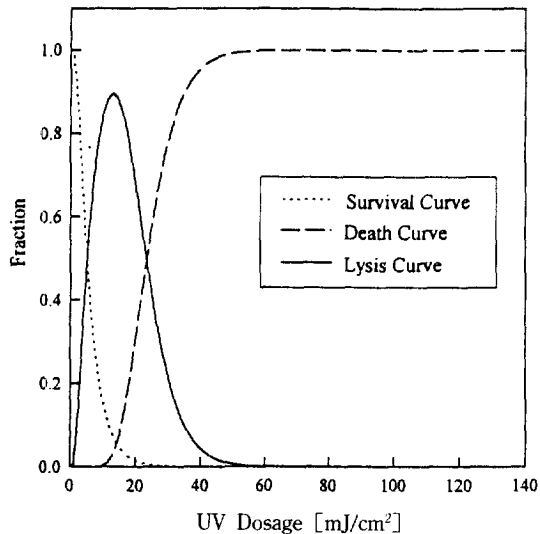


Fig. 7. Fate of lysogen with different UV dosage; $x_L = 1$, $x_D = 6.5$, $p = 0.3$.

자외선 조사량으로도 동일한 세포용해 효율을 얻을 수 있음을 알 수 있다. 위와 같이 모델을 통하여 가상적인 경우에 대한 결과를 예측함으로써 double-lysogen을 이용한 단백질 생산과 세포용해 시스템에 새로운 파아지와 균주를 사용하면 자외선 조사에 의한 세포용해율을 증대시킬 수 있으며, 결과적으로 더 효율적인 단백질 생산과 회수를 수행할 수 있음을 알 수 있었다.

4. 결 론

본 연구에서는 자외선 조사가 lysogenic cell의 life cycle에 미치는 영향을 알아보기 위한 모델을 제시하였다. 또한 실험을 통하여 각 매개변수 값 $x_L = 2.5$, $x_D = 5.5$, $p = 0.17$ 을 얻었으며, 이로부터 자외선에 조사되어진 double-lysogen[P90c/(λHL1,434)]의 생존율, 용해율, 사멸률을 자외선 조사량에 대한 수식으로 나타내었다. 이 모델을 이용하여 자외선에 의한 double-lysogen의 세포용해 특성을 고찰하였으며, 또한 각 매개변수 값을 변화시킴으로서 다른 조건에서 얻을 수 있는 결과들을 예측하였다. 이와 같은 결과들로부터 double-lysogen을 이용한 단백질 생산과 세포용해의 효율 증가는 본 시스템에 적합한 새로운 파아지와 박테리아 그리고 자외선에 대한 투과도가 높은 배지를 사용함으로써 얻을 수 있음을 보였다.

감 사

본 연구는 생물공정연구센터(한국과학재단)와 한국학술진흥재단의 연구비에 의해 수행되었으며, 이 지원에 감사드립니다.

사용기호

- K : UV dosage [mJ/cm²]
- p : probability of being irradiated by UV
- R_D : death fraction of double-lysogen
- $R_{D,S}$: death fraction of single-lysogen
- R_L : lysis fraction of double-lysogen
- R_S : survival fraction of double-lysogen
- $R_{S,S}$: survival fraction of single-lysogen
- x_D : threshold dosage for death of host cell [mJ/cm²]
- x_L : threshold dosage for induction of phage [mJ/cm²]

참고문헌

1. Foster, D.: *Bio/Technology*, **10**, 1539(1992).
2. Park, S.-S. and Koo, Y.-M.: *Biotechnol. Lett.*, **16** (10), 1007(1994).
3. Brock, T. D. and Madigan, M. T.: "Biology of Microorganisms", 6th ed., Prentice-Hall International, Inc.(1991).
4. Freifelder, D.: "Molecular Biology", 2nd ed., Jones and Bartlett Publishers, Inc.(1987).
5. Brent, R. and Ptashne, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **78**(7), 4204(1981).

6. Bagg, A., Kenyon, C. J. and Walker, G. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **78**(9), 5749(1981).
7. Hendrix, R. W., Roberts, J. W., Stahl, F. W. and Weisberg, R. A.: "Lambda II", Cold Spring Harbor Laboratory, New York(1983).
8. Ptashne, M.: "A Genetic Switch", 2nd ed., Cell Press and Blackwell Scientific Publications, Massachusetts(1992).
9. Baluch, J., Sussman, R. and Resnick, J.: *Molec. Gen. Genet.*, **178**, 317(1980).
10. Bailey, J. E. and Ollis, D. F.: "Biochemical Engineering Fundamentals", 2nd ed., McGraw-Hill Book Company, New York(1986).
11. Smith, J. M.: "Mathematical Ideas in Biology", Cambridge University Press, London(1971).
12. Hogg, R. V. and Tanis, E. A.: "Probability and Statistical Inference", 2nd ed., Macmillan Publishing Co., Inc.(1983).
13. Padukone, N., Peretti, S. W. and Ollis, D. F.: *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 369(1992).
14. Lin, C. S.: Ph.D. Dissertation, University of California, Irvine, CA, USA(1992).
15. Cohen, S., Knoll, B. J., Little, J. W. and Mount, D. W.: *Nature*, **294**(12), 182(1981).