

Methylotrophic Yeast를 이용한 외래단백질 발현에서의 발효 변수 최적화

†강 환 구 · 이 문 원 · 전 희 진

한남대학교 공과대학 화학공학과

(접수 : 1998. 3. 11., 게재승인 : 1998. 4. 27.)

The Optimization of Fermentation Parameters for Heterologous Protein Productivity Enhancement with *Pichia pastoris*

Whankoo Kang[†], Moonwon Lee, and Heejin Chun

Department of Chemical Engineering, Hannam University Ojung Dong 133, Daeduck Gu, Daejeon, Korea, 306-791

(Received : 1998. 3. 11., Accepted : 1998. 4. 27.)

The methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, is known to be a potential host to offer many advantages for production of recombinant proteins. Fermentation parameters were optimized to enhance the heterologous β -galactosidase productivity with *P. pastoris*. Optimum concentration of methanol, used as inducer, was observed to be 8 g/L and the extent of repression of AOX1 promoter by glycerol was lower than by glucose. The degradation of the gene product β -galactosidase by protease was inhibited as the pH increased from 5 to 8 and the yeast extract(1%) as nitrogen source increased expression level 4 times higher compared to yeast nitrogen base(1%). Induction method, in which methanol is just added to fermentation medium without centrifugation, was found to be as much effective as the one with centrifugation.

Key Words : *Pichia pastoris*, recombinant protein, fermentation

서 론

현재 유전자재조합 단백질 생산을 위해 주로 쓰이고 있는 숙주세포로는 *E. coli*와 *S. cerevisiae* 등의 효모 그리고 동물세포인 CHO cell들이 있으며 이들중 효모는 *E. coli*와 비교하여 몇 가지 장점을 가지고 있다(1). 첫째로는 효모의 세포내 환경이 생성된 단백질의 정확한 folding에 적합하고 둘째로는 효모는 단백질의 활성이나 안정성 등에 매우 중요한 당화(glycosylation)를 행할 수 있으며 셋째로는 효모는 *E. coli*에 비해 유전자 재조합 단백질을 더 효율적으로 세포 밖으로 분비 생산하여 이 단백질의 분리 정제에 도움을 줄 수 있고 넷째로 효모에서 단백질을 생산할 때에는 의약품 단백질의 경우에 꼭 제거되어야만 하는 endotoxin 등이 *E. coli*와는 다르게 문제가 되지 않는 장점을 가지고 있다. 이러한 효모중에 대표적으로 사용하고 있는 *S. cerevisiae*는 1981년 이를 이용하여 유전자 재조합 단백질 생산이 보고된 이래 수많은 연구자들에 의해 활발한 연구가 진행되어 왔고 실제 회사들에서는 이 *S. cerevisiae*를 이용하여 의약품용 외래 단백질을 생산하고 있다.

그러나 이 *S. cerevisiae*에는 다음과 같은 해결할 문제점을 가지고 있다 (2). 첫째로는 높은 발현양을 얻기 위해서는

multi-copy plasmid가 필요하게 되어지고 큰 규모의 발효조에서 고농도 세포배양을 할 때 이들 plasmid의 distribution, copy number, stability등이 자주 문제가 되어지고 있다. 둘째로는 glycolytic gene 유래의 promoter들은 대부분 constitutive promoter이어서 이를 이용하여 단백질 발현을 하는 경우는 특히 고농도 큰 규모 세포배양에서는 plasmid를 잃은 cell들의 숫자가 증가되므로 문제가 되어지고 또한 조절할 수 있는 promoter들도 정확하게 제어하기 어려운 문제점이 있다. 예를 들어 ADH2 promoter의 경우의 낮은 글루코오스 농도에서의 발현이나 acid phosphatase promoter의 경우의 낮은 phosphate 농도에서의 발현 등은 정확히 제어하기 쉽지 않은 점들이며 정확히 발현조절이 되지 않을 때는 역시 큰 규모의 발효에서는 발효 후반부에서 plasmid를 잃은 cell들의 숫자가 증가되어지고 또한 생성 단백질이 protease에 노출되는 시간이 많아 경우에 따라서는 생성 단백질 분해 문제가 생기기도 한다(1).

따라서 plasmid loss 문제가 없는 염색체 integrated foreign DNA 를 가지고 있고 확실한 제어가 가능하며 강한 promoter인 AOX1 promoter를 가지는 methylotrophic 효모인 *P. pastoris*를 이용한 재조합단백질 생산 연구가 필요하다 하겠다. 메탄산화 효모인 *P. pastoris*는 유전자 재조합 단백질을 생산하는데 있어서 많은 장점 (3-10)을 지니고 있는 유용 가능성이 매우 큰 숙주세포로 알려져 있는데 그 장점으로는 첫째로 *P. pastoris*의 알코올 산화효소 1 프로모터 (AOX 1

† Corresponding author : Department of Chemical Engineering, Hannam University, Ojung Dong 133, Daeduck Gu, Daejeon, Korea, 306-791

째로 *P. pastoris*의 알코올 산화효소 1 프로모터 (AOX 1 promoter)는 매우 강력하여 발현양이 전체 단백질의 30% 이상이며 또한 잘 제어 조절된다는 것이고 둘째로는 이 *P. pastoris*에서 외래 유전자를 발현시키기 위해 외래 DNA를 *P. pastoris*의 염색체 DNA에 삽입하게 되므로 이 삽입된 외래 DNA는 고농도 발효 및 발현 기간동안 매우 안정하다는 것이며 셋째로 *P. pastoris*는 shake flask로부터 발효기에서의 고농도 발효로의 scale up이 쉽다는 것과 넷째로 당화형태가 *S. cerevisiae*에서 발현할 경우와 다르게 terminal α 1,3-linkage mannose를 가지고 있지 않으므로 후에 의약품용으로 사용할 때 antigenicity 문제를 일으키지 않는다는 것이다 (11-13). 이와 같이 이용 가능성이 매우 높은 *P. pastoris*에 대하여 균주 개량이나 발현 vector를 비롯한 발현 체계 개발에는 많은 노력이 기울여졌으나 (3-6, 13-14) 상대적으로 이를 이용한 발효조건 변화에 따른 외래 단백질 생산성 증가에는 많은 연구가 진행되어져 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 *P. pastoris*를 이용하여 외래 단백질 생산성 증가를 위한 최적 발효 조건 탐색을 수행하였는데 AOX1 promoter의 induction을 극대화하기 위한 메탄올 유도 시기, 외래 단백질 발현을 증가 및 분해현상 억제에 위한 여러 질소원의 영향, 탄소원들의 promoter repression 정도, Mut⁺ 균주를 이용한 외래 단백질 생산 극대화를 위한 최적 메탄올 농도, 세포내 단백질 생산 경우에 있어서 단백질 분해 정도의 영향, *P. pastoris*에서의 최적 유도 방법 등을 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

본 연구에 사용되는 *P. pastoris*는 histidine auxotroph인 GS 115 strain이며 이 *P. pastoris*와 발현 kit는 invitrogen사에서 구입하였으며 실험에서 이용한 균주는 세포내 발현을 하게되는 β -galactosidase 유전자를 pHIL-D2 발현 vector에 넣어 host genome HIS4 locus에 integration된 GS 115 / his⁺mut⁺ β -gal intracellular strain이었다. 미생물 생육에 사용된 배지는 글리세롤 10g/L, 효모 nitrogen base(YNB) w/o amino acid 13.4g/L, biotin 0.4mg/L를 함유하는 minimal 배지와 글리세롤 10g/L, 효모 extract 10g/L를 함유하는 complex 배지이며 탄소원으로 글리세롤 또는 글루코오스를 inducer로서 methanol을 사용하였다. *P. pastoris* 균주는 -70°C에서 보관되는 1ml seed stock vial로부터 실험할 배지 50ml이 들어있는 멸균된 baffled flask로 접종되어 24시간 배양된 후 다시 5L fermenter로 접종되어 30°C, pH 5.5, 250 ~ 800 rpm에서 여러 조건으로 실험이 수행되었다.

분석방법

세포의 농도는 600nm에서 spectrophotometer (Milton Roy, Spectronic 21)를 이용하여 흡광도로 구하였다. 발현된 β -galactosidase는 Miller 방법에 의해서 측정하였는데 즉 1분 동안에 1nmol의 ONPG를 분해시킬 수 있는 효소의 활성을 unit로 정의하였다(4). 그리고 이 β -galactosidase는 세포내에 발현되어지므로 세포배양후 4000g에서 10분간 원심 분리하

여 세포를 얻은 후 0.5mm 크기의 glass bead를 사용 vortexing 한 후 10분간 centrifuge하여 supernatant인 cell lysate를 얻어 이를 이용하여 β -galactosidase 활성분석을 하였다. 메탄올 분석은 가스크로마토그래피 (Donnam, DS6200)에서 수행되었다. 사용된 column은 길이 6 ft의 녹슬지않는 stainless steel이고 충전물질은 Haysep Q (CRS)이며 FID detector를 이용하였다. 실험조건은 injector 180°C, oven은 130°C, detector는 200°C이었다.

결과 및 고찰

메탄올에 의한 최적 induction 시기

GS 115 / his⁺mut⁺ (메탄올을 잘 이용하는 균주) β -gal intracellular strain을 사용하여 메탄올에 의한 induction 시기가 재조합 단백질 생산성에 미치는 영향을 조사한 결과 Figure 1, Figure 2 와 같았다. 이 실험에서는 메탄올 첨가 시기 영향을 보기 위하여 초기에 메탄올을 첨가하여 induction 시킨 경우와 22hr후 균주가 exponential growth stage에 있을 때 메탄올을 첨가하여 induction 시킨 경우를 비교하였다. 사용한 배지는 글리세롤 10 g/L를 함유한 minimal 배지이었으며 8 g/L 메탄올을 이용하여 유도 시켰다. 이 결과 초기에 메탄올을 첨가한 경우보다 O. D. 가 약 2.5에서 유도한 경우가 최종 cell 농도 및 발현된 β -galactosidase 농도가 높았는데 이는 배양초기에 메탄올 첨가할 경우 낮은 세포농도에서의 메탄올에 의한 성장장애와 오랜시간동안의 발현에 의한 cell load의 증가와 발현된 β -galactosidase가 오랜시간동안 protease에 노출되어 분해되었기 때문으로 생각된다. 또한 Figure 1에서 알 수 있는 바와 같이 YNB w/o amino acid를 N source로 사용한 경우 발효후반부에서 intracellular 형태로 발현된 β -galactosidase의 분해현상을 확인할 수 있었으며 이 것이 *P. pastoris*의 단백질 분해 효소에 의한 β -galactosidase의 분해인가를 알기위해 PMSF 첨가에 의한 β -galactosidase 분해 저해 여부를 확인하였다.

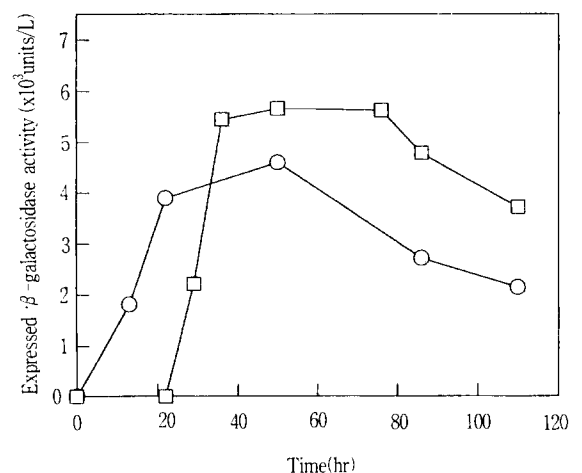


Figure 1. Effect of induction time on the expression of foreign protein with *Pichia pastoris*.

Methanol as inducer was added at t=0(○) or at t=22hr(□) Culture medium contains : glycerol(10g/L), YNB(13.4g/L) and biotin(0.4mg/L)

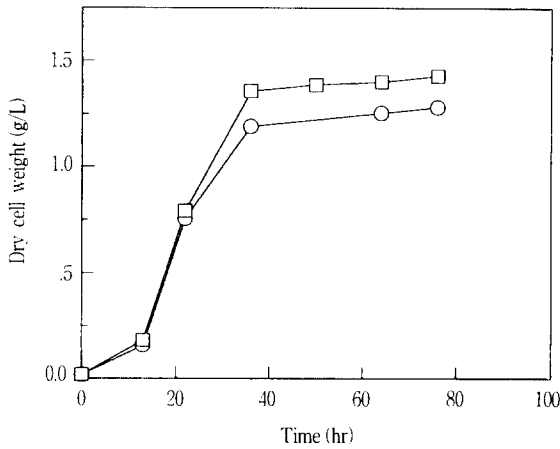


Figure 2. Effect of induction time on cell growth with *Pichia pastoris*. Methanol as inducer was added at t=0(○) or at t=22hr(□) Culture medium contains : glycerol(10g/L), YNB(13.4g/L) and biotin(0.4mg/L)

단백질 분해현상 확인

Figure 3에 나타남바와 같이 GS 115 / *his⁻mut⁻* β -gal intracellular strain을 글리세롤 10 g/L를 함유한 minimal배지에 접종하여 배양후 약 23시간에 8 g/L 메탄올로 유도하였다. 그후 발현된 β -galactosidase activity가 약 6000 unit/L 에 도달한 후 한쪽 배양 flask에는 PMSF를 10mM 첨가하고 다른 배양 flask에는 PMSF를 첨가하지 않은 경우를 비교하였다. PMSF는 강력한 protease inhibitor로 알려져 있으며 이러한 protease inhibitor인 PMSF를 첨가한 경우 생성된 β -galactosidase 생성량이 감소되지 않는 것으로 보아 PMSF가 첨가되지 않은 경우의 β -galactosidase activity 감소는 protease에 의한 분해임을 확인할 수 있었다. 이러한 *P. pastoris*의 단백질 분해효소에 의한 생성외래 단백질 분해 현상은 실제 상업화 공정에서 꼭 피

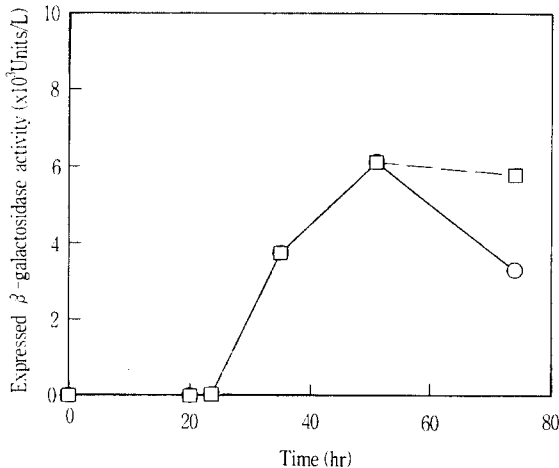


Figure 3. β -galactosidase degradation in *P. pastoris*. ○-○ : without PMSF add □-□ : with PMSF add at 50 hrs *YNB was used as N source

의한 생성외래 단백질 분해 현상은 실제 상업화 공정에서 꼭 피해야 하므로 이러한 단백질 분해현상을 막기 위하여 질소원에 대한 연구 및 pH shift에 관한 연구가 진행되었다.

질소원의 영향

GS 115 / *his⁻mut⁻* β -gal intracellular strain을 이용하여 글리세롤 10 g/L를 함유한 minimal 배지에 자라게 한 후 메탄올 8 g/L로 유도한 것을 control로 이 기본배지에 YNB를 2.68% 되게 첨가하여 이 YNB가 β -galactosidase 발현에 미치는 영향을 조사한바 Figure 4에 나타남 것과 같이 배지중 질소원인 YNB양의 증가에 의하여 β -galactosidase 발현량이 12 배이상 증가되고 단백질 분해현상도 감소함을 알 수 있었다. 따라서 *P. pastoris* 경우에 질소원이 외래단백질 발현에 미치는 영향이 매우 큼을 확인하고 여러 가지 종류의 질소원을 이용하여 실험하였는데 사용한 질소원은 효모 extract, casamino acid 등이었다. 원래 YNB w/o amino acid는 ammonium sulfate에 vitamin과 trace metal이 강화된 배지로 Invitrogen사에서 *P. pastoris*에 권하는 배지이나 selective media의 기능만 있을 뿐 고농도 발현에는 적합치 않은 배지임을 본 실험을 통하여 확인하였고 이 YNB와 다른 질소원을 비교한 결과는 Figure 4에 나타남 있는데 yeast extract 10 g/L를 사용한 경우 β -galactosidase 발현 양이 YNB에 비해 4배이상 증가되었고 단백질 분해현상도 어느 정도 해결할 수 있었다. 반면 casamino acid 10 g/L를 질소원으로 사용한 경우는 β -galactosidase 발현량이 YNB에 비해 그렇게 높지 않음을 알 수 있었다. 이러한 질소원들이 세포성장에 미치는 영향도 Figure 4에 나타남 바 casamino acid, 효모 extract 등이 YNB에 비해 세포성장을 증가시킴을 알 수 있었다. 본 실험결과 YE 10 g/L, 글리세롤 10 g/L를 함유한 complex배지를 기본배지로 사용하였다.

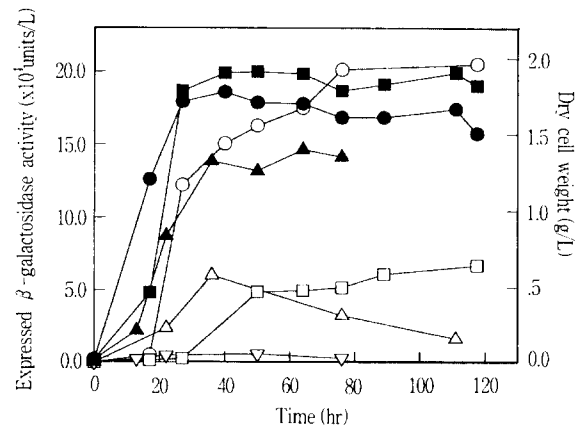


Figure 4. Effect of N source on cell growth and foreign protein expression level with *P. pastoris*. In all cases glycerol(10g/L) and biotin(0.4mg/L) were contained in medium β -galactosidase activity with yeast extract 10g/L(○-○), casamino acid 10g/L(□-□), YNB w/o amino acid 26.8g/L (△-△), YNB w/o amino acid 13.4g/L(▽-▽) Dry cell weight with yeast extract 10g/L(●-●), casamino

단백질 분해에 미치는 pH의 영향

앞에서 논의된 바와 같이 *mut⁻ β-gal* strain을 이용하여 pH가 단백질 분해현상에 어떤 영향을 미치는가를 실험하였다. 이를 위해 생성된 단백질 분해현상을 일으키는 글리세롤 10 g/L, YNB 10 g/L등을 함유하는 minimal 배지에 *mut⁻ β-gal* strain을 접종하여 약 23시간 후에 메탄올 8 g/L를 첨가하여 induction시켰는데 pH를 각각 5, 6, 8로 유지하면서 실험하였다. 실험결과에 Figure 5에 나타나 있는데 pH 5에서 8로 올라갈수록 생성단백질 분해현상이 감소됨을 알 수 있었는데 pH 8 근처에서 *P. pastoris*의 단백질 분해 효소 활성이 많이 저해되기 때문으로 생각된다. 그러나 각각 다른 pH에서 세포성장은 크게 영향을 받지 않는 것으로 확인되었다. 이와 같은 생성된 외래 단백질 분해 저해에 관한 최적 pH는 생성 단백질종류에 따라 각각 확인해 보아야 할 것으로 생각된다.

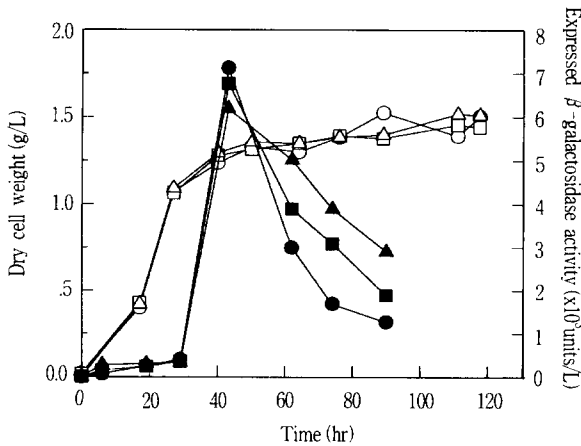


Figure 5. Effect of pH on cell growth and foreign protein expression level with *P. pastoris*.

Dry cell weight at pH 5(○-○), pH6(□-□), pH8(△-△)
 Expressed β-galactosidase activity at pH 5(●-●), pH6(■-■), pH8(▲-▲)
 glycerol(10g/L), YNB(13.4g/L) and Biotin(0.4mg/L) was contained in medium

AOX1 promoter repression에 미치는 탄소원의 영향

mut⁻ β-gal strain을 이용하여 YE 10 g/L를 질소원으로 사용하고 탄소원으로 글루코오스 10 g/L와 글리세롤 10 g/L를 각각 사용하고 메탄올 8 g/L로 induction하는 경우를 비교하였다. Figure 6에 나타난 바와 같이 글루코오스를 사용하였을 경우 글루코오스가 다 소비되어 글루코오스 농도가 0이 된 후에도 2~3시간 정도 발현이 이루어지지 않으나 글리세롤을 사용한 경우 글리세롤 농도가 1 g/L로 남아 있을 때에도 최대 발현의 약 10% 정도의 발현이 이루어짐을 알 수 있어 글리세롤에 의한 AOX 1 promoter repression이 글루코오스에 비해 적음을 알 수 있었다. 따라서 Fed-batch시 mixed feeding을 하고자 할 경우에는 글루코오스와 메탄올 대신 글리세롤과 메탄올을 feeding하는 것이 탄소원에 의한 AOX1 promoter repression을 줄일 수 있는 방법임을 알 수 있었다.

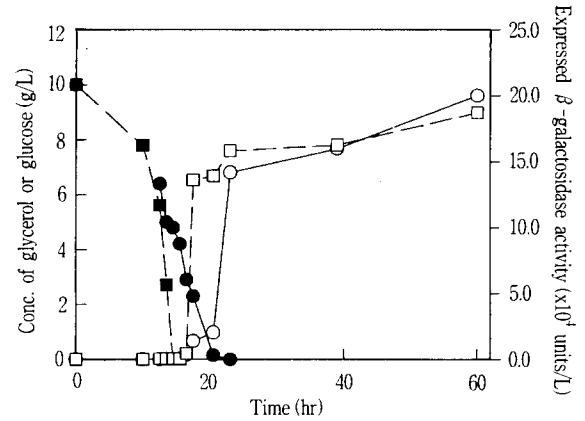


Figure 6. C source effect on β-galactosidase expression.

●-● : glycerol conc.(g/L)
 ■-■ : glucose conc.(g/L)
 ○-○ : β-gal expression level when glycerol was used
 □-□ : β-gal expression level glucose was used
 *YE(10g/L) was used as N source

Inducer로서 메탄올 농도가 발현에 미치는 영향

AOX1 promoter를 induce하는 최적 메탄올 농도를 구하기 위하여 *mut⁻ intercellular β-gal* strain을 이용하여 여러 메탄올 농도에서 induction하는 실험을 수행하였다. 이 결과는 Figure 7에 보여지는데, 메탄올 농도가 1 g/L에서 5 g/L 그리고 8 g/L로 증가할수록 외래 단백질 생산성은 증가하여 1 g/L에 비해 8 g/L경우는 5배이상의 외래단백질생산성을 나타내는 것을 알 수 있는데 메탄올 농도가 13 g/L로 증가하였을 경우는 오히려 생성단백질 농도가 50% 정도 감소됨을 알 수 있었다. 본 실험결과 AOX1 promoter의 inducer로서 최적 메탄올 농도는 약 8 g/L임을 확인할 수 있었다.

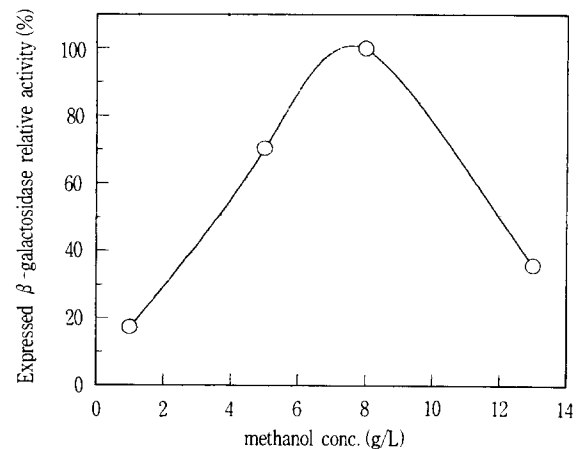


Figure 7. Effect of methanol conc on protein expression level with *mut⁺ Pichia pastoris*.

*Optimum methanol conc. is 8g/L
 *In all cases YNB was supplied regularly as N source

Induction방법이 발현율에 미치는 영향

본 실험에서는 induction방법이 발현율에 미치는 영향을 조사

하였는데 Invitrogen사에서 권하고 있는 induction방법인 발효도중 글리세롤 함유 초기 배지를 원심분리하여 버리고 pellet으로 얻어진 균주에 메탄올 함유배지를 첨가하는 방법을 글리세롤 함유배지에 적당한 시기에 원심분리없이 메탄올만 첨가하는 방법과 비교하였다. Invitrogen에서 권하는 induction방법은 원심분리를 통하여 글리세롤을 완전히 제거하여 메탄올에 의한 induction시 글리세롤에 의한 repression을 없애려한 것으로 보여지는데 이 Invitrogen 방법과 원심분리없이 메탄올만 첨가하는 방법을 비교한 결과는 Figure 8에 나타나는데 원심분리없이 메탄올만 첨가한 경우 β -galactosidase 단백질 발현정도가 원심분리한 경우와 거의 차이가 없음을 확인하였다. 특히 세포성장의 경우에는 원심분리없이 메탄올만 첨가하는 경우 cell의 damage 감소 및 남아 있는 탄소원의 영향으로 오히려 원심분리 경우보다 높음을 알 수 있었다. 그러므로 scale-up시 오염의 소지 및 여러 불편함이 따르는 원심분리없이 적절한 시점에 메탄올 첨가만에 의한 발현방법을 택하는 것이 바람직하다고 생각된다.

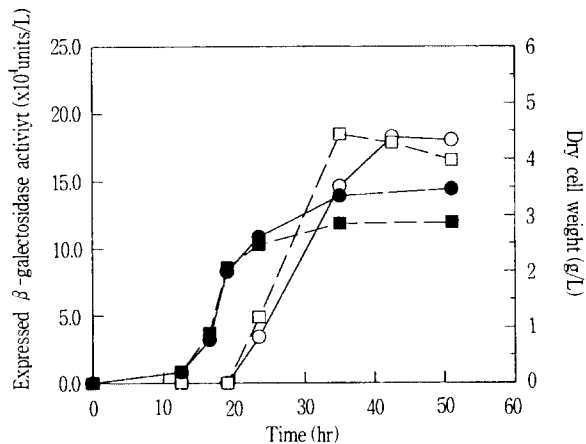


Figure 8. Effect of induction method on expression and cell growth.

*Method 1 : at 19 hrs, medium was centrifuged and cells were resuspended with 8 g/L methanol

□-□ : expressed beta galactosidase

■-■ : dry cell weight

*Method 2 : at 19 hrs, 8g/L methanol was just added to medium

○-○ : expressed beta galactosidase

●-● : dry cell weight

* YE (10g/L) was used as N source

요 약

*P. pastoris*를 이용하여 β -galactosidase의 발현 최적조건을 탐색하였다. 메탄올에 의한 최적 induction시기를 알아보기 위하여 메탄올 첨가 시점을 달리하여 실험을 수행한 결과 배양초기에 메탄올을 첨가하여 induction 한 경우보다 세포의 exponential growth 단계인 dry cell weight 0.9 g/L에서 induction한 경우가 발현된 β -galactosidase농도가 높았다. 여러 가지 질소원 및 pH가 단백질 발현양 및 분해에 미치는 영향을 살펴본 결과 질소원으로 YNB를 사용한 경우 YNB양의 증

가에 의하여 β -galactosidase발현양이 12배이상 증가되고 단백질 분해현상도 감소하였다. YNB와 다른 N source를 비교한 결과는 효모 extract 1%를 사용한 경우 β -galactosidase 발현양이 YNB에 비해 4배이상 증가되었고 단백질 분해현상도 어느 정도 해결할 수 있었다. 또한 배지 pH가 발현단백질 분해 현상에 미치는 영향을 조사한바 pH 4, 5, 6에 비해 약 pH 8 근처에서 생성단백질 분해현상이 감소됨을 알 수 있었다. AOX1 promoter repression에 미치는 탄소원의 영향을 살펴본 결과 글리세롤 경우 글루코우즈에 비해 AOX1 promoter repression을 적게 받음을 알 수 있었고 AOX1 promoter를 induce하는 최적 메탄올 농도를 구한 결과 8g/L임을 알 수 있었다. 또한 induction방법이 발현율에 미치는 영향을 조사하였는데 글리세롤 함유배지에 적당한 시기에 원심분리없이 메탄올만 첨가하는 것이 초기 배지를 원심분리하여 pellet으로 얻어진 균주에 메탄올 함유배지를 첨가하는 경우와 비해 더 높은 발현율을 얻을 수 있음을 확인하였다.

감 사

이 연구는 1995년도 교육부 생물화학공학 학술연구조성비에 의하여 연구되었습니다. 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Cregg, J. M., Tschopp, J. F., Stillman, C.(1987), High level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylophilic yeast, *Pichia pastoris*, *Bio/Technology*, 5, 497-504
2. Vedvick, T., Buckholz, R.G.(1991), High level secretion of biologically active aprotinin from the yeast *P. pastoris*, *J. Ind. Microbiol.*, 7, 197-205
3. Cregg, J., Barringer, K., Hessler, A. Y., and Madden, K. (1985), *Pichia pastoris* as a host system for transformations, *Mol. Cell. Biol.*, 5, 3376-3383
4. Cregg, J. M. and Madden, K. R.(1988), Development of the methylophilic yeast, *Pichia pastoris*, as a host system for the production of foreign proteins, *Dev. Ind. Microbiol.*, 29, 33-40
5. Cregg, J. M. and Madden, K. R.(1988a), Development of yeast transformation systems and construction of methanol utilization defective mutants of *P. pastoris* by gene disruption, *Biological Research on Industrial Yeasts*, Vol II, p.18 CRC Press, Boca Raton, FL
6. Cregg, J. M. and William C. R.(1993), Recent advances in the expression of foreign genes in *P. pastoris*, *Bio/Technology*, 11, 905-913
7. Ellis, S., Brust, P.F., Koutz, P. Z., Waters, A.F., and Harpold, M.M.(1985), Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *P. pastoris*, *Mol. Cell Biol.*, 5, 111-120
8. Barr, K. A., Hopkins, S.A. and Sreekrishna, K.(1992), Protocol for efficient secretion of HSA developed from

- P. pastoris*, *Pharm. Eng.*, **12**, 48-57
9. Digan, M. E. and Lair, S. V.(1989), Continuous production of a novel lysozyme via secretion from the yeast, *P. pastoris*, *Bio/Technology*, **7**, 160-168
 10. Tschopp, J. F., Brust, P. F., Cregg, J. M. and Stillman, C. A.(1987), Expression of the lac Z gene from two methanol regulated promoters in *P. pastoris*, *Nucleic Acids Res.*, **15**, 3859-3866
 11. Grinna, L. S. and Tschlopp, J. F.(1989), Size distribution and general structural features of N linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, *P. pastoris*, *Yeast*, **5**, 107-115
 12. Sreekrishna, K., Nelles, L. and Potenz, R.(1989), High level expression, purification and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast, *P. pastoris*, *Biochemistry*, **28**, 4117-4126
 13. Hirsch, H. H., Rendueles, P. S. and Wolf, D.H.(1989), Yeast proteinases ; Structure, Characteristics and Function, *Molecular and Cell Biology of Yeasts*, p.134 Blackie and van Nostrand Reinhold, NY