

재조합 효모의 고농도 세포 배양에 의한 이종 단백질의 대량생산

남 수 완

동의대학교 미생물학과

빵효모(*S. cerevisiae*)는 배양중에 당이 완전 고갈된 후 에탄올 소모가 시작(glucose 또는 Crabtree effect)된다. 이는 효모의 제한된 호흡용량 때문으로[51], 호기적 상태에서 포도당이 freely available 형태로 존재할 경우 mitochondria의 산화능력을 초과하는 pyruvate와 NADH가 생성되고, 과량의 pyruvate는 NADH에 의해 산화되어 에탄올 형태로 세포밖으로 분비된다. 일반적으로 빵효모의 경우 포도당 농도가 100 mg/L 이상일 때 에탄올 생성이 시작되고, 100 mg/L 이하일 때 에탄올 소모를 시작하는 것으로 알려지고 있다. 따라서, 빵효모의 전통적인 배양에서 에탄올 생성을 막기 위해(균체증식수율, $Y_{x/s}$, 을 증가시키기 위해) 포도당-제한 배양조건 또는 낮은 증식속도에서 배양한다. 그러나, Finland의 Alko사는 빵효모 유가 배양에서 당밀(molasses) 공급을 줄이는 에탄올 농도를 0.8 g/L로 setting하고 있으며, Paalme 등[42]에 의하면 에탄올 농도 3~4 g/L까지 호흡용량에 영향이 없는 것으로 알려지고 있어, 빵효모 균주마다 에탄올 소모가 시작되는 포도당 농도는 다를 수 있다.

포도당 제한 연속배양의 정상상태에서 효모(*S. cerevisiae*)는 완전산화(purely oxidative)와 산화·환원(oxidative/reductive, oxidoreductive)의 뚜렷한 두 가지 대사를 보인다. 낮은 포도당 농도(또는 낮은 희석율)에서 포도당은 완전히 산화되어 모든 포도당은 CO_2 와 biomass로 전환되며($Y_{x/s} \approx 0.5$ g-cell/g-glucose), 특정 포도당 농도(또는 임계 희석율, D_{crit})에서 포도당 흡수는 세포의 완전산화 용량을 초과한 수준에 도달하고 포도당의 일부는 에탄올로 전환된다. D_{crit} 이상에서 포도당 대사는 oxidative/reductive 대사를 통해 에탄올을 생성하며, $Y_{x/s}$ 는 0.5에서 0.15로 급격히 감소한다(산화적 대사에 비해 환원적 대사에서 ATP 수율이 감소하기 때문). 균주와 연속배양조건(pH, 배지성분)에 따라 달라지지만 대체적인 D_{crit} 값은 0.16-0.4 hr⁻¹ 범위이다. D_{crit} 이하에서 산소 비소모속도(q_{O_2})는 희석율이 따라 증가하며, D_{crit} 이상에서 q_{O_2} 는 일정해지거나 또는 감소하는 양상을 보인다. 이산화탄소 비발생속도(q_{CO_2})는 D_{crit} 이상에서 급격히 증가하여, 호흡율(RQ)이 증가한다. Carlsen 등[9]은 proteinase A 생산 재조합 효모의 배양에서 D_{crit} 인 0.15-0.16 hr⁻¹에서 최대 생산성을 얻었다.

이상과 같이 재조합 *S. cerevisiae*의 고농도 세포배양을 통한 이종 단백질의 효율적 생산에는 빵효모의 대사·생리적 특성 파악이 필수적으로 요구된다. 또한, 효모와 같은 진핵세포에서 유전자의 발현은 전사효율성과 분비경로에 크게 영향받기 때문에 높은 전사효율성을 위해 강력한 promoter가 요구되며, 세포생리적 인자(숙주세포의 선택, 배양조건)도 중요한 인자가 된다[6, 16, 18, 19, 53, 56]. 따라서, 본고에서는 효모세포의 대사·생리적 특성과 사용 promoter에 따른 재조합 효모(*S. cerevisiae* 및 메탄올 자화 효모 등)의 고농도 세포배양에 대하여 최근 연구동향을 간략히 소개하고자 한다.

재조합 *Saccharomyces*의 고농도 배양

산소 제한조건에서 *Saccharomyces*가 증식할 때 에탄올 생산은 불가피하며, 결과적으로 ATP 수율 감소, 독성물질생성, 증식수율감소 등으로 이어진다. 따라서, 균체 또는 균체 유래 산물(이종 단백질) 생산시 용존산소농도의 조절이 매우 중요하며, 산업적으로는 정밀제어 유가배양에 의해 산소제한을 피하고 있다[30, 35, 36, 39]. 이러한 유가배양에서 기질(포도당) 공급 지표로 포도당 농도나 비증식속도(μ)를 주로 사용해 왔으며, 이를 측정하기 위해 포도당 전극, off-gas analyzer, computer-control system 등이 요구된다.

고농도 세포농도에서 최적 증식을 위한 영양 요구성이 복잡하고, 외래 유전자 발현을 높은 수준으로 장기간 유지하기 힘들기 때문에, 산업적으로 응용성있는 결과는 몇 개로 국한된다. 특히, 제한 기질이 포도당일 경우 catabolite repression 조절이 매우 중요하며, 포도당 공급속도가 균주 특이적인 값인 D_{crit} 이하로 유지될 때 포도당은 완전산화되어 $Y_{x/s}$ 는 약 0.5 (glucose derepressed growth)에 달한다. 그러나, 포도당 공급속도가 너무 높으면 catabolite repression 발생(Crabtree effect)하고, 호흡대사의 기질산화 용량이 제한받아 최대값의 q_{O_2} 에 도달하며 (oxidoreductive growth), $Y_{x/s}$ 가 0.15로 감소하고 에탄올이 생성되기 시작한다. 따라서, 세포농도와 외래 단백질 생산성을 높게 유지하려면 D_{crit} 이하로 기질공급속도를 조절해야 한다. 이를 위해 RQ 값(on-line gas분석을 통해를 1.0~1.2사이로 유지)을 간접적 되먹임 조절 변수(indirect feedback

control parameter)로 이용하여 human interferon, HBsAg, pro-urokinase 등을 대량생산하였다[21, 33, 49, 55]. 이 외 포도당 공급속도를 미리 계산하여 비증식속도를 일정하게 유지하거나[29, 31], 더욱 정밀한 방법으로 ethanol 농도를 측정하여 포도당 공급속도를 조절하였다[1, 24].

이상과 같은 효모의 대사·생리적 특성 외에 고려할 인자는 promoter의 특성에 따른 유가배양 전략이다[44, 45, 48]. 즉, 조절용 promoter(주로 *GAL* promoter)인 경우 균체 증식(포도당 공급시기)과 유전자 발현 시기(galactose를 pulse로 공급 또는 포도당과 galactose 혼합액을 공급하는 시기)를 분리하여 약 100 g/L의 고농도 균체농도를 얻는다[1, 3, 13, 32]. 이때, 포도당과 galactose 혼합액을 공급할 경우 catabolite repression과 포도당 및 galactose의 소모속도를 고려하여 그 최적 혼합비를 결정해야 한다. 구성적 promoter(*ADH1*, *GAP*, *PGK*, *ENO* 등)인 경우 RQ-based 포도당 제한 유가배양[21, 55]이 가장 보편적으로 사용되며, 이때 산물의 독성에 의한 증식수율의 감소 및 plasmid 불안정성이 문제가 된다[21]. 초분비 변이주(super-secreting strain)인 *pmr1* 균주를 사용하거나[55], 다른 단백질과 fusion, 또는 산물 독성에 대한 내성 변이주를 선별하여 사용함으로써 어느 정도 문제를 해결할 수 있다[48]. 포도당 억제제성 promoter(*ADH2*, *MF α 1*, *GAP/ADH2* hybrid promoter)를 사용할 경우, 증식초기에는 과량의 포도당을 사용하여 유전자 발현을 억제시키고, 세포농도가 높아지면 에탄올을 공급하여 최종 1.6 g/L의 superoxide dismutase-human proinsulin을 생산하였으며[53], *GAP/ADH2* hybrid promoter 경우 탄소원으로 sucrose를 이용하여 *A. niger* glucose oxidase를 100 L 규모 회

분배양에서 3 g/L 수준으로 생산하였다[20]. 이와 같은 발현 promoter계에 따른 발효 공정상의 장·단점도 자세히 보고되었다[46].

최근, 배기 가스내 에탄올 농도를 on-line으로 측정하는 reducing gas sensor 및 형광 sensor를 도입하여 oxidative growth에서 oxidoreductive growth로 바뀌는 회석율(D_{crit})을 쉽게 측정함으로써 에탄올이 측정되지 않는 최대 회석율에서 작업할 수 있는 “productostat” 방법이 제안되기도 하였다[2].

재조합 Non-Saccharomyces의 고농도 배양

최근 *S. cerevisiae* 이외의 다양한 효모에서 유용 유전자들이 cloning되면서 재조합 단백질 생산계로 개발되었고[52], *S. cerevisiae* 발현계와 그 장단점을 비교하였다[7, 28]. *Saccharomyces* 발현계는 주로 2 μ -based episomal plasmid 형태인데 반하여 메탄올 자화 효모에서의 발현계는 삽입(integration) 발현계가 주종을 이루고 있다.

*Kluyvermyces lactis*의 경우 1,000 L 규모의 발효조에서 포도당 제한 유가배양법에 의해 80-90 g/L의 고농도세포가 얻어졌고 *PGK* promoter 조절을 받는 human serum albumin이 수 g/L 수준으로 생산되었다[22]. 또한, *LAC4* promoter의 조절을 받는 prochimosin 생산(integrated 균주는 G418로 선별, MF α 1의 분비신호 이용)에서 유청(whey)을 기질로 공급하는 유가배양기술은 41,000 L 규모로 scale-up되었으나, 자세한 배양방법은 알려지지 않았다[4]. *S. cerevisiae*의 *PHO5* promoter를 이용(*K. lactis*에서 인산염에 의한 조절·발현 가능한 발현계에서 포도당과 phytate를 대수적으로 공급함으로써

Table 1. 재조합 Saccharomyces의 고농도 세포배양계

Protein ^a	Promoter	Culture Time (hr)	Cell Conc. (g/L)	Product Conc. (mg/L)	Plasmid Stability (%)	Fed-Batch Strategy	Ref.
hG-CSF	<i>GAL1-10</i>	40	62	476	90	exponential of glucose/casamino acids and controlled feeding of galactose/yeast extract	3
hLC1	<i>GAL10</i>	75	100	500	78	exponential with glucose/galactose	13
Hirudin	<i>GAL10</i>	72	113	461	-	intermittent galactose feeding galactose control at 30 g/L	12
OspA	<i>MFα1</i>	53	101	2160	-	exponential ($\mu=0.18$ hr ⁻¹)	37
Candida Lipase	<i>GAL/CYC1</i>	115	100	1000	-	computer control, ethanol in exit gas as indicator	24
α 1-AT	<i>GAL10</i>	50	28	107	80	exponential with glucose/galactose	32
Hirudin	<i>MFα1</i>	57	60	500	100	exponential ($\mu=0.15$ hr ⁻¹)	35
HBsAg	<i>GAP</i>	72	60	-	73	constant (glucose, yeast extract, Hy-soy peptone)	49
Pro-urokinase	<i>PGK/TPI</i>	90	77	10	100 (integrated)	RQ-controlled	55
β -gal	<i>GAL/CYC1</i>	88	100	1550	100	computer control, ethanol in exit gas as indicator	1
SOD-PI	<i>ADH2/GAP</i>	70	150 OD	1600	-	constant with glucose and then ethanol	53
hIFN	<i>PGK</i>	-	<100	2000	-	RQ-controlled	21

^ahG-CSF, human granulocyte-colony stimulating factor; hLC1, human lipocortin-1; OspA, outer-surface protein A of *Borrelia burgdorferi*; α 1-AT, α 1-antitrypsin; HBsAg, hepatitis B surface antigen; β -gal, β -galactosidase; SOD-PI; human superoxide dismutase-human proinsulin; hIFN, human interferon.

표 2. 재조합 non-Saccharomyces의 고농도 세포배양계

Host	Proteina	Promoter	Culture Time (hr)	Cell Conc. (g/L)	Product Conc. (mg/L)	Plasmid Stability (%)	Fed-Batch Strategy	Ref.
K. lactis	IL1β	PHO5	39	40	200	- (episomal)	exponential (glucose and phytate) (μ=0.1 hr ⁻¹)	23
	HSA	PGK		80-90	수 g/L	-		22
H. polymorpha	Invertase	AOX1	90	90	1000	-	pulse and constant of methanol	47
	GO, CAT T	FMD	72	80	280 U/wet wt 140,000 U/wet		pO ₂ -controlled glycerol feeding and methanol/glycerol feeding	27
	Hirudin	MOX	70	100	수 g/L	-	pO ₂ -controlled feeding of glycerol (0.5<glycerol<3 g/L)	58
P. pastoris	β-gal	AOX1	60	192	5.7×10 ⁶ U/mL		constant feeding of glycerol	11
	mEGF	AOX1	-	85	450		constant feeding of glycerol	15
		AOX1	256	40	2500	-	constant feeding of glycerol	54
Y. lipolytica	rice α-amylase	XPR2	60	88	350		stepwise increase of glycerol/proteose peptone (μ=0.1 hr ⁻¹)	10

^aHSA, human serum albumin; GO, glycolate oxidase; CAT T, catalase T; mEGF, mouse epidermal growth factor.

interleukin-1β를 200 mg/L 수준으로 생산하였다[5, 23].

*Pichia pastoris*는 복잡한 유가배양전략이 없어도 glycerol 함유 단순배지로 100 g/L 이상으로 균체를 배양할 수 있다. 주로 사용하는 AOX1 발현계는 재조합 단백질의 생산기간과 균체 증식구간이 동일하기 때문에 균체수율과 산물수율을 감소시키지 않는 scale-up이 가능하다. *Pichia* Mut⁺ (*Methanol-utilization slow*) 균주로 tetanus toxin fragment C 생산 예를 보면[14], 배양초기에는 glycerol을 공급(glycerol-limited growth) 하고 배양후기에 methanol 공급하여, 총세포단백질의 27%에 달하는 2 g/L의 fragment C를 생산하였다. 이 외 1.3 g/L의 superoxide dismutase, 0.4 g/L의 HBsAg, 10 g/L의 tumor necrosis factor, 3 g/L의 *Bordetella pertussis* pertactin, 3 g/L의 human serum albumin, 2.5 g/L의 invertase, 0.45 g/L의 epidermal growth factor 등의 생산 예가 보고되었다[17]. AOX1 및 개량형 AOX2의 promoter[41]를 주로 이용하며, 이들은 매우 강력한 promoter이기 때문에 열색체에 1 copy만 삽입되어도 대량으로 발현생산이 가능하다. 또한, 고농도 세포 유가배양법도 확립되어 보통 100 g/L 이상의 건조균체량을 얻을 수 있고, 이때 human serum albumin 분비량은 5 g/L 이상에 달하며, 이렇게 생산된 human serum albumin은 이미 임상 실험을 마치고 실용화 단계에 있는 것으로 알려지고 있다. 최근, AOX1 및 AOX2 유전자가 결실된 숙주세포(Mut)와 AOX1 promoter를 이용한 발현계에서, glycerol 공급속도를 일정하게, methanol을 pulse로 한번 주입함으로써 192 g/L의 균체농도와 5.7×10⁶ U/mL의 *E. coli* β-galactosidase를 발현·생산하였다[11].

*Hansenula polymorpha*에서 기능을 하는 *P. pastoris* AOX1 promoter를 이용한 발현계에서 *S. cerevisiae* invertase를 1 g/L 까지 생산하였으며[47], methanol에 의해 조절되는 FMD

(formate dehydrogenase) promoter를 이용한 발현계에서는 100 g/L 이상의 고농도 균체농도와 1.4 g/L 수준의 *Schwanniomyces occidentalis* glucoamylase를 분비생산하였다[25]. 시금치의 glycolate oxidase(GO)와 *S. cerevisiae*의 catalase T (CAT T)를 공발현(coexpression)시킨 예[27]에 의하면 pO₂-controlled glycerol 첨가 후 methanol/glycerol 공급하여 균체농도 80 g/L, GO 280 U/g-wet cell wt., CAT T 140,000 U/g-wet cell wt. 얻을 수 있었다. *Pichia*와 *Hansenula*에서의 발현계 비교와 발현된 이종 단백질의 종류는 최근의 review[26]에 언급되어 있다.

*Candida utilis*는 사료용 또는 식품첨가물로 이미 이용되고 있기 때문에 유전자 재조합의 숙주세포로 사용하기에 안정성이 높은 효모로 인식되어 있다. 최근, 일본 기린사에서 형질전환계를 개발하여 감미 단백질 monellin의 대량생산계를 확립하였다[34]. Cycloheximide 내성 유전자(*CYH*)의 promoter 영역을 부분결실시켜(전사활성을 약화) 선택 표지 유전자로 개발하였고, *C. utilis* GAP promoter를 이용하여 single-chain monellin 유전자 카셋트를 제작한 후, 대장균 유래 DNA를 전혀 함유하지 않는 형태로 *URA3* 자리에 20 copy 이상으로 발현 카셋트를 삽입시켰다. 이 카셋트는 50세대 계대배양 후에도 안정하게 유지되었고, 발현된 monellin 단백질은 균체내 가용성 단백질의 50% 이상에 달하였다. Single-chain monellin의 내열성과 등전점이 높음을 이용하여 열처리(60°C) 및 산처리(pH 4.5)에 의해 고순도로 정제하는 공정도 함께 개발함으로써 monellin 단백질의 제품화가 곧 있을 것으로 예상된다(기린은 이미 airlift 연속배양법에 의한 *C. utilis* 대량배양기술을 보유하고 있음). 또한, *C. maltosa* 유래의 *GAL1*, *GAL10* 유전자도 최근 cloning되어 inducible promoter로 개발될 것으로 예상

된다[43]. *C. utilis*와 몇 종의 *Kluyveromyces*는 산소제한 조건에서 (포도당보다) maltose나 lactose 사용할 때 에탄올 생성없이 높은 균체수율을 보이므로(Kluyver effect), maltose나 lactose를 공급하는 고농도세포 유가배양기법도 곧 개발될 예정이다[8].

균체의 alkaline protease(*XPR2* 유전자)를 대량생산하는 *Yarrowia lipolytica*로부터 *XPR2* promoter를 이용 쌀 α -amylase를 대량분비생산하는 유가배양법이 최근 보고되었다[10].

결 론

이상에서 살펴 본 바와 같이 재조합 효모의 고농도 세포배양(유가배양)은 대사·생리적 특성뿐만 아니라 사용하는 발현계(promoter, episomal 또는 삽입 발현계)에 따라 크게 좌우된다. 삽입 발현계의 경우 연속배양을 통해 high-copy number로 삽입된 형질전환균주를 선별[50]할 수 있으며, 숙주세포로 polyploid 균주를 사용할 경우 증식수율의 증가 및 외래 유전자의 copy수 증가 등의 효과를 기대할 수 있으나, 약제(항생제) 또는 중금속 저항성으로 형질전환균주를 선별해야 하는 문제점이 있다[38]. 즉, 선별된 균주내에 외래 유전자를 안정하게 유지시키기 위해 약제 또는 중금속을 배지에 계속 첨가할 경우 상업적 대규모 배양에서는 비용증가 및 환경오염문제를 야기할 수 있다. 따라서, 안전성이 입증된 선별표지의 개발과 함께 숙주세포의 개량 연구도 병행되어야 한다. 특히, 효모에서 발현된 이종 단백질은 동물세포와 같이 소포체(ER)와 Golgi체에서 당쇄부가(N-linked 형 또는 O-linked 형)를 받기 때문에 효모 특유의 high-mannose형 당쇄구조를 가진다. 효모에서 mannose phosphate 생합성에 관여하는 유전자로 *MNN4*[40], *MNN6*[57]가 최근 cloning되어 그 기능이 해석되었고, *OCHI*(효모 특유의 당외체의 신장개시를 명령)과 함께 이들 유전자의 다중과과 효모주를 제작하면 포유류세포의 당단백질 당쇄와 동일한 구조의 ER core형 당쇄를 지닌 재조합 단백질의 생산이 가능하다. O-linked 당쇄의 생합성 유전자도 이미 밝혀져 있어, 이들 유전자 과과 효모 세포주의 개발로 사람에게 항원성을 나타내지 않는 당단백질의 생산이 조만간 가능할 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Alberghina, L. D. Porro, E. Martegani, and B.M. Ranzi. 1991. Efficient production of recombinant DNA proteins in *Saccharomyces cerevisiae* by controlled high-cell-density fermentation. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **14**: 82-89.
2. Andersen, M. Y., N. H. Pedersen, H. Brabrand, L. Hallager, and S. B. Jorgensen. 1997. Regulation of a continuous yeast bioreactor near the critical dilution rate using a productostat.

- J. *Biotechnol.* **54**: 1-14.
3. Bae, C. S., D. S. Yang, K. R. Chang, B. L. Seong, and J.W. Lee. 1998. Enhanced secretion of human granulocyte colony-stimulating factor directed by a novel hybrid fusion peptide from recombinant *Saccharomyces cerevisiae* at high cell concentration. *Biotechnol. Bioeng.* **57**: 600-609.
4. van den Berg, J.A. et al. 1990. *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. *Bio/Technol.* **8**: 135-139.
5. Blondeau, K., O. Boutur, H. Boze, G. Jung, G. Moulin, and P. Galzy. 1994. Development of high-cell-density fermentation for heterologous interleukin 1 β production in *Kluyveromyces lactis* controlled by the *PHO5* promoter. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**: 324-329.
6. Broker, M., O. Bauml, A. Gottig, J. Ochs, M. Bodenbenner, and E. Amann. 1991. Expression of the human blood coagulation protein Factor XIIIa in *Saccharomyces cerevisiae*: Dependence of the expression levels from host-vector systems and medium conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 756-764.
7. Buckholz, R. G. and M. A. G. Gleeson. 1991. Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Bio/Technol.* **9**: 1067-1072.
8. Castrillo, J. I., J. Kaliterna, R. A. Weusthuis, J. P. van Dijken, and J.T. Pronk. 1996. High-cell-density cultivation of yeasts on disaccharides in oxygen-limited batch cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **49**: 621-628.
9. Carlsen, M., K. V. Jochumsen, C. Emborg, and J. Nielsen. 1997. Modelling the growth and proteinase A production in continuous cultures of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **55**: 447-454.
10. Chang, C. C., D. D. Y. Ryu, C. S. Park, and J. Y. Kim. 1997. Enhancement of rice α -amylase production in recombinant *Yarrowia lipolytica*. *J. Ferment. Bioeng.* **84**: 421-427.
11. Chiruvolu, V., J. M. Cregg, and M. M. Meagher. 1997. Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fedbatch fermentations. *Enzyme Microb. Technol.* **21**: 277-283.
12. Choi, C. M., M. D. Kim, S. K. Rhee, and J. H. Seo. 1996. Effect of medium composition on hirudin production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **18**: 1129-1132.
13. Chung, B. H., D. J. Seo, S. W. Nam, J. G. Na, and Y. K. Chang. 1997. Optimization of feeding strategy for overproduction of human lipocortin-I in *Saccharomyces cerevisiae* controlled by the *GAL10* promoter. *J. Ferment. Bioeng.* **84**: 466-470.
14. Clare, J. J., F. B. Ratment, S. P. Ballantine, K. Sreekrishna, and M. A. Romanos. 1991. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Bio/Technol.* **9**: 455-

- 460.
15. Clare, J. J., *et al.* 1991. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene*. **105**: 205–212.
 16. Coppella, S. J. and P. Dhurjati. 1989. α -Factor directed expression of the human epidermal growth factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 976–983.
 17. Cregg, J. M., T. S. Vedvick, and W. C. Raschke. 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technol.* **11**: 905–910.
 18. Da Silva, N. A. and J. E. Bailey. 1991. Influence of dilution rate and induction of cloned gene expression in continuous fermentations of recombinant yeast. *Biotechnol. Bioeng.* **37**: 309–317.
 19. Da Silva, N. A. and J. E. Bailey. 1991. Influence of plasmid origin and promoter strength in fermentations of recombinant yeast. *Biotechnol. Bioeng.* **37**: 318–324.
 20. De Baetselier, A. *et al.* 1991. Fermentation of a yeast producing *A. niger* glucose oxidase: scale-up, purification and characterization of the recombinant enzyme. *Bio/Technol.* **9**: 559–561.
 21. Fieschko, J. C., K. M. Egan, T. Rich, R. A. Koski, M. Jones, and G. A. Bitter. 1987. Controlled expression and purification of human immune interferon from high-cell density fermentations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **29**: 1113–1121.
 22. Fleer, R., *et al.* 1991. Stable multicopy vectors for high-level secretion of recombinant human serum albumin by *Kluyveromyces* yeasts. *Bio/Technol.* **9**: 968–975.
 23. Fleer, R., *et al.* 1991. High-level secretion of correctly processed recombinant human interleukin-1 β in *Kluyveromyces lactis*. *Gene*. **107**: 285–295.
 24. Fusetti, F., S. Brocca, D. Porro, and M. Lotti. 1996. Effect of leader sequence on the expression of recombinant *C. rugosa* lipase by *S. cerevisiae* cells. *Biotechnol. Lett.* **18**: 281–286.
 25. Gellissen, G., Z. A. Janowicz, A. Merckelbach, M. Piontek, P. Keup, U. Weydemann, C. P. Hollenberg, and A. W. M. Strasser. 1991. Heterologous gene expression in *Hansenula polymorpha*: efficient secretion of glucoamylase. *Bio/Technol.* **9**: 291–295.
 26. Gellissen, G. 1994. Heterologous gene expression in C_1 compound-utilizing yeasts. *In* Recombinant Microbes for Industrial and Agricultural Applications, Y. Murooka and T. Imanaka (Eds.), pp. 787–948, Marcel Dekker, NY.
 27. Gellissen, G., M. Piontek, U. Dahlems, V. Jenzelewski, J. E. Gavagan, R. DiCosimo, D. L. Anton, and Z. A. Janowicz. 1996. Recombinant *Hansenula polymorpha* as a biocatalyst-coexpression of the spinach glycolate dioxidase (*GO*) and the *S. cerevisiae* catalase T (*CTT1*) gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**: 46–54.
 28. Gellissen, G. and C. P. Hollenberg. 1997. Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis*-a review. *Gene*. **190**: 87–97.
 29. Gu, M. B., K. H. Jung, M. H. Park, K. S. Shin, and K. H. Kim. 1989. Production of HBsAg by growth rate control with recombinant *Saccharomyces cerevisiae* in fed-batch. *Biotechnol. Lett.* **11**: 1–4.
 30. Hensing, M. C. M., R. J. Rouwenhorst, J. J. Heijnen, J. P. van Dijken, and J. T. Pronk. 1995. Physiological and technological aspects of large-scale heterologous-protein production with yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*. **67**: 261–279.
 31. Hsieh, J. H., *et al.* 1988. Controlled fed-batch fermentation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* to produce hepatitis B surface antigen. *Biotechnol. Bioeng.* **32**: 334–340.
 32. Kang, H. A., S. W. Nam, K. S. Kwon, M. H. Yu, and B. H. Chung. 1996. High-level secretion of human 1-antitrypsin from *Saccharomyces cerevisiae* using inulinase signal sequence. *J. Biotechnol.* **48**: 15–24.
 33. King, D. J., E. F. Walton, and G. T. Yarranton. 1989. The production of proteins and peptides from *Saccharomyces cerevisiae*. *In* Molecular and Cell Biology of Yeasts, E. F. Walton and G. T. Yarranton (Eds), pp. 107–133.
 34. Kondo, K., Y. Miura, H. Sone, K. Kobayashi, and H. Iijima. 1997. High-level expression of a sweet protein, monellin, in the food yeast *Candida utilis*. *Nature Biotechnol.* **15**: 453–457.
 35. Mendoza-Vega, O., C. Hebert, and S.W. Brown. 1994. Production of recombinant hirudin by high cell density fed-batch cultivations of a *Saccharomyces cerevisiae* strain: physiological considerations during the bioprocess design. *J. Biotechnol.* **32**: 249–259.
 36. Mendoza-Vega, O., J. Sabatie, and S.W. Brown. 1994. Industrial production of proteins by fed-batch cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**: 369–410.
 37. Mendoza-Vega, O., E. Keppi, B. Bouchon, M. Nguyen, and T. Achstetter. 1996. Recombinant outer-surface protein A (des-Cys¹-OspA) from the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*: high production levels in *Saccharomyces cerevisiae* yeast cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**: 624–628.
 38. Merlotti, M. C., S. B. Rech, and S. G. Oliver. 1997. Use of copper sulphate and Paraquat as selectable resistance markers for stable maintenance of yeast recombinant plasmids. *Biotechnol. Lett.* **19**: 1103–1107.
 39. O'Connor, G. M., F. Sanchez-Riera, and C. L. Cooney. 1992. Design and evaluation of control strategies for high-cell-density fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* **39**: 293–304.
 40. Odani, T., Y. Shimma, A. Tanaka, and Y. Jigami. 1996. Cloning and analysis of the MNN4 gene required for phos-

- phorylation of N-linked oligosaccharides in *Saccharomyces cerevisiae*. *Glycobiology*. **6**: 805–810.
41. Ohi, H., M. Miura, R. Hiramatsu, and T. Ohmura. 1994. The positive and negative cis-acting elements for methanol regulation in *Pichia pastoris* AOX2 gene. *Mol. Gen. Genet.* **243**: 489–499.
 42. Paalme, T., R. Elken, R. Vilu, and M. Korhola. 1997. Growth efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose/ethanol media with a smooth change in the dilution rate (A-stat). *Enzyme Microb. Technol.* **20**: 174–181.
 43. Park, S. M., M. Ohkuma, Y. Masuda, and A. Ohta, and M. Takagi. 1997. Galactose-inducible expression systems in *Candida maltosa* using promoters of newly-isolated *GALI* and *GAL10* genes. *Yeast*. **13**: 21–29.
 44. 朴龍洙. 1996. 微生物機能の效率的發現에 關する培養工學的研究. *生物工學會誌*. **74**: 171–183.
 45. Park, Y. S., S. Shiba, S. Iijima, T. Kobayashi, and F. Hishinuma. 1993. Comparison of three different promoter systems for α -amylase production in fed-batch cultures of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **41**: 854–861.
 46. Piper, P. W. and N. Kirk. 1991. Inducing heterologous gene expression in yeast as fermentations approach maximal biomass. In *Genetically-Engineered Proteins and Enzymes from Yeasts: Production Control*, A. Wiseman (Ed.), pp. 147–184, Ellis Horwood.
 47. Rodriguez, L., *et al.* 1996. Invertase secretion in *Hansenula polymorpha* under the AOX1 promoter from *Pichia pastoris*. *Yeast*. **12**: 815–822.
 48. Romanos, M. A., C. A. Scorer, and J. J. Clare. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*. **8**: 423–488.
 49. Schulman, C. A., R. E. Ellis, and R. Z. Maigetter. 1991. Production of hepatitis B surface antigen (PreS2+S) by high-cell density cultivations of a recombinant yeast. *J. Biotechnol.* **21**: 109–126.
 50. Shu, C.-H. and S.-T. Yang. 1996. Kinetics of continuous GM-CSF production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* in an airlift bioreactor. *J. Biotechnol.* **48**: 107–116.
 51. Sonnleitner, B. and O. Kappeli. 1986. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: formulation and verification of a hypothesis. *Biotechnol. Bioeng.* **28**: 927–937.
 52. Sudbery, P. E. 1994. The non-*Saccharomyces* yeasts. *Yeast*. **10**: 1707–1726.
 53. Tottrup, H. V. and S. Carlsen. 1990. A process for the production of human proinsulin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **35**: 339–348.
 54. Tschopp, J. F., G. Sverlow, R. Kosson, W. Craig, and L. Grinna. 1987. High-level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technol.* **5**: 1305–1308.
 55. Turner, B. G., G. C. Avgerinos, L. M. Melnick, and D. T. Moir. 1991. Optimization of pro-urokinase secretion from recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **37**: 869–875.
 56. Vasavada, A. 1995. Improving productivity of heterologous proteins in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* fermentations. *Adv. Appl. Microbiol.* **41**: 25–54.
 57. Wang, X.H., K. Nakayama, Y. Shimma, A. Tanaka, and Y. Jigami. 1997. *MNN6*, a member of the *KRE2/MNT1* family, is the gene for mannosylphosphate transfer in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **272**: 18117–18124.
 58. Weydemann, U., P. Keup, M. Piontek, A. W. M. Strasser, J. Schweden, A. Gellissen, and Z. A. Janowicz. 1995. High-level secretion of hirudin by *Hansenula polymorpha*-authentic processing of three different preprohirudins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**: 377–385.