

# 재조합 효모를 이용한 외래 단백질 생산을 위한 발효공정

김명동 · 박천석 · 박관화 · 서진호

서울대학교 농생명공학부

## 서론

효모는 1980년대 초반부터 인체, 동물 및 식물체 유래의 단백질을 산업적 규모로 생산하기 위하여 숙주세포로 사용되어 왔으며 생물공학적 측면에서 볼 때 유용한 점이 많다. 진핵세포로서의 효모는 접합과 같은 단백질의 번역 후 수식과정을 지니고 있으며, 최근 급속히 발전한 유전자 조작기술로 인하여 목적단백질 생산을 위한 다양한 발현벡터의 개발을 통하여 대장균과 같은 박테리아와 비교할 때 거의 대등한 수준에 이르게 되었다. 또한 고등 진핵세포인 동물이나 곤충세포와 비교하였을 때 목적단백질의 발현수준이 높거나 생육을 위한 영양 요구성이 크지 않아 산업적 측면에서 유리한 경우가 많다. 그러나 고등 진핵세포와 비교하여 단백질의 번역 후 수식과정은 미흡한 편이며 단백질의 수식 및 분비문제를 해결하기 위한 연구가 국내외에서 활발히 진행되고 있다[1, 2].

따라서 본 논문에서는 국내외서 진행되고 있는 효모를 이용한 목적단백질 발효공정의 현황과 전망을 살펴보고자 한다.

## 전통적 *Saccharomyces cerevisiae*

*S. cerevisiae*는 유전자 및 생리학적 측면에서의 충분한 정보와 발전된 발효공정기술에 힘입어 현재까지 목적단백질을 생산하기 위한 재조합 시스템의 숙주세포로서 현재까지 가장 널리 사용되어 왔다[1]. 1981년도에  $\alpha$ -interferon이 처음으로 생산된 이래 인체 유래의 nerve growth factor, prourokinase, serum albumin 등이 생산되고 있으며[3-5] *S. cerevisiae*에서 생산된 hepatitis B virus surface antigen 등의 일부 제품단백질은 FDA에 의하여 인체에 사용하여도 안전하다는 인증을 받았다[6]. 그러나 *S. cerevisiae*는 목적단백질을 생산하는데 있어서 단백질의 번역 후 수식과정에서 발생하는 hyperglycosylation, 강력하고도 조절 가능한 promoter 및 안정적인 발현벡터의 부족, 목적단백질의 낮은 분비효율 등 여러 가지 해결해야 할 문제를 가지고 있다[1,2,7]. 최근 목적단백질 유전자를 *S. cerevisiae*의 염색체로 다중도입하여 플라스미드를 이용한 시스템에 비하여 목적단백질을 안정적으로 생산하고자 하는 연구가 진행된 바 있으며[7], 단백질의 번역 후 수식 및 분비

과정에 관여하는 protein disulphide isomerase 등의 chaperone 단백질을 목적단백질과 동시에 발현시킴으로써 목적단백질의 생산성 및 분비효율을 크게 높인 연구사례도 있다[8]. 국내에서는 갈락토스에 의하여 조절되는 *GAL10* promoter 이용하여 항혈전 단백질인 hirudin, 인체 유래의 혈장단백질(HSA) 및 licoportin-1을 생산하기 위한 연구가 진행된 바 있다[9-11]. *S. cerevisiae*는 산업적으로 유용한 제품 단백질의 생산 뿐만 아니라 대사공학적 기법을 도입하여 대체 기능성 감미료인 xylitol 비롯한 대사산물을 효과적으로 생산하려는 시도도 보고되고 있다[12]. 최근에는 *S. cerevisiae*를 단백질과 리간드간의 존재하는 상호작용의 규명 및 기능성이 향상된 단백질을 신속하게 선별하기 위한 표면발현(surface display) 시스템의 숙주세포로 이용하기도 한다[13]. 표면발현 시스템이란 효모의 세포벽을 구성하는 단백질의 일종인  $\alpha$ -agglutinin 등을 목적단백질의 지지체(anchor motif)로 이용하여 세포의 표면에 목적단백질을 부착시키는 기술을 말한다. 세포의 표면에 single-chain antibody variable region(ScFv)를 발현시킨 경우 리간드에 대한 친화성이 향상된 clone을 flow cytometer를 사용하여 신속하게 선별한 경우와[14], amylase를 세포 표면에 발현시켜 전분 발효능력이 향상된 효모를 개발하는 등의 연구 사례가 보고되었으며[15], whole cell catalysis 및 live vaccine 등의 목적으로 연구 및 개발이 활발히 진행되고 있다.

## *Hansenula polymorpha* 및 *Pichia pastoris*

지난 10여년 동안 메탄올 자화효모인 *H. polymorpha*와 *Pichia pastoris*는 미생물의 산업적 이용이라는 측면에서 지속적인 관심을 끌어왔다[16]. 메탄올 자화효모는 초기에 주로 단세포 단백질을 생산하기 위한 목적으로 이용되었지만 최근에는 산업적으로 유용한 목적단백질을 생산하기 위한 연구에 주로 이용되고 있다. 최근에는 메탄올 대사와 관련된 효소를 강력하게 발현하는 promoter/terminator 및 이를 이용할 수 있는 재조합 균주가 개발됨에 따라 목적단백질 생산을 위한 효율적인 재조합 시스템으로서 자리를 잡아가고 있다.

*P. pastoris*는 목적단백질의 생산을 위해서 Alcohol oxidase I(AOX1)을 주로 사용하며, *AOX1* promoter는 메탄올에 의하

여 repression/induction되는 강력한 promoter이다[2]. 즉 포도당이나 glycerol 같은 탄소원을 이용하는 시기에는 목적단백질의 발현이 억제되지만 메탄올 주입하면 1000배 이상 목적단백질의 전사가 유도된다. 따라서 *P. pastoris*를 이용하는 생물공정에서는 포도당이나 glycerol을 탄소원으로 이용하여 균체를 고농도로 배양하고 메탄올을 주입하여 목적단백질의 생산을 유도하는 방법이 일반적이다. 그러나 메탄올을 탄소원이나 전사유도제로 사용하는 경우 폭발의 위험성이 있고 특히 목적단백질이 식품과 관련이 있는 경우는 이용의 제한이 따르는 단점도 가지고 있다. 최근에는 구조적 promoter인 GAP promoter나[17], methylamine을 유도제로 사용하는 *FLDI* promoter[18]를 이용하여 목적단백질을 생산하기 위한 연구사례도 보고되고 있다.

*H. polymorpha*는 *P. pastoris*와 마찬가지로 glycerol과 같은 배지성분을 이용하여 짧은 발효시간에 고농도의 균체와 단백질 발현수준을 얻을 수 있다는 장점을 갖고 있을 뿐만 아니라 목적단백질 이외의 숙주세포 유래의 단백질은 거의 배지중으로 분비하지 않기 때문에 상대적으로 높은 순도의 제품단백질을 얻을 수 있는 장점이 있다. 재조합 *S. cerevisiae* 시스템에서 번역 후 수식과정 중 빈번하게 발생하는 hyperglycosylation 또한 크게 문제가 되지 않는 것으로 알려져 있다[16]. 재조합 *H. polymorpha*를 이용하는 생물공정은 주로 methanol oxidase(MOX) promoter나 formate dehydrogenase(FMD) promoter를 사용하게 되는데, 이들 promoter는 *P. pastoris*와는 달리 메탄올을 주입하지 않고도 상당한 정도의 목적단백질을 발현시킬 수 있는 장점이 있다. 즉 *H. polymorpha*는 메탄올 대사와 관련된 효소의 발현이 *P. pastoris*의 induction/repression이 아닌 repression/derepression 메커니즘을 따르기 때문이다. 따라서 *H. polymorpha*는 목적단백질의 발현을 위하여 메탄올 뿐만 아니라 glycerol과 같은 보다 안전한 기질을 사용할 수 있고 *P. pastoris*처럼 메탄올 농도를 정밀하게 조절해야 하는 번거러움을 피할 수 있는 공정상의 이점이 있다[19]. *P. pastoris*의 경우는 목적단백질 유전자가 homologous recombination에 의하여 염색체의 *HIS4* 부위에 주로 도입되지만 *H. polymorpha*는 nonhomologous recombination을 통해서 100 copy 이상의 목적단백질 유전자를 도입할 수 있어서 목적단백질의 발현효율이 숙주세포에 존재하는 유전자의 copy number에 크게 의존하는 경우는 *P. pastoris*와 비교하여 상대적으로 유리하다[16, 19].

이러한 특성을 가진 메탄올 자화효모를 이용하여 목적단백질을 생산한 사례를 보면, *S. cerevisiae*의 mating factor  $\alpha$ 를 분비신호로 사용하여 항혈전 단백질인 hirudin을 *H. polymorpha*에서 약 1.5 g/L, *S. cerevisiae* 유래의 invertase를 *P. pastoris*에서 약 2.5 g/L, *Aspergillus niger* 유래의 glucose oxidase를 *H. polymorpha*를 이용하여 약 2.25 g/L까지 생산

한 경우 등이 있다[20-22]. 한편 국내에서도 거머리 유래의 항혈전성 단백질인 hirudin을 재조합 *H. polymorpha*를 이용하여 생산하고자 하는 연구가 활발히 진행 중이다[23].

### *Kluyveromyces lactis*

*S. cerevisiae*와 같이 GRAS(generally recognized as safe)인 *K. lactis*는 유청으로부터  $\alpha$ -galactosidase를 생산하기 위해 주로 이용되어 왔으며 포도당과 corn steep 배지 등의 값싼 배지를 이용하여 고농도의 건조 균체를 얻을 수 있는 장점이 있다[24]. 이러한 *K. lactis*가 최근에 생물공학 분야에서 주목을 끄는 이유는 분자량이 큰 단백질도 무리 없이 분비할 수 있는 단백질 분비능력 때문이라 하겠다. 또한 *K. lactis*는 균체의 생육과 목적단백질의 생산을 위하여 갈락토스나 유당을 사용하기 때문에 *H. polymorpha*나 *P. pastoris*와 같은 발효과정 중의 폭발을 방지하기 위한 공정상의 부수적인 장치가 필요 없다. *K. lactis*는 유당을 단일 탄소원으로 사용할 수 있기 때문에  $\beta$ -galactosidase(LAC4)와 같은 유당의 대사와 관련된 효소가 강력히 발현된다[25]. LAC4 promoter를 이용하여 생산된 목적단백질로는 인체유래의 interleukin-1 $\beta$ , mouse  $\alpha$ -amylase, 인체유래의 혈장단백질 및 prochymosin 등을 들 수 있다[26-29]. 이 중 prochymosin의 경우 목적단백질의 유전자를 염색체로 다중도입하여 1 g/L 이상으로 생산되었으며 rDNA 부위에 도입된 식물체 유래의  $\alpha$ -galactosidase 경우에도 고효율로 발현되어 분비되었다[30]. 목적단백질의 분비를 위해서는 *K. lactis* 숙주세포의 killer toxin signal peptide나 *S. cerevisiae*의 mating factor  $\alpha$ 가 주로 이용되었지만 인체유래 혈장단백질의 경우는 자체의 분비신호를 사용하여 고효율로 분비가 가능하였다. LAC4 promoter는 목적유전자의 효율적인 전사를 위하여 갈락토스나 유당을 요구하게 되는데, 이러한 탄소원은 동시에 숙주세포에 의하여 빠른 속도로 소모되기 때문에 숙주세포의 갈락토스 대사와 관련된 유전자에 변형을 가함으로써 값비싼 기질인 갈락토스의 소모속도를 감소시키고 동시에 목적단백질의 생산성을 높인 연구사례도 있다[32].

그러나 아직 목적단백질 생산을 위한 효율적인 숙주세포 및 다양한 발현벡터의 개발은 초기수준에 머물러 있는 상태이며, 동물세포에 비하여 미흡한 단백질의 번역 후 수식에 대한 문제는 향후 해결해야 할 과제로 남아있다[24, 32].

### *Yarrowia lipolytica*

*Yarrowia lipolytica*는 dimorphic 효모로서 구연산, 에리스리톨, 만니톨 및 단세포 단백질 생산하는데 많이 사용되어 왔다[33, 34]. 이 효모는 여러 가지 단백질들을 세포 외로 분비하는데, 특히 extracellular alkaline protease의 경우는 1-2 g/L

표 1. 재조합 효모 시스템에 사용되는 조절형 promoter

미생물	Promoter source	조절 메커니즘
메탄올 이용 효모		
<i>Candida boidinii</i>	AOD1	Methanol induced
<i>Hansenula polymorpha</i>	MOX, FMD	Methanol induced
<i>Pichia methanolica</i>	AUG1	Methanol induced
<i>Pichia pastoris</i>	AOX1	Methanol induced
	CUP1	Copper induced
	GAP	Strong constitutive
	FLD1	Methanol or methylamine induced
	YPT1	Moderate constitutive
유당 이용 효모	LAC4	Lactose induced
<i>Kluyveromyces lactis</i>	PGK	Strong constitutive
	ADH4	Ethanol induced
전분 이용 효모		
<i>Schiwanniomyces occidentalis</i>	AMY1	Maltose or starch induced
	GAM1	Maltose or starch induced
자일로스 이용 효모		
<i>Pichia stipitis</i>	XYL1	Xylose induced
알칸 및 지방산 이용 효모		
<i>Yarrowia lipolytica</i>	XPR2	Peptone induced
	TEF	Strong constitutive
	RPS7	Strong constitutive
	GAL1, 7, 10	Galactose induced
	MF $\alpha$	Moderate constitutive
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GAP	Moderate constitutive
	PHO5	Repression by Pi
	GAP/ADH2	Repression by glucose

의 양으로 분비한다[35, 36]. 이와 더불어 공업적으로 고농도 배양기술이 축적되어 있어 목적단백질의 생산에 적합한 균주로서 최근 관심을 불러 일으키고 있다. 이 효모에서 분비되는 extracellular alkaline protease의 조절형 promoter인 XPR2를 이용하여 prochymosin, porcine interferon- $\beta$ 1, hepatitis B virus middle surface antigen, human blood coagulation factor XIIIa, fungal cellulase와 rice  $\alpha$ -amylase등이 발현되었다[37-42]. 특히 rice  $\alpha$ -amylase의 경우는 유가식 발효공정을 통하여 배지 중으로 분비된 효소의 농도가 0.35g/L로서 회분식 공정과 비교하여 생산성이 28배나 증가되었다[43]. 또한 Muller 등은 숙주세포로 많이 사용되는 효모인 *S. cerevisiae*, *H. polymorpha*, *K. lactis* 등과 *Y. lipolytica* 등을 이용하여 6 종류의 곰팡이 유래의 단백질들을 발현시키고 그 결과를 비교하였다[44]. 그 결과 *Y. lipolytica*가 다른 효모에 비하여 발현 단백질의 세포 외 분비 면에서 월등히 우수한 것으로 확인되었고 XPR2 promoter 이외에 TEF와 RPS7의 두 종류의 새로운 promoter를 사용함으로써 *Y. lipolytica*가 목적단백질의 발현과 분비에 유용하게 쓰일 수 있음을 제안하였다. 그러나 아직까지 생물공정에 필요한 다양한 발현벡터의 개발과 숙주세포의 생리적 특성에 대한 정보가 상대적으로 부족하여 향후

생물산업

많은 연구의 여지가 있다고 하겠다[33].

## 결론

이상의 다양한 재조합 효모를 이용한 목적단백질의 생산에 관한 연구사례에서 알 수 있듯이 특정한 목적단백질을 위한 최적발현시스템의 선택에는 일정한 규칙이 없으며, 상업적으로 가치가 있는 목적단백질을 경제적으로 생산하기 위해서는 주어진 한가지 발현 시스템 뿐만 아니라 다양한 발현시스템에 대한 유전자 및 공정수준에서의 지속적인 feed-back이 필요한 이른바 'trial and error' 과정임을 알 수 있다. '생명공학의 세기'라고 하는 21세기에는 예방 및 치료제를 포함한 의약 및 식품생명산업에서 상당한 재조합 단백질의 수요가 예측되므로 목적단백질을 효과적으로 생산할 수 있는 강력하고도 다양한 발현시스템의 개발이 시급하다고 하겠다. 표 1에 재조합 효모에서 자주 사용되는 조절 가능한 promoter들을 간단히 정리하였다.

## 감사의 말씀

교육부 BK21 program의 지원을 감사 드립니다.

## 참고문헌

1. Romanos M.A., C.A. Scorer and J.J. Clare. 1992. Foreign gene-expression in yeast-a review. *Yeast* **8**: 423-488.
2. Geoffrey, P, L. Cereghino and J.M. Cregg. 1999. Application of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Curr Opin Biotechnology*. **10**: 422-427.
3. Bitter, G.A., K.K. Chen, A.R. Banks and P.H. Lai. 2984. Secretion of foreign proteins from *Saccharomyces cerevisiae* directed by a-factor fusions. *Proc .Natl. Acad. Sci. USA*. **81**: 5330-5334.
4. Etcheverry, T., W. Forrester and R. Hitzeman. 1986. Regulation of the chelatin promoter during the expression of human serum albumin or yeast phosphoglycerate kinase in yeast. *Bio/Technology* **4**: 726-730.
5. Schwab, H. Principles of genetic engineering for *Escherichia coli*, in Genetic Engineering of Microorganisms, A. Puhler, Editor. 1993, VCH Publishers: New York. P.1-53.
6. Valenzuela, P., A. Medina, W.J. Rutter, G. Ammerer and B.D. Hall. 1982. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature* **298**: 347-350.
7. Cho, K.M., Y.J. Yoo, and H.S. Kang. 1999.  $\delta$ -integration of endo/exo-glucanase and  $\beta$ -glucosidase gene into the yeast chromosomes for direct conversion of cellulose to ethanol. *Enz. Microb. Technol.* **25**: 23-30.
8. Shusta, E.V., R.T. Raines, A. Plucktun and K.D. Wittrup. 1998. Increasing the secretory capacity of *Saccharomyces cerevisiae* for production of single-chain antibody fragments. *Nature Biotechnol* **16**: 773-777.
9. Choi, C.M., M.D. Kim, S.K. Rhee and J.H. Seo. 1996. Effects of medium composition on hirudin production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **18**: 1129-1132.
10. Kang, H.A., E.S. Choi, W. K. Hong, J.W. Kim, S.M. Ko, J.H. Sohn and S.K. Rhee.2000. Proteolytic stability of recombinant human serum albumin secreted in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**: 575-582.
11. Chung B.H., B.M. Kim, S.K. Rhee, Y.H. Park and S.W. Nam. 1995. Effect of galactose feeding strategy on heterologous human lipocortin-I production in the fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* controlled by the GAL10 promoter. *J Microbiol Biotechnol* **5**: 224-228.
12. Lee, W.J., Y.W. Ryu and J.H. Seo. 2000. Characterization of two-substrate fermentation process for xylitol production using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing xylose reductase gene. *Proc. Biochem.* **35**: 1199-1204.
13. Cho, B.K., M.C. Kieke, E.T. Boder, K.D. Wittrup and D.M. Kranz. 1998. A yeast display system for the discovery of ligands that trigger cell activation. *J Immunol Methods* **220**: 179-188.
14. M.C. Kieke, Cho, B.K., E.T. Boder, D.M. Kranz and K.D. Wittrup. 1997. Isolation of anti-T cell receptor scFV mutants by yeast surface display. *Protein Eng* **10**: 1303-1310.
15. T. Murai, M. Ueda, H. Atomi, Y. Shibasaki, N. Kamasawa, M. Osumi, T. Kawaguchi, M. Arai and A. Tanaka. 1997. Genetic immobilization of cellulase on the cell surface of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **48**: 499-503.
16. Hollenberg C.P. and G. Gellissen. 1997. Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. *Curr Opin Biotechnol* **8**: 554-560.
17. Waterham, H.R., M.E., Digan, P.J. Koutz, S.V. Lair and J.M Cregg. 1997. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene* **186**: 37-44.
18. Shen, S., G. Sulter, T.W. Jeffries and J.M.Cregg. 1998. A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Gene* **216**: 93-102.
19. Mayer A.F., K. Hellmuth, H. Schlieker, R. Lopez-Ulibarri, S. Oerter, U. Dahlem, A.W.M. Strasser and A.P.G. van Loon. 1999. An expression system matures:  $\epsilon$  highly efficient and cost-effective process for phytase production by recombinant strains of *Hansenula polymorpha*. *Biotechnol Bioeng* **63**: 373-381.
20. Weydemann U., P Keup, M. Piontek, A.W.M. Strasser, J. Schweden, G. 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.
21. 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/Technology* **5**: 1305-1308.
22. Hodgkins, M., D. Mead, D.J. Balance, A. Goodey and P. Sudbery. 1993. Expression of glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* in *Hansenula polymorpha* and its use as reporter to isolate regulatory mutants. *Yeast* **9**: 625-635.
23. Kim C.H., H.W. Seo, H.Y. Kim, J.H. Sohn, E.S. Choi and S.K. Rhee. 1998. Production of recombinant hirudin in *Hansenula polymorpha*: variation of gene expression level depends on methanol oxidase and fermentation strategies. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 1-5.
24. Wesolowski-Louvel, M., K.D. Breuning and H. Fukuhara., *Kluyveromyces lactis*, in Nonconventional yeasts in Biotechnology: a handbook, K. Wolf, Editor. 1996, Springer-Verlag: Berlin. p. 139-201.
25. Swinkels, B.W., A.J. van Ooyen and F.J. Bonekamp.

1993. The yeast *Kluyveromyces lactis* as an efficient host for heterologous gene expression. *Antonie Van Leeuwenhoek* **64**: 187-201.
26. Fler, R., X.J. Chen, N. Amellal, P. Yeh, A. Fournier, F. Bacchetta, P. Baduel, G. Chung, H. L'Hote, J. Becquart, H. Fukuhara and J.F. Mayaux. 1991. High-level secretion of correctly processed recombinant human interleukin-1  $\beta$  in *Kluyveromyces lactis*. *Gene* **107**: 285-295.
27. Tokunaga, M., M. Ishibashi, D. Tatsuda and H. Tokugana. 1997. Secretion of mouse  $\alpha$ -amylase from *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* **13**: 699-706.
28. Fler, R., X.J. Chen, N. Amellal, P. Yeh, A. Fournier, F. Bacchetta, P. Baduel, G. Chung, H. L'Hote, J. Becquart, H. Fukuhara and J.F. Mayaux. 1991. Stable multicopy vectors for high-level secretion of recombinant human serum albumin by *Kluyveromyces yeasts*. *Bio/Technology* **9**: 968-975.
29. van de Berg, J.A., K.J. van der Laken, A.J.J. van Ooyen, T.C.H.M. Penniers, K. Reitveld, D. Moyer, M. Richman and J.R. Schuster. 1990. *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: Expression and secretion of prochymosin. *Bio/Technology* **8**: 135-139.
30. Bui, D.M., I. Kunze, C. Horstman, T. Schmidt, K.D. Breunig and G. Kunze. 1996. Expression of the *Arxula adenivorans* glucoamylase gene in *Kluyveromyces lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **45**: 102-106.
31. Bergkamp, R.J.M., I.M. Kool, R.H. Geerse and R.J. Planta. 1992. Multi-copy integration of the  $\alpha$ -galactosidase gene from *Cyamopsis tetragonoloba* into the ribosomal DNA of *Kluyveromyces lactis*. *Curr Genet* **21**: 365-370.
32. Hsieh, H.P. and N.A. Da Silva. 2000. Development of a *LAC4* promoter-based gratuitous induction system in *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnol Bioeng* **67**: 408-416.
33. Berth, G. and Gaillardin, C. *Yarrowia lipolytica*, in Nonconventional yeasts in Biotechnology: a handbook, K. Wolf, Editor. 1996, Springer-Verlag: Berlin. p. 313-388
34. Heslot, H. 1990 Genetic and genetic engineering of the industrial yeast, *Yarrowia lipolytica*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **43**: 43-73
35. Ogrydziak, D.M. 1993. Yeast extracellular protease. *Crit. Rev. Biotechnol.* **13**: 1-55
36. Ogrydziak, D.M. 1988. Production of alkaline extracellular protease by *Yarrowia lipolytica*. *J. Biotechnol.* **19**: 259-270
37. Franke, A.E., Kaczmarek, F.S., Eisenhard, M.E., Geoghengan, K.F., Danley, D.E., DeZeeuw, J.R., D'onnell, M.M., Gollaher, Jr. M.G., and Davidow, L.S. 1988. Expression and secretion of bovine prochymosin in *Yarrowia lipolytica*. *Dev. Ind. Microbiol.* **29**: 43-57
38. Hamsa, P.V., and Chatto, B.B. 1994. Cloning and growth-regulated expression of the gene encoding the hepatitis B virus middle surface antigen in *Yarrowia lipolytica*. *Gene* **143**: 165-170.
39. Nicaud, J.M., Fournier, P., La Bonnardiere, C., Chasles, M., and Gaillardin, C. 1991. Use of ars18 based vectors to increase protein production in *Yarrowia lipolytica*. *J. Biotechnology* **19**: 259-270.
40. Tharaud, C., Ribet, A.M., Costes, C., and Gaillardin, C. 1992. Secretion of human blood coagulation factor XIIIa by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Gene* **121**: 111-119
41. Park, C.S., Chang, C.C., and Ryu, D.D.Y. 2000. Expression and high-level secretion of *Trichoderma reesei* endoglucanase I in *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **87**: 1-15
42. Park, C.S., Chang, C.C., Kim, J.Y., Ogrydziak, D.M., and Ryu, D.D.Y. 1997. Expression, secretion, and processing of rice alpha-amylase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Biol. Chem.* **272**: 6876-6881
43. Chang, C.C., Ryu, D.D.Y., Park, C.S., and Kim, J.Y. 1997. Enhancement of rice  $\alpha$ -amylase production in recombinant *Yarrowia lipolytica*. *J. Ferment. Bioeng.* **84**: 421-427.
44. Muller, S., Sandal, T., Kamp-Hansen, P., and Dalboge, H. 1998. Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **14**: 1267-83.