

형질전환 벼 현탁세포 배양에서 투과성 증진을 통한 hCTLA4Ig의 생산성 증대

최홍열^{1a}, 전수환^{2a}, 권준영¹, 임정애¹, 박혜림¹, 김동일^{1*}

Enhanced Production of hCTLA4Ig through Increased Permeability in Transgenic Rice Cell Cultures

Hong-Yeol Choi^{1a}, Su-Hwan Cheon^{2a}, Jun-Young Kwon¹, Jung-Ae Lim¹, Hye-Rim Park¹, and Dong-II Kim^{1*}

Received: 31 August 2016 / Revised: 17 December 2016 / Accepted: 21 December 2016

© 2016 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: In this system, rice cells were genetically modified to express human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4-immunoglobulin (hCTLA4Ig) using RAmy3D promoter induced by sugar depletion. Even though the target protein fused with signal sequence peptide, plant cell wall can be a barrier against secretion of recombinant proteins. Therefore, hCTLA4Ig can be trapped inside cell wall or remained in intracellular space. In this study, to enhance the secretion of hCTLA4Ig from cytoplasm and cell walls into the medium, permeabilizing agents, such as dimethyl sulfoxide (DMSO), Triton X-100 and Tween 20, were applied in transgenic rice cell cultures. When 0.5% (v/v) of DMSO was added in sugar-free medium, intracellular hCTLA4Ig was increased, on the other hand, the secreted extracellular hCTLA4Ig was lower than that of control. DMSO did not give permeable effects on transgenic rice cell cultures. And Triton X-100 was toxic to rice cells and also did not give enhancing permeability of cells. When 0.05% (v/v) Tween 20 was added in rice cell cultures, however, intracellular hCTLA-

4Ig was lower than that of control cultures. And the maximum 44.76 mg/L hCTLA4Ig was produced for 10 days after induction, which was 1.4-fold increase compared to that of control cultures. Especially, Tween 20 at 0.05% (v/v) showed the positive effect on the secretion of hCTLA4Ig though the decrease of intracellular hCTLA4Ig. Also, Tween 20 as a non-toxic surfactant did not affect the cell growth, cell viability and protease activity. In conclusion, secretion of hCTLA4Ig could be increased by enhancing permeability of cells regardless of the cell growth, cell viability and protease activity.

Keywords: hCTLA4Ig, Plant cell culture, Permeabilizing agent, Protein secretion, Tween 20

1. INTRODUCTION

최근 식물 발현계를 이용한 바이오의약품 생산이 주목받고 있다. 2012년 미국 FDA로부터 허가를 받은 Protalix사의 고셔병 치료제 ELELYSOTM는 식물세포배양을 통해 생산되었고 [1], 에볼라 바이러스에 대한 긴급의약품인 Mapp Biopharmaceutical사의 Zmapp은 담배잎을 이용한 일시발현 시스템에서 생산되었다 [2]. 이러한 특정 분야의 치료용 단백질 생산에 있어 식물 발현계는 다른 발현계에 비해 장점을 가진다. 하지만 식물 발현계를 이용한 바이오의약품의 생산에 있어 목적단백질의 낮은 생산성은 극복해야할 문제로 남아있다 [3]. 벼 세포 배양에서 RAmy3D 프로모터는 인위적인 당 고갈 환경에서 단백질 고발현을 유도한다 [4]. 이러한 프로모터의

*These authors contributed equally to this work as the first author.

¹인하대학교 생명공학과
¹Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 22212, Korea
Tel: +82-32-860-7515, Fax: +82-32-872-4046
e-mail: kimdi@inha.ac.kr

²가천대학교 생명과학과
²Department of Life Science, Gachon University, Seongnam 13120, Korea

사용은 세포 성장단계와 단백질 생산단계를 분리하는 것이 가능하여 원하는 시점에 단백질을 생산할 수 있다. 하지만 식물세포는 세포벽이 존재하기 때문에 단백질이 분비되는 과정에서 세포벽이나 세포 내에 남게 되어 생산성이 낮아지는 문제가 있다. 식물세포에서는 세포 내에서 합성된 단백질을 세포 밖으로 분비시키기 위해 식물 신호서열 [5] 또는 외래 신호서열 [6]을 이용한다. 하지만 단백질의 분비효율에는 신호서열 외에도 여러 요인들이 영향을 미치며 [7], 합성된 단백질은 세포막이나 세포벽의 물리화학적 성질과 상호 작용하여 분비효율에 영향을 받게 된다 [8]. 발현된 단백질을 효율적으로 세포 밖으로 분비시키는 것은 배양 중의 생산성을 증가시킬 뿐만 아니라, 정제과정 효율에 큰 영향을 준다. 따라서 식물세포 내에서 분비되지 못한 재조합 단백질 분비를 증대시키기 위한 연구가 필요하다. 그 예로서 배지의 삼투압 조절 [9]이나 초음파처리 [10]를 통해 물리적 변화를 주거나, 계면활성제 [11] 등을 사용한 화학적 처리가 단백질의 분비 효율에 영향을 준다는 보고가 있다.

DMSO (Dimethylsulfoxide)는 양친매성의 수용성 분자 구조를 가진 용매이며 단백질 분자의 양성자주개 그룹과 수소결합을 형성함으로써 단백질의 안정화를 돕는다. 동물세포배양에서 DMSO를 처리하여 단백질의 변성을 억제함으로써 B형 간염 항원, 대식세포증식자극인자 등의 생산량을 증가시켰다는 보고가 있다 [12,13]. 트리톤 X-100 (Triton X-100)은 비이온성 계면활성제이며, 식물세포 투과성 증진의 적합한 대안으로 사용되고 있다 [14]. 비트의 현탁세포 배양에서 0.7 mM 농도의 트리톤 X-100의 첨가로 베타시아닌의 30%가 배지 내로 분비되었고 [15], 효모균 배양에서 트리톤 X-100이 세포에 일시적인 막관통구멍을 형성시켜 세포 투과성을 증대시켰다고 보고되었다 [16]. 트윈 20 (Tween 20)은 폴리소베이트 20이라고도 불리는 비독성 계면활성제이며, 세포막의 투과화 용도로 사용되고 있다. 또한 의약품을 안정화하는 목적으로도 쓰이며, 적은 농도로 효과를 나타낸다. 세겟독말풀의 뿌리배양에서 트윈 20의 첨가를 통해 뿌리 내에 축적된 트로판 알칼로이드의 분비를 촉진시킨 보고가 있다 [17].

본 연구에서는 형질전환 벼 세포 배양에서 hCTLA4Ig의 생산특성을 확인하고 목적단백질의 분비향상을 통해 생산성을 증진시키는 연구를 진행하였다. 세포 내외부의 hCTLA4Ig의 양을 정량 분석하여 목적단백질의 분비 정도를 확인하였고 세포벽의 투과성 증진을 위해 투과성 증강제인 DMSO, 트리톤 X-100, 트윈 20을 처리하여 hCTLA4Ig의 분비를 증대시키고자 하였다. 궁극적으로 형질전환 벼 세포에 독성이 있지 않으면서 hCTLA4Ig의 분비를 증진시킬 수 있는 투과성 증강제를 선별하여 배양에 적용하였다.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. 세포주 및 세포 배양조건

전복대로부터 분양 받은 hCTLA4Ig를 생산하는 형질전환 벼

(*Oryza sativa*) 세포주를 사용하였다 [18]. 본 세포주는 RAmY-3D 프로모터 기반의 발현시스템이기 때문에 당 고갈 환경에 의해 목적단백질을 발현한다. 벼 세포의 성장 배지는 2.0 mg/L 2,4-디클로로페녹시아세트산, 0.2 mg/L 카이네틴, 0.1 mg/L 지베렐린 산, 50 mg/L 하이그로마이신, 3% 수크로오스가 첨가된 아미노산 배지를 사용하였고 배지의 pH는 5.8로 맞추어 가압증기 멸균하여 사용하였다. 계대배양은 9일 간격으로 500-mL 플라스크에서 진행하였고 현탁배양은 28°C, 120 rpm, 암 조건에서 수행하였다. hCTLA4Ig의 생산유도를 위해 계대배양 후 9일차 세포를 접종하였고 생산배지는 수크로오스가 첨가되지 않은 아미노산 배지를 사용하였다. 투과성 증진제는 0.5, 1% (v/v) DMSO(Sigma aldrich, USA), 0.01, 0.05, 0.1% (v/v) 트리톤 X-100(Sigma aldrich, USA) 그리고 0.05, 0.5% (v/v) 트윈 20(Sigma aldrich, USA)으로 제조하여 첨가하였다.

2.2. 벼 세포 내부 hCTLA4Ig 추출

벼 세포 내에 남아 있는 hCTLA4Ig를 정량하기 위하여 세포 생체량 0.2 g을 액체질소로 파쇄하여 완충 용해액에 재현탁시켰다. 완충 용해액은 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 29 mM MgCl₂, 4% CHAPS, 10 mM EDTA, 100 mM DTE, 0.2% PVP 40으로 제조하였고 세포 파쇄 시에 분비되는 프로테아제에 의한 hCTLA4Ig의 분해를 방지하기 위해 프로테아제 저해 카테일을 첨가하였다. 파쇄액은 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 취하였다.

2.3. hCTLA4Ig 정량 분석

벼 세포 내부의 hCTLA4Ig 정량은 세포 파쇄액의 상등액을 이용하였고, 배지로 분비된 hCTLA4Ig의 정량은 회수한 배지를 이용하여 샌드위치 효소 결합 면역 분석 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay; ELISA)을 수행하였다. 표준물질은 ImmunoPure 인간형 IgG (Pierce)를 사용하였다.

2.4. 벼 세포 생존도 측정

세포의 생존도는 2,3,5-트리페닐테트라졸륨 클로라이드 (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride)를 이용한 TTC 환원법으로 상대적인 세포 생존도를 측정하였다 [19]. 세포 생체량 0.1 g을 1.5% TTC 용액 (0.05 M 인산칼륨 용액, pH 9.0) 1.6 mL을 첨가하여 상온에서 24시간 반응시켰다. 반응 후, TTC 용액을 제거하고 99% 에탄올 1 mL을 첨가하여 60°C에서 30분간 반응시켜 붉은색의 포르마잔을 추출하였다. 15,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취한 뒤, 485 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. 벼 세포 면역 조직 화학 염색

벼 세포를 회수하여 4% 파라포름알데하이드를 첨가 후 4°C에서 12시간 고정하였다. 그 후, 수크로오스 (10, 15, 20%) 용액에 차례로 처리하여 세정하고 동결용 포매제 O.T.C™ (Sakura Tissue)를 이용하여 벼 세포와 함께 동결시킨다. 회전형 박절기를 사용하여 실레인이 코팅된 슬라이드에 부착시킨 후

절편을 실온에서 건조시켰다. 벼 세포 절편의 hCTLA4Ig는 IHC select 키트 (Chemicon International)를 이용하여 염색하였고, goat anti-human antibody (KPL, USA)와 biotin-labeled rabbit anti-goat antibody (KPL, USA)를 이용하여 부착시켰다. Streptavidin alkaline phosphatase (abcam, UK)를 이용하여 발색시키고 hematoxylin (Sigma aldrich, USA)으로 핵을 염색하였다.

2.6. 프로테아제 활성 측정

Anson's method를 이용하여 배지내 프로테아제 활성을 측정하였다 [20]. 1% Na-casein (67 mM phosphate buffer, pH 7.0) 용액 0.5 mL에 세포배양액 0.5 mL을 첨가하고 50°C에서 20분간 반응시켰다. 효소활성을 정지시키기 위해 30% TCA (trichloroacetic acid) 용액 0.3 mL을 첨가하여 50°C에서 30분간 반응시켰다. 반응액을 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하였고 분광 광도계를 이용하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 3차 증류수를 이용하여 영점을 맞췄고 프로테아제 활성의 표준물질로는 티로신용액을 0.05~0.4 mg/mL로 농도 범위로 사용하였다. 프로테아제의 활성단위는 분당 티로신 1 mg이 생산되는 효소의 양을 1 U (unit)으로 정의하였다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 형질전환 벼 세포 내의 hCTLA4Ig 발현확인

형질전환 벼 세포배양에서 hCTLA4Ig의 발현양상을 확인하기 위해 당이 첨가되지 않은 생산배지를 적용하였다. 배지 내로 분비된 hCTLA4Ig는 생산유도 후 10일 차에 40.50 mg/L, 세포 내의 hCTLA4Ig는 생산유도 후 4일 차에 10.95 mg/L로 최대값을 나타내었다 (Fig. 1(a)). 목적단백질 생산유도 4일 차 이후에는 세포 내부의 hCTLA4Ig의 양이 점차 감소하였다. 이는 세포의 생존도 감소와 세포 용해로 인해 세포 내부의 hCTLA4Ig가 용출되었기 때문이다 [21]. 하지만 세포가 용해되면 세포내의 프로테아제가 배지내로 용출되어 목적단백질의 분해가 일어나기 때문에 적절한 시기에 목적단백질이 분비되는 것이 단백질의 품질에 있어 매우 중요하다.

세포막과 세포벽사이의 목적단백질인 hCTLA4Ig의 정성 분석을 위하여 단백질 생산유도 전의 세포와 생산유도 후 6일 차의 세포를 회수하여 절편을 만들었다. 벼 세포 절편에 면역 조직 화학 염색을 진행하였고 붉은색으로 염색된 hCTLA4Ig를 확인할 수 있었다 (Fig. 1(b)).

3.2. 형질전환 벼 세포배양에서 DMSO가 hCTLA4Ig 생산에 미치는 영향

형질전환 벼 세포배양을 통한 hCTLA4Ig의 생산에 있어 투과성 증진제인 DMSO의 영향을 알아보기 위해 배지 내로의 목적단백질 분비를 확인하였다. DMSO를 0, 0.5, 1% (v/v) 농도별로 첨가하였고, 단백질 생산유도 후 배지를 회수하여 hCTLA-

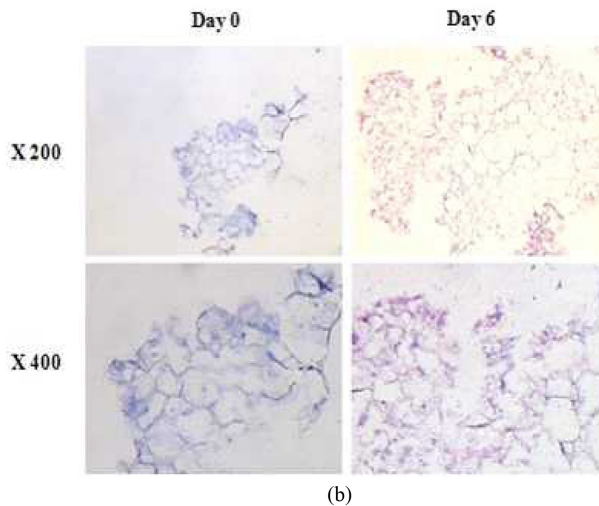
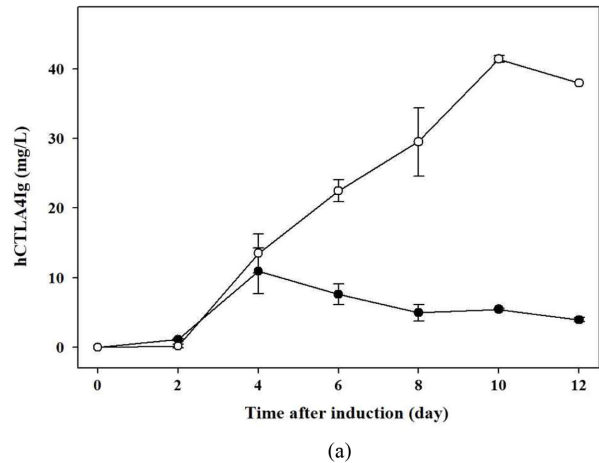


Fig. 1. (a) hCTLA4Ig production in transgenic rice cell cultures. The cells were cultured in sugar-free medium. ●, intracellular hCTLA-4Ig; ○, extracellular hCTLA4Ig. (b) Immunohistochemistry for the detection of intracellular hCTLA4Ig in transgenic rice cells.

A4Ig를 분석하였다. 배지 내로 분비된 hCTLA4Ig를 비교한 결과 DMSO를 첨가한 배지에서 첨가하지 않은 배지보다 낮은 생산량이 확인되었다 (Fig. 2(a)). 목적단백질 생산유도 후 4일 차의 세포들을 파쇄하여 세포내의 hCTLA4Ig의 양을 비교한 결과 DMSO를 첨가한 실험군의 세포 내에서 더 많은 양의 hCTLA4Ig가 확인되었다 (Fig. 2(c)). 결과적으로 DMSO는 배양 초기 세포 생존도에 부정적인 영향을 미치고 형질전환 벼 세포의 목적단백질 분비에도 영향을 주지 않는 것을 알 수 있었다 (Fig. 2(b)).

3.3. 형질전환 벼 세포배양에서 트리톤 X-100이 hCTLA4Ig 생산에 미치는 영향

비이온성 계면활성제인 트리톤 X-100을 형질전환 벼 세포배양 시 첨가하여 식물세포의 생존도와 hCTLA4Ig의 생산에 미치는 영향을 확인하였다. 트리톤 X-100을 0, 0.01, 0.05, 0.1%

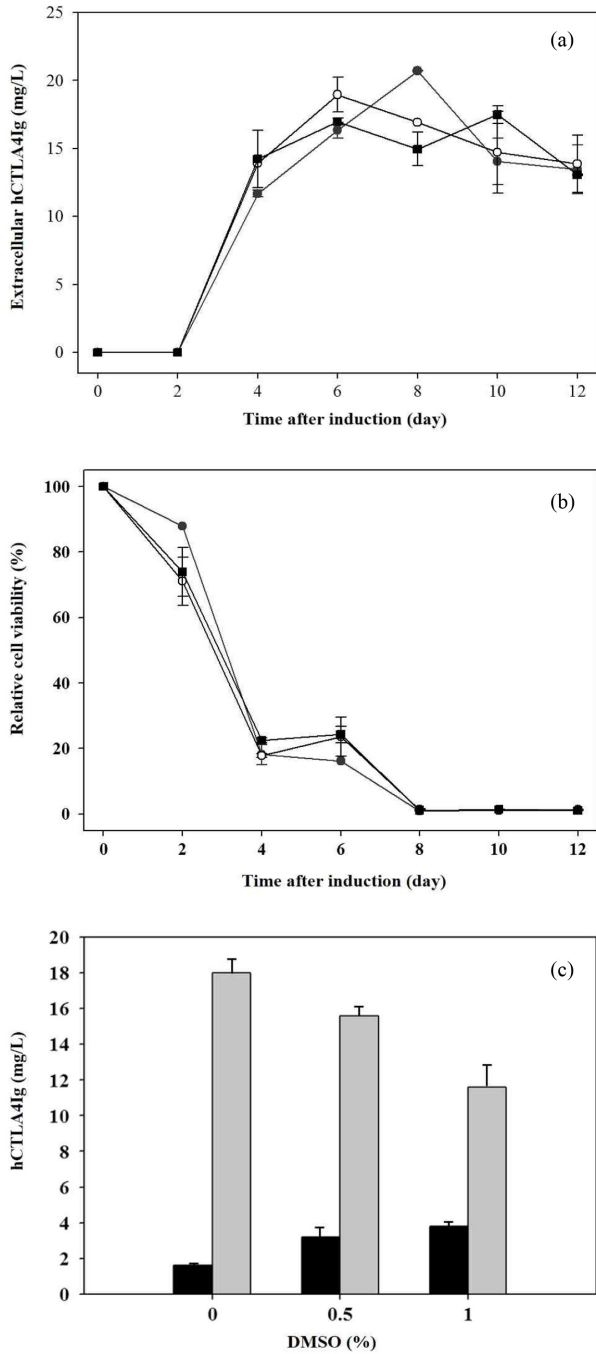


Fig. 2. Effects of DMSO concentration on (a) the production of extracellular hCTLA4Ig and (b) relative cell viability during production phase. ●, control; ○, 0.5% DMSO; ■, 1.0% DMSO. (c) Effects of DMSO concentration on the level of intracellular and extracellular hCTLA4Ig. The cells were cultured in sugar-free medium for 4 days. ■, intracellular hCTLA4Ig; ▒, Extracellular hCTLA4Ig.

(v/v) 농도별로 첨가하였고, 단백질 생산유도 후 배지를 회수하여 hCTLA4Ig를 분석하였다. 트리톤 X-100을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 모든 농도의 실험군에서 hCTLA4Ig의

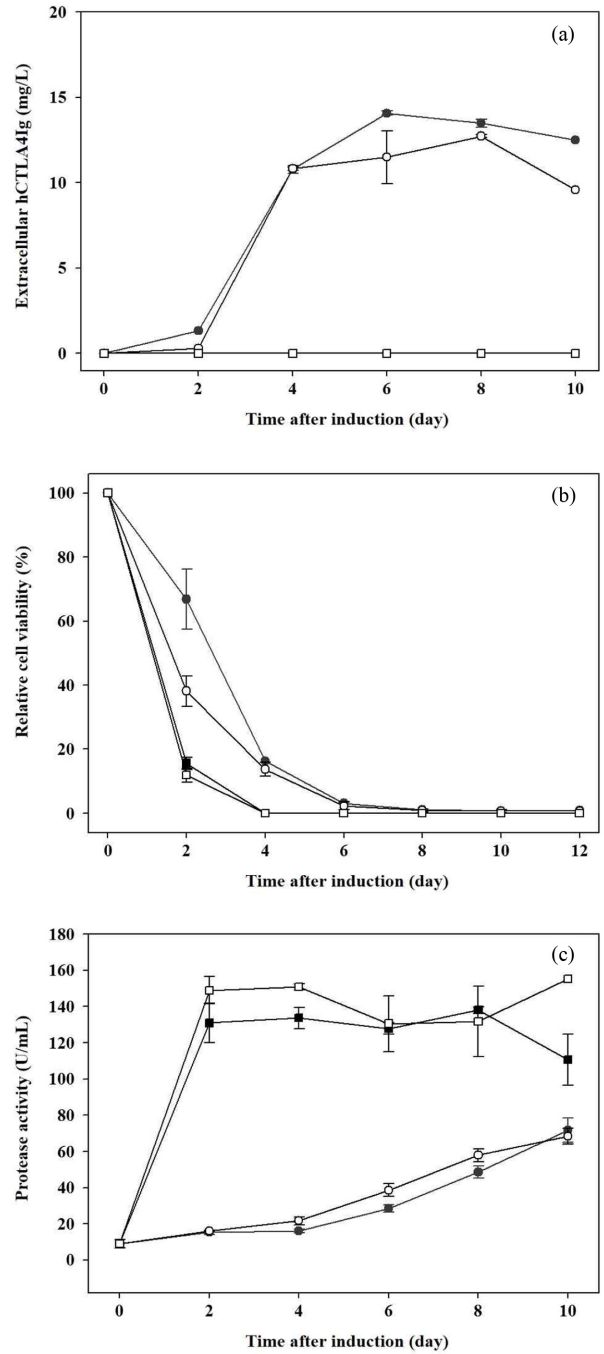


Fig. 3. Effects of Triton X-100 concentration on (a) the production of extracellular hCTLA4Ig, (b) relative cell viability and (c) protease activity during production phase. ●, control; ○, 0.01% Triton X-100; ■, 0.05% Triton X-100; □, 0.1% Triton X-100.

생산이 감소되는 것을 확인하였다 (Fig. 3(a)). 특히, 0.05, 0.1% (v/v) 농도의 트리톤 X-100 첨가는 세포의 생존도를 감소시켰고 (Fig. 3(b)), 세포의 용해를 유도하여 프로테아제의 활성을 증가시켰다 (Fig. 3(c)). 또한, 트리톤 X-100을 0.05, 0.1% (v/v) 농도로 처리한 경우 hCTLA4Ig의 생산이 전혀 유도되지 않았

다. 결론적으로, 트리톤 X-100은 형질전환 벼 세포에 독성이 있으며, 투과성 증진에는 영향을 주지 않는 것을 확인할 수 있었다.

3.4. 형질전환 벼 세포배양에서 트윈 20이 hCTLA4Ig 생산에 미치는 영향

형질전환 벼 세포배양에서 비독성 계면활성제인 트윈 20을 0, 0.05, 0.5% (v/v) 농도로 처리하여 hCTLA4Ig의 생산에 미치는 영향을 확인하였다. 단백질 생산유도 후 4일 차의 배지와 세포를 회수하였고 세포 생존도와 프로테아제 활성 그리고 hCTLA4Ig의 생산량을 비교하였다 (Fig. 4). 처리한 모든 농도의 트윈 20은 프로테아제의 활성과 세포 생존도에 영향을 주지 않았고 독성이 없었다. 0.05% (v/v) 농도의 트윈 20의 첨가는 트윈 20을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 1.6배 더 높은 hCTLA4Ig 생산성을 보였다. 하지만 0.5% (v/v) 농도의 트윈 20을 첨가한 실험군의 hCTLA4Ig는 대조군의 65%로 감소된 것을 확인하였다.

0.05% (v/v) 농도의 트윈 20을 선정하여 배양 중 세포 내외부의 hCTLA4Ig 생산을 비교하였다 (Fig. 5). 배지로 분비된 hCTLA4Ig는 단백질 생산유도 10일 차에 44.76 mg/L로 최대 값을 나타냈고 트윈 20을 처리하지 않은 대조군보다 약 1.4배 증가하였다. 반면에 세포 내에 잔재하는 hCTLA4Ig의 양은 대조군보다 감소한 것을 확인하였다. 트윈 20은 형질전환 벼 세포 배양에 독성이 없고 세포 생존도와 프로테아제의 활성에 영향을 주지 않았다. 이러한 결과는 트윈 20이 형질전환 벼 세포 배양에 영향을 주지 않으면서 세포벽 투과성의 변화를 주어 hCTLA4Ig의 분비를 증진시켰다는 것을 보여준다.

4. CONCLUSION

본 연구에서는 형질전환 벼 세포 배양에서 hCTLA4Ig의 생산 유도 시 투과성 증강제를 처리하여 목적단백질의 분비를 증대시키고자 하였다. 당이 첨가되지 않은 생산배지에 DMSO를 처리하였을 때, 목적단백질 생산유도 후 4일 차의 배양액과 세포 내 hCTLA4Ig 생산량을 확인해 보았다. DMSO의 첨가는 벼 세포의 투과성과 목적단백질의 분비에 영향을 주지 않았다. 트리톤 X-100을 생산배지에 적용하였을 경우, 모든 처리 농도에서 벼 세포에 독성이 있었다. 세포에 대한 독성은 프로테아제의 활성 증진으로 이어졌고 목적단백질인 hCTLA4Ig의 감소를 야기했다. 반면 트윈 20을 형질전환 벼 세포배양에 처리하였을 때, 세포의 생존도에 영향을 주지 않는 것을 확인하였고 프로테아제의 활성에도 영향을 주지 않았다. 특히 0.05% (v/v) 농도의 트윈 20을 첨가한 실험군의 배양액에서는 트윈 20을 처리하지 않은 대조군에 비해 1.4배 높은 hCTLA4Ig 생산이 확인하였고, 벼 세포내에 잔존하는 hCTLA4Ig의 양은 대조군보다 감소한 것을 확인하였다. 이는 비독성 계면활성제인 트윈 20이 형질전환 벼 세포의 세포벽 투과성을 증강시켜 배지 내 성분들의 흡수를 증진하고 세포의 생존

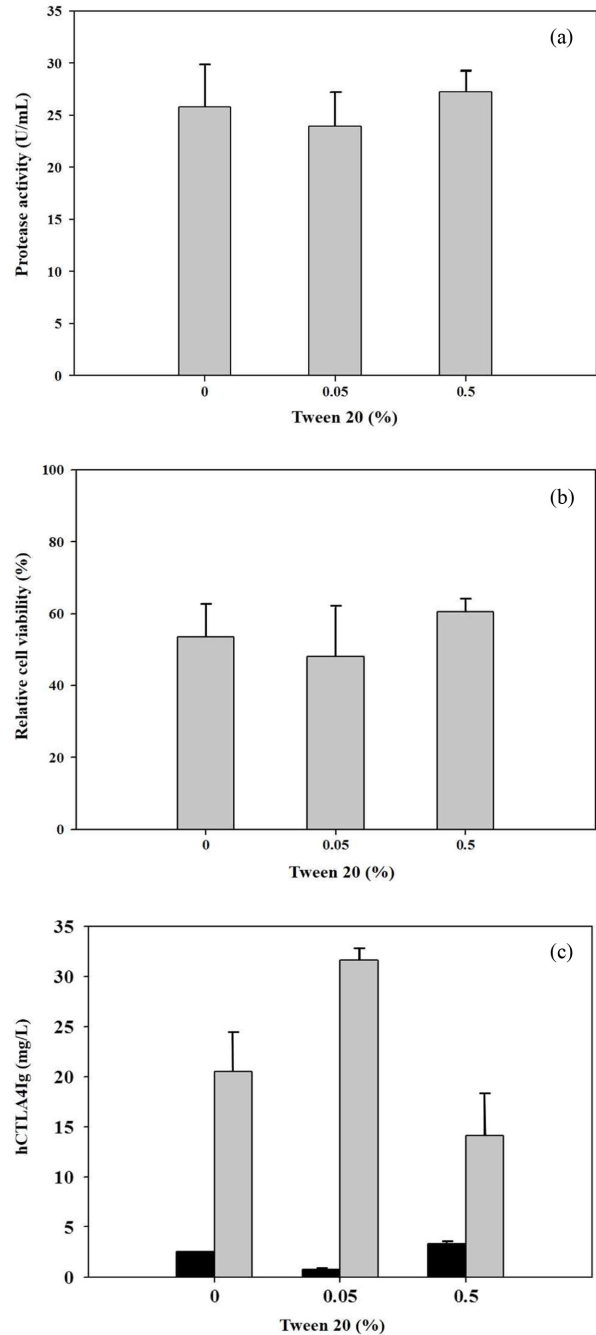


Fig. 4. Effects of Tween 20 concentration on (a) protease activity, (b) relative cell viability and (c) production of intracellular and extracellular hCTLA4Ig. Cells were cultured in sugar-free medium added Tween 20 for 4 days. ■, intracellular hCTLA4Ig; □, Extracellular hCTLA4Ig.

도 유지와 함께 세포 내 hCTLA4Ig의 분비를 촉진 시켰다는 것을 보여준다. 결론적으로, 트윈 20은 형질전환 벼 세포배양에서 목적단백질의 분비를 증강해 생산성을 증대시키는 첨가물로써 사용될 수 있다는 것을 확인하였다.

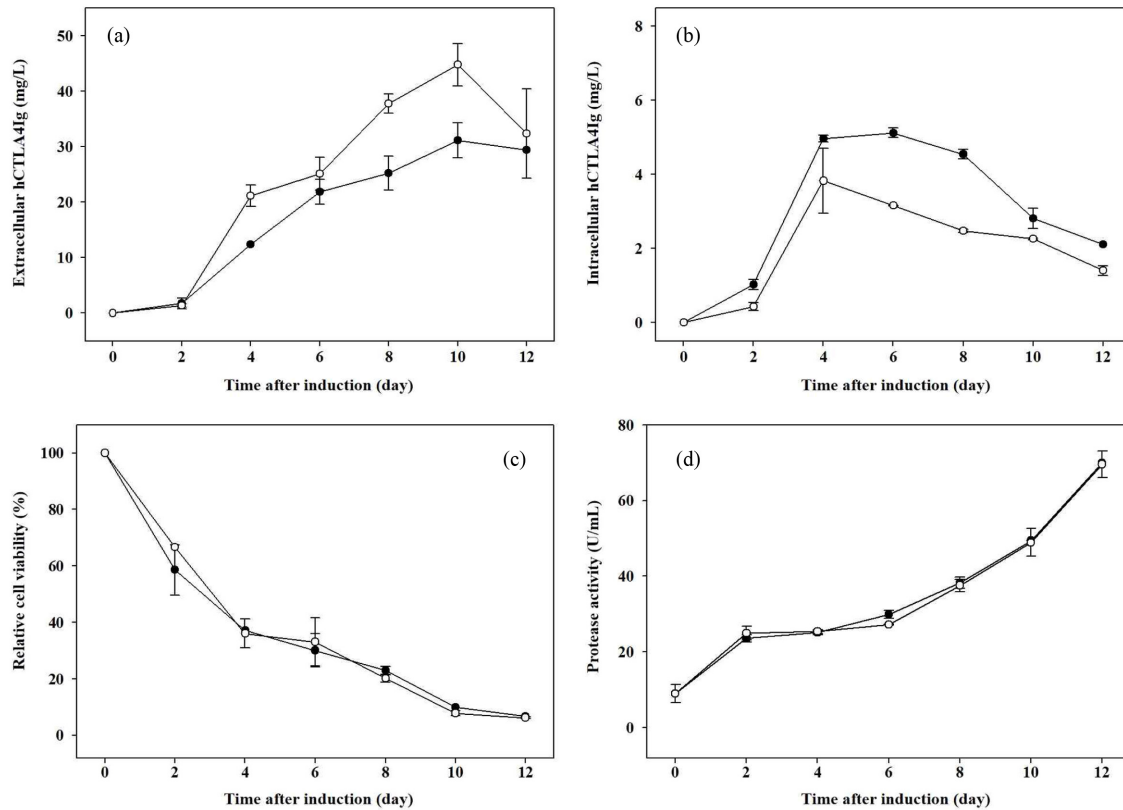


Fig. 5. Effects of Tween 20 on hCTLA4Ig production between (a) extracellular and (b) intracellular, (c) relative cell viability and (d) protease activity in transgenic rice cell cultures. The cells were cultured in sugar-free medium for added 0.5% Tween 20 at indicated times after induction. ●, control; ○, 0.05% Tween 20.

Acknowledgements

이 논문은 미래창조과학부 재원 한국연구재단의 바이오의료 기술개발사업 (과제번호 NRF-2013M3A9B6075887) 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Grabowski, G. A., M. Golembowski and Y. Shaaltiel (2014) Taliglucerase alfa: An enzyme replacement therapy using plant cell expression technology. *Mol. Gen. Metabol.* 112: 1-8.
- Davidson, E., Bryan, C., Fong, R. H., Barnes, T., Pfaff, J. M., Mabila, M., Rucker, J. B. and B. J. Doranz (2015) Mechanism of binding to ebola virus glycoprotein by the ZMapp, ZMAb, and MB-003 cocktail antibodies. *J. Virol.* 89: 10982-10992.
- Tekoah, Y., Shulman, A., Kizhner, T., Ruderfer, I., Fux, L., Nataf, Y., Bartfeld, D., Ariel, T., Gingis-Velitski, S., Hanania, U. and Y. Shaaltiel (2015) Large-scale production of pharmaceutical proteins in plant cell culture-the protalix experience. *Plant Biotechnol. J.* 13: 1199-1208.
- Shin, Y.-J., Chong, Y.-J., Han, K.-B., Yang, M.-S. and T.-H. Kwon (2010) N-linked glycan analysis of glycoproteins secreted from rice cell suspension cultures under sugar starvation. *Enzyme Microb. Tech.* 47: 189-193.
- Zhang, N., Gonzalez, M., Savary, B. and J. Xu (2016) High-yield secretion of recombinant proteins expressed in tobacco cell culture with a designer glycopeptide tag: Process development. *Biotechnol. J.* 11: 497-506.
- Magnuson, N. S., Linzmaier, P. M., Gao, J. W., Reeves, R., An, G. and J. M. Lee (1996) Enhanced recovery of a secreted mammalian protein from suspension culture of genetically modified tobacco cells. *Protein Expres. Purif.* 7: 220-228.
- Cereghino, G. P. Lin, Cereghino, J. L., Ilgen, C. and J. M. Cregg (2002) Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr. Opin. Biotech.* 13: 329-332.
- Drakakaki, G. and A. Dandekar (2013) Protein secretion: How many secretory routes does a plant cell have? *Plant Sci.* 203-204: 74-78.
- Lee, J.-H., Kim, N.-S., Kwon, T.-H. and M.-S. Yang (2002) Effects of osmotic pressure on production of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in plant cell suspension culture. *Enzyme Microb. Tech.* 30: 768-773.
- Lin, L., Wu, J., Ho, K.-P. and S. Qi (2001) Ultrasound-induced physiological effects and secondary metabolite (saponin) production in

- Panax ginseng* cell cultures. *Ultrasound Med. Biol.* 27: 1147-1152.
11. Lee, Y.-J., Kim, C.S. and D.-K. Oh (2004) Lactulose production by β -galactosidase in permeabilized cells of *Kluyveromyces lactis*. *Appl. Microbiol. Biot.* 64: 787-793.
 12. Liu, C.-H. and L.-H. Chen (2007) Promotion of recombinant macrophage colony stimulating factor production by dimethyl sulfoxide addition in Chinese hamster ovary cells. *J. Biosci. Bioeng.* 103: 45-49.
 13. Li, J., Huang, Z., Sun, X., Yang, P. and Y. Zhang (2006) Understanding the enhanced effect of dimethyl sulfoxide on hepatitis B surface antigen expression in the culture of Chinese hamster ovary cells on the basis of proteome analysis. *Enzyme Microb. Tech.* 38: 372-380.
 14. Kuruvilla, T., Komaraiah, P. and S. V. Ramakrishna (1999) Enhanced secretion of azadirachtin by permeabilized margosa (*Azadirachta indica*) cells. *Indian J Exp. Biol.* 37: 89-91.
 15. Trejo-Tapia, G., Cuevas-Celis, J., Salcedo-Morales, G., Trejo-Espino, J. L., Arenas-Ocampo, M. L. and A. Jimnez-Aparicio (2007) *Beta vulgaris* L. suspension cultures permeabilized with Triton X-100 retain cell viability and betacyanines production ability: A digital image analysis study. *Biotechnol. Progr.* 23: 359-363.
 16. Laouar, L., Lowe, K. C. and B. J. Mulligan (1996) Yeast responses to nonionic surfactants. *Enzyme Microb. Tech.* 18: 433-438.
 17. Boitel-Conti, M., Gontier, E., Laberche, J.-C., Ducrocq, C. and B. S. Sangwan-Norreel (1996) Inducer effect of tween 20 permeabilization treatment used for release of stored tropane alkaloids in *Datura innoxia* Mill. hairy root cultures. *Plant Cell Rep.* 16: 241-244.
 18. Lee, S.-J., Park, C.-I., Park, M.-Y., Jung, H.-S., Ryu, W.-S., Lim, S.-M., Tan, H.-K., Kwon, T.-H., Yang, M.-S. and D.-I. Kim (2007) Production and characterization of human CTLA4Ig expressed in transgenic rice cell suspension cultures. *Protein Express. Purif.* 51: 293-302.
 19. Lutts, S., Almansouri, M. and J.-M. Kinet (2004) Salinity and water stress have contrasting effects on the relationship between growth and cell viability during and after stress exposure in durum wheat callus. *Plant Sci.* 167: 9-18.
 20. Bettaglino, R. A., Huergo, M., Pilosof, A. M. and G. B. Bartholomai (1992) Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35: 292-296.
 21. Kwon, J.-Y., Jeong, S.-H., Choi, J.-W., Pak, Y.-Y. and D.-I. Kim (2013) Assessment of long-term cryopreservation for production of hCTLA4Ig in transgenic rice cell suspension cultures. *Enzyme Microb. Tech.* 53: 216-222.