

*Pichia pastoris*에서 메탄올 유도시 첨가물이 재조합 HBsAg 생산에 미치는 영향

이 경 훈 · 임 상 민 · † 김 동 일
인하대학교 공과대학 생물공학과
(접수 : 2006. 2. 27., 게재승인 : 2006. 8. 22.)

Effect of Various Additives on the Production of Recombinant HBsAg during Methanol Induction in *Pichia pastoris*

Kyoung-Hoon Lee, Sang-Min Lim, and Dong-Il Kim†
Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
(Received : 2006. 2. 27., Accepted : 2006. 8. 22.)

Methanol induction conditions with various additives for the enhanced production of recombinant hepatitis B surface antigen (HBsAg) were investigated in *Pichia pastoris*, which can utilize methanol as a carbon source and produce recombinant proteins under the control of strong, tightly-regulated alcohol oxidase (AOX) promoter. The presence of non-methanol carbon sources such as glycerol and glucose fully repressed the expression of AOX promoter. Various additives were tested to improve the production of recombinant protein and it was found that sorbitol could be a good carbon source during methanol induction period. An optimized concentration of amino acid mixture enhanced the production of HBsAg significantly. Pluronic F-68, a non-ionic surfactant, also improved the production of HBsAg without inhibiting cell growth. Addition of oleic acid at 0.01% (v/v) during the induction period showed positive effect on the production of HBsAg. Finally, 1.2% (v/v) of trace salts enhanced the production of HBsAg 1.9 times compared to that of control culture.

Key Words : *Pichia pastoris*, alcohol oxidase promoter, hepatitis B surface antigen, pluronic F-68, oleic acid, trace salts

서 론

B형 간염은 B형 간염 바이러스 (hepatitis B virus, HBV)에 의한 감염으로 인해 발생하며, 간암이나 간경화의 원인이 된다. 하지만 아직까지 효율적인 치료방법이 개발되지 않았으므로, 예방 방법으로 백신을 이용해야만 한다. 초기에는 감염된 혈장유래의 B형 간염 바이러스의 표면항원 (hepatitis B surface antigen, HBsAg)을 백신으로 이용하였다. 그러나 혈장 공급과 안전성의 한계로 인해 유전자 재조합 기술에 의해 HBsAg 유전자를 도입한 미생물이나 동물세포에 의한 생산 기술이 개발되었다. 동물세포를 이용할 경우 역가 측면에서 장기간 저장이 가능하고 안정성이 높다는 장점이 있다(1). 그러나 고가의 배양비용에 비해 생산성이 낮은 단점이 있다. 따라서 비용이 저렴하고 고농도

배양이 용이한 재조합 효모를 이용한 생산시스템을 많이 이용하고 있다. 재조합 효모에서 생산된 HBsAg는 인체 혈장에서 얻은 것과 거의 유사한 미립자들로 응집됨이 확인되었다(2). 대표적인 효모로는 *Saccharomyces cerevisiae*와 메탄올 자화 효모가 있다. 생산 숙주로서 *S. cerevisiae*는 발현된 외래 단백질이 전체 발현 단백질의 최대 1-5% 정도로 낮은 수율을 보이며 외래 단백질의 발현은 세포에게 스트레스로 작용한다. 그리고 일반적으로 플라스미드 안정성이 떨어진다. 이는 성장속도 및 수율 감소의 원인이 되며, 따라서 전체 생산성이 감소하는 결과를 초래한다(3). 최근에는 이러한 단점들을 개선한 *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha* 등과 같은 메탄올 자화 효모를 많이 사용하고 있다. 이 중에서 *P. pastoris*의 경우 고농도 배양이 용이하며 scale-up이 쉽다는 장점이 있다. 그리고 형질 전환된 경우 목적 유전자가 염색체상으로 삽입되어 장기간 배양에서도 도입된 발현벡터의 안정성이 높다. 또한 메탄올 자화 효모는 *S. cerevisiae*에서 발현된 당단백질에 비해 과당화가 되는 정도가 낮은 장점도 보인다(4). *P. pastoris*는 탄소원으로 메탄올을 이용할 수 있고, 강력한 알

† Corresponding Author : Department of Biological Engineering,
Inha University, Incheon 402-751, Korea
Tel : +82-32-860-7515, Fax : +82-32-875-0827
E-mail : kimdi@inha.ac.kr

콜산화효소 (alcohol oxidase, AOX) 프로모터를 통해 단백질 발현을 조절한다. 알콜산화 효소로는 AOX1, AOX2를 가지고 있으며, 산화능의 대부분은 AOX1에 의해 조절된다. 알콜산화효소 프로모터는 *S. cerevisiae*의 GAL1과 유사한 억제 (repression)/활성 (derepression)과 유도 (induction)의 두 가지 기작으로 발현이 조절된다. 하지만 GAL1과 다른 점은 배지 내에 포도당과 같은 억제 탄소원이 존재시 AOX는 작동되지 않으며, 메탄올 존재시에만 발현이 유도된다(5). 따라서 *P. pastoris*를 이용한 재조합 단백질 생산을 위해서는 고농도 배양을 위한 탄소원으로 글리세롤과 목적 단백질 발현 유도를 위한 메탄올을 주탄소원들로 이용한다(6).

본 연구에서는 유전자 재조합 효모인 *P. pastoris*를 이용한 HBsAg 생산에서 메탄올 유도 조건 연구를 통한 목적 단백질의 발현 향상을 연구하였다. 초기 배양은 탄소원으로 글리세롤을 이용하여 고농도 배양을 수행한 다음 유도 단계에서는 탄소원을 완전히 고갈시킨 후 메탄올에 의한 목적 단백질을 생산하게 된다. 글리세롤의 경우 프로모터에 억제작용을 하기 때문에 유가식 배양의 탄소원으로 프로모터에 억제작용이 덜한 대체 탄소원을 연구하였다. 그리고 메탄올 유도시 아미노산과 계면활성제, oleic acid, trace salts 첨가에 따른 단백질 발현에 미치는 영향을 연구하여 HBsAg 생산을 증진시키고자 하였다.

재료 및 방법

배지 및 배양조건

플라스크 배양을 위해서는 500 mL 및 250 mL 플라스크를 이용하였고 20% (v/v) 배지에 5% (v/v)로 접종한 후 30°C, 250 rpm으로 유지하며 진탕배양 하였으며 배지는 BMGY를 사용하였다.

5 L 발효조 배양은 코바이오텍사의 KF 5-L 발효기를 사용하였으며, 조업부피는 3 L였다. 배양형태는 유가식 배양을 사용하였다. 균체 접종량은 5% (v/v)로 접종하였으며, 배양온도는 37°C, 통기속도는 1 vvm, 교반속도는 300 rpm으로 하였다. 용존산소 농도는 30% 이상으로 유지하였으며, 산소전달제한에 따라 통기속도는 2 vvm, 교반속도는 800 rpm까지 증가시켰다. 그 이후에는 100% 산소를 공급하였다. pH는 28% 암모니아수를 사용하여 5.0으로 유지하였다. 소포제는 배양 전 배지 내에 Antifoam E20과 Adecanol LG를 각각 0.5 mL씩 첨가하여 배지와 함께 멸균하였다. 배양 중에는 Antifoam E20과 Adecanol LG를 각각 0.5% (v/v)로 희석한 용액을 멸균하여 사용하였다.

균체농도와 균체량

균체농도는 8453E UV-visible spectrophotometer (Agilent)를 사용하여 600 nm에서 흡광도로 측정하였고, 균체량은 배양액 1 mL를 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 pellet을 증류수로 2회 세척한 후 55°C 건조기에서 24시간 건조하여 건조 균체량 (DCW)을 측정하였다.

세포내 총 단백질량

플라스크 배양은 배양액 1 mL를 원심분리하여 얻은 pellet을 증류수로 2회 세척한 다음 425~600 mm glass bead (Sigma)와 100 mM Tris (pH 8.0), 10% (w/v) 글리세롤, 0.1% Triton X-100의 파쇄 buffer를 혼합하여 30분동안 강하게 교반하였다. 다시 원심분리한 상등액을 총단백질 측정에 이용하였다.

총 단백질의 정량분석을 위해서는 Bradford 방법 (BioRad)을 사용하였으며, Agilent사의 8453E UV-visible spectrophotometer로 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 5 L 발효조 배양의 경우에는 250 mL의 배양액 시료를 취해서 플라스크 배양액과 같은 방법으로 분석하였다.

글리세롤 농도

배지내 글리세롤 농도 분석은 Roche사의 glycerin glycerol kit를 이용하여 340 nm에서 흡광도를 측정하였다.

HBsAg 농도

발현된 목적 단백질인 HBsAg의 농도는 세포파쇄 후 녹십자 라이프 사이언스사의 Hepa S-ag test kit를 사용하여 reversed passive hemagglutination (RPHA) 방법으로 확인하였다.

결과 및 고찰

유가식 배양 탄소원으로서 sorbitol이 미치는 영향

AOX 프로모터는 메탄올에 의해서 유도된다. 하지만 메탄올 이외의 탄소원 존재시 프로모터가 억제된다. 따라서 메탄올 유도시의 잔존 탄소량이나 탄소원의 종류는 중요한 영향을 미친다(7). 탄소원으로는 글리세롤을 이용하며 메탄올 유도 전의 글리세롤 잔존량은 메탄올에 의한 AOX 프로모터 유도를 억제한다. 따라서 글리세롤 농도 조절이 세밀해야 하며 유도단계에서는 글리세롤을 완전히 고갈시켜야 한다. 유가식 배양 탄소원으로 메탄올에 의한 AOX 유도를 덜 억제하는 탄소원으로 당알콜을 이용한 보고도 있다(7). 또한 *P. pastoris*를 이용한 재조합 porcine follicle-stimulating 호르몬 생산에서도 유가식 배양 공급 탄소원으로 당알콜인 sorbitol를 사용한 예가 있다(8).

본 실험에서도 유가식 배양 탄소원을 당알콜의 일종인 sorbitol을 이용하여 세포증식과 HBsAg 단백질 발현에 미치는 영향을 글리세롤을 이용했을 때와 비교하여 Fig. 1에 나타내었다. 유가식 배양 탄소원은 초기 탄소원인 글리세롤 고갈에 따라 용존산소량이 급격히 증가하는 시점에서 공급을 시작하였다. 세포증식 측면에서는 글리세롤을 사용했을 때 보다 sorbitol을 사용했을 때 약간 감소하였다. 유가식 배양 이후 메탄올 유도에 의한 단백질 발현은 sorbitol을 사용한 경우 단위 건조균체량 당 HBsAg 발현량은 최대 203 mg이었으며, 글리세롤을 사용한 경우는 최대 191 mg으로 sorbitol을 사용했을 때 발현량은 6% 증가하였다.

Sorbitol은 탄소원으로서의 친화력이 글리세롤보다 약해

서 균체량이 감소하였다는 보고가 있다(8). 하지만 단백질 발현율은 증가한 것으로 보아 AOX 프로모터에 글리세롤보다 억제효과가 덜한 것으로 사료된다.

아미노산 혼합물 첨가의 영향

배지 내의 단백질 분해효소 활성을 억제 하기위해 아미노산을 첨가한다고 알려져 있다(9). 단백질 합성을 위해서는 단백질을 구성하는 아미노산이 필요하고, 아미노산을 합성하기 위해서는 많은 에너지를 필요로 한다. 따라서 목적 단백질인 HBsAg의 발현율을 향상시키기 위해서 본 실험에서는 아미노산 첨가가 미치는 영향에 대해서 알아보았다. 이를 위해 아미노산 혼합물을 사용하였는데, L-glutamic acid, L-methionine, L-lysine, L-leucine, L-isoleusine을 각각 5 mg/mL의 농도로 농축액을 만든 후 배양액에 0, 1, 2, 3, 4% (v/v)로 각각 첨가하였다.

세포증식은 아미노산 혼합물을 첨가한 경우 전반적으로 첨가하지 않은 경우보다 향상된 결과를 보여준다(Fig. 2(a)). 목적 단백질 생산을 보면 2%의 아미노산 혼합물을 첨가했을 때 139 mg HBsAg/g DCW로 가장 향상된 결과를 보였다. 이는 첨가하지 않은 경우의 77 mg HBsAg/g DCW

에 비해 1.8배 생산이 증가된 결과이다(Fig. 2(b)).

Fig. 3은 위 실험에서 가장 좋은 결과를 보였던 2% 아미노산 혼합물을 첨가하여 5 L 발효조 배양을 한 결과를 나타낸 것이다. 세포증식은 앞의 결과와 같이 첨가하지 않았을 때보다 향상된 결과를 보였고, 단백질 생산은 2% 첨가한 경우 최대 79.8 mg HBsAg/g DCW였고, 첨가하지 않은 경우의 최대 49.2 mg HBsAg/g DCW에 비해 62% 증가하였다. 그러나 메탄올 유도가 지속되면 아미노산 혼합물을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우 모두 발현이 감소하는 경향을 보이고 첨가 효과의 차이도 줄어들었다.

이상의 두 실험으로부터 목적 단백질인 HBsAg 생산에 아미노산 혼합물은 2% 첨가가 가장 좋은 결과를 보임을 확인하였고, 5 L 발효기로 배양한 경우에도 동일한 결과를 얻었다. 따라서 적당한 아미노산 첨가는 외래 단백질 생산에 긍정적인 효과가 있는 것으로 판단된다.

계면활성제의 영향

효모에 대해서 계면활성제의 첨가가 미치는 영향은 이미 보고된 바 있다(10). 비이온성 계면활성제인 Pluronic F-68은 세포 증식에 별 영향을 미치지 않으며, Triton

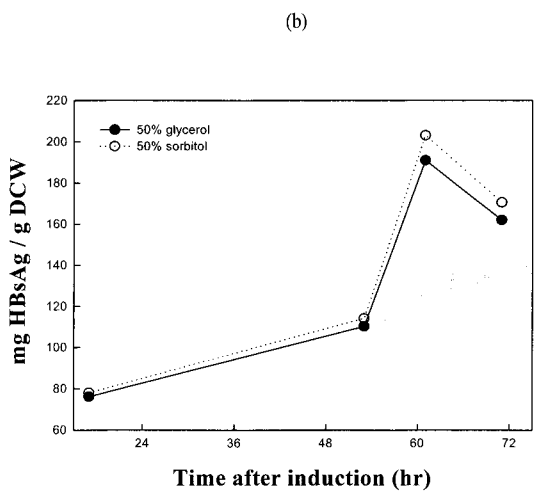
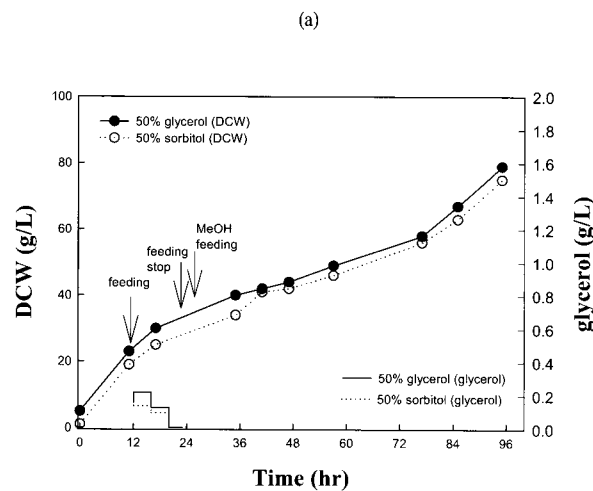


Figure 1. Effect of sorbitol feeding on (a) cell growth of *Pichia pastoris* and (b) recombinant HBsAg production in fed-batch fermentation.

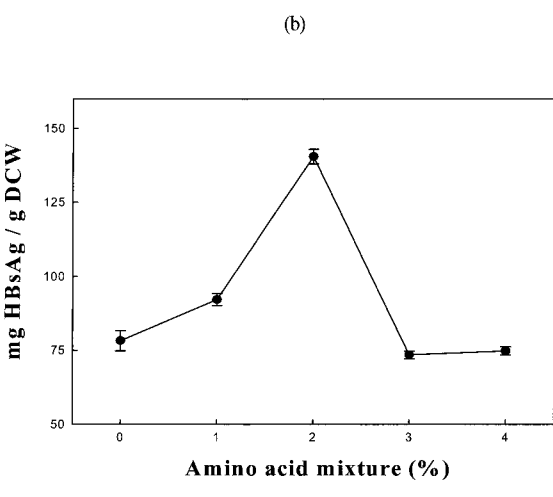
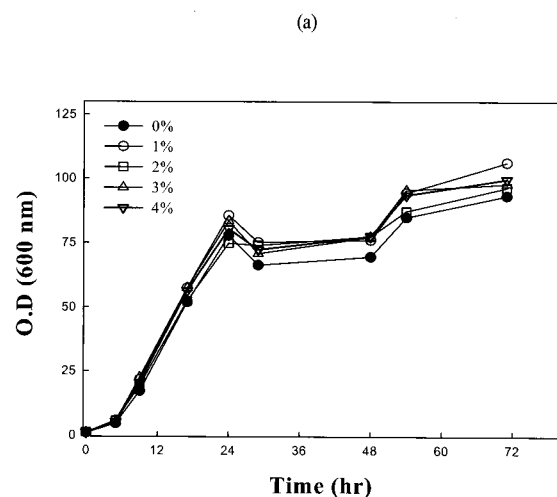


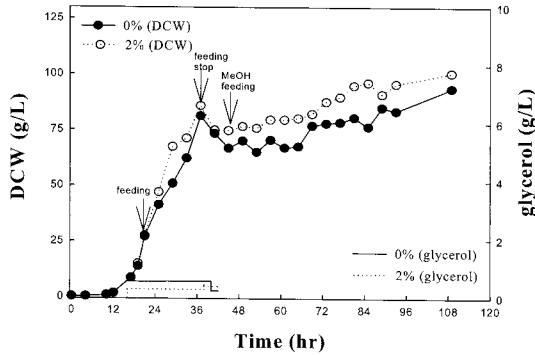
Figure 2. Effect of amino acid mixture on (a) cell growth and (b) HBsAg production.

X-100의 경우에는 초기 대수기 개시와 세포 노화 지연에 영향을 준다고 한다.

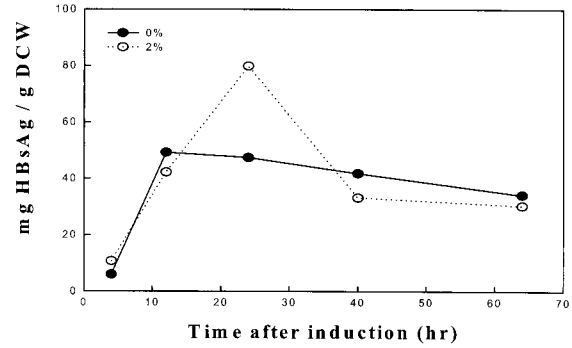
Pluronic F-68은 polyoxyethylene-polyoxypropylamine의 공중합체로서, 교반과 통기에 의한 전단응력에 대해서 세포를 보호하는 역할을 한다고 알려져 있다(11). 또한 세포막

의 인지질 구조를 변화시켜 영양소들의 투과성을 높인다는 보고도 있다(12).

본 실험에서는 단백질 발현에 미치는 계면활성제의 영향을 규명하기 위해서, Pluronic F-68 및 Triton X-100을 첨가한 실험을 수행하였다. Fig. 4(a)에서 볼 수 있는 것과

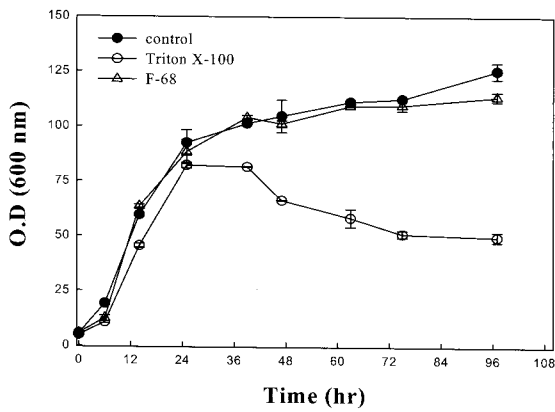


(a)

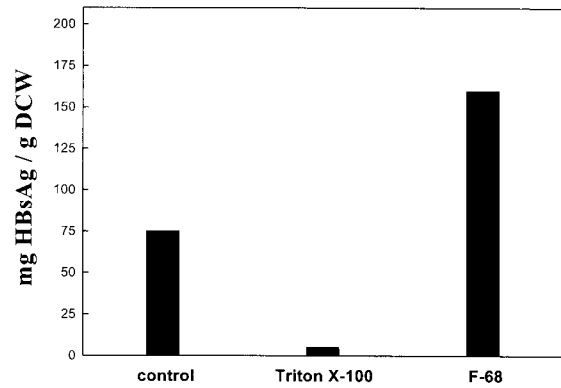


(b)

Figure 3. Effect of amino acid mixture on (a) cell growth and (b) the production yield of HBsAg in 5 L fermenter.

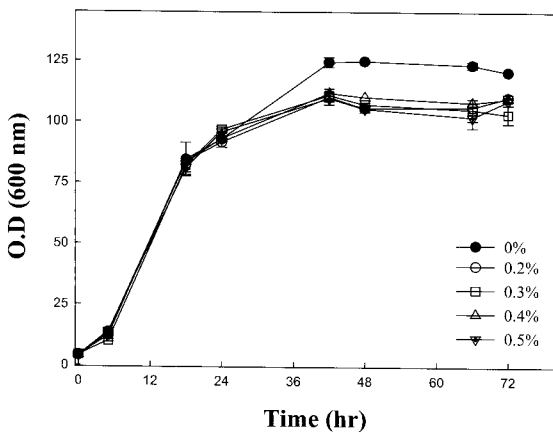


(a)

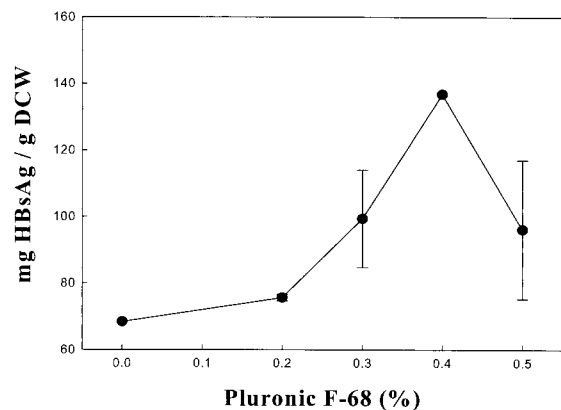


(b)

Figure 4. Effect of Pluronic F-68 and Triton X-100 on (a) cell growth and (b) HBsAg production.



(a)



(b)

Figure 5. Optimization of Pluronic F-68 concentration for the production of HBsAg.

같이 Pluronic F-68을 첨가한 배양에서는 대조구와 세포증식 면에서 거의 차이가 없었다. 그러나 Triton X-100을 첨가한 경우에는 메탄올 공급이 되고나서부터 현저히 증식이 감소하는 경향을 보였다. 단백질 생산에 있어서도 Triton X-100의 경우는 Fig. 4(b)에서 보면 대조구보다 급격히 감소한 것을 볼 수 있고, Pluronic F-68를 첨가한 경우에는 대조구에 비해 2.1배 증가한 결과를 보였다.

단백질 생산에 긍정적인 영향을 미치는 Pluronic F-68의 경우 최적 첨가농도를 확인하기 위해 0.2, 0.3, 0.4, 0.5% (v/v)로 각각 첨가하여 실험을 수행하였으며 Fig. 5에 그 결과를 정리하였다. 모든 농도에서 Pluronic F-68을 첨가하지 않은 대조구에 비해 세포증식이 약간 낮은 경향을 보였다. 그러나 HBsAg 생산에 있어서는 첨가한 모든 경우에 대조구보다 향상된 결과를 나타내었다. 가장 높은 생산량을 보인 것은 0.4%의 Pluronic F-68을 첨가한 것으로 대조구에 비해 2배 증가하였다.

일반적으로 계면활성제 첨가로 단백질 발현이 증가하며 박테리아의 경우 모든 계면활성제는 약간의 증식 억제 효과를 보이는 것으로 알려져 있으나, 같은 계면활성제라 할지라도 숙주의 종류나 목적 단백질의 종류에 따라 결과가 상반되게 나타나기도 한다고 한다(13). 그러나 계면활성제 첨가에 따른 단백질 생산의 증가는 그 기작이 아직 명확하게 알려져 있지 않으며, 세포막 자극에 따른 메탄올의 투과성 증가에 따른 발현 증가로 인한 것이라 추측할 수 있다. 발현농도 또한 계면활성제를 첨가한 경우 대조구보다 증가하였으므로 세포증식 억제에 의한 상대적 단백질 생산 증가는 아닌 것으로 판단된다.

Oleic acid 첨가가 미치는 영향

*P. pastoris*를 이용한 재조합 human serum albumin 생산의 경우 다양한 지방산 첨가로 단백질 발현이 증가하였다는 보고가 있다(14). 이는 AOX2 프로모터의 upstream 부위에 oleic acid와 반응하는 인자들이 존재하기 때문이라고 한다. 본 실험에 사용된 균주도 AOX1이 결실이 되고 AOX2 프로모터가 작동한다. 이로부터 oleic acid 첨가가 목적단백질인 HBsAg의 발현에 영향이 있을 것으로 판단

되었다.

따라서 oleic acid를 0.01 및 0.05% (v/v)로 첨가하여 세포증식과 단백질 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 세포증식에는 oleic acid 첨가가 미치는 영향이 거의 없었다(Fig. 6(a)). 단백질 생산에 있어서는 0.01% 첨가한 경우 최대 208 mg HBsAg/g DCW이었으며 대조구의 경우 96 mg HBsAg/g DCW로 oleic acid 첨가로 단백질 생산이 2.1배 증가한 결과를 보였다. 그러나 0.05%로 첨가한 경우에는 단백질 발현이 대조구보다 감소하는 결과를 나타내었다(Fig. 6(b)).

따라서 긍정적인 영향을 보인 0.01% 농도에서 5 L 발효조 배양을 수행하였으며, 결과는 Fig. 7에 나타내었다. 5 L 발효조 배양에 있어서는 플라스크 실험과 마찬가지로 세포증식에는 큰 영향을 보이지 않았다. 그러나 단백질 생산에 있어서는 앞의 플라스크 실험 결과와 달리 메탄올 유도 초기에는 대조구와 차이를 보이지 않다가 유도 후반부로 가면서 대조구에 비해 단백질 발현이 낮아지는 결과를 보였다. 위의 두 실험의 결과를 정리한다면 같은 농도의 oleic acid이라고 할지라도 발효조 배양에서는 효과가 떨어지는 것으로 판단된다. 따라서 발효조 배양에 적합한 최적 농도를 다시 선별해야할 것으로 생각된다.

Oleic acid는 지방산의 한 종류로 산화와 환원에도 관련이 있다. 목적단백질 발현에 알콜 산화효소 프로모터를 이용하기 때문에 프로모터의 upstream 부위의 반응에 의해 단백질 발현이 향상되었거나, 지방산의 산화환원 반응에 의해 프로모터에 영향을 준 것으로도 추측할 수 있다.

Trace salts 첨가 영향

P. pastoris 배양을 위한 배지에는 소량의 trace salts들이 첨가된다. 그러나 외래 단백질 생산에 긍정적인 영향을 미치는 농도 최적화가 이루어져 있지 못하다. Fe, Zn, Cu, I, Mg, Co, Se, Mo, Ni 등은 필수 trace 성분들이다. 이들은 소량이지만 그 역할이 중요하며, 세포의 많은 물질대사 반응에 중요한 부분을 차지한다.

본 실험에서는 AOX 프로모터에 의한 메탄올 대사경로에 trace salts의 영향이 있을 것으로 판단하고, 따라서 단백

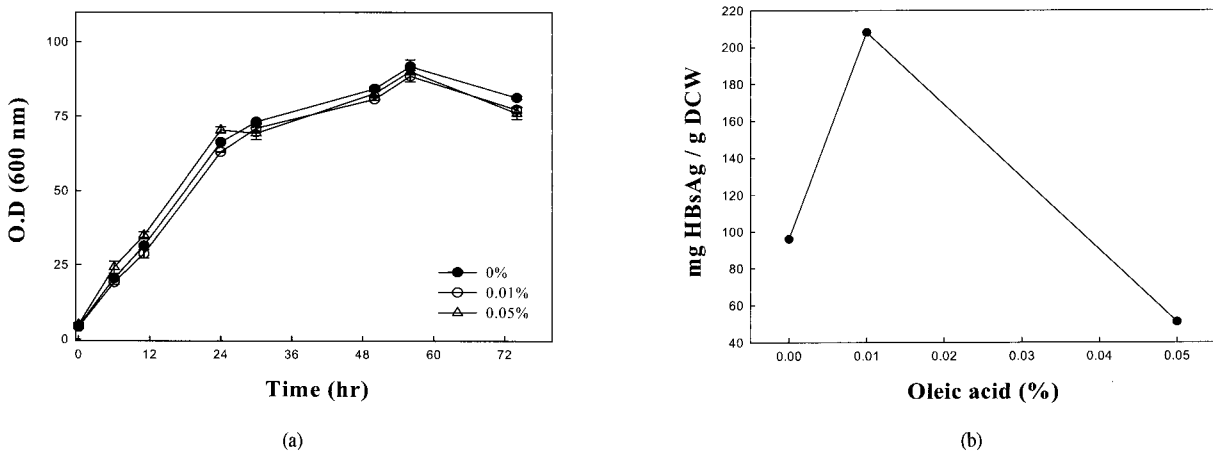


Figure 6. Effect of oleic acid concentration on (a) cell growth and (b) HBsAg production.

질 발현 향상에 긍정적인 효과가 있을 것으로 사료되어 메탄올 유도시에 농도별로 trace salts들을 첨가한 실험을 수행하였다. 초기 배지는 동일한 조건으로 배양을 하였고, 메탄올 유도시에 trace salts를 1.2, 2.4, 4.8, 9.6% (v/v)로 각각 첨가하였다. Trace salts의 조성은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Composition of trace salts

Component	Composition
Cupric sulfate • 5H ₂ O	6.0 g/L
Sodium iodide	0.08 g/L
Boric Acid	0.02 g/L
Cobalt chloride	0.5 g/L
Zinc chloride	20.0 g/L
Ferrous sulfate • 7H ₂ O	65.0 g/L
Sulfuric acid	5 mL/L
Manganese sulfate • H ₂ O	3.0 g/L
Sodium molybdate • 2H ₂ O	0.2 g/L

실험에 첨가한 각 trace salts 농도들에서는 메탄올 유도 이후에도 세포증식에 영향은 없었다(Fig. 8(a)). 하지만 단백질 발현에 있어서는 대조구의 경우 최대 발현율은 148 mg HBsAg/g DCW 이었고, trace salts첨가한 경우는 1.2%를 제외하고는 대조구보다 발현율이 낮은 경향을 보였다(Fig. 8(b)). 1.2% trace salts 첨가는 최대 발현율이 280

mg HBsAg/g DCW로 대조구에 비해 1.9배 증가한 결과이다.

위의 실험 결과로 볼 때 메탄올 유도시에 trace salts첨가는 앞에서 언급한 바와 같이 AOX에 의한 메탄올의 대사 반응에 관여하는 것으로 판단되며, 과량의 trace salts는 세포증식에는 영향이 없지만 단백질 발현 측면에서는 유해한 것으로 나타났다. 따라서 본 실험의 결과로 메탄올 유도시에 적당량의 trace salts의 공급은 단백질 발현 향상에 긍정적인 효과가 있는 것으로 사료된다.

요약

본 연구에서는 *P. pastoris*를 이용한 유전자 재조합 HBsAg 생산에서 메탄올 유도시 여러 가지 첨가물들의 영향에 대해서 알아보았다.

회분식 배양에서 탄소원으로 글리세롤을 사용하다가 유가식 배양의 공급 탄소원으로 글리세롤이 아닌 당알콜인 sorbitol로 대체하였을 때 단백질 발현이 향상된 결과를 보였다. 또한 메탄올 유도시에 적당량의 아미노산 혼합물 첨가는 세포증식에는 영향이 없었지만 단백질 발현율은 크게 증가시켰다. 계면활성제인 Triton X-100의 첨가는 세포증식과 단백질 발현을 현저히 감소시켰지만, Pluronic F-68

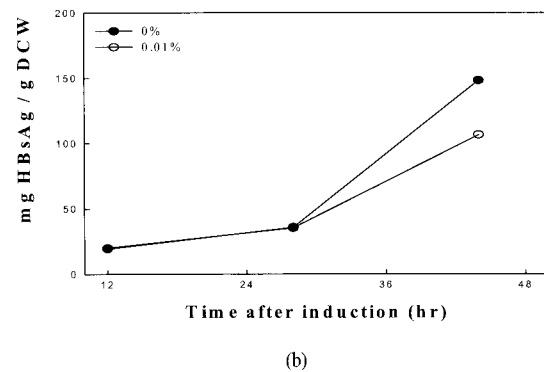
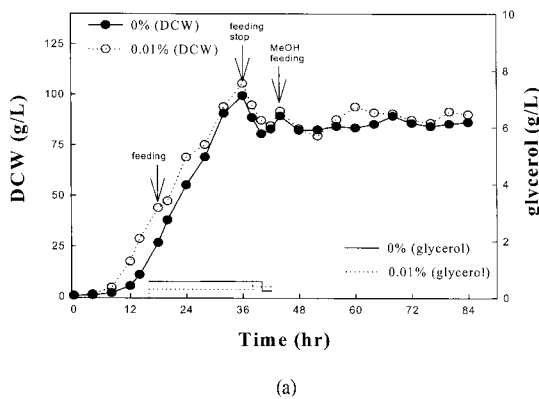


Figure 7. Effect of oleic acid concentration on (a) cell growth and (b) HBsAg production in 5 L fermenter.

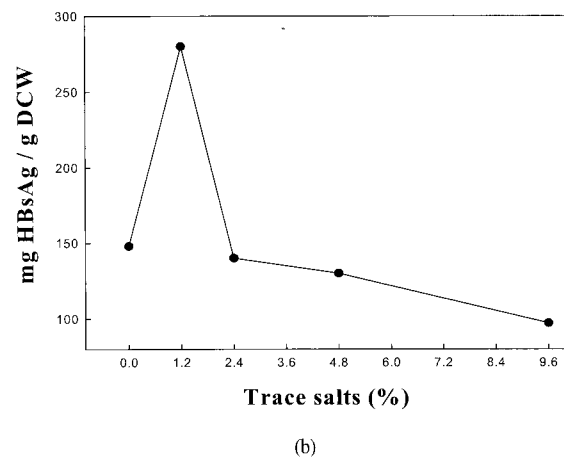
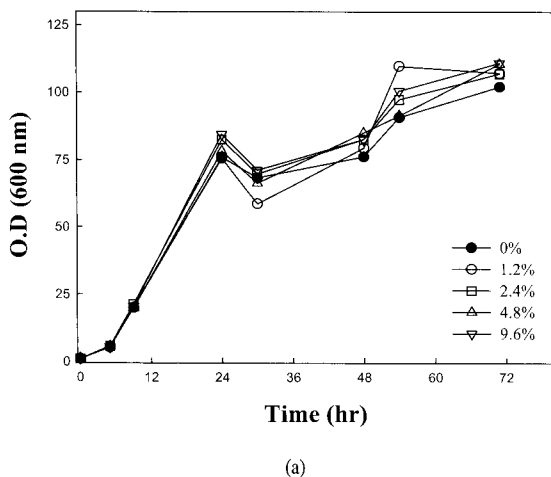


Figure 8. Effect of trace salts concentration on (a) cell growth and (b) HBsAg production.

를 첨가했을 경우 세포증식의 저해영향 없이 단백질 발현율을 향상시켰다. 배지 부피의 0.01% (v/v)으로 oleic acid를 첨가하면 플라스크 배양에서는 단백질 발현에 긍정적인 효과를 보였으나, 5 L 발효조 배양에서는 메탄올 유도 시간이 지속되면서 첨가하지 않은 경우에 비해 발현율이 낮아지는 결과를 보였다. 마지막으로 trace salts는 첨가량에 따라 세포증식에는 영향이 없으며 단백질 발현에는 소량 trace salts 첨가로 단백질 발현에 긍정적인 효과를 보였다. 하지만 첨가량이 많아질수록 단백질 발현에는 부정적인 영향을 보임을 확인할 수 있었다.

감 사

이 논문은 한국과학재단 지정 인하대학교 초정밀생물분리기술연구센터 (ERC)의 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Diminsky D., N. Moav, M. Gorecki, and Y. Barenholz (2000), Physical, chemical and immunological stability of CHO-derived hepatitis B surface antigen (HBsAg) particles, *Vaccine* **18**, 3-17.
- Yamaguchi, M., K. Sugahara, K. Shiosake, H. Mizokami, and K. Takeo (1998), Fine structure of hepatitis B virus surface antigen produced by recombinant yeast: comparison with HBsAg of human origin, *FEMS Microbiol. Lett.* **165**, 363-397.
- Richard G. B. and A. G. G. Martin (1991), Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins, *BioTechnology* **9**, 1067-1072.
- Higgins D. R. and J. M. Cregg (1998), *Pichia protocols*, Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Joan L. C. and M. C. James (2000), Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 45-66.
- Chen Y., J. Cino, G. Hart, D. Freedman, C. White, and E. A. Komives (1997), High protein expression in fermentation of recombinant *Pichia pastoris* by a fed-batch process", *Process Biochem.* **32**, 107-177.
- Emman D. T., C. d'Anjou Marc, and J. D. Andrew (1999), Sorbitol as a non-repressing carbone source for fed-batch fermentation of recombinant *Pichia pastoris*, *Biotechnol. Lett.* **21**, 669-672.
- Helene B., C. Laborde, P. Chemardin, F. Richard, and V. Christine (2001), High-level secretory production of recombinant porcine follicle-stimulating hormone by *Pichia pastoris*, *Process Biochem.* **36**, 907-913.
- Lee S. Y., Y. K. Lee, and H. N. Chang (1995), Stimulatory effects of amino acids and oleic acid on poly(3-hydroxybutyric acid) synthesis by recombinant *Escherichia coli*, *J. Ferment. Bioeng.* **2**, 177-180.
- Laouar L., K. C. Lowe, and B. J. Mulligan (1996), Yeast responses to non-ionic surfactants, *Enzyme Microb. Technol.* **18**, 433-438.
- Bassetti, L., M. Hagendoorn, and J. Tramper (1995), Surfactant-induced non-lethal release of anthraquinones from suspension cultures of *Morinda citrifolia*, *J. Biotechnol.* **39**, 149-155.
- Murhammer, D. W. and C. F. Goochee (1998), Scaleup of insect cell cultures: Protective effects of Pluronic F-68, *BioTechnology* **6**, 1411-1418.
- Reddy R. M., P. G. Reddy, and G. Scenayya (1999), Enhanced production of thermostable α -amylase and pullulanase in the presence of surfactant by *Clostridium thermosulfurogenes* SV, *Process Biochem.* **34**, 87-92.
- Kobayashi K., S. Kuwae, T. Ohya, T. Ohda, M. Ohyama, and K. Tomomitsu (2000), Addition of oleic acid increases expression of recombinant human serum albumin by the AOX2 promoter in *Pichia pastoris*, *J. Biosci. Bioeng.* **89**, 479-484.