

유가식과 세포재순환 연속공정을 이용한 항혈전제 hirudin의 생산

최치민·김명동·¹이상기·[†]서진호

서울대학교 식품공학과 및 농업생물신소재 연구센터, ¹한국과학기술연구원 생명공학연구소
(접수 : 1998. 4. 2., 게재승인 : 1998. 5. 25.)

Production of an Anticoagulant Hirudin by Fed-batch and Continuous Cell Recycle Fermentations Using Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*

Chi-Min Choi, Myoung-Dong Kim, Sang-Ki Rhee¹, and Jin-Ho Seo[†]

Department of Food Science & Technology and Research Center for New Bio-Materials in Agriculture,
Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

¹Korea Institute of Bioscience & Biotechnology, KIST, Taejeon 305-600, Korea

(Received : 1998. 4. 2., Accepted : 1998. 5. 25.)

Fed-batch fermentations were carried out in order to improve the efficiency of hirudin production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. A fed-batch fermentation done with the optimized semi-synthetic medium resulted in a maximum hirudin concentration of 342mg/l by keeping a galactose concentrations between 10 and 30g/l which corresponded to a 11.4-fold increase in hirudin concentration compared with the simple batch fermentation done with the same medium. Comparison of the chromatographic pattern of proteins in the growth medium clearly showed that the use of the semi-synthetic medium is more advantageous for separation of hirudin than the case of using the complex medium. Continuous cell recycle fermentations using hollow fiber catridges were also undertaken to enhance the productivity of hirudin. The continuous cell recycle fermentation done at dilution rate of 0.1h⁻¹ and an inlet galactose concentration of 100g/l yielded a maximum hirudin productivity of 19.1mg hirudin/l · h.

Key Words : Hirudin, recombinant *S. cerevisiae*, fed-batch, continuous cell recycle

서론

1955년 Markwardt(1) 등에 의하여 흡혈거머리인 *Hirudo medicinalis*로부터 분리된 hirudin은 thrombin specific inhibitor로 작용하여 thrombin이 fibrinogen을 fibrin으로 전환시키는 것을 막는다(2). Hirudin의 이러한 특이적 저해는 매우 강력하여 혈전증 치료 및 예방을 위한 의약 단백질로서 그 가능성을 인정받고 있다. Hirudin의 생산을 위한 연구들이 여러 방면에서 다양하게 이루어지고 있으며 최근 들어 그 연구결과의 보고가 급증하고 있다(3-5).

Mendoza-Vega(6) 등은 단순 연속배양 결과를 바탕으로 재조합 *Saccharomyces cerevisiae*를 유가식배양하여 최대 균체농도 60g/l, 최대 hirudin 농도 500mg/l를 얻었다. Ibb(7) 등은

에탄올 농도를 0.2g/l 이하로 유지하면서 포도당을 주입하는 repeated fed-batch fermentation을 합성, 복합배지에서 수행하여 장시간에 걸친 배양에도 hirudin이 안정하게 발현되도록 하여 0.88g/l의 hirudin을 생산하였다. Mendoza-Vega와 Ibb 등이 탄소원으로 포도당을 사용하는데 비하여 Lee(8) 등은 galactose에 의하여 발현이 조절되고 MF at prepro leader sequence에 의하여 배지로 hirudin이 분비되도록 구성한 재조합 *S. cerevisiae*를 이용하여 hirudin의 생산을 시도하였다. Galactose를 간헐적으로 주입하는 유가식 배양을 통하여 최대 균체농도 110g/l, 최대 hirudin 농도 260mg/l를 얻었다.

Park(9)은 복합배지를 사용하여 고농도 유가식 배양을 실시한 결과 최대 hirudin농도 460mg/l를 얻을 수 있었다. 그러나 질소원으로 사용되는 배지성분에 의하여 최종적으로 생산되는 단백질에 착색이 일어나거나 배지성분 유래의 이종단백질을 분리해야 하기 때문에 분리·정제 공정의 효율이 감소하는 단점이 있다. Mendoza-Vega(10) 등은 casein peptone를 사용한 배지에서 재조합 hirudin(rHV2-Lys⁴⁷)의 생산성이 casamino acid를 사용한 배지보다 25% 향상되었으나 HPLC로 배지중의 단백질 분포도를 살펴 본 결과 오히려 casamino acid를 사용한 경우보다 이종 단백질의 비율이 상당히 높음을 확인하였다

본 연구에서는 분리·정제 공정이 용이해짐으로써 경제성을

[†] Corresponding Author : Department of Food Science & Technology and Research Center for New Bio-Materials in Agriculture, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

Tel : 82-331-290-2583, Fax : 82-331-293-4789

e-mail : jhseo94@plaza.snu.ac.kr

URL : http://drseo.snu.ac.kr

확보할 수 있는 준합성배지를 이용한 유가식 공정을 개발하고 hirudin의 발현에 영향을 미치는 환경요인들을 살펴보았다. 또한 유가식배양보다 고농도의 세포농도에서 생산성을 보다 향상시킬 수 있는 세포재순환 연속공정에 대한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

균주 및 plasmid

Hirudin의 발현을 위한 숙주세포로서 *Saccharomyces cerevisiae* 2805(Mat a pep4:HIS3 prb1-δ can1 GAL2 his3δ ura3-52)를 사용하였다. Plasmid는 pBR322의 일부와 효모의 URA3 (Orotidone-5'-phosphate decarboxylase)유전자 및 2 μ m 유전자를 갖는 shuttle vector인 YEp352를 기초로 하여 제조한 YEG-HIR525를 사용하였다. 이 plasmid는 GAL10 promoter, mating factor α signal sequence(pre-pro leader sequence, MF α), HV2 hirudin gene, GAL7 terminator로 구성되어 있으며 selective marker gene으로 URA3 gene을 가지고 있다(11).

배양방법

전배양은 yeast nitrogen base w/o amino acids(Difco, USA) 6.67g/l, casamino acid(Difco, USA) 5g/l, 포도당(Showa, Japan; Sigma, USA) 20g/l가 포함된 준선택배지를 사용하여 진탕배양기(Vison, 한국)에서 200rpm, 30°C의 조건으로 배양한 후 발효기 접종에 사용하였다. 회분식 배양에는 3l의 준합성배지(12)에 포도당 5g/l와 galactose 20g/l를 첨가한 후 전배양액을 7%로 접종하였고, 유가식 배양에서는 준합성배지에 포도당 20g/l, galactose 30 g/l로 당을 첨가하고 9%의 전배양액을 접종하여 회분식배양을 실시하다가 galactose가 고갈될 시점부터 500g/l의 galactose 용액만을 간헐적으로 주입하였다. 세포재순환 연속배양에서는 주입하는 galactose의 농도를 50 또는 100g/l로 하였고 회전속도는 0.1h⁻¹로 고정하였다. 준합성배지에 전배양액을 접종하고 회분식 배양을 실시하다가 대수증식기 말기에 세포재순환 연속배양 또는 단순 연속배양으로 전환하였다. 세포재순환 연속배양에 사용한 실관막여과기의 여과막(Amicon, USA)은 분자량 cut off 100,000, 내경은 1.1mm였다. 여과막은 조업 중에 back flushing을 실시하여 membrane fouling에 의한 여과속도의 저하를 방지하였다. 발효기의 온도와 pH는 각각 30°C, 5.5로 조절하였다.

분석방법

균체농도는 배양액을 적당한 배율로 희석하여 spectrophotometer(U-1100, Hitachi, Japan)로 600nm에서 optical density를 측정하고 균체농도와외 관계식을 이용하여 계산하였다.

배양액 중의 포도당 농도는 배양액을 8,000g에서 원심분리하여 얻은 상등액을 취하여 5g/l 이하가 되도록 희석한 후 glucose kit(영동제약, 한국)을 사용하여 측정하였다. Galactose의 농도는 DNS(13)를 사용하여 측정된 총 환원당의 농도로부터 glucose kit으로 측정된 포도당의 농도를 감하여 결정하였다. Galactose의 농도가 5g/l 이하로 희석된 시료 0.1ml에 DNS용액 1ml을 넣고 100°C에서 5분간 반응시킨 후 찬물로 급속히 냉각하여 반응을 정지시킨 다음 570nm에서 흡광도를 측정하고 표준곡선과 비교하여 galactose의 농도를 계산하였다. 에탄올의 농

도는 gas chromatograph(Philips, UK)를 이용하여 측정하였다. Column은 2Hwp/10PEG20M을 사용하였고 온도는 150°C이었다. Carrier gas로 사용한 질소의 유속은 50ml/min이었다. Flame ionization detector를 사용하였으며 수소는 2.0kg/cm², 공기는 1kg/cm²의 압력으로 흘러주었고 injector와 detector의 온도는 모두 200°C였다.

한외여과를 위하여 발효액을 원심분리하여 상등액을 얻은 다음, 분자량 cut off가 3,000인 membrane(Amicon, USA)을 장착한 stirred cell에 넣고 50 psi의 질소를 주입하여 분자량에 따른 시료의 탈염, 분리 및 농축을 실시하였다. 한외여과를 통하여 농축한 시료의 hirudin의 순도를 알아보기 위하여 HPLC분석을 하였다. Aquapore RP 300 7 μ m reversed phase HPLC column(Pierce, USA)을 HPLC(Beckman, USA)에 장착하고 15 μ l의 시료를 주입하였다. 이동상으로 각각 0%와 70%의 acetonitrile을 포함하는 0.1% trifluoroacetic acid/water를 이용하여 15-30%의 acetonitrile gradient를 흘러줌으로써 시료를 분석하였다.

Hirudin의 양은 hirudin standard(Sigma, USA)와 약 0.4ATU/ml정도의 농도가 되도록 희석한 시료 50 μ l에 0.6unit/ml의 thrombin(Sigma, USA) 50 μ l를 microplate(Corning, USA)의 well에 각각 넣고 기질로서 200 μ M의 Chromozyme TH(Boehringer Mannheim, Germany) 100 μ l를 넣은 다음 microplate reader(Bio-Tek, USA)로 405nm에서 30초 간격으로 흡광도를 측정하고 흡광도의 증가율을 구한 뒤 표준곡선과 비교하여 농도를 결정하였다(11).

결과 및 고찰

5g/l의 포도당과 20g/l의 galactose가 포함된 준합성배지를 이용하여 제조한 효모를 배양하였을 때 포도당의 고갈 후 galactose가 소모되고 동시에 galactose에 의하여 hirudin의 발현이 유도되었다(Figure 1). 균체는 초기에 주입한 당에 대하여 약 0.4(g/g)의 수율로 증식되어 13.1g/l였고 에탄올은 최대 9g/l까지 생성되었다. 생성된 에탄올은 초기에 주입한 당이 모두 소비된 후 균체에 의하여 이용되었다. Hirudin 농도는 30.1mg/l로서 약 3.3mg/g cell의 specific hirudin activity(SHA)값을 나타내었다.

회분식 배양에 사용한 배지물 이용하여 고농도 배양을 위한 유가식 배양을 실시하였다. 본 연구에 사용된 hirudin 생산 시스템은 galactose에 의하여 hirudin의 발현이 유도되므로 배양 중 일정한 수준 이상의 galactose 농도가 유지되어야 한다 또한 galactose는 균체에 의하여 소모되므로 지속적인 공급이 이루어져야 한다. Galactose inducible promoter의 전사가 효율적으로 이뤄지려면 galactose 수준이 8g/l 이상 유지되어야 한다는 보고(13)와 Lee(8)가 결정한 galactose 수준 30g/l를 본 연구에 적용하기로 하고 배지중의 galactose의 농도가 약 10-30g/l가 되도록 간헐적으로 배지를 주입한 결과, hirudin의 발현은 균체의 성장과 밀접한 관련성을 보여주었으며 세포의 농도가 약 30g/l 이후부터는 SHA가 거의 일정하게 유지되었다. 최대균체 농도 94.8g/l, 최대 hirudin 농도 342mg/l, 평균 SHA 3.56mg hirudin/g cell의 값을 얻었다(Figure 2).

Lee와 Park(8,9)은 배양도중 생성되는 에탄올의 농도가

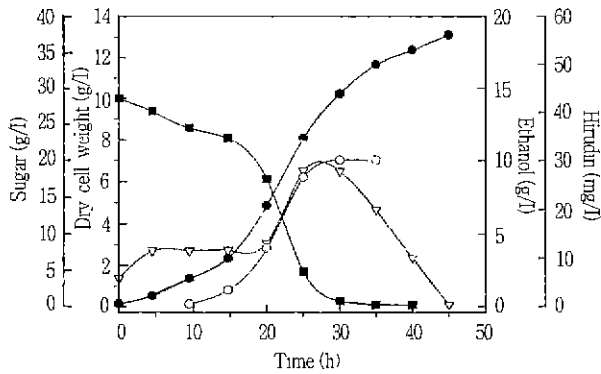


Figure 1. Profiles of batch fermentation of recombinant *S. cerevisiae* in the semi-synthetic medium at 30°C and pH 5.5 (●: Dry cell weight, ■: Sugar, ▽: Ethanol, ○: Hirudin).

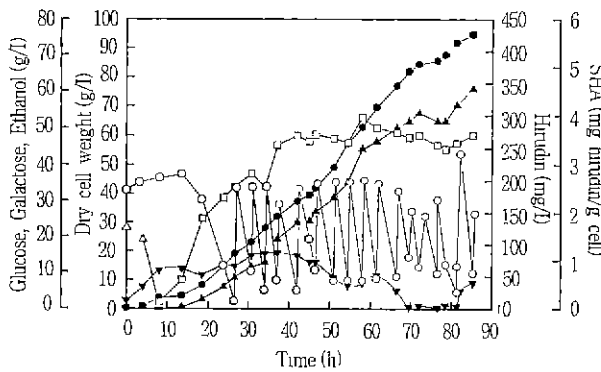


Figure 2. Fed-batch fermentation of recombinant *S. cerevisiae* at 30°C and pH 5.5 Galactose was to fed to maintain between 10 and 30g/l (●: Dry cell weight, ▲: Hirudin, ▼: Ethanol, ○: Galactose, △: Glucose, □: Specific hirudin activity, ▲: Hirudin).

10-12g/l를 넘게 되면 hirudin의 발현율이 감소된다고 하였다. Galactose의 농도를 조절한 유가식 배양의 경우 에탄올의 농도가 12g/l를 넘는 구간이 대부분을 차지하였기 때문에 에탄올의 농도를 5g/l이하로 조절하여 hirudin의 발현을 증가시키는 유가식 배양을 실시하였다. 유가식 배양 도중 에탄올의 농도가 5g/l이상이면 galactose의 농도가 낮더라도 에탄올의 농도가 감소할 때까지 주입을 지연시키는 방법을 사용하였다. 그 결과 최대 균체농도 99.4 g/l, 최대 hirudin 농도 233mg/l를 얻을 수 있었으며 평균 SHA는 약 2.53mg hirudin/g cell로서 galactose의 농도를 조절한 유가식 배양보다 다소 낮은 값을 얻었다 (Figure 3). 이는 에탄올의 농도가 일정수준 이하로 떨어질 때까지 배지의 주입을 지연시키는 동안 에탄올의 농도를 조절하지 않고 galactose의 농도를 유지시킨 유가식 배양보다 galactose 수준이 낮게 유지되는 시간이 더 길어졌고 이에 영향을 받아 hirudin의 발현이 저하되었기 때문이라고 생각되었다.

복합배지를 사용하여 hirudin를 생산하는 경우는 배지 밖으로 분리되는 hirudin과 배지 자체가 가지는 단백질 성분이 섞이므로써 분리·정제공정이 불리해질 것으로 예측되어 복합배지와 준합성배지에서의 hirudin의 상대적인 순도를 비교하였다. 최적화된 복합배지(9)와 준합성배지를 사용하여 유가식 배양을 실시하고 배양액을 얻은 다음 한외여과로 농축하고 HPLC를 이용하

여 단백질의 분포양상을 알아보았다. 복합배지와 준합성배지에서 생산되는 hirudin의 chromatogram을 비교한 결과, 복합배지를 사용하였을 때와 준합성배지를 사용하였을 때 hirudin의 전체 단백질에 대한 상대적인 순도는 각각 8.6%, 21%로서 준합성배지에서 발현되는 hirudin의 순도가 훨씬 높은 것을 알 수 있었다(Figure 4).

회분식 배양이나 유가식 배양은 hirudin을 연속적으로 생산할 수 있는 공정은 아니며 단순연속배양 공정은 연속적으로 hirudin을 생산할 수 있으나 생산되는 hirudin의 농도가 낮다. 그러므로 세포를 고농도로 유지하면서 hirudin을 연속적으로 생산할 수 있는 공정을 개발하기 위하여 실관막 여과기(hollow

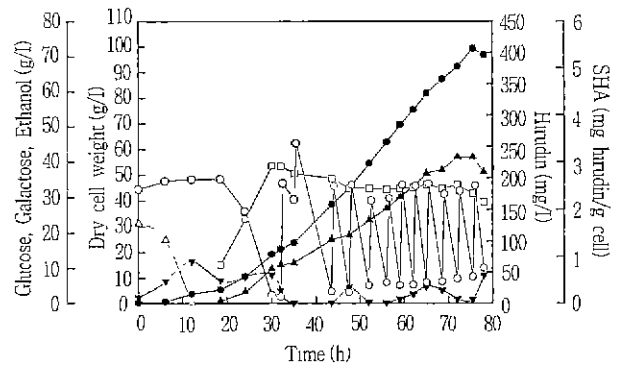


Figure 3 Trajectories of fed-batch fermentation for recombinant *S. cerevisiae* at 30°C and pH 5.5. Glactose was intermittently fed to keep ethanol concentration below 5g/l (●: Dry cell weight, ▲: Hirudin, ▼: Ethanol, ○: Galactose, △: Glucose, □: Specific hirudin activity).

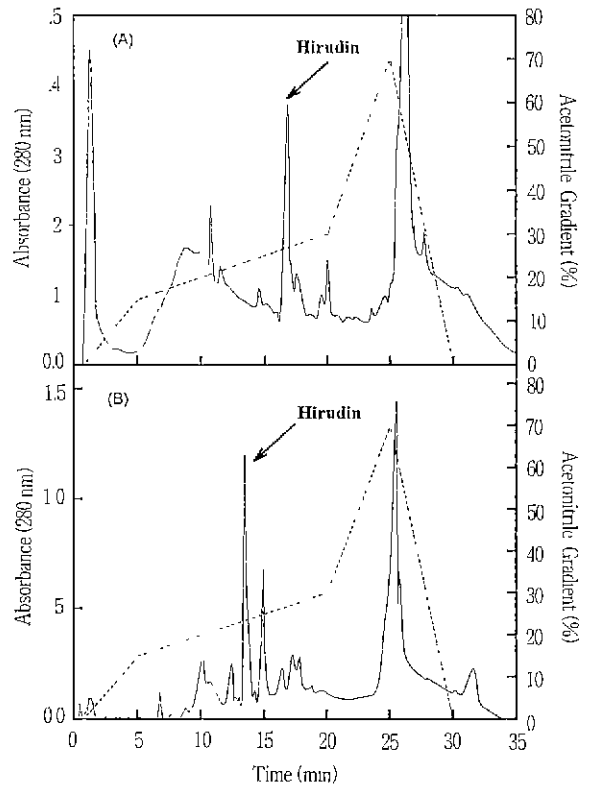


Figure 4. HPLC chromatogram of fermentation broth from the complex medium(A) and the semi-synthetic medium(B).

fiber membrane cartridge)을 사용하여 배출되는 세포를 회수하여 다시 사용하는 세포재순환 연속배양을 실시하였다. 세포재순환 연속배양은 실관막여과기를 통하여 균체와 hirudin이 분리되므로 원심분리과정 없이 분리 및 정제공정을 수행할 수 있는 장점이 있다. Galactose가 대부분 소비된 대수증식기 말기부터 50g/l의 galactose를 포함한 배지를 공급하면서 세포를 완전히 재순환 시켰다. 발효종료 시기의 최종 균체농도는 131g/l였으며 galactose의 농도는 2g/l 정도였다. Galactose의 농도가 낮게 유지됨에 따라 생산되는 에탄올의 양은 0.5g/l로서 매우 낮은 수준이었다. Hirudin은 약 79mg/l정도 생산되었으나 균체농도가 약 120g/l 이상인 시기부터 농도가 감소하기 시작하였는데 이는 배지중의 galactose의 농도가 충분하지 못하고 동시에 고농도의 균체로 인한 세포 자체의 viability에 문제가 발생한 것으로 생각된다. Hirudin 농도의 감소시기가 균체의 성장속도 감소시기와 일치하고 동시에 galactose의 농도가 증가하는 것으로 보아 균체의 viability가 galactose의 소비와 이에 따른 hirudin의 발현에 큰 영향을 미치는 것으로 판단하였다(Figure 5).

위의 실험에서 galactose의 농도가 낮게 유지되었기 때문에 주입하는 galactose의 농도를 100g/l로 증가시켜 실험을 수행하였다. 회색속도를 0.1h⁻¹로 하여 세포를 완전재순환 시켰을 때 최종 균체농도는 141g/l였으며 최종 hirudin농도는 191mg/l였다. 배지 중의 galactose의 농도는 약 5g/l로 유지되었고 에탄올의 경우는 약 12g/l로 증가하였지만 galactose의 농도가 다소 높게 유지되었기 때문에 hirudin의 농도는 2배이상 증가하였다. 그러나 이 실험에서도 발효말기에 hirudin의 농도가 점차 감소하기 시작하였는데 이 역시 에탄올 및 고농도에서의 세포의 viability 문제라고 생각하였다(Figure 6).

당농도를 달리하여 실시한 세포재순환 연속배양의 결과를 통하여 발효기 내에 존재하는 galactose의 농도가 높아질수록 생산되는 hirudin의 농도가 증가하는 것을 알 수 있었고 이는 Lee(8)의 설명에 의해서도 뒷받침된다. 즉, 높아진 galactose 수준에 의하여 galactose/cell의 비율이 증가하여 hirudin의 기질에 대한 발현수율이 증가하였기 때문이다. Lee는 hirudin발현을 위한 최적의 galactose/cell의 비율이 존재한다고 예측한 바 있다.

세포재순환 연속배양에서 나타난 galactose농도에 의한 hirudin 발현효율의 차이를 확인하기 위해서 단순 연속배양을 실시하였다. 회분식배양의 대수증식기 말기에 50g/l의 galactose를 포함한 배지를 0.1h⁻¹의 회색속도로 주입하였다. 연속배양 개시 후 평균 균체체류시간의 2-3배가 경과한 후 배양기내의 균체농도가 22.3 g/l, hirudin 농도 73.4mg/l, galactose 농도 4.0g/l, 에탄올 농도 0.8g/l인 정상상태에 도달하였다. 이 결과를 같은 농도의 galactose를 주입한 세포재순환 연속배양과 비교하면 단순 연속배양이 균체농도는 낮지만 hirudin의 농도는 거의 같음을 알 수 있다. 이것은 세포재순환 연속배양에서는 발효기 내에 유지되었던 galactose 수준이 2g/l이하로 매우 낮았으므로 세포재순환 연속배양에서 galactose/cell의 비율이 단순 연속배양보다 낮았기 때문이라고 해석되었다. 결과적으로 단순연속배양에서의 galactose/cell의 비율이 세포재순환 연속배양에서보다 5배 이상 높게 유지된 데 따라 hirudin발현 수율이 크게 증가한 것이다. 유가식, 단순 연속배양 및 세포재순환 연속배양으로부터 hirudin의 생산에 가장 중요한 영향을 미치는 요소는 배지 중의 galactose 농도임을 알 수 있었으며, 이상의 실험에서 얻은 결과를 Table 1에 요약하였다.

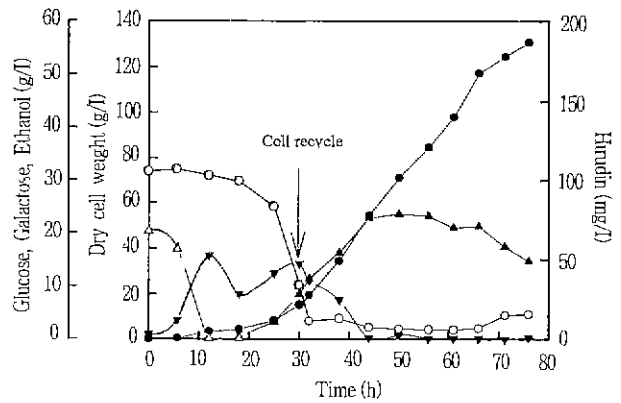


Figure 5. Continuous cell recycle fermentation of recombinant *S. cerevisiae* at 30°C and pH 5.5 Cell recycle was initiated at 30 hours of fermentation by feeding 50g/l galactose solution (●: Dry cell weight, ▲: Hirudin, ▼: Ethanol, ○: Galactose, △: Glucose, ▲: Hirudin).

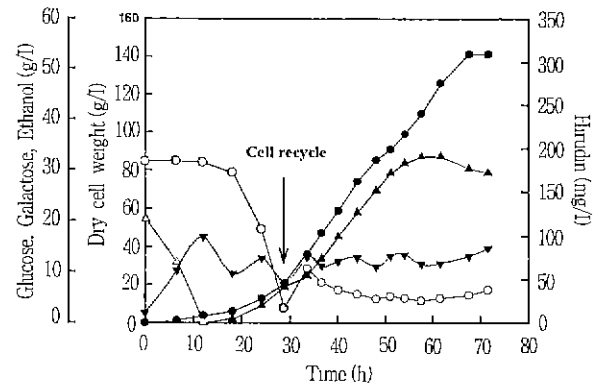


Figure 6. Continuous cell recycle fermentation of recombinant *S. cerevisiae* at 30°C and pH 5.5 Cell recycle was initiated at 30 hours of fermentation by feeding 100g/l galactose solution (●: Dry cell weight, ▲: Hirudin, ▼: Ethanol, ○: Galactose, △: Glucose, ▲: Hirudin).

Table 1. Comparison of final dry cell weight and hirudin concentration in various fermentation modes.

	Batch	Fed-batch ^{a)}	Cell recycle ^{b)}	CSTR ^{d)}
Dry cell weight (g/l)	13.1	94.8	141	22.3
Hirudin (mg/l)	30.1	342	191	73.4

a) Galactose was fed to maintain between 10 and 30g/l.

b) Cell recycle was initiated by feeding 100g/l galactose solution.

c) 50g/l galactose was fed without cell recycle.

요약

재조합 효모를 이용한 항혈전성 단백질인 hirudin을 생산하는 공정의 생산성과 분리 및 정제효율을 증가시키기 위하여 회분식, 유가식 및 연속식 배양공정을 개발하였다. 준합성배지를 이

용한 유가식 배양에서 galactose 수준을 10~30g/l로 유지하여 최대 hirudin 농도 342mg/l를 얻을 수 있었으며, 이는 단순 회분식 배양의 결과와 비교할 때 11.4배 증가한 것이다. 100g/l의 galactose를 0.1h⁻¹의 회석속도로 주입한 세포재순환 연속공정에서 19.1mg hirudin/l·h의 hirudin 생산성을 얻을 수 있었다. 복합배지와 준합성배지에서 생산된 hirudin의 HPLC chromatogram을 분석한 결과 준합성배지에서 생산된 hirudin의 상대적인 순도가 복합배지를 사용한 경우보다 2배이상 높게 나타났다. 따라서 준합성배지를 사용하는 것이 hirudin의 분리와 정제공정의 효율을 증가시킬 수 있을 것으로 판단되었다. 유가식, 세포재순환 및 단순 연속식 배양을 통하여 galactose/cell의 수준이 hirudin생산성에 크게 영향을 미치는 것으로 파악되었다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 지정 농업생물신소재 연구센터와 과학기술처 선도기술사업의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사의 말씀을 드립니다.

참 고 문 헌

1. Markwardt, F (1970), Hirudin As an Inhibitor of Thrombin, pp. 925-929. In Perlmann, C.E. and L. Lorands(eds.), *Methods in Enzymology*, Vol. 19, Academic Press, New York.
2. Stone, S. R. and J. Hofsteenge (1986), Kinetics of the Inhibition of Thrombin by Hirudin. *Biochemistry*, 25, 4622-4628.
3. Chung, B. H., J. H. Sohn, S. K. Rhee, Y. K. Chang, and Y. H. Park (1994), Enhanced Metal-affinity Partitioning of Genetically Engineered Hirudin Variants in Polyethylene glycol/dextran Two-Phase Systems, *J. Ferment. Bioeng.* 77, 75-80.
4. Schlaeppi, J.M. and D. G. Braun (1993), Monoclonal Antibodies Specific for Hirudin, US Patent 5272059.
5. Winant, R. C., J. B. Lazar, and P. H. Johnson (1991), Chemical Modifications and Amino Acid Substitutions in Recombinant Hirudin that Increase Hirudin-Thrombin Affinity, *Biochemistry Wash.* 30, 1271-1279.
6. Mendoza-Vega, O., C. Herbert, and S. W. Brown (1994), Production of Recombinant Hirudin by High Cell Density Fed-batch Cultivation of a *Saccharomyces cerevisiae* Strain: Physiological Considerations During the Bioprocess Design, *J. Biotechnol.* 32, 249-256.
7. Ibba, M., D. Bonarius, J. Kuhla, A. Smith, and M. Kuenzi (1993), Mode of Cultivation Is Critical for the Optimal Expression of Recombinant Hirudin by *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotech. Lett.* 15, 667-671.
8. Lee, D. H., J. B. Park, J. H. Seo, E. S. Choi, and S. K. Rhee (1994), Expression of Hirudin in Fed-batch Cultures of Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotech. Lett.* 16, 667-671.
9. Park, J. B., Y. E. Kweon, S.K. Rhee, and J. H. Seo (1995), Production of Hirudin by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* in a Membrane-recycle Fermentor, *Biotech. Lett.* 17, 1031-1034.
10. Mendoza-Vega, O., J. Sabatie, and S. W. Brown (1994), Industrial Production of Heterologous Proteins by Fed-batch Cultures of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiol. Rev.* 15, 369-375.
11. Sohn, J. H., Lee, S. K., Choi, E. S., and S. K. Rhee (1991), Gene Expression and Secretion of the Anticoagulant Hirudin in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 1, 266-271.
12. Choi, C. M., Kim, M. D. Choi, E. S., Rhee, S. K., and Seo, J. H. (1996), Production of Hirudin in a Continuous Cell Recycle Fermentor Using Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, Proc. 10th International Biotechnology Symposium, Sydney, Australia, pp119.
13. Chaplin, M. F. (1986), *Carbohydrates analysis: a practical approach*, pp. 3-10. IRL Press, Oxford, Washington D.C.
14. Hong, E. K. (1993), Plasmid Propagation and Heterologous Gene Expression in Recombinant Yeast. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 8, 133-137.