재조합 효모 세포의 고농도배양을 통한 섬유소와 자일란 분해효소 유전자의 동시 과발현

김연희¹, 허선연², 김군도³, 남수완^{1*}

¹동의대학교 공과대학 바이오응용공학부 의생명공학전공

²한국생명공학연구원 전북분원 미생물기능연구센터

³부경대학교 미생물학과

Received: October 16, 2018 / Revised: November 10, 2018 / Accepted: November 12, 2018

Simultaneous Overexpression of Genes Encoding Cellulose- and Xylan-Degrading Enzymes through High Density Culture of a Recombinant Yeast Cell

Yeon-Hee Kim¹, Sun-Yeon Heo², Gun-Do Kim³, and Soo-Wan Nam^{1*}

¹Biomedical Engineering and Biotechnology Major, Division of Applied Bioengineering, College of Engineering, Dong-Eui University, Busan 47340, Republic of Korea

²Microbial Biotechnology Research Center, Jeonbuk Branch Institute, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Jeongeup 56212, Republic of Korea

³Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Pukyong National University, Busan 48513, Republic of Korea

For the coexpression of endoxylanase and endoglucanase genes in yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the genes were separately inserted downstream of the yeast *ADHI* promoters, resulting the plasmid pAGX3 (9.83 kb). In the batch culture on YPD medium of the yeast transformant, *S. cerevisiae* SEY2102/pAGX3, the total activities of the enzymes reached about 7.91 units/ml for endoxylanase and 0.43 units/ml for endoglucanase. In the fed-batch culture with intermittent feeding of yeast extract and glucose, the total activities of 24.9 units/ml for endoxylanase and 0.84 units/ml for endoglucanase were produced which were about 3.1-fold and 2.0-fold increased levels, respectively, compared to those of the batch culture. Most of endoxylanase and endoglucanase activities were found in the extracellular media. This recombinant yeast could be useful for the development of simultaneous saccharification bioprocess of the cellulose and xylan mixture.

Keywords: Coexpression, endoxylanase, endoglucanase, fed-batch, *Saccharomyces cerevisiae*

자연계에서 cellulase와 xylanase의 기본 기능은 식물 세포 벽의 주요 구성물질인 cellulose와 xylan의 β -1,4-glycosidic linkage를 절단하여 구성 당으로 분해함으로써 생물이 에너지를 얻고 탄소원으로 이용할 수 있도록 하는 것이다[1, 2]. 따라서 cellulase와 xylanase는 광합성에 의해 고정된 carbon의 recycling에 주요한 역할을 수행한다. 자연계에 존재하는 fixed carbon의 최대 저장고인 식물 세포벽은 cellulose (불용성 β -1,4-glucan fiber), hemicellulose (glucan, mannan,

xylan을 포함하는 noncellulosic polysaccharides), lignin (a complex polyphenolic structure)과 같은 3가지의 주요한 중합체로 구성되어 있다[3]. 구성성분 중에서 cellulose가 가장 많이 존재하고 그 다음으로 xylan이 주성분인 hemicellulose가 존재하며, 이들 두 성분이 전체 plant biomass의 50% 이상을 차지한다. 이러한 식물의 fixed carbon을 효율적으로 이용하기 위해서 효소 cellulase와 xylanase는 다양한 용도로 개발되었고, 현재 섬유산업과 제지산업을 비롯한 여러 분야에서 상업화되고 있으며 또한 그 수요가 계속적으로 증가할 것으로 예측되므로 유용 효소자원을 확보하기 위한 기술개발이 활발해지고 있다[4–6].

*Saccharomyces cerevisiae*는 유전학적, 분자생물학적, 생

*Corresponding author

Tel: +82-51-890-2276, Fax: +82-505-182-6897

E-mail: swnam@deu.ac.kr

© 2018, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

리학적 연구가 대장균 못지 않게 많이 진행되어진 효모이다. 인체에 비병원성이며 무해한 GRAS (generally recognized as safe) 미생물이어서 식품 및 의약품 생산에 안전한 숙주 세포로 입증되었으며[7], 산업적으로 유용한 다양한 재조합 효소의 발현 및 분비에도 활용되고 있는 대표적인 숙주세포이다[8–10]. 본 연구에서는 plant biomass를 분해 및 활용 할 수 있는 기능성 효모 생균제를 개발하기 위해 *S. cerevisiae*에 endoxylanase와 endoglucanase 유전자를 동시에 발현시키고자 하였다. 균주의 성장과 함께 외래유전자를 항시적으로 발현시키기 위한 *ADH1* promoter를 이용하여 공발현 plasmid를 사용하였으며, 형질전환된 재조합 효모를 회분 및 유가배양을 통해 발현된 효소의 국제성을 조사하고 대량 생산하고자 하였다. 유가배양을 통한 외래 유전자의 과발현 및 배지로의 분비생산은 다양한 효소(*Aspergillus kawachii* polygalacturonase I, *Kluyveromyces marxianus* inulinase)와 의약품 단백질(human interleukin-1 β) 생산에서도 최근 확인된 바 있다[11–13].

본 실험에 사용한 효모 숙주 세포는 haploid인 *S. cerevisiae* SEY2102 균주(*MATa ura3-52 leu2-3 leu2-112 his4-519 suc2- Δ 9*)를 이용하였고 plasmid의 증폭을 위해서는 *E. coli* DH5 α 균주를 사용하였다.

Bacillus sp. 유래 endoxylanase 유전자(XYNA gene) [14]와 *Trichoderma* 유래의 endoglucanase 유전자(*EGL6* gene) [15]의 공발현 pAGX3 plasmid (*ADH1p-XYNA-ADH3t-ADH1p-EGL6-ADH3t*)는 *ADH1* promoter에 의해 두 유전자가 항시적으로 발현되도록 설계되었다[16]. Flask와 발효조 회분배양을 위해 YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose) 배지를 사용하였고 간헐적 유가배양에서는 YP5D 배지(1% yeast extract, 2% peptone, 5% dextrose)로 9–12시간 회분 배양 후 농축배지(10% yeast extract, 30% dextrose)를 50 ml씩 나누어 5번 공급하였다. 초기 배양액의 부피는 1.0 L, pH 5.5, DO는 30% 이상으로 유지하였다.

효모세포의 농도를 나타내는 optical density (OD)는 spectrophotometer를 사용하여 660 nm (OD₆₆₀)에서 측정하였고, 건조중량(dry cell weight, DCW)은 미리 측정된 conversion factor (0.3 DCW (g/L)/OD₆₆₀)를 적용하여 산출하였다. 효모배양액은 원심분리한 후 배양 상등액을 얻어 dinitrosalicylic acid (DNS) 방법을 사용하여 잔존 포도당 농도를 측정하였다. 균체 침전물은 zymolyase 100T와 glass beads를 사용하여 파쇄한 후 전세포 분획을 얻었고 이 분획과 배양 상등액을 사용하여 endoxylanase와 endoglucanase 활성을 측정하였다. Endoxylanase의 활성은 1% oat spelt xylan을 기질로 사용하여 pH 6.6 (0.02 M 인산 완충액), 60°C에서 분당 1 μ mol의 환원당을 생성하는 효소의 양을

Fig. 1. Active staining of endoxylanase and endoglucanase coexpression in yeast transformants and host strain (SEY2102 strain) which were grown on YPD plus xylan (A) and CMC (B) agar plate.

1 unit로 정의하였다. Endoglucanase 활성은 carboxymethyl cellulose (CMC)를 기질로 사용하였으며 pH 5.0 (0.1 M Na-acetate buffer), 50°C에서 분당 1 μ mol의 환원당을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다.

재조합된 endoxylanase와 endoglucanase를 효모세포에서 발현 생산하기 위해 먼저 pAGX3 plasmid를 *S. cerevisiae* SEY2102 균주에 형질전환하여 YNBCAD 배지(0.67% yeast nitrogen base w/o amino acid, 0.5% casamino acid, 2% dextrose)에서 형질전환체를 선별하였다. 선별된 효모 형질전환체가 endoxylanase와 endoglucanase 활성을 동시에 가지는지를 확인하기 위해 xylan과 CMC가 각각 포함된 agar plate (YPD + xylan and YPD + CMC)에서 정성분석을 실시하였다. 임의로 선택된 15개의 형질전환체에서 배지에 첨가된 xylan (Fig. 1A)과 CMC (Fig. 1B)를 효율적으로 분해한 분해환을 모두 확인할 수 있었고 숙주세포에서는 분해환을 확인할 수 없었다. 따라서 공발현에 의해 endoxylanase와 endoglucanase가 동시에 발현, 분비되었음을 알 수 있었고, 그 중 endoxylanase와 endoglucanase의 활성이 가장 큰 형질전환체(*S. cerevisiae* SEY2102/pAGX3)를 최종 선별하여 회분배양과 유가배양에 이용하였다.

선별된 고효성 형질전환체를 YPD 배지에서 50 ml flask 배양한 결과, 42시간째 endoxylanase는 6.87 unit/ml, endoglucanase는 0.37 unit/ml의 효소활성을 나타내었고, 70% 이상의 효소 활성이 배양 상등액에서 측정되었다(data not shown). 이는 재조합 효모균주에서 endoxylanase와 endoglucanase 효소를 효율적으로 세포밖으로 분비함을 의미한다. 다음으로 발효조를 이용한 회분배양을 위해 1L YPD 배지를 사용하여 *S. cerevisiae* SEY2102/pAGX3 균주를 72시간동안 배양하였다(Table 1). 그 결과, 포도당 고갈이 일어나는 12시간까지는 균체증식이 활발하며, endoxylanase와 endoglucanase 발현은 배양 48시간 이후까지도 계속됨

Table 1. Comparison of cell growth, endoxylanase and endoglucanase expression in the batch and intermittent fed-batch culture of *S. cerevisiae* SEY2102/pAGX3.

Culture types	Dry cell weight (g/l)	Endoxylanase activity (unit/ml)			Endoglucanase activity (unit/ml)		
		Extracellular	Intracellular	SE (%)*	Extracellular	Intracellular	SE (%)*
Batch	12.6	5.80	2.11	73	0.35	0.08	81
Fed-batch	25.4	18.4	6.5	74	0.67	0.17	80

*SE - Secretion efficiency (extracellular enzyme activity/total enzyme activity $\times$ 100).

을 확인 할 수 있었다(Fig. 2). 배양 12시간까지의 비증식속도(μ)는 약 0.216 h^{-1} 였고 배양 12시간 이후의 2차 증식기에서 비증식 속도는 0.029 h^{-1} 로 크게 감소하였다. 이렇게 포도당 고갈 후에 일어나는 2차 군체증식은 생성된 에탄올이 탄소원으로 이용되기 때문이며, endoxylanase와 endoglucanase 발현이 2차 증식기에도 계속되는 이유는 본 실험에 사용한 항시적 promoter의 특성인 growth-associated expression 때문으로 생각된다. 배양 60시간째 발효조 회분배양에서 발현된 endoxylanase의 총활성은 7.91 units/ml로 그 중 5.8 unit/ml은 세포외로 분비발현되어 73%의 분비효율을 보임을 확인할 수 있었고, endoglucanase의 경우에도 총활성 0.43 units/ml로 81%의 효소활성(0.35 unit/ml extracellular activity)이 세포외에서 확인되었다. 따라서 공발현에 사용된 XYNA와 EGL6 유전자의 경우, 별도의 단백질 분비서열(signal sequence)을 도입하지 않아도 자체 분비서열만으로도 효율적으로 세포밖으로 분비발현되어 생산되므로 단백질의 분리 정제에도 매우 용이할 것으로 판단된다.

회분배양 결과를 바탕으로 고농도 재조합효소의 생산을 유도하기 위해 간헐적 유가배양을 수행하였다. 간헐적 유가배

양에서는 기질용액(10% yeast extract, 30% dextrose)을 50 ml씩 5번 공급함으로써 고농도 세포배양 및 지속적인 유전자 발현을 유도하였다. 배양 9시간까지 탄소원은 활발히 소모되며 군체증식도 빠르게 일어났다. 포도당 소모 구간(0–24시간)에서의 endoxylanase와 endoglucanase 발현은 빠른 속도로 일어나지만 배양 30시간 이후의 에탄올 소모구간에서는 그 발현속도가 서서히 감소하거나 안정적으로 유지되었다(Fig. 3). 회분배양의 결과와 비교해보면 군체증식은 회분배양보다 2배 정도 증가했음을 알 수 있었고 endoxylanase와 endoglucanase효소의 총활성은 각각 24.9 units/ml와 0.84 units/ml로 약 2–3배 정도 증가했음을 알 수 있었다(Table 1). 이러한 endoxylanase와 endoglucanase 활성은, 구성적 GAP promoter를 이용하여 고농도 효모세포(OD_{600} 값이 333) 유가배양을 통해 132시간만에 1.28 units/ml의 endoglucanase 활성을 얻은 결과[17]와 유도성 inulinase promoter를 사용한 재조합 효모의 유가배양에서 24 units/ml의 endoglucanase 활성을 얻은 결과[18]들과 비교할 때, 60시간의 짧은 배양시간과 yeast extract와 포도당의 단순한 공급법으로 상당히 고효율로 발현·생산되었음을 알 수

Fig. 2. Time profiles of cell growth, glucose consumption, and endoxylanase and endoglucanase expression in the batch culture of *S. cerevisiae* SEY2102/pAGX3. Symbols: (●), cell growth; (■), Residual glucose concentration; (▲), Extracellular endoxylanase activity; (△), Intracellular endoxylanase activity; (◆), Extracellular endoglucanase activity; (◇), Intracellular endoglucanase activity.

Fig. 3. Time profiles of cell growth, glucose consumption, and endoxylanase and endoglucanase expression in the intermittent fed-batch culture of *S. cerevisiae* SEY2102/pAGX3. Arrows indicate the feeding time of yeast extract (10%) and dextrose (30%). Symbols are the same as in Fig. 2.

있다.

이상의 결과로부터 *S. cerevisiae*에서 endoxylanase와 endoglucanase를 성공적으로 공발현 시킬 수 있었으며, 높은 분비효율로 인해 배양 상등액으로부터 endoxylanase와 endoglucanase를 쉽게 얻을 수 있었고, glucose와 yeast extract를 이용하는 유가배양을 통해 endoxylanase와 endoglucanase를 대량생산할 수 있었다.

요 약

Endoxylanase와 endoglucanase 유전자가 *ADHI* 프로모터 하류에 따로따로 삽입된 pAGX3 플라스미드를 함유한 *Saccharomyces cerevisiae*에서 endoxylanase와 endoglucanase 유전자는 성공적으로 발현되었으며, YPD 배지에서의 회분 배양 결과, endoxylanase는 7.91 units/ml, endoglucanase는 0.43 units/ml에 달하는 총활성을 보였다. Yeast extract와 포도당을 간헐적으로 공급하는 유가배양에서 endoxylanase와 endoglucanase의 총활성은 24.9 units/ml과 0.84 units/ml을 각각 보였으며, 이는 회분배양에서 발현된 각각 활성의 3.1배와 2배에 해당되었다. 또한, 대부분의 endoxylanase와 endoglucanase 활성은 세포박 배지에서 측정되어, 향후 이 재조합 효모는 섬유소(cellulose)와 xylan 혼합물의 동시 당화 바이오공정 개발에 활용될 가능성이 높다 하겠다.

Acknowledgment

This work was supported by Dong-Eui University Foundation Grant (2018), and this research was also supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of

Korea (NRF) funded by the Ministry of Science, ICT & Future Planning (2014R1A1A1003519).

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Viikari L, Alapuranen M, Puranen T, Vehmaanperä J, Siika-Aho M. 2007. Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **108**: 121-145.
- Okeke BC. 2014. Cellulolytic and xylanolytic potential of high β -glucosidase-producing *Trichoderma* from decaying biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **174**: 1581-1598.
- Murashima K, Kosugi A, Doi RH. 2003. Synergistic effects of cellulosomal xylanase and cellulases from *Clostridium cellulovorans* on plant cell wall degradation. *J. Bacterio.* **185**: 1518-1524.
- Lambertz C, Garvey M, Klinger J, Heesl D, Klose H, Fischer R, et al. 2014. Challenges and advances in the heterologous expression of cellulolytic enzymes: a review. *Biotechnol. Biofuels.* **7**: 135.
- Hwangbo M, Tran JL, Chu KH. 2018. Effective one-step saccharification of lignocellulosic biomass using magnetite-biocatalysts containing saccharifying enzymes. *Sci. Total Environ.* **647**: 806-813.
- Kumar V, Dangi AK, Shukla P. 2018. Engineering thermostable microbial xylanases toward its industrial applications. *Mol. Biotechnol.* **60**: 226-235.
- Gellissen G, Melber K, Janowicz ZA, Dahlems UM, Weydemann U, Piontek M, et al. 1992. Heterologous protein production in yeast. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **62**: 79-93.
- Shi X, Zou Y, Chen Y, Ying H. 2018. Overexpression of *THI4* and *HAP4* improves glucose metabolism and ethanol production in

- Saccharomyces cerevisiae*. *Front Microbiol.* **9**: 1444.
9. Jiang J, Yin H, Wang S, Zhuang Y, Liu S, Liu T, et al. 2018. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for high-level production of salidroside from glucose. *J. Agric. Food Chem.* **66**: 4431-4438.
 10. Han JY, Seo SH, Song JM, Lee H, Choi ES. 2018. High-level recombinant production of squalene using selected *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **45**: 239-251.
 11. Rojas NL, Ortiz GE, Baruque DJ, Cavalitto SF, Ghiringhelli PD. 2011. Production of heterologous polygalacturonase I from *Aspergillus kawachii* in *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch cultures. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 1437-1447.
 12. Lim SH, Lee H, Sok DE, Choi ES. 2010. Recombinant production of an inulinase in a *Saccharomyces cerevisiae* gal80 strain. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 1529-1533.
 13. Landi C, Paciello L, de Alteriis E, Brambilla L, Parascandola P. 2015. High cell density culture with *S. cerevisiae* CEN. PK113-5D for IL-1 β production: optimization, modeling, and physiological aspects. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **38**: 251-261.
 14. Jeong KJ, Lee PC, Park IY, Kim MS, Kim SC. 1998. Molecular cloning and characterization of an endoxylanase gene of *Bacillus* sp. in *Escherichia coli*. *Enz. Microb. Technol.* **22**: 599-605.
 15. Shin DH, Kim JB, Kim BW, Nam SW, Shin JW, Chung DK, et al. 1998. Expression and secretion of *Trichoderma* endoglucanase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 406-412.
 16. Lee JH, Lim MY, Kim MJ, Heo SY, Seo JH, Kim YH, et al. 2007. Constitutive coexpression of *Bacillus* endoxylanase and *Trichoderma* endoglucanase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 2076-2080.
 17. Su X, Geng X, Fu M, Wu Y, Yin L, Zhao F, et al. 2017. High-level expression and purification of a molluscan endoglucanase from *Ampullaria crosseana* in *Pichia pastoris*. *Protein. Exp. Purif.* **139**: 8-13.
 18. Zhou J, Zhu P, Hu X, Lu H, Yu Y. 2018. Improved secretory expression of lignocellulolytic enzymes in *Kluyveromyces marxianus* by promoter and signal sequence engineering. *Biotechnol. Biofuels* **11**: 235-248.