출아효모에서 다양한 이종 유전자의 안정적 동시발현을 위한 방법의 비교

정희명, 김연희*

동의대학교 바이오융합공학부 의생명공학전공

Received: July 9, 2019 / Revised: September 18, 2019 / Accepted: September 26, 2019

Comparison of Methods for Stable Simultaneous Expression of Various Heterologous Genes in *Saccharomyces cerevisiae*

Heo-Myung Jung and Yeon-Hee Kim*

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

We compared two integration systems for stable expression of heterologous genes in *Saccharomyces cerevisiae*. A *Candida glabrata*-derived gene was used as the selective marker for the Cre/loxP system, and *XYLP*, *XYLB*, *GRE3*, and *XYL2* genes were used as model heterologous genes and ligated into the universal pRS-CMT vector. The resulting pRS-XylP, pRS-XylB, pRS-Gre3, and pRS-Xyl2 plasmids were sequentially integrated into yeast chromosome VII by four integration processes (marker rescue and gene integration). The four introduced genes were successfully expressed. Further, the pRS-PBG2 plasmid harboring expression cassettes for the four genes was constructed for one-step integration. The four genes that were introduced were stably maintained as a gene cluster and were simultaneously expressed. The one-step integration was more effective for the simultaneous integration and expression of the four genes related to xylan/xylose metabolism. This method will enable the generation of a useful biosystem through appropriate use of gene integration methods.

Keywords: *Candida glabrata* marker, one-step integration, *Saccharomyces cerevisiae*, sequential integration, xylan/xylose metabolism related genes

출아효모 *Saccharomyces cerevisiae*는 이종 유전자(heterologous gene)의 발현을 위한 중요한 숙주세포로서 그 특성이 잘 알려져 있으며 다양한 산업, 의료 및 식품분야의 응용과 연구에 이용되어지고 있다. 효모는 단순배지에서 성장속도가 빠르며 높은 세포농도를 보이고, 다른 진핵생물에 비해 유전학적 연구가 잘 되어있으며 유전자 조작도 대장균의 수준으로 용이하다고 할 수 있다. 또한 효모는 고등생물세포와 유사한 번역 후 수식계가 있어 folding 및 disulfide 결합 등 이종 단백질의 구조와 기능을 천연상태로 생산 할 수 있다. 효모에서 대부분의 유전자 발현을 위한 vector는 multi-copy episomal plasmid (YEpl)의 형태이며 이종 유전자의 효율적인 전사를 위한 효모 promoter와

terminator를 가지고 있어 다양한 유전자의 발현에 이용되고 있다. 하지만 YEpl은 세포분열 중에 종종 불안정해지며 plasmid의 결실이 일어날 수 있고, plasmid를 안정적으로 유지하기 위해 선택적인 배양조건(selective culture condition)이 필요하게 된다[1, 2]. 그러므로 *S. cerevisiae*에서 이종 유전자의 안정적인 발현을 위해 yeast integrative plasmid (YIp)를 이용하여 숙주세포의 염색체 안에 목적 유전자를 직접 도입(direct integration)하는 방법이 효과적이라고 할 수 있다[3]. 각각의 선택마커(영양요구성 마커, auxotrophic marker)를 가진 기존의 YEpl 및 YIp를 이용한 방법은 이종 유전자의 도입을 위한 효과적인 방법이지만, 다수의 이종 유전자를 도입하기 위해서는 각각 다른 선택마커를 가진 plasmid의 cloning이 필요했다. 따라서 사용할 수 있는 영양요구주인 숙주세포의 선택에 한계가 있었다. 이전의 연구에서 우리는 효모염색체를 인공염색체화하기 위해 반복적으로 선택마커의 제거가 가능한 Cre/loxP site-specific recombination

*Corresponding author

Tel: +82-51-890-2281, Fax: +82-504-033-6356

E-mail: yeonheekim@deu.ac.kr

© 2019, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

system [4]을 염색체가공기술인 PCR-mediated Chromosome Splitting (PCS) method [5]와 접목시켜 보고하였다. 또한 효모염색체내로 이중 유전자를 integration할 때 문제되는 유전자의 낮은 copy number를 인공염색체의 copy number amplification system을 도입하거나[6], δ -sequence와 같은 repetitive chromosomal DNA sequences를 이용한 random integration을 통해 해결하였다[7]. 이러한 시스템을 이용하여 우리는 단계적이고 반복적인 이중 유전자의 sequential integration 및 한번의 genome integration으로 4종의 이중 유전자를 도입할 수 있는 one-step integration 방법의 효과적인 사용과 장단점에 대해서 비교하고자 한다.

본 연구에서는 xylan/xylose 대사에 관여하는 endoxylanase, β -xylosidase, xylose reductase와 xylitol dehydrogenase를 모델 단백질로 사용하고 loxP sequences를 가진 CgMarker와 선택적 위치에 integration이 가능한 target sequence를 가진 integrative plasmid를 구축하였다. *S. cerevisiae* SEY2102 Δ trp (*MAT α ura3-52 leu2-3, 112 his4-519 suc2- Δ 9 trp1::KanMX*)를 효모숙주세포로 사용하였고, endoxylanase, β -xylosidase, xylose reductase와 xylitol dehydrogenase를 각각 코드하는 *XYLP*, *XYLB*, *GRE3* 및 *XYL2* 유전자를 효모의 7번 염색체에 안정적인 integration을 시도하였다.

효모의 성장배지와 형질전환체 선별배지인 YPD (yeast extract, peptone, dextrose)와 SC (synthetic complete)배지 및 배양방법은 이전의 연구에 기술되어 있으며[7], YPD 배지에 1%의 galactose가 첨가된 YPDG 배지는 galactose-

inducible gene expression을 위한 유도배지로 사용하였다. 5-Fluoroorotic acid (5-FOA) 배지는 CRE recombinase와 *URA3* selective marker를 가지고 있는 pSH47 plasmid (*GAL1p-CRE-CYC1t*) [8]의 제거를 위해 사용하였다. 균체 농도(optical density (OD))는 분광광도계(Shimadzu)를 사용하여 600 nm (OD₆₆₀)에서 흡광도를 측정하였고, dry cell weight (DCW)는 미리 측정된 conversion factor (0.3 DCW (g/l)/OD)를 적용하여 산출하였다[9]. 효모의 형질전환, PCR, pulsed field gel electrophoresis (PFGE)와 Southern hybridization 방법은 Kim *et al.* [10]에 기술되어 있으며, RT-PCR 및 signal intensity analysis를 위해 Scion image 법을 사용하였다[7]. 또한 endoxylanase, β -xylosidase, xylose reductase 및 xylitol dehydrogenase의 효소활성은 각각의 assay method [11–13]에 따라 측정되었다.

먼저 *XYLP*, *XYLB*, *GRE3* 및 *XYL2* 유전자를 효모염색체의 target position에 integration하기 위해 universal pRS-CMT (CgMarker-Target) plasmid를 구축하였다. pRS-CMT plasmid에는 reusable selective marker인 loxP-CgTRP1-loxP cassette와 상동성재조합(homologous recombination)을 위한 target gene인 *PMT6* gene을 포함하고 있다. Cre/loxP system은 CRE recombinase와 34 bp loxP 서열을 *CgMARKER* (*Candida glabrata* 유래의 selective marker)의 양쪽에 가지고 있는 selective marker (*loxP-CgMARKER-loxP*)를 이용하는 system으로, CRE recombinase의 발현유도에 의해 *CgMARKER* 양쪽의 loxP 서열간의 자발적인 재조합이 유

Fig. 1. Schematic of the integrative plasmids, pRS-XylP, pRS-XylB, pRS-Gre3 and pRS-Xyl2. The nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the junction site between *MFa* signal sequence (*MFas.s*) and the each gene are indicated and the endopeptidase cleavage site is denoted by an arrow. *lox* indicates loxP sequence.

Table 1. Oligonucleotides list used in this study.

Oligonucleotides	Sequences (5'-3')
XYLP-F	CTCTCTAGATAAGAGAAGAACCATTACGAA
XYLP-R	CTCGTCGACTTAGTTGCCAATAAAC
XYLB-F	CTCTCTAGATAAGAGAAAAATTATCAATCC
XYLB-R	GCACTCGAGTCATAGCTCTTTATAC
GRE3-F	AGGTGTTCTCTAGATAAGAGATCTTCACTGGTTACT
GRE3-R	TTCGTTCAAGTCGACTCAGGCAAAAGTGGG
XYL2-F	AGGTGTTCTCTAGATAAGAGAACTGTAACCTTCC
XYL2-R	TTCGTTCAAGTCGACTTACTCAGGGCCGTC
pRSGAL-F	TTTTCTGTCTTGAACATCGCTTCGCTGAT
pRSGAL-R	TTTTTATCTTTTGAATCGATAACGACACCG
pRStul-F	CTACACATGTATAGGCCTCATCGCTTCGCTGATTA
pRStul-R2	AGCGAAGCGATGAGGTCGATAACGACACCGACAAT
ACT1-F	ATCCAAGAGAGGTATCT
ACT1-R	CACACTTCATGATGGAG

도되어 loxP 서열 사이에 있는 *CgMARKER*가 pop-out 되어 결실되는 방식이다. 따라서 유전자 발현 cassettes의 반복적인 염색체내 integration을 가능하게 한다. 본 연구에 사용한 *C. glabrata* 유래의 *TRP1* (*CgTRP1*) 유전자는 *S. cerevisiae*의 *TRP1* gene과 효모세포 내에서 같은 기능을 하지만 염기서열의 상동성이 61%로 *S. cerevisiae* genome내에서 비특이적인 재조합이 일어나는 것을 방지하기 위해 사용되었다. *PMT6* gene은 *S. cerevisiae*의 7번 염색체에 위치한 유전자로 반복된 재조합에 의해 copy number가 증가(overexpression)되어도 세포에 영향을 미치지 않는 유전자로 선택되었고, 또한 원하는 integration position에 따라 다른 유전자로 대체될 수 있다. *XYLB*, *GRE3*, *XYL2* 유전자는 pGMF-XylP plasmid [14]을 vector로 사용하여 galactose에 의해 발현이 유도되는 *GAL10* promoter 하류에 각각 연결되었다. *XYLP*,

XYLB, *GRE3* 및 *XYL2* 유전자를 효모염색체내에 순차적으로 integration하기 위해 4개 유전자의 발현 cassettes (*XYLP*-E, *XYLB*-E, *GRE3*-E 및 *XYL2*-E)를 pRSGAL-F/R primer로 증폭하고 pRS-CMT plasmid에 도입하여, pRS-XylP, pRS-XylB, pRS-Gre3 및 pRS-Xyl2 plasmid를 구축하였다. 구축된 plasmid는 발현된 각 효소가 세포 밖으로 분비될 수 있도록 효모 분비서열(MF α signal sequence)을 가지도록 디자인되었고 각 plasmid의 구조는 Fig. 1에 나타내었으며 사용한 oligonucleotide는 Table 1에 나타내었다. 구축된 pRS-XylP plasmid는 *PMT6* target sequence의 *AccIII* 제한효소에 의해 선형화되어 *S. cerevisiae* SEY2102 Δ trp strain에 형질전환되었고(designated strain P), 다음으로 pRS-XylB plasmid의 도입을 위해 pRS-XylP plasmid 내의 *CgTRP1* marker는 pSH47 plasmid의 CRE recombinase에 의해 제거되었다. pSH47 plasmid는 5-FOA 유도에 의해 다시 제거되고 pRS-XylB plasmid를 strain P에 도입하여 SEY2102 Δ trp/pRS-XylP, pRS-XylB strain (designated strain PB)를 구축하였다. pRS-Gre3와 pRS-Xyl2 plasmid도 같은 방법으로 도입하여 SEY2102 Δ trp/pRS-XylP, pRS-XylB, pRS-Gre3 strain (designated strain PBG)와 SEY2102 Δ trp/pRS-XylP, pRS-XylB, pRS-Gre3, pRS-Xyl2 strain (designated strain PBG2)을 각각 구축하였다. *CgTRP1* marker의 제거는 Southern hybridization과 auxotrophic phenotype analysis를 통해 확인하였으며, CRE recombinase에 의해 marker는 80% 이상 효율적으로 제거되었다(data not shown).

구축된 각각의 균주는 YPDG 배지에서 48시간동안 유도 배양되었고, endoxylanase, β -xylosidase, xylose reductase 및 xylitol dehydrogenase의 효소활성을 측정하여 비교하였다(Table 2). Strain P와 PB에서 endoxylanase는 안정적으로 발현되었으며 integration이 반복될수록 활성이 다소 감소하는 양상을 보였다(Strains PBG and PBG2). β -

Table 2. Comparison of cell growth, endoxylanase, β -xylosidase, xylose reductase (XR) and xylitol dehydrogenase (XDH) activity in each transformant.

Strains*	Dry cell weight (DCW)	Endoxylanase activity (unit/ml)	β -xylosidase activity (unit/ml)	XR activity (unit/mg)	XDH activity (unit/mg)
P	4.82	13.37 $\pm$ 0.2	-	-	-
PB	5.67	14.23 $\pm$ 0.1	0.28 $\pm$ 0.02	-	-
PBG	5.61	9.48 $\pm$ 0.5	0.19 $\pm$ 0.04	0.13 $\pm$ 0.01	-
PBG2	5.43	6.23 $\pm$ 0.3	0.17 $\pm$ 0.03	0.14 $\pm$ 0.01	0.013 $\pm$ 0.002
2102 Δ trp/pRS-PBG2	5.32	14.60 $\pm$ 0.2	0.25 $\pm$ 0.03	0.16 $\pm$ 0.02	0.011 $\pm$ 0.004

*Strain P; SEY2102 Δ trp/pRS-XylP transformant

Strain PB; SEY2102 Δ trp/pRS-XylP, pRS-XylB transformant

Strain PBG; SEY2102 Δ trp/pRS-XylP, pRS-XylB, pRS-Gre3 transformant

Strain PBG2; SEY2102 Δ trp/pRS-XylP, pRS-XylB, pRS-Gre3, pRS-Xyl2 transformant

Fig. 2. Confirmation of integration and transcription levels of each gene by Southern hybridization (A) and RT-PCR (B). *XYLP*, *XYLB*, *GRE3* and *XYL2* genes were used as probe for Southern hybridization. Total RNA was isolated from each transformant and cDNA was synthesized from total RNA by RT-PCR. The *XYLP*, *XYLB*, *GRE3*, *XYL2* and *ACT1* (internal control) genes were amplified by PCR using each cDNA as template, and the products were visualized by agarose gel electrophoresis. Lane 1; strain P, lane 2; strain PB, lane 3; strain PBG, lane 4; strain PBG2.

xylosidase의 활성도 strain PB에서보다 strain PBG와 PBG2에서 약 30% 정도 감소하였으나 xylose reductase와 xylitol dehydrogenase의 활성은 안정적으로 유지되었다. 이것은 아마도 유전자 발현 cassettes의 반복된 integration 및 CRE recombinase에 의한 hyper-recombination 및 염색체 내의 반복적 구조에 의한 유전자의 결실 또는 전사 저해 (transcription inhibition)가 원인일 가능성을 생각할 수 있다. 각 균주들의 핵형(karyotype)을 PFGE 실시 후 Southern hybridization을 통해 분석해 본 결과(Fig. 2A), 도입한 4종의 유전자는 모두 효모 7번 염색체에 integration이 되었음을 확인하였고 sequential integration이 반복될수록 hybridization signals이 다소 약해지기는 했으나 4종의 유전자를 안정적으로 유지하고 있음을 확인할 수 있었다. 하지만 RT-PCR을 통한 각 유전자의 전사수준을 비교해 본 결과 (Fig. 2B), PBG2 균주에서 특히 *XYLP* 유전자의 발현량이 다른 균주에 비해 약 40% 정도 낮음을 확인할 수 있었다(Fig. 2B, lane 4). 이는 4회 이상의 반복적인 효모 내 integration으로 인한 염색체내 hyper-recombination 및 비정상적인 염색체 구조(다수 유전자의 cluster 형태)가 도입된 효소의 활성에 영향을 미칠 수 있음을 시사한다. 그러나 4종의 이중 유전자를 반복적으로 효모의 염색체내에 integration할 수 있었으며 효모세포 내에서 정상적으로 발현시킬 수 있었다. 다만 하나의 target gene을 이용한 sequential integration은 integration이 반복될수록 target gene (*PMT6*)의 copy number 증가로 인해 도입한 유전자 발현 cassette의 염색체 내 배치(순서)를 확인하기는 어렵다. 하나의 물질대사에 관여하는 효소 유전자들의 염색체내 위치 및 배열도 각 효소

의 활성에 영향을 미칠 수 있는데, 이는 인위적으로 유전자 발현 cassette를 인접하여 나열 배치한 경우, RNA polymerase의 promoter binding에 영향을 끼쳐 이어져 있는 유전자의 발현율이 억제 될 수도 있기 때문이다. 따라서 물질대사의 중간 산물 축적을 막기 위해 본 연구에서는 xylan/xylose의 대사 순서에 따라 유전자의 배치가 가능하도록 one-step integration을 시도하였다. One-step integration 방법은 도입하고자 하는 4종의 유전자를 가지도록 디자인된 발현 plasmid를 사용하여 한번의 염색체 integration을 통해 원하는 염색체 위치에 유전자들을 도입할 수 있다. 그러므로 먼저 *XYLP*, *XYLB* 및 *GRE3* 유전자 발현 cassette를 pRS-*Xyl2* plasmid에 차례로 도입하여 pRS-PBG2 plasmid (15 kb)를 구축하였다(Fig. 3A). *XYLP*, *XYLB* 및 *GRE3* 유전자 발현 cassette는 각각의 plasmid를 주형으로 universal pRStuI-F/R primer set를 이용하여 쉽게 증폭하여 사용할 수 있도록 하였고, 구축된 plasmid는 전기영동을 통해 확인하였다(Fig. 3B). 선형화된 pRS-PBG2 plasmid는 *S. cerevisiae* SEY2102Δ*trp* 균주에 형질전환되었고, 효모 7번 염색체에 도입된 각각의 유전자들은 colony PCR을 통해 확인하였다 (Fig. 3C). 선별된 SEY2102Δ*trp*/pRS-PBG2 균주를 YPDG 배지에서 48시간동안 유도배양하여 endoxylanase, β-xylosidase, xylose reductase 및 xylitol dehydrogenase의 효소활성을 측정해 본 결과, 도입된 4개의 유전자가 안정적으로 발현되어 sequential integration과 비슷한 효소활성을 보임을 확인할 수 있었다(Table 2). 또한 60 generations 후 비선택적 배지에서 각 유전자의 mitotic stability를 측정해 본 결과, 100%의 유전자 안정성을 보여 도입된 유전자가 안정하게 염색체내에 유지되고 있었으며, 도입된 유전자 발현 cassette는 염색체의 안정적 구조에 영향을 미치지 않음을 확인하였다. 본 연구의 결과로부터, CgMarker의 반복적 사용에 의한 sequential integration 방법은 4번의 유전자 발현 cassette의 도입으로 도입된 이중 유전자의 안정적 발현을 유도할 수 있었으며, 5회 이상의 integration이 필요한 공정에는 추가적인 다른 CgMarker (*CgHIS3*, *CgLEU2*, *CgLYS2*)와의 병행을 통해 더 많은 이중 유전자의 도입 및 안정적인 유전자 발현을 유도할 수 있으리라 기대한다. 이는 기존에 reusable selective marker로 사용되던 *hisG-URA3-hisG* cassette가 하나의 선택마커만 사용하여 동시에 2개이상의 유전자의 도입이 불가능했다는 점과 비교하여, Cre/loxP system은 2종의 CgMarker 사용으로 2종 이상의 이중 유전자를 염색체내에 동시에 도입할 수 있다는 것을 의미한다[7]. 그리고 도입한 유전자들의 배열이 그 유전자들의 발현에 영향을 미친다는 연구 결과에 따라[13], 도입된 유전자 발현 cassette의 배열(순서)을 특정하고자 한다면 one-step integration의 방법이 효과적이라고 할 수 있겠다. 하지만

Fig. 3. Construction scheme of pRS-PBG2 plasmid (A) and confirmation of plasmids by *StuI* treatment and agarose gel electrophoresis (B). XYL2-E, XYL2-E, GRE3-E, XYL2-E mean XYL2 gene expression cassette, XYL2 gene expression cassette, GRE3 gene expression cassette and XYL2 gene expression cassette, respectively. Lane M; λ /HindIII marker, lane 1; pRS-Xyl2/*StuI* (8.2 kb), lane 2; pRS-G2/*StuI* (10.4 kb), lane 3; pRS-BG2/*StuI* (13.2 kb), lane 4; pRS-PBG2/*StuI* (15 kb). Confirmation for integration of pRS-PBG2 plasmid into chromosome VII of *S. cerevisiae* SEY2102Δtrp by colony PCR (C). Lane M; 100 bp DNA ladder marker, lane 1; GRE3 gene (984 bp), lane 2; XYL2 gene (687 bp), lane 3; XYL2 gene (1000 bp), lane 4; XYL2 gene (1021 bp).

one-step integration을 위한 plasmid 사이즈(>20 kb)에 따라 효모염색체내의 integration 효율이 저하될 수 있으므로 도입하고자 하는 이중 유전자들의 개수 및 크기에 따라 적절한 integration 방법을 취하는 것이 바람직하다고 할 수 있겠다. 따라서 본 연구에서는 xylan/xylose 대사에 관여하는 4종의 유전자의 안정적인 염색체내 도입을 위해 sequential 또는 one-step integration 방법을 비교하여 각각의 장단점을 제시하였고, 사용된 4종의 유전자들의 경우 one-step integration 방법이 각 유전자를 안정적으로 유지할 수 있는 효과적인 방법임을 제시하였다. 또한 본 연구에서 제시한 이중 유전자의 안정적인 염색체내 도입을 위한 방법을 적절히 사용한다면 산업적으로 유용한 새로운 생물시스템의 손쉬운 육종도 기대할 수 있을 것이다.

요약

본 연구는 출아효모 *Saccharomyces cerevisiae*을 이용해 이중 유전자(heterologous gene)를 효모염색체내에 도입하여 안정적으로 발현하기 위한 시스템의 비교에 대해서 연구하였다. 반복적으로 사용할 수 있는 Cre/loxP system의 이용을 위해 *C. glabrata* 유래 유전자를 선택마커로 사용하였고, universal pRS-CMT vector를 이용한 4종의 유전자(XYL2, XYL2, GRE3 및 XYL2 유전자)를 모델 유전자로

cloning하였다. 구축된 pRS-Xyl2, pRS-Xyl2, pRS-Gre3 및 pRS-Xyl2 plasmid를 이용한 4번의 sequential integration을 통해 효모염색체내에 도입된 4종의 유전자를 순차적으로 발현시킬 수 있었다. 또한 4종의 유전자 발현 cassette를 동시에 가지는 pRS-PBG2 plasmid에 의한 one-step integration을 통해서, 도입될 유전자들의 순서를 정할 수 있었으며 각 유전자들의 동시발현을 안정적으로 유지할 수 있었다. 결론적으로 본 연구에서 사용한 4종의 유전자들의 염색체내 동시 integration 및 발현을 위해서는 one-step integration이 효과적임을 확인하였으며, 적절한 유전자 도입방법을 통해 산업적으로 유용한 생물시스템의 손쉬운 육종이 가능하리라 기대한다.

Conflict of interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Murray AW, Szostak JW. 1983. Pedigree analysis of plasmid segregation in yeast. *Cell* **34**: 961-970.
- Romanos MA, Scorer CA, Clare JJ. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* **8**: 423-488.
- Lee FW, Da Silva NA. 1997. Sequential delta-integration for the

- regulated insertion of cloned genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Prog.* **13**: 368-373.
4. Güldener U, Heck S, Fiedler T, Beinhauer J, Hegemann JH. 1996. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* **24**: 2519-2524.
 5. Kim YH, Sugiyama M, Yamagishi K, Kaneko Y, Fukui K, Kobayashi A, *et al.* 2005. A versatile and general splitting technology for generating targeted YAC subclones. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**: 65-70.
 6. Jung HM, Kim YH. 2018. Simultaneous overexpression of integrated genes by copy number amplification of a mini-yeast artificial chromosome. *J. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 821-825.
 7. Choi HJ, Kim YH. 2018. Simultaneous and sequential integration by Cre/loxP site-specific recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 826-830.
 8. Sugiyama M, Ikushima S, Nakazawa T, Kaneko Y, Harashima S. 2005. PCR-mediated repeated chromosome splitting in *Saccharomyces cerevisiae*. *BioTechniques* **38**: 909-914.
 9. Jo JH, Oh SY, Lee HS, Park YC, Seo JH. 2015. Dual utilization of NADPH and NADH cofactors enhances xylitol production in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. J.* **10**: 1935-1943.
 10. Kim YH, Nam SW. 2010. Development of simultaneous YAC manipulation-amplification (SYMA) system by chromosome splitting technique harboring copy number amplification system. *J. Life Sci.* **20**: 789-793.
 11. Chun YC, Jung KH, Lee JC, Park SH, Chung HK, Yoon KH. 1998. Molecular cloning and the nucleotide sequence of a *Bacillus* sp. KK-1 β -xylosidase gene. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 28-33.
 12. Lee LH, Kim DY, Han MK, Oh HW, Ham SJ, Park DS, *et al.* 2009. Characterization of an extracellular xylanase from *Bacillus* sp. HY-20, a bacterium in the gut of *Apis mellifera*. *Korean J. Microbiol.* **45**: 332-338.
 13. Kim SR, Kwee NR, Kim B, Jin YS. 2013. Feasibility of xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing endogenous aldose reductase (*GRE3*), xylitol dehydrogenase (*XYL2*), and xylulose kinase (*XYL3*) from *Scheffersomyces stipitis*. *FEMS Yeast Res.* **13**: 312-321.
 14. Kim MJ, Kim BH, Nam SW, Choi ES, Shin DH, Cho HY, *et al.* 2013. Efficient secretory expression of recombinant endoxylanase from *Bacillus* sp. HY-20 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Life Sci.* **23**: 863-868.