

## Expression System for Optimal Production of Xylitol Dehydrogenase (XYL2) in *Saccharomyces cerevisiae*

Hoe-Myung Jung<sup>1</sup> and Yeon-Hee Kim<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Smart bio-health, Dong-Eui University, Busan 47340, Korea

<sup>2</sup>Division of Applied Bioengineering, Biomedical Engineering and Biotechnology Major, Dong-Eui University, Busan 47340, Korea

Received August 16, 2017 / Revised October 24, 2017 / Accepted November 22, 2017

In this study, the xylitol dehydrogenase (XYL2) gene was expressed in *Saccharomyces cerevisiae* as a host cell for ease of use in the degradation of lignocellulosic biomass (xylose). To select suitable expression systems for the S.XYL2 gene from *S. cerevisiae* and the P.XYL2 gene from *Pichia stipitis*, pGMFa-S.XYL2, pGMFa-P.XYL2, pAMFa-S.XYL2 and pAMFa-P.XYL2 plasmids with the GAL10 promoter and ADH1 promoter, respectively, were constructed. The mating factor  $\alpha$  (MFa) signal sequence was also connected to each promoter to allow secretion. Each plasmid was transformed into *S. cerevisiae* SEY2102 $\Delta$  trp1 strain and the xylitol dehydrogenase activity was investigated. The GAL10 promoter proved more suitable than the ADH1 promoter for expression of the XYL2 gene, and the xylitol dehydrogenase activity from *P. stipitis* was twice that from *S. cerevisiae*. The xylitol dehydrogenase showed NAD<sup>+</sup>-dependent activity and about 77% of the recombinant xylitol dehydrogenase was secreted into the periplasmic space of the SEY2102 $\Delta$  trp1/pGMFa-P.XYL2 strain. The xylitol dehydrogenase activity was increased by up to 41% when a glucose/xylose mixture was supplied as a carbon source, rather than glucose alone. The expression system and culture conditions optimized in this study resulted in large amounts of xylitol dehydrogenase using *S. cerevisiae* as the host strain, indicating the potential of this expression system for use in bioethanol production and industrial applications.

**Key words** : *Pichia stipitis*, promoter strength, *Saccharomyces cerevisiae*, secretion production, xylitol dehydrogenase

### 서 론

출아효모 *Saccharomyces cerevisiae*는 매우 효율적인 에탄올 생산 균주로 알려져 있지만 lignocellulosic materials로부터 에탄올 생산을 위해 적합한 xylose를 발효할 수 없다는 단점이 있다. 따라서 woody plant materials로부터 xylose를 효율적으로 발효할 수 있는 *S. cerevisiae*는 효과적인 biofuel 생산에 직접적으로 사용될 수 있으므로, 이러한 균주의 구축은 주요한 산업적 관심사가 되고 있다[5, 26]. 비록 *S. cerevisiae*가 다른 여러 효모들(*Pichia stipitis*, *Candida shehatae*)과 달리 xylose에서 성장이나 발효를 할 수 없다고 할 지라도 매우 느리게는 xylose를 대사한다는 것도 보고 되어지고 있다[24]. Xylose의 대사에는 일반적으로 3개의 cytosolic enzymes (xylose reductase, xylitol dehydrogenase, and xylulokinase)이 관여하는 pathway가 이용되고, 이 효소들에 의해서 xylose는 pentose

phosphate pathway를 통해 대사가 가능한 xylulose 5-phosphate로 전환이 가능해진다[7]. *S. cerevisiae*에서 xylose uptake는 glucose transporters의 일부를 통해 이루어진다고 알려져 있고[15], xylose reductase (*GRE3*, *YHR104W*), xylitol dehydrogenase (*XYL2*, *YLR070C*)와 xylulokinase (*XKS1*, *YGR194c*)의 효소 활성도 *S. cerevisiae*에서 보고되어 지고 있다. *S. cerevisiae*는 상대적으로 xylose 이용은 잘 못하는데, xylulokinase의 활성이 좋기 때문에 xylulose의 존재 하에서는 잘 자랄 수 있다고 보고되고 있다[4, 22]. 하지만 *S. cerevisiae*에서 xylitol dehydrogenase의 활성에 관해서는 의견이 분분했다. Batt *et al.* [2]는 *S. cerevisiae*에서 xylitol dehydrogenase 활성이 있음을 보고했고, 반면에 van Zyl *et al.* [23]은 xylitol dehydrogenase의 활성이 세포에서 검출되지 않았다고 보고했다. 이러한 활성의 차이를 보이는 것은 xylitol dehydrogenase가 배양 조건에 따라 활성이 달라지기 때문인데, glucose 존재 하에서 세포가 자랄 때는 xylitol dehydrogenase 활성이 검출되지 않고, xylose가 배지 중에 존재할 때에만 xylitol dehydrogenase의 활성을 나타내기 때문인 것으로 보고되었다 [20]. 이는 xylitol dehydrogenase의 발현율(expression level)이 당(glucose, xylose)에 의해 조절된다는 것을 의미한다.

Xylitol dehydrogenase (XDH)를 코드하는 XYL2 유전자는 medium-chain dehydrogenase/reductase superfamily (polyol

#### \*Corresponding author

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

E-mail : yeonheekim@deu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

dehydrogenase family)의 member [19, 21]로 아연(zinc)을 포함하고 있다고 알려져 있다. MDR 효소들은 전형적으로 catalytic domain과 nicotinamide cofactor (NAD<sup>+</sup> or NADP<sup>+</sup>)의 결합을 위한 second domain을 가지며, 아연이 존재할 때 active site에서 촉매작용에 관여하게 된다[23]. Xylitol dehydrogenase의 경우, cofactor의 종류에 따라 xylitol을 L-xylulose로 전환시키는 NADP-linked xylitol dehydrogenase (EC 1.1.1.10)와 xylitol을 D-xylulose로 전환시키는 NAD-linked xylitol dehydrogenase (EC 1.1.1.9)로 나눌 수 있다[1]. 일반적으로 xylose로부터 D-xylulose의 생산을 위해서 NADPH를 cofactor로 쓰는 xylose reductase와 NAD<sup>+</sup>를 cofactor로 쓰는 xylitol dehydrogenase를 사용하게 되는데 이 경우 intracellular redox imbalance가 생기게 된다. 따라서 *S. cerevisiae*와 *P. stipitis* 균주 유래 효소들의 redox balance 유지 및 효율적인 D-xylulose 생산을 위해 mutation 등의 방법을 통해 NADP<sup>+</sup>-dependent xylitol dehydrogenase를 발현시켜 보고하고 있다[8, 18]. 따라서 많은 연구는 mutated-xylitol dehydrogenase를 구축하여 coenzyme recycling에 초점을 맞추어 연구가 진행되고 있다.

*S. cerevisiae*는 고등생물세포와 유사한 번역 후 수식계가 있어 folding, disulfide 결합 등 단백질의 구조와 기능이 천연상태로 생산된다. 또한 효모는 대장균에 비해 유전자 재조합 단백질의 더 효율적으로 세포 밖으로 분비 생산하여 단백질의 분리 정제에 도움을 줄 수 있다[17]. 따라서 lignocellulosic material (xylose)을 효과적으로 에탄올 생산에 사용하기 위해서는 xylose에서 생성된 xylitol의 축적을 막고 D-xylulose로의 전환을 촉진시키기 위한 xylitol dehydrogenase의 활성을 높이는 것과 효모를 숙주세포로 한 대량 생산이 요구된다. 또한 생산된 xylitol dehydrogenase의 효율적인 정제를 위해서도 배지 내로의 분비생산이 필요한데 효모로부터 재조합 단백질의 분비생산을 위해서는 효모의 분비서열을 이용하는 것이 효과적이다[10]. 실제로 xylitol dehydrogenase의 발현을 constitutive promoter를 사용하여 조절하여 xylitol accumulation을 낮추고, ethanol production yield를 증가시킨 결과도 보고되었고[12], 발현시키고자 하는 유전자의 특성에 따라 발현에 적합한 promoter (constitutive or inducible promoter)와 유전자의 combination이 달라진다는 결과도 보고하였다[11]. 따라서 본 연구에서는 *S. cerevisiae*와 *P. stipitis*의 XYL2 유전자 (*S.XYL2* and *P.XYL2* gene)를 inducible promoter인 *GAL10* (galactose inducible) promoter와 constitutive promoter인 *ADH1* (constantly expression) promoter를 이용하여 발현시키고, xylitol dehydrogenase의 발현 생산에 가장 적합한 promoter와 유전자 발현시스템(expression system)을 구축하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 plasmids

Plasmid 구축 및 증폭을 위한 *Escherichia coli* 숙주세포는 DH5α를 사용하였고, 효모 숙주세포는 *Saccharomyces cerevisiae* SEY2102 (*MATa ura3-52 leu2-3 leu2-112 his4-519 suc2Δ* 9)의 *TRP1* (ORF 0.7kb) 유전자가 *KanMX* 유전자로 대체되어 *TRP1* 유전자가 결실된 SEY2102Δ*trp1* 균주를 사용하였다. 효모 *S. cerevisiae*와 *P. stipitis*의 XYL2 유전자 발현을 위한 발현 plasmid는 유도성 promoter인 *GAL10* promoter를 포함하는 pGMFa-S.XYL2와 pGMFa-P.XYL2를 구성적 promoter인 *ADH1* promoter를 포함하는 pAMFa-S.XYL2와 pAMFa-P.XYL2 plasmid를 사용하였다. 이들 plasmid는 선별마커로 *URA3* 유전자를 함유하고 있어 uracil 영양요구성 변이주 효모세포 (*ura3-52*)를 숙주세포로 사용할 수 있다.

### 재조합 plasmid 구축 및 형질전환

*GAL10* promoter를 이용하여 *S. cerevisiae*의 XYL2 유전자 (*S.XYL2*)와 *P. stipitis*의 XYL2 유전자 (*P.XYL2*)의 과발현을 위한 plasmid를 구축하기 위해서 pGMFa-XYLP plasmid [10]를 vector로 사용하였고, 각각 SEY2102Δ*trp1*과 *P. stipitis* (KCTC 7230) 균주의 genomic DNA를 주형으로 S.XYL2-F (5'-AGGT GTTCCTCTAGATAAGAGAAGACTGACTTAACTACA-3')와 S.XYL2-R (5'-TTCGTTCAAGTC GACTCATTCCGGGCCCT C-3'), P.XYL2-F (5'-AGGTGTTCTCTAGATAAGAGAAGACT GCTAACCC TTCC-3')와 P.XYL2-R (5'-TTCGTTCAAGTCG ACTTACTCAGGGCCGTC-3') primer set를 이용하여 S.XYL2와 P.XYL2 유전자를 증폭하였다. Primer는 각각 *XbaI*과 *SalI* 제한효소서열을 포함한 22bp vector서열을 포함하도록 디자인되었고, pGMFa-XYLP plasmid (vector)는 *XbaI*과 *SalI* 제한효소로 처리하여 cloning에 사용하였다. Cloning을 위해서 vector와 증폭된 XYL2 유전자의 일부분의 overlap region을 사용하여 fusion시키는 In-fusion cloning (Clontech)법을 이용하였다

*ADH1* promoter를 이용하여 S.XYL2 유전자와 P.XYL2 유전자를 과발현 시키기 위한 plasmid의 구축을 위해서는 pVT-103U plasmid [25]를 vector로 사용하였고, pGMFa-S.XYL2와 pGMFa-P.XYL2 plasmid를 주형으로 pAMFa-F (5'-GCTGGA TCCTCTAGAATGAGATTCCCATCC-3')와 pAS.XYL2-R (5'-TGCTGCAGGCTCGAGTCATTCCGGGCCCTC-3'), pAP.XYL2-R (5'-TGCTGCAGGCTCGAGTTACT CAGGGCCGTC-3') primer를 이용하여 S.XYL2와 P.XYL2 유전자를 증폭하였다. pVT-103U plasmid를 *BamHI*과 *XhoI* 제한효소로 처리하여 vector로 사용하였고, In-fusion cloning 법을 이용하여 재조합 plasmid를 구축하였다. 이렇게 구축된 재조합 plasmid는 *E. coli* DH5α에서 증폭, 추출되었고, *S. cerevisiae* 균주로 형질전환을 위해서는 salmon testes 유래의 single-stranded carrier DNA를 사용하는 high efficiency transformation법[6]을 이용하였다.

**배지 조성 및 배양조건**

*S. cerevisiae* 균주의 증식배지로는 YPD 배지(1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose)를 사용하였으며, 유전자 발현 유도 시에는 YPDG 배지(1% yeast extract, 2% peptone, 1% glucose, 1% galactose)를 사용하였다. 또한 탄소원의 종류 및 조성에 따른 유전자 발현률 비교를 위해서는 YPD(2%)G(2%), YPDGX (2% xylose) 및 YPG(2%)X(2%) 배지 등을 사용하였다. 형질전환체의 선별을 위한 배지로는 YNBCAD 배지(0.67% yeast nitrogen base w/o amino acid, 0.5% casamino acid, 2% glucose)를 사용하였다. 재조합 효모 균주는 5 ml YPD 배지에서 16~24시간 동안 전배양 한 후 10 ml YPDG 배지에 접종(initial OD<sub>600</sub> 0.1)하여 30℃, 190 rpm에서 48시간 또는 72시간 배양하였다.

**Xylitol dehydrogenase (XDH)의 효소활성 측정**

Xylitol dehydrogenase의 효소활성 측정을 위하여 YPDG 배지에서 48시간 배양한 배양액을 3,000 rpm으로 원심분리하여 얻은 균체 침전물에 Y-PER (Yeast Protein extraction reagent, Thermo Fisher Scientific)을 첨가하여 단백질을 추출하였다. 2 ml의 Y-PER을 균체에 첨가하여 상온에서 20분간 반응시킨 후 균체와 동량의 glass beads (0.4~0.6 mm)를 추가하여 3회~10회정도 vortexing하고, 원심분리하여 상등액을 분리 한 다음 현미경 관찰을 통해 세포 파쇄 여부를 확인하였다. Periplasmic space (P)와 cytoplasmic space (C)의 효소액을 분리하기 위해서는 Y-PER만 첨가하여 반응시킨 후, 상등액(P)을 분리하고 남은 원형질체에 다시 한번 동량의 Y-PER와 glass beads를 추가하여 완전히 균체를 파쇄(C)하였다. 분리된 상등액 및 세포추출물 내의 protein 농도는 Bradford법[3]으로 정량하였고, BSA (Bovine Serum Albumin)를 표준물질로 0 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.6 mg/ml, 0.8 mg/ml, 1.0 mg/ml의 양만큼 첨가하여 표준직정곡선을 작성하였다. Xylitol dehydrogenase의 효소활성 측정은 0.7 ml의 50 mM Tris buffer (pH 9.0), 0.1 ml cell extract, 0.1 ml 2 mM NAD(P)<sup>+</sup>를 포함하는 reaction solution을 1분간 25℃에서 반응하고, 0.1 ml의 1 M xylitol의 기질을 첨가한 후 340 nm에서의 흡광값의 변화량을 2분간 모니터링하여 측정하였다[13]. 1 unit는 1분간 1 μmol NAD(P)<sup>+</sup>를 전환하는 효소의 양으로 정의하였다.

**RT-PCR을 통한 XYL2 유전자 발현률 조사**

SEY2102Δtrp1 균주와 각각의 형질전환체에서 *S.XYL2*와 *P.XYL2* 유전자의 발현률을 비교하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. Trizol method [9]를 통해 각 효모 균주의 total RNA를 추출하였고, Hyperscript™ First strand synthesis Kit (Gene All®)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA합성 조건은 2 μg의 total RNA와 Oligo dT를 첨가한 14 μl를 65℃에서 5분간 반응 후, ice에서 1분간 cooling하고 10x RTase reaction buffer

2 μl, 0.1M DTT 1 μl, Hyperscript™ Reverse Transcriptase (200 U/μl) 1 μl, ZymAll™ RNase Inhibitor 1 μl를 첨가하여 55℃에서 60분간 반응 후, 85℃에서 5분 반응하여 ice에서 cooling 하였다. 합성된 cDNA는 PCR의 주형으로 사용되었고, *S.XYL2* 및 *P.XYL2* 유전자의 증폭을 위해 *S.XYL2*-F와 *S.XYL2*-R, *P.XYL2*-F와 *P.XYL2*-R primer set을 사용하였다. Actin 단백질을 코딩하는 *ACT1* 유전자는 internal control로서 *ACT1*-F (5'-ATCC AAGAGAGGTATCT-3')와 *ACT1*-R (5'-CACACTTCATGAT GGAG-3') primer를 사용하여 증폭되었다. 전기영동 후 각각 signal intensity는 Scion image (<http://www.scioncorp.com/>) program을 이용하여 비교 분석하였다[14].

**결과 및 고찰**

**Xylitol dehydrogenase (XDH) 발현을 위한 plasmid 구축**

효모 유래 분비 서열을 이용하여 *S.XYL2*와 *P.XYL2* 유전자를 유도적, 구성적으로 발현·분비시키기 위하여 *GAL10* promoter와 *ADH1* promoter 하류에 각각 mating factor α (MFα) signal sequence와 *S.XYL2*와 *P.XYL2* 유전자를 cloning하여 pGMFa-*S.XYL2* (7.44 kb), pGMFa-*P.XYL2* (7.34 kb), pAMFa-*S.XYL2* (8.3 kb)와 pAMFa-*P.XYL2* (8.4 kb) plasmid를 구축하였다(Fig. 1). 각 유전자의 coding region (*S.XYL2* 유전자의 TDLT와 *P.XYL2* 유전자의 TANP로 시작되는 아미노산서열로 시작되는 영역)은 MFα 분비서열(MFas.s)의 염기성 아미노산 잔기 Lys-Arg (KR) 뒤에 연결되도록 design되었고, 번역 후 분비과정 중 효모세포내의 *KEX2* protease (yeast endopeptidase) [16]에 의해 절단되어 성숙형(mature form)의 xylitol de-

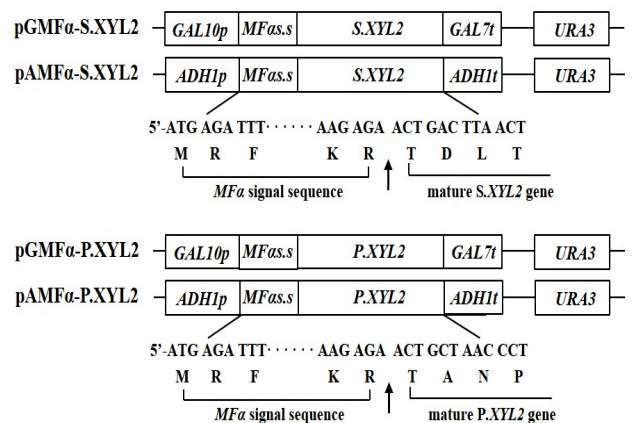


Fig. 1. Schematic of the xylitol dehydrogenase expression plasmids, pGMFa-*S.XYL2*, pAMFa-*S.XYL2*, pGMFa-*P.XYL2* and pAMFa-*P.XYL2*. The nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the junction site between MFα signal sequence and the XYL2 gene are indicated and the endopeptidase cleavage site is denoted by an arrow.

hydrogenase가 세포 밖으로 분비될 수 있다.

**Promoter와 cofactor에 따른 xylitol dehydrogenase 활성비교**

구축된 pGMFa-S.XYL2, pGMFa-P.XYL2, pAMFa-S.XYL2와 pAMFa-P.XYL2 plasmid를 각각 *S. cerevisiae* SEY2102Δtrp1 균주에 형질전환하여 YNBCAD배지에서 1차 선별하였다. 각 5개~10개의 형질전환체를 선별하여 XYL2 유전자의 유무를 확인해보기 위해 colony PCR을 수행한 결과, 모든 형질전환체에서 XYL2 유전자가 증폭되었음을 알 수 있었다(data not shown). 다음으로 각 형질전환체들 중 1개의 형질전환체를 선별하여 YPDG 배지에서 48시간 배양한 후 xylitol dehydrogenase 활성을 비교해보았다(Table 1). 먼저 promoter에 따른 xylitol dehydrogenase 활성을 조사해 본 결과, ADH1 promoter보다 GAL10 promoter를 사용하였을 때 xylitol dehydrogenase 활성이 5.8~8배 정도 증가됨을 확인할 수 있었는데, 이는 XYL2유전자의 source에 상관없이 GAL10 promoter가 XYL2유전자의 발현에 더욱 적합함을 보여주는 것이다. 또한 xylitol dehydrogenase 활성에 영향을 미치는 cofactor의 종류(NAD<sup>+</sup> and NADP<sup>+</sup>)에 따른 효소활성을 비교해 본 결과, S.XYL2 유전자와 P.XYL2 유전자 모두 NAD<sup>+</sup>를 cofactor로 사용하였을 경우에 효소 활성이 3.5~7.7배 정도 높게 나옴을 알 수 있었다. XYL2 유전자의 source에 따른 xylitol dehydrogenase의 활성 정도를 promoter와 cofactor의 영향을 반영하여 최종적으로 비교해 보면, *P. stipitis* 유래의 XYL2 유전자(P.XYL2)는 *S. cerevisiae* 유래 XYL2 유전자(S.XYL2)보다 *S. cerevisiae* 숙주세포에서 약 2배 이상 높게 발현됨을 알 수 있었다. 따라서 *S. cerevisiae* 균주를 숙주세포로 사용하여 재조합 xylose dehydrogenase의 과발현을 유도하기 위해서는 유도적 promoter인 GAL10 promoter를 사용하는 것이 효율적이며, *P. stipitis* 유래의 xylitol dehydrogenase 효소활성이 더 높았으며, 효소활성의 증가를 위해 cofactor로 NAD<sup>+</sup>가 적합함을 확인하였다.

**RT-PCR을 통한 xylitol dehydrogenase 발현을 비교**

XYL2 유전자의 과발현에 ADH1 promoter를 사용했을 때

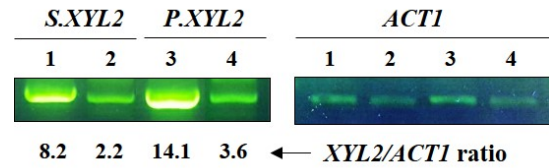


Fig. 2. Analysis of the transcription levels of xylitol dehydrogenase gene using RT-PCR. Total RNA was isolated from *S. cerevisiae* SEY2102Δtrp1 transformants. cDNA was synthesized from total RNA by RT-PCR. The S.XYL2, P.XYL2 and ACT1 (internal control) genes were amplified by PCR using each cDNA as template, and the products were visualized by agarose gel electrophoresis. Lane 1: SEY2102Δtrp1/pGMFa-S.XYL2 transformant, lane 2: SEY2102Δtrp1/pAMFa-S.XYL2 transformant, lane 3: SEY2102Δtrp1/pGMFa-P.XYL2 transformant, lane 4: SEY2102Δtrp1/pAMFa-P.XYL2 transformant.

보다 GAL10 promoter를 사용했을 때가 xylitol dehydrogenase의 활성이 높아지고, 특히 *P. stipitis* 유래의 P.XYL2 유전자 발현이 상대적으로 증가되었음을 확인할 수 있었는데, 이것이 XYL2 유전자의 transcription level의 증가인지 단백질 활성 증가의 영향인지 확인해보기 위해 RT-PCR을 수행하였다. SEY2102Δtrp1/pGMFa-S.XYL2 균주, SEY2102Δtrp1/pAMFa-S.XYL2 균주, SEY2102Δtrp1/pGMFa-P.XYL2 균주 및 SEY2102Δtrp1/pAMFa-P.XYL2 균주로부터 total RNA를 추출하고, cDNA 합성 후, S.XYL2, P.XYL2 유전자와 ACT1 유전자를 증폭하는 primer set로 PCR을 수행하였다. 그 결과, S.XYL2 유전자와 P.XYL2 유전자 모두 ADH1 promoter보다 GAL10 promoter를 사용했을 때 각 유전자의 transcription level이 약 4배정도 증가되었음을 확인할 수 있었고(Fig. 2), 또한 P.XYL2 유전자의 transcription level이 S.XYL2 유전자보다 약 1.7배정도 더 높게 나옴을 알 수 있었다(Fig. 2, lane 1 and 3). 따라서 SEY2102Δtrp1/pGMFa-P.XYL2 균주에서 xylitol dehydrogenase의 효소활성이 높게 나타난 것은 GAL10 promoter에 의해 조절된 P.XYL2 유전자의 transcription level의 증가에 의한 것으로 *S. cerevisiae*를 숙주세포로 하여 도입한 P.XYL2 유전자가 숙주세포 내에서 정상적인 전사, 번역시스템을 통해 발현되고 있음을 확인할 수 있었다.

Table 1. Comparison of cell growth (DCW) and xylitol dehydrogenase (XDH) activity according to cofactors (NAD<sup>+</sup> and NADP<sup>+</sup>) and promoters in each transformant

| Strains                   | Dry cell weight (DCW) | XDH activity (unit/mg) |                   |
|---------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------|
|                           |                       | NAD <sup>+</sup>       | NADP <sup>+</sup> |
| SEY2102Δtrp1              | 5.53                  | 0.001                  | 0.0004            |
| SEY2102Δtrp1/pGMFa-S.XYL2 | 5.91                  | 0.023                  | 0.003             |
| SEY2102Δtrp1/pAMFa-S.XYL2 | 6.63                  | 0.004                  | 0.001             |
| SEY2102Δtrp1/pGMFa-P.XYL2 | 5.13                  | 0.056                  | 0.013             |
| SEY2102Δtrp1/pAMFa-P.XYL2 | 6.36                  | 0.007                  | 0.002             |

Each transformant was cultivated in YPD and YPDG medium for 48 hr.

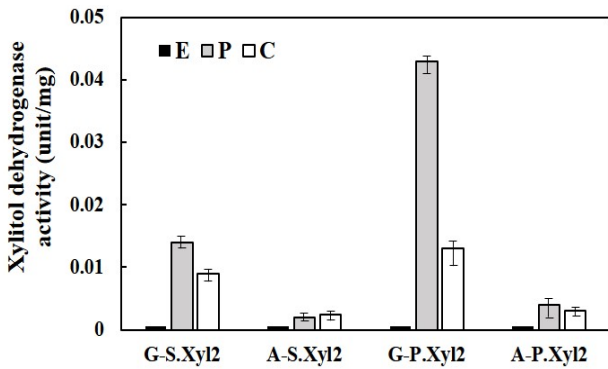


Fig. 3. Analysis of xylitol dehydrogenase (XDH) activity (unit/mg-protein) in various transformants. The transformants were cultivated in YPD and YPDG medium for 48 hr and enzyme solution from medium (extracellular fraction) and cell extract (periplasmic and cytoplasmic fraction) was used for analysis of XDH activity. E: extracellular fraction, P: periplasmic fraction, C: cytoplasmic fraction, G-S.Xyl2: SEY2102 $\Delta$ trp1/pGMFa-S.XYL2 transformant, A-S.Xyl2: SEY2102 $\Delta$ trp1/pAMFa-S.XYL2 transformant, G-P.Xyl2: SEY2102 $\Delta$ trp1/pGMFa-P.XYL2 transformant, A-P.Xyl2: SEY2102 $\Delta$ trp1/pAMFa-P.XYL2 transformant.

**재조합 xylitol dehydrogenase의 secretory efficiency 비교**

Xylitol dehydrogenase의 효율적인 분비발현을 위해서 각각의 plasmid 구축 시, *S. cerevisiae*의 MFa signal sequence (s.s)를 S.XYL2 유전자 및 P.XYL2 유전자의 앞에 도입하였다. 따라서 MFa s.s에 의한 재조합 xylitol dehydrogenase의 분비 효율을 각각의 형질전환주에 대해서 비교해보았다. 먼저, 각 형질전환주를 YPD배지(SEY2102 $\Delta$ trp1/pAMFa-S.XYL2 균주와 SEY2102 $\Delta$ trp1/pAMFa-P.XYL2 균주 배양)와 YPDG배지(SEY2102 $\Delta$ trp1/pGMFa-S.XYL2 균주와 SEY2102 $\Delta$ trp1/pGMFa-P.XYL2 균주 배양)에서 48시간 배양한 후, 배양상등액(E, extracellular fraction)과 세포추출물(P+C, P, periplasmic fraction; C, cytoplasmic fraction)에서의 효소활성을 조사해보았다(Fig. 3). 그 결과, 모든 형질전환균주에서 세포 밖(배지)으로 분비되는 xylitol dehydrogenase의 활성은 확인 할 수 없었으며, 대부분 세포 내에 활성을 가지고 있음을 확인하였다.

하지만 세포추출액을 periplasmic space와 cytoplasmic space로 나누어서 조사해 본 결과, SEY2102 $\Delta$ trp1/pGMFa-P.XYL2 균주의 경우 효소활성의 약 77%가 periplasmic space에서 관찰되었으며, 이는 분비서열에 의해 cytosol에서 periplasmic space까지 xylitol dehydrogenase가 분비되었음을 알 수 있었다. 이는 xylitol dehydrogenase 단백질을 구성하는 아미노산의 charge 및 분비를 위한 다양한 factor의 영향에 의해 분비효율이 감소했을 가능성을 생각해 볼 수 있고, 분비서열의 사용에 의해서 다른 형질전환균주에서도 약 50%~61% 단백질을 periplasmic space까지 분비시킬 수 있음을 확인할 수 있었다. Xylan을 xylose로 분해하는  $\beta$ -xylosidase 효소의 경우에도 MFa s.s에 의한 분비 생산을 유도했을 때,  $\beta$ -xylosidase 단백질이 periplasmic space까지만 분비되는 것을 확인 할 수 있었는데, 이 또한  $\beta$ -xylosidase를 구성하는 소수성 아미노산의 비율과 막 투과성의 변화에 의한 것임을 알 수 있었다(data not shown).

**탄소원에 따른 xylitol dehydrogenase의 활성변화 조사**

*S. cerevisiae*에서 xylitol dehydrogenase의 활성이 배지 중의 탄소원(glucose, galactose and xylose)에 의해 조절되고 변화할 수 있다는 몇몇 보고[2, 20, 23]에 근거하여, 재조합 xylitol dehydrogenase 생산에 최적인 SEY2102 $\Delta$ trp1/pGMFa-P.XYL2 균주를 사용하여 다양한 배지조성과 조건에서 xylitol dehydrogenase의 활성 변화를 조사해보았다. 먼저 GAL10 promoter의 유도를 위해 사용하는 galactose 농도와 재조합 균주의 성장을 위한 glucose의 농도를 각각 1%에서 2%로 증가시켰을 경우, xylitol dehydrogenase의 활성은 약 20~34% 정도 증가되었음을 알 수 있었다. 다음으로 전체적인 탄소원의 농도를 4%로 고정하고 xylose를 추가하여 xylitol dehydrogenase의 활성증가를 비교해 본 결과, YPD(1%)G(1%) 배지에서의 경우보다는 약 32~41%의 효소활성 증가를 보였고, YPD(2%)G(2%) 배지에서의 경우와 비교하였을 때는 약 5~10% 정도의 활성 증가를 보임을 확인 할 수 있었다. 하지만 glucose가 배지 중에 존재하지 않고 galactose와 xylose만 첨가한 배지에서는 세포의 성장속도 및 xylitol dehydrogenase 효소활성의 저하(약 46~58% 활성감소)됨이 관찰되었다(Table 2). 이러한 결과로 기존에 보고[2, 20, 23]된 *S. cerevisiae* 유래의 xylitol de-

Table 2. Comparison of cell growth (DCW) and xylitol dehydrogenase (XDH) activity according to carbon sources composition in SEY2102 $\Delta$ trp1/pGMFa-P.XYL2 transformant

| Carbon sources    | 48 hr cultivation     |                        | 72 hr cultivation     |                        |
|-------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
|                   | Dry cell weight (DCW) | XDH activity (unit/mg) | Dry cell weight (DCW) | XDH activity (unit/mg) |
| YPD(1%)G(1%)      | 5.33                  | 0.059                  | 5.21                  | 0.057                  |
| YPD(2%)G(2%)      | 7.56                  | 0.071                  | 8.71                  | 0.079                  |
| YPD(1%)G(1%)X(2%) | 6.02                  | 0.078                  | 7.18                  | 0.083                  |
| YPG(2%)X(2%)      | 3.15                  | 0.025                  | 4.56                  | 0.032                  |

The transformant was cultivated in YPDG, YPDGX and YPGX medium for 48 hr and 72 hr.

hydrogenase와는 달리, *P. stipitis* 유래의 재조합 xylylitol dehydrogenase는 glucose와 xylose가 공존할 때 최대의 효소활성을 보인다는 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 xylan 또는 xylose로부터 바이오에탄올 생산을 위해 배지 중에 xylose가 첨가될 때 더 효율적인 xylylitol dehydrogenase 활성 증가를 기대 할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 lignocellulosic biomass (xylose)를 이용한 바이오에탄올 생산 및 부산물의 효과적인 이용을 위해 xylylitol dehydrogenase의 과발현시스템을 구축하였다. 효율적으로 xylylitol dehydrogenase를 분비 생산하기 위한 promoter의 선별, 유전자의 선별 및 탄소원에 대한 영향을 비교 분석하여 최적의 발현 조건을 제시하였으며, *S. cerevisiae*를 숙주세포로 하여 외래 유전자의 발현이 잘 조절되고 있음을 확인 할 수 있었다. 따라서, 본 연구에서 최적화한 발현 시스템은 xylose 뿐만 아니라 다양한 biomass를 이용한 bioethanol 생산을 위한 관련 단백질의 발현 분비시스템 구축 및 대량생산에도 응용될 수 있을 것이라 생각된다.

## 감사의 글

본 논문은 2014년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(과제번호: 2014R1A1A1003519)입니다. 연구비 지원에 감사 드립니다.

## References

- Arsenis, C. and Touster, O. 1969. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-linked xylylitol dehydrogenase in guinea pig liver cytosol. *J. Biol. Chem.* **244**, 3895-3899.
- Batt, C. A., Caryallo, S., Easson, D. D., Akedo, M. and Sinskey, A. J. 1986. Direct evidence for a xylose metabolic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **28**, 549-553.
- Bradford, M. M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Deng, X. X. and Ho, N. W. 1990. Xylulokinase activity in various yeasts including *Saccharomyces cerevisiae* containing the cloned xylulokinase gene. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **24/25**, 193-199.
- Eliasson, A., Christensson, C., Wahlbom, C. F. and Hahn-Hägerdal, B. 2000. Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying *XYL1*, *XYL2*, and *XKS1* in mineral medium chemostat cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3381-3386.
- Gietz R. D. and Schiestl, R. H. 1995. Transforming yeast with DNA. *Methods Mol. Cell. Biol.* **5**, 225-269.
- Hahn-Hägerdahl, B., Jeppson, H., Skoog, K. and Prior, B. A. 1994. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 933-943.
- Hou, J., Shen, Y., Li, X. P. and Bao, X. M. 2007. Effect of the reversal of coenzyme specificity by expression of mutated *Pichia stipitis* xylylitol dehydrogenase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Letts. Appl. Microbiol.* **45**, 184-189.
- Hummon, A. B., Lim, S. R., Difilippantonio, M. J. and Ried, T. 2007. Isolation and solubilization of proteins after TRIZOL extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage. *BioTechniques* **42**, 467-472.
- Kim, M. J., Kim, B. H., Nam, S. W., Choi, E. S., Shin, D. H., Cho, H. Y., Son, K. H., Park, H. Y. and Kim, Y. H. 2013. Efficient secretory expression of recombinant endoxylanase from *Bacillus* sp. HY-20 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Life Sci.* **23**, 863-868.
- Kim, M. J., Nam, S. W., Tamano, K., Machida, M., Kim, S. K. and Kim, Y. H. 2011. Optimization for production of exo- $\beta$ -1,3-glucanase (laminarinase) from *Aspergillus oryzae* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 427-432.
- Kim, S. R., Ha, S. J., Kong, I. I. and Jin, Y. S. 2012. High expression of *XYL2* coding for xylylitol dehydrogenase is necessary for efficient xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* **14**, 336-343.
- Kim, S. R., Kwee, N. R., Kim, H. J. and Jin, Y. S. 2013. Feasibility of xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing endogenous aldose reductase (*GRE3*), xylylitol dehydrogenase (*XYL2*), and xylulokinase (*XYL3*) from *Scheffersomyces stipitis*. *FEMS Yeast Res.* **13**, 312-321.
- Kim, Y. H., Ishikawa, D., Ho, P. H., Sugiyama, M., Kaneko, Y. and Haragima, S. 2006. Chromosome XII context is important for rDNA function in yeast. *Nucleic. Acids Res.* **34**, 2914-2924.
- Kötter, P. and Ciriacy, M. 1993. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 776-783.
- Latchinian-Sadek, L. and Thomas, D. Y. 1993. Expression, purification, and characterization of the yeast *KEX1* gene product, a polypeptide precursor processing carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* **268**, 534-540.
- Lim, M. Y., Lee, J. W., Lee, J. H., Kim, Y. H., Seo, J. H. and Nam, S. W. 2007. Secretory overexpression of clostridium endoglucanase A in *Saccharomyces cerevisiae* using *GAL10* promoter and exoinulinase signal sequence. *J. Life Sci.* **17**, 1248-1254.
- Matsushika, A., Watanabe, S., Kodaki, T., Makino, K., Inoue, H., Murakami, K., Takimura, O. and Sawayama, S. 2008. Expression of protein engineered NADP<sup>+</sup>-dependent xylylitol dehydrogenase increases ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **281**, 243-255.
- Nordling, E., Jörnval, H. and Persson, B. 2002. Medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR). Family characterizations including genome comparisons and active site modeling. *Eur. J. Biochem.* **269**, 4267-4276.
- Richard, P., Toivari, M. H. and Penttilä, M. 1999. Evidence that the gene *YLR070c* of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a xylylitol dehydrogenase. *FEBS Lett.* **457**, 135-138.
- Riveros-Rosas, H., Julián-Sánchez, A., Villalobos-Molina, R., Pardo, J. P. and Piña, E. 2003. Diversity, taxonomy and evo-

- lution of medium-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Eur. J. Biochem.* **270**, 3309-3334.
22. Rodriguez-Peña, J. M., Cid, V. J., Arroyo, J. and Nombela, C. 1998. The YGR194c (*XKS1*) gene encodes the xylulokinase from the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **162**, 155-160.
  23. van Zyl, C., Prior, B. A., Kilian, S. G. and Brandt, E. V. 1993. Role of D-ribose as a cometabolite in D-xylose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1487-1494.
  24. van Zyl, C., Prior, B. A., Kilian, S. G. and Kock, J. L. 1989. D-xylose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 2791-2798.
  25. Vernet, T., Dignard, D. and Thomas, D. Y. 1987. A family of yeast expression vectors containing the phage fl intergenic region. *Gene* **52**, 225-233.
  26. Zhang, J., Tian, S., Zhang, Y. and Yang, X. 2008. Construction of a recombinant *S. cerevisiae* expressing a fusion protein and study on the effect of converting xylose and glucose to ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **150**, 185-192.

### 초록 : 출아효모에서 xylitol dehydrogenase (XYL2)의 최적 생산을 위한 발현 시스템 구축

정희명<sup>1</sup> · 김연희<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>동의대학교 스마트바이오헬스학과, <sup>2</sup>동의대학교 바이오응용공학부 의생명공학전공)

본 연구에서는 lignocellulosic biomass (xylose)의 부가가치를 높이고 효율적인 활용을 위해 xylitol dehydrogenase를 *Saccharomyces cerevisiae* 숙주세포에서 분비 생산하고자 하였다. 먼저 *S. cerevisiae*와 *Pichia stipitis* 유래 XYL2 유전자(*S.XYL2* and *P.XYL2* gene)의 발현 시스템을 구축하기 위하여 *GAL10* promoter와 *ADH1* promoter 하류에 각각 mating factor  $\alpha$  (MF $\alpha$ ) signal sequence와 XYL2 유전자를 가진 pGMF $\alpha$ -*S.XYL2*, pGMF $\alpha$ -*P.XYL2*, pAMF $\alpha$ -*S.XYL2*와 pAMF $\alpha$ -*P.XYL2* plasmid를 구축하였다. 각각의 plasmid는 *S. cerevisiae* SEY2102 $\Delta$ trp1 균주에 형질전환되었고, 생산된 xylitol dehydrogenase의 활성을 조사해 본 결과, *GAL10* promoter가 *ADH1* promoter보다 XYL2 유전자의 발현에 더욱 적합함을 확인 할 수 있었다. 또한 *P. stipitis* 유래의 xylitol dehydrogenase 효소 활성이 *S. cerevisiae* 유래의 효소 활성보다 2배 이상 더 높았으며, 활성의 증가를 위해 두 유전자 모두 co-factor로 NAD<sup>+</sup>에 의존한다는 것을 확인하였다. 재조합 유전자가 가지는 분비서열에 의해 SEY2102 $\Delta$ trp1/pGMF $\alpha$ -*P.XYL2* 균주에서 xylitol dehydrogenase의 약 77%는 periplasmic space로 분비 발현되었음을 알 수 있었다. 또한 재조합 xylitol dehydrogenase의 효율적인 생산을 위해 탄소원의 영향을 조사해본 결과, glucose 단독보다 glucose와 xylose를 혼합 배양한 경우에서 효소활성이 최대 41% 정도 증가되었음을 확인 할 수 있었다. 본 연구에서 최적화된 발현 시스템 및 배양 조건은 xylose 뿐만 아니라 다양한 biomass를 이용한 유용물질 생산을 위한 관련 단백질의 발현 분비시스템 구축 및 대량생산에도 응용될 수 있을 것이라 생각된다.