최신 연구동향

효모를 이용한 단백질 대량 분비 발현

한국생명공학연구원
세포공장연구센터 성봉현
(bhsung@kribb.re.kr)

1. 개요

최근 많은 산업이 '친환경'을 강조하며 'natural', 'bio' 라는 말을 강조하고 있다. 제약 산업에서는 바이오의약품의 중요성이 부각되고 있고, 산업적 촉매로서 효소의 가치가 더욱 커지고 있다. 1982년 재조합 인슐린이 처음으로 소개된 이후 전세계 의료용 단백질 시장은 급속하게 팽창해 왔다. 현재 170종 이상의 단백질과 펩타이드가 FDA에서 승인되어 사용되고 있으며 2020년에는 전세계 단백질 의약품 시장이 3,200억 달러 규모에 이를 것으로 예측되고 있다. 산업용 효소 역시 2015년 46억 달러에서 2024년에는 약 100억 달러 이상으로 성장할 것으로 예상되고 있다(의약품 시장은 시장가치이고, 산업용 효소는 효소 자체의 가격이라 직접적으로 규모를 비교하기는 어렵다). 이렇게 중요한 단백질이 자연계에서는 많이 생산되지 않으므로, 의약용이나 산업용 유용 단백질들을 재조합 방법을 통해 대량생산하는 것이 중요하다.

의약용 단백질의 경우, 대장균을 비롯하여 효모, 동물 세포 등에서 많이 생산되고 있다(표 1). 많이 사용되는 단백질 생산 host는 저마다 다양한 특징이 존재하는데(표 2), 그 중 진핵생물인 효모 *Saccharomyces cerevisiae*는 GRAS (generally recognised as safe) 균주로 여러 장점을 가지고 있다. 비록 과당화(hyperglycosylation)가 일어나지만 이를 제외하고는 고등생물과 유사한 분비 경로 및 발현이후 변형(post-translational modification) 시스템을 가지고 있다. 그래서 대장균에서는 inclusion body로 발현되는 고등생물 유래 복잡한 단백질을 효과적으로 저렴하게 생산할 수 있다. 단백질 분비생산, 정제 측면에서 박테리아에 비해 유리하기 때문에 산업적으로 이용하기 위한 시도가 많았다. 효모는 리터당 수 그램 이상의 단백질을 생산하는 능력을 가지고 있지만, 목적단백질에 따른 생산량은 천차만별이다. 예를 들어 human serum albumin과 human gelatin의 경우에는 효모 *Pichia pastoris*에서 수 g/L를 분비한다(1,2). 하지만 의약용 단백질인

human interleukin-2, granulocyte-colony stimulating factor, platelet-derived growth factor는 아주 적은 양이 분비된다(3-5). 이처럼 단백질에 따른 생산성 차이 때문에 실험을 해보기 전까지는 아무것도 알 수가 없고, 이는 목적 단백질이 바뀔 때마다 다양한 방법과 조건에서 실험해야 한다는 문제가 있다. 따라서 분비능력이 제한적인 야생형 *S. cerevisiae*를 대사공학을 통하여 분비능력을 향상 시키려는 시도가 많이 이루어 졌고, 이를 통하여 down-stream process의 비용을 감소시키고자 하였다. 이 글에서는 yeast *S. cerevisiae*에서 단백질 분비 증가를 위한 최근의 연구들을 소개하고자 한다.

표 1. 대장균, 효모, 동물세포에서 생산되는 바이오의약 제품 예(6)

Therapeutic group	**Recombinant protein**	**Host**	**Protein properites**	
			Mw (kDa)	**Post-translational modification**
Blood factors, thrombolytics, anticoagulants	Factor VIII	Mammalian cells	267.0	Disulphide bonds, glycosylation, sulphation
	Tissue plasminogen activator	Mammalian cells, *E. coli* (fragment)	62.9	Proteolytic cleavage, disulphide bonds, glycosylation
	Hirudin	*S. cerevisiae*	7.0	Disulphide bonds, glycosylation, sulphation
Hormones	Insulin	*E. coli, S. cerevisiae*	12.0	Proteolytic cleavage, disulphide bonds
	Human growth hormone	*E. coli, S. cerevisiae*	24.8	Disulphide bonds, phosphoprotein
	Follicle-stimulating hormone	Mammalian cells	14.7 (subunit)	Disulphide bonds, glycosylation
	Glucagon	*E. coli, S. cerevisiae*	20.1	Amidation, proteolytic cleavage
Growth factors	Erythropoietin	Mammalian cells	21.3	Disulphide bonds glycosylation
	Granulocyte-colony stimulating factor	*E. coli*, mammalian cells	22.3	Disulphide bonds glycosylation
	Granulocyte–macrophage colony stimulating factor	*E. coli*	16.3	Disulphide bonds glycosylation
Cytokines	Interferon-alpha	*E. coli*	21.5	Disulphide bonds glycosylation
	Interferon-beta	*E. coli*	22.3	Disulphide bonds, glycosylation,

				phosphoprotein
Monoclonal antibodies, enzymes	Infliximab	Mammalian cells	144.2	Disulphide bonds glycosylation
	Enzymes Alpha-galactosidase	Mammalian cells	48.8	Disulphide bonds glycosylation
	Deoxyribonuclease	Mammalian cells	31.4	Disulphide bonds glycosylation
	Uricase	*S. cerevisiae*	34.2	Acetylation

표 2. 단백질 발현 시스템 비교

Expression System	Ease of Handling and Scale-Up*	Protein Expression Level	Cytotoxic Mammalian Proteins	Percent Yield (Based on Dry Weight)	PTMs†	Applications
Bacterial	****	Up to 10–30 g/L	Yes	1–5%	+	Functional assays Structural analysis Antibody generation Protein interactions
Yeast	***	Up to 30 g/L	Yes	1%	++	Functional assays Structural analysis Antibody generation Protein interactions
Insect	**	Up to 500 mg/L	Yes	30%	+++	Functional assays Structural analysis Antibody generation
Mammalian	*	Under 10 mg/L		<1%	++++	Functional assays Protein interactions Antibody generation
Cell free	*	1–3 mg	Yes	N/A	++	Functional assays Protein interactions

*Most difficult handling: ****; easiest handling: *.
†Very minimal PTM: +; PTM the closest to that in naturally occurred proteins: ++++.

출처: http://www.chromatographyonline.com/popular-cell-expression-systems-biotechnology-industry

2. 효모의 단백질 분비

박테리아에서는 세포막이나 외부로 바로 단백질이 분비되는 것에 반해, 진핵생물은 세포 내부의 소포체 (endoplasmic reticulum, ER)-Golgi 경로를 이용한다(그림 1). 핵에서 나온 RNA가 cytosol에서 translation되어 단백질이 형성되면 ER membrane을 통해 ER 안으로 들어간다. 이 때 꼭 필요한 것이 단백질의 N-말단에 존재하는 secretion signal peptide이다. 효모 S. cerevisiae에서는 전체 단백질의 9.2%인 543개의 단백질에 signal peptide가 있는 것으로 추정된다(7). ER에서 signal peptidase에 의해 signal peptide가 절단되고, 단백질은 구조형성(folding)을 통해 Golgi로 translocation된 뒤, post-translational modification이 일어난다. 이 후 단백질은 secretory vesicles에 쌓여 세포표면으로 이동하여 분비된다.

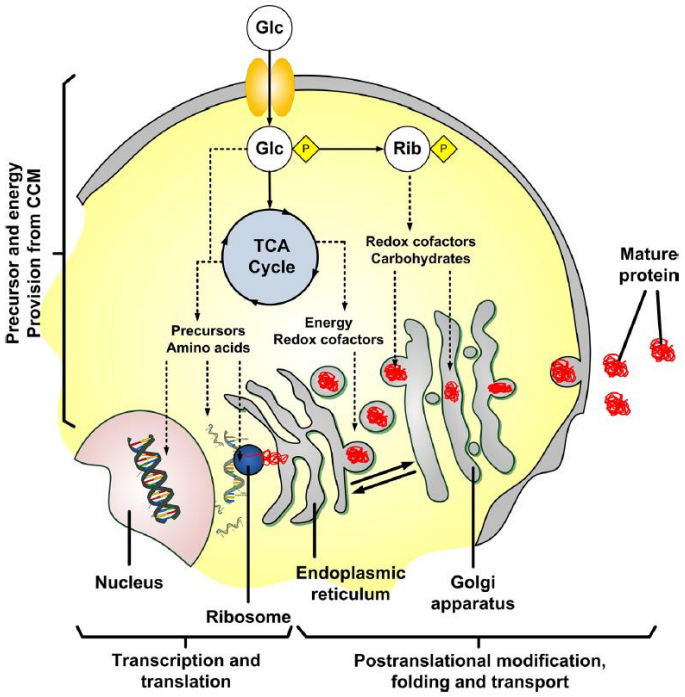

그림 1. 일반적인 효모의 단백질 분비 경로 (8)

이처럼 효모는 단백질 분비에 적합한 기구를 가진 host이나, 단백질에 따라 분비가 잘 되지 않는 경우가 많다. 효모에서 분비가 잘 안되는 단백질을 분비하기 위해서, 또한 분비경로에 대한 이해를 위해서 많은 연구가 수행되었다(9). 외부 단백질이 과발현되면 ER내 단백질 구조형성 장치(folding machinery)가 포화될 수 있으며(10), ER 내 단백질의 구조형성, 접힘 속도는 과발현

단백질의 분비속도에 영향을 끼친다(11). 만약 단백질의 구조가 제대로 형성되지 않으면 ER의 품질제어 시스템 (ER quality control system) 때문에 분비경로를 지나가지 못한다(12). 구조를 제대로 형성하지 못한 단백질이 ER에서 뭉쳐지면, 비접힘단백질반응 (unfolded protein response)이 작동, ER-associated degradation(ERAD) pathway를 통해 단백질을 분해한다(13). 단백질이 뭉쳐지고 분해되는 것을 방지하고 제대로 된 단백질 구조형성(접힘)을 위해서 trans-acting chaperones(14,15) 과 cis-acting chaperones (secretory fusion partners)(16-18)이 연구되었다.

여러 signal peptide를 적용한 단백질 분비 연구에서는 목적 단백질에 따라 다양한 분비 효과를 보였다. secretion signal을 논리적으로(rational design), 혹은 임의적으로 돌연변이(directed evolution)를 일으켜 단백질 분비가 증가 되기도 했다(19,20). 그런데 이 역시 앞서 언급한 것과 마찬가지로 모든 외부 단백질에 작용가능 하지 않았다. 즉 어느 단백질에나 다 잘 작동하는 signal peptide가 없어, 목적 단백질에 적합한 signal peptide를 탐색해야 했다. Signal peptide에 의해 소포체 (ER)로 이동한 재조합 단백질의 구조가 제대로 형성되지 않으면 ER 스트레스를 유발하게 되고, unfolded protein이 ER에 축적되면 UPR가 작동한다. UPR의 주요 조절 인자 중 하나인 전사 인자 Hac1p을 과발현 하면 단백질의 분비가 증가된다고 보고되었다(21). 또한 ER에서 이황화결합 형성에 중요한 역할을 하는 Chaperone PDI1를 과발현하면 단백질의 분비가 증가되었다(10). ER에서 Golgi로의 소포체 전달을 증가시키기 위하여 Sly1p와 Sec1p를 과발현 하면 단백질 분비를 증가시킬 수 있었으며(22), ER exit site에 축적되어 ER에서 Golgi로 단백질을 운반하는 coat protein complex (COP) Ⅱ 소낭을 형성하는데 관여하는 Sec16p를 적당히 발현하면 단백질 분비가 증가되었다(23). 그리고 ER과 Golgi 사이의 COP 밸런스를 조절하기 위하여 Glo3p를 과발현 하였을 때, 재조합 단백질의 분비가 더 증가되었다(24). 이러한 방법을 통하여 몇몇 단백질의 분비효율이 증가되었지만, 이 또한 단백질에 따라서 제한적이었다(25-27). 이는 모든 단백질에 적용가능한 단 하나의 특정 단백질 분비 시스템을 구축하는 것은 어렵다는 것을 의미한다.

3. Translational fusion partner (TFP)를 이용한 단백질 분비

앞서 언급한 것처럼, 단백질의 분비 발현을 위해서는 secretion signal peptide가 중요하다. 일반적으로 효모에서는 단백질 분비발현을 위하여 MF , Inv, Pho5, KT, -Amy의 signal protein을 많이 사용하는 편이다. 하지만 이러한 다양한 signal peptide를 사용한 경우에도 분비가 잘 되는 단백질이 있고, 그렇지 못한 것도 있었다. 이는 단백질 분비에 있어서 단순히 signal peptide만 영향을 끼치는 것이 아니라 단백질의 특징(charge, hydrophobicity, structure 등)도 영향을 끼치기 때문이다. 그래서 단순하게 signal sequence만 붙이는 것이 아니라 분비가 잘되는 단백질을 fusion하여 translational fusion partner(TFP)로 이용하면 fusion partner의 효과로 단백질이 분비가 될 수 있다는 것이 보고되었다(17,18,28). 최근에는 단백질 분비에 효율적인 fusion partner로 몇몇 유전자를 활용하는 것을 넘어서, 각 목적 단백질에 적합한 TFP를 yeast genome에서 찾기 위해 random priming을 통해서 많은 수의 fusion partners library를 구축하고 스크리닝하는 방법이 보고되었다(그림 2a). 그리고 이러한 TFP library를 목적단백질(X)과 invertase(suc2)에 결합한 뒤, invertase 결손 세포에 도입하였다. 목적단백질과 함께 invertase가 분비되는 세포만이 sucrose를 포함하는 plate에서 성장이 가능하므로, 이를 기반으로 plate에서 자라는 colony에서 목적단백질의 분비가 가능하게 하는 TFP를 선별하였다. 이후 선별한 TFP와 목적 단백질(X)만을 이용하여 목적단백질이 분비되는 것을 확인하였다. 이 때, TFP와 목적단배질 사이에 kex2 cleavage site를 도입하여 분비되는 목적단백질 X는 mature한 형태로 발현되게 되는 방식이다. 관련 연구진에서는 이를 다양한 단백질에 적용한 결과, 20개 내외의 특정 TFP 들이 단백질 분비에 주로 이용되는 것을 확인하고 이를 기본 시스템으로 제작한 뒤 효모 단백질 분비에 사용하여 interleukin, human growth hormone, lipase, cellulase 분비 균주 탐색에 활용되었다(그림 2b)(29,30).

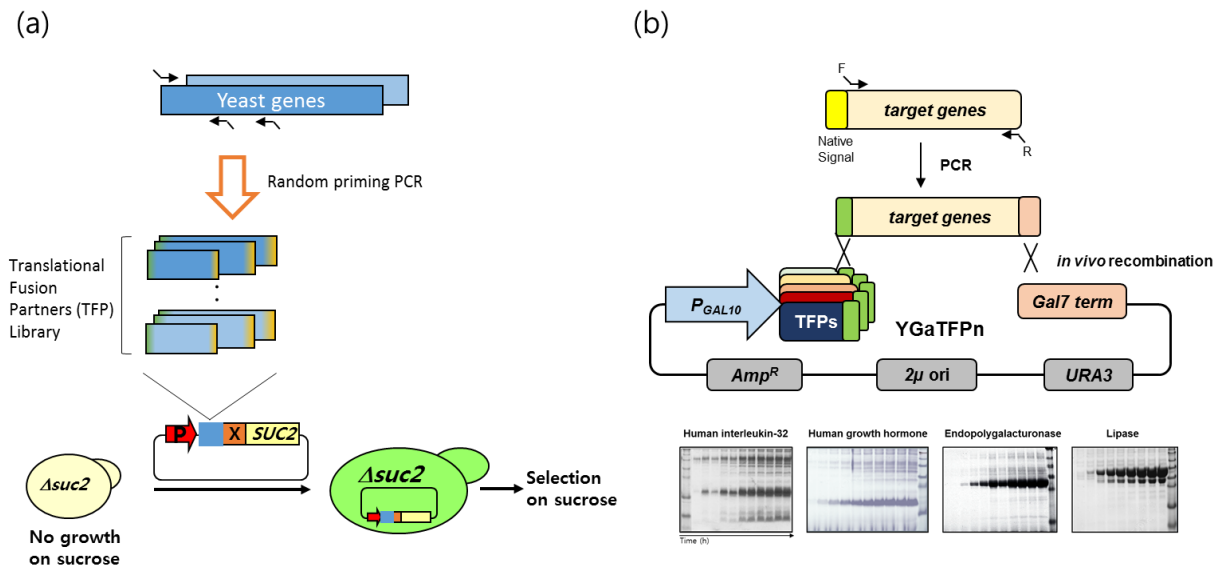

그림 2. TFP library 구축 및 분비 단백질 선별 방법

4. Spinach aptamer를 이용한 단백질 고분비 strain screening

다양한 돌연변이 균주 라이브러리에서 단백질 고분비 균주를 선별하기 위해서는 적합한 screening 방법이 존재하는 것이 필수적이다. 기존 lipase 분석을 위한 tributyrin agar plate 및 protease 분석을 위한 casein agar plate 등 타겟 단백질 고분비 균주 screening 방법이 있는 경우 선별이 쉬운 편이나 그렇지 않은 경우, 배지 상에서 결과산물이 섞이는 문제가 있어 우수한 단백질 분비 균주를 screening하는 것은 쉽지 않다. 이러한 문제의 해결을 위해서 최근에는 liquid droplet 안에서 단일세포를 키우고 FACS를 이용해 대량으로 선별하는 연구가 진행되고 있다(31), 최근에는 특정 아미노산이나 단백질에 결합한 후 형광을 내는 Spinach aptamer를 선별한 뒤, 이를 활용하여 단백질 고분비 single cell을 liquid droplet에서 형광으로 선별하는 방법이 개발되었다(32). 단백질이 많이 분비될 경우 droplet 안에서 형광이 더 강하게 나오게 되어 FACS를 이용하여 cell sorting이 가능하다. 이 논문에서는 thrombin과 streptavidin에 한정해 screening을 했지만, 목적 단백질에 맞는 Spinach aptamer를 개발한다면 형광으로 목적 단백질 고분비 균주를 선별할 수 있을 것이다.

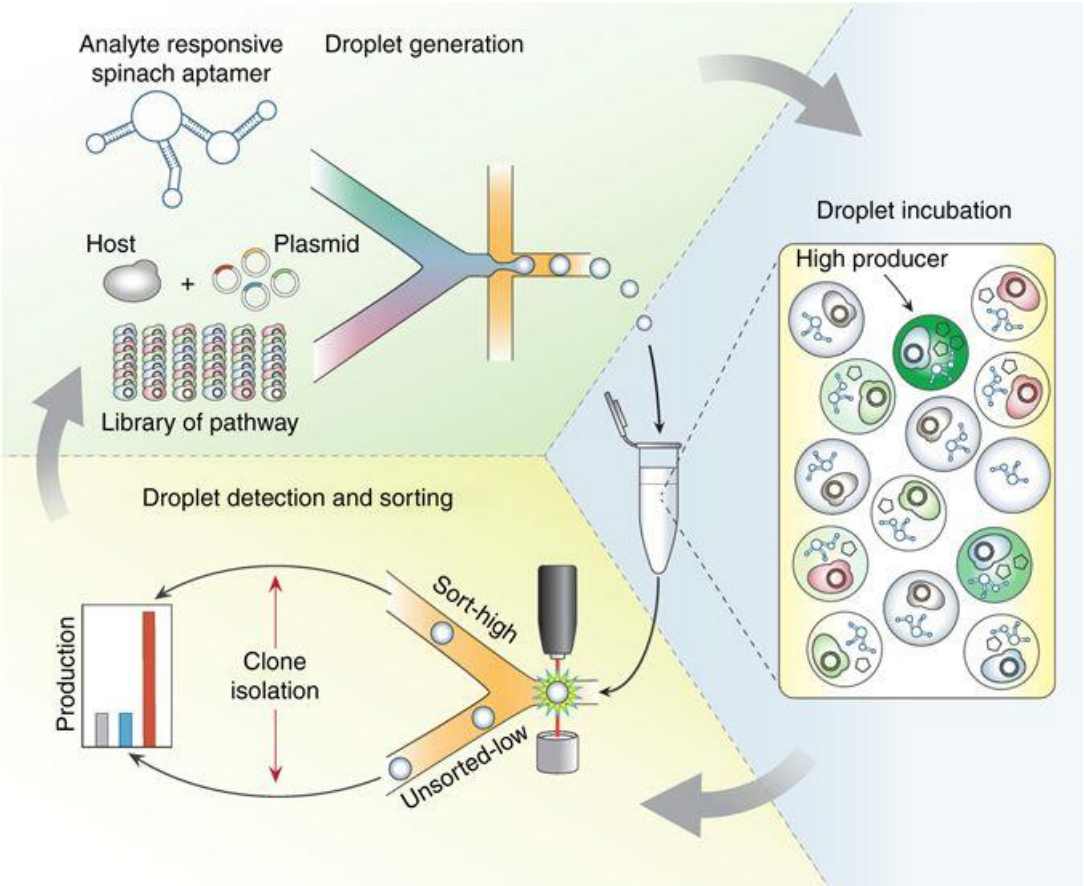

그림 3. RNA-aptamers-in-droplets screening system (32).

5. 단백질 고분비 돌연변이 효모의 유전학적 분석

효모의 단백질 분비 시스템은 아주 복잡하며, 소수의 요소로 인해 결정되는 것이 아니므로 단백질 고분비 효모를 이론적 설계를 통해 구축하기 어렵다. 그래서 단백질 분비능이 증가도니 다양한 효모들의 유전 분석을 통하여 공통점을 찾고자 하는 시도가 있다. -amylase 분비가 증가된 다양한 돌연변이 library를 구축하고, 이를 microfluidics와 반응 결과물의 형광을 이용해 단백질 고분비 단일세포들을 선별하였다(31). 이렇게 선별된 8개 균주의 특징을 genome sequencing을 통하여 확인한 결과, 총 330개의 돌연변이 유전자를 발견하였고, 그림 4에서와 같이 많은 유전자들이 단백질 분비 시스템과 관련한 돌연변이 임을 확인하였다. 또한 이 돌연변이 효모 균주의 단백질 분비 시 변화되는 전사 반응 요소를 next generation sequencing 을 이용하여 확인한 결과, 단백질 고분비를 위해서는 단순한 한 두군데의 조절이 아닌 전체적인 대사의 조절이 필요하다는 것을 확인하였다(33).

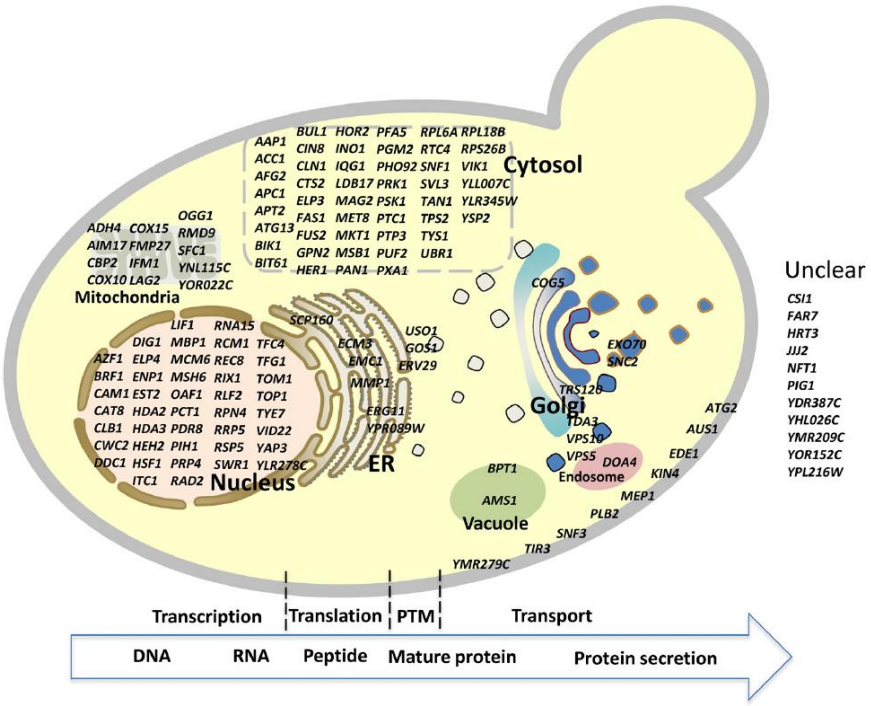

그림 4. 8종의 amylase 분비생산 증대 돌연변이의 염기서열 분석을 통하여 확인한 변이 유전자들 (31)

6. 고찰

바이오 의약 뿐 아니라 산업용 효소, 식·미용 단백질의 수요 증가에 따라 고기능 단백질(효소 포함) 제작 및 생산의 중요성은 지속적으로 증가할 것으로 보인다. 이러한 단백질을 값싸게 대량생산하는 방법에 대한 수요도 꾸준히 늘어날 것이다. GRAS 미생물이면서도 진핵세포 단백질 분비 시스템을 가지고 있는 효모를 이용한 단백질 분비 시스템 개발 연구는 학문적으로나 산업적으로 중요한 연구 분야이다. 위에서 언급한 것처럼, 효모의 단백질 분비시스템은 복잡하여 단순히 한두군데 조작을 통하여 얻기는 쉽지 않다. 하지만 최근 합성생물학적으로 복잡한 단백질 분비 시스템의 biopart 개선, 이들 간의 상호 작용, 조절 연구가 NGS 및 CRISPR 활용 genome editing과 결합되어 진행되고 있다. 복잡한 단백질 분비 메카니즘으로 인해 정답이 밝혀지지 않았지만, 지속적인 노력을 통하여 주어진 문제가 조금씩 해결되지 않을까 한다. 이데 덧붙여, 현재 전세계 여러 합성생물학 연구진이 Sc 2.0 프로젝트를 통하여 새로운 인공효모를 제작하고 있다(http://syntheticyeast.org). 지금은 새로운 효모 유전체 제작에 초점이 맞추어져 있지만, 어느

정도 시간이 지나면 이를 활용한 단백질 분비 효모 연구도 진행될 것으로 생각된다. 다양한 합성생물학 기술과 접목되어 유용한 단백질을 대량으로 생산할 수 있는 시기가 머지않아 도래하기를 기대해 본다.

7. 참고문헌

1. Kobayashi, K., Kuwae, S., Ohya, T., Ohda, T., Ohyama, M., Ohi, H., Tomomitsu, K., and Ohmura, T. (2000) High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast Pichia pastoris with minimal protease production and activation. *J. Biosci. Bioeng.* **89**, 55-61
2. Werten, M. W., van den Bosch, T. J., Wind, R. D., Mooibroek, H., and de Wolf, F. A. (1999) High-yield secretion of recombinant gelatins by Pichia pastoris. *Yeast* **15**, 1087-1096
3. Anzur Lasnik, M., Nemec, M., Romih, R., and Schara, M. (2003) An EPR study of the secretion of G-CSF heterologous protein from Pichia pastoris. *Biotech. Bioeng.* **81**, 768-774
4. Guan, B., Chen, F., Lei, J., Li, Y., Duan, Z., Zhu, R., Chen, Y., Li, H., and Jin, J. (2013) Constitutive expression of a rhIL-2-HSA fusion protein in Pichia pastoris using glucose as carbon source. *Appl. Biochem. Biotech.* **171**, 1792-1804
5. Ernst, J. F. (1988) Efficient secretion and processing of heterologous proteins in Saccharomyces cerevisiae is mediated solely by the pre-segment of alpha-factor precursor. *DNA* **7**, 355-360
6. Berlec, A., and Strukelj, B. (2013) Current state and recent advances in biopharmaceutical production in Escherichia coli, yeasts and mammalian cells. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 257-274
7. Delic, M., Valli, M., Graf, A. B., Pfeffer, M., Mattanovich, D., and Gasser, B. (2013) The secretory pathway: exploring yeast diversity. *FEMS Microbiol Rev* **37**, 872-914
8. Klein, T., Niklas, J., and Heinzle, E. (2015) Engineering the supply chain for protein production/secretion in yeasts and mammalian cells. *J. Ind Microbiol.* **42**, 453-464
9. Hou, J., Tyo, K. E., Liu, Z., Petranovic, D., and Nielsen, J. (2012) Metabolic engineering of recombinant protein secretion by Saccharomyces cerevisiae. *FEMS Yeast Res* **12**, 491-510
10. Schroder, M. (2008) Engineering eukaryotic protein factories. *Biotechnol. Lett.* **30**, 187-196
11. Young, C. L., and Robinson, A. S. (2014) Protein folding and secretion: mechanistic insights advancing recombinant protein production in S. cerevisiae. *Curr. Opin. Biotechnol.* **30**, 168-177
12. Sitia, R., and Braakman, I. (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature* **426**, 891-894
13. Thibault, G., and Ng, D. T. (2012) The endoplasmic reticulum-associated degradation pathways of budding yeast. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**

14. Shusta, E. V., Raines, R. T., Pluckthun, A., and Wittrup, K. D. (1998) Increasing the secretory capacity of Saccharomyces cerevisiae for production of single-chain antibody fragments. *Nat Biotechnol* **16**, 773-777
15. Smith, J. D., Tang, B. C., and Robinson, A. S. (2004) Protein disulfide isomerase, but not binding protein, overexpression enhances secretion of a non-disulfide-bonded protein in yeast. *Biotech. Bioeng.* **85**, 340-350
16. Han, K. S., Kim, S. I., Choi, S. I., and Seong, B. L. (2005) N-Glycosylation of secretion enhancer peptide as influencing factor for the secretion of target proteins from Saccharomyces cerevisiae. *Biochem Biophys Res Commun* **337**, 557-562
17. Andres, I., Gallardo, O., Parascandola, P., Javier Pastor, F. I., and Zueco, J. (2005) Use of the cell wall protein Pir4 as a fusion partner for the expression of Bacillus sp. BP-7 xylanase A in Saccharomyces cerevisiae. *Biotechnol. Bioeng.* **89**, 690-697
18. Ahn, J. O., Choi, E. S., Lee, H. W., Hwang, S. H., Kim, C. S., Jang, H. W., Haam, S. J., and Jung, J. K. (2004) Enhanced secretion of Bacillus stearothermophilus L1 lipase in Saccharomyces cerevisiae by translational fusion to cellulose-binding domain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 833-839
19. Rakestraw, J. A., Sazinsky, S. L., Piatesi, A., Antipov, E., and Wittrup, K. D. (2009) Directed evolution of a secretory leader for the improved expression of heterologous proteins and full-length antibodies in Saccharomyces cerevisiae. *Biotechnol. Bioeng.* **103**, 1192-1201
20. Kjeldsen, T., Pettersson, A. F., Hach, M., Diers, I., Havelund, S., Hansen, P. H., and Andersen, A. S. (1997) Synthetic leaders with potential BiP binding mediate high-yield secretion of correctly folded insulin precursors from Saccharomyces cerevisiae. *Protein Expr Purif* **9**, 331-336
21. Valkonen, M., Penttila, M., and Saloheimo, M. (2003) Effects of inactivation and constitutive expression of the unfolded- protein response pathway on protein production in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Appl Environ Microbiol* **69**, 2065-2072
22. Hou, J., Tyo, K., Liu, Z., Petranovic, D., and Nielsen, J. (2012) Engineering of vesicle trafficking improves heterologous protein secretion in Saccharomyces cerevisiae. *Metab Eng* **14**, 120-127
23. Bao, J., Huang, M., Petranovic, D., and Nielsen, J. (2017) Moderate Expression of SEC16 Increases Protein Secretion by Saccharomyces cerevisiae. *Appl Environ Microbiol* **83**
24. Bao, J., Huang, M., Petranovic, D., and Nielsen, J. (2018) Balanced trafficking between the ER and the Golgi apparatus increases protein secretion in yeast. *AMB Express* **8**, 37
25. Bao, W. G., and Fukuhara, H. (2001) Secretion of human proteins from yeast: stimulation by duplication of polyubiquitin and protein disulfide isomerase genes in Kluyveromyces lactis. *Gene* **272**, 103-110
26. Morris, J. A., Dorner, A. J., Edwards, C. A., Hendershot, L. M., and Kaufman, R. J. (1997) Immunoglobulin binding protein (BiP) function is required to protect cells from endoplasmic reticulum stress but is not required for the secretion of selective proteins. *J Biol Chem* **272**,

4327-4334

27. van der Heide, M., Hollenberg, C. P., van der Klei, I. J., and Veenhuis, M. (2002) Overproduction of BiP negatively affects the secretion of Aspergillus niger glucose oxidase by the yeast Hansenula polymorpha. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**, 487-494
28. Bae, J. H., Sung, B. H., Seo, J. W., Kim, C. H., and Sohn, J. H. (2016) A novel fusion partner for enhanced secretion of recombinant proteins in Saccharomyces cerevisiae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 10453-10461
29. Lee, C. R., Sung, B. H., Lim, K. M., Kim, M. J., Sohn, M. J., Bae, J. H., and Sohn, J. H. (2017) Co-fermentation using Recombinant Saccharomyces cerevisiae Yeast Strains Hyper-secreting Different Cellulases for the Production of Cellulosic Bioethanol. *Sci. Rep.* **7**, 4428
30. Bae, J. H., Sung, B. H., Kim, H. J., Park, S. H., Lim, K. M., Kim, M. J., Lee, C. R., and Sohn, J. H. (2015) An Efficient Genome-Wide Fusion Partner Screening System for Secretion of Recombinant Proteins in Yeast. *Sci. Rep.* **5**, 12229
31. Huang, M., Bai, Y., Sjostrom, S. L., Hallstrom, B. M., Liu, Z., Petranovic, D., Uhlen, M., Joensson, H. N., Andersson-Svahn, H., and Nielsen, J. (2015) Microfluidic screening and whole-genome sequencing identifies mutations associated with improved protein secretion by yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E4689-4696
32. Abatemarco, J., Sarhan, M. F., Wagner, J. M., Lin, J. L., Liu, L., Hassouneh, W., Yuan, S. F., Alper, H. S., and Abate, A. R. (2017) RNA-aptamers-in-droplets (RAPID) high-throughput screening for secretory phenotypes. *Nat Commun* **8**, 332
33. Huang, M., Bao, J., Hallstrom, B. M., Petranovic, D., and Nielsen, J. (2017) Efficient protein production by yeast requires global tuning of metabolism. *Nat Commun* **8**, 1131