



공학석사학위논문

Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of Shinorine, a natural sunscreen material

Saccharomyces cerevisiae 의 대사공학을 통한

천연 자외선 차단 물질 시노린 생산

2021년 8월

서울대학교 대학원

공과대학 화학생물공학부

진 채 연

Metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae for production of Shinorine, a natural sunscreen material

지도 교수 한지 숙

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함 2021 년 6 월

> 서울대학교 대학원 화학생물공학부 진 채 연

진채연의 공학석사 학위논문을 인준함 2021 년 7 월



초 록

시노린은 남조류, 곰팡이 등이 생산하는 천연 자외선 차단 물질 마 이코스포린 유사 아미노산 (mycosporine-like amino acids, MAAs)에 포함되는 물질이다. 30가지 이상의 물질들이 알려져 있는 마이코스포린 유사 아미노산 중에서도 시노린은 자외선 흡수 파장대가 300~360 nm로 단독으로 사용하여 도 지표면에 도달하는 자외선을 충분히 커버할 수 있고 높은 몰흡광계수에 의해 자외선 차단 효율이 높아서 천연 자외선 차단 물질로 사용하기에 적합 하다. 또한 이러한 천연 자외선 차단 물질을 사용함으로써 현재 쓰이는 화 학적 및 물리적 성분의 단점들을 해결할 수 있다.

본 연구에서는 무작위로 도입했던 자일로스 동화 경로의 유전자 카 세트를 비활성화된 HIS3 부위에 재도입하여 선행 연구에서 제작한 시노린 생산능과 자일로스 소모능을 가진 S. cerevisiae 균주를 안정화시켰다. 이후 해당 과정 및 포도당 억제 약화, 경쟁 경로 제거 등의 전략을 유전자 결손 을 통해 진행하여 sedoheptulose 7-phosphate (S7P) 의 생산량을 늘림으로써 시노린 생산량을 증가시키고자 하였다. 이 중에서 HXK2 결손 균주의 시노 린 생산량이 1.3배 증가하여 가장 좋은 효과를 보였다. 또한 도입해준 N. punctiforme 유래의 시노린 생합성 경로의 유전자 NpR5600, NpR5599, NpR5598, NpF5597를 각각 과발현하여 속도 결정 단계가 NpR5600이 관여하 는 첫 번째 반응임을 발견했다. 다른 미세조류 유래의 유전자의 효과를 비 교하기 위해 A. variabilis 유래 유전자 Ava3858과 A. mirum 유래 유전자 Amir4259를 동일하게 과발현 하였다. 44.18 mg/L and 17.02 mg/g DCW 의 시 노린을 생산하는 Ava3858 과발현 균주는 시노린 생산량에서 1.3 배 증가를 보였고, 가장 많은 시노린을 생산하였다. 동일한 과발현 방법으로 오탄당 인 산 경로 일부인 glucose 6-phosphate (G6P) 에서 ribulose 5-phosphate (Ru5P) 로 전환되는 반응에 관여하는 유전자들을 과발현하여 포도당으로부터 오탄

i

당 인산 경로로의 흐름을 늘리고자 하였다. 그 결과 ZWF1이 과발현 되었을 때 함량이 1.22배 증가하였다.

마지막으로 가장 많은 시노린을 생산했던 *Ava3858* 과발현 균주를 최종 균주로 사용하여, 포도당과 자일로스 비율이 다양한 배지로 실험을 진 행하였다. 그 결과 14 g/L 포도당과 6 g/L 자일로스가 포함된 배지에서 배양 하였을 때 최대 농도인 68.41 mg/L의 시노린을 생산하였고 최대 함량은 17.85 mg/g DCW로 12 g/L 포도당과 8 g/L 자일로스가 포함된 배지에서 배양 한 경우이다.

주요어: 시노린, Saccharomyces cerevisiae, 오탄당 인산 경로, 해당 과정, Hexokinase 2 (Hxk2), Sedoheptulose 7-phosphate (S7P)

학번: 2019-29209

Contents

Chapter 1. Introduction	. 1
1.1. Mycosporine-like amino acids와 shinorine	2
1.2. Shinorine 생산 연구 동향	3
1.3. S. cerevisiae에서의 shinorine 생산	. 4
1.4. 연구 목표	7
Chapter 2. Materials and methods	9
2.1. 사용된 균주 및 제작 방법	10
2.2. 플라스미드 제작	12
2.3. 배양 조건	18
2.4. 시료 채취 및 검출 방법	. 19
Chapter 3. Results and discussion	. 21
3.1. Xylose-utilization 유전자 재도입을 통한 균주 안정화	22
3.2. 유전자 결손을 통한 glycolysis 약화 및 경쟁경로 제거	26
3.3. 다양한 미세조류 유래의 DDGS 과발현 효과	28
3.4. Pentose phosphate 경로 유전자의 과발현 효과	31
3.5. 최적의 포도당과 자일로스 비율을 위한 배지 최적화	33
Chapter 4. Conclusions	. 35
References	. 39
Abstract	. 43

List of Tables

Table 1. Overview of studies for production of shinor	rine using various
microorganisms	5
Table 2. Strains used this study	11
Table 3. Primer sequences used this study	14
Table 4. Plasmids used this study	

List of Figures

Figure 1. Metabolic pathway for shinorine production using S. cerevisiae
in the previous study6
Figure 2. Objectives for increasing shinorine production
Figure 3. Re-construction of xylose consuming S. cerevisiae by HIS3 site
integration of xylose-utilization genes
Figure 4. The effect of <i>TAL1</i> deletion on increasing shinorine production.
Figure 5. Effects of attenuating glycolysis and eliminating competitive re-
action through gene deletion on shinorine production
Figure 6. Overexpression effects of the introduced shino rine biosynthesis
genes from <i>N. punctiforme</i> 29
Figure 7. Effects of DDGS overexpression from other microorganisms 30
Figure 8. Effects of overexpression of genes corresponding to the begin-
ning of the pentose phosphate pathway to enhance flux
into this pathway32
Figure 9. Optimization the ratio of glucose and xylose in the medium for
shinorine production in JHYS133-6

Chapter 1. Introduction

1.1. Mycosporine-like amino acids와 shinorine

자외선은 파장대에 따라 UV-A(315~400 nm), UV-B(280~315 nm), UV-C (200~280 nm)로 나뉘는데 이 중 UV-A와 UV-B의 일부가 지표면에 도달 한다. 지구 온난화로 인한 오존층 파괴로 인해 피부 노화나 피부암 등을 유 발하는 자외선이 지표면에 도달하는 정도가 강해지면서 자외선 차단제에 대 한 필요성이 증가하고 있다. 현재 화장품 시장에서의 자외선 차단제에는 옥 시벤존 (oxybenzone), 아보벤존 (avobenzone) 등의 벤젠 계열의 물질이나 이 산화 타이타늄 (TiO₂), 산화 아연 (ZnO) 등이 쓰이고 있지만 이들은 인체에 대한 유해성이 존재하고 부작용을 일으킬 가능성이 있을 뿐만 아니라 환경 오염을 유발하는 등의 다양한 문제를 야기한다. 이러한 이유들로 자외선 차 단 소재에 대한 규제가 강화되고 있으며, 이를 대체할 수 있는 안정성이 높 은 물질 또는 천연 자외선 차단 물질의 필요성이 대두되고 있다.[1]

Mycosporine-like amino acids (MAAs) 는 미세조류나 곰팡이 등의 2차 대 사산물로 흡수한 자외선 에너지를 열 에너지로 전환하여 방출하는 생분해성 물질이고 268 ~ 362 nm의 최대 흡수 파장대를 가진다. 또한 무색이고 높은 안정성을 가질 뿐만 아니라 항산화, 주름개선 등의 효과가 있기 때문에 천 연 자외선 차단제로 사용되기에 적합하다. [2-6] 실제로 *Porphyra umbilicalis* 에서 추출된 MAAs가 포함된 자외선 차단제 Helioguard 365 (Mibelle Biochemistry), Helionori (Gelyma) 등의 상품이 개발되었다. [7,8] 하지만 이들 의 낮은 생산성과 복잡한 배양 조건 때문에 높은 생산 비용이 단점이고 이 들의 대사 공학을 통한 생산 증대가 어렵다는 문제가 있다.

30가지 이상의 물질이 알려진 MAAs에 속하는 shinorine은 자외선 흡수 범위는 300~360 nm이며 높은 몰흡광계수 (ε = 28 100 ~ 50 000 M⁻¹ cm⁻¹) 를 가지므로 자외선 차단 효율이 높다. [6, 9-11] 그리고 shinorine의 합성 유전자 와 생합성 경로가 잘 알려져 있으므로 대사공학적으로 활용하기에 적합하다.

1.2. Shinorine 생산 연구 동향

미세조류나 곰팡이 등에서 생산되는 shinorine은 pentose phosphate 경로 중간체인 sedoheptulose 7-phosphate (S7P) 로부터 2-demethyl 4-deoxygadusol (DDG), 4-deoxygadusol (4-DG), mycosporine-glycine (MG) 순서로 전환된 후 생산된다. 이 때 각각의 반응은 공통적으로 DDG synthase (DDGS), *O*-methyltransferase (O-MT), C-Nligase에 의해 진행되지만 MG에서 shinorine으로의 반 응에 관여하는 효소는 2가지 종류가 존재한다. 하나는 D-Ala-D-Ala ligase로 *Nostoc punctiforme* 유래의 NpF5597이 대표적이다. 이 효소의 경우 세린과 반응할 때 shinorine이 생성되고, 트레오닌과 반응하면 또 다른 MAAs 물질 인 porphyra-334가 생성된다. 다른 종류의 효소는 *Anabaena variabilis* 유래의 Ava3855나 *Actinosynnema mirum* 유래의 Amir4256과 같은 nonribosomal peptides (NRP)-like synthase 이다. [3, 5, 7, 9, 12]

기존의 shinorine 생산 방법은 자연적으로 MAAs를 생산해내는 균주로 부터 추출하는 것이었다. 하지만 생산성이 낮았기 때문에 이후의 연구들 에 서는 Escherichia coli, Corynebacterium glutamicum, Streptomyces avermitilis 등 의 다양한 이종 균주들을 이용하여 생산량 증대를 시도하였다.

상업적으로 사용된 MAAs는 *P. umbilicalis*에서 추출하였고 이 중 shinorine은 3.27 mg/g DCW 이다. [10] 또한 자연적으로 shinorine을 생산하는 균주에서 추출한 경우는 *A. variabilis* ATCC 29413에서 0.97 mg/g DCW를, *Fischerella sp.* PCC9339에서 0.76 mg/g DCW를 생산한 경우뿐이다. [12, 13] 이 후에는 밝혀진 shinorine 생합성 유전자를 이종 균주에 도입하여 생산을 진 행하였고 가장 먼저 사용한 균주는 *E. coli*이다. 이 때 *A. variabilis* 유래의 유 전자들을 도입하였지만 0.15 mg/L의 shinorine을 생산하는 데에 그쳤다. [14] 그리고 현재 가장 많은 shinorine을 생산한다고 알려진 균주는 *A. mirum* 유 래 유전자들을 도입한 *S. avermitilis* 균주이다. 이 균주를 10 L의 배양기에서 8일동안 배양한 결과 총 11.4 mg/g DCW, 154.1 mg/L의 shinorine을 생산하였 고 이는 현재 가장 높은 생산량이다. [9] 이후에도 *C. glutamicum*을 이용하여 19.1 mg/L를, *Synechocytis sp.* PCC6803 균주로부터 2.37 mg/g DCW를, *Methylomicrobium alcaliphilum 20Z*에서 17.13 mg/L의 shinorine을 생산하였다. [12, 15, 16]

위에서 설명한 shinorine에 대한 연구와 생산량은 Table 1에 정리하였다.

1.3. S. cerevisiae에서의 shinorine 생산

S. cerevisiae는 GRAS (generally recognized as safe) 에 속하여 생명 공학 산업이나, 대규모 연구 등에서 널리 사용되고 있다. 균주의 특징, 유전자, 경 로 등에 대해 자세히 연구가 되어있을 뿐만 아니라 유전자 조작 등과 같은 공학적인 방법들도 많이 밝혀져 있기 때문에 대사공학을 활용하기 위한 균 주로 사용하기 적합하다. [17, 18]

Table 1에서의 S. cerevisiae를 이용한 shinorine 생산은 본 연구실에서의 선행 연구이다. 이 연구에서는 N. punctiforme ATCC 29133 균주 유래의 shinorine 생합성 유전자들인 NpR5600, NpR5599, NpR5598, NpF5597을 무작위 로 도입하여 shinorine을 생산하는 S. cerevisiae 균주를 제작하였다. 또한 Scheffersomyces stipitis 유래의 xylose-utilization 유전자 카세트의 도입, 경쟁 경로 제거를 위한 TAL1 결손, STB5와 TKL1의 과발현을 이용한 pentose phosphate 경로 강화를 통해 shinorine 생산량을 증가시켰다. (Figure 1) 이후 배지 최적화로 shinorine이 최대로 생산되는 최적의 포도당과 자일로스 비율 을 결정하였고 이로부터 9.62 mg/g DCW, 31.0 mg/L의 최대 생산량을 얻었다. [19] 이는 보고된 결과 중 소규모 회분식 배양임에도 불구하고 높은 값을 가 질 뿐만 아니라 S. cerevisiae를 최초로 이용한 연구라는 가치를 가지고 있다.

Strain	Origin of gene cluster	Content (mg/g DCW)	Titer (mg/L)	Culture conditions	Reference
Natural hosts					
Anabaena variabilis	Anabaena variabilis	0.97		BG_{11} medium, 20 °C, 72 hr	[13]
Porphyra umbilicalis	Porphyra umbilicalis	3.27		P. umbilicalis culture.	[10]
Fischerella sp.	Fischerella sp.	0.76	0.29	BG_{11} medium, 26 °C, 21 days	[12]
Heterologous hosts					
Escherichia coli	Anabaena variabilis	·	0.15	LB medium, 20 °C, 20 hr, 500 mM IPTG induction	[14]
Streptomyces avermitilis	Actinosynnema mirum	11.4	154.1	SC medium (60 g/L glucose and 400 mM NH4Cl), 28 °C, 8 days, 10L fermenter	[6]
Corynebacterium glutamicum	Actinosynnema mirum	ı	19.1	BHI medium (40 g/L sodium D-gluconate and 0.5% CaCO ₃), 30 °C, 72 hr, Fed-batch	[15]
Synechocytis sp.	Fischerella sp.	0.23	0.07	BG_{11} medium, 26 °C, 21 days	[12]
Synechocytis sp.	Fischerella sp.	2.37	0.71	BG_{11} medium (0.5 mM serine), 26 °C, 13 days	[12]
Methylomicrobium alcaliphilum 20Z	Nostoc punctiforme	I	17.13	NMS medium (50 % v/v methane, 10 g/L xylose), 30 °C, 216 hr	[16]
Saccharomyces cerevisiae	Nostoc punctiforme	9.62	31.0	SC-Trp medium (8 g/L xylose and 12 g/L glucose), 30 °C, 120 hr	[19]



Figure 1. Metabolic pathway for shinorine production using S. cerevisiae in the previous study

Dash boxes are introduced pathways to *S. cerevisiae* for shinorine. NpR5600 (DDG synthase, DDGS), NpR5599 (*O*-methyltransferase, O-MT), NpR5598 (C-N ligase), and NpF5597 (D-Ala-D-Ala ligase) of *N. punctiforme* were introduced to *S. cerevisiae*. And xylose reductase (Xyl1), xylitol dehydrogenase (Xyl2) and xylulokinase (Xyl3) were introduced for increasing shinorine production. Thick arrows and letters indicate overexpression of the corresponding genes. Double line is deletion of genes.; G6P, glucose 6-phosphate; F6P, fructose 6-phosphate; G3P, glycerol 3-phosphate; Ru5P, ribulose 5-phosphate; Rtp, ribulose 5-phosphate; E4P, erythrose 4-phosphate; DDG, 2-demethyl-4-deoxygadusol; 4-DG, 4-deoxygadusol; MG, mycosporine-glycine; Stb5, sin three binding protein 5; Tk11, transketolase 1; Tal1, transaldolase 1;

1.4. 연구 목표

본 연구는 선행 연구의 균주에서 도입하였던 xylose-utilization 유전자 카세트의 위치를 조정하여 유전자 발현의 불안정성을 해결하였다. S. cerevisiae는 포도당을 가장 선호하며 Crabtree-positive 균주이다. 그리고 포 도당과 다른 탄소원을 함께 사용하는 하는 경우 glucose repression이 일어나 므로 포도당이 모두 소모된 이후에만 다른 탄소원이 소모된다는 문제점이 있다. [20-22] 본 연구는 포도당과 함께 자일로스를 사용하여야 했기 때문에 이 문제점을 해결할 필요가 있었다. 따라서 glycolysis 및 glucose repression 에 관여하는 HXK2, glycolysis 유전자 발현 활성화에 관여하는 GCR2를 각각 결손하여 glycolysis와 glucose repression을 약화시킴과 동시에 pentose phosphate 경로를 강화시키고자 하였다. [23-29] 또한 S7P에서의 경쟁 반응에 관여하는 PHO13을 결손한 균주도 함께 비교하여 shinorine 생산량에 미치는 효과를 보고자 하였다. [28, 30] 이후 N. punctiforme와 다른 미세조류 유래의 shinorine 생합성 유전자 과발현을 통해 shinorine 생합성 경로 자체를 강화 하여 각 유전자들의 효과를 비교하였다. 그리고 glucose 6-phosphate (G6P) 로 부터 pentose phosphate 경로로의 반응에 관여하는 ZWF1, SOL3, SOL4, GND1, GND2 유전자의 과발현에 의해 포도당으로부터 pentose phosphate 경로로의 흐름 증가를 통한 shinorine 생산량 변화를 확인하였다. [31] (Figure 2)

이후 shinorine 생산량이 최대인 균주를 최종 균주로 선별하여 배지 내 의 포도당과 자일로스 비율에 따른 변화들을 확인하고, 이를 통해 shinorine 최대 생산량을 결과로 얻었다.

7



Figure 2. Objectives for increasing shinorine production.

Red arrows are the manipulations in order to weaken glycolysis and glucose repression and strengthen pentose phosphate pathway in this study. Thick arrows and letters indicate overexpression of the corresponding genes. Double lines are deletion of genes. Thin arrows indicate weakening of the reaction due to deletion of the corresponding gene, hexokinase 2 (*HXK2*). This reaction of glucose to G6P is not indicated by double lines because other genes such as glucokinase 1 (*GLK1*), hexokinase 1 (*HXK1*) are also involved. Dashed line indicates multiple enzymatic steps.

Chapter 2. Materials and methods

2.1. 사용된 균주 및 제작 방법

본 연구에서는 *E. coli* DH5α[F⁻ Φ80d*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17* (r_K⁻, m_K⁺) *phoA supE44* λ⁻ *thi-1 gyrA96 relA1*]를 이용하여 유전자 조작을 진행하였다. *E. coli*의 경우 50 µg/mL 암피실린 (ampicillin) 을 첨가한 Luria-Bertani (LB) 배지 (10 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract, 10 g/L NaCl) 에서 배양하였다.

본 연구에서 사용한 모균주는 *S. cerevisiae*으로부터 제작된 JHYS13 (delta-integration of P_{TEF1}-NpR5597-T_{GPM1}-P_{TDH3}-NpR5600-T_{CYC1} and P_{TEF1}-NpR5598-T_{GPM1}-P_{TDH3}-NpR5599-T_{CYC1} into CEN.PK2-1C) 균주이고 이를 포함한 제작된 균주들은 Table 2에 나타내었다. 그리고 균주 형질 전환에는 리튬 아 세트산 (lithium acetate, LiOAc) 방법을 이용하였다.

XYL1, XYL2, XYL3 유전자를 S. cerevisiae genomic DNA 상에서 비활성화 상태의 HIS3 자리에 도입하기 위해 coex303-XYL 플라스미드를 PstI를 이용 하여 선형으로 만들어준 후 균주 내로 도입하였다. 이후 TAL1, HXK2, GCR2, PHO13 유전자 결손은 CRISPR/Cas9을 이용한 유전체 편집 시스템을 이용하 였다. 유전자 결손 카세트는 각 유전자 (target) 의 target donor F, target donor R 프라이머로 PCR하여 Cas9과 해당 유전자의 guide RNA(gRNA) 를 포함하 는 coex416-Cas9-target gRNA 벡터와 함께 균주에 도입하였다. 이후 target confirm F, target confirm R 프라이머를 이용한 PCR을 통해 유전자 결손을 확 인한 후, 플라스미드를 제거해주기 위해 YPD 배지 (20 g/L 포도당, 10 g/L yeast extract, 20 g/L bacto-peptone) 에서 24시간 이상 배양하였다.

Strain	Genotype	Reference
E. coli		
DH5a	$F^- \Phi 80dlacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1$	
	$hsdR17(r_{K},m_{K}) phoA supE44 \lambda$ thi-1 gyrA96 relA1	
S. cerevisiae		
JHYS13	Delta-integration of P_{TEFI} -NpR5597-T _{GPMI}	[19]
	-P _{TDH3} -NpR5600-T _{CYC1} and P _{TEF1} -NpR5598-T _{GPM1}	
	-PTDH3-NpR5599-TCYCl into CEN.PK2-1C	
JHYS16	NTS-integration of P _{TDH3} -XYL1-T _{CYC1} -P _{TEF1} -XYL2-	[19]
	T _{GPM1} -P _{TP11} -XYL3-T _{TP11} into JHYS13	
JHYS17	JHYS16 tall Δ	[19]
JHYS131	JHYS13 HIS3:: PTDH3-XYL1-TCYCI-PTEFI-XYL2-TGPM1	This study
	-P _{TP11} -XYL3-T _{TP11}	
JHYS132	JHYS131 tall Δ	This study
JHYS133	JHYS132 $hxk2\Delta$	This study
JHYS134	JHYS132 gcr2 Δ	This study
JHYS135	JHYS132 phol 3 Δ	This study
JHYS133-1	JHYS133 harboring pRS416GPD	This study
JHYS133-2	JHYS133 harboring pRS416GPD-NpR5600	This study
JHYS133-3	JHYS133 harboring pRS416GPD-NpR5599	This study
JHYS133-4	JHYS133 harboring pRS416GPD-NpR5598	This study
JHYS133-5	JHYS133 harboring pRS416GPD-NpF5597	This study
JHYS133-6	JHYS133 harboring pRS416GPD-Ava3858	This study
JHYS133-7	JHYS133 harboring pRS416GPD-Amir4259	This study
JHYS133-8	JHYS133 harboring pRS416GPD-Zwf1	This study
JHYS133-9	JHYS133 harboring pRS416GPD-Sol3	This study
JHYS133-10	JHYS133 harboring pRS416GPD-Sol4	This study
JHYS133-11	JHYS133 harboring pRS416GPD-Gnd1	This study
JHYS133-12	JHYS133 harboring pRS416GPD-Gnd2	This study

Table 2. Strains used this study

2.2. 플라스미드 제작

본 연구에서 사용된 프라이머와 제작된 플라스미드는 각각 Table 3, Table 4에 나타내었다.

coex416-XYL를 AscI와 PvuI로 처리하여 얻은 xylose-utilization 유전자 카세트를 pRS303GPD의 AscI, PvuI 자리에 넣어 영양요구성 마커를 바꾼 coex303-XYL 플라스미드를 제작하였다. coex413-Cas9-TAL1 gRNA와 pRS416GPD도 동일한 방법으로 AscI과 PvuI을 제한효소로 사용하여 coex416-Cas9-TAL1 gRNA를 제작하였다.

CRISPR/Cas9을 이용한 유전체 편집 시스템을 사용하여 *TAL1*, *HXK2*, *GCR2*, *PHO13* 유전자를 결손하기 위해 필요한 gRNA 서열은 CHOPCHOP (https://chopchop.cbu.uib.no) 을 이용하여 설계하였다. *TAL1*의 경우 기존의 gRNA의 효율이 좋지 않아서 새로운 gRNA로써 TAL1 gRNA2 서열을 이용 하였다. coex416-Cas9-TAL1 gRNA을 주형으로 하여 각 유전자 (target) 의 target gRNA F, target gRNA R 프라이머로 플라스미드 전체를 증폭하였다. 이 후 *Dpn*I을 제한효소로 사용하여 gRNA 위치에서 위치 특이적 돌연변이가 일어난 coex416-Cas9-target gRNA만을 선별하였다.

N. punctiforme 유래의 유전자들 (NpR5600, NpR5599, NpR5598, NpF5597), A. variabilis 유래의 Ava3858, A. mirum 유래의 Amir4259를 open reading frame (ORF) 이라 하고 각각의 ORF BamHI F, ORF XhoI R 프라이머를 이용한 PCR 을 통해 증폭된 ORF 단편을 얻었다. 이후 모든 ORF 단편들은 BamHI, XhoI 을 처리하고 pRS416GPD의 BamHI, XhoI 자리에 넣어서 pRS416GPD-NpR5600, pRS416GPD-NpR5599, pRS416GPD-NpR5598, pRS416GPD-NpF5597, pRS416GPD-Ava3858, pRS416GPD-Amir4259를 제작하였다. PCR을 통해 CEN.PK2-1로부터 ZWF1, SOL3, SOL4, GND1, GND2 유전자 들의 증폭된 ORF 단편을 얻었다. 이 때 ZWF1, GND1, GND2는 BamHI과 Xhol을, SOL3와 SOL4는 NheI과 Sall을 제한효소 자리로 가지는 프라이머를 사용하였다. ZWF1, GND1, GND2와 pRS416GPD는 BamHI과 Xhol를 처리한 후 pRS416GPD-Zwf1, pRS416GPD-Gnd1, pRS416GPD-Gnd2를 제작하였다. SOL3, SOL4는 NheI과 Sall을, pRS416GPD는 XbaI과 Sall을 처리하여 pRS416GPD-Sol3, pRS416GPD-Sol4를 제작하였다.

Table 3. Primer	sequences	used this	study
-----------------	-----------	-----------	-------

Primer	Description
For gene deletion	using CRISPR/Cas9
TAL1 gRNA2 F	AGCACTGGTAAAGATTACAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
TAL1 gRNA2 R	TTGTAATCTTTACCAGTGCTGATCATTTATCTTTCACTGC
TAL1 donor F	TAGTACGATAGTAAAATACTTCTCGAACTCGTCACATATAC GTGTACATAGGAAGTATCT
TAL1 donor R	AGAAACGTGCATAAGGACATGGCCTAAATTAATATTTCCGA GATACTTCCTATGTACACG
TAL1 confirm F	CGGGAATAAAGCGGAACT
TAL1 confirm R	GGTGGTTCCGGATGTTTT
HXK2 gRNA F	GGCCAAAGCAGCAATAACAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
HXK2 gRNA R	CTGTTATTGCTGCTTTGGCCGATCATTTATCTTTCACTGC
HXK2 donor F	ATTGTAGGAATATAATTCTCCACACATAATAAGTACGTTAAT TAAATAAAACTTAATTTG
HXK2 donor R	TTAAAAAAGGGCACCTTCTTGTTGTTCAAACTTAATTTAC AAATTAAGTTTTAATTAAT
HXK2 confirm F	AATTTTCCACGACGACGACG
HXK2 confirm R	AGAGGAAGTGTAGAGAGGGT
GCR2 gRNAF	GCCCTCAGGTATGGTTAACGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
GCR2 gRNA R	CGTTAACCATACCTGAGGGGGGATCATTTATCTTTCACTGC
GCR2 donor F	AAGGAACCTGAGAACACAAAGAGTATTTGACGAAAAGTT ACACTCACATAACGATAATAA
GCR2 donor R	ACACCAGAAAATTAAAAGAGAAAGCAATATATGTTAAACA TTATTATCGTTATGTGAGTG
GCR2 confirm F	GCGGAGCTCCAAGTGCTTAGGTGAGGTCATATCCGAC
GCR2 confirm R	GCGCTCGAGACAGCCTGCGCGACACTAAACCC
PHO13 gRNAF	GCAGTGTAACAGCCAAACGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
PHO13 gRNA R	CCGTTTGGCTGTTACACTGCGATCATTTATCTTTCACTGC
PHO13 donor F	CAAAAAAGCCTTATAGCTTGCCCTGACAAAGAATATACA ACTCGGGAAAAGGAGCAATG
PHO13 donor R	ATTTTTCCTTTTCAAAAAGTAATTCTACCCCTAGATTTTGCA TTGCTCCTTTTCCCGAGT
PHO13 confirm F	ATAAGTGGCTTGAGCTGTGG
PHO13 confirm R	TTTCTTCCCCAACAAGACCG

For gene cloning

NpR5600 BamHIF	GCG <u>GGATCC</u> ATGAGTAATGTTCAAGCATCG
NpR5600 Xhol R	GCG <u>CTGGAG</u> TCACACTCCCAATAGTTTGG
NpR5599 BamHIF	GCG <u>GGATCC</u> ATGACCAGTATTTTAGGACG
NpR5599 Xhol R	GCG <u>CTGGAG</u> TTATACCAAGCGTCTAATCAG
NpR5598 BamHIF	GCG <u>GGATCC</u> ATGGCACAATCAATCTCTTTA
NpR5598 Xhol R	GCG <u>CTGGAG</u> TAGTCGCCCCCTAATTCC
NpF5597BamHIF	GCG <u>GGATCC</u> ATGCCAGTACTTAATATCCTT
NpF5597 XhoI R	GCG <u>CTGGAG</u> TCAATTTTGTAACACCTTTTTATTA
Ava3858BamHIF	GCG <u>GGATCC</u> ATGAGTATCGTCCAAGCAAA
Ava3858XhoIR	GCG <u>CTGGAG</u> TTATTTAACACTCCCGATTAATTCT
Amir4259BamHIF	GCG <u>GGATCC</u> ATGACTACCAACTTGAC
Amir4259 Xhol R	GCG <u>CTGGAG</u> TTCAAGCAGCACCAGAT
ZWF1 BamHI F	GCG <u>GGATCC</u> ATGAGTGAAGGCCCCGTCAA
ZWF1 XhoI R	GCG <u>CTCGAG</u> CTAATTATCCTTCGTATCTTCTGGC
SOL3 NheIF	GCG <u>GCTAGC</u> ATGGTGACAGTCGGTGTG
SOL3 SalI R	GGCG <u>GTCGAC</u> CTAAAAAGTTTTCGTTTGAACTTTT
SOL4 NheI F	GCG <u>GCTAGC</u> ATGGTGAAATTACAAAGGTTTAGC
SOL4 SalI R	GGCG <u>GTCGAC</u> TTAGCAGTTTTCAGGAATCAAGG
GND1 BamHIF	GCG <u>GGATCC</u> ATGTCTGCTGATTTCGGTTT
GND1 XhoI R	GCG <u>CTCGAG</u> TTAAGCTTGGTATGTAGAGGAAGAA
GND2 BamHI F	GCG <u>GGATCC</u> ATGTCAAAGGCAGTAGGTGA
GND2 Xhol R	GCG <u>CTCGAG</u> TTAAGCTTGGTAGGTTGAGGAAG

Restriction enzyme sites are underlined

Plasmid	Description	Reference
pRS416GPD	CEN/ARS plasmid, URA3, P _{TDH3} , T _{CYC1}	[32]
pRS303GPD	$HIS3, P_{TDH3}, T_{CYCI}$	[33]
coex416-XYL	CEN/ARS plasmid, URA3, P _{TDH3} -XYL1-T _{CYC1} -P _{TEF1} -XYL2-T _{GPM1} -P _{TPU1} -XYL3-T _{TPU1}	[19]
coex303-XYL	HIS3, P _{TDH3} -XYL1-T _{CYC1} -P _{TEF1} -XYL2-T _{GPM1} -P _{TP11} -XYL3-T _{TP11} (HIS3 locus integration)	This study
coex413-Cas9- TAL1 gRNA	CEN/ARS plasmid, HIS3, P _{TDH3} -CAS9-T _{TPII} , P _{SNR52} -TAL1 gRNA-T _{SUP4}	[19]
coex416-Cas9- TAL1 gRNA	CEN/ARS plasmid, URA3, P _{TDH3} -CAS9-T _{TPII} , P _{SNR52} -TAL1 gRNA-T _{SUP4}	This study
coex416-Cas9- TAL1 gRNA2	CEN/ARS plasmid, URA3, P _{TDH3} -CAS9-T _{TPII} , P _{SNR52} -TAL1 gRNA2-T _{SUP4}	This study
coex416-Cas9- HXK2 gRNA	CEN/ARS plasmid, URA3, P _{TDH3} -CAS9-T _{TPII} , P _{SNR52} -HXK2 gRNA-T _{SUP4}	This study
coex416-Cas9- GCR2 gRNA	CEN/ARS plasmid, URA3, P_{TDH3} -CAS9-T _{TPII} , P_{SNR52} -GCR2 gRNA-T _{SUP4}	This study
coex416-Cas9- PHO13 gRNA	CEN/ARS plasmid, URA3, P _{TDH3} -CAS9-T _{TPI1} , P _{SNR52} -PHO13 gRNA-T _{SUP4}	This study
coex413-NpR4	CEN/ARS plasmid, <i>HIS3</i> , P _{TEF1} -NpR5597-T _{GPM1} , P _{TDH3} -NpR5600-T _{CYC1} , P _{TEF1} -NpR5598-T _{GPM1} , P _{TDH3} -NpR5599-T _{CYC1}	[19]
pRS416GPD- NpR5600	CEN/ARS plasmid, URA3, P _{TDH3} -NpR5600-T _{CYC1}	This study
pRS416GPD- NpR5599	CEN/ARS plasmid, $URA3$, P_{TDH3} - $NpR5599$ - T_{CYCI}	This study
pRS416GPD- NpR5598	CEN/ARS plasmid, URA3, P _{TDH3} -NpR5598-T _{CYC1}	This study
pRS416GPD- NpF5597	CEN/ARS plasmid, $URA3$, P_{TDH3} -NpF5597-T _{CYC1}	This study
pRS416GPD- Ava3858	CEN/ARS plasmid, $URA3$, P_{TDH3} -Ava3858- T_{CYCI}	This study
pRS416GPD- Amir4259	CEN/ARS plasmid, URA3, P _{TDH3} -Amir4259-T _{CYC1}	This study

Table 4. Plasmids used this study

pRS416GPD-Zwfl	CEN/ARS plasmid, $URA3$, P_{TDH3} - $ZWF1$ - T_{CYC1}	This study
pRS416GPD-Sol3	CEN/ARS plasmid, URA3, PTDH3-SOL3-TCYCI	This study
pRS416GPD-Sol4	CEN/ARS plasmid, URA3, PTDH3-SOL4-TCYCI	This study
pRS416GPD- Gnd1	CEN/ARS plasmid, $URA3$, P_{TDH3} - $GND1$ - T_{CYC1}	This study
pRS416GPD- Gnd2	CEN/ARS plasmid, $URA3$, P_{TDH3} - $GND2$ - T_{CYC1}	This study

2.3. 배양 조건

실험에 사용된 모든 효모는 YPD 배지 (20g/L 포도당, 10g/L yeast extract, 20g/L bacto-peptone) 또는 SC 배지 (아미노산이 빠진 6.7g/L yeast nitrogen base, 2g/L 아미노산 혼합물, 10g/L 포도당, 10g/L 자일로스) 에서 배양하였다. 형질 전환된 효모를 선별하는 과정에서 JHYS131 균주를 선별할 때는 히스 티딘이 제외된 SC-His (아미노산이 빠진 6.7g/L yeast nitrogen base, 1.96g/L 히 스티딘이 제외된 아미노산 혼합물, 10g/L 포도당, 10g/L 자일로스) 배지를, 이외의 모든 경우에서는 유라실이 제외된 SC-Ura 배지 (아미노산이 빠진 6.7g/L yeast nitrogen base, 1.92g/L 유라실이 제외된 아미노산 혼합물, 10g/L 포도당, 10g/L 자일로스) 비죄를, 이외의 모든 경우에서는 우라실이 제외된 SC-Ura 배지 (아미노산이 빠진 6.7g/L yeast nitrogen base, 1.92g/L 유라실이 제외된 아미노산 혼합물, 10g/L 포도당, 10g/L 자일로스) 를 사용하였다. 또한 포도당과 자일로스의 비율에 따른 배지 최적화 실험에서는 두 물질 농도의 합이 20g/L가 되도록 비율을 조절하였다.

형질이 전환된 효모는 SC 배지 또는 SC-Ura 배지 5 mL를 50 mL 플라 스크에서 1차 접종하여 24시간동안 사전 배양하였다. 이후 0.2의 optical density (OD₆₀₀) 로 100 mL 플라스크에 동일한 배지 10 mL로 2차 접종하여 30 ℃, 170 rpm으로 진탕 배양기 (shaking incubator) 에서 120시간동안 회분식 배양하였다.

2.4. 시료 채취 및 검출 방법

2차 접종한 이후 배양액 500 µL를 24시간마다 채취하였고, 소량을 희석 한 후에 spectrophotometer (Varian Cary® 50 UV-Vis) 를 이용하여 측정한 OD₆₀₀ 값으로 세포 성장을 관찰하였다. 그리고 남은 배양액은 배지에 남은 포도당과 자일로스 검출에 사용하기 위해 원심분리기를 이용 (14000 rpm, 1 min) 하여 상층액을 채취하였고, 이를 친수성의 폴리비닐리덴플루오라이드 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 0.22 µm 주사기 여과 장치를 사용하여 여과하 였다. 모든 샘플들은 Aminex HPX-87H column (300 mm X 7.8 mm, 5 µm, Bio-Rad) 을 사용하는 HPLC (Ultimate 300 HPLC system, Thermo fishers scientific) 로 분석하였다. 5 mM 황산을 첨가한 물을 이동상으로써 0.6 mL/min로 이용 하였고 굴절률 (refractive index, RI) 검출기로 검출하였다. 컬럼과 RI 검출기 의 온도는 측정하는 동안 각각 60 ℃, 35 ℃로 유지하였다. 데이터 정량은 데 이터 분석 도구인 Chromeleon chromatography data system을 사용하였다.

120시간이 되고 난 이후 배지와 세포 추출액의 shinorine 농도를 측정하 기 위해 각각 1 mL와 2 mL의 배양액을 채취하였다. 1.7 mL 마이크로 튜브에 채취한 배지 1 mL 시료는 원심분리기를 이용 (14000 rpm, 1 min) 하여 얻은 상층액을 측정에 사용하였다. 추가로 건조균체중량 (dry well weight, dcw) 을 측정하기 위해 채취하기 전 마이크로 튜브의 무게를 측정하고 채취한 후 상 층액을 모두 제거하여 60 ℃ 오븐에서 세포를 24시간동안 말린 뒤에 무게를 측정하였다. 세포 추출액 시료의 경우 15 mL 플라스틱 원심관 튜브에 채취 하여 원심분리 (4 ℃, 3000 rpm, 5 min) 한 뒤 상층액을 모두 제거하고 증류수 1 mL를 넣어 세포를 재부유시켰다. 이후 클로로포름 1.5 mL를 넣어주고 4분 간 볼텍싱해주었다. 원심분리 (4 ℃, 3000 rpm, 7 min) 를 진행하여 증류수와 클로로포름을 층 분리해주었고 증류수 층을 800 µL 채취하였다.

19

이후 각각 얻은 시료들은 동일하게 PVDF 0.22 µm 주사기 여과 장치를 사용하여 여과해준 뒤 HPLC를 사용하였다. 이 때 사용한 컬럼은 Agilent Eclipse XDB-C18 컬럼 (5 µm, 4.6 mm × 250 mm) 이며 컬럼의 온도는 40 ℃로 설정하였다. 또한 물과 아세토니트릴 이 95 : 5의 비율의 이동상을 0.5 mL/min의 속도로 흘려주었다. Shinorine 검출은 UV-Vis (Ultraviolet-Visible) 검출기가 사용되었고 측정 파장은 334 nm였다.

Chapter 3. Results and discussion

3.1. Xylose-utilization 유전자 재도입을 통한 균주 안정화

선행 연구의 균주는 자일로스를 탄소원으로 사용하고자 S. stipitis 유래 의 xylose-utilization 유전자 카세트 (PTDH3-XYL1-TCYCI-PTEF1-XYL2-TGPM1-PTP11-XYL3-TTP11)를 rDNA에서의 nontranscribed spacers (NTS) 자리에 무작위로 도 입하였다. 하지만 추가적인 유전자 조작을 할수록 이 유전자 카세트가 도입 된 자리의 불안정성이 심화된다는 문제점이 있으므로 영양요구성 마커로 사 용하기 위해 비활성화 되어있는 HIS3 자리에 동일한 카세트를 다시 도입하 였다.

Xylose-utilization 유전자 카세트를 도입하기 전의 모균주는 JHYS13이다. 이 유전자 카세트를 NTS 자리에 도입했던 선행 연구의 균주는 JHYS16, 비 활성 *HIS3* 자리에 다시 도입한 본 연구의 균주는 JHYS131로 나타내었다. 이들을 10 g/L의 포도당과 10 g/L의 자일로스를 함유한 SC 배지에서 배양하 였고 24시간마다 세포 성장과 배지에 남아있는 포도당, 자일로스의 양을 측 정하였다. 생산된 shinorine은 120시간 후에 측정하였다.

그 결과 JHYS13 균주보다 xylose-utilization 유전자들을 도입한 JHYS16, JHYS131 균주가 자일로스를 탄소원으로써 사용할 수 있는 것을 보았고 이 때 JHYS131 균주의 자일로스 소비 속도가 조금 더 빠르다는 것을 확인하였 다 (Figure 3B). 그리고 이 두 균주는 세포 성장도 증가하였다 (Figure 3C). 120시간이 지난 후 생산된 shinorine을 측정한 결과, JHYS16 균주의 농도는 5.77 mg/L, 함량은 1.20 mg/g DCW 였지만 JHYS131 균주는 9.33 mg/L, 1.85 mg/g DCW 로 더 많은 양의 shinorine을 생산하였다. 또한 이 균주는 자일로 스를 소비함을 통해 JHYS13 균주보다 농도는 15배 이상, 함량은 9배 이상 이 증가하였다 (Figure 3D).

22



Figure 3. Re-construction of xylose consuming *S. cerevisiae* by *HIS3* site integration of xylose-utilization genes.

In order to construct JHYS131, xylose-utilization genes (*XYL1-XYL2-XYL3* cassette) were integrated into inactive *HIS3* site of JHYS13. In JHYS16, the same cassette was integrated into NTS-site in previous study. JHYS13, JHYS16, and JHYS131 strains were grown in SC medium containing 10 g/L glucose and 10 g/L xylose for 120 h. Glucose (A) and xylose (B) remaining in the medium. Cell growth (C). Shinorine production at 120 h (D). Each value indicates the average \pm SD of triplicate experiments.

Pentose phosphate 경로에서 shinorine 생합성 경로로 가기 위해서는 S7P 가 핵심이기 때문에 shinorine의 생산량을 높이기 위해서는 S7P의 생산량을 늘려주는 것이 필요하다. 선행 연구에서 shinorine 생합성 경로의 경쟁 경로 에 관여하는 *TAL1*의 결손으로 shinorine 생산량이 증가한다는 것을 확인하였 으므로 JHYS131 균주도 동일하게 *TAL1*을 결손하여 JHYS132 균주를 제작 하였다.

JHYS131, JHYS132 균주의 shinorine 생산량을 선행 연구의 균주인 JHYS16, JHYS17 균주와 비교하기 위해 10 g/L 포도당, 10 g/L 자일로스를 함 유한 SC 배지에서 동시에 배양하였다. 그 결과, *TAL1* 결손에 의해 pentose phosphate 경로가 불완전해짐으로써 JHYS17, JHYS132 균주의 자일로스 소 비량이 제한되었으나 균주의 안정화를 통해 JHYS132 균주가 더 많은 양의 자일로스를 소비하였다 (Figure 4B). 또한 *TAL1* 결손으로 감소한 자일로스 소비량으로 인해 소비한 전체 탄소원이 감소하였으므로 세포 성장이 감소하 였다 (Figure 4C). 120시간 때의 생산된 shinorine을 측정한 결과, *TAL1*이 결손 된 JHYS17와 JHYS132 균주의 shinorine 생산량이 농도와 함량 값 모두 증 가하는 동일한 경향성을 확인하였다. 특히 JHYS132 균주의 경우 23.16 mg/L, 6.91 mg/g DCW 생산량으로 가장 많은 shinorine을 생산하였다. 이는 JHYS131 균주에 비해 농도는 2.7배 이상, 함량은 4.5배 이상 증가한 값이다. 그리고 JHYS17 균주보다도 생산량이 1.2배 이상 증가하였다 (Figure 4D).

이러한 결과는 다시 도입된 유전자 카세트가 비활성화된 HIS3 자리에서 더 안정적으로 발현되었기 때문이라고 할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 shinorine 생산의 추가 개선을 위해 JHYS132 균주로부터 유전자 조작을 진 행하였다.

24



Figure 4. The effect of *TAL1* deletion on increasing shinorine production.

JHYS17 and JHYS132 strains were strains made by deleting *TAL1* from strains JHYS16 and JHYS131, respectively. All strains were grown in SC medium containing 10 g/L glucose and 10 g/L xylose. The incubation time was 120 hours. Glucose (A) and xylose (B) in medium. Cell growth measured every 24 hours for 120 h (C). Shinorine production (D). Each value indicates the average \pm SD of triplicate experiments.

3.2. 유전자 결손을 통한 glycolysis 약화 및 경쟁경로 제거

Pentose phosphate 경로를 강화하여 S7P의 생산량을 높이는 것은 결국 shinorine의 생산량을 높이는 것과 연결된다. *S. cerevisiae*는 glycolysis가 굉장 히 강하므로 이를 약화시키면 상대적으로 pentose phosphate 경로가 강화될 것이라고 예상하였고 이를 위해 *HXK2*와 *GCR2* 유전자 결손을 진행하였다. Hxk2는 포도당을 전환하는 반응에 관여할 뿐만 아니라 glucose repression의 활성화에도 다양한 방법으로 관여한다. Gcr2는 glycolysis에 관여하는 효소 발현을 활성화시킨다. 또한 S7P의 생산량을 높이고자 S7P를 sedoheptulose로 전환하는 *PHO13* 유전자를 결손한 균주도 함께 제작하여 비교하였다.

유전자 결손은 모두 JHYS132 균주에서 진행이 되었고 HXK2 결손 균주 는 JHYS133, GCR2 결손 균주는 JHYS134, PHO13 결손 균주는 JHYS135로 나타내었다. 모든 균주는 10 g/L 포도당, 10 g/L 자일로스를 함유한 SC 배지 에서 배양하였다. Glycolysis 약화에 의한 차이가 어떠한 지를 확인하기 위해 기존 실험 방법에서 8시간, 16시간 때에 추가로 측정을 진행하였다. 그 결과 JHYS133, JHYS134 균주의 포도당 소비속도가 감소하였고 이에 따라 자일로 스 소비 속도도 함께 감소하였다 (Figure 5A, B). 세포 성장도 감소하는 모습 을 보였으나 JHYS133 균주는 24시간 이후에 세포 성장을 회복하여 JHYS 132 균주와 차이를 보이지 않았다 (Figure 5C). 120시간 후에 shinorine 생산 량을 비교한 결과, JHYS134, JHYS135 균주는 JHYS132 균주보다 함량이 소 폭 증가하였으나 세포 성장의 감소로 인해 농도 값은 감소하였다. 그리고 JHYS133 균주에서는 농도와 함량 모두 약 1.3배 증가한 결과를 통해 HXK2 결손이 shinorine 생산량 증대에 가장 효과적임을 확인하였다 (Figure 5D).

자일로스를 더 적게 소비하였음에도 더 많은 shinorine을 생산한 것은 *HXK2* 결손에 의해 포도당으로부터 pentose phosphate 경로로의 유입이 증가 하였기 때문이라고 할 수 있다.



Figure 5. Effects of attenuating glycolysis and eliminating competitive reaction through gene deletion on shinorine production.

All strains were cultured in SC medium containing 10 g/L glucose and 10 g/L xylose for 120 h. Glucose (A) and xylose (B) during 120 h. In this experiment, additional measurements were performed at 8 h and 16 h to observe the decrease of the glucose consumption rate through the weakening of glycolysis. Cell growth (C). Shinorine production (D) measured at 120 h. Each value indicates the average \pm SD of triplicate experiments.

3.3. 다양한 미세조류 유래의 DDGS 과발현 효과

Shinorine은 효모에서 생산되지 않는 물질이므로 이를 생산할 수 있는 균주의 외래 유전자를 도입하여야 한다. 본 연구에서 사용한 균주는 *N. punctiforme* 유래의 *NpR5600* (DDGS), *NpR5599* (O-MT), *NpR5598* (C-N ligase), *NpF5597* (D-Ala-D-Ala ligase)를 무작위로 도입하였다. 이 때 다른 미세조류 인 *A. variabilis*와 *A. mirum* 유래의 유전자를 과발현 하였을 때의 shinorine 생산량을 비교하여 가장 효과가 좋은 유전자를 확인하고자 하였다.

우선 JHYS133 균주에서 속도 결정 단계를 확인하기 위해 NpR5600, NpR5599, NpR5598, NpF5597를 플라스미드에 복제하여 과발현을 진행하였다. pRS416GPD 플라스미드로 형질 전환된 균주를 JHYS133-1로 나타내었고 4 개의 유전자가 각각 과발현된 효모는 JHYS133-2, 3, 4, 5로 나타내었다. 모든 균주들은 10 g/L의 포도당과 자일로스를 함유한 SC-Ura 배지에서 배양하였 다. 배양 결과, 모든 균주의 포도당과 자일로스 소비속도, 세포 성장속도는 거의 차이가 없었다. 하지만 shinorine 생산량은 DDGS인 NpR5600을 과발현 한 JHYS133-2 균주에서 농도와 함량 모두 가장 높은 값이 나왔다 (Figure 6).

이후 다른 미세조류 유래의 DDGS 유전자 효과를 확인하기 위해 *A. variabilis* 유래의 *Ava3858과 A. mirum* 유래의 *Amir4259* 유전자를 동일하게 플라스미드에 복제하여 과발현 하였다. *Ava3858* 과발현 균주는 JHYS133-6, *Amir4259* 과발현 균주는 JHYS133-7로 나타내었고 이전 실험과 동일한 배지 에서 배양하였다. 이 실험 결과도 마찬가지로 shinorine 생산량에서만 뚜렷한 차이를 보였는데 JHYS133-6 균주를 배양한 결과가 가장 높은 값이 나왔다. JHYS133-6 균주는 44.18 mg/L의 농도 값을, 17.02 mg/g DCW의 함량 값을 가 졌고 이는 JHYS133-1 균주에 비해 약 1.3배 증가된 값이다. (Figure 7)

28



Figure 6. Overexpression effects of the introduced shinorine biosynthesis genes from *N. punctiforme*

JHYS133-1 strain harbored pRS416GPD vector. And each of strains in order from 133-2 to 133-5 was harboring the pRS416GPD vector into which cloned *NpR5600*, *NpR5599*, *NpR5598*, and *NpF5597* genes. Selected cells were cultured in SC-Ura medium containing 10 g/L glucose and 10 g/L xylose for 120 h. Glucose (A) and xylose (B) that cells cannot consume. Cell growth (C) during 120 h. Shinorine production (D). Each value indicates the average \pm SD of triplicate experiments.



Figure 7. Effects of DDGS overexpression from other microorganisms.

NpR5600 from *N. punctiforme*, Ava3858 from *A. variabilis*, and Amir4259 from *A. mirum* were overexpressed by cloning into pRS416GPD vector. Cells transformed with each vector were cultured in SC-Ura medium containing 10 g/L glucose and 10 g/L xylose for 120 h. Glucose (A) and xylose (B). Cell growth (C). Shinorine production after 120 h (D). Each value indicates the average \pm SD of triplicate experiments.

3.4. Pentose phosphate 경로 유전자의 과발현 효과

Pentose phosphate 경로의 유전자를 과발현하여 이 경로를 강화하면 S7P 의 생산량을 높일 수 있고, 이는 곧 shinorine 생산량을 높이는 것과 연결된 다. 포도당에서 전환된 G6P는 대부분 F6P로 전환되어 glycolysis에 사용되고, 소량은 Ru5P로 전환되어 pentose phosphate 경로에 사용된다. 따라서 Ru5P로 전환되는 반응에 관여하는 *ZWF1*, *SOL3*, *SOL4*, *GND1*, *GND2*를 과발현하여 pentose phosphate 경로로의 유량을 증가시키고자 하였다. 5개의 유전자는 플 라스미드를 이용하여 과발현 하였고, 순서대로 JHYS133-8,9, 10, 11, 12로 나 타내었다.

제작된 균주들은 10 g/L의 포도당과 자일로스를 함유한 SC-Ura 배지에 서 120시간동안 배양하였다. 배양 결과, *ZWF1* 과발현 균주인 JHYS133-8 균 주의 결과만이 다른 결과를 가졌다. JHYS133-8 균주는 포도당 소비 속도가 조금 느려졌고 (Figure 8A), 이로 인해 자일로스 소비도 소폭 감소했다 (Figure 8B). 세포 성장도 다른 균주들과 비교했을 때 감소하였다 (Figure 8C). 하지만 shinorine 생산량에서는 모든 균주들의 농도 값이 비슷하였기 때문에 세포 성장이 감소했던 JHYS133-8 균주의 함량 값이 18.20 mg/g DCW로 가 장 높은 값을 가졌다. 이는 대조군인 JHYS133-1 균주와 비교하였을 때 약 1.22배 증가한 값이다 (Figure 8D).



Figure 8. Effects of overexpression of genes corresponding to the beginning of the pentose phosphate pathway to enhance flux into this pathway.

JHYS133 harboring empty vector (JHYS133-1) or overexpressing ZWF1 (JHYS133-8), SOL3 (JHYS133-9), SOL4 (JHYS133-10), GND1 (JHYS133-11), and GND2 (JHYS133-12) were grown in SC-Ura containing 10 g/L glucose and 10 g/L xylose for 120 h. Glucose (A) and xylose (B) in the medium after consumption. Cell growth (C). Shinorine production at 120 h (D). Each value indicates the average \pm SD of triplicate experiments.

3.5. 최적의 포도당과 자일로스 비율을 위한 배지 최적화

본 연구에서 제작한 균주 중 가장 많은 shinorine을 생산하는 균주인 JHYS133-6 균주를 최종 균주로 정하였다. 이 균주는 포도당과 자일로스를 둘 다 탄소원으로 사용할 수 있기 때문에 배지 내의 두 탄소원의 전체 농도 는 동일하게 유지하되 비율을 다르게 하였을 때 어떠한 변화가 있는지, 어 느 배지에서 가장 많은 shinorine을 생산하는지를 확인하고자 하였다. SC 배 지를 사용하였으며 배지의 종류는 포도당과 자일로스 비율에 따라 1번부터 5번까지로 정하였다. 각 배지 내의 포도당과 자일로스의 비율은 Figure 9A에 나타내었다.

JHYS133-6 균주는 모든 배지에서 120시간동안 배양하였고, 포도당은 모든 배지에서 전부 소모되었지만 자일로스는 일부 배지에서만 전부 소모되 었다. 또한 포도당이 모두 소모되고 난 이후 에야 자일로스 소비량이 증가 하는 것을 확인하였다 (Figure 9B, C). 세포 성장은 포도당의 농도가 증가할 수록 증가하였다 (Figure 9D). Shinorine 생산 측면에서는 4번 배지까지 자일 로스 농도가 높아질수록 shinorine 생산량도 증가하였다. 따라서 4번 배지에 서 17.85 mg/g DCW가 생산되어 최대 함량 값을 가졌으나 낮은 세포 성장으 로 인해 최대 농도 값을 기록하지는 못하였다. 즉, 3번 배지에서 68.41 mg/L 로 최대 농도 값을 가지는 것을 확인하였다 (Figure 9E).







Figure 9. Optimization the ratio of glucose and xylose in the medium for shinorine production in JHYS133-6.

JHYS133-6 cells were cultured in 5 types of SC medium with different ratios of glucose and xylose (A). Remained Glucose (B) and xylose (C). Cell growth (D). Shinorine titer and content (E) at 120 h. Each value indicates the average \pm SD of triplicate experiments.

Chapter 4. Conclusions 지표면에 도달하는 자외선의 범위와 세기가 점차 증가할수록 이에 의한 문제점들을 예방 및 해결하기 위해 자외선 차단제의 필요성이 강조되고 있 다. 하지만 현재의 자외선 차단제 성분들이 인체와 환경에 유해하다는 이유 로 규제가 강화되면서 대체 가능한 천연 자외선 차단 물질이 필요 해졌다. 알려진 대체 물질 중에서 미세조류, 곰팡이 등에서 생산되는 MAAs는 무색 이고 높은 안정성을 가질 뿐만 아니라 자외선 차단, 항산화, 주름 개선 등의 효과가 있기 때문에 천연 자외선 차단제 및 화장품의 성분으로써 효용성이 있다.

MAAs에 속하는 많은 물질들 중에서도 shinorine은 높은 몰흡광계수를 가지므로 자외선 차단 효율이 좋으며 최대 흡수 파장대가 지표면에 도달하 는 자외선의 범위와 겹치기 때문에 단독으로도 천연 자외선 차단 소재로 사 용할 수 있다. 하지만 shinorine을 자연적으로 생산하는 균주나 생합성 유전 자를 도입한 이종 균주로부터의 생산량은 대부분 굉장히 낮다. 이에 비해 본 연구실의 선행 연구인 *S. cerevisiae*에서의 shinorine 생산은 알려진 연구들 중에서 생산량이 굉장히 높다. 따라서 본 연구에서는 선행 연구의 균주로부 터 대사공학적 방법을 활용하여 shinorine 생산량을 높이고자 하였다.

선행 연구에서 제작된 균주인 JHYS16은 xylose-utilization 유전자 카세 트의 자리가 불안정하여 추가적인 유전자 조작이 어려웠다. 때문에 동일한 유전자 카세트를 안정적인 자리에 재도입함으로써 JHYS131 균주를 제작하 였고 안정성을 회복하였다. 균주 안정화 이후에는 선행 연구와 동일하게 *TAL1* 유전자를 결손하여 JHYS132 균주를 제작하였다. 이 균주는 선행 연구 의 균주인 JHYS17보다 더 많은 자일로스를 소비하였고, 이를 통해 더 많은 shinorine을 생산하는 것을 확인하였다. 그리고 경쟁 경로를 제거함으로써 JHYS131 균주보다 농도는 약 2.7배, 함량은 4.5배 이상 증가한 23.16 mg/L, 6.91 mg/g DCW 의 shinorine을 생산하였다.

36

Glycolysis 반응에서 포도당을 G6P로 전환하는 반응에 관여함과 동시에 glucose repression에 다양한 기작으로 관여하는 *HXK2* 유전자를 결손하여 JHYS133 균주를 제작하였다. 비록 유전자 결손에 의해 자일로스의 소비량 자체는 감소하였지만 shinorine의 농도와 함량 모두 약 1.3배 증가하여 36.35 mg/L, 10.54 mg/g DCW를 생산하였다. 이는 glycolysis 약화와 동시에 pentose phosphate 경로 강화를 통해 포도당으로부터 pentose phosphate 경로로의 유입이 증가하였기 때문이라고 할 수 있다.

또한 shinorine 생합성 경로에서의 속도 결정 단계가 DDGS가 관여하는 첫 번째 반응임을 밝히고 *A. variabilis* 유래의 DDGS인 *Ava3858*를 과발현 함으로써, 그리고 G6P로부터 pentose phosphate 경로로의 첫 번째 반응에 관여 하는 *ZWF1*를 과발현 함으로써 shinorine의 생산량을 더 높였다. 본 연구의 균주 중에서 가장 많은 shinorine을 생산한 균주는 *Ava3858*를 과발현한 JHYS133-6 균주이며 이를 최종 균주로 하여 최적의 포도당과 자일로스 비 율을 정하기 위한 배지 최적화 실험을 진행하였다. 그 결과 14 g/L 포도당과 6 g/L 자일로스가 포함된 배지에서 최대 농도인 68.41 mg/L를 생산하였고 12 g/L 포도당과 8 g/L 자일로스가 포함된 배지에서 최대 함량인 17.85 mg/g DCW를 생산하였다.

이후 과발현 효과를 보았던 Ava3858 유전자를 S. cerevisiae DNA로의 도 입을 진행한다면 세포 성장이 회복되면서 shinorine 생산 농도가 증가할 것 으로 예상된다. 또한 ZWF1의 과발현으로 shinorine의 함량이 증가한 결과를 통해 glycolysis 약화를 위해 G6P에서 F6P로 전환되는 반응에 관여하는 PGI1의 유전자 발현을 감소시킨다면 shinorine 생산량이 증가할 것이라고 기 대한다. 추가적으로 자일로스만을 수송할 수 있는 오탄당 수송체나 돌연변 이가 일어난 육탄당 수송체를 발현하여 glucose repression에 의해 자일로스 소비가 억제되는 것을 해결해준다면 자일로스 소비량이 증가하고, 이로써 shinorine 생산량이 증가할 것이다.

37

본 연구에서 제작된 균주는 유전자 결손을 이용한 glycolysis 약화, 유전 자 과발현을 이용한 pentose phosphate 경로 및 shinorine 생합성 경로 강화의 전략으로 제작되었고 이를 통해 shinorine 생산량이 증가하였다. 이 전략들은 모두 pentose phosphate 경로를 간접적 혹은 직접적으로 강화시켜 S7P 및 shinorine의 생산량을 높인다는 방향성을 가지고 있다. 따라서 이러한 전략들 은 shinorine 생산만이 아니라 다른 MAAs를 생산하거나 pentose phosphate 경로의 중간 물질을 이용하는 대사공학적 접근에 활용할 수 있을 것이다.

References

- 1. Chrapusta, E., et al., **Mycosporine-Like Amino Acids: Potential Health** and Beauty Ingredients. *Mar Drugs*, 2017. **15**(10).
- Sinha, R.P., S.P. Singh, and D.P. Hader, Database on mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals. *JPhotochem PhotobiolB*, 2007. 89(1): p. 29-35.
- 3. Singh, S.P., et al., Mycosporine-like amino acids (MAAs): chemical structure, biosynthesis and significance as UV-absorbing/screening compounds. *Indian J Exp Biol*, 2008. **46**(1): p. 7-17.
- Carreto, J.I. and M.O. Carignan, Mycosporine-like amino acids: relevant secondary metabolites. Chemical and ecological aspects. *Mar Drugs*, 2011. 9(3): p. 387-446.
- Gao, Q. and F. Garcia-Pichel, Microbial ultraviolet sunscreens. Nat Rev Microbiol, 2011. 9(11): p. 791-802.
- Wada, N., T. Sakamoto, and S. Matsugo, Mycosporine-Like Amino Acids and Their Derivatives as Natural Antioxidants. *Antioxidants (Basel)*, 2015. 4(3): p. 603-46.
- Katoch, M., et al., Heterologous Production of Cyanobacterial Mycosporine-Like Amino Acids Mycosporine-Ornithine and Mycosporine-Lysine in *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol, 2016. 82(20): p. 6167-6173.
- 8. Rosic, N.N., Mycosporine-Like Amino Acids: Making the Foundation for Organic Personalised Sunscreens. *Mar Drugs*, 2019. **17**(11).
- 9. Miyamoto, K.T., M. Komatsu, and H. Ikeda, Discovery of gene cluster for mycosporine-like amino acid biosynthesis from Actinomycetales microorganisms and production of a novel mycosporine-like amino acid by heterologous expression. *Appl Environ Microbiol*, 2014. **80**(16): p.

5028-36.

- 10. Becker, K., et al., **Immunomodulatory Effects of the Mycosporine-Like Amino Acids Shinorine and Porphyra-334**. *Mar Drugs*, 2016. **14**(6).
- Losantos, R., D. Sampedro, and M.S. Churio, Photochemistry and photophysics of mycosporine-like amino acids and gadusols, nature's ultraviolet screens. *Pure and Applied Chemistry*, 2015. 87(9-10): p. 979-996.
- 12. Yang, G., et al., **Photosynthetic Production of Sunscreen Shinorine Using an Engineered Cyanobacterium**. *ACS Synth Biol*, 2018. **7**(2): p. 664-671.
- Singh, S.P., et al., Role of various growth media on shinorine (mycosporine-like amino acid) concentration and photosynthetic yield in Anabaena variabilis PCC 7937. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008. 24(12): p. 3111-3115.
- Balskus, E.P. and C.T. Walsh, The genetic and molecular basis for sunscreen biosynthesis in cyanobacteria. *Science (Washington, DC, U. S.)*, 2010. 329(5999): p. 1653-1656.
- Tsuge, Y., et al., Metabolic engineering of Corynebacterium glutamicum for production of sunscreen shinorine. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2018.
 82(7): p. 1252-1259.
- Duc Nguyen, A., T. Hoang Trung Chau, and E. Yeol Lee, Methanotrophic microbial cell factory platform for simultaneous conversion of methane and xylose to value-added chemicals. *Chemical Engineering Journal*, 2020.
- Hong, K.K. and J. Nielsen, Metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae: a key cell factory platform for future biorefineries. Cell Mol Life Sci, 2012. 69(16): p. 2671-90.
- Lian, J., S. Mishra, and H. Zhao, Recent advances in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: New tools and their applications. *Metab Eng*, 2018. 50: p. 85-108.

- Park, S.H., et al., Metabolic Engineering of Saccharomyces cerevisiae for Production of Shinorine, a Sunscreen Material, from Xylose. ACS Synth Biol, 2019. 8(2): p. 346-357.
- 20. Subtil, T. and E. Boles, **Competition between pentoses and glucose during** uptake and catabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, 2012. **5**.
- Matsushika, A., et al., Fermentation of xylose causes inefficient metabolic state due to carbon/energy starvation and reduced glycolytic flux in recombinant industrial *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, 2013. 8(7): p. e69005.
- 22. Zeng, W.Y., et al., **Transcriptomes of a xylose-utilizing industrial** flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain cultured in media containing different sugar sources. *AMB Express*, 2016. 6(1): p. 51.
- Gancedo, J.M., Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1998. 63: p. 334-361.
- Kummel, A., et al., Differential glucose repression in common yeast strains in response to HXK2 deletion. FEMS Yeast Res, 2010. 10(3): p. 322-32.
- Bergdahl, B., et al., Engineering yeast hexokinase 2 for improved tolerance toward xylose-induced inactivation. *PLoS One*, 2013. 8(9): p. e75055.
- 26. Lane, S., et al., Glucose repression can be alleviated by reducing glucose phosphorylation rate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci Rep*, 2018. 8(1): p. 2613.
- 27. Shin, M. and S.R. Kim, Metabolic Changes Induced by Deletion of Transcriptional Regulator *GCR2* in Xylose-Fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. *Microorganisms*, 2020. 8(10).
- Shin, M., et al., Transcriptomic changes induced by de-activation of lower glycolysis and its advantage on pentose sugar metabolism in Saccharomyces cerevisiae. 2020.

- 29. Maslanka, R. and R. Zadrag-Tecza, Reproductive Potential of Yeast Cells Depends on Overall Action of Interconnected Changes in Central Carbon Metabolism, Cellular Biosynthetic Capacity, and Proteostasis. Int J Mol Sci, 2020. 21(19).
- 30. Xu, H., et al., *PHO13* deletion-induced transcriptional activation prevents sedoheptulose accumulation during xylose metabolism in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, 2016. **34**: p. 88-96.
- Liu, G., et al., Enhancement of Simultaneous Xylose and Glucose Utilization by Regulating ZWF1 and PGI1 in Saccharomyces cerevisiae. Transactions of Tianjin University, 2017. 23(3): p. 201-210.
- 32. Mumberg, D., R. Muller, and M. Funk, Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene 156*, 1995: p. 119-122.
- 33. Sikorski, R.S. and P. Hieter, A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in Saccharomyces cerevisiae. Genetics, 1989. 122(1): p. 19-27.

Abstract

Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of Shinorine, a natural sunscreen material

Chaeyeon Jin School of Chemical and Biological Engineering The Graduate School Seoul National University

Shinorine is a substance included in mycosporine-like amino acids (MAAs), which are known as natural sunscreen substances produced by cyanobacteria, algae, and others. Among mycosporine-like amino acids for which more than 30 substances are known, shinorine has an ultraviolet rays (UV) absorption wavelength range of 300-360 nm, which can sufficiently cover UV rays reaching the earth's surface and has high UV blocking efficiency due to its high molar extinction coefficient. So shinorine is suitable for use as a component of sunscreen. In addition, it is possible to solve the disadvantages of the chemical and physical components in sunscreens.

In this study, the xylose-utilization gene cassette was re-introduced to the inactivated HIS3 site to stabilize the S. cerevisiae strain with shinorine-producing ability and xylose-consuming ability in the previous study. After that, strategies such as weakening glycolysis, attenuating glucose suppression, and eliminating competitive pathways were carried out through gene deletion to increase the pool of sedoheptulose 7-phosphate (S7P), thereby increasing the amount of shinorine. Among them, the HXK2 deleted strain increased the amount of shinorine by 1.3 folds, showing the best effect. In addition, by overexpressing the genes of the introduced *N. punctiforme*-derived shinorine biosynthesis pathway, it was found that the ratedetermining step is the first reaction involving DDG synthase (DDGS), NpR5600. In order to compare the effects of DDGS derived from other microorganisms, Ava3858 from A. variabilis and Amir4259 from A. mirum were overexpressed. The Ava3858 overexpressing strain producing 44.18 mg/L and 17.02 mg/g DCW of shinorine showed a 1.3-fold increase in shinorine production and produced the most amount of shinorine. Using the same overexpression method, the genes involved in the conversion G6P to Ru5P was overexpressed to increase the flow from glucose to the pentose phosphate pathway. As a result, when ZWF1 of the first reaction was overexpressed, the content increased 1.22 times.

Lastly, the *Ava3858* overexpressing strain, which produced the most amount of shinorine, was used as the final strain, and the experiment was performed with medium containing various ratios of glucose and xylose. As a result, when cultured in medium containing 14 g/L glucose and 6 g/L xylose, 68.41 mg/L of shinorine was produced, which is the maximum titer. In the medium containing 12 g/L glucose and 8 g/L xylose, shinorine with the maximum content of 17.85 mg/g DCW was produced.

Key words: Shinorine, *Saccharomyces cerevisiae*, Pentose phosphate pathway, Glycolysis, Hexokinase 2 (Hxk2), Sedoheptulose 7-phosphate (S7P)

Student Number: 2019-29209