

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

• 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건 을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer 🖃





이학석사 학위논문

제빵용 효모의 전사체 분석과 이를 통한 형질 개량

Improving Fermentation Characteristics of
Commercial Baker's Yeast
by Transcriptome analysis

2022 년 2 월

서울대학교 대학원 생명과학부 임 희 나

제빵용 효모의 전사체 분석과 이를 통한 형질 개량

Improving Fermentation Characteristics of
Commercial Baker's Yeast
by Transcriptome analysis

지도 교수 허원기

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함 2021 년 12 월

> 서울대학교 대학원 생명과학부 임 희 나

임희나의 이학석사 학위논문을 인준함 2021 년 12 월

위 육	원 장	<u>(인)</u>
부위	원장	(인)
위	원	(인)

초 록

현재 국내에서 제빵용으로 사용되는 효모는 대부분 해외에 특허가 있는 균주로, 사용 시에 비용을 지급해야 한다. 국내 고유 균주가 개발되고 있지만 해외 상업 균주에 비해 발효 효율 등이 떨어져 상품화되기 어려운 것이 현실이다. 본 연구는 이러한 상황을 개선하기 위해 현재까지 개발된 국내 고유 균주의 발효 효율 등의 형질을 개량하고자 하였다. 분석에 사용한 국내 균주는 ㈜SPC에서 개발한 토종 균주 SPC70-1과, SPC70-1과 상업 균주의 교배로 만들어진 SPC73-2 두 균주이며, 비교를 위해 해외 상업 균주인 Lesaffre, OYC 균주를 사용하였다. SPC73-2 균주는 상업 균주와 비슷하게 우수한 발효 형질을 가지고 있지만 냉동 내성에서 다소 떨어지는 형질을 보였으며 SPC70-1은 냉동 내성을 포함하여 고당 내성 등 여러 조건에서 발효 형질이 좋지 않았다. 따라서 SPC73-2에서 냉동 내성을, SPC70-1에서 고당 내성을 증가시키고자 하였으며 GMO 규제를 피할 수 있는 균주를 제작하기 위해 CRISPR-Cas9 방법으로 target 유전자를 deletion한 균주를 제작하고자 하였다. 이때 효과적인 target 유전자를 선정하기 위해 국내 균주와 상업 균주의 RNA sequencing data 비교로 국내 균주에서 더 많이 발현하고 있는 유전자 14개를 탐색하였다. 추가적으로 문헌 조사를 통해 유전자 6개를 더하여 총 20개의 유전자에 대해 국내 균주에서 deletion 균주를 제작하였다. 이렇게 제작된 균주의 발효 효율 등 여러 형질을 모균주와 비교한 결과 POG1, TIR1의 deletion 균주에서 발효 효율이 증가하고, 냉동 조건에서 활성의 감소 정도가 줄어든 것으로 나타났다. 또한 POG1, TIR1 deletion 균주에서 세포를 보호하는 trehalose의 양이 증가한 것이 확인되어 trehalose 관련 유전자 TPS1, TPS2, TPS3(TSL1), NTH1의 발현 정도를 확인하였지만 유의미한 차이는 없었다. POG1과 TIR1 deletion 상황에서 trehalose의 증가의 상관관계를 규명하기 위해서는 추가적인 검증이 필요할 것으로 생각된다. 또한 최종적으로 CRISPR-Cas9 방법을 이용해 SPC70-1, SPC73-2 균주에서 유전체 안에 marker가 포함되지 않고 특정 유전자를 deletion 할 수 있는 방법을 고안하여 추후 GMO 관련 규제에 위반하지 않고 사용할 수 있는 국내 균주를 제작하였다.

주요어: 제빵용 효모, 전사체, 냉동 내성, 고당 내성, trehalose

학 번:2020-27560

목 차

초록i
목차 iii
그림 목차 iv
표 목차v
I. 서론 1
II. 재료 및 방법 5
III. 결과 17
IV. 논의
V. 참고문헌 40
Abstract

그림 목차

[그림 1. 국내 균주와 해외 상업 균주의 여러 조건에 따른 (발생량 분석 결과]	
[그림 2. 냉동 내성 target 유전자 선정을 위한 RNA sequenc 결과 및 target 유전자의 발현 차이]	
[그림 3. 고당 내성 target 유전자 선정을 위한 RNA sequenc 결과 및 target 유전자의 발현 차이]	
[그림 4. 냉동 내성 target 유전자의 deletion 균주에 대한 - 에서의 viability]	
[그림 5. 냉동 내성 target 유전자의 deletion 균주에 대한 S의 CO ₂ 발생량] 2	
[그림 6. 냉동 내성 target 유전자의 deletion 균주에 trehalose level]	
[그림 7. 고당 내성 target 유전자의 deletion 균주에 대해 3 배지에서의 viability]	
[그림 8. 고당 내성 target 유전자의 deletion 균주에 대해 3 반죽에서의 CO ₂ 발생량 측정]	
[그림 9. <i>pog1</i> Δ, <i>tir1</i> Δ 균주에서 trehalose 관련 유전자의 발현교]	
[그림 10. Complete deletion에 의해 만들어진 <i>gnp1∆ 균</i> deletion 확인을 위한 PCR 결과]	

표 목차

[丑	1.	본	연·	구에	사	용된	균주	와	발효	특	성].	•••••	•••••	•••••	•••••	•••	4
[丑	2.	본	연·	구에	사	용된	prin	ner	목록	}]	•••••	•••••	•••••	•••••	• • • • • •	•••	8
	3.	RN	ſΑ 	seqı 	ıen	cing			서 선 								
						고당 목록]											

I. 서 론

1. 연구의 배경

1.1 제빵용 효모의 발효 형질

제빵용으로 사용되는 효모 균주에서 발효 효율은 매우 중요한 형질이다. 이러한 발효 효율을 확인하기 위해 여러 factor가 사용되는데, 발효 과정 중 발생하는 CO₂의 양을 확인하는 방법이 대표적이다. 시간에 따른 CO2 발생량의 변화와 전체 발생량을 측정함으로써 효모 균주의 발효 효율을 전반적으로 확인할 수 있는데, 반죽의 조성과 보관 온도 등을 다르게 하면 여러 조건에 따른 발효 효율의 변화를 파악할 수 있다. 특히 국내 제빵 산업에서는 본사에서 대량 생산한 반죽을 냉동한 뒤 각 지점으로 보내는 시스템을 흔히 사용하기 때문에 냉동과 해동 과정을 거치며 효모 균주의 활성 감소에 따라 CO2의 발생량이 감소하게 되는데, 냉동 전후 감소 정도가 적은 균주에 대해 냉동 내성(Cold stress tolerance)을 가지고 있다고 한다. 또한 국내에서 많이 판매되는 빵의 대부분은 설탕이 많이 포함된 반죽으로 만들어진다. 반죽 내 설탕의 농도 역시 효모의 활성에 영향을 주기 때문에 고농도의 설탕 반죽에서 CO2의 발생량이 높은 것을 고당 내성(High sugar tolerance)이라 한다. 이 외에도 술이나 바이오 연료를 생산하기 위해 효모의 발효를 이용하는 경우 균주에서 만들어지는 ethyl alcohol, ethyl acetate와 같은 VOC(Volatile organic compound)의 양을 비교하기도 하다¹.

1.2 제빵용 효모 균주의 현재 상황

현재 제빵 등에 사용되는 효모 균주는 대부분 해외에서 수입해서 사용하는 상업 균주로, 형질이 우수한 토종 균주를 개발하기 위해 여러실험이 진행되고 있다. ㈜SPC에서는 누룩에서의 분리 과정을 통해 토종 균주 SPC-SNU 70-1(SPC70-1)을 개발하였으나 기존 상업 균주에비해 여러 상황에서의 발효 효율이 떨어지는 것으로 나타났다. 특히상업 균주와 비교했을 때 고당 반죽에서의 발효 효율이 좋지 않았다(그림 1). 이를 개선하기 위해 SPC70-1을 상업 균주와 교배하여

SPC73-2 균주를 개발하였다. SPC73-2의 경우 기존 상업 균주와비슷하게 우수한 형질을 보였지만 냉동 후 발효 효율 면에서는 다소어지는 경향을 보였다. (그림 1).

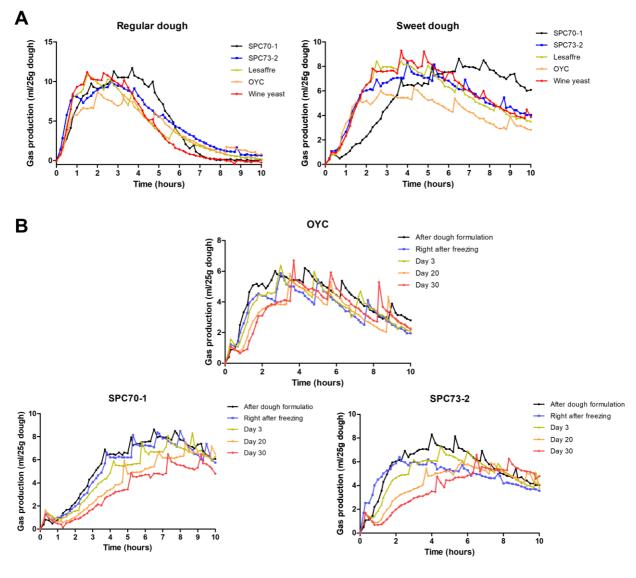


그림 1. 국내 균주와 해외 상업 균주의 여러 조건에 따른 CO_2 발생량 분석 결과

A. 국내 균주와 해외 상업 균주에서 고당 반죽에서의 CO_2 발생량 결과이다. SPC70-1에서 특히 다른 균주에 비해 고당 반죽에서의 CO_2 발생량이 낮은 것을 볼 수 있다.

B. 국내 균주와 해외 상업 균주에서 냉동 후 반죽에서의 CO_2 발생량 결과이다. SPC73-2의 경우 다른 발효 특성은 우수하나, 냉동 후 CO_2 발생량이 크게 감소한 것이 관찰되었다.

1.3 새로운 균주 개발 방법

발효 형질이 우수한 새 균주를 개발하기 위해서는 다양한 방법이 사용될 수 있다. 좋은 형질을 가진 균주끼리 교배하여 좋은 형질이 축적될 수 있도록 하는 mating 방법과 연속적으로 계대 배양하여 좋은 형질의 균주를 선별하는 adaptive laboratory evolution 방법은 전통적으로 많이 사용되었던 방법이다. 두 방법은 GMO 규제에 대한 위반 없이 확실하게 좋은 형질의 균주를 개발할 수 있다는 장점이 있지만 시간과 비용이 매우 많이 소요된다. 최근 분자생물학 기술이 발전하면서 mutagenesis를 통해 균주를 개발하고자 하는 시도가 시작되었는데, DNA나 chemical mutagen, bacteria 등을 처리하여 random으로 mutation을 발생시키는 경우 GMO 규제로 식품에 사용될 수 없을 뿐만 아니라 시간 역시 오래 걸린다. 반면 CRISPR-Cas9을 이용해 특정 유전자의 발현을 조절하는 방법은 유전자를 deletion하는 경우에 한해 추후 GMO 규제를 벗어날 수 있고, 가능성 있는 유전자를 탐색하여 deletion하기 때문에 시간을 단축시킬 수 있다. 이 때 여러 균주들의 전사체 분석 (Transcriptome analysis)을 진행하여 발현에서 유의미한 차이가 있는 유전자를 탐색하여 target 유전자로 선정한다면 해당 유전자가 발효 형질에 영향을 미치는 유전자일 가능성이 크기 때문에 긍정적인 결과를 얻을 확률이 높다고 할 수 있다.

2. 연구의 목표

균주의 효율적인 개량을 위해 SPC73-2에서는 여러 형질 중 냉동 내성을, SPC70-1에서는 고당 내성을 개선하고자 하였는데, 먼저 target 유전자를 선정하기 위해 SPC 균주와 상업 균주의 RNA sequencing을 진행하고, 이 결과에서 발현량이 균주마다 유의미한 차이를 보이는 유전자를 정리하고자 하였다. 이 때 SPC73-2와 상업 균주의 RNA sequencing data를 비교하여 SPC73-2에서 더 많이 발현하는 유전자를 찾고, SPC70-1과 상업 균주를 비교하여 SPC70-1에서 더 많이 발현하는 유전자를 찾고, SPC70-1과 상업 균주를 비교하여 SPC70-1에서 더 많이 발현하는 유전자를 찾아 deletion 균주를 제작하여 발효 효율을 비교하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 연구에 사용된 효모 균주와 배지

본 연구에서 사용된 효모 균주의 목록은 다음 표 1과 같다. SPC70-1과 SPC73-2 및 상업 균주 Lesaffre, OYC-us, OYC-LT는 모두 야생 균주이며, trehalose assay 및 trehalose 관련 유전자들의 qRT-PCR, western blot 등에서 사용된 균주는 실험실 유래 균주인 BY4741에서 유래되었다. 실험을 위한 효모 세포들은 일반 조건 30℃, 냉동 조건 -20℃에서 배양되었으며 사용된 배지는 YPD (1% yeast extract, 2% glucose, 2% peptone), synthetic complete medium (SC; 0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose), appropriate amino acid), LD (liquid dough) ² 이다.

표 1. 본 연구에 사용된 균주와 발효 특성

Strain	Description	Fermentation characteristics	Source
SPC70-1	lsolated from Nuruk, traditional strain	Better than existed traditional strain, but worse than commercial strain	SPC
SPC73-2 Generated by mating traditional strain(SPC70-1) with other commercial strains		Good for fermentation ability in various condition, but not good for cold stress tolerance	SPC
Lesaffre (Commercial 1) French commercial strain from LESAFFRE		Good for fermentation ability in various condition, especially high sugar tolerance	SPC
OYC-us (Commercial 2)	Japanese commercial strain from OYC	Good for fermentation ability in various condition	SPC
OYC-LT (Commercial 3)	Japanese commercial strain from OYC	Good for fermentation ability in various condition	SPC
SPC73-2 MATa	Haploid cell of SPC73-2	-	SPC
BY4741 <i>MATa his3</i> Δ 1 <i>leu2</i> Δ 0 <i>met15</i> Δ 0 <i>ura3</i> Δ 0		- (S288C-derivative laboratory strain, haploid cell)	Research genetics

2. Homologous recombination을 이용한 deletion 균주 제작

본 연구에서 제작한 deletion 균주는 일부 CRISPR-Cas9을 이용한 균주를 제외하고 모두 target 유전자에 antibiotic marker sequence를 넣는 homologous recombination 방법으로 제작되었다. primer를 이용해 PCR-매개 유전자 타겟팅 방법으로 template를 제작한 후 효모세포를 YPD 배지, OD600 0.8로 배양하여 lithium acetate를 이용해형질 전환을 시켰다³. 형질 전환이 이루어진 세포들은 G418, Hygromycin이 포함된 배지에서 선택적으로 배양되었으며 colony-PCR과 qRT-PCR 과정을 통해 deletion을 확인하였다. Deletion 및후에 언급된 여러 실험에 사용된 모든 primer를 표 2에 정리하였다.

3. Trehalose assay

Media에서 배양한 효모 세포의 trehalose 양을 측정하기 위해 YPD 배지에서 OD600 8.0까지 세포를 배양한 뒤 각 조건에 따라 YPD, LD20, SC 배지로 resuspension하여 YPD와 LD20 배지의 세포는 30 ℃, SC 배지의 세포는 -20 ℃에서 5시간 배양하였다. 이후 세포만을 모은 뒤 phosphate-buffered saline으로 씻어내고 0.25M Na2CO3를 넣어 95℃에서 4시간 동안 끓였다. 1M acetic acid와 0.2M sodium acetate (pH 5.2)를 넣고 trehalase를 첨가하여 37 ℃에서 16시간 반응시켰다. 14,000 g에서 5분 간 원심 분리하여 상층액을 따 glucose assay reagent (Supelco, G3293)와 상온에서 15분 동안 반응시켜 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험에서 positive control을 위해 OD600 8.0까지 배양한 효모 세포에 대해 42 ℃에서 15분 heat shock을 주어 동일하게 trehalose level을 측정하였다.

4. qRT-PCR

각 균주에서 RNA 발현을 측정하기 위해 YPD 배지에서 OD 8.0까지 효모 세포를 배양한 뒤 각 조건에 따라 YPD, LD20, SC 배지로 resuspension하여 YPD와 LD20 배지의 세포는 30 ℃, SC 배지의

세포는 -20 ℃에서 5시간 배양하였다. 이후 1 ml를 4 ℃, 1000 g, 5분 동안 원심분리하고 pellet만을 모아 zymolase, 0.1% β - mercaptoethanol이 포함된 Y1 buffer에 풀어 30 ℃에서 30분 간반응시켰다. 이후 RNeasy mini kit (Qiagen, Cat. No. 74104)를이용하여 RNA을 분리한 뒤, ReverTraAce qPCR RT kit (TOYOBO, Cat. No. FSQ-101)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA는 SensiFAST SYBR Lo-ROX kit (Bioline, Cat. No. BIO-94020)를이용하여 Thermo Fisher Scientific 사의 Applied Biosystems QuantStudio 3 (Cat. No. A28137)로 qRT-PCR을 진행하였다.

5. Western blot assay

Western blot analysis를 위해 효모 세포들을 SC 배지에서 mid logarithmic phase까지 키웠다. 세포만을 모으고 phosphate-buffered saline으로 두 번 씻어냈다. 그리고 세포에 lysis buffer (50mM tris-Cl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.15% NP-40, 1mM EDTA)와 protease inhibitor (10mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1mM benzamedine, 1mM leupeptin, 1mM pepstatin)을 첨가하여 bead beating 방법으로 세포를 파괴시켰다. 이후 13,000 rpm, 4 ℃에서 10분 동안 원심분리시켰다. 상등액만을 추출하여 모으고 6X sodium dodecyl sulfate sample buffer와 섞어주었다. 이를 95℃에서 3분간 가열해주었다. SDS-PAGE와 western blot assay는 일반적인 방법으로 수행되었으며, HRP가 결합된 GFP 항체 (600-103-215, Rockland)를 이용하였다.

표 2. 본 연구에서 사용된 primer 목록

Primer	Sequence (5' to 3')
POG1-F(kan)	ATCAAAGTGGATGCCATATTATGAAGCAGGAGCCACATAG CGATTTAGGTGACACTATAG
POG1-R(kan)	CACGTCATGTGGGAGGAGGATGTTTTGGTGTATGAATGAG TTAATACGACTCACTATAGG
POG1-F(hyg)	ATCAAAGTGGATGCCATATTATGAAGCAGGAGCCACATAG GATCCGCTAGGGATAACAGG
POG1-500	ACAACTTTCCGCACGTAGTG
POG1+86R	AATGAGGTATGCTGCTCTCG
POG1+889	GGTCAGGAACGAGACCAGTC
POG1+1050R	GGGAGGAGGATGTTTTGGTG
POG1-UP-R	GAAAATTACTGCACGTCATGTGGGAGGAGG GTATGAGTTAAGCGCAGGGA
POG1-Down-F	TTGCGTGCAATCCCTGCGCTTAACTCATA CCCTCCTCCCACATGACGTGC
POG1-Down-R	GTTTATCTGTTCTGTAACCG
POG1+1877R	GTAGATGGCACCTGCTATTG
HSP104-F(kan)	ACTACACGTACCATAAAATATACAGAATATATGAACGACC CGATTTAGGTGACACTATAG
HSP104-R(kan)	ACACTATATTAAATTAATCTAGGTCATCATCAATTTCCAT TTAATACGACTCACTATAGG
HSP104-F(hyg)	ACTACACGTACCATAAAATATACAGAATATATGAACGACC GATCCGCTAGGGATAACAGG
HSP104-400	CATCGTGGTAGTGTTTGCTG
HSP104+83R	GGATGTTGATGATCCGAAGC
INP51-F(kan)	TTTCACTACAATGAGACTCTTCATCGGTAGAAGATCACGG CGATTTAGGTGACACTATAG
INP51-R(kan)	ATATAATCTTTTCACTAATGATCATTTACTTACCTTTCTA TTAATACGACTCACTATAGG
INP51-F(hyg)	TTTCACTACAATGAGACTCTTCATCGGTAGAAGATCACGG GATCCGCTAGGGATAACAGG
INP51-400	TGTCCACATCTACGTAGTCC

Primer	Sequence (5' to 3')
INP51+99R	ACTGGCACCTGGTATGCTGC
TIP1-F(kan)	CCTCTGCTAAATAAAATAAAATGTCCGTTTCCAAGATTGC CGATTTAGGTGACACTATAG
TIP1-R(kan)	TTGTAAAAGGTTCCCTTTTATAACAATAAAGCAGCTGCAC TTAATACGACTCACTATAGG
TIP1-F(hyg)	CCTCTGCTAAATAAAATAAAATGTCCGTTTCCAAGATTGC GATCCGCTAGGGATAACAGG
TIP1-500	AAGAGCATCAGACGATCTGG
TIP1+89R	TGCAATTCAGCAGTTTCGGC
TIP1+492	CGTTTCTTCTGTCGCTC
TIP1+614R	GCACCTGCAACAACAGCACC
TIR1-F(kan)	AAGTACTACAATAATTAAAAATGGCTTACACTAAGATCGC CGATTTAGGTGACACTATAG
TIR1-R(kan)	CCAATAACTTATAACAACATAGCGGCAGCTGCGACAACAC TTAATACGACTCACTATAGG
TIR1-F(hyg)	AAGTACTACAATAATTAAAAATGGCTTACACTAAGATCGC GATCCGCTAGGGATAACAGG
TIR1-500	TAGTACGTGTTTCC
TIR1+69R	TTGATCTTGGGTTTGAGCGG
TIR1-Up-R	ACCAATAACTTATAACAACATAGCGGCAGC GTAGTACTTGTTGAAAGCGA
TIR1-Down-F	ACTTTTCATTCGCTTTCAACAAGTACTAC GCTGCCGCTATGTTGTTATA
TIR1-Down-R	TCAGCCTTCGTTGAATTCGG
TIR1-1428R	CGTATGTCCTTAAGGAGAAC
TIR1+603	TGCTCCAAGCTCCACTGGTG
TIR1+747R	AGCTGCGACAACACCAGCAC
SLT2-F(kan)	ATTGAAGGGCGTGTATAACAATTCTGGGAGATGGCTGATA CGATTTAGGTGACACTATAG

Primer	Sequence (5' to 3')
SLT2-R(kan)	GTCTAGAAGCGTGCCGTTATCATTCTGAGGCGGAATATCT TTAATACGACTCACTATAGG
SLT2-F(hyg)	ATTGAAGGGCGTGTATAACAATTCTGGGAGATGGCTGATA GATCCGCTAGGGATAACAGG
SLT2-400	AGGTTCGAATACTTGTGAGC
SLT2+108R	TATGCCGTATGCTCCATGCC
TDH1-F(kan)	AAATGATCAGAATTGCTATTAACGGTTTCGGTAGAATCGG CGATTTAGGTGACACTATAG
TDH1-R(kan)	CATTATCCTCATCAAGATTGCTTTATTTAAGCCTTGGCAA TTAATACGACTCACTATAGG
TDH1-F(hyg)	AAATGATCAGAATTGCTATTAACGGTTTCGGTAGAATCGG GATCCGCTAGGGATAACAGG
TDH1-500	TAGGATATGCGACGAAGACG
TDH1+64R	GCAAAGCCAATCTCAAGACC
TDH1+837	TGTCTCCTCTGATTTCTTGG
TDH1+978R	GATCAAGTCAACAACTCTGG
ZRT1-F(kan)	AAAAGGAATTATGAGCAACGTTACTACGCCGTGGTGGAAA CGATTTAGGTGACACTATAG
ZRT1-R(kan)	CGCTTTGGTTTAAGCCCACTTACCGATCAAAGCCATGATA TTAATACGACTCACTATAGG
ZRT1-F(hyg)	AAAAGGAATTATGAGCAACGTTACTACGCCGTGGTGGAAA GATCCGCTAGGGATAACAGG
ZRT1-500	ACAATGCAGATCCACGCTAC
ZRT1+59R	GCAAGTGTAACTTCAGAAGG
ZRT1+990	GTACACTGGTTTGGAAC
ZRT1+1123R	ACTTACCGATCAAAGCCATG
ZPS1-F(kan)	AACCAAATCCACACAACTACTAAACATTATGAAGTTCT CGATTTAGGTGACACTATAG
ZPS1-R(kan)	ACATATTCTGTGGAAGTAATGATGTGGTTATTACAAGTTA TTAATACGACTCACTATAGG

Primer	Sequence (5' to 3')
ZPS1-F(hyg)	AACCAAATCCACACAACTACTAAACATTATGAAGTTCT GATCCGCTAGGGATAACAGG
ZPS1-500	TGAAGCATTAAGCTCTGACG
ZPS1+53R	GCTAGAGAAGCAATAGTTGC
ZPS1+612	GGAAACTCTTGAAGAAGTTG
ZPS1+743R	TTACCTAGACAGCCACCAGG
ANB1-F(kan)	CATACACCTATTTCATTCACACACTAAAACATGTCTGACG CGATTTAGGTGACACTATAG
ANB1-R(kan)	AAATATCTAATCAGATCTTGGAGCTTCCTTGAAGGAGATG TTAATACGACTCACTATAGG
ANB1-R(hyg)	CATACACCTATTTCATTCACACACTAAAACATGTCTGACG GATCCGCTAGGGATAACAGG
ANB1-500	TCGACGATGTCGTCTCACAC
ANB1+69R	ACATTGCATTGGGTAGGTGG
ANB1+324	AACCAAAGACGATGTCAAGG
ANB1+465R	TCTTGGAGCTTCCTTGAAGG
GNP1-F(kan)	TAGCTTATATAATATCAAATATTGCACATTATGACGCTTG CGATTTAGGTGACACTATAG
GNP1-R(kan)	GAATCGTGATTTCTGCTTTAACACCAGAAATCAAGAACTC TTAATACGACTCACTATAGG
GNP1-F(hyg)	TAGCTTATATAATATCAAATATTGCACATTATGACGCTTG GATCCGCTAGGGATAACAGG
GNP1-500	ATGCGACGTGCTTGCGATCC
GNP1+83R	ACATCGTCAAGGTCGTTACG
GNP1+1789	GCTATGCCAATCTGGATTGC
GNP1+1958R	GGTCCGTTTCTTAATCTCTC
GNP1-Up-R	ACAGGAAGAGCGTGTAGGAAGGCTGGGATT GGCGTCTATTACCAAGCGTC

Primer	Sequence (5' to 3')
GNP1-Down-F	TGCACATTATGACGCTTGGTAATAGACGCC AATCCCAGCCTTCCTACACG
GNP1-Down-R	AGTCTGCTAAAGCCTTCGAG
GNP1+2793R	CGCCTCTTGTCCTGTGGATC
IMA2-F(kan)	AAAGAAAGCAACGTACAATGACTATTTCTTCTGCACATCC CGATTTAGGTGACACTATAG
IMA2-R(kan)	TAAAAATCTTGTCGTCACAATCATCAATCATTCAGATATGT TAATACGACTCACTATAGG
IMA2-F(hyg)	AAAGAAAGCAACGTACAATGACTATTTCTTCTGCACATCC GATCCGCTAGGGATAACAGG
IMA2-500	AGTGCCAAGGGATGCACGAG
IMA2+48R	TTTCCACCACTTGGGTTCTG
IMA2+1613	TTGCTGCTTTGAACTTCAGC
IMA2+1743R	CCATGGCTTCAATGTTCTGG
GIP2-F(kan)	GTTTATTAGGATTTCATCAACGCAACAATGTATATAAAGG CGATTTAGGTGACACTATAG
GIP2-R(kan)	TCCATTCTTCATCTCCTTCCTTGGTTGCCTTCATGCTG TTAATACGACTCACTATAGG
GIP2-F(hyg)	GTTTATTAGGATTTCATCAACGCAACAATGTATATAAAGG GATCCGCTAGGGATAACAGG
GIP2-500	AGTTCGTTCTATCCAACAGG
GIP2+46R	TCTTCCTCTCAAACTGTTGG
GIP2+1479	CGATGATGTCAGCAAAGTGG
GIP2+1615R	CATCCATTACAACATCCACC
GIP2-Up-R	CCATTCTTCATCTCCTTCTGGTTGCC GTTGCGTTGATGAAATCCTA
GIP2-Down-F	CCAAGTTTATTAGGATTTCATCAACGCAAC GGCAACCAGAAGGAAGGAGA
GIP2-Down-R	GAAGCGTCGGGATGAGACTG

Primer	Sequence (5' to 3')
GIP2+2402R	GTTATCGGATATAGGCTACC
CYC7-F(kan)	AAGTAAACTTCAGTAAACTACATTACATCATAAACAAAACC GATTTAGGTGACACTATAG
CYC7-R(kan)	TAATAAATATCTCGTCCGGCGACATAGCCTATTTGGCAGC TTAATACGACTCACTATAGG
CYC7-F(hyg)	AAGTAAACTTCAGTAAACTACATTACATCATAAACAAAAC GATCCGCTAGGGATAACAGG
CYC7-500	GTATACGAGCTAGCAGGACG
CYC7+38R	GCAGAGCCTGGTTTGAATCC
DAK2-F(kan)	AACCCAACTACAATTGACTAAATAATCATGTCTCACAAAC CGATTTAGGTGACACTATAG
DAK2-R(kan)	GCTTCTAGTGTACGAGCAATTCTAGTACCCAGCAGCTG TTAATACGACTCACTATAGG
DAK2-F(hyg)	AACCCAACTACAATTGACTAAATAATCATGTCTCACAAAC GATCCGCTAGGGATAACAGG
DAK2-500	TTTGATCGACCAAGACTAGG
DAK2+56R	CAAGTAGGTAGGAGTAACG
DAK2+1600	CAAGCTGCTTATGATGGTGC
DAK2+1754R	AATCCATCGAGTAGTGCAGC
DAK2-Up-R	CTGTTATGTTTGGCTTCTAGTGTGTACGAGGTAG GTAGGGAGTAACGATG
DAK2-Down-F	CAGATGGAAACATCGTTACTCCCTACCTAC CTCGTACACACTAGAAGCCA
DAK2-Down-R	GATTGCTATCCTAGAACTTG
DAK2+2349R	CTGTTGAGTTCAATGCCTTC
SUC2-F(kan)	TTCTTTTCACTAACGTATATGATGCTTTTGCAAGCTTTCC CGATTTAGGTGACACTATAG
SUC2-R(kan)	CAATAAGTTTTATAACCTCTATTTTACTTCCCTTACTTGG TTAATACGACTCACTATAGG
SUC2-F(hyg)	TTCTTTTCACTAACGTATATGATGCTTTTGCAAGCTTTCC GATCCGCTAGGGATAACAGG

Primer	Sequence (5' to 3')
SUC2-500	GAACTCGATCCATTATGAGG
SUC2+74R	GTTTCGTTTGTCATTGATGC
LTV1-F(kan)	AAAGCACGAAGATGTCGAAGAAATTTAGCTCTAAAAAACTC CGATTTAGGTGACACTATAG
LTV1-R(kan)	TGTAATGTAGGTGCTTTCTCATCTCATTCTACTCCTCTAA TTAATACGACTCACTATAGG
LTV1-F(hyg)	AAAGCACGAAGATGTCGAAGAAATTTAGCTCTAAAAACTC GATCCGCTAGGGATAACAGG
LTV1-500	CATCCAGTTACTATCTCACC
LTV1+54R	TCTGTGTACCACCACGTACC
LTV1+1216	TACGAACTGGAGAGTGGTGG
LTV1+1378R	TGCTTAGTGTATTGGTGACC
LTV1-Up-R	GTACTTGTAATGTAGGTGCTTTCTCATCTC CTGGTTGCTCGTAGGATTCG
LTV1-Down-F	GGGTTCTTACCGAATCCTACGAGCAACCAG GAGATGAGAAAGCACCTACA
LTV1-Down-R	GGCATCGAATTGAGTAGCGG
LTV1+2063R	ATTAGGCAGTGGCGCTATAA
GPH1-F(kan)	AACAATGCCGCCAGCTAGTACTAGTACTACCAATGATATG CGATTTAGGTGACACTATAG
GPH1-R(kan)	AAGTCACTGGTTCAACGTTCCAAATGGTATCGGAGTATTC TTAATACGACTCACTATAGG
GPH1-F(hyg)	AACAATGCCGCCAGCTAGTACTAGTACTACCAATGATATG GATCCGCTAGGGATAACAGG
GPH1-500	ACGCTCAACGGAAGAGGAAG
GPH1+89R	AGTCTCCTTGTAAGCCTTGG
SPG1-F(kan)	TTAGATTCAGGAATATACTCAGAGGCACAAAGAGTTGTGA CGATTTAGGTGACACTATAG
SPG1-R(kan)	AACCAAGTACAAATTCCCTTACATGATTGAAGAGAACATC TTAATACGACTCACTATAGG

Primer	Sequence (5' to 3')		
SPG1-F(hyg)	TTAGATTCAGGAATATACTCAGAGGCACAAAGAGTTGTGA GATCCGCTAGGGATAACAGG		
SPG1-500	CATAAACCACTCACAACGGG		
SPG1+50R	GTTCTCACAACTCTTTGTGC		
TIM18-F(kan)	AATGCTATTGTTTCCTGGCTTGAAGCCTGTTCTTAATGCT CGATTTAGGTGACACTATAG		
TIM18-R(kan)	GGTCATCATTTTCATTCCAAAGTTTCTTTACCAGGTCAAC TTAATACGACTCACTATAGG		
TIM18-F(hyg)	AATGCTATTGTTTCCTGGCTTGAAGCCTGTTCTTAATGCT GATCCGCTAGGGATAACAGG		
TIM18-500	GCAGTCTAAGACAGAAGGAA		
TIM18+70R	CAGCTCGTACAGGATTTACA		
YAR1-F(kan)	CACAGTGAACCGTTAGATCAAGAGGACCAAGACACCATAA CGATTTAGGTGACACTATAG		
YAR1-R(kan)	CCTCGGTGGCTTCCTTGGTGACTTGTTCAATTTCTGTACC TTAATACGACTCACTATAGG		
YAR1-F(hyg)	CACAGTGAACCGTTAGATCAAGAGGACCAAGACACCATAA GATCCGCTAGGGATAACAGG		
YAR1-500	GGATTACTGTGTGAGAGAG		
YAR1+73R	AATCGCCAGCTCTTGCATCG		
KanC-R	TCGCGAGCCCATTTATACCC		
Hyg-CHK2	CTTCTCGACAGACGTCGCGG		
TPS1+1313	TTTCTGATGCCATCAACGAG		
TPS1+1473R	AGAGGAGCTTGTTGAGCTTG		
TPS2+2506	CCTCAGCAAGTCCTGGAGAC		
TPS2+2650R	CATAAGCTTTAGATGCTAGC		
TSL1+3075	TCCCACTGTGTCAGTGAACC		

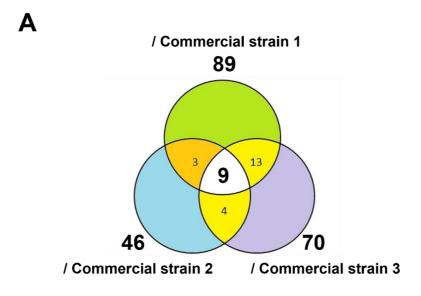
Primer	Sequence (5' to 3')		
TSL1+3230R	TAAGTAGAAGTAGCATCACC		
NTH1+1577	TAACAACTTCAGCTATGTGG		
NTH1+1729R	ATGCCCAGAATGTAGTTGCG		
ACT1-CHK	TGACTGACTACTTGATGAAG		
ACT1+1000R	TGCATTTCTTGTTCGAAGTC		
CUP1+30	TGAAGGTCATGAGTGCCAAT		
CUP1+192R	TTCGTTTCATTTCCCAGAGC		

Ⅲ. 결과

1. 전사체 분석

토종 균주와 상업 균주의 전사체 비교를 위해 RNA sequencing을 진행하였다. 첫번째 RNA sequencing 분석은 YPD, 30℃의 기본조건에서 토종 균주인 SPC70-1과 SPC73-2, 상업 균주인 Lesaffre, OYC-us, OYC-LT, 총 5 종의 균주의 RNA를 추출하여 sequence를 비교하였다. 이를 통해 냉동 내성 target 유전자를 찾고자 하였다. 두번째 RNA sequencing 분석은 고당 내성 target 유전자를 찾기 위해 반죽과 유사한 성분을 가지며 sucrose 농도가 높은 LD(Liquid Dough) 배지에서 배양한 SPC70-1과 Lesaffre 균주의 RNA에서 진행되었다. LD 배지는 sucrose 20% 농도(LD20)와 40% 농도(LD40) 두 종류를 사용하였다.

두 RNA sequencing 결과에서 모두 각 비교군에서 유의미하게 발현 정도가 차이 나는 유전자들을 정리하였다. 이러한 결과에서, deletion 균주를 제작했을 때 형질이 개선될 만한 유전자 후보군을 얻기 위해 각각의 비교군에서 상업 균주보다 SPC 균주에서 더 많이 발현하고 있는 유전자를 정리하였다. 첫번째 냉동 내성 target 유전자를 찾기위한 RNA sequencing data에서는 SPC73-2가 더 많이 발현하고 있는 유전자들을 정리하여 공통 유전자를 얻었으며, 이 유전자 중 발현차이가 매우 크거나, 이미 알려진 특징이 냉동 내성과 연관 있는 유전자 TIP1, TIR1, TDH1, ZRT1, ZPS1, ANB1 6개를 선정하였다. (그림 2)



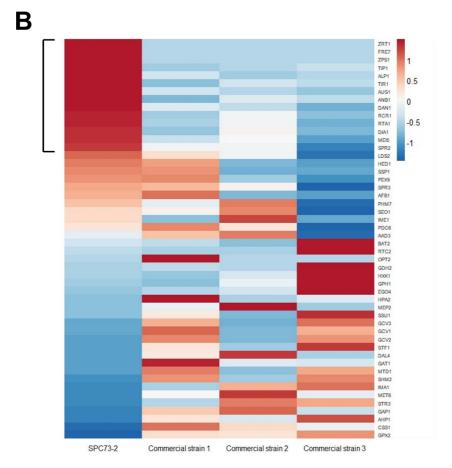


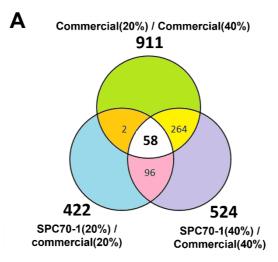
그림 2. 냉동 내성 target 유전자 선정을 위한 RNA sequencing 결과 및 target 유전자의 발현 차이

A. 냉동 내성 target 유전자 선정을 위한 RNA sequencing 결과 중 SPC73-2 균주에서 상업 균주(Lesaffre, OYC-us, OYC-LT)에 비해 더 많이 발현하고 있는 유전자의 정리 결과이다. 각 비교군에서 공통적으로 나타난 유전자 중 발현 차이가 크거나 특징이 관련된 유전자 6개를 선정하였다.

B. RNA sequencing 결과의 heat map이다. 그림에서 빨간색으로 나타날수록 유전자의 발현 정도가 큰 것이고, SPC73-2에서 많이 발현하면서 나머지 상업 균주에서는 적게 발현하고 있는 표시된 부분에서 target 유전자를 탐색하였다. 해당 부분에 속한 유전자 중 발현 정도의 차이가 크거나 관련 특징이 보고된 유전자 TIP1, TIR1, ZRT1, ZPS1, ANB1을 선택하였으며 공통 부분에는 속하지 않았지만 발현 차이가 매우 크게 나타난 TDH1까지 포함하여 총 6개의 target 유전자를 선택하였다.

이와 동일하게, 고당 내성 target 유전자를 찾기 위해 SPC70-1 혹은 저당 조건에서 더 많이 발현하고 있는 유전자들을 정리하였으며 그 중 발현 차이가 크거나 고당 내성과 관련 있는 특징이 알려진 유전자 GNP1, IMA2, GIP2, CYC7, DAK2, SUC2, GPH1, SPG1 8개를 선정하였다. (그림 3)

여기에 더하여 이전 연구에서 deletion 시켰을 때 freeze-thaw resistance 또는 hyperosmotic stress resistance가 증가한 것이 보고된 유전자를 추가적으로 선정하였다. 냉동 내성에서는 POG1, HSP104, INP51을, 고당 내성에서는 LTV1, TIM18, YAR1를 선정하였으며 최종적으로 deletion을 위해 선정한 target 후보 유전자의 목록을 표 3에 정리하였다.



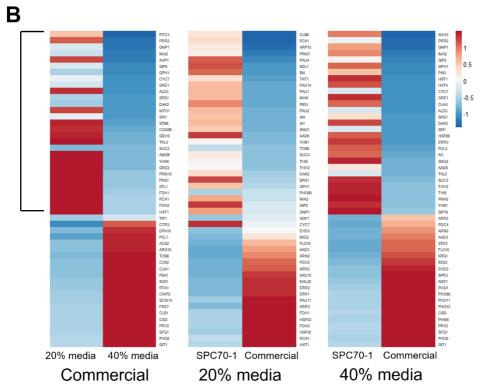


그림 3. 고당 내성 target 유전자 선정을 위한 RNA sequencing 결과 및 target 유전자의 발현 차이

A. 고당 내성 target 유전자 선정을 위한 RNA sequencing 결과 중 SPC70-1 균주에서 상업 균주(Lesaffre)에 비해 더 많이 발현하고 있거나 각 균주마다 저당 배지인 LD20에서 더 많이 발현하고 있는 유전자의 정리 결과이다. 각 비교군에서 공통적으로 나타난 유전자 중 발현 차이가 크거나 특징이 관련된 유전자 8개를 선정하였다.

B. RNA sequencing 결과의 heat map이다. 마찬가지로 그림에서 빨간색으로 나타날수록 유전자의 발현 정도가 큰 것이고, 두 가지 농도의 배지에서 모두 SPC70-1에서 많이 발현하거나, 저당배지에서 많이 발현하는 부분을 표시하였다. 해당 부분에 속한 유전자 중 발현 정도의 차이가 크거나 관련 특징이 보고된 유전자 GNP1, IMA2, GIP2, CYC7, DAK2, SUC2, GPH1, SPG1 등 총 8개를 선정하였다.

표 3. RNA sequencing 결과에서 선정한 deletion target 유전자

For	ORF	Gene	Description	Source
Cold stress tolerance	YBR067C	TIP1	Temperature shock-inducible protein	RNA sequencing data
	YER011W	TIR1	Tip1-related, cell wall mannoprotein	RNA sequencing data
	YJL052W	TDH1	Triose-phosphate dehydrogenase	RNA sequencing data
	YGL255W	ZRT1	Zinc-regulated transporter	RNA sequencing data
	YOL154W	ZPS1	Zinc- and pH-regulated surface protein	RNA sequencing data
	YJR047C	ANB1	Anaerobically induced, translation elongation factor	RNA sequencing data
	YIL122W	POG1 4	DNA-binding transcriptional activator	Sasano Y et al., (2013)
	YLL026W	HSP104 ⁵	Heat shock protein	lwahashi et al., (1998)
	YIL002C	INP51 6	Inositol polyphosphate 5-phosphatase	Stolz et al., (1998)
High sugar tolerance	YDR508C	GNP1	Amino acid permease	RNA sequencing data
	YOL157C	IMA2	Isomaltase	RNA sequencing data
	YER054C	GIP2	protein phosphatase	RNA sequencing data
	YEL039C	СҮС7	Cytochrome c isoform 2	RNA sequencing data
	YFL053W	DAK2	Dihydroxyacetone kinase	RNA sequencing data
	YIL162W	SUC2	sucrose hydrolyzing enzyme	RNA sequencing data
	YPR160W	GPH1	Glycogen phosphorylase	RNA sequencing data
	YGR236C	SPG1	Protein for high temperature survival during stationary phase	RNA sequencing data
	YKL143W	LTV1 7	Heat shock Subunit of the EGO/GSE complex	Loar et al., (2004)
	YOR297C	TIM18 8	Component of the mitochondrial TIM22 complex	Du et al., (2007)
	YPL239W	YAR1 7	Nucleocytoplasmic shuttling assembly chaperone	Loar et al., (2004)

2. 후보 유전자 deletion 균주 제작

표 3의 유전자 목록에 대하여 homologous recombination 방법을 이용해 deletion 균주를 제작하였다. 최종적인 목표인 CRISPR-Cas9을 사용하지 않고 homologous recombination 방법을 사용한 것은 효모에서 transformation을 이용한 homologous recombination으로 deletion 균주를 제작하는 방법이 잘 갖춰져 있기 때문에 실험의 편의를 위해 우선적으로 homologous recombination 방법을 사용하였다. 냉동내성 target 유전자의 경우 SPC73-2에서 deletion 균주를 제작하였으며, 고당 내성 target 유전자의 경우 SPC70-1에서 deletion 균주를 제작하고자 하였으나, 원인을 알 수 없는 문제에 의해 diploid 균주에서 deletion이 정상적으로 되지 않아 haploid 균주인 SPC73-2 MATa 균주에서 deletion 균주를 제작하였다. 또한 SPC70-1, SPC73-2와 같은 야생 균주에서 유전자 조작을 하고자 했기 때문에 Ura, Leu 등의 auxotrophic maker가 아닌 Kanamycin A, Hygromycin B 와 같은 항생제 저항성 유전자를 marker로 사용하였다. 이렇게 제작한 균주에 대한 설명을 아래 표 4과 같이 정리하였다.

표 4. 냉동 내성과 고당 내성에서의 target gene에 대하여 완성한 deletion 균주의 목록

Target gene	Mother strain	Selection marker	Strain name
POG1			pog1∆
HSP104			<i>hsp104</i> ∆
INP51			inp51∆
TIP1			tip1∆
TIR1	SPC73-2	Kanamycin A and Hygromycin B	tir1∆
TDH1			tdh1∆
ZRT1			zrt1∆
ZPS1			zps1∆
ANB1			anb1∆
GNP1	SPC73-2 <i>MATa</i>	Kanamycin A	gnp1∆
IMA2		Hygromycin B	ima2∆
GIP2		Kanamycin A	gip2∆
CYC7		Hygromycin B	<i>cyc7</i> ∆
DAK2		Hygromycin B	dak2∆
SUC2		Hygromycin B	suc2∆
LTV1		Kanamycin A	ltv1∆
GPH1		Hygromycin B	gph1∆
SPG1		Kanamycin A	spg1∆
TIM18		Hygromycin B	<i>tim18</i> ∆
YAR1		Hygromycin B	yar1∆

3. Deletion 균주의 발효 형질 확인

표 4와 같이 제작한 deletion 균주에 대하여 발효와 관련된 여러 특성을 확인하였다. 먼저 냉동 내성 target 유전자의 deletion 균주에 대해 -20 $^{\circ}$ C에 보관한 세포를 꺼내 일반 배지에서 배양한 결과 SPC73-2에 비해 $pog1\Delta$, $tir1\Delta$ 균주에서 약간의 viability의 증가가 관찰되었고, 다른 유전자의 deletion 균주에서는 큰 차이를 보이지 않았다. SPC에서 진행한 CO_2 발생량에 대한 test 결과 역시 비슷했다. 냉동 후 모든 균주에서 CO_2 발생량이 감소하는데, $pog1\Delta$, $tir1\Delta$ 균주에서 모균주에 비해 CO_2 발생량의 감소 정도가 줄어든 것으로 나타났다. (그림 4,5)

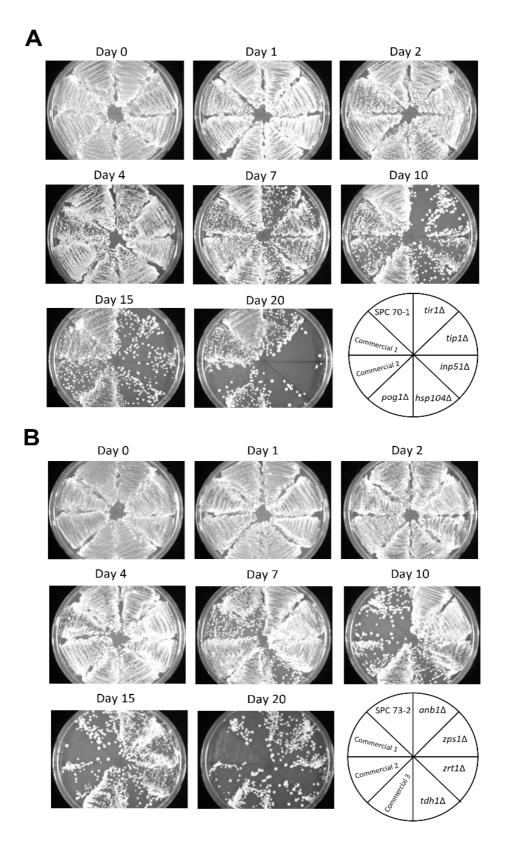


그림 4. 냉동 내성 target 유전자의 deletion 균주에 대한 - 20 ℃에서의 viability

A. $pog1\Delta$, $hsp104\Delta$, $inp51\Delta$, $tip1\Delta$, $tip1\Delta$ 균주의 viability 결과이다. $pog1\Delta$, $tir1\Delta$ 균주에서 모균주인 SPC73-2에 비해 약간의 viability가 증가한 것이 관찰되었다. 실험에서 대조 균주로 사용한 commercial 1, 2는 각각 상업 균주인 Lesaffre, OYC-us 균주이다.

B. $tdh1\Delta$, $zrt1\Delta$, $zps1\Delta$, $anb1\Delta$ 균주의 viability 결과이다. 네 균주 모두 유의미한 차이를 보이지 않았다. 실험에서 대조 균주로 사용한 commercial 1, 2, 3은 각각 상업 균주인 Lesaffre, OYC-us, OYC-LT 균주이다.

또한 $pog1\Delta$, $tir1\Delta$ 균주에서는 SPC에서 진행한 반죽에서의 실험과, 본 연구에서 직접 진행한 media에서의 실험 모두에서 trehalose level이 증가하였다. (그림 6) 그림 6의 B를 보면, 냉동 상태와 고당 상태에 따라 trehalose level이 증가하였으며, wild type에 비해 POG1, TIR1 deletion 균주에서 trehalose level이 유의미하게 증가한 것이 나타났다. 이는 $pog1\Delta$, $tir1\Delta$ 균주가 wild type에 비해 stress 조건에서 trehalose를 더 많이 만들어 내어 stress로부터 세포를 보호하여 결과적으로 발효 효율이 증가하는 결과라고 볼 수 있다.

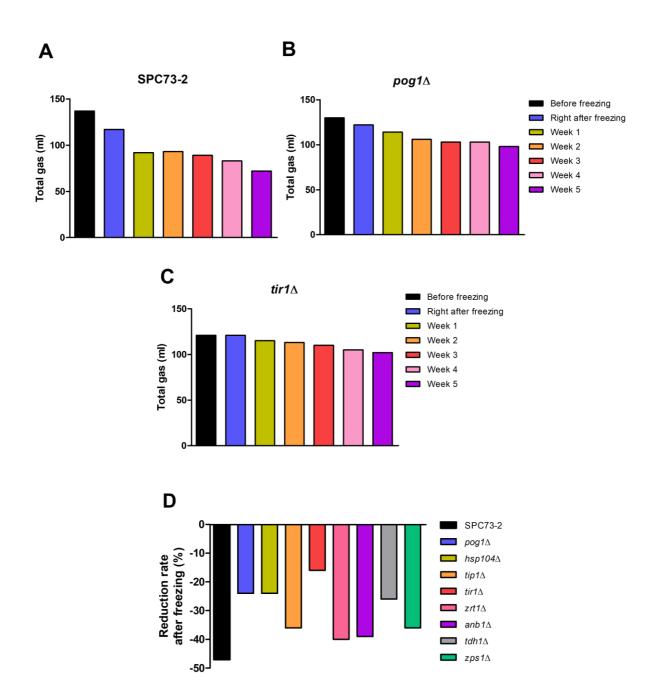


그림 5. 냉동 내성 target 유전자의 deletion 균주에 대한 SPC의 CO₂ 발생량

- A, B, C. SPC73-2(A), $pog1\Delta(B)$, $tir1\Delta(C)$ 균주에서 냉동 전후 시간에 따른 CO_2 발생량의 변화 결과 그래프이다. 전체적으로 냉동 이후 CO_2 발생량이 감소하는데, SPC73-2에 비해 $pog1\Delta$, $tir1\Delta$ 균주에서 감소하는 정도가 줄어들었다.
- D. 냉동 내성 target으로 선정한 유전자에 대해 제작한 deletion 균주에서 냉동후 CO_2 발생량의 감소 정도를 나타낸 그래프이다. 모균주 SPC73-2와 비교했을 때 $tir1\Delta$ 균주에서 가장 감소 정도가 크게 줄어들었으며, $pog1\Delta$, $hsp104\Delta$ 균주에서도 감소 정도가 줄어들었다. 즉 이러한 균주에서 모균주에비해 냉동 내성이 개선된 것으로 보인다.

고당 내성 target 유전자의 경우 LD배지에서 연속적으로 배양했을 때의 viability와 sucrose 25%의 반죽에서 CO2 발생량을 확인했지만 모든 균주에서 모균주와 비교했을 때 유의미한 개선을 보이지 않았다. (그림 7,8)

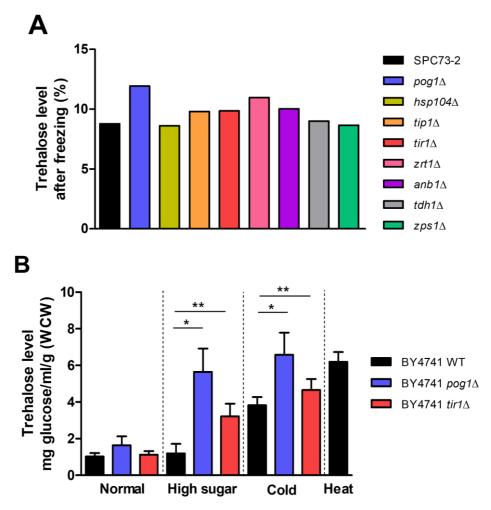


그림 6. 냉동 내성 target 유전자의 deletion 균주에 대한 trehalose level

A. SPC에서 측정한 반죽 상태에서의 결과이다. $pog1\Delta$ 에서 모균주 SPC73-2에 비해 trehalose level이 다소 증가한 것을 볼 수 있다.

B. 본 연구에서 직접 측정한 배지 상태에서의 결과이다. 냉동과 고당 상태에 따라 trehalose level이 증가할 뿐만 아니라, wild type에 비해 $pog1\Delta$, $tir1\Delta$ 균주에서 유의미하게 trehalose level이 증가한 것을 확인하였다. 그래프에서 Heat 으로 표시된 항목은 42 $^{\circ}$ C에서 15 분간 heat shock을 준 positive control이다.

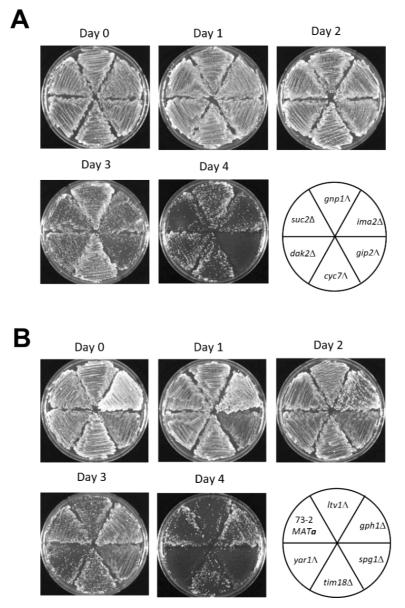


그림 7. 고당 내성 target 유전자의 deletion 균주에 대해 고당 배지에서의 viability

A. $gnp1\Delta$, $ima2\Delta$, $gip2\Delta$, $cyc7\Delta$, $dak2\Delta$, $suc2\Delta$ 균주에서 모균주인 SPC73-2 MATa 균주와 고당 배지에서의 viability를 비교한 결과이다. viability의 유의미한 증가를 보이는 결과는 나타나지 않았다.

B. $ltv1\Delta$, $gph1\Delta$, $spg1\Delta$, $tim18\Delta$, $yar1\Delta$ 균주에서 모균주인 SPC73-2 MATa 균주와 고당 배지에서의 viability를 비교한 결과이다. 마찬가지로 유의미하게 viability의 증가를 보이는 결과를 볼 수 없었다.

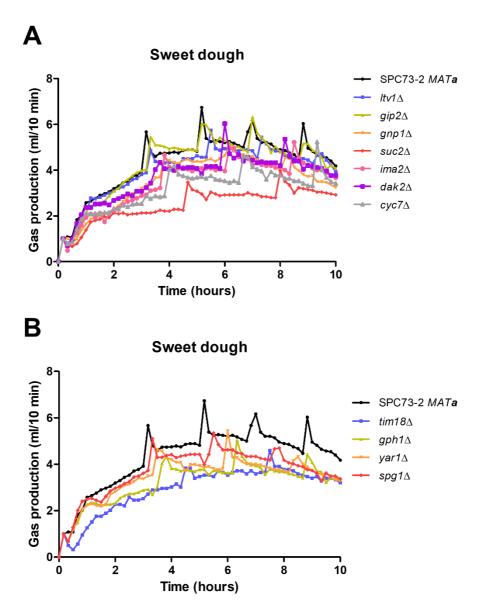


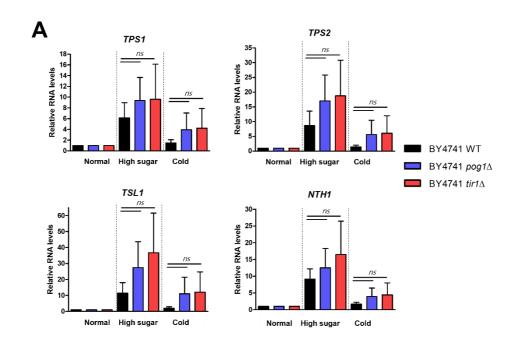
그림 8. 고당 내성 target 유전자의 deletion 균주에 대해 고당 반죽에서의 CO2 발생량 측정

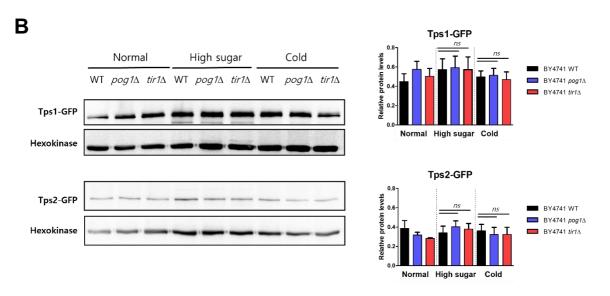
A. $ltv1\Delta$, $gip2\Delta$, $gnp1\Delta$, $suc2\Delta$, $ima2\Delta$, $dak2\Delta$, $cyc7\Delta$ 균주에서 모균주인 SPC73-2 MATa 균주와 고당 반죽 상태에서의 CO_2 발생량을 비교한 결과이다. 고당 내성의 유의미한 증가는 나타나지 않았다.

B. $tim18\Delta$, $gph1\Delta$, $yar1\Delta$, $spg1\Delta$ 균주에서 모균주인 SPC73-2 MATa 균주와 고당 반죽 상태에서 CO_2 발생량을 비교한 결과이다. 마찬가지로 유의미하게 고당 내성이 증가하지 않았다.

4. pog1, tir1 균주의 형질 확인

모균주와 비교했을 때 유의미한 개선을 보인 pog1A, tir1A 균주에서 trehalose의 양이 증가하는 것이 관찰되었다. (그림 6) 이에 POG1, TIR1 deletion 상황과 trehalose의 증가 간의 관계를 추가적으로 규명하기 위해 관련 유전자들을 탐색하였다. 8세포 내에서 trehalose를 생성하는 Trehalose-6-p와 관련된 gene인 TPS1, TPS2, TPS3(TSL1의 paralog⁹)와, trehalose를 분해하는 enzyme인 trehalase gene NTH1의 발현량을 qRT-PCR과 Western blot으로 확인해본 결과 stress 조건, 혹은 균주에 따라 유의미한 차이를 보이지 않았다. (그림 9) 이는 POG1과 TIR1의 deletion이 trehalose의 생성과 분해에 직접적인 영향 보다는 간접적인 영향을 미치기 때문으로 보인다. 이러한 상관관계를 보다 명확하게 규명하기 위해서는 유전자의 발현 정도 보다는 trehalase의 activity나 trehalose의 phosphorylation 등과 같이 protein level에서의 변화를 확인하는 추가적인 검증이 필s요할 것으로 생각된다.





C

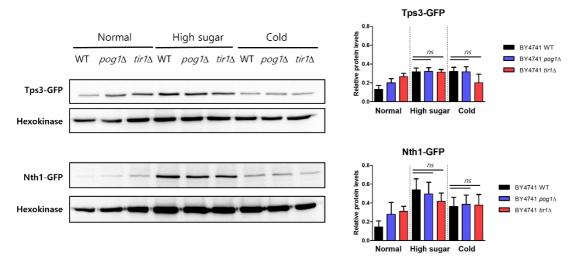


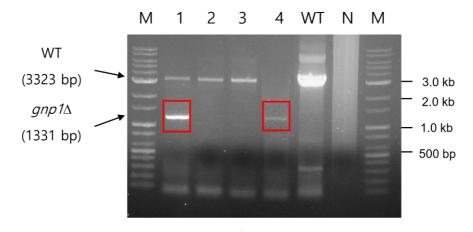
그림 9. $pog1\Delta$, $tir1\Delta$ 균주에서 trehalose 관련 유전자의 발현 비교

A. trehalose 관련 유전자 TPS1, TPS2, TSL1(TPS3), NTH1 유전자의 발현을 qRT-PCR로 확인해본 결과이다. 냉동과 고당 등 stress 조건에 따라, POG1과 TIR1의 deletion에 따라 유의미한 RNA 발현의 차이는 보이지 않았다.

B, C. trehalose 관련 유전자 TPS1, TPS2, TPS3(TSL1), NTH1 유전자의 발현을 western blot으로 확인해본 결과이다. 마찬가지로 stress 조건에 따라, POG1 혹은 TIR1의 deletion에 따라 유의미한 단백질 발현의 차이는 보이지 않았다.

5. CRISPR-Cas9

Homologous recombination을 이용해 만들어진 균주의 경우 항생제 저항성 유전자가 target 유전자 sequence 안으로 들어가게 되므로 해당 균주는 외부의 유전자가 포함된 GMO로써 식품에 사용할 수 없다. 따라서 CRISPR-Cas9을 이용해 유전자 전체를 deletion하여 외부의 유전자가 포함되지 않는 deletion 균주를 만들고자 하였다. 먼저 target 유전자 ORF의 upstream 부분과 downstream 부분을 PCR로 증폭하여 donor DNA를 제작하고, 이 donor DNA와 Cas9, sgRNA 등이 포함된 vector를 세포 안으로 넣어 Cas9에 의한 double strand break가 발생함과 동시에 donor DNA와 homologous recombination이 발생하여 전체 ORF가 deletion 되는 complete deletion 10,11이 가능하게 하였다. GNP1, DAK2 등에서 이와 같은 방법을 사용하여 deletion 균주를 제작하였고, 일반적으로 deletion 여부를 확인하는 marker sequence가 존재하지 않기 때문에 PCR band의 크기로 deletion을 확인하였다. 유전자의 ORF 부분을 deletion하였기 때문에 ORF의 앞과 뒤 sequence를 primer로 사용하여 증폭시키면 deletion이 되지 않은 유전자 부분은 크기가 큰 band가, deletion이 된 유전자 부분은 크기가 작은 band가 나타나게 된다. Diploid 균주에서 deletion을 진행할 경우 두 chromosome에서 모두 deletion이 발생하면 작은 크기의 band만 나타나며, 하나의 chromosome에서만 deletion이 발생하면 서로 다른 크기의 band가 두 개 나타날 것이다. 그림 10에서 1번 colony는 하나의 chromosome에서만 deletion이 발생한 경우이며, 4번 colonv는 두 chromosome 모두에서 제대로 deletion된 경우이다. 이와 같은 방법을 사용하여 SPC70-1과 SPSC73-2에서 POG1, TIR1에 대해 deletion 균주를 제작한다면, GMO 문제를 피할 수 있는 발효 형질이 뛰어난 균주를 얻을 수 있을 것이다.



M : Marker, 1 ~ 4 : strain WT : SPC70-1 Wild type N : Negative control(DW)

그림 10. Complete deletion에 의해 만들어진 $gnp1\Delta$ 균주의 deletion 확인을 위한 PCR 결과

Cas9 module과 donor DNA를 이용한 complete deletion 방법으로 $gnp1\Delta$ 균주를 제작하였다. 유전자에서 deletion된 부분을 잡는 PCR을 진행하여 band의 크기로 deletion을 확인할 수 있다. 3323 bp의 큰 band는 deletion이 되지 않은 유전자를, 1331 bp의 작은 band는 deletion이 된 유전자를 뜻한다. 사용한 균주는 diploid 균주로써 chromosome 두 개 중하나에서만 deletion이 발생할 경우 크기가 다른 두 band가 동시에 나타나며, 두 chromosome 모두에서 deletion이 완료된 경우 작은 크기의 band만 나타나게 된다.

IV. 논의

SPC 균주와 상업 균주 간의 전사체 분석을 통해 SPC 균주에서 더 많이 발현되는 유전자를 찾았다. 그 결과, 냉동 내성에서는 총 9개의 후보 유전자를, 고당 내성에서는 총 11개의 유전자를 찾을 수 있었다. 이 유전자에 대해 SPC 균주에서 deletion을 진행하여 균주를 완성하였고, 해당 균주가 모균주에 비해 냉동 내성 또는 고당 내성이 개선되는지 여부를 확인하였다. 고당 내성 11개의 유전자 중에서는 개선이 확인되는 유전자가 없었지만, 냉동 내성 중 POG1과 TIR1의 경우 deletion 균주에서 모균주에 비해 냉동 후 CO2 발생량의 감소 정도가 줄어들었으며 (그림 4, 5), stress 조건에 따라 반죽과 media 모두에서 trehalose의 양이 증가하였다. (그림 6) 이는 POG1과 TIR1의 deletion이 trehalose level의 증가에 직, 간접적인 영향을 미칠 수 있다는 증거로써, POG1과 TIR1의 deletion 균주에서 냉동 내성이 모균주에 비해 개선된 것을 설명할 수 있는 근거가 되기도 한다. 하지만 POG1과 TIR1의 deletion 상황에서 trehalose와 관련된 유전자들의 RNA와 단백질 발현에는 차이가 없었기 때문에 (그림 9) POG1과 TIR1의 deletion이 trehalose gene의 발현에는 직접적으로 영향을 주지 않을 것이라고 추측된다. POG1과 trehalose synthase gene인 TPS1 사이에 genetic interaction이 있다는 보고¹²가 있었지만, 구체적인 내용은 보고된 바가 없고, 알려진 POG1과 TIR1의 기능 역시 trehalose와는 관계가 없다. 따라서 POG1과 TIR1의 deletion과 trehalose level의 증가 간의 상관관계를 보다 명확히 밝히기 위해 추가적인 연구가 필요하다.

고당 내성의 11개 유전자 중에서 형질에 변화가 있는 유전자는 나오지 않았다. (그림 7, 8) 그러나 RNA sequencing data에 나온 모든 유전자가 deletion 후보로써 가능성 있는 유전자이므로, 시도해 보지 않은 다른 유전자에 대하여, 또는 추가적인 조사를 통해 발굴할 다른 유전자에 대하여 확인해볼 필요가 있다. 전사체 분석과 같은 이러한 방법은 mating과 같은 전통적인 방법의 단점을 극복하고 보다효율적으로 균주를 개발하기 위해 계속해서 사용될 수 있을 것이다.

마지막으로 본 연구에서는 GMO 규제를 피하면서 사용할 수 있는

complete deletion 방법을 구축하였다. Diploid cell에서 이와 같은 방법으로 deletion을 진행했을 때 추후 Cas9 모듈을 제거함으로써 완전한 non-GMO로 사용될 수 있는 가능성이 있다. 이러한 방법은 앞서 언급한 전사체 분석을 통해 target 유전자를 찾는 접근과 더불어 효과적인 균주 개발에 도움이 될 것이다.

V. 참고 문헌

- 1. Contarino, R., Brighina, S., Fallico, B., Cirvilleri, G., Parafati, L., & Restuccia, C. (2019). Volatile organic compounds (VOCs) produced by biocontrol yeasts. *Food microbiology*, 82, 70-74.
- 2. Panadero, J., Randez-Gil, F., & Prieto, J. A. (2005). Validation of a flour-free model dough system for throughput studies of baker's yeast. *Applied and environmental microbiology*, 71(3), 1142-1147.
- 3. Gietz, R. D., & Schiestl, R. H. (1995). Transforming yeast with DNA. *Methods in molecular and cellular biology*, 5, 255-269.
- 4. Sasano, Y., Haitani, Y., Hashida, K., Oshiro, S., Shima, J., & Takagi, H. (2013). Improvement of fermentation ability under baking—associated stress conditions by altering the POG1 gene expression in baker's yeast. *International journal of food microbiology*, 165(3), 241-245.
- 5. Iwahashi, H., Nwaka, S., Obuchi, K., & Komatsu, Y. (1998). Evidence for the interplay between trehalose metabolism and Hsp104 in yeast. *Applied and environmental microbiology*, 64(11), 4614–4617.
- 6. Stolz, L. E., Huynh, C. V., Thorner, J., & York, J. D. (1998). Identification and characterization of an essential family of inositol polyphosphate 5-phosphatases (INP51, INP52 and INP53 gene products) in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Genetics*, 148(4), 1715-1729.
- 7. Loar, J. W., Seiser, R. M., Sundberg, A. E., Sagerson, H. J., Ilias, N., Zobel-Thropp, P., ... & Lycan, D. E. (2004). Genetic and

biochemical interactions among Yar1, Ltv1 and Rps3 define novel links between environmental stress and ribosome biogenesis in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics*, 168(4), 1877-1889.

- 8. Petzold, E. W., Himmelreich, U., Mylonakis, E., Rude, T., Toffaletti, D., Cox, G. M., ... & Perfect, J. R. (2006). Characterization and regulation of the trehalose synthesis pathway and its importance in the pathogenicity of Cryptococcus neoformans. *Infection and immunity*, 74(10), 5877-5887.
- 9. Byrne, K. P., & Wolfe, K. H. (2005). The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. *Genome research*, 15(10), 1456–1461.
- 10. Chin, Y. W., Kang, W. K., Jang, H. W., Turner, T. L., & Kim, H. J. (2016). CAR1 deletion by CRISPR/Cas9 reduces formation of ethyl carbamate from ethanol fermentation by Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43(11), 1517–1525.
- 11. Ai, L., Guo, W., Chen, W., Teng, Y., & Bai, L. (2019). The gal80 deletion by CRISPR-Cas9 in engineered Saccharomyces cerevisiae produces artemisinic acid without galactose induction. *Current microbiology*, 76(11), 1313-1319.
- 12. Costanzo, M., VanderSluis, B., Koch, E. N., Baryshnikova, A., Pons, C., Tan, G., ... & Boone, C. (2016). A global genetic interaction network maps a wiring diagram of cellular function. *Science*, *353*(6306).

Abstract

Improving Fermentation Characteristics of Commercial Baker's Yeast by Transcriptome Analysis

임희나(Heena Rim) 생명과학부 (School of Biological Sciences) The Graduate School Seoul National University

Most of the yeast currently used for baking in Korea is a strain patented overseas and requires payment when used. Although unique strains in Korea are being developed, the reality is that it is difficult to commercialize them due to the lower fermentation efficiency than overseas commercial strains. In order to improve this situation, this study attempted to improve the characteristics such as fermentation efficiency of domestic inherent strains developed so far. The domestic strains used for the analysis are SPC70-1, a native strain developed by SPC, and SPC73-2, a hybrid of SPC70-1 and commercial strains, and overseas commercial strains Lesaffre and OYC strains were used for comparison. SPC73-2 strain has excellent fermentation properties similar to commercial strains, but showed slightly lower freezing resistance, and SPC70-1 had poor fermentation properties under various conditions, including freezing resistance and high sugar resistance. Therefore, it was intended to increase refrigeration resistance in SPC73-2 and high sugar resistance in SPC70-1, and to produce strains that can avoid GMO regulation, it was intended to produce strains that have deleted target genes by CRISPR-Cas9. At this time, in order to select an effective target gene, 14 genes that are more expressed in domestic strains were explored by comparing RNA sequencing data of domestic and commercial strains. In addition, through literature research, 6 genes were added to produce deletion strains in domestic strains for a total of 20 genes. As a result of comparing various traits such as the fermentation efficiency of the produced strain with the mother strain, it was found that the fermentation efficiency increased in the deletion strain of POG1 and TIR1, and the degree of decrease in activity under freezing conditions was reduced. In addition, it was confirmed that the amount of trehalose protecting cells in POG1, TIR1 deletion strains increased, confirming the expression of the trehalose-related genes TPS1, TPS2, TPS3 (TSL1), and NTH1, but there was no significant difference. Additional verification is thought to be necessary to investigate the correlation between the increase in trehalose in the situation of POG1 and TIR1 deletion. In addition, using the CRISPR-Cas9 method, the final method was devised to delete specific genes without markers in the genome in the SPC70-1 and SPC73-2 strains. Through it, it became possible to produce domestic strains that can be used without violating GMO-related regulations in the future.

Keywords: Baker's yeast, transcriptome analysis, cold stress

tolerance, high sugar tolerance, trehalose

Student Number : 2020-27560