

# 무유도인자 단백질 발현 시스템을 이용한 재조합 시아노박테리아의 광합성 스쿠알렌 생산 평가

최선영<sup>1,2,3\*</sup>, 우한민<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>성균관대학교 식품생명공학과 식품분자생물공학연구실

<sup>2</sup>성균관대학교 생명공학연구원 바이오파운드리 연구센터

<sup>3</sup>㈜솔 기업부설연구소

Received: February 4, 2021 / Revised: April 14, 2021 / Accepted: April 15, 2021

## Evaluation of Photosynthetic Squalene Production of Engineered Cyanobacteria Using the Chemical Inducer-Free Expression System

Sun Young Choi<sup>1,2,3\*</sup> and Han Min Woo<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Biotechnology, <sup>2</sup>BioFoundry Research Center, Sungkyunkwan University (SKKU), Suwon 16419, Republic of Korea

<sup>3</sup>SOL INC., BK Tower 2F, Seoul 05836, Republic of Korea

Photosynthetic conversion through cyanobacteria and microalgae is an increasingly serious concern in the global warming crisis. Many value-added substances are produced through strain improvement, and much research and development is being conducted to determine its potential as an actual industrial strain. Economic barriers throughout processing production can be overcome to produce value-added chemicals by microalgal strains. In this study, we engineered cyanobacteria strains for the photosynthetic production of squalene and confirmed the continuous cultivation of CO<sub>2</sub> and light conditions. The free-inducer system of gene expression was developed at the cyanobacterial strains. Then, the squalene production level and growth of the recombinant cyanobacteria were analyzed and discussed. For bio solar-cell factories, the ability to regulate genes based on the free-inducer gene expression system promotes metabolic engineering research and construction to produce value-added chemicals.

**Keywords:** Cyanobacteria, squalene, IPTG free-inducer, *Synechococcus elongatus* PCC 7942

## 서론

화석 연료 유래 화합물 생산에서 자립 화합물 생산으로의 전환에 대한 최근 대중의 관심은 이산화탄소의 전환 및 탈석유화 대체 에너지화 가치관의 상승으로 이어지고 있다. 이것에 발맞추어 발효 생 화합물 생산 및 바이오 디젤 생산을 위한 유망한 공급 원료로서 산업 규모의 미세조류 생산 개

발을 촉진시키고 있다[1]. 현재 산업에 새로운 기회로서 이산화탄소를 고부가가치 제품으로 생산하기 위한 노력의 수요 증가에 따라 인간, 동물, 식물영양인자에서 화합물원료에 이르기까지 높은 가치의 생 화합물 생산이 이루어져 왔다 (예: 지방산, 안료, 이소 프리노이드계 생 화합물)[2]. 오늘날 미세조류 바이오매스 산업은 연간 5,000톤의 건조 물질을 생산하며, 연간 약 60억 달러(USD)의 세계 시장을 가지고 있다. 상업용 생산업체에는 주요한 *Chlorella*, *Spirulina*, *Dunaliella* 및 기타 110개 다른 미세조류로부터 식품, 의약품, 고부가가치 제품이 보고된 바 있다[3]. 또한, 전통적인 생산시스템에 비해 생 촉매 단일 호스트 플랫폼에서 재생가능 생산을 확대하기 위해 미세 조류와 남 조류의 대사 공학이 집중적으로 연구되고 개발되었다[4, 5]. 특히, 대사 공학을 통한 미세조류 바이오 시스템을 통하여 외부단백질의 생산을

### \*Corresponding authors

S. Y. Choi

Tel.: +82-2-6949-2965, Fax: +82-2-6949-2964

E-mail: sychoi@sol.re.kr

H. M. Woo

Tel.: +82-31-290-7808, Fax: +82-31-290-7882

E-mail: hmwoo@skku.edu

위한 프로모터 연구는 불리한 경제성 시장 점유율에 대한 현재 생산 한계와 수명주기 관점에서 에너지 집약적인 바이오 프로세스의 효율을 극대화할 수 있는 접근 포인트다. 따라서, 지속 가능한 바이오 가치 경제 창출 수요와 함께 다양한 연구가 진행되었다. *Bacillus subtilis* 균주에서 무-유도 인자 계속적인 프로모터 접근으로 타겟 단백질 발현의 세기가 강한 프로모터를 개발함으로써 타겟 단백질 생산의 극대화를 꾀하였다[6]. 발현의 세기와 조절과 생산량을 늘리기 위한 노력의 일환으로 시아노박테리아 균주에서 T7 프로모터 라이브리리를 통한 유전자 발현 세기의 범위 조절 실험을 진행되었으며, 다양한 promoter의 발현 세기 조절과 타겟생산물의 영향 정도를 형광으로 비교함으로써 좀 더 효율적인 프로모터 연구가 진행 되어왔다[7, 8]. 본 연구 선행논문에서 이산화탄소로부터 지속 가능한 스쿠알렌 생산을 위한 엔지니어링 된 시아노박테리아 균주를 모델 플랫폼으로 제작한 바 있다[9, 10]. 특히, 시아노박테리아의 스쿠알렌 생합성을 위한 전구체와 스쿠알렌 합성을 위한 핵심 효소의 발현을 제어하기 위한 화학 유도제가 필요 없는 프로모터 발현시스템이 요구되었다. 그래서, 본 연구에서는 유도 인자가 필요 없는 단백질 발현시스템을 시아노박테리아 스쿠알렌 생산 적

합형 프로모터로 개발하여 적색 형광 단백질 발현 세기로 증명하였다. 그리고, 광 생합성 과정과 생산성을 증가시키기 위한 전략으로 실제 타겟 산물 생산의 촉진을 유도한 균주의 생산능력을 비교하여 디스커션 하였다. 시아노박테리아의 대사 공학 연구를 통한 균주개량으로 타겟 물질의 생산량 및 이산화탄소의 생물학적 전환 연구에 기여도를 가늠하여 향후 대사공학적 접근 방향을 모색하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료

벡터 제작을 위한 제한효소, 유전자 증합효소, 유전자 연결효소는 Fermentas (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)로부터 구입하였다. 특별한 것을 제외한 모든 화합물은 Sigma-Aldrich (USA)를 사용하였다.

### 플라스미드와 균주개량

1 mM isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 유도체가 없는 프로모터 단백질 발현시스템을 구축하기 위하여, pSe1Bb1s-RFP [11]의 AatII와 EcoRI 제한 효소 서열을

**Table 1. Bacteria strains and plasmids used in this study.**

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Reference
<b>Strains</b>		
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> (80d <i>lacZ</i> M15) ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>hsdR17</i> (r <sup>-</sup> m <sup>+</sup> ) <i>recA1 endA1 relA1 deoR96</i>	[16]
<i>S. elongatus</i> PCC 7942	<i>S. elongatus</i> PCC 7942 (ATCC 33912)	ATCC 33912
SeSC_RFP	<i>S. elongatus</i> NSI::Bb1s-RFP	This study
SeSC_RFP(const)	<i>S. elongatus</i> NSI::Bb1s( $\Delta$ lacl)_RFP	This study
SeSC37S	<i>S. elongatus</i> NSI::Bb1s-dxs-idi-ispA NSII::k-PcpcB1-cpcB1-SF-SQS	[10]
SeSC37S_MEP(const)	<i>S. elongatus</i> NSI::Bb1s( $\Delta$ lacl)-dxs-idi-ispA NSII::k-PcpcB1-cpcB1-SF-SQS	[13]
SeSC35SII	<i>S. elongatus</i> NSI::Bb1s-dxs-idi-ispA NSII::k-PcpcB1-cpcB1-SF-SQS NSIII::k-PcpcB1-cpcB1-SF-SQS	[10]
SeSC35SII_MEP(const)	<i>S. elongatus</i> NSI::Bb1s( $\Delta$ lacl)-dxs-idi-ispA NSII::k-PcpcB1-cpcB1-SF-SQS NSIII::k-PcpcB1-cpcB1-SF-SQS	This study
<b>Plasmids<sup>a</sup></b>		
pSyn_1	pUC, Spc <sup>r</sup> , P <sub>N<sub>trc</sub></sub> , NSI target sites	Invitrogen
pSe1Bb1s-gfp	pUC, Spc <sup>r</sup> , Lacl, P <sub>trc</sub> , BglBrick sites, NSI targeting SyneBrick vector: derived from pSyn_1 vector	[11]
pSe1Bb1s-rfp	pUC, Km <sup>r</sup> , Lacl, P <sub>trc</sub> , BglBrick sites, NSII targeting SyneBrick vector	[11]
pSe1Bb1s-rfp (const)	pUC, Cm <sup>r</sup> , Lacl, P <sub>trc</sub> , BglBrick sites, NSIII targeting SyneBrick vector	This study
pSe1Bb1s( $\Delta$ lacl)-dxs-idi-ispA	pUC, Spc <sup>r</sup> , P <sub>trc</sub> , <i>dxr</i> (se.co), <i>idi</i> (se.co), <i>ispA</i> (se.co), NSI target sites	[13]
pSe2k-cpcB1-SF-SQS	pUC, Km <sup>r</sup> , P <sub>trc</sub> , P <sub>trc</sub> , cpcB1, cpcB1-SF-SQS(se.co), fusion protein, NSII target sites	[10]

<sup>a</sup>Km<sup>r</sup>, kanamycin resistance, Spc<sup>r</sup>, spectinomycin resistance, Cm<sup>r</sup>, chloramphenicol; *dxs* (*E. coli*), 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase; *idi* (*E. coli*), 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductase; *ispA* (*E. coli*), farnesyl diphosphate synthase (IspA); *SQS* (*S. cerevisiae*), squalene synthase; (se.co) [17] represents that the gene sequence is codon-optimized to *S. elongatus* PCC 7942. Note that strains and plasmids were constructed in this work unless cited.

이용하여 lacI를 제거함으로써 pSe1Bb1s-( $\Delta$ lacI)-RFP 벡터 (Fig. 1)를 제작하였다. 제작된 벡터들의 *Escherichia coli* 균주 대상으로 형질전환을 위하여 Lysogeny broth medium (10 g tryptone, 5 g yeast extract, and 10 g NaCl : 리터당) 배지에서 37°C 온도조건으로 배양한다. 형질 전환된 돌연변이 *E. coli*는 항생제(30  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> chloramphenicol, 50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> kanamycin, and 100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> spectinomycin)가 포함된 선택적 배지에서 선별한다.

*S. elongatus* PCC 7942 돌연변이 균주를 제작하는 방법은 다음과 같다[12]. 시네브릭벡터(SyneBrick)내에[7] 자연적 서열(Natural site I, II, III)이 존재하여 시아노박테리아 지놈으로 삽입 될 수 있다. pSe1Bb1s-( $\Delta$ lacI)-RFP 벡터는 *S. elongatus* PCC 7942 야생 균주의 유전자 NSI (natural site I) 내로 형질 전환하여 SeSC\_RFP (const) 돌연변이 균주를 획득하였다(Table 1). 항생제 포함된 배지에서 형질전환 돌연변이 균주를 선별한 후, 균주 유전자의 삽입으로 인한 형질전환 여부를 genomic PCR를 통하여 확인하였다. 모든 균주와 플라스미드 정보는 Table 1에 명시하였다.

### 배양과 성장 조건

RFP 형광 단백질 발현하는 *Escherichia coli* 돌연변이 균주는 LB 배지에 OD600 0.5가 되도록 접종한다. OD600가 1이 되었을 때, IPTG 전사 유도 인자를 1 mM 첨가한다. 유도 인자의 여부에 관한 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h의 세포 성장과 형광단백질의 발현 정도를 비교모니터링 하였다.

*S. elongatus* PCC 7942 야생 균주 및 돌연변이 균주는 10 mM 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) (pH 7.5)가 포함된 Blue-green-11 (BG-11)에서 지속적인 형광 빛(100  $\mu$ mol photons  $\cdot$  m<sup>-2</sup>  $\cdot$  s<sup>-1</sup>), 이산화탄소 (5% [v/v], 10 ml  $\cdot$  min<sup>-1</sup>)의 공급 하에 배양한다. 선택적 항생제로서 이용된 Spectinomycin (10 ng  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>), kanamycin (5 ng  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>), chloramphenicol (3 ng ml<sup>-1</sup>)는 blue-green-11 (BG-11)에 첨가된다. 무-유도체 프로모터 발현시스템의 유무에 따른 형광단백질의 발현 정도를 비교하기 위한 균주 SeSC\_RFP와 SeSC\_RFP (const)의 발현 시작을 위하여 1 mM isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 전사 유도인자를 OD730가 1이 되었을 때 첨가한다. 세포 성장은 Eppendorf BioSpectrometer® (Eppendorf AG, Germany)에 의하여 730 nm 파장에서 모니터링 하였고, 유도 인자에 대한 성장 저해는 없는 것으로 밝혀지고 있다[7]. 모든 균주와 플라스미드 정보는 Table 1에 명시하였다.

### 형광 분석법 활용 적색 형광 단백질 발현 정도 비교

유도 인자의 유무로 인한 단백질 발현 시스템 프로모터의 작동 하에 RFP (Red fluorescence protein)가 발현되는 정도

를 형광 세기로 비교하고자 하였다. RFP 단백질이 발현되는 *S. elongatus* 돌연변이 균주는 BG-11 배지에서 30°C 온도로 6-well plate에서 배양한다. 1 mM IPTG는 시아노박테리아의 OD730가 1이 되었을 때 첨가한다. 세포 부유물 200  $\mu$ l는 96-well microtiter plate (Corning Inc., USA)로 옮겨 시간 별로(0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h) 형광 세기를 Infinity M Nano 200 pro (Tecan, Switzerland) 로 측정하였다. 세포 성장은 Eppendorf BioSpectrometer® (Eppendorf AG, Germany)를 이용하여 측정하였다. RFP 형광세기는 532/588 nm (excitation/emission) 파장으로 측정하였다. 시간별 형광 세기는 시간 별 해당 세포 수로 표준화 계산하였다. Bg-11 배지는 blank로서 사용되었다.

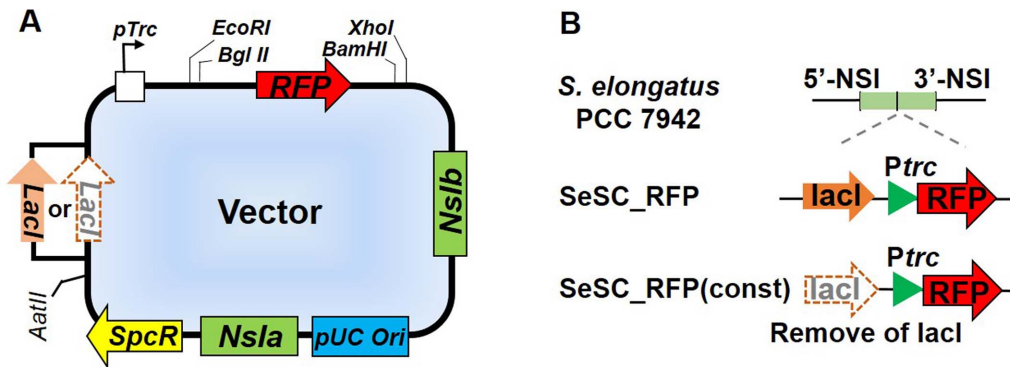
### 가스 크로마토그래피 분석법을 이용한 스쿠알렌 측정

*S. elongatus* PCC 7942 돌연변이 균주 내 스쿠알렌은 유기용매 추출법을 이용하였고, GC에 의하여 정량하였다[9, 13] 클로로폼과 메탄올(1:2)의 비율로 혼합된 유기용매 2 ml 을 이용하여 세포 내부에 침착된 스쿠알렌을 추출한다[9]. 추출된 스쿠알렌은 GC-FID (flame ionization detector) (Agilent 7890B, USA)을 이용하여 분석하였다. Column은 DB-5 column (30 m  $\times$  0.2 mm, film thickness 0.11  $\mu$ m; Agilent Technologies, USA)을 사용하였으며, 이동상 가스의 유속은 0.8 ml/min<sup>-1</sup>, 오븐 온도는 120–180°C (20°C 증가율)와 180–290°C (6°C 증가율)이며 한 샘플 당 분석 시간은 24분이다. 분석 시 이용한 Positive standard 스쿠알렌과 Internal standard로서 1-phenyloctadecane는 Sigma-Aldrich와 Santa clara (USA) 로부터 구입하였다.

### 결과 및 고찰

#### 무-유도 인자 단백질 발현시스템의 구축과 성능

IPTG 유도 인자가 필요 없는 단백질 발현 시스템, 즉 지속적인 프로모터는 시아노박테리아의 바이오 공정 시에 높은 효율을 가질 수 있다. 대사 공학 틀을 적용한 유전적인 돌연변이 시아노박테리아 균주를 환경적으로 가능한 위험 요소들을 줄이기 위하여 닫힌 배양기에서 빛 세기를 최적화하여 스케일 업 배양한 문헌이 있다[10]. 또한, 대량 배양 시에 다른 미생물의 오염을 줄이기 위하여 phosphite dehydrogenase 외부유전자를 도입하기도 하였다[14]. 그래서, 본 연구에서는 스쿠알렌을 생산하는 능력을 향상시키며 대량 배양 공정 상에 유도 인자가 필요없도록 장점을 갖는 *S. elongatus* PCC7942에 적합한 지속적인 프로모터 개발을 시네브릭 벡터의 lacI free P<sub>trc</sub> 프로모터 벡터를 개발하였다(Fig. 1A). 시아노박테리아 내에서 lacI free P<sub>trc</sub> 프로모터의 성능을 비교하기 위하여 lacI P<sub>trc</sub> inducer IPTG 유도인자 발현시스



**Fig. 1. The system of inducer-free cyanobacteria for photosynthetic squalene production from CO<sub>2</sub>.** (A) The schematic vector of inducer free system for transformation into cyanobacteria genome. (B) The strain SeSC\_RFP and SeSC\_RFP (const) were used for the cultures.

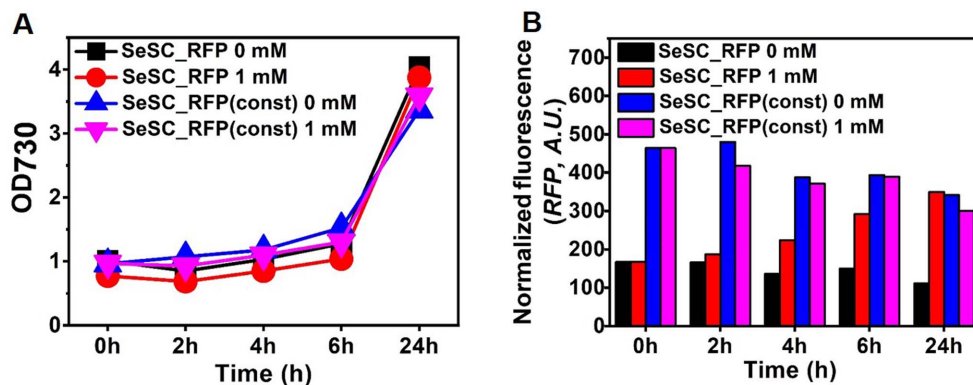
템 벡터를 시아노박테리아 지놈에 도입되어 형질 전환된 돌연변이 균주 SeSC\_RFP, SeSC\_RFP (const)의 적색 형광단백질의 형광 세기를 시간(0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h)에 따라 세포 성장과 함께 관찰하였다(Fig. 1B). 그 결과, 두 돌연변이 균주는 6 h 전으로는 세포 성장의 증가가 크지 않았으며, 24 h SeSC\_RFP, SeSC\_RFP (const)의 OD는 IPTG 1mM에서 각각 3.8, 3.5 정도로서 두 돌연변이 균주의 성장 곡선에 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 2A). 그러나 적색 형광단백질의 Normalized fluorescence 형광세기는 두 돌연변이 균주에서 확연히 다른 양상을 보였다(Fig. 2B). SeSC\_RFP 즉 lacI Ptrc inducer IPTG 1 mM 존재 하에 단백질 발현시스템에서는 시간이 지날수록 적색 형광 단백질이 점진적으로 10.6%, 25.4%, 42.8%, 52.2% 늘어났으나, SeSC\_RFP (const) 돌연변이 균주는 성장 곡선은 증가하여도 적색형광단백질의 발현률은 유도 인자의 유무에 따라 변화 폭이 크지 않았다. Normalized fluorescence 형광세기는 0 h에서 24 h까지는 35.4% 감소하였다. SeSC\_RFP와

SeSC\_RFP (const) 시아노박테리아 돌연변이 균주의 적색형광단백질 발현률이 성장 시간 동안에는 시간 단위 별 단백질 발현률의 차이가 발생하나, 최종 성장 24 h에는 생산량에서 큰 차이가 보이지 않았다.

이와 같이 유도 인자의 유무에 따른 단백질 발현 세기의 차이가 *E. coli* 균주에서도 앞서 동일한 현상이 나타났다. 하지만, 반대로 *B. subtilis* 균주에서는 무-유도 인자 벡터시스템에서 타겟 단백질의 양이 증가됨으로써 강한 프로모터를 최적화하였다[6]. 즉 균주의 대사 특성에 따라 달라지는 프로모터 기반 단백질 발현률의 차이를 확인하였고, 시아노박테리아내 실제 타겟단백질의 양과 성장 곡선, 비 경제성 상관성을 예상해보고자 다음 실험을 계획하였다.

**무-유도 인자 단백질 발현시스템에 의한 시아노박테리아 내에서 스쿠알렌 생산량의 비교**

무-유도 인자(IPTG) 단백질 발현시스템하에 고부가 산물 스쿠알렌 타겟 물질의 생산량 정도를 시아노박테리아 *S.*

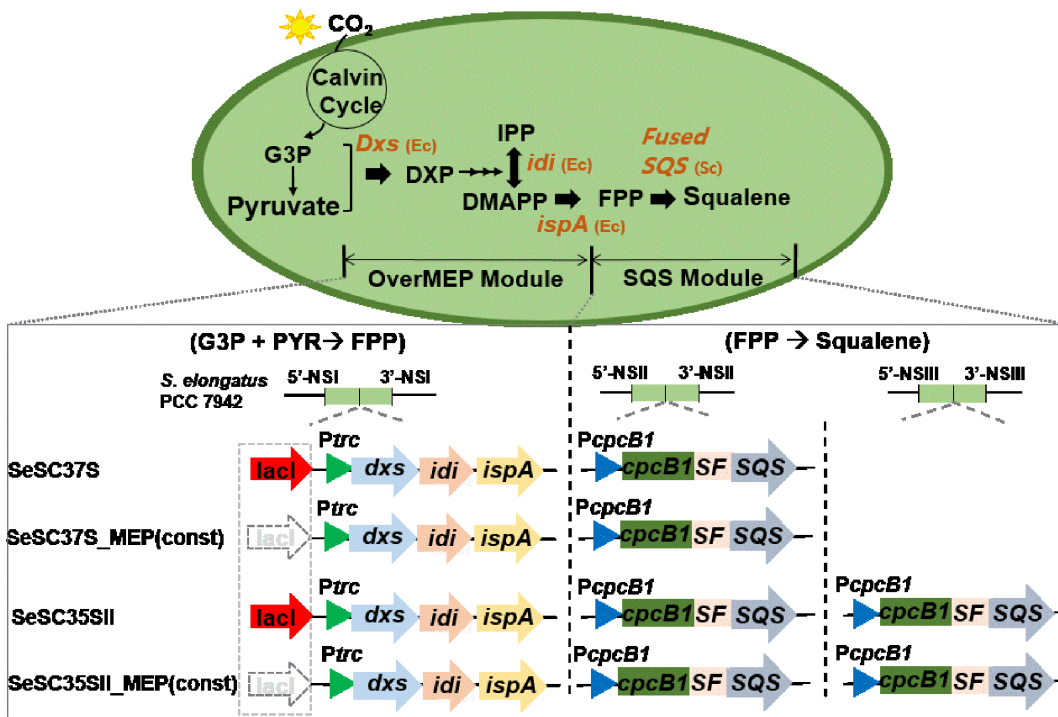


**Fig. 2. The comparison growth and RFP expression rate level of inducer-free cyanobacteria.** (A) Comparison of cell growth (OD<sub>730</sub>) SeSC\_RFP, SeSC\_RFP (const) (black square and blue triangle; 0 mM, red circle and pink triangle; 1 mM of IPTG) (B) Comparison of fluorescence intensity SeSC\_RFP, SeSC\_RFP (const) (black and blue square; 0 mM, red and pink square; 1 mM of IPTG at normalized signal).

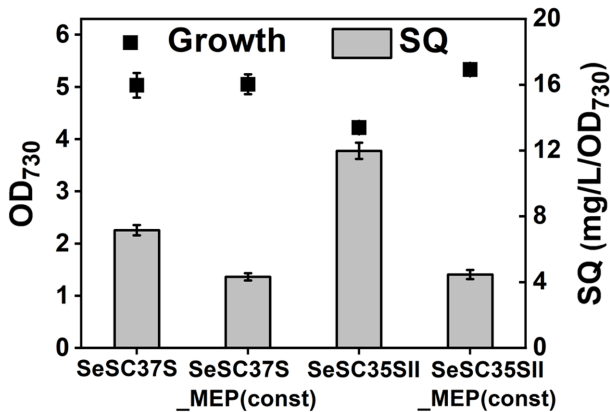


*elongatus* PCC 7942에서 구현하고 생산량을 비교함으로써 무-유도 인자 프로모터의 바이오 공정상의 효율성 및 경제성을 스케일-업 대량 배양 시에 확보할 수 있는지의 여부를 가늠하고 대사공학적인 방향을 검토하고자 하였다. 선행 문헌 [10]에서 구축된 *S. elongatus* PCC 7942 돌연변이 균주 SeSC37S와 SeSC35SII는 시아노박테리아내에서 MEP pathway의 대사공학으로 인한 중요한 효소 *dxs*, *idi*, *ispA*를 증가시키고, 시아노박테리아에서 강한 *cpcB* 프로모터를 포함한 높은 단백질 발현률을 갖는 *cpcB1* 빛에너지 포집 단백질과 스쿠알렌 생합성 효소(SQS; Squalene synthase)의 중합을 통하여 스쿠알렌의 양이 시아노박테리아에서 향상되어 생합성되도록 공학적 돌연변이 모 균주 SeSC33S [9] 보다 7.16 ± 0.31 1.43 fold, 11.98 ± 0.49 mg/L/OD<sub>730</sub>로서 1.67 fold만큼 증가하였다. 또한, 이산화탄소 광합성 미생물 이용 생물학적 전환에서는 스쿠알렌 최고의 생산량을 갖는 시아노박테리아 돌연변이 균주를 개발하였고, 200 μmol·photon/m<sup>2</sup>/s, 5% CO<sub>2</sub>, 5 L photobioreactor 스케일-업 배양

함으로써 Bioprocessing 최적화를 진행하였다. 이 두 돌연변이 균주는 외부유전자를 도입하여 IPTG 유도인자에 의한 단백질 발현시스템으로서 대량 배양 스케일-업 적용 시에 유도 인자의 다량 소비가 예상된다. 이것은 스케일-업 대량배양시에 경제성의 우의성에서 적합하지 않아서, 유도 인자가 필요 없는 지속적인 프로모터의 개발이 중요하다. 따라서 무-유도 인자 LacI 제거된 프로모터를 시아노박테리아 내 지놈상 Natural sequence I 자리에 도입하고, Natural sequence I 그리고/또는 II에 *cpcB1*-SF-SQS를 도입하여 SeSC37S\_MEP (const), SeSC35SII\_MEP(const) 돌연변이 균주를 각각 제작하였다(Fig. 3). 그 결과, SeSC37S와 SeSC37S\_MEP (const) 세포의 성장은 OD 5.034 ± 0.32, 5.04 ± 0.19로서 비슷하나, 스쿠알렌의 양이 계속적인 프로모터 컨트롤 아래에서는 7.16 ± 0.31에서 4.32 ± 0.22로서 1.6배 감소하였다(Figs. 2A and 2B)의 SeSC\_RFP, SeSC\_RFP (const) 시아노박테리아 돌연변이 균주 OD 성장 결과와 유사하게 유도인자 유무에 따라 큰 차이를 보이지 않으나 단백질 발현률의 차이로 최



**Fig. 3. Modular and metabolic engineering of inducer-free cyanobacteria for comparison of photosynthetic squalene production and growth from CO<sub>2</sub>.** (A) The schematic metabolic pathway for photosynthetic squalene production by engineered *S. elongatus* PCC 7942. The parental strain SeSC37 and SeSC35SII strain were used for the cultures and comparison [10, 18]. SeSC37S\_MEP (const) and SeSC35SII\_MEP (const) strain were removed the lacI from parental strain. Abbreviations: *dxs*, 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase gene of *E. coli*; *idi*, isopentenyl diphosphate isomerase gene of *E. coli*; *ispA*, farnesyl diphosphate synthase (IspA) gene of *E. coli*; SQS (*Sc*), squalene synthase gene of *S. cerevisiae*; G3P, glyceraldehyde-3-phosphate; DXP, 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate; MEP, 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate; HMBPP, (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphate; IPP, isopentenyl diphosphate; DMAPP, dimethylallyl diphosphate; FPP, farnesyl diphosphate; P<sub>cpcB1</sub>, promoter region of the upstream 500 bp of the *cpcB1* operon from *S. elongatus* PCC 7942; *cpcB1*, encoding the phycocyanin β-subunit protein from *S. elongatus* PCC 7942; WT, wild type.



**Fig. 4.** The comparison growth (OD<sub>730</sub>) and squalene production (mg/L/OD<sub>730</sub>) of inducer-free system engineered cyanobacteria. Squalene contents (gray square) in the strain with inducer-free system [MEP (const)]; under control of pTrc promoter without lacI in MEP pathway). SeSC37S\_MEP (const) and SeSC35SII\_MEP (const) strain were removed the lacI from parental strain. cell growth (OD<sub>730</sub>) represent black square.

중 성장 시간의 스쿠알렌 생산량은 감소하였다(Fig. 4).

SeSC35SII는 SeSC37S 균주보다 스쿠알렌 생산량이 증가한 것은 시아노박테리아 지놈 상에 SQS의 gene dosage가 2배 증가하여 MEP 흐름 내 중요한 효소에 의해 생산된 잉여 FPP (파이넨신; farnesyl diphosphate; 스쿠알렌 전구체)가 cpcB1와 중합된 SQS에 SQS에 의해 스쿠알렌으로 전환률이 높아진 결과이다[10]. 세포 성장률은  $4.14 \pm 0.28$ ,  $11.98 \pm 0.49$ 로서 2.8배 증가하였다. SeSC35SII\_MEP (const)도 SeSC35SII보다 스쿠알렌 생산량이  $4.14 \pm 0.28$ ,  $11.98 \pm 0.49$ 로서 2.8배 감소하였다. 그러나 SeSC35SII\_MEP (const)의  $5.33 \pm 0.03$  세포 성장은 SeSC35SII보다 OD  $4.22 \pm 0.04$ 로서 OD 1.1 정도 증가하였다(Fig. 4).

SeSC35SII\_MEP (const) 시아노박테리아 돌연변이 균주는 MEP 흐름 상의 중요한 효소 3가지(*dxs*, *idi*, *ispA*)가 유도인자 불필요한 pTrc 계속적인 프로모터 제어 아래 각각 작용하는 전구체들이 다름에 따라 시간 단위별 단백질 발현률의 차이가 커질 가능성이 있으며, 최종 성장 시간이 24 h보다 긴 192 h으로 증가된 것도 생산량 감소에 영향을 미쳤을 것이다. 또한, 이산화탄소 광 생물 시아노박테리아의 기존 유기생화학물 중간대사체를 향한 털핀 생합성 흐름의 탄소 유량은 원하는 외부 생화학물 생산물 수율과 경쟁한다고 보고한 바 있다[8].

위와 같이, 무-유도인자 프로모터를 통하여 시아노박테리아 대사공학 접근으로 유기합성체 생합성 흐름과 이산화탄소 대사체의 흐름의 강도 사이를 조절하여 경제성의 우의성을 평가하고자 하였지만, 시아노박테리아 세포 공장의 효율

한계를 극복하는 도전과제는 여전히 존재한다. 이것을 극복하는 접근방향으로서 유전자 발현 조절 제어를 위한 대사 공학 툴의 개발이 시급하다. 그것의 한 시도로서 시아노박테리아 시스템 바이오테크놀로지 플랫폼 기반으로, 유전자 발현 조절의 제어를 위하여 조절시스템과 프로모터를 포함한 리보솜 부착 사이트 포함 벡터를 개발하였다[7, 15]. 또한, 전체 단백질의 20%를 차지하여 고 발현되는 phycoyanin  $\beta$ -subunit 단백질과 프로모터의 중합단백질을 제작하여  $\beta$ -phellanderin synthase (PHLS) 생산량을 증가시켰던 접근의 문헌도 눈여겨볼 만하다[8]. 다음 논문에서는 시아노박테리아 타겟 무-유도인자 단백질 발현 프로모터 시스템 아래 고부가 산물 스쿠알렌을 배가스와 태양광을 이용하여 100 L 대량 배양을 시도하였다[13].

결론적으로, 본 연구는 대사공학적인 접근의 툴로서 시아노박테리아내 무-유도인자의 단백질 발현시스템을 구축하여 형광단백질과 스쿠알렌 물질의 생산능을 비교하며 고찰하였다. 따라서, 직접적 태양광 아래 최적화된 광 생합성 효율적인 과정과 높은 생산성, 실제 유용한 생산의 촉진을 유도하여 앞으로 시아노박테리아의 대사 공학 연구를 통한 균주개발로 타겟 물질의 생산량 및 이산화탄소의 생물학적 전환 연구에 기여를 할 수 있을 것으로 사료된다.

## Acknowledgments

This study was supported by the Korea CCS R&D center (KCRC) and (2017M1A8A1072034) through the National Research Foundation of Korea funded by the Korean government (Ministry of Science and ICT), funded by Ministry of Trade, industry and Energy (20011255).

## Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

## References

- Choi YY, Hong ME, Chang WS, Sim SJ. 2019. Autotrophic bio-diesel production from the thermotolerant microalga *Chlorella sorokiniana* by enhancing the carbon availability with temperature adjustment. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **24**: 223-231.
- Spolaore P, Claire JC, Elie D, Lsambert A. 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* **101**: 87-96.
- Pulz O, Gross W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**: 635-648.
- Atsumi S, Higashide W, Liao JC. 2009. Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde. *Nat. Biotechnol.* **27**: 1177-1180.
- Woo HM. 2017. Solar-to-chemical and solar-to-fuel production from CO<sub>2</sub> by metabolically engineered microorganisms. *Curr.*

- Opin. Biotechnol.* **45**: 1-7.
6. Tran DTM, Trang TPP, Thanh KH, Ngan TKD, Phuong THK, Tri MN, *et al.* 2017. Development of inducer-free expression plasmids based on IPTG-inducible promoters for *Bacillus subtilis*. *Microb. Cell Fact.* **16**: 130.
  7. Kim WJ, Lee SM, Um Y, Sim SJ, Woo HM. 2017. Development of synebrick vectors as a synthetic biology platform for gene expression in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Front. Plant Sci.* **8**: 293.
  8. Formighieri C, Melis A. 2016. Sustainable heterologous production of terpene hydrocarbons in cyanobacteria. *Photosynth. Res.* **130**: 123-135.
  9. Choi SY, Lee HJ, Choi J, Sim SJ, Um Y, Kim Y, *et al.* 2016. Photosynthetic conversion of CO<sub>2</sub> to farnesyl diphosphate-derived phytochemicals (amorpha-4,11-diene and squalene) by engineered cyanobacteria. *Biotechnol. Biofuels* **9**: 202.
  10. Choi SY, Wang JY, Kwak HS, Lee SM, Um Y, Kim Y, *et al.* 2017. Improvement of squalene production from CO<sub>2</sub> in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 by metabolic engineering and scalable production in a photobioreactor. *ACS Synth. Biol.* **6**: 1289-1295.
  11. Chwa JW, Kim WJ, Sim SJ, Um Y, Woo HM. 2016. Engineering of a modular and synthetic phosphoketolase pathway for photosynthetic production of acetone from CO<sub>2</sub> in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 under light and aerobic condition. *Plant Biotechnol. J.* **14**: 1768-1776.
  12. Golden SS, Brusslan J, Haselkorn R. 1987. Genetic engineering of the cyanobacterial chromosome. *Methods Enzymol.* **153**: 215-231.
  13. Choi SY, Sim SJ, Ko SC, Son J, Lee JS, Lee HJ, *et al.* 2020. Scalable cultivation of engineered cyanobacteria for squalene production from industrial flue gas in a closed photobioreactor. *J. Agric. Food Chem.* **68**: 10050-10055.
  14. Shaw AJ, Lam FH, Hamilton M, Consiglio A, Kyle M, Brevnova EE, *et al.* 2016. Metabolic engineering of microbial competitive advantage for industrial fermentation processes. *Science* **353**: 583-586.
  15. Elias E, Feiyan L, Pia L. 2016. Evaluation of promoters and ribosome binding sites for biotechnological applications in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Sci. Rep.* **6**: 36640.
  16. Zhang C, Xixan C, Gregory S, Too HP. 2016. Efflux transporter engineering markedly improves amorphaadiene production in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **113**: 1755-1763.
  17. Zhang D, Jennings SM, Robinson GW, Poulter CD. 1993. Yeast squalene synthase: expression, purification, and characterization of soluble recombinant enzyme. *Arch Biochem. Biophys.* **304**: 133-143.
  18. Choi SY, Wang JY, Kwak HS, Lee SM, Um Y, Kim Y, *et al.* 2017. Improvement of squalene production from CO<sub>2</sub> in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 by metabolic engineering and scalable production in a photobioreactor. *ACS Synth. Biol.* **6**: 1289-1295.