스테롤 의약품 전구체 생산을 위한 인공효모 세포공장 개발의 연구 동향 및 전망

중앙대학교 분자시스템생물학연구실
이동욱, 문혜연, 강현아

전통효모 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)를 비롯한 여러 다양한 효모 종들은 오랜 기간 동안 맥주와 빵 발효에서 사용된 균주로 인체에 대한 안전성이 보증된 GRAS (Generally Recognized as Safe) 미생물로서 안전성이 높다. 특히, 효모는 고등생물과 매우 유사한 유전자 전사 및 번역 시스템과 더불어 단백질 분비기관을 갖추고 있어서 번역 후 수식을 통해 활성화된 단백질들을 생산할 수 있어 대장균에 비해 고등생물 유래의 의약용 단백질 대량생산에 보다 유용한 숙주시스템으로 이용되고 있다. 또한 균주의 배양 및 세포외 분비단백질의 정제가 용이하여 scale-up이 간단하므로 식품 및 재조합 의약용 단백질의 산업적 생산에 유용한 숙주 시스템이다(Kim et al., 2015).

한편, 효모는 다양한 이차대사산물 생합성 경로를 도입하여 발현시킬 수 있는 숙주로 관심을 받고 있다. 다양한 생명체들이 생산하는 이차대사산물은 고부가가치 화학화합물의 주요 공급처로서 많은 경우 중요한 의약적인 성질을 지니고 있다. 특히 식물의 대사산물들은 항산화제 또는 항생제 기능을 통해 박테리아, 바이러스, 곰팡이 등의 감염을 막아주며, 또한 인체 건강에 유익한 기능성 물질로 치료제로서의 활용도가 높아 미생물을 활용한 대량생산 기술에 대한 수요가 높다. 이차대사 생합성 경로가 자체적으로 제한적인 효모는 유전공학을 통해 도입된 외래 대사 경로를 방해하거나 경쟁하지 않으며, 무엇보다 다양한 오믹스 분석 시스템이 잘 구축되어 있어 전사체와 대사체 분석을 통해 효모 숙주의 생리 상태에 대한 총체적인 정보를 확보할 수 있는 장점이 있다. 또한 대사과정에 대한 상세한 모델이 개발되어 변형된 대사 네트워크의 행동을 예측할 수 있는 인실리코(*in silico*) 효모가 구축되어 있어 이를 활용한 인공 세포 디자인 및 제작이 더욱 용이한 점이 큰 장점이다(Walker and Pretorius, 2018). 특히, 단세포 진핵 미생물로서 효모는 소포체 및 미토콘드리아 같은 소기관에서 발현되어야만 활성을 갖게 되는 cytochrome P450 같은 외래 효소 발현에 적합한 숙주이며, 식물 및 동물 유래의 효소 활성에 필수적인 단백질 번역 후 변형능이 있는 점도 원핵 미생물 숙주에 비해 갖는 장점이다(Gold et al., 2018). 본 소고에서는 전통효모 *S. cerevisiae*와 *Pichia pastoris*와 *Yarrowia lipolytica*와 같은 다양한 비전통 효모 종들을 대상으로 수행되고 있는 합성생물학 기반 스테롤(sterol) 의약품 전구체 생산을 위한 인공효모 세포 공장(cell factory) 연구에 대한 최신 동향에 대해 살펴보고자 한다.

1. 스테롤의 구조, 기능 및 생합성 경로

스테로이드(steroid)는 지방산을 함유하지 않고 6개의 탄소 원자로 이루어진 고리 3개, 5개의 탄소 원자로 이루어진 고리 한 개 즉, 고리 네 개가 결합된 공통의 기본 구조를 가진 지질이자 유기 화합물로서, 스테롤(sterol), 담즙산, 성호르몬과 같이 스테레오 핵을 가진 지방 융해성 화합물이 이에 포함된다(그림 1A). 스테로이드 계열 화합물 중 대표주자인 스테롤은 스테로이드 알코올로써 유동성과 기능을 조정하는 세포막의 부분을 형성하여 진핵생물체의 생리에 중요한 역할을 하는 핵심 유기 분자이다(그림 1B). 대부분의 식물과 동물, 곰팡이류(균류)에서 발견되는 스테롤 종류로는 캄페스테롤(campesterol), 시토스테롤(sitosterol), 스티그마스테롤(stigmasterol)이 있고, 동물성 스테롤에는 콜레스테롤(cholesterol), 균류의 세포막에는 에르고스테롤(ergosterol)이 있다(그림 2). 동물에서 가장 흔한 스테롤은 콜레스테롤로서 동물세포막의 구조와 기능에 필수적인 역할을 하며, 지용성 비타민과 스테로이드 계열 호르몬의 전구체로서 부신피질 호르몬 및 담즙산의 모체이다. 식물과 동물, 곰팡이류(균류)에 존재하는 스테롤 생합성 경로는 스쿠알렌 에포사이드(squalene epoxide) 생합성까지의 초기 경로는 공통적으로 보전되어 있지만, 그 후의 생합성 경로가 차별성을 보이고 있어, 이와 같은 차이점을 기반으로 하는 항진균제가 개발되고 유용하게 활용되고 있다(그림 3). 예로써, 효모의 에르고스테롤 생합성 관련 효소들 중, 사람을 포함한 포유류에는 존재하지 않는 진균 특이적 효소 Erg11 단백질의 기능을 억제하는 물질들이 아졸(azole) 계열 항진균제로 사용되고 있다.

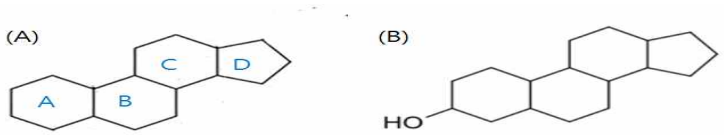

그림 1. 스테로이드(A) 및 스테롤(B) 기본 구조 그림

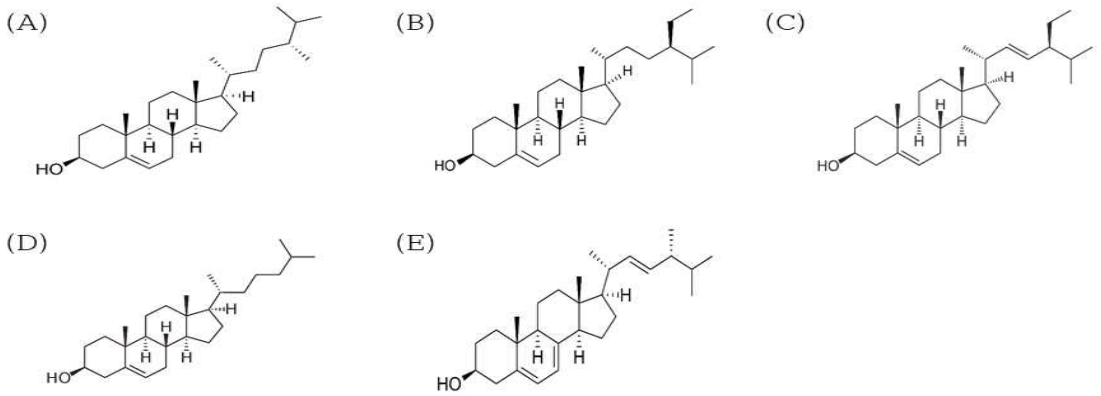

그림 2. 다양한 생명체에서 발견되는 스테롤 구조. 캄페스테롤(A), 시토스테롤(B), 스티그마스테롤(C), 콜레스테롤(D), 에르고스테롤(E)

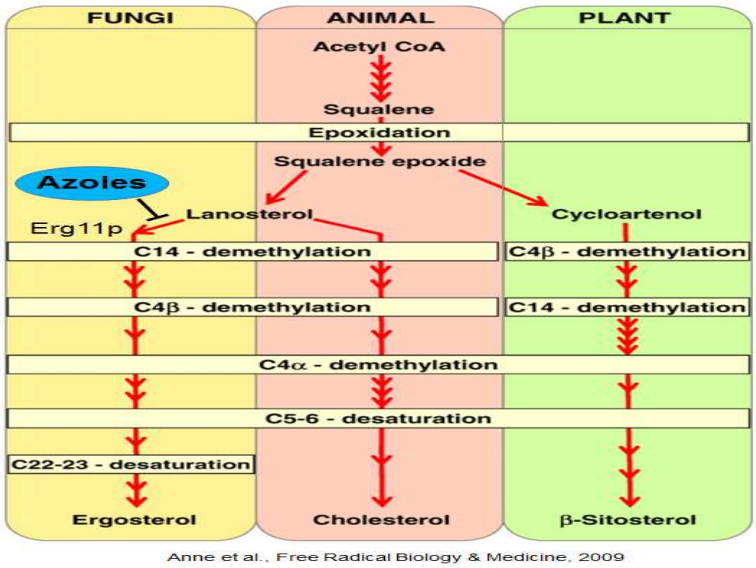

그림 3. 동물, 식물, 균류에서 스테롤 생합성 경로의 공통점 및 차이점

2. 효모 에르고스테롤 생합성 경로 및 산업적 활용

효모에서는 에르고스테롤이 주요 스테롤이고 세포막 구성요소이면서 비타민 D2의 전구체로서 상업적으로 중요한 대사산물이다. 또한 중간대사산물인 스쿠알렌(squalene)은 가장 잘 알려진 건강 증진 식품이며, 그 다음 단계의 대사물질인 라노스테롤(lanosterol)과 함께 피부보습제 및 화장품 원료로 유용하게 활용되고 있다. 이와 같이 중간대사산물 그대로를 이용한 산업 분야 외에 최근에는 에르고스테롤 합성 과정을 유전공학적 기술로 변경함으로써 외래 유전자 도입에 의한 다양한 종류의 식물 및 동물 유래의 대사물질을 효모에서 생산하는 대사공학 분야가 각광을 받고 있다.

효모 소포체에서 진행되는 에르고스테롤 생합성 경로에는 25개의 생합성 효소들이 작용하여, 크게 아세트산에서 acetyl-CoA를 통해 메발론산(mevalonte)를 합성▪변형시키는 메발론산 경로(mevalonate pathway)와 Erg9 효소에 의해 스쿠알렌이 생성되고 이후 최종 산물인 에르고스테롤 합성하는 스쿠알렌 이후 경로(post-squalene pathway)로 나뉘게 된다(그림 4). 에르고스테롤 생합성 경로의 초기 대사산물로 생성되는 이소프레노이드(isoprenoid)는 이소프렌〔CH2=C(CH3)CH=CH2〕이 중합한 탄소골격을 갖는 화합물로서 상업적으로 널리 사용되고 있는 항산화제(carotenoids), 풍미제(terpens), 기능식품(ubiquinone), 항암 화합물(taxol)의 전구체로서 유용하게 활용되고 있어서, 메발론산 경로를 활용한 이소프레노이드 계통의 대사산물 대량 생산 효모 숙주 개발 연구가 활발하게 진행되어 왔다(Mata-Gómez et al., 2014, Vickers et al., 2017). 최근에는 합성생물학 기법의 발전과 더불어 스쿠알렌 이후 생합성 경로를 대상으로 스테로이드 계통의 유용 대사물질을 대량생산하기 위한 효모 숙주 개발로 그 연구 분야가 확장되고 있다. 효모 합성생물학의 본격적인 시작을 알리는 연구 사

례로써, 중간대사물질인 자이모스테롤(zymosterol)로부터 에르고스테롤 합성까지의 대사경로를 차단하고 새로운 유전자들을 외부로부터 도입하여 발현시킴으로써 관절염, 피부병, 부신기능부전증(adrenal insufficiency) 등의 치료에 사용되는 항염 스테로이드 호르몬인 하이드로코티슨(hydrocortisone)을 생산하는 인공 효모가 개발되었다(Szczebara 2003). 또한 에르고스테롤 생합성 경로에서 스쿠알렌 다음단계 중간대사산물인 에폭시스쿠알렌(epoxysqualene)은 인삼(*Panax ginseng*)의 담마레네디올 II 합성효소 (dammarenediol II synthase)의해 담마레네디올로 전환될 수 있고 두 종류의 cytochrome P450와 여러 종류의 당전이효소(glucosyltransferase)에 의해 다양한 진세노사이드로 만들어질 수 있어 최근에는 진세노사이드 생합성 인공 효모 세포공장 개발 연구가 주목을 받고 있다(Wang et al., 2017, 2019). 또 다른 응용 분야로는, 간 질환 치료제인 우르소데옥시콜산(UDCA, ursodeoxycholic acid) 전구체로 활용될 수 있는 콜레스테롤 생산 효모(Souza al. 2011), 비타민 D 전구체인 7-디하이드로데스모스테롤(7-dehydrodesmosterol) 생산 효모(Guo et al., 2018), 식물 스테롤인 캠페스테롤(campestrol) 생산 효모(Du et al. 2016)와 같이 스테롤 의약품 전구물질 대량생산용 인공효모 세포공장 개발에 대한 관심도 고조되고 있다(그림 4).

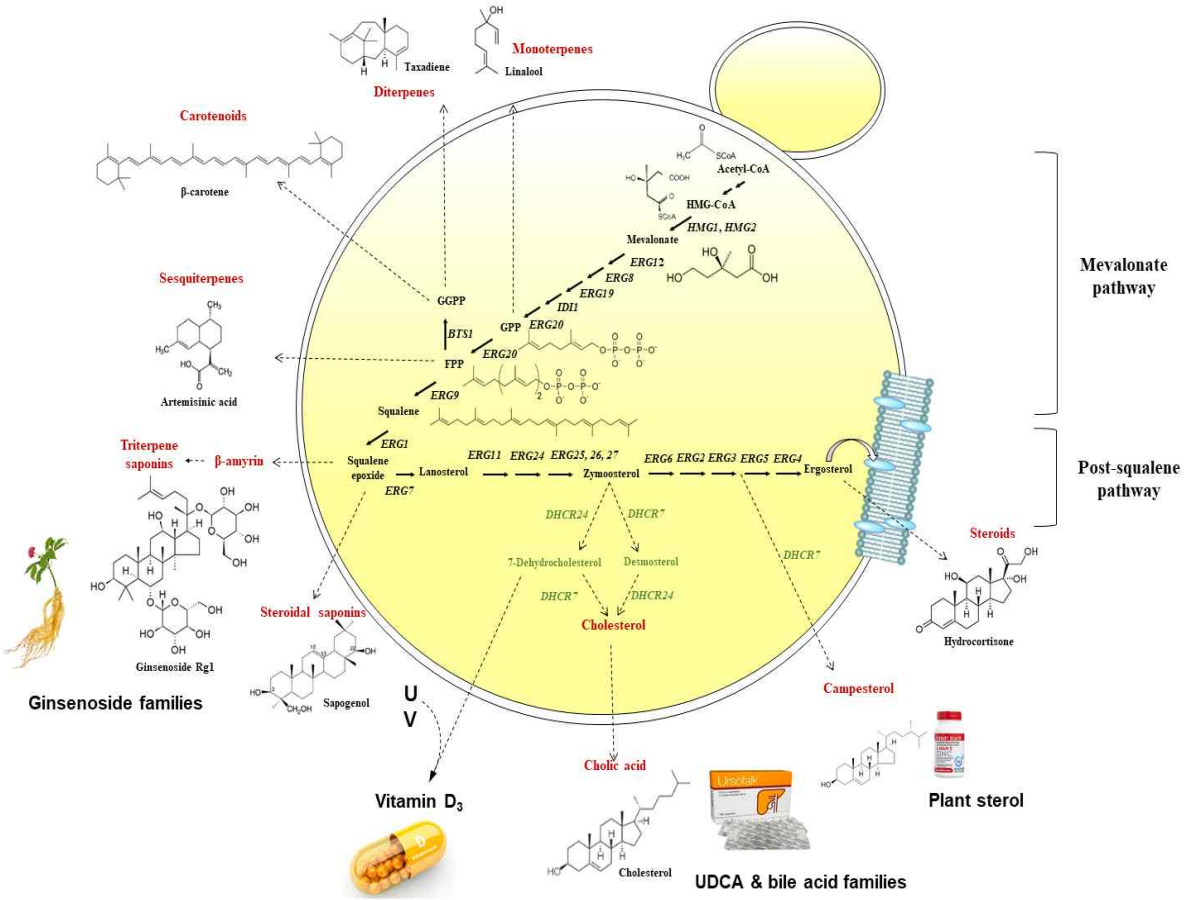

그림 4. 효모 에르고스테롤 생합성 경로 및 이를 이용한 다양한 의약품 전구체 생산

3. 효모 에르고스테롤 생합성 피드백 제어 조절 기작

효모의 에르고스테롤 생합성 경로의 여러 단계에서 성장 저해를 초래하는 대사중간물질 및 최종 산물의 과축적을 방지를 위해 피드백 제어(feedback inhibition)에 의한 조절 기작이 작동하고 있다(Hu et al., 2017). 최근의 연구에서 에르고스테롤 생합성에 관련된 일부 유전자들의 경우 결손시키거나 과발현시키는 경우 효모의 성장이 크게 저해받고 여러 형태의 생리적 결함이 발생함이 보고되었다(Bhattacharya et al., 2018). 에르고스테롤 생합성 경로 관련 효소들 중 초기 단계에 작용하는 Hmg1 효소와 중간 단계에 작용하는 Erg1 효소의 경우 유비퀴틴(ubiquitin)에 의해 매개되는 단백질 분해에 통한 비활성화된다. *HMG1* 유전자에 의해 발현되는 효소인 HMG-CoA reductase인 Hmg1의 경우, Hmg1 효소 작용 단계의 바로 다음 과정에 존재하는 파네실 피로포스페이트(farnesyl pyrophosphate)라는 스테롤 전구물질이 세포 내에 충분해지면 Hrd1 효소가 작동하여 Hmg1 효소의 N-말단에 있는 라이신(lysine) 잔기에 유비퀴틴을 붙여서 다중 유비퀴틴 부착이 일어나게 되면 프로테아좀(proteasome)에 의한 분해가 일어난다(그림 5A, Polakowski et al., 1998). *ERG1* 유전자에 의해 발현되는 스쿠알렌 모노옥시다제(squalene monooxygenase)인 Erg1도 뒷 과정에 존재하는 라노스테롤(lanosterol)이 세포 내에 축적되면 Doa10이라는 ubiquitin-protein ligase에 의해 단백질 분해가 촉진되는 피드백 제어를 받게 된다(그림 5B, Foresti et al., 2013). 따라서 이들 효소들의 특정 라이신 잔기에 돌연변이를 일으켜 다른 성질을 지니는 아미노산으로 교체가 되거나 해당 부위가 결손되면, 다중 유비퀴틴 부착이 일어나지 않게 되어 피트백 제어 작용을 받지 않게 되어 세포 내에 중간대사물질이 많아져도 효소가 계속해서 반응할 수 있을 것으로 예측된다. 흥미로운 것은, Hmg1 돌연변이 도입을 통해 에르고스테롤 생합성 초기 생합성 과정을 증폭하는 경우 Erg1의 낮은 활성 때문에 스쿠알렌이 축적됨이 관찰되며 이는 Erg1이 관여하는 스쿠알렌에서 스쿠알렌에포사이드의 전환 과정에서 병목현상이 일어남을 시사하고 있다.

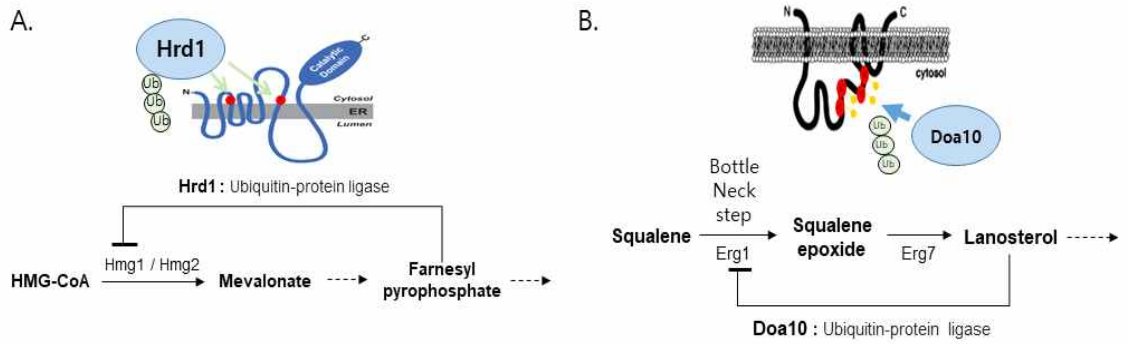

그림 5. 유비퀴틴 기반 단백질 분해 기작에 의한 에르고스테롤 생합성 효소 활성의 피드백 제어 조절 기작 A) Hrd1 효소에 의한 Hmg1 단백질 polyubiquitination 기작 (B) Doa10 효소에 의한 Erg1 단백질 polyubiquitination 기작

한편, 효모의 에르고스테롤 생합성 과정에 관여하는 여러 유전자들과 자체의 발현을 유도하는 전사조절인자 Upc2가 존재한다. Upc2의 C-말단에 존재하는 리간드 결합 부위(ligand-binding domain)에 억제 리간드로 작용하는 최종 산물인 에르고스테롤이 결합하면 비활성화 상태로 세포질에 존재하다가, 세포 내에 에르고스테롤이 부족해지면 결합이 되지 않은 Upc2가 핵 내부로 들어가 에르고스테롤 합성 관여 유전자들의 프로모터에 존재하는 약 6bp 크기의 SRE (sterol regulatory element) 부위에 이합체 형태로 결합할 수 있게 된다. 이 결합을 통해 스테롤 합성 관여 유전자들의 발현이 유도되고, 결과적으로 에르고스테롤 합성 과정을 촉진시키는 역할을 한다. C-말단의 리간드 결합 부위에서 중요한 역할을 하는 활성 루프(activation loop) 부분에 아미노산 변이가 일어난 단백질인 Upc2-1의 경우 에르고스테롤과의 결합 친화력이 매우 감소하여 세포 내에 에르고스테롤이 충분한 상황에서도 결합이 이루어지지 않아 항상 활성화된 상태로 존재하며 에르고스테롤 생합성 과정을 촉진하게 된다(그림 6, Yang et al., 2015)

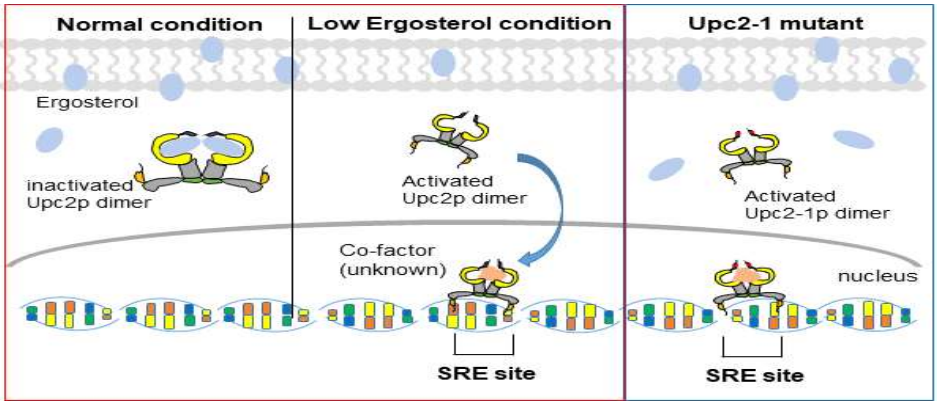

그림 6. 전사조절인자 Upc2 및 Upc2-1 변이체의 작용 기작(Yang et al., 2015, 논문 그림 수정)

4. 효모 에르고스테롤 생합성 경로 재설계를 통한 스테롤 의약품 생산 연구사례

1) 콜레스테롤 생산 인공 효모

동물에서 생산되는 콜레스테롤은 세포막의 주요 구성성분으로서 막의 유동성(fluidity)을 조절하고 답즙산의 콜린산, 생리조절의 역할을 하는 여러 가지 스테로이드 호르몬, 칼슘 형성에 관계되는 비타민 D의 전구 물질인 칼시페롤 생성에 관여한다. 이러한 콜레스테롤을 효모에서 생산할 경우 스테로이드와 비타민 D의 유기합성을 대신할 수 있을 뿐만 아니라 동물에서 얻던 담즙산 또한 안정적으로 획득할 수 있어, 효모에서 콜레스테롤과 그 외 스테롤

전구체 물질들을 생산하는 연구가 진행되고 있다. 전통효모 *S. cerevisiae*를 대상으로 개발된 콜레스테롤 생산 균주는 C-22 desaturase를 코딩하는 *ERG5* 유전자와 C-24 methyltransferase를 코딩하는 *ERG6* 유전자의 결손과 동시에 7-dehydrocholesterol reductase를 코딩하는 외래유전자 *DHCR7*와 24-Dehydrocholesterol reductase를 코딩하는 외래유전자 *DHCR24*을 도입하여 제작되었다(그림 7). 이렇게 제작된 콜레스테롤 생산 효모는 아미노산의 하나인 트립토판 수송 능력을 감소시키는 특징을 가진다(Souza al. 2011). 또한 재조합 단백질 생산 숙주로 널리 활용되고 있는 메탄올자화 효모 *P. pastoris*를 대상으로 *S. cerieviaise* 와 동일한 전략으로 *ERG5*, *ERG6* 결손과 동시에 *DHCR7*, *DHCR24* 발현을 통해 콜레스테롤 생산 균주 제작 연구가 수행되었다. 이 콜레스테롤 생산 *P. pastoris* 균주에 추가적으로 인체 유래의 막단백질 Na,K-ATPase를 발현시킨 결과 야생형보다 훨씬 안정적으로 발현됨을 확인함으로써 효모에서 고등 포유류 유래의 막 단백질 대량생산 숙주로서 콜레스테롤 생산 효모의 장점을 제시하였다(Hirz M et al. 2013).

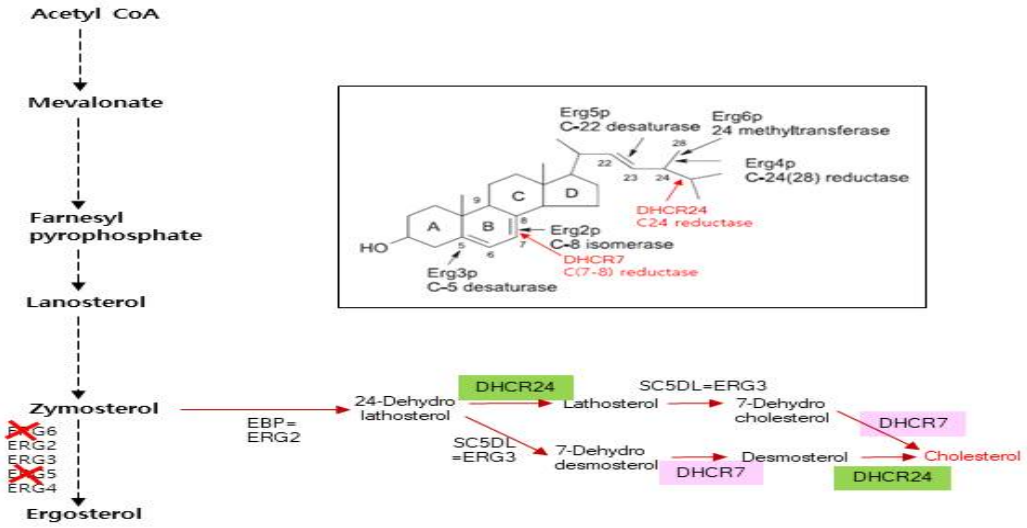

그림 7. 에르고스테롤 생합성 경로에서 *ERG5*, ERG6 결손과 동시에 외래 유전자 *DHCR7*, *DHCR24* 도입을 통한 콜레스테롤 생산 효모 균주 제작 도식도

2) 비타민 D 전구체 7-디하이드로콜레스테롤 대량 생산 인공 효모

최근에는 효모의 에르고스테롤 생합성 경로를 이용해 비타민 D 전구체 대량 생산 숙주 개발 및 공정개발에 관한 관심이 증가되고 있다(Guo et al., 2018, Su et al., 2015). 효모에서는 에르고스테롤 전구물질인 자이모스테롤이 Erg6에 의해 페코스테롤(fecosterol)로 변환되거나 Erg2와 Erg3에 의해 7-디하이드로데모스테롤로 변환된다, 동물세포의 경우 *DHCR24* 유전자에 의해 발현되는 효소인 디하이드로콜레스테롤 환원효소(dehydrocholesterol reductase)에 의해 자이모스테롤이 최종적으로 7-디하이드로콜레스테롤로 변환되게 된다(그림 7). 이 물질

은 자외선에 의해 프리비타민 D3로 변환되고 순차적으로 비타민 D3로 변환된다. 비타민 D3는 비타민복합제의 주원료로 사용되는 유용 물질로서, 초기의 낮은 수율을 보이는 재조합 균주에 대한 추가적인 여러 엔지니어링 전략을 통하여 2018년 중국 연구팀에서 고농도 발효에서 리터당 1 g의 7-디하이드로데모스테롤 수득률을 보고하였다(Guo et al., 2018). 이들은 7-디하이드로데모스테롤을 최대한 축적시키기 위해 초기 에르고스테롤 생합성 경로에 해당되는 메발론산 경로의 유전자들(*ERG10, ERG13, ERG12, ERG8, ERG19, IDI1, ERG20*)을 추가적으로 도입하고, Hmg1 효소 역시 앞서 언급한대로 Hrd1에 의한 억제 현상을 막기 위해 라이신 잔기를 가지고 있는 N-말단을 절단시킨 변이체를 코딩하는 *tHMG1* 유전자 도입하였다. 또한 다양한 동물 유래의 *DHCR24* 유전자의 기능을 비교 분석하여 가장 좋은 활성을 지니는 *Gallus gallus* (닭) 유래의 유전자를 이용하고, 발현 수준과 성장 간의 균형을 맞출 수 있도록 강력하면서 발현 조절이 가능한 *GAL* 프로모터를 이용하여 발현하였다. 또한, 스테롤 축적에 간접적으로 영향을 주는 지질대사에 관여하는 *NEM1* 유전자를 추가 결손시킴으로서 최종적으로 앞서 말한 수득률을 가지는 효모 균주를 제작하였다(그림 8)

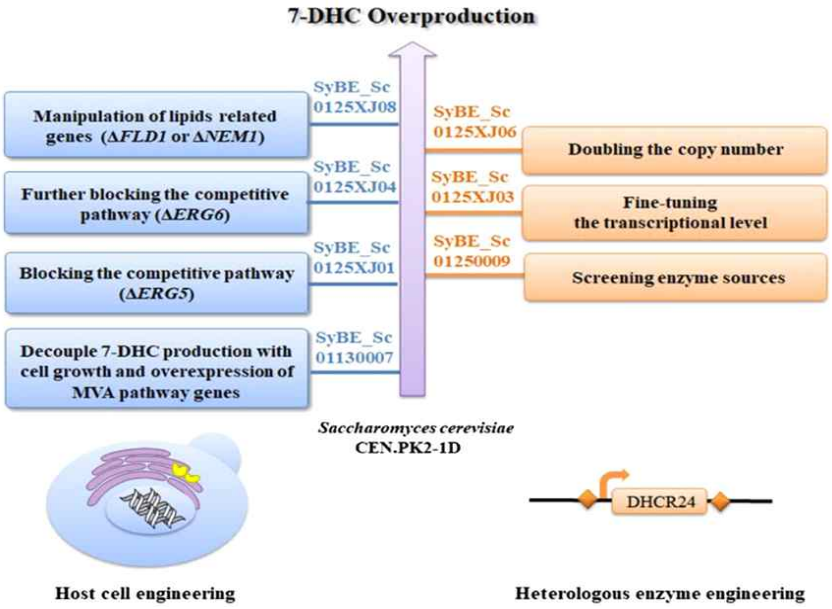

그림 8. 7-디하이드로데모스테롤(7-DHC) 과생산 효모 균주 제작을 위한 다양한 엔지니어링 전략(Guo et al., 2018)

3) 식물성 스테롤 캠페스테롤 대량생산 인공 효모

식물에서 생성되는 피토스테롤(phytosterols)의 한 종류인 캠페스테롤(campesterol)은 비만, 과체중 및 고혈압과 같은 생활 습관 관련 질병에서 콜레스테롤 저하 효과를 나타내고 있어 이와 관련된 식품 및 음료 생산 과정에서 사용이 증가되고 있을 뿐만 아니라, 항체호르몬(프로게스테론), 피부염 관절염 치료제(히드로코르티손) 등의 스테로이드 의약품 산업에서 중

요한 전구체로 그 수요가 계속해서 증가되고 있다(He et al., 2018). 다양한 종류의 오일을 탄소원으로 활용하면서 비극성 물질을 저장할 수 있는 큰 지질체(lipid body)을 형성할 수 있는 비전통 효모 *Y. lipolytica*를 대상으로 C-22 desaturase를 코딩하는 *ERG5* 결손과 동시에 7-dehydrocholesterol reductase를 코딩하는 외래유전자 *DHCR7*을 도입하여 캠페스테롤 대량 생산 균주 제작 및 발효 공정 개발 연구가 수행되어 해바라기 씨 오일을 이용한 배양에서 0.45 g/L 캠페스테롤 생산이 가능함이 보고되었다(Du et al. 2016). 또한 최근 후속연구에서 지방산에서 beta-oxidation을 통해 스테롤 생합성 경로의 초기 전구체인 acetyl-Co A 생산 단계에 관여하는 *POX2 유전자*를 과발현시킬 경우 0.92 g/L 수준으로 생산량이 증가되었다 (그림 9, Zhang et al. 2017)

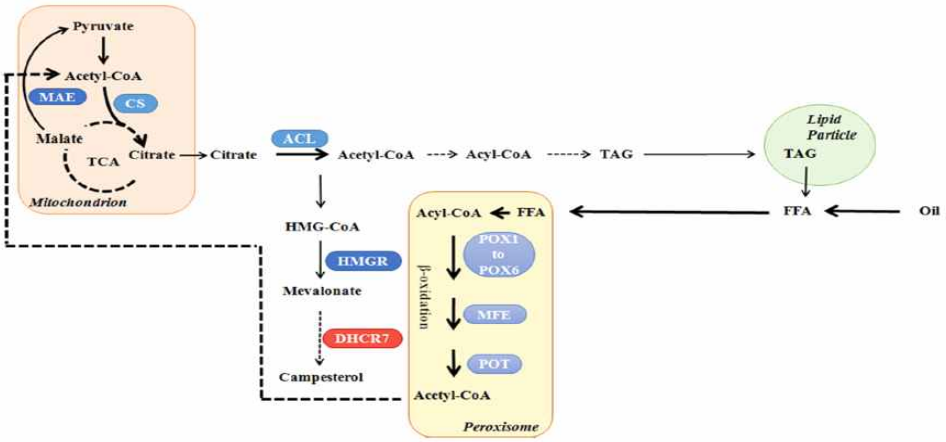

그림 9. 캠페스테롤 생합성 인공효모 숙주에서 acetyl Co-A 전구체 생산 증대 전략(Zhang et al. 2017)

5. 스테롤 전구체 생산 인공효모 개발 연구에 대한 현안 및 전망

최첨단 합성생물학 기반의 생명공학 기술을 이용해서 효모 세포의 대사경로를 지능형으로 재설계하여 다양한 유용 물질을 대량생산하는 인공효모 세포공장을 개발하는 연구의 범위는 바이오연료, 화학산업 기반화학물질, 고부가 생리 활성 기능 물질, 의약용 소재 등 날로 확장되고 있다. 동물세포의 대표적인 스테롤인 콜레스테롤은 에스트로겐, 테스토스테론 같은 호르몬, 소화흡수와 관련이 있는 담즙산, 체내 칼슘의 흡수를 도와 뼈를 튼튼하게 유지하는 비타민 D 등 스테로이드 계통의 의약품 대량생산에 유용한 전구체로서 활용될 수 있다. 한편 콜레스테롤은 우리 몸에 꼭 필요한 성분이지만 높은 혈중 콜레스테롤은 고지혈증을 비롯하여 인체에 여러 종류의 질병을 유발시킨다. 최근 식물성 스테롤은 담즙산의 존재 하에서 동물의 장 점막에 대한 친화도가 콜레스테롤보다 높기 때문에 장의 점막을 통한 콜레스테롤

의 흡수를 억제한다는 역할이 알려지면서 혈중 콜레스테롤 수치를 적정하게 관리해주는 건강기능식품으로 주목받기 시작했다. 따라서 이러한 성분을 농축한 식물성 스테롤은 기능성 식소재로서 이용 가능성이 아주 높으며, 미국 FDA와 국내 식품의약품안전처에서 인정받는 건강기능식품으로도 개발이 시작되고 있다.

이와 같이 식물 및 동물 유래의 스테롤 활용 의약품 및 건강식품 개발에 대한 수요가 증가됨에 따라 다양한 종류의 스테롤 전구체 대량생산할 수 있는 인공 효모 숙주 개발을 위한 에르고스테롤 생합성 경로 재설계 연구에 대한 관심이 고조되고 있다. 빠른 속도로 가속화되고 있는 효모 합성생물학 기반의 발현 도구 개발 기술의 발전과 더불어 다각도의 오믹스 분석 기술로 규명되고 있는 에르고스테롤 생합성 경로 조절 기작에 대해 축적되는 정보는 맞춤형 스테롤 전구체 대량생산 인공효모 세포공장 개발과 이를 이용한 산업화의 성공 가능성을 높이고 있다. 이미 고대시대부터 인류의 식생활에 활용되어 오면서 가장 인류에게 잘 길들어진 생명체인 효모는 앞으로 다가올 미래의 세상에도 인류가 필요한 거의 모든 소재를 고객 친화적 형태로 경제적으로 대량생산하는 인공미생물 공장으로서 우리의 일상생활에 미치는 그 영향력이 더욱 확장될 것이다. .

인용문헌

Bhattacharya S, Esquivel BD, White TC. Overexpression or deletion of ergosterol biosynthesis genes alters doubling time, response to stress Agents, and drug susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*. MBio. 2018 24;9(4).

Du HX, Xiao WH, Wang Y, Zhou X, Zhang Y, Liu D, Yuan YJ. Engineering *Yarrowia lipolytica* for campesterol overproduction. PLoS One. 2016, 11(1):e0146773.

Foresti O, Ruggiano A, Hannibal HKB, Ejsing CS, Carvalho P. Sterol homeostasis requires regulated degradation of squalene monooxygenase by the ubiquitin ligase Doa10/Teb4. Elife. 2013, 23:2.

Gold ND, Fossati E, Hansen CC, DiFalco M, Douchin V, Martin VJJ. A Combinatorial approach to study cytochrome P450 enzymes for De Novo production of steviol glucosides in bakers Yeast. ACS Synthetic Biology. 2018, 7:2918-2929.

Guo XJ, Xiao WH, Wang Y, Yao MD, Zeng BX, Liu H, Zhao GR, Yuan YJ. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for 7-dehydrocholesterol overproduction. Biotechnol Biofuels. 2018, 11:192

He WS, Zhu H, Chen Z. Plant Sterols: Chemical and enzymatic structural modifications and effects on their cholesterol-lowering activity. J Agric Food Chem. 2018, 66(12):3047-3062.

Hirz M, Richter G, Leitner E, Wriessnegger T, Pichler H. A novel cholesterol-producing *Pichia pastoris* strain is an ideal host for functional expression of human Na,K-ATPase $\alpha 3 \beta 1$ isoform. Appl Microbiol Biotechnol. 2013, 97(21):9465-78.

Hu Z, He B, Ma L, Sun Y, Niu Y, Zeng B. Recent advances in ergosterol biosynthesis and regulation cechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. Indian J Microbiol. 2017, 57(3):270-277.

Kim H, Yoo SJ, Kang HA. Yeast synthetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins. FEMS Yeast Res. 2015, 15(1):1-16.

Mata-Gómez LC, Montañez JC1, Méndez-Zavala A, Aguilar CN. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. Microb Cell Fact. 2014, 13:12.

Polakowski T, Stahl U, Lang C. Overexpression of a cytosolic hydroxymethylglutaryl-CoA reductase leads to squalene accumulation in yeast. Appl Microbiol Biotechnol. 1998, 49: 66-71.

Szczebara FM, Chandelier C, Villeret C, Masurel A, Bourot S, Duport C, Blanchard S, Groisillier A, Testet E, Costaglioli P, Cauet G, Degryse E, Balbuena D, Winter J, Achstetter T, Spagnoli R, Pompon D, Dumas B. Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast. Nat Biotechnol. 2003, 21(2):143-9.

Souza CM, Schwabe TM, Pichler H, Ploier B, Leitner E, Guan XL, Wenk MR, Riezman I, Riezman H. A stable yeast strain efficiently producing cholesterol instead of ergosterol is

functional for tryptophan uptake, but not weak organic acid resistance. Metab Eng. 2011 13(5):555-69.

Su W, Xiao WH, Wang Y, Liu D, Zhou X, Yuan YJ. Alleviating redox imbalance enhances 7-dehydrocholesterol production in engineered *Saccharomyces cerevisiae.* PLOS One. 2015, 10(6):e0130840.

Vickers CE, Williams TC, Peng B, Cherry J. Recent advances in synthetic biology for engineering isoprenoid production in yeast. Curr Opin Chem Biol. 2017, 40:47-56.

Walker RSK, Pretorius IS. Applications of yeast synthetic biology geared towards the production of biopharmaceuticals. Genes (Basel). 2018, 9(7):340.

Wang P, Wei Y, Fan Y, Liu Q, Wei W, Yang C, Zhang L, Zhao G, Yue J, Yan X, Zhou Z. Production of bioactive ginsenosides Rh2 and Rg3 by metabolically engineered yeasts. Metab Eng. 2015, 29:97-105.

Wang P, Wei W, Ye W, Li X, Zhao W, Yang C, Li C, Yan X, Zhou Z. Synthesizing ginsenoside Rh2 in *Saccharomyces cerevisiae* cell factory at high-efficiency. Cell Discov. 2019, 5:5.

Yang H, Tong J, Lee CW, Ha S, Eom SH, Im YJ. Structural mechanism of ergosterol regulation by fungal sterol transcription factor Upc2, Nautre Commun. 2015, 6;6129.

Zhang Y, Wang Y, Yao M, Liu H, Zhou X, Xiao W, Yuan Y. Improved campesterol production in engineered *Yarrowia lipolytica* strains. Biotechnol Lett. 2017 39(7):1033-1039.