



Doctoral Thesis

## Metabolic engineering of yeast

**Author(s):**

Çakar, Zeynep Petek

**Publication Date:**

2000

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004017268> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 13665

# **METABOLIC ENGINEERING OF YEAST**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH  
for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

Presented by  
Zeynep Petek Çakar  
M.Sc. Chem. Eng., Bogaziçi University, Istanbul  
born August 23, 1972  
citizen of Turkey

Accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Bernard Witholt, examiner  
Prof. Dr. Theo Wallimann, co-examiner  
Dr. Uwe Sauer, co-examiner  
Prof. Dr. Markus Aebi, chairman

Zürich, 2000

## SUMMARY

The aim of this thesis was to provide insights into cellular properties that are relevant for metabolic engineering of yeast: intracellular carbon fluxes, side effects of using auxotrophic markers, and susceptibility of multiple stress resistance to evolutionary engineering. For this purpose, several new methodologies were adapted for application to yeast, and the reported results as well as the methods themselves can be used to increase the efficiency of metabolic engineering in yeast.

First, we describe a metabolic engineering strategy that aims at improving yeast energy metabolism by overexpression of creatine kinases, key enzymes of energy metabolism in higher eukaryotes. Despite a previous report that creatine kinase-overexpressing *Saccharomyces cerevisiae* takes up creatine and forms phosphocreatine, our *in vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR and inhibitor data reveal that such cells do not form phosphocreatine, presumably for lack of creatine uptake. Thus, installing a functional creatine kinase system in yeast requires further metabolic engineering of either intracellular creatine biosynthesis or creatine uptake.

Second, we adapt a new methodology for metabolic flux analysis in yeast for the first time. This method is based on the combination of classical metabolic flux balancing and NMR tracing of  $^{13}\text{C}$ -labeled amino acids. The wealth of available data also allowed to include compartmentalization in the model and, contrary to previous attempts, to actually conclude on the localization of certain metabolite pools. This flux model, along with the generated data, were used to gain insights into the metabolic differences between the yeasts *Pichia* and *Saccharomyces*. Most prominently, the results reveal significantly higher fluxes through the pentose phosphate pathway in *Pichia*. A possible explanation for these differences is the presence of a transhydrogenase or transhydrogenase-like activity in *Pichia* and its absence in *Saccharomyces*. Furthermore, our results suggest transaldolase and transketolase, possibly in combination with transhydrogenase as a target for metabolic engineering of xylose utilization for fuel ethanol production in *S. cerevisiae*.

Third, we show that auxotrophic yeast mutants may have physiological alterations and sensitivities that are not generally recognized. Analyzing yeast morphology by advanced high pressure freezing-freeze substitution and transmission electron microscopy, we show the interrelation of vacuolar morphology, cell cycle, and amino acid availability in auxotrophic *S. cerevisiae* strains. These techniques for sample preparation, so far, have been barely successful in yeast. The results present a note of caution that auxotrophic host-related physiological effects may complicate interpretation of morphological, cell cycle, and metabolic engineering studies.

Fourth, we describe directed evolution of multiple-stress resistant *S. cerevisiae*. Specifically, various batch and chemostat selection strategies were compared for their suitability of selecting multiple-stress resistant mutants. These results revealed that

transient stress challenges in chemostat yielded mutants with up to 10-fold improved oxidative, freezing and ethanol stress survival, compared to the wild-type. Selection in batch culture, in contrast, yielded more specialized mutants with highly improved (up to 150-fold) resistances to oxidative and freezing stresses. These results suggest a combination of selection in batch and transient stress challenges in a chemostat as most appropriate for obtaining further improved multiple-stress resistant *S. cerevisiae*.

## ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Doktorarbeit war die Untersuchung zellulärer Eigenschaften, die für das 'Metabolic Engineering' von Hefe bedeutsam sind: intrazelluläre Kohlenstoffflüsse, Nebeneffekte auxotropher Marker und die Möglichkeit, Mutanten zu isolieren, die gegen mehrere Stressbedingungen resistent sind. Zu diesem Zweck wurden diverse neue Methoden für die Anwendung in Hefe adaptiert. Sowohl die Methoden als auch die erzielten Ergebnisse ermöglichen die Verbesserung zukünftiger 'Metabolic Engineering' Strategien.

Zunächst beschreiben wir eine 'Metabolic Engineering' Strategie zur Verbesserung des Energiemetabolismus der Hefe durch Ueberexpression von Kreatinkinasen, wichtiger Enzyme des Energiemetabolismus in höheren Eukaryonten. Trotz früherer Berichte, dass Kreatinkinase-exprimierende *Saccharomyces cerevisiae* Kreatin aufnehmen und Phosphokreatin bilden können, zeigen unsere *in vivo* <sup>31</sup>P-NMR und Inhibitor-daten, dass solche Zellen kein Phosphokreatin bilden, wahrscheinlich wegen eines fehlenden Transportsystems. Zur Etablierung eines funktionellen Kreatinkinasesystems sind daher weitere Veränderungen der Hefe notwendig. Diese sollten entweder die intrazelluläre Biosynthese von Kreatin oder dessen Transport ermöglichen.

Im zweiten Teil modifizieren wir eine neue Methode zur Abschätzung der intrazellulären Kohlenstoffflüsse für die erstmalige Anwendung in Hefe. Diese Methode basiert auf der Kombination von klassischen Flussbilanzierungen und NMR Analyse von <sup>13</sup>C markierten Aminosäuren. Die ermittelten, umfangreichen Daten ermöglichen auch die Berücksichtigung der Kompartimentalisierung der Hefezelle in unserem Modell und, anders als in bisherigen Modellen, die Gewinnung von Informationen über die Lokalisierung von bestimmten Metabolitenpools. Modell und Analyse erlaubten uns einen tieferen Einblick in die metabolischen Unterschiede zwischen den Hefen *Saccharomyces* und *Pichia* zu erhalten. Die Ergebnisse zeigen insbesondere deutlich höhere Kohlenstoffflüsse durch den Pentose Phosphat Weg von *Pichia*. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied ist die Präsenz einer Transhydrogenase oder Transhydrogenase-ähnlichen Aktivität in *Pichia* und deren Abwesenheit in *Saccharomyces*. Weiterhin erlauben unsere Ergebnisse den Schluss, dass die Reaktionen der Transaldolase und Transketolase, möglicherweise in Kombination mit der Transhydrogenase, in *S. cerevisiae* stärker exprimiert werden müssen, um Alkohol aus Xylose zu produzieren.

Drittens zeigen wir, dass auxotrophe Hefe Mutanten häufig unbeachtete physiologische Veränderungen zeigen. Durch morphologische Analysen mit 'Advanced High Pressure Freezing-Freeze Substitution' und Transmissions Elektronenmikroskopie, konnten wir zeigen, dass die Vakuolenmorphologie, der Zellzyklus und die Aminosäureverfügbarkeit in auxotrophen Hefestämmen in einem Zusammenhang stehen. Diese Technik zur Probenvorbereitung konnte bisher noch nicht erfolgreich in Hefe

angewendet werden. Unsere Ergebnisse zeigen, dass physiologische Effekte von auxotrophen Mutationen mit morphologischen, Zellzyklus- und 'Metabolic Engineering' Experimenten interferieren.

Viertens beschreiben wir eine Strategie zur Selektion von *S. cerevisiae* Mutanten, die gegen mehrere Stressbedingungen resistent sind. Zu diesem Zweck wurden diverse Batch und Chemostat Selektionsverfahren auf ihre Tauglichkeit hin untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass Chemostaten mit kurzzeitigen Stressbedingungen auf Mutanten selektionierten, die bis zu 10-fach erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem, Gefrier- und Alkoholstress als der Elternstamm zeigen. Batchverfahren dagegen selektionierten Mutanten mit bis zu 150-fach höherer Resistenz gegenüber oxidativem und Gefrierstress. Die Ergebnisse erlauben den Schluss, dass Mutanten mit Mehrfachstressresistenzen am Besten durch eine Kombination von Selektionsverfahren in Batch und Chemostat mit kurzzeitigen Stressbedingungen zu erhalten sind.