

Research Article

Open Access

酵母Sibirny*の新しいエタノール方法V. Dmytruk, V. 陽性Kshanovskaのための過剰生産バーバラ、変異体チャールズ選択A. アッバス、Andriy.

New methods for positive selection of yeast ethanol overproducing mutants

DOI 10.1515/bioeth-2015-0003

2014年12月11日受領、2015年6月29日受理

要旨: 燃料用エタノールは、広く使用されている石油由来の輸送用液体燃料に代わる、環境に優しい液体燃料である。2007年以降、燃料用エタノールの生産量は世界的に増加している。現在、エタノールは主に酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた発酵により、スクロースやデンプンなどの炭水化物から生産されている。本研究では、加水分解トウモロコシ粕からのエタノール生産量を増加させる *S. cerevisiae* 株を選択するための新しいアプローチについて述べる。*Saccharomyces cerevisiae* AS400の工業生産株を、毒性濃度のオキシチアミン、トレハロース、3-プロモピルビン酸、グリオキシル酸、グルコサミンに耐性を持つ変異体のポジティブセレクションに供した。選択された変異体は、工業用エタノール生産株の親株と比較して、エタノール収量（消費グルコースの g^{-1} ）が5–8%増加するという特徴がある。グリオキシル酸、グルコサミン、プロモピルビン酸を用いた3段階選抜法により、工業培地での発酵中のエタノール収量が12%増加した。これらの結果は、選抜された菌株が工業用エタノール生産の有望な候補であることを示している。

Keywords: fuel ethanol, yeast, selection, alcoholic fermentation.

1 Introduction

今日のバイオ燃料産業は、主にトウモロコシや小麦のような穀類、サトウキビやテンサイのような砂糖作物のような伝統的な原料からエタノールを生産している。

酵母による植物炭水化物の発酵は、新石器時代まで遡る[1]。今日、酵母は多くのバイオテクノロジープロセスで広く利用されており、ビールやワインなどのアルコール飲料や燃料用エタノールの生産に最も多く利用されている。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、工業用エタノール生産の主要な微生物である。この酵母は、増殖の速さ、効率的なグルコースの嫌気性代謝、良好なエタノール生産性と収率、高エタノール濃度や低酸素濃度などの環境ストレス因子に対する耐性など、工業的に望ましい特性をいくつか備えている[2]。グルコースやスクロースからのエタノール収率は良好であるが、これらの糖類からの収率はさらに向上させることができる。これには、副生成物の発生を抑制することで、糖質からのエタノール生産量を増加させることを目的とした酵母代謝の方向転換を行う遺伝子工学技術など、いくつかのアプローチがある[3]。特に、グリセロールとバイオマス合成はバイオエタノール生産中の主要な副生成物であるため、これを減少させることで達成することができる。*S. cerevisiae* の嫌氣的増殖中、グリセロールは、エタノールの生合成中に生成される還元型NADHを再酸化するための必須電子シンクとして機能する。細胞質NADHの生成を抑制することで細胞の酸化還元代謝を変化させることを目的とした工学的アプローチを採用することで、エタノール収量の増加を伴うグリセロール生成の減少がもたらされた[4, 5, 6, 7]。バイオマス蓄積を減少させることは、消費された糖からエタノール収量を増加させる代替方法である。バイオマス蓄積の程度は、ATPの形でエネルギーが利用できるかどうか依存する。細胞のATP収量が減少すれば、エタノール収量が増加すると予想される[8]。予想通り、エタノール生産は、代謝工学的アプローチを用いて、以下の方法で実証された。

*Corresponding author Andriy Sibirny, Department of Molecular Genetics and Biotechnology, Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, Drahomanov Street, 14/16, Lviv 79005 Ukraine, E-mail: sibirny@cellbiol.lviv.ua.

Kostyantyn V. Dmytruk, Barbara V. Kshanovska, Department of Molecular Genetics and Biotechnology, Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, Drahomanov Street, 14/16, Lviv 79005 Ukraine
Charles A. Abbas, ADM Research, 1001 N. Brush College Rd., Decatur, IL 62521-1656 USA

Andriy Sibirny, Department of Biotechnology and Microbiology, University of Rzeszow, Zelwerowicza 4, Rzeszow 35-601, Poland

Research Article

Open Access

Kostyantyn V. Dmytruk, Barbara V. Kshanovska, Charles A. Abbas, Andriy Sibirny*

New methods for positive selection of yeast ethanol overproducing mutants

DOI 10.1515/bioeth-2015-0003

Received December 11, 2014; accepted June 29, 2015

Abstract: Fuel ethanol is an environmentally friendly alternative liquid fuel to the widely used petroleum derived transportation liquid fuels. Since 2007, worldwide fuel ethanol production has increased. Currently ethanol is primarily produced from carbohydrates such as sucrose and starch by fermentation using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In this work, new approaches for the selection of *S. cerevisiae* strains with increased ethanol production from hydrolyzed corn meal are described. An industrial production strain of *Saccharomyces cerevisiae* AS400 was subjected to positive selection of mutants resistant to toxic concentrations of oxythiamine, trehalose, 3-bromopyruvate, glyoxylic acid, and glucosamine. The selected mutants are characterized by 5–8% increase in ethanol yield (g g⁻¹ of consumed glucose) as compared to the parental industrial ethanol-producing strain. A three-step selection approach that consisted of the use of glyoxylic acid, glucosamine and bromopyruvate resulted in a 12% increase in ethanol yield during fermentation on industrial media. These results indicate that the selected strains are promising candidates for industrial ethanol production.

Keywords: fuel ethanol, yeast, selection, alcoholic fermentation.

1 Introduction

Today the biofuel industry primarily produces ethanol from traditional feedstocks such as cereal crops like corn and wheat and sugar crops like sugar cane and sweet sugar beet.

The fermentation of plant carbohydrates by yeast dates back to the Neolithic period [1]. Today, yeasts are widely used in many biotechnological processes, with the largest use for the production of alcoholic beverages such as beer and wine and fuel ethanol. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is the predominant microorganism for industrial ethanol production. This yeast is characterized by several desirable industrial properties which include fast growth, efficient glucose anaerobic metabolism, good ethanol productivity and yield, and tolerance to several environmental stress-factors, such as high ethanol concentration and low oxygen level [2]. In spite of good ethanol yields from glucose and sucrose, the yield from these sugars can be further increased. There are several approaches that can be employed for this, which include genetic engineering techniques that target the redirection of yeast metabolism towards increased yield of ethanol production from carbohydrates by reducing co-product generation [3]. Particularly, this can be achieved through the reduction of glycerol and biomass synthesis, since these represent the major by-products during a bioethanol production. During anaerobic growth of *S. cerevisiae*, glycerol serves as an essential electron sink for reoxidizing reduced NADH generated during biosynthesis of ethanol. The employment of engineering approaches, which aim to change cellular redox metabolism via of reduced formation of cytosolic NADH, resulted in the reduction of glycerol production with increase in ethanol yield [4, 5, 6, 7]. Decreasing biomass accumulation is an alternative way to increase ethanol yield from sugar consumed. The extent of biomass accumulation is dependent on the availability of energy in the form of ATP. If cellular ATP yield is decreased, it is anticipated that an increase in ethanol yield will result [8]. As predicted, ethanol production was demonstrated using metabolic engineering approaches via

*Corresponding author **Andriy Sibirny**, Department of Molecular Genetics and Biotechnology, Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, Drahomanov Street, 14/16, Lviv 79005 Ukraine, E-mail: sibirny@cellbiol.lviv.ua

Kostyantyn V. Dmytruk, Barbara V. Kshanovska, Department of Molecular Genetics and Biotechnology, Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, Drahomanov Street, 14/16, Lviv 79005 Ukraine

Charles A. Abbas, ADM Research, 1001 N. Brush College Rd., Decatur, IL 62521-1656 USA

Andriy Sibirny, Department of Biotechnology and Microbiology, University of Rzeszow, Zelwerowicza 4, Rzeszow 35-601, Poland

CSLは、グルコニン生成酵素のいくつかを制御解除することで、酵母のATP加水分解無益サイクルを導入した[9]。ATPaseの過剰発現[10]や、ATPを加水分解するアルカリホスファターゼPho8の過剰発現[11]によっても、エタノール生産にプラスの効果が得られた。

遺伝子工学的アプローチを用いて酵母の代謝をエタノール生産量の増加に向かわせることは比較的容易であるが、主にワイン酵母のエタノール生産に遺伝子組換え株を用いることは、飲料用アルコールへの遺伝子組換え生物 (GMO) の使用に対する消費者の抵抗感から、世界の多くの地域では受け入れられていない[12]。このため、新たな改良株の開発には、伝統的選抜と適応進化からなる非遺伝子組み換えアプローチを用いなければならない[13]。伝統的な選抜と適応進化では、対象となる形質をもたらす突然変異体が集団内で増殖するのに有利な選択圧を与える培養条件を適用する。このように、細胞集団を特定の選択的環境で培養することで、望ましい表現型への適応が蓄積されることになる [13, 14, 15]。嫌氣的にキシロースを利用する酵母株[16]、マルトース利用能と浸透耐性を向上させた酵母[17]、エタノール耐性を向上させた酵母[18]、酢酸の生成を抑えて発酵速度を向上させた酵母[19]の選抜に、このアプローチが有用であることを示す優れた例がいくつかある。

本研究では、エタノール生産が向上した表現型を持つ *S. cerevisiae* 菌株のポジティブセレクションのための新しい方法について述べる。そのために、Archer Daniels Midland Company (米国イリノイ州ディケーター) でバイオエタノール生産に使用されている工業用 *S. cerevisiae* AS400 株を用いた。オキシチアミン、トレハロース、3-プロモピルビン酸、グリオキシル酸、グルコサミンは、アルコール発酵とストレス応答に関する酵素に対する阻害効果を考慮して選択した。

2 Methods

菌株、培地、増殖および発酵条件

S. cerevisiae AS400 株 (Archer Daniels Midland (ADM) Company, Decatur, IL, USA より入手) を改良株選抜のための親株として用いた。本研究で使用したすべての化学物質は、特に断りのない限り、米国Sigma社から入手した。

S. cerevisiae 株は30°Cで定常培養した。酵母株は、豊富なYPD (1%酵母エキス、1%ペプトン、2%グルコース) またはミネラルYNB (0.67%、アミノ酸を含まない酵母窒素ベース、(Difco, USA)、0.5%硫酸アンモニウム、2%グルコース) 培地で維持した。*S. セレビシエ*細胞をYPD中で一晚培養し、 H_2O で2回洗浄した。エタノール過剰生産変異体の選択には、AS400の細胞懸濁液 (10^6 、 1.7×10^6 、 3.3×10^6 cells per plate $d = 90$ mm) を、選択剤であるオキシチアミン (118 mM)、トレハロース (1.31 M)、3-プロモピルビン酸 (2.75 mM)、グリオキシル酸 (4 mM)、またはグルコサミン (2.75 mM) の毒性濃度を添加したYNB固体培地にプレーティングし、選択剤に応じて7-14日間培養した。薬剤の最小毒性濃度は、YNBグルコース (2%) 固形培地中で、1プレートあたり 3.3×10^6 細胞をプレーティングした後、AS400株の増殖を完全に阻害する試薬量と定義した。選択剤に耐性のある単一の酵母コロニーをピックアップし、対応する濃度の試薬を含む新鮮なYNBプレートに再度播種し、発酵実験に使用した。選択された変異株は安定で、選択剤に対する耐性を維持していた。また、選択された菌株は、-80°Cで6ヶ月間保存した後でも、エタノールの生産量が増加し、安定であることがわかった。変異株には、使用した異なる選択剤に対する交差耐性は認められなかった。コーンステーパーリカー (CSL) はトウモロコシ湿式粉碎の副産物であり、いくつかの異なる発酵において効果的な低コスト発酵栄養補助食品として使用されてきた[20]。CSL は、ADM 社の蒸留所およびフエタノール工場における工業的アルコール発酵プロセスで定常的に使用される加水分解トウモロコシ粕を補うために使用された。

CSL 培地は、前述の方法で調製した 2 種類の溶液を組み合わせで調製した。溶液1は、200gのコーンミール (Melvit、ポーランド) を800mlの脱イオン水と混合し、NaOHを用いてpHを6.0に調整して調製した。酵素 α -アミラーゼ (Liquizyme SC) をミール1g当たり0.1単位の割合で添加し、混合物を80°Cに30分間加熱してスラリーを液化した。溶液2を調製するため、乾燥固形分~50%を含むCSL濃縮物 (ADM社提供) 63mlを脱イオン水137mlと混合した。CSLの組成は他の文献[21]に記載されている。使用前に、2つの溶液をオートクレーブ滅菌し、冷却した後、合わせて混合した。酵素グルコアミラーゼ (Liquizyme SC) を無菌フラスコに、ミール1グラムあたり0.2ユニットの割合で添加し、フラスコを28°Cでインキュベートした。グルコース濃度は、酵母を接種していない対照フラスコで 200 g l^{-1} の CSL 培地で測定した。

the introduction of ATP-hydrolyzing futile cycles in yeast through the deregulation of some of the gluconeogenic enzymes [9]. Positive effect on ethanol production was also accomplished by the overexpression of ATPase [10] or the alkaline phosphatase Pho8 which can also hydrolyze ATP [11].

Though redirecting yeast metabolism towards increasing ethanol production using genetic engineering approaches is relatively easy to achieve, the usage of genetically modified strains for ethanol production, mainly in wine yeast, is not accepted in many parts of the world due to consumer's resistance to the use of genetically modified organisms (GMO) for beverage alcohol [12]. For this reason, the use of non-GMO approaches, which consist of traditional selection and adaptive evolution, must be relied on developing new improved strains [13]. Traditional selection and adaptive evolution involve applying culture conditions that provide a selection pressure favoring the growth of mutants within a population that confer the trait of interest. Thus, the culturing of cell populations in a specific selective environment, will direct the accumulation of adaptation towards a desired phenotype [13, 14, 15]. There are several excellent examples that illustrate the usefulness of this approach to the selection of anaerobically xylose utilizing yeast strains [16], yeast with enhanced maltose utilization and osmotolerance [17], yeast with enhanced ethanol tolerance [18] and yeast with improved fermentation rate with decreased formation of acetate [19].

In the present study, we describe new methods for positive selection of *S. cerevisiae* strains with enhanced ethanol production phenotypes. To achieve this, we used the industrial *S. cerevisiae* AS400 strain which is used for bioethanol production at Archer Daniels Midland Company (Decatur, IL, USA). The selective agents oxythiamine, trehalose, 3-bromopyruvate, glyoxylic acid and glucosamine, were used in this work and chosen for their inhibitory effect on the enzymes involved in alcoholic fermentation and stress response.

2 Methods

2.1 Strains, media, growth and fermentation conditions

The *S. cerevisiae* strain AS400 (obtained from Archer Daniels Midland (ADM) Company, Decatur, IL, USA) was used as the parental strain for the selection of improved strains. All chemicals used through the work were obtained from Sigma, USA, unless otherwise noted.

S. cerevisiae strains were routinely cultured at 30°C. Yeast strains were maintained in rich YPD (1% yeast extract, 1% peptone and 2% glucose) or mineral YNB (0.67%, yeast nitrogen base without amino acids, (Difco, USA), 0.5% ammonium sulfate, 2% glucose) media. *S. cerevisiae* cells were grown overnight in YPD and washed twice with H₂O. For selection of ethanol overproducing mutants, a cell suspension of AS400 (10⁶, 1.7 x 10⁶ and 3.3 x 10⁶ cells per plate $d = 90$ mm) was plated on YNB solid medium supplemented with toxic concentrations of the selective agents, oxythiamine (118 mM), trehalose (1.31 M), 3-bromopyruvate (2.75 mM), glyoxylic acid (4 mM) or glucosamine (2.75 mM) and incubated for 7-14 days depending on selective agents. The minimal toxic concentrations of agents were defined as the amount of reagent in YNB glucose (2%) solid medium that totally inhibited growth of AS400 strain after plating 3.3 x 10⁶ cells per plate. Single yeast colonies resistant to the selective agents were picked up, re-streaked on fresh YNB plates containing corresponding concentrations of reagent and used in fermentation experiments. The selected mutants were stable, maintaining resistance to the selective agents. Selected strains were also found to be stable in respect of their ability to produce increased amount of ethanol after 6 months of storage at -80 °C. No cross-resistance to the different selection agents used was found in the mutants.

Corn steep liquor (CSL) is a by-product of corn wet-milling and has been used as effective low-cost fermentation nutrient supplement in several different fermentations [20]. CSL was used to supplement hydrolyzed corn meal as routinely used in industrial alcoholic fermentation processes in distillery and fuel-ethanol plants at ADM.

The CSL medium was prepared by combining two solutions that were prepared as described. Solution 1 was prepared by adding 200 g of corn meal (Melvit, Poland) mixed with 800 ml of deionized water and pH adjusted to 6.0 using NaOH. The enzyme alpha-amylase (Liquizyme SC) was added at a rate of 0.1 units of per gram of meal, and the slurry was liquified by heating the mixture to 80°C for 30 minutes. To prepare Solution 2, 63 ml of the CSL concentrate (provided by ADM Company) containing ~50% dry solids was mixed with 137 ml of deionized water. The composition of CSL was described elsewhere [21]. Prior to use, the two solutions were autoclaved, cooled, and then combined and mixed. The enzyme glucoamylase (Liquizyme SC) was added at a rate of 0.2 units of glucoamylase per gram of meal to sterile flasks, and the flasks were incubated at 28°C. Glucose concentration was measured in the control flasks without yeast inoculation at 200 g l⁻¹ in the CSL medium prepared.

エタノール発酵では、全菌株が20%グルコースを添加したYNB培地、または加水分解コーン粕を添加したコーンCSL培地を主要炭素源として試験された。

アルコール発酵では、AS400 株とその誘導体の細胞を 300 ml 三角フラスコ中の 100 ml の YPD 培地で一晩培養した後、50 ml 三角フラスコ中の 200 g l⁻¹ グルコース添加ミネラル YNB 培地または加水分解ミール添加 CSL 培地 20 ml に接種した。YNB 培地での発酵には、8 g (乾燥重量) l⁻¹ の初期バイオマス濃度を用いた。CSL 培地では、初期バイオマス濃度 10 g (乾燥重量) l⁻¹ を用いた (これは工業的エタノール発酵で通常使用される細胞密度である) [22]。発酵は、温度34°Cで、ジャイレトリシェーカーを用い、120回転/分⁻¹の設定で、限定通気で行った。YNB培地では3時間ごと、CSL培地では12時間ごとに サンプルを採取した。発酵実験は、結果の再現性を保証するため、少なくとも3連で行った。

2.2 Assays

発酵培地中のエタノール濃度は、アルコールオキシダーゼ/ペルオキシダーゼベースの酵素キット「アルコテスト」[23, 24]を用いて測定した。バイオマスは、Helios Gamma 分光光度計 (OD, 600 nm; キュベット, 10 mm) を用い、重量校正を行い、濁度を用いて測定した。グルコース濃度は、「Diagluco」アッセイキット (UBT, Lviv) を用いて測定した[23]。すべてのサンプルは二重測定した。

3 結果と考察

オキシチアミンはチアミン拮抗物質であり、ピロリン酸オキシチアミンに変換された後、チアミン依存性酵素の活性中心に結合する。オキシチアミンで処理した *S. cerevisiae* 細胞は、12時間培養後にトランスケトララーゼとピルビン酸脱炭酸酵素の比活性が高くなることが示された[25]。トランスケトララーゼはペントースリン酸経路の重要な酵素で、解糖の代謝中間体 (グリセルアルデヒド-3-リン酸とフルクトース-6-リン酸) と高分子合成の基質 (NADPH、リボースリン酸) を供給する。ピルビン酸脱炭酸酵素は、ピルビン酸からエタノールへの炭素フラックスを導く重要な酵素である。従って、オキシチアミンに耐性を持つ酵母株は、ピルビン酸からアセトアルデヒドへの変換が増加し、その結果エタノールの生産が増加することが示唆された。

我々は、有毒濃度のオキシチアミン (118 mM) を添加した選択培地上で、AS400の誘導体である数株を選択することができた。これらの菌株のうち、AS400567株はYNB培地での発酵中にエタノール合成が増加することが示された。AS400567 株は、発酵中に親株である AS400 株の 80.3 g l⁻¹ に対し、85.2 g l⁻¹ のエタノールを生産し、親株の AS400 株に比べ、6%多くエタノールを蓄積した (表 1、図 1.A, B)。発酵中のバイオマス蓄積量とグルコース消費量が同程度であったため、AS400-567 株のエタノール生産性 (4.73 g l⁻¹ h⁻¹)、比エタノール生産性 (1.97 g⁻¹ バイオマス h⁻¹)、エタノール収量 (消費グルコース g⁻¹ エタノール g⁻¹ 0.426 g) も AS400 と比較して 6%増加した。CSL 培地でのアルコール発酵では、AS400-567 株のエタノール生産量が 7%増加し、総エタノール生産量は 90.5 g l⁻¹ であった (AS400 株のエタノール生産量は 84.6 g l⁻¹ であった) (表 1)。また、AS400-567 株は親株と同様にグルコースを完全に消費したため、エタノール収量は 7%増加した (表 1)。CSL 培地には多くの不溶性粒子が含まれており、直接乾燥重量や光学密度分析による細胞バイオマスの測定に支障をきたすため、本菌株および他の菌株のバイオマスあたりのエタノール合成生産性の測定は行わなかった。

アルコール発酵中、酵母細胞は生存能と発酵効率に影響を与えうるストレスにさらされる。*S. cerevisiae* では、トレハロースが主要なストレス保護物質の1つとして機能し、トレハロースの合成が転写レベルでいくつかの文書化されたストレス条件によって誘導されることがよく知られている[26]。トレハロース-6-リン酸合成酵素はトレハロース合成に関与する主要な酵素であり、高濃度のトレハロースによって阻害されることが知られている [27]。高濃度のトレハロースに耐性を示す酵母変異体は、この二糖の細胞内濃度が上昇し、その結果トレハロースがエタノール生産に有益に作用している可能性がある。AS400株は、有毒濃度のトレハロース (1.31M) を含む培地で選抜を行った。14日間の培養後、いくつかのトレハロース耐性株が選択された。トレハロース耐性株 AS400-543 は、YNB 培地で発酵させた場合、親株と比較してエタノール生産量 (84.3 g l⁻¹)、エタノール生産性 (4.68 g l⁻¹ h⁻¹)、エタノール収率 (消費グルコース量 0.422 g⁻¹) が 5%増加した (表 1、図 1.C)。しかし、本菌株の比エタノール生産性は 48% 増加し、比増殖率の 1.6 倍の低下から計算すると 2.75 g⁻¹ バイオマス h⁻¹ に達した (表 1、図 1.C)。

For ethanol fermentation, all strains were tested using YNB medium that was supplemented with 20% glucose or by using a medium containing corn CSL supplemented with hydrolyzed corn meal as the primary carbon source.

For alcoholic fermentation, cells of AS400 strain and its derivatives were grown overnight in 100 ml of YPD medium in 300 ml Erlenmeyer flasks and then used to inoculate 20 ml aliquots of mineral YNB medium supplemented with 200 g l⁻¹ glucose or CSL medium supplemented with hydrolyzed meal in 50 ml Erlenmeyer flasks. An initial biomass concentration of 8 g (dry weight) l⁻¹ was used for fermentation in YNB medium. For CSL medium, an initial biomass concentration of 10 g (dry weight) l⁻¹ was used (this is the cell density normally used in industrial ethanol fermentation) [22]. Fermentation was carried out at a temperature of 34°C with limited aeration using a gyratory shaker at a setting of 120 rev. min⁻¹. Samples were taken every 3 hours for YNB medium or 12 hours for CSL medium. Fermentation experiments were performed in at least triplicate to ensure the results are reproducible.

2.2 Assays

The concentration of ethanol in fermentation media was determined using alcohol oxidase/peroxidase-based enzymatic kit “Alcotest” [23, 24]. The biomass was determined using turbidity with a Helios Gamma spectrophotometer (OD, 600 nm; cuvette, 10 mm) with gravimetric calibration. Glucose concentration was determined using the “Diagluco” assay kit (UBT, Lviv) [23]. All samples were assayed in duplicate.

3 Results and discussion

Oxythiamine is a thiamine antagonist, that after conversion to oxythiamine pyrophosphate binds to the active centers of thiamine-dependent enzymes. It was shown that *S. cerevisiae* cells treated by oxythiamine possessed higher specific activity of transketolase and pyruvate decarboxylase after 12 h of cultivation [25]. Transketolase is a crucial enzyme of the pentose phosphate pathway, providing metabolic intermediate (glyceraldehyde-3-phosphate and fructose-6-phosphate) for glycolysis and the substrates (NADPH, ribose-phosphate) for macromolecule synthesis. Pyruvate decarboxylase in turn is the key enzyme directing carbon flux from pyruvate to ethanol. Therefore, it was suggested that yeast strains resistant to oxythiamine will

possess increased pyruvate to acetaldehyde conversion that result in increased production of ethanol. We were able to select several strains, derivative of AS400 on the selective media supplemented with toxic concentration of oxythiamine (118 mM). Among these strains, AS400-567 was demonstrated to have an increase in ethanol synthesis during fermentation on YNB medium. This strain accumulated 6% more ethanol relative to the parental strain AS400 during fermentation producing 85.2 g l⁻¹ of ethanol versus 80.3 g l⁻¹ for AS400 (Table 1, Fig. 1. A, B). Due to similar biomass accumulation and complete glucose consumption during fermentation, ethanol productivity (4.73 g l⁻¹ h⁻¹), specific ethanol productivity (1.97 g g⁻¹ biomass h⁻¹) and ethanol yield (0.426 g of ethanol g⁻¹ of consumed glucose) for strain AS400-567 were also increased for 6% as compared to AS400. Alcoholic fermentation in CSL medium demonstrated a 7% increase in ethanol production for strain AS400-567 for a total ethanol production of 90.5 g l⁻¹, as compared to strain AS400 which produced 84.6 g l⁻¹ of ethanol (Table 1). Ethanol yield for strain AS400-567 was also increased on 7% since this and parental strains consumed glucose completely (Table 1). Measurement of the productivity of ethanol synthesis per biomass for this and other strains was not carried out in CSL medium as it contains many insoluble particles that interfered with cell biomass measurement using direct dry weight or by optical density analyses.

During the alcoholic fermentation, yeast cells are subjected to stress that could affect their viability and fermentation efficiency. It is well known that trehalose functions as one of the major stress protectants and that the synthesis of trehalose is induced by several documented stress conditions at the transcriptional level in *S. cerevisiae* [26]. Trehalose-6-phosphate synthase is the key enzyme involved in trehalose synthesis and is known to be inhibited by high concentrations of trehalose [27]. Yeast mutants resistant to increased concentrations of trehalose may have elevated intracellular concentration of this disaccharide with subsequent beneficial effect of trehalose on ethanol production. Strain AS400 was subjected to a selection on the medium containing toxic concentration of trehalose (1.31 M). Several trehalose resistant strains were selected after 14 days of incubation. The trehalose resistant strain AS400-543 had a 5% increase in ethanol production (84.3 g l⁻¹), ethanol productivity (4.68 g l⁻¹ h⁻¹) and an ethanol yield (0.422 g g⁻¹ of consumed glucose) as compared to the parental strain during fermentation on YNB medium (Table 1, Fig. 1. C). However, specific ethanol productivity of this strain was increased by 48%, reaching 2.75 g g⁻¹ biomass h⁻¹ as calculated from a

表1: オキシチアミン、トレハロース、プロモピルビン酸、グリオキシル酸、グルコサミン、および初期株AS400に耐性を持つ *S. cerevisiae* 変異体の、グルコース20%添加YNB培地および加水分解ミールを括弧内に示した CSL 培地でのアルコール発酵中の増殖速度、エタノール生産量、生産性、比生産性および収量。

Strain	Selective agent	Specific growth rate, $g\ l^{-1}h^{-1}$	Ethanol $g\ l^{-1}$	エタノール生産性 $g\ l^{-1}h^{-1}$	比エタノール生産性 $g\ g^{-1}biomass\ h^{-1}$	消費グルコースのエタノール収量 $g\ g^{-1}$
AS400	-	0.133±0.003	80.3±1.5 (84.6±1.0)	4.46±0.08 (3.53±0.03)	1.86±0.03	0.402±0.007 (0.423±0.005)
AS400-567	oxythiamine	0.133±0.004	85.2±1.6 (90.5±0.9)	4.73±0.09 (3.77±0.04)	1.97±0.04	0.426±0.008 (0.453±0.004)
AS400-543	trehalose	0.083±0.002	84.3±1.6 (88.8±0.9)	4.68±0.09 (3.70±0.03)	2.75±0.06	0.422±0.008 (0.444±0.005)
AS400-617	bromopyruvate	0.133±0.003	84.1±1.5 (89.7±1.0)	4.67±0.09 (3.74±0.03)	1.95±0.03	0.421±0.007 (0.449±0.005)
AS400-510	glyoxylic acid	0.133±0.004	85.1±1.6 (91.4±0.9)	4.73±0.09 (3.81±0.03)	1.97±0.04	0.426±0.007 (0.457±0.005)
AS400-128	glucosamine	0.117±0.003	84.6±1.7 (89.6±0.9)	4.70±0.09 (3.73±0.04)	2.24±0.04	0.423±0.008 (0.448±0.005)
AS400-510-42	glyoxylic acid, glucosamine	0.133±0.004	86.7±1.7 (93.0±0.9)	4.82±0.09 (3.88±0.03)	2.01±0.04	0.434±0.008 (0.465±0.004)
AS400-510-42-214	glyoxylic acid, glucosamine, bromopyruvate	0.117±0.003	88.4±1.5 (94.8±1.0)	4.91±0.08 (3.95±0.04)	2.34±0.04	0.442±0.008 (0.474±0.005)

(±) - absolute error

このトレハロース耐性株では、工業用 CSL 培地での発酵中に、エタノール生産量とエタノール収量の同様の増加が観察された。AS400-543株は合計88.8 $g\ l^{-1}$ のエタノールを合成したが、AS400株は合計84.6 $g\ l^{-1}$ のエタノールを生産した（表1）。エタノール収量は消費グルコースに対して 0.444 g^{-1} に達し、親株と比較して 5%増加した（表 1）。

プロモピルビン酸（3-プロモピルビン酸）化合物は、ヘキソキナーゼの効率的な阻害剤であることが知られており、細胞内のATPの深刻な枯渇を引き起こすことが示されている[28, 29]。これにより解糖が阻害される。プロモピルビン酸に耐性を持つ酵母変異体は、合成されるエタノールの量が増加し、解糖が増加する可能性がある。AS400-617株を、この選択剤の毒性濃度（2.75 mM）を添加した培地で選抜した。このプロモピルビン酸耐性株は、AS400株と比較して、YNB培地での発酵中のエタノール生産量（84.1 $g\ l^{-1}$ ）、生産性（1.95 g^{-1} バイオマス h^{-1} ）、およびエタノール収量（消費グルコース g^{-1} エタノール0.421 g）が最大5%増加するという特徴を示した（表1、図1.D）。AS400617 株は、CSL 培地において、初期株 AS400 と比較してエタノール蓄積量が最大 6%増加し、合計 89.7 $g\ l^{-1}$ のエタノールを合成した（表 1）。エタノール収量も6%増加し、消費グルコースの0.421 g^{-1} に達した（表1）。

我々は、耐熱性酵母 *Hansenula polymorpha* において、プロモピルビン酸がキシロースからエタノールを過剰生産する変異体を選択するための非常に効率的な薬剤として、同様の効果を報告した[30]。

グリオキシル酸は、エタノール合成の鍵となる酵素であるピルビン酸デカルボキシラーゼ活性の不可逆的阻害剤として知られている [31]。そこで、4mMのグリオキシル酸を含むYNB培地を用いて、エタノール過剰生産株の選抜を行った。AS400株を5~8日間プレート培養した後、いくつかの耐性コロニーを得、グルコースからのエタノール生産を試験した。単離されたAS400-510株は、YNB培地でのアルコール発酵において、総エタノール生産量（85.1 $g\ l^{-1}$ ）が6%上昇し、生産性（1.97 g^{-1} バイオマス h^{-1} ）およびエタノール収量（消費グルコース0.426 g^{-1} ）が増加した（表1、図1.E）。CSL培地での発酵では、合計 91.4 $g\ l^{-1}$ のエタノールが生産され、エタノール収量（消費グルコースの 0.457 g^{-1} ）はAS400より8%増加した（表1）。

グルコサミン（2-デオキシ-2-アミノグルコース）はグルコースの構造類似体である。2位に水酸基がないため、この化合物は解糖酵素ホスホグルコイソメラーゼによってケトヘキソース（フルクトースの類似体）に異性化されない[32]。このため、この段階での解糖が阻害される。グルコサミン耐性変異体は、グルコースの取り込みが欠損している可能性がある、

Table 1: Growth rate, ethanol production, productivity, specific productivity and yield of *S. cerevisiae* mutants resistant to oxythiamine, trehalose, bromopyruvate, glyoxylic acid, glucosamine and initial strain AS400 during alcoholic fermentation of on YNB medium supplemented with 20% glucose and CSL medium with hydrolyzed meal indicated in brackets.

Strain	Selective agent	Specific growth rate, $\text{g l}^{-1}\text{h}^{-1}$	Ethanol g l^{-1}	Ethanol productivity $\text{g l}^{-1}\text{h}^{-1}$	Specific ethanol productivity $\text{g g}^{-1}\text{biomass h}^{-1}$	Ethanol yield g g^{-1} of consumed glucose
AS400	-	0.133±0.003	80.3±1.5 (84.6±1.0)	4.46±0.08 (3.53±0.03)	1.86±0.03	0.402±0.007 (0.423±0.005)
AS400-567	oxythiamine	0.133±0.004	85.2±1.6 (90.5±0.9)	4.73±0.09 (3.77±0.04)	1.97±0.04	0.426±0.008 (0.453±0.004)
AS400-543	trehalose	0.083±0.002	84.3±1.6 (88.8±0.9)	4.68±0.09 (3.70±0.03)	2.75±0.06	0.422±0.008 (0.444±0.005)
AS400-617	bromopyruvate	0.133±0.003	84.1±1.5 (89.7±1.0)	4.67±0.09 (3.74±0.03)	1.95±0.03	0.421±0.007 (0.449±0.005)
AS400-510	glyoxylic acid	0.133±0.004	85.1±1.6 (91.4±0.9)	4.73±0.09 (3.81±0.03)	1.97±0.04	0.426±0.007 (0.457±0.005)
AS400-128	glucosamine	0.117±0.003	84.6±1.7 (89.6±0.9)	4.70±0.09 (3.73±0.04)	2.24±0.04	0.423±0.008 (0.448±0.005)
AS400-510-42	glyoxylic acid, glucosamine	0.133±0.004	86.7±1.7 (93.0±0.9)	4.82±0.09 (3.88±0.03)	2.01±0.04	0.434±0.008 (0.465±0.004)
AS400-510-42-214	glyoxylic acid, glucosamine, bromopyruvate	0.117±0.003	88.4±1.5 (94.8±1.0)	4.91±0.08 (3.95±0.04)	2.34±0.04	0.442±0.008 (0.474±0.005)

(±) - absolute error

1.6 fold decrease in specific growth rate (Table 1, Fig. 1. C). Similar increase in ethanol production and ethanol yield was observed for this trehalose resistant strain during fermentation on industrial CSL medium. Strain AS400-543 synthesized a total of 88.8 g l⁻¹ of ethanol, whereas strain AS400 produced a total of 84.6 g l⁻¹ of ethanol (Table 1). Ethanol yield reached 0.444 g g⁻¹ of consumed glucose providing 5% increase as compared to the parental strain (Table 1).

The bromopyruvate (3-bromopyruvic acid) compound is known to be an efficient inhibitor of hexokinase and has been shown to cause severe depletion of cellular ATP [28, 29]. This leads to disruption of glycolysis. Yeast mutants resistant to bromopyruvate may have an increase in glycolysis with elevated amount of synthesized ethanol. The strain AS400-617 was selected on a medium supplemented with toxic concentration of this selective agent (2.75 mM). The bromopyruvate resistant strain was characterized by up to 5% increase of ethanol production (84.1 g l⁻¹), a productivity (1.95 g g⁻¹ biomass h⁻¹) and an ethanol yield (0.421 g of ethanol g⁻¹ of consumed glucose) during fermentation on YNB medium when compared to the strain AS400 (Table 1, Fig. 1. D). Strain AS400-617 synthesized a total of 89.7 g l⁻¹ ethanol with up to 6% increase in ethanol accumulation when compared to initial strain AS400 in CSL medium (Table 1). Ethanol yield was also increased by 6% reaching 0.421 g g⁻¹ of the

consumed glucose (Table 1). We reported similar effects of bromopyruvate as a very efficient agent for the selection of ethanol overproducing mutants from xylose in the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* [30].

Glyoxylic acid is a known irreversible inhibitor of pyruvate decarboxylase activity [31], the key enzyme in ethanol synthesis. Therefore, selection of ethanol overproducers was carried out using a YNB medium containing 4 mM glyoxylic acid. Several resistant colonies were obtained from AS400 after 5-8 days of plate incubation and subjected to testing for ethanol production from glucose. The isolated strain AS400-510 had a 6% elevation of total ethanol production (85.1 g l⁻¹), a productivity (1.97 g g⁻¹ biomass h⁻¹) and an increase in ethanol yield (0.426 g g⁻¹ of consumed glucose) during alcoholic fermentation in YNB medium (Table 1, Fig. 1. E). During fermentation on CSL medium, a total of 91.4 g l⁻¹ of ethanol was produced with an ethanol yield (0.457 g g⁻¹ of consumed glucose) for an 8% increase in ethanol production and yield over AS400 (Table 1).

Glucosamine (2-deoxy-2-aminoglucose) is a structural analog of glucose. Due to the absence of hydroxyl at the second position, this compound cannot be isomerized to the ketohexose (analog of fructose) by the glycolytic enzyme phosphoglucosomerase [32]. This leads to disruption of the glycolysis at this step. The glucosamine resistant mutants can be defective in glucose uptake,

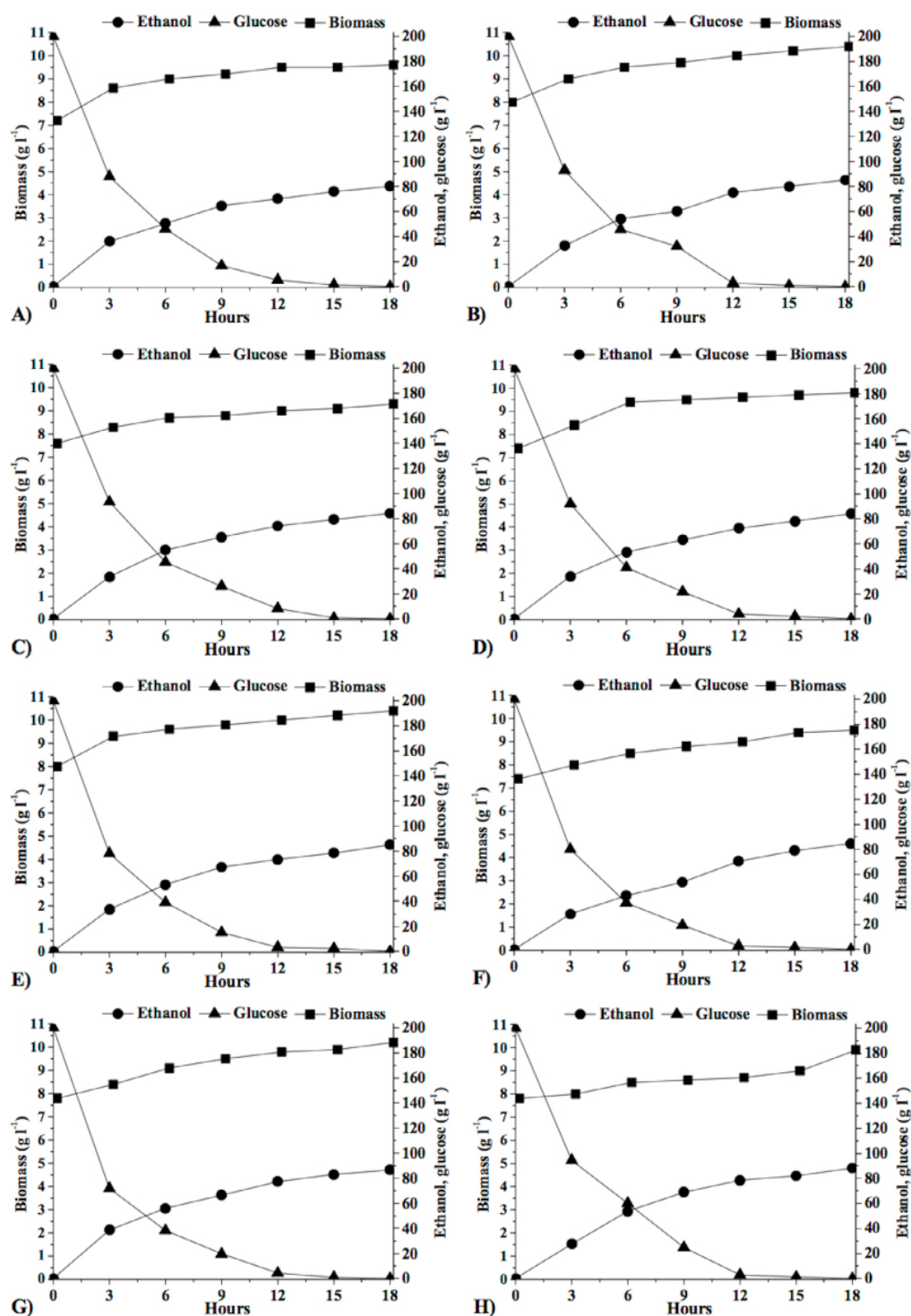


図1: 変異株とAS400初期株のアルコール発酵中の成長、グルコース消費量、エタノール生産量。株は200 g l⁻¹ D-グルコースを添加したYNB培地で半好気条件下で培養した。A AS400株、B AS400-567株、C AS400-543株、D AS400-617株、E AS400-510株、F AS400-128株、G AS400-510-42株、H AS400-510-42-214株を34℃、120rpmで振とう培養した。四角、三角、丸はそれぞれ、バイオマス蓄積量 (g of biomass l⁻¹ of medium)、グルコース消費量 (g of glucose l⁻¹ of medium)、エタノール生産量 (g of ethanol l⁻¹ of medium) に対応する。

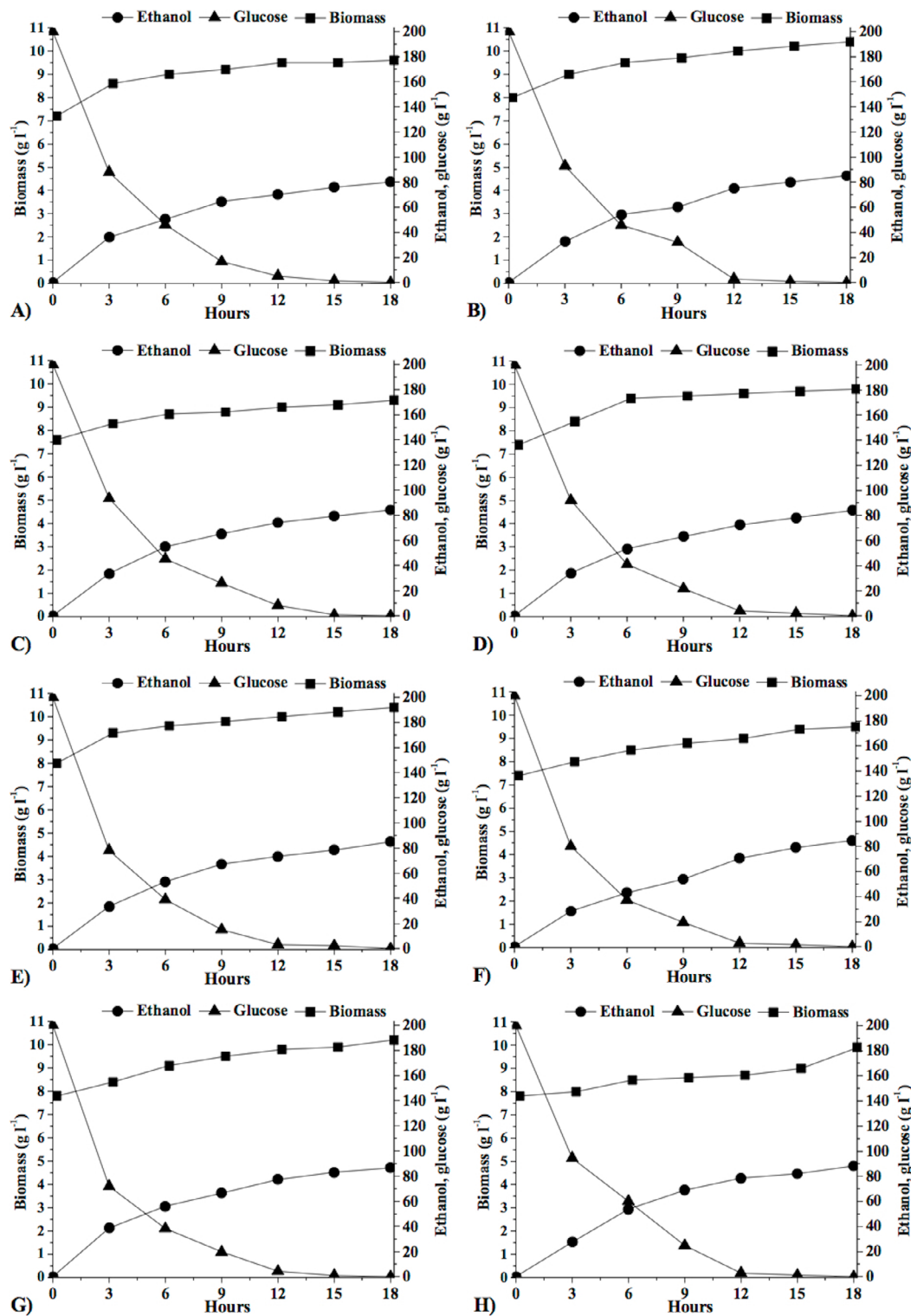


Figure 1: Growth, glucose consumption and ethanol production during alcoholic fermentation of mutants and initial AS400 strains. Strains were cultured under semianaerobic conditions in YNB medium with 200 g l⁻¹ D-glucose. Cultures A - AS400, B - AS400-567, C - AS400-543, D - AS400-617, E - AS400-510, F - AS400-128, G - AS400-510-42, H - AS400-510-42-214 were incubated at 34°C, shaking at 120 rpm using. The squares, triangles and circles correspond to biomass accumulation (g of biomass l⁻¹ of medium), glucose consumption (g of glucose l⁻¹ of medium) and ethanol production (g of ethanol l⁻¹ of medium), respectively.

しかし、グルコースを唯一の炭素源とする選抜では、この可能性は非常に低い。他の説明としては、PGIIのみ、あるいは大部分の解糖系酵素の制御に関するレギュロン全体の抑制解除が考えられる。最後の事象は、解糖経路を通るグルコースフラックスの増加をもたらすであろう。グルコサミンは、*S. cerevisiae*のエタノール過剰生産者のポジティブセレクションのための選択剤として使用された。この選択剤の毒性濃度は2 mMであった。グリオキシル酸耐性変異株として単離されたAS400株とその誘導体AS400-510株をグルコサミンを含む培地で選抜した。2mMのグルコサミンを含むYNB培地での選抜の結果、14日間の培養でいくつかの耐性変異体が単離された。選抜された変異体について、グルコースからのエタノール生産を試験した。AS400由来のグルコサミン耐性変異体 (AS400-128株) は、エタノール生産量が5%増加し (84.6 g l^{-1})、エタノール生産性が高く ($4.7 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$)、エタノール収量が増加した (0.423 g g^{-1} (消費グルコース))、比エタノール生産性 ($2.24 \text{ g g}^{-1} \text{ バイオマス h}^{-1}$) は、YNB培地での発酵中、比増殖速度 ($0.117 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) が親株に比べて12%低下したため、20%増加した (表1、図1.F)。CSL 発酵中の AS400-128 株の最高エタノール力価は 89.6 g l^{-1} であったが、初期株は 84.6 g l^{-1} のエタノールを合成し、エタノール生産量とエタノール収量が6%増加した (表1)。AS400-510から派生したAS400-510-42株は、YNB培地での発酵において、AS400株と比較してエタノール生産量 (86.7 g l^{-1})、比エタノール生産性 ($2.01 \text{ g l}^{-1} \text{ バイオマス h}^{-1}$)、エタノール収量 (0.434 g g^{-1} 消費グルコース) が8%増加した (表1、図1.G)。AS400-510-42株は 93.0 g l^{-1} のエタノールを合成したが、初期株AS400はCSL培地での発酵で 84.6 g l^{-1} のエタノールしか生産しなかった (表1)。従って、この菌株のエタノール生産量とエタノール収量の増加は10%に達した。次に、グリコキシル酸とオキシチアミンまたはトレハロースの交配選択を試みた。しかし、選択株はエタノール生産量の増加を示さなかった (データは示さず)。AS400-510-42株はグリオキシル酸とグルコサミン耐性変異株として二重交差選抜を行った結果、エタノール生産量が増加したことから、さらに選抜を行った。AS400-510-菌株

42 was used for the selection of bromopyruvate resistant derivatives. Several mutants were selected on the medium supplemented with 2.75 mM of bromopyruvate. Among them, strain AS400-510-42-214 which had a 10% increase in ethanol production (88.3 g l^{-1}), an ethanol productivity ($4.91 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) and an ethanol yield (0.442 g g^{-1} of consumed

グルコース)、比エタノール生産性 ($2.34 \text{ g l}^{-1} \text{ バイオマス h}^{-1}$) は、YNB培地での発酵中、比増殖速度 ($0.117 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) が12%減少した結果、26%増加した (表1、図1.H)。AS400-510-42-214株は、CSL培地で 94.8 g l^{-1} のエタノールを生産し、単離された変異体の中で最も高いエタノール合成量を示した。AS400-510-42-214株は、親株AS400株と比較して、エタノール生産量およびエタノール収量が12%増加した (表1)。

加水分解コーンミールを添加した工業用培地上で、エタノール生産量が増加した *S. cerevisiae* 株を選抜するための新しい簡便な陽性法を適用した結果、親株である工業用菌株と比較して、エタノール合成量が5%から8%増加した。エタノール合成とエタノール収量が5%増加したのは、毒性濃度のトレハロースで選抜した株で、プロモピルビン酸またはグルコサミン、オキシチアミン、グリオキシル酸で選抜した変異株は、エタノール生産と収量がそれぞれ6%、7%、8%増加した。グリオキシル酸とグルコサミン、またはグリオキシル酸とグルコサミンとプロモピルビン酸の組み合わせで2段階または3段階の選抜を行った株は、エタノール生産量と収量が親株に比べて10%または12%増加した。トレハロース、グルコサミン、またはグリオキシル酸、グルコサミン、プロモピルビン酸で1段階または3段階選抜した株は、比エタノール生産性が増加したが、これは発酵手順中のバイオマス蓄積が減少した結果である。本研究で選択された菌株は、グルコース消費速度が非常に類似していた。単離された変異株によるエタノール生産が増加した理由は不明である。観察されたエタノール蓄積の増加は、発酵副産物、例えばバイオマス、グリセロールまたは酢酸の蓄積の減少によって引き起こされることが示唆された。選択された変異体における変異遺伝子の同定は、今後の研究課題である。

各タイプの変異株について、30 株以上を選抜し、グルコースからのエタノール生産を評価した。適用した選択剤に耐性を示す単離された変異株の55~65%でエタノール合成の増加が認められた。エタノール収量は親株と比較して平均 5~6%増加した。エタノール生産過剰株の割合が比較的高いことから、我々のアプローチはエタノール生産過剰株のポジティブセレクションの新しい方法であると結論づけられる。

プロモピルビン酸を用いたエタノール生産過剰株のポジティブセレクション法は、最近発表された *H. polymorpha* のアルコール性キシロース発酵中のエタノール生産量増加株のセレクション研究[30]でも成功したことは注目に値する。

but this is very unlikely during the selection on glucose as the only carbon source. Other explanation for this could be the derepression of *PGI1* only or the entire regulon involved in regulation of the majority of glycolytic enzymes. The last event would result in an increase of glucose flux through glycolysis pathway. Glucosamine was used as selective agents for positive selection of *S. cerevisiae* ethanol overproducers. Toxic concentrations of this selective agent was found to be 2 mM. Strains AS400 and its derivative AS400-510 isolated as a glyoxylic acid resistant mutant were subjected for selection on a medium containing glucosamine. The selection on the YNB medium containing 2 mM of glucosamine resulted in the isolation of several resistant mutants after 14 days of incubation. The selected mutants were tested for ethanol production from glucose. The glucosamine resistant mutant derived from the AS400 (strain AS400-128) had an 5% increase in ethanol production (84.6 g l^{-1}), higher ethanol productivity ($4.7 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) and an increase in ethanol yield (0.423 g g^{-1} of consumed glucose), while the specific ethanol productivity ($2.24 \text{ g g}^{-1} \text{ biomass h}^{-1}$) was increased by 20% due to reduction of its specific growth rate ($0.117 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) by 12%, as compared to the parental strain, during fermentation on YNB medium (Table 1, Fig. 1. F). The highest ethanol titer for strain AS400-128 during CSL fermentation was 89.6 g l^{-1} , whereas the initial strain synthesized 84.6 g l^{-1} of ethanol, providing 6% increase of ethanol production and ethanol yield (Table 1). The strain AS400-510-42, that was derived from AS400-510, had an 8% increase in ethanol production (86.7 g l^{-1}), a specific ethanol productivity ($2.01 \text{ g g}^{-1} \text{ biomass h}^{-1}$) and ethanol yield (0.434 g g^{-1} of consumed glucose) as compared to the AS400 during fermentation on YNB medium (Table 1, Fig. 1. G). Strain AS400-510-42 synthesized 93.0 g l^{-1} of ethanol, while the initial strain AS400 produced only 84.6 g l^{-1} of ethanol during fermentation on CSL medium (Table 1). Thus, the increase of ethanol production and ethanol yield for this strain reached 10%. Next, we attempted to combine cross selection of glyoxylic acid and oxythiamine or trehalose. However, selected strains did not show any increase in ethanol production (data not shown). The increase of the ethanol production by strain AS400-510-42 obtained as a result of double cross selection as a glyoxylic acid and glucosamine resistant mutant encouraged us to perform an additional round of the selection. Strain AS400-510-42 was used for the selection of bromopyruvate resistant derivatives. Several mutants were selected on the medium supplemented with 2.75 mM of bromopyruvate. Among them, strain AS400-510-42-214 which had a 10% increase in ethanol production (88.3 g l^{-1}), an ethanol productivity ($4.91 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) and an ethanol yield (0.442 g g^{-1} of consumed

glucose), while the specific ethanol productivity ($2.34 \text{ g g}^{-1} \text{ biomass h}^{-1}$) was increased by 26% as a result of reduction of the specific growth rate ($0.117 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) on 12%, during fermentation on YNB medium (Table 1, Fig. 1. H). Strain AS400-510-42-214 had the highest amount of synthesized ethanol among all isolated mutants reaching a total of 94.8 g l^{-1} of ethanol production on CSL medium. Strain AS400-510-42-214 showed a 12% increase in ethanol production and ethanol yield when compared to the parental strain AS400 (Table 1).

Applying the new simple positive methods for selection of *S. cerevisiae* strains with increased ethanol production on industrial medium supplemented with hydrolyzed corn meal, we were able to demonstrate an increase in ethanol synthesis from 5 to 8% when compared to the parental industrial strain. The 5% increase in ethanol synthesis and ethanol yield was reached for strain selected on toxic concentration of trehalose, while mutants selected on bromopyruvate or glucosamine, oxythiamine and glyoxylic acid possessed 6%, 7% and 8% increase in ethanol production and yield, respectively. The combination of glyoxylic acid and glucosamine or glyoxylic acid, glucosamine and bromopyruvate for two- or three-steps selection schemes led to 10 or 12% increase of ethanol production and yield as compared to the parental strain. Strains selected on trehalose, glucosamine or glyoxylic acid, glucosamine and bromopyruvate for one- or three-steps selection had an increase of specific ethanol productivity, which is a result of the decrease of biomass accumulation during fermentation procedure. Selected strains described in this work possessed very similar kinetics for glucose consumption. The reasons of the increased ethanol production by the isolated mutants remain unknown. We suggest that the observed increase in ethanol accumulation is caused by a decrease in accumulation of fermentation by-products, e.g. biomass, glycerol or acetate. The identification of the mutated genes in the selected mutants is the subject of our subsequent work.

For each type of mutants, more than 30 selected strains were selected and evaluated for the ethanol production from glucose. From 55 to 65% of isolated mutants resistant to the applied selective agents showed an increase in ethanol synthesis. On average, the ethanol yield in the analyzed strains was increased by 5-6% as compared to the parental strain. Relatively high percentage of ethanol overproducers lead us to conclude that our approaches represent new methods for positive selection of ethanol overproducers.

It is noteworthy that the method for positive selection of ethanol overproducers with bromopyruvate was

この研究では、*S. cerevisiae*を用いた現在の研究結果と比較して、*H. polymorpha*ではエタノール過剰生産変異体の割合が高く（70%以上）、エタノール収量への影響も大きい（約20%）ことが示された。これは、*S. cerevisiae*が理論上の最大収量に近い収量でグルコースを発酵させる能力を持つことで説明できる。得られた結果から、オキシチアミン、トレハロース、プロモピルビン酸、グリオキシル酸およびグルコサミンは、アルコール発酵の有効性を向上させた酵母菌株の選択に非常に有効な薬剤であることが示唆された。さらに、グリオキシル酸とグルコサミン、またはグリオキシル酸、グルコサミン、プロモピルビン酸の組み合わせは、2段階または3段階の選抜スキームで使用すると、1段階の選抜よりもエタノール生産量が増加する。単離された菌株は工業的なエタノール生産に利用できる。

謝辞 著者らは利益相反がないことを宣言する。本研究は、アーチャー・ダニエルズ・ミッドランド社（イリノイ州ディケーター）およびポーランド国立科学センター（NCN）DEC-2012/05/B/NZ1/01657の助成を受けた。原稿を批判的に読んでくれたPetro Starokadomskyy（University of Texas Southwestern Medical Center、米国）に感謝する。

利益相反：著者らは利害関係がないことを宣言する。発表データは、K.V. Dmytruk, B.V. Kshanovska, C.A. Abbas, A.A. Sibirnyにより、「New methods for the positive selection of ethanol overproducing mutants from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*」と題する特許出願CP.0174として出願された。

References

- [1] Dashko S., Zhou N., Compagno C., Piškur J., Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation?, *FEMS Yeast Res.*, 2004, 14(6), 826-832.
- [2] Piškur J., Langkjaer R.B., Yeast genome sequencing: the power of comparative genomics, *Mol. Microbiol.*, 2004, 53, 381-389.
- [3] Gombert A.K., van Maris A.J., Improving conversion yield of fermentable sugars into fuel ethanol in 1st generation yeast-based production processes, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2015, 7, 33C, 81-86.
- [4] Nissen T.L., Kielland-Brandt M.C., Nielsen J., Villadsen J., Optimization of ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of the ammonium assimilation, *Metab. Eng.*, 2000, 2, 69-77.
- [5] Bro C., Regenber B., Forster J., Nielsen J., *In silico* aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production, *Metab. Eng.* 2006, 8, 102-111.
- [6] Guo Z., Zhang L., Ding Z., Shi G., Minimization of glycerol synthesis in industrial ethanol yeast without influencing its fermentation performance, *Metab. Eng.*, 2011, 13, 49-59.
- [7] Zhang L., Tang Y., Guo Z., Ding Z., Shi G., Improving the ethanol yield by reducing glycerol formation using cofactor regulation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Lett.*, 2011, 33, 1375-1380.
- [8] de Kok S., Kozak B.U., Pronk J.T., Van Maris A., Energy coupling in *Saccharomyces cerevisiae*: selected opportunities for metabolic engineering, *FEMS Yeast Res.*, 2012, 12, 387-397.
- [9] Navas M.A., Cerdan S., Gancedo J.M., Futile cycles in *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing the gluconeogenic enzymes during growth on glucose, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1993, 90, 1290-1294.
- [10] Dmytruk K.V., Semkiv M.V., Sibirny A.A., Ethanol yield and reduction of biomass accumulation in the recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing ATPase, *WO/2010/151866*. 2010.
- [11] Semkiv M.V., Dmytruk K.V., Abbas C.A., Sibirny A.A., Increased ethanol accumulation from glucose via reduction of ATP level in a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing alkaline phosphatase, *BMC Biotechnol.*, 2014, 14, 42.
- [12] Grossmann M., Kiessling F., Singer J., Schoeman H., Schröder M.B., von Wallbrunn C., Genetically modified wine yeasts and risk assessment studies covering different steps within the wine making process, *Ann. Microbiol.*, 2011, 61, 103-115.
- [13] Chambers P.J., Bellon J.R., Schmidt S.A., Varela C., Pretorius I.S., Non-genetic engineering approaches to isolating and generating novel yeast for industrial applications, In: Kunze G., Satyanarayana T. (eds), *Yeast biotechnology: Diversity and applications*, Springer Science+Business Media, 433-457, 2009.
- [14] Cakar Z.P., Seker U.O., Tamerler C., Sonderegger M., Sauer U., Evolutionary engineering of multiple-stress resistant *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Res.*, 2005, 5, 569-578.
- [15] Zeyl C., The number of mutations selected during adaptation in a laboratory population of *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*, 2005, 169, 1825-1831.
- [16] Kuypers M., Toirkens M.J., Diderich J.A., Winkler A.A., van Dijken J.P., Pronk J.T., Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain, *FEMS Yeast Res.*, 2005, 5, 925-934.
- [17] Higgins V.J., Bell P.J.L., Dawes I.W., Attfield P.V., Generation of a novel *Saccharomyces cerevisiae* strain that exhibits strong maltose utilization and hyperosmotic resistance using nonrecombinant techniques, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67, 4346-4348.
- [18] Stanley D., Fraser S., Chambers P.J., Rogers P., Stanley G.A., Generation and characterisation of stable ethanol-tolerant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 2010, 37, 139-149.
- [19] Cadie A., Ortiz-Julien A., Camarasa C., Dequin S., Evolutionary engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains with increased in vivo flux through the pentose phosphate pathway, *Metab. Eng.*, 2011, 13, 263-271.
- [20] Lawford H.G., Rousseau J.D., Corn steep liquor as a cost-effective nutrition adjunct in high-performance

also successful in our recently published work [30] for selection of *H. polymorpha* strains with increased ethanol production during alcoholic xylose fermentation. In this work we provided higher percentage (over 70%) of ethanol overproducing mutants and demonstrated greater impact on ethanol yield (around 20%) in *H. polymorpha* as compared to results represented in current studies with *S. cerevisiae*. This can be explained by the ability of *S. cerevisiae* to ferment glucose with a yield closed to theoretical maximum. Obtained results allow us to propose that oxythiamine, trehalose, bromopyruvate, glyoxylic acid and glucosamine are quite efficient agents for the selection of yeast strains with improved efficacy of alcoholic fermentation. Moreover, the combination of glyoxylic acid and glucosamine or glyoxylic acid, glucosamine and bromopyruvate when used for two- or three-steps selection schemes, can result in an elevation of ethanol production over one-step selection. Isolated strains could be used for industrial ethanol production.

Acknowledgement: The authors declare no conflict of interest. This work was supported in part by Archer Daniels Midland Company (Decatur, IL) and Polish grant of National Scientific Center (NCN) DEC-2012/05/B/NZ1/01657 awarded to A. Sibirny. We are grateful to Petro Starokadomskyy (University of Texas Southwestern Medical Center, US) for critical reading of the manuscript.

Conflict of interest: The authors declare that they have no competing interest. Presented data were filed by K.V. Dmytruk, B.V. Kshanovska, C.A. Abbas, A.A. Sibirny as a Patent Application CP.0174 entitled "New methods for the positive selection of ethanol overproducing mutants from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*."

References

- [1] Dashko S., Zhou N., Compagno C., Piškur J., Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation?, *FEMS Yeast Res.*, 2004, 14(6), 826-832.
- [2] Piškur J., Langkjaer R.B., Yeast genome sequencing: the power of comparative genomics, *Mol. Microbiol.*, 2004, 53, 381-389.
- [3] Gombert A.K., van Maris A.J., Improving conversion yield of fermentable sugars into fuel ethanol in 1st generation yeast-based production processes, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2015, 7, 33C, 81-86.
- [4] Nissen T.L., Kielland-Brandt M.C., Nielsen J., Villadsen J., Optimization of ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of the ammonium assimilation, *Metab. Eng.*, 2000, 2, 69-77.
- [5] Bro C., Regenbreg B., Forster J., Nielsen J., *In silico* aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production, *Metab. Eng.* 2006, 8, 102-111.
- [6] Guo Z., Zhang L., Ding Z., Shi G., Minimization of glycerol synthesis in industrial ethanol yeast without influencing its fermentation performance, *Metab. Eng.*, 2011, 13, 49-59.
- [7] Zhang L., Tang Y., Guo Z., Ding Z., Shi G., Improving the ethanol yield by reducing glycerol formation using cofactor regulation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Lett.*, 2011, 33, 1375-1380.
- [8] de Kok S., Kozak B.U., Pronk J.T., Van Maris A., Energy coupling in *Saccharomyces cerevisiae*: selected opportunities for metabolic engineering, *FEMS Yeast Res.*, 2012, 12, 387-397.
- [9] Navas M.A., Cerdan S., Gancedo J.M., Futile cycles in *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing the gluconeogenic enzymes during growth on glucose, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1993, 90, 1290-1294.
- [10] Dmytruk K.V., Semkiv M.V., Sibirny A.A., Ethanol yield and reduction of biomass accumulation in the recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing ATPase, WO/2010/151866. 2010.
- [11] Semkiv M.V., Dmytruk K.V., Abbas C.A., Sibirny A.A., Increased ethanol accumulation from glucose via reduction of ATP level in a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing alkaline phosphatase, *BMC Biotechnol.*, 2014, 14, 42.
- [12] Grossmann M., Kiessling F., Singer J., Schoeman H., Schröder M.B., von Wallbrunn C., Genetically modified wine yeasts and risk assessment studies covering different steps within the wine making process, *Ann. Microbiol.*, 2011, 61, 103-115.
- [13] Chambers P.J., Bellon J.R., Schmidt S.A., Varela C., Pretorius I.S., Non-genetic engineering approaches to isolating and generating novel yeast for industrial applications, In: Kunze G., Satyanarayana T. (eds), *Yeast biotechnology: Diversity and applications*, Springer Science+Business Media, 433-457, 2009.
- [14] Cakar Z.P., Seker U.O., Tamerler C., Sonderegger M., Sauer U., Evolutionary engineering of multiple-stress resistant *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Res.*, 2005, 5, 569-578.
- [15] Zeyl C., The number of mutations selected during adaptation in a laboratory population of *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*, 2005, 169, 1825-1831.
- [16] Kuyper M., Toirkens M.J., Diderich J.A., Winkler A.A., van Dijken J.P., Pronk J.T., Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain, *FEMS Yeast Res.*, 2005, 5, 925-934.
- [17] Higgins V.J., Bell P.J.L., Dawes I.W., Attfield P.V., Generation of a novel *Saccharomyces cerevisiae* strain that exhibits strong maltose utilization and hyperosmotic resistance using nonrecombinant techniques, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67, 4346-4348.
- [18] Stanley D., Fraser S., Chambers P.J., Rogers P., Stanley G.A., Generation and characterisation of stable ethanol-tolerant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 2010, 37, 139-149.
- [19] Cadieere A., Ortiz-Julien A., Camarasa C., Dequin S., Evolutionary engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains with increased in vivo flux through the pentose phosphate pathway, *Metab. Eng.*, 2011, 13, 263-271.
- [20] Lawford H.G., Rousseau J.D., Corn steep liquor as a cost-effective nutrition adjunct in high-performance

- Zymomonas ethanol fermentations*, Applied Biochemistry and Biotechnology, Spring 1997, 63-65, 1, 287-304.
- [21] Christianson D.D., Cavins J.F., Wall J.S., Steep liquor constituents, identification and determination of nonprotein nitrogenous substances in corn steep liquor., *J. Agric. Food Chem.*, 1965, 13(3), 277–280.
- [22] Lin Y., Tanaka S., Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, 69, 627–642.
- [23] Gonchar M.V., Sensitive method for quantitative determination of hydrogen peroxide and oxidase substrates in biological samples, *Ukr. Biokhim. Zh.*, 1998, 70, 157–163.
- [24] Gonchar M.V., Maidan M.M., Pavlishko H.M., Sibirny A.A., A new oxidase-peroxidase kit for ethanol assays in alcoholic beverages, *Food. Technol. Biotechnol.* 2001, 39, 37–42.
- [25] Tylicki A., Czerniecki J., Dobrzyn P., Matanowska A., Olechno A., Strumilo S., Modification of thiamine pyrophosphate dependent enzyme activity by oxythiamine in *Saccharomyces cerevisiae* cells, *Can. J. Microbiol.*, 2005, 51(10), 833–839.
- [26] Kaino T., Takagi H., Gene expression profiles and intracellular contents of stress protectants in *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol and sorbitol stresses, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, 79, 273–283.
- [27] リッパートK., ガリンスキーE.A., トゥルーパーH.G., *Ectothiorhodospira halochloris*におけるトレハロースの合成と機能, *Antonie Leeuwenhoek* 1993, 63, 85–91.
- [28] Ko Y.H., Pedersen P.L., Geschwind J.F., Glucose catabolism in the rabbit VX2 tumor model for liver cancer: characterization and targeting hexokinase, *Cancer Lett.*, 2001, 173, 83–91.
- [29] Geschwind J.F., Georgiades C.S., Ko Y.H., Pedersen P.L., Recently elucidated energy catabolism pathways provide opportunities for novel treatments in hepatocellular carcinoma, *Expert Rev. Anticancer Ther.*, 2004, 4, 449–457.
- [30] Kurylenko O.O., Ruchala J., Hryniv O.B., Abbas C.A., Dmytruk K.V., Sibirny A.A., Metabolic engineering and classical selection of the methylotrophic thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* for improvement of high-temperature xylose alcoholic fermentation, *Microb. Cell. Fact.*, 2014, 13, 122.
- [31] Uhlemann H., Schellenberger A., Glyoxylic acid as an active site marker of yeast pyruvate decarboxylase, *FEBS Lett.*, 1976, 63, 37–39.
- [32] Bekesi J.G., Molnar Z., Richard J., Winzler inhibitory effect of d-glucosamine and other sugar analogs on the viability and transplantability of ascites tumor cells, *Cancer Res.*, 1969, 29, 353–359.

- Zymomonas* ethanol fermentations, Applied Biochemistry and Biotechnology, Spring 1997, 63-65, 1, 287-304.
- [21] Christianson D.D., Cavins J.F., Wall J.S., Steep liquor constituents, identification and determination of nonprotein nitrogenous substances in corn steep liquor., *J. Agric. Food Chem.*, 1965, 13(3), 277–280.
- [22] Lin Y., Tanaka S., Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, 69, 627-642.
- [23] Gonchar M.V., Sensitive method for quantitative determination of hydrogen peroxide and oxidase substrates in biological samples, *Ukr. Biokhim. Zh.*, 1998, 70, 157–163.
- [24] Gonchar M.V., Maidan M.M., Pavlishko H.M., Sibirny A.A., A new oxidase-peroxidase kit for ethanol assays in alcoholic beverages, *Food. Technol. Biotechnol.* 2001, 39, 37–42.
- [25] Tylicki A., Czerniecki J., Dobrzyn P., Matanowska A., Olechno A., Strumilo S., Modification of thiamine pyrophosphate dependent enzyme activity by oxythiamine in *Saccharomyces cerevisiae* cells, *Can. J. Microbiol.*, 2005, 51(10), 833-839.
- [26] Kaino T., Takagi H., Gene expression profiles and intracellular contents of stress protectants in *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol and sorbitol stresses, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, 79, 273–283.
- [27] Lippert K., Galinski E.A., Trueper H.G., Biosynthesis and function of trehalose in *Ectothiorhodospira halochloris*, *Antonie Leeuwenhoek* 1993, 63, 85-91.
- [28] Ko Y.H., Pedersen P.L., Geschwind J.F., Glucose catabolism in the rabbit VX2 tumor model for liver cancer: characterization and targeting hexokinase, *Cancer Lett.*, 2001, 173, 83–91.
- [29] Geschwind J.F., Georgiades C.S., Ko Y.H., Pedersen P.L., Recently elucidated energy catabolism pathways provide opportunities for novel treatments in hepatocellular carcinoma, *Expert Rev. Anticancer Ther.*, 2004, 4, 449–457.
- [30] Kurylenko O.O., Ruchala J., Hryniv O.B., Abbas C.A., Dmytruk K.V., Sibirny A.A., Metabolic engineering and classical selection of the methylotrophic thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* for improvement of high-temperature xylose alcoholic fermentation, *Microb. Cell. Fact.*, 2014, 13, 122.
- [31] Uhlemann H., Schellenberger A., Glyoxylic acid as an active site marker of yeast pyruvate decarboxylase, *FEBS Lett.*, 1976, 63, 37-39.
- [32] Bekesi J.G., Molnar Z., Richard J., Winzler inhibitory effect of d-glucosamine and other sugar analogs on the viability and transplantability of ascites tumor cells, *Cancer Res.*, 1969, 29, 353–359.