

内在性キシロース資化性遺伝子を用いたサッカロマイセス・セレビシエによるキシロース発酵

Jin Konishi · Akira Fukuda · Kozue Mutaguchi ·
Takeshi Uemura

Received: 10 March 2015 / Accepted: 2015 年 4 月 11 日
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2015

Abstract

Objectives To genetically engineer *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol productivity from グルコース/キシロース混合物. 結果 アルドース還元酵素 (GRE3)、ソルビトール脱水素酵素 (SOR1)、キシロースキナーゼ (XKS1) から構成される内在性遺伝子カセットを、PGK1 プロモーターとターミネーターを用いて、実験室株 (CEN.PK2-1C) と工業株 (協会 No. 7) の 2 株の *S. cerevisiae* に導入した。協会 7 号株 (K7-XYL) は、CEN.PK2-1C 株と比較して、グルコースとキシロースの混合溶液から高い糖消費率 ($1.03 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) とエタノール収率 (63.8 %) を示した。さらに、K7-XYL は、GRE3 および SOR1 の代わりにキシロース資化性酵母 *Scheffersomyces stipitis* 由来のキシロース還元酵素およびキシリトール脱水素酵素を組み込んだ K7SsXYL (32 g l^{-1}) と比較して、多量のエタノール (39.6 g l^{-1}) を生産した。

この菌株は、グルコース/キシロースからの効率的なエタノール生産に使用できる十分なキシロース発酵能を示した。

キーワード サッカロマイセス・セレビシエ キシロース エタノール

Introduction

リグノセルロース系バイオマスから生産されるエタノールは、化石燃料に代わる環境に優しい代替燃料として、世界的に注目されている。*Saccharomyces cerevisiae* は、工業的規模でのエタノール生産に伝統的に使用されている。高濃度のエタノールに耐性があり、過酷な環境にも耐えることができる点が魅力である。さらに、遺伝子組換えや発酵技術のための様々な遺伝子ツールが確立されており、安全であると評価されている。

硬い木材やわらなどのリグノセルロース系バイオマスは、キシロースを 20~30% (w/w) 含んでおり、これは 2 番目に多い糖である。したがって、キシロースを発酵させてエタノールに変換できる微生物を開発すれば、バイオエタノール製造の総コストを大幅に削減できる。*S. cerevisiae* はキシロースを発酵させることができないため、多くの研究がキシロースを利用するための代謝工学を目指し、キシロース還元酵素/キシリトール脱水素酵素 (XR-XDH) 経路の異種発現によるキシロース代謝経路の酵素をコードする遺伝子の導入に焦点を当ててきた (Kötter and Ciriacy 1993; Ho et al. 1998; Karhumaa et al. 2007a) またはキシロースイソメラーゼ (XI) 経路 (Walfriedsson et al.) XR-XDH 経路では、まずキシロースがキシロース還元酵素 (XR) によってキシリトールに還元され、次にキシリトールがキシリトール脱水素酵素 (XDH) によって酸化されてキシロースになる。

J. Konishi (✉) · A. Fukuda · K. Mutaguchi · T. Uemura
Bio Fuels & Chemicals R&D Group, Frontier Research Laboratory, Central Technical Research Laboratory, JX Nippon Oil & Energy Corporation, 8, Chidori-cho, Naka-Ku, Yokohama 231-0815, Japan
e-mail: jin.konishi@noe.jx-group.co.jp

Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* using endogenous xylose-assimilating genes

Jin Konishi · Akira Fukuda · Kozue Mutaguchi · Takeshi Uemura

Received: 10 March 2015 / Accepted: 11 April 2015
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2015

Abstract

Objectives To genetically engineer *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol productivity from glucose/xylose mixtures.

Results An endogenous gene cassette composed of aldose reductase (*GRE3*), sorbitol dehydrogenase (*SOR1*) and xylulose kinase (*XKS1*) with a *PGK1* promoter and a terminator was introduced into two *S. cerevisiae* strains, a laboratory strain (CEN.PK2-1C) and an industrial strain (Kyokai No. 7). The engineered Kyokai No. 7 strain (K7-XYL) exhibited a higher sugar consumption rate ($1.03 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) and ethanol yield (63.8 %) from a glucose and xylose mixture compared to the engineered CEN.PK2-1C strain. Furthermore, K7-XYL produced a larger amount of ethanol (39.6 g l^{-1}) compared to K7-SsXYL (32 g l^{-1}) with integrated xylose reductase and xylitol dehydrogenase from a xylose-assimilating yeast *Scheffersomyces stipitis* instead of *GRE3* and *SOR1*.

Conclusion The created *S. cerevisiae* strain showed sufficient xylose-fermenting ability to be used for efficient ethanol production from glucose/xylose.

Keywords *Saccharomyces cerevisiae* · Xylose · Ethanol

Introduction

Ethanol produced from lignocellulosic biomass is an environmentally friendly alternative to fossil fuels and is attracting interest worldwide. *Saccharomyces cerevisiae* is traditionally used for production of ethanol on an industrial scale. It is attractive because it tolerates high ethanol concentrations and is able to withstand harsh environments. Moreover, various genetic tools for gene modification and fermentation technologies are well established and is regarded as being safe.

Lignocellulosic biomass such as hard woods and straws consists of 20–30 % (w/w) xylose which is the second most abundant sugar. Thus, the development of microorganisms capable of fermenting xylose to ethanol would greatly reduce the overall cost of bioethanol production. As *S. cerevisiae* is not able to ferment xylose, many studies have aimed at metabolically engineering it for xylose utilization and have been focused on introducing genes that encode enzymes of the xylose metabolic pathway by heterologous expression of the xylose reductase/xylitol dehydrogenase (XR-XDH) pathway (Kötter and Ciriacy 1993; Ho et al. 1998; Karhumaa et al. 2007a) or the xylose isomerase (XI) pathway (Wal-friedsson et al. 1996; Madhavan et al. 2009). In the XR-XDH pathway, xylose is first reduced to xylitol by xylose reductase (XR), then xylitol is oxidized to

J. Konishi (✉) · A. Fukuda · K. Mutaguchi · T. Uemura
Bio Fuels & Chemicals R&D Group, Frontier Research
Laboratory, Central Technical Research Laboratory, JX
Nippon Oil & Energy Corporation, 8, Chidori-cho, Naka-
Ku, Yokohama 231-0815, Japan
e-mail: jin.konishi@noe.jx-group.co.jp

最後に、キシロースはキシロキナーゼ (XK) によってキシロース5-リン酸にリン酸化され、ペントースリン酸経路を経てエタノールに代謝される。XI経路では、キシロースは細菌または真菌のXIによって直接キシロースに変換される。XI経路は酸化還元補酵素を必要とせず、キシリトール生産量は少ないが、XI発現株はXR-XDH発現株よりもはるかに低いキシロース消費率を示す (Karhu maa et al.)

現在、キシロース発酵酵母 *Scheffersomyces stipitis* 由来のXRとXDHが遺伝子工学のソースとして広く用いられている。*S. cerevisiae* は、キシロース資化性遺伝子と相同な遺伝子を持つが、天然ではキシロースを炭素源として利用しない。*S. cerevisiae* は、キシロースからキシリトールへの変換に関与すると思われる6つのアルドケト還元酵素を持っている。GRE3遺伝子を欠失させると、キシリトール生成が半減することが判明している (Tr äff et al. 2002)。さらに、*S. cerevisiae* ゲノムには、*Scheffersomyces stipitis* のXDHをコードする遺伝子と類似した3つの遺伝子 (YLR070c、SOR1、SOR2) が見つかった (Richardら、1999)。このうち、SOR1酵素はキシロースをキシリトールに酸化することができる (Sarthy et al.)。我々は、バイオエタノール生産のためのセルフクロニング宿主を作製する目的で、*S. cerevisiae* のこれらの内在性遺伝子を利用した。

本研究では、内在性キシロース資化性遺伝子を導入した実験用 *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C株および工業用 *S. cerevisiae* 協会7号株のキシロースおよびグルコース/キシロース混合溶液からのエタノール発酵能について検討した。また、*S. stipitis* XR (SsXYL1)とXDH (SsXYL2)を導入した協会7号株のグルコース/キシロース糖混合液からのエタノール発酵性能を比較した。

材料と方法

株と培地

本研究で使用したプラスミドと酵母株を表1に示す。酵母細胞の前培養には、YPD培地 ($20 \text{ g peptone l}^{-1}$, $10 \text{ g yeast extract l}^{-1}$, $20 \text{ g glucose l}^{-1}$) を用いた。

発酵には、SC 培地 ($0.67 \text{ g Difco 酵母窒素ベース (アミノ酸なし) l}^{-1}$ に適切なアミノ酸を添加) と CBS 培地 [$7.5 \text{ g (NH}_4)_2 \text{SO}_4 \text{ l}^{-1}$, $0.75 \text{ g MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O l}^{-1}$, $3.5 \text{ g KH}_2\text{PO}_4 \text{ l}^{-1}$, $10.2 \text{ g フタル酸水素カリウム l}^{-1}$, pH 5.0] を用い、炭素源としてグルコースと/またはキシロースをそれぞれ指示量添加した。大腸菌JM109株は、組換えDNA操作に日常的に使用されている。形質転換体の選択には、YPD寒天プレートにアウレオバシジンAを 0.5 mg l^{-1} 添加した。

プラスミドと株の構築

遺伝子クローニングおよびプラスミド構築には、組換えDNA技術および分子生物学の標準的技術を用いた。GRE3、SOR1、XKS1およびPGK1プロモーターとターミネーターは、CEN.PK.2-1CのゲノムDNAから増幅した。SsXYL1 と SsXYL2 は *S. stipitis* N BRC 1687 のゲノム DNA から増幅した。酵素アッセイのために、GRE3、SOR1、ScXYL2、SsXYL1およびSsXYL2をHindIII制限部位を有するPCRによって増幅し、HindIIIで消化したpGADT7 (Clontech, CA, USA) に挿入して、それぞれpGAD-GRE3、pGAD-SOR1、pGADScXYL2、pGAD-SsXYL1およびpGAD-SsXYL2を作成した。これらのプラスミドをCEN.PK2-1Cに導入し、それぞれCEN-GRE3、CEN-SOR1、CEN-ScXYL2、CEN-SsXYL1、CEN-SsXYL2を作製した。

キシロース資化性遺伝子発現カセットの構築は以下のように行った。GRE3、SOR1およびXKS1遺伝子を、pUC18に導入したPGK1プロモーターとPGK1ターミネーターの間に位置するSalI部位にそれぞれクローニングした。GRE3、SOR1およびXKS1とPGK1プロモーターおよびターミネーターをそれぞれEcoRIおよびSphIで励起した。励起断片をプラントエンドライゲーションによりpUC18にタンデムに導入し、pUC-XYLを作製した。K7-SsXYLを構築するために、PGK1プロモーターとターミネーターを持つXKS1をpUC18の同じ部位にライゲーションし、pUC-XKS1を得た。次に、PGK1プロモーターとターミネーターを持つSsXYL2をpUC-XKS1のBamHI部位にプラントライゲーションし、pUCSsXYL2-XKS1を得た。最後に、PGK1プロモーターとターミネーターを持つSsXYL1をpUC-SsXYL2-XKS1のSmaI部位にプラントライゲーションし、pUC-SsXYLを得た。

xylulose by xylitol dehydrogenase (XDH). Finally, xylulose is phosphorylated to xylulose 5-phosphate by xylulokinase (XK) and metabolized into ethanol via the pentose phosphate pathway. In the XI pathway, xylose is directly converted to xylulose by bacterial or fungal XI. Although the XI pathway requires no redox cofactors and xylitol production is low, XI-expressing strains exhibit much lower xylose consumption rates than XR-XDH expressing strains (Karhumaa et al. 2007b).

Currently, XR and XDH derived from the xylose-fermenting yeast, *Scheffersomyces stipites*, are widely used as the sources of the gene engineering. *S. cerevisiae* does not naturally utilize xylose as a carbon source although it possesses genes that are homologous to the xylose-assimilating genes. *S. cerevisiae* has six aldo-keto reductases which seem to be involved in conversion of xylose to xylitol. Among them, *GRE3* is thought to be the main xylose reducing enzyme because deletion of the *GRE3* gene was found to decrease xylitol formation by half (Träff et al. 2002). In addition, three genes (*YLR070c*, *SOR1*, *SOR2*) are found in the *S. cerevisiae* genome which are similar to the gene encoding XDH of *Scheffersomyces stipitis* (Richard et al. 1999). Among them, *SOR1* enzyme can oxidize xylose to xylitol (Sarthy et al. 1994). We utilized these endogenous genes of *S. cerevisiae* for the purpose of creating a self-cloning host for bioethanol production because the establishment of non-genetically modified yeast would be desirable and suitable for commercial application.

In the present study, we investigated the ethanol fermenting capacities from xylose and a glucose/xylose mixture of a laboratory *S. cerevisiae* strain CEN.PK2-1C, and industrial *S. cerevisiae* strain Kyokai No. 7 engineered with the endogenous xylose-assimilating genes. We also compared the ethanol fermentation performance from a glucose/xylose sugar mixture of Kyokai No. 7 engineered with *S. stipitis* XR (*SsXYL1*) and XDH (*SsXYL2*).

Materials and methods

Strains and media

The plasmids and yeast strains used in this study are listed in Table 1. For pre-cultivation of the yeast cells, YPD medium (20 g peptone l⁻¹, 10 g yeast

extract l⁻¹, 20 g glucose l⁻¹) was used. For fermentation, SC medium (0.67 g Difco yeast nitrogen base without amino acids l⁻¹ with appropriate amino acids) and CBS medium [7.5 g (NH₄)₂SO₄ l⁻¹, 0.75 g MgSO₄·7H₂O l⁻¹, 3.5 g KH₂PO₄ l⁻¹, 10.2 g potassium hydrogen phthalate l⁻¹, pH 5.0], each containing an indicated amount of glucose and/or xylose as the carbon source were used. *Escherichia coli* strain JM109 was routinely used for recombinant DNA manipulation. For selection of the transformants, aureobacidin A was added (0.5 mg l⁻¹) to YPD agar plates.

Plasmid and strain construction

Standard techniques of recombinant DNA technology and molecular biology were used in gene cloning and plasmid construction. *GRE3*, *SOR1*, *XKS1* and a *PGK1* promoter and a terminator were amplified from the genomic DNA of CEN.PK.2-1C. *SsXYL1* and *SsXYL2* were amplified from the genomic DNA of *S. stipitis* NBRC 1687. For the enzyme assay, *GRE3*, *SOR1*, *ScXYL2*, *SsXYL1* and *SsXYL2* were amplified by PCR with a *HindIII* restriction site and inserted into pGADT7 (Clontech, CA, USA) digested with *HindIII* to create pGAD-*GRE3*, pGAD-*SOR1*, pGAD-*ScXYL2*, pGAD-*SsXYL1* and pGAD-*SsXYL2*, respectively. These plasmids were introduced into CEN.PK2-1C to produce CEN-*GRE3*, CEN-*SOR1*, CEN-*ScXYL2*, CEN-*SsXYL1* and CEN-*SsXYL2*, respectively.

Construction of the xylose-assimilating gene expression cassette was performed as follows. The *GRE3*, *SOR1* and *XKS1* genes were each cloned into the *SalI* site located between the *PGK1* promoter and *PGK1* terminator introduced into pUC18. The *GRE3*, *SOR1* and *XKS1* with the *PGK1* promoter and terminator were each excised with *EcoRI* and *SphI*. Excised fragments were introduced in tandem into pUC18 by blunt-end ligation to create pUC-XYL. For construction of K7-*SsXYL*, *XKS1* with a *PGK1* promoter and a terminator was ligated into the same site of pUC18 to yield pUC-XKS1. Next, *SsXYL2* with a *PGK1* promoter and a terminator was blunt-ligated into the *BamHI* site of pUC-XKS1 to yield pUC-*SsXYL2*-XKS1. Finally, *SsXYL1* with a *PGK1* promoter and a terminator was blunt-ligated into the *SmaI* site of pUC-*SsXYL2*-XKS1 to yield pUC-*SsXYL*. The expression cassettes (*GRE3-SOR1-XKS1* and

表1 本研究で使用した*Saccharomyces cerevisiae*株とプラスミド

Strain/plasmid	Description	Source of reference
Plasmids		
pGADT7	21ベースのマルチコピーベクター、LEU2	Clontech
pUC18	Cloning vector	Takara Bio
pAUR135	クローニングベクター AUR1	Takara Bio
pGAD-GRE3	pGADT7, intracellular expression of <i>GRE3</i>	This study
pGAD-SOR1	pGADT7, intracellular expression of <i>SOR1</i>	This study
pGAD-ScXYL2	pGADT7, intracellular expression of <i>ScXYL2</i>	This study
pGAD-SsXYL1	pGADT7, intracellular expression of <i>SsXYL1</i>	This study
pGAD-SsXYL2	pGADT7, intracellular expression of <i>SsXYL2</i>	This study
pAUR-XYL	pAUR135 containing <i>PGKp-GRE3-PGKt</i> , <i>PGKp-SOR1-PGKt</i> , <i>PGKp-XKS1-PGKt</i>	This study
pAUR-SsXYL	pAUR135 containing <i>PGKp-SsXYL1-PGKt</i> , <i>PGKp-SsXYL2-PGKt</i> , <i>PGKp-XKS1-PGKt</i>	This study
Strains		
CEN.PK2-1C	MATa <i>ura3-52</i> , <i>trp1-289</i> , <i>leu2-3 112</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>MAL2-8^C</i> , <i>SUC2</i>	Euroscarf
Kyokai No. 7	Japanese sake yeast strain	National Research Institute of Brewing
CEN-XYL	CEN.PK2-1C, <i>AUR1::[PGKp-GRE3-PGKt, PGKp-SOR1-PGKt, PGKp-XKS1-PGKt]</i>	This study
K7-XYL	Kyokai No. 7, <i>AUR1::[PGKp-GRE3-PGKt, PGKp-SOR1-PGKt, PGKp-XKS1-PGKt]</i>	This study
K7-SsXYL	Kyokai No. 7, <i>AUR1::[PGKp-SsXYL1-PGKt, PGKp-SsXYL2-PGKt, PGKp-XKS1-PGKt]</i>	This study

発現カセット (PGK1プロモーターとターミネーターを持つGRE3-SOR1-XKS1とSsXYL1-SsXYL2-XKS1)をPvuIIで消化し、SmaIで消化したpAUR135にライゲーションして、それぞれpAUR-XYLとpAUR-SsXYLを作製した。pAURXYLをStuIで消化し、CEN.PK2-1CとK7に形質転換し、それぞれCEN-XYLとK7XYLを産生した。pAUR-SsXYLをStuIで消化し、K7に形質転換し、K7-SsXYLを産生した。酵母は酢酸リチウム法 (Ito et al. 1983) で形質転換した。

Enzyme activities

酵素活性測定用の細胞抽出物は、Y-PER酵母タンパク質抽出試薬 (Pierce, Rockford, IL, USA) を用いて調製した。XRの活性は、基質として100 mMのキシロースを用い、50 mMのリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) と0.2 mMのNADPHを含む反応混合液中で測定した。XDHの活性は、50mM Tris/HCl (pH8.5)、1mM NAD⁺、

100mM キシリトールを基質とする反応混合液で測定した。細胞抽出液中のタンパク質濃度は、ウシ血清アルブミンを標準物質としてQuickstart Bradford kit (BioRad社製) を用いて測定した。酵素活性の1単位は、1分間に11molのNAD⁺またはNADPHを還元または酸化する酵素量と定義した。

Fermentation

*S. cerevisiae*をYPD培地で30℃、一晚培養し、遠心分離で回収し、滅菌蒸留水で2回洗浄してグルコースの痕跡を除去した後、適量の水に懸濁した。この細胞を、エタノールの蒸発を防ぐためにフィルター付きシリコン栓をし、適切なアミノ酸を含む50mlのSC培地またはCBS培地を入れた200mlのバッフル付きシェイクフラスコに接種した。発酵は30℃、140rpmで行った。初期乾燥細胞重量は、協会No.7で8.8g乾燥細胞重量l⁻¹、CEN.PK2-1Cで7.1g乾燥細胞重量l⁻¹であった。

Table 1 *Saccharomyces cerevisiae* strains and plasmids used in this study

Strain/plasmid	Description	Source of reference
Plasmids		
pGADT7	2 μ -based multicopy vector, <i>LEU2</i>	Clontech
pUC18	Cloning vector	Takara Bio
pAUR135	Cloning vector, <i>AUR1</i>	Takara Bio
pGAD-GRE3	pGADT7, intracellular expression of <i>GRE3</i>	This study
pGAD-SOR1	pGADT7, intracellular expression of <i>SOR1</i>	This study
pGAD-ScXYL2	pGADT7, intracellular expression of <i>ScXYL2</i>	This study
pGAD-SsXYL1	pGADT7, intracellular expression of <i>SsXYL1</i>	This study
pGAD-SsXYL2	pGADT7, intracellular expression of <i>SsXYL2</i>	This study
pAUR-XYL	pAUR135 containing <i>PGKp-GRE3-PGKt</i> , <i>PGKp-SOR1-PGKt</i> , <i>PGKp-XKS1-PGKt</i>	This study
pAUR-SsXYL	pAUR135 containing <i>PGKp-SsXYL1-PGKt</i> , <i>PGKp-SsXYL2-PGKt</i> , <i>PGKp-XKS1-PGKt</i>	This study
Strains		
CEN.PK2-1C	MATa <i>ura3-52</i> , <i>trp1-289</i> , <i>leu2-3 112</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>MAL2-8^C</i> , <i>SUC2</i>	Euroscarf
Kyokai No. 7	Japanese sake yeast strain	National Research Institute of Brewing
CEN-XYL	CEN.PK2-1C, <i>AUR1::[PGKp-GRE3-PGKt, PGKp-SOR1-PGKt, PGKp-XKS1-PGKt]</i>	This study
K7-XYL	Kyokai No. 7, <i>AUR1::[PGKp-GRE3-PGKt, PGKp-SOR1-PGKt, PGKp-XKS1-PGKt]</i>	This study
K7-SsXYL	Kyokai No. 7, <i>AUR1::[PGKp-SsXYL1-PGKt, PGKp-SsXYL2-PGKt, PGKp-XKS1-PGKt]</i>	This study

SsXYL1-SsXYL2-XKS1 with a *PGK1* promoter and a terminator) were digested with *PvuII* and ligated into pAUR135 which was digested with *SmaI* to generate pAUR-XYL and pAUR-SsXYL, respectively. pAUR-XYL was digested with *StuI* and transformed into CEN.PK2-1C and K7 to produce CEN-XYL and K7-XYL, respectively. pAUR-SsXYL was digested with *StuI* and transformed into K7 to produce K7-SsXYL. The yeast was transformed by the lithium acetate method (Ito et al. 1983).

Enzyme activities

Cell extracts for enzyme activity measurement were prepared using Y-PER yeast protein extract reagent (Pierce, Rockford, IL, USA). The activity of XR was determined in a reaction mixture containing 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) and 0.2 mM NADPH with 100 mM xylose as the substrate. The activity of XDH was determined in a reaction mixture containing 50 mM Tris/HCl (pH 8.5) and 1 mM

NAD⁺ with 100 mM xylitol as the substrate. Protein concentrations in the cell extracts were determined using Quickstart Bradford kit (BioRad) with bovine serum albumin as the standard. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that reduced or oxidized 1 μ mol NAD⁺ or NADPH per min.

Fermentation

S. cerevisiae was grown overnight at 30 °C in YPD medium, harvested by centrifugation, washed twice with sterile distilled water to remove traces of glucose, then suspended in an appropriate amount of the water. The cells were inoculated into a 200 ml baffled shake-flask with a filtered silicone plug to avoid ethanol evaporation and containing 50 ml SC or CBS medium with appropriate amino acids. Fermentation was performed at 30 °C with shaking at 140 rpm. The initial dry cell weights were 8.8 g dry cell weight l⁻¹ for Kyokai No. 7 and 7.1 g dry cell weight l⁻¹ for CEN.PK2-1C.

基質と生成物の分析

基質および生成物は、Shodex sugar SP0810 カラム (300 × 8 mm) を用い、屈折率検出器を用いてHPLCで定量した。HPLCシステムは水を移動相として80℃で0.8 ml min⁻¹で操作した。

Results and discussion

活性化された内因性遺伝子の酵素活性

GRE3、ScXYL2、SOR1、SsXYL1およびSsXYL2を、CEN.PK2-1CのADH1プロモーター-ターミネーター下、21ベースのマルチコピープラスミドpGADT7上で発現させ、形質転換体の無細胞抽出液中の比酵素活性を測定した。比酵素活性を表2に示す。GRE3の比酵素活性はSsXYL1の比酵素活性よりもはるかに高かった。SOR1は*S. stipitis*の対応する酵素と同様の活性を示した。しかし、ScXYL2の活性はほとんど検出されず、*S. cerevisiae*では機能していないことが示された。これは、Toivariら(2004)が報告したScXYL2では低活性しか検出されなかったという結果と一致する。彼らはまた、SOR1がキシロースおよびグルコース培養においてキシロース特異的な応答を示したと報告している。そこで、GRE3 と SOR1 を XR 遺伝子と XDH 遺伝子として選択し、キシロース資化性酵母を作製した。

キシロースおよびグルコース-キシロース混合物からのエタノール発酵

キシロース資化性遺伝子を安定発現させるため、CEN.PK2-1C および K7 の AUR1 遺伝子座にタンデム配列した 3 遺伝子 (GRE3, SOR1, XKS1) を染色体統合した。

表2 各菌株の細胞抽出液におけるXRおよびXDHの特異的酵素活性

Strain	特異的酵素活性 (U mg ⁻¹ タンパク質)
CEN-SsXYL1	0.06
CEN-GRE3	0.35
CEN-ScXYL2	0.21
CEN-SsXYL2	2.8
CEN-SOR1	2.1

細胞はYPD培地で培養した。値は3反復の平均値。

得られた組換え株 (CEN-XYLおよびK7XYL) を用いて、バッチフラスコ培養でキシロース (50 g l⁻¹) からエタノール発酵を行った (図1; 表3)。CEN-XYLは47時間後にキシロースの45 %を消費し、エタノールは7.1 g l⁻¹ に達した。キシリトールは4.3 g l⁻¹ に達した。培養中、グリセロールの生産は観察されなかった。K7-XYLはCEN-XYLよりもはるかに早くキシロースをエタノールに変換した。K7-XYLは47時間後に培養中のキシロースを完全に消費し、エタノールは12.2 g l⁻¹に達したが、消費キシロースあたりのエタノール収率 (46.3 %) はCEN-XYL (51.1 %) よりわずかに低かった。K7-XYLはCEN-XYLに比べ、キシリトールとグリセロールを多く生産した。CEN.PK2-1Cの酢酸生産量は徐々に増加したが、発酵中は比較的低いレベル (2 g l⁻¹) にとどまった。一方、K7-XYLはほとんど検出できないレベルの酢酸を生産した。これらの結果から、内因性キシロース資化性遺伝子の組み合わせは、キシロース発酵において十分な活性を示すことが示された。

次に、リグノセルロース系バイオマスの代表的な糖組成であるグルコース80 g l⁻¹とキシロース50 g l⁻¹を含む培地を用いて、CEN-XYLとK7-XYLによるエタノール生産を調べた (図2; 表4)。両菌株ともグルコースに続いてキシロースを速やかに発酵させた。グルコースの消費速度は両菌株間で有意差はなかった。K7-XYL株はCEN-XYL株より1.8倍早くキシロースを消費したが、生成したエタノールの量はキシロース発酵の場合 (2.9倍) より少なかった。培地中にグルコースが存在する場合、キシロースの消費速度は、キシロースのみを発酵させた場合に比べておよそ30~50%低下した。これは、発酵中に2つの糖が同じ糖輸送体をめぐって競合したためと考えられる。同様の観察は、*S. cerevisiae*の別の実験室株でも報告されている (Gonçalves et al.) また、*S. cerevisiae*の工業株では、実験室株に比べて高いキシロース消費率とエタノール生産率が報告されている (Matsushika et al.) CEN-XYLの消費糖量あたりのエタノール収率は73.6 %であり、K7-XYLよりもわずかに高かった。K7XYLの初期糖からのエタノール収率はCEN-XYL (58.5%) よりはるかに高く (63.8%)、工業用酵母の優れた頑健性を示している。

Analysis of substrates and products

The substrates and products were determined by HPLC using a refractive index detector with a Shodex sugar SP0810 column (300 × 8 mm). The HPLC system was operated at 80 °C using water as the mobile phase at 0.8 ml min⁻¹.

Results and discussion

Enzyme activities of activated endogenous genes

We expressed *GRE3*, *ScXYL2*, *SOR1*, *SsXYL1* and *SsXYL2* on a 2 µ-based multicopy plasmid pGADT7 under the *ADH1* promoter-terminator in CEN.PK2-1C and measured their specific enzyme activities in the cell free extracts of the transformants. The specific enzyme activities are shown in Table 2. The specific activity of *GRE3* was much higher than that of *SsXYL1* in our assay system. *SOR1* showed activities similar to the corresponding enzyme of *S. stipitis*. However, the activity of *ScXYL2* was barely detected, indicating that it does not function in *S. cerevisiae*. This is consistent with the results reported by Toivari et al. (2004) that only low activity was detected with *ScXYL2*. They also reported that *SOR1* showed a xylose-specific response in xylose and glucose culture. Therefore, *GRE3* and *SOR1* were selected as XR gene and XDH gene to create a xylose-assimilating yeast.

Ethanol fermentation from xylose and glucose–xylose mixture

In order to achieve a stable expression of xylose assimilating genes, three genes (*GRE3*, *SOR1*, *XKS1*)

Table 2 Specific enzyme activities of XR and XDH in cell extracts of the strains

Strain	Specific enzyme activity (U mg ⁻¹ protein)
CEN-SsXYL1	0.06
CEN-GRE3	0.35
CEN-ScXYL2	0.21
CEN-SsXYL2	2.8
CEN-SOR1	2.1

Cells were cultured in YPD medium. Values are averages of three replicates

arranged in tandem were chromosomally integrated into the *AUR1* locus of CEN.PK2-1C and K7. The obtained recombinant strains (CEN-XYL and K7-XYL) were used for ethanol fermentation from xylose (50 g l⁻¹) in a batch flask culture (Fig. 1; Table 3). CEN-XYL had consumed 45 % of the xylose after 47 h and ethanol reached 7.1 g l⁻¹. Xylitol reached 4.3 g l⁻¹. No glycerol production was observed during the culture. K7-XYL converted xylose to ethanol much faster than CEN-XYL. K7-XYL had completely consumed the xylose in the culture after 47 h and ethanol reached 12.2 g l⁻¹, although the ethanol yield of K7-XYL (46.3 %) per consumed xylose was slightly lower than that of CEN-XYL (51.1 %). K7-XYL produced a large amount of xylitol and glycerol compared to CEN-XYL. Acetic acid production of CEN.PK2-1C gradually increased but remained at a relatively low level (2 g l⁻¹) during fermentation. In contrast, K7-XYL produced a barely detectable level of acetic acid. These results showed that the combination of endogenous xylose-assimilating genes exhibit sufficient activity in xylose fermentation.

Next, a medium containing 80 g glucose l⁻¹ and 50 g xylose l⁻¹, representing a typical sugar composition of lignocellulosic biomass, was used to investigate ethanol production by CEN-XYL and K7-XYL (Fig. 2; Table 4). Both strains rapidly fermented glucose followed by xylose. There was no significant difference between the two strains in the rate of glucose consumption. K7-XYL consumed the xylose 1.8 times faster than CEN-XYL, although the amount of the produced ethanol was lower to that in xylose fermentation (2.9 times). When glucose was present in the medium, the rate of consumption of xylose decreased by roughly 30–50 % compared to when xylose was fermented as the only sugar. This may be due to competition between the two sugars for the same sugar transporter during fermentation. A similar observation has been reported with another laboratory strain of *S. cerevisiae* (Gonçalves et al. 2014). Higher rates of xylose consumption and ethanol production have also reported for an industrial strain of *S. cerevisiae* compared to a laboratory strain (Matsushika et al. 2014). The ethanol yield of CEN-XYL per consumed sugar was 73.6 %, which was slightly higher than that of K7-XYL. The ethanol yield of K7-XYL from the initial sugars was much higher (63.8 %) than that of CEN-XYL (58.5 %) indicating the

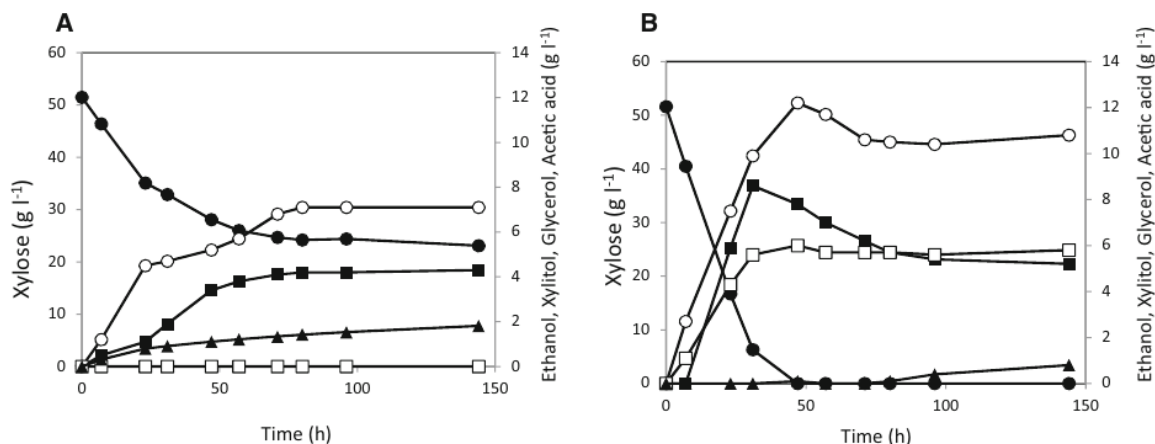


図1 キシロース (50 g l⁻¹) を炭素源とするSC培地におけるCEN-XYL株 (a) およびK7XYL株 (b) の発酵プロファイル。

キシリトール、塗りつぶした四角、グリセロール、開いた四角、酢酸、塗りつぶした三角。データポイントは3回の独立実験の平均値。偏差は平均値の10%以下であった。

表3 キシロース培養における組換え酵母の発酵性能

Strain	R _x ^a	Y _e ^b	Y _{xl} ^c	Y _{gl} ^d
CEN-XYL	0.07 ± 0	0.25 ± 0	0.1 ± 0	0.1 ± 0
K7-XYL	0.20 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.19 ± 0	0.12 ± 0.01

Values are averages of duplicate experiments ± SD

^a Xylose consumption rate (g xylose⁻¹ g-cells⁻¹ h⁻¹)

^b Ethanol yield (g ethanol g-consumed xylose⁻¹)

^c Xylitol yield (g xylitol g-consumed xylose⁻¹)

^d Glycerol yield (g glycerol g-consumed xylose⁻¹)

Urbanczykら (2011) は、K7はストレス耐性が低いにもかかわらず高いエタノール発酵活性を示したと報告しているが、これはK7XYLがCEN-XYLに比べて高いエタノール生産性を示した我々の結果と一致する。従って、エタノール生産性の向上には、エタノール耐性を付与すること、および/または、よりエタノール耐性の高い菌株を用いることが必要である。

K7-XYLとK7-SsXYLの比較

SsXYL1はNADHとNADPHの両方を利用できるが、GRE3はNADPHのみを補酵素として利用する。したがって、SsXYL1はGRE3よりもキシリトールの蓄積を防ぎ、その結果、キシロースからエタノールへの代謝の流れがスムーズになるという点で有利であると考えられる。

*S. cerevisiae*におけるキシロース同化経路の再構築では、キシロース代謝の最初の3段階を担う内在性遺伝子を統合し、K7-XYLとK7-SsXYLの2種類の株を構築した。K7-XYLはK7由来の内在性遺伝子 (GRE3、SOR1、XKS) に由来するキシロース資化性遺伝子を有するが、K7SsXYLではGRE3、SOR1の代わりにSsXYL1、SsXYL2がそれぞれ第1、第2工程に利用されている。キシロースの利用に不可欠な因子である補酵素の量は細胞内の酸化還元状態と密接に関係していることから、培養液中の溶存O₂濃度はキシリトール生成に影響を及ぼす可能性がある。エタノール生産に対する通気効果を評価する目的で、培養液の作業量を変えてキシロース発酵を行った。図3にK7-XYLとK7-SsXYLのキシロース発酵結果を示す。

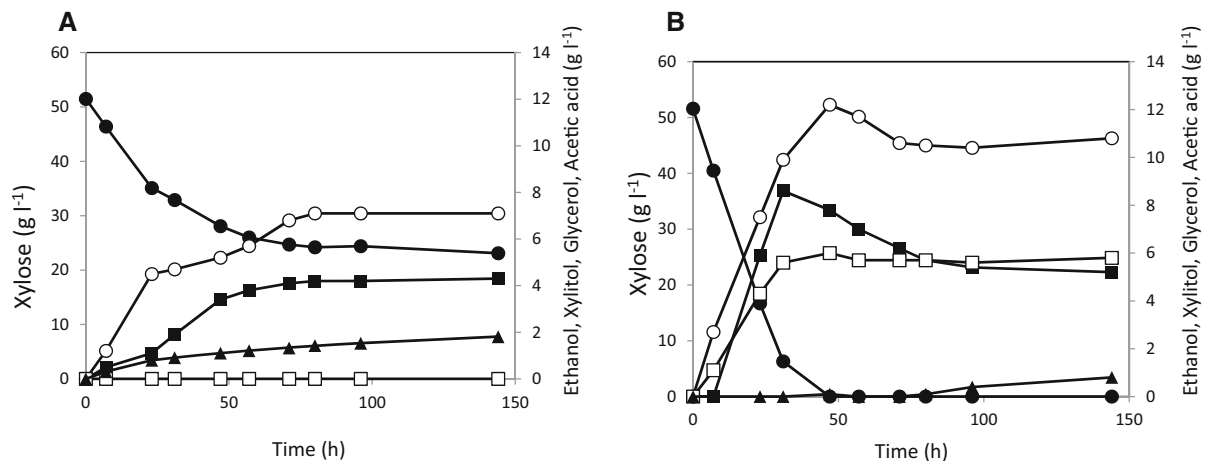


Fig. 1 Fermentation profiles of strains CEN-XYL (a) and K7-XYL (b) in SC medium containing xylose (50 g l⁻¹) as the carbon source. Xylose, filled circles; ethanol, open circles;

xylitol, filled squares; glycerol, open squares, acetic acids, filled triangles. Data points represent the average of three independent experiments. Deviation was below 10 % of the average

Table 3 Fermentation performance of the recombinant yeasts on xylose culture

Strain	R _x ^a	Y _e ^b	Y _{xl} ^c	Y _{gl} ^d
CEN-XYL	0.07 ± 0	0.25 ± 0	0.1 ± 0	0.1 ± 0
K7-XYL	0.20 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.19 ± 0	0.12 ± 0.01

Values are averages of duplicate experiments ± SD

^a Xylose consumption rate (g xylose⁻¹ g-cells⁻¹ h⁻¹)

^b Ethanol yield (g ethanol g-consumed xylose⁻¹)

^c Xylitol yield (g xylitol g-consumed xylose⁻¹)

^d Glycerol yield (g glycerol g-consumed xylose⁻¹)

superior robustness of the industrial yeast. Urbanczyk et al. (2011) reported that K7 showed high ethanol fermentation activity in spite of low stress tolerance which is consistent with our results showing that K7-XYL has high ethanol productivity compared to CEN-XYL. Therefore, ethanol production should be improved by conferring ethanol tolerance and/or using more ethanol tolerant strains.

Comparison of K7-XYL and K7-SsXYL

SsXYL1 can utilize both NADH and NADPH, whereas *GRE3* uses only NADPH as a cofactor. Therefore, *SsXYL1* is considered to be more advantageous than *GRE3* in that xylitol accumulation is prevented, resulting in a smooth metabolic flow from xylose to ethanol. In reconstitution of xylose assimilation

pathway in *S. cerevisiae*, we integrated the endogenous genes responsible for the first three steps of xylose metabolism to construct two types of strains, K7-XYL and K7-SsXYL. K7-XYL possesses xylose-assimilating genes derived from endogenous genes from K7 (*GRE3*, *SOR1* and *XKS*), whereas in K7-SsXYL, *SsXYL1* and *SsXYL2* have been utilized for the first and second steps instead of *GRE3* and *SOR1*, respectively. Since the amount of cofactors which is an essential factor in xylose utilization is closely related to the intracellular redox state, the dissolved O₂ concentration in the culture broth might have an effect on xylitol formation. With the aim of evaluating the effects of aeration on ethanol production, xylose fermentation was carried out with different working volumes of the culture. Figure 3 shows xylose fermentation results for K7-XYL and K7-SsXYL.

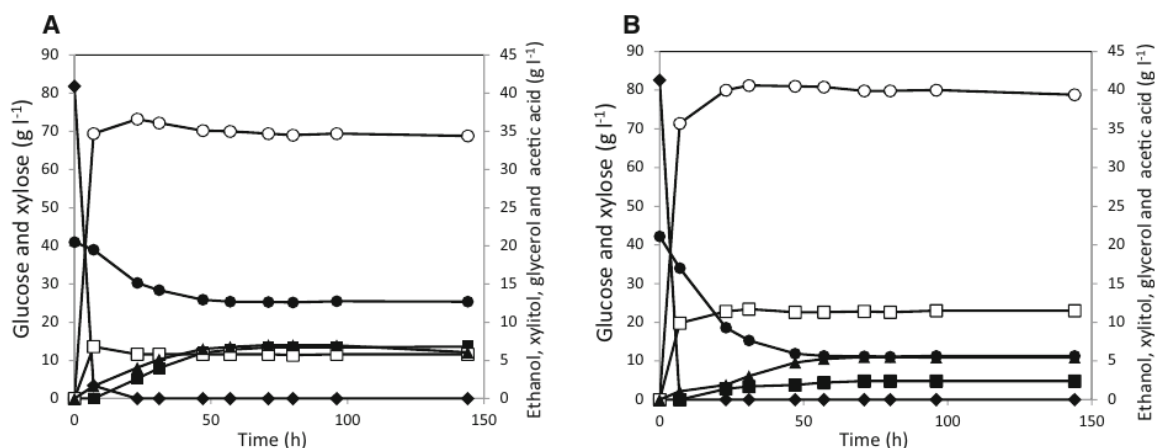


図2 グルコース (80 g l⁻¹) とキシロース (50 g l⁻¹) を炭素源とするSC培地 でのCEN-XYL株 (a) とK7XYL株 (b) の発酵プロファイル。

グリセロール、開きの四角、酢酸、塗りつぶしの三角。データ点は3つの独立した実験の平均を表す。偏差は平均値の10%以下であった。

表4 グルコースおよびキシロース培養における組換え酵母の発酵性能

Strain	R _g ^a	R _x ^b	Y _e ^c	Y _{xl} ^d	Y _{gl} ^e
CEN-XYL	1.29 ± 0	0.05 ± 0	0.39 ± 0.01	0.07 ± 0	0.06 ± 0
K7-XYL	1.26 ± 0.02	0.09 ± 0	0.37 ± 0.01	0.02 ± 0	0.11 ± 0

数値は二重実験の平均値±SD

^a Glucose consumption rate (g glucose⁻¹ g-cells⁻¹ h⁻¹)

^b Xylose consumption rate (g xylose⁻¹ g-cells⁻¹ h⁻¹)

^c Ethanol yield (g-ethanol g consumed sugar⁻¹)

^d Xylitol yield (g-xylitol g consumed xylose⁻¹)

^e Glycerol yield (g-glycerol g consumed sugar⁻¹)

K7-SsXYL株は、培養量に関係なくほぼ同じキシロース消費速度を示した (15 mlで1.82 g l⁻¹ h⁻¹、30 mlで1.84 g l⁻¹ h⁻¹)。通気量を増やすと、キシリトールの生産量は劇的に減少した。

グルコース、塗りつぶし菱形；キシロース、塗りつぶし丸；エタノール、開丸；キシリトール、これはSsXYL2の効率的な触媒活性を示しており、培養液中のO₂の増加によって供給されるNAD⁺。しかし、消費されたキシロースからの最終的なエタノール収率は、通気量を増やしてもわずかにしか改善されなかった (15 mlで59.1 %、30 mlで56.9 %)。ことから、エタノール生産につながるキシリトールからの下部経路に代謝ボトルネックが存在することが示唆された。K7-SsXYLの場合、通気量を増やすとK7-XYLのキシロース消費量 (15 mlで1.47 g l⁻¹ h⁻¹、

30 mlで0.87 g l⁻¹ h⁻¹) とエタノール生産速度 (15 mlで1.47 g l⁻¹ h⁻¹、30 mlで0.87 g l⁻¹ h⁻¹) が有意に促進された。これらの結果は、XR-XDH系における補酵素の不均衡に起因する悪影響を、酸素供給の最適化によって克服し、効率的なエタノール生産を達成できることを強く示唆している。

*S. cerevisiae*のSsXYL1、SsXYL2およびXKS1を組み込んだ株 (K7-SsXYL) のグルコース/キシロース混合液からのエタノール生産を、K7XYLと比較して検討した (図4)。両菌株とも6時間以内にすべてのグルコースを変換したが、キシロースの消費量には有意な差があった。K7-XYLは1.5 g h⁻¹の速度でキシロースを消費し、48時間以内にキシロースを使い果たした。一方、K7-SsXYLはK7-XYLよりもキシロースの変換速度が遅く (0.73 g h⁻¹)、発酵72時間後でもキシロースの48 %しか消費しなかった。

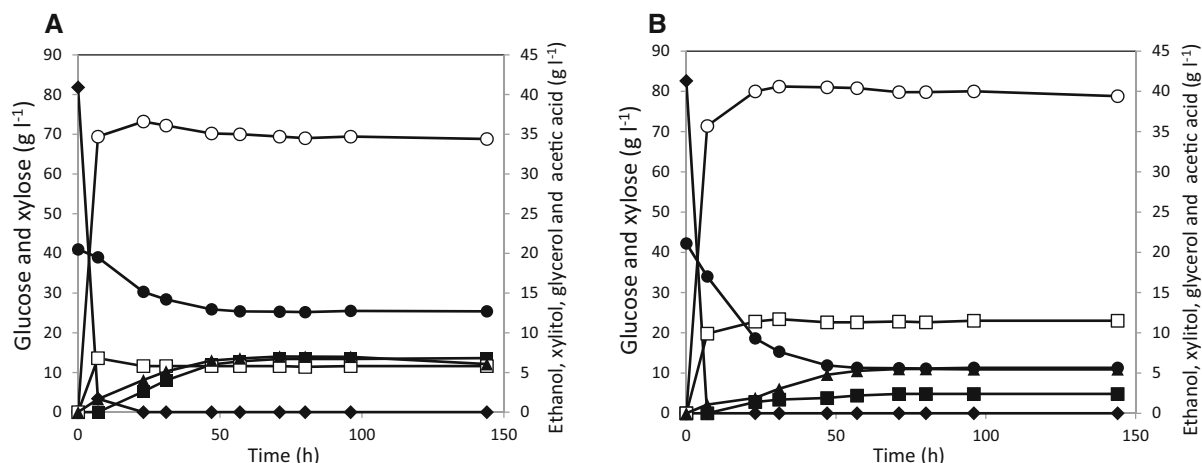


Fig. 2 Fermentation profiles of strains CEN-XYL (**a**) and K7-XYL (**b**) in SC medium containing glucose (80 g l^{-1}) and xylose (50 g l^{-1}) as the carbon sources. Glucose, filled diamonds; xylose, filled circles; ethanol, open circles; xylitol, filled squares; glycerol, open squares; acetic acids, filled triangles. Data points represent the average of three independent experiments. Deviation was below 10 % of the average

filled squares; glycerol, open squares, acetic acids, filled triangles. Data points represent the average of three independent experiments. Deviation was below 10 % of the average

Table 4 Fermentation performance of the recombinant yeasts on glucose and xylose culture

Strain	R_g^a	R_x^b	Y_e^c	Y_{xl}^d	Y_{gl}^e
CEN-XYL	1.29 ± 0	0.05 ± 0	0.39 ± 0.01	0.07 ± 0	0.06 ± 0
K7-XYL	1.26 ± 0.02	0.09 ± 0	0.37 ± 0.01	0.02 ± 0	0.11 ± 0

Values are averages of duplicate experiments \pm SD

^a Glucose consumption rate ($\text{g glucose}^{-1} \text{ g-cells}^{-1} \text{ h}^{-1}$)

^b Xylose consumption rate ($\text{g xylose}^{-1} \text{ g-cells}^{-1} \text{ h}^{-1}$)

^c Ethanol yield ($\text{g-ethanol g consumed sugar}^{-1}$)

^d Xylitol yield ($\text{g-xylitol g consumed xylose}^{-1}$)

^e Glycerol yield ($\text{g-glycerol g consumed sugar}^{-1}$)

K7-SsXYL showed almost identical xylose consumption rates regardless of the culture volume ($1.82 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ with 15 ml and $1.84 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ with 30 ml). Increased aeration dramatically decreased xylitol production.

This indicates efficient catalytic activity of *SsXYL2* presumably utilizing NAD^+ supplied by increased O_2 in the culture broth. However, the final ethanol yield from the consumed xylose was improved only slightly by increased aeration (59.1 % with 15 ml and 56.9 % with 30 ml), suggesting the existence of metabolic bottlenecks in the lower pathway from xylitol leading to ethanol production. In the case of K7-SsXYL, increased aeration significantly promoted xylose consumption of K7-XYL ($1.47 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ with 15 ml and $0.87 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ with 30 ml) and ethanol production

rate ($1.47 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ with 15 ml and $0.87 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ with 30 ml). Xylitol production was decreased by 56 % in 63 h. These results strongly suggest that the negative effects caused by the cofactor imbalance in the XR-XDH system can be overcome through optimization of the oxygen supply to achieve efficient ethanol production.

We examined ethanol production from a glucose/xylose mixture of the *S. cerevisiae* integrated *SsXYL1*, *SsXYL2* and *XKS1* (K7-SsXYL) in comparison to K7-XYL (Fig. 4). Both strains converted all the glucose within 6 h. However, there was a significant difference in xylose consumption. K7-XYL consumed xylose at a rate of 1.5 g h^{-1} and the xylose was exhausted within 48 h. In contrast, K7-SsXYL converted xylose more slowly than K7-XYL (0.73 g h^{-1}) and consumed only

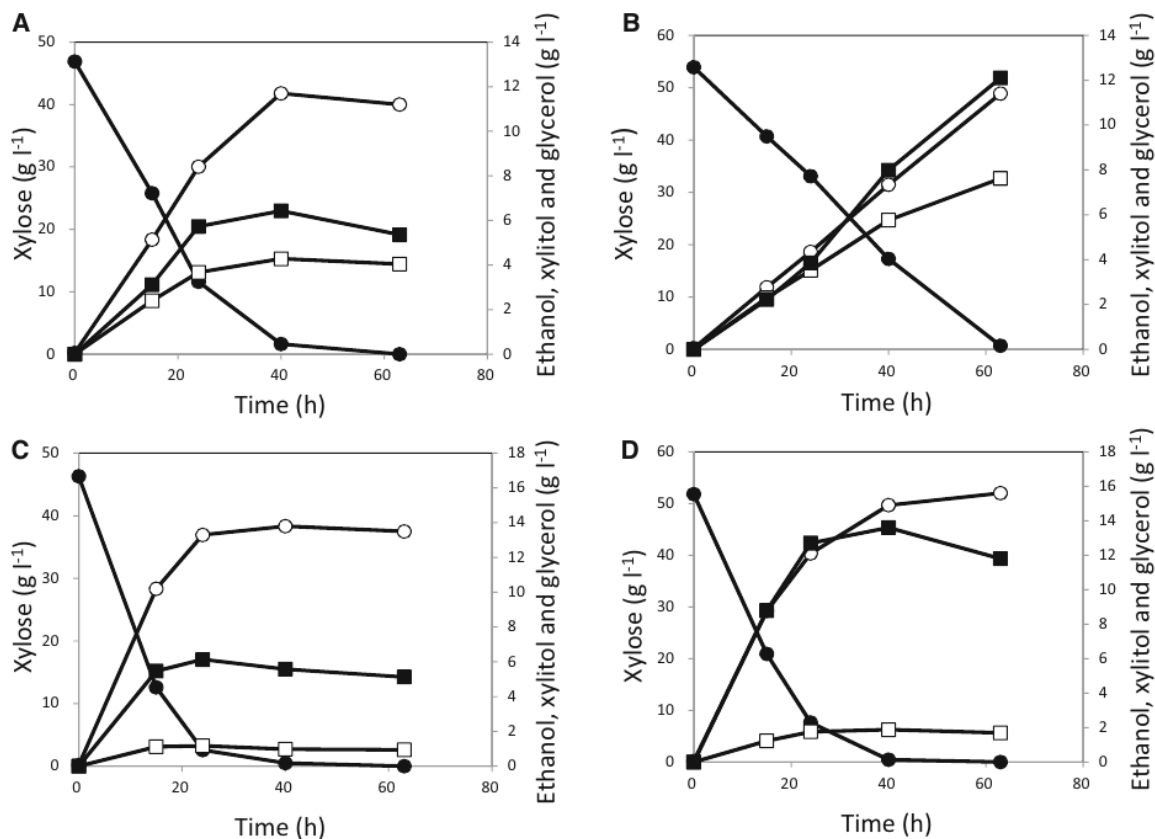


図3 キシロース (50 g l^{-1}) を炭素源とするCBS培地におけるK7-XYL株 (a, b) およびK7SsXYL株 (c, d) の発酵プロファイル。

その結果、K7-SsXYLはK7-XYL (37.6 g l^{-1}) に比べてエタノールの生産量が少なかった (32 g l^{-1})。予想外なことに、K7-SsXYLは72時間後に 5.31 g l^{-1} という大量の酢酸を生成し、これはK7-XYLを用いた場合よりも40 %高かった。酢酸は0.5 % v/vでキシロースの同化を阻害するので、これはK7-SsXYLによるキシロースの消費速度が遅く、エタノール生産量が低い主な原因のひとつと考えられる (Limtong et al.) XR-XDH 発現 *S. cerevisiae* 株で観察されたキシロースからの低いエタノール収量は、主に XR と XDH の補酵素選好性の違いによるもので、その結果キシリトールが蓄積する。驚くべきことに、補酵素嗜好性の違いにもかかわらず、両菌株ともキシリトール蓄積量は低かった。

作業量は15ml (a, c)、30ml (b, d)。XDHの反応によるキシリトールからキシロースへの変換には、 NAD^+ の供給が重要であると考えられる。

グリセロールは開きの四角。データポイントは2回の独立実験の平均。偏差は平均値の10%以下であった。

キシリトール生産量が少ないのは、本培養条件下では、主にグルコース消費による十分な酸素供給によって NAD^+ が十分に再生されたためと考えられる。キシリトール生産量が NAD^+ の再生の程度に影響されるのは合理的であり、それは培養液中の溶存 O_2 と密接な関係がある。したがって、 O_2 供給に焦点を当てた培養条件の最適化は、キシリトール生成をさらに抑制し、エタノール生産を増加させる有望な戦略であると思われる。K7-XYLは、K7-SsXYLに比べてグリセロール生産量が約2倍増加した。K7-XYLがK7SsXYLに比べてグリセロールと酢酸の生産量が多いのは、各菌株の細胞内酸化還元状態の違いによるものと思われるが、正確なメカニズムは現在のところ不明である。

結論として、我々が作成したキシロース資性*S. cerevisiae*は、グルコースとキシロースの混合物からエタノールを効率的に生産する



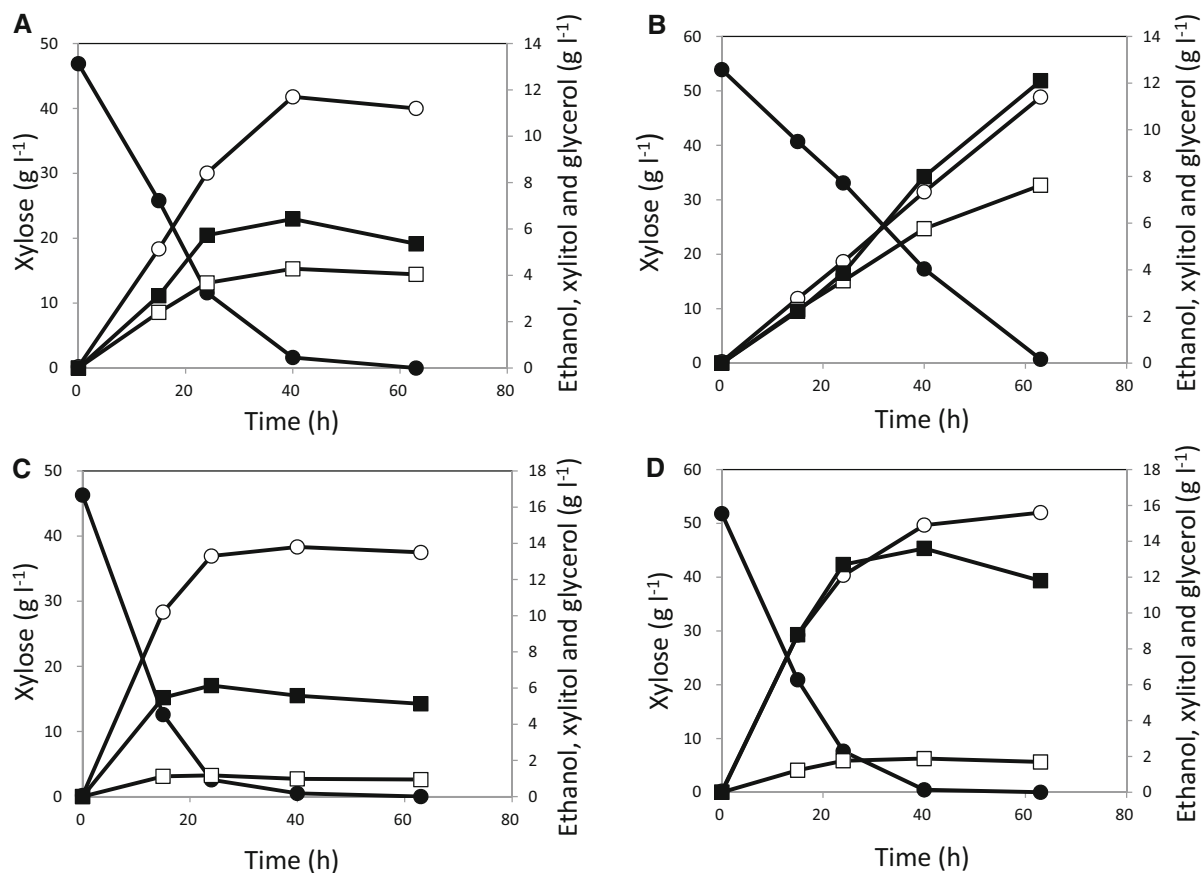


Fig. 3 Fermentation profiles of strains K7-XYL (a, b) and K7-SsXYL (c, d) in CBS medium containing xylose (50 g l⁻¹) as the carbon source. Working volume is 15 ml (a, c) and 30 ml (b, d). Xylose, filled circles; ethanol, open circles; xylitol, filled

squares; glycerol, open squares. Data points represent the average of two independent experiments. Deviation was below 10 % of the average

48 % of the xylose even after 72 h of fermentation. As a result, K7-SsXYL produced less ethanol (32 g l⁻¹) compared to K7-XYL (37.6 g l⁻¹). Unexpectedly, K7-SsXYL produced a large amount of acetic acid: 5.31 g l⁻¹ after 72 h, which was 40 % higher than that with K7-XYL. This may be one of the main causes of the slow xylose consumption and low ethanol production by K7-SsXYL since 0.5 % v/v acetic acid inhibits xylose assimilation (Limtong et al. 2000). The low ethanol yield from xylose observed with XR-XDH expressing *S. cerevisiae* strains is mainly ascribed to the difference in cofactor preference between XR and XDH, which results in xylitol accumulation. Surprisingly, both strains exhibited low xylitol accumulation despite the difference in the cofactor preferences.

For conversion of xylitol to xylulose by the reaction of XDH, the supply of NAD⁺ is assumed to be crucial. The low xylitol production may be attributed to

sufficient NAD⁺ regeneration presumably generated by adequate oxygen supply mainly from glucose consumption in our culture condition. It is reasonable that xylitol production is affected by degree of NAD⁺ regeneration which is closely related to the dissolved O₂ in the culture broth. Therefore, optimization of the culture conditions with a focus on O₂ supply seems to be a promising strategy to further reduce xylitol formation and increase ethanol production. K7-XYL showed a roughly twofold increase in glycerol production compared to K7-SsXYL. The high amounts of glycerol and acetic acid observed with K7-XYL compared to K7-SsXYL seem to be the result of the difference in the intracellular redox state of each strains, although the precise mechanism is not known at present.

In conclusion, the xylose-assimilating *S. cerevisiae* we created showed sufficient xylose fermenting ability to be used for the efficient production of ethanol from a

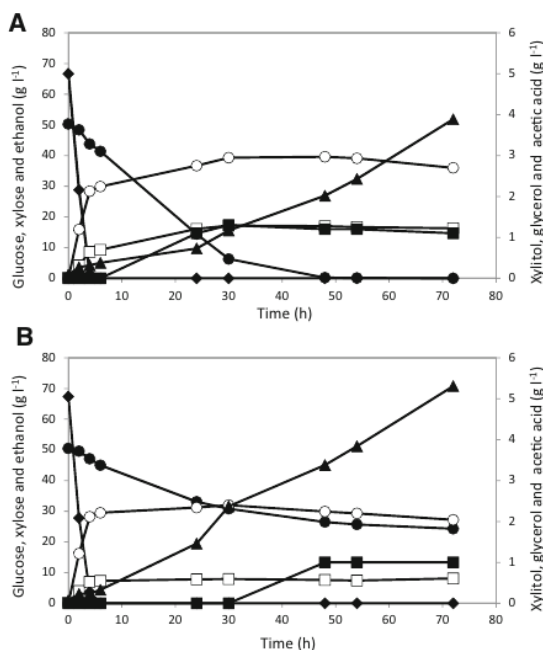


図4 グルコース (70 g l^{-1}) とキシロース (50 g l^{-1}) を炭素源とするCBS培地におけるK7-XYL株 (a) とK7SsXYL株 (b) の発酵プロフィール。グルコース、塗りつぶした菱形; キシロース、塗りつぶした円; エタノール、開いた円; キシリトール、塗りつぶした四角; グリセロール、開いた四角; 酢酸、塗りつぶした三角。データポイントは2回の独立実験の平均値。偏差は平均値の10%以下であった。

めに使用できる十分なキシロース発酵能力を示した。この結果は、リグノセルロース系バイオマスからの工業的エタノール生産に使用するセルフクローニング菌株の作製に関するさらなる研究を促すものである。

References

- Gonçalves DL, Matsushika A, de Sales BB, Goshima T, Bon EPS, Stambuk BU (2014) Xylose and xylose/glucose co-fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing individual hexose transporters. *Enzym Microb Technol* 63:13–20
- Ho NW, Chen Z, Brainard AP (1998) Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose. *Appl Environ Microbiol* 64:1852–1859
- Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153:163–168
- Karhumaa K, Fromanger R, Hahn-Hägerdal B, Gorwa-Grauslund MF (2007a) High activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase improves xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 73:1039–1046
- Karhumaa K, Sanchez RG, Hahn-Hägerdal B, Gorwa-Grauslund MF (2007b) Comparison of the xylose reductase-xylose dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact* 6:5
- Kötter P, Ciriacy M (1993) Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 38:776–783
- Limtong S, Sumpradit T, Kitpreechavanich V, Tuntirungkij M, Seki T, Yoshida T (2000) Effect of acetic acid on growth and ethanol fermentation of xylose fermenting yeast and *Saccharomyces cerevisiae*. *Kasetsart J* 34:64–73
- Madhavan A, Tamalampudi S, Ushida K, Kanai D, Kitahara S, Srivastava A, Fukuda H, Bisaria VS, Kondo A (2009) Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpinomyces*: gene sequencing, cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* 82:1067–1078
- Richard P, Toivari MH, Penttilä M (1999) Evidence that the gene YLR070c of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a xylitol dehydrogenase. *FEBS Lett* 457:135–138
- Sarthy AV, Schopp C, Idler KB (1994) Cloning and sequence determination of the gene encoding sorbitol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 140:121–126
- Toivari MH, Salusjärvi L, Ruohonen L, Penttilä M (2004) Endogenous xylose pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 70:3681–3686
- Träff KL, Jönsson LJ, Hahn-Hägerdal B (2002) Putative xylose and arabinose reductases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 19:1233–1241
- Urbanczyk H, Noguchi C, Wu H, Watanabe D, Akao T, Takagi H, Shimoi H (2011) Sake yeast strains have difficulty in entering a quiescent state after cell growth cessation. *J Biosci Bioeng* 112:44–48
- Walfriedsson M, Bao X, Anderlund M, Liljus G, Bülow L, Hahn-Hägerdal B (1996) Ethanolic fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus xylA* gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase. *Appl Environ Microbiol* 62:4184–4190

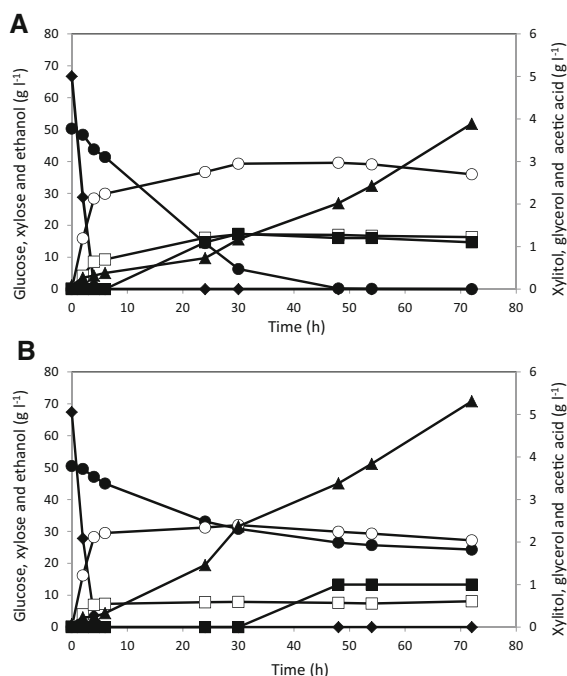


Fig. 4 Fermentation profiles of strains K7-XYL (a) and K7-SsXYL (b) in CBS medium containing glucose (70 g l^{-1}) and xylose (50 g l^{-1}) as the carbon sources. Glucose, filled diamonds; xylose, filled circles; ethanol, open circles; xylitol, filled squares; glycerol, open squares; acetic acids, filled triangles. Data points represent the average of two independent experiments. Deviation was below 10 % of the average

glucose and xylose mixture. Our results should encourage further studies on the creation of self-cloning strains to be used in industrial ethanol production from lignocellulosic biomass.

References

- Gonçalves DL, Matsushika A, de Sales BB, Goshima T, Bon EPS, Stambuk BU (2014) Xylose and xylose/glucose co-fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing individual hexose transporters. *Enzym Microb Technol* 63:13–20
- Ho NW, Chen Z, Brainard AP (1998) Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose. *Appl Environ Microbiol* 64:1852–1859
- Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153:163–168
- Karhumaa K, Fromanger R, Hahn-Hägerdal B, Gorwa-Grauslund MF (2007a) High activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase improves xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 73:1039–1046
- Karhumaa K, Sanchez RG, Hahn-Hägerdal B, Gorwa-Grauslund MF (2007b) Comparison of the xylose reductase-xylose dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact* 6:5
- Kötter P, Ciriacy M (1993) Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 38:776–783
- Limtong S, Sumpradit T, Kitpreechavanich V, Tuntirungkij M, Seki T, Yoshida T (2000) Effect of acetic acid on growth and ethanol fermentation of xylose fermenting yeast and *Saccharomyces cerevisiae*. *Kasetsart J* 34:64–73
- Madhavan A, Tamalampudi S, Ushida K, Kanai D, Kitahara S, Srivastava A, Fukuda H, Bisaria VS, Kondo A (2009) Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpinomyces*: gene sequencing, cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* 82:1067–1078
- Richard P, Toivari MH, Penttilä M (1999) Evidence that the gene YLR070c of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a xylitol dehydrogenase. *FEBS Lett* 457:135–138
- Sarthy AV, Schopp C, Idler KB (1994) Cloning and sequence determination of the gene encoding sorbitol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 140:121–126
- Toivari MH, Salusjärvi L, Ruohonen L, Penttilä M (2004) Endogenous xylose pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 70:3681–3686
- Träff KL, Jönsson LJ, Hahn-Hägerdal B (2002) Putative xylose and arabinose reductases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 19:1233–1241
- Urbanczyk H, Noguchi C, Wu H, Watanabe D, Akao T, Takagi H, Shimoi H (2011) Sake yeast strains have difficulty in entering a quiescent state after cell growth cessation. *J Biosci Bioeng* 112:44–48
- Walfriedsson M, Bao X, Anderlund M, Liljus G, Bülow L, Hahn-Hägerdal B (1996) Ethanol fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus* xylA gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase. *Appl Environ Microbiol* 62:4184–4190