



Improvement of high-temperature and inhibitor stress tolerance of xylose-fermenting yeast strains based on transcriptomic analysis

KU SYAHIDAH BINTI KU ISMAIL

(Degree)

博士 (工学)

(Date of Degree)

2013-09-25

(Date of Publication)

2014-09-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第5936号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005936>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



論文内容の要旨

氏 名 KU SYAHIDAH BINTI KU ISMAIL

専 攻 CHEMICAL SCIENCE AND ENGINEERING

論文題目 (外国語の場合は、その和訳を併記すること。)

Improvement of High-temperature and Inhibitor Stress Tolerance of Xylose-fermenting Yeast Strains based on Transcriptomic Analysis

トランスクリプトミクスに基づくストレス耐性機構の解明と高効率キシロース
資化性酵母の創製

指導教員 Prof Dr. Akihiko Kondo

Improvement of High-temperature and Inhibitor Stress Tolerance of Xylose-fermenting Yeast Strains based on Transcriptomic Analysis

The development of renewable energy has drawn interests among researchers not only because of the steady rise in oil prices, but also the limited fossil fuel reserves. The reserves would somehow be depleted and the transportation sector would be severely affected. Countries such as Brazil and United States had started their biofuel production mainly from sugarcane and corn, respectively. However, with the interest not to compete with food supply, agricultural biomass residues would be an alternative replacement.

Thus, Chapter 1 describes an overview of bioethanol production from lignocellulosic biomass. Described in this chapter is also the concept of consolidated bioprocessing replacing the conventional process which requires lesser unit operations and costs. Ethanol production via consolidated bioprocessing requires a robust microorganism to withstand the harsh fermentation environment of high temperature, high ethanol concentration and exposure to inhibitors. It is also important that the microorganism selected for use in converting hemicellulosic hydrolyzates have the ability to ferment both glucose and pentose rapidly and at high yield to maximize conversion performance. The prominent ethanol producer *Saccharomyces cerevisiae* is not able to uptake xylose as the carbon source. However, most pentose utilizing strains such as *Scheffersomyces stipitis*, *Candida shehatae* and *Kluyveromyces marxianus* were not capable of handling ethanol toxicity and hydrolysates inhibitors when compared to *S. cerevisiae*. Thus, *S. cerevisiae* obtained from different industrial backgrounds were genetically modified by expressing the xylose reductase (XR) and xylitol dehydrogenase (XDH) from *S. stipitis* and xylulokinase (XK) from *S. cerevisiae*, enabling it to produce ethanol from xylose. After conferring the xylose uptake ability, the interest to develop a heat and inhibitor tolerant strain was implemented through inverse metabolic engineering strategy involving the use of DNA microarray for gene expression analysis.

In Chapter 2, a high throughput transcriptomics analysis using DNA microarray was performed to study the genes response between several industrial yeast strains to heat stress. Production of ethanol from xylose as the sole carbon source at high temperature would be an economical approach since it reduces risk of contamination and allows both the saccharification and fermentation steps in simultaneous saccharification and fermentation (SSF) to be running at elevated temperature. Eight recombinant xylose-utilizing *S. cerevisiae* strains

developed from industrial strains were constructed and subjected to high-temperature fermentation at 38°C. The best performing strain was sun049T, which produced up to 15.2 g/L ethanol (63% of the theoretical production), followed by sun048T and sun588T, both with 14.1 g/L ethanol produced. Via transcriptomic analysis, expression profiling of the top three best ethanol producing strains compared to a negative control strain, sun473T, led to the discovery of genes in common that were regulated in the same direction. Identification of the 20 most highly up-regulated and the 20 most highly down-regulated genes indicated that the cells regulate their central metabolism and maintain the integrity of the cell walls in response to high temperature. We also speculate that cross-protection in the cells occurs, allowing them to maintain ethanol production at higher concentration under heat stress than the negative controls. This novel report provides further transcriptomics information in the interest of producing a robust microorganism for high-temperature ethanol production utilizing xylose.

Chapter 3 describes the first investigation on heat responsive genes via time-based transcriptomics analysis when xylose is the only carbon source during ethanol fermentation. The genetically enhanced industrial *S. cerevisiae* strain, sun049T enabled to uptake xylose as the sole carbon source at high fermentation temperature was chosen as the best candidate strain for this analysis, based on the fermentation performance in Chapter 2. This strain was able to produce 13.9 g/L ethanol from 50 g/L xylose at 38°C. To better understand the xylose consumption ability during long-term high temperature conditions, we compared by transcriptomics two fermentation conditions: high temperature (38°C) and control temperature (30°C) during the first 12 h of fermentation. The results suggest that genes related to amino acid, cell wall and ribosomal protein synthesis are down-regulated under heat stress. To allow cell stability and continuous xylose uptake in order to produce ethanol, hexose transporter *HXT5*, heat shock proteins, ubiquitin proteins and proteolysis were all induced at high temperature. We also speculate that the strong relationship between high temperature and increased xylitol accumulation represents the cell's mechanism to protect itself from heat degradation.

Apart from high temperature stress during the SSF process, lignocellulosic biomass usually contains inhibitory compounds such as furfural that are not well tolerated by *S. cerevisiae*. Thus, in Chapter 4, *S. cerevisiae* strains with the capability of utilizing both glucose and xylose in the presence of inhibitors such as furfural were successfully developed. Under the synergistic conditions of transaldolase (TAL) and alcohol dehydrogenase (ADH) overexpression, *S. cerevisiae* MT8-1X/TAL-ADH was found to be able to produce 1.3-fold and

2.3-fold more ethanol in the presence of 70 mM furfural than a TAL-expressing strain and a control strain, respectively. We also tested the strains' ability by mimicking industrial ethanol production from hemicellulosic hydrolysate containing fermentation inhibitors, and ethanol production was further improved by 16% when using MT8-1X/TAL-ADH compared to the control strain. Transcript analysis further revealed that besides the pentose phosphate pathway genes *TKL1* and *TAL1*, *ADH7* was also up regulated in response to furfural stress, which resulted in higher ethanol production compared to the TAL-expressing strain. The improved capability of our modified strain was based on its capacity to remain viable in a toxic environment and to more quickly reduce furfural in situ with higher ethanol production. The co-expression of *TAL/ADH* genes is one crucial strategy to fully utilize undetoxified lignocellulosic hydrolysate, leading to cost-competitive ethanol production.

Besides furfural, another common inhibitor liberated during the pretreatment of lignocellulosic biomass is acetic acid. Metal ions supplementation such as zinc, magnesium and calcium was found to be essential in maintaining better cell growth and metabolism under inhibitor stress condition as elaborated in Chapter 5. Ethanol fermentation in media containing 30 mM acetic acid was carried out using *S. cerevisiae* sun049T. The optimum concentrations for each metals; zinc, magnesium and calcium for improved ethanol production under acetic acid stress was 180 µM, 3.5 mM Mg and 2 mM Ca, respectively. The improved ethanol production was found linked to higher cell viability observed with the metal supplementation. Among the three metal tested, 2 mM calcium supplementation gave the highest ethanol production, 15 g/L, while 3.5 mM magnesium supplementation resulted in the highest cell viability, 91%. The improvement observed in both xylose consumption and ethanol production was further elucidated using the microarray analysis to analyze the gene regulation during metal ions supplementation. Comparative transcriptomics between the supplemented cultures and the control suggest that the cell viability was improved by upregulation of cell wall and membrane genes. Also, upregulation of hexose transporter genes and genes in metabolic pathways might enhance the ethanol production in the presence of acetic acid.

To conclude, efforts have been made to develop thermotolerant and inhibitor tolerant strains. Chapters 2 and 3 focused on developing a thermotolerant yeast strain by analyzing gene expression profiling from different perspectives, while Chapters 4 and 5 demonstrates the efforts in developing an inhibitor tolerant strain for use in bioethanol production from cellulosic wastes. Transcriptomics results obtained from Chapters 2 and 3 helps narrows down the list of genes

(氏名 : Ku Syahidah Binti Ku Ismail NO. 4)

responsive to heat stress. Further investigation is required to determine whether a single gene or a network of genes made up the heat tolerance phenotype in the industrial strain. In terms of inhibitor tolerant strain, the application of the genetically improved strain was demonstrated using real undetoxified hydrolyzates mimicking the industrial practise and the results showed promising. Also, the impact of metal ions supplementation showed improvements in tolerating acetic acid stress in fermentation media. This work serves as an additional contribution in augmenting the genetic toolbox for developing a multi-tolerant *S. cerevisiae* strain for consolidated ethanol bioprocessing.

氏名	KU SYAHIDAH BINTI KU ISMAIL		
論文 題目	Improvement of high-temperature and inhibitor stress tolerance of xylose-fermenting yeast strains based on transcriptomic analysis トランスプリプトミクスに基づくストレス耐性機構の解明と高効率キシロース資化性酵母の創製		
審査 委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教授	近藤 昭彦
	副 査	教授	西野 孝
	副 査	教授	山地 秀樹
	副 査	准教授	田中 勉
	副 査		
印			
要 旨			
バイオエタノールの生産において、再生可能で食糧と競合しないリグノセルロース系バイオマスを効率的にエタノールへ変換する技術の開発が求められている。その際、エタノールの生産者である酵母の発酵能の向上は重要である。リグノセルロース系バイオマスからのエタノール生産では、糖化と発酵を同時に進行させる同時糖化発酵プロセスが主流であるが、糖化の最適温度が 50℃付近であるのに対して酵母の発酵温度が 30～35℃付近であるため、より高い温度で発酵可能な酵母の利用がのぞまれている。また、リグノセルロースにはグルコースだけでなくキシロースが主要構成糖として存在するため、キシロースからエタノールへの高い変換効率も求められる。本研究は、高温でキシロースを高効率にエタノールを発酵生産する酵母の開発について報告している。特に、グルコースに次いで多いバイオマス構成糖であるキシロースからのエタノール生産に着目し、高温条件下、発酵阻害物存在下で効率的エタノールを生産する酵母の開発に取り組んでいる。高温での発酵は、同時糖化発酵を促進するほか、バクテリアなどによる雑菌汚染を回避する利点がある。また、リグノセルロース系バイオマスを出発材料とするときには、前処理工程で生成する過分解物質（フルフラール、酢酸など）が発酵を阻害することが避けられないため、このような発酵阻害物存在下で高効率にエタノールを生産できる酵母の開発が必須である。従来の研究で、遺伝子組換え酵母の開発が進み、酵母細胞内に異種微生物（<i>Scheffersomyces stipitis</i>）由来の酵素（XR および XDH）を過剰発現させることにより、キシロースを資化できる遺伝子組換え酵母がおおく作出されてきたが、キシロースを資化する細胞内代謝は発酵阻害物などのストレスに対して敏感で大きく阻害を受けることが分かってきた。しかしながら、キシロース資化性酵母へのストレス耐性の付与に関する報告はほとんどなく、本研究ではこの課題に対するアプローチを行なっている。 本研究では、リグノセルロース系バイオマスからのエタノール生産の現状と課題を抽出するとともに、高温プロセスの有用性や発酵阻害物耐性酵母創製の重要性から、課題に取り組むための新規代謝工学的アプローチを検討した。具体的には、まず、キシロース資化性酵母を導入した産業用酵母を複数株構築し、高温条件下でのキシロース発酵能に関して株間の比較を行なった。38℃において、60%以上の対糖収率でエタノールを生産する株（3種）において共通の発現様式を示す遺伝子を、DNA マイクロアレイ解析により探索することで、高温耐性関連遺伝子を見出した。次に、最も優れたキシロース資化能を示した産業用酵母を材料として、30℃と 38℃で発現様式の異なる遺伝子を探索するとともに、啓示的な発現量の変化を DNA マイクロアレイ解析により観測することにより、高温耐性関連遺伝子の同定を進めた。ジーン・オントロロジー解析の結果から、細胞壁の維持やアミノ酸代謝、糖トランスポーター、ヒートショックタンパク質系に関わる遺伝子が高温での酵母の耐性機構に寄与していることが明らかになった。			

氏名	KU SYAHIDAH BINTI KU ISMAIL
次に、フルフラール存在下でのキシロース発酵能の向上をめざし、フルフラールの無毒物質への変換に関与する酵素（ADH）とキシロース資化経路の代謝を促進する酵素（TAL）を導入した遺伝子組換え酵母を作成し、70 mM フルフラール存在下でのキシロース発酵試験に供した。ADH と TAL を同時に導入することにより、フルフラール存在下におけるエタノール生産の効率化に成功し、稲わら水熱処理によって得られたバイオマス加水分解液の発酵における有効性も確かめることができた。さらに、酢酸存在下でのキシロース発酵能の向上をめざし、酢酸耐性を付与する遺伝子の探索を行った。従来の研究で、亜鉛イオンが酢酸存在下でのグルコース発酵を向上させる報告があり、特定の金属イオンが酵母の発酵能を強化することが知られている。本研究では、亜鉛イオン、マグネシウムイオン、カルシウムイオンを添加して、酢酸存在下でのキシロース発酵を行うことにより、酢酸耐性関連遺伝子の単離を試みた。まず、金属イオン存在下で酢酸存在下のキシロース発酵効率が向上することを初めて見出した。遺伝子発現解析の結果から細胞壁や細胞膜合成に関与する遺伝子の発現量が上昇していることが明らかになるとともに、糖輸送やエタノール代謝に関する遺伝子が酢酸存在下で上昇していることが明らかとなった。 以上のように、本研究では高温ストレスおよび発酵阻害物ストレスに耐性を付与する遺伝子の単離を報告した。酵母等の微生物はストレスに応答して、防御機構を駆動させることが知られているが、高温や低 pH 等のストレスを受けた場合には、特定の酵素の発現にとどまらず細胞の代謝状態を大きく変化させることが明らかである。この点から、従来、ストレス耐性関連遺伝子の同定は容易に進まなかった。本研究では、網羅的遺伝子発現解析を行うことにより、細胞の状態を俯瞰することで代謝変化の鍵遺伝子を単離するという従来にないアプローチを展開することで有用遺伝子の単離に成功したと言える。よって、学位申請者の KU SYAHIDAH BINTI KU ISMAIL は、博士(工学)の学位を得る資格があると認める。。	