

國立臺灣海洋大學食品科學系碩士班
專題討論書面報告

探討表現於 *Saccharomyces cerevisiae*
之突變木糖異構酶特性與其於乙醇
發酵之影響

授課老師：宋文杰 老師

黃意真 老師

指導老師：方翠筠 老師

學 生：游凱甯

學 號：10732062

報告日期：108 年 2 月 27 日

指導老師簽名：_____

探討表現於 *Saccharomyces cerevisiae* 之突變木糖異構酶特性
與其於乙醇發酵之影響

游凱甯(5109)

2019/02/27

大綱

- 一、前言
- 二、篩選自牛瘤胃總體基因庫而表現於 *Saccharomyces cerevisiae* 的木糖異構酶之特性探討與突變
- 三、探討 PMR1 突變可促進基因改造後 *Saccharomyces cerevisiae* 的木糖異構酶活性與利用木糖厭氧生長的分子機制
- 四、探討在醋酸壓力下錳離子對於可表現木糖異構酶之 *Saccharomyces cerevisiae* 乙醇發酵的影響
- 五、結論

摘要

木質纖維素被認為是可作為永續生質燃料生產最有希望的原料之一，在木質纖維素原料中戊糖與己糖的完全轉化可以為乙醇生質燃料產業產生顯著的經濟效益，其中木糖異構酶 (xylose isomerase, XI) 基因的異源表現 (heterologous expression) 被認為是一種直接且有效的生產策略，可為 *Saccharomyces cerevisiae* 建立木糖的代謝途徑，以增加乙醇發酵的效率。因此，本篇探討表現於 *Saccharomyces cerevisiae* 之突變木糖異構酶之特性與其於乙醇發酵之影響。篩選自牛瘤胃總體基因組的 XI 基因 (xylA) 在 *Saccharomyces cerevisiae* 表現後得到的 XI 具有功能性，可有效催化木糖轉化，因此，以牛瘤胃總體基因組篩選出的 xylA 成為 XI 的新來源，其酵素活性為 1.31 U/mg，與 *Piromyces* sp. 來源的 XI 活性相當。另外，高基氏體 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ ATPase 的基因 PMR1 突變後可促進基因改造後 *Saccharomyces cerevisiae* 的 XI 活性，又在錳離子存在下對於 XI 的活性促進相對於其他二價金屬離子而言明顯較高。此外，醋酸的存在顯著抑制可表現 XI 之 *Saccharomyces cerevisiae* 的乙醇發酵，但是透過添加錳離子，可減輕醋酸所造成的環境壓力。綜上所述，透過突變或添加錳離子可提升基因改造後 *Saccharomyces cerevisiae* 的 XI 活性，進而促進乙醇的生產。

一、前言

在生產乙醇生質燃料中，其原料以己糖的二聚體或聚合物為主，其可以透過釀酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 在有氧環境中有效且快速發酵；然而在厭氧環境中木糖 (xylose) 與阿拉伯糖 (arabinose) 不能被 *S. cerevisiae* 發酵 (van Maris *et al.* 2006; Alper & Stephanopoulos 2009)，因此，戊糖轉化成各種可讓釀酒酵母直接發酵之基質的轉化程度，影響生物乙醇的生產效益，使異源表現的木糖異構酶 (xylose isomerase, XI) 在轉化過程中扮演重要的角色。

雖然在酵母菌種中可篩選出利用木糖生長之菌株，其代謝過程是藉由木糖還原酶 (xylose reductase) 與木糖醇脫氫酶 (xylitol dehydrogenase) 兩種酵素轉化木糖為木酮糖 (Jeffries 1983)。因為木糖還原酶與木糖醇脫氫酶需要不同氧化還原輔因子 (Kötter & Ciriacy 1993; Hahn-Hägerdal *et al.* 2001; Jeffries 2006)，異源表現此二基因的 *S. cerevisiae* 菌株在厭氧環境下培養表現後會產生大量木糖醇 (Watanabe *et al.* 2007; Runquist *et al.* 2010)，使得木糖發酵遇到瓶頸。而 *S. cerevisiae* 本身無法直接發酵木糖，但能透過磷酸戊糖途徑代謝木酮糖 (xylulose) (Wang & Schneider 1980)，故需藉由異源表現 XI 將木糖轉化為木酮糖後加以利用。

PMR1 為高基氏體膜上表現鈣/錳離子 ATP 幫浦 ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ ATPase) 之基因，其可將鈣離子送入細胞內，並把錳離子運送至胞外，因此，將此基因突變後，細胞內錳離子的濃度提高，促使基因改造後 *S. cerevisiae* 表現之 XI 的活性增加。

因此，本研究利用篩選與突變，以期獲得高表現量與高活性之 XI；並於木糖發酵中，添加錳離子以提升 XI 於醋酸環境中之酵素活性，並優化乙醇的生產流程及生產效率。

二、篩選自牛瘤胃總體基因庫而表現於 *Saccharomyces cerevisiae* 的木糖異構酶之特性探討與突變

將牛瘤胃中分離出 XI 基因 (Ru-xylA) 並以 PCR 擴增；此外，從 *Sorangium cellulosum* 中分離出另一種 XI 基因 (Sc-xylA)。將此兩種 XI 基因於 *S. cerevisiae* BSPX042 中表現，並測定重組菌株中之 XI 的比活性。Ru-xylA 與 Sc-xylA 的比活性分別為 1.31 ± 0.00 U/mg 與 0.35 ± 0.05 U/mg，由此可知 Ru-xylA 活性較 Sc-xylA 高，因此分析 Ru-xylA 之最適作用 pH 值、溫度、及不同離子中之活性。由 Fig. 1A 可知 XI 於 Mn^{2+} 具有最高活性；而酵素最適作用 pH 值為 7.0 與最適作用溫度為 60°C (Fig. 1B)。

比較來自牛瘤胃總體基因庫、*Piromyces* sp.、*S. cellulosum*、及 *E. coli* 於 *S. cerevisiae* 表現 xylA 之 XI 純化後活性 (Table 1)。其中，來自牛瘤胃總體基因庫的 Ru-xylA 具有最高活性，而來自 *E. coli* 的 xylA 在 *S. cerevisiae* 中表現出的 XI 沒有催化功能。且相對於在 *E. coli* 中表現，來自牛瘤胃的 Ru-xylA 在 *S. cerevisiae* 中表現具有更高的催化活性。由結果顯示，重組 Ru-xylA 於 *S. cerevisiae* 表現具有較高活性。

本研究進行定點突變與生長條件的篩選，以選擇在 *S. cerevisiae* 中表現出更高酵素活性的基因突變菌株 (Fig. 2)。將隨機突變產生的 XI 基因庫轉殖到 *S. cerevisiae* BSPX042 菌株中，在含有木糖的培養基上生長並篩選菌落，在兩輪篩選後，獲得了五種突變菌株，其活性比對照菌株高 30% (Fig. 2A)。在五種基因突變菌株中，一個位點突變的 F45Y 與 V33A 所表現之 XI 分別比對照組的活性高 43% 與 35%，而雙位點突變的 K11T/D220V 表現之酵素活性最高。將含有 pJFE1-Ru XI 的 BSPX042 與含有 pJFE1-Ru XI (K11T/D220V) 的 BSPX042 分別培養在含有木糖的培養基，含有 pJFE1-Ru XI (K11T/D220V) 的 BSPX042 突變菌株在培養遲滯 40 小時後開始生長，生長速率約為 0.02/hr，而培養 117 小時後木糖消耗了約 80%。相反地，含有 pJFE1-Ru XI 的 BSPX042 菌株在木糖培養基中完全不能生長 (Fig. 2B, C)。

三、探討 PMR1 突變可促進基因改造後 *Saccharomyces cerevisiae* 的木糖異構酶活性與利用木糖厭氧生長的分子機制

為研究基因改造後菌株 *S. cerevisiae* IMX696 的厭氧生長，將菌株置於氮氣引入生物反應器中，以 SMX (semi-synthetic medium) 培養基培養，並補充厭氧生長因子 Tween-80 與麥角甾醇 (ergosterol)。在兩重複實驗中，連續監測生物反應器產生之廢氣中 CO₂ 的產生，結果僅在厭氧培養 12 天後偵測到 CO₂。針對木糖發酵的厭氧生長適應程度，本研究也定期分析菌株的生長、存活率、及代謝物濃度 (Fig. 3)。同樣的，在培養前 12 天發現木糖的濃度沒有顯著變化，當培養於 SMD (semi-synthetic medium with glucose) 培養基上時，需氧與厭氧平板顯示出相似的菌落數量趨勢 (Fig. 3)。

在研究 PMR1 的突變在木糖發酵上的厭氧生長適應試驗中，所得 IMX906 突變菌株在 24 小時內生長並在 70 小時內完全消耗所有糖 (Fig. 4)。兩種產物的比生產速率為 0.08，而木糖發酵中的生物質與乙醇產量分別為 0.086 g ± 0.01 生物質與 0.40 g ± 0.01 乙醇。為了進一步研究 PMR1 的基因缺失對於 IMX906 菌株在利用木糖瞬間厭氧生長的影響，野生型 PMR1 等位基因 (allele) 被重新嵌入該菌株中，得到的 IMX979 菌株在生物反應器培養顯示超過 250 小時的滯後期，從而證實了 PMR1 的基因缺失對於基因改造後 *S. cerevisiae* 在厭氧條件下利用木糖生長的能力扮演著關鍵作用。

為了探討金屬離子與 PMR1 基因改造後 *S. cerevisiae* 利用木糖厭氧生長之間的可能關係，本研究使用質譜法分析了細胞內 Ca²⁺、Mn²⁺、Mg²⁺、及 Fe²⁺ 的濃度。發現各菌株間 Mg²⁺、Ca²⁺ 及 Fe²⁺ 的含量相似，但 Mg²⁺ 含量與 Ca²⁺ 及 Fe²⁺ 有巨大差異。在具有野生型 PMR1 等位基因的菌株中，Mn²⁺ 含量不到所測總金屬離子的 0.2%，另外，在具有突變 PMR1 等位基因菌株中的 Mn²⁺ 含量比野生型 PMR1 等位基因菌株高 12 至 29 倍，無論它們是在木糖上生長還是在葡萄糖上生長 (Table 2)。結果也顯示 PMR1 的突變影響 Mn²⁺ 的胞內含量而不影響 Ca²⁺ 的胞內含量，這與先前的研究結果一致 (Yu *et al.* 2012)。

在含有 SMD 培養基的搖瓶分別以有氧及厭氧培養後，在菌株 IMX906 (*pmr1Δ*) 及其母菌株 IMX696 的細胞抽取物中測定 XI 活性。在酵素活性測定實驗中添加 Mn^{2+} 比在沒有添加金屬離子的情況下具有更高的 XI 活性。相反地，添加 Ca^{2+} 反而導致酵素活性降低。將酵素純化後測定 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、及 Mn^{2+} 的金屬離子含量，與 Mg^{2+} 存在下 XI 之比活性 (Table 3)。菌株 IMX906 利用木糖與葡萄糖培養，於木糖培養所表現出的 XI 活性較葡萄糖高，而且於純化酵素液添加 1 mM $MgCl_2$ 顯示了其對酵素活性的促進作用。

四、探討在醋酸壓力下錳離子對於可表現木糖異構酶之 *Saccharomyces cerevisiae* 乙醇發酵的影響

為探討在醋酸的存在下，*S. cerevisiae* SXA-R2P-E 在分別含有葡萄糖與木糖培養基的搖瓶於 pH 5 發酵培養，所表現之 XI 的生長及發酵情況 (Fig. 5, Table 4)。在不存在醋酸的情況下，葡萄糖 (Fig. 5a) 與木糖 (Fig. 5c) 的生長速率分別為 0.19/hr 與 0.07/hr，而加入 10 g/L 醋酸後，以葡萄糖發酵的 *S. cerevisiae* 生長速率略有下降 (Fig. 5b)，而隨著醋酸濃度的增加，發酵產生之生物質產量與甘油產率降低 (Table 4)。其中，在 5 g/L 醋酸下觀察到葡萄糖消耗速率些微增加，此結果顯示中等濃度的醋酸會刺激乙醇產量與葡萄糖消耗率，然而，10 g/L 醋酸的存在對葡萄糖發酵有顯著抑制作用。與利用葡萄糖發酵相比，醋酸對木糖發酵的影響嚴重許多 (Fig. 5c-f)。在高醋酸條件下 (5 g/L 與 10 g/L 醋酸，pH 5)，細菌在木糖發酵中生長最少，生長速率為 0.01 - 0.02/hr，僅為對照組的 14-29% (0.07/hr)。在醋酸的存在下，乙醇產率降低多達 33%，木糖消耗率降低了 87.5%。很明顯地，木糖發酵受到醋酸的強烈抑制。

為了降低醋酸的抑制作用，利用添加三種不同濃度的金屬離子來研究金屬離子的補充對木糖發酵的影響 (0.2 - 0.5 mM $MnSO_4$ 、0.1 - 0.2 mM $ZnSO_4$ 與 1-2 mM $CaCl_2$)。在添加三種二價金屬離子情況下，僅錳離子顯示出在醋酸壓力下有顯著提高木糖消耗效率 (Fig. 6)。此外，更測定了在發酵效率較好的金屬離子濃度下 XI 活性 (Fig. 7)，與對照組相比，在 0.2 mM Mn^{2+} 存在下，*S. cerevisiae* SXA-R2P-E 表現之 XI 活性增加了 1.4 倍，而添加 0.1 mM 的 Zn^{2+} 使酵素活性抑制了 20%。雖然已知 Zn^{2+} 在醋酸壓力下保護細胞免受活性氧 (ROS) 的影響而提高細胞活力 (Wan *et al.* 2015)，但其對 XI 活性的抑制可能會降低其對細胞耐受性的正面影響。

隨著醋酸濃度從 0 增加至 5 g/L，添加 0.2 mM $MnSO_4$ 使木糖消耗量分別增加了 2.9、9.5、24.3、及 25.7% (Fig. 8a)。如 Fig. 5b 所示，木糖最佳 Mn^{2+} 消耗效率的濃度為 0.1 mM。使用木質纖維素水解產物 (稻草水解產物) 了解 Mn^{2+} 對乙醇發酵的影響，在發酵營養物添加後，發酵培養基由 37.5 g/L 葡萄糖、27 g/L 木糖、1.65 g/L 醋酸、1.2 g/L 酚類與 0.6 g/L 糠醛 (furfural) 組成，並另外測試了標準糖混合物 (39.1 g/L 葡萄糖與 26.8 g/L 木糖) 與 1.5 g/L 醋酸於 0.1 mM Mn^{2+} 補充下的發酵 (Fig. 9)。標準糖混合物的木糖消耗量在 96 小時後

達到 77.3% (Fig. 9d)，與不含 Mn^{2+} 的相比，消耗量增加了 29% (Fig. 9c)，然而，在 Fig. 9 中沒有觀察到木質纖維素水解產物的發酵在錳離子存在下，發酵效率有顯著變化。雖然醋酸壓力下標準糖混合物中 *S. cerevisiae* SXA-R2P-E 的發酵性能通過添加錳離子得到改善，但是該方法對於含有多種抑制劑的實際水解產物並沒有顯著效果。除了 1.65 g/L 的醋酸外，本研究使用的稻草水解產物含有 1.2 g/L 的酚類與 0.6 g/L 的糠醛，這可能使 Mn^{2+} 對發酵的影響複雜化。

五、結論

1. 從牛瘤胃總體基因庫中分離的 Ru-xylA 基因於 *S. cerevisiae* 中表現出較高的活性，並且其活性高於來自 *Piromyces* sp. 的 XI。
2. Ru-XI 經基因突變為 Ru-XI (K11T/D220V) 後於 *S. cerevisiae* BSPX042 所表現之 XI 具有最高活性。
3. PMR1 的基因剔除使得 *S. cerevisiae* 可於含有木糖的培養基上厭氧生長，添加 Mn^{2+} 可提高 XI 的活性。
4. 在醋酸壓力下， Mn^{2+} 的添加使木糖發酵的木糖消耗率提高，並且可以有效減輕醋酸壓力。

參考文獻

- Alper H., Stephanopoulos G.** (2009). Engineering for biofuels: exploiting innate microbial capacity or importing biosynthetic potential? *Nature Reviews Microbiology*, 7, 715–723.
- Hahn-Hägerdal B., Wahlbom C. F., Gárdonyi M., Van Zyl W. H., Otero R. R. C., Jönsson L. J.** (2001). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization. *Metabolic Engineering*, pp. 53-84.
- Hou J., Shen Y., Jiao C., Ge R., Zhang X., Bao X.** (2015). Characterization and evolution of xylose isomerase screened from the bovine rumen metagenome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 121(2), 160-165.
- Jeffries T. W.** (1983). Utilization of xylose by bacteria, yeasts, and fungi. *Pentoses and Lignin*, pp. 1-32.
- Jeffries T. W.** (2006). Engineering yeasts for xylose metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(3), 320–326.
- Ko J. K., Um Y., Lee S. M.** (2016). Effect of manganese ions on ethanol fermentation by xylose isomerase expressing *Saccharomyces cerevisiae* under acetic acid stress. *Bioresource Technology*, 222, 422-430.
- Kötter P., Ciriacy M.** (1993). Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38(6), 776–783.
- Lee S. M., Jellison T., Alper H. S.** (2012). Directed evolution of xylose isomerase for improved xylose catabolism and fermentation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), 5708-5716.
- Runquist D., Hahn-Hägerdal B., Bettiga, M.** (2010). Increased ethanol productivity in xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* via a randomly mutagenized xylose reductase. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(23), 7796–7802.
- Van Maris A. J., Abbott D. A., Bellissimi E., Van Den Brink J., Kuyper M., Luttik M. A., Wisselink H. W., Scheffers W. A., Van Dijken J. P., Pronk J. T.** (2006). Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 90(4), 391-418.
- Verhoeven M. D., Lee M., Kamoen L., Van Den Broek M., Janssen D. B., Daran J. M. G., Van Maris A. J., Pronk J. T.** (2017). Mutations in PMR1 stimulate xylose isomerase activity and anaerobic growth on xylose of engineered *Saccharomyces cerevisiae* by influencing manganese homeostasis. *Scientific Reports*, 7:46155.
- Wan C., Zhang M., Fang Q., Xiong L., Zhao X., Hasunuma T., Bai F., Kondo A.** (2015). The impact of zinc sulfate addition on the dynamic metabolic profiling of *Saccharomyces cerevisiae* subjected to long term acetic acid stress treatment and

identification of key metabolites involved in the antioxidant effect of zinc. *Metallomics*, 7(2), 322–332.

Wang P. Y., Schneider H. (1980). Growth of yeasts on D-xylulose. *Canadian Journal of Microbiology*, 26(9), 1165–1168.

Watanabe S., Saleh A. A., Pack S. P., Annaluru N., Kodaki T., Makino K. (2007). Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein-engineered NADH-preferring xylose reductase from *Pichia stipitis*. *Microbiology*, 153(9), 3044-3054.

Yu D., Danku J. M., Baxter I., Kim S., Vatamaniuk O. K., Vitek O., Ouzzani M., Salt D. E. (2012). High-resolution genome-wide scan of genes, gene-networks and cellular systems impacting the yeast ionome. *BMC Genomics*, 13(1), 623.

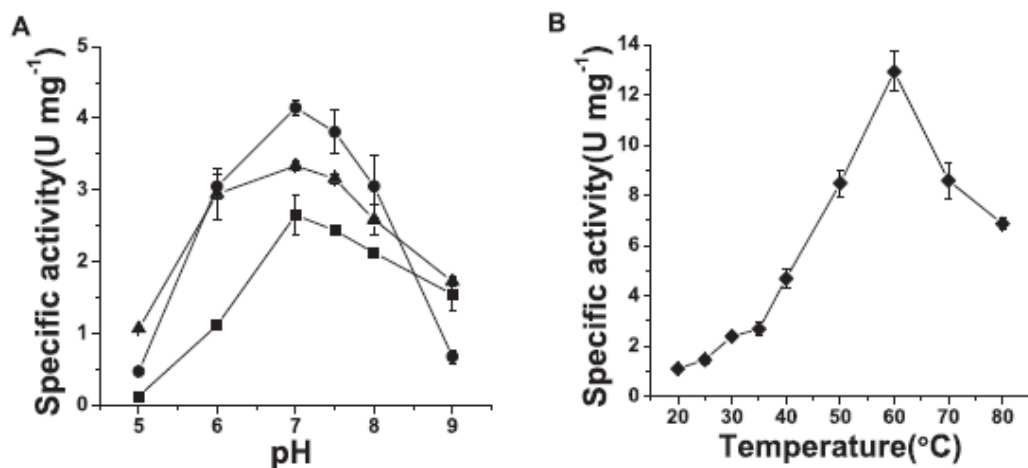


Fig. 1. Properties of Ru-XI. The effects of pH and divalent metal ions (A) were measured at 30°C. The optimum temperature (B) was determined at a pH of 7.5, and Mg²⁺ was added in the reaction mixture. The experiments were performed in duplicate trials. (A) Squares, Mg²⁺; circles, Mn²⁺; and triangles, Co²⁺.

(Hou *et al.* 2015)

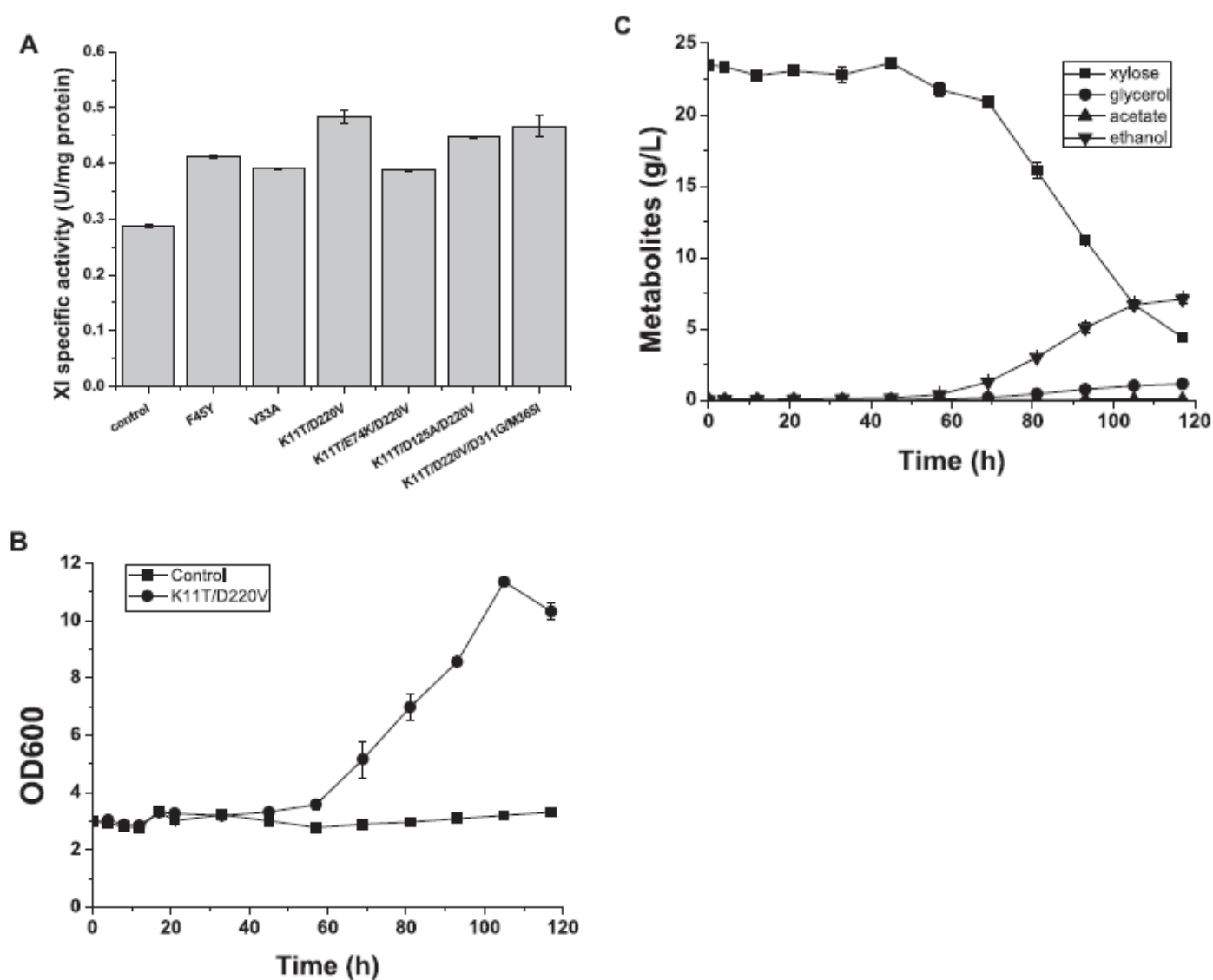


Fig. 2. (A) The enzyme activities of Ru-XI mutants. (B) The growth curves of the strains containing Ru-xylA or Ru-xylA K11T/D220V in the centromeric plasmid. Symbols: squares, the strain containing Ru-XI; circles, the strain containing Ru-XI K11T/D220V. (C) The fermentation profile of Ru-xylA K11T/D220V in the centromeric plasmid. Symbols: squares, xylose; circles, glycerol; triangles, acetate; and inversed triangles, ethanol.

(Hou *et al.* 2015)

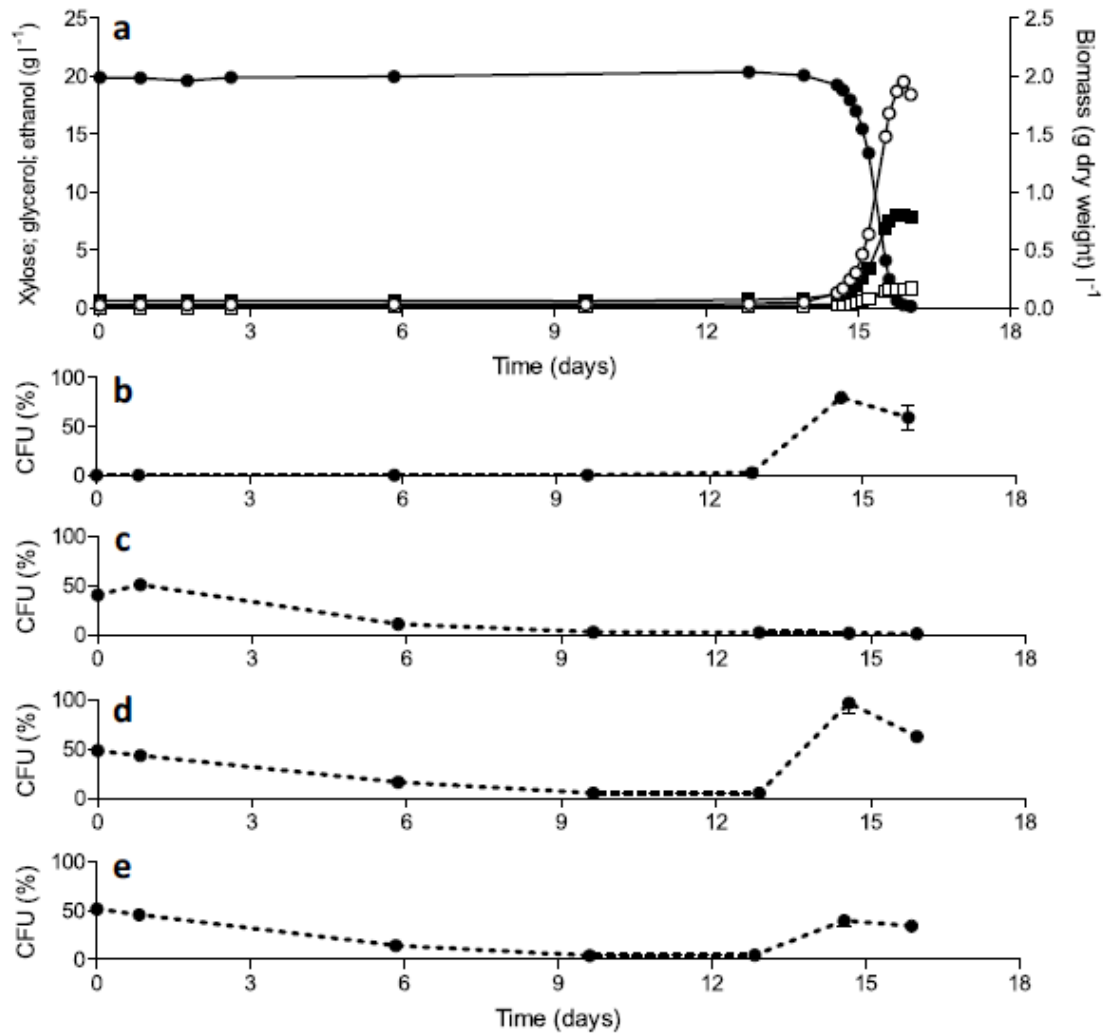


Fig. 3. Anaerobic growth of *S. cerevisiae* IMX696 (xylA, PPP $\uparrow$, XKS1 $\uparrow$) on xylose requires a prolonged adaptation period. (a) Growth, xylose consumption and product formation after inoculation of aerobically pregrown cells in anaerobic bioreactors containing synthetic medium with xylose (20 g l⁻¹). Symbols: ● , xylose, ■ , ethanol, ○ , biomass, □ , glycerol. (b) Colonyforming units (CFU) on anaerobically incubated xylose medium reflect adaptation to growth on xylose in the absence of oxygen. (c) CFU on aerobically incubated xylose medium reflect trade-off between aerobic and anaerobic growth on xylose. (d) and (e) CFU on anaerobically and aerobically incubated glucose medium, respectively, showing that oxygen sensitivity of cells adapted to anaerobic growth on xylose is not carbon-source dependent.

(Maarten *et al.* 2017)

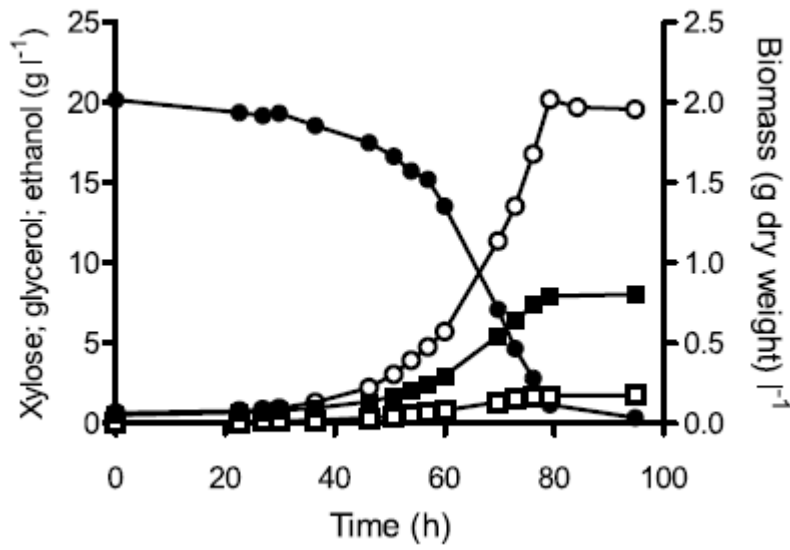


Fig. 4. Deletion of PMR1 enables anaerobic growth on xylose of engineered *S. cerevisiae* without prior adaptation phase. Growth and product formation of *S. cerevisiae* strain IMX906 (xylA, PPP $\uparrow$, XKS1 $\uparrow$, pmr1 Δ) on xylose (20 g/L) in anaerobic bioreactors. Symbols: $\bullet$, xylose; $\blacksquare$, ethanol; $\circ$, biomass; $\square$, glycerol. The data shown are from one of two independent replicates.

(Maarten *et al.* 2017)

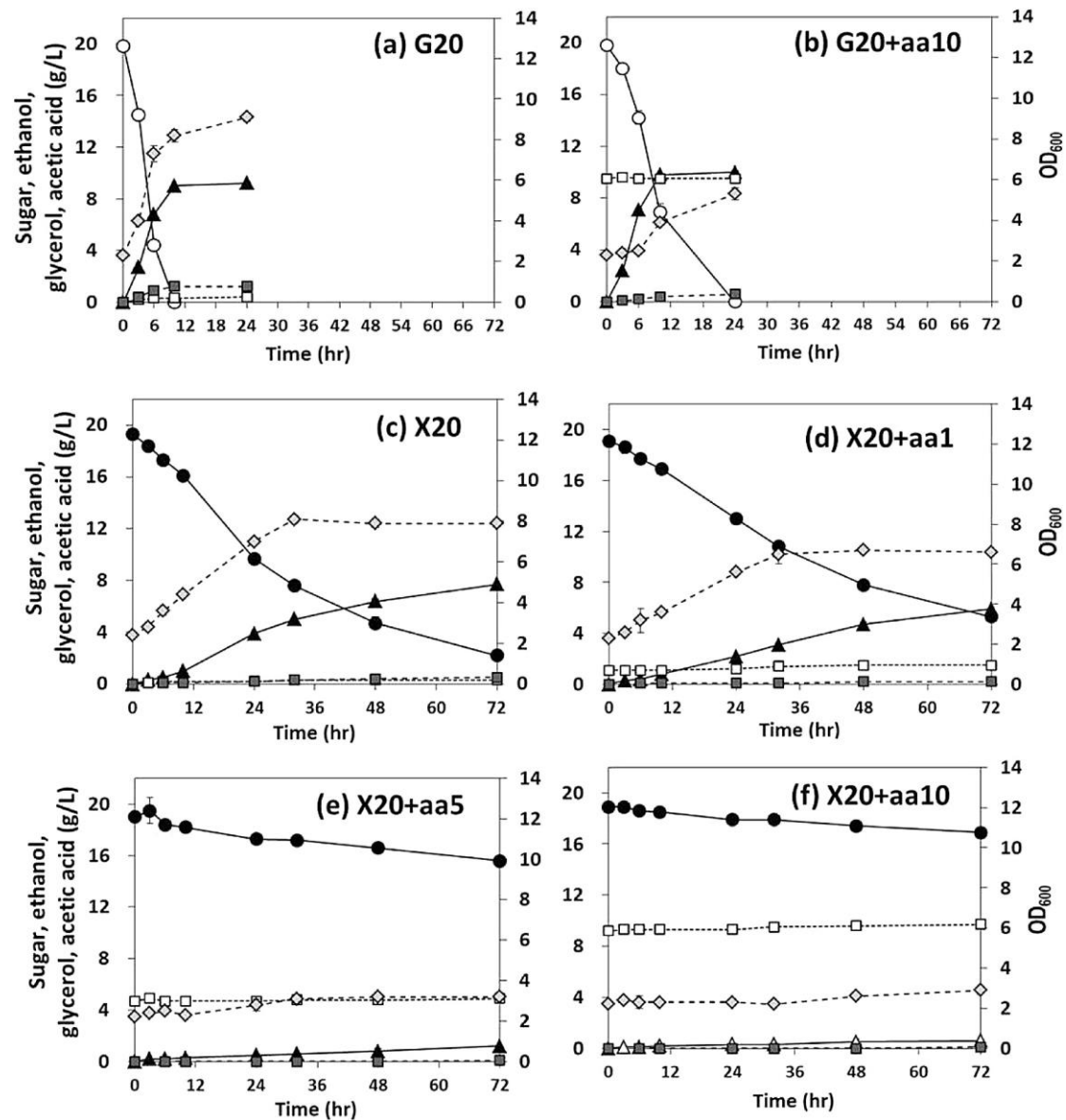


Fig. 5. Effect of acetic acid on the single sugar fermentation by SXA-R2P-E at pH 5. The glucose (a and b) and xylose (c – f) fermentations were carried out in the presence of (a & c) 0 g/L acetic acid; (d) 1 g/L acetic acid; (e) 5 g/L acetic acid; and (b & f) 10 g/L acetic acid. The fermentation was initiated with a low cell density (initial OD₆₀₀ = 2) at 30°C, pH 5, and 200 rpm under a microaerobic condition (symbols: (○) glucose; (●) xylose; (▲) ethanol; acetic acid (□); glycerol (■); OD₆₀₀ (◇)). Each experiment was performed in triplicate, and the error bars indicate the standard deviation of the mean of triplicate values.

(Ko *et al.* 2016)

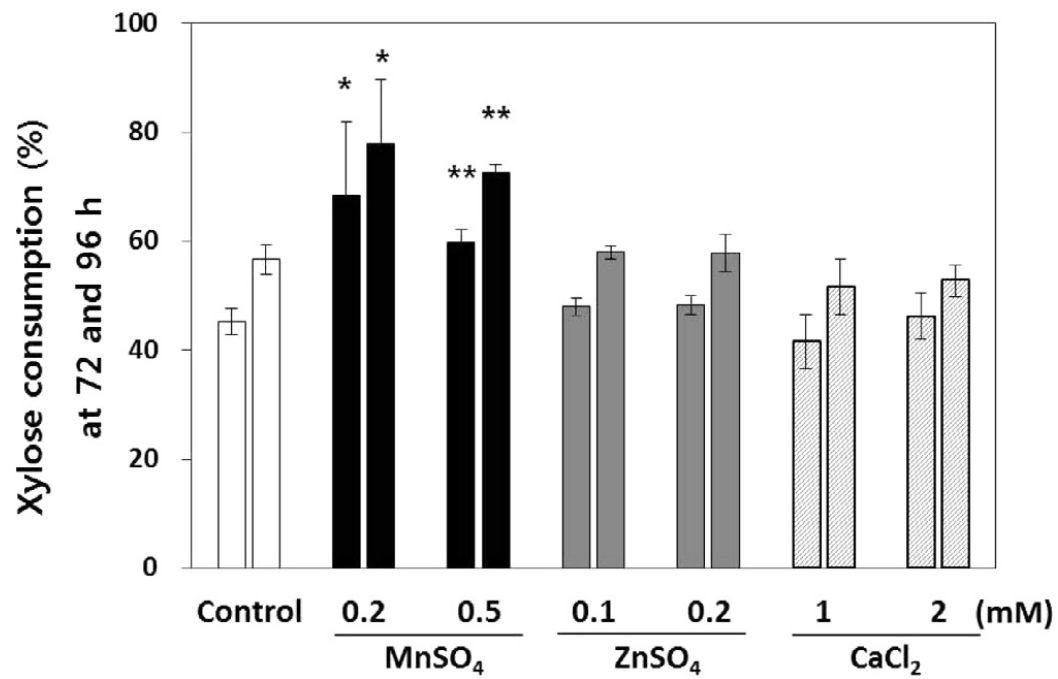


Fig. 6. Effects of metal ion supplementation on xylose consumption after 72 (left bar) and 96 h (right bar) under 2 g/L acetic acid stress. Each experiment was performed in triplicate, and the error bars indicate the standard deviation of the mean of triplicate values. Metal ion supplemented groups were compared with the control groups by using unpaired Student's t-test (two tailed, $n = 3$); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs controls.

(Ko *et al.* 2016)

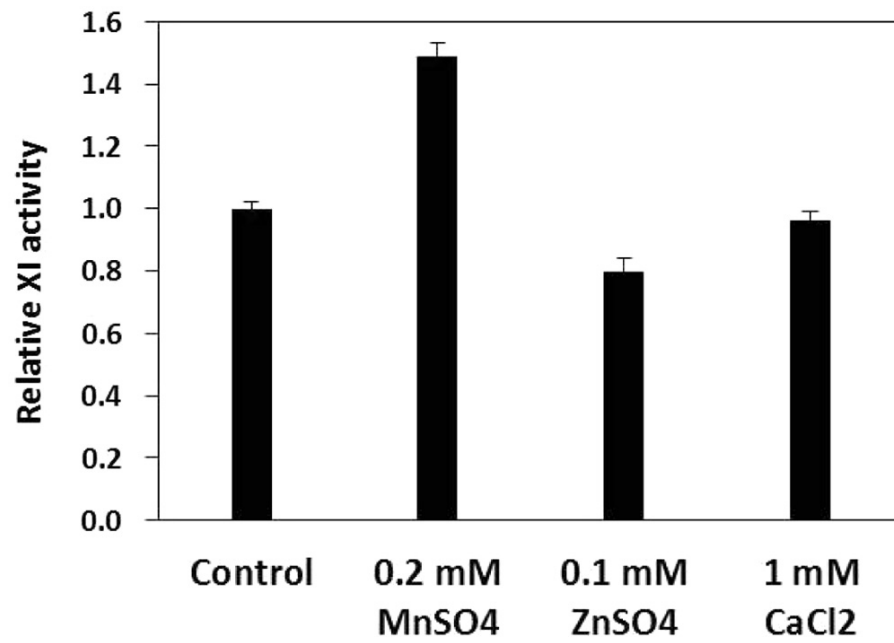


Fig. 7. Effect of different metal ions on xylose isomerase activity. Relative activities compared to the control (without metal ion) are presented. Enzyme assays were performed using cell extracts prepared from three independent cultures.

(Ko *et al.* 2016)

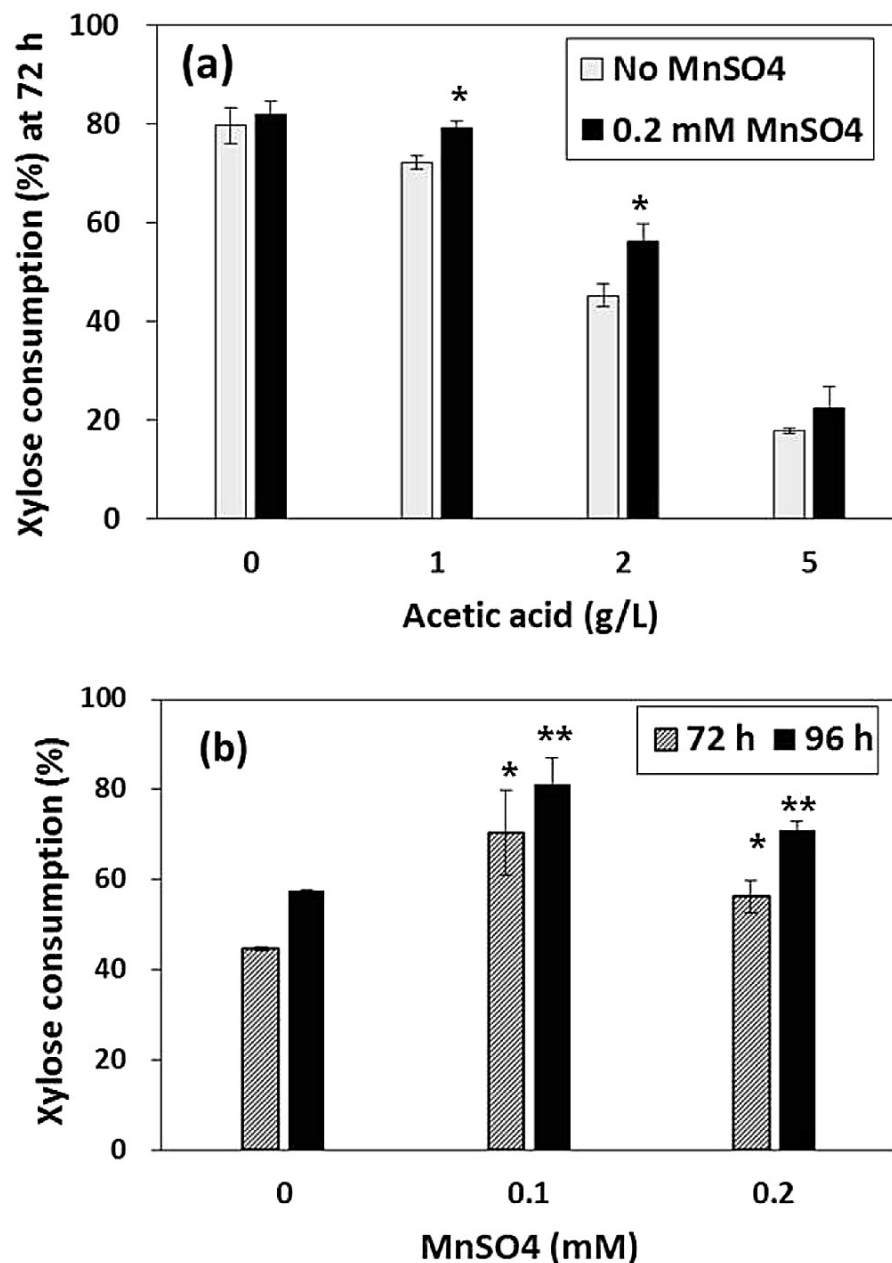


Fig. 8. Effect of concentrations of acetic acid and manganese ions on xylose consumption. (a) Effect of 0.2 mM manganese ion on xylose consumption in the presence of different acetic acid concentrations (0, 1, 2 and 5 g/L of acetic acid); (b) Effect of manganese ion concentrations (0, 0.1 and 0.2 mM) on xylose consumption under 2 g/L acetic acid stress. Manganese ion supplemented groups were compared with the control groups (no MnSO₄) by using unpaired Student's t-test (two tailed, $n = 3$); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs controls.

(Ko *et al.* 2016)

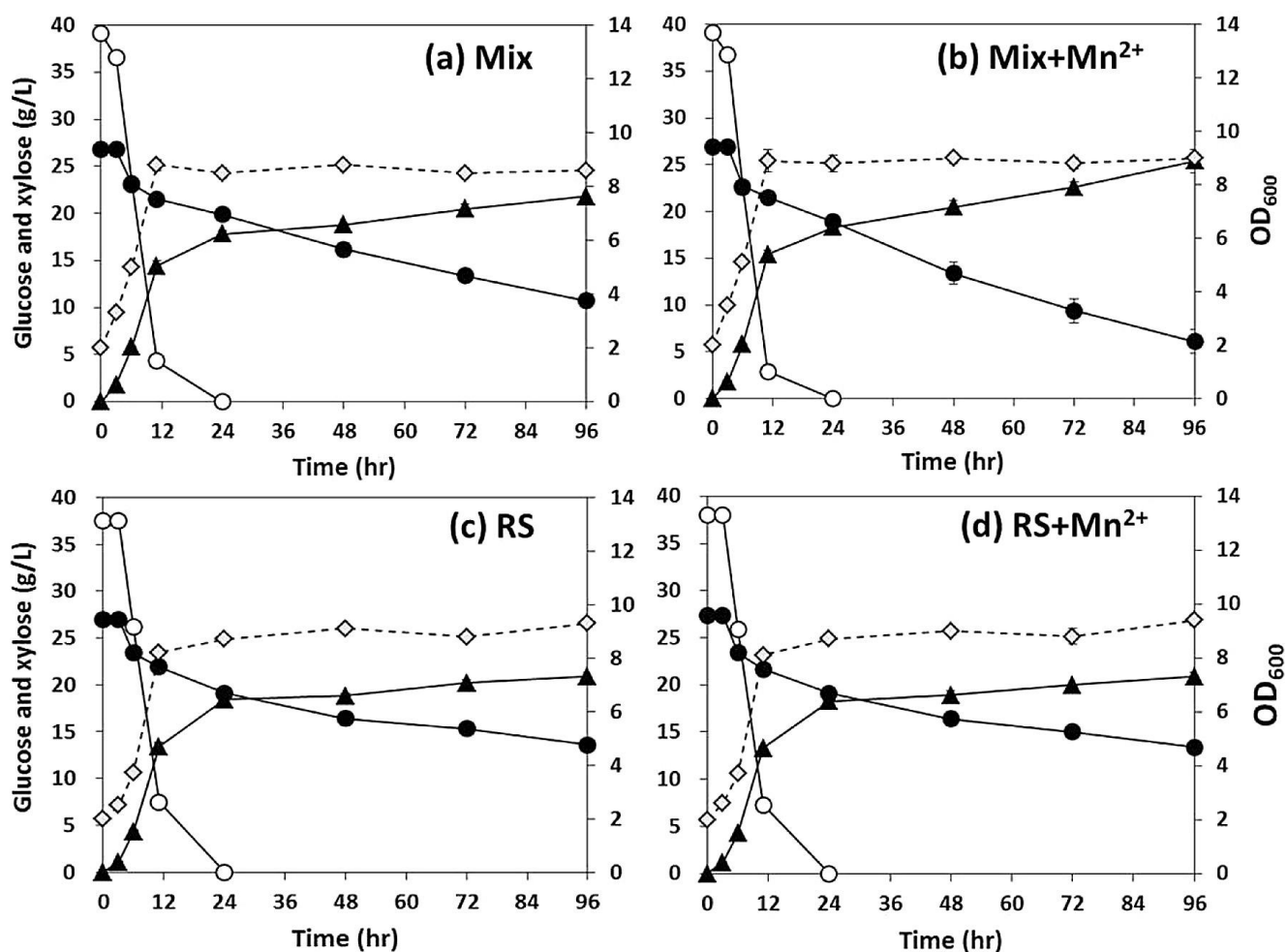


Fig. 9 . Effect of manganese ions on co-fermentation of (a and b) mixed sugars of glucose and xylose in the presence of 1.5 g/L of acetic acid and of (c and d) rice straw hydrolysates. The co-fermentations were carried out in the mixed sugars without (a) and with (b) 0.1 mM MnSO₄ and in the rice straw hydrolysates without (c) and with (d) 0.1 mM MnSO₄, respectively. The fermentation was initiated with a low cell density (initial OD₆₀₀ = 2) at 30 °C , pH 5, and 200 rpm under a microaerobic condition (symbols:(○) glucose; (●) xylose; (▲) ethanol). Each experiment was performed in triplicate, and the error bars indicate the standard deviation of the mean of triplicate values.

(Ko *et al.* 2016)

TABLE 1. The enzyme activity and kinetics of four xylose isomerases expressing in *S. cerevisiae* and *E. coli*.

Resource	Enzyme activity (U mg ⁻¹ protein)	K _m (mM)	K _{cat} (min ⁻¹)
Expression xylose isomerase in <i>S. cerevisiae</i>			
Bovine rumen	6.02	16.8	1296
<i>Piromyces</i> sp. E2	5.18	12.9	469
<i>S. cellulosum</i>	3.57	17.2	159
<i>E. coli</i>	—	—	—
Expression xylose isomerase in <i>E. coli</i>			
Bovine rumen	3.03	n.m.	n.m.
<i>Piromyces</i> sp. E2	3.36	n.m.	n.m.
<i>S. cellulosum</i>	0.12	n.m.	n.m.
<i>E. coli</i>	2.77	n.m.	n.m.

n.m., the value was not measured.

(Hou *et al.* 2015)

Table 2. Impact of the deletion of PMR1 on intracellular metal ion concentrations. *S. cerevisiae* strains were grown in anaerobic bioreactors on xylose or glucose (20 g l⁻¹). Data represent average and mean deviation calculated from analyses on independent duplicate cultures.

<i>S. cerevisiae</i> strain (relevant genotype)	Carbon source	$\mu\text{mol (g dry biomass)}^{-1}$				
		Mg ²⁺	Ca ²⁺	Fe ²⁺	Mn ²⁺	Total
IMX696 (<i>xylA</i> , <i>PPP</i> [↑] , <i>XKS1</i> [↑])	glucose	60 ± 1	8.8 ± 1.6	0.56 ± 0.02	0.069 ± 0.001	69 ± 2
IMX906 (<i>xylA</i> , <i>PPP</i> [↑] , <i>XKS1</i> [↑] , <i>pmr1</i> Δ)	glucose	64 ± 1	12 ± 2	0.51 ± 0.02	1.2 ± 0.1	77 ± 2
IMX906 (<i>xylA</i> , <i>PPP</i> [↑] , <i>XKS1</i> [↑] , <i>pmr1</i> Δ)	xylose	50 ± 1	4.0 ± 0.7	0.36 ± 0.01	1.4 ± 0.1	56 ± 1
CEN.PK113-7D (reference strain)	glucose	61 ± 1	6.8 ± 1.3	0.44 ± 0.01	0.046 ± 0.001	68 ± 2
IMK692 (<i>pmr1</i> Δ)	glucose	72 ± 1	6.7 ± 1.2	0.46 ± 0.02	0.86 ± 0.06	80 ± 2

(Maarten *et al.* 2017)

Table 3. Impact of PMR1 deletion on metal content and activity of XylA. XylA protein was isolated from *S. cerevisiae* cultures grown on xylose or glucose (20 g/L) in anaerobic bioreactors. Data represent average and mean deviation of analyses on XylA isolated from independent duplicate cultures.

<i>S. cerevisiae</i> strain (relevant genotype)	Carbon source	mol metal/mol XylA monomer				Sp. activity (U/mg XylA protein)	
		Mg ²⁺	Ca ²⁺	Fe ²⁺	Mn ²⁺	no metal added	Mg ²⁺ added (1 mM)
IMX906 (<i>xylA</i> , PPP ⁺ , <i>XKS1</i> ⁺ , <i>pmr1</i> Δ)	xylose	0.18 ± 0.01	0.54 ± 0.11	0.06 ± 0.01	0.38 ± 0.04	2.39 ± 0.61	2.68 ± 0.5
IMX906 (<i>xylA</i> , PPP ⁺ , <i>XKS1</i> ⁺ , <i>pmr1</i> Δ)	glucose	0.20 ± 0.06	0.66 ± 0.07	0.064 ± 0.02	0.30 ± 0.03	1.35 ± 0.14	2.10 ± 0.1
IMX696 (<i>xylA</i> , PPP ⁺ , <i>XKS1</i> ⁺)	glucose	0.22 ± 0.06	0.93 ± 0.41	0.086 ± 0.04	0.017 ± 0.004	0.60 ± 0.24	1.68 ± 0.1

(Maarten *et al.* 2017)

Table 4. Summary of glucose and xylose fermentation profiles of SXA-R2P-E under different fermentation conditions varying acetic acid concentrations.

Substrate	Glucose				Xylose			
Acetic acid (g/L)	0	1	5	10	0	1	5	10
Growth rate (h^{-1})	0.19	0.19	0.14	0.11	0.07	0.06	0.02	0.01
Biomass yield (g biomass/g sugar)	0.06	0.05	0.04	0.03	0.05	0.05	0.05	0.05
Ethanol yield (g ethanol/g sugar)	0.45	0.5	0.49	0.51	0.45	0.43	0.35	0.3
Sugar consumption rate (g/L/h)	2.57	2.72	2.5	0.93	0.24	0.19	0.05	0.03
Ethanol productivity (g/L/h)	0.90	0.98	0.98	0.42	0.11	0.08	0.02	0.01
Glycerol (g/L)	1.2	0.9	0.6	0.6	0.5	0.21	0.07	0.05
Glycerol yield (g glycerol/g sugar)	0.06	0.05	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.03
Final ethanol titer (g/L)	9	9.8	9.8	10.1	7.7	5.9	1.2	0.6

(Ko *et al.* 2016)