



Contents lists available at ScienceDirect

バイオリソース技術

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biortech



におけるグルコース、キシロース、キシシルロース共発酵の動的フラックスバランスモデルとボトルネックの同定。



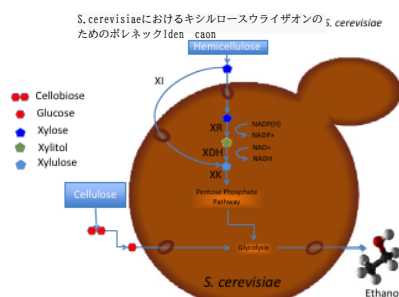
William Hohenschuh^a, Ronald Hector^b, Ganti S. Murthy^{a,*}

米国オレゴン州立大学^b

HIGHLIGHTS

- Xylulose utilization limited by phosphorylation by xylulokinase in wt *S. cerevisiae*.
- 輸送はキシロキナーゼ強化株のキシロース利用を制限する。
- セレビスエのキシロース輸送を担うトランスポーターHXTファミリー。
- 細胞死を考慮することで、バッチ発酵のモデリング時間が改善された。

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 November 2014
Received in revised form 4 February 2015
Accepted 5 February 2015
Available online 20 February 2015

Keywords:

Xylose
Cellulosic ethanol
Fermentation
Pentose
Flux balance analysis

ABSTRACT

バッチ発酵とゲノム規模のフラックスバランス解析を組み合わせ、キシロースの輸送および利用経路における速度制限反応を同定し、定量化した。野生型*Saccharomyces cerevisiae*では、キシロキナーゼによるキシロースのリン酸化が制限的であることが同定されたが、キシロキナーゼがアップレギュレートされると輸送が制限的になった。さらなる実験により、非特異的グルコーストランスポーターのHXTファミリーを介したキシロース輸送が示された。HXTの発現によって制御される改良された可変糖取り込み制約を含む、ゲノムスケールのフラックスバランスモデルが開発された。モデル予測は実験的なキシロース利用率とほぼ一致し、輸送とキシロキナーゼの制約の組み合わせが*S. cerevisiae*のキシロース利用制限を説明するのに十分であることを示唆した。

© 2015 Elsevier Ltd. 02015年Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

リグノセルロース系エタノールは、米国で消費される液体燃料の大部分を代替する可能性を秘めているが、バイオ燃料の採用は、GHG排出量削減の願望よりも経済性によって推進されるだろう。リグノセルロース系エタノール生産の技術経済学的分析では、

原料コストがエタノール生産コストの最大要因の一つとなっている (Sassner et al.) したがって、エタノールを従来の化石輸送用燃料の生産と経済的に競争できるようにするには、原料の糖分を効率よく完全にエタノールに変換する必要がある。

リグノセルロース系バイオマスに含まれるヘキソース糖は*Saccharomyces cerevisiae*によって容易に発酵可能であるが、ヘミセルロース由来のペントース糖は発酵しにくい。ヘミセルロース糖の発酵に成功すれば、エタノール収量は最大40%増加し、製造コストは22%以上減少する (Kumar et al.) この収量増加を実現する1つの方法は、細胞外酵素を用いて主要な五炭糖 (キシロース) をより利用しやすい形態 (キシシルロース) に変換することである。

* Corresponding author at: 116 Gilmore Hall, Corvallis, OR 97331, United States. Tel.: +1 541 737 6291.

E-mail address: MurthyG@ONID.OregonState.EDU (G.S. Murthy).



A dynamic flux balance model and bottleneck identification of glucose, xylose, xylulose co-fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*



William Hohenschuh^a, Ronald Hector^b, Ganti S. Murthy^{a,*}

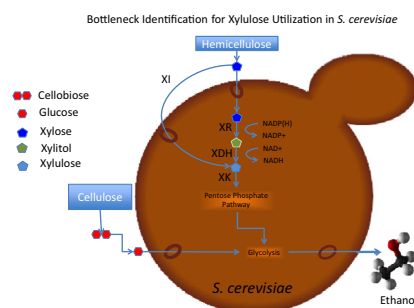
^a Oregon State University, United States

^b USDA, ARS, NCAUR, United States

HIGHLIGHTS

- Xylulose utilization limited by phosphorylation by xylulokinase in wt *S. cerevisiae*.
- Transport limits xylulose utilization in xylulokinase enhanced strains.
- HXT family of transporters responsible for xylulose transport in *S. cerevisiae*.
- Accounting for cell death produces improved modeling fit of batch fermentation.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 November 2014

Received in revised form 4 February 2015

Accepted 5 February 2015

Available online 20 February 2015

Keywords:

Xylose

Cellulosic ethanol

Fermentation

Pentose

Flux balance analysis

ABSTRACT

A combination of batch fermentations and genome scale flux balance analysis were used to identify and quantify the rate limiting reactions in the xylulose transport and utilization pathway. Xylulose phosphorylation by xylulokinase was identified as limiting in wild type *Saccharomyces cerevisiae*, but transport became limiting when xylulokinase was upregulated. Further experiments showed xylulose transport through the HXT family of non-specific glucose transporters. A genome scale flux balance model was developed which included an improved variable sugar uptake constraint controlled by HXT expression. Model predictions closely matched experimental xylulose utilization rates suggesting the combination of transport and xylulokinase constraints is sufficient to explain xylulose utilization limitation in *S. cerevisiae*.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Lignocellulosic ethanol has the potential to displace the bulk of liquid fuels consumed in the US, but the adoption of biofuels will be driven more by economics than by the desire to decrease GHG emissions. Techno-economic analyses of lignocellulosic ethanol production have the cost of raw feedstocks to be one of the largest contributing factors to ethanol production cost (Sassner et al.,

2008; Wingren et al., 2003). An efficient and complete conversion of feedstock sugars to ethanol is therefore required to make ethanol economically competitive with the production of conventional fossil transportation fuels.

Hexose sugars found in lignocellulosic biomass are readily fermentable by *Saccharomyces cerevisiae*, but the pentose sugar derived from hemicellulose is less readily fermentable. Successful fermentation of the hemicellulose sugars would increase ethanol yield by up to 40% and decrease production cost by upwards of 22% (Kumar et al., 2012). One method to capture this yield increase is to convert the main pentose sugar (xylose) to a more readily utilized form (xylulose) using an extracellular enzyme. Extracellular

* Corresponding author at: 116 Gilmore Hall, Corvallis, OR 97331, United States. Tel.: +1 541 737 6291.

E-mail address: MurthyG@ONID.OregonState.EDU (G.S. Murthy).

細胞外キシロースは*S. cerevisiae*によって80%以上の効率で利用される (Gongら、1981)。キシロースは野生型*S. cerevisiae*に取り込まれ、キシロキナーゼ (XK) によってキシロース-5-リン酸に変換され、ペントースリン酸経路を通じて最終的にエタノールを生産する。この経路での利用は遅く、*S. cerevisiae*のグルコース消費速度 ($4\text{g/gDCW} \cdot \text{h}$) より約1~2桁遅い (Sonnleitner and Kappeli, 1986)。利用速度が遅いと、発酵槽の大型化、発酵期間の延長、酵母負荷の増加などの組み合わせが必要となり、生産コストが増加する。利用率を高めるには、酵素的および輸送的なボトルネックの可能性を理解する必要がある。キシロキナーゼ能力の制約による酵素的ボトルネックを拡大するための以前の研究では、エタノール生産速度が1時間当たり乾燥細胞重量1グラム当たり0.04グラムから0.23グラム ($\text{g/gDCW} \cdot \text{h}$) に増加した (Leeら、2003)。下流のペントースリン酸経路酵素の能力を高めることを目的とした他の研究では、利用率が0.09から0.22 $\text{g/gDCW} \cdot \text{h}$ に増加した (Johansson and Hahn-Hägerdal, 2002; Matsushika et al.)

0.23 $\text{g/gDCW} \cdot \text{h}$ を超える収量を増加させる酵素修飾の能力は実証されていない。これは、輸送が限界反応となったためであろう。*S. cerevisiae*におけるキシロース輸送はよく理解されていないが、キシロース輸送はより広範に研究されている (Hotta et al., 2009; Runquist et al., 2010; Sedlak and Ho, 2004; Tanino et al., 2010)。*S. cerevisiae*はキシロース特異的トランスポーターを持たず、キシロースはヘキソーストランスポーターを介した輸送においてヘキソース糖と競合する。キシロースの輸送は、その異性体であるキシロースと同様のトランスポーターと輸送メカニズムを利用している可能性がある。

キシロース輸送をモデル化する一つの試みは、*S. cerevisiae*のヘキソーストランスポーターファミリー (HXTファミリー) を介したキシロースの輸送に焦点を当てたものであった (Bertilsson et al.)。個々のHXTトランスポーターの既知の発現パターンと輸送速度論に基づいたODE系を用い、このモデルはキシロース/グルコース混合発酵における糖の消費を正確に表現することができた (Bertilsson et al.)。同様の輸送経路を仮定すると、同じ手法でキシロース輸送の背後にあるメカニズムを特徴付けることができる。フラックスバランス解析 (FBA) は制約ベースのモデリングの一種で、物理的または化学的制約を用いて、ネットワークを通過する流束のすべての許容セットを定義する。制約に基づく解析では、系が定常状態 (代謝物が蓄積しておらず、流束が一定) であり、すべての物理化学的制約 (反応速度が許容範囲内にあり、すべての反応で使用される代謝物が実際に利用可能) を満たしていると仮定します。フラックスバランス解析については、他の研究でも詳しく述べられている (Kauffman et al.)

本研究は、*S. cerevisiae*におけるキシロース利用における酵素的および輸送的ボトルネックの同定を試みたものである。キシロースの輸送機構について、Bertilssonの糖取り込み近似手法とフラックスバランスアプローチを併用することで、ボトルネックとなる因子の同定を試みた。

2. Methods

2.1. 発酵実験

2.1.1. Yeast strains

菌株名、遺伝子型、および記述子を表1に示す。この研究では、親株CEN.PK2-1Cから開発された5株を使用した。これらの5株に含まれるのは、空ベクター対照株 (野生型またはYRH524として参照)、XKをコードする低コピープラスミドを含む株 (低強化型またはYRH857として参照)、XKをコードする高コピープラスミドで修飾した株 (高強化型XKまたはYRH858として参照) である。HXTトランスポーター1-7をノックアウトした野生型株 (野生型HXTノックアウト株またはYRH1153)、高コピーXK強化HXTノックアウト株 (高コピーHXTノックアウト株またはYRH1154)。

HXT1~HXT7を欠失したYRH1087株を作出するため、CEN.PK21Cを、HXT遺伝子を選択可能マーカーで置換することを指示するPCR生成DNA断片で形質転換した。HXT3、HXT6、およびHXT7は、*Kluyveromyces lactis* URA3遺伝子で置換した。HXT2は、*K. lactis* HIS5遺伝子で置換した。HXT5、HXT1、およびHXT4は、LEU2遺伝子で置換した。各形質転換の後、遺伝子置換の間に作られたユニークな配列からPCR産物が生成され、遺伝子が除去されたことが確認された。遺伝子置換に使用された選択可能マーカーはloxP部位でフランキングされ、その後Creリコンビナーゼの発現により除去された。Creリコンビナーゼの発現後、ウラシル、ヒスチジン、ロイシンのオーソトロフィーを持ついくつかの株が選択された。これらの株のうち数株を、マーカーを α ankするプライマーを用いたPCRで解析した結果、HXT遺伝子が欠失し、マーカーが除去されていることがさらに確認された。YRH1153株およびYRH1154株は、YRH1087株をpRS424 (空ベクター) またはpRH196 (XK発現ベクター) で形質転換することにより作出した。

これらの菌株で利用されたプラスミドのより詳細な説明は、補足表1にある。プラスミド保持のプレッシャーは、トリプトファンを欠乏させた培地上で、プラスミドを保持する細胞のみを増殖させるトリプトファン選択マーカーによってかけた。

2.1.2. 継代条件

酵母株は無菌条件下でストックから増殖させた。コロニーはプレート上で増殖させ、25℃の液体継代培地 (6%グルコース、6.7 g/L YNB (アミノ酸なし)、2 g/L アミノ酸ドロップアウトミックス (トリプトファン欠乏)、1 mL/L Tween) に移した。培養液は攪拌せず、細胞密度を高く維持するために2-4日ごとに継代した。実験前に、培養液を1000 g で10分間遠心分離して回収し、上清をデカントし、ペレットを脱イオン水に懸濁した。

2.1.3. 実験条件

バッチ発酵は25℃のウォーターバスで行った。培地組成は、炭素源を除いて継代培地と同様であった。

Table 1
Description of strains.

Strain definitions		
Strain	Descriptor	Genotype
CEN.PK2-1C	Parent strain	<i>MATa ura3-52 trp1-289 leu2-3_112 his3A1 MAL2-8c SUC2</i>
YRH524	Wild type control	CEN.PK2-1C + pRS414 (空のTRP1マーカー CEN.PK2-1C or)
YRH857	Low enhanced XK	+ pRH195 (ローコピーベクター + XKS1)
YRH858	High enhanced XK	CEN.PK2-1C + pRH196 (high-copy vector + XKS1)
YRH1087	HXT knockout	CEN.PK2-1C <i>hxt1Δ, hxt2Δ, hxt3Δ, hxt4Δ, hxt5Δ, hxt6Δ, hxt7Δ</i>
YRH1153	Wild type control HXT knockout	CEN.PK2-1C <i>hxt1Δ, hxt2Δ, hxt3Δ, hxt4Δ, hxt5Δ, hxt6Δ, hxt7Δ</i> + pRS424
YRH1154	XK HXT ノックアウト	CEN.PK2-1C <i>hxt1Δ, hxt2Δ, hxt3Δ, hxt4Δ, hxt5Δ, hxt6Δ, hxt7Δ</i> + pRH196

xylulose can be utilized by *S. cerevisiae* with greater than 80% efficiency (Gong et al., 1981). Xylulose is taken up by wild-type *S. cerevisiae*, is converted to xylulose-5-phosphate by xylulokinase (XK), and is funneled through the pentose phosphate pathway to eventually produce ethanol. Utilization through this pathway is slow at approximately 1–2 orders of magnitude below *S. cerevisiae*'s glucose consumption rate (4 g/gDCW-h) (Sonnleitner and Kappeli, 1986). Slow utilization increases production costs by requiring some combination of larger fermenters, longer fermentation periods, and increased yeast loading. Increasing the rate of utilization requires an understanding of possible enzymatic and transport bottlenecks. Previous work to expand an enzymatic bottleneck caused by constrained xylulokinase capacity yielded an increase in ethanol production rate from 0.04 to 0.23 grams per gram dry cell weight per hour (g/gDCW-h) (Lee et al., 2003). Other work aimed at increasing the capacity of downstream pentose phosphate pathway enzymes yielded an increase in utilization rate from 0.09 to 0.22 g/gDCW-h (Johansson and Hahn-Hägerdal, 2002; Matsushika et al., 2012).

The ability for enzymatic modifications to increase yield beyond 0.23 g/gDCW-h has not been demonstrated. This may be due to transport becoming the limiting reaction. Xylulose transport in *S. cerevisiae* is not well understood, but xylose transport has been more extensively studied (Hotta et al., 2009; Runquist et al., 2010; Sedlak and Ho, 2004; Tanino et al., 2010). *S. cerevisiae* does not have xylose specific transporters and xylose competes with hexose sugars for transport through hexose transporters. Xylulose transport may use similar transporters and transport mechanisms to its isomer xylose.

One attempt to model xylose transport focused on the transport of xylose through the native *S. cerevisiae* hexose transporter family (HXT family) (Bertilsson et al., 2007). Using a system of ODE's based on the known expression patterns and transport kinetics of the individual HXT transporters; the model was able to accurately represent the consumption of sugars in mixed xylose/glucose fermentation (Bertilsson et al., 2007). Assuming a similar transport pathway, the same technique could help to characterize the mechanism behind xylulose transport.

Flux balance analysis (FBA) is a type of constraint-based modeling that uses physical or chemical constraints to define all allowable sets of fluxes through a network. Constraint-based analysis assumes that the system is at steady state (i.e. that it is not accumulating metabolites and fluxes are constant) and that it is satisfying all physio-chemical constraints (reaction rates are within allowable ranges and metabolites used in all reactions are actually available). Flux balance analysis has been described at length in other works (Kauffman et al., 2003; Orth et al., 2010).

This work attempts to identify enzymatic and transport bottlenecks in the utilization of xylulose in *S. cerevisiae*. Using a flux balance approach in combination with Bertilsson's sugar uptake approximation techniques the proposed bottlenecks are reconciled against the proposed mechanism of xylulose transport.

2. Methods

2.1. Fermentation experiments

2.1.1. Yeast strains

Strain names, genotypes, and descriptors are listed in Table 1. Five strains developed from the parent strain CEN.PK2-1C were utilized in this work. Included in these five strains were an empty vector control strain (referenced as wild type or YRH524), a strain containing a low copy plasmid encoding XK (referenced as low enhanced or YRH857), a strain with modified with a high copy plasmid encoding XK (referenced as high enhanced XK or YRH858), a wild type strain with HXT transporters 1–7 knocked out (referenced as Wild type HXT knockout or YRH1153), and a high copy XK enhanced HXT knockout strain (referenced as high copy HXT knockout or YRH1154).

To create strain YRH1087 lacking *HXT1* through *HXT7*, CEN.PK2-1C was transformed with PCR-generated DNA fragments that directed the replacement of the *HXT* genes with selectable markers. *HXT3*, *HXT6*, and *HXT7* were replaced with the *Kluyveromyces lactis* *URA3* gene. *HXT2* was replaced with the *K. lactis* *HIS5* gene. *HXT5*, *HXT1*, and *HXT4* were replaced with the *LEU2* gene. After each transformation, PCR products generated from the unique sequences created during the gene replacement confirmed that the genes were removed. The selectable markers used for the gene replacements were flanked by loxP sites and were subsequently removed by expression of Cre recombinase. After expression of Cre recombinase, several strains with uracil, histidine, and leucine auxotrophies were selected. Analysis of several of these strains by PCR using primers that flanked the markers further confirmed that the *HXT* genes were deleted and the markers removed. Strains YRH1153 and YRH1154 were generated by transforming YRH1087 with either pRS424 (empty vector) or pRH196 (XK expression vector).

A more detailed description of plasmids utilized in these strains can be found in Supplementary Table 1. Plasmid retention pressure was applied via a tryptophan selection marker that allowed only cells retaining the plasmid to grow on tryptophan lacking media.

2.1.2. Passage conditions

Yeast strains were propagated from stocks under sterile conditions. Colonies were grown on plates and transferred to 25 °C liquid passage media (6% glucose, 6.7 g/L YNB (without amino acids), 2 g/L amino acid dropout mix (lacking tryptophan), 1 mL/L Tween). Cultures were unstirred and were passaged every 2–4 days to maintain high cell density. Before experiments, cultures were harvested via centrifugation at 1000g for 10 min, the supernatant decanted, and the pellet re-suspended in deionized water.

2.1.3. Experimental conditions

Batch fermentations were carried out in 25 °C water baths. Media composition was similar to that of passage media with the

Table 1
Description of strains.

Strain definitions		
Strain	Descriptor	Genotype
CEN.PK2-1C	Parent strain	<i>MATa ura3-52 trp1-289 leu2-3_112 his3Δ1 MAL2-8c SUC2</i>
YRH524	Wild type control	CEN.PK2-1C + pRS414 (empty TRP1-marked vector)
YRH857	Low enhanced XK	CEN.PK2-1C + pRH195 (low-copy vector + XKS1)
YRH858	High enhanced XK	CEN.PK2-1C + pRH196 (high-copy vector + XKS1)
YRH1087	HXT knockout	CEN.PK2-1C <i>hxt1Δ, hxt2Δ, hxt3Δ, hxt4Δ, hxt5Δ, hxt6Δ, hxt7Δ</i>
YRH1153	Wild type control HXT knockout	CEN.PK2-1C <i>hxt1Δ, hxt2Δ, hxt3Δ, hxt4Δ, hxt5Δ, hxt6Δ, hxt7Δ</i> + pRS424
YRH1154	High enhanced XK HXT knockout	CEN.PK2-1C <i>hxt1Δ, hxt2Δ, hxt3Δ, hxt4Δ, hxt5Δ, hxt6Δ, hxt7Δ</i> + pRH196

Table 2

7つの検証実験それぞれの初期条件。

Experiment	Initial glucose (g/l)	Initial xylose (g/l)	Initial xylulose (g/l)	Initial biomass (g/l)	Strains
E1*	22.77 ± 1.89	24.78 ± 1.35	11.11 ± 0.54	11.20 ± 0.31	野生型XK、低強化XK、高強化XK
E2	0.00 ± 0.00	37.51 ± 0.98	20.20 ± 0.52	17.92 ± 0.54	
E3	0.82 ± 0.16	102.85 ± 7.35	37.24 ± 6.15	19.58 ± 1.60	
E4	0.00 ± 0.00	43.47 ± 1.17	60.68 ± 1.18	9.89 ± 1.35	
E5	0.00 ± 0.00	33.45 ± 0.54	71.11 ± 0.97	17.17 ± 0.49	
E6	0.08 ± 0.32	77.27 ± 3.41	101.29 ± 8.97	11.26 ± 1.31	Wild type XK, Low enhanced XK, High enhanced XK, Wild type XK HXT-, High enhanced XK HXT-
E7*	32.59 ± 1.49	34.84 ± 1.27	53.67 ± 3.47	9.88 ± 0.35	
E8**	33.09 ± 2.20	29.40 ± 0.59	15.77 ± 10.75	10.86 ± 0.42	

* Denotes experiments from which fitting data was drawn.

E8はE7の実験を拡張したものである（最初の48時間の後、E8の複製はグルコースシロップでスパイクされ、記載された開始条件が生成された）。キシロースの消費速度が異なると、株によってキシロース濃度が異なり、キシロースの高標準偏差が生じる。

グルコース、キシロース、キシロースの比率と濃度を各実験で異ならせ、細胞のキシロース利用を飽和させようとした。各実験で測定した初期濃度を表2に示す。一般にグルコース濃度は0から35 g/L、キシロースは25から100 g/L、キシロースは5から100 g/Lの範囲であった。

2.1.4. データ収集

細胞密度は、660 nmでの蛍光分光光度測定によってモニターした。培地組成は、HPLC測定によってモニターした。HPLC分離は、BioRad HPX-87Hカラムを用い、0.01N H₂ SO₄移動相を用い、流速0.6mL/分で65℃に維持した。関連化合物（グルコース、キシロース、キシロース、酢酸、乳酸、コハク酸、グリセロール、エタノール）は屈折率検出器で定量した。

2.2. フラックスバランス解析

2.2.1. 基本モデル構造

このモデルは、以前に開発されたゲノムスケールモデルiMM904に基づいている。このモデルは、30秒の時間ステップで流束を統合するカスタムdFBA (dynamic flux balance analysis) ループに組み込まれている（図1）。この手法は、Mahadevanら（2002）（Mahadevan et al.）この手法では、ベクトル z に媒体代謝物濃度をモル単位で格納します。 z の各成分の変化率は、代謝マトリックス A の化学量論マトリックス（化学量論もモル単位）、ベクトル v に含まれる各代謝流束の速度（モル単位/時間）、および現在のバイオマス濃度 X （グラム単位/リットル）に関連する（式（1））。バイオマスは、増殖前駆体 w_i を合成する反応の加重和として決定される増殖速度 μ に従って生成される。

$$\frac{dz}{dt} = AvX, \quad \frac{dX}{dt} = \mu X, \quad \mu = \sum w_i v_i \quad (1)$$

dFBAの各反復において、培地組成は糖取り込みの新しいflux境界を計算するために使用され（セクション2.2.2を参照）、線形ソルバーが細胞を通過する最適flux速度を同定するために使用され、培地組成は細胞への最適fluxと細胞からの最適fluxの影響を反映するように更新される。このループは、指定された長さの実行が完了するまで繰り返される。

2.2.2. 砂糖輸送モデル

キシロース用に開発された糖輸送モデルは、もともとキシロース輸送用に記述された輸送モデルに基づいている（Bertilsson et al., 2007）。このモデルは、すべての糖輸送がグルコース輸送タンパク質のHXTファミリーによって促進されると仮定している。培地中のグルコース濃度に基づいて、

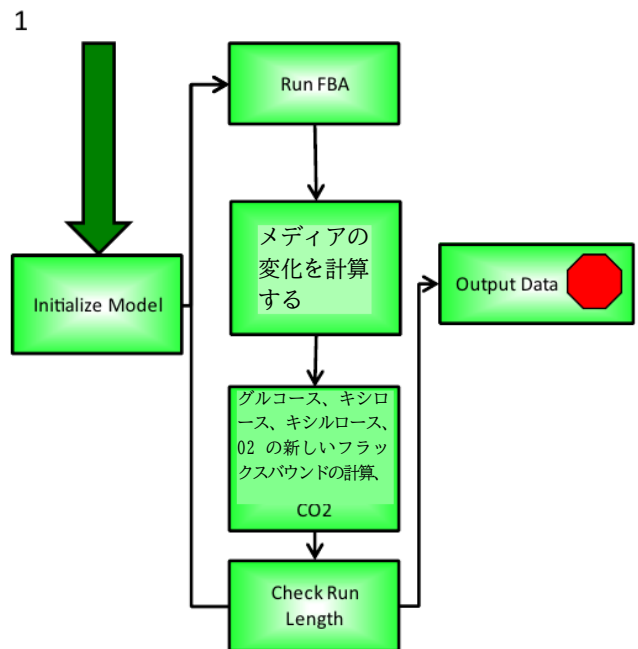


図1. 基本的なdFBAループ構造-FBAは最適な流束分布を計算するために使用される。この流束は30秒の時間ステップで外挿され、その結果、培地組成が変化する。メディアの構成は、次のFBA反復のための新しい制約として使用される新しい許容flux境界を指示する。

個々のトランスポーターの発現を導き出す（図2a）（Diderich, 1999; Liang and Gaber, 1996; Ozcan and Johnston, 1995）。この相対発現は、モデル式(2.1)と(2.2)において h_{HXTi} として表される。キシロース (xyl) とグルコース (glu) の両方について、各トランスポーターを介した糖の取り込み（相対式でスケール）をMichaelis–Menten速度論で記述した（式(2.1)と(2.2)）。総輸送量は、各トランスポーターを介した輸送量の合計に等しかった（式(2.3)と(2.4)）。本研究で開発されたモデルには、キシロース (xylu) の取り込みに対応する方程式が追加され、式（2.1）および（2.2）にキシロースの競合阻害が組み込まれている。

$$V_{HXTi,glu} = \theta_{HXTi} \times \frac{V_{max,HXTi,glu} \times S_{glu}}{K_{m,HXTi,glu} \times \left(1 + \frac{S_{xyl}}{K_{m,HXTi,xyl}}\right) + S_{glu}} \quad (2.1)$$

$$V_{HXTi,xyl} = \theta_{HXTi} \times \frac{V_{max,HXTi,xyl} \times S_{xyl}}{K_{m,HXTi,xyl} \times \left(1 + \frac{S_{glu}}{K_{m,HXTi,glu}}\right) + S_{xyl}} \quad (2.2)$$

Table 2

Initial conditions for each of seven validation experiments.

Experiment	Initial glucose (g/l)	Initial xylose (g/l)	Initial xylulose (g/l)	Initial biomass (g/l)	Strains
E1*	22.77 ± 1.89	24.78 ± 1.35	11.11 ± 0.54	11.20 ± 0.31	Wild type XK,
E2	0.00 ± 0.00	37.51 ± 0.98	20.20 ± 0.52	17.92 ± 0.54	Low enhanced XK,
E3	0.82 ± 0.16	102.85 ± 7.35	37.24 ± 6.15	19.58 ± 1.60	High enhanced XK
E4	0.00 ± 0.00	43.47 ± 1.17	60.68 ± 1.18	9.89 ± 1.35	
E5	0.00 ± 0.00	33.45 ± 0.54	71.11 ± 0.97	17.17 ± 0.49	
E6	0.08 ± 0.32	77.27 ± 3.41	101.29 ± 8.97	11.26 ± 1.31	Wild type XK,
E7*	32.59 ± 1.49	34.84 ± 1.27	53.67 ± 3.47	9.88 ± 0.35	Low enhanced XK,
E8**	33.09 ± 2.20	29.40 ± 0.59	15.77 ± 10.75	10.86 ± 0.42	High enhanced XK, Wild type XK HXT-, High enhanced XK HXT-

* Denotes experiments from which fitting data was drawn.

** E8 is an extension of experiment of E7 (after the initial 48 h E8 replicates were spiked with glucose syrup to produce the starting conditions listed. Different xylulose consumption rates left different xylulose concentrations for different strains producing the xylulose high standard deviation).

exception of the carbon source. Different ratios and concentrations of glucose, xylose, and xylulose were used in each experiment in an attempt to saturate the xylulose utilization of the cells. Measured initial concentrations for each experiment is shown in Table 2. In general glucose concentrations ranged from 0 to 35 g/L, xylose from 25 to 100 g/L, and xylulose from 5 to 100 g/L.

2.1.4. Data collection

Cell density was monitored through offline spectrophotometric absorbance measurements at 660 nm. Media composition was monitored through offline HPLC measurements. HPLC separation was performed on a BioRad HPX-87H column maintained at 65 °C with a 0.01 N H₂SO₄ mobile phase and a 0.6 mL/min flow rate. Relevant compounds (glucose, xylose, xylulose, acetic acid, lactic acid, succinic acid, glycerol, and ethanol) were quantified via a refractive index detector.

2.2. Flux balance analysis

2.2.1. Basic model structure

This model is based on the previously developed genome scale model iMM904. This model is built into a custom dFBA (dynamic flux balance analysis) loop that integrates fluxes over 30 s time steps (Fig. 1). This technique is similar to that used by Mahadevan et al. (2002) (Mahadevan et al., 2002). In this technique, a vector z contains the media metabolite concentrations in moles. The rate of change of each component in z is related to the stoichiometric matrix of the metabolic matrix A (stoichiometry is also in mol units), the rate of each metabolic flux contained in the vector v in units of moles per hour, and the current biomass concentration X in grams per liter (Eq. (1)). In turn, biomass is created according to the growth rate μ , determined as the weighted sum of the reactions that synthesize growth precursors w_i .

$$\frac{dz}{dt} = AvX, \quad \frac{dX}{dt} = \mu X, \quad \mu = \sum w_i v_i \quad (1)$$

At each iteration of the dFBA the composition of the media is used to calculate new flux bounds for sugar uptake (see Section 2.2.2), a linear solver is used to identify optimal flux rates through the cell, and the media composition is updated to reflect the effects of the optimal flux into and out of the cell. This loop repeats until the designated run length is completed.

2.2.2. Sugar transport model

The sugar transport model developed for xylulose was based on a transport model described originally for xylose transport (Bertilsson et al., 2007). This model assumes all sugar transport to be facilitated by the HXT family of glucose transport proteins. It derives the expression of individual transporters based on glucose

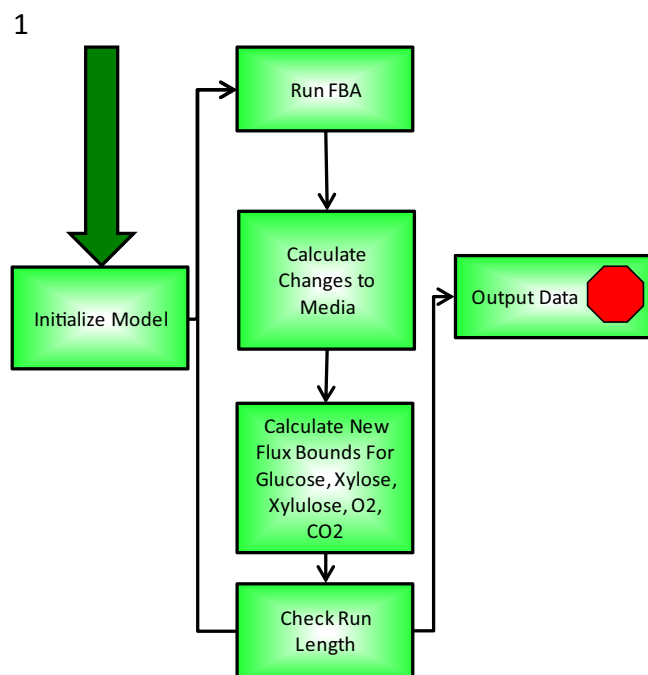


Fig. 1. Basic dFBA looping structure – an FBA is used to calculate an optimal flux distribution. This flux is extrapolated over a 30 s time step and results in changes to the media composition. The composition of the media dictates new allowable flux bounds that are used as new constraints for the next FBA iteration.

concentration in the media (Fig. 2a) (Diderich, 1999; Liang and Gaber, 1996; Ozcan and Johnston, 1995). This relative expression is expressed as θ_{HXTi} in model Eqs. (2.1) and (2.2). The sugar uptake through each transporter (scaled by the relative expression) was described for both xylose (xyl) and glucose (glu) with Michaelis–Menten kinetics (Eqs. (2.1) and (2.2)). The total transport was equal to the sum of transport through each transporter (Eqs. (2.3) and (2.4)). The model developed in this work includes an additional set of corresponding equations for xylulose (xylu) uptake and incorporates xylulose competitive inhibition into Eqs. (2.1) and (2.2).

$$v_{HXTi,glu} = \theta_{HXTi} \times \frac{v_{max,HXTi,glu} \times S_{glu}}{K_{m,HXTi,glu} \times \left(1 + \frac{S_{xyl}}{K_{m,HXTi,xyl}}\right) + S_{glu}} \quad (2.1)$$

$$v_{HXTi,xyl} = \theta_{HXTi} \times \frac{v_{max,HXTi,xyl} \times S_{xyl}}{K_{m,HXTi,xyl} \times \left(1 + \frac{S_{glu}}{K_{m,HXTi,glu}}\right) + S_{xyl}} \quad (2.2)$$

$$r_{glu} = V_{HXT1,glu} + V_{HXT2,glu} + V_{HXT3,glu} + V_{HXT4,glu} + V_{HXT6/7,glu} \quad (2.3)$$

$$r_{xyl} = V_{HXT1,xyl} + V_{HXT2,xyl} + V_{HXT3,xyl} + V_{HXT4,xyl} + V_{HXT6/7,xyl} \quad (2.4)$$

$$\text{if } r_{glu} + r_{xyl} > r_{\max,glu,flux}, \text{ then } \alpha = \frac{r_{\max,glu,flux}}{r_{glu} + r_{xyl}} \quad (2.5)$$

$$\text{if } r_{glu} + r_{xyl} \leq r_{\max,glu,flux}, \text{ then } \alpha = 1 \quad (2.6)$$

ここで、 $m_{HXTi,glu}$ = グルコース輸送HXTトランスポーター*i*の速度 (g/gDCW-h)、 h_{HXTi} = HXTトランスポーター*i*の相対発現 (単位なしスカラー)、 S_{glu} = グルコースの培地濃度 (g/l)、 r_{glu} = HXTトランスポーターを介したグルコース輸送の総和 (g/gDCW-h)、 a = スカラー (単位なしスカラー)。

この輸送モデルはBertilssonのモデルとは異なり、糖の総流量制約を課している。Bertilssonのモデルでは、計算された糖流束の合計が4g/gDCW・hを超える場合、グルコースとキシロースの輸送比率を維持しながら、4g/gDCW・hの制限内に収まるように比例的にスケリングされた (式(2.5)と(2.6))。このモデルでは、各糖の最大輸送量 (他の糖が存在しない場合) を個別に設定し、輸送されるすべての糖についてトランスポーターの総輸送能力を定義することで、より現実的に糖の輸送量を制約しようとしている。

例えば、グルコースの最大流出速度を4 g/gDCW・h、キシロースの最大流出速度を2 g/gDCW・hとし (仮定)、均一な輸送速度を仮定すると、1 g/gDCWのグルコースを輸送する時間は15分、一方1 g/gDCW・hのキシロースを輸送する時間は30分となる。したがって、輸送能力は1時間当たりグルコース4単位、またはキシロース2単位、あるいはグルコースとキシロースの合計が輸送能力に反しない組み合わせとなる。キシロース1個とグルコース2個であれば、総輸送能力 (所要時間60分) に抵触しないので許容できるが、グルコース3個とキシロース1個では、個々の輸送能力が許容範囲内であっても、総輸送能力 (所要時間105分) に抵触するので許容できないことになる (図2b)。キシロース輸送の最大レベルは、すべての条件においてうまく定義できない。その結果、キシロースの''時間スカラー''はモデルパラメーターとして された。

2.2.3. 代替糖輸送体

HXT以外のトランスポーターがキシロースに作用する可能性を考慮し、モデルにトランスポーターを追加した。このトランスポーターは、すべての非HXTトランスポーターを介したキシロースの総輸送量を表している。このトランスポーターのαッティングについてはセクション3.2.1で説明するが、モデル開発の観点からは、このトランスポーターは一定の発現レベルであり、糖の時間スカラーを計算する際には、合計された輸送レベルに含まれる。

2.2.4. バッチ発酵のエンドダイナミクス

ここで開発されたモデルは、一連のバッチ発酵実験の結果を予測するために設計された。最初のモデル開発では、全ての糖が消費されると仮定した。しかし、実験データによると、多くの場合、糖の消費は枯渇するかなり前に停止した。この現象は、十分な微量栄養素を含む複雑な培地でのグルコース発酵や、エタノールが低い場合 (100g/l以下) にはほとんど起こらないが、キシロースが取り込まれる効率が低いため、細胞が維持に必要な最小限のATP産生に到達するのが難しく、これが細胞死につながった可能性があるという仮説が立てられた。標準的な動的FBAでは、必要なATP維持はαxed制約であるため、これをモデル化する方法がない。現実をよりよくモデル化するために、細胞死方程式がモデルに追加された。この反応が活性化すると、生存バイオマスが減少し、細胞増殖に必要な代謝産物の一定割合が生き残った細胞に還元された。この栄養素のリサイクルにより、細胞の一部は維持に必要な最小限のATPを生産し、生き残り、ゆっくりとキシロースを消費し続けることができた。細胞死が何度か繰り返された後、この生存細胞は発酵を停止させるのに十分なほど小さくなった。

3. 結果と考察

3.1. Fermentation results

バッチ実験の主な目的は、キシロース利用のボトルネックを特定することであった。このボトルネックは、細胞内へのキシロースの輸送か、キシロースからキシロース-5-リン酸への変換のどちらかであろうという仮説が立てられていた。

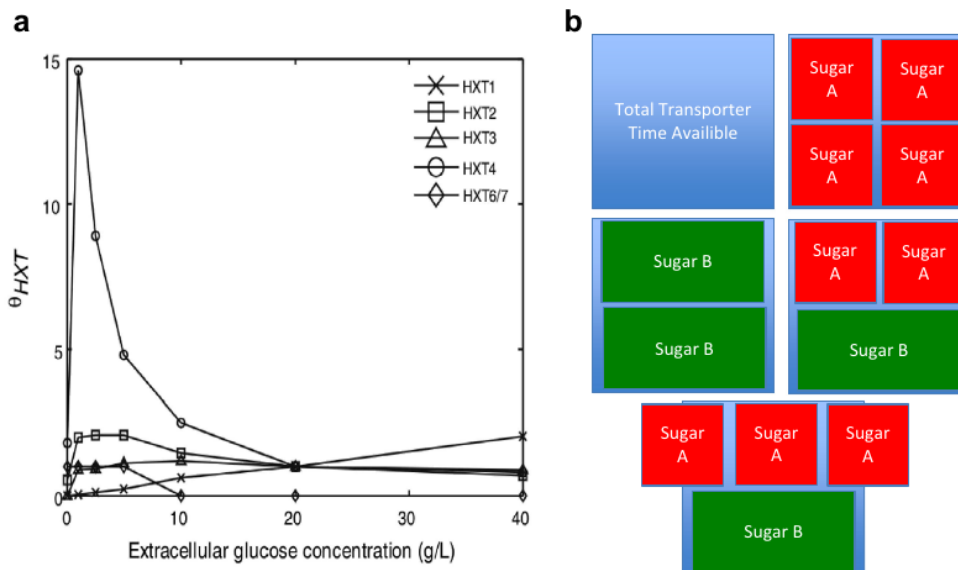


Fig. 2. (a) HXT expression level correlation with glucose – these correlations were used in Bertilsson's model and are used here. (b) Rational for a sugar time scalar – unlike Bertilsson's model that used the same scalar for all sugars, this model considers the unique maximum transport rate for each sugar to calculate the scalar.

$$r_{glu} = v_{HXT1,glu} + v_{HXT2,glu} + v_{HXT3,glu} + v_{HXT4,glu} + v_{HXT6/7,glu} \quad (2.3)$$

$$r_{xyl} = v_{HXT1,xyl} + v_{HXT2,xyl} + v_{HXT3,xyl} + v_{HXT4,xyl} + v_{HXT6/7,xyl} \quad (2.4)$$

$$\text{if } r_{glu} + r_{xyl} > r_{\max,glu,flux}, \text{ then } \alpha = \frac{r_{\max,glu,flux}}{r_{glu} + r_{xyl}} \quad (2.5)$$

$$\text{if } r_{glu} + r_{xyl} \leq r_{\max,glu,flux}, \text{ then } \alpha = 1 \quad (2.6)$$

where $v_{HXTi,glu}$ = rate of glucose transport HXT transporter i (g/gDCW-h), θ_{HXTi} = relative expression of HXT transporter i (unitless scalar), S_{glu} = media concentration of glucose (g/l), r_{glu} = sum of glucose transport through HXT transporters (g/gDCW-h), α = scalar (unitless scalar).

The transport model deviates from Bertilsson's model in how it imposes a total sugar flux constraint. In Bertilsson's model, if the sum of calculated sugar fluxes exceeded 4 g/gDCW-h they were scaled proportionally to be within the 4 g/gDCW-h limit while maintaining the ratio of glucose to xylose transport (Eqs. (2.5) and (2.6)). The model in this work seeks to more realistically constrain sugar flux by fitting each maximal sugar flux (in the absence of other sugars) separately and defining the total transport capacity of the transporter set in terms of all transported sugars.

For example, using the a maximal flux rate of 4 g/gDCW-h for glucose and (a hypothetical) 2 g/gDCW-h for xylose, and assuming a uniform transportation rate, the time to transport 1 g/g-DCW glucose would be 15 min while transporting 1 g/gDCW-h of xylose would take 30 min. Therefore the capacity is four units of glucose per hour, or two units of xylose, or some combination of glucose and xylose the sum of which does not violate the transport capacity. It follows that one xylose and two glucose would be acceptable as the total transport capacity is not violated (60 total minutes required), but that three glucose and one xylose would be unacceptable as the total transport capacity is violated (105 total minutes required) even while individual transport capacities are within allowable ranges (Fig. 2b). The maximum level of xylulose transport is not well defined for all conditions. As a result the "time scalar" for xylulose was fit as a model parameter.

2.2.3. Alternative sugar transporters

To account for the possibility of non-HXT transporters acting on xylulose an additional transporter was added to the model. This transporter represented the aggregate xylulose transport through all non-HXT transporters. The fitting of this transporter is discussed in Section 3.2.1, but in terms of model development it is of constant expression level and is included in the summed transport levels when calculating the sugar time scalar.

2.2.4. End dynamics of batch fermentation

The model developed here was designed to predict the outcome of a series of batch fermentation experiments. During initial model development it was assumed that all sugar would be consumed. However, experimental data showed that in many cases sugar consumption arrested well before exhaustion. This rarely happens in glucose fermentation in complex media with adequate micronutrients and when ethanol is low (below 100 g/l), but because of the low efficiency with which xylulose is taken up, it was hypothesized that cells may have difficulty reaching the minimum ATP production required for maintenance and that this may have led to cell death. A standard dynamic FBA has no way of modeling this because the required ATP maintenance is a fixed constraint.

In an attempt to better model reality a cell death equation was added to the model. When this reaction was active it decreased viable biomass and returned a percentage the metabolites required for cell growth to the surviving cells. This recycling of nutrients allowed a portion of the cells to produce the minimum ATP required for maintenance, survive, and continue to slowly consume xylulose. After several iterations of cell death, this surviving fraction would be sufficiently small to halt fermentation.

3. Results and discussion

3.1. Fermentation results

A major objective of the batch experiments was to identify the bottleneck in xylulose utilization. It had been hypothesized that this bottleneck would either be in the transport of xylulose into the cell or in the conversion of xylulose to xylulose-5-phosphate.

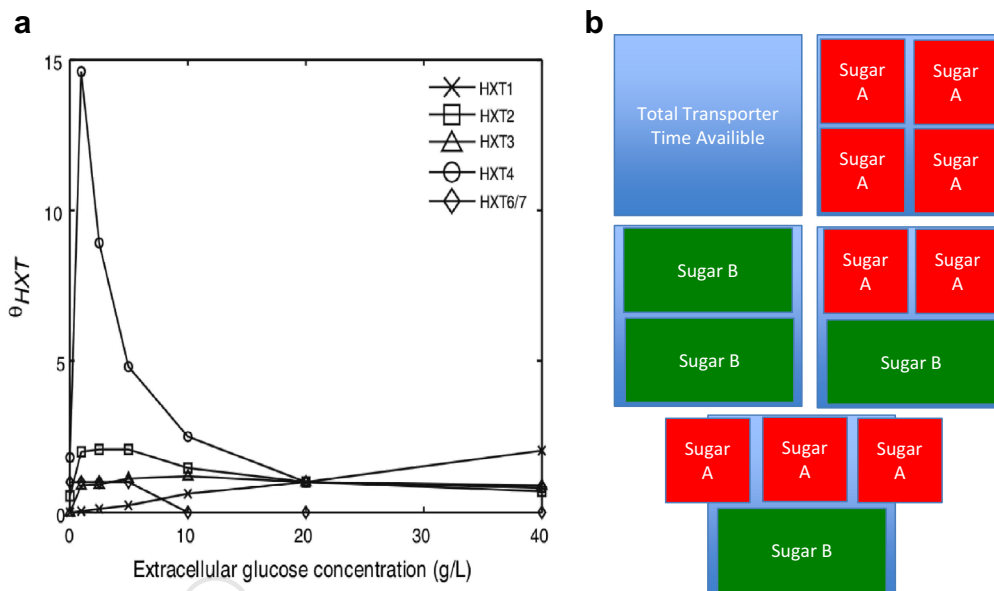


Fig. 2. (a) HXT expression level correlation with glucose – these correlations were used in Bertilsson's model and are used here. (b) Rational for a sugar time scalar – unlike Bertilsson's model that used the same scalar for all sugars, this model considers the unique maximum transport rate for each sugar to calculate the scalar.

この仮説を検証するために、野生株、低コピーXK株、高コピーXK株の実験結果を比較した。これらの株は、XKの発現レベル以外は遺伝的に同一である。ある実験において、XKの発現量が多い菌株の方がキシロース利用率の増加を示した場合、XKがキシロースの利用における制限反応であると結論づけられる。逆に、キシロース利用率（1回の実験）が、XK能力に関係なく、これらの菌株間で同じであれば、XKは制限反応ではないと結論づけられる。

野生型(YRH524) *S. cerevisiae*とXK過剰株(XKプラスミドが高コピーまたは低コピーの株)を比較すると、野生型株は7つの独立した実験のうち4つで、発酵の最初の12時間の平均キシロース利用率が低下した。実験条件E1、E2、E3、E4では、野生型株(YRH524)と各XK強化株との間に統計的に有意な差(p 値 < 0.05)が認められた。実験条件E3では、すべてのXK強化株で平均消費率がわずかに高かったが、その差は統計的に妥当といえるほど大きくはなかった(p 値0.096)。

YRH524株では、4つの実験処理のうち3つで利用率が有意に低下しており、さらに1つの実験では、この傾向をわずかではあるが統計的に有意でない裏付けを示していることから(図3b)、このデータは全体として、YRH524株ではXKが制限的であったという仮説を支持している。さらに、低増強株と高増強株との間に統計的に有意な差がないことから、これらの株ではXKは制限されないことが示唆された。

キシロース輸送もまた、キシロース利用のボトルネックとして提唱されたものである。HXTタンパク質ファミリーはキシロース輸送に活性があることが以前に示されており、キシロース輸送にも活性があると仮定された。HXTタンパク質ファミリーの発現パターンは、グルコースの存在とよく相関しているが、輸送される糖の量は、トランスポーターと競合する利用可能な糖の濃度にも依存していた。キシロース輸送の動態を理解する試みとして、グルコース濃度がゼロに近いときにキシロース輸送を飽和させる試みがなされた。

キシロース輸送は標準的なミカエリス-メンテン速度論に従って増加し、最終的には飽和すると予想された。しかし、キシロース濃度とキシロース消費速度を比較したところ、明確なパターンは現れなかった(図3a)。いずれの実験ケースでも、キシロース消費速度は0.26~0.18g/gDCW・hでピークに達した。このことから、キシロースは比較的低濃度でトランスポーターが飽和することが示唆されるが、同じ低糖濃度でも各実験で輸送速度が異なる理由は説明できない。例えば、E1は15g/Lのキシロースで0.18g/gDCW-hの輸送を達成したが、E6は50g/L以上のキシロースでしか同じ輸送速度を達成できなかった。同じ消費量データを時間に対してプロットすると、実験間の消費速度はより一貫しているように見える。実験に使用された菌株はグルコース培地で培養され、各実験の開始時(グルコースが存在する条件E1では最初の数時間)はグルコースが枯渇した時に相当することに留意されたい。HXTトランスポーターファミリーの発現は知られていたが、これらの測定は定常状態に近い状態で行われた。したがって、発現状態間の変化率は決定されなかった。実験に使用された菌株は、実験前にグルコースで培養されていたため、グルコースレベルが高値から低値に下がり、発現パターンが変化するトリガーとなった時点が、ゼロ時点(実験培地にグルコースが含まれていたE1では、その直後)であった。この変化は予測可能な時間軸で起こり、図3cのような一貫した消費パターンになるのだろう。

このようなパターンは、HXTファミリーのタンパク質に似た、グルコース条件下で発現するトランスポーターを示しているのだろう。キシロース輸送におけるHXTタンパク質ファミリーの作用を確認するため、HXTトランスポーター1-7が欠損している以外はHigh Enhanced XK株と遺伝的に同一のHXTノックアウト株を利用した。この株を用いた3回の実験のうち2回で、非ノックアウト株と比較して、キシロース消費量が統計的に有意に減少した。3番目の実験では、同じ傾向を支持する非統計的な有意差があった(p 値=0.067)(図3d)。このことは、HXTタンパク質ファミリーがキシロース輸送において活性を持つことを示唆しているが、ノックアウト株は依然としてキシロース輸送を示したため、HXTタンパク質ファミリーはすべてのキシロース輸送を説明するには不十分である。これは3.2節でさらに詳しく述べる、制御された三次トランスポーターによるものかもしれない。

3.2. モデリング結果

3.2.1. モデルの最適化

モデルパラメータ(表3)は3つのステップで調整した。第一に、HXT陰性株におけるグルコースとキシロースの輸送と、利用可能なグルコースとの間に観察された相関から、凝集トランスポーターの境界値(HXT陰性株におけるグルコースとキシロースのこれまで説明できなかった輸送を考慮)を直接設定した。次に、全菌株に共通するパラメータ(HXT輸送変化の $d m / dt$ 、キシロースのサイズスカラー、キシロースのスカラー、ATP維持率、死反応回復率)を、粒子群ヒューリスティックを用いて設定した。このヒューリスティックは、式(3)の目的関数を最小化することを目指した。目的関数は、グルコース、キシロース、キシロース、グリセロール、酢酸、乳酸、コハク酸の比率を変えた2つの実験を通して、各サンプル時間における培地中のグルコース、キシロース、キシロース、グリセロール、酢酸、乳酸、コハク酸濃度を考慮した。実験データから、この菌株ではXKが制限的でないことが示唆されたため、この段階ではXK能力が最も高い菌株を用いた。

$$\text{Objective} = \sum_{n=7} |\text{Experimental measurement} - \text{model prediction}| \quad (3)$$

最後に、キシロキナーゼの発現量と反応能力が異なる複数の菌株をモデル化したため、XKの上限値を菌株ごとに αt した。最もXKが制限された株を除き、XK容量を制限してもモデルの αt は改善されなかった。これらの菌株では、XK容量は1000 mM/gDCW・hで制約されなかった。

キシロキナーゼ容量の αt は、野生型株ではXKが制限されるが、XK強化株では制限されないという実験的知見を支持した。野生型株では、XK容量が段階的に制約されるにつれて、目的値の値が減少した(良くなった)(図4a)。このことは、最適な(実現可能な最大)XK容量を見つける前に、制約によって非現実的な高い容量が除去され、最終的に過剰な制約となって目的値が悪化したことを示唆している。低強化XKひずみ(図4b)でも高強化XKひずみ(データは示さず)でも、拘束は目的値を改善しなかった。これは、実験データから、これらのひずみではXKが制限にならないことが示唆されたため、予想されたことである。

3.2.2. モデルの検証

このモデルは、2つの実験からそれぞれ1回ずつ得たデータを用いて作成した。モデルを検証するために、合計7つの実験からなるより大きな実験データセットを作成した。これらの実験における全菌株平均の初期条件と反復数(最小3)を表2に示す。

To test this hypothesis experimental results from the wild type, low copy XK, and high copy XK strains were compared. These strains are genetically identical except in the level of XK expression. If, for a given experiment, strains with higher XK capacity showed an increased rate of xylulose utilization it would be concluded that XK was the limiting reaction in the utilization of xylulose. Conversely, if the rates of xylulose utilization (for a single experiment) were the same amongst these strains independent of XK capacity, it would be concluded that XK was not the limiting reaction.

In comparing wild-type (YRH524) *S. cerevisiae* to strains with excess of XK (with high or low copy XK plasmid), the wild-type strain showed a decreased average xylulose utilization rate over the first 12 h of fermentation in four of seven independent experiments. Under experimental treatments E1, E2, E3, and E4 there was a statistically relevant difference (p -value < 0.05) between the wild-type strain (YRH524) and each of the XK enhanced strains. Experimental condition E3 showed average consumption rates slightly higher in all XK enhanced strains, but the differences were not large enough to be statistically valid (p -value 0.096).

With three of four experimental treatments showing a significantly decreased utilization rate in YRH524 and one additional experiment showing small but statistically insignificant support for this trend (Fig. 3b), this data as a whole supports the hypothesis that XK was limiting in strain YRH524. Additionally, the lack of statistically significant difference between the low and high enhanced strains suggests that XK is not limiting in these strains.

Xylulose transport was another proposed xylulose utilization bottleneck. The HXT family of proteins was previously shown to be active in xylose transport and was hypothesized to be also active in xylulose transport. The expression pattern of the HXT family of proteins is well correlated with the presence of glucose, but the quantity of sugar transported also depended on the concentration of available sugars competing for transporters. In an attempt to understand the kinetics of xylulose transport an attempted was made to saturate xylulose transport when glucose concentration was near zero.

It was expected that xylulose transport would increase according to standard Michaelis–Menten kinetics and eventually saturate. However, when xylulose concentration was compared to xylulose consumption rate, no clear pattern emerged (Fig. 3a). In each experimental case xylulose consumption rate peaked at between 0.26 and 0.18 g/gDCW-h. This suggests that xylulose saturates its transporters at relatively low concentration, but it does not explain why each experiment had a different transport rate at the same low sugar concentration. For example E1 reached 0.18 g/gDCW-h or transport at 15 g/L xylulose, but E6 was only able to achieve the same rate of transport at greater than 50 g/L xylulose.

When the same consumption data was plotted against time the consumption rate between experiments appears to be much more consistent. It was noted that the strains used in the experiments were cultured on a glucose media and that the start of each experiment (or in the first few hours for condition E1 in which glucose was present) would correspond to when glucose was exhausted. While the expression of the HXT family of transporters was known, these measurements were taken at near steady state conditions. The rate of change between expression states was therefore not determined. Since the strains used in the experiments were cultured on glucose prior to the experiments, time zero (or shortly thereafter for E1 for which the experimental media contained glucose) was when glucose levels would drop from high to low triggering a change in expression pattern. This change may happen over a predictable timeline resulting in the consistent consumption pattern in Fig. 3c. This sort of pattern would be indicative of a

transporter expressed under glucose conditions similar to the HXT family of proteins.

To confirm the action of the HXT family of proteins in xylulose transport, a HXT knockout strain that was genetically identical to the High Enhanced XK strain except that it was deficient in HXT transporters 1–7 was utilized. In two of three experiments utilizing this strain there was a statistically significant decrease in xylulose consumption compared to the non-knockout strain. In the third experiment there was a non-statistically significant difference supporting the same trend (p -value = 0.067) (Fig. 3d). This suggests that the HXT family of proteins is active in xylulose transport, but because the knockout still displayed xylulose transport, the HXT family of proteins is not sufficient to explain all xylulose transport. This could be due to up regulated tertiary transporters discussed further in Section 3.2.

3.2. Modeling results

3.2.1. Model fitting

Model parameters (Table 3) were fit in three steps. First, the bounds for the aggregate transporter (accounting for previously unexplained transport of glucose and xylulose in HXT negative strains) were set directly from the observed correlation between transport in HXT negative strains and available glucose. Second, the parameters common to all strains (dv/dt for HXT transport change, xylose size scalar, xylulose scalar, ATP maintenance, death reaction recovery percent) were set using a particle swarm heuristic. This heuristic sought to minimize the objective function described in Eq. (3). The objective function considered glucose, xylose, xylulose, glycerol, acetic acid, lactic acid, and succinic acid concentration in the media at each sample time throughout two experiments with different ratios of glucose, xylose, and xylulose. This stage of fitting was based on the strain with the highest XK capacity as experimental data suggested that XK was not limiting in this strain.

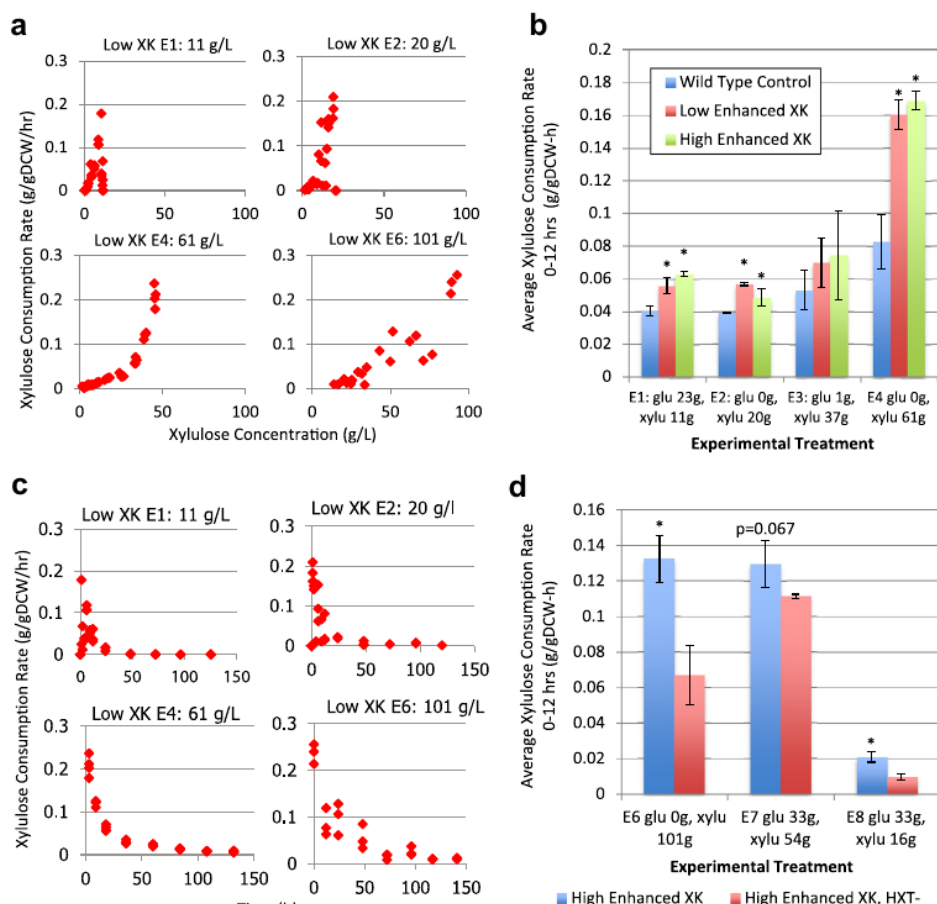
$$\text{Objective} = \sum_{n=7} |\text{Experimental measurement} - \text{model prediction}| \quad (3)$$

Finally, since multiple strains were modeled with differing xylulokinase expression levels and reaction capacities, the upper bounds for XK were fit for each strain. In all but the most XK limited strain the model fit does not improve with constraining XK capacity. For these strains the XK capacity was unconstrained at 1000 mM/gDCW-h.

The fitting of xylulokinase capacity provided support for the experimental finding that XK was limiting in the wild type strain, but not in XK enhanced strains. In the wild type strain, the value of the objective value decreased (became better) as XK capacity was incrementally constrained (Fig. 4a). This suggests that constraint removed unrealistically high capacity before finding an optimal (maximum realizable) XK capacity and finally becoming over constrained causing the objective value to become worse. Constraint did not improve the objective value for either the low-enhanced XK strain (Fig. 4b) or the high-enhanced XK strain (data not shown). This is expected as experimental data suggested XK was not limiting in these strains.

3.2.2. Model validation

This model was fit using a single run from each of two experiments. To validate the model a larger experimental data set was created consisting of seven total experiments. The initial conditions averaged across all strains and replicates (minimum 3) for these experiments are listed in Table 2. Validation runs compared



(a) 低増強XK株におけるキシロース消費率をキシロース濃度の関数としてプロットしたもの。(b) 4つの独立した実験における野生型、低強化XK株、高強化XK株のキシロース消費率の比較。*は野生型株との統計的に有意な差を示す。エラーバーは3反復の標準偏差。(c) 低強化XK株におけるキシロース濃度率を実験時間進行の関数としてプロットしたもの。(d) 高増強XK株と高増強XK HXT株における発酵初期12時間のキシロース利用率の比較。

検証の実行では、実験中の各サンプルポイントで、与えられた菌株の全レプリケートで平均した糖消費量の測定値を比較した。バリデーションの3つの主な目的は、(1)糖取り込みのHXTモデルが糖取り込みを説明するのに十分であることを検証すること、(2)細胞死をモデルに組み込むことで、実験的に観測された糖取り込みプロファイルに対するモデルの適合性が向上することを示すこと、(3)二次代謝産物の生産を予測するモデルの精度を検討することであった。

全体として、初期発酵中（細胞死が大きな役割を果たす前）のモデル化されたキシロース取り込み速度は、バッチ実験で観測されたものとほぼ一致した。

キシロース消費の内部動態は厳密には制約されていなかった（XK容量がモデル内で制約されていた野生型XKを除く）。このことは、キシロース輸送経路の制約が、キシロース利用を近似するのに十分であったことを示唆している。このことは、キシロース輸送がXK強化株のボトルネックであることを示唆している。

低増強株と高増強株は、糖の取り込みに関して、モデルと実験データの間に強い相関を示した（図 5b、c、e、f、h、i）。

Table 3

最適パラメータ値。この表は、パラメータとその説明、および上述のモンテカルロ法を用いて最適に同定された値を示している。これらの値は、本研究の残りの部分を通してモデルリングに使用された。

モデルリングに使用したパラメータ		
Parameter	Description	Value
XK capacity	Maximum capacity of xylose kinase (strain wt XK strains, all other strains)	0.4376, 1000 mM/gDCW-h
Theta max growth ratio	キシロースとグルコースの輸送比較に使用される時間スカラー	1.2932
最大分解率	キシロースとグルコースの輸送比較に使用される時間スカラー	0.935
Xylose time scalar	細胞死後に生細胞集団が回収する細胞代謝産物のパーセンテージ	600.0975
Xylose time scalar*		55.556
Death recovery percentage		66.391%
ATP maintenance	The ATP cost to maintain a cell	0.988819 mM/gDCW-h

* キシロースの消費はモデルでは不可能であったため、このパラメータを使用した。

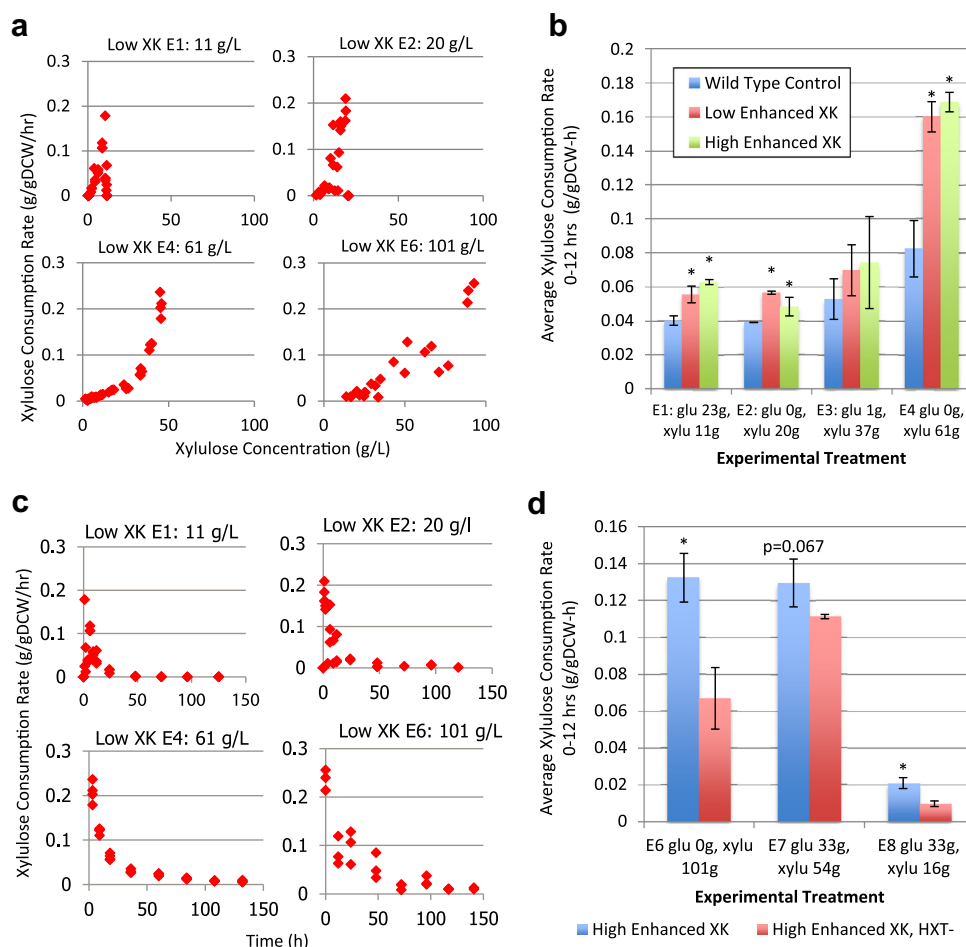


Fig. 3. (a) Xylulose consumption rate in a low-enhanced XK strain plotted as a function of xylulose concentration. (b) Xylulose consumption rate comparison between wild type, low-enhanced XK, and high-enhanced XK in 4 independent experiments. *Denotes a statistically significant difference to wild type strain. Error bars are the standard deviation of three replicates. (c) Xylulose concentration rate in a low-enhanced XK strain plotted as a function of experiment time progression. (d) Comparison of xylulose utilization rate over the initial 12 h of fermentation in a high-enhanced XK strain and a high-enhanced XK HXT-strain.

the measured sugar consumption averaged across all replicates for a given strain at each sample point in an experiment. The three main goals of validation were to (1) verify that the HXT model of sugar uptake was sufficient to explain sugar uptake, (2) show that incorporation of the cell death into the model results in a better model fit to experimentally observed sugar uptake profiles, and (3) consider the accuracy of the model in predicting the production of secondary metabolites.

Overall, modeled xylulose uptake rates during the initial fermentation (before cell death played a large role) closely

approximated those observed during batch experiments. The internal dynamics of xylulose consumption were not strictly constrained (except in the wild type XK where XK capacity was constrained in the model). This suggests that the constraint of the xylulose transport pathway was sufficient to approximate xylulose utilization. This points to xylulose transport as the bottleneck for the XK enhanced strains.

The low and high-enhanced strains exhibited strong correlation between the model and experimental data in terms of sugar uptake (Fig. 5b, c, e, f, h and i). The wild type strain performed

Table 3
Best parameter fits – this table lists parameters, their description, and the best-identified fit using the Monte Carlo method described above. These values were used in modeling throughout the rest of this work.

Parameter fits used in modeling		
Parameter	Description	Value
XK capacity	Maximum capacity of xylulokinase (strain wt XK strains, all other strains)	0.4376, 1000 mM/gDCW-h
Theta max growth ratio	The maximum scalar by which the sugar consumption rate could increase in one time step	1.2932
Theta max degradation ratio	The minimum scalar by which the sugar consumption rate could decrease in one time step	0.935
Xylulose time scalar	The time scalar used to compare xylulose and glucose for transport	600.0975
Xylose time scalar*	The time scalar used to compare xylose and glucose for transport	55.556
Death recovery percentage	The percentage of cell metabolites recovered by living cell population after cell death	66.391%
ATP maintenance	The ATP cost to maintain a cell	0.988819 mM/gDCW-h

* Since xylose consumption was not possible in the model this parameter.

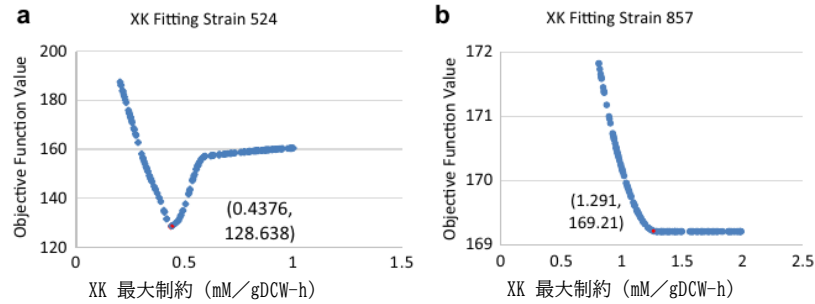


図4. 野生型対照株 (a) と低強化XK株 (b) におけるXK最大速度制約のフィッティング。これらの図では、より低い目的関数値がより最適である。データのラベルは最適なフィッティングを示す。

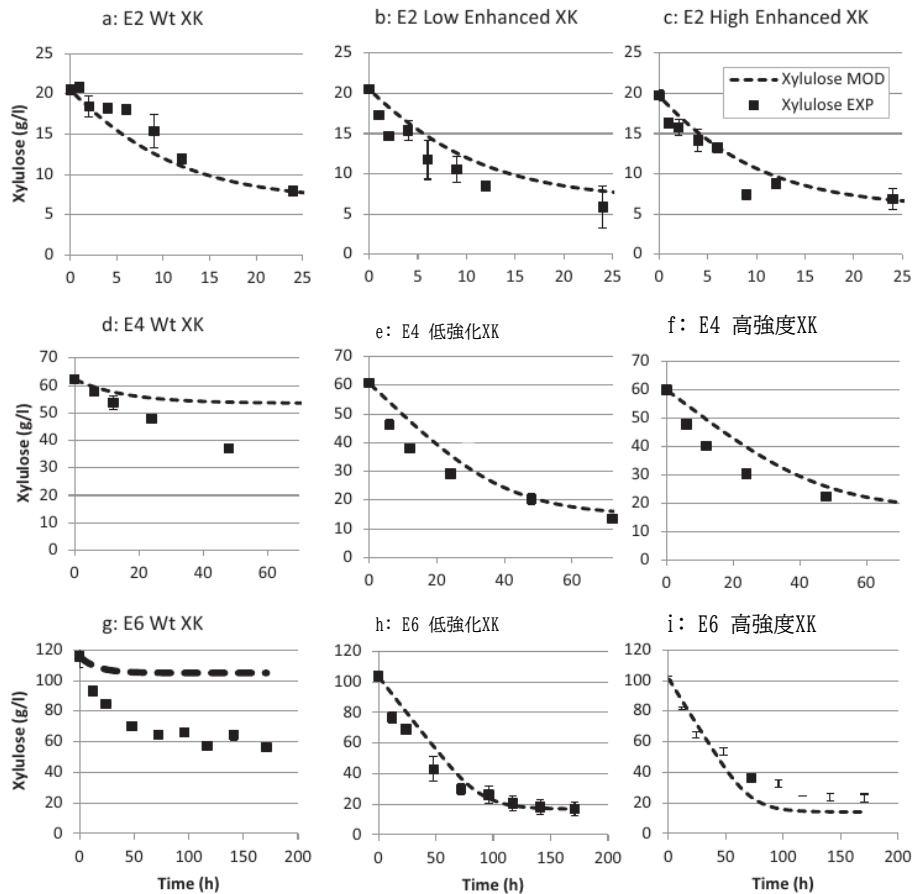


図5. 3つの実験条件 (E2, E4, E6) における、時間経過に伴うキシリトース濃度のモデル化と実験。低XK強化株と高XK強化株はうまくフィッティングしているが、野生型XK株はキシリトース消費を早期に終了しており、XK能力がいくぶん過剰に抑制されていることが示唆される。印は実験データ。破線はモデルデータ。エラーバーは3反復の標準偏差。

野生型株は、低糖濃度では良好な結果を示したが、糖濃度が50 g/lを超えると、最もフィッティングが悪くなった (図5e, f, hおよびi)。この株では、モデルは糖の消費が早期に停止すると予測した。この傾向は糖濃度が高いほど悪化し、XKが過度の制約を受けたか、ATP維持に必要な糖の取り込み量が高く設定されすぎた可能性を示唆している。

フラックス・バランス・モデルにデス・パラメーターを導入することで、バッチ発酵の終末ダイナミクスをより正確に捉えられるようになった (図6a)。このパラメーターがないと、モデル化された実行は、利用可能な糖分をすべて消費するか (ATP維持が非常に低く設定された場合)、ATP維持が満たされなくなるまで消費し、その結果モデルエラーが発生した。

死亡パラメーターが実験結果を捕らえる能力は、このモデルでは定数として設定されているATP維持パラメーターの値に非常に敏感である。しかし、一つの生物のATP維持レベルは培地組成に関連して変化することが示されている (Olz et al.) この制限のため、このモデルは糖の消費を早期に終了する傾向がある。この傾向は、開始キシリトース濃度が低い実験処理で特に顕著である (図6b)。このことは、ATP維持を満たすために必要な糖のレベルは、低糖濃度 (したがって、低エタノールストレスを示す低エタノール生産) の実験条件ではより低い可能性があり、死滅パラメーターはより研究が必要であることを示唆している。さらに、実際の細胞生存率は実験的に測定されていない。

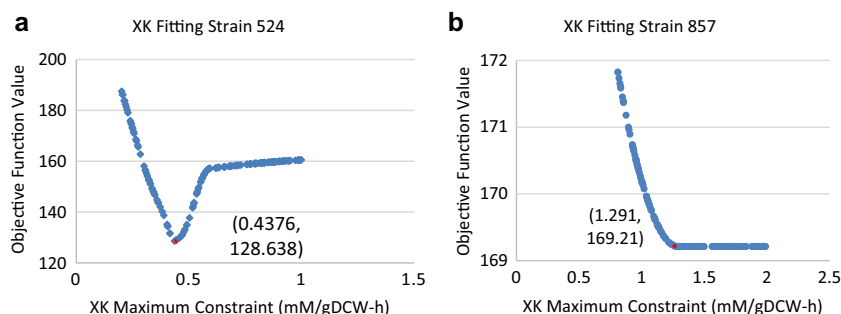


Fig. 4. Fitting of XK maximum rate constraint in a wild type control strain (a) and a low-enhanced XK strain (b). In these figures a lower objective function value is more optimal. Data label represents the best-identified fit.

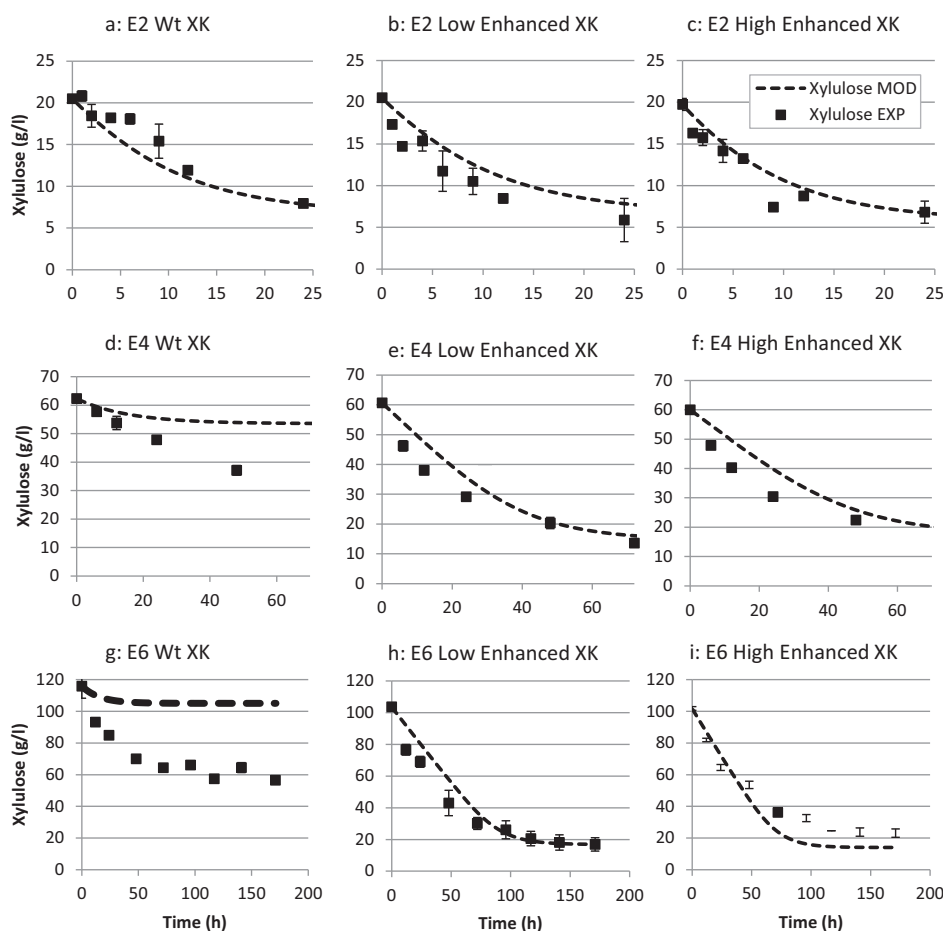
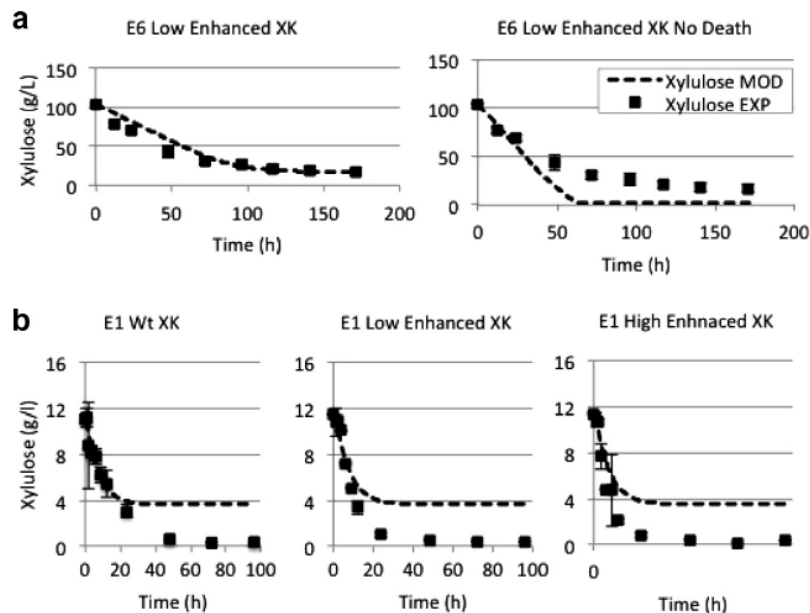


Fig. 5. Modeled and experimental xylulose concentration over time for three experimental conditions (E2, E4, and E6) – low and high XK enhanced strains fit well, but wild type XK strain terminates xylulose consumption prematurely suggesting that its XK capacity has been somewhat over constrained. Markers represent experimental data. Dashed line represents model data. Error bars are the standard deviation of three replicates.

well at lower sugar concentration, but was the poorest fitting for sugar concentrations above 50 g/l (Fig. 5e, f, h and i). For this strain the model predicted premature stoppage for sugar consumption. This trend was exacerbated at high sugar concentration and suggests that XK may have been over constrained or that the required sugar uptake for ATP maintenance was set too high.

The end dynamics of batch fermentation captured more accurately through the implementation of a death parameter in the flux balance model (Fig. 6a). Without this parameter, modeled runs would either consume all available sugar (when ATP maintenance was set very low) or would consume until ATP maintenance could not be satisfied resulting in a model error.

The ability of the death parameter to capture experimental results is highly sensitive to the value of the ATP maintenance parameter which is set as a constant in this model. However ATP maintenance levels for a single organism have been shown to change in correlation with media composition (Olz et al., 1993). Due to this limitation, the model tends to terminate sugar consumption prematurely. This trend is especially apparent in experimental treatments with low starting xylulose concentrations (Fig. 6b). This suggests that the level of sugar required to satisfy ATP maintenance may be lower for low sugar concentration (and thus low ethanol producing indicating lower ethanol stress) experimental conditions and that the death parameter requires greater study. Further, actual cell viability was not measured



(a)細胞死機能の有無によるモデルと実験データの比較-細胞死を含むとキシロース消費が不完全になる。(b)キシロースの開始量が少ない場合の細胞死関数と糖の開始量が少くないと、すべての株が糖を検出可能なレベル以下まで消費する。このことは、低糖（ひいては低エタノール）実験のモデル化には、ATP維持の要求が低い方が適していることを示唆している。印は実験データ。破線はモデルデータ。エラーバーは3反復の標準偏差。

従って、死滅パラメータはデータとモデルを改善するが、メカニズムは確認されていない。

4. Conclusion

本研究で開発されたモデルは、HXT輸送制限とキシロキナーゼ能力制約が、*S. cerevisiae*の混合糖発酵中の糖輸送を説明するのに十分であることを示している。モデル内に細胞死と代謝物のリサイクルを含めることで、バッチ発酵の終末ダイナミクスをよりよく表現できるようになった。このモデルの予測能力により、実験的研究で同定されたキシロース利用のボトルネックを検証することができ、将来的には*S. cerevisiae*をより指向的に改良できるようになるはずである。

付録A. 補足データ

この論文に関連する補足データは、オンライン版では <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.015>。

References

- Bertilsson, M., Andersson, J., Lidén, G., 2007. Modeling simultaneous glucose and xylose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* from kinetics and gene expression of sugar transporters. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 31, 369–377. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-007-0169-1>.
- Diderich, J.A., 1999. Glucose uptake kinetics and transcription of HXT genes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 274, 15350–15359. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.22.15350>.
- Gong, C.-S., Chen, L.-F., Flickinger, M.C., Chiang, L.-C., Tsao, G.T., 1981. Production of ethanol from D-xylose by using D-xylose isomerase and yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 430–436.
- Hotta, A., Tanino, T., Ito, T., Hasunuma, T., Ogino, C., Kondo, A., Ohmura, N., 2009. Bioethanol production from mixed sugars using sugar uptake ability enhanced yeast strain by overexpression of transporters. *J. Biosci. Bioeng.* 108, S53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.08.152>.
- Johansson, B., Hahn-Hägerdal, B., 2002. The non-oxidative pentose phosphate pathway controls the fermentation rate of xylulose but not of xylose in *Saccharomyces cerevisiae* TMB3001. *FEMS Yeast Res.* 2, 277–282.

- Kauffman, K.J., Prakash, P., Edwards, J.S., 2003. Advances in flux balance analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 491–496. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2003.08.001>.
- Kumar, D., Juneja, A., Hohenschuh, W., Williams, J.D., Murthy, G.S., 2012. Chemical composition and bioethanol potential of different plant species found in Pacific Northwest conservation buffers. *J. Renew. Sust. Energy* 4, 063114. <http://dx.doi.org/10.1063/1.4766889>.
- Lee, T.-H., Kim, M.-D., Park, Y.-C., Bae, S.-M., Ryu, Y.-W., Seo, J.-H., 2003. Effects of xylulokinase activity on ethanol production from D-xylulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.* 95, 847–852. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02055.x>.
- Liang, H., Gaber, R.F., 1996. A novel signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae* defined by Snf3-regulated expression of HXT6. *Mol. Biol. Cell* 7, 1953.
- Mahadevan, R., Edwards, J.S., Doyle, F.J., 2002. Dynamic flux balance analysis of diauxic growth in *Escherichia coli*. *Biophys. J.* 83, 1331.
- Matsushika, A., Goshima, T., Fujii, T., Inoue, H., Sawayama, S., Yano, S., 2012. Characterization of non-oxidative transaldolase and transketolase enzymes in the pentose phosphate pathway with regard to xylose utilization by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* 51, 16–25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2012.03.008>.
- Olz, R., Larsson, K., Adler, L., Gustafsson, L., 1993. Energy flux and osmoregulation of *Saccharomyces cerevisiae* grown in chemostats under NaCl stress. *J. Bacteriol.* 175, 2205–2213.
- Orth, J.D., Thiele, I., Palsson, B.O., 2010. What is flux balance analysis? *Nat. Biotechnol.* 28, 245–248.
- Ozcan, S., Johnston, M., 1995. Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1564–1572.
- Runquist, D., Hahn-Hägerdal, B., Radström, P., 2010. Comparison of heterologous xylose transporters in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels* 3, 422–430. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2007.10.014>.
- Sedlak, M., Ho, N.W.Y., 2004. Characterization of the effectiveness of hexose transporters for transporting xylose during glucose and xylose co-fermentation by a recombinant *Saccharomyces* yeast. *Yeast* 21, 671–684. <http://dx.doi.org/10.1002/yea.1060>.
- Sonnleitner, B., Kappeli, O., 1986. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: formulation and verification of a hypothesis. *Biotechnol. Bioeng.* 28, 927–937. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.260280620>.
- Tanino, T., Hotta, A., Ito, T., Ishii, J., Yamada, R., Hasunuma, T., Ogino, C., Ohmura, N., Ohshima, T., Kondo, A., 2010. Construction of a xylose-metabolizing yeast by genome integration of xylose isomerase gene and investigation of the effect of xylitol on fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88, 1215–1221. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-010-2870-2>.
- Wingren, A., Galbe, M., Zacchi, G., 2003. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnol. Prog.* 19, 1109–1117. <http://dx.doi.org/10.1021/bp0340180>.

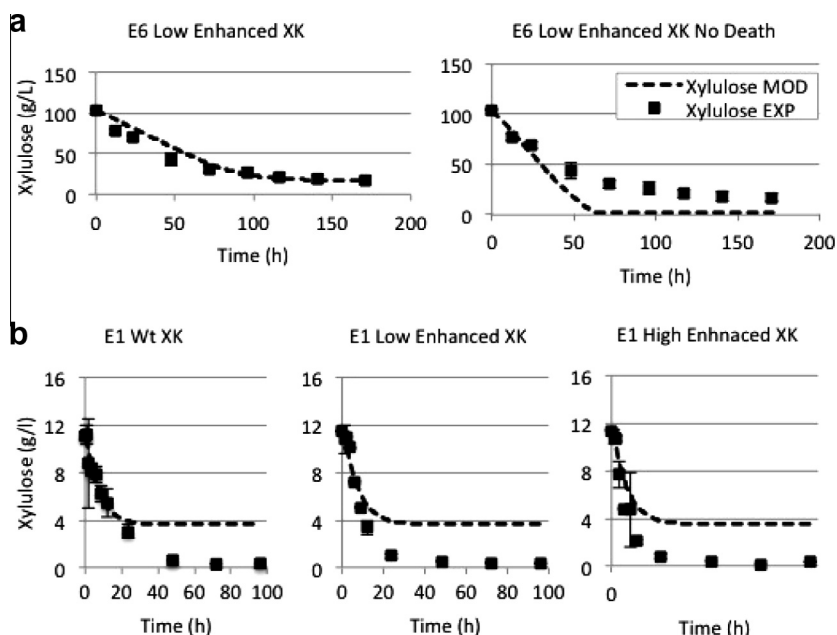


Fig. 6. (a) Comparison of model fit with and without cell death function – including cell death allows for incomplete xylulose consumption. (b) Cell death function fit at with low starting xylulose – with low starting sugar all strains consume sugar to below detectable levels. This suggests that a lower requirement for ATP maintenance would be more appropriate for modeling low sugar (and subsequently low ethanol) experiments. Markers represent experimental data. Dashed line represents model data. Error bars are the standard deviation of three replicates.

experimentally. Therefore, while the death parameter improves the data fit, the mechanism is not confirmed.

4. Conclusion

The model developed in this work demonstrates that HXT transport limitation and xylulokinase capacity constraint are sufficient to explain sugar transport during mixed sugar fermentation in *S. cerevisiae*. The inclusion of a cell death and metabolite recycle within the model allows for a better representation of end dynamics of batch fermentations. The predictive capabilities of the model allow for the validation of xylulose utilization bottlenecks identified in the experimental work and should allow for more directed modification of *S. cerevisiae* in the future.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.015>.

References

- Bertilsson, M., Andersson, J., Lidén, G., 2007. Modeling simultaneous glucose and xylose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* from kinetics and gene expression of sugar transporters. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 31, 369–377. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-007-0169-1>.
- Diderich, J.A., 1999. Glucose uptake kinetics and transcription of HXT genes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 274, 15350–15359. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.22.15350>.
- Gong, C.-S., Chen, L.-F., Flickinger, M.C., Chiang, L.-C., Tsao, G.T., 1981. Production of ethanol from D-xylose by using D-xylose isomerase and yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 430–436.
- Hotta, A., Tanino, T., Ito, T., Hasunuma, T., Ogino, C., Kondo, A., Ohmura, N., 2009. Bioethanol production from mixed sugars using sugar uptake ability enhanced yeast strain by overexpression of transporters. *J. Biosci. Bioeng.* 108, 553. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.08.152>.
- Johansson, B., Hahn-Hägerdal, B., 2002. The non-oxidative pentose phosphate pathway controls the fermentation rate of xylulose but not of xylose in *Saccharomyces cerevisiae* TMB3001. *FEMS Yeast Res.* 2, 277–282.

- Kauffman, K.J., Prakash, P., Edwards, J.S., 2003. Advances in flux balance analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 491–496. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2003.08.001>.
- Kumar, D., Juneja, A., Hohenschuh, W., Williams, J.D., Murthy, G.S., 2012. Chemical composition and bioethanol potential of different plant species found in Pacific Northwest conservation buffers. *J. Renew. Sust. Energy* 4, 063114. <http://dx.doi.org/10.1063/1.4766889>.
- Lee, T.-H., Kim, M.-D., Park, Y.-C., Bae, S.-M., Ryu, Y.-W., Seo, J.-H., 2003. Effects of xylulokinase activity on ethanol production from D-xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.* 95, 847–852. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02055.x>.
- Liang, H., Gaber, R.F., 1996. A novel signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae* defined by Snf3-regulated expression of HXT6. *Mol. Biol. Cell* 7, 1953.
- Mahadevan, R., Edwards, J.S., Doyle, F.J., 2002. Dynamic flux balance analysis of diauxic growth in *Escherichia coli*. *Biophys. J.* 83, 1331.
- Matsushika, A., Goshima, T., Fujii, T., Inoue, H., Sawayama, S., Yano, S., 2012. Characterization of non-oxidative transaldolase and transketolase enzymes in the pentose phosphate pathway with regard to xylose utilization by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* 51, 16–25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2012.03.008>.
- Olz, R., Larsson, K., Adler, L., Gustafsson, L., 1993. Energy flux and osmoregulation of *Saccharomyces cerevisiae* grown in chemostats under NaCl stress. *J. Bacteriol.* 175, 2205–2213.
- Orth, J.D., Thiele, I., Palsson, B.O., 2010. What is flux balance analysis? *Nat. Biotechnol.* 28, 245–248.
- Ozcan, S., Johnston, M., 1995. Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1564–1572.
- Runquist, D., Hahn-Hägerdal, B., Radstrom, P., 2010. Comparison of heterologous xylose transporters in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels* 3.
- Sassner, P., Galbe, M., Zacchi, G., 2008. Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials. *Biomass Bioenergy* 32, 422–430. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2007.10.014>.
- Sedlak, M., Ho, N.W.Y., 2004. Characterization of the effectiveness of hexose transporters for transporting xylose during glucose and xylose co-fermentation by a recombinant *Saccharomyces* yeast. *Yeast* 21, 671–684. <http://dx.doi.org/10.1002/yea.1060>.
- Sonnleitner, B., Kappeli, O., 1986. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: formulation and verification of a hypothesis. *Biotechnol. Bioeng.* 28, 927–937. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.260280620>.
- Tanino, T., Hotta, A., Ito, T., Ishii, J., Yamada, R., Hasunuma, T., Ogino, C., Ohmura, N., Ohshima, T., Kondo, A., 2010. Construction of a xylose-metabolizing yeast by genome integration of xylose isomerase gene and investigation of the effect of xylitol on fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88, 1215–1221. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-010-2870-2>.
- Wingren, A., Galbe, M., Zacchi, G., 2003. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnol. Prog.* 19, 1109–1117. <http://dx.doi.org/10.1021/bp0340180>.