



キシロースを使用するサッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) において、より高いエタノール生産を実現するための速度論的モデリングと感度解析。

Akira Fukuda,^{1,2} Yuki Kuriya,¹ Jin Konishi,² Kozue Mutaguchi,² Takeshi Uemura,² Daisuke Miura,³ and Masahiro Okamoto^{4,*}

九州大学大学院生物資源環境科学研究所合成生物学研究室, 〒812-8582 福岡市東区舞鶴3-1-1, JXTG日鉱石エネルギー株式会社中央技術研究所フロンティア研究室バイオ燃料研究開発グループ, 〒231-0815 横浜市中区千鳥町8, 日本,² 九州大学メディカルレドックスナビゲーションイノベーションセンター 代謝プロファイリング研究グループ,³ 九州大学大学院システム生命科学研究院 合成生物学研究室,⁴ 〒812-8582 福岡市東区舞鶴3-1-1

2018年9月17日受領、2018年10月25日受理 Available online xxx

我々は、内性キシロース資化性遺伝子を利用したキシロース資化性*Saccharomyces cerevisiae*株 (K7-XYL株) を構築した。このような自己クローニング酵母は、エタノール生産プロセスのコスト削減に大きく貢献すると期待される。しかし、利用可能な遺伝子源が限られているため、セルフクローニング酵母を最適な性能に改変することは困難である。そこで、セルフクローニング酵母のエタノール生産性を向上させるために、エタノール生産速度論モデルを構築し、感度解析を行った。アルコール脱水素酵素 (ADH1) は、エタノール生産経路における代謝ボトルネック反応として同定された。ADH1過剰発現株 (K7-XYL-ADH1) を構築し、50g/Lのキシロースを唯一の炭素源とするYP (酵母エキス10g/L、ペプトン20g/L) 培地で評価した。K7-XYL-ADH1株はK7-XYL株 (12.5g/L) よりも高いエタノール生産性 (13.8g/L) を示した。次に、K7-XYL-ADH1をグルコース80 g/L、キシロース50 g/Lを含むYP培地で評価したが、エタノール生産性はK7-XYLと変わらなかった (K7-XYL 46.3g/L、K7-XYL-ADH1 45.9g/L)。我々は、グルコースの存在により、細胞内部の酸化還元バランスが変化しと推定した。細胞内部の酸化還元バランスを変化させるために5Lジャーファーマンターで通気培養したところ、K7-XYL-ADH1株はK7-XYL株よりも高いエタノール生産性を示した (K7-XYL 45.0 g/L、K7-XYL-ADH1 49.4g/L)。その結果、ADH1がエタノール生産経路の代謝ボトルネックであることが確認された。このボトルネックを解消することで、セルフクローニング酵母は遺伝子組換え酵母とほぼ同等のエタノール生産性を示した。

© 2018, The Society for Biotechnology, Japan. All rights reserved.

[Key words: *Saccharomyces cerevisiae*; Self-cloning; Ethanol production; Xylose; Kinetic modeling; Metabolic bottleneck]

セルロース系バイオマスのエタノールへのバイオコンバージョンは、化石燃料から排出される二酸化炭素を削減するために世界的に注目されている。セルロース系バイオマスの主成分はセルロースとヘミセルロースで、それぞれグルコースとキシロースに分解される。キシロースは硬い木材やハーブに2番目に多く含まれる糖であるため、グルコースだけでなくキシロースもエタノールに変換することで、セルロース系バイオマスのエタノールへのバイオコンバージョンコストを大幅に削減できる可能性がある。

サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) は、グルコースからエタノールを生産するのに非常に有効であり、長い間発酵産業で使用されてきた。しかし、*S. cerevisiae*は天然ではキシロースを増殖とエタノール生産に利用することができない。そのため、多くの研究者がキシロースをエタノールに変換できる*S. cerevisiae*の人工株の開発を試みてきた。

キシロース発酵酵母*Scheffersomyces stipitis*由来のキシロース還元酵素 (XR) とキシリトール脱水素酵素 (XDH) 遺伝子の異種発現は、*S. cerevisiae*にキシロース発酵能を導入するためにしばしば用いられる (1e3)。しかし、こうして生産された酵母は外来遺伝子を持つため、遺伝子組換え生物 (GMO) とみなされ、使用時に管理や制限を受けるため、エタノール生産の経済性が低下する。この問題を克服する解決策として、「セルフクローニング」酵母の応用が考えられる。セルフクローニング酵母は異種遺伝子を含まず、生物自身と近縁種の遺伝子のみで構成されている。国によっては (日本など)、セルフクローニング酵母を遺伝子組み換え作物とみなしていないため (4)、拡散防止策が不要となる。このように、セルフクローニング酵母の利用は、エタノール製造コストの削減に大きく貢献する。これは、エタノールのように販売価格が低いものを製造する際には重要なポイントである。

*S. cerevisiae*は、*S. stipitis*のキシロース資化性XRおよびXDH遺伝子にそれぞれ相同なアルドース還元酵素 (GRE3) およびXDH (XYL2) をコードする遺伝子を持っている (5, 6)。GRE3とXYL2を持つキシロース資化性*S. cerevisiae*のセルフクローニングの可能性が示されている (7)。XYL2はキシロース存在下では誘導されなかったが、XDH活性も有するソルビトール脱水素酵素をコードするSOR1は誘導された。その後、我々はGRE3とSOR1を過剰発現させることにより、*S. cerevisiae*にキシロースを利用する能力を付与できることを示した (8)。

* Corresponding author at: Kyushu University, c/o School of Interdisciplinary Science and Innovation, Student Affairs, Center Building 1, 744 Motoima, Nishi-ku, 819-0395 福岡県福岡市東区舞鶴3-1 九州大学大学院システム生命科学研究院内 Tel: 081 92 642 6691; fax: 081 92 642 6744. E-mail addresses: fukuda@brs.kyushu-u.ac.jp (A. Fukuda), kuriya@people.kobe-u.ac.jp (Y. Kuriya), jin.konishi@jxtg.com (J. Konishi), kozue.mutaguchi@jxtg.com (K. Mutaguchi), takeshi.uemura.922@jxtg.com (T. Uemura), daipon@agr.kyushu-u.ac.jp (D. Miura), okahon@brs.kyushu-u.ac.jp (M. Okamoto).



Kinetic modeling and sensitivity analysis for higher ethanol production in self-cloning xylose-using *Saccharomyces cerevisiae*

Akira Fukuda,^{1,2} Yuki Kuriya,¹ Jin Konishi,² Kozue Mutaguchi,² Takeshi Uemura,² Daisuke Miura,³ and Masahiro Okamoto^{4,*}

Laboratory of Synthetic Biology, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Science, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan,¹ Biofuel R&D Group, Frontier Research Laboratory, Central Technical Research Laboratory, JXTG Nippon Oil & Energy Corporation, 8 Chidoricho, Naka-ku, Yokohama 231-0815, Japan,² Metabolic Profiling Research Group, Innovation Center for Medical Redox Navigation, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan,³ and Laboratory of Synthetic Biology, Graduate School of Systems Life Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan⁴

Received 17 September 2018; accepted 25 October 2018

Available online xxx

We constructed a xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain using endogenous xylose-assimilating genes (strain K7-XYL). Such self-cloning yeast is expected to make a great contribution to cost reduction of ethanol production processes. However, it is difficult to modify self-cloning yeast for optimal performance because the available gene source is limited. To improve the ethanol productivity of our self-cloning yeast, a kinetic model of ethanol production was constructed and sensitivity analysis was performed. Alcohol dehydrogenase (*ADH1*) was identified as a metabolic bottleneck reaction in the ethanol production pathway. An *ADH1* overexpression strain (K7-XYL-*ADH1*) was constructed and evaluated in YP (yeast extract 10 g/L, peptone 20 g/L) medium containing 50 g/L xylose as the sole carbon source. Strain K7-XYL-*ADH1* showed higher ethanol productivity (13.8 g/L) than strain K7-XYL (12.5 g/L). Then, K7-XYL-*ADH1* was evaluated in YP medium containing 80 g/L glucose and 50 g/L xylose; however, the ethanol productivity did not change relative to that of K7-XYL (K7-XYL 46.3 g/L, K7-XYL-*ADH1* 45.9 g/L). We presumed that due to the presence of glucose, the internal redox balance of the cells had changed. On culturing in an aerated 5-L jar fermentor to change the internal redox balance of cells, strain K7-XYL-*ADH1* showed higher ethanol productivity than K7-XYL (K7-XYL 45.0 g/L, K7-XYL-*ADH1* 49.4 g/L). Our results confirmed that *ADH1* was a metabolic bottleneck in the ethanol production pathway. By eliminating the bottleneck, self-cloning yeast showed almost the same ethanol productivity as genetically modified yeast.

© 2018, The Society for Biotechnology, Japan. All rights reserved.

[Key words: *Saccharomyces cerevisiae*; Self-cloning; Ethanol production; Xylose; Kinetic modeling; Metabolic bottleneck]

Bioconversion of cellulosic biomass to ethanol is attracting much attention worldwide to help reduce carbon dioxide emissions from fossil fuels. The main components of cellulosic biomass are cellulose and hemicellulose, which are degraded to glucose and xylose, respectively. Because xylose is the second most abundant sugar in hard wood and herbs, converting not only glucose but also xylose to ethanol could greatly reduce the cost of bioconversion of cellulosic biomass to ethanol.

Saccharomyces cerevisiae is highly effective for the production of ethanol from glucose and has been used in the fermentation industry for a long time. However, *S. cerevisiae* cannot naturally use xylose for growth and ethanol production. Thus, many researchers have tried to develop engineered *S. cerevisiae* strains that can convert xylose to ethanol. Heterologous expression of the xylose reductase (XR) and xylitol dehydrogenase (XDH) genes from the

xylose fermenting yeast *Scheffersomyces stipitis* is often used to introduce xylose-fermenting ability into *S. cerevisiae* (1–3). However, since the yeast thus produced has foreign genes, it is regarded as a genetically modified organism (GMO) and subjected to controls and limitations when it is used, so the economic efficiency of ethanol production decreases. A possible solution to overcome this problem could be the application of “self-cloning” yeast. Self-cloning yeast does not contain heterologous genes, and consists only of genes from the organism itself and closely related species. Some countries (such as Japan) do not regard self-cloning yeast as a GMO (4), so diffusion prevention measures become unnecessary. Thus, the use of self-cloning yeast greatly contributes to reduction of ethanol production costs. This is an important point when manufacturing something with a low selling price, such as ethanol.

S. cerevisiae possesses genes encoding aldose reductase (*GRE3*) and XDH (*XYL2*) that are respectively homologous to the xylose-assimilating XR and XDH genes of *S. stipitis* (5,6). The possibility of creating self-cloning xylose-using *S. cerevisiae* with *GRE3* and *XYL2* has been demonstrated (7). While *XYL2* was not induced in the presence of xylose, *SOR1*, coding for a sorbitol dehydrogenase that also has XDH activity, was induced. Subsequently, we showed that *S. cerevisiae* could be given the ability to use xylose by overexpression of *GRE3* and *SOR1* (8). These are the only reports on

* Corresponding author at: Kyushu University, c/o School of Interdisciplinary Science and Innovation, Student Affairs, Center Building 1, 744 Motoiima, Nishi-ku, Fukuoka-City 819-0395, Japan. Tel.: +81 92 642 6691; fax: +81 92 642 6744.

E-mail addresses: fukuda@brs.kyushu-u.ac.jp (A. Fukuda), kuriya@people.kobe-u.ac.jp (Y. Kuriya), jin.konishi@jxtg.com (J. Konishi), kozue.mutaguchi@jxtg.com (K. Mutaguchi), takeshi.uemura.922@jxtg.com (T. Uemura), daipon@agr.kyushu-u.ac.jp (D. Miura), okahon@brs.kyushu-u.ac.jp (M. Okamoto).

これらは、キシロースを利用する *S. cerevisiae* をセルフクローニングで作出した唯一の報告である。しかし、セルフクローニングしたキシロース利用 *S. cerevisiae* のエタノール生産性は商業的に成立するほど十分ではないため、さらなる改良が必要である。

代謝経路シミュレーションは、工業的に重要な微生物を培養する際に、その生産性を向上させるための最も成功した有用なアプローチの一つである (9e12)。代謝流束解析 (MFA) は、代謝経路ネットワークにおける個々のステップの役割を評価するための体系的な手法である。MFA と代謝モデリングを利用したキシロース利用酵母の研究がこれまでに報告されているが (13, 14)、いずれも遺伝子組み換え作物に関するものである。セルフクローニング型キシロース利用酵母の MFA と代謝経路シミュレーションの前例はない。遺伝子組換え酵母と自己クローニング酵母では、キシロースを代謝するための遺伝子が異なり、補酵素の特異性も異なるため、代謝挙動も異なると考えられる。グルコースからのエタノール収率は、多くの菌株で理論値に近くっており、これ以上の改善の余地はほとんどない。しかし、セルフクローニング酵母のキシロースからのエタノール収率はまだ低いので、これを改善することができる。本研究では、キシロースを培養した自己クローニング酵母の培養上清と細胞内代謝産物を解析し、キシロースからのエタノール生産経路の速度論モデルを構築した。そして、代謝ボトルネックを同定し、そのボトルネックに対応する遺伝子进行操作した。さらに、グルコースとキシロースの混合培養でエタノール生産性を調べた。これはセルフクローニングしたキシロースを用いる *S. cerevisiae* の代謝シミュレーションに関する最初の報告である。

MATERIALS AND METHODS

菌株、培地および培養条件 本試験で用いた菌株は、清酒酵母 *S. cerevisiae* 協成 7 号 (K7) である。酵母細胞の前培養には、YPD 培地 (酵母エキス 10 g/L、ペプトン 20 g/L、グルコース 20 g/L) を用いた。バッチ発酵は、YPD 培地 (pH 5.0) 中で、30°C、140 rpm で振とうしながら、500 mL のバッフル付き振とうフラスコ (エタノールの蒸発を防ぐため、フィルター付きシリコン栓を使用) で行った。各フラスコには、炭素源として表示量のグルコースと/またはキシロースを入れた。初期細胞濃度は 2×10^8 個/mL でフラスコ発酵させた。溶存酸素濃度を 0.2 ppm に制御するため、作業容積 3 L の 5L ジャーファーマンター (エイブル、東京、日本) もバッチ発酵に使用した。温度は 30°C に保ち、pH は 5 M NaOH を添加して 5.0 に制御した。培養は 50 mL/分 で空気をスパージした。ジャー発酵の初期細胞濃度は 1×10^7 個/mL であった。フラスコ発酵とジャー発酵を各 2 回行った。酵母形質転換体の選抜には、6.7 g/L の酵母窒素塩基を含む完全培地 (SC) を用いた。プラスミドのクローニングには大腸菌 JM109 を用い、LB 培地 (酵母エキス 5 g/L、トリプトン 10 g/L、NaCl 5 g/L) 中、37°C、140 rpm で振とう培養した。

プラスミドと菌株の構築 ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK1) プロモーターとターミネーターを持つキシロース同化遺伝子発現カセット、XR、XDH、キシロースキナーゼ (XKS) の構築は、以前に記載されている (8)。EcoRI および HindIII 制限部位を持つ発現カセットを pUC18 (日本、滋賀、タカラ) のマルチプルクローニングサイトに導入し、pUC-XYL を作成した。XYL2 を K7 株のゲノム DNA から SmaI 制限部位で増幅し、SmaI で消化した pUC18 に導入して pUC-XYL2 を作成した。pUC-XYL2-XYL-XYL2 を SmaI で消化し、K7 に形質転換して K7-XYL2 を作成した。酵母の形質転換は酢酸リチウム法で行った (15)。形質転換体は、キシロースを唯一の炭素源とする SC 寒天プレート上で選抜した。

アルコール脱水素酵素 (ADH1) 過剰発現ベクターの構築 は以下の通りである。K7 株のゲノム DNA から、PGK1 プロモーターとターミネーター、ADH1 をそれぞれ増幅した。pAUR135-ADH1 を StuI で消化し、K7-XYL に形質転換して K7-XYLADH1 株を作製した。形質転換体の選抜には、YPD 寒天プレートに 0.5 mg/L aureobasidin A (タカラ) を添加した。

分析方法 細胞密度は、UV1800 分光光度計 (島津製作所、京都、日本) を用いた 600 nm の光学密度測定 (OD600) により測定した。細胞増殖は、OD600 との所定の相関を用いて算出した。培養上清中のグルコース、キシロース、エタノール、グリセロール、キシリトール、酢酸の濃度は、

SUGAR SP0810 カラム (Shodex, Tokyo, Japan) を備えた高速液体クロマトグラフィーシステム (島津製作所) を用い、水を移動相として、流速 0.8 mL/分、80°C で測定した。

細胞内代謝物の定量は、液体クロマトグラフィー/三重四重極質量分析計 (LC-QqQ-MS) を用いて行った。LC-QqQMS による代謝物分析は既述 (16) と同様に行い、サンプルは以下のように調製した。クエンチのために、1 mL の細胞培養液を、20°C に予冷した 5 mL の純粋なメタノールを含む 15 mL のファルコンチューブに注入し、転倒混和した。その後、サンプルを 15,000g、9°C で 2 分間遠心し、上清を捨てた。ペレットを 3 mL の予冷水で洗浄し、9°C で 15,000g、2 分間遠心した。サンプルは代謝物抽出まで 80°C で保存した。代謝物抽出のため、ペレットを内部標準物質として 6 mM (p)-10-カンファースルホン酸 (東京化成工業、東京、日本) を含む 1 mL の 100% メタノールに再懸濁し、2 mm ジルコニアビーズを含む 1.5 mL チューブに移した。この細胞懸濁液を、ビーズセルディスラプター (MS-100R; タカラトミー、東京、日本) を用いて、3000 rpm、9°C で 5 分間破碎した。その後、試料を 15,000 g、9°C で 5 分間遠心し、上清を氷上で新しい 15 mL ファルコンチューブに回収した。ペレットを 1 mL の 50% (v/v) メタノールに懸濁し、再度破碎した。サンプルを遠心分離し、上清をすでに回収したメタノール抽出液の入ったファルコンチューブに加えた。回収した上清を、クロロホルムと水を 1:1.5:1 の割合で混合し、15,000g、9°C で 5 分間遠心分離した。抽出液の水相を真空下で乾燥させ (CVE-2000、EYELA、東京および DTU-20、ULVAC、神奈川、日本)、さらに使用するまで 80°C で保存した。

モデルの構築 キシロース資化性 *S. cerevisiae* におけるキシロースからのエタノール生産の数理モデルを、既報のモデル (17e19) を参考に常微分方程式系により構築した。図 1 に示すように、代謝モデルには、中心炭素代謝系、ペントースリン酸経路、キシロース代謝経路、グリセロール、エタノール、酢酸生産経路が含まれる。数理モデルは、細胞外 (培養液) と細胞内 (細胞質) の 2 つのコンパートメントで構成されている。細胞内代謝反応は、各酵素反応機構 (20) に基づいて記述した (表 S1)。糖の取り込みは、細胞内外の濃度差に基づく Michaelis-Menten 型の式で記述した (21, 22)。2 つのコンパートメント間の物質輸送は一次方程式で記述した。細胞内外の物質輸送による各区画の濃度変化は、酵母特異的細胞容積 2.0 mL/g-乾燥細胞重量 (23) に基づいて決定した (表 S2)。モデルに含まれる補酵素のうち、ATP、ADP、AMP、NAD⁺、NADH、NADP⁺、NADPH の濃度は、実験的な時間経過データから補間し、各時点で補間によって計算された値を他の常微分方程式に代入してシミュレーションに使用した (表 S3 および図 S1)。キノン、キノール、CoA、リン酸、CO₂ は時間に関係なく一定と仮定した (表 S2)。

まず、BRENDA (24) などの酵素反応データベースで数理モデルの動力学パラメータ値を調べ、可能な限り多くの動力学パラメータ値を取得した (表 S4)。次に、初期キシロース濃度 50 g/L のフラスコ培養で得られた実験データを再現するため、実数値遺伝的アルゴリズム (25) と手動操作により、値が不明なその他のパラメーターを推定した。シミュレーションは Gear 法 (26) を用いて行った (表 S5)。モデルのシミュレーション結果は、実験結果の時間経過および実験値とシミュレーション値の相関係数との比較によって評価した。キシロースキナーゼ (XKS1) アップレギュレーション株、ビルビン酸デカルボキシラーゼ (PDC1) アップレギュレーション株、ビルビン酸トランスポートー ダウンレギュレーション株という 3 つの K7-XYL 変異体を作成し、カイネティクスパラメータ推定の過大評価を防いだ。3 つの変異株の実験値とシミュレーション値の相関係数を表 S6 に示す。XKS1 アップレギュレーション株と PDC1 アップレギュレーション株は、材料と方法に記載した ADH1 アップレギュレーション株の作製方法と同じ方法で作製した。ビルビン酸トランスポートー 発現低下株は、ビルビン酸トランスポートー 自体を破壊することが困難であったため、PDA1 を破壊して作製したビルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDA1) 発現低下株で代用した。エタノール生産系の数式、動力学パラメータ、および従属変数の初期値は、補足資料 (表 S1eS5) に記載されている。

感度解析 感度解析は、開発したモデルの妥当性を評価し、どの経路がエタノール生産性に最も影響を与えるかを明らかにするための手法である。本研究では、48 時間後までにすべてのキシロースが消費されたため、48 時間後のエタノール生産量を評価した。

どの反応経路がエタノール生産に影響を与えるかを明らかにするため、後述するエタノールの終点偏差 (ED) を評価した。この計算では、モデル内の速度方程式の各速度パラメータに 100% の増加を割り当てた。各速度パラメータは、このように個別にテストした。

$$ED \% 100 \left(\frac{[\text{エタノール}]_{\text{end}} - [\text{エタノール}]_{\text{control}}}{[\text{エタノール}]_{\text{control}}} \right) \quad (1)$$

ここで、 $[\text{Ethanol}]_{\text{change}}$ は速度式中の速度パラメーターが 100% 増加したときの 48 時間後のエタノール濃度、 $[\text{Ethanol}]_{\text{control}}$ はエタノール濃度を変化させなかったときの濃度である。ED の絶対値が高いほど、エタノール濃度が高いことを示す。

creating self-cloning xylose-using *S. cerevisiae*. However, as the ethanol productivity of the self-cloning xylose-using *S. cerevisiae* is not sufficient to be commercially viable, further modification is needed.

Metabolic pathway simulation is one of the most successful and useful approaches for improving the productivity of industrially relevant microorganisms during their cultivation (9–12). Metabolic flux analysis (MFA) is a systematic method to assess the roles of individual steps in a metabolic pathway network. Previous studies on xylose-using yeast utilizing MFA and metabolic modeling have been reported (13,14), but all relate to GMOs. There is no precedent for MFA and metabolic pathway simulation of self-cloning xylose-using yeast. GMO yeast and self-cloning yeast have different genes used to metabolize xylose, and because of different coenzyme specificities, their metabolic behavior is considered to be different.

The ethanol yield from glucose is now close to the theoretical value in many strains, and there is little margin for further improvement. However, since the ethanol yield from xylose in self-cloning yeast is still low, this can be improved. In this study, we analyzed the culture supernatant and intracellular metabolites of self-cloning xylose-using *S. cerevisiae* in xylose culture and constructed a kinetic model of the ethanol production pathway from xylose. Then, we identified a metabolic bottleneck and manipulated a gene corresponding to the bottleneck. Furthermore, ethanol productivity was examined in glucose and xylose mixed culture. This is the first report on metabolic simulation of self-cloning xylose-using *S. cerevisiae*.

MATERIALS AND METHODS

Strain, media and culture conditions The strain used in this study was the industrial sake yeast *S. cerevisiae* Kyokai No. 7 (K7). For precultivation of yeast cells, YPD medium (yeast extract 10 g/L, peptone 20 g/L, glucose 20 g/L) was used. Batch fermentations were carried out in 500-mL baffled shaken flasks (with a filtered silicone plug to avoid ethanol evaporation) at 30°C with shaking at 140 rpm in YPD medium (pH 5.0). Each flask contained the indicated amount of glucose and/or xylose as the carbon source(s). The initial cell concentration was 2×10^8 cells/mL for flask fermentation. A 5-L scale jar fermentor (ABLE, Tokyo, Japan) with 3 L working volume was also used for batch fermentation to control the dissolved oxygen concentration at 0.2 ppm. The temperature was maintained at 30°C, and the pH was controlled at 5.0 through addition of 5 M NaOH. The culture was sparged with air at 50 mL/min. The initial cell concentration was 1×10^7 cells/mL for jar fermentation. Flask and jar fermentor fermentations were carried out twice each. Synthetic complete (SC) medium containing 6.7 g/L yeast nitrogen base was used for yeast transformant selection. *Escherichia coli* JM109 was used for cloning of plasmids and grown at 37°C with shaking at 140 rpm in LB medium (yeast extract 5 g/L, tryptone 10 g/L, NaCl 5 g/L).

Plasmid and strain construction Construction of the xylose assimilating gene expression cassette, XR, XDH and xylulose kinase (XKS) with a phosphoglycerate kinase (*PGK1*) promoter and a terminator, was described previously (8). The expression cassette with *EcoRI* and *HindIII* restriction sites was introduced into the multiple cloning site of pUC18 (Takara, Shiga, Japan) to create pUC-XYL. *XYL2* was amplified from the genomic DNA of strain K7 with a *SmaI* restriction site and introduced into *SmaI*-digested pUC18 to create pUC-XYL2. pUC-XYL and pUC-XYL2 were digested with *EcoRI* and *HindIII*, and *Apal* respectively. The fragments were bluntly ligated to create pUC-XYL2-XYL-XYL2. pUC-XYL2-XYL-XYL2 was digested with *SmaI* and transformed into K7 to produce strain K7-XYL. Yeast transformation was carried out by the lithium acetate method (15). Transformants were selected on SC agar plates with xylose as the sole carbon source.

Construction of the alcohol dehydrogenase (*ADH1*) overexpression vector was as follows. A *PGK1* promoter and terminator, and *ADH1*, were respectively amplified from the genomic DNA of strain K7. The three fragments were ligated and introduced into the *SmaI* site of pAUR135 (Takara) to create pAUR135-*ADH1*. pAUR135-*ADH1* was digested with *StuI* and transformed into K7-XYL to produce strain K7-XYL-*ADH1*. For selection of transformants, 0.5 mg/L aureobasidin A (Takara) was added to YPD agar plates.

Analytical methods Cell density was measured by optical density measurement at 600 nm (OD600) using a UV1800 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). Cell growth was calculated using a predetermined correlation with OD600.

Concentrations of glucose, xylose, ethanol, glycerol, xylitol, and acetate in culture supernatants were determined with a high-performance liquid

chromatography system (Shimadzu) equipped with a SUGAR SP0810 column (Shodex, Tokyo, Japan) using water as the mobile phase at a flow rate of 0.8 mL/min and 80°C.

Intracellular metabolites were quantitated using liquid chromatography/triple-stage quadrupole mass spectrometry (LC-QqQ-MS). Metabolite analysis by LC-QqQ-MS was performed as previously described (16), and samples were prepared as follows. For quenching, 1 mL cell culture was injected into a 15-mL Falcon tube containing 5 mL pure methanol precooled to –20°C and mixed by inversion. Subsequently, samples were centrifuged at 15,000 $\times g$ at –9°C for 2 min, and the supernatant was discarded. The pellets were washed with 3 mL precooled water and centrifuged at 15,000 $\times g$ at –9°C for 2 min. Samples were stored at –80°C until metabolite extraction. For metabolite extraction, the pellets were resuspended in 1 mL 100% methanol containing 6 μM (+)-10-camphor sulfonic acid (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan) as an internal standard and transferred to a 1.5-mL tube that contained 2 mm zirconia beads. The cell suspension was disrupted using a bead cell disrupter (MS-100R; TOMY, Tokyo, Japan) at 3000 rpm and –9°C for 5 min. Then, samples were centrifuged at 15,000 $\times g$ at –9°C for 5 min, and supernatants were collected in a fresh 15-mL Falcon tube on ice. The pellets were resuspended in 1 mL 50% (v/v) methanol and disrupted again. Samples were centrifuged, and supernatants were added to the Falcon tube containing the methanol extract already recovered. The collected supernatants were mixed with chloroform and water at a ratio of 1:1.5:1 and centrifuged at 15,000 $\times g$ at –9°C for 5 min. The aqueous phase of the extract was dried under vacuum (CVE-2000, EYELA, Tokyo and DTU-20, ULVAC, Kanagawa, Japan) and stored at –80°C until further use.

Model development A mathematical model of ethanol production from xylose in xylose-assimilating *S. cerevisiae* was constructed by an ordinary differential equation system with reference to previously reported models (17–19). As Fig. 1 shows, the metabolic model includes the central carbon metabolism system, pentose phosphate pathway, xylose metabolism pathway, and glycerol, ethanol and acetic acid production pathways. The mathematical model consists of two compartments: extracellular (culture fluid) and intracellular (cytoplasm). The intracellular metabolic reactions were described based on each enzyme reaction mechanism (20) (Table S1). Sugar uptake was described by a Michaelis–Menten type equation based on the difference in concentration inside and outside the cell (21,22). Substance transport between the two compartments was described via linear equations. Concentration change in each compartment because of the transport of substances inside and outside the cell was determined based on the yeast-specific cell volume 2.0 mL/g-dry cell weight (23) (Table S2). Among the coenzymes included in the model, ATP, ADP, AMP, NAD⁺, NADH, NADP⁺ and NADPH concentrations were interpolated from experimental time course data and used in simulation by substituting the values calculated by interpolation at each time point into other ordinary differential equations (Table S3 and Fig. S1). Quinone, quinol, CoA, phosphoric acid and CO₂ were assumed to be constant regardless of time (Table S2).

First, the kinetic parameter values for the mathematical model were investigated in enzyme reaction databases such as BRENDA (24), and as many kinetic parameter values as possible were acquired (Table S4). Next, other parameters whose values were unknown were estimated using a real-valued genetic algorithm (25) and manual operation to reproduce the experimental data obtained in flask culture with an initial xylose concentration of 50 g/L. Simulations were carried out with the Gear method (26) (Table S5). The simulation results of the model were evaluated by comparison with the time course of the experimental results and the correlation coefficient between the experimental values and the simulation values. Three mutants of K7-XYL, a xylulose kinase (*XKS1*) upregulation strain, a pyruvate decarboxylase (*PDC1*) upregulation strain, and a pyruvate transporter downregulation strain, were created to prevent overfitting in kinetic parameter estimation. The correlation coefficient between the experimental values and the simulation values of three mutants are shown in Table S6. A *XKS1* upregulation strain and a *PDC1* upregulation strain were constructed in the same method for preparing an *ADH1* upregulation strain described in the materials and methods. A pyruvate transporter downregulation strain was substituted by a pyruvate dehydrogenase (*PDA1*) downregulation strain, which was created by disruption of *PDA1*, since it was difficult to disrupt pyruvate transporter itself. The mathematical equations for the ethanol production system, kinetic parameters, and initial values of dependent variables are described in the supplemental materials (Tables S1–S5).

Sensitivity analysis Sensitivity analysis is a method for assessing the validity of a developed model and clarifying which pathway(s) have the most impact, in the present case on ethanol productivity. The amount of ethanol production at 48 h was assessed in this study because all the xylose was consumed by 48 h.

The endpoint deviation (ED) of ethanol described below was assessed to reveal which reaction pathway(s) impact ethanol production. In this calculation, we assigned a 100% increase to each kinetic parameter in rate equations in the model; each kinetic parameter was tested individually in this way.

$$ED = 100 \times ([\text{Ethanol}]_{\text{change}} - [\text{Ethanol}]_{\text{control}}) / [\text{Ethanol}]_{\text{control}} \quad (1)$$

where $[\text{Ethanol}]_{\text{change}}$ was the ethanol concentration at 48 h given a 100% increase in the kinetic parameter in the rate equation, and $[\text{Ethanol}]_{\text{control}}$ was the ethanol concentration without any change. The higher the absolute value of ED, the more a

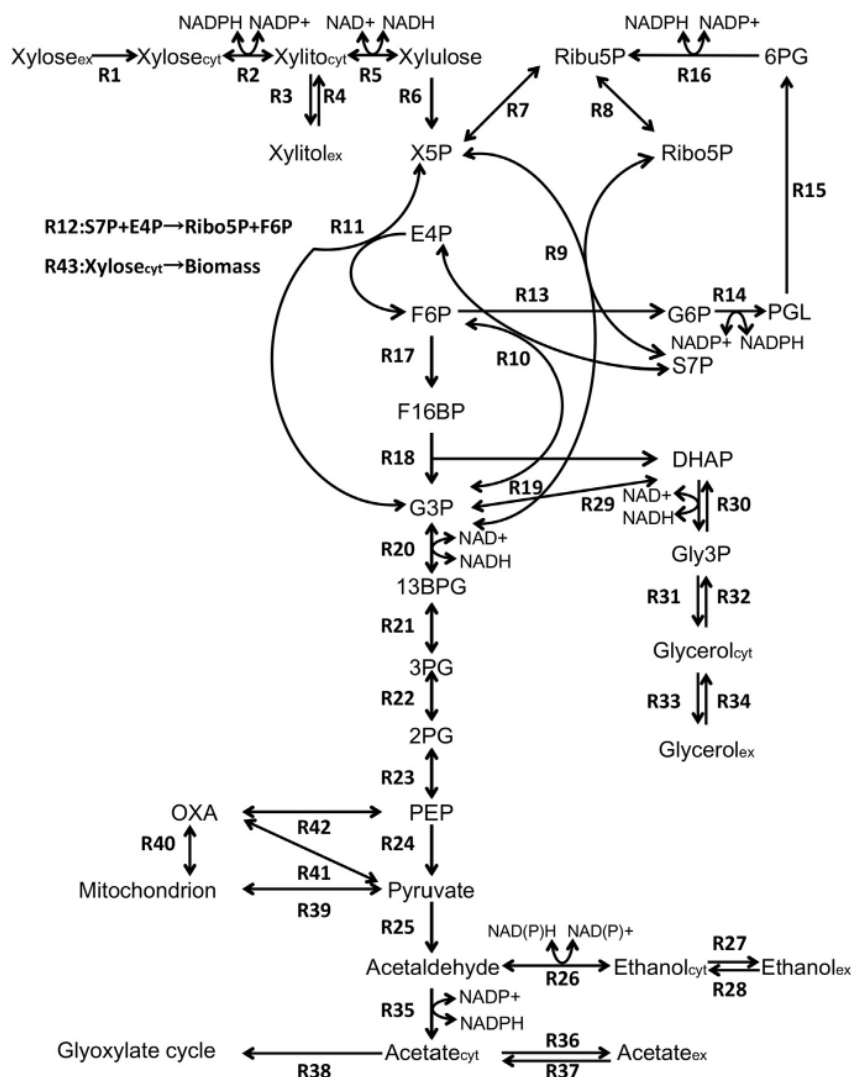


図1. キシロースからのエタノール生産の代謝経路。X5P、キシロース5-リン酸；Ru5P、リボース5-リン酸；R5P、リボース5-リン酸；S7P、セドヘブツロース7-リン酸；GAP、グリセルアルデヒド3-リン酸；E4P、エリスロース4-リン酸；F6P、フルクトース6-リン酸；G6P、グルコース6-リン酸；PGL、6-ホスホグルコノラクトン；6PG、6-ホスホグルコネート；FBP、フルクトース-1,6-ビスホスホネート；1,3BPG、1,3-ビスホスホグリセレート；3PG、グリセレート3-ホスフェート；2PG、グリセレート2-ホスフェート；PEP、ホスホエノールピルビン酸；DHAP、ジヒドロキシアセトンホスフェート；Gly3P、グリセロール3-ホスフェート；OXA、オキサロ酢酸。

kinetic parameter affects the ethanol production. Various genetic manipulation strategies were developed based on the outcomes of this analysis.

RESULTS

エタノール生産経路の速度論的シミュレーションモデルの開発 K7-XYL株のバッチ培養を500mLのバッフル付き振とうフラスコで行い、初期キシロース濃度を50g/Lとして実験データを取得し、エタノール生産の速度論的シミュレーションモデルの開発に備えた。実験データとシミュレーション結果を図2に示す。シミュレーションはC言語で開発した独自のプログラムを用い、43の反応と46の代謝物をモデルに組み込んだ（表S1およびS5）。代謝濃度データと代謝初期状態は、本研究で取得したデータに基づいて決定した。モデルには、先行研究(17,19)に基づき、6-ホスホフルクトキナーゼとピルビン酸キナーゼのアロステリック制御を含めた。

細胞増殖速度の式には、シミュレーションにおける過剰な増殖を避けるため、増殖停止の項が含まれていた。補酵素については、測定によって得られた補酵素濃度の時系列データを補間し、時間の関数として表した。基質および/または生成物による競合阻害や平衡定数などの制約条件は、酵素の速度論と反応に基づいた。各代謝物について、実験データとシミュレーション結果の相関係数(r)を算出したところ、キシロース：0.999、キシリトール：0.953、グリセロール：0.997、エタノール：0.999、バイオマス：0.991、酢酸：0.927となり、全体のrは0.978であった。運動パラメータの過大評価を避けるため、K7-XYLの3つの変異体、XKS1 アップレギュレーション株、PDC1 アップレギュレーション株、ピルビン酸トランスポーター ダウンレギュレーション株を作成した。モデルの動力学パラメータを3つの変異に対応するように1箇所ずつ変更し、シミュレーションを行った。シミュレーション結果は、表S6に示すように、3つの変異体における実験データと一致した。

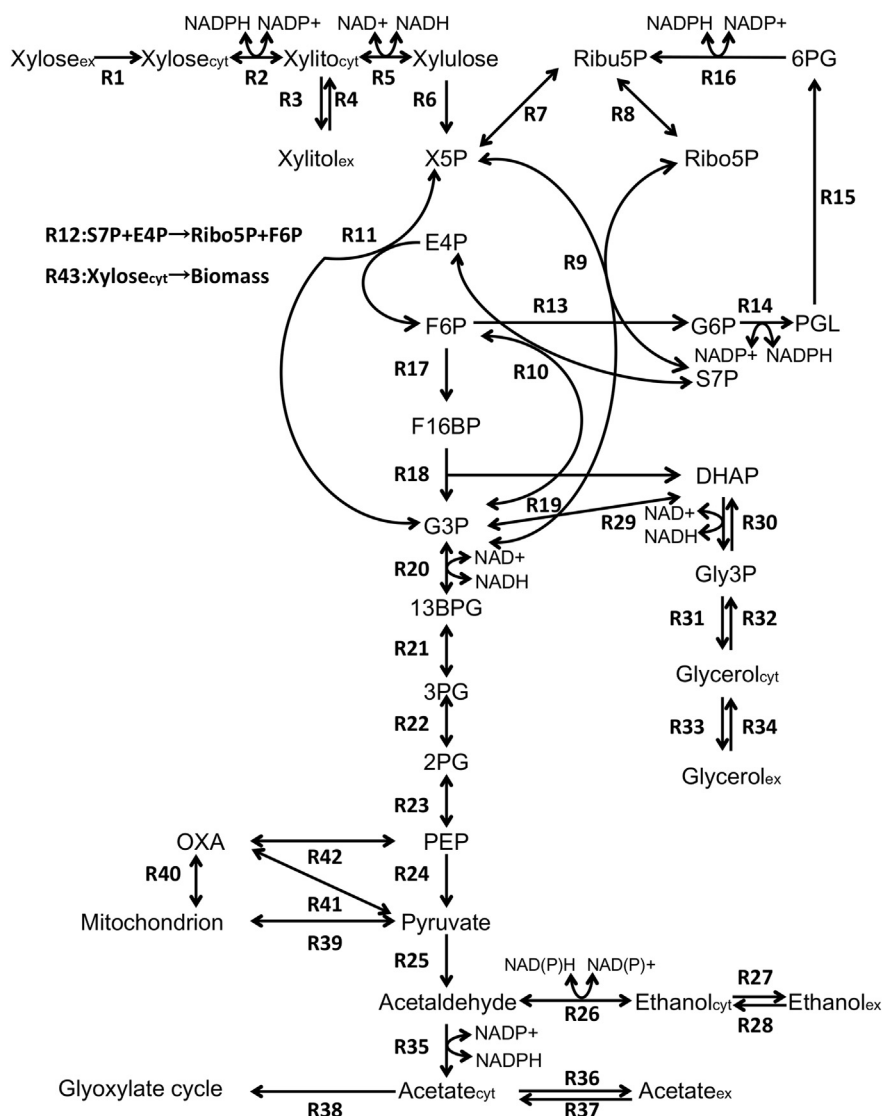


FIG. 1. Metabolic pathway of ethanol production from xylose. X5P, xylulose 5-phosphate; Ru5P, ribulose 5-phosphate; R5P, ribose 5-phosphate; S7P, sedoheptulose 7-phosphate; GAP, glyceraldehyde 3-phosphate; E4P, erythrose 4-phosphate; F6P, fructose 6-phosphate; G6P, glucose 6-phosphate; PGL, 6-phosphogluconolactone; 6PG, 6-phosphogluconate; FBP, fructose-1, 6-bisphosphate; 1,3BPG, 1,3-bisphosphoglycerate; 3PG, glyceraldehyde 3-phosphate; 2PG, glyceraldehyde 2-phosphate; PEP, phosphoenolpyruvic acid; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; Gly3P, glycerol 3-phosphate; OXA, oxaloacetic acid.

kinetic parameter affects the ethanol production. Various genetic manipulation strategies were developed based on the outcomes of this analysis.

RESULTS

Development of the kinetic simulation model of the ethanol production pathway Batch cultures of strain K7-XYL were grown in 500-mL baffled shaken flasks with an initial xylose concentration of 50 g/L to obtain experimental data in preparation for the development of the kinetic simulation model of ethanol production. The experimental time course data and simulation results are shown in Fig. 2. The xylose was depleted after 48 h and the ethanol concentration reached 12.6 g/L at 24 h. The simulation was conducted using an original program developed in the language C. Forty-three reactions and 46 metabolites were included in the model (Tables S1 and S5). The metabolic concentration data and the initial metabolic state were determined based on data we acquired in this study. The model included allosteric regulation of 6-phosphofructokinase and

pyruvate kinase based on previous works (17,19). The cell growth rate equation included a term for growth shut-down to avoid excess growth in the simulation. For coenzymes, time-course data of the coenzyme concentrations obtained by measurement were interpolated and expressed as a function of time. Constraints such as competitive inhibition by substrate(s) and/or product(s) and equilibrium constants were included based on enzyme kinetics and reactions. The correlation coefficients (r) between the experimental data and the simulation results for each metabolite were calculated to be: 0.999 for xylose, 0.953 for xylitol, 0.997 for glycerol, 0.999 for ethanol, 0.991 for biomass, and 0.927 for acetate; overall, r was 0.978. To avoid overfitting in kinetic parameter estimation, three mutants of K7-XYL, a *XKS1* upregulation strain, a *PDC1* upregulation strain, and a pyruvate transporter downregulation strain, were created. The kinetic parameters of the model were changed in one place to correspond to each of the three mutations, and simulation was carried out. The simulation results agreed with experimental data in the three mutants as shown in Table S6. We conducted sensitivity analysis using this simulation model and parameter

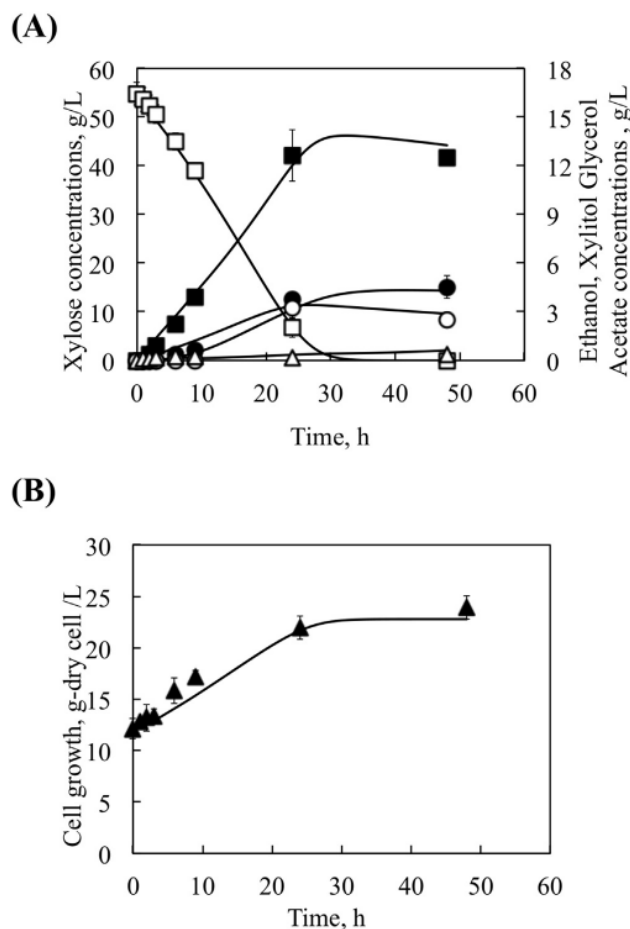


図2. 初期キシロース濃度50 g/Lでの実験時間経過データとシミュレーション結果。記号は実験データ、線はシミュレーション結果を示す。実験結果は2反復に基づく。データポイントは2回の実験の平均、エラーバーは標準偏差を示す。(A) キシロース、開四角、エタノール、閉四角、キシリトール、開丸、グリセロール、閉丸、酢酸、開三角。(B) バイオマス、閉じた三角形。

シミュレーション結果と実験データの相関係数は、K7-XYLの3つの変異体で一致していたため、このシミュレーションモデルとパラメーターセットを用いて感度解析を行った。

感度解析 上位3位までの感度解析結果と遺伝子操作戦略を表1に示す。表S7には、エタノール生産に4位以下の影響を与える反応のED値を示し、我々の予測結果のうち2つを、キシロース使用 *S. cerevisiae* 菌株の過去の代謝工学的業績と比較した。本シミュレーションでエタノール生産に最も大きな影響を与えた因子は、XDHのアップレギュレーションであった(図1のR5)。しかし、XDHはすでにPGK1プロモーターでアップレギュレーションされ、酵母にキシロース利用能を付加している(K7-XYL)。

PGK1プロモーターは *S. cerevisiae* で最も強力なプロモーターの一つであることから(27)、XDHのさらなるアップレギュレーションは困難であると判断した。シミュレーションの結果、高いED値をもたらす他の戦略が示されたため、本研究ではXDHのさらなるアップレギュレーションは行わなかった。エタノール生産に影響を与える反応の第2位は、キシロース取り込みのダウンレギュレーションであった(図1のR1)。しかし、*S. cerevisiae* にはキシロース特異的のトランスポーターが存在せず、非特異的のヘキソーストランスポーターは低い輸送速度でキシロースを輸送すると考えられている(28, 29)。従って、キシロース取り込みのダウンレギュレーションは、我々の実験(すなわち、キシロースを使用する *S. cerevisiae* のセルフクローニング)の制約の中では実行不可能である。エタノール生産に影響を与える酵素反応の第3位は、アルコール脱水素酵素(図1のR26)であった。シミュレーションの結果、ADHを2倍にアップレギュレートした場合、エタノールの生産性は約13%向上することが示唆された。ADHをアップレギュレートし、エタノール生産性への影響を調べることにした。

キシロース培地およびグルコース/キシロース混合培地におけるADH1過剰発現の効果 最初に、K7-XYL株およびK7-XYL-ADH1株のフラスコスケール培養を、初期キシロース濃度50 g/Lの500 mLバフ付き振とうフラスコで行った(図3AおよびB)。K7-XYL-ADH1はK7-XYLよりもキシロースをエタノールに変換する速度がやや遅かったが(K7-XYL 1.31 g/L/h, K7-XYL-ADH1 1.08 g/L/h)、エタノール生産性はK7-XYL-ADH1株の方がK7-XYL株より高かった(K7-XYL 12.5 g/L, K7-XYL-ADH1 13.8 g/L)。K7-XYL-ADH1のグリセロール生産量はK7-XYL株に対して0.73 g/L増加し、K7-XYL-ADH1のキシリトール生産量はK7-XYL株に対して4.01 g/L減少した。図2Aのキシリトール生産性は図3Aの約半分であるが、これは図2Aのデータ作成に用いたフラスコ内の液量が図3Aのデータ作成に用いたフラスコ内の液量よりも少なくなったため、図2Aの方が好氣的条件となり、キシリトールの蓄積が抑制されたためである。これは、モデル構築のためのデータを得るために、Fig. 2AではFig. 3Aよりもサンプリング頻度を高くしたためである。さらに、細胞内代謝物のデータを収集するために、Fig. サンプリングによる液量減少をシミュレーションで再現することは困難であった。初期糖からのエタノール収率はK7-XYL株で46.5%、K7-XYL-ADH1株で51.1%であり、ADH1の過剰発現によりキシロース培地でのエタノール収率が向上することが示された。

次に、グルコースとキシロースの混合物を含む培地におけるADH1過剰発現の効果の評価した。K7-XYLはまずグルコースを消費し、グルコース枯渇後にキシロースを発酵させた。K7-XYLはグルコースとキシロースを同時に消費しないので、ADH1過剰発現の効果はキシロース消費段階のグルコースとキシロースの混合培地で観察されると予想された。図3CおよびDは、グルコース(初期濃度80 g/L)とキシロース(初期濃度50 g/L)を含むYP(酵母エキス10 g/L、ペプトン20 g/L)培地を用いたK7-XYLおよびK7-XYL-ADH1のフラスコスケール培養の培養パラメーターを示している。両菌株ともグルコースを速やかにエタノールに発酵させ、次にキシロースを発酵させた。キシロース培地で観察されたように、K7-XYL-ADH1のキシロース消費速度はK7-XYLよりも遅かった。

表1. エタノールを高生産するための操作戦略ランキングトップ3。

Rank	Reaction step ^a	Strategy	Enzyme ^b	Sensitivity, % ^c	Reaction
1	R5	Up	XDH	16.4	Xylitol _{cyt} → NAD ⁺ ↔ Xylulose + NADH
2	R1	Down	Xylose uptake	13.3	Xylose _{ex} → Xylose _{cyt}
3	R26	Up	ADH	13.2	Acetaldehyde + NAD(P)H → Ethanol _{cyt} + NAD(P) ⁺

^a Reaction step corresponds to numbering in Fig. 1.

^b Enzymes are abbreviated as follows: XDH, xylose dehydrogenase; ADH, alcohol dehydrogenase.

^c Sensitivity indicates the endpoint deviation (ED) of ethanol at 48 h, when we applied a 100% increase to each respective kinetic parameter in the rate equations in the model.

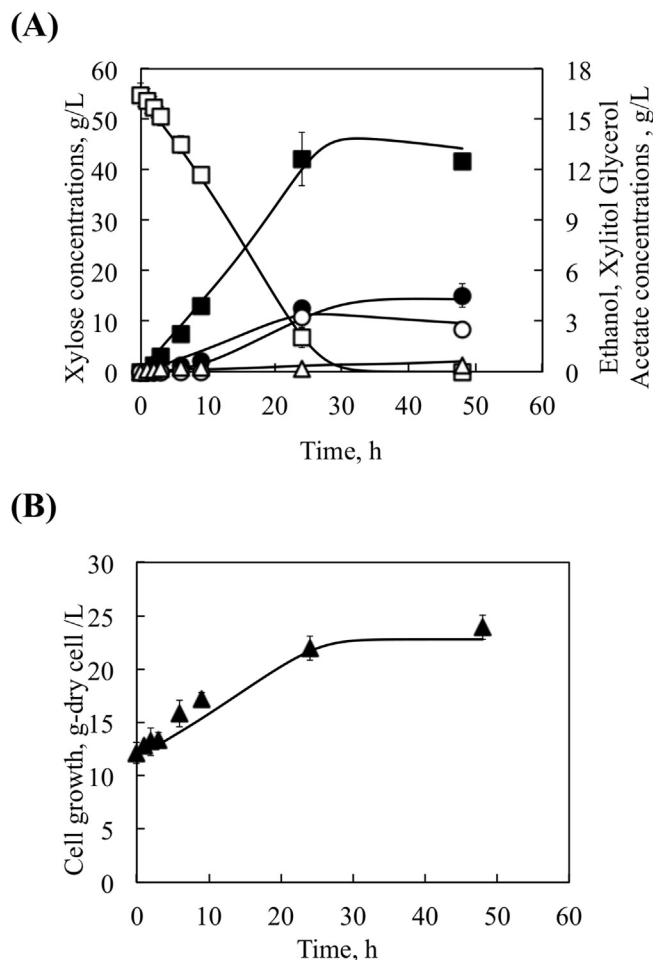


FIG. 2. Experimental time course data and simulation results with initial xylose concentration 50 g/L. The symbols show experimental data and the lines indicate simulation results. Experimental results are based on two replications. Data points represent the average of two experiments and error bars indicate standard deviations. (A) Xylose, open squares; ethanol, closed squares; xylitol, open circles; glycerol, closed circles; acetate, open triangles. (B) Biomass, closed triangles.

sets, since the correlation coefficients of the simulation results and experimental data were consistent for the three mutants of K7-XYL.

Sensitivity analysis Our top three ranked sensitivity analysis results and genetic manipulation strategies are shown in Table 1. Table S7 shows the ED values of reactions having the fourth or less impact onward on ethanol production and two of our prediction results were compared with the previous metabolic engineering works of the xylose-using *S. cerevisiae* strains in Table S7. The factor in our simulation that had the biggest effect on ethanol production was upregulation of XDH (R5 in Fig. 1). However, XDH has already been upregulated with the *PGK1* promoter to add xylose using ability to the yeast (K7-XYL). Since the *PGK1* promoter is one of the strongest promoters in

S. cerevisiae (27), we decided that further upregulation of XDH would be difficult. As our simulation showed other strategies that would lead to high ED values, no further upregulation of XDH was undertaken in this study.

The second ranked reaction that had an impact on ethanol production was downregulation of xylose uptake (R1 in Fig. 1). However, there is no xylose-specific transporter in *S. cerevisiae*, and it is considered that non-specific hexose transporters transport xylose with low transport rates (28,29). Thus, downregulation of xylose uptake is not feasible within the constraints of our experiments (i.e., in self-cloning xylose-using *S. cerevisiae*).

The third ranked enzyme reaction that had an impact on ethanol production was that of alcohol dehydrogenase (R26 in Fig. 1). Our simulation suggested that if ADH was upregulated twofold, the ethanol productivity would increase by about 13%. We decided to upregulate ADH and examine the effect on ethanol productivity, because this manipulation strategy was feasible and logical.

Effect of *ADH1* overexpression in xylose medium and glucose/xylose mixed medium Initially, flask-scale cultures of strains K7-XYL and K7-XYL-ADH1 were grown in 500-mL baffled shaken flasks with an initial xylose concentration of 50 g/L (Fig. 3A and B). Although K7-XYL-ADH1 converted xylose to ethanol slightly slower than K7-XYL (K7-XYL 1.31 g/L/h, K7-XYL-ADH1 1.08 g/L/h), the ethanol productivity of strain K7-XYL-ADH1 was higher than that of K7-XYL (K7-XYL 12.5 g/L, K7-XYL-ADH1 13.8 g/L). Glycerol production by K7-XYL-ADH1 increased by 0.73 g/L, and xylitol production of K7-XYL-ADH1 decreased by 4.01 g/L relative to strain K7-XYL, respectively. The productivity of xylitol in Fig. 2A was about half of that in Fig. 3A, because the amount of liquid in the flask used to generate the data in Fig. 2A became less than that in the flask used for Fig. 3A, so conditions in Fig. 2A were more aerobic and accumulation of xylitol was suppressed. This was because, in order to obtain data for model construction, the sampling frequency in Fig. 2A was higher than that in Fig. 3A. Furthermore, for the collection of intracellular metabolite data, the sampling amount in Fig. 2A was large. It was difficult to reproduce reduction of liquid volume by sampling in the simulation. The ethanol yield from the initial sugars was 46.5% for strain K7-XYL and 51.1% for K7-XYL-ADH1, which indicated that overexpression of *ADH1* increased the ethanol yield in xylose medium.

Second, the effect of *ADH1* overexpression in medium containing a mixture of glucose and xylose was evaluated. K7-XYL consumed glucose first, then fermented xylose after depletion of glucose. Since K7-XYL does not simultaneously consume glucose and xylose, we expected that the effect of *ADH1* overexpression would be observed in glucose and xylose mixed medium during the xylose consumption phase. Fig. 3C and D shows culture parameters for flask scale cultures of K7-XYL and K7-XYL-ADH1 with YP (yeast extract 10 g/L, peptone 20 g/L) medium containing glucose (initial concentration 80 g/L) and xylose (initial concentration 50 g/L), representing the typical sugar composition of cellulosic biomass. Both strains rapidly fermented glucose to ethanol and then fermented xylose. As observed in xylose medium, the xylose consumption rate of K7-XYL-ADH1 was slower than that of K7-XYL.

TABLE 1. Top three ranked manipulation strategy for higher production of ethanol.

Rank	Reaction step ^a	Strategy	Enzyme ^b	Sensitivity, % ^c	Reaction
1	R5	Up	XDH	16.4	Xylitol _{cyt} → NAD ⁺ ↔ Xylulose + NADH
2	R1	Down	Xylose uptake	13.3	Xylose _{ex} → Xylose _{cyt}
3	R26	Up	ADH	13.2	Acetaldehyde + NAD(P)H → Ethanol _{cyt} + NAD(P) ⁺

^a Reaction step corresponds to numbering in Fig. 1.

^b Enzymes are abbreviated as follows: XDH, xylose dehydrogenase; ADH, alcohol dehydrogenase.

^c Sensitivity indicates the endpoint deviation (ED) of ethanol at 48 h, when we applied a 100% increase to each respective kinetic parameter in the rate equations in the model.

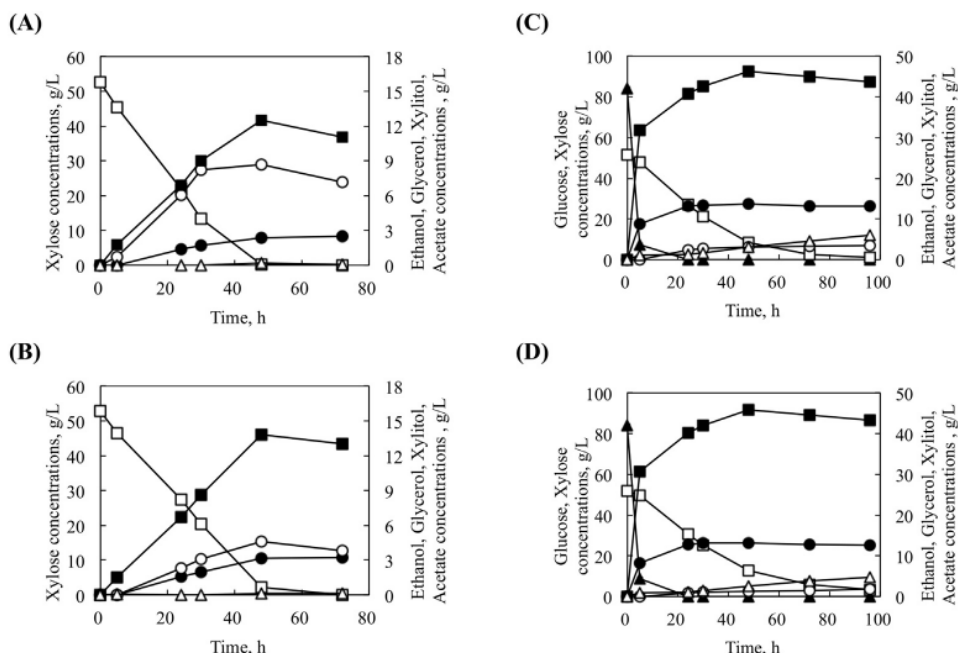


図3. K7-XYL 株 (A, C) および K7-XYL-ADH1 株 (B, D) を、炭素源として 50 g/L キシロース (A, B) または 80 g/L グルコース+50 g/L キシロース (C, D) を含む YP 培地でフラスコ培養したときの発酵プロファイル。結果は2反復に基づく。データポイントは2回の実験の平均を示し、エラーバーは標準偏差を示す。グルコース：閉じた三角形；キシロース：開いた四角形；エタノール：閉じた四角形；キシリトール：開いた円；グリセロール：閉じた円；アセテート：開いた三角形。

しかし、K7-XYL-ADH1のエタノール生産性は、グルコースとキシロースの混合培地におけるK7-XYLとほぼ同じであった (K7-XYL 46.3 g/L, K7-XYL-ADH1 45.9 g/L)。これらのデータから、グルコースとキシロースの混合培地では、キシロース培地と異なり、ADH1の過剰発現はエタノール収量を増加させないことが示された。

コントロールされた溶存酸素発酵 α asksでは、キシロースを唯一の炭素源とした場合にADH1過剰発現の効果が観察されたものの、グルコース-キシロース混合培地ではその効果は確認されなかった。我々は、グルコースの存在によって細胞の内部酸化還元バランスが変化し、ADH1過剰発現の効果が見られなかったと推測した。内部酸化還元バランスを変化させるために、K7-XYLおよびK7-XYL-ADH1の5Lジャーファーマンター培養を、溶存酸素濃度を0.2ppmに維持して培養した。図4に培養パラメータを示す。両菌株とも、48時間以内に80 g/Lのグルコースと50 g/Lのキシロースを変換した。5-L 瓶発酵槽の初期細胞濃度はフラスコ培養のそれよりも20倍低かったが、5-L 瓶発酵槽でのキシロース消費はフラスコ培養のそれよりも速かった。K7-XYL-ADH1株のエタノール生産性はK7-XYL株よりも高かった (K7-XYL 44.9 g/L, K7-XYL-ADH1 49.2 g/L)。初期糖からのエタノール収率は、K7-XYLで66.9%、K7-XYL-ADH1で73.3%であった。酸素濃度を制御した5Lジャーファーマンターの結果は、培地量がフラスコ培養と5Lジャーファーマンターで大きく異なるにもかかわらず、フラスコ培養の結果を十分に反映している。

DISCUSSION

我々は、キシロース資化性遺伝子GRE3とSOR1が関与する*S. cerevisiae*のエタノール生産経路 (すなわち、自己クローニング型キシロース資化性*S. cerevisiae*) を解析し、エタノール生産経路の動力学シミュレーションモデルを構築し、そのモデルの感度解析を行った。そして、経路における代謝ボトルネックを特定した。

解析の結果、ADH1が触媒する反応がボトルネックであり、ADH1を過剰発現させれば、キシロースを自己クローニング化した*S. cerevisiae*のエタノール収量を増加させることができることが明らかになった。このことは、キシロース存在下でのフラスコスケール培養 (K7-XYL、収量12.5 g/L, K7-XYL-ADH1、13.8 g/L)、およびグルコースとキシロース存在下での5Lジャーファーマンター培養 (K7-XYL、収量45.0 g/L, K7-XYL-ADH1、49.4 g/L) で検証された。エタノール収量が10%向上するということは、変動費と固定費が10%削減されることを意味する。これは、特にエタノールのような低価格製品の製造において、産業にダイナミックな影響を与えるだろう。天然のセルロース系バイオマスにはグルコースとキシロースの両方が含まれている。K7-XYL-ADH1株のエタノール収率 (gエタノール/g糖) は、グルコースとキシロースの存在下、5Lジャーファーマンター培養で0.38であった。これに対し、*S. stipitis* XRとXDHを含む遺伝子組換え酵母のエタノール収率は0.40であった (30, 31)。このように、我々のセルフクローニング酵母は、遺伝子組換え酵母とほぼ同等のエタノール生産性を示した。今後、遺伝子組換え酵母でADH1の過剰発現を行い、エタノール生産性への影響を確認する必要がある。もし遺伝子組換え酵母にポジティブな効果があれば、自己クローニング酵母との定量的比較が必要である。*S. stipitis* XRはNADPHとNADHの両方を利用できる。しかし、GRE3は厳密なNADPH特異性を持つ (32)。*S. stipitis* XDHとSOR1は補酵素としてNAD⁺のみを使用するが、GRE3を含むセルフクローニングしたキシロースを使用する*S. cerevisiae*はXDH反応にNAD⁺を供給できない。すなわち、自己クローニング型キシロース使用*S. cerevisiae*の代謝経路は、補酵素の不均衡を引き起こす傾向がある。セルフクローニング型キシロース資化性*S. cerevisiae*の作成は (前述のように) 困難であるが、エタノール生産コストの削減に貢献することが期待される。酸素制御発酵条件下において、我々のセルフクローニング型キシロース資化性*S. cerevisiae*は遺伝子組換え酵母とほぼ同等のエタノール収量を示したことから、セルフクローニング型キシロース資化性*S. cerevisiae*を工業的エタノール生産に利用できる可能性が示唆された。

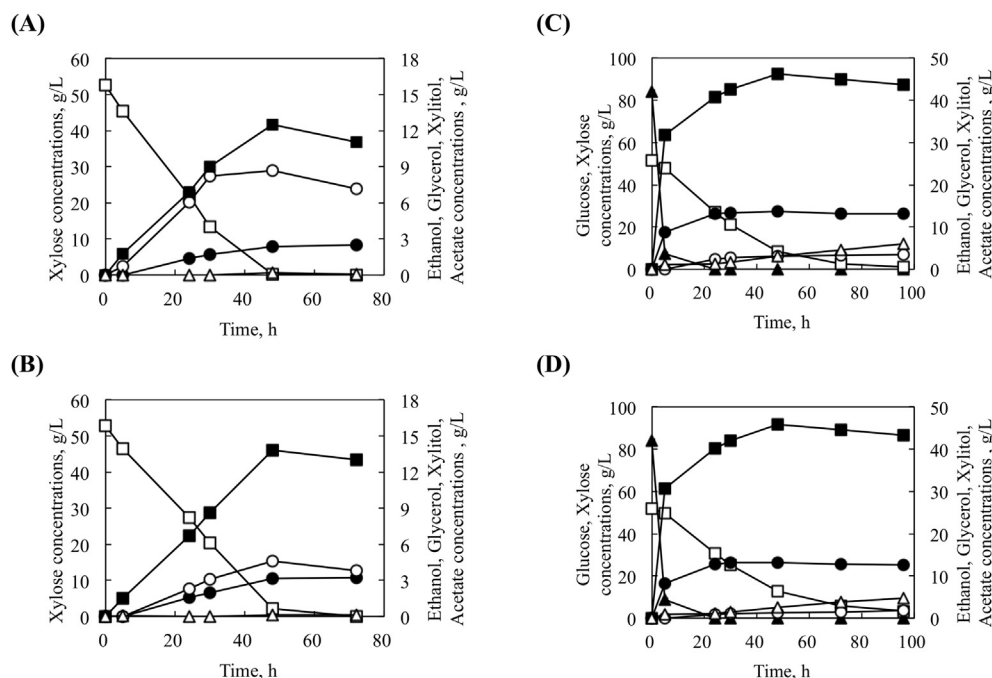


FIG. 3. Fermentation profiles of flask cultures of strains K7-XYL (A, C) and K7-XYL-ADH1 (B, D) in YP medium containing 50 g/L xylose (A, B) or 80 g/L glucose plus 50 g/L xylose (C, D) as the carbon source(s). Results are based on two replications. Data points represent the average of two experiments and error bars indicate standard deviations. Glucose, closed triangles; xylose, open squares; ethanol, closed squares; xylitol, open circles; glycerol, closed circles; acetate, open triangles.

However, the ethanol productivity of K7-XYL-ADH1 was almost the same as that of K7-XYL in the glucose and xylose mixed-medium (K7-XYL 46.3 g/L, K7-XYL-ADH1 45.9 g/L). These data indicated that, unlike in xylose medium, overexpression of *ADH1* did not increase the ethanol yield in glucose and xylose mixed medium in flask-scale culture.

Controlled dissolved oxygen fermentation In flasks, although an effect of *ADH1* overexpression was observed when xylose was the sole carbon source, the effect was not confirmed in mixed glucose-xylose medium. We presumed that the internal redox balance of the cells changed due to the presence of the glucose and this led to there being no effect of *ADH1* overexpression. To modify the internal redox balance, 5-L jar fermentor cultures of K7-XYL and K7-XYL-ADH1 were grown with dissolved oxygen concentration maintained at 0.2 ppm. Fig. 4 shows the culture parameters. Both strains converted 80 g/L glucose and 50 g/L xylose within 48 h. Although the initial cell concentration in the 5-L jar fermentor culture was 20-times lower than that in flask-scale cultures, xylose consumption in the 5-L jar fermentor was faster than that in flask-scale culture. The ethanol productivity of strain K7-XYL-ADH1 was higher than that of K7-XYL (K7-XYL 44.9 g/L, K7-XYL-ADH1 49.2 g/L). The ethanol yield from the initial sugars was 66.9% for K7-XYL, and 73.3% for K7-XYL-ADH1. The results from the 5-L jar fermentor with controlling oxygen concentration sufficiently reflect the results of their flask culture, even though the amount of medium was significantly different between the flask cultivation and the 5-L jar fermentor.

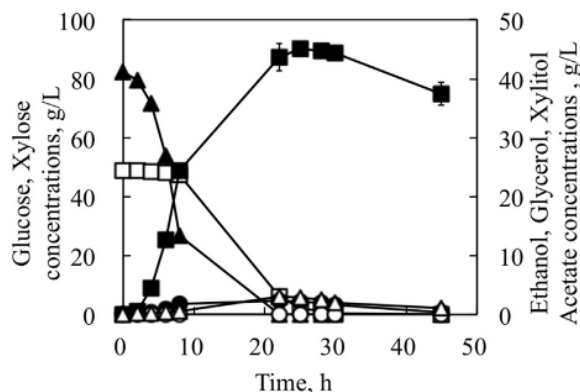
DISCUSSION

We analyzed an ethanol production pathway of *S. cerevisiae* involving the endogenous xylose-assimilating genes *GRE3* and *SOR1* (i.e., a self-cloning xylose-using *S. cerevisiae*) by construction of a kinetic simulation model of the ethanol producing pathway and undertaking sensitivity analysis in that model. Then, we

identified a metabolic bottleneck in the pathway. Analysis revealed that the reaction catalyzed by *ADH1* was a bottleneck, and that overexpression of *ADH1* would enable the self-cloning xylose-using *S. cerevisiae* to increase the ethanol yield. This was verified in the presence of xylose in flask-scale cultures (K7-XYL, yield 12.5 g/L; K7-XYL-ADH1, 13.8 g/L), and in the presence of glucose and xylose in 5-L jar fermentor cultures (K7-XYL, yield 45.0 g/L; K7-XYL-ADH1 49.4 g/L). Improvement in ethanol yield by 10% means that variable and fixed costs are reduced by 10%. That would have a dynamic impact on industry, especially in manufacture of a low-priced product such as ethanol. Natural cellulosic biomass contains both glucose and xylose. The ethanol yield (g ethanol/g sugars) from strain K7-XYL-ADH1 was 0.38 in the presence of glucose and xylose in 5-L jar fermentor culture. By comparison, the ethanol yield from genetically modified yeasts containing *S. stipitis* XR and XDH was 0.40 (30,31). Thus, our self-cloning yeast showed almost same the ethanol productivity as genetically modified yeast. In the future, overexpression of *ADH1* should be carried out in genetically modified yeast and the effect on ethanol productivity should be confirmed. If there is a positive effect on genetically modified yeast, a quantitative comparison with self-cloning yeast is necessary.

S. stipitis XR can use both NADPH and NADH. However, *GRE3* has strict NADPH specificity (32). *S. stipitis* XDH and *SOR1* use only NAD⁺ as a cofactor, but self-cloning xylose-using *S. cerevisiae* containing *GRE3* cannot supply NAD⁺ for the XDH reaction. That is, the metabolic pathways in the self-cloning xylose-using *S. cerevisiae* tend to cause a cofactor imbalance. Creating a self-cloning xylose-using *S. cerevisiae* is difficult (as mentioned above), but would be expected to contribute to the reduction of ethanol production costs. In oxygen-controlled fermentation conditions, our self-cloning xylose-using *S. cerevisiae* showed close to the same ethanol yield as the genetically modified yeast, suggesting that there is a possibility that self-cloning xylose-using *S. cerevisiae* could be used for industrial ethanol production. Strain K7-XYL-ADH1 showed higher ethanol yield than K7-XYL in the presence of glucose and xylose in 5-L jar fermentor culture but not in flask culture. We guessed that

(A)



(B)

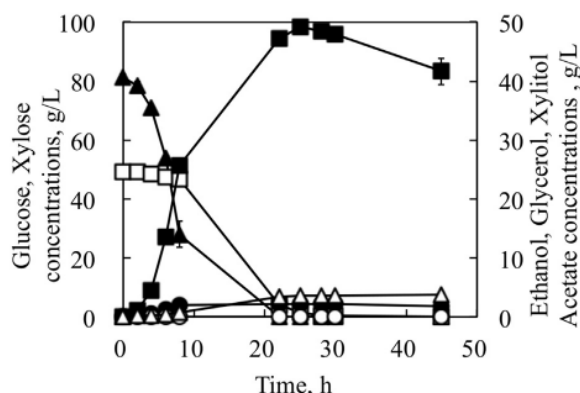


図4. K7-XYL株 (A) およびK7XYL-ADH1株 (B) の5Lジャーファーマンター培養の発酵プロフィール (炭素源として80g/Lグルコースおよび50g/Lキシロースを含むYP培地)。結果は2反復に基づく。データポイントは2回の実験の平均を示し、エラーバーは標準偏差を示す。グルコース：閉じた三角形；キシロース：開いた四角形；エタノール：閉じた四角形；キシリトール：開いた円；グリセロール：閉じた円；アセテート：開いた三角形。

K7-XYL-ADH1株は、5Lジャーファーマンター培養ではグルコースおよびキシロース存在下でK7-XYL株より高いエタノール収量を示したが、フラスコ培養では示さなかった。これは、フラスコ培養ではグルコース消費段階で酸素の大半が消費されたため、キシロース消費段階の溶存酸素濃度が低く、呼吸が行われないためにNAD⁺の再生が行われなかったためと推測された。したがって、NAD⁺の供給はXDHの反応に十分ではなかった。5Lジャーファーマンターの酸素供給量を増やすことで、呼吸によるNAD⁺の再生が可能になり、XDHによるキシリトールからキシロースへの変換が促進され、エタノール生産量が全体的に増加する可能性がある。今回の実験では1種類の酸素濃度しか試していないため、酸素濃度を最適化すれば、エタノール生産性はさらに向上する可能性がある。

キシロースからのエタノール生産の速度論的モデルを構築し、モデルの妥当性を評価し、どの経路がエタノール生産性に最も影響を与えるかを明らかにするために感度分析を行った。我々が構築したモデルは、エタノール生産経路におけるボトルネックを特定した。実験データは予測と一致していたため、この方法は検証された。今回はMFAを実施していないが、今後エタノール生産性をさらに向上させるためには、セルフクローニング酵母のMFAと遺伝子組換え酵母のMFAを比較する必要があると考えている。

要約すると、*S. cerevisiae* K7-XYL株でADH1を過剰発現させると、グルコースとキシロースの混合培地でのエタノール生産性が向上することが実証された。

私たちのキシロース使用*S. cerevisiae*は、自己クローニングという大きな制約があるにもかかわらず、遺伝子改変酵母とほぼ同等のエタノール生産性を示した。セルロース系バイオマスからのエタノール変換の工業化の観点から、セルフクローニング酵母の使用は、遺伝子組み換え作物を使用せずにエタノール生産性を向上させる重要なアプローチである。

この論文の補足データは、<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.10.020>に掲載されている。

ACKNOWLEDGMENTS

本研究は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構より助成を受けた（セルロース系バイオエタノールの革新的総合生産システムの開発、プロジェクトコード：P09014）：P09014）。

References

- Kötter, P. and Ciriacy, M.: Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 776–783 (1993).
- Ho, N. W., Chen, X., and Brainard, A. P.: Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 1852–1859 (1998).
- Karhumaa, K., Fromanger, R., Hahn-Hägerdal, B., and Gorwa-Grauslund, M. F.: High activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase improves xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **73**, 1039–1046 (2007).
- Hino, A.: Safety assessment and public concerns for genetically modified food products: the Japanese experience, *Toxicol. Pathol.*, **30**, 126–128 (2002).
- Träff, K. L., Jönsson, L. J., and Hahn-Hägerdal, B.: Putative xylose and arabinose reductases in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, **19**, 1233–1241 (2002).
- Richard, P., Toivari, M. H., and Penttilä, M.: Evidence that the gene YLR070c of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a xylitol dehydrogenase, *FEBS Lett.*, **457**, 135–138 (1999).
- Toivari, M. H., Salusjärvi, L., Ruohonen, L., and Penttilä, M.: Endogenous xylose pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 3681–3686 (2004).
- Konishi, J., Fukuda, A., Mutaguchi, K., and Uemura, T.: Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* using endogenous xylose-assimilating genes, *Biotechnol. Lett.*, **37**, 1623–1630 (2015).
- Bailey, J. E.: Toward a science of metabolic engineering, *Science*, **252**, 1668–1675 (1991).
- Stephanopoulos, G. and Vallino, J. J.: Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction, *Science*, **252**, 1675–1681 (1991).
- Vallino, J. J. and Stephanopoulos, G.: Metabolic flux distributions in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction, *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 633–646 (1993).
- Kuriya, Y., Tanaka, S., Kobayashi, G., Hanai, T., and Okamoto, M.: Development of an analytical pipeline for optimizing substrate feeding and eliminating metabolic bottlenecks, *Chem. Bio Inf.*, **11**, 1–23 (2011).
- Wasylenko, T. M. and Stephanopoulos, G.: ¹³C-Metabolic flux analysis of a xylose-consuming *Saccharomyces cerevisiae* strain expressing xylose isomerase, *Biotechnol. Bioeng.*, **112**, 470–483 (2015).
- Parachin, N. S., Bergdahl, B., van Niel, E. W. J., and Gorwa-Grauslund, M. F.: Kinetic modelling reveals current limitations in the production of ethanol from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, *Metab. Eng.*, **13**, 508–517 (2011).
- Giets, D., St Jean, A., Woods, R. A., and Schiestl, S. H.: Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells, *Nucleic Acids Res.*, **20**, 1425 (1992).
- Kiyonari, S., Iimori, M., Matsuoka, K., Watanabe, S., Morikawa-Ichinose, T., Miura, D., Niimi, S., Saeki, H., Tokunaga, E., Oki, E., and other 3 authors: The 1,2-diaminocyclohexane carrier ligand in oxaliplatin induces p53-dependent transcriptional repression of factors involved in thymidylate biosynthesis, *Mol. Canc. Therapeut.*, **14**, 2332–2342 (2015).
- Teusink, B., Passarge, J., Reijenga, C. A., Esgalhado, E., van der Weijden, C. C., Schepper, M., Walsh, M. C., Bakker, B. M., van Dam, K., Westerhoff, H. V., and Snoep, J. L.: Can yeast glycolysis be understood in terms of in vitro kinetics of the constituent enzymes? Testing biochemistry, *Eur. J. Biochem.*, **267**, 5313–5329 (2000).
- Hynne, F., Danø, S., and Sørensen, P. G.: Full-scale model of glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biophys. Chem.*, **94**, 121–163 (2001).
- Rizzi, M., Baltes, M., Theobald, U., and Reuss, M.: In vivo analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: II. Mathematical model, *Biotechnol. Bioeng.*, **55**, 592–608 (1997).

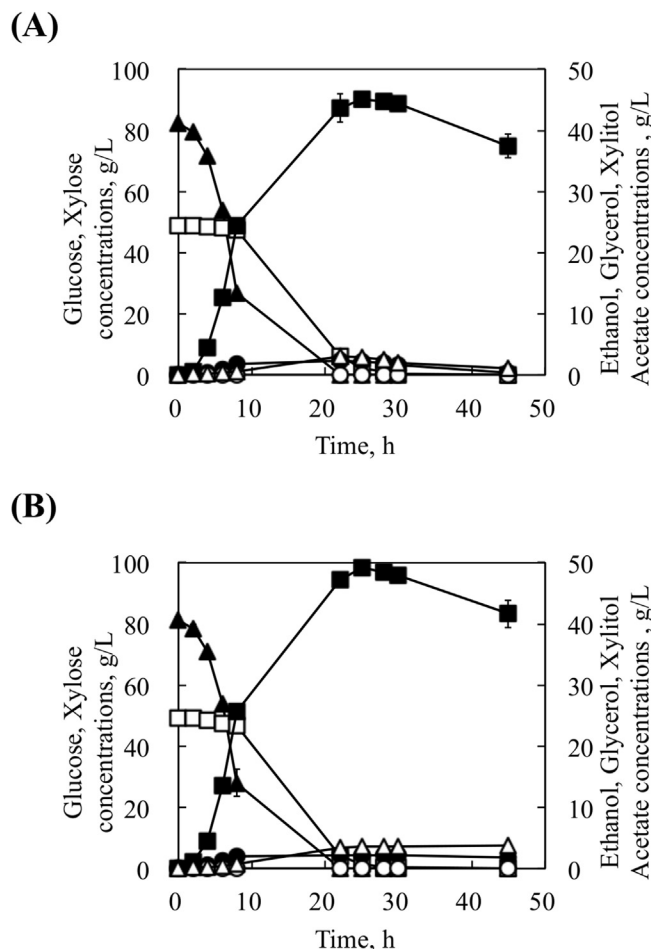


FIG. 4. Fermentation profiles of 5-L jar fermentor cultures of strains K7-XYL (A) and K7-XYL-ADH1 (B) in YP medium containing 80 g/L glucose plus 50 g/L xylose as carbon sources. Results are based on two replications. Data points represent the average of two experiments and error bars indicate standard deviations. Glucose, closed triangles; xylose, open squares; ethanol, closed circles; xylitol, open circles; glycerol, closed squares; acetate, open triangles.

this was because, in flask culture, the dissolved oxygen concentration was low during the xylose consumption phase because most of the oxygen had been consumed during the glucose consumption phase, and, due to lack of respiration, NAD^+ regeneration did not occur. Therefore, the NAD^+ supply was not sufficient for the reaction of XDH. The increased oxygen supply in the aerated 5-L jar fermentor might make it possible to regenerate NAD^+ by respiration and thus accelerate the conversion of xylitol to xylulose by XDH, leading to an overall increase in ethanol production. Since only one oxygen concentration was tested in our experiments, ethanol productivity may increase further if the oxygen concentration is optimized.

We constructed a kinetic model of ethanol production from xylose and conducted a sensitivity analysis to assess the validity of the model and clarify which pathway(s) have most impact on the ethanol productivity. The model we constructed identified a bottleneck in the ethanol production pathway. Since our experimental data were consistent with the prediction, the method was validated. Although we have not implemented MFA this time, we believe that it is necessary to compare MFA of self-cloning yeast with that of genetically modified yeast to further improve ethanol productivity in the future.

In summary, we have demonstrated that overexpression of *ADH1* in *S. cerevisiae* strain K7-XYL improved ethanol productivity

in glucose and xylose mixed medium. Our xylose-using *S. cerevisiae* had almost the same ethanol productivity as genetically modified yeast, despite the large constraint of self-cloning. From the viewpoint of industrialization of ethanol conversion from cellulosic biomass, use of self-cloning yeast is an important approach to increase ethanol productivity without using GMOs.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.10.020>.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the New Energy and Industrial Technology Development Organization, Japan (Development of an Innovative and Comprehensive Production System for Cellulosic Bioethanol, project code: P09014).

References

- Kötter, P. and Ciriacy, M.: Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 776–783 (1993).
- Ho, N. W., Chen, X., and Brainard, A. P.: Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 1852–1859 (1998).
- Karhumaa, K., Fromanger, R., Hahn-Hägerdal, B., and Gorwa-Grauslund, M. F.: High activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase improves xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **73**, 1039–1046 (2007).
- Hino, A.: Safety assessment and public concerns for genetically modified food products: the Japanese experience, *Toxicol. Pathol.*, **30**, 126–128 (2002).
- Träff, K. L., Jönsson, L. J., and Hahn-Hägerdal, B.: Putative xylose and arabinose reductases in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, **19**, 1233–1241 (2002).
- Richard, P., Toivari, M. H., and Penttilä, M.: Evidence that the gene YLR070c of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a xylitol dehydrogenase, *FEBS Lett.*, **457**, 135–138 (1999).
- Toivari, M. H., Salusjärvi, L., Ruohonen, L., and Penttilä, M.: Endogenous xylose pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 3681–3686 (2004).
- Konishi, J., Fukuda, A., Mutaguchi, K., and Uemura, T.: Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* using endogenous xylose-assimilating genes, *Biotechnol. Lett.*, **37**, 1623–1630 (2015).
- Bailey, J. E.: Toward a science of metabolic engineering, *Science*, **252**, 1668–1675 (1991).
- Stephanopoulos, G. and Vallino, J. J.: Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction, *Science*, **252**, 1675–1681 (1991).
- Vallino, J. J. and Stephanopoulos, G.: Metabolic flux distributions in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction, *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 633–646 (1993).
- Kuriya, Y., Tanaka, S., Kobayashi, G., Hanai, T., and Okamoto, M.: Development of an analytical pipeline for optimizing substrate feeding and eliminating metabolic bottlenecks, *Chem. Bio Inf. J.*, **11**, 1–23 (2011).
- Wasylenko, T. M. and Stephanopoulos, G.: ^{13}C -Metabolic flux analysis of a xylose-consuming *Saccharomyces cerevisiae* strain expressing xylose isomerase, *Biotechnol. Bioeng.*, **112**, 470–483 (2015).
- Parachin, N. S., Bergdahl, B., van Niel, E. W. J., and Gorwa-Grauslund, M. F.: Kinetic modelling reveals current limitations in the production of ethanol from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, *Metab. Eng.*, **13**, 508–517 (2011).
- Giets, D., St Jean, A., Woods, R. A., and Schiestl, S. H.: Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells, *Nucleic Acids Res.*, **20**, 1425 (1992).
- Kiyonari, S., Iimori, M., Matsuoka, K., Watanabe, S., Morikawa-Ichinose, T., Miura, D., Niimi, S., Saeki, H., Tokunaga, E., Oki, E., and other 3 authors: The 1,2-diaminocyclohexane Carrier ligand in oxaliplatin induces p53-dependent transcriptional repression of factors involved in thymidylate biosynthesis, *Mol. Canc. Therapeut.*, **14**, 2332–2342 (2015).
- Teusink, B., Passarge, J., Reijenga, C. A., Esgalhado, E., van der Weijden, C. C., Schepper, M., Walsh, M. C., Bakker, B. M., van Dam, K., Westerhoff, H. V., and Snoep, J. L.: Can yeast glycolysis be understood in terms of in vitro kinetics of the constituent enzymes? Testing biochemistry, *Eur. J. Biochem.*, **267**, 5313–5329 (2000).
- Hynne, F., Danø, S., and Sørensen, P. G.: Full-scale model of glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biophys. Chem.*, **94**, 121–163 (2001).
- Rizzi, M., Baltes, M., Theobald, U., and Reuss, M.: In vivo analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: II. Mathematical model, *Biotechnol. Bioeng.*, **55**, 592–608 (1997).

20. Cleland, W. W.: The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products: I. Nomenclature and rate equations, *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 104–137 (1963).
21. Bertilsson, M., Andersson, J., and Lidén, G.: Modeling simultaneous glucose and xylose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* from kinetics and gene expression of sugar transporters, *Bioproc. Biosyst. Eng.*, **31**, 369–377 (2008).
22. Teusink, B., Diderich, J. A., Westerhoff, H. V., van Dam, K., and Walsh, M. C.: Intracellular glucose concentration in derepressed yeast cells consuming glucose is high enough to reduce the glucose transport rate by 50%, *J. Bacteriol.*, **180**, 556–562 (1998).
23. Van Urk, H., Mak, P. R., Scheffers, W. A., and van Dijken, J. P.: Metabolic responses of *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 and *Candida utilis* CBS 621 upon transition from glucose limitation to glucose excess, *Yeast*, **4**, 283–291 (1988).
24. Schomburg, I., Chang, A., Placzek, S., Söhngen, C., Rother, M., Munaretto, C., Stelzer, M., Grote, A., Scheer, M., and Schomburg, D.: BRENDA in 2013: integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: new options and content in BRENDA, *Nucleic Acids Res.*, **41**, D764–D772 (2013).
25. Akimoto, Y., Nagata, Y., Sakuma, J., Ono, I., and Kobayashi, S.: Proposal and evaluation of adaptive real-coded crossover AREX, *Trans. Jpn. Soc. Artif. Intell.*, **24**, 446–458 (2009).
26. Gear, C. W.: Numerical initial value problem in ordinary differential equations. Prentice-Hall, Upper Saddle River (1971).
27. Partow, S., Siewers, V., Bjørn, S., Nielsen, J., and Maury, J.: Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, **27**, 955–964 (2010).
28. Lee, W. J., Kim, M. D., Ryu, Y. W., Bisson, L. F., and Seo, J. H.: Kinetic studies on glucose and xylose transport in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **60**, 186–191 (2002).
29. Saloheimo, A., Rauta, J., Stasyk, O. V., Sibirny, A. A., Penttilä, M., and Ruohonen, L.: Xylose transport studies with xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **74**, 1041–1052 (2007).
30. Matsushika, A. and Sawayama, S.: Effect of initial cell concentration on ethanol production by flocculent *Saccharomyces cerevisiae* with xylose-fermenting ability, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **162**, 1952–1960 (2010).
31. Casey, E., Sedlak, M., Ho, N. W. Y., and Mosier, N. S.: Effect of acetic acid and pH on the cofermentation of glucose and xylose to ethanol by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Res.*, **10**, 385–393 (2010).
32. Kuhn, A., van Zyl, C., van Tonder, A., and Prior, B. A.: Purification and partial characterization of aldo-keto reductase from *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 1580–1585 (1995).



Readable

20. **Cleland, W. W.:** The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products: I. Nomenclature and rate equations, *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 104–137 (1963).
21. **Bertilsson, M., Andersson, J., and Lidén, G.:** Modeling simultaneous glucose and xylose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* from kinetics and gene expression of sugar transporters, *Bioproc. Biosyst. Eng.*, **31**, 369–377 (2008).
22. **Teusink, B., Diderich, J. A., Westerhoff, H. V., van Dam, K., and Walsh, M. C.:** Intracellular glucose concentration in derepressed yeast cells consuming glucose is high enough to reduce the glucose transport rate by 50%, *J. Bacteriol.*, **180**, 556–562 (1998).
23. **Van Urk, H., Mak, P. R., Scheffers, W. A., and van Dijken, J. P.:** Metabolic responses of *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 and *Candida utilis* CBS 621 upon transition from glucose limitation to glucose excess, *Yeast*, **4**, 283–291 (1988).
24. **Schomburg, I., Chang, A., Placzek, S., Söhngen, C., Rother, M., Munaretto, C., Stelzer, M., Grote, A., Scheer, M., and Schomburg, D.:** BRENDA in 2013: integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: new options and content in BRENDA, *Nucleic Acids Res.*, **41**, D764–D772 (2013).
25. **Akimoto, Y., Nagata, Y., Sakuma, J., Ono, I., and Kobayashi, S.:** Proposal and evaluation of adaptive real-coded crossover AREX, *Trans. Jpn. Soc. Artif. Intell.*, **24**, 446–458 (2009).
26. **Gear, C. W.:** Numerical initial value problem in ordinary differential equations. Prentice-Hall, Upper Saddle River (1971).
27. **Partow, S., Siewers, V., Bjørn, S., Nielsen, J., and Maury, J.:** Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, **27**, 955–964 (2010).
28. **Lee, W. J., Kim, M. D., Ryu, Y. W., Bisson, L. F., and Seo, J. H.:** Kinetic studies on glucose and xylose transport in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **60**, 186–191 (2002).
29. **Saloheimo, A., Rauta, J., Stasyk, O. V., Sibirny, A. A., Penttilä, M., and Ruohonen, L.:** Xylose transport studies with xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **74**, 1041–1052 (2007).
30. **Matsushika, A. and Sawayama, S.:** Effect of initial cell concentration on ethanol production by flocculent *Saccharomyces cerevisiae* with xylose-fermenting ability, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **162**, 1952–1960 (2010).
31. **Casey, E., Sedlak, M., Ho, N. W. Y., and Mosier, N. S.:** Effect of acetic acid and pH on the cofermentation of glucose and xylose to ethanol by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Res.*, **10**, 385–393 (2010).
32. **Kuhn, A., van Zyl, C., van Tonder, A., and Prior, B. A.:** Purification and partial characterization of aldo-keto reductase from *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 1580–1585 (1995).



Readable