

## مقاله آموزشی

### کاربرد مهندسی ژنتیک در تغییر سوخت‌وساز مخمر ساکارومایسس سرویزیه

محسن مبینی دهکردی، ایرج نحوی، کامران قانیدی\*

#### چکیده

مخمر ساکارومایسس سرویزیه مهم‌ترین مخمر صنعتی برای تولید محصولات بیوشیمیایی، پروتئین‌های نوترکیب و پروتئین تک‌یاخته است. برای افزایش قابلیت‌های این مخمر در استفاده وسیع‌تر از منابع فراوان کربن، مانند زایلوز و لاکتوز، افزایش بازدهی تولید محصولات و تسهیل فرایند تخمیر صنعتی می‌توان از روش‌های متنوع مهندسی ژنتیک، با هدف تغییر در مسیر یا مسیرهای طبیعی سوخت‌وساز مخمر استفاده کرد. این تغییرات در شاخه‌ای جدید از علم زیست‌شناسی، به نام "مهندسی متابولیک" مطالعه می‌شود. واژه‌های کلیدی: مهندسی ژنتیک؛ ساکارومایسس سرویزیه؛ مسیرهای سوخت‌وساز.

#### مقدمه

فنون مهندسی ژنتیک، در سال ۱۹۷۳ میلادی، توسط کوهن و بویر<sup>۱</sup> بر روی باکتری اشریشیاکلی (E. coli) تجربه شد که نتیجه آن تولید پروتئین‌های نوترکیب در این باکتری بود و مهم‌ترین محصولی که با این روش تولید شد، انسولین انسانی بود. پس از آن، بهینه‌سازی فرایندهای میکروبیولوژیک صنعتی، با دستیابی به سویه‌های مناسب میکروبی از طریق تغییرات مستقیم و هدفمند در ژنوم میکروارگانیسم‌ها مورد توجه قرار گرفت و جایگزین روش‌های قدیمی، از جمله ایجاد جهش و ردیابی جهش یافته‌ها، شد (۲و۱). امروزه تحقیقات زیادی برای افزایش فعالیت و قابلیت‌های سلولی در میکروارگانیسم‌ها با کمک روش‌های مختلف مهندسی ژنتیک در دست اجرا است که در برگرفته تغییر در یک یا تعدادی از مسیرهای سوخت‌وساز درون سلولی و هدف آن افزایش بازدهی در تولید محصول، افزایش قدرت تکثیر سلول‌ها، تولید محصولات جدید و افزایش محدوده مصرف سوستر است.

برای انجام تغییرات در واکنش‌های بیوشیمیایی سلول، ابتدا باید هدف

یا اهداف مورد نظر برای ایجاد تغییرات ژنتیکی شناسایی شود و سپس با استفاده از روش‌های مختلف مهندسی ژنتیک، سویه نوترکیب و مطلوب ساخته شود. در تحلیل یک سلول به منظور تشخیص اهداف ژنی، باید فیزیولوژی سلولی مطالعه شود؛ زیرا پس از انجام تغییرات ژنتیکی، فیزیولوژی و فنوتیپ سلول‌های مورد نظر دگرگون خواهد شد (شکل ۱) (۱). برای مطالعه دقیق فیزیولوژی سلول می‌توان از ابزار و روش‌های بسیار جدید بهره گرفت که عبارتند از ریزآرایه‌های DNA<sup>۲</sup> برای ارزیابی کمی میزان بیان ژن‌ها، ژل الکتروفورز دو بعدی<sup>۳</sup> برای ارزیابی کمی پروتئین‌های سلولی، کروماتوگرافی گازی-جرم‌سنجی<sup>۴</sup> برای اندازه‌گیری مقدار متابولیت‌ها در درون سلول، نشانه‌گذاری ترکیبات مختلف با اتم کربن رادیواکتیو (C<sup>13</sup>)، به منظور پی بردن به نحوه ارتباط مسیرهای سوخت‌وساز در سلول و انجام فرایندهای پیشرفته تخمیر در مخمرهایی که امکان ردیابی، اندازه‌گیری و تنظیم تمام متغیرهای مهم آنها در هر لحظه وجود دارد (۱، ۳و۴).

اما در بعد ایجاد سویه نوترکیب دلخواه، باید اطلاعات به‌دست‌آمده در

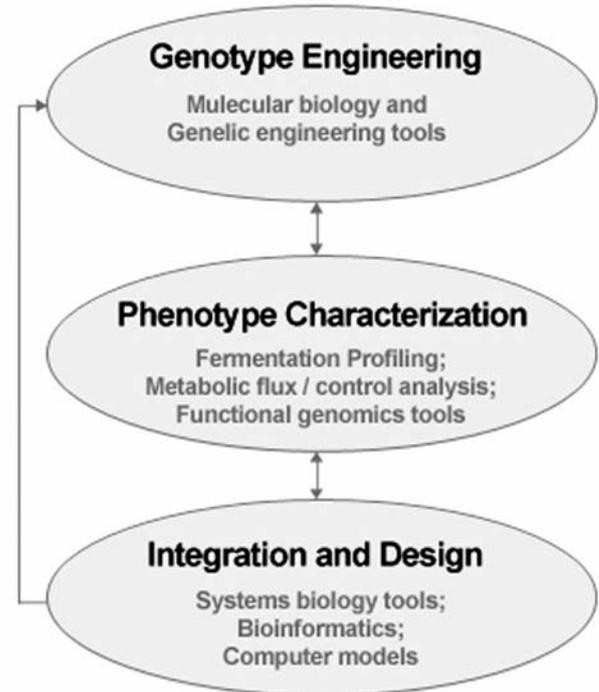
\*کامران قانیدی، Ph.D

اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، بخش ژنتیک- گروه سلول‌های بنیادی پژوهشگاه رویان، پایگاه تحقیقاتی اصفهان تلفن: ۰۳۱۱-۷۹۳۲۴۷۹  
E.mail: kamranghaedi@yahoo.com

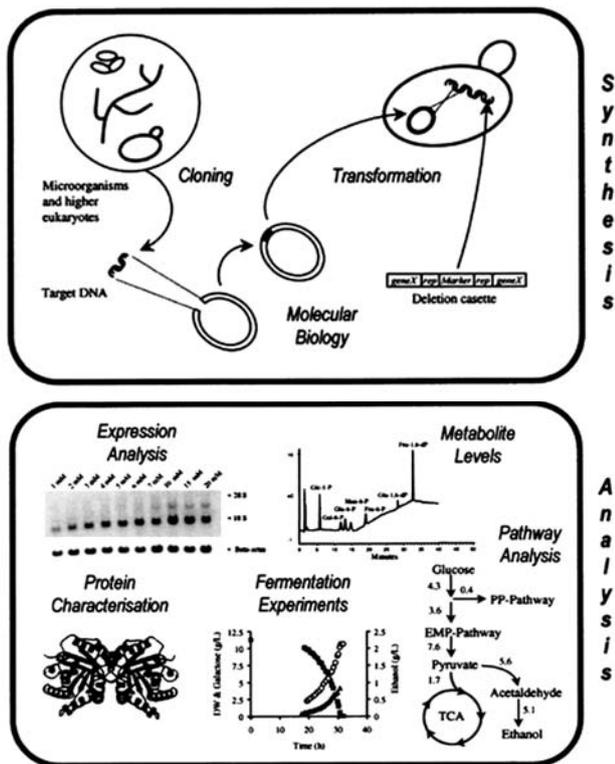
1. Cohen & Boyer
2. DNA-microarray
3. Two-Dimensional Gel Electrophoresis
4. Gas-Chromatography Mass-Spectrometry

جانبی و استفاده از سوبستراهای فراوان و ارزان قیمت در حال انجام است و بسیاری از آنها نیز به نتایج مطلوب رسیده است (۶تا۹).

**افزایش محدوده مصرف سوبسترا در ساکارومایسس سرویزیه**  
 ساکارومایسس سرویزیه به صورت طبیعی نمی تواند از لاکتوز به عنوان سوبسترا استفاده کند. لاکتوز یکی از قندهای عمده در شیر و آب پنیر است. تنها نیمی از آب پنیر تولیدشده در صنایع شیری در تهیه غذاها استفاده می شود و بقیه آن به علت بالا بودن میزان BOD و COD<sup>۱۰</sup>، یک ماده آلوده کننده محیط زیست به شمار می رود. ساکارومایسس سرویزیه به علت فقدان سیستم لاکتوز پرمئاز<sup>۱۱</sup>، قادر به جذب این قند از محیط کشت نیست و هم چنین به علت فقدان آنزیم بتا-گالاکتوزیداز<sup>۱۲</sup>، هیدرولیز آنزیمی قند لاکتوز را نیز انجام نمی دهد. با استفاده از دو راهکار، قابلیت مصرف لاکتوز در ساکارومایسس سرویزیه ایجاد شده است. راهکار اول انتقال ژن های مولد لاکتوز پرمئاز و بتا-گالاکتوزیداز از مخمر کلویورومایسس لاکتیس<sup>۱۳</sup> به ساکارومایسس سرویزیه است. سویه نوترکیب حاصل می تواند در شرایط بیورآکتور پیوسته، قند لاکتوز را پس



شکل ۱: ارتباط مستقیم بین ژنوتیپ و فنوتیپ میکروارگانیسم ها به منظور طراحی سویه های نوترکیب



شکل ۲: ابعاد مختلف شکل گیری یک سویه نوترکیب با انجام تحلیل های مختلف و استفاده از فنون مهندسی ژنتیک

- |                                   |                            |
|-----------------------------------|----------------------------|
| 5. <i>Saccharomyces cervisiae</i> | 6. Baker yeast             |
| 7. Xylitol                        | 8. Single-cell Protein     |
| 9. Biological Oxygen Demand       | 10. Chemical Oxygen Demand |
| 11. Lactose Permease              | 12. $\beta$ -Galactosidase |
| 13. <i>Kluyveromyces lactis</i>   |                            |

مرحله تحلیل، با روش های متنوع مهندسی ژنتیک به سمت تحقق نوترکیبی هدایت شوند. برای رسیدن به چنین هدفی، از کلون و بیان ژن یا ژن های غیر خودی در میزبان مورد نظر، ادغام پروتوپلاست ها، حذف ژن، نوترکیبی، ایجاد جهش با کمک عوامل فیزیکی و شیمیایی و سایر روش ها استفاده می شود. این روش ها در شکل ۲ خلاصه شده اند (۳).

**روش های تغییر در سوخت و ساز مخمر ساکارومایسس سرویزیه<sup>۵</sup>**  
 تغییرات ژنتیکی در مخمر ساکارومایسس سرویزیه و ایجاد سویه های نوترکیب آن، به علت کاربرد وسیع در صنایع غذایی و دارویی و شناسایی کامل ترادف ژنوم این مخمر در سال ۱۹۹۶، بسیار گسترده است (۵). این مخمر از چند قرن پیش، برای تولید مشروبات الکلی و مواد غذایی گوناگون استفاده شده است و امروزه در صنایع داروسازی نیز به کار می رود. ساکارومایسس سرویزیه، برای انسان و حیوانات غیر بیماری زا است و در نتیجه، زمینه تحقیقات ژنتیکی و زیست شناختی مولکولی و هم چنین، کاربردهای متنوع زیست فناوری با کمک آن فراهم است. در حال حاضر، از این مخمر در تولید مخمر نانوبی<sup>۶</sup>، اتانول و اسید لاکتیک، پروتئین های متنوع نوترکیب، زایلیتول<sup>۷</sup>، پروتئین تک یاخته<sup>۸</sup>، مواد دارویی و غیره استفاده می شود و تحقیقات بسیار زیادی در مورد تغییر مسیرهای سوخت و ساز آن، به منظور تولید محصول بیشتر، کاهش تولید محصولات

اکسیداتیو غیرفعال است. با انجام تغییراتی خاص در روند احیاء در این مخمر از راه تغییر کوفاکتورهای مورد نیاز حین جذب آمونیموم، می‌توان تولید گلیسرول را در شرایط بی‌هوازی مهار کرد تا میزان تولید اتانول ۸ درصد افزایش یابد (۳).

### از بین بردن مهار گلوکز بر روی سوخت‌وساز ساکارز و مالتوز

مخمر ساکارومایسس سرویزیه در حضور گلوکز موجود در محیط کشت، از سایر ترکیبات قندی، مانند ساکارز و مالتوز، استفاده نمی‌کند. به چنین پدیده‌ای نقش مهارکننده گلوکز اطلاق می‌شود. از آنجایی که در تولید مخمر نانویی از سوبسترای ملاس با ۴۰ تا ۵۰ درصد  $(\frac{W}{W})$  ساکارز و در تولید اتانول توسط سویه‌های آبجو از سوبسترای با ۵۰ تا ۶۰ درصد  $(\frac{W}{W})$  مالتوز استفاده می‌شود، حذف اثر مهارکننده گلوکز می‌تواند سرعت و میزان تولید محصول مورد نظر را به شدت افزایش دهد. نقش مهاری گلوکز با واسطه یک پروتئین انگشتی روی<sup>۱۹</sup> به نام Mig1 اعمال می‌شود (۱۵).

این پروتئین، بیان ژن‌های Suc2 و مجموعه Mal را تنظیم می‌کند. ژن Suc2 رمزگذار آنزیم اینورتاز<sup>۲۰</sup>، ژن Mal S رمزگذار آنزیم مالتاز<sup>۲۱</sup> و ژن Mal T رمزگذار ناقل مالتوز هستند. بنابراین طبیعی است که در حضور گلوکز، پروتئین Mig1 تولید و مسیرهای مصرف ساکارز و مالتوز کاملاً مسدود می‌شود؛ زیرا حضور این پروتئین ناحیه پروموتور ژن‌های نام‌برده را اشغال و از نسخه‌برداری آنها جلوگیری می‌کند (۴).

در یک مطالعه، برای حذف کردن اثر مهاری گلوکز، ژن مولد پروتئین Mig1 در مخمر ساکارومایسس سرویزیه تخریب شد. در سویه نوترکیب ایجادشده فعالیت تنفسی به شدت افزایش یافت و میزان رشد در حدود ۱۲ درصد بیشتر شد. استفاده از این گونه سویه‌های جهش‌یافته برای تهیه توده‌زیستی<sup>۲۲</sup> در کمترین زمان ممکن بسیار مناسب است.

### افزایش محدوده تولید پروتئین‌های نوترکیب و محصولات بیوشیمیایی

یکی از کاربردهای مخمر ساکارومایسس سرویزیه، تولید پروتئین‌های نوترکیب و سایر محصولات بیوشیمیایی است. تاکنون تولید اینترفرون انسانی، آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت B، هورمون انسولین، هورمون رشد، بتا-لاکتاماز، کایموزین و چند مورد دیگر در مخمر فوق انجام شده است (۱). وجود مسیرهای گوناگون ترش‌چی در ساکارومایسس، وجود تغییرات پس از ترجمه مانند N- و O-گلیکوزیلاسیون، سادگی فرایند

از جذب و هیدرولیز، به اتانول تبدیل کند (۱۰). راهکار دوم انتقال ژن مولد آنزیم بتا-گالاکتوزیداز از کپک اسپرژیلوس نایجر<sup>۱۴</sup> به مخمر ساکارومایسس سرویزیه و بیان آن در حضور پروموتری قوی، به صورت خارج سلولی است. در این حالت، سویه نوترکیب می‌تواند با ترشح آنزیم به محیط کشت، قند لاکتوز را خارج از سلول‌ها هیدرولیز کند و زیرواحدهای گلوکز و گالاکتوز ایجادشده را به مصرف برساند و در تهیه پروتئین تک‌یاخته استفاده شود (۱۱ و ۱۲).

سوبسترای دیگری که در شرایط طبیعی به مصرف مخمر ساکارومایسس سرویزیه نمی‌رسد، D-زایلوز است؛ زیرا آنزیم‌های مورد نیاز جهت مصرف آن را در اختیار ندارد. D-زایلوز پس از D-گلوکز فراوان‌ترین ترکیب قندی موجود در طبیعت و منبع اصلی آن مواد گیاهی و بخشی از پلیمر غیریکنواخت همی سلولز است. این ترکیبات به مقدار فراوان در لیگنوسلولز دیده می‌شوند و از آنها می‌توان برای تولید ترکیباتی با ارزش افزوده بیشتر، از جمله اتانول، استفاده کرد (۳). برای ایجاد قابلیت مصرف زایلوز در ساکارومایسس سرویزیه، ژن‌های مولد زایلوز ردوکتاز<sup>۱۵</sup> و زایلیتول دهیدروژناز<sup>۱۶</sup> از مخمر پیکیا استیبیتیس<sup>۱۷</sup> به میزان مورد نظر انتقال داده می‌شود و ژن مولد زایلوز کیناز که در ساکارومایسس سرویزیه وجود دارد، شدیداً بیان می‌شود. سویه نوترکیب ایجادشده می‌تواند زایلوز را با تبدیل به زایلولوز-۵ فسفات وارد مسیرهای سوخت‌وساز خود سازد و با تولید پیرووات، محصول اتانول را با بازدهی ۶۳ درصد مقدار پیش‌بینی شده، تولید کند (۱۳).

پژوهش‌های دیگری نیز در مورد ایجاد قابلیت مصرف نشاسته، ملی‌بیوز<sup>۱۸</sup>، بتا-گلوکان‌ها و دکسترین در مخمر ساکارومایسس سرویزیه انجام شده است و با توسعه محدوده مصرف سوبسترا، ضمن رفع مشکلات زیست‌محیطی، تولید محصولاتی با قیمت کمتر رواج یافته است (۱۴).

### محدود کردن تولید محصولات جانبی در فرایندهای تخمیر صنعتی

هدف دسته دیگری از تغییرات ایجادشده در مسیرهای سوخت‌وساز مخمر ساکارومایسس سرویزیه، کاهش میزان یا حذف محصولات جانبی هنگام تولید یک محصول تخمیری اصلی است تا از این راه بازدهی فرایند افزایش یابد. مهم‌ترین مثال در این خصوص تولید گلیسرول، به عنوان محصول جانبی هنگام تولید اتانول، است که می‌تواند بخشی از انرژی در دسترس مخمر را از مسیر تولید اتانول خارج و مشکلاتی را ایجاد کند. وقتی ساکارومایسس سرویزیه در شرایط هوازی رشد می‌کند، روند تبدیل به NADH با کمک آنزیم NADH دهیدروژناز میتوکندری‌ها انجام می‌شود. در شرایط بی‌هوازی، اکسیداسیون NADH سیتوزولی فقط از راه تولید گلیسرول اتفاق می‌افتد. در این شرایط مسیر فسفوریلاسیون

14. *Aspergillus niger*  
16. Xylitol Dehydrogenase  
18. Melibiose  
20. Invertase  
22. Biomass

15. Xylose Kinase  
17. *Pichia stipitis*  
19. Zinc finger protein  
21. Maltase

### نتیجه گیری

مخمر ساکارومایسس سرویزیه، به عنوان مهم ترین مخمر صنعتی، جایگاهی ویژه در تحقیقات و صنایع مختلف دارد. علاوه بر این، به رغم قابلیت های فراوان و ویژگی های بارز این مخمر به منظور استفاده در جنبه های مختلف زیست فناوری و به ویژه پزشکی و کشاورزی، و با توجه به امکان دست ورزی های ژنتیکی در این مخمر با روش های گوناگون، تغییر در مسیر یا مسیرهای سوخت و ساز این مخمر با هدف گیری خاص ممکن است در ایجاد محصولات جدید، رفع مشکلات موجود در صنایع مختلف، افزایش بازدهی تولید و رفع مشکلات زیست محیطی مفید باشد. احتمالاً هر قدر تغییرات ایجاد شده در ژنوم این مخمر پایدارتر باشد و مسیر یا مسیرهای سوخت و ساز تغییر یافته با نظم و توان بیشتر فعالیت کند، سویه های تغییر یافته در زمینه های مورد نظر به مدت طولانی قابل استفاده خواهند بود.

حضور نزدیک به ۶۰۰ ژن در ساکارومایسس سرویزیه و گستردگی و پیچیدگی مسیرهای سوخت و ساز در این مخمر، از یک طرف امکان مطالعه تغییرات ژنتیکی را دشوار می کند و از طرف دیگر بستری فراهم می کند تا با اعمال تغییرات دقیق ژنتیکی، نتایج بسیار ارزشمندی به دست آورد. گستردگی مسیرهای سوخت و ساز، حضور عوامل مختلف تنظیم کننده در این مسیرها و متفاوت بودن شدت انجام واکنش های آنزیمی درون سلول های مخمر سبب پیدایش شاخه های جدید در مطالعات سوخت و ساز سلولی، به نام فلوکسوم<sup>۳۰</sup>، شده است (۴). در این علم، غلظت سوبسترا و محصول و فعالیت آنزیم های مختلف که در یک مسیر سوخت و ساز فعالیت دارند، با دقت زیاد اندازه گیری می شود و پس از اعمال هر گونه تغییر در سطح ژن یا ژن های درگیر در مسیر سوخت و ساز، تغییرات غلظت آنالیت های مورد نظر اندازه گیری خواهد شد. بنابراین به سهولت می توان نقش ژن یا ژن های تأثیر گذار بر اجرای ایده ای جدید را ردیابی و برای تغییر در ساختار یا بیان آنها برنامه ریزی کرد.

ترانسفورماسیون با قطعات DNA خارجی و وجود اطلاعات کامل در خصوص فناوری تخمیر، این مخمر را به عنوان یک میزبان خوب برای بیان هر چه بیشتر و متنوع تر محصولات نوترکیب مطرح ساخته است (۱۶). تولید اسیدهای آلی در سیتوپلاسم سلول های مخمر با کمک آنزیم های پیرووات کربوکسیلاز و مالئات دهیدروژناز انجام می شود. تغییر در مسیر تولید اسید مالیک، با بیان شدید ژن مولد آنزیم مالئات دهیدروژناز با کمک یک پرموتر قوی، سبب افزایش ۳/۷ برابری تولید L-مالئیک اسید خواهد شد. تجمع زیاد این اسید درون سلول های مخمر، مسیر تولید اسید فوماریک و اسید سیتریک را نیز فعال می کند و غلظت این دو اسید نیز افزایش می یابد (۱۷).

تولید فلاونوئیدهای گیاهی نیز در مخمر ساکارومایسس سرویزیه انجام شده است. این ترکیبات فعالیت ضد میکروبی، ضد التهابی و ضد سرطانی دارند. برای تولید این ترکیبات، ۵ یا ۶ ژن از گیاه به مخمر انتقال داده می شود و پس از القاء، تولید فلاونوئیدها از نوع آپینین<sup>۲۳</sup> و کریسین<sup>۲۴</sup> آغاز می شود (۱۸). هم چنین با انتقال ژن مولد فایتوکلاتین<sup>۲۵</sup> از گیاه آرابیدوپسیس تالیانا<sup>۲۶</sup> به مخمر ساکارومایسس سرویزیه، سویه نوترکیب ایجاد شده قادر است سه برابر سویه وحشی، ترکیبات آرسنیک را در خود ذخیره کند. از آنجایی که ترکیبات آرسنیک در حد بیشتر از ۲۷۱۰ ppb سمی هستند، با استفاده از چنین سویه هایی می توان این گونه ترکیبات مضر را از آب آشامیدنی خارج کرد (۱۹).

علاوه بر اینها، با انتقال ژن های FAD<sub>2</sub> و FAD<sub>3</sub> از گیاه آرابیدوپسیس به مخمر ساکارومایسس سرویزیه، آنزیم مولد اسیدهای چرب غیر اشباع در مخمر تولید می شود. در این حالت جذب اسیدهای چرب تسریع و مسیرهای سوخت و ساز جدید فعال می شوند. نتیجه این فرایند تبدیل اولئیک اسید<sup>۲۸</sup> به لینولئیک اسید<sup>۲۹</sup> است. و از این سویه می توان در تبدیل ترکیبات کم ارزش لیبیدی به مشتقات لیبیدی با ارزش افزوده بیشتر کمک گرفت (۲۰).

### References

1. Olsson L, Nielsen J. The role of metabolic engineering in the improvement of *S. cerevisiae*. *Enz and Microb Technol* 2000;26:785-92.
2. Theobald U, Mailinger W. In vivo analysis of metabolic dynamics in *S. Cerevisiae* I, experimental observations. *Biotechnol and Bioeng*, 1997;55:305-16.

23. Apigenin  
25. Phytochelatin  
27. 10 part per billion  
29. Linoleic Acid

24. Chrysin  
26. *Arabidopsis thaliana*  
28. Oleic Acid  
30. Fluxome

3. Ostergaard S, Olsson L, Nielson J. Metabolic engineering of *S. Cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64(1):34-50.
4. Sedlak M, Edenberg HJ. DNA-microarray analysis of the expression of the genes encoding the major enzymes in ethanol production by engineered *Saccharomyces* yeast. *Enz Microb Technol* 2003;33:19-28.
5. Mobini-Dehkordi M, Nahvi I, Ghaedi K. Tavassoli M. Isolation of high resistant species of *Saccharomyces Cerevisiae*.

Res Pharm Sci 2006;1(2):85-91.

6. Moeini H, Valian S, Nahvi I. Isolation and identification of yeast strains capable of producing single cell protein from whey in co-cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. Iranian Biotechnol 2004;2(1):13-18.

7. Nahvi I, Emtiazi G, Alkabi L. Isolation of a flocculating *Saccharomyces cerevisiae* and investigation of its performance in the fermentation of beet molasses to ethanol. Biomass Bioenergy 2002;23:481-6.

8. Nahvi I, Moeini H, Tavassoli M. Improvement of SCP production and BOD removal of whey with mixed yeast culture. Electronic Journal of Biotechnology 2005;7(3).

9. Shafiee R, Nahvi I, Emtiazi G. Bioconversion of raw starch to SCP by co-culture of *Cryptococcus aerius* and *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Sci 2005;5(6):717-23.

10. Dominques L, Teixeira JA, Lima N. Construction of a flocculent *Saccharomyces Cerevisiae* fermenting lactose. Appl Microbiol Biotechnol 1999;51:621-6.

11. Dominques L, Dantas MM, Lima N. Continuous ethanol fermentation of lactose by a recombinant flocculating *S.Cerevisiae* strain. Biotechnol Bioengin 1999;64: 692-7.

12. Jeong YS, Vieth WR. Fermentation of lactose to ethanol with recombinant yeast in an immobilized yeast membrane bioreactor. Biotechnol Bioengin 1991;37:587-90.

13. Ho NW, Chen YZ, Brainard AP. Genetically engineered

*Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose. Appl Environ Microbiol 1998;64:1852-59.

14. Kang NY, Park JN, Chin JE. Construction of an amyolytic industrial strain of *S. Cerevisiae* containing the *Schwanniomyces occidentalis* alpha-amylase gene. Biotechnol Letter 2003;25(21):1847-51.

15. Nehlin JO, Ronne H. Yeast MIG1 repressor is related to the mammalian early growth response and Wilms tumor finger proteins. EMBO Journal 1990;9:2891-8.

16. Schaaff I, Heinisch J, Zimmermann FK. Overproduction of glycolytic enzymes in yeast. Yeast 1989;5:285-90.

17. Pines O, Shemesh S, Battat E, Goldberg I. Overexpression of cytosolic malate dehydrogenase cause overproduction of specific organic acids in *S. Cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol 1997;48:248-55.

18. Jiang H, Morgan JA. Increasing flavonoid production by metabolic pathway engineering in multiple yeast hosts. The Annual Meeting of Metabolic Engineering, Denmark, 2005.

19. Lee W, Shah D, Chen W. Metabolic engineering of yeast for bioaccumulation of arsenic. The Annual Meeting of Metabolic Engineering, Denmark 2005.

20. Dyer JM, Chapital DC, Kuan JW. Metabolic engineering of *S.cerevisiae* for production of novel lipid compound. Appl Microbiol Biotechnol 2002;59:224-30.