# نقش مهندسی متابولیک در توسعه شیمی سبز

**محمد علی اسداللهی[1*]، مهدی کمالی[2]**

۱- اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوریهای نوین، گروه زیست فناوری

۲- اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوریهای نوین، گروه مهندسی هسته‌ای

پیام نگار: **masadollahi@yahoo.com**

زمان دریافت: ۱۳۸۸/۱۱/۴

زمان پذیرش: ۱۳۸۸/۱۲/۲۲

**چکیده**

*شیمی سبز به عنوان یک رویکرد جدید در صنایع شیمیایی و علم شیمی در اوایل دهه‌ی ۱۹۹۰ میلادی مطرح گردید و در آغاز هزاره‌ی جدید میلادی مورد پذیرش و اقبال عمومی قرار گرفت. اصول دوازده‌گانه‌ی شیمی سبز به طور کلی مبتنی بر کمترین تولید ضایعات، کمترین تولید و یا استفاده از مواد زیان‌بار، استفاده از روش‌هایی با بیشترین بازدهی و تولید محصولات زیست تخریب‌پذیر و دارای کمترین اثرات زیان‌بار محیطی می‌باشد. دستیابی به اهداف شیمی سبز و پایدار با توجه به ماهیت این اهداف، مستلزم همکاری محققین و متخصصین دارای تخصص‌های مختلف است. در این مقاله نقش مهندسی متابولیک به عنوان یک شاخه نوظهور از زیست فناوری در دسترسی به اهداف شیمی سبز و پایدار بررسی می‌شود.*

**کلمات کلیدی: مهندسی متابولیک، شیمی سبز، زیست فناوری صنعتی، زیست فناوری سفید**

## ۱- مقدمه

در طول دهه‌های ۱۹۶۰ و ۱۹۷۰ میلادی و پس از جنگ جهانی دوم، صنایع شیمیایی با سرعت بسیار زیادی شروع به رشد کردند و محصولات تولید شده توسط این بخش از صنعت، تمام جنبه‌های زندگی بشر را تحت تاثیر خود قرار داد به طوری که امروزه تصور جنبه‌ای از زندگی بشر که در آن محصولات شیمیایی نقشی نداشته باشند، بسیار مشکل است. محصولات تولید شده توسط صنایع شیمیایی در بخش‌های مختلف از جمله مواد دارویی، پوشاک، حمل و نقل، ایمنی، پزشکی، کشاورزی و ... مورد استفاده قرار می‌گیرند و ارزش محصولات شیمیایی تولید شده در سال ۲۰۰۲ به بیش از ۱/۳ تریلیون دلار رسیده است [۱]. با این حال توسعه‌ی علم شیمی و صنایع شیمیایی بدون توجه کافی به جنبه‌های جانبی و اثرات مخرب آن بر محیط زیست صورت گرفته است به طوری که آشکار شدن اثرات زیان‌بار برخی از محصولات تولید شده توسط صنایع شیمیایی بر محیط زیست و سلامت بشر، خدمات ارائه شده توسط این بخش را تا حد زیادی تحت‌الشعاع خود قرار داده است. از طرف دیگر، مصرف بی‌رویه سوخت‌های فسیلی در صنایع شیمیایی، نگرانی‌های زیادی در مورد اتمام سریع این منابع زیرزمینی که ماده‌ی اولیه‌ی اصلی برای بسیاری از صنایع شیمیایی می‌باشند، به وجود آورده است. بحران نفتی طی سال‌های ۱۹۷۳ تا ۱۹۷۹ که سازمان اوپک قیمت نفت را از بشکه‌ای ۲ دلار به بشکه‌ای حدود ۳۰ دلار افزایش داد، باعث افزایش هزینه‌ی مواد اولیه گردید و بشر را به طور جدی به فکر استفاده از منابع تجدیدپذیر که مشکلات کمتری را نیز برای محیط زیست به وجود می‌آورند، انداخت. افزایش میزان

گازهای گلخانه‌ای، گرم شدن زمین و تغییرات اقلیمی سریع از دیگر مشکلات ناشی از فرایند صنعتی شدن و نیز توسعه‌ی صنایع شیمیایی بود. در این شرایط، لزوم توجه به توسعه‌ی پایدار[1] مورد توجه قرار گرفت. در یکی از کمیسیون‌های سازمان ملل متحد در مورد محیط زیست و توسعه در سال ۱۹۸۷ میلادی، توسعه‌ی پایدار به صورت "تامین نیازهای زمان حال بدون قربانی کردن توانایی نسل‌های آینده برای تامین نیازهای خود" تعریف شد. در واقع هدف از توسعه‌ی پایدار، جلوگیری از تهدیدات جدی برای کره زمین در دراز مدت و ایجاد توازن بین توسعه‌ی اقتصادی، حفظ اکوسیستم‌ها و ارتقای کیفیت زندگی بشر است [۳-۲].

لذا در سال‌های اخیر، دولت‌ها، سازمان‌های غیردولتی و بخش‌های صنعتی، حرکت به سوی توسعه‌ی پایدار را مورد توجه بیشتری قرار داده‌اند و تدوین راهکارهای دستیابی به توسعه‌ی پایدار به یکی از اولویت‌های جوامع بشری تبدیل شده است. در این راستا، صنایع شیمیایی به دلیل بهره‌برداری بی‌رویه از منابع طبیعی و تهدیدهای جدی برای محیط زیست، وظیفه خطیری را عهده‌دار می‌باشند. صنایع شیمیایی یک بخش بسیار مهم تولیدی با طیف وسیعی از محصولات و در عین حال یک مصرف کننده‌ی بزرگ منابع سوخت‌های فسیلی و یک تولیدکننده‌ی بزرگ مواد آلاینده و ضایعات می‌باشند. در حال حاضر، محققین، شیمیدان‌ها و مهندسین شیمی با یک چالش بزرگ در زمینه‌ی توسعه‌ی فرایندهایی مواجه هستند که ضمن بی‌خطر بودن برای محیط زیست، کیفیت زندگی را ارتقاء داده و از قابلیت رقابت در بازار مصرف برخوردار می‌باشند.

## ۲- شیمی سبز و توسعه پایدار

در اوایل دهه‌ی ۱۹۹۰، آژانس حفاظت از محیط زیست[2] آمریکا واژه‌ی شیمی سبز[3] را به منظور ارتقای فناوری‌های شیمیایی خلاقانه که استفاده و یا تولید مواد شیمیایی خطرناک را به حداقل می‌رسانند، انتخاب نمود. در طول سال‌های گذشته، شیمی سبز به عنوان یک راهکار برای دستیابی به توسعه‌ی پایدار در صنایع شیمیایی پذیرفته شده و به صورت زیر تعریف می‌شود [۴]: "کاربرد یک سری اصول به منظور کاهش و یا حذف استفاده و تولید مواد خطرناک در طراحی، ساخت و کاربرد مواد شیمیایی". اصولی که شیمی سبز بر آن مبتنی است را می‌توان به ۱۲ اصل کلی زیر خلاصه کرد [۶-۴ و ۲]:

- جلوگیری از تولید ضایعات بهتر از تصفیه و پاک‌سازی آن پس از تولید ضایعات است. آلودگی را بایستی در سرچشمه متوقف کرد.
- روش‌های سنتز مواد شیمیایی باید به گونه‌ای طراحی شوند که مواد اولیه‌ی مورد استفاده در فرایند به جای تولید محصولات جانبی یا ضایعات، تا حد امکان وارد ساختار محصول نهایی شوند.
- در سنتز مواد شیمیایی بایستی موادی استفاده و یا تولید شوند که حداقل سمیت و آلایندگی را برای انسان و محیط زیست ایجاد کنند.
- محصولات شیمیایی باید به گونه‌ای طراحی شوند که ضمن برخورداری از کارکرد مناسب، حداقل سمیت را در کوتاه مدت و بلند مدت برای محیط زیست ایجاد کنند.
- از مصرف مواد جانبی مانند حلال‌ها و عوامل جداکننده باید اجتناب شود و یا در صورت نیاز این مواد باید بی‌ضرر باشند.
- سنتز مواد شیمیایی باید با حداقل استفاده از انرژی و تا حد ممکن در دما و فشار متعارف صورت گیرد.
- مواد خام مورد استفاده باید تا حد امکان تجدیدپذیر باشند.
- مراحل مشتق‌سازی[4] در سنتز باید به حداقل برسد چرا که انجام این مراحل خود مستلزم مصرف مواد شیمیایی است و می‌تواند منجر به تولید ضایعات شود.
- استفاده از کاتالیزگرهایی که به صورت اختصاصی عمل می‌کنند بر استفاده از واکنش‌گرهای شیمیایی ارجحیت دارد.
- محصولات شیمیایی باید به گونه‌ای طراحی شوند که پس از استفاده به ترکیبات بی‌خطر تجزیه شوند و در محیط باقی نمانند.
- توسعه‌ی روش‌های تجزیه به شکلی مورد نیاز است که بتوان ترکیبات را در زمان انجام فرایند اندازه‌گیری کرد و از تشکیل مواد خطرزا جلوگیری نمود.
- مواد مورد استفاده در فرایندهای شیمیایی باید به صورتی

1. Sustainable Development
2. Environmental Protection Agency (EPA)
3. Green Chemistry
4. Derivatization

طراحی شوند که خطر وقوع حوادث مانند انفجار، آتش‌سوزی و یا انتشار در محیط به حداقل برسد.

## ۳- زیست‌فناوری صنعتی یا زیست‌فناوری سفید

دستیابی به اهداف مشخص شده در اصول دوازده‌گانه‌ی شیمی سبز، امر ساده‌ای نبوده و مستلزم استفاده از فناوری‌ها و تخصص‌های مختلف می‌باشد. به همین دلیل، شیمی سبز کاملا ماهیت بین رشته‌ای دارد. یکی از فناوری‌هایی که می‌تواند نقش مهمی در دستیابی به اهداف فوق ایفا کند، زیست‌فناوری[1] است.

برای زیست‌فناوری تعاریف زیادی ارائه شده است که یکی از تعاریف جامع " کاربرد علم و مهندسی در استفاده مستقیم یا غیر مستقیم از موجودات زنده، بخشی از بدن موجودات زنده یا فراورده های آنها به صورت طبیعی یا تغییریافته آنهاست". در واقع هدف زیست‌فناوری، استفاده از موجودات زنده مانند میکروب‌ها و یا اجزای آنها برای تولید محصولات جدید و یا بهبود کیفیت زندگی بشر است. زیست‌فناوری علم جدیدی نیست و بشر از هزاران سال پیش به صورت آگاهانه و یا ناآگاهانه از این علم بهره برده است. با این حال، در دهه‌ی ۱۹۷۰ میلادی با ابداع فناوری نوترکیب‌سازی DNA[2] نوترکیب و امکان تبیین ژن‌های موجودات مختلف در میکروارگانیسم‌ها، تحول عظیمی در زیست‌فناوری رخ داد که این علم را وارد مرحله‌ی جدیدی از دوران تاریخ طولانی خود نمود. به دنبال این ابداع، امکان تولید فراورده‌های دارویی مانند انسولین و هورمون رشد در مقیاس انبوه توسط میکروارگانیسم‌ها به سرعت فراهم گردید. در ابتدا فناوری DNA نوترکیب بیشتر برای تولید فراورده‌های دارویی مورد استفاده قرار گرفت ولی پس از مدتی دانشمندان به فکر استفاده از قابلیت‌های ایجاد شده توسط این فناوری برای تولید محصولات شیمیایی افتادند. بدین ترتیب فنون مهندسی ژنتیک برای افزایش میزان تولید محصولات شیمیایی توسط ارگانیسم‌های تولید کننده و یا تولید این فراورده‌ها در ارگانیسم‌هایی که در حالت طبیعی آنها را تولید نمی‌کنند، به صورت فزاینده‌ای مورد استفاده قرار گرفتند. استفاده از فناوری‌های زیستی برای تولید فراورده‌های شیمیایی در فرایندهای صنعتی، "زیست‌فناوری صنعتی"[3] نام گرفت و از این عبارت به صورت گسترده‌ای از دهه‌ی ۱۹۸۰ میلادی به بعد در منابع علمی استفاده شد. زیست‌فناوری صنعتی که اغلب به عنوان زیست‌فناوری سفید[4] نیز شناخته می‌شود، تبدیل زیستی[5] مواد آلی خام مورد استفاده از زیست‌توده[6] یا مشتقات آن به مواد شیمیایی و یا انرژی است. به طور خاص، زیست‌فناوری صنعتی یا زیست‌فناوری سفید، تولید انواع محصولات شیمیایی خالص و فله‌ای مانند آمینواسیدها، ویتامین‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها، آنزیم‌ها، اسیدهای آلی، پلیمرها و سایر محصولات شیمیایی را در برمی‌گیرد [۹-۷].

دپارتمان انرژی آمریکا[7] پیش‌بینی کرده است که ارزش محصولات شیمیایی تولید شده با استفاده از زیست‌فناوری صنعتی تا سال ۲۰۱۰ به بیش از ۱۰۰ میلیارد دلار و تا سال ۲۰۳۰ به بیش از ۴۰۰ میلیارد دلار خواهد رسید و بدین ترتیب بیش از ۵۰ درصد از سهم بازار این گونه فراورده‌ها را به خود اختصاص خواهد داد [۸]. بر اساس یک پیش‌بینی دیگر، تا سال ۲۰۱۰ بین ۱۰ تا ۲۰ درصد از کل مواد شیمیایی آلی از طریق روش‌های زیست‌شناختی تولید خواهد شد [۱۰]. زیست فناوری صنعتی در تاریخچه‌ی نسبتا کوتاه خود، توانسته است محصولات مختلفی را از طریق تجاری‌سازی فرایندهای تخمیری به بازار عرضه کند که از این میان می‌توان به پنی‌سیلین (با استفاده از قارچ پنی‌سیلیوم کرایزوژنوم[8] با بازاری بیش از ۱/۵ میلیارد دلار در سال)، ویتامین‌ها (مانند L-آسکوربیک اسید با استفاده از فرایند ریشتن[9] توسط باکتری گلوکونوباکتر اکسیدانس[10] با میزان تولید ۸۰۰۰۰ تن در سال و بازاری به ارزش بیش از ۶۰۰ میلیون دلار)، اسیدهای آلی (مانند تولید اسید سیتریک توسط قارچ‌های گونه‌ی آسپرژیلوس با میزان تولید ۱۰۰۰۰۰۰ تن در سال و بازاری به ارزش بیش از ۱/۵ میلیارد دلار)، آمینواسیدها (مانند L-گلوتامات با میزان تولید ۱۰۰۰۰۰۰ تن در سال و L-لیزین با میزان تولید ۳۵۰۰۰۰ تن در سال توسط باکتری کورینه باکتریوم گلوتامیکام[11]) اشاره نمود [۹ و ۱].

عوامل مختلفی در توسعه‌ی سریع زیست‌فناوری صنعتی طی

1. Biotechnology
2. DNA Recombination

3. Industrial Biotechnology
4. White Biotechnology
5. Bioconversion
6. Biomass
7. US Department of Energy
8. *Penicillium chrysogenum*
9. Reichstein Process
10. *Gluconobacter oxydans*
11. *Corynebacterium glutamicum*

سال‌های گذشته دخیل بوده‌اند که برخی از مهم‌ترین آنها عبارتند از:

- فرایندهای زیستی در مقایسه با فرایندهای شیمیایی، ضایعات کمتری تولید می‌کنند و بازدهی بالاتری از نظر انرژی و استفاده از منابع دارند. به عنوان مثال، در جدول (۱) تولید شیمیایی و زیست‌شناختی اکریل آمید با یکدیگر مقایسه شده است. همان گونه که مشاهده می‌شود، استفاده از فرایند زیستی علاوه بر نیاز به دمای پایین‌تر (کاهش مصرف انرژی)، دارای بازدهی بالاتری است و غلظت نهایی محصول به دست آمده نیز بالاتر است. مصرف انرژی و میزان انتشار دی‌اکسید کربن در فرایند زیستی تولید اکریل آمید حدود یک پنجم فرایند شیمیایی است.
- در فرایندهای شیمیایی، مواد اولیه‌ی مورد استفاده معمولا منابع فسیلی هستند و این فرایندها با تولید مقادیر زیادی از گازهای گلخانه‌ای از جمله گاز دی‌اکسید کربن همراه می‌باشند که افزایش میزان این گازها در اتمسفر، تغییرات آب و هوایی شدیدی را در سال‌های گذشته به وجود آورده است. این در حالی است که در فرایندهای زیستی از زیست‌توده به عنوان ماده‌ی اولیه استفاده می‌شود و کربن موجود در زیست‌توده از طریق تثبیت گاز دی‌اکسید کربن موجود در اتمسفر به وجود آمده است، در نتیجه این فرایندها از نظر تولید گاز دی‌اکسید کربن خنثی هستند.
- محصولات تولید شده توسط فرایندهای زیستی، زیست تخریب‌پذیر هستند و خطرات کمتری برای محیط زیست ایجاد می‌کنند.
- زیست‌فناوری، امکان تولید طیف وسیعی از مولکول‌ها با تنوع بسیار زیاد و ساختارهای نوین را فراهم می‌کند که سنتز این گونه مولکول‌ها از طریق فرایندهای متداول شیمیایی بسیار مشکل و در بسیاری از موارد، ناممکن است [۱۰].

همان گونه که مشاهده می‌شود، زیست‌فناوری صنعتی امکانات مختلفی را به منظور دستیابی به شیمی سبز و پایدار فراهم می‌کند. تعدادی از این قابلیت‌ها شامل تولید کمترین ضایعات و مواد آلاینده و مضر برای محیط زیست، تولید محصولات زیست تخریب‌پذیر، استفاده بهینه و کمترین انرژی، حداقل استفاده از حلال‌ها و مواد شیمیایی در طول فرایند، تولید محصولات غیر مضر برای محیط زیست، استفاده از منابع تجدیدپذیر به عنوان مواد خام به جای سوخت‌های فسیلی و جلوگیری از انتشار گازهای گلخانه‌ای است.

**جدول ۱- مقایسه‌ی فرایند شیمیایی و زیست‌شناختی برای تولید اکریل آمید** [۳].

| پارامتر | فرایند شیمیایی | فرایند زیستی |
|---|---|---|
| دمای واکنش | ۷۰ درجه سلسیوس | ۱۵-۰ درجه سلسیوس |
| بازدهی واکنش در یک بار گذر | ۸۰-۷۰ درصد | ۱۰۰ درصد |
| غلظت اکریل آمید | ۳۰ درصد | ۵۰-۴۸ درصد |
| تغلیظ محصول | ضروری است | لازم نیست |
| انرژی مورد نیاز (بخار و الکتریسیته برحسب مگاژول به ازای هر کیلوگرم اکریل آمید) | ۱/۹ | ۰/۴ |
| تولید $CO_2$ (کیلوگرم $CO_2$ به ازای هر کیلوگرم اکریل آمید) | ۱/۵ | ۰/۳ |

## ۴- مهندسی متابولیک و شیمی سبز

در فرایندهای زیست‌فناوری صنعتی، در اغلب موارد از کارخانه‌های سلولی[1] برای تولید محصولات مورد نظر استفاده می‌شود. در واقع در توسعه‌ی فرایندهای زیستی جدید (یا ارتقای فرایندهای موجود)، ارزش افزوده‌ی اصلی در طراحی بهینه‌ی کارخانه‌ی سلولی مورد استفاده نهفته است. بنابراین ارتقاء و بهینه‌سازی میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در تولید محصولات به روش زیست‌شناختی، نقش مهمی در اقتصادی شدن و قابلیت استفاده از فرایندهای زیستی، به جای فرایندهای سنتی شیمیایی، ایفا می‌کند.

دستکاری مسیرهای متابولیک با هدف تغییر در خصوصیات مورد نظر میکروارگانیسم‌ها برای مدت‌های طولانی به صورت سنتی، توسط محققین دنبال شده است. این روش‌ها اغلب مبتنی بر استفاده از جهش‌زایی[2] (با استفاده از مواد شیمیایی جهش‌زا و یا نور UV) و فنون جداسازی برای تعیین سویه‌های بهبود یافته برای دستیابی به هدف مورد نظر بوده است. مثال‌های زیادی در مورد استفاده موفق از این روش‌های سنتی برای توسعه‌ی سویه‌های صنعتی برای تولید آمینواسیدها، آنتی بیوتیک‌ها، حلال‌ها و ویتامین‌ها وجود دارد که می‌توان به افزایش ۱۰۰۰ برابری غلظت پنی‌سیلین تولید شده توسط قارچ پنی‌سیلیوم کرایزوژنوم با استفاده از روش های فوق و در طول سالیان متمادی اشاره کرد [۹]. با وجود مقبولیت گسترده و موفقیت‌های چشمگیر در توسعه‌ی سویه‌های صنعتی، این روش‌ها معمولا تصادفی است و ماهیت ژنتیکی تغییرات به وجود آمده و نحوه تاثیر این تغییرات ژنتیکی در بهبود خصوصیات سویه‌ها به طور کامل و دقیق بررسی نشده است [۱۱].

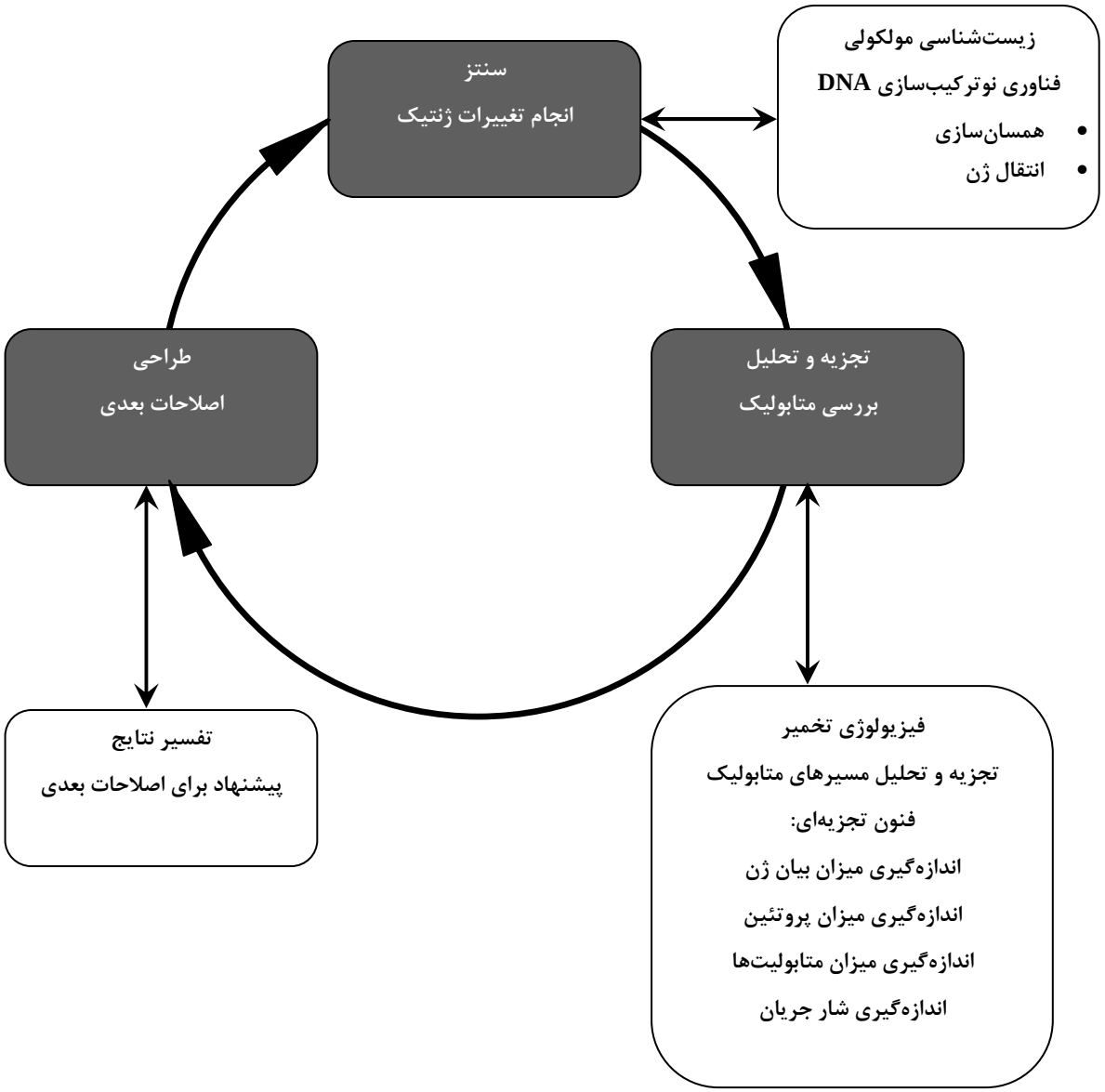
توسعه‌ی فنون مهندسی ژنتیک، امکان اصلاح دقیق و مشخص مسیرهای زیست‌شیمیایی و توسعه‌ی هدفمند میکروارگانیسم‌ها را فراهم ساخت. مدت کوتاهی پس از اثبات قابلیت‌های فنون مهندسی ژنتیک برای بهبود سویه‌های میکروبی، واژه‌های متعددی از جمله اصلاح مولکولی[3]، تکامل آزمایشگاهی[4]، مهندسی مسیرهای متابولیک، مهندسی سلولی[5] و مهندسی متابولیک[6] برای نشان دادن کاربردهای بالقوه این فناوری برای اصلاح هدفمند مسیرهای متابولیک پیشنهاد شد. در این میان، واژه‌ی مهندسی متابولیک که توسط بیلی[7] در سال ۱۹۹۱ [۱۲] ارائه شد، عمومیت بیشتری یافت. بیلی، مهندسی متابولیک را به صورت "بهبود فعالیت‌های سلولی از طریق دستکاری در کارکردهای آنزیمی، انتقالی و تنظیم‌کنندگی سلول با استفاده از فناوری نوترکیب‌سازی DNA" تعریف کرد.

مهندسی متابولیک یک فرایند پیوسته تا دستیابی به سویه‌ای با خصوصیات مطلوب است. این فرایند که می‌توان آن را به شکل یک چرخه در نظر گرفت (شکل(۱))، شامل دو مرحله‌ی سنتز و تجزیه و تحلیل است. در مرحله‌ی سنتز، ابتدا خصوصیات ژنتیکی مورد نظر در سویه‌ی میکروبی اعمال می‌شود و سپس تغییرات ایجاد شده در اثر این تغییرات ژنتیکی با استفاده از فنون مختلف مانند بررسی فیزیولوژیکی رشد، اندازه‌گیری میزان بیان ژن، اندازه‌گیری میزان پروتئین‌ها، اندازه‌گیری میزان متابولیت‌ها و اندازه‌گیری شار جریان[8] در هر مسیر زیست‌شیمیایی، بررسی می‌شود. اطلاعات به دست آمده از این اندازه‌گیری‌ها و تجزیه و تحلیل نتایج به دست آمده در مرحله‌ی سوم چرخه (طراحی)، به منظور اعمال هدفمند تغییرات ژنتیکی بعدی مورد استفاده قرار می‌گیرد و این فرایند تا رسیدن به سویه‌ای با خصوصیات مورد قبول ادامه می‌یابد.

تاکنون مثال‌های فراوان و متنوعی از کاربرد مهندسی متابولیک به منظور گسترش و بهبود خصوصیات میکروارگانیسم‌ها گزارش شده است. این مثال‌ها را بسته به هدف مورد نظر می‌توان به پنج گروه کلی تقسیم‌بندی نمود که عبارتند از [۱۴و۱۳]:

- افزایش بازدهی[9] یا بهره‌دهی[10] محصولات تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها: در بسیاری از فرایندهای زیستی صنعتی به خصوص در تولید محصولات با ارزش افزوده‌ی پایین، افزایش مداوم بازدهی و یا بهره‌دهی برای کمک به اقتصادی شدن فرایند اهمیت زیادی دارد. در برخی موارد این کار را می‌توان با افزایش فعالیت آنزیم‌های موجود در یک مسیر متابولیک (مثلا با افزایش میزان تبیین ژن‌ها) انجام داد. در برخی موارد تعداد مراحل منتهی به تولید محصول در یک مسیر متابولیک زیاد بوده و امکان افزایش میزان تبیین تمام آنزیم‌ها وجود ندارد. در این‌گونه موارد تجزیه و تحلیل چگونگی تنظیم شار جریان در مسیر متابولیکی مورد نظر، ضروری است.

1. Cell Factories
2. Mutation
3. Molecular Breeding
4. In vitro Evolution
5. Cell Engineering
6. Metabolic Engineering
7. Bailey
8. Flux
9. Yield
10. Productivity




**شکل ۱- چرخه‌ی مهندسی متابولیک** [۱۳].

- گسترش طیف سوبستراهای قابل مصرف توسط یک میکروارگانیسم: به طور کلی افزایش توانایی میکروارگانیسم مورد استفاده در یک فرایند صنعتی برای مصرف طیف وسیعی از منابع کربنی، انعطاف‌پذیری فرایند را افزایش داده و فرایند را از نظر اقتصادی توجیه‌پذیرتر می‌نماید. این مساله به خصوص در فرایندهای تولید انبوه که قیمت سوبسترا سهم زیادی در قیمت تمام شده محصول دارد (به عنوان مثال ۶۵-۶۰ درصد برای اتانول، ۴۵-۴۰ درصد برای لیزین و ۳۵-۲۵ درصد برای آنتی‌بیوتیک‌ها و آنزیم‌های صنعتی)، از اهمیت زیادی برخوردار است. از آنجا که میکروارگانیسم‌ها در اغلب مسیرهای متابولیک شباهت زیادی با یکدیگر دارند، این کار مستلزم افزودن یک یا چند مرحله‌ی آنزیمی به مسیرهای متابولیک میکروارگانیسم مورد نظر می‌باشد. در این زمینه تاکنون تحقیقات زیادی به منظور توانمند ساختن میکروارگانیسم‌ها برای مصرف سوبستراهایی مانند زایلوز، لاکتوز، سلولز و نشاسته صورت گرفته است.

- ایجاد مسیرهای متابولیک برای تولید محصولات جدید: به طور سنتی، فرایندهای زیستی براساس جداسازی و غربال نمودن سویه‌های میکروبی با خصوصیات مورد نظر بوده‌اند. در سال‌های اخیر این روند تغییر نموده و به سمت استفاده از کمترین تعداد سویه‌های میکروبی برای تولید حداکثر تعداد محصولات پیش رفته است. این امر باعث می‌شود که بتوان از اطلاعات به دست آمده در مورد یک میکروارگانیسم که با صرف هزینه‌ی زیادی به دست آمده‌اند، برای فرایندهای مختلف استفاده نمود. برای این منظور می‌توان مسیرهای متابولیکی موجود را با بیان ژن‌های غیرهمگن[1] از سایر ارگانیسم‌ها گسترش داد. گاهی اوقات نیز می‌توان محصولات کاملا جدیدی را با استفاده از به‌هم‌آمیزی ژنی[2] تولید نمود [۱۵].
- مهندسی فیزیولوژی سلولی برای توسعه‌ی فرایند: هنگام بهره‌برداری صنعتی از میکروارگانیسم‌ها یا سلول‌های عالی، گاهی اوقات مهندسی فیزیولوژی سلولی برای توسعه و بهبود فرایند اهمیت زیادی دارد. به عنوان مثال ایجاد سلول‌های با تحمل زیاد در شرایط غلظت پایین اکسیژن، حساسیت کم به غلظت بالای گلوکز، بهبود ریخت‌شناسی سلولی به خصوص در فرایندهایی که از قارچ‌های رشته‌ای استفاده می‌کنند و افزایش میزان لخته شدن[3] در فرایندهای مختلف حائز اهمیت می‌باشند.
- حذف یا کاهش تشکیل محصولات جانبی: تشکیل محصولات جانبی در فرایندهای صنعتی مشکلات زیادی از جمله اتلاف مواد اولیه، سمیت این محصولات و تداخل محصولات جانبی با فرایندهای جداسازی را به همراه دارد. در برخی موارد می‌توان با حذف ژن‌های مسئول تولید محصولات جانبی از تشکیل این محصولات جلوگیری نمود ولی در برخی موارد نیز تشکیل این محصولات برای عملکرد طبیعی سلول لازم بوده و نمی‌توان این ژن‌ها را حذف نمود. در این گونه موارد باید در ابتدا تجزیه و تحلیل کاملی از شبکه‌های متابولیک صورت گرفته و براین اساس راه حل کاهش تشکیل محصولات جانبی ارائه شود.

1. Heterologous Genes
2. Gene Shuffling
3. Flocculation

## ۵- کاربردهای عملی

در این قسمت، مثال‌هایی از موارد عملی استفاده از روش‌های مهندسی متابولیک با هدف تولید تجاری فراورده‌های شیمیایی ارائه می‌شود.

### ۵-۱ زیست‌اتانول

در حال حاضر مهم‌ترین محصول به دست آمده از زیست فناوری صنعتی، چه از نظر حجم تولید و چه از نظر ارزش اقتصادی، زیست‌اتانول می‌باشد و با توجه به تقاضای رو به گسترش برای انرژی‌های تجدیدپذیر، پیش‌بینی می‌شود زیست‌اتانول در سال‌های آینده نیز در صدر محصولات زیست فناوری صنعتی قرار گیرد.

اگرچه انواع سویه‌های میکروبی برای تولید زیست‌اتانول مورد استفاده قرار می‌گیرند، مخمر ساکارومایسس سروسیه به دلیل مزایای زیادی که دارد، متداول‌ترین سویه‌ی مورد استفاده برای این منظور می‌باشد. مدل‌های متابولیک برای بهینه‌سازی تولید زیست‌اتانول در مخمر ساکارومایسس سروسیه مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در یک تحقیق، با استفاده از یک مدل متابولیک ساده، حذف ژن کدکننده‌ی گلوتامات دهیدروژناز وابسته به NADPH و بیش‌بیان[4] ژن کدکننده‌ی گلوتامات دهیدروژناز وابسته به NADH به عنوان اهداف ژنی برای افزایش تولید اتانول در این مخمر مشخص شدند و انجام این تغییرات علاوه بر افزایش تولید اتانول منجر به کاهش ۴۰ درصدی تولید گلیسرول به عنوان محصول جانبی گردید [۱۶]. در مطالعه دیگری با استفاده از یک مدل متابولیک در مقیاس ژنوم[5] بیان ژن گلیسرآلدئید دهیدروژناز تشکیل دهنده NADPH به عنوان یک هدف جدید برای افزایش تولید اتانول تعیین گردید و این تغییر منجر به افزایش تولید اتانول و کاهش تولید گلیسرول گردید [۱۷].

با توجه به میزان بسیار زیاد ضایعات لیگنوسلولزی در دنیا، تولید زیست‌اتانول با استفاده از این ضایعات اهمیت بسیار زیادی دارد. قند زایلوز مهم‌ترین قند پنج کربنه در ضایعات لیگنوسلولزی است و پس از گلوکز دومین مونوساکارید فراوان در طبیعت می‌باشد. برخلاف قندهای شش کربنه، مخمر ساکارومایسس سروسیه قادر به مصرف موثر قندهای پنج کربنه نیست و بنابراین روش‌های مهندسی

4. Overexpression
5. Genome-Scale Metabolic Model

متابولیک برای افزایش توان این مخمر در مصرف قندهای پنج کربنه مورد استفاده قرار گرفته است. بیان ژن‌های کدکننده زایلوز ردوکتاز و زایلیتول دهیدروژناز از مخمر پیکیا استیپیتیس[1] منجر به مصرف زایلوز توسط مخمر ساکارومایسس سروسیه گردید و بیش‌بیان ژن کدکننده زایلولوکیناز نیز این توانایی را تا حد زیادی افزایش داد. با این حال هنوز توانایی ساکارومایسس سروسیه برای مصرف زایلوز به دلیل عدم توازن کوفاکتورهای اکسید و احیا در حدکافی نیست. بنابراین در تحقیق دیگری، حذف ژن کدکننده‌ی گلوتامات دهیدروژناز وابسته به NADPH و بیش‌بیان ژن کدکننده‌ی گلوتامات دهیدروژناز وابسته به NADH منجر به افزایش ۱۶ درصدی تولید اتانول و کاهش ۴۴ درصدی تولید زایلیتول گردید [۱۸].

### ۵-۲ پروپان دی‌ال

۱و۳-(پروپان دی‌ال) به عنوان یک ماده‌ی واسط در تولید بسیاری از پلیمرها، از اهمیت زیادی برخوردار است. تولید پروپان دی‌ال با استفاده از روش‌های سنتز شیمیایی صورت می‌گرفته است ولی در سال‌های اخیر شرکت دوپونت[2] با سرمایه‌گذاری زیادی که انجام داد توانست تولید زیست‌شناختی پروپان دی‌ال را با استفاده از باکتری اشریشیا کولی در مقیاس صنعتی به انجام رساند. باکتری اشریشیا کولی مهندسی شده‌ی فوق، ابتدا گلوکز را به دی‌هیدروکسی استن فسفات و سپس به گلیسرول و در نهایت به پروپان دی‌ال تبدیل می‌کند. واحد صنعتی تولید کننده‌ی پروپان دی‌ال توسط سویه‌ی فوق و با استفاده از گلوکز به دست آمده از ذرت به عنوان ماده اولیه در سال ۲۰۰۶ میلادی تکمیل شد و از ماه نوامبر سال ۲۰۰۶ تولید خود را آغاز نمود و این واحد قادر به تولید ۴۵ میلیون کیلوگرم پروپان دی‌ال در سال می‌باشد. با استفاده از پروپان دی‌ال تولید شده، شرکت دوپونت، کوپلیمری متشکل از پروپان دی‌ال و ترفتالیک اسید یا دی‌متیل ترفتالات با نام تجاری سورونا[3] به بازار عرضه نموده است. ارزیابی‌های انجام شده نشان می‌دهد که تولید پلیمر سورونا در مقایسه با تولید پلیمر نایلون ۶ منجر به کاهش ۳۰ درصدی مصرف انرژی و نیز کاهش ۶۳ درصدی انتشار گازهای گلخانه‌ای می‌شود [۹].

پروپان دی‌ال از قدیمی‌ترین محصولات تخمیری می‌باشد که برای اولین بار توسط آگوست فروند[4] در کشت مخلوط کلستریدیوم پاستوریانوم[5] مشاهده شد. در میکروارگانیسم‌هایی که به طور طبیعی پروپان دی‌ال تولید می‌کنند، تشکیل پروپان دی‌ال نتیجه‌ی تخمیر بی‌هوازی گلیسرول است. به خاطر مزایای زیاد گلوکز نسبت به گلیسرول به عنوان ماده‌ی اولیه برای تولید پروپان دی‌ال، دستکاری‌های ژنتیکی متعددی بر روی باکتری اشریشیا کولی صورت گرفت تا این باکتری در نهایت قادر به تولید ۱۳۵ گرم در لیتر پروپان دی‌ال با بازده ۰/۵۱ گرم پروپان دی‌ال به ازاء هر گرم گلوکز مصرف شده گردید. انجام این دستکاری‌های ژنتیکی علاوه بر سرمایه‌گذاری فراوان به ۱۰ سال زمان نیاز داشت. اهمیت این دستاورد به حدی بود که انجمن شیمی آمریکا به تیم تحقیقاتی این پروژه جایزه قهرمانان شیمی[6] در سال ۲۰۰۷ را اهدا نمود.

### ۵-۳ ترپنوئیدها

ترپنوئیدها دسته‌ی بزرگی از متابولیت‌های طبیعی را تشکیل می‌دهند و تا کنون بیش از ۴۰۰۰۰ ترکیب از این خانواده شناسایی شده است [۱۹]. با وجود گستردگی و تنوع فراوان، پیش‌ساز زیست‌شناختی تمام ترپنوئیدها یک ترکیب پنج کربنه به نام ایزوپنتنیل دی‌فسفات (IPP) می‌باشد. ترپنوئیدها در فرایندهای مختلف سلولی از جمله فتوسنتز، تنفس، تنظیم هورمونی متابولیسم، تنظیم رشد، دفاع علیه عوامل بیماری‌زا، انتقال مولکول‌ها داخل سلول و نیز در ساختار غشا دخیل هستند. بسیاری از ترپنوئیدها نیز به عنوان ترکیبات دارویی، افزودنی غذایی، ترکیبات معطر و طعم دهنده اهمیت تجاری پیدا کرده‌اند که به عنوان مثال می‌توان به داروی تاکسول[7] به عنوان یکی از موثرترین داروهای ضدسرطان اشاره نمود. با وجود اینکه ترپنوئیدها دارای کاربردهای وسیع تجاری هستند، تاکنون تولید انبوه تعداد محدودی از ترپنوئیدها امکان‌پذیر شده است. به دلیل وفور ترپنوئیدها در بافت‌های گیاهی، استخراج این ترکیبات از گیاهان همواره به عنوان اولین گزینه برای تولید مطرح بوده است ولی عوامل متعدد از جمله غلظت پایین، وجود ناخالصی‌های فراوان، هزینه‌های بالای جداسازی و خالص‌سازی، تغییر ترکیب بسته به گونه‌ی گیاهی و شرایط جغرافیایی و آب و

1. *Pichia stipitis*
2. DuPont
3. Sorona

4. August Freund
5. *Clostridium pasteurianum*
6. Heroes of Chemistry Award
7. Taxol

هوایی تا کنون مانع از کاربرد گسترده‌ی این روش شده است. تولید ترپنوئیدها به روش سنتز شیمیایی نیز به دلیل پیچیدگی ساختار، تولید محصولات جانبی، تعداد زیاد مراحل و بازده پایین، هنوز به عنوان یک گزینه برای تولید صنعتی، جز در موارد محدودی، مطرح نیست.

بنابراین در سال‌های اخیر تولید ترپنوئیدها با استفاده از میکروارگانیسم‌ها به عنوان یک گزینه‌ی جدید اقتصادی و سازگار با محیط زیست توجه دانشمندان و گروه‌های تحقیقاتی را به خود جلب نموده است. با وجود شناسایی تعدادی از میکروارگانیسم‌ها که به طور طبیعی قادر به تولید ترپنوئیدها هستند، به دلیل مشکل بودن دستکاری‌های ژنتیکی در این میکروارگانیسم‌ها، دانشمندان تولید غیرهمگن ترپنوئیدها در سلول‌های میکروبی شناخته شده را ترجیح می‌دهند. در این میان، باکتری اشریشیا کولی و مخمر ساکارومایسس سرویسیه به دلایل متعدد از جمله مشخص بودن توالی ژنوم و شناخته شدن وظیفه‌ی بسیاری از ژن‌ها، وجود تجربه‌ی کار صنعتی با این دو میکروارگانیسم، در دسترس بودن اطلاعات فراوان در مورد خصوصیات فیزیولوژیک و رفتار این ارگانیسم‌ها در زیست‌راکتورهای صنعتی و نیز در دسترس بودن فنون و ابزار دستکاری‌های ژنتیک بیشتر از بقیه مورد توجه قرار گرفته‌اند و تعداد زیادی از ترپنوئیدها به صورت غیرهمگن در این دو میکرارگانیسم تولید شده‌اند [۲۵-۲۰].

داروی ضد مالاریای آرتمیسینین[1] یکی از ترکیبات خانواده‌ی ترپنوئیدها می‌باشد ولی به علت قیمت نسبتاً بالا، امکان تهیه‌ی آن برای اکثر مبتلایان به این بیماری که ساکن کشورهای فقیر آفریقایی می‌باشند، وجود ندارد. در سال ۲۰۰۴، بنیاد بیل و ملیندا گیتس[2] قراردادی به ارزش ۴۲/۵ میلیون دلار به منظور تولید میکروبی این دارو و کاهش قیمت آن از ۲/۴ دلار به ازاء هر دوز به ۰/۲۵ دلار با شرکت آمیریس بیوتکنولوجیس[3] و آزمایشگاه پروفسور جی کیسلینگ[4] در دانشگاه کالیفرنیا، برکلی منعقد نمود. این گروه، عمده‌ی تحقیقات خود را بر روی باکتری اشریشیا کولی متمرکز نمود و یک روش دومرحله‌ای یعنی تولید میکروبی آمورفادین[5] (پیش‌ساز داروی آرتمیسینین) و سپس تبدیل آن به آرتمیسینین با استفاده از روش سنتز شیمیایی را پیشنهاد نمود. این گروه ابتدا با بیان ژن آمورفادین سنتاز توانست ترکیب آمورفادین را در باکتری اشریشیا کولی با غلظت پایین تولید کند. در مرحله‌ی بعد استفاده از ژن آمورفادین سنتاز با کدون بهینه شده[6] میزان تولید را بین ۱۰ تا ۳۰۰ برابر افزایش داد. بیش‌بیان ژن های کنترل کننده‌ی سرعت در مسیر زیست‌شیمیایی MEP (دخیل در سنتز پیش‌ساز ترپنوئیدها در باکتری اشریشیا کولی) میزان تولید را به میزان ۳/۶ برابر بهبود بخشید. سپس این گروه در یک کار ابتکاری با وارد نمودن کلیه‌ی ژن‌های مسیر MVA (دخیل در سنتز پیش‌ساز ترپنوئیدها در مخمر) از مخمر ساکارومایسس سرویسیه در باکتری اشریشیا کولی یک باکتری حاوی دو مسیر زیست‌شیمیایی مختلف برای سنتز پیش‌ساز ترپنوئیدها به وجود آورد و بدین ترتیب میزان تولید را ۱۰ برابر دیگر افزایش داد [۲۳]. استفاده از این باکتری در یک زیست‌راکتور غیرمداوم خوراک‌دهی شده[7] منجر به تولید حدود ۰/۵ گرم در لیتر آمورفادین گردید [۲۵].

مدل‌های متابولیک در مقیاس ژنوم، به منظور یافتن اهداف ژنی جدید نیز تا کنون با موفقیت برای افزایش تولید لیکوپن[8] [۲۶] و کیوببول[9] [۲۰] مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

## ۶- نتیجه‌گیری

رشد سریع صنایع شیمیایی و توسعه‌ی فرایندهای شیمیایی برای تولید انواع محصولات و فراورده‌ها در قرن بیستم و به خصوص پس از جنگ جهانی دوم، علم شیمی را به عنوان علمی که قادر به حل طیف وسیعی از مشکلات بشری است، مطرح ساخت. در دوران اوج شکوفایی صنایع شیمیایی، کمتر کسی قادر بود مشکلات به وجود آمده توسط این بخش از صنعت را در دهه‌های بعد پیش‌بینی نماید. با گذشت زمان، انواع مشکلات به وجود آمده توسط صنایع شیمیایی از جمله آلودگی‌های شدید زیست محیطی، مصرف سریع منابع فسیلی، افزایش میزان گازهای گلخانه‌ای و تغییرات اقلیمی آشکار شد. این مشکلات هر یک به تنهایی می‌تواند حیات بشر را بر روی کره زمین با تهدیدات جدی مواجه نماید. مجموعه‌ی این مشکلات

1. Artemisinin
2. Bill and Melinda Gates Foundation
3. Amyris Biotechnologies
4. Jay Keasling
5. Amorphadiene
6. Codon Optimized
7. Fed-Batch Bioreactor
8. Lycopene
9. Cubebol

باعث ایجاد یک تصویر منفی از علم شیمی و صنایع شیمیایی در ذهن بشر شده است به طوری که حتی تعداد افراد علاقمند به تحصیل در رشته‌های مرتبط به علم شیمی در کشورهای پیشرفته در سال‌های گذشته به نحو چشمگیری کاهش یافته است [۴].

حل مشکلات به وجود آمده توسط صنایع شیمیایی مستلزم اتخاذ سیاست‌ها و رویکرد جدیدی به این بخش از صنعت می‌باشد. این رویکرد جدید تحت عنوان شیمی سبز و پایدار به همراه اصول دوازده‌گانه‌ی آن در دهه‌ی ۱۹۹۰ میلادی مطرح گردید و این اصول در سال‌های اخیر تا حد زیادی مورد پذیرش همگانی قرار گرفته است. از طرفی دستیابی به یک شیمی سبز و پایدار مستلزم همکاری محققین و دانشمندان با تخصص‌های مختلف می‌باشد.

استفاده از میکروارگانیسم‌ها برای تولید فراورده‌های شیمیایی قدمت زیادی دارد و دارای مزایای مختلفی از جمله استفاده از منابع تجدیدپذیر، عدم انتشار گازهای گلخانه‌ای، حداقل تولید ضایعات و حداقل اثرات زیان‌بار محیط زیستی می‌باشد. با وجود اینکه میکروارگانیسم‌ها توانایی تولید طیف وسیعی از محصولات شیمیایی را دارا می‌باشند، تولید صنعتی این فراورده‌ها به روش زیست‌شناختی به دلیل بازدهی پایین و قابل رقابت نبودن با روش‌های سنتز شیمیایی، در بسیاری از موارد امکان‌پذیر نبوده است. از دهه‌ی ۱۹۸۰ میلادی، توسعه‌ی روش‌های مهندسی ژنتیک، امکان دستکاری ژنتیکی میکروارگانیسم‌ها و افزایش بازدهی و نیز تولید محصولات جدید به روش میکروبی را فراهم آورد. در دهه‌ی ۱۹۹۰ میلادی، استفاده‌ی هدفمند از روش‌های مهندسی ژنتیک برای بهبود خصوصیات سویه‌های میکروبی در جهت مورد نظر به عنوان شاخه‌ی جدیدی از زیست فناوری با عنوان مهندسی متابولیک مطرح گردید. مهندسی متابولیک دستکاری هدفمند میکروارگانیسم‌ها را برای بهبود خصوصیات سویه‌های میکروبی به جای استفاده از روش‌های سنتی که اغلب به صورت تصادفی هستند، امکان‌پذیر ساخته است. در دهه‌های اخیر مثال‌های فراوان و موفقیت آمیزی از کاربرد فنون مهندسی متابولیک برای افزایش میزان تولید، انعطاف پذیری بیشتر میکروارگانیسم‌ها نسبت به مصرف سوبستراهای مختلف و شرایط محیطی، تولید محصولات جدید و ... در منابع علمی منتشر شده و تعدادی نیز به مرحله بهره‌برداری تجاری رسیده است. بنابراین انتظار می‌رود در سال‌های آینده، استفاده از فنون و قابلیت‌های مهندسی متابولیک، تولید انبوه بسیاری از محصولات شیمیایی را به روش زیست‌شناختی امکان‌پذیر سازد و بنابراین مهندسی متابولیک به عنوان یک شاخه‌ی علمی نوظهور نقش به سزایی در دستیابی به اهداف شیمی سبز و پایدار ایفا خواهد نمود.

## مراجع


[1] M. Gavrilescu, Y. Chisti, "Biotechnology- A Sustainable Alternative for Chemical Industry", Biotechnol. Adv. 23, 471-499, (2005).

[2] M. Lancaster, "Green Chemistry: An Introductory Text", The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, (2002).

[3] E. Vandamme, C. G. Bienfait, "Industrial Biotechnology and Sustainable Chemistry", Brussels: Royal Belgian Academy Council of Applied Sciences, Belgium, Available at http://www.massey.ac.nz/~ychisti/Ind Biotech.pdf , (2004).

[4] J. Clark, D. Macquarrie, "Handbook of Green Chemistry and Technology", Blackwell Science, Oxford, UK, (2002).

[5] P. T. Anastas, J. C. Warner, "Green Chemistry: Theory and Practice", Oxford University Press, New York, USA, (1998).

[6] M. Doble, A. K. Kruthiventi, "Green Chemistry & Engineering", Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, (2007).

[7]. J.M.Otero, G.Panagiotou, L.Olsson, "Fueling Industrial Biotechnology Growth with Bioethanol", Adv. Biochem. Eng. Biotechnol,, 108, 1-40, (2007).

[8] J.Maury, M.A.Asadollahi, K.Møller, A.Clark, M.Schalk, J.Nielsen, "Microbial Isoprenoid Production: An Example of Green Chemistry through Metabolic Engineering", Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 100, 19-51, (2005).

[9] J.M.Otero, J. Nielsen, "Industrial Systems Biology", Biotechnol. Bioeng. 105, 439-460, (2010).

[10] EuropaBio, "White biotechnology: Gateway to a more sustainable future", EuropaBio, Lyon. Available at http://www.mckinsey.com/clientservice/chemicals/pdf/BioVision_Booklet_final.pdf , Brussels, Belgium, (2003).

[۱۱] شجاع‌الساداتی ع. ، اسداللهی م.ع. ، "بیوتکنولوژی صنعتی"، چاپ دوم، انتشارات دانشگاه تربیت مدرس، (۱۳۸۷).

[12] J.E.Bailey, "Toward a Science of Metabolic Engineering", Science 252, 1668-1675, (1991).

[13] J.Nielsen, "Metabolic Engineering", Appl. Microbiol. Biotechnol, 55, 263-283, (2001).

[14] G. N. Stephanopoulos, A. A. Aristidou, J. Nielsen, "Metabolic Engineering: Principles and Methodologies", Academic Press, San Diego, USA,

(1998).

[15] D.Umeno, A.V.Tobias, F.H. Arnold, "Diversifying Carotenoid Biosynthetic Pathways by Directed Evolution", Microbiol. Mol. Biol. Rev., 69, 51-78, (2005).

[16] T.L.Nissen, M.C.Kielland-Brandt, J.Nielsen, J.Villadsen, "Optimization of Ethanol Production in Saccharomyces cerevisiae by Metabolic Engineering of the Ammonium Assimilation", Metab. Eng., 2, 69-77, (2000).

[17] C. Bro, B. Regenberg, J. Forster, J. Nielsen, "In Silico Aided Metabolic Engineering of Saccharomyces cerevisiae for Improved Bioethanol Production", Metab. Eng., 8, 102-111, (2006).

[18] C.Roca, J.Nielsen, L.Olsson ,"Metabolic Engineering of Ammonium Assimilation in Xylose-Fermenting Saccharomyces cerevisiae Improves Ethanol Production", Appl. Environ. Microbiol., 69, 4732–4736, (2003).

[19]. S. T. Withers, J. D. Keasling, "Biosynthesis and Engineering of Isoprenoid Small Molecules", Appl. Microbiol. Biotechnol., 73, 980-990, (2007).

[20] M. A. Asadollahi, J. Maury, K. R. Patil, M. Schalk, A. Clark, J. Nielsen, "Enhancing Sesquiterpene Production in Saccharomyces cerevisiae through in silico Driven Metabolic Engineering", Metab., Eng. 11, 328-334, (2009).

[21] J. Maury, M. A. Asadollahi, K. Møller, M. Schalk, A. Clark, L. R. Formenti, J. Nielsen, "Reconstruction of a Bacterial Isoprenoid Biosynthetic Pathway in Saccharomyces cerevisiae", FEBS Lett., 582, 4032-4038, (2008).

[22] M. A. Asadollahi, J. Maury, K. Møller, K. F. Nielsen, M. Schalk, A. Clark, J. Nielsen, "Production of Plant Sesquiterpenes in Saccharomyces cerevisiae: Effect of ERG9 Repression on Sesquiterpene Biosynthesis", Biotechnol. Bioeng., 99, 666-677, (2008).

[23] V.J.J.Martin, D.J.Pitera, S.T.Withers, J.D.Newman, J.D. Keasling ,"Engineering a Mevalonate Pathway in Escherichia coli for Production of Terpenoids", Nat. Biotechnol., 21, 796-802, (2003).

[24] M.A.Asadollahi, J.Maury, M.Schalk, A.Clark, J.Nielsen, "Enhancement of farnesyl diphosphate pool as direct precursor of sesquiterpenes through metabolic engineering of the mevalonate pathway in Saccharomyces cerevisiae", Biotechnol. Bioeng., 106, 86-96, (2010).

[25] J.D.Newman, J.Marshall, M.Chang, F.Nowroozi, E.Paradise, D.Pitera, K.L. Newman, J.D. Keasling, "High-Level Production of Amorpha-4,11-diene in a Two-Phase Partitioning Bioreactor of Metabolically Engineered Escherichia coli", Biotechnol. Bioeng., 95, 684-691, (2006).

[26] H.Alper, K. Miyaoku, G. Stephanopoulos, "Construction of Lycopene-Overproducing E. coli Strains by Combining Systematic and Combinatorial Gene Knockout Targets", Nat. Biotechnol., 23, 612-616, (2005).