

Ernests Tomass Auziņš

Kā raugs uzvedas, kad tam atņem būvelementus?

How does brewer's yeast behave when lacking essential building blocks?

Abstract

The study explored changes in carbon fluxes in the central metabolism of brewer's yeast in the absence of building blocks such as adenine or nitrogen. These flows provide insight into changes in the central metabolism of brewer's yeast. It was found that in the absence of a building block, the yeast mainly uses fermentation for growth, producing ethanol. Deletion of *Δade1* in purine *de novo* synthesis reduces ethanol production, and decreased glycerol production in adenine starvation indicates a slowing of central metabolism.

Keywords: purine auxotrophy, bioreactors, central carbon metabolism, *Saccharomyces cerevisiae*.

Ievads

Purīni ir ķīmiski savienojumi, kuri nepieciešami DNS nukleotīdu un citu organismam būtisku molekulu veidošanai. Parasti šos savienojumus gandrīz visi eikarioti spēj veidot paši. Purīnu auktrofija ir organisma nespēja *de novo* veidot purīnus kāda sintēzes ceļa soļa vai pat visa ceļa trūkuma dēļ. Vairākiem parazitiskiem vienšūņiem piemīt purīnu auktrofija, no kuriem spilgtākie piemēri ir toksoplazma un malārijas plazmodijs. Purīnu auktrofija var parādīties arī vēža šūnās pēc ārstniecības ar purīnu sintēzes ceļa antimetabolītiem. Tā kā šajā darbā tiek novērota purīnu

badināšanas ietekme uz rauga purīnu *de novo* sintēzes ceļa auktrotrofiem, svarīgi zināt, ka lielākoties aminoskābju vai citu metabolītu trūkums auktrotrofiem celmiem būtiski samazina to izdzīvotības spējas, savukārt tādu organogēno elementu kā slāpeklis, ogleklis vai fosfāti trūkums palēnina šūnu augšanu, bet to izdzīvotība būtiski nemainās [Petti et al. 2011]. Tas skaidrojams ar to, ka pastāv regulācijas mehānismi, kas samazina oksidatīvo stresu šūnās organogēno elementu jeb “dabisku” barības vielu trūkuma gadījumos. Tomēr starp aminoskābju auktrotrofiem var atrast izņēmuma gadījumus, kuros šūnas kļūst izturīgas pret stresu un uzvedas līdzīgi kā organogēnu elementu trūkuma gadījumos, piemēram, metionīns [Petti et al. 2011] vai adenīns [Kokina et al. 2019].

Maizes raugs ir nozīmīgs organisms, ko izmanto, piemēram, vēža pētniecībā, pārbaudot pretvēža medikamentu iedarbību vai ģenētiskos faktorus vēža šūnu attīstībā [Matuo et al. 2012]. Izmaiņas maizes rauga auktrotrofu metabolismā vidē ar purīniem un bez tiem sniegtu ieskatu par to stresa izturības fizioloģiju, kā arī iegūtos rezultātus varētu izmantot, lai modelētu viensīņu patogēnu un vēža audzēju auktrotrofu fizioloģiju.

1. Literatūras apskats

1.1. Maizes raugs kā metabolisma modeļorganisms

Maizes raugs ir eikariots – ar membrānu apņemtu kodolu saturošs organisms. Tas ir piemērots eikariotisku šūnu bioloģisku procesu pētīšanai, jo tas ir viegli, ātri un lēti kultivējams, tam ir labi izpētīta ģenētiskā sistēma un tam ir ērti veikt dezoksiribonukleīnskābes (DNS) transformācijas ar plazmīdu vai homologās rekombinācijas metožu palīdzību [Sherman 1997]. Jau drīz pēc visa maizes rauga genoma sekvenēšanas tika atklāts, ka teju 31% no visiem potenciālajiem proteīnu kodējošiem gēniem ir homologi zīdītāju proteīniem. Pārsteidzošs atklājums bija gēni, kas homologi dažādiem nozīmīgiem vēža audzēju attīstības gēniem: *RAS1* un *RAS2*, *MSH2* un *MLH1*, kā arī *SGS1* [Botstein et al. 1997]. Maizes raugu iespējams pielīdzināt vēža audzēju fizioloģijai, veicot ģenētiskas modifikācijas, piemēram, delēcijas DNS reparācijas ceļos, kas ir konservatīvas starp rauga un zīdītāju šūnām [Matuo et al. 2012].

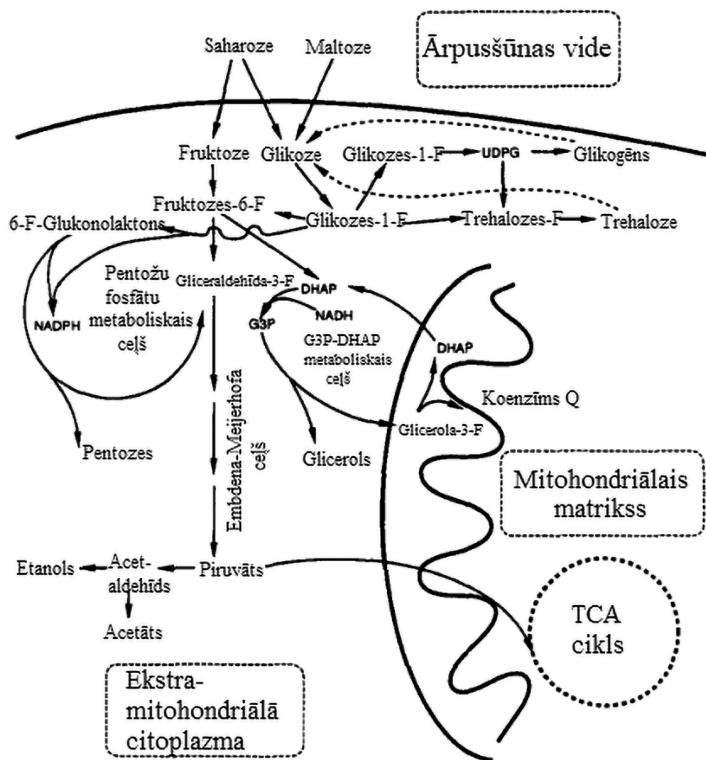
Raugu izmanto ne tikai konkrētu gēnu, bet arī metabolisma ceļu pētījumiem. Jau pirms 30 gadiem tika izveidots maizes rauga celms ar modificētu metabolismu, kurš spēja efektīvāk šķelt maltozi. Šāds raugs tika veidots, lai samazinātu maizes mīklas uzbriešanas laiku [Hodgson 1990]. Mūsdienās tiek pārbaudītas iespējas raugu izmantot gēnu inženierijā. Ir iespējams izslēgt adenīna *de novo* sintēzi raugā un to pilnībā aizvietot ar cilvēka ortologiem proteīniem [Agmon et al. 2020]. Minētajā pētījumā raugam tika izdzēsti 10 adenīna *de novo* sintēzes gēni un tie tika aizvietoti ar 7 cilvēka gēniem. Jaunizveidotais raugs bija spējīgs augt vidē, kas nesatur adenīnu. Rezultāti norāda, ka ir iespējams aizvietot raugu metaboliskos ceļus ar citu organismu metaboliskajiem ceļiem pat gadījumos, ja tie sastāv no atšķirīgiem proteīniem. Tas sniedz plašas iespējas pārbaudīt dažādu medicīnisku preparātu iedarbību uz, piemēram, malārijas plazmodija vai karcinomas metabolismu, neizmantojot pašus slimību izraisošos organismus [Kokina et al. 2019].

1.2. Maizes rauga centrālais oglekļa metabolisms

Maizes raugs izmanto glikozi par galveno oglekļa avotu. Ar centrālo oglekļa metabolismu tiek domāts reakciju un savienojumu kopums, kurā maizes raugs rada respirācijai un fermentācijai nepieciešamos savienojumus, kas nodrošina šūnu ar enerģiju, kā arī pentožu vai aminoskābju prekursorus, kas nepieciešami augšanai. Galvenie šajā rakstā aplūkoti metaboliskie ceļi ir glikolīze, pentožu fosfātu metaboliskais ceļš, gliceraldehīda-3-fosfāta un dihidroksiacetona (G3P-DHAP) metaboliskais ceļš, kā arī etanola fermentācija, kuru savstarpējā saistība ilustratīvi parādīta 1. attēlā.

Pirmais etaps glikozes metabolismā ir glikolīze, kurā norisinās glikozes šķelšana līdz piruvātam, radot starpsavienojumus, kurus var izmantot glicerīna vai pentožu veidošanā.

Etanola izejviela ir glikolīzes produkts – piruvāts. Aerobos apstākļos piruvāta dehidrogenāze pievieno divus piruvāta oglekļa atomus koenzīmam A (KoA), radot acetil-KoA un reakcijā atbrīvojot CO₂. Acetil-KoA ir galvenais substrāts trikarbonskābju cikla (Krebsa cikla) starpmetabolītu reģenerēšanai. Anaerobos apstākļos piruvāta pārveidošana etanolā norisinās divos soļos: piruvāta dekarboksilāze divus piruvāta oglekļa atomus



1. att. **Glikozes utilizēšanas ceļi. Attēlā veiktas izmaiņas [Wills 1990]**

pārveido par acetaldehīdu, atbrīvojot CO_2 , pēc tam alkohola dehidrogenāzes izoenzīms I pārveido acetaldehīdu par etanolu [Wills 1990]. Rezultātā anaerobās fermentācijas apstākļos maizes raugs ražo ekvivalentos molāros daudzumos etanolu un CO_2 .

Anaerobos apstākļos acetaldehīds vēl var tikt pārveidots acetātā jeb etiķskābē, ko katalizē enzīms acetaldehīda dehidrogenāze. Acetil-KoA sintēze pēc tam var izmantot acetātu, lai aerobos apstākļos veidotu acetil-KoA [Rodrigues et al. 2006], iegūstot enerģiju caur Krebsa ciklu.

Atkarībā no skābekļa un fermentējamo ogļhidrātu pieejamības maizes raugs spēj strauji pāriet no oksidatīva metabolisma uz fermentatīvu ogļhidrātu metabolismu, un otrādi [Brink et al. 2008]. Fermentatīvā metabolisma galaprodukts ir etanols. Maizes raugs var veikt alkohola

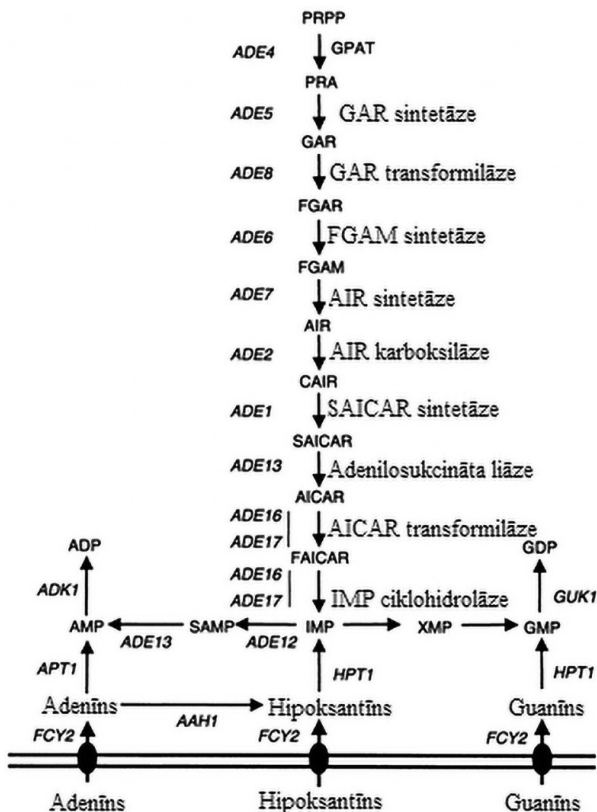
fermentāciju arī skābekļa klātbūtnē, kas gan nav universāla īpašība visām raugu sugām. Šo fenomenu dēvē par *Crabtree* efektu, un izšķir gan *Crabtree* pozitīvus raugus, kas skābekļa klātbūtnē spēj fermentēt ogļhidrātus par etanolu, gan arī *Crabtree* negatīvus raugus, kas to nespēj [Rodrigues et al. 2006].

Glicerīna avots raugā ir G3P-DHAP metaboliskais ceļš [Wills 1990]. Tas ir svarīgs metabolīts reducēšanās-oksidēšanās balansa uzturēšanā. Rauga biomasa ir oksidētāka nekā tā galvenais barības avots – glikoze –, kas liecina par reducējošo ekvivalentu (nikotīnamīda adenīndinukleotīdu NADH vai NADPH) pārprodukciju. Maizes raugs spēj oksidēt NADH divos galvenos veidos – izmantojot mitohondriju ārpusē lokalizēto NADH dehidrogenāzi vai G3P-DHAP metabolisko ceļu. Aerobās respirācijas gadījumā tas izmanto abus šos metaboliskos ceļus, bet anaerobi iespējams izmantot tikai G3P-DHAP, jo NADH dehidrogenāze ir savienota ar elektronu transporta ķēdi mitohondrijos. Tā kā raugs galvenokārt aug fermentatīvi, tas liekos reducējošos ekvivalentus izmanto glicerīna veidošanā [Rodrigues et al. 2006]. Otrs reducējošais ekvivalents NADPH rodas pentožu-fosfātu metaboliskajā ceļā. Atšķirībā no citiem raugiem, *S. cerevisiae* NADPH oksidācija nav tiešā veidā savienota ar elektronu transportu ķēdi mitohondrijos, kā arī to nav iespējams pārveidot NADH transhidrogenāzes trūkuma dēļ. Šim raugam atliek NADPH izmantot asimilējošās reakcijās [Rodrigues et al. 2006].

1.3. Purīnu *de novo* biosintēze

Purīni ir heterocikliski slāpekli saturoši savienojumi, kuri ietilpst DNS vai RNS nukleotīdu sastāvā. Pie purīniem pieder tādas slāpekļa bāzes kā adenīns un guanīns. Purīnu *de novo* sintēzes izejviela ir fosforibozil-pirofosfāts (PRPP), kurš ir pentožu-fosfātu metaboliskā ceļa produkts [Rodrigues et al. 2006]. To sintēzes ceļš ir diezgan lineārs (sk. 2. att.), kas liek domāt, ka sekas ADE gēnu delēcijām būtu kumulatīvas, tās veicot tālākā sintēzes posmā.

Pastāv divi veidi, kā organismi var iegūt brīvi lietojamus purīnus – esošo purīnu pārstrāde (angl. *salvage pathway*) un *de novo* sintēze. Purīnus var uzņemt no ārējās vides vai arī degradējot šūnas citoplazmā esošo RNS. Sintēze norisinās, PRPP secīgi pievienojot oglekļa un slāpekļa



2. att. **Shematisks purīna metabolisma attēlojums *S. cerevisiae*.**
Attēlā veiktas izmaiņas [Rébora et al. 2001]

atomus no aminoskābēm – glutamīna un asparagīnskābes, kā arī formiāta un CO₂. Kopīgās izmaksas šūnai, veidojot vienu nukleotīdu, ir ap 50 adenozintrifosfāta (ATP) molekulu, ieskaitot arī visu starpsavienojumu veidošanu, kas purīnu *de novo* sintēzi padara par resursu ietilpīgu procesu [Kokina et al. 2019].

2. Materiāli un metodes

2.1. Celmi un kultivēšanas apstākļi

Pētījumā tika salīdzināti divi maizes rauga CEN.PK 113-7D purīnu *de novo* sintēzes auksotrofi, kuriem katram tika izslēgts viens no *ADE* gēniem (*ADE6* un *ADE1*). Šie celmi tiek salīdzināti ar maizes rauga prototrofu – celmu, kas spēj sintezēt adenīnu. Celmi tika audzēti bioreaktoros ar gaisa plūsmas ātrumu 1,0 L/L, barotnes tilpumu 0,3 L, maisīšanas ātrumu 300 rpm, kultivēšanas temperatūru 30 °C. Kultivēšanai tika izmantota SD (angl. *Synthetic dextrose*) barotne ar 2% glikozi kā vienīgo oglekļa avotu [Treco & Lundblad 1993]. Katrs celms tika audzēts divās grupās – adenīna saturošās (ade+) un adenīna nesaturošās (ade-) barotnēs. Katra grupa tika audzēta trīs bioloģiskos atkārtojumos (trīs bioreaktoros). Prototrofs tika audzēts barotnē bez slāpekļa avota (N-). Sagaidāms, ka iespējamie vielu zudumi audzēšanas gaitā ir niecīgi, jo izejošais gaiss tika atdzesēts, lai izvairītos no vielu zuduma iztvaikošanas dēļ. Bioreaktoru skaits arī ir ierobežots, tas apgrūtina veikt vairāk atkārtojumu.

2.2. Oglekļa metabolītu mērīšana

Oglekļa metabolītu – etanola, glicerīna, sukcināta un etiķskābes – koncentrācijas tika noteiktas, izmantojot augstspiediena šķidruma hromatogrāfijas metodi HPLC-SEC (angl. *size-exclusion chromatography*). Metodes darbības principa pamatā ir atšķirīgi daļiņu pārvietošanās ātrumi cauri porām to izmēru dēļ. No katra reaktora tika ņemts viens paraugs HPLC-SEC mērījumiem, kas rezultātā veido trīs bioloģiskos mērījumus katrai celmu grupai.

2.3. Aprēķini

Ar spektrofotometru pie viļņa garuma λ_{590} tika izmērīta paraugu optiskā turbiditāte un pārrēķināta biomasā, reizinot ar to biomasu uz OD vienību. Specifiskais augšanas ātrums μ katram celmam tika aprēķināts, nosakot augšanas līknes naturālogaritma slīpumu. Šis koeficients raksturo šūnu dalīšanās ātrumu eksponenciālās augšanas laikā.

Visu metabolītu mērījumi tika pārveidoti mili C molos (mCmol), kas parāda kopējo oglekļa daudzumu milimolos katrā vielā. Vielu daudzums

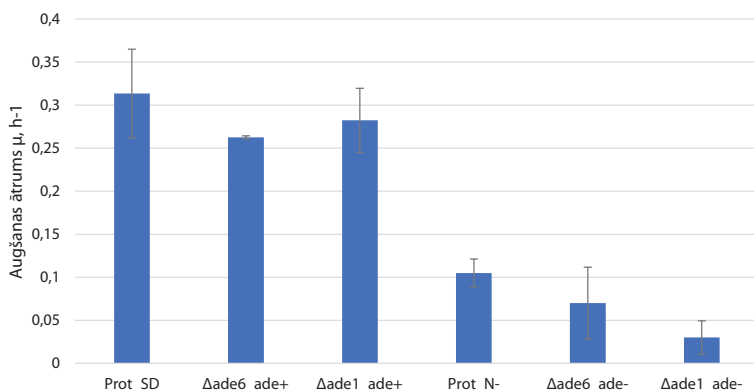
mCmol HPLC mērijumiem tika noteikts, izdalot katras vielas koncentrāciju ar tās molmasu un reizinot ar oglekļa atomu skaitu molekulā. Biomasai pieņem molmasu $26,15 \text{ g mol}^{-1}$ [Wu 2006]. Ogļskābā gāze tika aprēķināta, izdalot izmērīto tilpuma daļu ar miltipumu 20 °C ($V_0 = 24,4 \text{ mol L}^{-1}$).

Izmantojot vielu daudzumus mCmol dažādos laika punktos celmu eksponenciālās augšanas laikā, tika aprēķināts katra metabolīta specifiskais ražošanas vai patēriņa ātrums q ($\text{mCmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

3. Rezultāti un diskusija

3.1. Augšanas ātrumu izmaiņas

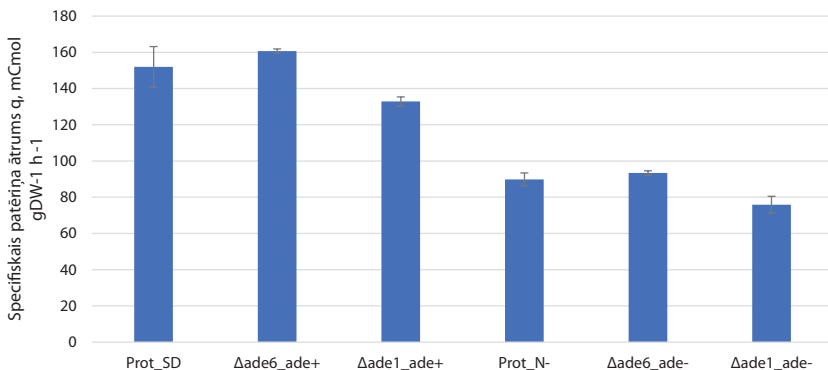
Visiem celmiem tika noteikts augšanas ātrums to eksponenciālās augšanas laikā (sk. 3. att.). Iegūtie rezultāti rāda, ka prototrofa un auktotrofo celmu augšanas ātrumi sakrīt, kad celmiem ir pieejams adenīns. Novērojams, ka adenīna badināts $\Delta ade1$ aug lēnāk nekā slāpekļa badināts prototrofs. Ja auktotrofiem celmiem trūkst adenīna vai prototrofam slāpekļa, tad novērojams 4,2 reizes lēnāks augšanas ātrums.



3. att. **Maizes rauga prototrofa, $\Delta ade6$ un $\Delta ade1$ auktotrofu augšanas ātrumu salīdzinājums. Ar nogriežņiem parādītas standartnovirzes no trim atkārtojumiem**

3.2. Centrālā metabolisma oglekļa dinamika

Visi celmi par vienīgo oglekļa avotu izmantoja glikozi, un katram tika noteikts glikozes patēriņa ātrums (sk. 4. att.).



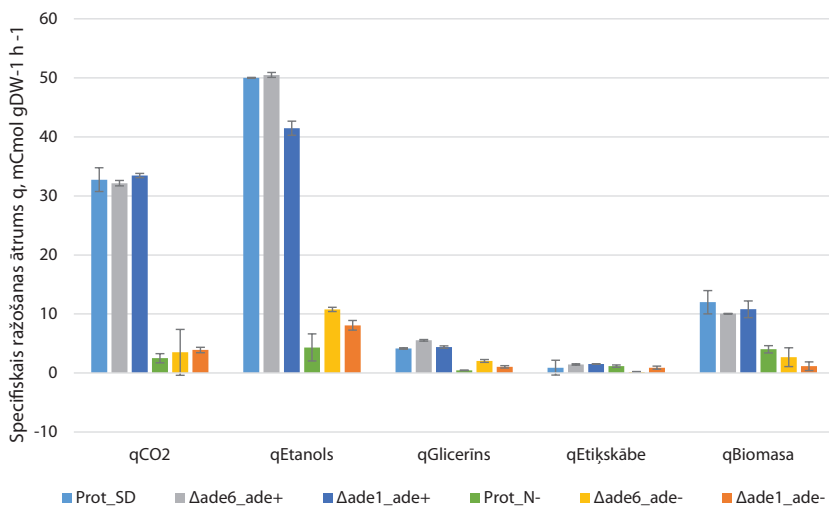
4. att. **Specifiskais glikozes patēriņa ātrums mCmol, normējot uz sauso svaru biomasas stundā. Ar nogriežņiem norādītas standartnovirzes, kas noteiktas no trim bioloģiskajiem atkārtojumiem**

Lai raksturotu centrālā oglekļa metabolisma funkcionēšanu, raugus kultivējot pilnajā barotnē un barotnē bez adenīna, tika noteikti centrālā oglekļa metabolisma galveno produktu specifiskie ražošanas ātrumi (sk. 5. att.). Tika novērots, ka visiem adenīna badinātiem celmiem samazinās metabolītu ražošanas ātrumi un slāpekļa badinātais prototrofs uzvedas līdzīgi kā adenīna badinātie celmi.

Ogļskābās gāzes ražošana celmos, kas audzēti barotnē ar adenīnu, pārsniedz vērtību, kāda būtu sagaidāma anaerobās fermentācijas apstākļos (sagaidāmais specifiskais CO₂ ražošanas ātrums ir puse no etanola ražošanas ātruma). Tas norāda, ka bez etanola ražošanas, raugam fermentējot, ir vēl citi CO₂ avoti, piemēram, aerobā elpošana. Adenīna badinātajiem celmiem ogļskābās gāzes ražošana atbilst aptuveni pusei no etanola ražošanas ātruma. Tātad, neskatoties uz to, ka šūnām tika pievadīts skābeklis (aerācija ar gaisu), fermentācija ir galvenais vielmaiņas ceļš enerģijas ieguvei. Adenīna badinātajiem celmiem ogļskābās gāzes

ražošana samazinās 9,9 reizes, salīdzinot ar auksotrofiem, kuriem pievienots adenīns.

Etanols ir galvenais produkts, ko raugs ražo no tam pieejamiem ogļhidrātiem. Saražotais daudzums prototrofam un auksotrofiem ar pieejamu adenīnu atbilst aptuveni 32% no pievienotās glikozes, savukārt adenīna badinātajiem celmiem tas atbilst aptuveni 9% no glikozes. Novērojams, ka $\Delta ade1$ celms ražo par $8,8 \text{ mCmol gDW}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (DW – *dry weight*) mazāk etanola nekā prototrofs vai $\Delta ade6$ adenīna saturošā barotnē.



5. att. **Centrālā oglekļa metabolisma metabolītu ražošanas ātrumi mCmol uz sausā svara biomasas stundā. Ar nogriežņiem norādītas standartnovirzes, kas noteiktas no trim bioloģiskajiem atkārtojumiem**

Adenīna auksotrofiem celmiem samazinās glicerīna ražošana adenīna trūkuma gadījumā. 3,4% no patērētās glikozes pilnajā barotnē tiek izmantoti glicerīna ražošanai, bet adenīna badošanās gadījumā tie ir 1,8%. Prototrofam slāpekļa trūkuma gadījumā šīs vērtības samazinās no 2,7% līdz 0,5%. Glicerīna ražošana norāda uz vajadzību šūnai oksidēt NADH par NAD⁺. Aerobos apstākļos NADH tiek oksidēts elektronu transporta ķēdē mitohondrijā, savukārt gan aerobos, gan anaerobos apstākļos NADH

tiek oksidēts par NAD⁺ G3P-DHAP metaboliskajā ceļā. Tā kā adenīna trūkuma gadījumā samazinās glicerīna ražošana, bet ne tik ļoti kā slāpekļa trūkuma gadījumā, var secināt, ka nepieciešamība oksidēt citoplazmas NADH adenīna badināšanas gadījumā nav tik spiedīga kā pilnajā barotnē. Etiķskābes ražošana norādītu uz tādām asimilācijas reakcijām kā lipīdu biosintēze, jo to izmanto acetil-KoA ražošanai šūnas citoplazmā. Celmos tika noteikta etiķskābes klātbūtne, tomēr izmērītie daudzumi ir niecīgi un tuvu HPLC-SEC jutības apakšējai robežai.

Asimilācijas reakcijās nonākušais ogleklis nokļūst biomasā, kas veido vidēji 7,4% no patērētās glikozes adenīna barotnēs augušajiem celmiem un 3,0% adenīna badinātajiem celmiem.

Kopumā var secināt, ka abiem celmiem, kuriem ir traucēta adenīna biosintēze, vidē bez adenīna notiek strauja vielmaiņas bremsēšana – samazinās augšanas ātrums un uzņemta oglekļa daudzums, kas kopumā atgādina rauga reakciju situācijā, kad pietrūkst slāpekļa avota. Interesanti, ka adenīna trūkuma dēļ raugs enerģiju pilnībā iegūst fermentatīvi – notiek *Crabtree* efekta pastiprināšanās.

Secinājumi

Spriežot pēc izmaiņām ogļskābās gāzes, etanola, glicerīna un biomasas ražošanas ātrumos, adenīna badināti maizes rauga purīnu *de novo* sintēzes ceļa auksotrofi uzvedas līdzīgi kā slāpekļa badināts maizes rauga prototrofs.

Tā kā adenīna badinātajiem auksotrofiem ogļskābās gāzes ražošanas ātrums atbilst pusei no etanola ražošanas, būvelementu trūkuma gadījumā raugs izmanto substrāta fermentāciju par galveno enerģijas ieguves veidu.

Δade1 mutācija ietekmē etanola ražošanu, jo adenīna saturošā barotnē šis celms ražo par 8,8 mCmo gDW⁻¹ h⁻¹ mazāk etanola nekā prototrofs vai *Δade6*.

Adenīna badināšanas gadījumā auksotrofām šūnām samazinās glicerīna ražošana, bet ne tik ļoti kā slāpekļa trūkuma apstākļos, kas norāda uz centrālā oglekļa metabolisma procesu palēnināšanos, bet ne pilnīgu apstāšanos.

Izmantotā literatūra

1. Agmon, N., Temple, J., Tang, Z., Schraink, T., Baron, M., Chen, J., Mita, P., Martin, J. A., Tu, B. P., Yanai, I., Fenyö, D., Boeke, J. D. (2020). Phylogenetic debugging of a complete human biosynthetic pathway transplanted into yeast. In: *Nucleic Acids Research*, No. 48 (1), pp. 486-499.
2. Botstein, D., Chervitz, S. A., Cherry, J. M. (1997). Yeast as a model organism. In: *Science*, No. 277 (5330), pp. 1259-1260.
3. Brink, J., Canelas, A. B., Gulik, W. M., Pronk, J. T., Heijnen, J. J., Winde, H., Daran-Lapujade, P. (2008). Dynamics of Glycolytic Regulation during Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to Fermentative Metabolism. In: *Applied and Environmental Microbiology*, No. 74 (18), pp. 5710-5723.
4. Hodgson, J. (1990). UK Sweet on Engineered Yeast. In: *Nature Biotechnology*, No. 8, p. 281.
5. Kokina, A., Ozolina, Z. & Liepins, J. (2019). Purine auxotrophy: possible applications beyond genetic marker. In: *Yeast*, No. 36, pp. 649-656.
6. Matuo, R., Sousa, F. G., Soares, D. G., Bonatto, D., Saffi, J., Escargueil, A. E., Larsen, A. K., Henriques, J. A. (2012). *Saccharomyces cerevisiae* as a model system to study the response to anticancer agents. In: *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, No. 70 (4), pp. 491-502.
7. Petti, A., Crutchfield, C., Rabinowitz, J., Botstein, D. (2011). Survival of starving yeast is correlated with Oxidative stress response and nonrespiratory mitochondrial function. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, No. 108 (45), pp. 1089-1098.
8. Rébora, K., Desmoucelles, C., Borne, F., Pinson, B., Daignan-Fornier, B. (2001). Yeast AMP pathway genes respond to adenine through regulated synthesis of a metabolic intermediate. In: *Molecular and cellular biology*, No. 21 (23), pp. 7901-7912.
9. Rodrigues, F., Ludovico, P., Leão, C. (2006). Sugar Metabolism in Yeasts: an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism. In: *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook*. Péter G., Rosa C. (eds.). Berlin, Heidelberg, Springer, pp. 101-121.
10. Sherman, F. (1991). Getting started with yeast. In: *Methods in Enzymology*, No. 194, pp. 3-21.
11. Treco, D. A, and Lundblad, V. (1993). Preparation of Yeast Media. In: *Current Protocols in Molecular Biology*, No. 23 (1), pp. 13.1.1-13.1.7.

12. Wills, C. (1990). Regulation of sugar and ethanol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, No. 25 (4), pp. 245-280.
13. Wu, L., van Dam, J., Schipper, D., Kresnowati, M. T., Proell, A. M., Ras, C., van Winden, W. A., van Gulik, W. M. & Heijnen, J. J. (2006). Short-term metabolome dynamics and carbon, electron, and ATP balances in chemostat-grown *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK 113-7D following a glucose pulse. In: *Applied and Environmental Microbiology*, No. 72 (5), pp. 3566-3577.