

Perspektive i izazovi u industrijskoj biotehnologiji

Lenček, Mariana

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:934217>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski Biotehnologija**

Mariana Lenček
0058216277

Perspektive i izazovi u industrijskoj biotehnologiji

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 2

Mentor: prof. dr. sc. Sunčica Beluhan

Zagreb, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Perspektive i izazovi u industrijskoj biotehnologiji

Mariana Lenčec, 0058216277

Sažetak: Mikrobi su iznimno važni za život na Zemlji. Oni su preci svega života i vodeći su sustav za proučavanje evolucije. Mikrobna biotehnologija je grana biotehnologije koja proučava upotrebu mikrobnih stanica za proizvodnju prirodnih proizvoda i rekombinantnih proteina. Mikroorganizmi su naširoko korišteni kao stanične tvornice za industrijsku proizvodnju proteina, biofarmaceutika, finih kemikalija, hrane i pića, bioinsekticida, biognojiva te biogoriva. Industrijska biotehnologija pobuđuje veliko zanimanje uglavnom zato što je to područje povezano sa smanjenom potrošnjom energije, emisijama stakleničkih plinova i stvaranjem otpada, i može omogućiti promjenu paradigme s fosilnih goriva na proizvodnju kemikalija viših dodanih vrijednosti. Uspješne inovacije biotehnoloških proizvoda ili procesa nikada nisu definirane isključivo tehnologijom i znanošću nego i drugim čimbenicima kao što su javno prihvaćanje, inovativno okruženje i podrška vlasti putem dosljedne politike istraživanja i razvoja.

Ključne riječi: industrijska mikrobiologija, fermentacija, genetičko inženjerstvo, mikroorganizmi

Rad sadrži: 34 stranice, 7 slika, 6 tablica, 48 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Sunčica Beluhan

Datum obrane: 7. rujna 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study of Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology, Malting and Brewing Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Perspectives and challenges in industrial biotechnology

Mariana Lenček, 0058216277

Abstract: Microbes are essential for life on Earth. They are the progenitors of all life and the preeminent system for studying evolution. Microbial biotechnology is the branch of biotechnology that studies the use of microbial cells as factories for producing both natural products and recombinant proteins. Microorganisms have been widely used as cell factories for the industrial production of proteins, biopharmaceuticals, fine chemicals, food and beverage products, bioinsecticides, biofertilizers, and biofuels. Much interest has been generated in industrial biotechnology mainly because this field is associated with reduced energy consumption, greenhouse gas emissions, and waste generation and may enable the paradigm shift from fossil fuel-based to bio-based production of value-added chemicals. Successful innovations of biotechnological products or processes are never solely defined by technology and science but equally by other factors such as acceptance by the general public, the innovation climate, and support by the authorities through a consistent Research and Development policy.

Keywords: industrial biotechnology, fermentation, genetic engineering, microorganisms

Thesis contains: 34 pages, 7 figures, 6 tables, 48 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Sunčica Beluhan, PhD, Full Professor

Thesis defended: September 7, 2022

Sadržaj

1.UVOD	1
2.TEORIJSKI DIO.....	3
2.1..KONCEPTI INDUSTRIJSKE MIKROBIOLOGIJE I BIOTEHNOLOGIJE	3
2.2..IZBOR MIKROORGANIZAMA ZA INDUSTRIJSKU MIKROBIOLOGIJU I BIOTEHNOLOGIJU	3
2.2.1. IZOLACIJA MIKROORGANIZAMA IZ PRIRODE.....	4
2.2.2. GENETIČKA MANIPULACIJA MIKROORGANIZAMA	4
2.2.2.1. MUTACIJA	4
2.2.2.2. FUZIJA PROTOPLASTA	5
2.2.2.3. UGRADNJA KRATKIH DNA SEKVENCI	5
2.2.2.4. PRENOŠENJE GENETIČKE INFORMACIJE IZMEĐU RAZLIČITIH ORGANIZAMA	6
2.2.2.5. MODIFIKACIJA EKSPRESIJE GENA	7
2.2.2.6. PRIRODNO GENETIČKO INŽENJERSTVO	8
2.3..ČUVANJE KULTURA RADNIH MIKROORGANIZAMA	9
2.3.1. PRONALAZAK MIKROORGANIZAMA U PRIRODI.....	11
2.3.2. PRIPREMA HRANJIVIH PODLOGA	11
2.3.3. RAST MIKROORGANIZAMA U INDUSTRIJSKIM UVJETIMA	13
2.3.4. MIKROBNI RAST U SLOŽENOM OKOLIŠU	16
2.3.5. BOKONVERZIJSKI PROCESI.....	16
2.4..GLAVNI PROIZVODI INDUSTRIJSKE MIKROBIOLOGIJE.....	17
2.4.1. ANTIBIOTICI	18
2.4.2. AMINOKISELINE	19
2.4.3. ORGANSKE KISELINE	20
2.4.4. SPECIFIČNI SPOJEVI KOJI SE KORISTE U MEDICINI.....	20

2.5. PRIMJENA BIOTEHNOLOGIJE	22
2.5.1. BIOSENZORI	22
2.5.2. IMUNO METODE (MICROARRAY).....	23
2.5.3. BIOPESTICIDI.....	25
2.5.4. BAKTERIJE	25
2.5.5. VIRUSI.....	26
2.6. UČINCI MIKROBNE BIOTEHNOLOGIJE	26
3.ZAKLJUČCI.....	28
4.POPIS LITERATURE	29

1. UVOD

Mikrobna biotehnologija je grana biotehnologije koja proučava korištenje mikrobnih stanica kao tvornice za proizvodnju prirodnih proizvoda i rekombinantnih proteina, gdje se stanica tvornica odnosi na relevantnost genetike i metabolizma mikroorganizma za proizvodni proces (De Felice i sur., 2008). Mikroorganizmi su naširoko korišteni kao zelene tvornice za industrijsku proizvodnju proteina, biofarmaceutika, finih kemikalija, hrane i proizvoda za piće, bioinsekticida i biognojiva te biogoriva. Mikrobna biotehnologija, međutim, nije novo područje: njezino podrijetlo može se pratiti unatrag do rane čovjekove povijesti i vjerojatno je započelo poljoprivredom. Primjena mikroorganizama - prve fermentacije za proizvodnju piva - može se pratiti do 7000 godina prije Krista u Sumeru i Babilonu. Već se u starom Egiptu sušenje i soljenje koristilo za konzerviranje hrane, alkoholna pića dobivena su fermentacijom slatkih sokova i proizvodio se dizani kruh (Demain, 2010).

Trenutačno treći val biotehnologije, industrijska biotehnologija, snažno se razvija. Industrijska biotehnologija, koja se također naziva bijela biotehnologija, izdvaja se od crvene biotehnologije, usmjerene na područje medicine, plave biotehnologije, koja se bavi istraživanjem slatkovodnih i morskih resursa, i zelene biotehnologije, fokusirane na genetski modificirane usjeve. Industrijska biotehnologija koristi biološke sustave za proizvodnju kemikalija, materijala i energije. Ova tehnologija se uglavnom temelji na biokatalizi (uporaba enzima za kataliziranje kemijskih reakcija) i fermentativnim tehnologijama (usmjereno korištenje mikroorganizama), u kombinaciji s napretkom molekularne genetike, enzimskog inženjerstva i metaboličkog inženjerstva. Nova biotehnologija razvila se u glavni doprinos takozvanoj zelenoj kemiji u kojoj se obnovljivi resursi poput šećera ili biljnih ulja prevode u široku lepezu kemijskih tvari kao što su fine i bazne kemikalije, lijekovi, biobojila, otapala, bioplastika, vitamini, prehrambeni aditivi te biogoriva kao što su bioetanol i biodizel (Demain i sur., 2017). Primjena industrijske ili "bije" biotehnologije nudi značajne ekološke prednosti. Obnovljivi poljoprivredni usjevi su preferirane sirovine, umjesto sve manje dostupnih fosilnih resursa poput sirove nafte i prirodnog plina. Ova tehnologija stoga ima povoljan učinak na emisiju stakleničkih plinova i istovremeno podupire poljoprivredni sektor. Štoviše, industrijska mikrobiologija i biotehnologija često pokazuju značajne prednosti u usporedbi s konvencionalnom kemijskom tehnologijom, kao što je veća brzina reakcije, povećana učinkovitost pretvorbe, poboljšana čistoća proizvoda, smanjena potrošnja energije i značajno

smanjenje proizvedenog kemijskog otpada. Kombinacija ovih čimbenika dovela je do snažnog prodora industrijske mikrobiologije i biotehnologije u sve sektore kemijske industrije, osobito u proizvodnji finih kemikalija, ali jednako tako i za proizvodnju velikih količina kemikalija kao što su plastika i goriva (Soetaert i Vandamme, 2006).

Ovaj razvoj sada uglavnom pokreću zakoni tržišnog gospodarstva, s obzirom na postignutu veću učinkovitost biotehnoških procesa proizvodnje. Očekuje se da će promjene još više ojačati ovaj trend, kao što je iscrpljivanje rezervi sirove nafte, povećana potražnja rastuće svjetske populacije za sirovinama i energijom, zahtjev za održivošću i učinkovitošću u sustavima kemijske proizvodnje i promjenama u poljoprivrednoj politici (Fessner i Turner, 2011). Snažan razvoj industrijske mikrobiologije i biotehnologije je od neposrednog interesa za ekonomski važne industrije: kemijsku i agroindustriju. Iz suradnje ove dvije industrije, mogu se, u obliku biorafinerija na ekološki i održiv način, proizvesti novi proizvodi. Također, industrijska mikrobiologija i biotehnologija mogu značajno doprinijeti budućnosti europske poljoprivrede. Nadalje, potrebni su dodatni napori da se podigne javna svijest o važnosti industrijske mikrobiologije i biotehnologije s obzirom na jasnu vezu između industrijske mikrobiologije i biotehnologije i održivog razvoja našeg društva (Soetaert i Vandamme, 2006).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KONCEPTI INDUSTRIJSKE MIKROBIOLOGIJE I BIOTEHNOLOGIJE

Industrijska mikrobiologija i biotehnologija uključuju korištenje mikroorganizama za postizanje određenih ciljeva, bilo za stvaranje novih proizvoda dodane vrijednosti ili za poboljšanje uvjeta u okolišu. Industrijska mikrobiologija tradicionalno se bavi proizvodima od izravne ekonomske važnosti kao što su farmaceutski i medicinski značajni kemijski spojevi (antibiotici, hormoni, modificirani steroidi), otapala, aminokiseline, organske kiseline i enzimi. Mikroorganizmi, koji se koriste u industriji, izolirani su iz prirode i u mnogim slučajevima izmijenjeni korištenjem metoda mutacije i selekcije.

Era biotehnologije naglo se razvila u posljednjih nekoliko desetljeća i karakterizira ju izmjena mikroorganizama uz pomoć molekularne biotehnologije, uključujući i korištenje tehnologije rekombinantne DNA. Danas je moguće manipulirati genetičkom informacijom kako bi se dobili proizvodi poput proteina ili modificirala mikrobna ekspresija gena. Također, genetička informacija može se prenositi između različitih grupa organizama, na primjer između bakterija i biljaka. Izbor i korištenje mikroorganizama u industrijskoj mikrobiologiji i biotehnologiji izazovan je zadatak koji zahtijeva razumijevanje rasta i funkcije mikroorganizama, te razumijevanje njihove interakcije s drugim organizmima. Korištenje mikroorganizama prati logičan slijed, prvo je potrebno prepoznati ili kreirati mikroorganizam koji će provoditi željeni proces sa što većim iskorištenjem, a zatim osigurati kontrolirane uvjete u bioreaktorima ili kompleksne podloge za provođenje procesa i postizanje krajnjeg cilja (Demain, 2000).

2.2. IZBOR MIKROORGANIZAMA ZA INDUSTRIJSKU MIKROBIOLOGIJU I BIOTEHNOLOGIJU

Prvi korak industrijskog mikrobiologa jest pronaći prigodni mikroorganizam za provođenje željenog procesa. Postoji puno mogućnosti za pronalazak potrebnog mikroorganizma, počevši od izolacije iz prirode pa sve do sofisticiranijih molekularnih tehnika za modifikaciju postojećeg organizma.

2.2.1. Izolacija mikroorganizama iz prirode

Sve do nedavno, glavni izvori mikrobnih kultura za industrijsku mikrobiologiju bili su prirodni izvori poput uzorka zemlje, vode te pljesnivog kruha ili voća. Istražene su kulture iz svih dijelova svijeta s ciljem pronalaska sojeva željenih osobina, te se potraga i dalje nastavlja. S obzirom na mali broj izoliranih i uzgojenih mikrobnih vrsta, istražuju se područja širom svijeta, pa čak i ona koja su istraživana već desetljećima. Mikroorganizmi pronađeni u ekstremnim uvjetima, ekstremofili, posebno su zanimljivi zbog širokog spektra jedinstvenih osobina. Ekstremna staništa podrazumijevaju vrlo visoke te niske temperature, visoki tlak, rast na vrlo slanim područjima ili područjima izrazito visokog ili niskog pH (Gupta i sur., 2014).

Unatoč uloženom trudu, većina izoliranih mikroorganizama iz prirode ne može se uspješno uzgojiti u laboratorijskim uvjetima bez obzira na postojeće molekularne tehnike koje omogućuju prikupljanje informacija o mikrobnim kulturama. S rastućim interesom za mikrobnu raznolikost i ekologiju, a posebno za mikroorganizme ekstremnih staništa, intenzivno se povećava broj poznatih mikroorganizama s poželjnim osobinama za industrijsku mikrobiologiju i biotehnologiju. Istražuju se i mikroorganizmi uključeni u mutualističke i simbiotske odnose s drugim mikroorganizmima te višim biljkama i životinjama. Kontinuirano se istražuju sva područja Zemlje i mnoge kompanije organiziraju istraživanja za novim mikroorganizmima različitih poželjnih osobina (Demain i sur., 2017).

2.2.2. Genetička manipulacija mikroorganizama

Genetička manipulacija koristi se za kreiranje mikroorganizama s novim poželjnim osobinama. Klasične metode mikrobne genetike imaju ključnu ulogu u razvoju kultura za industrijsku mikrobiologiju. Najčešće korištene metode su mutacija, fuzija protoplasta, ugradnja kratkih DNA sekvenci, prijenos genetičke informacije između različitih organizama, modifikacija ekspresije gena te metode prirodnog genetičkog inženjerstva (Agapakis i Silver, 2009).

2.2.2.1. Mutacija

Jednom kada je željena kultura izolirana, može se primijeniti veliki raspon tehnika za

poboljšanje osobina te kulture, uključujući kemijske mutacije i ultraljubičasto zračenje. Npr. prve kulture plijesni *Penicillium notatum*, koje su se mogle uzgojiti jedino površinskim uzgojem, proizvodile su vrlo male koncentracije penicilina. 1943. godine izoliran je soj *P. chrysogenum* NRRL 1951, koji je kasnije poboljšan mutacijama. Danas se većina penicilina proizvodi uz pomoć *P. chrysogenum* kontinuiranim uzgojem u aerobnim uvjetima, uz miješanje, što rezultira 55% većim prinosima penicilina u odnosu na početne uzgoje u statičkim kulturama (Bridges, 1997).

2.2.2.2. Fuzija protoplasta

Fuzija protoplasta danas je široko primjenjiva na kvasce i plijesni. Većina ovih mikroorganizama aseksualna je ili samooplodna i zbog toga je smanjena šansa nasumičnih mutacija koje bi mogle dovesti do degeneracije soja. Za provođenje genetičkih istraživanja tih mikroorganizmima, protoplast se priprema uzgajanjem stanica u izotoničnoj otopini uz djelovanje enzima celulaze i β -galaktozidaze. Protoplast se nakon toga regenerira koristeći osmotske stabilizatore poput saharoze. Ako fuzijom nastanu hibridi, željeni rekombinanti identificiraju se selektivnim tehnikama uzgoja na pločama. Nakon stabilizacije stanične stijenke nova protoplazma koristi se u daljnjim istraživanjima. Glavna prednost ove tehnike je što se fuzijom mogu spojiti protoplasti različitih vrsta mikroorganizama koji taksonomski nisu srodni. Ovim pristupom dobivamo mnoge nove i zanimljive mikroorganizme te produkte (Shalsh i sur., 2016).

2.2.2.3. Ugradnja kratkih DNA sekvenci

Kratki dijelovi kemijski sintetizirane DNA mogu se ugraditi u mikroorganizme putem lokusno usmjerene mutageneze. Time se stvaraju male genetičke promjene koje vode do zamjena jedne ili više aminokiselina u ciljanom proteinu. Takve male promjene aminokiselina dovode do neočekivanih promjena karakteristika proteina što na kraju rezultira novim krajnjim produktima kao što su enzimi otporniji na promjene u okolini i enzimi koji mogu katalizirati ciljane kemijske reakcije. Takav pristup koristi se u području proteinskog inženjerstva. Moguće je proizvesti enzime i bioaktivne peptide bitno drukčijih osobina, npr. veće stabilnosti i

aktivnosti (Zheng i sur., 2020).

2.2.2.4. Prenošenje genetičke informacije između različitih organizama

Postupkom prenošenja nukleinskih kiselina između različitih organizama pojavile su se nove metode koje su dio brzo rastuće znanosti, kombinacijske biologije. Ove metode uključuju prijenos gena potrebnih za sintezu određenog proizvoda iz jednog u drugi organizam što primatelju gena osigurava nove sposobnosti poput povećane sposobnosti za razgradnju ugljikovodika. Jedan od prvih, važnijih primjera ovog pristupa je dobivanje tzv. “bakterije koja jede naftu”, koju je mikrobiolog Anand Mohan Chakrabarty 1971. godine uspio dobiti genetičkim modificiranjem bakterija roda *Pseudomonas*. Prijenosom plazmida dobio je stabilnu bakterijsku kulturu koja ima povećanu sposobnost razgradnje ugljikovodika (Padney i Arora, 2020). Svoju primjenu ima u smanjenju zagađenja morskih ekosustava nakon velikih izljeva nafte (Bull i sur., 2000).

Geni za proizvodnju određenog antibiotika mogu biti preneseni u mikroorganizam koji proizvodi neke druge antibiotike ili u mikroorganizam koji uopće nema sposobnost proizvodnje antibiotika. Na primjer, geni za sintezu bialafosa (antibakterijski herbicid) preneseni su iz *Streptomyces hygroscopicus* u *S. lividans* (Hidaka i sur., 1992). Drugi primjer je ekspresija enzima kreatininaze iz *Arthrobacter nicotianae* u *E. coli* (Liu i sur., 2015).

Ekspresija DNA u različitim organizmima može poboljšati iskorištenje procesa i minimizirati troškove pročišćavanja prije dobivanja konačnog produkta. Na primjer, rekombinantni bakulovirusi mogu se ugraditi u ličinke insekata kako bi se postigla velika brzina proizvodnje ciljanog virusa ili proteina (Kost i sur., 2005).

Transgene biljke mogu se koristiti za proizvodnju velikih količina različitih metabolita. Najkreativniji način prijenosa DNA u biljku je korištenje mikroprojektila presvučenih s DNA i pištolja za gene (*engl.* gene gun). Širok spektar genetičke informacije može se prenijeti u mikroorganizme koristeći vektore i tehnike rekombinantne DNA. Vektori uključuju umjetne kromosome kao na primjer kromosome kvasaca (YAC), bakterija (BAC), P1 bakteriofag-izmijenjene kromosome (PAC) i umjetne kromosome sisavaca (MAC). YAC su posebno vrijedni jer se mogu koristiti za istraživanje eukariotskih proteina koji zahtijevaju posttranslacijske modifikacije (Heesche-Wagner, 2001).

Dobar primjer korištenja vektora je virus koji uzrokuje bolest stopala i usta kod stoke, *Aphthovirus*. Genetička informacija za proizvodnju antigena protiv ove bolesti može se

prenijeti u *E. coli* te se kasnije antigen sintetiziran u *E. coli* koristi za proizvodnju cjepiva. Prijenos genetičke informacije omogućuje proizvodnju specifičnih proteina i peptida bez kontaminacije sličnim proizvodima metabolizma originalnog organizma. Ovaj pristup smanjuje vrijeme i troškove izolacije i pročišćavanja konačnog proizvoda (Guo i sur., 2013). Dakle, moderne tehnike kloniranja gena predstavljaju neograničene mogućnosti za manipulaciju mikroorganizmima i korištenje biljaka i životinja ili njihovih stanica kao tvornice za ekspresiju gena rekombinantne DNA. Novije molekularne metode nastavljaju se istraživati i primjenjivati za prenošenje genetičke informacije i dizajniranje mikroorganizama s novim sposobnostima.

2.2.2.5. Modifikacija ekspresije gena

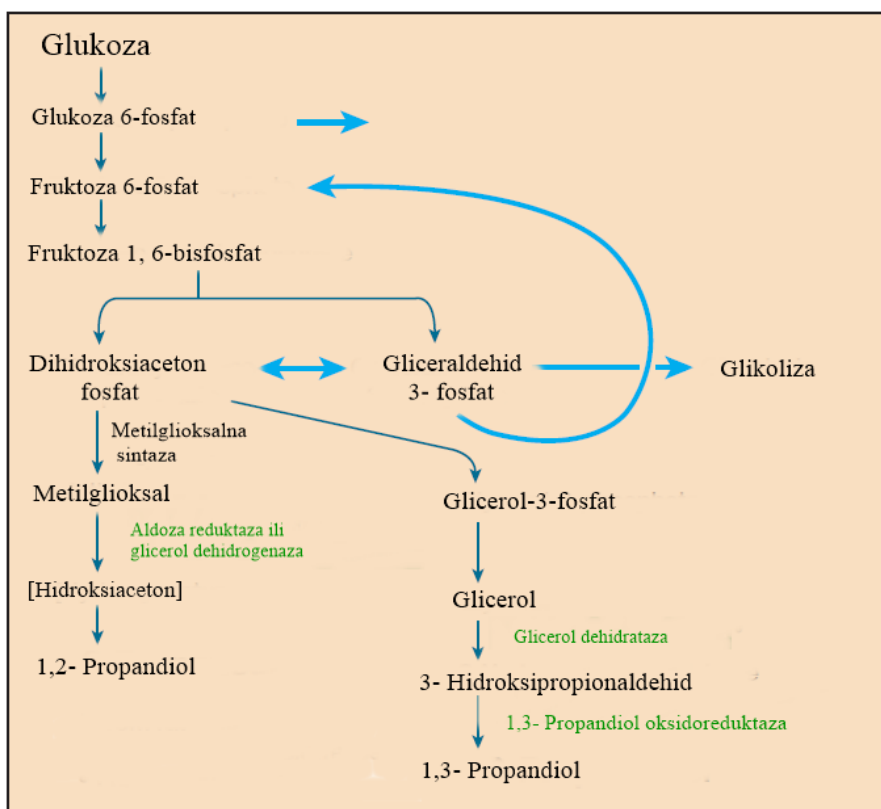
Osim dodataka novih gena u organizme, moguće je modificirati regulaciju gena mijenjanjem njihove transkripcije, pomoću spajanja gena, korištenjem promotora ili uklanjanjem kontrole mehanizma povratne sprege. Ovi postupci omogućuju proizvodnju raznolikih produkata, od kojih su neki prikazani u tablici 1. Zanimljiv razvoj na području ekspresije gena je postupak sinteze likopena, važnog antioksidansa prisutnog u rajčici i proizvodima rajčice. U ovom slučaju je put sinteze likopena dizajniran s obzirom na metabolizam *E. coli*. Područje koje regulira dva ključna enzima sinteze stimulirano je pomoću visoke glikolitičke aktivnosti te ima utjecaj na razinu acetil-fosfata, pri čemu se proizvodi više likopena i smanjuje negativan utjecaj na metaboličku ravnotežu (Ostergaard i sur., 2000)

Tablica 1. Primjeri rekombinantnog DNA sustava korištenog za modificiranje ekspresije gena (Ostergaard i sur., 2000)

Produkt	Mikroorganizam	Promjena
Aktinorodin	<i>S. coelicolor</i>	Modifikacija transkripcije
Celulaza	Geni <i>Clostridium</i> u <i>Bacillus</i>	Pojačanje sekrecije
Rekombinantni albumin	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fuzija u visoko proizvodni protein
Heterologni protein	<i>S. cerevisiae</i>	Korištenje promotora UAS _{gal} /CYC1
Ubrzani rast	<i>Aspergillus nidulans</i>	Hiperprodukcija gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze
Aminokiseline	<i>Corynebacterium</i>	Izolacija biosintetskih gena koji dovode do pojačane enzimske aktivnosti/uklanjanja povratne sprege

2.2.2.6. Prirodno genetičko inženjerstvo

Najnoviji pristup stvaranja novih metaboličkih sposobnosti u određenom mikroorganizmu je područje prirodnog genetičkog inženjerstva, koje uključuje prisilnu evoluciju i prilagođene mutacije. Ovo je proces korištenja specifičnih uvjeta kako bi se mikroorganizmi prisilno prilagodili i mutirali, što dovodi do stvaranja organizama s raznim novim mogućnostima. Istraživanja na području prirodnog genetičkog inženjerstva su još uvijek bez čvrstog temelja (Davisson i sur., 2012). Moguće je da su ovakvi „prisilni procesi evolucije“, u nekim slučajevima, učinkovitiji i povoljniji od ostalih. Usmjerene mutacije imaju potencijal proizvodnje mikroba sa novim biosintetskim mogućnostima. Iako je navedeno područje jako kontroverzno, korištenje prisilne evolucije je puno neotkrivenog potencijala kada govorimo o novim rješenjima u biotehnologiji i industrijskoj mikrobiologiji. Korištenje aldoza reduktaze ili glicerol dehidrogenaze i 1,3-propandiol oksidoreduktaze pomiče metabolizam *E. coli* u smjeru proizvodnje propandiola, kao što je prikazano na slici 1.



Slika 1. Primjena molekularne biologije u proizvodnji propandiola u *E.coli* (Flores i sur., 1996)

2.3. ČUVANJE KULTURA RADNIH MIKROORGANIZAMA

Jednom kad je mikroorganizam odabran u određenom procesu, on se mora održati u originalnom obliku za daljnja istraživanja. Prijenos kulture pokazao se nepovoljnim zbog raznih mutacija i promjena u mikroorganizmu, iako se često koristio u prošlosti. Kako bi izbjegli ovakve probleme, mogu se koristiti tehnike koje čuvaju povoljne karakteristike određene mikrobne kulture. Jedna od tih tehnika je liofilizacija, ili sušenje smrzavanjem, te čuvanje u tekućem dušiku. Iako su ove dvije tehnike komplicirane i zahtijevaju skupu opremu, one omogućuju da se mikrobne kulture čuvaju godinama, bez gubitka kvalitete ili nepoželjnih mutacija. Neke od metoda koje se koriste za očuvanje kultura prikazane su u tablici 2.

Tablica 2. Metode za čuvanje kultura poželjnih u industrijskoj mikrobiologiji i biotehnologiji (Singh i sur., 2017)

Metoda	Karakteristike
Precjepljivanje kulture	Ovisi o učestalosti prijenosa, podlozi, temperaturi, može dovesti do većeg broja mutacija
Mineralno ulje, najčešće tekući parafin	Kultura je uzgajana na čvrstoj kosoj podlozi i pokrivena steriliziranim mineralnim uljem, čuva se u hladnjaku
Destilirana voda/agar	Čuva se u hladnjaku, kulture su upotrebljive i nakon 3-5 mjeseci
Zamrzavanje	Povoljno za neke vrste bakterija i gljiva, moguća oštećenja mikrobnih struktura, što je niža temperatura čuvanja, to je duže kultura stabilna
Sušenje	Kulture su sušene zajedno s podlogom, na sterilnim papirnatim diskovima, u kapsulama želatine
Liofilizacija	Voda je uklonjena sublimacijom uz lioprotektor, kultura se može očuvati i do 30 godina
Krioprezervacija	Kultura se čuva u tekućem dušiku na -196 °C, kultura se može očuvati i do 15 godina

Osim prethodno navedenih metoda, koriste se i precjepljivanje, kosi agar prekriven mineralnim uljem, destilirana voda ili vodeni agar, zamrzavanje te sušenje. Kod precjepljivanja na nove hranjive podloge, bitno je obratiti pozornost na učestalost prijenosa, korištenu podlogu i temperaturu, jer može doći do povećanja broja mutacija i proizvodnje mutanata. Prilikom uzgoja na kosom agaru, izvorna kultura uzgaja se na kosoj čvrstoj hranjivoj podlozi i prekriva steriliziranim mineralnim uljem. Cilj je ograničiti pristup kisika i time usporiti metabolizam i

rast mikroorganizma. Ukoliko se koriste destilirana voda, kosi agar ili minimalni medij, potrebno je kulture pohraniti u hladnjaku te mogu biti održive od tri do pet mjeseci ili dulje. Zamrzavanje hranjivih podloga tijekom faze rasta kultura nije pouzdana metoda jer može dovesti do oštećenja mikrobnih struktura, iako postoje kulture kojima pogoduje takav način očuvanja. Prilikom postupka sušenja, kulture su sušene na sterilnom tlu, sterilnim diskovima filter papira ili u kapsulama želatine, nakon čega se mogu pohraniti u hladnjaku ili zamrznuti radi poboljšanja održivosti. Vrijeme sušenja treba biti što kraće (Singh i sur., 2017).

2.3.1. Pronalazak mikroorganizama u prirodi

Za mnoge industrijske procese mikroorganizmi se moraju uzgajati u posebno pripremljenim hranjivim podlogama pod kontroliranim uvjetima. Potrebno je održavati optimalnu temperaturu i pH, kontrolirati prisutnost, odnosno odsutnost kisika, te količinu hranjivih nutrijenata tijekom fermentacije. Rast mikroorganizama pri takvim kontroliranim uvjetima je skup te se koristi samo kada se iz željenog produkta može ostvariti profit. Troškovi proizlaze iz uzgoja određenog mikroorganizma koji će se koristiti u procesu fermentacije, opreme, pripreme hranjivih podloga, pročišćavanja proizvoda, ambalaža, marketinških ulaganja te mikrobiološke i analitičke kontrole konačnog proizvoda prije izlaska na tržište. Termin fermentacija se u industrijskoj biotehnologiji koristi u širokom značenju. Razvoj industrijske fermentacije zahtijeva odgovarajuće hranjive podloge za uzgoj kultura mikroorganizama. Često su potrebne godine da se postigne optimalni prinos proizvoda (Chen i Kazlauskas, 2011).

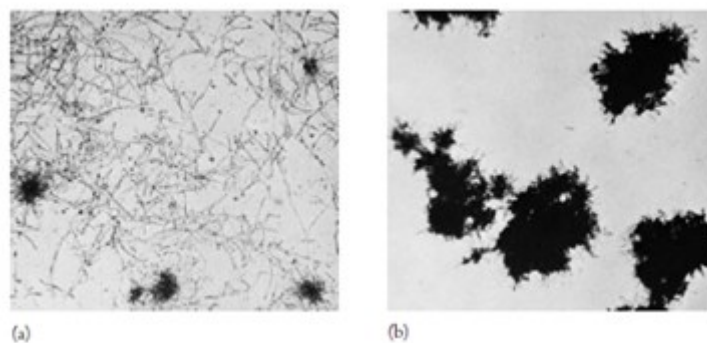
2.3.2. Priprema hranjivih podloga

Podloge koje se koriste za uzgoj mikroorganizama kritičan su dio uzgoja jer mogu utjecati na ekonomsku konkurentnost određenog procesa. Često se koriste sirovine niže cijene kao izvori ugljika, dušika i fosfora. Sirovi biljni hidrolizati često se koriste kao složeni izvori ugljika, dušika i čimbenika rasta. Nusproizvodi iz industrije piva često se koriste zbog nižih troškova i veće dostupnosti. Ostali izvori ugljika uključuju melasu iz proizvodnje konzumnog šećera i sirutku iz procesa proizvodnje sira (tablica 3).

Tablica 3. Glavni sastojci hranjivih podloga za rast mikroorganizama u industrijskim procesima (Singh i sur., 2017)

Izvor	Sirovina	Izvor	Sirovina
ugljik i energija	melasa sirutka žitarice poljoprivredni otpad	vitamini	neobrađeni pripravci biljnih i životinjskih produkata
dušik	kukuruzna močevina (CSL) sojino brašno klačnički otpad amonijak, amonijeve soli nitrati	željezo, soli u tragovima	anorganske kemikalije tehničke čistoće
puferi	kreda karbonati	protupjenila	viši alkoholi silikoni prirodni esteri salo i biljna ulja

Količine i bilanca minerala, posebno željeza, te faktori rasta mogu biti ključni u pripremi hranjivih podloga. Tako npr. biotin i tiamin utječu na biosintetske reakcije i time kontroliraju nakupljanje proizvoda u mnogim fermentacijama. Hranjive podloge također mogu biti pripravljene tako da ugljik, dušik, fosfor ili specifičan faktor rasta postanu ograničavajući u određenom vremenu tijekom fermentacije te time utječu na brzinu prelaska iz faze rasta mikroorganizma u fazu proizvodnje željenih metabolita (slika 2).



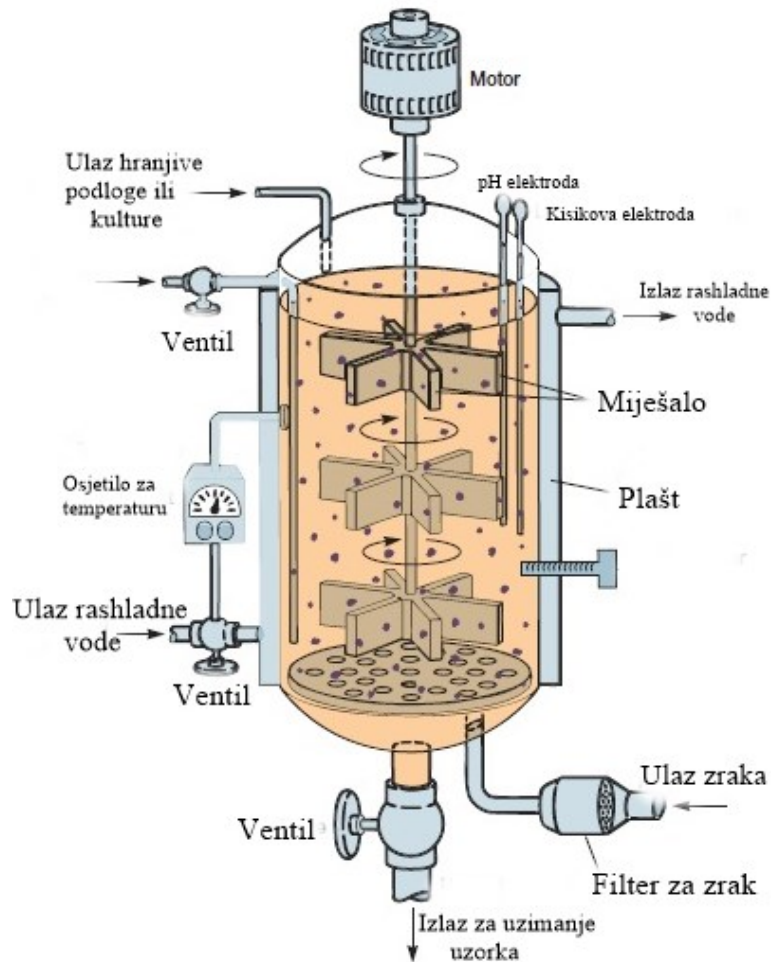
Slika 2. Rast filamentoznih funga tijekom fermentacije a) inicijalna kultura; b) nakon 18 sati rasta (Nevalainen i sur, 2014)

2.3.3. Rast mikroorganizama u industrijskim uvjetima

Nakon pripreme hranjive podloge, potrebno je odrediti uvjete za mikrobnog funkcioniranje u združenoj kulturi. To često uključuje preciznu kontrolu miješanja, temperature, promjene pH i opskrbe kisikom. Fosfatni puferi se mogu koristiti za kontrolu pH, a također mogu poslužiti i kao izvor fosfora. Koncentracija kisika i protok zraka moraju biti dovoljno visoki kako kisik ne bi ograničio brzinu procesa. Kada se uzgajaju fungi i aktinomiceti, aeracija može biti ograničena vlaknastim rastom. Kako bi se ovaj problem smanjio, kulture se mogu uzgajati u obliku peleta, flokula ili vezane za umjetne čestice (imobilizirane). Bitno je osigurati da ti fizički čimbenici ne ograničavaju mikrobni rast. To je najvažnije prilikom prenošenja postupka u veće mjerilo (Chen, 2012). Mikroorganizmi se mogu uzgajati u epruvetama, tikvicama na tresilici, fermentorima ili drugim sustavima za uzgoj većih volumena kultura. Fermentori s miješalicom mogu biti u rasponu od 3 ili 4 litre do 100 000 litara ili više, ovisno o zahtjevima proizvodnje. Takvi fermentori zahtijevaju velika ulaganja i kvalificirane djelatnike. Svi koraci koji obuhvaćaju rast mikroorganizama i obradu proizvoda moraju se provoditi u aseptičkim uvjetima. Ne samo da hranjiva podloga mora biti sterilizirana, već se aeracija, podešavanje pH, uzimanje uzoraka i praćenje procesa moraju provoditi pod strogo kontroliranim uvjetima. Kada je to potrebno, moraju se dodati sredstva za kontrolu pjene, osobito kada se radi o podlozi s visokim udjelom proteina.

Praćenje krajnjih proizvoda obično se odvija uz pomoć računala. Dobivene informacije potrebne su za preciznu kontrolu procesa i proizvoda. Uvjeti uzgoja mogu se mijenjati ili održavati konstantnima, ovisno o ciljevima za određeni proces. Vrlo je važno prilagoditi sastav

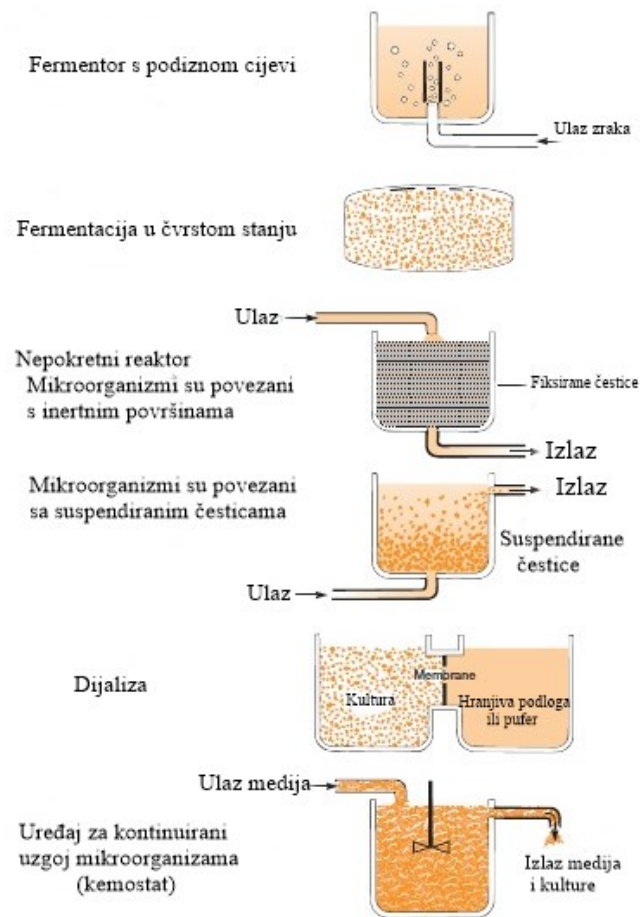
podloge, primjerice izvor ugljika, koji se dodaje kontinuirano kako mikroorganizam ne bi imao višak supstrata dostupan u bilo kojem trenutku procesa. Višak supstrata može uzrokovati akumulaciju nepoželjnih otpadnih metaboličkih produkata. Ovo je osobito važno kada se radi o glukozi i drugim ugljikohidratima jer prisutnost viška glukoze na početku fermentacije može povećati prinos etanola, koji se gubi kao hlapljivi produkt i smanjuje konačni prinos (slika 3).



Slika 3. Industrijski fermentor s miješanjem (Anderson, 2000)

Osim tradicionalnog fermentora s mehaničkim miješalom, mogu se koristiti i drugi načini uzgoja mikroorganizama, kao na primjer fermentori s podiznom cijevi, fermentacija na čvrstim supstratima, nepokretni i vrtložni reaktori gdje su mikroorganizmi povezani s inernim površinama kao biofilmovima i medij teče preko fiksnih ili suspendiranih čestica te reaktori u kojima su mikrobna kultura i hranjiva podloga odvojene membranom. Time se toksični otpad

metabolita ili krajnji proizvod difundiraju daleko od mikrobne kulture i omogućeno je da se supstrati raspršuju kroz membranu prema kulturi (slika 4).



Slika 4. Različite metode uzgoja kulture radnih mikroorganizama (Chen, 2012)

Kontinuirane tehnike u kemostatima mogu značajno poboljšati izlazak stanica i koeficijent konverzije supstrata u biomasu ili proizvod jer mikroorganizmi mogu biti održavani u kontinuiranoj logaritamskoj fazi. Međutim, kontinuirano održavanje mikroorganizma u aktivnoj fazi rasta nepoželjno je u mnogim industrijskim procesima. Mikrobiološki proizvodi često su klasificirani kao primarni i sekundarni metaboliti. Primarni metaboliti sastoje se od spojeva koji nastaju tijekom rasta mikroorganizma. Oni uključuju aminokiseline, nukleotide i krajnje proizvode fermentacije kao što su etanol i organske kiseline. Osim toga, industrijski korisne enzime mikroorganizmi često sintetiziraju tijekom faze rasta. Ti enzimi se najčešće koriste u proizvodnji hrane ili završnoj obradi tekstila. Biosinteza sekundarnih metabolita započinje tek nakon ulaska mikrobne kulture u stacionarnu fazu rasta. Sekundarni metaboliti,

kao na primjer antibiotici i mikotoksini, nemaju izravnu vezu sa sintezom staničnih organela i normalnim rastom mikroorganizma.

2.3.4. Mikrobni rast u složenom okolišu

Industrijska biotehnologija se može provoditi i u složenom prirodnom okolišu kao na primjer u tlima i kompostima s visokim udjelom organskih tvari. U tim kompleksnim okolinama fizikalni i nutritivni uvjeti za mikrobni rast ne mogu biti potpuno kontrolirani, te u njima postoji velik udio nepoznatih komponenata. Produkti obično postižu nižu cijenu, a procesi se odvijaju u većim volumenima, te se njima ne dobivaju specifični mikrobni komercijalni produkti. Primjeri primjene su korištenje mikrobnih zajednica za provođenje biorazgradnje, bioremedijacije te dodatak mikroorganizama u tla ili biljke s ciljem poboljšanja kvalitete i kvantitete prinosa (Alexander, 1999).

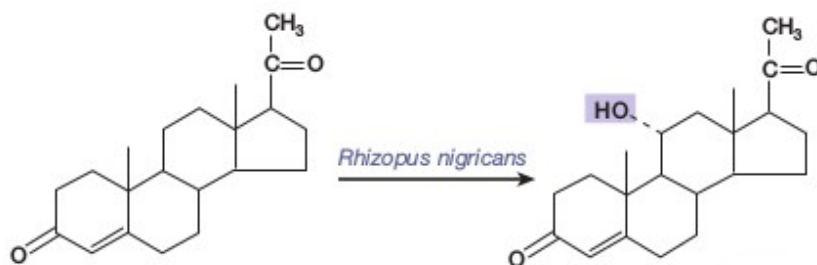
2.3.5. Biokonverzijski procesi

Biokonverzije, još poznate kao mikrobiološke transformacije ili biotransformacije, su male promjene u molekulama koje provode stanice ili spore mikroorganizama, djelujući poput biokatalizatora. Biokonverzije imaju mnogobrojne prednosti nad kemijskim postupcima. Velika prednost je stereokemijska, u tome što se stvara biološki aktivan oblik produkta. Nasuprot prethodno spomenutom, većina kemijskih sinteza stvara racemične smjese u kojima mikroorganizam može koristiti samo jedan od dva dobivena izomera (Schauer i Rainer, 2004). Enzimi također provode vrlo specifične reakcije u umjerenim uvjetima, što omogućuje većim, u vodi netopljivim molekulama da budu transformirane. Jednostanične bakterije, aktinomiceti, kvasci i plijesni se koriste u raznim biokonverzijama. Enzimi koji provode navedene pretvorbe mogu biti intracelularni ili ekstracelularni. Stanice se mogu uzgojiti kontinuiranim ili šaržnim uzgojima i potom sušiti radi izravne upotrebe, ili se mogu pripremiti na specifičnije načine kako bi doveli do željene biokonverzije (Donova, 2022).

Biotransformacije provode slobodni enzimi ili izolirane stanice ili spore mikroorganizama i imaju svoja ograničenja. Reakcije koje se odvijaju u odsutnosti aktivnog metabolizma su primarno egzergone reakcije. Ukoliko su ATP ili reducensi potrebni, izvor energije poput glukoze mora biti dodan pod pažljivo kontroliranim uvjetima. Kada su slobodno suspendirane,

vegetativne stanice ili spore obavljaju svoju funkciju, a mikrobna biomasa se koristi samo jednom. Na kraju procesa, stanice se odstranjuju. Često se mogu koristiti ponovno nakon što ih vežemo u smole za ionske izmjene pomoću ionskih interakcija ili ako ih imobiliziramo u polimernom matriksu. Ionske, kovalentne ili fizikalne metode fiksiranja mogu se koristiti za imobiliziranje mikrobnih stanica, spora ili enzima. Mikroorganizmi također mogu biti imobilizirani na unutarnjim stijenkama cijevi. Otopina koju trebamo modificirati se tada pušta kroz cijev koja na svojim stijenkama sadrži mikroorganizme; ovaj pristup se koristi u mnogim industrijskim procesima. U njih uključujemo biokonverziju steroida, razgradnju fenola, te proizvodnju širokog spektra antibiotika, enzima, organskih kiselina i metaboličkih međuprodukata. Jedna od primjena stanica kao biokatalizatora je obnova dragocjenih metala iz razrijeđenih tokova u procesima (Pera i sur, 2008).

Tipična biokonverzija je hidroksiliranje steroida. Na slici 5 je prikazan steroid netopljiv u vodi, koji je otopljen u acetonu i potom dodan u reakcijski sustav s prethodno uzgojenim mikrobnim stanicama. Praćen je tijek modificiranja, a konačni produkt je izdvojen iz podloge te pročišćen.



Slika 5. Modifikacija steroida (Donova, 2022)

2.4. GLAVNI PROIZVODI INDUSTRIJSKE MIKROBIOLOGIJE

Industrijska mikrobiologija sa svojim proizvodima utječe direktno na naše živote, ali se često njen doprinos ne cijeni dovoljno. Ti proizvodi su promijenili naše živote i produžili naš životni vijek. Industrijski mikrobiološki proizvodi uključuju industrijska i poljoprivredna dobra, medicinski važne proizvode te biogoriva. U posljednjih nekoliko godina, povećala se uporaba proizvoda, koji nisu antibiotici, u medicini i zdravstvu (tablica 4).

Tablica 4. Glavni mikrobnii proizvodi i procesi važni u industrijskoj mikrobiologiji i

Proizvodi	Mikroorganizmi
Industrijski proizvodi Etanol (iz glukoze) Etanol (iz laktoze) Aceton i butanol 2,3-butandiol Enzimi	<i>S. cerevisiae</i> <i>Kluyveromyces fragilis</i> <i>C. acetobutylicum</i> <i>Enterobacter, Serratia</i> <i>Aspergillus, Bacillus, Mucor, Trichoderma...</i>
Proizvodi agrikulture Giberelini	<i>Gibberella fujikuroi</i>
Aditivi Aminokiseline (lizin) Organske kiseline (limunska kiselina) Nukleotidi Vitamini Polisaharidi	<i>C. glutamicum</i> <i>A. niger</i> <i>C. glutamicum</i> <i>Ashbya, Eremothecium, Blakeslea</i> <i>Xanthomonas</i>
Medicinski proizvodi Antibiotici Alkaloidi Inzulin, hormon rasta, interferoni	<i>Penicillium, Streptomyces, Bacillus</i> <i>Claviceps purpurea</i> <i>E. coli, S. cerevisiae...</i>
Biogoriva Hidrogen Metan Etanol	Fotosintetski mikroorganizmi <i>Methanobacterium</i> <i>Zymomonas, Thermoanaerobacter</i>

2.4.1. Antibiotici

Mnogi antibiotici su proizvodi mikroorganizama, a uglavnom ih proizvode aktinobakterije iz roda *Streptomyces* i plijesni.

Penicilin - kojeg proizvodi plijesan *P. chrysogenum*, odličan je primjer proizvoda bioprocesa gdje pažljiva priprema podloge donosi maksimalno iskorištenje. Brza proizvodnja stanica, koja se događa kada se koristi velika koncentracija glukoze kao izvor ugljika, ne dovodi do maksimalne proizvodnje antibiotika. Dovođenje laktoze koju mikroorganizam sporo hidrolizira, uz ograničenu dostupnost dušika, stimulira veće nakupljanje penicilina nakon što je završena faza rasta. Isti rezultat se može postići sporim, kontinuiranom dotokom glukoze. Ako je potrebna određena vrsta penicilina, u hranjivu podlogu se dodaju određeni prekursori. Na primjer, feniloctena kiselina se dodaje da se maksimizira proizvodnja penicilina G, koji ima benzilni bočni lanac. pH se održava oko neutralne vrijednosti dovođenjem sterilnih lužina, koje omogućuju maksimalnu stabilnost sintetiziranog penicilina. Kada je bioprocen završen, obično

nakon 6 do 7 dana, hranjiva podloga je odvojena od micelija gljiva i provodi se izdvajanje konačnog proizvoda. Taj proizvod se dalje može kemijski modificirati da dobijemo razne polusintetske peniciline.

Streptomycin - sekundarni metabolit plijesni *S. griseus* za koji promjene u uvjetima okoliša i dostupnost supstrata utječu na proizvodnju. U ovom procesu, koristi se hranjiva podloga na bazi soje, s glukozom kao izvorom ugljika. Soja je izvor dušika koji limitira rast. Nakon faze rasta, ako imamo limitiranu koncentraciju dušika, količina antibiotika se povećava.

Razvoj antibiotika se nastavlja. Trenutno je opisano oko 6000 antibiotika, od koji je njih 4000 proizašlo iz aktinobakterija. Svake godine istraživači otkriju oko 300 novih antibiotika (Badger-Emeka i sur., 2018).

2.4.2. Aminokiseline

Aminokiseline poput lizina i soli glutaminske kiseline koriste se u prehrambenoj industriji kao suplementi u proizvodnji kruha ili kao pojačivači okusa poput natrijeva glutaminata (MSG). Proizvodnja aminokiselina obično se vrši pomoću regulacijskih mutanata, koji imaju ograničenu sposobnost da limitiraju sintezu završnog produkta. Prirodni mikroorganizmi nemaju sposobnost proizvodnje prevelike količine međuprodukata zbog pažljive kontrole staničnog metabolizma. Proizvodnja glutaminata i drugih aminokiselina u velikim količinama provodi se pomoću mutanata bakterije *C. glutamicum* koji nemaju ili imaju limitiranu sposobnost da prerade međuprodukt ciklusa limunske kiseline, α -ketoglutarat, u sukcinil-CoA. Kontrolirani dodatak male koncentracije biotina i derivata masnih kiselina dovodi do povećane permeabilnosti membrane i izlučivanja veće koncentracije glutaminata. Bakterija koristi glioksilatni ciklus da osigura esencijalne biokemijske međuprodukte, pogotovo u fazi rasta. Nakon što se mogućnost rasta limitira zbog promjene u dostupnosti nutrijenata, gotovo se sav izocitrat prevede u glutaminat.

Lizin, esencijalna aminokiselina, se originalno proizvodila u mikrobnom procesu od dva koraka. Umjesto toga primijenjen je jednostupanjski proces u kojoj se bakteriju *C. glutamicum* zaustavlja u sintezi homoserina čime dolazi do nagomilavanja lizina (Sindelar i Wendisch, 2007).

2.4.3. Organske kiseline

Proizvodnja organskih kiselina pomoću mikroorganizama je važna u industrijskoj mikrobiologiji i prikazuje utjecaj metala u tragovima u njihovoj proizvodnji. Limunska, octena, mliječna, fumarna i glukonska kiselina su najvažnije organske kiseline proizvedene metodama industrijske mikrobiologije. Prije razvoja mikrobnih procesa glavni izvor limunske kiseline su bili talijanski limuni. Danas, većinu limunske kiseline proizvode mikroorganizmi; 70 % se koristi u industriji hrane i pića, 20 % u farmaceutskoj industriji, a ostatak u ostalim industrijama. Bit proizvodnje limunske kiseline uključuje limitiranje metala u tragovima, poput mangana i željeza, da zaustave rast pljesni *A. niger* u određenoj točki procesa. Obično podlogu tretiramo pomoći ionskih izmjenjivača da osiguramo nisku i kontroliranu koncentraciju metala. Proces proizvodnje limunske kiseline se u prošlosti odvijao površinskim uzgojem u plitkim posudama, a danas u aerobnim bioreaktorima s miješalicom. Za proizvodnju se koristi visoka koncentracija šećera (15 do 18 %). Bakar sprječava inhibiciju proizvodnje limunske kiseline koju uzrokuje željezo. Uspjeh ovog procesa ovisi o regulaciji i funkcionalnosti glikolitičkih puteva i o ciklusu limunske kiseline. Nakon aktivne faze rasta, kada je koncentracija supstrata velika, aktivnost sinteze limunske kiseline se povećava, a aktivnost akonitaze i izocitrat dehidrogenaze se smanjuje što rezultira nakupljanjem i lučenjem limunske kiseline. Usporedno, za proizvodnju glukonske kiseline, koristi se samo jedan mikrobnii enzim, glukoza oksidaza koji se nalazi u *A. niger*. *A. niger* optimalno raste u kukuruznoj močevini. Rast je limitiran dušikom, a stanice prerade ostatak glukoze u glukonsku kiselinu u jednostupanjskoj reakciji. Glukonska kiselina se koristi kao nosač kalcija i željeza te kao sastojak detergenata (Panda i sur., 2020).

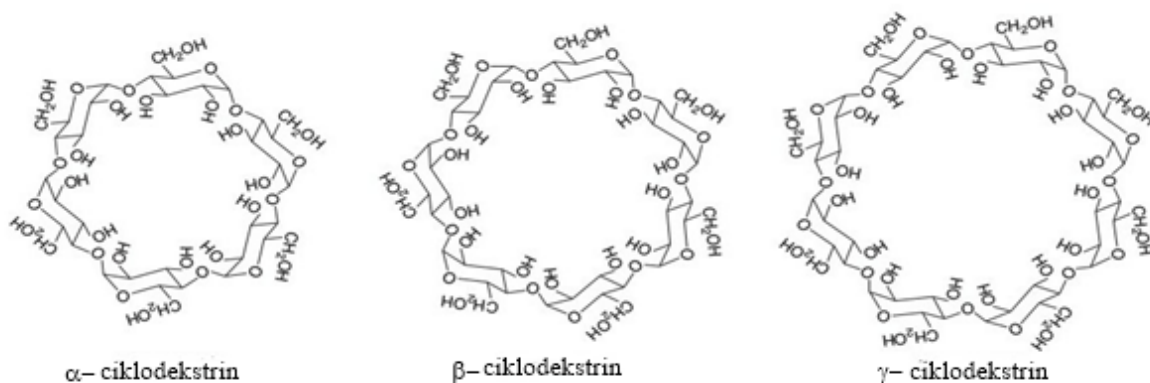
2.4.4. Specifični spojevi koji se koriste u medicini

2.4.4.1. Biopolimeri

Biopolimeri su mikrobiološki proizvedeni polimeri korišteni da modificiraju karakteristike tekućina, kao sredstva za zgrušavanje, kao ambalažni materijal, itd.. Upotrebljavaju se u raznim područjima farmaceutske i prehrambene industrije. Prednosti korištenja biopolimera

je ta da proizvodnja ne ovisi o klimi, nije ograničena dostupnošću materijala i da ne dolazi do trošenja prirodnih resursa. Proizvodni pogoni se mogu izgraditi blizu izvora jeftinih supstrata (u blizini polja). Biopolimeri uključuju: dekstrane, koji se koriste kao apsorbensi; polisaharide iz *Erwinia* koji se nalaze u bojama; i poliestere, dobivene iz *P. oleovorans*, koji su sirovina za specijalnu plastiku. Najmanje 75% svih polisaharida se koristi kao stabilizatori, sredstva za proizvodnju filma te sredstva koja omogućuju zadržavanje vode u raznim proizvodima. Polisaharidi pomažu u zadržavanju teksture u zamrznutoj hrani i sladoledima, koji su podložni drastičnim promjenama temperature. Svojstva polisaharida moraju odgovarati pH vrijednosti hrane i moraju biti kompatibilni s drugim polisaharidima te ne smiju gubiti svoja fizikalna svojstva zagrijavanjem (Baranwal i sur., 2022).

Celulozna mikrovlakna koju proizvode bakterije iz roda *Acetobacter*, koriste se kao zgušnjivači hrane. Polisaharidi poput skleroglukana koriste se u naftnoj industriji kao dodaci tekućinama za bušenje. Ciklodekstrini imaju jedinstvenu strukturu, prikazanu na slici 6. Oni su ciklički oligosaharidi čiji su šećeri povezani α -1,4 vezama. Ciklodekstrini mogu biti korišteni u širokom spektru namjena jer se ove cikličke molekule vežu sa supstancama i modificiraju njihova fizikalna svojstva. Na primjer, ciklodekstrini će povećati topljivost lijekova, smanjiti njihovu gorčinu i maskirati njihove kemijske mirise. Ciklodekstrini se također mogu koristiti kao selektivni adsorbensi za uklanjanje kolesterola iz jaja i maslaca ili za zaštitu začina od oksidacije (Szente i Szejtli, 2004).



Slika 6. Osnovna struktura ciklodekstrina bakterija iz roda *Thermoanaerobacter* (Gonzales Pereira i sur., 2021)

2.4.4.2. Biosurfaktanti

Mnoge površinski aktivne tvari (surfaktanti) koje su se koristile u komercijalne svrhe su produkti kemijske sinteze (Md, 2012). U današnje vrijeme raste zanimanje za korištenje biosurfaktanata. Ono je posebno bitno za primjene u okolišu gdje je biorazgradivost vrlo bitno svojstvo. Biosurfaktanti se koriste za emulgiranje, močenje i fazno raspršivanje, ali i za otapanje tvari. Navedena svojstva su od izuzetne važnosti u bioremedijaciji, raspršivanju naftnih mrlja te njihovoj poboljšanoj prirodnoj razgradnji. Najšire korišteni mikrobiološki proizvedeni biosurfaktanti su glikolipidi. Molekule ovih tvari imaju hidrofilni i hidrofobni dio, a njihova konačna struktura i svojstva ovise o uvjetima rasta mikroorganizma te o korištenom izvoru ugljika. Dobri prinosi su često dobiveni s netopljivim supstratima. Takvi biosurfaktanti su izvrsna disperzna sredstva (Fracchia i sur., 2014).

2.5. PRIMJENA BIOTEHNOLOGIJE

2.5.1. Biosenzori

Biosenzori su uređaji koji biokemijsku reakciju pretvaraju u električni analogni signal koji se može obrađivati, analizirati, pohranjivati i dr. U ovom polju bioelektronike, živi mikroorganizmi (ili njihovi enzimi ili organeli) su povezani elektrodama, a biološke reakcije su tim biosenzorima prevedene u električnu energiju. Primjena biosenzora svakodnevna je u medicini, industrijskoj mikrobiologiji i nadzoru okoliša (Španović, 2018).

U prehrambenoj industriji i ekologiji se razvijaju biosenzori za mjerenje specifičnih komponenti u pivu, praćenje zagađivača vode, zraka, tla i poljoprivrednih dobara, te za otkrivanje spojeva koji daju aromu hrani. Moguće je izmjeriti koncentraciju tvari u različitim okruženjima (tablica 5). Primjena uključuje određivanje glukoze, octene kiseline, glutaminske kiseline, etanola i biokemijske potrošnje kisika. Osim toga, primjenjuju se za mjerenje cefalosporina, nikotinske kiseline te nekoliko vitamina B skupine. Za analizu hrane najčešće se koriste optički imunosenzori koji otkrivanje prisutnost toksina, bakterija i patogena. Imunosenzori kao biološki element koriste antitijela koja se nakon vezanja s antigenom više ne mogu odvojiti te se mogu koristiti samo jednom. Biosenzor koji se najviše koristi (85% tržišta biosenzora) naziva se glukometar te služi za mjerenje količine glukoze u krvi. Njegova velika prednost je što se može koristiti na licu mjesta te znatno olakšava život oboljelim osobama

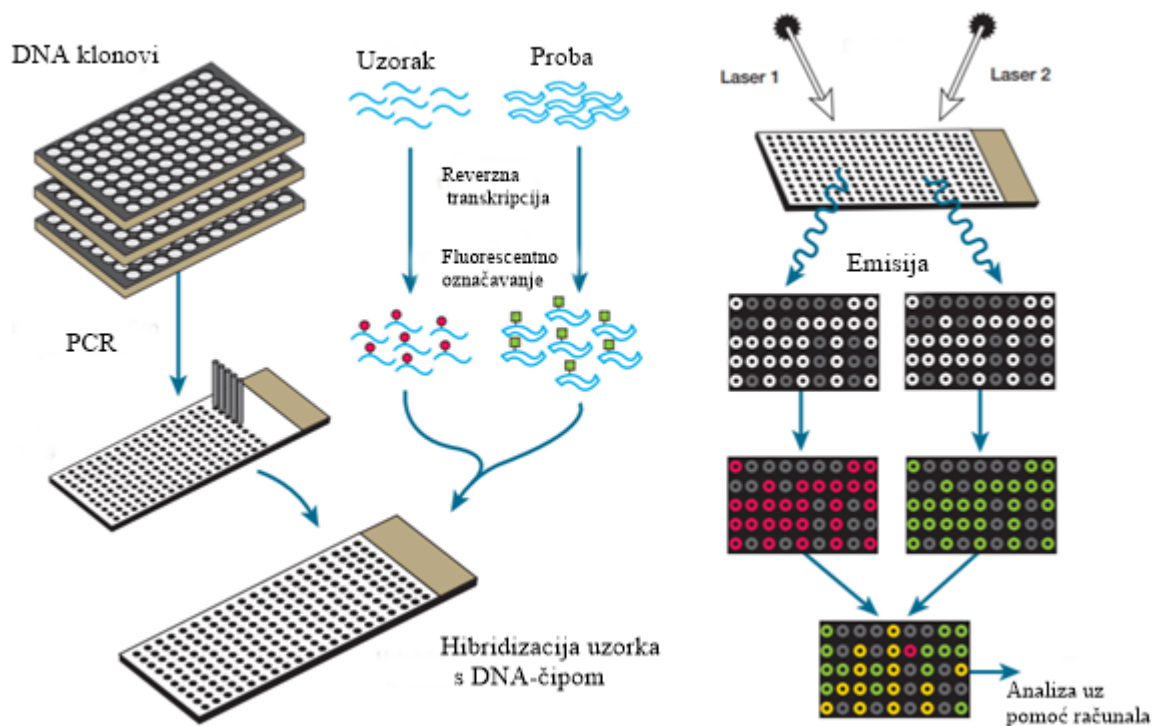
(Prasad i sur., 2009).

Tablica 5. Potencijalna primjena biosenzora u medicini, industriji i ekologiji (Prasad i sur., 2009)

Primjena biosenzora
Klinička dijagnoza i medicinska kontrola
Poljoprivredna, hortikultura, veterinarska analiza
Otkrivanje onečišćenja i mikrobne kontaminacije vode
Fermentacijska analiza i kontrola
Praćenje industrijskih plinova i tekućina
Izravno biološko mjerenje okusa i feromona

2.5.2. Imuno metode (Microarray)

Veliki dio nove i razvijenije mikrobiološke biotehnologije uključuje uporabu DNA sekvenci u genskim nizovima za praćenje ekspresije gena u kompleksnim biološkim sustavima. Brzi napredak koji se dogodio u ovom području rezultat je napretka u genetici, tehnologiji rekombinantne DNA, optici, te mogućnosti brzog prikupljanja i obrade informacija (Bartulovic-Nad i sur., 2006). Microarray tehnika ima potencijal za testiranje svih gena koji tvore organizam i mogu pratiti ekspresiju desetaka tisuća gena zasnovanih na načelima pokazanim na slici 7.



Slika 7. Microarray sustavi za praćenje ekspresije gena (Xiang i Chen, 2000)

U ovoj tehnici od 100 do 200 mikrolitara volumena koji sadrži poznate, željene sekvence - probe (jednolančanu DNA) - postavljeno je na staklenu pločicu ili drugi inertni materijal gdje se osuši te time nastaje DNA čip. Zatim se uvodi cDNA (komplementarna DNA) stanice čiju ekspresiju gena želimo pratiti. cDNA je prethodno dobivena reverznom transkripcijom i označena fluorescentnim bojama. Količina hibridizirane cDNA sa DNA čipom se mjeri pomoću fluorescentnog laserskog skenera. Do hibridizacije će doći samo na komplementarnim mjestima između cDNA i probe.

Uz cDNA čipove koji se koriste za proučavanje ekspresije gena, detekciju određenih proteinskih komponenti u hrani te detekciju mutiranih gena, postoje i oligonukleotidni DNA čipovi koji služe za identifikaciju mutacija i DNA varijacija na cijelom genomu te sekvencioniranje i analizu genoma (Bolarić i sur., 2009).

Ovi pristupi, sada i u budućnosti, omogućuju proučavanje na tisuće gena i proučavanje globalne regulacije mikrobnog rasta i omogućuju odgovore na promjene u okolišu (Bartulovic-Nad i sur., 2006).

2.5.3. Biopesticidi

Već dugo postoji interes za korištenje bakterija, viših gljiva i virusa kao bioinsekticida i biopesticida, tj. korištenje mikroorganizama, kao što su bakterije, gljive, virusi ili njihovi sastojci, za prirodno uklanjanje insekata (tablica 6).

Tablica 6. Korištenje bakterija, virusa i gljiva kao bioinsekticida (Butu i sur., 2020)

Mikrobna grupa	Glavni organizmi i primjene
Bakterije	<i>Bacillus thuringiensis</i> se koristi na raznolikom povrću i usjevima, voću, drveću i ukrasnim biljkama. <i>B. popilliae</i> koristi se prvenstveno protiv larve japanskog kornjaša. Obje bakterije se smatraju bezopasnima za ljude.
Virusi	Koriste se tri glavne grupe virusa za koje se čini da se ne repliciraju u toplokrvnim životinjama: NPV, GP i CPV.
Fungi	Preko 500 različitih vrsta gljiva je povezano s insektima. Infekcije i bolesti se javljaju kroz kutikulu insekta. <i>Beauveria bassiana</i> i <i>Metarhizium anisopliae</i> se koriste za kontroliranje Colorado krumpirove zlatice i pjenuša u plantaži šećerne trske. <i>Verticillium lecanii</i> i <i>Entomophthora</i> sp. se koriste u kontroli lisnih uši u staklenicima i na otvorenim poljima.

2.5.4. Bakterije

Bakterijski agensi uključuju različite vrste bakterije *Bacillus*, pretežito *B. thuringiensis*. Ova bakterija nije toliko toksična za insekte kao vegetativna stanica, ali tijekom sporulacije proizvodi intracelularni proteinski otrov, parasporalno tijelo koje može djelovati kao mikrobnii insekticid za pojedine grupe insekata. Parasporalni kristal se u alkalnim uvjetima raspada na protoksin koji reagira s enzimom dajući aktivni toksin. 6 aktivnih toksičnih jedinica integriraju se u plazminu membranu kako bi formirali otvor u obliku heksagona kroz stanicu. Ovo dovodi do narušavanja osmotske ravnoteže i gubitka ATP-a, i naposljetku uništavanja stanice. Najnovija istraživanja u razumijevanju djelovanja *B. thuringiensis* su rezultirala u kreiranju biljaka otpornih na pesticide. Prvi korak bio je unijeti gen za toksin u *E. coli*. Ovaj je pokus dokazao da kristalni toksin može biti prisutan u drugome organizmu, i pritom djelovati na njega. Nakon ovog velikog otkrića, 1987. počela je proizvodnja biljaka rajčice koje su sadržavale toksični gen. *B. thuringiensis* može biti uzgajana u fermentorima. Kada stanice liziraju, spore i kristali oslobađaju se u podlogu, koja se zatim centrifugira i obrađuje da se dobije u formi praška ili vlažnog praha kako bi se nanijela na biljke. Srodna bakterija, *B.*

popilliae koristila se protiv japanskih buba. Ova bakterija ne može se uzgajati u fermentorima, već se inokulum mora inokulirati u živog domaćina. Mikroorganizmi kontroliraju razvoj larve, ali uništavanje odrasle bube zahtjeva kemijske insekticide (Ruiu, 2015).

2.5.5. Virusi

Virusi koji su patogeni za pojedine insekte uključuju NPV (*engl.* Nuclear Polyhedrosis Virus), GV (*engl.* Granulosis Virus) i CPV (*engl.* Cytoplasmic Polyedrosis Virus). Trenutno je poznato više od 125 vrsta NPV virusa, od kojih 90% utječe na insekte iz reda *Lepidoptera* – leptire i moljce. Poznato je oko 50 vrsta GV virusa, koji također utječe na leptire i moljce. CPV virusi najmanje su specifični za domaćina i utječu na oko 200 različitih vrsta insekata. Važan komercijalni pesticid nalazi se na tržištu pod imenom *Elcar* koji kontrolira larve *Heliothis zea*. Moguće je korištenje bacilovirusa koji su genetički modificirani kako bi proizveli otrov škorpiona koji djeluje na larve insekata. Nakon što ga larva probavi, virusi se hidroliziraju i otpuštaju. Rekombinantni bacilovirus proizvodi ovaj neurotoksin, koji djeluje puno brže nego roditeljski virus, i promjene na listovima biljaka koje izazivaju insekti značajno su smanjene (Varanda i sur., 2021).

2.6. UČINCI MIKROBNE BIOTEHNOLOGIJE

Korištenje mikroorganizama u industrijskoj mikrobiologiji i biotehnologiji ne događa se uvijek u skladu s etičkim kodeksima. Odluke donesene za proizvodnju određenog proizvoda i korištene metode mogu imati dugoročne i neočekivane posljedice, poput nastanka patogena otpornih na antibiotike. Mikrobiologija je važan dio industrijske ekologije koja se bavi praćenjem slijeda elemenata i spojeva u prirodi i industriji ili u biosferi i antroposferi. Mikroorganizmi su od iznimne koristi čovječanstvu zbog svoje uloge u proizvodnji i preradi hrane, korištenju njihovih proizvoda kako bi poboljšali ljudsko i životinjsko zdravlje, u poljoprivredi, i za poboljšanje i održavanje okolišne ravnoteže. Mikrobiolozi su također uspješni ograničiti djelovanje patogenih mikroorganizama te mikroorganizama koji su zaslužni za kvarenje hrane. Otkriće i korištenje mikrobnih proizvoda, poput antibiotika, doprinijeli su poboljšanju kvalitete života i produljenju životnog vijeka tijekom zadnjeg stoljeća.

Mikrobiolog koji radi u bilo kojem području biotehnologije trebao bi razmatrati o dugoročnim posljedicama koje bi pojedine odluke imale. Odličnu poveznicu između biotehnologije i mogućih posljedica, dao je Samuel Florman koji je rekao: „Naš prvi izazov, kao mikrobiolozima, je razumjeti, koliko je to moguće, potencijalne učinke novih produkata i procesa u širem svijetu, kao i u mikrobiologiji. Važan dio ove odgovornosti je mogućnost uspješnog sporazumijevanja s različitim vladama o neposrednim i dugoročnim potencijalnim posljedicama različitih tehnologija” (Singh, 2019).

3. ZAKLJUČCI

Na temelju činjenica iznesenih u teorijskom dijelu mogu se donijeti ovi zaključci:

1. Industrijska biotehnologija je imala i ima vrlo važan i pozitivan utjecaj na razvoj čovječanstva. Uključuje korištenje mikroorganizama za dobivanje antibiotika, aminokiselina, organskih kiselina, hormona, te time znatno doprinosi poboljšanju kvalitete ljudskog i životinjskog zdravlja.
2. Pored antibiotika, industrijska biotehnologija omogućava i proizvodnju drugih spojeva kao npr. antitumorne agense koji se široko primjenjuju.
3. Najčešće korišteni mikroorganizmi su izolirani iz prirode ili modificirani metodama prirodnog genetičkog inženjerstva - mutacijama. Biotehnologija uključuje korištenje tehnika molekularne biologije za modificiranje i unaprjeđivanje mikroorganizama.
4. Pronalaženje novih mikroorganizama za korištenje u biotehnologiji je stalni izazov. Selekcija i mutacija imaju bitnu ulogu u otkrivanju novih sojeva mikroorganizama, te je, u kombinaciji s molekularnom biologijom i metaboličkim inženjerstvom, moguće prenositi gene iz jednog organizma u drugi i time dobivati mikroorganizme novih svojstava.
5. Industrijska biotehnologija može imati dugoročne, i nepredvidive pozitivne ili negativne efekte na okoliš, ljude i životinje. Zato svakom napretku valja pristupati odgovorno i s oprezom, te ga uvijek promatrati u širokom ekološkom i društvenom kontekstu.

4. POPIS LITERATURE

Agapakis CM, Silver PA (2009) Synthetic biology: exploring and exploiting genetic modularity through the design of novel biological networks. *Molecular BioSystems* **5**, 704-713. <https://doi.org/10.1039/b901484e>

Alexander M (1999) Biodegradation and bioremediation, 2. izd., Academic Press, San Diego, str. 17-39.

Anderson TM (2000) Industrial fermentation processes. U: Lederberg J (ured.) Encyclopedia of microbiology, Academic Press, San Diego, str. 767–781.

Badger-Emeka LI, Emeka PM, Quadri S (2018) A five-year retrospective study of the antimicrobial susceptibility pattern of *pseudomonas aeruginosa* ICU clinical isolates in Al-Ahsa, Saudi Arabia. *Biomedical Research* **29**, 3856-3862. <https://doi.org/10.4066/biomedicalresearch.29-18-1154>.

Baranwal J, Barse B, Fais A, Delogu GL, Kumar A (2022) Biopolymer: A Sustainable Material for Food and Medical Applications. *Polymers* **2022**, **14**, 983. <https://doi.org/10.3390/polym14050983>

Bartulovic-Nad I, Lucente M, Sun Y, Zhang M, Wheeler AR (2006) Bio-Microarray Fabrication Techniques – A Review. *Critical Reviews in Biotechnology* **26**, 237–259. <https://doi.org/10.1080/07388550600978358>

Bolarić S, Trusk M, Kozumplik V, Vokurka A (2009) DNA-ČIP TEHNOLOGIJA *Agronomski glasnik* **71(3)**, 215-224.

Bridges BA (1997) Hypermutation under stress. *Nature* **387**, 557–58.

Bull AT, Ward AC, Goodfellow M (2000) Search and discovery strategies for biotechnology: The paradigm shift. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64(3)**, 573–606. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.573-606.2000>

Butu M, Ramona S, Grozea I, Corneanu M (2020) Biopesticides: Clean and Viable Technology for Healthy Environment. U: Hakeem KR (ured.) Bioremediation and Biotechnology, Sustainable Approaches to Pollution Degradation, Springer Nature Switzerland AG, Cham, str. 107-151.

Chen GQ (2012) New challenges and opportunities for industrial biotechnology. *Microbial Cell Factories* **11**, 111. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-111>

Chen GQ, Kazlauskas R (2011) Chemical biotechnology in progress. *Current Opinion in Biotechnology* **22(6)**, 747-748. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.003>

Davisson MT, Bergstrom DE, Reinholdt LG, Donahue LR (2012) Discovery Genetics - The History and Future of Spontaneous Mutation Research. *Current Protocols in Molecular Biology* **1(2)**, 103-118. <https://doi.org/10.1002/9780470942390.mo110200>

De Felice M, Mattanovich D, Papagianni M, Wegrzyn G, Villaverde A (2008) The scientific impact of microbial cell factories. *Microbial Cell Factories* **7**, 33. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-7-33>

Demain AL (2000) Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* **52**, 455–63. <https://doi.org/10.1007/s002530051546>

Demain, A. L. History of industrial biotechnology U: Sotaert V, Vandamme EJ (ured.) Industrial Biotechnology, Sustainable Growth and Economic Success, Wiley-VCH: Weinheim, 2010; str. 17-77.

Demain AL, Vandamme EJ, Collins J, Buchholz K (2017) History of Industrial Biotechnology. U: Wittmann C, Liao JC (ured.) Industrial Biotechnology: Microorganisms, Volume 1. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. str. 3-84.

Donova M (2022) Microbial Steroid Production Technologies: Current Trends and Prospects. *Microorganisms* **10**, 53. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010053>

Fessner WD, Turner NJ (2011) Biocatalysis - A Gateway to Industrial Biotechnology. *Advanced Synthesis and Catalysis* **353(13)**, 2189-2190. <https://doi.org/10.1002/adsc.201100679>

Flores N, Xiao J, Berry A, Bolivar F, Valle F (1996) Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology* **14**, 620–23. <https://doi.org/10.1038/nbt0596-620>

Fracchia L, Ceresa C, Franzetti A, Cavallo M, Gandolfi I, Van Hamme J, i sur. (2014) Industrial Applications of Biosurfactants. Biosurfactants: Production and Utilization - Processes, Technologies and Economics. Taylor & Francis, London, str. 245-268.

Heesche-Wagner K, Schwartz T, Kaufmann M (2001) A directed approach to the selection of bacteria with enhanced catabolic activity. *Letters in Applied Microbiology* **32**, 162–65. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2001.00879.x>

Hidaka T, Hidaka M, Uozumi T, Seto H (1992) Nucleotide sequence of a carboxyphosphoenolpyruvate phosphonmutase gene isolated from a bialaphos-producing organism, *Streptomyces hygroscopicus*, and its expression in *Streptomyces lividans*. *Molecular Genetics and Genomics* **233**, 476–478. <https://doi.org/10.1007/BF00265446>

Gonzalez Pereira A, Carpena M, García Oliveira P, Mejuto JC, Prieto MA, Simal Gandara J (2021) Main Applications of Cyclodextrins in the Food Industry as the Compounds of Choice to Form Host–Guest Complexes. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 1339. <https://doi.org/10.3390/ijms22031339>

Gupta GN, Srivastava S, Khare SK, Prakash, V (2014) Extremophiles: An Overview of Microorganism from Extreme Environment. *International Journal of Agriculture Environment and Biotechnology* **7 (2)**, 371. <https://doi.org/10.5958/2230-732X.2014.00258.7>

Kost T, Condreay J, Jarvis D (2005) Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology* **23**, 567–575.

<https://doi.org/10.1038/nbt1095>

Liu S, Dai J, Kang Z, Li J, Chen J, Du G (2015) Production of novel NaN₃-resistant creatine amidinohydrolase in recombinant *Escherichia coli*. *Bioengineered* **6(4)**, 248-50. <https://doi.org/10.1080/21655979.2015.1052919>

Martins AM (2014) Systems Biotechnology for Industrial Microorganisms. U: Thangadurai D, Sangeetha J (ured.) *Biotechnology and Bioinformatics: Advances and Applications for Bioenergy, Bioremediation and Biopharmaceutical Research*, Apple Academic Press, Oakville, str. 391-457.

Md F, (2012) Biosurfactant: Production and Application. *Journal of Petroleum and Environmental Biotechnology* **3**, 4 <https://doi.org/10.4172/2157-7463.1000124>

Nevalainen H, Kautto L, Te'o J (2014) Methods for Isolation and Cultivation of Filamentous Fungi. U: Clifton NJ (ured.) *Methods in molecular biology*. vol 1096. Humana Press, Totowa, str. 3-15.

Ostergaard S, Olsson L, Nielsen J (2000) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64(1)**, 34–50. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.1.34-50.2000>

Pandey P, Arora NK (2020) Prof. Ananda Mohan Chakrabarty: The Superbug Superhero!. *Environmental Sustainability* **3**, 333–335. <https://doi.org/10.1007/s42398-020-00117-x>

Panda SK, Sahu L, Behera SK, Ray RC (2020) Research and Production of Organic Acids and Industrial Potential U: Molina G, Gupta V, Singh B, Gathergood N (ured.) *Bioprocessing for Biomolecules Production*, John Wiley & Sons, Ltd. str. 195-209.

Pera LM, Baigori MD, Castro GR (2008) Biotransformations. U: C. Larroche, C.R. Soccol, C.G. Dussap, A. Pandey (ured.) U: *Advances in Fermentation Technology*, Asiatech Publishers Inc., New Delhi, str. 555-577.

Prasad K, Ranjan RK, Lutfi Z, H. Pandey H (2009) Biosensors : Applications and Overview in Industrial Automation. *International Journal on Applied Bioengineering* **3(1)**, 66-70. <https://doi.org/10.18000/ijabeg.10041>

Ruiu L (2015) Insect Pathogenic Bacteria in Integrated Pest Management. *Insects* **6**, 352-367. <https://doi.org/10.3390/insects6020352>

Schauer F, Rainer B (2004) Biocatalysis and Biotransformation. U: Tkacz JS, Lange L (ured.). *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, str. 237-306.

Shalsh FJ, Ibrahim NA, Arifullah M, Meor Hussi AS (2016) Optimization of the Protoplast Fusion Conditions of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* for Improvement of Bioethanol Production from Biomass. *Asian Journal of Biological Sciences* **9**, 10-18. <https://doi.org/10.3923/ajbs.2016.10.18>

Sindelar, Wendisch (2007) Improving lysine production by *Corynebacterium glutamicum* through DNA microarray-based identification of novel target genes. *Applied Microbiology and Biotechnology* **76(3)**, 677-89. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0916-x>

Singh R (2019) Microbial Biotechnology: A Promising Implement for Sustainable Agriculture. U: *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier, str. 107-114.

Singh V, Haque S, Niwas R, Sristava A, Pasupuleti M, Tripathi CKM (2017) Strategies for Fermentation Medium Optimization. *Frontiers in Microbiology* **7**, 2087. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02087>

Soetaert W, Vandamme E (2006) The impact of industrial biotechnology. *Biotechnology Journal* **1**, 756-769. <https://doi.org/10.1002/biot.200600066>

Szente L, Szejtli J (2004) Cyclodextrins as food ingredients. *Trends in Food Science and*

Technology **15**, 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.019>

Španović F (2018) Biosenzori (završni rad), Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet elektrotehnike, računarstva i informacijskih tehnologija Osijek

Varanda C, do Rosário Félix M, Campos MD, Materatski P (2021) An Overview of the Application of Viruses to Biotechnology. *Viruses* **13**, 2073. <https://doi.org/10.3390/v13102073>

Wang M, Si T, Zhao H (2012) Biocatalyst Development by Directed Evolution. *Bioresource Technology* **115**, 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.054>.

Xiang CC, ChenY (2000) cDNA microarray technology and its applications. *Biotechnology Advances* **18**, 35–46. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00035-X](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00035-X)

Zheng S, Jiang B, Zhang T, Chen J (2020) Combined mutagenesis and metabolic regulation to enhance D-arabitol production from *Candida parapsilosis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **47**, 425–435. <https://doi.org/10.1007/s10295-020-02278-4>

Izjava o izvornosti

Ja, Mariana Lenček, izjavlujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Mariana Lenček