

Korištenje genetički modificiranih mikroorganizama za proizvodnju enzima u prehrambenoj industriji

Kožul, Martina

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:305835>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Martina Kožul
0058217729**

**KORIŠTENJE GENETIČKI MODIFICIRANIH
MIKROORGANIZAMA ZA PROIZVODNJU ENZIMA
U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 2

Mentor: prof. dr. sc. Sunčica Beluhan

Zagreb, 2023.

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 piva i slada

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

**Korištenje genetički modificiranih mikroorganizama za proizvodnju enzima u prehrambenoj
industriji**

Martina Kožul, 0058217729

Sažetak:

Enzimi se desetljećima koriste u prehrambenoj industriji i njihova upotreba u industriji konstantno raste. Enzimi se mogu ekstrahirati iz tkiva biljaka i životinja ili se mogu dobiti fermentacijom pomoću mikroorganizama, pri čemu se mogu koristiti divlji tipovi ili genetički modificirani sojevi. Proizvodnjom enzima iz mikroorganizama postiže se veći prinos i stabilnost te ih je lakše genetički modificirati s ciljem dobivanja željenog enzima. Korištenjem genetički modificiranih mikroorganizama omogućena je ekspresija enzima u organizmima koji ne proizvode taj enzim te je ograničena proizvodnja toksina. Genetičke modifikacije mogu se dobiti primjenom rekombinantnih enzima ili modifikacijom proizvodnog soja. Jedna od novijih tehnologija za uvođenje genetičkih modifikacija je CRISPR/Cas9. Rekombinantni enzimi mogu se dobiti pomoću racionalnog dizajna, poluracionalnog dizajna i usmjerene evolucije. Europski Parlament je donio četiri uredbe za usklađivanje kriterija za procjenu i odobrenje prehrambenih aditiva, enzima i aroma. Prije stavljanja na tržište, prehrambeni enzim mora proći sigurnosnu provjeru Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA).

Ključne riječi: prehrambeni enzimi, genetički modificirani mikroorganizmi, europske uredbe, kontrola sigurnosti

Rad sadrži: 30 stranica, 6 slika, 3 tablice, 53 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: 15. lipnja 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

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

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Genetically Modified Microorganisms for Industrial Food Enzyme Production

Martina Kožul, 0058217729

Abstract:

Enzymes have been used in the food industry for decades, and their use in the industry is constantly growing. Enzymes can be extracted from plant and animal sources or obtained through microbial fermentation using either wild-type or genetically modified strains. Microbial enzyme production achieves a higher yield and stability, and it is easier to genetically modify microorganisms in order to obtain the desired enzyme. The use of genetically modified microorganisms enables the expression of enzymes in organisms that would not produce that enzyme. In addition, the production of toxins is limited. Genetic modifications can be obtained by using recombinant enzymes or by genetic modification of the production strain. One of the newer technologies for introducing genetic modifications is CRISPR/Cas9. Recombinant enzymes can be obtained by rational design, semi-rational design, and directed evolution. The European Parliament published four regulations in order to obtain a harmonized safety evaluation and approval of food additives, enzymes and flavourings. Before being placed on the market, a food enzyme must pass a risk assessment by the European Food Safety Agency (EFSA).

Keywords: food enzymes, genetically modified microorganisms, European Directives, safety control

Thesis contains: 30 pages, 6 figures, 3 tables, 53 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: June 15, 2023

SADRŽAJ

1.UVOD	1
2.TEORIJSKI DIO.....	2
2.1..INDUSTRIJSKA PROIZVODNJA PREHRAMBENIH ENZIMA.....	2
2.1.1. FERMENTACIJA I PROČIŠĆAVANJE.....	2
2.1.2. IMOBILIZACIJA I FORMULACIJA.....	3
2.2..GENETIČKI MODIFICIRANI MIKROORGANIZMI U PROIZVODNJI PREHRAMBENIH ENZIMA.....	4
2.2.1. OBILJEŽJA GMM.....	4
2.2.2. ODABIR DOMAĆINA.....	5
2.2.3. EKSPRESIJSKI VEKTORI I PROCESI TRANSFORMACIJE.....	5
2.2.4. SELEKCIJSKI MARKERI I POVEĆANA EKSPRESIJA GENA.....	6
2.3..NOVE TEHNOLOGIJE ZA UVOĐENJE GENETIČKIH MODIFIKACIJA.....	8
2.4..RAZVOJ REKOMBINANTNIH ENZIMA.....	10
2.5..EUROPSKI PROPISI O PREHRAMBENIM ENZIMIMA.....	11
2.5.1. DODACI PREHRANI I POMOĆNA SREDSTVA U PROIZVODNJI.....	11
2.5.2. PREGLED POJEDINIH EUROPSKIH ZAKONA.....	11
2.5.3. IZAZOVI I KRITERIJI UZ PRISUTNOST MIKROBA U PREHRAMBENIM ENZIMSKIM PRIPRAVCIMA.....	14
2.6..PREGLED DOSTAVLJENIH DOSJEA.....	16
2.7..GMO PROPISI I PREHRAMBENI ENZIMI.....	20
3.ZAKLJUČCI.....	24
4.POPIS LITERATURE.....	25

1. UVOD

Enzimi su proteini prisutni u svim živim organizmima, koji kataliziraju razne biokemijske reakcije. Desetljećima se koriste u prehrambenoj industriji, npr. u pekarstvu, za proizvodnju različitih sireva, bistrenje vina, piva, itd. (Robinson, 2015). Osim toga, često se koriste u tekstilnoj, papirnoj, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Procijenjena tržišna vrijednost industrijskih enzima u 2021. godini iznosila je 6,6 milijuna USD. Do 2026. godine tržišna vrijednost enzima trebala bi doseći brojku od 9,1 milijuna USD (MarketsandMarkets, 2022; Chapman i sur. 2018). Različiti su načini dobivanja enzima za njihovu upotrebu u industriji. Oni se mogu ekstrahirati iz tkiva biljaka i životinja ili se mogu dobiti fermentacijom pomoću bakterija i kvasaca, pri čemu se mogu koristiti divlji tipovi ili genetički modificirani sojevi. Proizvodnja takvih mikroorganizama se mora optimirati da se poveća produktivnost proizvodnje enzima i ograniči nastajanje neželjenih sekundarnih metabolita (Liu i Kokare, 2023).

U okviru Europske Unije, donesene su odredbe o odobravanju prehrambenih enzima, aditiva i aroma (EC broj 1331/2008; EC broj 1332/2008; EC broj 1333/2008; EC broj 1334/2008) koje omogućavaju sigurnu provjeru i procjenu enzima, aditiva i aroma prije puštanja i prodaje na tržištu (engl. *European Commission*, EC) (Deckers i sur., 2020). Pri tome, jedan od ključnih kriterija prilikom odobravanja određenog enzima je taj da krajnji proizvod neće sadržavati proizvodni soj.

U ovom radu bit će prikazana industrijska proizvodnja prehrambenih enzima (FE), s posebnim naglaskom na proizvodnju iz genetički modificiranih organizama (GMM). Nakon opisa industrijskog procesa proizvodnje enzima, bit će navedene karakteristike mikroorganizma koji će se koristiti tijekom procesa fermentacije. Te karakteristike uključuju opis kriterija odabira odgovarajućeg mikroorganizma domaćina i izbor odgovarajućih vektora i selekcijskih markera. Nadalje, bit će predočene nove tehnologije za unošenje modifikacija i razvoj rekombinantnih enzima, te propisi i posljedične procjene sigurnosti FE industrijskih pripravaka. Sažeto će biti objašnjene prihvaćene odredbe različitih GMO propisa i osiguranje njihove primjenjivost na industrijske FE, te razvijanje strategije za otkrivanje GMM u hrani. Na kraju će biti opisana studija slučaja koja predstavlja analizu komercijalnog enzimskog pripravka, a rezultirala je otkrivanjem neovlaštenog GMM-a i time naglasila važnosti razvoja odgovarajućih radnih procesa za kontrolu i praćenje FE pripravaka.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. INDUSTRIJSKA PROIZVODNJA PREHRAMBENIH ENZIMA

2.1.1. FERMENTACIJA I PROČIŠĆAVANJE

Izvori prehrambenih enzima mogu biti biljne i životinjske stanice ili ih se može dobiti fermentacijom pomoću različitih mikroorganizama. U prošlosti je sigurniji način dobivanja enzima bila ekstrakcija enzima iz biljaka i životinja jer se vjerovalo da tada enzimi nisu mogli biti kontaminirani kao što je to moguće u mikrobnim fermentacijama. Međutim, posljednjih je godina sve više pažnje usmjereno na mikrobne fermentacije zbog brojnih prednosti (Zhang i sur., 2019).

Submerzni uzgoj (engl. *Submerged Fermentation*, SmF) i uzgoj na čvrstoj podlozi (engl. *Solid-State Fermentation*, SSF) vrste su procesa koji se mogu koristiti za proizvodnju enzima iz mikroorganizama (Liu i Kokare, 2023). Za submerzni uzgoj su potrebni veliki volumeni vode i visoke koncentracije kisika, te razne miješalice kako bi se izmiješali svi sastojci hranjive podloge. Zbog jednostavnog rukovanja u velikim mjerilima i mogućnosti on-line kontrole određenih parametara, kao što su pH i temperatura, ovaj način uzgoja najčešće se primjenjuje u prehrambenoj industriji. Ovisno o vrsti radnog mikroorganizma, razlikuju se četiri vrste submerznog uzgoja: šaržni, šaržni s pritokom supstrata, polukontinuirani i kontinuirani (Patel i sur., 2023).

Ako se za proizvodnju enzima koristi soj plijesni, tad je bolje primijeniti uzgoj na čvrstoj podlozi jer bi tijekom submerznog uzgoja moglo doći do oštećenja propelera miješalice zbog viskoznosti otopine (Liu i Kokare, 2023). Istodobno, SSF je često jeftiniji od SmF-a, te se postiže veća produktivnost procesa i koncentracija produkta. Tijekom SSF-a, mikroorganizmi rastu na podlozi u kojoj su prisutni supstrat i tvari za povećanje enzimske produktivnosti (Katalinić, 2021; Deckers i sur., 2020).

Nakon završenog procesa fermentacije, enzime je potrebno pročistiti. Načini pročišćavanja ovise o tome je li enzim intracelularan ili ekstracelularan, načinu fermentacije i krajnjoj upotrebi enzima (Deckers i sur., 2020; Robinson, 2015). Ako je enzim intracelularan, prvo se mora enzimski razgraditi ili mehanički razoriti stanična stijenka i membrana. Međutim, u većini slučajeva enzimi su ekstracelularni, te ih se tada, u prvom koraku pročišćavanja, izdvaja iz stanica prisutnih u fermentacijskoj komini centrifugiranjem pri malim brzinama okretaja centrifuge. Bakterijske se stanice mogu izdvojiti flokulacijom, tijekom koje dolazi do

povezivanja stanica u veće nakupine (klastere), koje se mogu jednostavno izdvojiti iz suspenzije stanica. Nakon toga se, za dobivanje željenog stupnja pročišćenosti enzimskog pripravka, provodi pročišćavanje u više koraka, a sastoji se od filtracije, kristalizacije, elektroforeze i kromatografije (Patel i sur., 2023).

2.1.2. IMOBILIZACIJA I FORMULACIJA

U proizvodnji hrane mogu se koristiti topljivi i imobilizirani enzimi. Topljivi enzimi se najčešće koriste u šaržnim procesima u bioreaktorima s miješalom, ali ih je na kraju procesa potrebno odvojiti od neiskorištenog enzima i preostalog supstrata. Osim što je sam postupak odvajanja skup, može doći i do denaturacije enzima. U tom slučaju, za sljedeći proces mora se koristiti novi enzim (Sirisha i Jain, 2016). Imobiliziranjem enzima omogućava se ponovna uporaba enzima za višekratne šaržne procese, čime se smanjuje ukupna cijena utrošenog enzima. Metode imobilizacije temelje se na adsorpciji i kovalentnom vezanju (na nosač), ili hvatanju enzima u ili na nosač. Za industrijsku proizvodnju bolji su imobilizirani enzimi jer omogućuju korištenje reaktora s kontinuiranim protokom. Takvi reaktori omogućavaju kontinuirani dotok supstrata i izdvajanje proizvoda. Unatoč manjoj učinkovitosti imobiliziranih enzima, ovakvi reaktori smanjuju proizvodne troškove zahvaljujući boljem iskorištenju procesa. Vrlo su prikladni za industrijsku proizvodnju zbog manjih varijacija u kakvoći proizvoda i manjih proizvodnih pogona (Robinson, 2015).

Enzimi su na tržištu prisutni u 3 različita oblika. Prvo, enzim može biti u čistom obliku kakav se koristi u laboratorijima. Zatim, mogu se naći enzimski pripravci koji uz enzim sadrže i vrlo mali udio drugih supstanci dobivenih tijekom procesa fermentacije. Najčešće su to drugi (sekundarni) enzimi ili zaostali proizvodi fermentacije, te oni prolaze sigurnosnu procjenu prije komercijalne prodaje. Na kraju, postoje enzimski pripravci koji se sastoje od smjese koncentrata različitih enzima, uz dodatak stabilizatora, konzervansa i sredstva za razrjeđivanje. Ove supstancije služe za stabiliziranje enzima i štite njegovu aktivnost, te se upravo ovakvi pripravci prodaju na tržištu (Deckers i sur., 2020; Fernandes i Carvalho, 2017). Također, postoje pripravci u tekućem i čvrstom stanju. Pripravci u tekućem stanju preporučljiviji su zbog potencijalnih alergijskih reakcija koje mogu izazvati čvrsti pripravci (Patel i sur. 2023).

2.2. GENETIČKI MODIFICIRANI MIKROORGANIZMI U PROIZVODNJI PREHRAMBENIH ENZIMA

2.2.1. OBILJEŽJA GMM

Izvori industrijskih enzima su najčešće plijesni (50%), bakterije (35%), a samo 15% čine životinjski i biljni izvori. Uporaba mikroorganizama za proizvodnju enzima ima brojne prednosti. Prvo, proizvodnja enzima je ekstracelularna što pojednostavljuje i olakšava ekstrakciju prilikom postupka pročišćavanja (Robinson, 2015). Drugo, omogućena je selekcija različitih mikroorganizama u cilju dobivanja enzima sa željenim svojstvima. Treće, koriste se manji pogoni za proizvodnju koji rezultiraju nižim proizvodnim troškovima (Chang i sur., 2016). Četvrto, enzimi proizvedeni iz mikroorganizama imaju veći prinos od enzima ekstrahiranih iz biljaka i životinja. Razlog je što doba godine može utjecati na dostupnost enzima iz biljaka i životinja te samim time rezultirati smanjenim prinosom i ograničenjima u kontinuiranosti proizvodnje (Singh i sur., 2016). Zatim, enzimi proizvedeni iz mikroorganizama imaju veću stabilnost i aktivnost, npr. enzimi proizvedeni iz termofilnih mikroorganizama imaju veću otpornost na visoke temperature. Najveća prednost je što se mikroorganizmi mogu jednostavno genetički modificirati s ciljem dobivanja enzimskog preparata s boljim svojstvima i većim prinosom (Liu i Kokare, 2023). Nadalje, korištenjem genetički modificiranih mikroorganizama omogućena je ekspresija enzima u organizmima koji ne proizvode taj enzim i limitirana je proizvodnja neželjenih metabolita (mikotoksini). Genetičke modifikacije mogu se provesti primjenom rekombinantnih enzima ili modifikacijom proizvodnog soja. Rekombinantni enzimi koriste se za poboljšanje svojstava enzima, npr. aktivnosti, pH i temperaturnog optimuma (Trono, 2019). Za uspješnu konstrukciju rekombinantnog soja treba voditi računa o izboru domaćina koji sadrži određene karakteristike za ekspresiju i proizvodnju željenog enzima, vrsti ekspresijskog vektora, upotrijebljenim transformacijskim metodama i selekcijskim markerima koji se koriste za selekciju transformiranih sojeva (Hui i sur., 2008). Deckers i sur. (2020) spominju kako korištenje genetički modificiranih mikroorganizama (engl. *Genetically Modified Microorganisms*, GMM) za proizvodnju prehrambenih enzima omogućuje kombinaciju odgovarajućih proizvodnih sojeva s proizvodnjom željenih enzima. Također, korištenje genetičkih modifikacija omogućuje deleciju gena kako bi se spriječila ekspresija štetnih sekundarnih metabolita.

2.2.2. ODABIR DOMAĆINA

Bakterije su jeftini i jednostavni domaćini s višestrukim sustavima za ekspresiju. Kod bakterija je prisutan problem savijanja proteina i to rezultira nastajanjem jednostavnih proteina. Bakterije nemaju puno posttranslacijskih modifikacija, pa u tom slučaju enzim neće biti aktivan ako nisu napravljene posttranslacijske modifikacije. S druge strane, kao domaćin mogu se koristiti i sojevi nitastih gljiva koji omogućuju savijanje proteina i kod kojih su prisutne posttranslacijske modifikacije. Uz to, nitaste gljive olakšavaju postupak pročišćavanja izlučujući ograničenu količinu sekundarnih proteina u medij (Deckers i sur., 2020; Demain i Vaishnav, 2009).

Escherichia coli, *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* i *B. amyloliquefaciens* su bakterijske vrste koje se najčešće koriste kao domaćini. Zbog postojanja brojnih molekularnih alata dostupnih za *E. coli*, olakšana je proizvodnja enzima s visokim prinosom. No, potrebni su dodatni koraci pročišćavanja zbog ekspresije proteina u citoplazmu. S druge strane, *B. subtilis* se više koristi u proizvodnji proteaza i α -amilaza zbog sposobnosti lučenja veće količine enzima u podlogu (Trono, 2019; Yan i Wu, 2017).

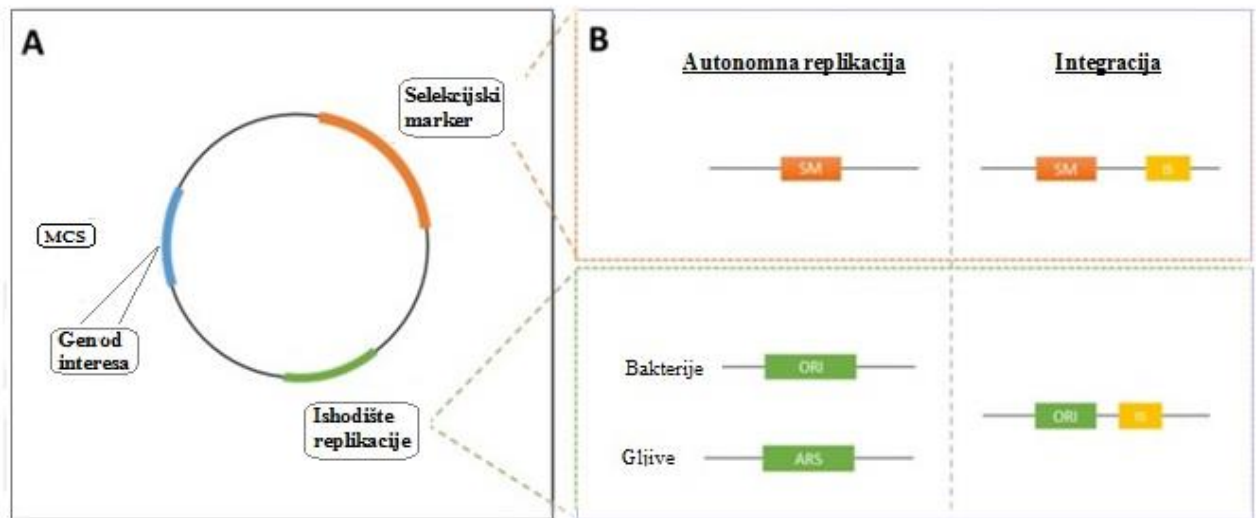
Aspergillus niger, *A. oryzae* i *Trichoderma reesei* su vrste nitastih gljiva koje se često koriste kao domaćin (Meyer, 2008). Primjerice, plijesan *A. oryzae*, koja se već desetljećima koristi u proizvodnji fermentirane hrane, proizvodi mikotoksin aflatoksin. Iz tog razloga proizveden je mutirani soj BECh2 u kojem su geni za aflatoksin i ciklopiazonsku kiselinu deletirani te je smanjena proizvodnja kojične kiseline. Za proizvodnju triacilglicerol lipaze i glukoza oksidaze, kao domaćin koristi se soj BECh2 (Deckers i sur., 2020).

2.2.3. EKSPRESIJSKI VEKTORI I PROCESI TRANSFORMACIJE

Ekspresijski vektori se koriste za ekspresiju nekog gena, najčešće u svrhu izolacije željenog proteina. Ekspresijski vektori sastoje se od ishodišta replikacije (ori), polilinkera (engl. *Multiple Cloning Site*, MCS), selekcijskog markera (SM), te promotorskih i terminatorskih regija koje reguliraju ekspresiju željenog gena i selekcijskog biljega (Rieder i sur., 2021).

Ekspresijski vektori mogu biti integrativni i episomalni. Integrativni plazmid nastaje ugradnjom vektora u genom domaćina, dok je episomalni vektor ekstrakromosomska molekula DNA koja se autonomno replicira u stanici domaćina. Kod eukariota često se koriste tzv. shuttle vektori koji se mogu replicirati u dva ili više različitih organizama (Deckers i sur., 2020;

Stavrou i sur., 2019). Na slici 1 mogu se vidjeti dijelovi ekspresijskog vektora kao i prikaz integrativnog i episomalnog plazmida.



Slika 1. Shematski prikaz ekspresijskog vektora. **A.** Ekspresijski vektori sadrže ishodište replikacije (ORI), višestruko mjesto kloniranja (MCS) u koje je integriran gen od interesa i slijedi seleksijski marker (SM). **B.** Episomalni i integrativni plazmid. ARS, autonomna replikacijska sekvenca; IS, integracijsko mjesto (Deckers i sur., 2020)

Cijepanje vektora i daljnja integracija u genom domaćina omogućena je preko dva integracijska mjesta koja okružuju polilinker. Ugradnja u genom domaćina provodi se u određeni lokus. Za episomalne plazmide nužna je prisutnost ishodišta replikacije koje je kompatibilno s ishodištem replikacije domaćina. Autonomna replikacijska sekvenca (engl. *Autonomously Replicating Sequence*, ARS) kod eukariota slična je ishodištu replikacije kod prokariota. Postoje različite metode genetičkih transformacija kojima se DNA prenosi u organizam domaćina. Neke od njih su: elektroporacija, konjugacija, upotreba kompetentnih stanica i metode protoplastiranja koja se uglavnom koristi kod transformacije eukariota (Deckers i sur., 2020).

2.2.4. SELEKCIJSKI MARKERI I POVEĆANA EKSPRESIJA GENA

Većinom je gen za antimikrobnu rezistenciju način selekcije prokariota i eukariota. Taj seleksijski biljeg može biti specifičan samo za prokariote ili za eukariote ili se može primijeniti na oba organizma. Kako bi izbjegli korištenje gena za antimikrobnu rezistenciju jer mogu biti rizični za ljudsko zdravlje, mogu se koristiti i auktotrofni mutanti koji zahtijevaju dodatak neke

aminokiseline ili druge hranjive tvari nužne za rast. Ovaj je način poželjan u industriji kako bi se osigurala stabilnost unesenog plazmida (Rieder i sur., 2021). Kod bakterija su najčešći geni za antimikrobnu rezistenciju na antibiotik *kan^R* (rezistencija na antibiotik kanamicin), *tet^R* (rezistencija na antibiotik tetraciklin) i *amp^R* (rezistencija na antibiotik ampicilin). Nitaste (filamentozne) gljive kao selekcijski marker uglavnom koriste auksotrofne markere. Primjer auksotrofnog markera je acetamidaza *amdS* koja hidrolizira acetamid do acetata i amonijaka. Korištenjem acetamida kao izvora dušika možemo selekcionirati sojeve transformirane markerom *amdS*. *AmdS* uglavnom se preferira za primjenu u industriji zato što ga sojevi domaćina *A. niger* i *A. oryzae* nemaju. Osim *amdS-a*, kao auksotrofni marker koristi se i *URA3* iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae* koji kodira za enzim orotidin-5'-fosfat dekarboksilazu potreban u biosintetskom putu za uracil (Pranklin, 2015).

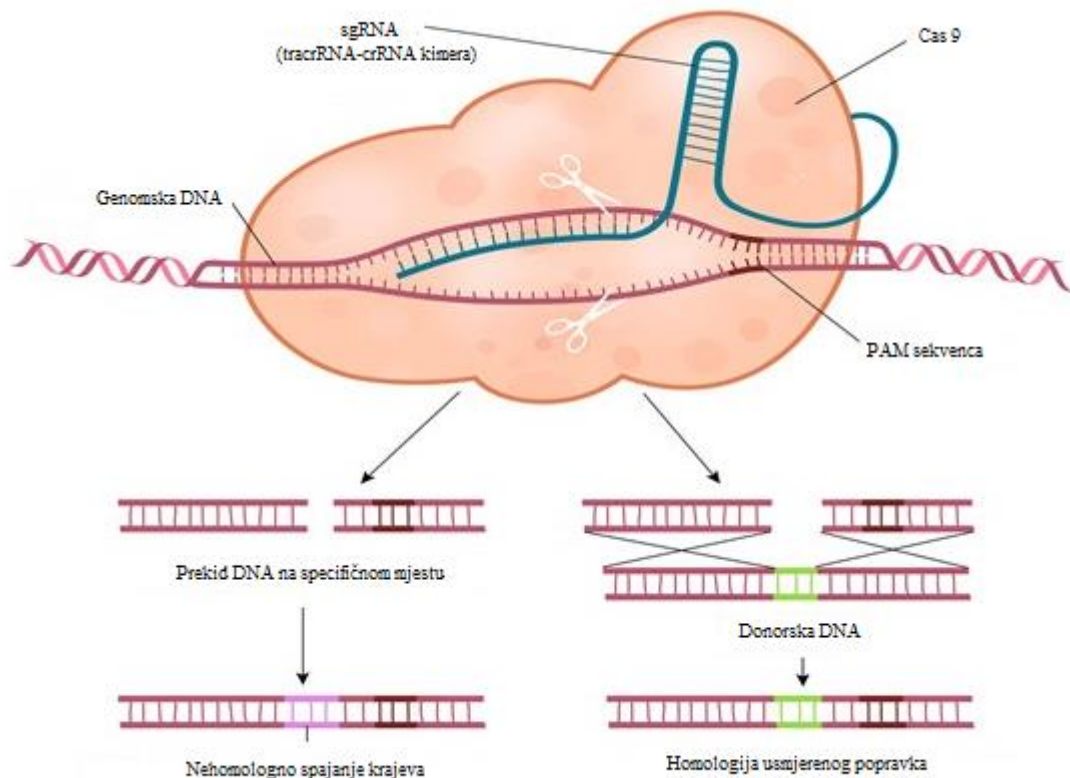
S ciljem dobivanja većeg prinosa enzima, esencijalna je zadovoljavajuća ekspresija gena. Za povećanje ekspresije koristi se strategija višestruke integracije. U tom slučaju na raspolaganju su razne strategije: 1) postizanje jakog antibiotskog pritiska, 2) upotreba ogromne količine DNA tijekom procesa transformacije, 3) primjena dviju kopija željenog gena koji se u ekspresijskom vektoru nalazi u oba smjera i, 4) uzastopna integracija ekspresijskih konstrukata koji sadrže različite vrste selekcijskih biljega. Jak antibiotski pritisak postiže se primjenom slabijeg promotora za selekcijski marker ili upotrebom visoke koncentracije antibiotika (Rieder i sur., 2021). Međutim, u industriji je potreban dugotrajan postupak uzgoja zbog čega integracija višestrukih kopija predstavlja problem jer negativno utječe na stabilnost dobivenog soja (Deckers i sur., 2020). Posttransformacijska amplifikacija vektora primjer je metode kod koje se koncentracija antibiotika povećava i pomoću koje se mogu selekcionirati sojevi s višestrukim insercijama (Sunga i sur., 2008). Snaga promotora također je važan čimbenik u povećanju ekspresije gena. Nadalje, razlikuju se dvije vrste promotora: konstitutivni i inducibilni promotori. Ekspresija konstitutivnih promotora ne ovisi o abiotičkim i biotičkim čimbenicima, dok ekspresija kod inducibilnih promotora ovisi o tome je li neki abiotički ili biotički faktor prisutan ili odsutan (Fitz i sur., 2018; Rešetar, 2018). Rod *Bacillus* koristi 2 gena kao promotore: gen *amyL* (α -amilaza *B. licheniformis*) i gen *amyM* (maltogena amilaza *B. stearothermophilus*). Kod filamentoznih gljiva (*A. oryzae*) često se koristi TAKA amilazni promotor (Christensen i sur., 1988). Ekspresija inducibilnog TAKA promotora inducirana je transkripcijskim aktivatorom *amyR* (ekspresija amilolitičkog gena), dok je potisnuta prisutnošću regulatora *creA* (represor ugljikovog katabolita). *Cbh I* (promotor gena za

celulobiohidrolazu I) induciran celulozom još je jedan inducibilni promotor koji se koristi kod *T. reesei* i ostalih nitastih gljiva (Zou i sur., 2012).

Također, moguća je upotreba dvosmjernih promotora (engl. *Bidirectional Promoters*, BDPs) koji omogućuju reguliranu ekspresiju jednog ili više gena u oba smjera od promotora (Ahmad i sur., 2021; Rajamanickam i sur., 2017). Moguće je ostvariti kombiniranu ekspresiju selekcijskog markera i željenog gena (Deckers i sur., 2020). Međutim, veći broj setova promotora mora biti na raspolaganju kako bi se dopustila upotreba dvosmjernih promotora u industriji. Dvosmjerni promotori moraju kombinirati regulatorne profile koji variraju ovisno o smjeru ekspresije i moraju predstavljati drugačije razine ekspresije. Zbog toga su Vogl i sur. (2018) uspostavili banku dvosmjernih promotora koja omogućava korištenje organizama kao što je kvasac *Pichia pastoris* u ulozi domaćina u nastajanju.

2.3. NOVE TEHNOLOGIJE ZA UVOĐENJE GENETIČKIH MODIFIKACIJA

Posljednjih nekoliko godina počele su se pojavljivati nove tehnologije genetičkog inženjerstva. Jedna od njih je CRISPR/Cas9 (CRISPR= *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*; Cas= CRISPR associated protein). Kratka palindromska ponavljanja (CRISPR) zajedno s razmaknicom koja se nalazi između njih, pronađena su u bakterijskim imunološkim sustavima (Song i sur., 2019). Protein Cas9 ima endonukleaznu aktivnost te uvodi dvostrani lom u željenu DNA. Genomska DNA može se popraviti pomoću 2 mehanizma. Prvi mehanizam je nehomologno spajanje krajeva (engl. *Non-homologous end joining*, NHEJ), no ovaj mehanizam sklon je pogreškama te dolazi do mutacija u obliku malih insercija ili delecija. Drugi mehanizam je homologija usmjerenog popravka (engl. *Homology directed repair*, HDR) pomoću kojeg se može ubaciti neka sekvenca, fragment DNA. Ta sekvenca poslužit će kao kalup za popravak dvostranog loma i na taj se način na točno određenom mjestu uvodi željena modifikacija (Song i sur., 2019; Donohoue i sur., 2018; Savić i Schwank, 2016). Na slici 2 prikazano je uređivanje genoma pomoću sustava CRISPR-Cas9 u kojem sgRNA (engl. *single-guide RNA*) prepoznaje ciljanu sekvencu i tamo usmjerava protein Cas za uređivanje. Sekvencija PAM (engl. *Protospacer Adjacent Motif*) nalazi se uz regiju koja će se pocijepati te je ona neizostavna za endonukleaznu aktivnost proteina Cas. crRNA predstavlja CRISPR RNA, dok tracrRNA predstavlja traker RNA (Savić i Schwank, 2016).



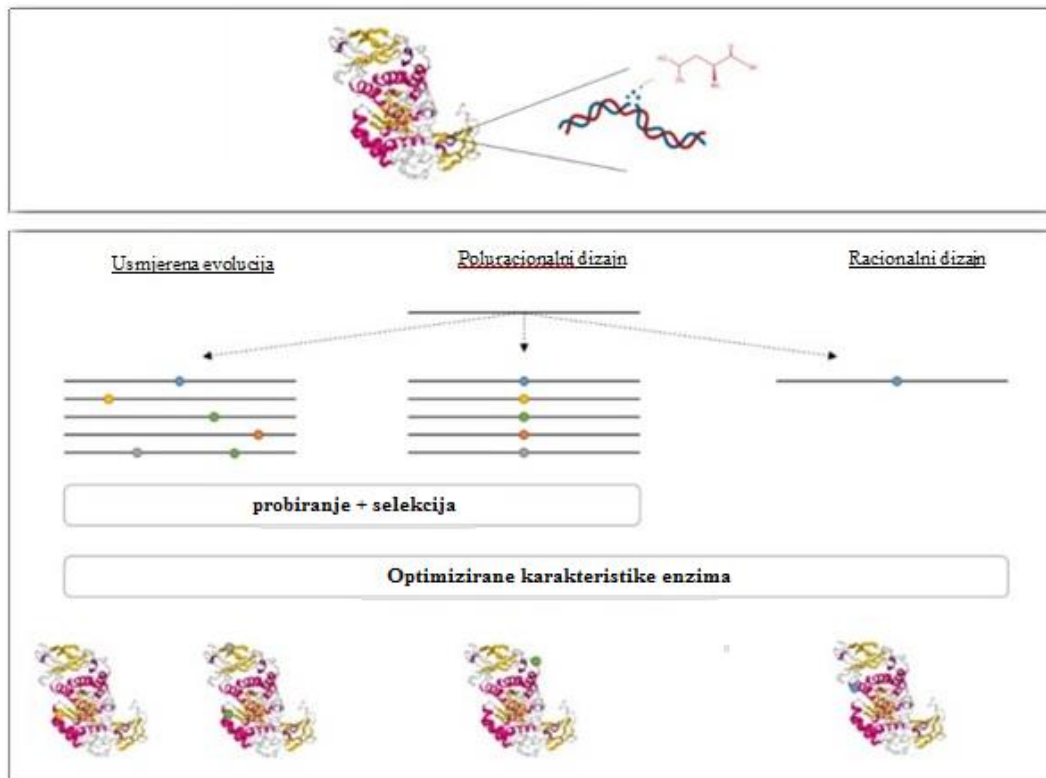
Slika 2. Uređivanje genoma pomoću sustava CRISPR-Cas9 (Savić i Schwank, 2016)

Većina bakterija ne sadrži mehanizam nehomolognog spajanja krajeva, zbog čega te bakterije ne mogu koristiti sustav CRISPR-Cas9 za popravak dvolančanih lomova. Samim time, dolazi do smrti sojeva divljeg tipa (Börner i sur., 2019). Međutim, to pruža mogućnost korištenja sustava CRISPR-Cas9 za selekciju rekombinantnih sojeva i ujedno kao alternativa genima s antimikrobnim rezistencijama (Donohoue i sur., 2018).

Korištenjem sustava CRISPR-Cas9 pojačana je proizvodnja pululanaze u *B. subtilis*. Obzirom da proteaze imaju sposobnost razgradnje heterolognih enzima kao što je pululanaza, dolazi do ometanja gena za proizvodnju pululanaze (Zhang i sur., 2018). Osim toga, mogu se omesti geni s nepoželjnim karakteristikama (npr. stvaranje pjene tijekom fermentacije) s ciljem nastajanja boljeg soja koji se koristi u proizvodnji enzima (Zhang i sur., 2016). Sustav CRISPR-Cas9 koristi se za precizno popravljjanje eukariotskih genoma. Primjerice, deletiran je gen *ku70* u razvijenom soju *Penicillium subrubescens*. Ovom delecijom potencira se HDR i insercija željene sekvencije na mjestu dvolančanog loma jer je deletiran gen *ku70* koji je dio NHEJ-a (Salazar-Cerezo i sur., 2020).

2.4. RAZVOJ REKOMBINANTNIH ENZIMA

Uz mogućnost modifikacije soja, može se modificirati i enzim s ciljem poboljšanja svojstava tog enzima. Ovisno o poznatim svojstvima enzima, 3D strukturi i slijedu enzima, postoje 3 tehnike prikazane na slici 3 kojima možemo dobiti rekombinantni enzim. To su: racionalni dizajn, poluracionalni dizajn i usmjerena evolucija (Zhang i sur., 2019; Fernandes i Carvalho, 2017; Sanchez i Demain, 2017).



Slika 3. Tri različita načina konstrukcije rekombinantnih proteina (Deckers i sur., 2020)

Racionalni dizajn se koristi za modifikaciju određene aminokiseline koja je povezana sa svojstvom koji se želi poboljšati na način da se primjenjuje zamjena, delecija ili insercija neke regije DNA koja kodira za tu aminokiselinu. Prilikom primjene racionalnog dizajna potrebno je poznavati kemijski mehanizam kao i 3D strukturu enzima (Zhang i sur., 2019; Trono, 2019; Sanchez i Demain, 2017).

Poluracionalni dizajn kombinacija je racionalnog dizajna i usmjerene evolucije. Kod ove tehnike nisu poznate informacije o modifikacijama koje trebaju biti napravljene kako bi dobili željeni enzim. Međutim, poznate su informacije o funkciji i strukturi enzima. Zbog izostanka

saznanja o modifikacijama, prvi korak u ovoj tehnici je uvođenje mutacije u određenu regiju aminokiseline. Nakon toga, potrebno je provesti pregled i procjenu na ploči s agarom kako bi se izabrali modificirani enzimi s odgovarajućim svojstvima (Zhang i sur., 2019; Trono, 2019). Usmjereni evolucija je tehnika kod koje nije potrebno poznavati strukturu i funkciju enzima. Ovaj pristup podrazumijeva provedbu 2 koraka. Prvi korak je nasumična mutagenaza koja se može postići: izlaganjem UV zračenju, PCR-om u kojem je veća učestalost pogrešaka, te kemijskom mutagenozom. U drugom koraku je potrebno provesti pregled i procjenu na ploči s agarom kao i kod poluracionalnog pristupa (Zhang i sur., 2019; Sanchez i Demain, 2017).

2.5. EUROPSKI PROPISI O PREHRAMBENIM ENZIMIMA

2.5.1. DODACI PREHRANI I POMOĆNA SREDSTVA U PROIZVODNJI

Neki prehrambeni enzimi, ovisno o utjecaju na prehrambeni proizvod, mogu se svrstati u kategoriju dodataka prehrani ili u kategoriju pomoćnih sredstava. Navedene kategorije zahtijevaju drugačije propise u okviru zahtjeva označavanja proizvoda (Deckers i sur., 2020). Prema EUR-Lex, (2023) dodaci prehrani namjerno se dodaju u hranu u tehnološke svrhe, npr. za konzerviranje hrane. Dodaci prehrani mogu se odobriti i koristiti samo ako zadovoljavaju uvjete iz Uredbe br. 1332/2008 Europskog parlamenta i vijeća te su prošli procjenu rizika Europske agencije za sigurnost hrane (engl. *European Food Safety Agency*, EFSA) (EUR-Lex, 2023).

Pomoćna sredstva su tvari koje se koriste u procesu prerade sirovina i hrane kako bi se ispunila odgovarajuća tehnološka namjena tijekom prerade. Uz to, u Članku 3. Uredbe br. 1333/2008, navodi se da dodatak pomoćnih sredstava za obradu može dovesti do prisutnosti ostataka tvari ili njezinih derivata u konačnom proizvodu, uz uvjet da ne predstavljaju nikakav zdravstveni rizik i da nemaju nikakav tehnološki učinak na taj konačni proizvod (EUR-Lex, 2023).

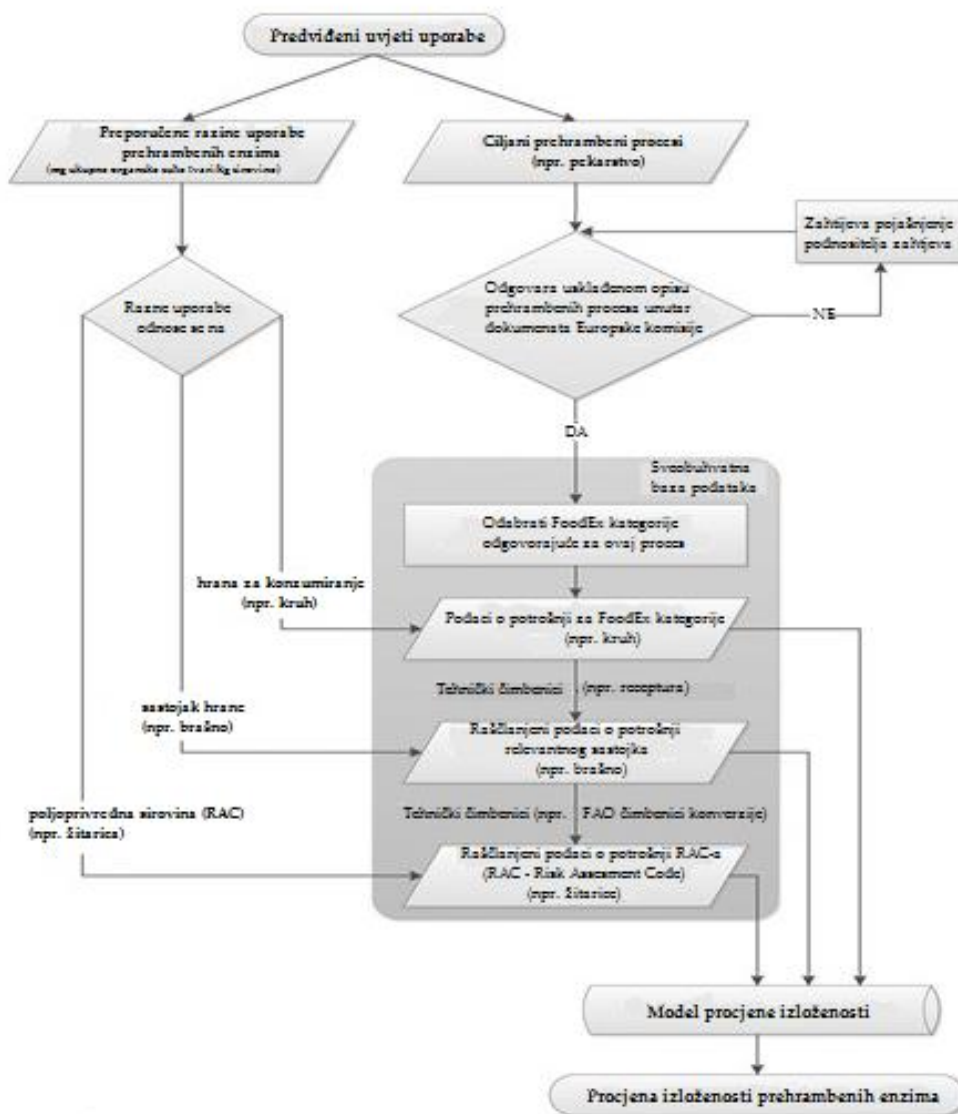
2.5.2. PREGLED POJEDINIH EUROPSKIH ZAKONA

Obzirom da je industrija i dalje odgovorna za kvalitetu enzima dostupnih na europskom tržištu, Europski Parlament je 2008. godine donio četiri uredbe pomoću kojih se utvrđuje usklađenost kriterija i zahtjeva za procjenu i odobrenje prehrambenih aditiva, prehrambenih enzima i aroma. Četiri donesene uredbe su: Uredba br. 1331/2008, Uredba br. 1332/2008, Uredba br. 1333/2008 i Uredba br. 1334/2008. Uredba br. 1331/2008 govori o uspostavi zajedničkog

postupka odobravanja prehrambenih aditiva, prehrambenih enzima i aroma; Uredba br. 1332/2008 je o prehrambenim enzimima i o izmjeni Direktive Vijeća iz 2001. godine; Uredba br. 1333/2008 je o prehrambenim aditivima, dok Uredba br. 1334/2008 govori o aromama i određenim sastojcima hrane s osobinama aroma za upotrebu u hrani. Kao rezultat spomenutih uredbi formirani su popisi zajednice dopuštenih prehrambenih enzima, aditiva i aroma na europskom tržištu (Deckers i sur., 2020). Prema Uredbi br. 1332/2008, samo oni prehrambeni enzimi koji su na popisu zajednice, mogu se staviti na tržište i koristiti u hrani. Prehrambeni enzim će biti uvršten na popis zajednice samo ako na osnovu dostupnih znanstvenih dokaza ne predstavlja zdravstveni rizik za potrošače, za njim postoji tehnološka potreba i njegova upotreba ne dovodi potrošače u zabludu (EUR-Lex, 2012). U Članku 7. Uredbe br. 1332/2008 prikazane su informacije o prehrambenom enzimu koje moraju biti sadržane u popisu zajednice, a to su:

- (a) naziv prehrambenog enzima;
- (b) specifikacije prehrambenog enzima, uključujući njegovo podrijetlo, kriterije čistoće i sve druge potrebne informacije;
- (c) hrana kojoj se može dodati prehrambeni enzim;
- (d) uvjeti pod kojima se prehrambeni enzim može koristiti; prema potrebi, ne utvrđuje se maksimalna koncentracija za prehrambeni enzim. U tom slučaju, prehrambeni enzim se mora koristiti u skladu s načelom *quantum satis* (proizvođač smije u skladu s dobrom proizvođačkom praksom (DPP) određenoj namirnici dodati onu količinu enzima koja je nužna da se postigne učinak zbog kojeg se enzim uporablja);
- (e) ako je prikladno, postoje li ograničenja u prodaji prehrambenog enzima izravno krajnjem potrošaču;
- (f) prema potrebi, posebne zahtjeve u pogledu označavanja hrane u kojoj su korišteni prehrambeni enzimi kako bi se osiguralo da je krajnji potrošač obaviješten o fizičkom stanju hrane ili posebnoj obradi kojoj je podvrgnuta (EUR-Lex, 2012).

Prehrambeni enzim, prije stavljanja na popis zajednice, mora procijeniti Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) koja daje svoje znanstveno mišljenje na temelju kojeg Europska komisija donosi popis zajednice (Deckers i sur., 2020; EUR-Lex, 2012). Cilj procesa procjene koju provodi EFSA je identificirati sve potencijalno opasne spojeve te procijeniti rizik za ljudsko zdravlje pomoću toksikoloških testova (EFSA, 2016). Detaljniji postupak procesa procjene rizika prikazan je na slici 4.



Slika 4. Dijagram toka metodologije procjene izloženosti za prehrambene enzime na temelju EFSA-ine Opsežne europske baze podataka o potrošnji hrane (EFSA, 2016).

U Uredbi br. 1332/2008 spomenuto je kako su prehrambeni enzimi invertaza (E1103) i lizozim (E1105) odobreni kao prehrambeni aditivi. Uredba br. 1493/1999 dozvoljava upotrebu lizozima, β -glukanaze i ureaze u vinu (Deckers i sur., 2020; EUR-Lex, 2012). Također, u Uredbi br. 1332/2008 u uvodnom dijelu napisano je da će ti prehrambeni enzimi biti obuhvaćeni unutar popisa zajednice uz koje će biti označene i primjene enzima u skladu s Uredbom (EC) br. 1493/1999 i Uredbom (EC) br. 423/2008 (EUR-Lex, 2012). Nakon 2008. godine objavljeno je nekoliko novih zakona, kao i izmjena postojećih zakona. Europska komisija 10. ožujka 2011. donosi Uredbu (EC) br. 234/2011 o provedbi Uredbe (EC) br.

1331/2008 Europskog parlamenta i Vijeća o uspostavljanju zajedničkog postupka odobravanja prehrambenih aditiva, prehrambenih enzima i prehrambenih aroma. Ova Uredba sadrži svu potrebnu dokumentaciju koju podnositelj zahtjeva mora dostaviti kako bi se omogućila cjelokupna provjera tvari (Deckers i sur., 2020; EUR-Lex, 2021). Uz potrebne podatke za podnošenje zahtjeva, ovom Uredbom utvrđen je i vremenski okvir podnošenja zahtjeva. Uredbom br. 1056/2012 rok za predaju zahtjeva produžen je s 24 na 48 mjeseci (Deckers i sur., 2020).

Pojam statusa kvalificirane pretpostavke o sigurnosti (engl. *Qualified Presumption of Safety Status*, QPS) uveden je 2003. godine kako bi se uskladila procjena sigurnosti mikroorganizama. „QPS je postupak za procjenu sigurnosti mikroba koji se upotrebljavaju u prehrambenom lancu. U okviru QPS-a upotrebljavaju se postojeće spoznaje o sigurnosti određenih mikroba kako bi se razlikovali mikrobi koji ne izazivaju zabrinutost (i kojima se može dodijeliti status QPS-a) od mikroba koji mogu predstavljati rizik i koje treba podvrgnuti cjelovitoj procjeni sigurnosti” (Herman i sur., 2019). Popis mikroorganizama s QPS statusom prvi je put uspostavljen 2007. godine te je ažuriran jednom godišnje sve do 2014. godine. Nakon 2014. godine, ažuriranja se provode i objavljuju svake 3 godine (EFSA BIOHAZ, 2023). Prvi QPS popis objavljen je 2016. godine (Ricci i sur., 2017). Ako se saznaju neke nove informacije koje bi promijenile QPS, to se objavljuje u izjavi komisije koja pokriva prethodnih 6 mjeseci (EFSA BIOHAZ, 2023). Sewalt i sur. (2016) spominju kako se QPS status može usporediti s GRAS statusom (engl. *Generally Recognised As Safe*).

2.5.3. IZAZOVI I KRITERIJI UZ PRISUTNOST MIKROBA U PREHRAMBENIM ENZIMSKIM PRIPRAVCIMA

Ključna zadaća EFSA-e je osigurati sigurnost u prehrambenom lancu. Sigurnosna provjera samog izvora proizvodnje, posebice ako ima toksigeni i patogeni potencijal, bitan je korak u provjeri nekog prehrambenog enzima, naročito ako je dobiven iz nekog mikroorganizma (Deckers i sur., 2020). U Članku 5, Uredbe br. 234/2011, objašnjene su opće odredbe o potrebnim podacima za procjenu rizika. Uz sve navedeno u Članku 5., moraju se dostaviti i dodatni podaci koji su potrebni za procjenu rizika prehrambenih enzima opisani u Članku 8. i Članku 9. Uredbe br. 234/2011. Podaci o korištenom izvoru dio su podataka koji moraju biti dostavljeni EFSA-i od strane podnositelja zahtjeva (EUR-Lex, 2021). Uredba br. 234/2011 nadopunjena je 27. ožujka 2021. u kojoj je navedeno da dokumentacija koja je dostavljena zajedno sa zahtjevom za procjenu sigurnosti ne mora sadržavati toksikološke podatke u dva

slučaja. U prvom slučaju, kad je taj prehrambeni enzim dobiven od jestivih dijelova biljaka ili životinja, a u drugom, ako je dobiven od mikroorganizma koji imaju QPS status. Međutim, prvi slučaj ne vrijedi ako su te biljke ili životinje genetički modificirane (EUR-Lex, 2021). U slučaju da je prehrambeni enzim dobiven iz genetički modificiranih organizama, moraju se dostaviti dodatne informacije za ocjenu odgovarajućeg proizvoda. Sve potrebne informacije sadržane su u dokumentu „Smjernice za procjenu rizika genetski modificiranih mikroorganizama i njihovih proizvoda namijenjenih prehrani i hrani za životinje” koji je usvojio EFSA GMO panel 2006. godine. Neke od informacija u ovom dokumentu su: karakteristike soja primatelja ili roditeljskog soja; informacije o svim prethodnim modifikacijama koje su napravljene kako bi se dobio organizam primatelja; načini, tehnike detekcije i identifikacije organizma roditelja ili primatelja; informacije o podrijetlu donirane sekvence; značajke korištenog vektora, kao i informacije o genetičkoj stabilnosti organizma primatelja (EFSA, 2011).

Za sve prehrambene enzime dobivene iz genetički modificiranih mikroorganizama i za one dobivene iz negenetički modificiranih mikroorganizama, ali koje sadrže gene za rezistenciju na antibiotike, mora se provesti PCR analiza (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR), kako bi se testirala prisutnost DNA iz proizvodnog soja (Deckers i sur., 2020). Također, za prehrambene enzime dobivene iz GMM-a, podnositelj zahtjeva mora istražiti i potvrditi odsutnost živih stanica u proizvodnom soju. Nužno je provesti i uključiti sljedeće kontrole i testove osjetljivosti:

- a) ukupnu DNA iz proizvodnog soja, kao pozitivnu kontrolu za PCR;
- b) ukupnu DNA iz proizvodnog soja dodanu u uzorak proizvoda prije procesa ekstrakcije DNA, počevši od poznate količine uz različita razrjeđenja do iscrpljivanja DNA, za izračunavanje LoD;
- c) pozitivnu kontrolu s ukupnom DNA iz proizvodnog soja, dodanu ekstrahiranoj DNA iz svake od tri serije testiranog proizvoda, za provjeru svih čimbenika koji uzrokuju neuspjeh PCR-a;
- d) negativnu kontrolu bez uzorka.

U svrhu ove procjene, podnositelj bi trebao istražiti ima li ciljna DNA otkrivena analizom LoD od 10 ng DNA po g ili mL proizvoda ili niže (engl. *Limit of Detection*, LoD) (EFSA, 2021).

Svi podaci vezani uz proizvodne sojeve prenose se EFSA-i i samim time ti podaci su nedostupni kontrolnim laboratorijima koji bi htjeli kontrolirati prehrambene enzime dostupne na europskom tržištu. Ovo onemogućava laboratorijima provjeru usklađenosti enzimskih pripravaka s načelima sigurnosti EFSA-e. Iz Uredbe br. 2001/18/EC i Uredbe br. 1829/2003 Europskog parlamenta prikazano je da nepostojanje metode detekcije te granica od 10 ng/mL

koja je postavljena za procjenu rizika, predstavlja problem kod određivanja prisutnosti genetički modificiranih organizama u hrani (Deckers i sur., 2020).

2.6. PREGLED DOSTAVLJENIH DOSJEA

Napravljen je popis dostavljenih dosjea prema Uredbi br. 1332/2008 Europske Komisije koji se može koristiti za pregled korištenih enzima na europskom tržištu. U Članku 17. Uredbe br. 1332/2008 o prehranbenim enzimima utvrđeno je razdoblje u kojem se mogu podnositi zahtjevi za uvrštavanje enzima na popis EU. Taj određeni period trajao je od 11. rujna 2011. do 11. ožujka 2015. godine. U tom razdoblju Komisija je primila preko 300 zahtjeva (Deckers i sur., 2020). Detaljniji podaci prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Pregled svih predanih dosjea o prehranbenim enzimima Europskoj Komisiji na procjenu i uvrštavanje na popis zajednice prema Uredbi br. 1332/2008 Europske komisije (Deckers i sur., 2020)

STATUS DOSJEA	BROJ DOSJEA
Dostavljeni dosjei (u zakonskom roku)	303
Povučeni dosjei	8
Neprihvaćeni dosjei	5
Podneseni dosjei (nakon zakonskog roka)	11
Ocijenjeni dosjei	74
Evaluacije u tijeku	216

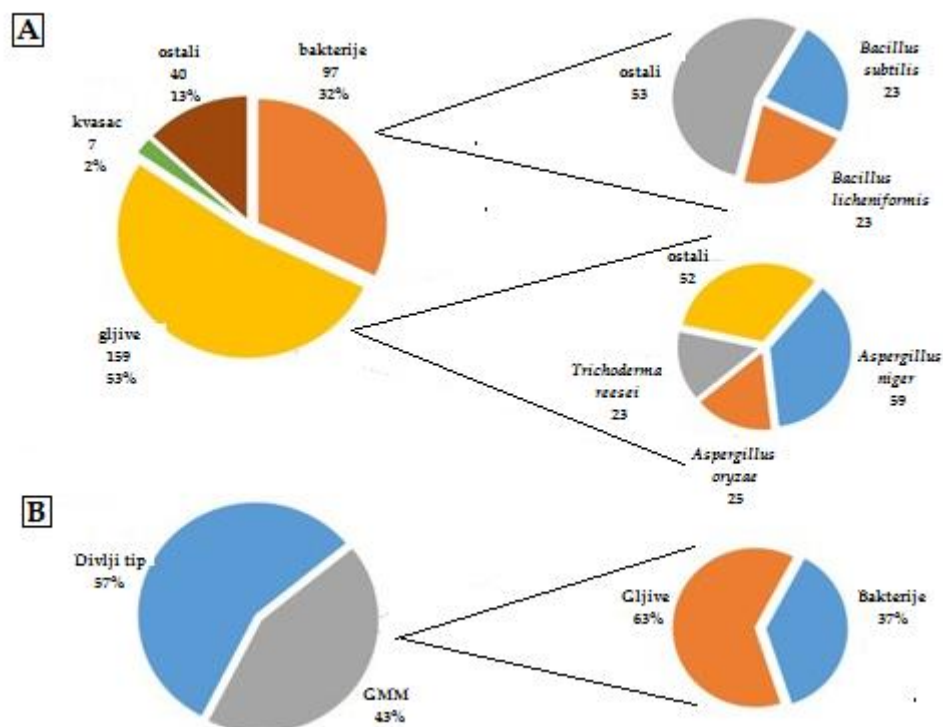
Prema reakcijama koje kataliziraju, enzimi se dijele u 6 skupina: oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze i ligaze. Zahvaljujući detaljnoj analizi dostavljenih dosjea, utvrđeno je 10 najboljih enzima koji su najčešće korišteni i proizvedeni. Tih 10 enzima pripada u skupinu hidrolaza (Patel i sur., 2023; Fernandes i Carvalho, 2017). Prikaz enzima kao i njihova primjena u prehrambenoj industriji prikazane su u tablici 2.

Tablica 2. Pregled deset najboljih prehrambenih enzima (FE) spomenutih u 303 dostavljena dosjea (Deckers i sur., 2020)

ENZIM	SKUPINA ENZIMA	BROJ DOSJEA	PRIMJENA ENZIMA U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI	BROJ DOSJEA
α -amilaza	3	31	Pekarski proizvodi i ostali proizvodi na bazi žitarica (npr. tjestenina, grickalice, rezanci)	70
Triacilglicerol lipaza	3	21	Prerada mliječnih proizvoda (prerada sirutke)	63
Ksilanaza	3	21	Proizvodnja aroma	51
β -galaktozidaza (laktaza)	3	12	Pivo i ostala pića na bazi žitarica	49
Glukoamilaza	3	12	Prerada škroba	42
Proteaza	3	10	Destilirana alkoholna pića na bazi žitarica	37
Endo-1,3(4)- β -glukanaza	3	9	Prerada voća i povrća	36
Celulaza	3	8	Prerada proteina	34
Ciklomaltodekstrin glukanotransferaza	2	7	Prerada kvasca	32
Poligalakturonaza	3	7	Prerada ulja i masti	18

Nadalje, proučavanjem dostavljenih dosjea o prehrambenim enzimima uočeno je da je 87% prehrambenim enzima dobiveno mikrobnom fermentacijom. Od tih 87%, gljive se koriste u proizvodnji 53%, bakterije proizvode 32%, dok kvasci proizvode 2% prehrambenih enzima. Osim mikrobne fermentacije, 13% enzima proizvedeno je ekstrakcijom iz biljaka i životinja. Među tim enzimima proizvedenim ekstrakcijom, 47,5% je životinjskog, a 52,5% biljnog podrijetla. *A. niger*, *A. oryzae*, *T. reesei*, *B. subtilis* i *B. licheniformis* su vrste odgovorne za proizvodnju prehrambenih enzima u 50% dostavljenih dosjea. Također, 43% dostavljenih

dosjea spominje uporabu genetički modificiranih (GM) sojeva. 63% enzima dobivenih iz GM sojeva proizvodi sojevi nitastih gljiva, a 37% proizvode sojevi bakterija (Deckers i sur., 2020). Detaljniji podaci kao i najčešće zastupljene vrste u dosjeima prikazane su na slici 5.



Slika 5. Najčešće zastupljene vrste mikroorganizama u dosjeima: **A.** Pregled izvora prehranbenih enzima iz dostavljenih dosjea; **B.** Postotak dosjea koji spominju korištenje GM sojeva kao izvora prehranbenih enzima (Deckers i sur., 2020).

Ricci i sur. (2017) spominju kako je analizom QPS popisa koji je objavila EFSA utvrđeno da većini mikroorganizama koji proizvode prehranbene enzime nije dodijeljen QPS status. *Arthrobacter ramosus*, *Bacillus circulans*, *Geobacillus pallidus*, *G. caldoproteolyticus*, *Paenibacillus macerans* i *Pullulanibacillus naganoensis* su vrste koje trebaju potpunu provjeru sigurnosti jer nema dovoljno informacija o njihovoj sigurnoj upotrebi. Zbog toga nisu preporučljive za QPS status. Osim njih, *Protaminobacter rubrum* i *Chryseobacterium proteolyticum* nisu valjana imena vrsta te se ne uzimaju u obzir za QPS popis zajedno s vrstama *Streptomyces* koje proizvode antibiotike i druge sekundarne metabolite koji mogu biti toksični. QPS status dobilo je 33% bakterijskih sojeva koji proizvode prehranbene enzime. *Cellulosimicrobium cellulans*, *Corynebacterium glutamicum*, *E. coli*, *Klebsiella*

pneumonia i *Pseudomonas fluorescens* su vrste koje imaju patogeni potencijal (Deckers i sur., 2020). U tablici 3. prikazani su dodatni sojevi koji ne posjeduju i posjeduju QPS status.

Tablica 3. Pregled statusa kvalificirane pretpostavke o sigurnosti (QPS) mikroorganizama koji proizvode prehrambene enzime za koje je predan dosje EFSA-i na procjenu sigurnosti i naknadno uvrštavanje na popis zajednice prehrambenih enzima (Deckers i sur., 2020)

Rod	Vrsta	QPS	Rod	Vrsta	QPS
<i>Arthrobacter</i>	<i>ramosus</i>	Ne	<i>Chaetomium</i>	<i>gracile</i>	Ne
<i>Bacillus</i>	<i>circulans</i>	Ne	<i>Chaetomium</i>	<i>erraticum</i>	Ne
<i>Cellulosimicrobium</i>	<i>cellulans</i>	Ne	<i>Cryphonectria</i>	<i>parasitica</i>	Ne
<i>Chryseobacterium</i>	<i>proteolyticum</i>	Ne	<i>Sporobolomyces</i>	<i>singularis</i>	Ne
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	Ne	<i>Disporotrichum</i>	<i>dimorphosporum</i>	Ne
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	Ne	<i>Boletus</i>	<i>edulis</i>	Ne
<i>Geobacillus</i>	<i>pallidus</i>	Ne	<i>Fusarium</i>	<i>venenatum</i>	Ne
<i>Geobacillus</i>	<i>caldoproteolyticus</i>	Ne	<i>Hansenula</i>	<i>polymorpha</i>	Ne
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	Ne	<i>Humicola</i>	<i>insolens</i>	Ne
<i>Paenibacillus</i>	<i>macerans</i>	Ne	<i>Leptographium</i>	<i>procerum</i>	Ne
<i>Paenibacillus</i>	<i>alginolyticus</i>	Ne	<i>Mucor</i>	<i>javanicus</i>	Ne
<i>Protaminobacter</i>	<i>rubrum</i>	Ne	<i>Penicillium</i>	<i>roqueforti</i>	Ne
<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>	Ne	<i>Penicillium</i>	<i>camemberti</i>	Ne
<i>Pseudomonas</i>	<i>amiloderamoza</i>	Ne	<i>Penicillium</i>	<i>multicolor</i>	Ne
<i>Pullulanibacillus</i>	<i>naganoensis</i>	Ne	<i>Penicillium</i>	<i>citrinum</i>	Ne
<i>Streptomyces</i>	<i>violaceoruber</i>	Ne	<i>Penicillium</i>	<i>decumbens</i>	Ne
<i>Streptomyces</i>	<i>murinus</i>	Ne	<i>Penicillium</i>	<i>chrysogenum</i>	Ne
<i>Streptomyces</i>	<i>netropsis</i>	Ne	<i>Penicillium</i>	<i>funiculosum</i>	Ne
<i>Streptomyces</i>	<i>mobaraensis</i>	Ne	<i>Rhizomucor</i>	<i>miehei</i>	Ne
<i>Streptomyces</i>	<i>rubiginosus</i>	Ne	<i>Rhizopus</i>	<i>oryzae</i>	Ne
<i>Aspergillus</i>	<i>oryzae</i>	Ne	<i>Rhizopus</i>	<i>niveus</i>	Ne
<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>	Ne	<i>Talaromyces</i>	<i>pinophilus</i>	Ne
<i>Aspergillus</i>	<i>niger agg.</i>	Ne	<i>Talaromyces</i>	<i>emersonii</i>	Ne
<i>Aspergillus</i>	<i>niger, macrosporus</i>	Ne	<i>Trametes</i>	<i>hirsuta</i>	Ne
<i>Aspergillus</i>	<i>niger awamori</i>	Ne	<i>Trichoderma</i>	<i>reesei</i>	Ne
<i>Aspergillus</i>	<i>fijiensis</i>	Ne	<i>Trichoderma</i>	<i>citrinoviride</i>	Ne
<i>Aspergillus</i>	<i>acidus</i>	Ne	<i>Trichoderma</i>	<i>viride</i>	Ne
<i>Aspergillus</i>	<i>melleus</i>	Ne	<i>Candida</i>	<i>rugosa</i>	Ne

Rod	Vrsta	QPS
<i>Bacillus</i>	<i>licheniformis</i>	Da
<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	Da
<i>Bacillus</i>	<i>pumilus</i>	Da
<i>Bacillus</i>	<i>amyloliquefaciens</i>	Da
<i>Bacillus</i>	<i>flexus</i>	Da
<i>Geobacillus</i>	<i>stearothermophilus</i>	Da
<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>	Da
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>	Da
<i>Leuconostoc</i>	<i>citreum</i>	Da
<i>Microbacterium</i>	<i>imperiale</i>	Da
<i>Candida</i>	<i>cylindracea</i>	Da
<i>Kluyveromyces</i>	<i>lactis</i>	Da
<i>Pichia</i>	<i>pastori</i>	Da
<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	Da
<i>Kluyveromyces</i>	<i>lactis</i>	Da

Zbog proizvodnje mikotoksina, nitaste plijesni nemaju QPS status. Za razliku od kvasca *Candida rugose* koja nema QPS status jer uzrokuje mastitis, sve ostale vrste kvasaca imaju QPS status. Međutim, to ne znači da sojevi koji nemaju QPS nemaju GRAS status, te da predstavljaju sigurnosne probleme prilikom proizvodnje prehrambenih enzima. EFSA mora provesti detaljniju procjenu sigurnosti samo za sojeve koji nemaju QPS status (Deckers i sur., 2020).

2.7. GMO PROPISI I PREHRAMBENI ENZIMI

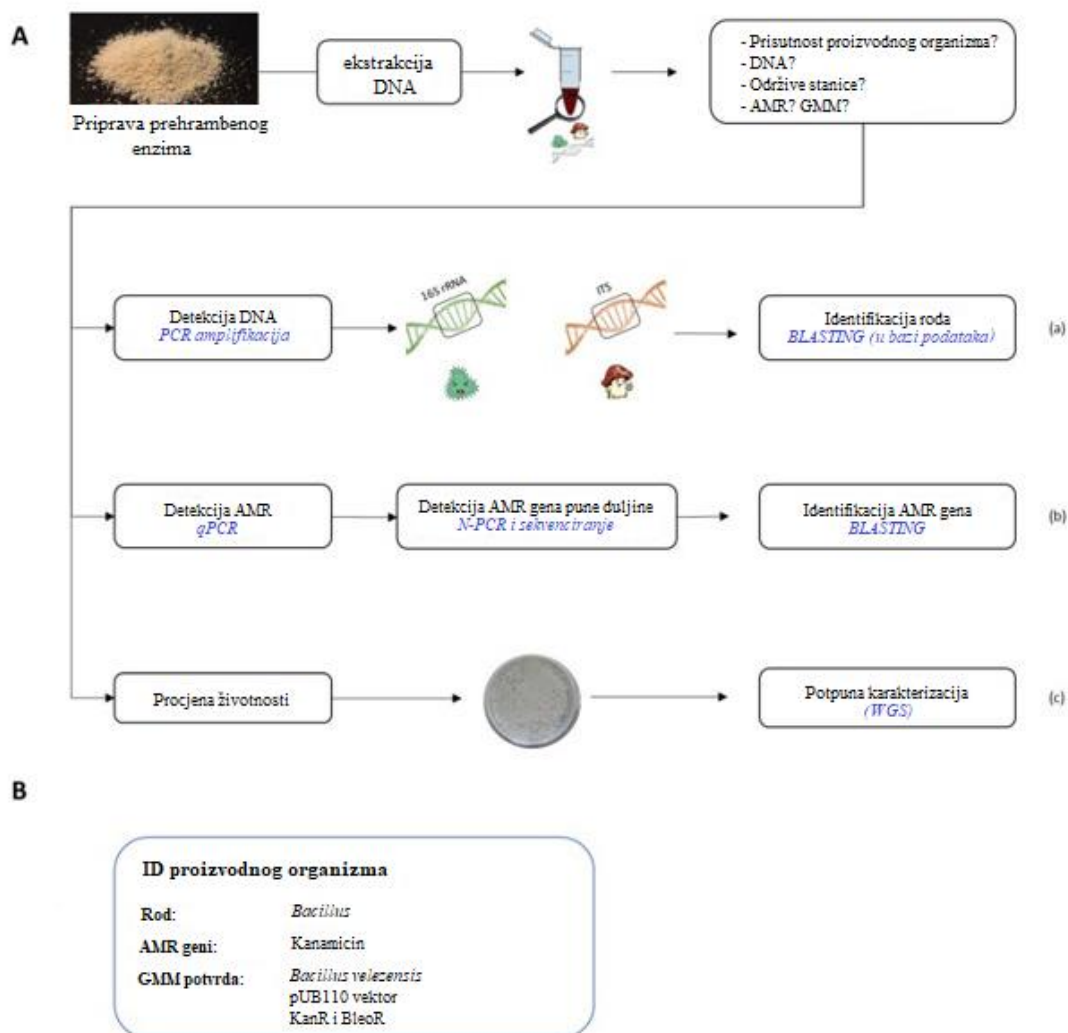
Kako bi se zaštitilo zdravlje ljudi i životinja, genetički modificirana hrana prije stavljanja na tržište mora proći procjenu sigurnosti. U Članku 2. Uredbe br. 1829/2003 definirana je genetički modificirana hrana: „Genetički modificirana hrana je hrana koja sadrži genetički modificirane organizme, sastoji se od njih ili je od njih proizvedena; proizveden od genetički modificiranih organizama znači da potječe u cijelosti ili djelomično od genetički modificiranog organizma, ali ne sadrži genetički modificirani organizam niti se od njega sastoji. Ova Uredba treba obuhvaćati hranu i hranu za životinje proizvedenu „od” genetički modificiranog organizma, ali ne i hranu i hranu za životinje „s” genetički modificiranim

organizmom. Odlučujući kriterij je jesu li u hrani ili hrani za životinje prisutne životinje koje potječu od genetički modificirane sirovine ili ne. Pomoćne tvari koje se koriste samo u postupku proizvodnje hrane i hrane za životinje nisu obuhvaćene definicijom hrane i hrane za životinje i stoga nisu uključene u područje primjene ove Uredbe. Također, ni ljudska hrana, niti hrana za životinje koja se proizvodi uz pomoć genetički modificiranog pomoćnog sredstva, nisu uključene u područje primjene ove Uredbe.” (EUR-Lex, 2021). Potrebno je ispitati dva koraka kako bi se utvrdilo je li Uredba br. 1829/2003 primjenjiva na prehrambene enzime. Prvi korak je utvrditi koristi li se prehrambeni enzim kao pomoćno sredstvo ili kao sastojak u procesu proizvodnje. Kod drugog koraka je ključno za pomoćno sredstvo u obradi odrediti može li uporaba enzima utjecati na prisutnost materijala iz genetički modificiranog izvora u konačnom proizvodu. Ako je u enzimskom pripravku ili prehrambenom proizvodu prisutan materijal iz genetički modificiranog izvora, tad se primjenjuje Uredba (EC) br. 1829/2003. Za sve prehrambene enzime na koje se odnosi Uredba br. 1829/2003 i za koje nije podnesen dosje u kontekstu ove uredbe, primjenjuje se nulta stopa tolerancije na genetički modificiran proizvodni soj (Deckers i sur., 2020).

Nadležna tijela pokazuju velik interes za pripravke prehrambenih enzima proizvedenih iz genetički modificiranih mikroorganizama. Obzirom da se informacije o izvoru proizvodnje povjerljivo dostavljaju samo EFSA-i, belgijski laboratorij razvio je strategiju za otkrivanje genetički modificiranih mikroorganizama u hrani prikazanu na slici 6 (Deckers i sur., 2020).

Prikazana strategija može se koristiti za dobivanje informacija o kontaminaciji enzimskog pripravka s DNA bakterije ili gljive ili za dobivanje informacija o prisutnosti AMR gena pune duljine. AMR geni pune duljine pokazatelji su potencijalne prisutnosti GMM-a, te bi takav proizvod trebalo detaljnije istražiti. Zahvaljujući prethodno spomenutoj strategiji otkrivene su neke pojedinosti u enzimskom preparatu proteazi koji je komercijaliziran na europskom tržištu. Prvo, otkrivena je prisutnost bakterijske DNA u enzimskom preparatu. Ta bakterija je kasnije identificirana kao *Bacillus*. Drugo, probiranje (engl. *screening*) proizvoda pokazalo je prisutnost *aadD* gena pune duljine dajući *kan^R* (Fraiture i sur., 2020.). Uz to, u preparatu prehrambenog enzima izolirane su stanice *Bacillus*. Izolirane stanice *Bacillus* prošle su ponovnu analizu pomoću PCR-a i qPCR-a kako bi se potvrdila prisutnost gena za rezistenciju pune duljine. Izolirani soj *Bacillus* podvrgnut je analizi sekvenciranja cijelog genoma što je rezultiralo identifikacijom i karakterizacijom neovlaštene genetički modificirane bakterije *B. velezensis*. Ta bakterija prekomjerno proizvodi enzim proteazu. Osim toga, ovaj GMM

sadržavao je pUB110 shuttle vektor, koji je sadržavao *kan^R* i *bleo^R* (gen za rezistenciju na antibiotik bleomicin). Otkriveni podaci rezultirali su uklanjanjem proizvoda s europskog tržišta (Deckers i sur., 2020).



Slika 6. Strategija za otkrivanje GMM u hrani: **A.** Opći pregled razvijene strategije usmjerene na prisutnost GMM-a koji proizvode prehrambene enzime. (a) Prvo, ciljanjem sekvence 16S rRNA i regije ITS (engl. *Internal Transcribed Spacer*, ITS) može se detektirati potencijalna prisutnost DNA bakterije i gljive. Identifikacija PCR produkta dobiva se sekvenciranjem nakon čega slijedi ispitivanje u bazama podataka. (b) Prisutnost gena za antimikrobnu rezistenciju (AMR) ciljano je pomoću qPCR. Ako se dobije pozitivan signal, puna duljina gena umnožava se korištenjem N-PCR-a (engl. *Nested PCR*) i zatim sekvencira. Identifikacija otkrivenih AMR

gena provjerava se postupkom blastinga. (c) Kao dodatna analiza provodi se procjena održivosti. Ako se dobiju kolonije, prvo se ponavljaju dvije gore navedene metode kako bi se potvrdili prethodno dobiveni rezultati i odabrale GMM kolonije ukoliko su otkriveni AMR geni. Potpuna karakterizacija može se stoga dobiti sekvenciranjem cijelog genoma (engl. *Whole Genome Sequencing*, WGS) dobivenih kolonija. Genetičke modifikacije mogu se okarakterizirati i može se dokazati identitet GMM-a. **B.** Pomoću strategije prikazane u **A.** može se identificirati detektirani mikroorganizam. Prikazan je primjer proteaze koja proizvodi GMM (RASFF2019.3332) (Deckers i sur., 2020).

3. ZAKLJUČCI

Temeljem podataka iznesenih u ovom završnom radu može se zaključiti:

1. Enzimi su proteini prisutni u živim organizmima u kojima ubrzavaju razne biokemijske reakcije zahvaljujući ulozi katalizatora. Mogu se dobiti ekstrakcijom iz biljaka i životinja ili fermentacijom iz mikroorganizama.
2. Enzimi može doći u 3 različita oblika: čisti enzim, enzimski pripravci s drugim supstancama dobivenih nakon fermentacije te enzimski pripravci u kojima su enzimski koncentracije s dodanim stabilizatorima za očuvanje aktivnosti enzima.
3. Jedna od najvećih prednosti korištenja mikroorganizama za proizvodnju prehrambenih enzima je jednostavno uvođenje genetičkih modifikacija. Genetičke modifikacije mogu se dobiti pomoću rekombinantnih enzima ili uvođenjem genetičkih modifikacija u proizvodni soj.
4. Europski Parlament je 2008. donio četiri uredbe pomoću kojih se utvrđuje usklađenost kriterija i zahtjeva za procjenu i odobrenje prehrambenih aditiva, prehrambenih enzima i aroma. Četiri donesene uredbe su: Uredba br. 1331/2008, Uredba br. 1332/2008, Uredba br. 1333/2008 i Uredba br. 1334/2008.
5. Kako bi se zaštitilo zdravlje ljudi i životinja, genetički modificirana hrana prije stavljanja na tržište mora proći procjenu sigurnosti.
6. Uz sigurnosne provjere prehrambenih enzima naglašena je važnost njihove dodatne provjere u kontrolnim laboratorijima. Dodatna kontrola u laboratorijima potrebna je kako bi se provjerila i utvrdila usklađenost podataka sadržanih u dosjeima koje sadrži EFSA s podacima dobivenima u laboratorijima.
7. Zbog nedosljednosti podataka koje sadrži laboratoriji i EFSA potrebno je uskladiti podatke i kriterije na europskoj razini.

4. POPIS LITERATURE

Ahmad SS, Samia NSN, Khan AS, Turjya RR, Khan MA (2021) Bidirectional promoters: an enigmatic genome architecture and their roles in cancers. *Mol Biol Rep* **48** (9), 6637-6644. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06612-6>

Börner RA, Kandasamy V, Axelsen AM, Nielsen AT, Bosma EF (2019) Genome editing of lactic acid bacteria: Opportunities for food, feed, pharma and biotech. *FEMS Microbiol Lett* **366**, fny291. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny291>

Bošković, M i Podhorsky R (1976) ENZIMI, Tehnička enciklopedija, sv. 5, Zagreb, str. 334–345.

Chang M, Chu X, Lv J, Li Q, Tian J, Wu N (2016) Improving the thermostability of acidic pullulanase from *Bacillus naganoensis* by rational design. *PLOS One* **11**, e0165006. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165006>

Chapman J, Ismail AE, Dinu CZ (2018) Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts* **8** (6), 238. <https://doi.org/10.3390/catal8060238>

Christensen T, Woeldike H, Boel E, Mortensen SB, Hjortshøj K, Thim L i sur. (1988) High Level Expression of Recombinant Genes in *Aspergillus Oryzae*. *Nat Biotechnol* **6** (12), 1419–1422. <https://doi.org/10.1038/nbt1288-1419>

Deckers M, Vanneste K, Winand R, De Keersmaecker SC, Denayer S, Heyndrickx M, i sur. (2020) Strategy for the identification of micro-organisms producing food and feed products: Bacteria producing food enzymes as study case. *Food chem* **305**, 125431. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125431>

Deckers M, Deforce D, Fraiture M-A, Roosens NHC (2020) Genetically Modified Micro-Organisms for Industrial Food Enzyme Production: An Overview. *Foods* **9** (3), 326. <https://doi.org/10.3390/foods9030326>

Demain AL, Vaishnav, P (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol adv* **27** (3), 297-306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008>

Donohoue PD, Barrangou R, May AP (2018) Advances in Industrial Biotechnology Using CRISPR-Cas Systems. *Trends Biotechnol* **36** (2), 134–146. <https://doi.org/10.1016/j.ti-btech.2017.07.007>

EFSA (2011) Guidance on the risk assessment of genetically modified microorganisms and their products intended for food and feed use. EFSA- European Food Safety Authority, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2193>. Pristupljeno 28.3.2023.

EFSA (2016) Exposure assessment of food enzymes. EFSA- European Food Safety Authority, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4581>. Pristupljeno 28.3.2023.

EFSA (2021) New Guidance for Submission of Dossiers on Food Enzymes. EFSA-European Food Safety Authority, <https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/2021-07/presentations-21-june-2021.pdf>. Pristupljeno 28.3.2023.

EFSA BIOHAZ Panel, Koutsoumanis, K, Allende, A, Alvarez-Ordenez, A, Bolton, D, Bover-Cid, S, Chemaly, M, i sur. (2023) Updated list of QPS-recommended microorganisms for safety risk assessments carried out by EFSA. *Zenodo* <https://doi.org/10.5281/zenodo.7554079>. Pristupljeno 28.3.2023.

EUR-Lex (2012) The European Parliament and the Council of the European Union Regulation (EC) No 1332/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on food enzymes and amending Council Directive 83/417/EEC, Council Regulation (EC) No 1493/1999, Directive 2000/13/EC, Council Directive 2001/112/EC and Regulation (EC) No 258/97. <http://data.europa.eu/eli/reg/2008/1332/2012-12-03> Pristupljeno 28.3.2023.

EUR-Lex (2021) Commission Regulation (EU) No 234/2011 of 10 March 2011 implementing Regulation (EC) No 1331/2008 of the European Parliament and of the Council establishing a common authorisation procedure for food additives, food enzymes and food flavourings. http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2011/234/2021-03-27 Pristupljeno 28.3.2023.

EUR-Lex (2021) Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. <http://data.europa.eu/eli/reg/2003/1829/2021-03-27> Pristupljeno 28.3.2023.

EUR-Lex (2021) The European Commission Regulation (EU) No 234/2011 of 10 March 2011 implementing Regulation (EC) No 1331/2008 of the European Parliament and of the Council establishing a common authorisation procedure for food additives, food enzymes and food flavourings. http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2011/234/2021-03-27 Pristupljeno 28.3.2023.

EUR-Lex (2023) Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on food additives. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02008R1333-20230322> Pristupljeno 28.3.2023.

EUR-Lex (2023) The European Commission regulation (EU) no 231/2012 of 9 March 2012 laying down specifications for food additives listed in annexes II and III to regulation (EC) no 1333/2008 of the European Parliament and of the Council. <http://data.europa.eu/eli/reg/2012/231/2023-03-22> Pristupljeno 28.3.2023.

Fernandes P, Carvalho F (2017) Microbial enzymes for the food industry. In *Biotechnology of microbial enzymes*. Academic Press 513-544. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00019-4>

Fitz E, Wanka F, Seiboth B (2018) The promoter toolbox for recombinant gene expression in *Trichoderma reesei*. *Front Bioeng Biotechnol* **6**, 135. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00135>

Fraiture MA, Deckers M, Papazova N, Roosens, NH (2020) Detection strategy targeting a chloramphenicol resistance gene from genetically modified bacteria in food and feed products. *Food Control* **108**, 106873. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106873>

Herman L, Chemaly M, Cocconcelli PS, Fernandez P, Klein G, Peixe L, i sur. (2019) The qualified presumption of safety assessment and its role in EFSA risk evaluations: 15 years past. *FEMS Microbiol Lett* **366** (1), fny260. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny260>

Hui YH, Nip WK, Nollet LM, Paliyath G, Simpson, BK (Eds.)(2008) Food biochemistry and food processing, John Wiley & Sons, New Jersey

Katalinić T (2021) Utjecaj biološke obrade pomoću *Phanerochaete chrysosporium* na udio fenolnih spojeva u tropu grožđa (diplomski rad), Prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek

Liu X, Kokare C (2023) Microbial enzymes of use in industry. In *Biotechnology of microbial enzymes*. Academic Press 405-444. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-19059-9.00021-9>

Lopes TS, Klootwijk J, Veenstra AE, van der Aar PC, van Heerikhuizen H, Raué HA i sur. (1989) High-copy-number integration into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*:

a new vector for high-level expression. *Gene* **79** (2), 199-206. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90202-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90202-3)

MarketsandMarkets (2022) Industrial Enzymes Market by Type (Amylases, Cellulases, Proteases, Lipases, and Phytases), Application (Food & Beverages, Cleaning Agents, and Animal Feed), Source (Microorganism, Plant, and Animal), and Region—Global Forecast to 2026. Market Research Report. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/industrial-enzymes-market-237327836.html>. Pristupljeno 28.3.2023.

Meyer V (2008) Genetic engineering of filamentous fungi—progress, obstacles and future trends. *Biotechnol adv* **26** (2), 177-185. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.001>

Patel AK, Dong CD, Chen CW, Pandey A, Singhania RR (2023) Production, purification, and application of microbial enzymes. In *Biotechnology of microbial enzymes*. Academic Press 25-57. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-19059-9.00019-0>

Franklin A (2015) Uspješnost genskog ciljanja u prirodnim, biotehnoški interesantnim sojevima kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Rajamanickam V, Metzger K, Schmid C, Spadiut O (2017) A novel bi-directional promoter system allows tunable recombinant protein production in *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact* **16**, 152. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0768-8>

Rešetar J (2018) Konstrukcija plazmidnog vektora za transformaciju kvasca *Pichia pastoris* (završni rad), Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Ricci A, Allende A, Bolton D, Chemaly M, Davies R, Girones R, i sur. (2017) Scientific Opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA. *EFSA J* **15**, 177. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4664>

Rieder L, Ebner K, Glieder A, Sørlie M (2021) Novel molecular biological tools for the efficient expression of fungal lytic polysaccharide monoxygenases in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Biofuels* **14**, 122. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01971-5>

Robinson PK (2015) Enzymes: Principles and biotechnological applications. *Essays Biochem* **59**, 1–41. <https://doi.org/10.1042/bse0590001>

Salazar-Cerezo S, Kun RS, de Vries RP, Garrigues S (2020) CRISPR/Cas9 technology enables the development of the filamentous ascomycete fungus *Penicillium subrubescens* as a new industrial enzyme producer. *Enzyme Microb Tech* **133**, 109463. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109463>

Sanchez S, Demain AL (2017) Useful microbial enzymes-an introduction. *In Biotechnology of microbial enzymes*. Academic Press 1-11. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00001-7>

Savić N, Schwank G (2016) Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. *Transl Res* **168**, 15-21. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.09.008>

Sewalt V, Shanahan D, Gregg L, La Marta J, Carillo R (2016) The Generally Recognized as Safe (GRAS) process for industrial microbial enzymes. *Ind Biotechnol* **12** (5), 295–302. <https://doi.org/10.1089/ind.2016.0011>

Singh R, Kumar M, Mittal A, Mehta PK (2016) Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech* **6**, 1-15. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8>

Sirisha VL, Jain A, Jain A (2016) Enzyme Immobilization: an overview on methods, support material, and applications of immobilized enzymes. *Advances in Food and Nutrition Research* **79**, 179-211. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.07.004>

Song R, Zhai Q, Sun L, Huang E, Zhang Y, Zhu Y i sur. (2019) CRISPR/Cas9 genome editing technology in filamentous fungi: progress and perspective . *Appl Microbiol Biot* **103**, 6919–6932. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10007-w>

Stavrou EF, Simantirakis E, Verras M, Barbas III C, Vassilopoulos G, Peterson KR i sur. (2019) Episomal vectors based on S/MAR and the β -globin Replicator, encoding a synthetic transcriptional activator, mediate efficient γ -globin activation in haematopoietic cells. *Sci Rep* **9**, 19765. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56056-z>

Sunga AJ, Tolstorukov I, Cregg JM (2008) Posttransformational vector amplification in the yeast *Pichia pastoris*. *FEMS yeast res* **8** (6), 870-876. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00410.x>

Trono D (2019) Recombinant enzymes in the food and pharmaceutical industries. In *Advances in enzyme technology*. Elsevier, Amsterdam, 349-387. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64114-4.00013-3>

Vogl T, Kickenweiz T, Pitzer J, Sturmberger L, Weninger A, Biggs BW i sur. (2018) Engineered bidirectional promoters enable rapid multi-gene co-expression optimization. *Nat Commun* **9**, 3589. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05915-w>

Yan S, Wu G (2017) Bottleneck in secretion of α -amylase in *Bacillus subtilis*. *Microb Cell Fact* **16**, 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0738-1>

Zhang K, Duan X, Wu J (2016) Multigene disruption in undomesticated *Bacillus subtilis* ATCC 6051a using the CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep* **6**, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep27943>

Zhang K, Su L, Wu J (2018) Enhanced extracellular pullulanase production in *Bacillus subtilis* using protease-deficient strains and optimal feeding. *Appl Microbiol Biot* **102**, 5089–5103. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8965-x>

Zhang Y, Geary T, Simpson BK (2019) Genetically modified food enzymes: A review. *Curr Opin Food Sci* **25**, 14–18. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.01.002>

Zou G, Shi S, Jiang Y, van den Brink J, de Vries RP, Chen L i sur.(2012) Construction of a cellulase hyper-expression system in *Trichoderma reesei* by promoter and enzyme engineering. *Microb Cell Fact* **11**, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-21>

Izjava o izvornosti

Ja MARTINA KOŽUL izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Vlastoručni potpis