

FIZIOLOGIJA INDUSTRIJSKIH MIKROORGANIZAMA

temeljni modul sveučilišnih diplomskih studijskih programa Bioproceno inženjerstvo i Molekularna biotehnologija

doktorskog studijskog programa

Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo, prehrambeno tehnologija i nutricionizam

6 ECTS bodova

1. dio

prof. dr. sc. Anita Slavica

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

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

Pierottijeva 6/IV (desno)

Prof. dr. sc. Anita Slavica (soba br. 161, 4 17; e-pošta: aslavica@pbf.unizg.hr)

FIZIOLOGIJA INDUSTRIJSKIH MIKROORGANIZAMA - UVOD

-
- Predavanja
 - Domaće zadaće
 - Konzultacije (po potrebi)
 - Dva parcijalna pismena ispita
 - Pismeni ispit u redovitim ispitnim rokovima

FIZIOLOGIJA

“...znanost o procesima u živim organizmima; objašnjava mehanizam, uzročne veze i odnose između životnih pojava, istražuje opće zakone života, rad i funkciju pojedinih organa, tkiva i stanica; služi se eksperimentalnim metodama fizike, kemije i biologije, pa je povezana s biokemijom i biofizikom...” (Hrvatski opći leksikon, Leksikografski zavod MK, Zagreb, 1996.)

MIKROBNA FIZIOLOGIJA

- proučava procese u mikrobnim stanicama
- interakcija i preklapanja s mikrobiologijom, genetikom, biokemijom, molekularnom biologijom
- holistički pristup: proučava stanicu kao cjelinu

FIZIOLOGIJA INDUSTRIJSKIH MIKROORGANIZAMA

- proučava procese u stanicama mikroorganizama koji se koriste u biotehnologiji
(bakterije, kvasci, alge, plijesni, stanice biljnih i životinjskih tkiva)

- dvije suprotne tendencije:

uvođenje sve većeg broja novih vrsta u industrijsku proizvodnju,

“ubacivanje” gena iz “novih”, slabo poznatih vrsta, u “stare”, dobro poznate vrste

(ugrožavanje biološke raznolikosti)

fiziologija industrijskih mikroorganizama: neki industrijski važni mikroorganizmi i njihov potencijal (1)

- "(pre-)biblijski" "industrijski" bioprocesi

- vino, pivo, ocat, mliječni proizvodi...

-20. stoljeće - zlatno doba industrijske mikrobiologije: proizvodnja otapala, antibiotika, enzima, vitamina, aminokiselina, nukleotida (pojačivači okusa), polimeri, steroidi i dr.

- u ovom predavanju osvrtno na industrijski primijenjene stanice:

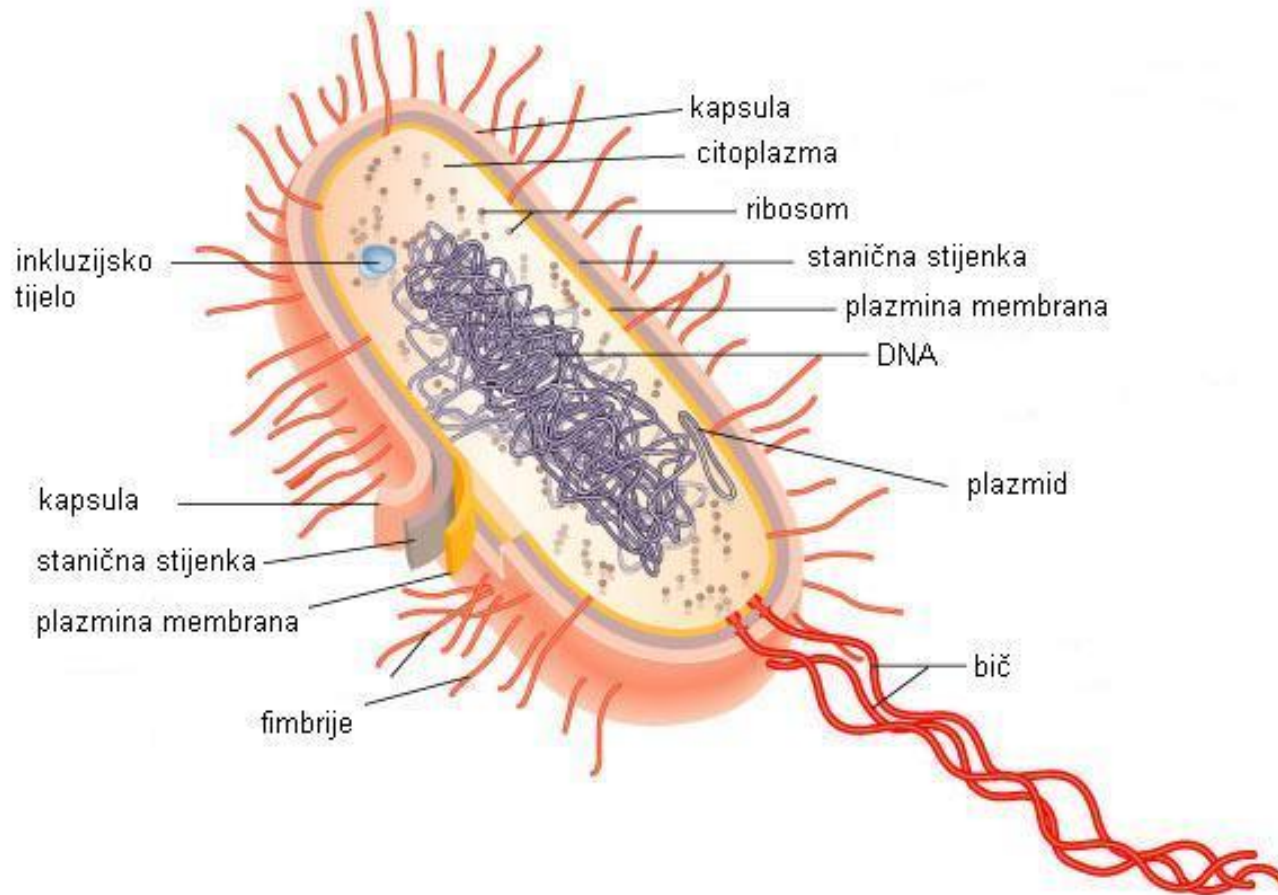
bakterija

kvasaca

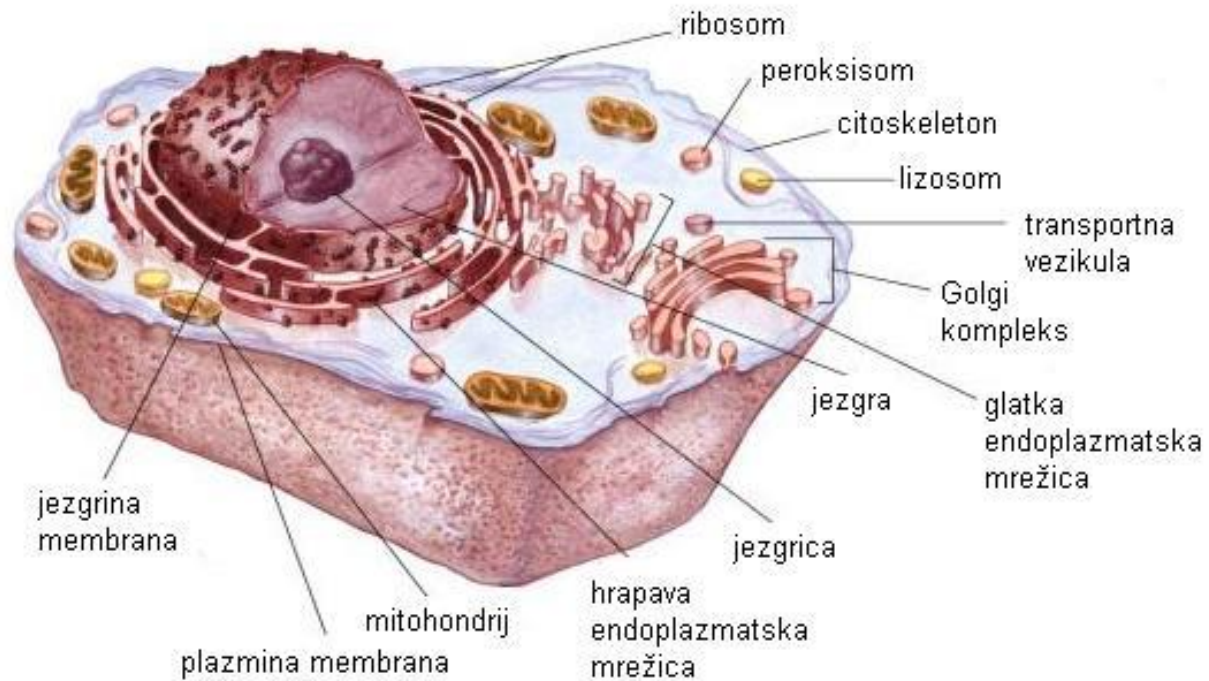
filamentoznih funga

biljnih i životinjskih tkiva

podsjetimo se: karakteristike stanica mikroorganizama - stanica prokariota



podsetimo se: karakteristike stanica mikroorganizama - stanica eukariota



sites.sinauer.com/cooper5e

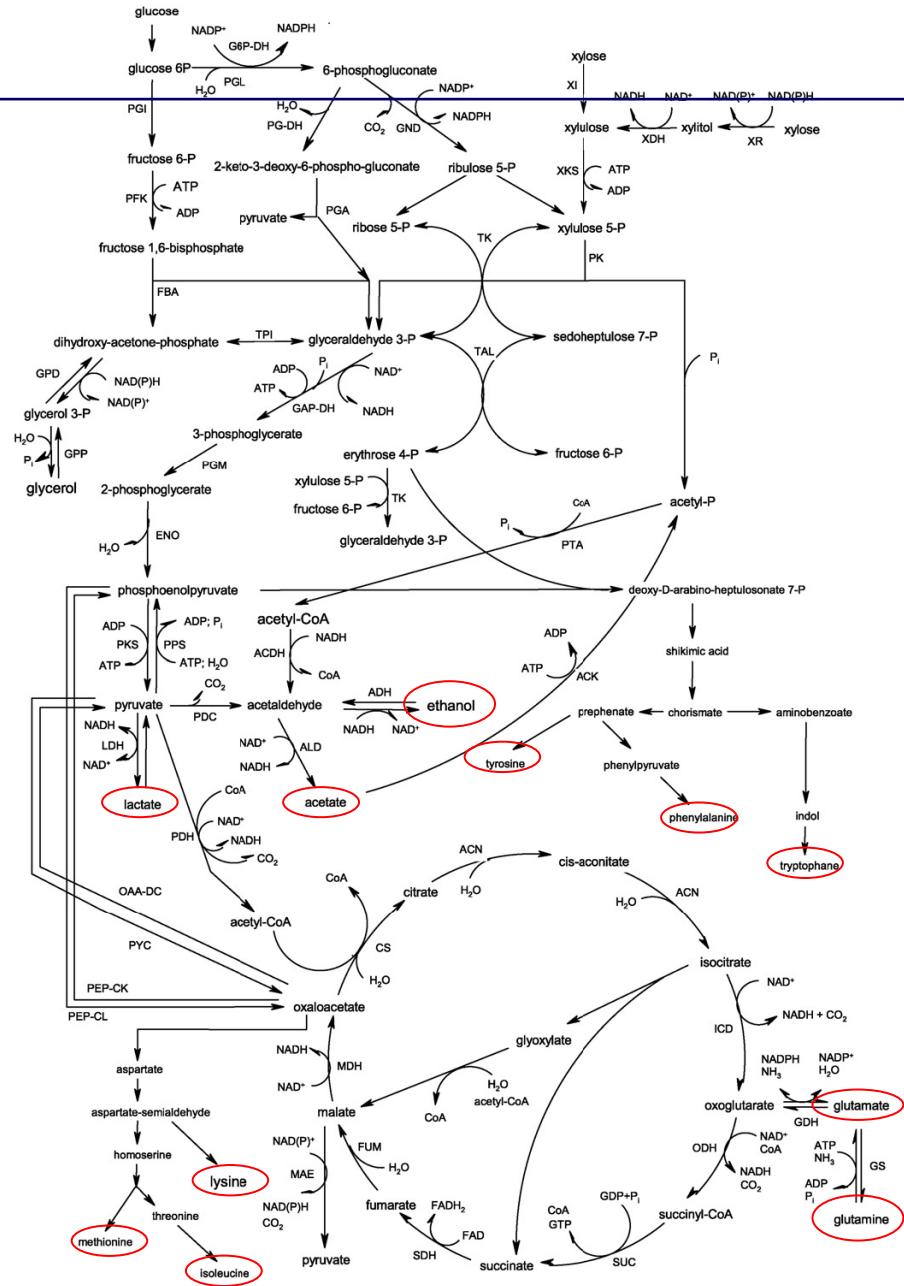
Animations and Micrographs

Sumanas, Inc., www.sumanasinc.com

animacija: **Eukaryotic organelles**

www.sumanasinc.com/webcontent/animations/biology.html

podsetimo se: primarni metaboliti



neki industrijski važni mikroorganizmi i njihov potencijal (2)

bakterije mogu se postići visoke koncentracije bakterijske biomase

Acetobacter sp. (octena kiselina)

Bacillus sp. (vitamini, industrijski enzimi: amilaze, proteaze, lipaze)

Bacillus subtilis (transport proteina iz stanice - ind. primjena)

Clostridium sp. (aceton, butanol)

Corynebacterium sp. (aminokiseline) ($\approx 4.5 - 10^9$ USD; 2004)

Corynebacterium glutamicum

- proizvodnja aminokiselina:

ekstrakcija iz hidrolizata proteina

sinteza

biotehnološki bioproces (cjelovita stanica biokatalizatora)

enzimska kataliza (Japan)

Amino acid	Strain/mutant
L-Lysine HCl	<i>C. glutamicum</i> B-6
L-Threonine	<i>E. coli</i> KY 10935
L-Tryptophan	<i>C. glutamicum</i> KY9218/pIK9960
L-Tryptophan	<i>E. coli</i>
L-Phenylalanine	<i>E. coli</i> MWPWJ304/pMW16
L-Arginine	<i>Brevibacterium flavum</i> AJ12429
L-Histidine	<i>C. glutamicum</i> F81/pCH99
L-Isoleucine	<i>E. coli</i> H-8461
L-Serine	<i>Methylobacterium</i> sp. MN43
L-Valine	<i>C. glutamicum</i> VR 3

neki industrijski važni mikroorganizmi i njihov potencijal (3)

bakterije mogu se postići visoke koncentracije bakterijske biomase

Acetobacter sp. (octena kiselina)

Bacillus sp. (vitamini, amilaze, proteaze, lipaze)

Bacillus subtilis

Clostridium sp. (acetone, butanol)

Corynebacterium sp. (aminokiseline) ($\approx 4.5 \cdot 10^9$ USD; 2004)

Corynebacterium glutamicum

Escherichia coli

(dominantni prokariotski biokemijski i genetički model, domaćin “tvornicama proteina”, acetone, etanol, ...)

Lactobacillus sp. i *Streptococcus* sp.

(mliječna kiselina)


Streptomyces sp. (vitamin B12, enzimi, antibiotici)

Streptomyces coelicolor (20-tak sekundarnih metabolita)

Amino acid	Strain/mutant
L-Lysine HCl	<i>C. glutamicum</i> B-6
L-Threonine	<i>E. coli</i> KY 10935
L-Tryptophan	<i>C. glutamicum</i> KY9218/pIK9960
L-Tryptophan	<i>E. coli</i>
L-Phenylalanine	<i>E. coli</i> MWPWJ304/pMW16
L-Arginine	<i>Brevibacterium flavum</i> AJ12429
L-Histidine	<i>C. glutamicum</i> F81/pCH99
L-Isoleucine	<i>E. coli</i> H-8461
L-Serine	<i>Methylobacterium</i> sp. MN43
L-Valine	<i>C. glutamicum</i> VR 3

kvasci

mogu se postići visoke koncentracije kvaščeve biomase
etanol, mliječna kis.

Saccharomyces cerevisiae (transportira heterologne proteine u podlogu,
posttranslacijske modifikacije – *over*glikozilacija) 

Hansenula polymorpha (*Pichia angusta*; koristi metanol - metilotrof, glikozilacija) 

Pichia pastoris (*Komagatella phaffi*) (metilotrof, glikozilacija; heterologni proteini)

Pichia stipitis (obnovljive sirovine, celuloza → → ksiloza → → etanol)

filamentozni fungi - obligatni aerobi

transport proteina iz stanice; organske kiseline, enzimi, polisaharidi, antibiotici

Ashbya gossypii (istraživanje fiziologije mikroorganizma)

Aspergillus nidulans (istraživanje fiziologije mikroorganizma)

Aspergillus niger (limunska kiselina)

Aspergillus oryzae (α -amilaza)

Aspergillus terreus (biofarmaceutska ind.)

Neurospora crassa (istraživanje fiziologije mikroorganizma)

Penicillium chrysogenum (β -laktamski antibiotici)

neki industrijski važni mikroorganizmi i njihov potencijal (5)

vrijednost proizvoda vs volumen



„**Biotechnology** uses substances, materials or extracts derived from living cells, **employing 22 million Europeans in a €1.5Tn endeavor**, being the premier global economic growth opportunity this century.”...

„Biotechnology will deliver solutions to unimagined problems, **providing food security, health and well-being to mankind for centuries to come.**”

KMA Gartland et al., *Current Opinion in Biotechnology*, **24S**, S6-S13, 2013.

tržište različitih proizvoda biotehnoške industrijske proizvodnje: $48 \cdot 10^9$ € (2010)
porast u 2012. godini za > 180 % ($86.4 \cdot 10^9$ €)

neki industrijski važni mikroorganizmi i njihov potencijal (6)

neki biotehnološki proizvodi i ekonomska vrijednost njihove proizvodnje na početku 21. stoljeća

sekundarni metaboliti

penicilinski antibiotici	<i>P. chrysogenum</i>	$4 \cdot 10^9$ USD
cefalosporinski a.	<i>Acremonium chrysogenum</i>	$11 \cdot 10^9$ USD
	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	
statini	<i>Aspergillus terreus</i>	$9 \cdot 10^9$ USD
taksol	biljne stanice	$1 \cdot 10^9$ USD

rekombinantni proteini

inzulin	<i>S. cerevisiae</i>	$3 \cdot 10^9$ USD
	<i>E. coli</i>	
eritropoetin	chinese hamster ovary (CHO) cell	$3.6 \cdot 10^9$ USD
humani hormon rasta	<i>E. coli</i>	$1 \cdot 10^9$ USD
interferoni	<i>E. coli</i>	$2 \cdot 10^9$ USD
vakcine	bakterije i kvasci	
monoklonska antitijela	hibridoma stanice	$7 \cdot 10^8$ USD

neki industrijski važni mikroorganizmi i njihov potencijal (7)

neki biotehnološki proizvodi i ekonomska vrijednost njihove proizvodnje na početku 21. stoljeća

enzimi

enzimi / detergents	<i>Bacillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp.	$6 \cdot 10^8$ USD
enzimi / škrob	<i>Bacillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp.	$2 \cdot 10^8$ USD
kimozi	<i>Aspergillus</i> sp.	

polimeri

ksantan	<i>Xanthom. campestris</i>	$4 \cdot 10^8$ USD
polihidroksialkanoati	<i>Alcaligenes erytrophus</i>	

DNA

vakcine	<i>E. coli</i>	
genska terapija	<i>E. coli</i>	

drugi industrijski važni organizmi, proizvodi i njihov potencijal (8)

- alge, stanice viših biljaka i životinja

- hormoni, steroidi, citokini (vanstanični proteini koji se izlučuju zbog promjene funkcija stanice, npr. upala, tzv. imuno-odgovor), vanstanični polisaharidi, ergot alkaloidi, pigmenti, insekticidi, ...

- proizvodnja kiralnih (među)spojeva i finih kemikalija npr. sinteza S-6-hidroksinorleucina (antihipertenzijski lijek *Omapatrilat*) visoke učinkovitosti s pomoću različitih m.o. i/ili enzima mikrobnog porijekla

- proizvodnja rekombinantnih proteina

transgene biljke (uljana repica - citokin enkefalin)

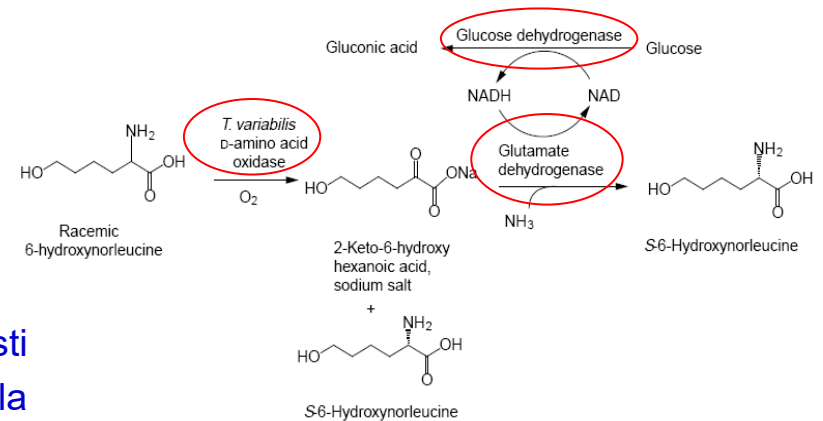
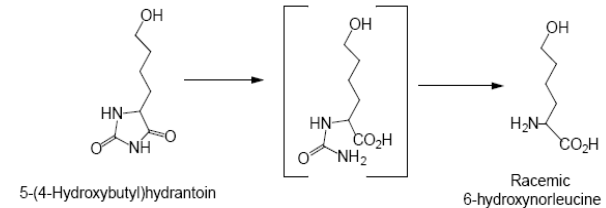
stanice sisavaca (CHO)

sustav za proizvodnju mlijeka (svinje, ovce)

uro-trakt

- proizvodnja tkiva (kožno, hrskavično, koštano tkivo, tkivo jetre)

- proizvodnja biljaka za ishranu rastuće populacije ("zlatna" riža s provitaminom A, β -karotenske rajčice, ...)



neke prednosti i **nedostaci** domaćina za proizvodnju rekombinantnih proteina (1)

E. coli

preživljava u vrlo širokom rasponu različitih parametara bioprocasa
brzo i precizno modificira svoj genom uz vrlo visoku ponovljivost
relativno se lako uzgaja, brzo raste, postiže visoka koncentracija biomase u “jeftinim” podlogama
postižu relativno visoki prinosi određenih proizvoda
reducira aktivnost proteaze
kod sinteze proteina izbjegava ugradnja analoga aminokiselina
kontrolira promotor
formiraju disulfidne veze
sintetizira heterologi protein uz udio do 50% suhe tvari bakterijske biomase
dobra sekrecija proteina

ne provodi posttranslacijske modifikacije proteina
relativno visok udio endotoksina
agregacija proteina (inkluzijska tijela)



animacija: **Translation-Linked Protein Secretion**

www.sumanasinc.com/webcontent/animations/biology.html

neke prednosti i **nedostaci** domaćina za proizvodnju rekombinantnih proteina (2)

S. cerevisiae

GRAS (eng. Generally Regarded As Safe)

nije patogen za čovjeka

proizvodnja s tradicijom u industrijskom mjerilu

moguće neke posttranslacijske modifikacije proteina (kovalentne preinake) npr. glikozilacija

dostupan ograničen broj vektora za kloniranje

glikozilacija nije identična glikozilaciji kod sisavaca

genetički nešto manje poznat od *E. coli*

filamentozni fungi

iskustvo u proizvodnji u industrijskom mjerilu

mikroorganizmi pogodni za proizvodnju brojnih industrijski primijenjenih enzima

izvrstan transport proteina

relativno niska ekspresija heterolognih proteina

genetički manje poznati

neke prednosti i nedostaci domaćina za proizvodnju rekombinantnih proteina (3)

stanice sisavaca

istovjetna biološka aktivnost kao kod “prirodnog” proteina
dostupan relativno velik broj vektora

problemi pri rastu stanica u bioreaktoru

stanice sporo rastu

niska produktivnost bioprocasa

relativno skup bioprocas

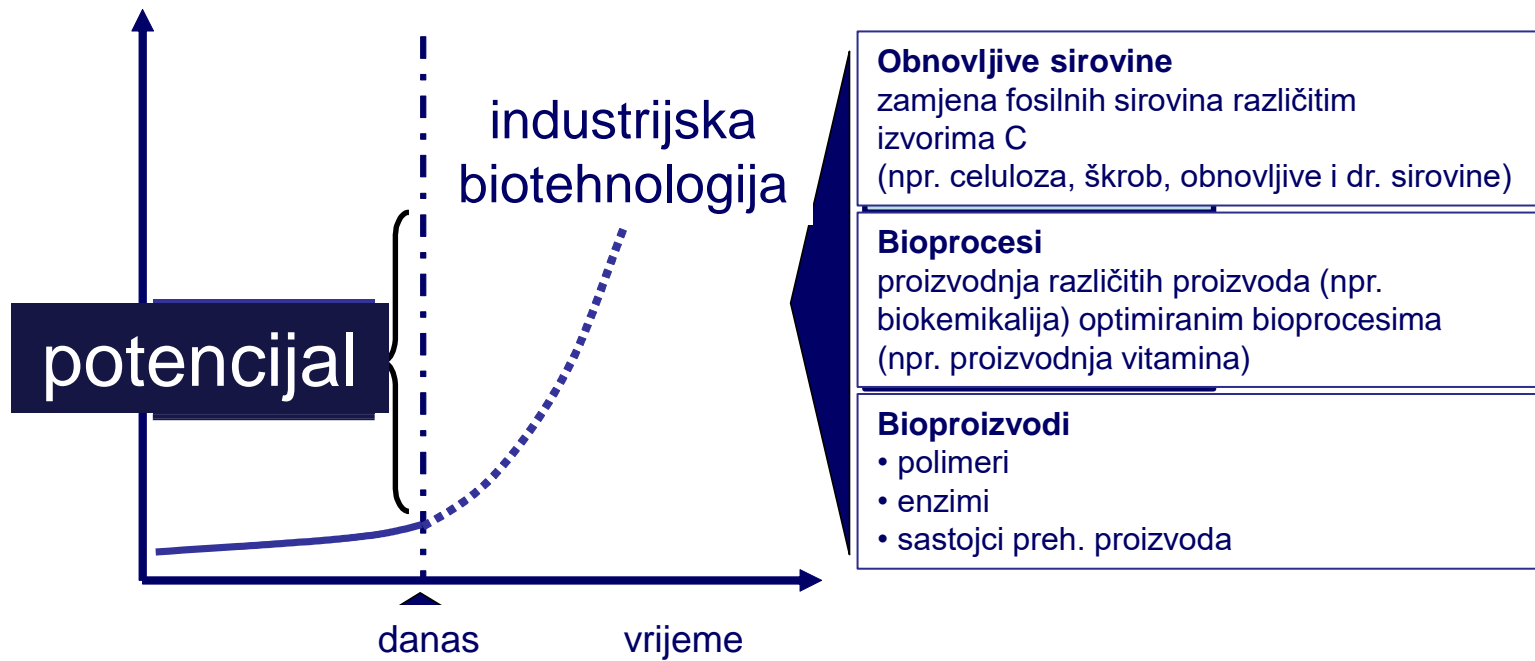
stanice insekata

moguć relativno visoka ekspresija ciljanog gena

moguće posttranslacijske modifikacije proteina (fosforilacija, glikozilacija, signalno cijepanje peptida, proteoliza)

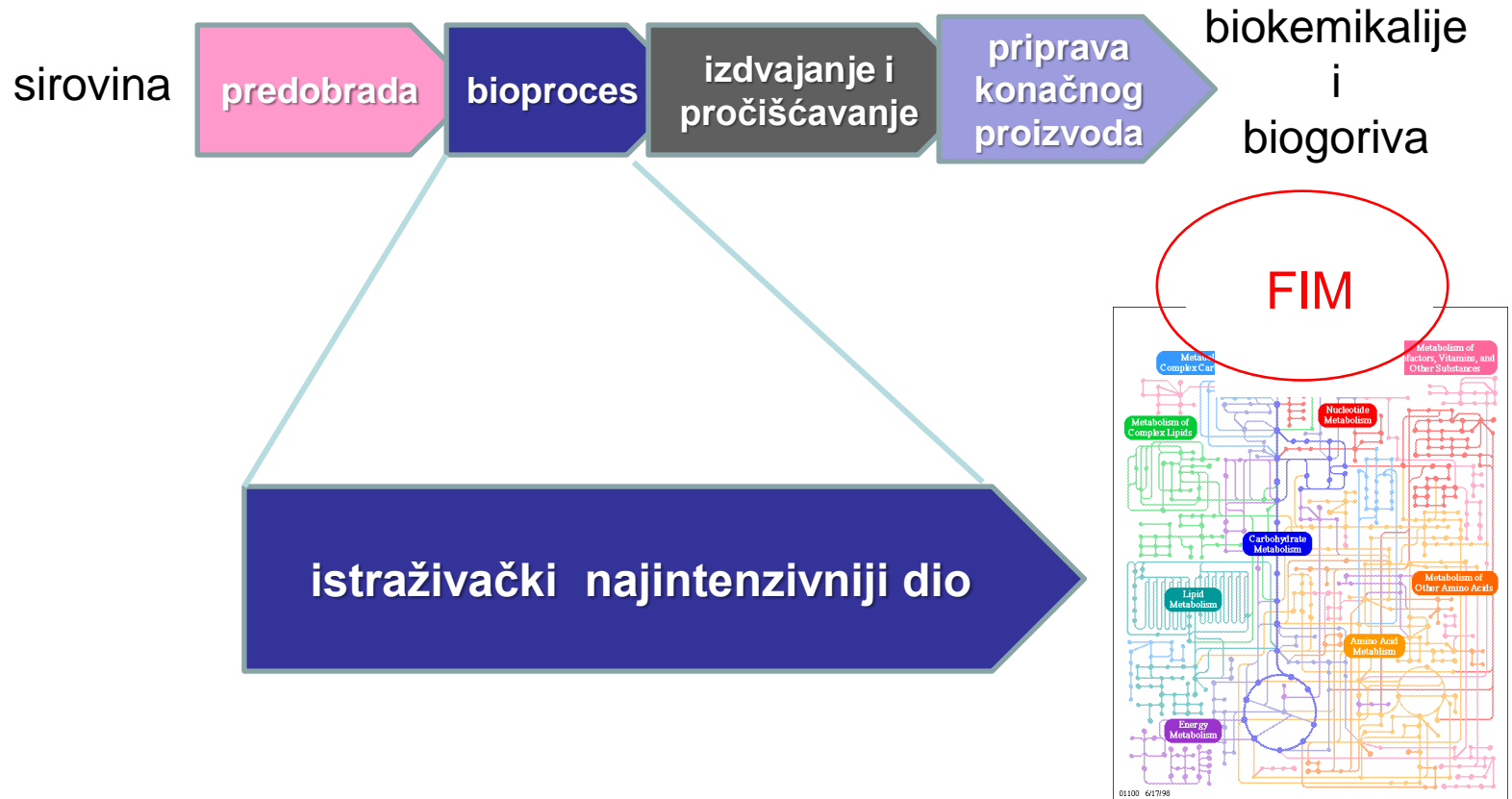
proteini rijetko pokazuju (očekivanu) relativno visoku aktivnost

različiti mehanizmi regulacije određenih procesa i prijenosa informacija još uvijek nepoznati



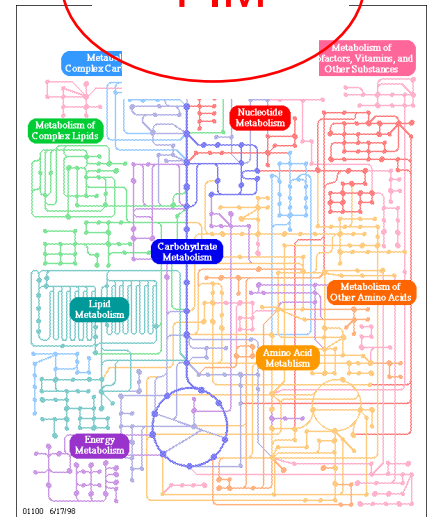
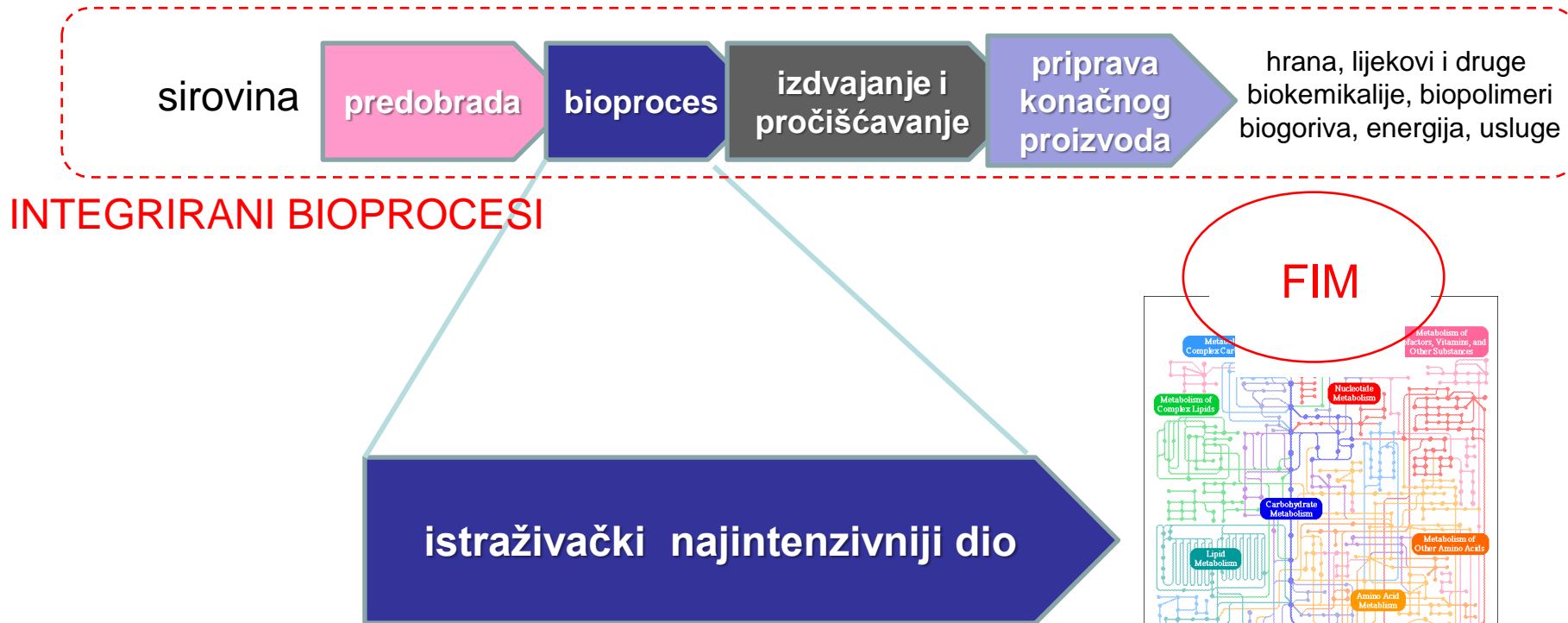
neki industrijski važni mikroorganizmi i njihov potencijal (10)

- lanac vrijednosti u industrijskoj biotehnologiji



neki industrijski važni mikroorganizmi i njihov potencijal (10)

- lanac vrijednosti u industrijskoj biotehnologiji



karakteristike industrijskog mikroorganizma

- ✓ MORA BITI ČISTA KULTURA
- ✓ MORA BITI GENETIČKI STABILAN
- ✓ MORA BRZO RASTI I LAKO SE UMNAŽATI
- ✓ NE SMIJE BITI PATOGEN, TOKSIČAN
- ✓ NE SMIJE STVARATI INFLAMATORNE TVARI
- ✓ MORA PROIZVODITI ŽELJENI PROIZVOD ŠTO BRŽE
- ✓ POŽELJNA SAMOZAŠTITA OD KONTAMINACIJE
- ✓ MORA SE LAKO ODRŽAVATI
- ✓ MORA BITI PRILAGOĐEN TEHNOLOŠKIM UVJETIMA

gdje se nalazi (potencijalni) industrijski mikroorganizam

- dio je prirodnih staništa
- u mikrobiološkoj zbirci (ATCC, DSMZ, NRRL, ...) eng. the Agricultural Research Service Culture Collection, ranije poznat pod nazivom Northern Regional Research Laboratory
- mutant dobiven mutagenезom
- rekombinant je (rekombinacija *in vivo*)
- r-DNA mikroorganizam (rekombinacija *in vitro*)

Definicija vrste

Mikroorganizmi istorodni po svojim morfološkim, fiziološkim i genetičkim odlikama, ali među kojima postoji određeni stupanj raznolikosti (varijabilnosti) dajući podvrste (subspecies), varijetete i klonove.

Više kategorije od vrste su rod, porodica, red, razred i carstvo.

Definicija soja

Najčešće podrazumijeva klon označen na temelju nekoliko tipičnih, dovoljno stabilnih karakteristika po kojima se razlikuje od ostalih sojeva iste vrste.

izolacija čiste kulture mikroorganizma



animacija: **Streak Plate Procedure**

www.sumanasinc.com/webcontent/animations/microbiology.html

Metode:

iscrpljivanja

uzastopnog razrijeđivanja

korištenja selektivnih podloga i različitih uvjeta uzgoja

viseće kapi

mikromanipulacije

Prvi odabir (eng. screening): npr. različiti indikatori, dodatak CaCO_3 , replika ploča, test mikroorganizam.

Drugi odabir: čvrste i tekuće podloge, auksonografska analiza.

(auksotrof - divlji tip ili genetski modificirani divlji tip koji ne može sintetizirati određeni organski spoj koji mu je potreban za rast; takav je spoj potrebno dodati u hranjivu podlogu u kojoj se želi uzgojiti ovaj mikroorganizam)

za proučavanje fiziologije određenog mikroorganizma potrebno je:

1. izolirati ga iz prirode,
2. uzgojiti ga kao čistu kulturu,
3. prirediti ga i čuvati kao trajnu kulturu (zbirka),
4. moći ga uzgojiti po želji u odgovarajućem volumenu i koncentraciji s ponovljivim uspjehom.

**PREMA NOVIJIM ISTRAŽIVANJIMA 90% BAKTERIJA JOŠ NIJE IZOLIRANO I OKARAKTERIZIRANO
JER SE NE MOGU UZGOJITI POZNATIM METODAMA!**

Optimiranje uvjeta uzgoja mikroorganizma:

1. **sastav podloge** (izvori C, N, P, S; minerali; faktori rasta; prekursori)

2. **optimalna temperatura uzgoja**

PSIHROFILI	< 20°C
MEZOFILI	20 - 42°C
TERMOFILI	42 - 80°C
EKSTREMNI TERMOFILI	> 80°C (npr. 80 - 113°C)

Termorezistentni mikroorganizmi podnose visoke temperature, ali pri njima ne rastu.

Optimiranje uvjeta uzgoja mikroorganizma (nastavak):

3. **pH optimum** (za bakterije uglavnom pH 6 - 8, a za kvasce i plijesni pH 4 - 6)

4. **kisik** (obligatni aerobi, obligatni anaerobi, fakultativni anaerobi, mikroaerofili)

5. **aktivnost vode**

a) halofili - trebaju povišenu koncentraciju soli.

slabi (1 - 6% NaCl)

srednji (6 - 15% NaCl)

ekstremni (15 - 30% NaCl)

Halotolerantni mikroorganizmi podnose više koncentracije soli, ali ih ne trebaju.

b) osmofili - rastu pri visokim koncentracijama ugljikohidrata.

c) kserofili - rastu na vrlo "suhim" supstratima.

tzv. ekstremna staništa prokariota i malog broja eukariota:

geotermalni izvori (80 - 121°C)

polarni pojasevi (-20 do 20°C)

kiseli (pH < 4) i alkalni (pH > 8) izvori

slana jezera (2 - 5 M NaCl)

hladne dubine (< 5°C) oceana uz visoki tlak

vulkani i hidrotermalni izvori (< 400°C)

Ovi su mikroorganizmi “vrlo moćan alat” za provođenje potencijalnih industrijskih bioprocasa i to zbog stabilnosti njihovih enzima pri visokim temperaturama, ekstremnim vrijednostima pH i tlaka, visokim koncentracijama soli i organskih otapala, kao i relativno visokim koncentracijama metala.

metode mikrobne fiziologije (5)

- neki primjeri enzima izoliranih iz mikroorganizama i cjelovitih stanica mikroorganizama koji obitavaju u tzv. ekstremnim staništima, a koji nalaze primjenu u industrijskoj biotehnologiji:

mikroorganizam	stanište s	enzim/stanica	primjena u proizvodnji
termofil	visokom temp. 45 - 65°C	amilaze ksilanaze	glukoze, fruktoze (zaslađivači) papira (izbjeljivanje)
	65 - 85°C	proteaze	piva, detergenata, itd.
	< 85°	DNA polim.	rekomb. mo (gen. inženjerstvo)
psihrofil	niskom temp.	proteaze	sira, mliječnih proizvoda
		dehidrogenaze	biosenzora
		amilaze	detergenata (razgr. polimera)
acidofil	niskom pH vrijednosti	oks. sumpora	ugljena
alkalofil	visokom pH vrijednost	celulaze	detergenata (razgr. polimera), PHB
halofil	visokom konc. soli	celulaze	poli(γ -glutaminske kiseline)(PGA)
piezofil	visokim tlakom	cjelovite stanice mo	gelova i granula škroba
metalofil	visokom konc. metala	cjelovite stanice mo	metala izluživanjem, bioremedijac.
radiofil	visokom radijacijom	cjelovite stanice mo	radionuklida bioremedijacijom
mikroaerofil	niskom konc. O ₂ (< 21%)		

još primjera ekstremnih uvjeta u kojima rastu i preživljavaju neki mikroorganizmi

<i>Pyrococcus</i> sp., <i>Pyrodictium</i> sp.	105°C (vulkanska područja, gejziri)
<i>Sulfolobus</i> sp.	pH 1, 80°C (vulkanska područja)
<i>Bacillus alkalophilus</i> , <i>Natronobacterium</i> sp.	pH 10.5 (alkalna jezera)
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	pH 2.0 - 8.0 (rudarske isplake)
<i>Halobacterium</i> sp.	30% NaCl (slana jezera, soljena riba)
osmofilni kvasci i plijesni	50% šećera (pekmez, šećerni sirupi)
xerofilne gljive	90% suhe tvari (brašno, sušeno voće)

Uzgoj mikroorganizama u laboratoriju:

1. POVRŠINSKI (kosi „agar”, Petryjeva zdjelica)

2. SUBMERZNO (u tekućoj hranjivoj podlozi u epruveti,

u tikvici u termostatu ili

laboratorijskom bioreктору

a) šaržni uzgoj (krivulja rasta)

b) pritočni uzgoj

c) polukontinuirani uzgoj

b) kontinuirani uzgoj (kemostat)

3. NA (POLU-)ČVRSTIM SUPSTRATIMA/SIROVINAMA

literatura (1)

1. A.L. Demain (2001) Genetics and microbiology of industrial microorganisms. Molecular genetics and industrial microbiology - 30 years of marriage, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 27, 352-356.
2. D.C. Demirjan, F. Morís-Varas, C.S. Cassidy (2001) Enzymes from extremophiles, *Current Opinion in Chemical Biology* 5, 144-151.
3. K. Egorova, G. Antranikian (2005) Industrial relevance of thermophilic Archaea, *Current Opinion in Microbiology* 8, 649-655.
4. Grupa autora: Hrvatski opći leksikon, A. Kovačec (ed.) Leksikografski zavod "Miroslav Krleža", Zagreb (1996).
5. Grupa autora: Biotehnologija - osnovna znanja, P. Raspor (ed.), Bia, Ljubljana (1996).
6. D.R. Higgins Overview of protein expression in *Pichia pastoris*, *Current Protocols in Protein Science*, J.E. Coligan, B.M. Dunn, D.W. Speicher, P.T. Wingfield (eds.), Chapter 5: Unit5.7. (2001).
7. C.P.Hollenberg, G. Gellissen (1997) Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts, *Current Opinion in Biotechnology* 8, 554-560.
8. J. Hugenholtz, E.J. Smid (2002) Nutraceutical production with food-grade microorganisms, *Current Opinion in Biotechnology* 13, 497-507.
9. M. Ikeda (2003) Advances in biochemical engineering / biotechnology, vol. 79. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 1-35.
10. A. Kern, E. Tilley, I.S. Hunter, M. Legiša, A. Glieder (2007) Engineering primary metabolic pathways of industrial microorganisms, *Journal of Biotechnology* 129, 6-29.
11. www.ebtna.net (**E**uropean **B**io**T**echnology **T**hematic **N**etwork **A**ssociation)

literatura (2)

12. O.P. Kuipers (1999) Genomics for food biotechnology: prospects of the use of high-throughput technologies for the improvement of food microorganisms, *Current Opinion in Biotechnology* **10**, 511-516.
13. W. Leuchtenberger, K. Huthmacher, K. Drauz (2005) Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects, *Applied Microbiology and Biotechnology* **69**, 1-8.
14. P. Li, A. Anumanthan, X.G. Gao, K. Ilangovan, V.V. Suzara, N. Düzgüneş, V. Renugopalakrishnan (2007) Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **142**, 105-124.
15. V. Marić, B. Šantek: *Biokemijsko inženjerstvo*, A. Rešetar (ed.) Golden marketing - Tehnička knjiga, Zagreb (2009).
16. Z.S. Olempiska-Bier, R.I. Merker, M.D. Ditto, M.J. DiNovi (2006) Food-processing enzymes from recombinant microorganisms – a review, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **45**, 144-158.
17. R.N. Patel (2001) Biocatalytic synthesis of intermediates for the synthesis of chiral drug substances, *Current Opinion in Biotechnology* **12**, 587-604.
18. M. Rai, H. Padh (2001) Expression systems for production of heterologous proteins, *Current Science* **80**, 1121-1128.
19. K.M.A. Gartland, F. Bruschi, M. Dundar, P.B. Gahan, M.P. Viola Magni, Y. Akbarova (2013) Progress towards the 'Golden Age' of biotechnology, *Current Opinion in Biotechnology* **24S**, S6-S13.
20. the ENCODE project, <http://www.genome.gov/10005107>
21. the brain research through innovative neurotechnologies (BRAIN), <http://www.humanbrainproject.eu>