

# FIZIOLOGIJA INDUSTRIJSKIH MIKROORGANIZAMA

temeljni kolegij sveučilišnih diplomskih studijskih programa

Bioproceno inženjerstvo i Molekularna biotehnologija

sveučilišnog 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](mailto:aslavica@pbf.unizg.hr))

# FIZIOLOGIJA INDUSTRIJSKIH MIKROORGANIZAMA - UVOD

- 
- Predavanja i vježbe
  - Domaće zadaje
  - Konzultacije (po potrebi)
  - Dva parcijalna pisana ispita
  - Pisani 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 osvrt na industrijski primijenjene biokatalizatore (stanice, ali i druge biokatalizatore):

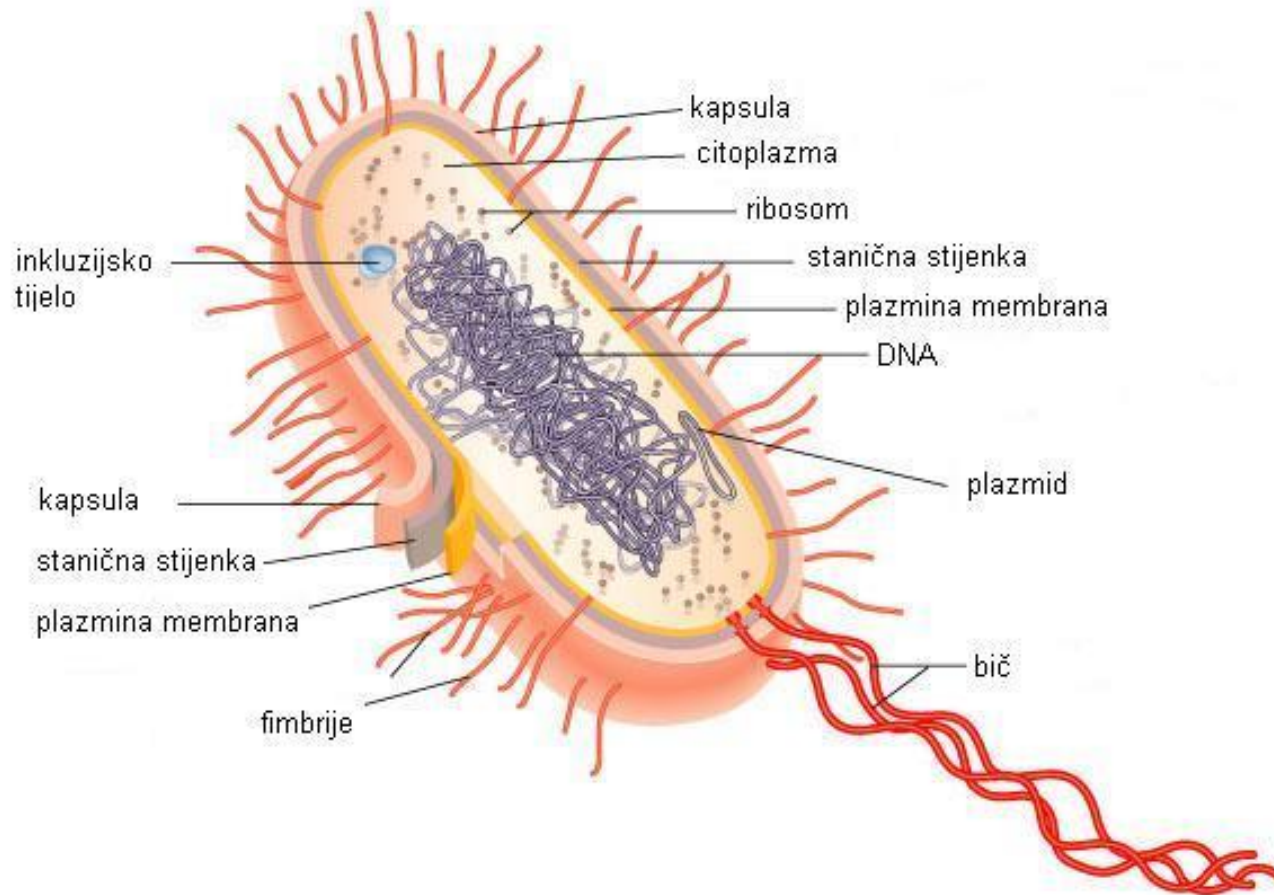
bakterija

kvasaca

filamentoznih funga

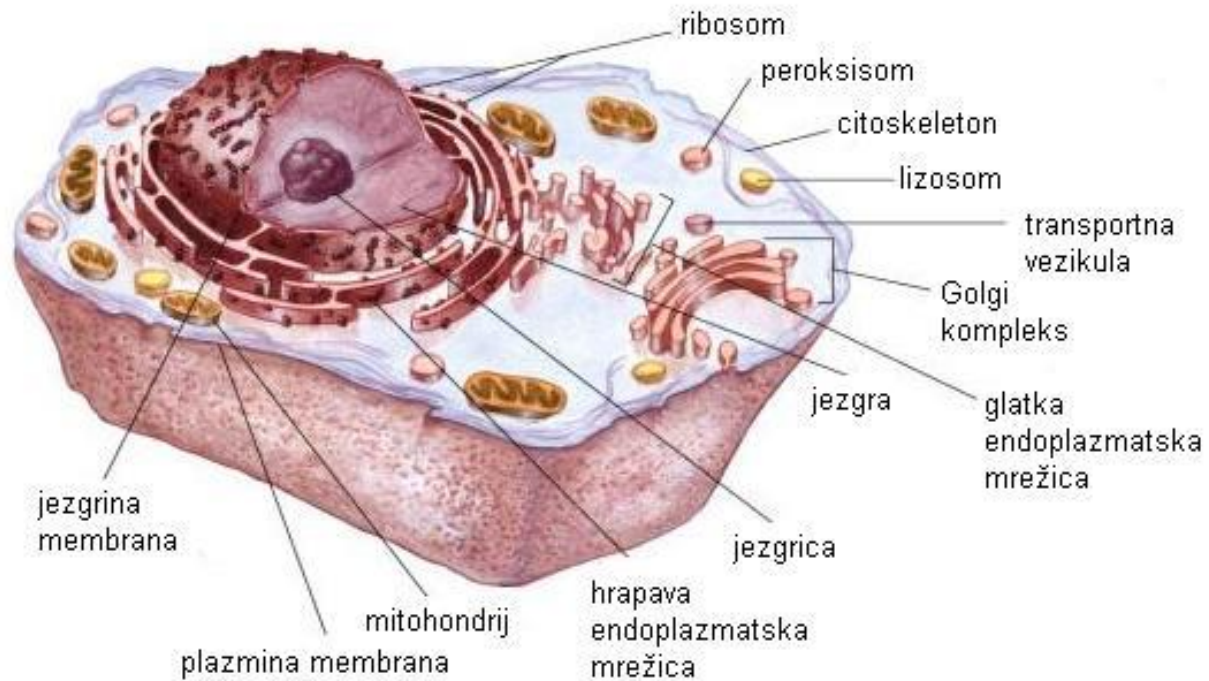
biljnih i životinjskih tkiva

podsjetimo se: karakteristike stanica mikroorganizama - stanica prokariota





podsetimo se: karakteristike stanica mikroorganizama - stanica eukariota



[sites.sinauer.com/cooper5e](https://sites.sinauer.com/cooper5e)

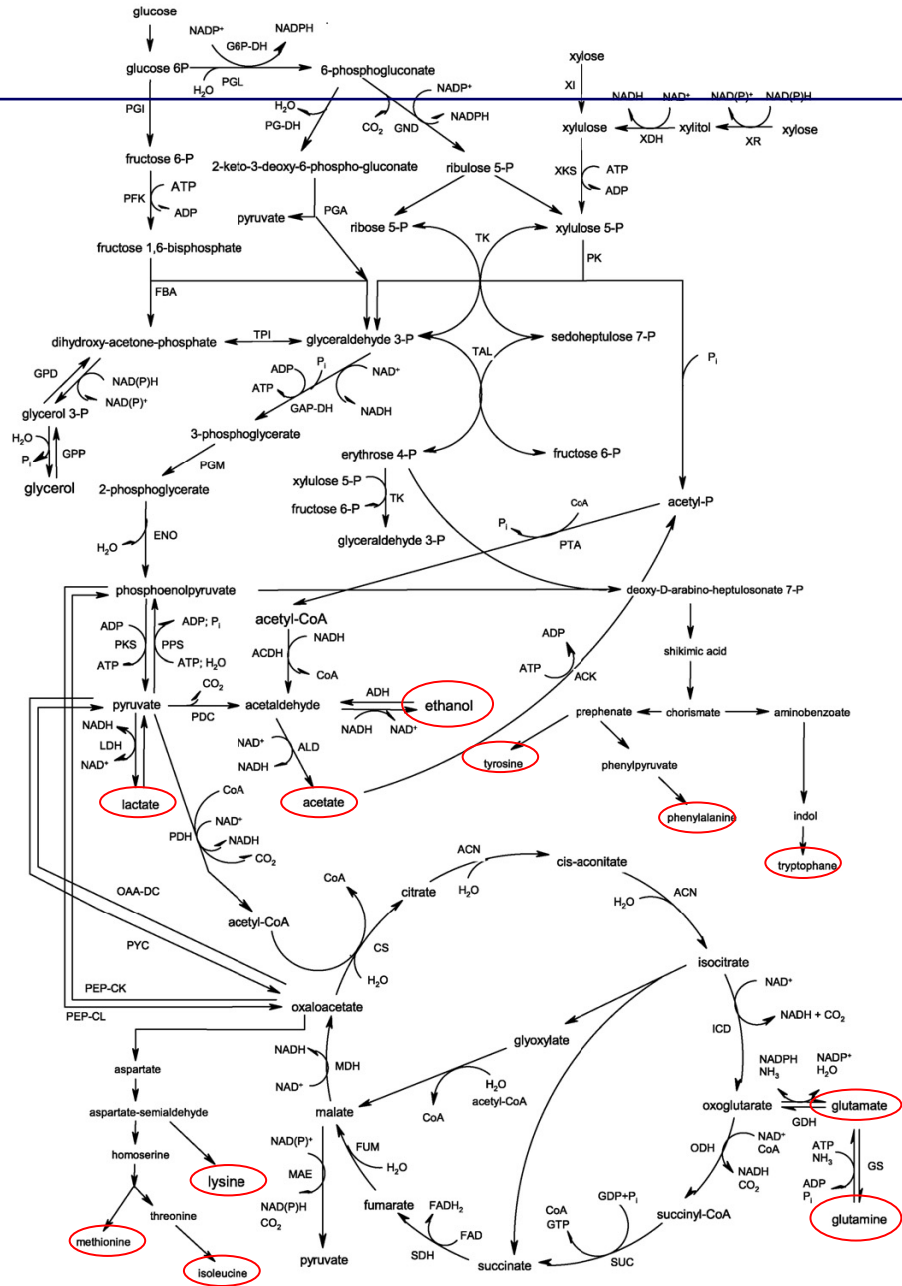
**Animations and Micrographs**

Sumanas, Inc., [www.sumanasinc.com](http://www.sumanasinc.com)

animacija: **Eukaryotic organelles**

[www.sumanasinc.com/webcontent/animations/biology.html](http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/biology.html)

podsjetimo 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	<del><i>E. coli</i> KY 10935</del>
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. (aceton, 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”, aceton, 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 iz stanice,  
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* ( $\alpha$ -amilaza)

*Aspergillus terreus* (biofarmaceutska ind.)

*Neurospora crassa* (istraživanje fiziologije mikroorganizma)

*Penicillium chrysogenum* ( $\beta$ -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
kimozin	<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)

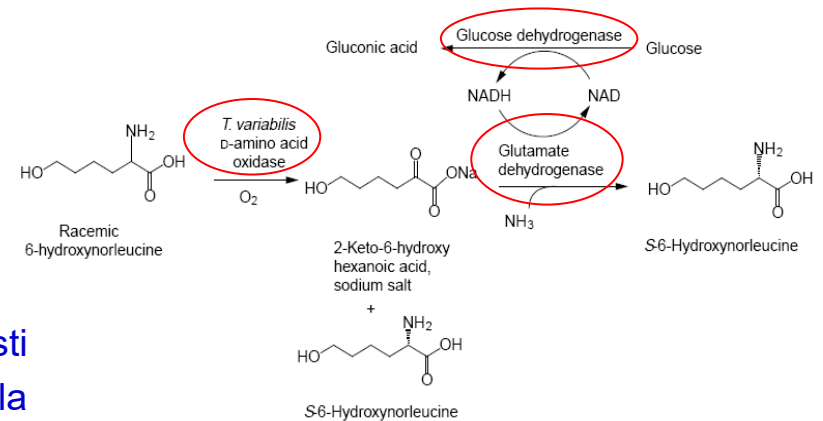
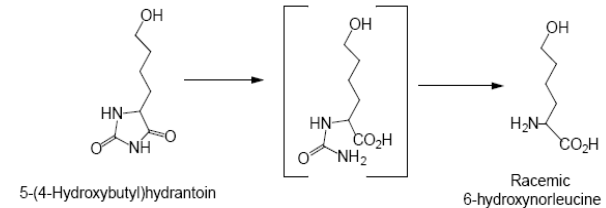
stanice sisavaca (CHO)

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,  $\beta$ -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](http://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**

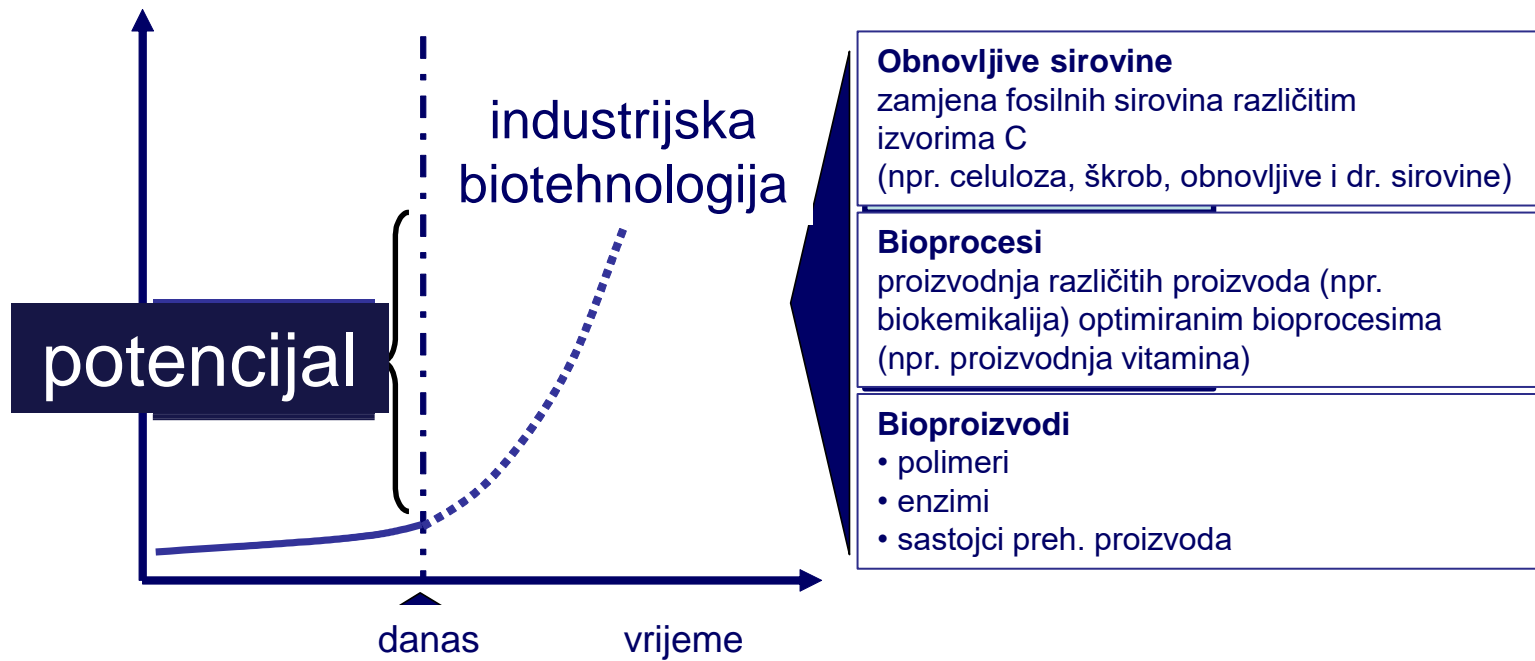
### stanice insekata

moguć relativno visoka ekspresija ciljanog gena

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

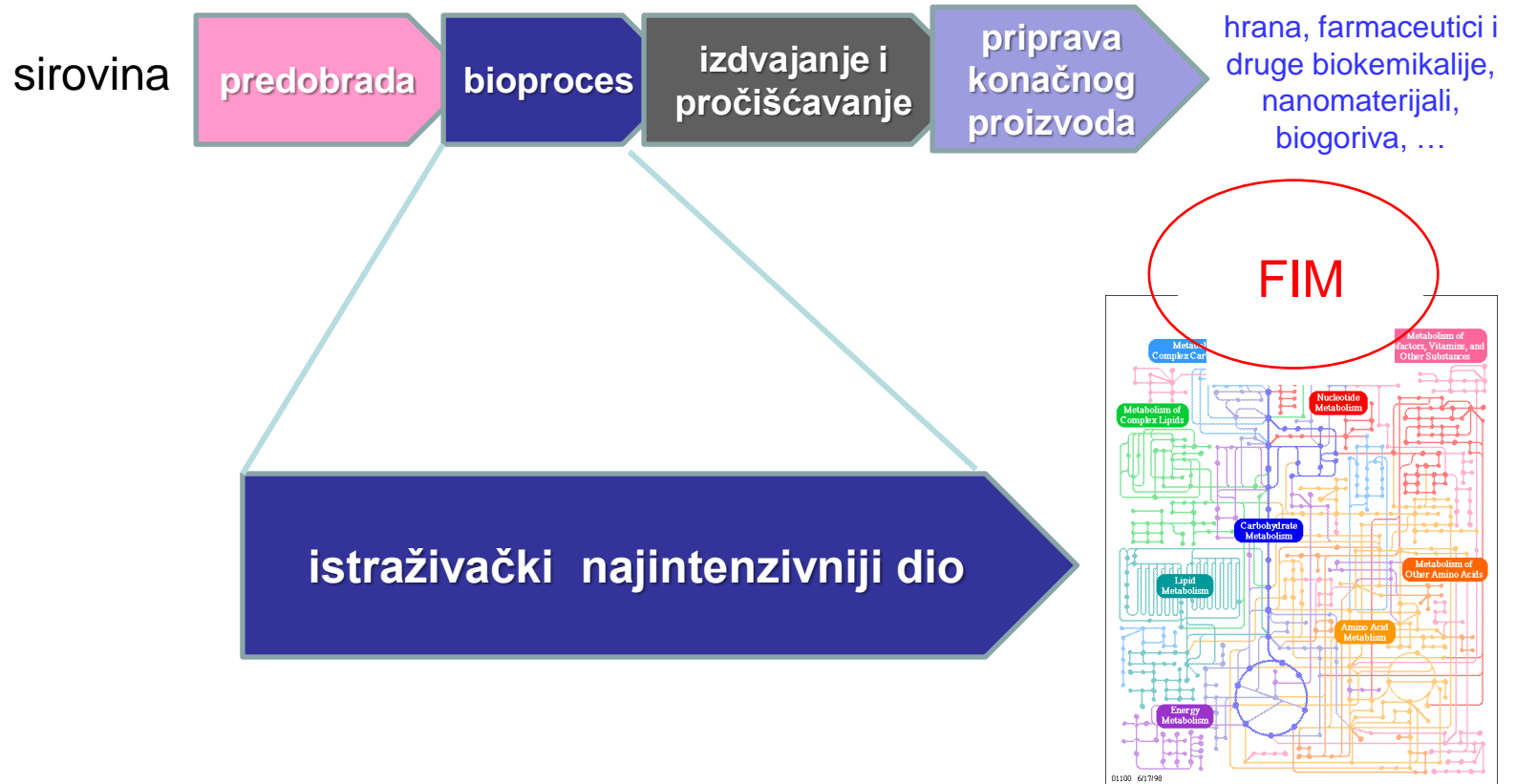
**proteini rijetko pokazuju (očekivanu) relativno visoku aktivnost**

**različiti mehanizmi regulacije određenih procesa i prijenosa informacija još uvijek nepoznati**



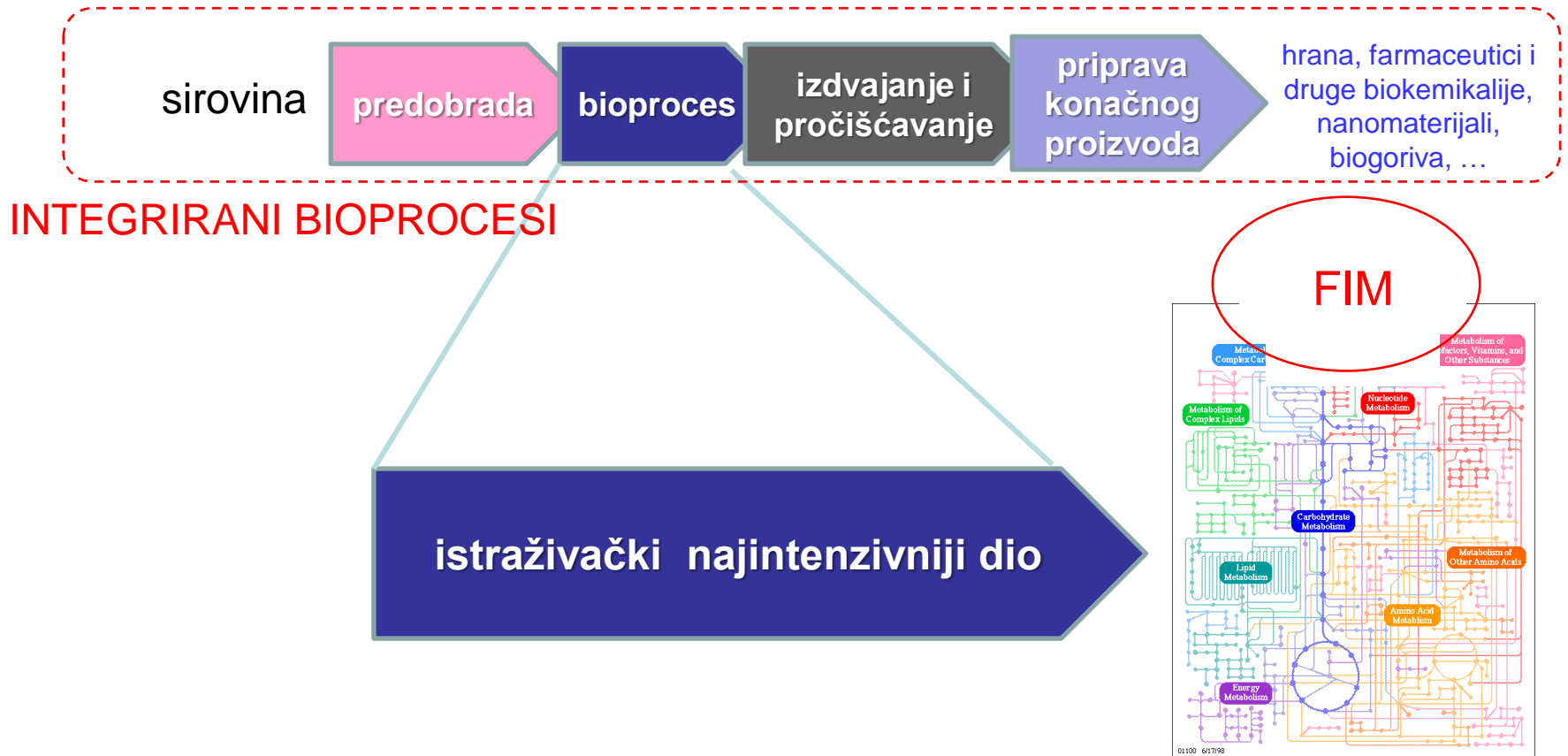
## neki industrijski važni mikroorganizmi i njihov potencijal (10)

- 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](http://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  $\text{CaCO}_3$ , 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( $\gamma$ -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 <sub>2</sub> (< 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](http://www.ebtna.net) (European Bio**technology Thematic Network Association)**

## 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>