



UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Maj HROVAT

**SINTEZNO BIOLOŠKI PRISTOPI ZA  
PRIDOBIVANJE ŽIVILSKIH AROM**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2020

V duhu Richarda Feynmana:

“Česar ne morem ustvariti, ne razumem.”

In spirit of Richard Feynman:

“When I cannot create, I do not understand.”

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Maj HROVAT

**SINTEZNO BIOLOŠKI PRISTOPI ZA PRIDOBIVANJE ŽIVILSKIH  
AROM**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij - 1. stopnja

**SYNTHETIC BIOLOGY APPROACHES TO FOOD FLAVOURS  
PRODUCTION**

B. SC. THESIS  
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2020

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študijskega programa prve stopnje Biotehnologija.

Študijska komisija 1. in 2. stopnje študija biotehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Polono Jamnik, za somentorja pa prof. dr. Romana Jerala.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednik: prof. dr. Mojca NARAT  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Polona JAMNIK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: doc. dr. Iztok PRISLAN  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Roman JERALA  
Kemijski inštitut, Odsek za sintezno biologijo in imunologijo

Datum predstavitve: 26. 8. 2020

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du1
DK	UDK 606:62:602.6:578/579:604.4:663.051:663.051:576.343(043.2)
KG	sintezna biologija, metabolni inženiring, biotehnoška proizvodnja spojin, aromatične spojine
AV	HROVAT Maj
SA	JAMNIK Polona (mentor), JERALA Roman (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Univerzitetni študijski program prve stopnje Biotehnologija
LI	2020
IN	SINTEZNO BIOLOŠKI PRISTOPI ZA PROIZVODNJO ŽIVILSKIH AROM
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
OP	VI, 21 str., 1 pregl., 2 sl, 62 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Vonj in okus sta med seboj povezani, kompleksni čutili, s katerima zaznavamo nekatere male molekule v naši neposredni bližini. Tekom zgodovine naše vrste smo razvili množico receptorjev, ki z interakcijami s specifičnimi spojinami vzbudijo akcijske potenciale živcev, ki jih naši možgani interpretirajo kot senzacijo arome. Naravna mešanica aromatičnih spojin v živilu je kljub kompleksnosti eden od glavnih vzrokov za senzorično sprejemljivost izdelkov. V industriji se tako arome in ojačevalci arom živilom dodajajo, da omogočijo boljše senzorične izkušnje potrošnikom. A zaradi omejenih naravnih virov, preference potrošnikov po naravnih sestavinah in industrijskega posluževanja netrajnostne kemijske sinteze, se danes išče alternativne poti za pridobivanje naravnih aromatičnih spojin. Sintezna biologija nam kot inženirska disciplina s svojimi pristopi omogoča, da mikroorganizme prirojimo svojim proizvodnim potrebam. Tako skupaj z industrijsko biotehnologijo predstavlja ekonomičen pristop k trajnostni proizvodnji naravnih arom za uporabo v živilski industriji. V 21. stoletju postane mogoče v laboratorijskih in industrijskih bioreaktorjih po vsem svetu, s pomočjo živih celic, z inženirsko prirojenimi genomi, proizvajati raznovrstne spojine. Tudi take, ki jih v naravi najdemo le v strokih orhideje z Madagaskarja, lubju aromatičnega drevesa iz Indije ali omamnih cvetovih sivke s polj v Franciji. Le-te pa se nato lahko vključijo kot aditivi v živila po vsem svetu.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du1
- DC UDK 606:62:602.6:578/579:604.4:663.051:663.051:576.343(043.2)
- CX synthetic biology, metabolic engineering, biotechnology production of compounds, aromatic compounds
- AU HROVAT Maj
- AA JAMNIK, Polona (supervisor), JERALA, Roman (co-advisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
- PY 2020
- TI SYNTHETIC BIOLOGY APPROACHES TO FOOD FLAVOURS PRODUCTION
- DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)
- NO VI, 21 p., 1 tab., 2 fig., 62 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Taste and smell are interconnected, complex senses which enable us to perceive specific small molecules in our presence. During our history as a species, we evolved a group of receptors, which bind specific compounds and trigger action potentials of nerves, which are interpreted as aroma sensations. Natural mixture of aromatic compounds in food is complex, but essentially one of biggest reasons for sensory acceptance of food products. In industry therefore flavourings, fragrances and flavour enhancers are used as food additives, resulting in better sensory experiences of food products. But because of limited natural sources, consumer preference for natural ingredients and unsustainable chemical synthesis at industrial scales, industry seeks alternatives to natural aromatic compounds production. Synthetic biology is an engineering discipline with approaches that enable us to shape microorganisms to our production needs. Together with industrial biotechnology it enables an economical approach to sustainable natural flavour and fragrance production for use in food industry. In 21<sup>st</sup> century becomes possible to use laboratory or industrial bioreactor and utilize live cells with modified genomes to produce amazing range of natural products. Even ones that are naturally found only in beans of Madagascar's orchid, bark of aromatic tree in India or even flowering lavender fields of France. Those can subsequently become part of food products all around the globe.

## KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VI
KAZALO SLIK	VI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VI
<b>1 UVOD</b>	1
<b>2 AROME V ŽIVILSKI INDUSTRIJI</b>	2
2.1 RAZUMEVANJE VONJA IN OKUSA	2
2.2 PRISOTNOST NA TRGU Z ADITIVI	2
2.3 PRODUKTI IN FORMULACIJE	3
2.4 RAZVRSTITEV AROM	4
2.5 REGULATIVA V EVROPSKI UNIJI	5
<b>3 SINTEZNA BIOLOGIJA</b>	5
3.1 UVOD V SINTEZNO BIOLOGIJO	5
3.2 METABOLNI INŽENIRING	6
<b>4 SINTEZNO BIOLOŠKA ORODJA ZA PRIDOBIVANJE AROM</b>	7
4.1 TEHNIKE METABOLNEGA INŽENIRINGA	7
4.1.1 Povečanje endogene sinteze prekurzorjev	7
4.1.2 Zmanjšanje toksičnih efektov	7
4.1.3 Genski in proteinski inženiring	8
4.1.4 Prostorska optimizacija metabolizma	9
4.2 MIKROBNE ŠASIJE IN CELIČNE TOVARNE	9
4.2.1 <i>Escherichia coli</i>	10
4.2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in druge kvasovke	11
4.2.3 <i>Pseudomonas putida</i>	12
4.3 SINTEZNA BIOLOGIJA ZA PROIZVODNJO AROM V PRAKSI	13
4.3.1 Terpenoidi	13
4.3.2 Fenil propanoidi	14
4.4 NAPREDNA UPORABA	15
4.4.1 Inženiring kvasovke za proizvodnjo arom hmelja	15
4.4.2 Proizvodnja leghemoglobina v kvasovki <i>Pichia pastoris</i>	16
<b>5 SMISELNOST IN EKONOMIKA</b>	16
<b>6 ZAKLJUČEK</b>	17
<b>7 VIRI</b>	17

## KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
Preglednica 1: Primer formulacije arome maline, za namen uporabe v bombonih in pijačah (Prirejeno po Lukin in sod., 2019)	3

## KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Biosinteza terpenoidnih aromatičnih spojin (Prirejeno po Van Wyk in sod., 2018)	5
Slika 2: Biosinteza fenil propanoidnih aromatičnih spojin (Prirejeno po Van Wyk in sod., 2018)	14



## 1 UVOD

Vonj in okus sta izjemno pomembni senzorični lastnosti živil in ena glavnih dejavnikov, zakaj potrošniki izdelke vzljubijo. Fiziologija naših nosov, olfaktornega aparata, v nerazdružljivi povezavi z receptorji za okus, na jeziku, omogoča našim možganom, da interpretirajo kombinacije kemičnih dražljajev. Sistem je tako zmogljiv, da z njim lahko zaznamo in med seboj razločimo teoretično kar 1 trilijon različnih aromatičnih senzacij (Bushdid in sod., 2014). Zato seveda ni nepredstavljivo, da je manevrskega prostora za inženiring aromatičnosti živil več kot dovolj. Arome so glede na Evropsko regulativo definirane kot snovi, uporabljene za dodajanje ali spreminjanje vonja in okusa živil. Pogosto so to manjše, hlapne molekule iz različnih kemijskih skupin. V živilski industriji predstavljajo pomembno kategorijo aditivov, ki predstavlja kar eno četrtno vsega trga z živilskimi aditivi (Asunción in Angeles, 2006). Večinoma se pridobivajo z ekstrakcijo molekul iz naravnih virov, predvsem rastlin, ali pa s kemijsko sintezo, ki je danes najbolj množično uporabljena metoda (Van Wyk in sod., 2018). Oba pristopa spremlja kar nekaj težav. Izolacija iz naravnih virov je energijsko zahtevna, saj so komponente v rastlinskih tkivih pogosto prisotne v nizkih koncentracijah. Hkrati dostopnost in letno razpoložljive količine variirajo zaradi vplivov okolja, političnih vplivov ter bolezni in škodljivcev rastlin (Asunción in Angeles, 2006). Kemijska sinteza je zaradi proizvodnje in vitro večinoma odporna na probleme izhajajoče iz okolja, a hkrati je energijsko zahtevna, izdelek ne more biti označen kot "naraven". Pogosto proizvodni proces spremlja tudi nastanek toksičnih odpadnih snovi, ki bremenijo okolje. Za nekatere molekule je kemijska sinteza tudi neučinkovita, saj pri ne-encimski reakciji pogosto nastajajo mešanice enantiomerov, od katerih ne posedujejo vsi aromatičnih lastnosti. Tovrstne težave in inženirski izzivi pa pomenijo priložnost za aplikacijo biotehnologije.

S postopki moderne biotehnologije lahko danes proizvajamo velike količine malih molekul v industrijskih bioprocseh. Za te namene pa v biotehnologiji poznamo mnoge načine, pogosto se pri tem poslužujemo metod genskega inženiringa. V 21. stoletju se bliskovito razvija področje sintezne biologije - naprednega genskega inženiringa. Pogosto se z besedno zvezo označuje interdisciplinarno področje biotehnologije, kjer se z raznolikimi metodami razvija in proizvaja nove biološke dele, naprave in sisteme, ki v naravi ne obstajajo (Synthetic biology ..., 2019). V metabolnem inženiringu je uporaba sintezne biologije pogosta, saj se metabolno pot lahko sestavi z encimi iz različnih vrst organizmov ter s tem zagotovi želene lastnosti. To je pogosto nujen korak, ki omogoči proizvodnjo molekul v izbrani "celični tovarni", ki večinoma ni celica organizma, iz katerega encimi izhajajo. Z metodami sintezne biologije pogosto lahko dosežemo višje donose ter posledično nižjo lastno ceno proizvodnje molekule. Pogosto se lahko za vstopno surovino pri danih procesih uporabi tudi stranski snovni tok iz industrije - odpadne snovi. V primerjavi z ostalimi metodami to pomeni veliko manjše breme za okolje, hkrati pa konkurenčno ceno na trgu. Pogosto je z biološkimi sistemi mogoče proizvajati molekule, ki jih s kemijsko sintezo ne znamo, ali pa je le-ta prezahtevna. Zaradi proizvodnje v bioreaktorjih na enostavnih substratih so vplivi na okolje zanemarljivi.

## 2 AROME V ŽIVILSKI INDUSTRIJI

### 2.1 RAZUMEVANJE VONJA IN OKUSA

Vonj in okus sta pomembna osnovna parametra senzorične zaznave živil in kot taka tudi izjemno pomembna za sprejetost živilskih izdelkov na trgu. Človek zaznava nehlapne substance z direktnim stikom molekul z receptorji v ustni votlini, kar omogoča kemijsko identifikacijo nehlapnih molekul. Receptorji so različnih tipov in kompleksnost sistema je zaenkrat omogočila znanstveno potrditev prisotnosti petih zaznavnih receptorjev, ter povezanih osnovnih okusov, ki jih zaznamo: sladko, slano, kislo, grenko in umami (slastno). Osnovni okus lahko potrdimo, če je zanj odgovoren znan receptor na celicah. Počasi se kopičijo dokazi, da je osnovnih okusov več, a zaenkrat znanstveno še niso potrjeni. Kot potencialni kandidati so receptorji za maščobo, kredo (ang. Chalky taste), kovine, kalcij ali ogljikove hidrate (Tole in sod., 2019) A svet še zdaleč ni tako enostaven, za nas je pomembno mnogo več molekul, katerih zaznava je našim prednikom omogočila evolucijske prednosti. Naši možgani tvorijo predstave o živilih, ki jih zaužijemo, s sestavljanjem signalov okusa in olfaktornimi signali. Sistem za zaznavanje vonjev je sestavljen iz več akterjev. Male molekule v plinski fazi se preko olfaktornih receptorskih proteinov, ki so molekule iz superdružine G-proteini povezanih receptorjev. Signal na receptorskem proteinu aktivira Golf protein, ki nato aktivira adenilat ciklazo, encim, ki vrši reakcijo pretvorbe ATP v cAMP. Le-ta pa nato aktivira kationske kanalčke, membrana aksioma pa se depolarizira, kar po njej povede dražljaj skozi cibriform ploščo, do glomerulusov, sinapsnih povezav z mitralnimi celicami, ki predstavljajo olfaktorna bulbosa, specializirane predele naših možganov (Constanzo, 2017). Vsaka mitralna celica je v povprečju zvezana na 1000 aksonov receptorskih celic (Wright, 2010). Za odkritja na področju molekularnih in genetskih mehanizmov olfaktornega sistema, je bila leta 2004 podeljena tudi Nobelova nagrada za Fiziologijo ali medicino znanstvenikoma Richardu Axelu in Lindi B. Buck, ki sta ogromno prispevala razvoju področja (Buck in Axel, 1991; NobelPrize.org, 2004).

### 2.2 PRISOTNOST NA TRGU Z ADITIVI

Čeprav je pojem aroma precej vseobsegajoč, ter se uporablja tudi za vonjave, dišave in okuse, se v živilski industriji arome uporabljajo predvsem za izboljšanje, oziroma vzpostavitev senzoričnih lastnosti izdelkov. Po nekaterih ocenah, je velikost trga z aromami leta 2006 znašala kar 18 milijard ameriških dolarjev (Shukla in sod., 2019). Veliko število ne preseneča, saj se poleg uporabe v živilih, arome veliko uporabljajo tudi v kozmetičnih izdelkih, dišavah, pralnih sredstvih in raznih dišečih pripomočkih. Ocenjuje se, da se danes več kot 100 različnih aromatičnih komponent proizvaja z biotehnološkimi metodami (Shaaban in sod., 2016). Število naj bi v naslednjem desetletju raslo, saj se razvijajo tehnologije, ki omogočajo bolj ekonomično biotehnološko proizvodnjo, hkrati pa se na trgu večja potreba po ne-sintezni pridobljenih aromah, ki so lahko potemtakem deklarirane kot "naravne arome", glede na povsem drugačen tip proizvodnje, se jih imenuje tudi "bioarome", čeprav to poimenovanje še ni sprejeto s strani regulative (Van Wyk in sod., 2018).

## 2.3 PRODUKTI IN FORMULACIJE

V živilski industriji se arome uporabljajo večinoma kot kompleksne mešanice posameznih aromatičnih spojin. Formulacije se delijo glede na aplikacijo arome ter kemijske lastnosti posameznih molekul. V grobem jih lahko delimo na trdne, praškaste formulacije, ki se delijo na razpršene in sušene z razprševanjem (ang. "Spray drying") ter tekoče formulacije arom, ki jih lahko nadaljnje razdelimo na vodotopne tekoče, bistre vodotopne tekoče, v olju topne tekoče, in emulgirane. Pogosto za vsak tip, različne končne aplikacije in kemijsko različne spojine industrijski proizvajalec arom postavi povsem drugačne procese za formulacijo. Prikaz formulacije tipičnega produkta predstavlja Preglednica 1, tako imenovani "šolski primer" izdelave arome maline. Najprej so navedene posamezne aromatične spojine, ki sestavljajo produkt, nato je predstavljena njihova zastopanost v naravnem ekstraktu maline, ter zastopanost v zmesi spojin, formulaciji arome maline, kakršno bi imel potencialni produkt na trgu.

Preglednica 1: Primer formulacije arome maline za namen uporabe v bombonih in pijačah (Prirejeno po Lukin in sod., 2019).

Ime aromatične spojine	Ekstrakt [%]	Aroma [%]
Alfa-ionon	4,00	0,035
Beta-ionon	1,80	0,015
4-hidroksipropil butan-2-on	0,50	1,000
Damaskenon	0,05	0,040
Dimetil sulfid	0,02	0,020
Acetoin	0,50	0,009
Etil acetat	5,00	0,200
Cis-3-heksenol	8,00	-
Cis-3-heksenil acetat	0,02	0,030
Delta-dekalakton	0,60	0,050
Jasmine absolute	-	0,020

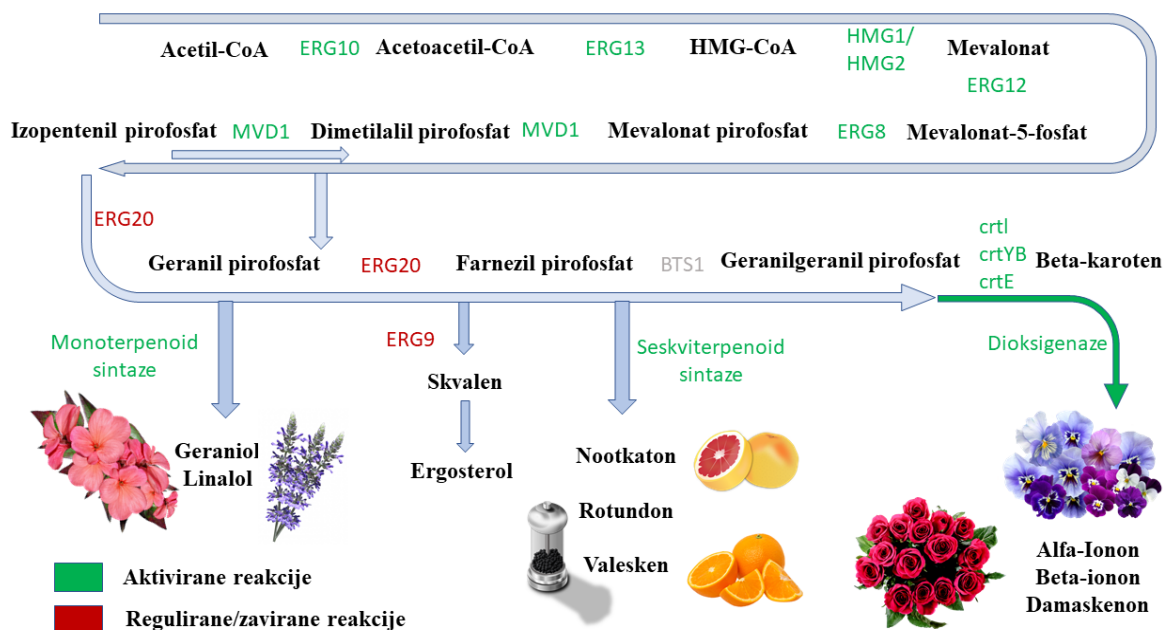
Pogosto so kompleksne arome sestavljene tako, da flavoristi, strokovnjaki za arome, najprej izdelajo iz ključnih primarnih arom osrednjo strukturo arome, le-teh je zgolj nekaj, v primeru maline lahko kot primarne smatramo alfa-ionon (vijolična nota, pogosto asociirana z jagodičevjem), beta-ionon (vijolična nota s pridihom ciprese, skupaj z alfa-iononom pogosto prisotna v vseh gozdnih sadežih) in 4-hidroksipropil butan-2-on (molekula, ki ima specifično jagodičasto aromo, ki asociira ravno na malino). Primarne arome flavorist izbere glede na teorijo in senzorično testiranje, pri tem pa si pomaga s pomočjo analize elementarnih arom v ekstraktu naravnega vira, v tem primeru - maline. Če bi zmešali le te tri komponente v pravih razmerjih, bi že prepoznali aromo, ki spominja na malino, a deluje nekako nepristno, umetno. To je zgolj skelet iz primarnih arom, ki mu nato flavoristi dodajo sekundarne arome, ki povečajo kompleksnost in izboljšajo karakter. Damaskenon ima "sadni" karakter in je pogosta

izbira za vsako aromo, ki se želi približati zrelemu sadju. Dimetil sulfid je pogosto naravno prisoten in ga naš olfaktorni organ prepozna kot vonj zrelega sadja, če je koncentracija nizka in vonj kislega zelja, če je koncentracija visoka. S takšno sekundarno aromo, ki ima dva značaja je torej treba biti previden. Acetoin in etil-acetat oba prispevata tudi k "rdečkasti", "sadni" noti, ter se ju v zelo razredčenih koncentracijah doda za ojačenje kompleksnosti sadnega značaja mnogih arom. "Svežino" in "zeleno" noto, ki asociira na sveže, nezrelo sadje, ali pa pokošeno travo, vnesemo s cis-3-heksenolom, a pri tem mora flavorist prav tako paziti, da vnese zgolj svežino in ne občutne "ne-zrelosti", zato je bolj varna izbira alternativnega cis-3-heksenil acetata, z manj izrazito "ne-zrelo" noto, ki ga je v dejanskem ekstraktu malin malo. Aromi nato dodamo še nekaj globine z dodatkom delta-dekalaktona, ki doda "kremno" noto. Pogosto se na koncu za dodatek kompleksnosti in učinek naravne arome doda kompleksen izolat, pogosto je to za sadeže kar ekstrakt jasmina (ang. »Jasmin absolute«), ki vsebuje mnoge aromatične molekule, kot so benzil acetat, linalol, indole in metil jasmonat (Lukin in sod., 2019).

## 2.4 RAZVRSTITEV AROM

Kemijsko gledano lahko arome razvrstimo v skupine glede na sestavo molekul. Glavne skupine osnovnih hlapnih spojin, ki vsebujejo atome ogljika, vodika in kisika so aldehidi, alkoholi, ketoni, estri, laktoni, karboksilne kisline, terpeni in terpenoidi. Nato se jim priključijo še spojine, ki vsebujejo več kisikovih atomov. Te so furani, furanoidi, furanoni, maltol in cikloteni ter fenoli. Sledijo spojine z vključenimi dušikovimi atomi. Le-te so amini, imini, piroli, pirolini, piridini in pirazini. Na koncu pa sledijo še spojine z vključenim žveplovim atomom. Te razvrščamo v sulfide, tiole, tiofene, tiazole, tiazoline, tioestre, merkapto estre, izotiocianate in tionitrile (Parker, 2015).

Gledano skozi oči biotehnologa, naravne spojine lahko smiselno razdelimo glede na biosintezne poti nastanka. Molekul, ki posedujejo aromatične lastnosti je mnogo, a velika večina izhaja iz le nekaj metabolnih poti. Delimo jih torej na terpenoide (le-teh je v naravi največ, ocenjuje se da je kar 60 % raznolikih naravnih spojin pripadnic terpenoidov), polifenole, poliketide, fenilpropanoide (ki skupaj znašajo še nadaljnjih 30 % naravnih spojin) in nato še ostale, redkejšje molekule, ki imajo svoje, unikatne metabolne poti. Med vsemi temi skupinami obstajajo seveda tudi hlapne molekule, ki jih zaznajo naši olfaktorni receptorji in so zato industrijsko zanimivi (Firn, 2010). Na Sliki 1 prikazana terpenoidna metabolna pot, ki je izvor mnogih posameznih razredov aromatičnih molekul, ki jih najdemo v raznolikih organizmih. Danes so nekatere biosintezne poti za pridobivanje navedenih spojin že znane. Razvoj in komercializacija biotehnoške proizvodnje enostavnih molekul pogosto tudi nista smiselna, če jih izjemno poceni in učinkovito lahko pridobivamo s kemijsko sintezo, ali pa naravno izolacijo iz poceni materialov. Zato so predvsem zanimive arome, ki se v naravi proizvajajo s specifično metabolno potjo, ki prispeva h kompleksnosti molekule, naravni viri pa so omejeni (Van Wyk in sod., 2018).



Slika 1: Biosinteza terpenoidnih aromatičnih spojin (Prirejeno po Van Wyk in sod., 2018).

## 2.5 REGULATIVA V EVROPSKI UNIJI

V Evropski uniji na področju uporabe arom v živilski industriji velja Izvedbena uredba komisije (EU) št. 872/2012 o sprejetju seznama aromatičnih snovi, ki vsebuje seznam molekul, ter pogoje v skladu s katerimi se lahko uporabljajo. Seznam se letno posodablja, glede na nove znanstvene podatke o toksičnosti molekul (Izvedbena ..., 2012). Zelo pomembno je označevanje arom kot aditivov v živilih in pri prodaji polproduktov podjetjem, B2B (ang. Business to business). Z besedo "aroma" se namreč glede na Uredbo (ES) št. 1334/2008 Evropskega parlamenta in Sveta lahko označi kemijske snovi z aromatičnimi lastnostmi. Pri tem je treba poudariti, da je izvor lahko kemijska sinteza. Besedna zveza „naravna aromatična snov“ oziroma "naravna aroma" pomeni aromatično snov, ki se z ustreznimi fizikalnimi, encimskimi ali mikrobiološkimi postopki pridobiva iz surovin rastlinskega, živalskega ali mikrobiološkega izvora bodisi v nepredelani obliki ali po predelavi za prehrano ljudi z enim ali več tradicionalnimi postopki za pripravo živil. V to kategorijo pa spadajo seveda tudi biotehnološko pridobljene kemijske snovi z aromatičnimi lastnostmi, pri proizvodnji katerih se lahko uporabijo tudi tehnologije genskega inženiringa (Uredba ..., 2008).

## 3 SINTEZNA BIOLOGIJA

### 3.1 UVOD V SINTEZNO BIOLOGIJO

Sintezna biologija je področje znanosti, ki se ukvarja z genskim inženiringom živih organizmov na način, da pridobijo nove sposobnosti, ki jih v naravi nimajo. Le-te so lahko proizvodne (recimo proizvodnja farmacevtske učinkovine, ali aromatične molekule),

remediacijske sposobnosti (čiščenje naftnih madežev, zraka, vode itd.), uporabnost za medicinske namene (pametne celice imunskega sistema, razvita protitelesa in dostavljalski sistemi), izboljšane poljščine (riž, ki proizvaja beta-karoten, rožnati ananas itd.) in biološki sistemi za zaznavo in prilagojeni odziv na molekule (National Human Genome Research Institute, 2019).

Pogosto se definicije razlikujejo, a vse so skladne z dejstvom, da gre za napredni genski inženiring in racionalno oblikovanje bioloških delov, naprav in sistemov (Baldwin in sod., 2012). Trenutno pristope sintezne biologije v praksi najpogosteje srečamo pri metabolnem inženiringu v farmaciji, za proizvodnjo farmacevtskih učinkovin (Keasling, 2016), novih terapij (Mohanty in sod., 2019), diagnostičnih orodij (Gerald in Giri-Rachman, 2018) in pa v industriji za proizvodnjo malih molekul (El Karoui in sod., 2019).

### 3.2 METABOLNI INŽENIRING

Metabolne sposobnosti mikroorganizmov so brez najmanjšega dvoma izjemne in imamo fizične dokaze, da se jih človeštvo poslužuje že vsaj 9000 let (Alba-Lois in Segal-Kischinevzky, 2010), tako stari so namreč odkriti ostanki posod, ki so vsebovale vino. Kvasovke so tekom spontane fermentacije grozdnega soka v antično vino proizvedle privlačne arome, mehurčke CO<sub>2</sub> in etanol, molekulo s psihološko-fiziološkimi učinki. Ko se je kopičilo znanje in je tehnologija napredovala, smo pričeli odkrivati, da mikroorganizmi zmorejo še marsikaj. Od proizvodnje farmacevtskih učinkovin in živilskih aditivov do biogoriv (Keasling, 2010).

Včasih v naravi obstaja molekula, katere učinki so v industriji zaželeni in jo človeštvo potrebuje v velikih količinah, naravni viri pa niso zadostni, molekula strukturno prezahtevna ali pa predraga za proizvodnjo s kemijsko sintezo. Tako se pojavi inženirski izziv, ki je pisan na kožo biotehnologom, ki uporabljajo orodja metabolnega inženiringa in sintezne biologije. Metabolni inženiring je proces vstavitve, oziroma optimizacije metabolnih poti in z njimi povezane regulacije, z namenom vzpostavitve proizvodnje tarčne molekule (Keasling, 2016). Proizvodnja le-te tako temelji na bioprocesu, v katerem nastopajo kot glavni akter gensko spremenjeni mikroorganizmi (ali celo sesalske in rastlinske celice), ki so metabolno natančno prirojeni industrijskim potrebam. Glavni cilj ni zgolj vzpostavitev novih metabolnih poti in proizvodnje tarčne molekule v celici, temveč tudi optimizirati produktivnost, rast, koncentracije celic in produkta ter tako doseči izkoristke, ki so smiselni za vzpostavitev industrijske proizvodnje (Schempp in sod., 2018).

Prenos rekombinantnih genov iz naravnega donorja v proizvodno šasijo (ang. Chassis) je eno glavnih orodij metabolnega inženiringa. Pogosto vstavljeni geni nosijo zapis za encime v metabolni poti, ki nato z delovanjem v gostitelju omogočajo sintezo zelenega intermediata ali produkta. Geni pri prenosu v nov organizem potrebujejo tudi nove genske elemente, kot so promotorji, operatorji in terminatorji, da se v novi celici lahko pravilno izražajo v relevantnih količinah. Pogosto se poslužujemo metabolnega inženiringa v naprej prilagojenih proizvodnih sevih modelnih mikroorganizmov, kot sta *Escherichia coli* in *Saccharomyces cerevisiae*, ker

za manipulacijo genomov le-teh že obstaja veliko orodij, hkrati pa pri reprogramiranju zaradi poglobljenega poznavanja metabolizma lažje identificiramo težave. Pri prenosu genov za encim iz donorskega organizma je zaželen kodonska optimizacija, sploh če prenašamo med evolucijsko bolj oddaljenimi organizmi. Potrebna je tudi uporaba pravega promotorja, operatorja, stop kodona (oziroma drugega načina zaustavitve transkripcije) ter ostalih regulatornih elementov. Večinoma je zaželeno, da je izražanje gena za encim čim večje, da je tudi metabolni fluks v sintezni poti velik, hkrati pa fluks za sintezo drugih metabolitov in biomase, v proizvodnji fazi, zmanjšan (Schempp in sod., 2018).

## **4 SINTEZNO BIOLOŠKA ORODJA ZA PRIDOBIVANJE AROM**

### **4.1 TEHNIKE METABOLNEGA INŽENIRINGA**

#### **4.1.1 Povečanje endogene sinteze prekursorjev**

Razpoložljivost prekursorskih molekul je pogosto prva omejitev, ki jo je potrebno razrešiti, pri metabolnem inženiringu (Vickers in Sabri, 2015). Večinoma je potrebno tudi spreminjati regulacijo genov za encime centralnega metabolizma, zato da preusmerimo fluks ogljika proti potrebnim prekursorjem naše metabolne poti. V primeru metabolnega inženiringa za proizvodnjo terpenoidov, je potrebno povečati fluks molekul skozi mevalonatno (ang. Mevalonate; MVA) metabolno potjo, če je mikroorganizem evkariont ali arheja oziroma ne-mevalonatno (ang. 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate; MEP) metabolno pot, če je mikroorganizem bakterija. Dober način za povečanje fluksa je mutacija ključnih regij, ki v nativnem mikroorganizmu predstavljajo negativne povratne zanke. Uspešno so na primer dosegli visoko izražanje gena za encim 3-hidroksi-3-metilglutaril-koencim A reduktaza (HMGR1), brez zaporedja za vezavo na membrano in hkrati za farnezil difosfat (FPP), ki posledično nastaja v metabolni poti (Schempp in sod., 2018). Z vstavitvijo heterologne mevalonatne metabolne poti v *Escherichia coli*, se je sinteza prekursorjev sinergistično povečala (Pitera in sod., 2007).

#### **4.1.2 Zmanjšanje toksičnih učinkov**

Povečanje sinteze prekursorskih molekul, posebno v izoprenoidni metabolni poti, lahko privede do toksičnosti, metabolnega stresa in neželene negativne povratne regulacije. Toksičnost je pogosto znak, da celicam primanjkuje bistvenih metabolitov za vzdrževanje homeostaze, ali pa pride do direktne citotoksičnosti zaradi povečanega fluksa metabolitov v neželenih smereh in toksičnih intermediatov. Pogosto je treba zato precizno uravnati izražanje genov tako, da je v vsakem trenutku toksičnega intermediata v celici kar najmanj. Poleg vzpostavitve dobrega proizvodnega, metabolnega okolja v celici, pa se pogosto pojavi težava pri akumulaciji večjega števila produkta v celici. To je posebej izrazito pri terpenoidih, ki so izrazito hidrofobni, kar celici povzroča preglavice zaradi napačnega zvijanja proteinov v nepolarnem okolju in motnje reakcij (Choe in sod., 2016). Takšnih izzivov se lahko lotimo na več načinov, vsem pa je skupno, da želimo povečati toleranco gostitelja na problematične molekule, oziroma znižati koncentracijo problematičnih molekul v celici. Dobra možnost je

tudi da zamenjamo celično šasijo za vrsto, ki dobro tolerira akumulacijo hidrofobnih molekul, oziroma ima dobro izražene sisteme efluksa. Takšne vrste so *Pseudomonas putida* (Inoue in Horikoshi, 1989), *Bacillus sp.* in *Rhodococcus sp.* (Alvarez, 2010).

Čeprav nam je sintezna biologija prinesla veliko kontrolnih logičnih genetskih vezij, je večina inducibilnih, v industriji takšnih, da potrebujejo zunanji signal, torej uvedbo molekule v okolje celice, ki nato v celici aktivira ali zavre delovanje promotorja želenega gena. Največ pa se uporabljajo kar močni, konstitutivni promotorji, brez regulacije. Tak pristop je praktičen za uporabo v farmaciji, kjer so marže proizvodnje molekul višje, a postane nesmiselno finančno breme pri proizvodnji manjših molekul za uporabo v živilski industriji, kaj šele za molekule z masovno porabo, kot so biogoriva. Smiselno bi bilo, da bi se celica sama odzvala na interni stres tako, da bi dinamično vklapljala in izklapljala izražanje genov za encime, ki tvorijo toksične intermediate. Tako ne bi potrebovali v proces vključevati signalno molekulo, kar predstavlja dodatni strošek, hkrati pa bi vsaka celica ob najbolj primernem trenutku lahko dinamično zmanjšala stres, ter prekinila nepotrebno sintezo proteinov, kar bi povzročilo višjo produktivnost bioprocasa. Mevalonatna metabolna pot, zanimiva za proizvodnjo mnogih terpenoidnih arom, vsebuje vsaj dva toksična intermedijata: 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) in farnezil pirofosfat (FPP) (Martin in sod., 2003; Kizer in sod., 2008). HMG-CoA vpliva na sintezo maščobnih kislin, mehanizem toksičnosti za FPP pa še ni poznan. Z analizo transkriptoma, so uspeli identificirati promotorje, ki se aktivirajo ali zavirajo glede na prisotnost toksičnih intermediatov. Le-te so nato uporabili za nadziranje transkripcije genov za encime metabolne poti, kar je privedlo do višje produktivnosti (Dahl in sod., 2013).

#### 4.1.3 Genski in proteinski inženiring

Uravnavanje izražanja genov in trajanja izražanja se lahko lotimo z različnimi metodami, na različnih nivojih. Lahko izbiramo med mnogimi promotorji, terminatorji, represorji, transkripcijskimi faktorji, lahko vstavimo optimalno število kopij gena, kodonsko optimiziramo zapis za optimalno izražanje in pravo hitrost prepisovanja, se poslužimo regulacije z majhnimi protismernimi RNA molekulami, uravnamo sekundarne strukture mRNA in stabilnost RNA z izbiro pravih kodonov. Dober primer izziva, ki ga rešimo s tovrstnimi postopki je vstavitvev genov iz rastline, ki kodirajo specifične encime, kot so na primer citokrom P450 monooksigenaze. Pogosto je ravno ta tip encima odgovoren za funkcionalizacijo bistvenih skupin terpenoidov. Sintezno biološki pristopi se najbolj odražajo pri inženiringu proteinov, saj se lahko poslužimo mnogih metod, ki izboljšajo katalitsko aktivnost, specifično vezavo substrata, regiospecifičnost in stereospecifičnost reakcije, razširijo diverzitetu produktov, zmanjšajo potrebo po kofaktorjih, izboljšajo funkcionalno izražanje gena za encim in sintezo encima v gostiteljski celici, izboljšajo med-proteinske interakcije ter povečajo metabolni fluks skozi ozka grla metabolne poti. Za namene proizvodnje terpenoidnih arom se je izkazalo, da je zaradi zmanjšanja toksičnih intermediatov poti, dobra rešitev fuzija bistvenih encimov, oziroma grupiranje encimov na proteinskem ali DNA ogrodju, kjer zaradi neposredne bližine encimov lahko pohitrimo reakcije v katerih nastopajo problematični, toksični intermedijati. Le-ti se tako hitro pretvorijo v manj toksične



produkte in so posledično v celici prisotni le v nizkih koncentracijah (Schempp in sod., 2018). V rastlinah se monoterpeni biosintetizirajo v kloroplastih, kar ima za posledico to, da encimi, sodelujoč v reakcijah, posedujejo signalni peptid na N-koncu. Opažena je bila izboljšana aktivnost rekombinantnih encimov monoterpen sintaz, če signalni peptid odstranimo (Williams, 1998).

#### 4.1.4 Prostorska optimizacija metabolizma

Fuzijski proteini in makro-molekularno grupiranje encimov na proteinskih ogrodjih omogočajo, da katalitska mesta več encimov postavimo v neposredno bližino in s tem ojačamo metabolni fluks ter znižamo koncentracijo intermediata v celici. Podobna organizacija se je v nekaterih biosintezni poteh razvila tudi evolucijsko. Nekateri encimi se grupirajo na membranah in na makroencimskih kompleksih. Direktna fuzija FPP sintaze s heterologno seskviterpen sintazo, se je odražala v dvakratno povečani proizvodnji pačulola, ki je industrijsko pomembna aromatična spojina in hkrati surovina za sintezo zdravila paklitaksela (Albertsen in sod., 2011). Takšna fuzija proteinov je sicer uporabna, a za le-to so zanimivi zgolj encimi iz ene polipeptidne verige. Pri fuziji lahko izgubimo delno tudi aktivnost encimov in funkcionalnost njihovih vezavnih mest. Pogosto naletimo tudi na težavo, če bi želeli s fuzijo povezati več kot dva encima. Alternativna, sintezno biološka metoda, je grupiranje encimov na proteinsko ali DNA ogrodje. Obstajajo tudi naravni sistemi, ki z prostorsko ureditvijo encimov dosežejo substratno "kanaliziranje" (ang. Channeling), usmerjajoči tok intermediatov, kot na primer triptofan sintaza iz bakterij vrste *Salmonella typhimurium*. Prostorska ureditev metabolizma omogoča kar nekaj prednosti, ki bi jih s sintezno biologijo želeli doseči tudi v celičnih tovarnah in tako doseči boljšo produktivnost: (I) preprečitev intermediatu, da se izgubi z difuzijo (znižanje lokalne koncentracije na področju encimske aktivnosti) in zmanjšanje njegovega vstopa v konkurenčne metabolne poti, (II) krajši čas obstoja neobstoječih intermediatov in preprečitev interakcij s celično vsebino, (III) zaobidenje neučinkovitega ravnovesja metabolitov znotraj metabolne poti, kar se odraža v toksičnih učinkih na celico (Dueber in sod., 2009). Poleg proteinskih ogrodij pa obstajajo tudi povsem sintezna RNA in DNA ogrodja (Benčina in sod., 2018). Vsako ogrodje ima svoje prednosti in slabosti, kar omogoča prilagoditev sinteznega sistema gostitelju. DNA ogrodje omogoča veliko fleksibilnost kar se tiče števila zaporedno vezanih encimov, saj je znano veliko dobro poznanih zaporedij in DNA vezavnih domen, to nam omogoča tudi optimizacijo števila aktivnih mest glede na encimske aktivnosti encimov. Pogosto je metabolni fluks večji, če je manj aktivnih encimov številčno več, kar prepreči ozko grlo in kopičenje intermediatov (Dueber in sod., 2009).

## 4.2 MIKROBNE ŠASIJE IN CELIČNE TOVARNE

Zgodovinsko gledano so se na področju industrijske biotehnologije večinoma uporabljali le najbolj raziskani in pogosto uporabljeni modelni mikroorganizmi, kot so *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum* in drugi (Calero in Nike, 2018). Zaradi hitrega razvoja genetskih metod in orodij, ki jih je prinesel

bliskovit razvoj sintezne biologije, se danes pojavljajo tudi alternativni mikroorganizmi, ki jih lahko uporabljamo v industrijskih bioprocesih za proizvodnjo finih kemikalij. Žargonsko se za proizvodne celične linije, ki jih uporabimo kot osnovo za vzpostavitev metabolne poti v mikroorganizmu, uporablja izraz "šasija" kot nosilno/strukturno ogrodje, na katerega lahko nato z inženiringom pripnemo nove funkcionalne dele. S takšnim inženirskim udejstvovanjem zajamemo tudi praktične cilje sintezne biologije, ki so izgradnja živih celic iz posameznih delov, ki so namerno sestavljene na način, da tvorijo smiselno entiteto (Julleson in sod., 2015). Vsaka celična šasija, mora imeti nekaj lastnosti, ki inženirjem omogočajo, da tekom razumljivo dolgega in dragega razvojnega procesa pridejo do komercialno zanimivega proizvodnega seva. Dobro vodilo so naslednje lastnosti, ki omogočajo biotehnologu, da izbere pravi mikroorganizem za izbrano nalogo. Navedene lastnosti tudi predstavljajo velik izziv za nov organizem, da vstopi v panogo, kjer vladajo tradicionalni modelni mikroorganizmi. (I) Mikroorganizem mora biti dovolj poznan, da vemo na kakšnem mediju raste in pri kakšnih pogojih ga lahko gojimo v bioprocesu. (II) Mora imeti sposobnost rasti na enostavnih in dostopnih virih ogljika in dušika. (III) Mora posedovati učinkovito, vgrajeno odpornost na fizično-kemijski stres. (IV) Mora rasti hitro in učinkovito. (V) Dostopna morajo biti orodja (ali pa možnost razvoja novih) za tarčne genomske manipulacije. (VI) Mora posedovati tudi učinkovite sisteme za sekrecijo molekul, kar omogoča lažje čiščenje končnega produkta iz medija. To je pomembno predvsem za celične šasije pri proizvodnji proteinov. (VII) Mora tolerirati ekstremne pogoje, kot so visoka temperatura (Calero in Nike, 2018).

Za industrijo so zanimivi tudi novi mikroorganizmi, ki kažejo posebno dobro odpornost na fizikalno kemijske strese, ali pa rastejo hitro in učinkovito na enostavnih in poceni substratih. Zato, da je vstavljanje novih metabolnih poti v šasijo, kar se da enostavno, je zaželeno, da se pojavlja minimalna interferenca med endogeno biokemijo in heterolognimi metabolnimi potmi. Metaboliti in tudi sami encimi v novih reakcijah lahko delujejo toksično zaradi interakcij z obstoječimi reakcijami. Lahko nastajajo toksični produkti zaradi nepredvidene encimske aktivnosti, ali pa povzročajo inhibicijo funkcionalnih lastnosti. Potencialno rešitev za tovrstne izzive predstavljajo celične tovarne, ki temeljijo na celični šasiji z minimalnim genomom (Martinez-Garcia in de Lorenzo, 2016). Takšne minimalizirane celične tovarne zaradi zmanjšanega obsega kompleksnosti metabolizma lahko vršijo želene, vstavljene funkcije zelo dobro, hkrati pa nimajo genov za stranske funkcije, ki porabljajo metabolite in energijo s transkripcijo in translacijo, ter nas pri industrijski proizvodnji molekul ne zanimajo (Choe in sod., 2016).

#### **4.2.1 *Escherichia coli***

Po Gramu negativna bakterija, ki je zaradi več kot 50 let intenzivnega raziskovanja, pogosto prva odločitev, ko pride do izbire šasije za vstavitve heterolognih metabolnih poti. Razvitih je mnogo sevov, ki posedujejo različne lastnosti in metabolne predispozicije, hkrati pa je za uporabo na voljo mnogo komercialno dostopnih orodij za genski inženiring. Poseduje pozitivne lastnosti, kot so: hitra rast, nezahtevne potrebe po hranilih (kar omogoča nižje proizvodne cene), pri šaržnem bioprocesu z dohranjevanjem je mogoče doseči zelo visoko

gostoto celic, precej razvejan nativni metabolizem, ki je dodobra raziskan in seveda prisotnost mnogo orodij za gensko manipulacijo. Hkrati je, zaradi nakopičenega znanja o metabolizmu *E. coli*, mogoče sestaviti modele metabolizma na nivoju celega genoma (O'Brien, 2015). Obstajajo tudi metode za prilagoditev sevov za proizvodnjo drugače toksičnih molekul, kot so ALE (ang. Adaptive laboratory evolution). Razvite so bile tudi šasije *E. coli*, s povečano proizvodnjo specifičnih intermediatov centralnega metabolizma (kot sta piruvat in acetilkoencim A), ki nato lahko služijo kot izhodiščne molekule za proizvodnjo finih kemikalij. Takšne šasije se nato lahko nadgradijo tudi tako, da se metabolni fluks ojača preko šikimatne metabolne poti do aromatskih aminokislin (tirozin, triptofan in fenilalanin). Zelo pomembna prokariontom nativna metabolna pot za proizvodnjo molekul uporabnih v živilski industriji, je MEP metabolna pot, pri kateri iz osrednjih metabolitov kot sta izopentenil pirofosfat (IPP) in dimetilalil difosfat (DMAPP) nastajajo terpenoidi, oziroma izoprenoidi, mnogi izmed njih uporabni v industriji arom (Calero in Nike, 2018). Obstajajo tudi težave, predvsem z izražanjem rekombinantnih genov evkariontov, saj lahko pride do napačnega zvitja in posledično do nižje aktivnosti (Van Wyk in sod., 2018). Primer je izražanje genov za encime citokromov P450 iz rastlin, ki so odgovorni za funkcionalizacijo terpenoidov. Pogosto so to encimi, vezani na membrano, katere struktura je pri prokariontih precej drugačna od evkariontske. Čeprav se s proteinskim inženiringom lahko spopademo s tem izzivom, pa tudi po uspešni inkorporaciji encimov v membrano, katalitska aktivnost pogosto ostane nizka (Chen in sod., 2014).

#### 4.2.2 *Saccharomyces cerevisiae* in druge kvasovke

*Saccharomyces cerevisiae* je ena najbolj raziskanih enoceličnih evkariontskih vrst, hkrati pa tudi najbolj uporabna celična tovarna za proizvodnjo terpenoidnih in drugih spojin, med katere spada tudi veliko aromatičnih spojin. Ima dobre metabolne sposobnosti, poznane so genomske sekvence mnogih sevov, hkrati pa je ne-patogena vrsta, ki uživa celo GRAS status, za genski inženiring pa je na voljo mnogo orodij (Jackson in sod., 2018). Poleg tega poseduje tudi robusten sistem za homologne rekombinacije, popravljanja dvojnih zlomov, kar nam lahko celo pomaga pri bolj drastičnih genomskih posegih, kot so vstavljanja več genskih sekvenc na različne točke genoma hkrati (DiCarlo in sod., 2013). To omogoča, da je *Saccharomyces cerevisiae* dobra platforma za razvoj novih heterolognih metabolnih poti, včasih namenjenih tudi proizvodnji aromatičnih spojin. Kljub temu, je pogosto ugotovljeno, da se po razvoju zaradi iskanja optimalnih titrov in produktivnosti, biotehnologi zatečejo tudi k alternativnim vrstam kvasovk. Čeprav je *Saccharomyces cerevisiae* dobro raziskana šasija za proizvodnjo heterolognih metabolitov, pa ni popolna. Kot vrsta ni najbolj primerna za hitro proizvodnjo biomase, zaradi sistema glikozilacije, pa so heterologni encimi lahko neaktivni. Včasih je gene zaradi neznanih razlogov težko rekombinantno izraziti v *Saccharomyces cerevisiae*. Tako je po vzpostavitvi heterologne metabolne poti smiselno preveriti izražanje genov in proizvodnjo spojin v alternativnih vrstah kvasovk, kot sta metilotrofni *Pichia pastoris* (danes reklasificirana kot *Komagataella phaffii*) in *Hansenula polymorpha* (danes reklasificirana kot *Ogataea polymorpha*), ker imata dobre sposobnosti hitre rasti in množenja biomase (Gellissen in sod., 2005). Zaradi posebnih lastnosti pa so v industrijski uporabi tudi druge vrste, kot so

*Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica* in *Schizosaccharomyces pombe*. Zaradi dobre naravne sposobnosti proizvodnje mnogih terpenoidov ter evkariontskih mehanizmov izražanja genov so kvasovke dober kandidat za heterologno izražanje genov iz rastlin. Novejša sintezna biološka orodja za razvoj sevov kvasovk so z biosenzorji omogočena usmerjena evolucija, hitro vse-genomsko urejanje z uporabo oligonukleotidov (ang. Yeast oligo-mediated genome engineering; YOGE), sintezna rekonstrukcija celotnih metabolnih poti (ang. Versatile genetic assembly system; VEGAS) in celo sintezna genomika (Yeast 2.0)(Van Wyk in sod., 2018).

#### 4.2.3 *Pseudomonas putida*

Pogosto se zgodi, da se v bioprocesu soočimo s toksičnim učinkom intermedijata metabolne poti, ali pa celo končnega produkta. Lahko celo neznana komponenta gojišča zaradi interakcije z mikroorganizmom, le-tega poškoduje, ali pa celo ubije (Keasling, 2010). Pri proizvodnji molekul, kjer uporabimo sekundarno, organsko fazo za ekstrakcijo produkta iz vodne raztopine (dvofazne fermentacije), kar je pogosto pri biotehnoški proizvodnji aromatičnih spojin, želimo uporabiti mikroorganizem, ki tolerira stres, ki nastane zaradi prisotnosti druge faze. V tem primeru včasih uporaba standardnih mikroorganizmov kot sta *Escherichia coli* in *Saccharomyces cerevisiae* ne bo mogoča ter se je treba zateči k nekoliko novejšim alternativam. *Pseudomonas putida*, bakterija izolirana iz zemlje, ki naravno zaseda saprofitsko okoljsko nišo, je kot šasija dober primer mikroorganizma, ki je zelo robusten in dobro odporen na kemijske pogoje, ki bi poškodovali ali celo ubili druge vrste. Hkrati je zaradi saprofitske okoljske niše sposobna kot vir ogljika uporabiti raznolike heksoze, intermedijate Krebsovega cikla, ter celo aromatske molekule, ostanke degradiranega lignina. Poleg vseh naštetih pozitivnih lastnosti, je sev *Pseudomonas putida* KT2440 pridobil GRAS status, kar zagotavlja da je ravnanje z organizmom varno, kar omogoča študije v mnogih laboratorijih in tudi v industrijskem okolju. Zaradi intenzivnih raziskav in razvoja proizvodnih sevov s pomočjo orodij sintezne biologije, smo uspešno biotehnoško "udomačili" bakterijo (Nikel in sod., 2014). Odkritih je bilo tudi kar nekaj inducibilnih promotorjev in z njimi povezanih induktorjev, kar omogoča dobro kontrolo bioprocesa in vzpostavitev povratnih zank znotraj metabolne poti, kar je izjemno dobrodošlo pri sintezi terpenoidnih arom, zaradi toksičnih intermedijata metabolne poti. Zaradi visoke vsebnosti C/G baznih parov v genomu (kar 61.5%) je mogoče v njej dobro izražati heterologne gene vrst aktinobakterij in miksobakterij, ki producirajo, za industrijo zanimive, sekundarne metabolite. Sev KT2440 je tudi dobro odporen na raznovrstne ksenobiotike in antibiotike, za katere uporablja dobro razvit sistem efluksa, aktivnih izlivnih črpalk, s katerimi črpa neželene metabolite iz celice. Zaradi dobrih katabolnih sposobnosti, lahko za substrat uporabljamo stranske snovne tokove iz industrije kot na primer melasa iz sladkorne pese (Onbasli in Aslim., 2009). Uspešno so bili s *Pseudomonas putida* proizvajani raznovrstni terpenoidi, spojine z izrazitimi aromatičnimi lastnostmi. Primer je geranična kislina, molekula, zanimiva za uporabo kot aromatična spojina in celo antikancerogena učinkovina (Mi in sod., 2014). Zaradi efluksnih mehanizmov, pa jih bakterija tudi izloča direktno v medij, tako da je izolacija dokaj enostavna (Loeschcke in Thies, 2015; Calero in Nike, 2018).

## 4.3 SINTEZNA BIOLOGIJA ZA PROIZVODNJO AROM V PRAKSI

### 4.3.1 Terpenoidi

So naravni produkti in sorodne spojine, sintetizirani polimeri izoprena, obogateni z dodatkom raznolikih kisikovih funkcionalnih skupin (McNaught in Wilkinson, 1997). Velika večina jih poseduje aromatične lastnosti, hkrati pa so naravni viri omejeni, kar pomeni visoko tržno ceno naravnih molekul, posebej v živilski industriji. Zaradi ogromnega števila potencialnih kombinacij razporeditve osnovnih gradnikov in funkcionalnih modifikacij, se ocenjuje, da terpenoidi predstavljajo kar 60 % vseh naravnih spojin (Zwenger in Basu, 2008). So zelo dober primer uporabe principa celičnih tovarn, kjer je cilj razvoj seva mikroorganizma, ki je sposoben proizvajati večje količine prekuzorskih molekul. Nato se vanj modularno vgradi različne dodatne metabolne poti, namenjene proizvodnji posameznega industrijsko zanimivega produkta. Tak pristop je smiseln predvsem z ekonomskega vidika, saj se nekaterih arom, čeprav so precej dragocene, na leto porabi le od nekaj kilogramov do nekaj ton na svetovni ravni. Tako je mogoče z isto tehnološko in proizvodno platformo proizvajati veliko različnih produktov z dobro, komercialno zanimivo, produktivnostjo, potencialno iz trajnostnih in poceni virov. Za namene proizvodnje terpenoidov s pomočjo mikroorganizmov je bilo napravljeno veliko študij z uporabo sevov *Escherichia coli* in *Saccharomyces cerevisiae*. Čeprav je kvasovka sama po sebi precej sposobna producirati večje količine terpenoidov, se izkaže, da je zaradi uporabe MEP metabolne poti *E. coli* veliko bolj učinkovita, saj na mol glukoze izloči le mol CO<sub>2</sub>, medtem ko kvasovka izloči 1,5 mola CO<sub>2</sub>, zaradi uporabe MVA metabolne poti (Schempp in sod., 2018).

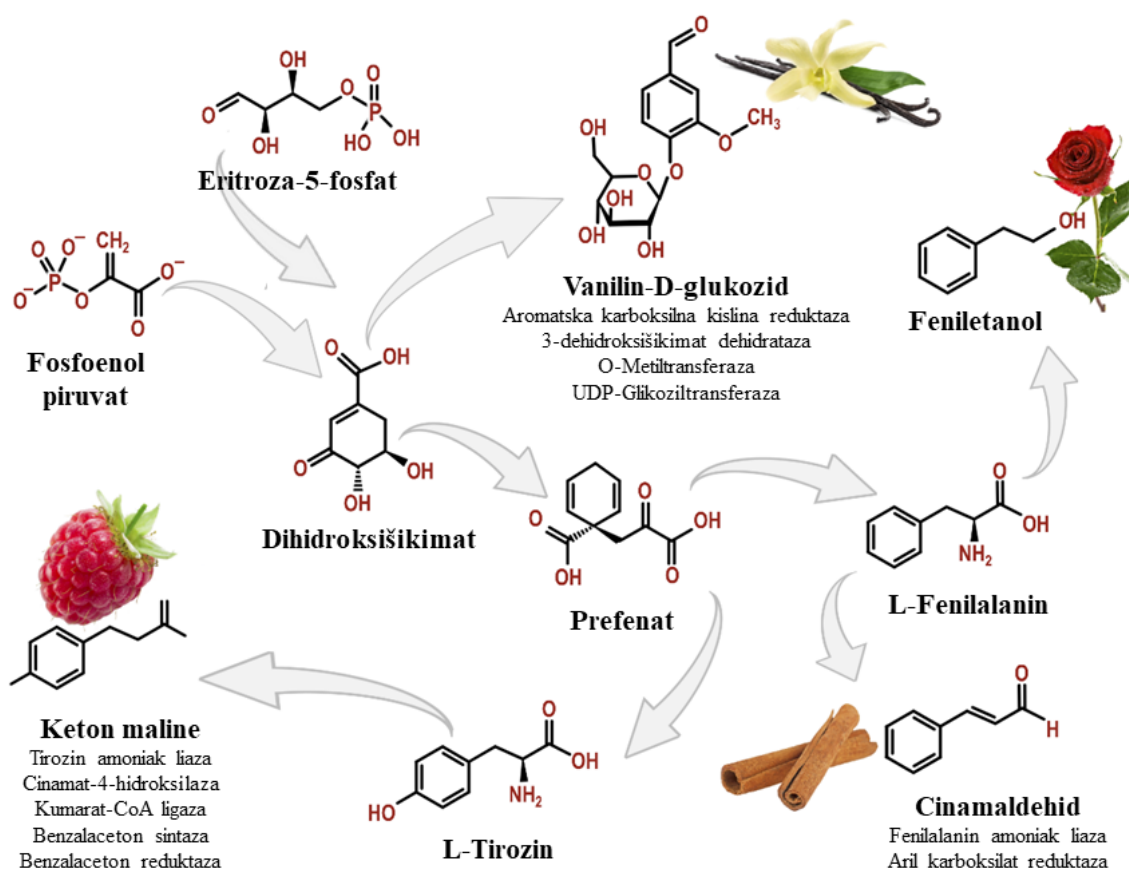
*Escherichia coli*, kot eden najbolj uporabljenih prokariotov, je seveda zanimiva tudi za proizvodnjo terpenoidov. Opažena je bila celo sinergija pri izražanju heterologne MVA metabolne poti skupaj z nativno MEP metabolno potjo. Predvidevanja *in silico* so privedla tudi do potrjenih *in vitro* preizkusov (Yang in sod., 2016). A kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* se kljub teoretični metabolni prednosti *E. coli*, z le-to brez težav primerja, oziroma jo v industrijskih procesnih pogojih celo prekosi. Pri proizvodnji farnezena, ki se uporablja kot zelena nota v industriji arom, ter tudi kot gorivo, so z drastičnimi posegi v centralni metabolizem *Saccharomyces cerevisiae*, uvedli kar 4 različne nenativne reakcije. To je omogočilo postavitvev komercialno zanimivega bioprocesa. V bioreaktorjih velikosti 200000 L so namreč dosegli koncentracije 130 g/L farnezena, hkrati pa zmanjšali potrebe po kisiku za 75 %, kar močno olajša vodenje bioprocsov z ogromnimi volumni (Peralta-Yahya in sod., 2011).

Velik del komponent prej omenjenega primera arome maline prav tako predstavljajo terpenoidne spojine. Alpha-ionone, beta-ionone in damaskenon so terpenoidi iz skupine apokarotenoidov, ki so pogoste aromatične spojine, prisotne v cvetju in lesu. Nastanejo tako, da se najprej sintetizirajo karotenoidi po terpenoidni poti, nato pa se z encimom dioksidogenazo odcepijo aromatski konci. Nastale molekule imajo tipičen vonj vijolice, vrtnice in jagodičevja

(maline). Zaradi dobrih aromatičnih lastnosti so zelo zaželeni v industriji, a zaradi potrebe po molekulah, ki prekašajo zmožnosti izolacije iz naravnih virov, se danes v glavnem proizvajajo s kemijsko sintezo. Zaradi velikih svetovnih potreb po naravnih aromah, apokarotenoidih, obstajajo tudi patenti, ki so vodili do komercializacije tehnologije. Uporabnost orodij sintezne biologije se izkaže tako, da mikroorganizem, ki je šasija za proizvodnjo karoteinoidov, modularno spremenijo še z dodatkom gena za encim dioksigenazo. Mikroorganizem v enem od prej omenjenih patentov, ni definiran, saj modularna zgradba biosintezne poti dovoljuje prenos v različne celične šasije (Jach in sod., 2015). Terpenoidi proizvedeni biotehnološko se danes poleg agro-živilstva uporabljajo v farmaciji (artemisinin, taxol) ter kot biogoriva. To omogoča razvoj tehnologije, proizvodne platforme za terpenoide, ki nato lahko prispeva k več industrijam hkrati in tako omogoči finančno smiselnost (Keasling, 2010).

### 4.3.2 Fenil propanoidi

Fenil propanoidi predstavljajo raznovrstno skupino molekul, ki se pogosto sintetizirajo kot sekundarni metaboliti preko šikimatne metabolne poti iz aromatskih aminokislin, ali intermediatov metabolne poti, kot je prikazano na Sliki 2.



Slika 2: Biosinteza fenil propanoidnih aromatičnih spojin (prirejeno po Van Wyk in sod., 2018).

V to skupino sodi aromatična molekula z največjim tržnim deležem – vanilin. Naravni vir so stroki orhideje vanilije (*Vanilla planifolia*), ki jih pridelujejo predvsem v Indoneziji, na Madagaskarju in na Kitajskem, večinoma pa uporabljamo vanilin, proizveden s kemijsko sintezo. Zaradi velikih količin, ki jih zahteva svetovna poraba in visoke cene naravnega vanilina, je bilo v preteklosti kar veliko raziskav, za vzpostavitev biotehnoške proizvodnje bio-vanilina. Večinoma je šlo predvsem za vzpostavitev biokonverzije poceni prekursorskih molekul, kot so evgenol, isoevgenol, lignin, ferulična kislina, sladkorji, fenolni stilbeni, vanilinska kislina, aromatske aminokislina in celo stranski snovni tokovi iz agroživilske industrije. Sintezno biološki pristopi so omogočili uporabo glukoze za *in vivo* proizvodnjo vanilina. Z gensko optimiziranimi sevoma *Schizosaccharomyces pombe* in *Saccharomyces cerevisiae* so uspeli pretvoriti glukozo v vanilin z 92 % molarno konverzijo. Biosintezna pot je bila sestavljena iz encimov dehidrošikimat dehidrataza (vir je bila plesen *Podospora pauciseta*), aromatska karboksilna kislina reduktaza (vir je bila bakterija iz rodu *Nocardia*) in O-metiltransferaza (vir je bil *Homo sapiens*). Da se vanilin ne bi reduciral v vanilin alkohol, so izvedli tudi izbitje gena za alkohol dehidrogenazo (ADH6) v obeh sevih. Ker je vanilin toksičen za kvasovke, ko se akumulira v večjih koncentracijah, se je produktivnost še zvečala ob uvedbi gena za encim UDP-glikoziltransferazo, ki vanilin pretvori v netoksični produkt vanilin beta-D-glukozid (Hansen in sod., 2009).

Keton maline [4-(4-hydroxyphenyl)butan-2-one] – je aromatična spojina, ki se naravno pojavlja v mnogih sadežih in se uporablja kot primarna aroma za vzpostavitev arome maline. Naravna molekula je precej draga, saj se pojavlja v količinah mg/kg sadeža, zato cena 3000 \$/kg naravne molekule ne preseneča. S kemijsko sintezo pridobljena molekula ima drastično nižjo, a še vseeno precej visoko ceno 58 \$/kg. Z uvedbo štirih encimov: fenilalanin amonijak liaza, gen PAL (vir je *Rhodospiridium toruloides*), cinamat-4-hidroksilaza, gen AtC4H (vir je *Arabidopsis thaliana*), kumarat-CoA-ligaza, gen Pc4CL2 (vir je *Petroselinum crispum*) in benzalaceton sintaza, gen RpBAS (vir je *Rheum palmatum*), so uspeli vinarski sev kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* razviti v proizvajalca ketona maline. Proizvodnja spojine se je še izboljšala ob fuziji encimov AtC4H in RpBAS z nefleksibilnim linkerjem. Sev so nato preizkusili v fermentaciji grozdnega soka Chardonnay, kjer so izmerili proizvodnjo 3,5 mg/L ketona maline, kar je bilo precej nad nivojem zaznave. Fermentacija samega vina pri postopku ni bila okrnjena, kar nakazuje na komercialno zanimiv sev za vinarsko industrijo (Lee in sod., 2016).

#### 4.4 NAPREDNA UPORABA

##### 4.4.1 Inženiring kvasovke za proizvodnjo arom hmelja

Pivo varjeno z dodatkom hmelja ali ekstrakta le-tega poseduje prepoznavne arome, ki so zaželeni in imajo poseben senzorični čar. Veliko se vlaga v raziskave za izboljšave sort hmelja, da bi bila rastlina bolj odporna na bolezni, sušo ter imela boljšo aromo, tako se z metodami žlahtnjenja pridobiva nove sorte. A uporaba hmelja prinese s seboj kar nekaj težav. Za proizvodnjo se uporabi ogromne količine vode, koncentracija arome v cvetovih hmelja variira iz leta v leto, hkrati pa suše, bolezni in politične razmere vplivajo na ceno hmelja na

trgu. Dr. Charles M. Denby verjame, da je prihodnost varjenja piva v uporabi gensko spremenjenih pivskih kvasovk, v katere so vstavljene biosintezne poti za sintezo dveh monoterpenov, ki sta primarni aromi hmelja – linalol in geraniol. Pivo varjeno z uporabo kvasovk modificiranih sevov je vsebovalo primerljive koncentracije linalola in geraniola, kot komercialno pivo, brez dodatka hmelja. Primerno aromo hmelja so potrdile tudi senzorične analize, danes pa se že iščejo poti do komercializacije tehnologije. Pri le-tej je edina ovira odnos ljudi do gensko spremenjenih organizmov v hrani (Denby in sod., 2018).

#### 4.4.2 Proizvodnja leghemoglobina v kvasovki *Pichia pastoris*

Meso je kulturno in zgodovinsko umeščeno, kot del vsakodnevne prehrane v zahodnem svetu. A mesno industrijo spremlja senca signifikantnega vpliva na okolje. Hkrati veliko potrošnikov zmanjšuje vnos mesa zaradi zdravstvenih razlogov in etičnih prepričanj. Na trgu so se kot posledica pojavili mesni nadomestki, ki temeljijo na rastlinskih proteinih, hkrati pa so z dodatkom barvil in arom senzorično podobni tradicionalnim, iz živalskih tkiv pridobljenim, mesnim izdelkom. Podjetje Impossible Foods, ki ga je ustanovil dr. Patrick O. Brown, razvija in proizvaja izdelke, katerih biokemijski profil omogoča tvorbo arom govedine med peko. To je mogoče zaradi dodatka prostih aminokislin, reducirajočih sladkorjev, vitaminov in hema. Hem je porfirinska molekula, ki vsebuje atom železa  $Fe^{2+}$ , ki ob segrevanju odda elektron in se pretvori v  $Fe^{3+}$  le to povzroči tvorbo posebnih aromatičnih molekul, značilnih za rdeče meso. Problematiko komercialne proizvodnje hema ne-živalskega izvora so rešili z uporabo biotehnološke proizvodnje. Z uporabo kvasovke *Pichia pastoris*, s patentiranim procesom proizvajajo velike količine leghemoglobina, proteina, katerega gen je izoliran iz genoma soje (*Glycine max*). To je precej unikatna uporaba sintezne biologije, za proizvodnjo proteina, ki se v živilo dodaja, kot aroma in katalizator za nastanek arome. Produkti podjetja so danes komercialno uspešni v ZDA. Leghemoglobin proizveden s *Pichia pastoris* je prestal varnostne teste za uporabo v živilih ter posledično pridobil GRAS status in odobritev FDA, odobritev s strani EFSA, za vstop na Evropski trg pa še čakajo (Fraser in sod., 2013, 2018).

## 5 SMISELNOST IN EKONOMIKA

Cena aromatičnih spojin na trgu vsako leto raste. Najpogosteje se arome, ki se uporabljajo v velikih količinah (svetovna poraba vanilina je bila 20.000 ton leta 2015, trg pa v velikosti 230 milijonov ), proizvajajo s kemijsko sintezo. Cena takšne molekule je drastično nižja, kot če bi jo izolirali iz naravnega vira (kemijsko pridobljeni vanilin stane od 15\$ - 1000\$ na kilogram, naravni vanilin pa 2000\$ - 4000\$ na kilogram) (Khwanjaisakun in sod., 2019). Čeprav se arome v končnih živilih uporabljajo v tako nizkih količinah, da na ceno živila zelo malo vplivajo, je za industrijo naravna aroma nemogoča izbira, saj v tako velikih količinah molekule iz naravnih virov ne moremo izolirati. Ker se arom, proizvedenih s kemijsko sintezo, ne sme deklarirati kot "naravne arome", se pojavlja čedalje večje povpraševanje po alternativah. Biotehnološka proizvodnja omogoča sintezo takšnih molekul po ugodni ceni in v velikem obsegu. Hkrati uporaba inovativnih pristopov omogoča proizvodnjo iz odpadnih snovnih tokov iz industrije (koruzna omakalna vodica, melasa, sirotka, lignoceluloza ipd. ), kar



dodatno zniža ceno, hkrati pa omogoči trajnostno proizvodnjo z mehanizmi krožnega gospodarstva (Onbasli in Aslim., 2009; Shaaban in sod., 2016).

## 6 ZAKLJUČEK

Vonj in okus sta med seboj povezana, kompleksna in s pomočjo malih molekul, ki jih lahko z inženiringom dodamo živilom, je mogoče doseči, da so končni izdelki na trgu veliko boljše sprejeti. Orodja sintezne biologije veliko obetajo na področju proizvodnje finih kemikalij, manjših molekul za namene uporabe v industriji, pri tem pa je, tudi z ekonomskega vidika, zelo zanimiva proizvodnja arom za živilsko industrijo, kjer so potrošniki pripravljeni plačati več za naravne arome. Nezadostni in nezanesljivi naravni viri in neuspešnost, visoka cena kemijske sinteze, pri čemer lahko nastajajo tudi toksični stranski produkti in mešanica enantiomerov, so glavni razlogi, zakaj je proizvodnja z gensko spremenjenimi mikroorganizmi zanimiva možnost. A pogosto je cena proizvodnje, četudi biotehnološke vseeno previsoka, da bi bila takšna proizvodnja komercialno zanimiva. Problem se pojavi tudi v tem, ker se svetovna uporaba nekaterih, čeprav dragocenih, aromatičnih molekul meri v kilogramih, predvsem dobre aromatične spojine, ki jih naš olfaktorni sistem zazna že pri nekaj delcih na trilijon. Z uporabo orodij sintezne biologije je mogoče razviti sev mikroorganizma, da postane celična tovarna. Z metabolnim inženiringom lahko povečamo sintezo prekurzorjev in izboljšamo robustnost seva, odpornost na stres in akumulacijo toksičnih metabolitov, ter mu celo prostorsko optimiziramo metabolne poti z molekularnimi ogrodji. Vse to nam omogoča, da takšna celica postane platforma, celična šasija, v katero nato z vnosom končnih nekaj genov, modularno dosežemo visoko proizvodnjo zelenega produkta. Takšne celične tovarne so bile razvite za namen proizvodnje terpenoidov (optimizacija sinteze prekurzorjev preko mevalonatne ali ne-mevalonatne poti – ali celo obeh), ter sinteze fenil propanoidov, med katere spada tudi veliko komercialno zanimivih arom.

Področje je mlado in komercialno uspešnih produktov proizvedenih s tovrstnimi orodji je relativno malo. A še vseeno obstajajo tudi posebni primeri napredne tehnologije, ki se že danes pojavlja v trgu. Pivovarska kvasovka *Saccharomyces cerevisiae*, ki sintetizira terpenoidne arome hmelja, med procesom fermentacije piva je že uspešna zgodba. Podjetje Impossible Foods, pa uporablja sintezno biologijo za proizvodnjo rastlinskega leghemoglobina v kvasovki, ter svoje produkte uspešno prodaja v ZDA.

## 7 VIRI

- Alba-Lois L., Segal-Kischinevzky C. 2010. Yeast fermentation and the making of beer and wine. *Nature Education*, 3, 9: 17: 7 str.  
[https://www.researchgate.net/publication/231175032\\_Yeast\\_Fermentation\\_and\\_the\\_Making\\_of\\_Beer\\_and\\_Wine](https://www.researchgate.net/publication/231175032_Yeast_Fermentation_and_the_Making_of_Beer_and_Wine) (29. jul. 2020)
- Albertsen L., Chen Y., Bach L. S., Rattleff S., Maury J., Brix S., Nielsen J., Mortensen U. H. 2011. Diversion of flux toward sesquiterpene production in *Saccharomyces cerevisiae* by fusion of host and heterologous enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 3: 1033–1040

- Alvarez H. M. 2010. *Biology of Rhodococcus*. Microbiology Monographs. 1st ed. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag: 368 str.
- Baldwin G., Bayer T., Dickinson R., Ellis T., Freemont P. S., Kitney R. I., Polizzi K., Stan G. B. 2012. *Synthetic Biology — A Primer*. Freemont P. S. in Kitney R. I. (ur.). London, Imperial College Press: 196 str.
- Benčina M., Mori J., Gaber R., Jerala R.. 2018. V: *Metabolic channeling using DNA as a scaffold*. *Synthetic biology: Parts, devices and applications*. Smolke C., Lee S. Y., Nielsen J., Stephanopoulos G. (ur.). Weinheim. John Wiley & Sons: 237–259
- Buck L., Axel R. 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors. *Cell*, 65: 175–187
- Bushdid C., Magnasco M. O., Vosshall L. B., Keller A. 2014. Humans can discriminate more than 1 trillion olfactory stimuli. *Science*, 343: 1370–1372
- Calero P., Nike P. I. 2018. Chasing bacterial chassis for metabolic engineering: a perspective review from classical to non-traditional microorganisms. *Microbial Biotechnology*, 12, 1: 98–124
- Chen Y., Zhou Y. J., Siewers V., Nielsen J. 2014. Enabling technologies to advance microbial isoprenoid production. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 148: 143–160
- Choe D., Cho S., Kim S. C., Cho B. K. 2016. Minimal genome: worthwhile or worthless efforts toward being smaller? *Biotechnology Journal*, 11: 199–211
- Costanzo L. 2017. *Physiology*, 6th ed. Philadelphia. Elsevier: 528 str.
- Dahl R. H., Zhang F., Alonso-Gutierrez J., Baidoo E., Bath T. S., Redding-Johanson A. M., Petzold C. J., Mukhopadhyay A., Lee T. S., Adams P. D., Keasling J. D. 2013. Engineering dynamic pathway regulation using stress-response promoters. *Nature Biotechnology*, 31: 1039–1046
- Denby C. M., Li R. A., Vu V. T., Costello Z., Lin W., Chan L. J. G., Williams J., Donaldson B., Bamforth C. W., Petzold C. J., Scheller H. V., Martin H. G., Keasling J. D. 2018. Industrial brewing yeast engineered for the production of primary flavor determinants in hopped beer. *Nature Communications*, 9, 965. doi: 10.1038/s41467-018-03293-x: 10 str.
- DiCarlo J. E., Conley A. J., Penttilä M., Jäntti J., Wang H. H., Church G. M.. 2013. Yeast oligo-mediated genome engineering (YOGE). *ACS Synthetic Biology*, 2, 12:741–749
- Dueber J. E., Wu G. C., Malmirchegini G. R., Moon T. S., Petzold C. J., Ullal A. V., Prather K. L., Keasling J. D. 2009. Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux. *Nature Biotechnology*, 27: 753–759

- El Karoui M., Hoyos-Flight M., Fletcher L.. 2019. Future trends in synthetic biology—A report. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. doi: 10.3389/fbioe.2019.00175: 10 str.
- Fraser R. Z., Shitut M., Agrawal P., Mendes O., Klapholz S.. 2018. Safety evaluation of soy leghemoglobin protein preparation derived from *Pichia pastoris*, intended for use as a flavor catalyst in plant-based meat. *International Journal of Toxicology*, 37: 241–262
- Fraser R., Brown P. O., Karr J., Holz-Schietinger Elysia C., Elysia C.. 2013. Methods and compositions for affecting the flavor and aroma profile of consumables. WO2014110532A2: 83 str.
- Gellissen G., Kunze G., Gaillardin C., Cregg J. M., Berardi E., Veenhuis M., Klei I. V. D.. 2005. New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica*—A comparison. *FEMS Yeast Research*, 5: 1079–1096
- Geraldi A., Giri-Rachman E. A. 2018. Synthetic biology-based portable in vitro diagnostic platforms. *Alexandria Journal of Medicine*, 54: 423–428
- Hansen E. H., Møller B. L., Kock G. R., Bünner C. M., Kristensen C., Jensen O. R., Okkels F. T., Olsen C. E., Motawia M. S., Hansen J. 2009. De novo biosynthesis of vanillin in fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) and baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 2765–2774
- Inoue A., Horikoshi K. A. 1989. *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. *Nature*, 338: 264–266
- Izvedbena uredba komisije (EU) št. 872/2012 z dne 1. oktobra 2012 o sprejetju seznama aromatičnih snovi iz Uredbe (ES) št. 2232/96 Evropskega parlamenta in Sveta, njegovi uveljavitvi v Prilogi I k Uredbi (ES) št. 1334/2008 Evropskega parlamenta in Sveta ter razveljavitvi Uredbe Komisije (ES) št. 1565/2000 in Odločbe Komisije 1999/217/ES. 2012. Uradni list Evropske unije. L 281/1
- Jach G., Azdouffal S., Schullehner K., Welters P., Natanek A. 2015. Method of fermentative alpha-ionone production. WO2017036495A1: 84 str.
- Jackson P., De Chiara M., Friedrich A., Yue J. X., Pflieger D., Bergström A., Sigwalt A., Barre B., Freel K., Llored A., Cruaud C., Labadie K., Aury J. M., Istace B., Lebrigand K., Barbry P., Engelen S., Lemainque A., Wincker P., Liti G., Schacherer J. 2018. Genome evolution across 1011 *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Nature*, 556: 339–344
- Julleson D., David F., Pflieger B., Nielsen J.. Impact of synthetic biology and metabolic engineering on industrial production of fine chemicals. 2015. *Biotechnology Advances*, 33: 1395–1402
- Keasling J. D. 2010. Manufacturing molecules through metabolic engineering. *Science*, 330: 1355–1358

- Keasling J. D. 2016. Synthetic biology: engineering microbes to solve global challenges. *iBiology Techniques*.  
<https://youtu.be/N0iOB0a3Sho> (28. maj 2020)
- Khwanjaisakun N., Amornraksa S., Simasatitkul L., Charoensuppanimit P., Assabumrungrat S. 2019. Techno-economic analysis of vanillin production from Kraft lignin: Feasibility study of lignin valorization. *Bioresource Technology*, 299, 122559. doi: 10.1016/j.biortech.2019.122559: 32 str.
- Kizer L., Pitera D. J., Pfleger B. F., Keasling J. D. 2008. Application of functional genomics to pathway optimization for increased isoprenoid production. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 3229–3241
- Lee D., Lloyd N. D. R., Pretorius I. S., Borneman A. R. 2016. Heterologous production of raspberry ketone in the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* via pathway engineering and synthetic enzyme fusion. *Microbial Cell Factories*, 15, 49. doi: 10.1186/s12934-016-0446-2: 7 str.
- Loeschcke A., Thies S. 2015. *Pseudomonas putida*—a versatile host for the production of natural products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99: 6197–6214
- Lukin I., Jach G., Wingartz I., Welters P., Schembecker G. 2019. Recovery of natural  $\alpha$ -ionone from fermentation broth. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 67, 49: 13412–13419
- Martin V., Pitera D., Withers S., Newman J., Keasling J. D. 2003. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nature Biotechnology*, 21: 796–802
- Martínez-García E., de Lorenzo V. 2016. The quest for the minimal bacterial genome. *Current Opinion in Biotechnology*, 42: 216–224
- McNaught A. D., Wilkinson A.. IUPAC. 1997. *Compendium of chemical terminology – The gold book*. 2nd ed. Oxford. Blackwell Scientific Publications: 464 str.
- Mi J., Becher D., Lubuta P., Dany S., Tusch K., Schewe H., Buchhaupt M., Schrader J. 2014. De novo production of the monoterpenoid geranic acid by metabolically engineered *Pseudomonas putida*. *Microbial Cell Factories*, 13:170. doi:10.1186/s12934-014-0170-8: 11 str.
- Mohanty R., Chowdhury C. R., Arega S., Sen P., Ganguly P., Ganguly N. 2019. CAR T cell therapy: A new era for cancer treatment (Review). *Oncology Reports*. 42, 6: 2183–2195
- National Human Genome Research Institute. Synthetic biology. 2019. <https://www.genome.gov/about-genomics/policy-issues/Synthetic-Biology>. (28. maj 2020)
- Nature Communications. 2018. Building better yeast.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-04159-y> (28. 5. 2020)

- Nikel P. I., Martínez-García E., de Lorenzo V. 2014. Biotechnological domestication of pseudomonads using synthetic biology. *Nature Reviews. Microbiology*, 12, 5: 368–379
- NobelPrize.org. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2004. Nobel Media AB 2020. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2004/summary/>. (28. 5. 2020)
- O'Brien E. J., Monk J. M., Palsson B. O. 2015. Using genome-scale models to predict biological capabilities. *Cell*, 161: 971–987
- Onbasli D., Aslim B. 2009. Biosurfactant production in sugar beet molasses by some *Pseudomonas* spp. *Journal of Environmental Biology*, 30: 161–163
- Parker J. K. 2015. Introduction to aroma compounds in foods. V: Flavour development, analysis and perception in food and beverages. Parker J. K., Elmore S. in Methven L. (ur). Cambridge. Woodhead Publishing: 3–30
- Peralta-Yahya P. P., Ouellet M., Chan R., Mukhopadhyay A., Keasling J. D. in Lee T. S. 2011. Identification and microbial production of a terpene-based advanced biofuel. *Nature Communications*, 2, 1. doi: 10.1038/ncomms1494: 8 str.
- Pitera D. J., Paddon C. J., Newman J. D., Keasling J. D. 2007. Balancing a heterologous mevalonate pathway for improved isoprenoid production in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 9: 193–207
- Richard Fern. 2010. *Natures Chemicals The Natural Products that Shaped Our World*. Oxford. Oxford University Press: 250 str.
- Schempp F. M., Drummond L., Buchhaupt M., Schrader J. 2018. Microbial cell factories for the production of terpenoid flavor and fragrance compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66: 2247–2258
- Shaaban H., Mahmoud K., Amin A., Banna H. 2016. Application of Biotechnology to the Production of Natural Flavor and Fragrance Chemicals. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 7: 2670–2717
- Shukla R., Chauhan N., Rajak C., Flora S. J. S. 2019. Flavor Development for Functional Foods and Nutraceuticals. 1st ed. Selvamuthukumar M., Yashwant V. (ur.). Boca Raton. CRC Press: 292 str.
- Sleator R. D. 2010. The story of *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0: The forty million dollar microbe. *Bioengineered bugs*, 1, 4: 229–230
- Synthetic biology and its potential implications for biotrade and access and benefit-sharing. 2019. United Nations Conference on Trade and Development: 45 str. [https://unctad.org/en/PublicationsLibrary/ditctedinf2019d12\\_en.pdf](https://unctad.org/en/PublicationsLibrary/ditctedinf2019d12_en.pdf) (29. 7. 2020)
- Tole C. J., Behrens M., Meyerhof W. 2019. Taste receptor function. *Handbook of Clinical Neurology*, 164: 173–185

- Uredba (ES) št. 1334/2008 Evropskega Parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o aromah in nekaterih sestavinah živil z aromatičnimi lastnostmi za uporabo v in na živilih ter spremembi Uredbe Sveta (EGS) št. 1601/91, uredb (ES) št. 2232/96 in (ES) št. 110/2008 ter Direktive 2000/13/ES. 2008. Uradni list Evropske unije, L 354/34
- Van Wyk N., Kroukamp H., Pretorius I. S. 2018. The smell of synthetic biology: Engineering strategies for aroma compound production in yeast. *Fermentation*, 4, 54. doi: 10.3390/fermentation4030054: 18 str.
- Vickers C. E. in Sabri S. 2015. Isoprene. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 148: 289–317
- Williams D. C., McGarvey D. J., Katahira E. J., Croteau R. 1998. Truncation of limonene synthase preprotein provides a fully active “pseudomature” form of this monoterpene cyclase and reveals the function of the amino-terminal arginine pair. *Biochemistry*, 37: 12213–12220
- Wright J. 2010. Creating and formulating flavours. *Food Flavour Technology*, 2nd ed. Taylor A. J., Linforth R. S.T. (ur.). Oxford. Wiley-Blackwell: 23 str.
- Yang C., Gao X., Jiang Y., Sun B., Gao F., Yang S. 2016. Synergy between methylerythritol phosphate pathway and mevalonate pathway for isoprene production in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 37: 79–91
- Zwenger S., Basu C. 2008. Plant terpenoids: Applications and future potentials. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 3: 1–7