HUMAN RESOURCE DEVELOPMENT CENTRE

ECO Center

Funded by the Erasmus+ Programme of the European Union

БИОТЕХНОЛОГИЯТА КАТО СРЕДСТВО ЗА СЪЗДАВАНЕ НА ЕКОЛОГИЧНИ ЧИСТИ ИНДУСТРИАЛНИ ПРОЦЕСИ

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ

Гл. ас. д-р АННА ТОМОВА

1. Биотехнология – кратък преглед

1.1. Въведение

Биотехнологията е мултидисциплинарна наука, която използва живи организми, техни части или странични продукти от жизнената им дейност за индустриално приложение, с цел да се подобри качеството на живот на хората. Тя обединява използването на група от свързани дисциплини като биология, биохимия, микробиология, генетика, клетъчна и молекулярна биология, геномика, протеомика и компютърни науки, за да се постигне технологично прилагане на микроби и култивирани клетки или клетъчни компоненти. Тази интегрирана наука предлага нови постижения в разбирането и контролирането на жизнените процеси, чрез развитието на нови технологии.

Думата биотехнология се образува от гръцките думи "bios" (всичко да правя с живота) и "technikos" (с участието на човешки знания и умения). Като клон от науката тази дисциплина не е млада.

Нейното развитие обхваща два основни периода:

• Традиционна биотехнология, базирана по-скоро на емпирична употреба, отколкото на теоретични знания.

• Съвременна биотехнология, базирана на теоретични знания и непрекъснато нарастващото приложение.

Ферментационните технологии като алкохолна ферментация и правене на хляб, представляват всъщност най-ранната форма на биотехнология, които са възникнали в Китай и Египет. Египтяните са използвали дрожди в производството на хляб, китайците са разработвали ферментационни техники за производство на пиво и сирене, а ацтеките са използвали синьо-зелени водорасли от р. *Spirulina* за направата на пити. Тази традиционна или класическа биотехнология не отразява биотехнологията, каквато е известна днес, тъй като процесите са били експериментални и не контролирани. Хората са използвали природни щамове микроорганизми за получаване на полезни продукти като извара, вино, оцет, хляб, сирене и др.

Съвременната биотехнология използва генно модифицирани микроорганизми, растителни или животински клетки в развиващите се

производствени технологии, с които се постига повишаване на производителността, както и получаване и разработване на нови продукти и процеси. Настоящите и потенциални приложения на съвременната биотехнология включват повишаване на хранителните качества на зърнените култури, засилване устойчивостта към болести и пестициди в икономически важни растения и животни, увеличаване продуктивността от зърно и добитък, превенция, диагностика и лечение на заболявания, както и заместване на синтетичните продукти и химични процеси с био продукти и процеси чрез рекомбинантна ДНК технология.

В зависимост от сферата на приложение, в биотехнологията се обособяват пет основни групи, които се идентифицират по цветове.

Червена биотехнология - известна също като медицинска биотехнология, тя обединява всички онези приложения на биотехнологията, свързани с медицината и здравето на човека. Медицинската биотехнология търпи голям напредък през изминалите десетилетия, след откриването на молекулярната структура на ДНК от Уотсън и Крик през 1953 г., което по-нататък довежда до разшифроването на човешкия геном през 2000 г.

В обхвата на нейната дейност е използването на живи клетки и клетъчни компоненти за изследване и производство на фармацевтични и диагностични продукти, които помагат при лечение и профилактика на заболявания при човека. Учените използват познанията за генетичната информация, за да разберат механизмите на жизнените процеси и заболяванията. Колкото повече информация имат за това, кои гени са отговорни за синтезата на определени белтъци, толкова по-лесно и бързо ще разработят целеви лекарства. Чрез използването на рекомбинантни ДНК технологии се разработват много терапевтични продукти, в които се включват ваксини, моноклонални антитела, антибиотици, човешки белтъци и по-ефективни, но по-малко токсични нови лекарства Като направления в червената биотехнология се очертават клетъчната терапия и регенеративната медицина (тъканно инженерство), генната терапия, за лечение на болести, които в миналото са били нелечими, терапии със стволови клетки, лечение на рак. Червената биотехнология също помага в репродуктивните технологии, като ин витро оплождане, ДНК профилиране, съдебната медицина и при трансплантация на органи. Сред

областите на приложение на червената биотехнология е и производството на лекарства, където се използват микроорганизми или животински клетки, за да се получат желаните лекарствата в специално разработени биореактори. Тази техника е особено приложима за лекарства на белтъчна основа, като хормони и антитела. Тъй като тези активни биомолекули имат триизмерна структура и са насочени в своя терапевтичен режим на действие, те могат да се произвеждат само от живи организми или клетки. Синтетично произведените субстанции не функционират в такива случаи.

Приложението на червената биотехнология не се свежда само до хора. Тя се използва предимно във ветеринарната медицина за разработването на по-добри ваксини. Сред тях са така наречените маркерни ваксини, които служат за серологична диференциация между ваксинирани и заразени животни. На основата на биотехнологични процеси е производството на токсин антигени и имуномодулаторни средства.

Бяла биотехнология – обхваща приложенията на биотехнологията, свързани с индустриалните процеси, поради което се нарича още индустриална биотехнология. Тя обръща специално внимание на разработването на икономични процеси, в които се използват по-малко ресурси и продукти, което ги прави по-енергийно ефективни и по-малко замърсяващи от традиционните. Могат да бъдат посочени много примери за бяла биотехнология, сред които използването на микроорганизми в производството на химикали, производството на нови материали за ежедневна употреба (пластмаси, текстил, храни хранителни вещества, прахове за пране и други продукти) и развитието на нови устойчиви енергийни източници като биогорива.

Като пример за ползата от бялата биотехнология пред традиционното производство може да се посочи въвеждането на ферментационната технология за производство на антибиотици в индустриален мащаб. Тази технология позволява сложният многоетапен химически процес, който включва 13 етапа, да бъде заменен от едностъпален ферментационен процес и последващ двуензимен процес, като това води до 65 % икономия на енергия и намаляване наполовина разходите за суровини.

Сивата биотехнология известна също като биотехнология на околната среда, изследва предимно проблеми свързани с околната среда, като рециклиране на питейна вода, пречистване на отпадъчни води, възстановяване на замърсени територии, рециклиране на отпадъци и др. Ползите за околната среда, предлагани от сивата биотехнология, са огромни, особено в области като обработка на отпадъци и биоремедиация на замърсени терени, вода и въздух, контрол на вредители, третиране на промишлени отпадъчни води и емисии и дренаж на руднични води. За тази цел се прилагат различни аналитични методи и подходи.

Приложението на сивата биотехнология може да бъде разделено в две основни направления: поддържане на биоразнообразието и отстраняване на замърсители. По отношение на първото направление, трябва да се спомене прилагането на молекулярната биология за генетичен анализ на видовете в популациите, които са част от екосистемите, тяхното сравняване и класификация, както и техники за клониране, насочени към запазване на видове и технологии за съхраняване геноми . Поддържането на биоразнообразието в естествените хабитати подпомага функционирането на екосистемите на по-широка площ. Естествените местообитания са убежище за популации от птици и други хищници, които помагат да се контролира числеността на насекоми - вредители в селскостопанските райони, като по този начин се намалява нуждата от изкуствени мерки за контрол и разходите за тях.

Нарастващият дял на замърсители в околната среда е тревожен за екосистемите. Редица органични замърсители, като полихлорирани бифенили (ПХБ), полиароматни въглеводороди (ПАВ) и пестициди, са устойчиви на разграждане, и те представляват токсикологична заплаха за дивата природа, както и за хората. В световен мащаб се предприемат различни физиологични и биологични мерки, с цел разграждане на тези въглеводороди, за да се подобри качеството на околната среда. Най-обещаваща стратегия за решаването на този проблем е биоремедиацията, където се използват микроорганизми, за да разградят органичните и неорганични замърсители с възможност, за последващо използване на тези вещества или продукти от тяхната дейност. Изолирани са голям брой щамове- микроорганизми от природата, които рутинно се използват в биоремедиацията, но в ерата на индустриализацията,

замърсяването с ксенобиотици надвишава природния толеранс. Ето защо биотехнолозите прилагат различни генно- инженерни подходи, за създаване на нови генно модифицирани щамове микроорганизми (GEMS), които са по-ефективни в процесите на биоремедиация. Чрез биомолекулярни инженерни подходи, като рационален дизайн и насочен мутагенез, са конструирани микроорганизми, които синтезират ензими за разграждане на устойчивите органични замърсители като повърхностно активни вещества, полихлорбифенилни съединения и пестициди. Проведени са няколко разработки в областта на рекомбинантни ДНК технологии, като например развитие на "микроорганизми-самоубийци", за да се постигне безопасно и ефикасно биоремедиацията на замърсените места (Soccol et al., 2003).

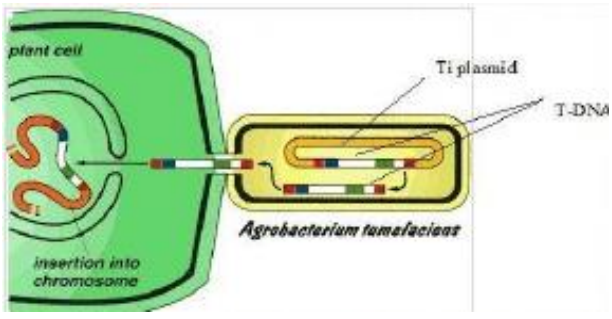
Зелената биотехнология, известна още като растителна или земеделска биотехнология, е бързо развиващо се направление в съвременната биотехнология. Тя се прилага с цел разрешаване на проблеми, във всички области на земеделското производство и преработка. Това включва отглеждане и размножаване на растения за повишаване и стабилизиране на добивите; повишаване устойчивостта им към насекоми-вредители, болести и абиотични фактори като суша и студ; повишаване на хранителното съдържание на храни; подобряване качеството на зърнените култури; разработване на евтин посадъчен материал за култури, като маниока, банани и картофи; създаване на нови инструменти за диагностика и лечение на растителни и животински заболявания и за измерване и опазване на генетичните ресурси. Тези подобрения не са възможни при естественото кръстосване на родствени видове в природата. Широкото приложение на биотехнологията в селското стопанство, по-специално при зърнените култури, включва разработване на китове за диагностика на болести, биоторове и биопестициди, както и използването на молекулярни маркери, тъканни култури и генното инженерство, за създаване на различни растителни сортове (Tang, 2008; Ortiz, 2010 г). Производството на модифицирани сортове растения се основава почти изцяло на трансгенеза, или въвеждане на целеви гени от един сорт растение, или организъм в друго растение. Това прави революционна техниката, от гледна точка на потенциалните ползи, които тя може да донесе, но също причинява

безпокойство по отношение на въпроси, свързани с безопасността, етиката, потребителския избор и въздействието върху околната среда.

Съществуват четири методи за трансформиране на растителни клетки с чужда ДНК, които се използват успешно за получаване на трансгенни растения.

Първият от тях е подходът "рязане и лепене“, в който бактериални ензими разпознават, срязват и присъединяват трансгенна ДНК към определени участъци от растителната ДНК, като по този начин действат като молекулярни ножици и слепващи агенти. Избраният ген се прехвърля в растителната клетка, чрез използване на плазмидни вектори, съдържащи маркерни гени, като гените за антибиотична резистентност, които се използват като основа за селекция.

Вторият подход се основава на използването на бактерията *Agrobacterium tumefaciens* като природен генен инженер. В природата тази почвена бактерия прониква в растенията през рани по стъблото и корена. Екстрахромозомалната ДНК, известна още като плазмид Ti, се интегрира в хромозомите на растението (фиг. 1). След инсерцията, плазмидните гени започват да работят. Те кодират ензими, които принуждават растителната клетка да синтезира метаболити, необходими за растежа на бактериите. Генните инженери се възползват от тази естествена способност на *Agrobacterium tumefaciens,* като отстраняват плазмидните гени, които променят растителния метаболизъм и причиняват заболяване, и на тяхно място включват желани гени. Бактериите с променени плазмиди могат да се използват за инфектиране и трансформиране на растителни клетки, растящи в тъканна култура.



Фиг. 1 Механизъм на инвазия на *Agrobacterium tumefacians*

Третият подход се нарича „генен пистолет“, известен още като ускорение на частици или бомбардиране с микрочастици. Както показва и името,

растителната клетка се обстрелва с микроскопични златни или волфрамови частици, покрити със стотици копия от целеви гени. Веднъж попаднали в ядрото на растителната клетка, гените се освобождават от частиците и се вмъкват между растителните гени. След това, от трансформираната растителна клетка се регенерира цялото растение.

Четвъртият подход се основава на използването на микровлакна за трансформиране на клетки от тъканна култура. Микровлакната, известни също като „мустаци“ са покрити със стотици копия на гена (ите). Те пробождат растителните клетки и доставят ДНК в ядрото на клетката, без да я убиват.

Синята биотехнология, наричана още морска, се основава на използване на морските биоресурси за създаване на продукти и процеси с промишлено значение. Тя е бързо развиващо се и много важно изследователско направление в сектора на световната биотехнология. Морските екосистеми в голяма степен са неизследвани, неизучении недостатъчно използвани, в сравнение с екосистемите на сушата и организмите в тях. Те се характеризират като уникални ниши, поради екстремните условия на местообитание, като например висока соленост и хидростатично налягане в морските дълбини, екстремни стойности на температурата и pH в дълбоководните хидротермални извори и кораловите рифове. Голямото разнообразие от видове, води до голямо разнообразие от химични съединения, открити в океаните, включително структури и биоактивности, които не са открити никъде другаде (Burges J., 2012). Тяхното проучване и използване, чрез прилагането на биотехнологични подходи, може да задоволи нарастващото търсене на здравословни хранителни продукти, биоматериали, алтернативни източници на енергия, нови лекарства и продукти за лична хигиена и за справяне с проблемите на околната среда. Морските организми се използват като източник на биоматериали, генен резервоар, различни ценни съставки, като пигменти, биоактивни съединения, мастни киселини, ензими, антиоксиданти. Областта на морските природни продукти е вече голяма и развиваща се. Някои от тях се прилагат в промишлената биотехнология, докато други могат да участват в развитието на нови процеси в хранителната и фармацевтичната промишленост или в молекулярната биология и диагностиката. Медицината и науката са основните

бенефициенти от развитието в синята биотехнология. Бактериите и микроскопичните гъби, както и макроорганизми като гъби, корали и водорасли, са продуценти на биологично активни вещества с известна активност, не само срещу патогенни бактерии, гъби и вируси, но също така срещу туморни клетки. Те могат да действат също върху сърдечно-съдовата, имунната и нервната система. Индустриалното приложение на многобройните открити биоактивни съединения е ограничено, поради проблеми, свързани с възпроизводството и разработването на процеса в голям мащаб. В допълнение, получаването на достатъчни количества чисти субстанции, също в много случаи ограничава по-нататъшния напредък. Например, за получаването на по-малко от 1 г вещество като халихондрин, ектеинасцидин или бриостатин, се използват съответно един тон гъби, асцидии или ектопрокти (Molinski et al., 2009; Mayer et al., 2010). За някои съединения, този проблем е решен с използването на алтернативни производствени процеси (Battershill et al. 1998, Duckworth et al., 2004). Прилагането на геномни и метагеномни подходи, в допълнение към културално-зависимите проучвания, предлагат нови възможности за изследване на огромното разнообразие от морски микроорганизми и техния капацитет да произвежда нови химически структури, с биологична активност. Липсата на системен подход често води до преоткриването на вече известни съединения (Penesyan et al., 2010). Ранното откриване на известните биоактивни съединения е възможно благодарение на напредъка в разработването на нови аналитични техники, като например диференциален анализ на масиви от 2D ЯМР спектър (Шрьодер и сътр., 2007). Тези техники, съчетани със създаването на големи бази данни, са ценни инструменти за бързо идентифициране на известни и откриване на нови съединения.

В изследователската практика често се използват маркерни молекули от морски организми. Например генетичната способност за луминисценция на медузата *Aequorea victoria,* доведе до характеризирането на зеления флуоресциращ белтък (GFP). Той, ведно с ензимът луцифераза, продуциран от *Vibrio fischeri*, имат широко приложение в молекулярната биология като маркерни белтъци.

Водораслите са богат източник на естествени полизахариди, много от които вече имат търговско приложение, поради техните свойства като желиращи

и стабилизиращи агенти. Биополимерите агар и агароза се използват за изследователски цели, в продължение на много години като хранителна среда и при приготвянето на гелове за електрофореза. Полизахаридите хитин и хитозан (получени съответно от скариди и раци) и карагенан (извличан от водорасли), са широко използвани в хранителната промишленост като сгъстители и стабилизатори.

Морските микро и макроводорасли могат да бъдат използвани като част от решението, за задоволяване непрекъснатото увеличаване на глобалната необходимост от биоенергия. Налице са обещаващи резултати от пилотни проучвания, в използване на тези видове като наличните ресурси за производство на биогаз. Като възможни приложения на микроводорасли, отглеждани в големи мащаби, са производство на скъпи търговски съединения, използването им като енергийни ресурси и за отстраняване на CO_2 от въглищни електроцентрали, поради способността им да фотосинтезират и растат бързо.

Нанотехнологията (понякога наричана за кратко нанотех) е бързо развиваща се област на изследване и е една от най-обещаващите технологии за 21-ви век, заедно с биотехнологията. Нанонауката и нанотехнологията се занимават с изключително малки частици, с размери между 1 и 100 нанометра (т. нар. наноскала) и изучават тяхното приложение на молекулярно и клетъчно ниво. От създаването си, нанотехнологията никога не е била самостоятелна дисциплина. Ето защо е препоръчително да се говори за нанотехнологии, тъй като тя се позовава на набор от методи и подходи от физиката, химията, инженерните науки, биологичните и медицинските науки. В резултат от сливането на нано и биотехнологията възниква нанобиотехнологията (Singh, et al., 2010).

Нанобиотехнологията е модерна мултидисциплинарна сфера на дейност и научни изследвания, която се появи съвсем наскоро и се отнася до начините, по които се използват нанотехнологиите за създаване на устройства за изучаване на биологичните системи на субклетъчно и молекулярно ниво. Наноустройствата и наноматериалите помагат на учените да изследват различни биологични процеси на молекулярно ниво. Тези приложения са полезни в научните изследвания, клиничната диагностика, разработване на

лекарства, както и в много други области. Първото приложение на нанобиотехнологията е свързано с напредъка в медицината, където наночастиците се използват, за да свързват или капсулират лекарства. Такъв нов клас нанотерапевтици, може да са насочени към определени обекти в тялото или дори болната тъкан, като по този начин се ограничава страничните ефекти на лекарството. Много метали образуват метални наночастици, които имат различни полезни свойства. Някои от тях образуват кристални структури с уникални оптични характеристики и се използват като нано-биосензори, докато други показват магнитни свойства и се използват в ядрено-магнитен резонанс. Магнитните наночастиците са широко използвани в изследвания на молекулярната биология, като средства за разделяне при разработването на методи за отделяне на макромолекули. Други важни характеристики на наноструктури е тяхната голяма площ с функционални групи, което ги правят подходящи магнитни сорбенти в процеса на спиране на различни биологично активни молекули, като нуклеинови киселини и белтъци .Най-добре проучени наноструктури са сребърните, които притежават антимикробни и противовъзпалителни свойства. Тяхната голяма повърхност увеличава възможността за взаимодействия, което определя прилагането им, като ефективни антимикробни агенти. Златни наночастици се използват в медицинската образна диагностика за белязване на проби, за трансмисионна електронна микроскопия. Желязо-базирани наночастици са използват в ин витро и ин виво експерименти за проследяване на пътя на стволови клетки, имплантирани в рана. Настоящите химични и физични методи за производство на наночастици, използвани от синтетичната биология, са скъпи, по отношение на високата температура или налягане, което изискват. Като алтернативен начин за получаване на наночастици е биологичен синтез, с използване както на прокариотни, така и на еукариотни организми. Те ги произвеждат като част от тяхната защита срещу токсични вещества. Сред еукариотите, микроскопичните гъби са добре известни продуценти на наночастици. Например представителите на р. Phoma произвеждат сребърни наночастици, като антимикробни агенти за медицинско използване. Освен от сребро, *Fusarium oxysporum* произвежда наночастици и от други метали, като: Pt, Ag, Au, Pb и Ti (Edmundson., M. et al., 2014).

Много видове бактерии са в състояние да произвеждат наночастици естествено и са предпочитани за тази цел, поради по-високите скорости на растеж и по-лесната работа с тях. Някои бактерии, например водните бактерии *Magnetospirillum gryphyswaldense* формират магнитни желязонаноструктури в техните клетки, известни като магнетозоми. Други бактерии, например *Shewanella,* формират наночастици, известни като наножици, които служат за транспортиране на електрони извън клетката при дишане в анаеробни условия. Този вид наночастици са изследвани за техните потенциално проводящи свойства.

Нанотехнологията е все по-важно направление в различни сектори от хранителната индустрия. Вече са получени обещаващи резултати и приложения в областта на системи за доставка на хранителни вещества чрез биоактивни наноенкапсулати, биосензори за откриване и количествено определяне на органични съединения от патогени, промяна в състава на храните, а също и при създаване на покрития за запазване на плодове или зеленчуци.

1.2. Основни инструменти на биотехнологията

Биотехнологията прилага техники, в които се използват живи организми или техни ензими за производството на продукти и процеси, полезни за хората. Изследователите използват съвкупност от средства, за да манипулират милиони различни видове растения, животни и микроорганизми в света, всеки от които, притежава клетки и молекули с уникални характеристики. Ето защо биотехнологията е толкова мощна дисциплина и може да се прилага по много различни начини.

1.2.1. Ферментационни процеси

Ферментационни процеси са най-старите биотехнологични процеси и са много важна дисциплина в съвременното общество. Тази технология е приложима в много индустрии за производство на различни хранителни продукти и безалкохолни напитки, хлебна мая, биогорива, органични киселини, ензими, витамини, антибиотици, ваксини, моноклонални антитела, стероиди,

хормони и фини химикали. Тя се основава на "микробни ферментации" и може да се определи като традиционен биотехнологичен метод. В този случай, микроорганизмите служат като миниатюрни фабрики, които превръщат суровините в крайни продукти. Ферментационните процеси се извършват в биореактори, в които се осъществява строг контрол на параметрите на процеса като температура, pH, аерация, разбъркване и др. Тъй като почти всички биотехнологични продукти се произвеждат от микроорганизми, ферментационната технология е незаменим елемент от поддържащата биотехнологична система. Всеки индустриален микробен процес включва три основни фази: предварителна обработка, процес на ферментация и постферментационна обработка.

Фазата на предварителна обработка включва избор на подходящ микробен щам, формулиране, оптимизация и стерилизация на хранителната среда и подготовка и стерилизация на оборудването, подготовка на инокулума и последващо инокулиране на средата. Скринингът (селекция на нови изолати за производство на нови метаболити) и изолирането на подходящ щам-продуцент на индустриално важно съединение, който се характеризира с висока продуктивност, е най-важната стъпка от всеки ферментационен процес. Има няколко разработени стратегии, които имат за цел да предоставят щамове, подходящи за промишлено използване. Най-простия, но все още най-мощния подход, е да се използва природното разнообразие, като щамове продуценти на желани продукти, се изолират от природни проби. Изолатите не винаги се характеризират с висока продуктивност, поради което те се подлагат на генно инженерни модификации, с цел да се подобри тяхната метаболитна и клетъчна характеристика, за да се отговори на нуждите от висок добив и продуктивност. Метаболитното инженерство се превърна в жизненоважен подход за създаване на генно модифицирани микроорганизми за производство на желаните биохимикали (Chaudhary и сътр., 2015 г.).

Други желани характеристики на щамовете са:

- бърз растеж
- генетична стабилност
- да не са токсични за хората

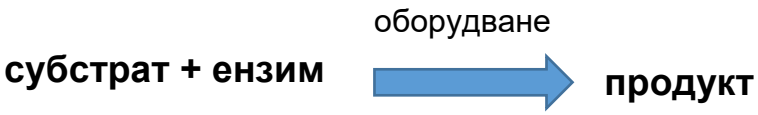
- голям размер на клетката за лесно отстраняване от културалната течност

Последните метагеномни проучвания разкриха, че природното биоразнообразие е необятно и в голяма степен неизследвано и изолираните индустриални щамове представляват само една малка част от съществуващите микроорганизми в природата. Има много неизвестни видове и щамове в природата, които могат да се окажат с изключителни способности за определен промишлен процес. Някои от тях може да не са подходящи за директно култивиране в промишлени условия, но да служат като източник на гени, кодиращи ценни вещества. Метагеномният подход позволява изолирането на гени от индустриален интерес, директно от природни проби и клонирането им в промишлени щамове, като по този начин се създават нови щамове с допълнителни полезни характеристики (Steensels, J., 2014).

Фазата на реалния процес на ферментация включва растежа и размножаването на избрания микробен щам и синтезата на желания продукт. Култивирането се извършва в подходяща хранителна среда, която трябва да осигури необходимите количества от въглерод, азот, микроелементи и растежни фактори. Съставът на хранителната среда повлиява добива на биомаса, скоростта на растеж на културата и образуването на продукт. По-мащабни процеси се провеждат в биореактори при аеробни или анаеробни условия, в зависимост от микробния метаболизъм. Оптималните физични параметри на култивиране, като температура, pH, газова атмосфера и разбъркване се поддържат и контролират непрекъснато. Много често растежа и производителността на даден щам-продуцент са по-добри в процес, провеждан в малък мащаб, поради различните условия, които се създават при култивиране в големи по обем биореактори.

Има два основни подхода, които се прилагат за осъществяването на промишлен микробиологичен процес. При първият подход (Фиг. 2А), субстратът се смесва с цели микробни клетки и в резултат на биотрансформацията на субстрата се постига крайния продукт.

Фиг. 2 А. Първи подход за реализация на микробен процес



Фиг. 2 В. Втори подход при реализация на микробен процес

При вторият подход субстратът се трансформира в продукт, в резултат от действието на микробни ензими, изолирани предварително от микробните клетки и внесени в средата като биокатализатори.

Фазата на постферментативна обработка включва изолирането на полученият продукт и третиране на получените отпадъци от ферментационния процес. Търговски важните продукти от микробната ферментация могат да се разделят в пет основни групи:

- биомаса (хлебна мая, стартерни култури, фуражи за животни, и др.); основни метаболити (аминокиселини, органични киселини, витамини, полизахариди, етанол и др.);
- вторични метаболити (антибиотици, пигменти и др.);
- продукти в резултат на биоконверсия или биотрансформация (стероиди, L-сорбитол и др.);
- вътреклетъчни или извънклетъчни ензими (амилаза, липаза, целулаза и др.);
- рекомбинантни продукти (ваксини, инсулин и хормони на растежа и т.н.).

Изолирането на продукта се извършва чрез поредица от операции, които включват отделяне на клетки чрез утаяване, центрофугиране или филтриране; извличане на продукта чрез разрушаване на клетките (ако е вътреклетъчен); екстракция и пречистване на продукта. Много често, отпадъчни продукти от различни промишлени процеси, служат като субстрат за други индустриални ферментации, след предварителна модификация (меласа, лигноцелулозни отпадъци, суроватка, царевични екстракти и др.).

За индустриални цели най-често се използват микробни клетки, поради голямото им разнообразие и лесното им обработване. Бързият напредък в биологичните науки доведе до значително увеличаване наличието на цели микробни клетки като биокатализатори. Рекомбинантна ДНК технология е добър пример в това отношение. Наскоро, във ферментационната технология започна използването на растителни и животински клетки под формата на клетъчна или тъканна култура. Промишленото приложение на тези култури е все още ограничено, въпреки че има данни за получаване на ценни за индустрията вторични метаболити, чрез култивиране на растителни клетки в биореактор. Докато растителните клетъчни култури представляват надеждна система за продукция на тези съединения в лабораторни условия, тяхното приложение в индустриален мащаб е ограничено, поради ниски добиви от целевите метаболити или трудности при реализирането на процеса. Тези трудности се обуславят от недостатъчното познаване на регулаторните механизми на биосинтеза при растенията. (Stanbury et. al., 2003).

Биотехнологичните процеси имат много предимства пред конвенционалните химични методи на производство, тъй като в тях се използват живи клетки, изискват се по-ниски температури, налягане и pH в сравнение с химичните процеси и могат да се използват възобновяеми източници като суровини. В допълнение може да се каже, че оптимални количества от даден продукт, могат да бъдат произведени с минимален разход на енергия.

1.2.2. Генно инженерство

В основата на генното инженерство е трансфера на гени, което се постига чрез различни методи за получаване на рекомбинантна ДНК и съответно

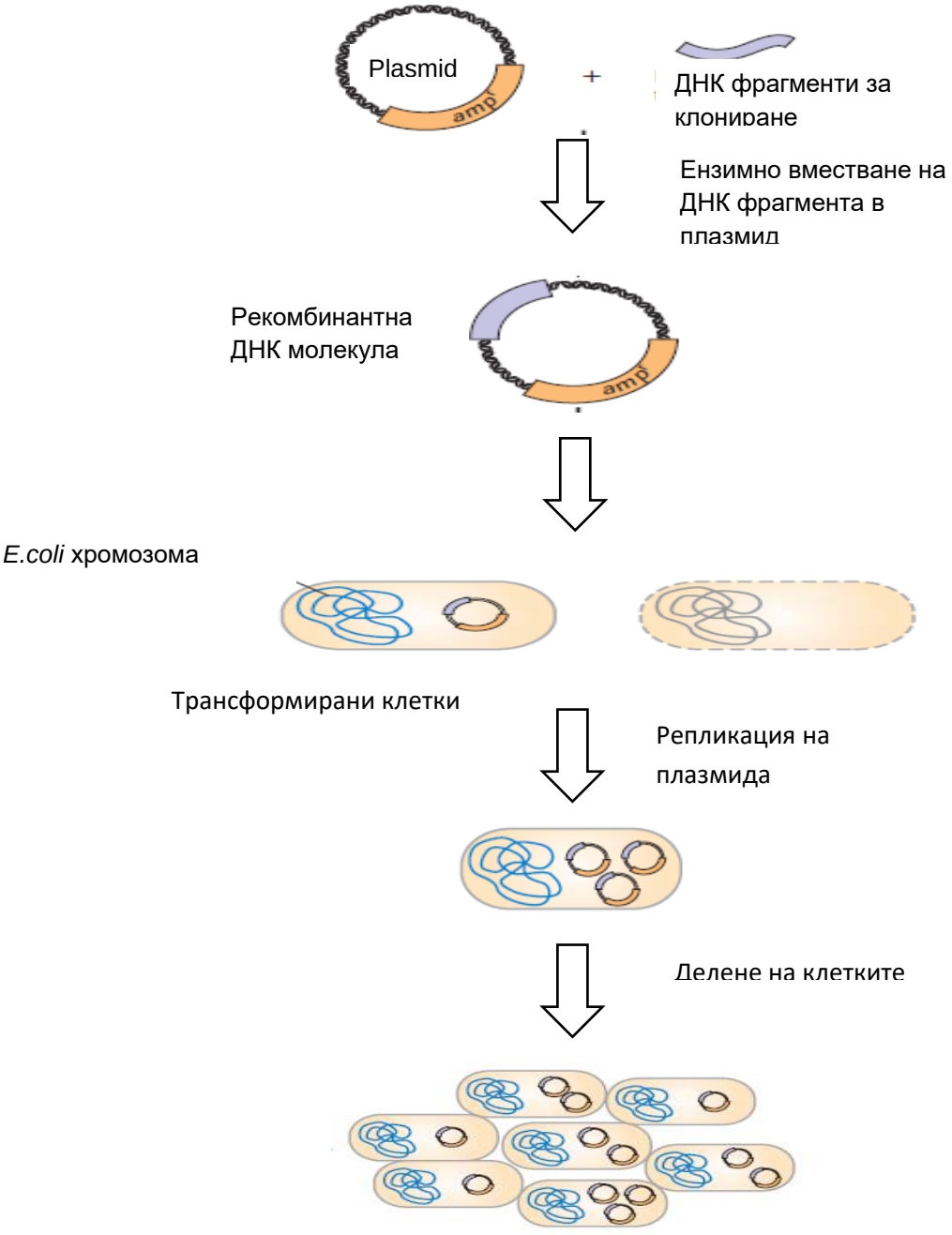
рекомбинантни белтъци, генетично модифицирани микроорганизми, трансгенни растения и животни за търговски цели. Рекомбинантна ДНК е всяка ДНК молекула, съставена от последователности, получени от различни източници. Генното инженерство повлиява растежа на биотехнологичната индустрия. Двете най- важни цели на генното инженерство са производството на полезни белтъци и ензими в голямо количество и създаване на трансгенни растения и животни и генетично модифицирани микроорганизми, с нови характеристики, използвайки рекомбинантна ДНК технология. Идеята за възникване на генното инженерство се заражда през 1973 г., когато двама учени Стенли Коен и Хърб Бойен, решават да вмъкнат гени от висши организми в генома на бактериите. По-нататъшно развитие в тази област се дължи на появата на някои важни техники, като PCR (полимеразна верижна реакция), въведена като подход от Кари Мълис през 1983 г., техниките за секвенционен анализ, за доставяне на гени (плазмиди, транспозони, генни пистолети). Революционната техника PCR позволява малки количества от ДНК да бъдат амплифицирани, което води до получаване на достатъчно ДНК за последващ анализ. Техниката продължава да намира нови приложения в биотехнологиите. Полимеразната верижна реакция (PCR) позволява експоненциално увеличаване на специфичен ДНК фрагмент от матрична ДНК молекула, чрез използване на къси ДНК последователности (праймери), които са комплементарни на известни последователности от матричната ДНК и позволяват амплифицирането на целевият фрагмент. За превръщането на PCR техниката в основна техника от голямо значение е било откриването на ДНК-полимераза, която да запазва активността си при температури между 37°, при която става свързването на праймерите и последваща полимеризация и 95 °C, при която се достига до денатурация на ДНК. Такава ДНК-полимераза, известна още като Taq полимераза, е изолирана от термофилната бактерия *Thermus aquaticus*, обитаваща горещи извори в Националния парк Йелоустоун.

Преди даден ген да бъде клониран в бактерии, е необходимо да се знае нуклеотидната му последователност. В началото са разработени независимо един от друг два метода, като средство за секвениране на ДНК нуклеотидни вериги, методът на Сейнджър, предложен от Фредерик Сейнджър през 1977 г. и метод на Гилберт, разработен по същото време от Уолтър Гилберт. В първия

метод става ензимно разкъсване на молекулата на ДНК, в резултат на което се получават ДНК вериги с различна дължина. Вторият метод се основава на химично разкъсване на ДНК. В двата метода, последователността на базите в ДНК се разкрива, чрез разделяне на получените белязани ДНК фрагменти на агарозна гел електрофореза. През 1985 г. Лирой Худ и негови колеги от Калифорнийския технологичен институт разработват автоматизиран метод за секвениране на базите в молекулата на ДНК, чрез изобретяване на ДНК секвенатор. Секвенирането на ДНК фрагменти с големина до около 500 нуклеотида, най-често се осъществява в апарати, чийто принцип на секвениране се основава на метода на Сейнджър (прекратяване на секвенирането при достигане до белязан нуклеотид).

За да се клонира даден ген, той трябва да бъде свързан с векторна молекула, която може да се реплицира в клетката гостоприемник. Векторите представляват ДНК молекули, които имат способността да се реплицират в организъм-гостоприемник, в който ще бъде клониран целевия ген. Съществуват различни видове вектори, които намират приложение в методите за клониране - плазмиди, бактериофаги, космиди, бактериална изкуствена хромоза, дрождеви вектори, совалкови вектори. Всички те трябва да притежава три важни функции: да имат начало на репликация, да съдържат най-малко два избираеми маркера (обикновено гени, определящи резистентност към антибиотици), да съдържат места за специфично срязване от рестрикционни ензими. Когато една рекомбинантна ДНК молекула е въведена в клетка гостоприемник, въведения ген се реплицира заедно с вектор, генерират се голям брой идентични ДНК молекули. Изборът на рекомбинантни клетки се основава на способността на трансформираните клетки да растат на селективна среда. Пълната характеристика на всеки клониран ДНК фрагмент изисква определяне на неговата нуклеотидна последователност.

Най-често използвани плазмиди в рекомбинантна ДНК технология, са тези, които се реплицират в *E.coli*. Основната схема на процесът на трансформация може да бъде обобщена, както епоказано на следната фигура:



Фиг. 3 Процес на трансформация на плазмиден вектор в *E.coli*

1.2.3. Биоинформатика

Биоинформатиката е бързо развиваща се област, която помага на изследователите, особено на биолозите, да ускорят изследванията, прилагането и търговското значение на биотехнологията в области като медицината, селското стопанство и получаване на био-енергия. Чрез използването на специализирани рекомбинантни ДНК техники, изследователите са определили голям брой ДНК и белтъчни последователности, включващи цялата геномна последователност при хората и много други организми. Получените данни от секвениране и функционален анализ се събират, съхраняват, класифицират, анализират и разпределят чрез компютърни програми. Първият секвениран геном е на вида *Haemophilus influenza* през 1995 г. От тогава са секвенирани стотици геноми. Огромният обем от данни, който се разраства бързо се съхранява и организира в бази данни, такива като GenBank /ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genbank/ в Националния здравен институт, Бетезда, Мериленд, и EMBL /http://www.ebi.ac.uk/ena/ в Европейска лаборатория по молекулярната биология в Хайделберг, Германия. Тези бази данни непрекъснато обменят новорегистрираните последователности и ги предоставят на учените от цял свят чрез интернет. Изследователите ги използват, за да планират и конструират своите експерименти и да анализират получените резултати. Основните изследвания в биоинформатиката могат да бъдат класифицирани в

:- Геномика - секвениране и сравнително изследване на генома, за да се идентифицират гените и тяхната функционалност.

- Протеомика - идентифициране и характеризиране на белтъците и реконструкция на метаболизма и регулаторните пътища.

- Клетъчна визуализация и симулация, с цел изучаване и моделиране на клетъчното поведение.

- Приложение на биоинформатиката за разработването на лекарства и анти-микробни агенти.

Част от подходите, които се използват в биоинформатиката, са белтъчно моделиране, геномен анализ и сравнение на цели геномни и белтъчни профили, анализ на биомаркерни данни, експресионни профили и моделиране на заболявания. Сравняването на аминокиселинната последователност на белтък,

кодиран от даден клониран ген, с последователности на белтъци с известна функция, позволява по подобието в последователностите да се направи заключение за функцията на белтъка. Въз основа на данните от последователностите на клетъчните макромолекули, учените биха могли да създадат модел на тяхната триизмерна структура. Белтъчната функция може да се предвиди, чрез сравняване на 3D структурата на неизвестен белтък с тази на известен белтък. Все още, данните за 3D структурите, получени чрез рентгенова кристалография и ядреномагнитен резонанс, са ограничени. Ето защо съществува алтернативен механизъм за сравняване подобието в последователността на гените (Bansal, A., 2005).

Има два основни подхода за моделиране 3D структура на белтъците:

- Предсказване на третичната структура въз основа на подобие в аминокиселинните секвенции
- *ab initio* (or *de novo*) метод.

Разработени са няколко софтуерни инструмента като алгоритъма BLAST, който ефективно намира участъци със сходни последователности в големи бази данни от секвенции с известна последователност. Динамични алгоритми, като например Smith-Waterman, както и други схеми за индексиране, дават по-точни данни за подобието при двойки гени.

Изследователите в областта на биоинформатиката, сравняват множество микробни геноми, с цел съпоставявянето и класифицирането им в различни семейства и изучаване на еволюционните връзки между тях. Сравняването на родствени последователности от различни видове, може да даде информация за еволюционни взаимоотношения между организмите. Подходът 16S рРНК, който се основава на теорията за нискочестотни мутации в консервативни гени, какъвто е генът за 16S рРНК, използва база данни от известни 16S рРНК последователности и наслагване на множество последователности, като средство за сравняване на хомоложни гени (гени, които имат подобни последователности) и за намиране на консервативни участъци. Този подход се основава също на Neighborjoin алторитъм за създаване на филогенетично дърво, на базата на данните от консеративните секвенции.

Microarray технологията е една от най-обещаващите технологии за изучаване на генната експресия, разработена в последните 15 години. ДНК анализът може да

разкрие разлики в генната експресия в клетки при различни експериментални условия. Анализът измерва относителната промяна в генната експресия при стресирани (или стимулирани) клетки и промяна в клетъчния експресионен профил - диференциация, клетъчен цикъл, тъканно ремоделиране, спорулиране.

Литература:

1. Amit Kumar Chaudhary, Dokyun Na, Eun Yeol Lee (2015). Rapid and high-throughput construction of microbial cell-factories with regulatory noncoding RNAs. *Biotechnol Adv* vol. 33, (6), pp. 914-930.
2. Bansal, A. (2005). Bioinformatics in microbial biotechnology – a mini review. *Microb Cell Fact* 2005, 4:19
3. Battershill, C. N, Page, M.J., Duckworth, A.R., Miller, K.A., Bergquist, P.R., Blunt, J.W., et al. (1998). Discovery and sustainable supply of marine natural products as drugs, industrial compounds and agrochemicals: chemical ecology, genetics, aquaculture and cell culture. Origin and Outlook, 5th International Sponge Symposium, Book of Abstracts. Brisbane: Queensland Museum. p. 16.
4. Burges, J. (2012). New and emerging analytical techniques for marine biotechnology. *Curr Opin Biotech*, 23, pp. 29-33.
5. Edmundson., M.,Capeness, M., Horsfall L. (2014). Exploring the potential of metallic nanoparticles within synthetic biology. *New Biotechnol*, vol. 31 (6).
6. Mayer, A.M.S., Glaser, K.B., Cuevas, C., Jacobs, R.S., Kem, W., Little, R.D., McIntosh, J.M., Newman, D.J., Potts, B.C., Shuster, D.E. (2010). The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends Pharmacol Sci,* 31, pp. 255-265.
7. Molinski, T.F., Dalisay, D.S., Lievens, S.L., Saludes, J.P. (2009): Drug development from marine natural products. *Nat Rew Drug Discov*, 8, pp. 69–85.
8. Niemirowicz, K (2013). Magnetic nanoparticles as separators of nucleic acid. *Chemic*, 67 (10), pp. 836-841.
9. Ortiz, R. (2010). Agricultural Biotechnologies in Developing Countries: Options and Opportunities in Crops, Forestry, Livestock, Fisheries and Agro-Industry to Face the Challenges of Food Insecurity and Climate Change. Background document.
10. Penesyan. A., Kjelleberg, S., Egan, S. (2010). Development of novel drugs from marine surface associated microorganisms. *Mar Drugs,* 8, pp. 438–59.
11. Sandeep Kumar, S., Vikas Kumar Dagar, Yogender Pal Khasa, Ramesh Chander Kuhad, Chapter in book Biotechnology for Environmental Management and Resource Recovery, pp 191-218

12. Schroeder, F.C., Gibson, D.M., Churchill, A.C., Sojikul, P., Wursthorn, E.J., Krasnoff, S.B., et al. (2007). Differential analysis of 2D NMR spectra: new natural products from a pilot-scale fungal extract library. *Angew Chem Int Ed Engl*, 46, pp. 901–4.
13. Singh, M., Manikandan, S., Kumaraguru, A.K. (2010). Nanoparticles:A new technologywith wide application. *Res J Naosci Nanotechol,* pp.1-11
14. Soccol, C.R., Vandenberghe, L.P., Woiciechowski, A.L., Thomaz-Soccol, V., Correia, C.T., Pandey, A. (2003). Bioremediation: an important alternative for soil and industrial wastes clean-up. *Indian J Exp Biol*, 41 (9), pp.1030-45.
15. Stanbury, P.F., Whitaker, A., &Hall, S.J. (2003). Principles of fermentation technology 2nd Edition Butterworth –Heinemann Publishers, UK.
16. Steensels, J., Snoek, T., Meersham, E., Nicolino, M., Voordeckers, K., Verstrepen, K. (2014). Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiol Rev*., 38, pp. 947-995.
17. Teng, P. (2008). An Asian Perspective on GMO and Biotechnology Issues. *Asia Pac J Clin. Nutr.*, vol. 17 (81), pp. 237-240.

Използвани Интернет източници:

http://www.biotechnologyforums.com/thread-2336.html

/http://www.iea-coal.org.uk/documents/83696/9385/Microalgae-removal-of-CO2-from-flue-gas,-ccc/250/

http://www.submariner-project.eu/index.php?option=com_content&view=article&id=93&Itemid=230

https://biotechspain.com/?iid=colores_biotecnologia&itid=4&lan=en

2. Повече за индустриална /бяла/ биотехнология

"The microbes will have the last word "

Louis Pasteur

2.1. Въведение

Сред основните нови технологии, които са се появили след 1970 г., биотехнологията привлича най-голямо внимание. Тя осигурява средства за адаптиране и модифициране на биологични организми, продукти, процеси и системи, открити в природата, за разработването на процеси, които са екологично ефективни и продукти, които са не само полезни, но и по--благоприятни за околната среда. По този начин, тя генерира огромно богатство и оказва влияние във всеки значим сектор на икономиката и това може да допринесе за устойчивото развитие на промишлеността. Промишлената биотехнология е един от най-обещаващите нови подходи за предотвратяване на замърсяването, опазването на ресурсите, както и за намаляване на разходите. Последните научни постижения в областта на геномиката, молекулярната генетика, метаболитното инженерство и катализата, заедно с напредъка в ензимните и ферментационните технологии и с други фактори като растящи цени на енергията, екологични проблеми и страхове относно енергийната сигурност, правят бялата биотехнология по-важна от всякога. Тя често е наричан третата вълна в областта на биотехнологиите (термин, илюстриращ хронологията на развитие, в който червената и зелената биотехнология са на първо и второ място съответно). Ако бъде разработена до пълния й потенциал, промишлената биотехнология би могла да има по-голямо въздействие върху от медицинската и аграрна биотехнология. Тя предлага на бизнеса начини за намаляване на разходите и създаване на нови пазари, като същевременно се опазва околната среда. Специално внимание се обръща на ензимите от микроорганизми, които функционират като специализирани катализатори на химични реакции. Тези белтъчни молекули са допринесли значително за традиционната и модерна химическа промишленост, чрез подобряване на съществуващите процеси. В момента са идентифицирани и описани повече от 4000 различни ензими с микробен произход (Shuang et al., 2012), но само 200 от тях са намерили своето място в различни индустриални сектори. Останалата

част, все още не са в състояние да отговорят на всички изисквания на индустрията. По-голямата част от микробните ензими, използвани до този момент, са получени от мезофилни микроорганизми и въпреки многото им предимства, тяхното прилагане все още е ограничено поради недостатъчната им стабилност при екстремални температури, pH, йонна сила и др. (Gomes and Steiner, 2004). Вследствие на това, изолирането и характеризирането на микроорганизми, които обитават екстремалните ниши, е получило голямо внимание. Биокатализата с използване на екстремофили и екстремозими, бързо се трансформира от академична наука в индустриално важна технология.

Само една малка част от микроорганизмите на Земята се използват от хората. Голям брой от тях не могат да бъдат култивирани в лабораторни условия, което не може да бъде преодоляно само чрез подобрения в техниките за култивиране, а се налага да се разчита повече на "-omics" технологиите. Нови тенденции в култивирането на екстремофилите, както и разработки, свързани с клонирането и експресията на техни гени в хетероложни гостоприемници, ще увеличи броят на ензимните трансформации в химическата, хранително-вкусовата, фармацевтичната и други индустрии (Kumar et al., 2011).

Химическият сектор е най-големия потребител на продукти и процеси от бялата биотехнология, сред всички останали индустриални сектори. От суровините, които се получават, 16% са от възобновяеми източници и този процент непрекъснато нараства, благодарение на бързото развитие на бялата биотехнология. Други индустриални отрасли, в които се прилагат биотехнологични средства, са хранителния и текстилния сектор, производството на хартия и дървен материал, фармацевтичната, селскостопанската и козметичната индустрии, както и в енергийния сектор и опазването на околната среда.

Развиването на мащабни ензимни технологии, подходящи за приложения в промишлената биотехнология, се очертава надеждно направление за опазване на околната среда и бъдещо устойчиво развитие (Srinivasan, et al., 1999).

2.2. Предимства на индустриалната биотехнология пред традиционната химическа индустрия

Предимството при използването на бялата биотехнология е, че тя подобрява ефективността на химичните процеси. Има няколко основни точки, които могат да бъдат споменати като предимства на биотехнологичните процеси:

- По-чиста и екологична продукция, тъй като се генерират по-малко отпадъци и се елиминират вредни химични продукти.
- Използване на евтини изходни суровини като целулоза и биомаса, в сравнение с използването на нефтени продукти.
- Биокатализа с участието на микробни клетки или техни ензими. Биокаталитичните реакции се характеризират с висока регио- и стерео специфичност.
- В биотехнологичният процес етапи на реакцията са редуцирани и обикновено включват реакция на синтез и наизолиране на продукта.
- Възможност за синтеза на продукти, които не се получават по химичен път. Например, понастоящем сред диацидите с дължина на веригата от 10 до 18 въглеродни атома, само няколко (предимно диациди с дължина на веригата от 12 въглеродни атома), могат да се произвеждат чрез икономични химични процеси, докато по-голямата част от тях могат да бъдат произведени чрез икономични биопроцеси. Полимерите, направени от тези дълговерижни въглеродни съединения са с подобрени качества като по-голяма гъвкавост и намалена абсорбция на влага, и могат да създадат нови ценни приложения.
- Конвенционалните химически процеси изискват висока температура и налягане, докато микроорганизмите и ензимите, използвани в биотехнологичните процеси, работят при налягане близко до атмосферното и нормални температури, биоразградими са и могат да функционират също и при екстремни условия.

2.3. Разработки на бялата биотехнология за екологично производство на продукти

Бялата биотехнология води своето начало още от древността и нейните продукти са неизменна част от ежедневието на хората - от витамини, лекарства (фини химикали), биогориво и биопластмаси, до ензими в детергенти или млечни и хлебни изделия. Основните дългосрочни приложения на бялата биотехнология, ще бъдат насочени към замяна на изкопаемите горива с възобновяеми ресурси (преобразуване на биомаса), заменяйки конвенционалните процеси с биопроцеси (включително метаболитно инженерство) и създаване на нови биопродукти с висока стойност, включително хранителни добавки, ефективни препарати и биоактивни вещества (Lorenz and Eck, 2005). Много хора считат, че зелената химия и промишлената биотехнология са синоними на бялата биотехнология. Целта на бялата биотехнология е да се създаде устойчиво общество (Gupta et al., 2007). Тя се отнася до използването на живи клетки и / или техни ензими за създаване на индустриални продукти, които са по-лесно разградими, изискват по-малко енергия, генерират се по-малко отпадъци по време на производството и понякога продуктите са по-ефективни от тези, създадени с помощта на традиционните химически процеси. Такива процеси са по-рентабилни, тъй като те са икономически ефективни, с по-малък разход на материали и енергия.

Организацията за икономическо сътрудничество и развитие (OECD), е събрала и анализирана казуси на прилагането на биотехнологични процеси в такива разнообразни сектори като производство на химикали и пластмаси, хранително-вкусовата промишленост, производство на текстил, хартия и картон, минното дело, металообработка и енергиен сектор. Казусите показват, че биотехнологичните процеси може не само да намалят разходите, но и водят до намаляване на вредата върху околната среда за дадено ниво на производство. В някои случаи, капиталовите и оперативните разходи са намалели с 10-50%. В други случаи, разходите на вода и енергия намаляват с 10-80%, както и използването на химически разтворители е сведено до минимум или напълно се елиминира. В редица случаи, използването на биотехнологията позволява

развитие на нови продукти, чиито свойства, цена и екологични показатели не можат да се постигнат с помощта на конвенционални химични процеси или нефтени продукти като суровина (www.oecd.org/sti/biotechnology).

Съгласно публикуваната информация на Световния фонд за дивата природа (WWF), прилагането на бели биотехнологични продукти и процеси спестява 33 милиона тона CO_2 на година и по този начин спомага за изграждането на по-екологична икономика (WWF, 2009).

Използването на бялата биотехнология е свързано основно с процесите на ферментация и биокатализата.

Ферментацията включва използването на микроорганизми като бактерии, дрожди и гъби, които са култивирани в биореактори, за ефективното преобразуване на захари в полезни материали като биоетанол, млечна киселина, янтарна киселина, лимонена киселина, витамини, аминокиселини, антибиотици, алкалоиди, стероиди и др. Предвижда се, в бъдеще пластмасите да се произвеждат от захари, нишесте, целулоза и растителни масла (Carmichael H., 2006). Ферментационният процес е единствения метод за получаването на някои от тези продукти в значителни количества. Като пример може да се посочи производството на витамин B2 (рибофлавин). Получаването му по конвенционален път включва поредица от осем етапа, които комбинират химична и биотехнологична синтеза. Синтезата на D-рибоза, мономерът, който изгражда този витамин, се синтезира от *Bacillus sp*. чрез ферментационен процес, след което чрез химични реакции се получава рибофлавин. Този сложен процес е заместен напълно от биотехнологична синтеза на рибофлавина във ферментационни процеси, с участието на бактерии, дрожди и гъби. Немската компания BASF (Ludwigshafen, Germany), произвежда 1000 тона годишно витамин B2, само чрез ферментационен процес. С използването на вида *Ashbya gossypii* като биокатализатор в процеса, компанията отбелязва значително намаляване на разходите за производство, както и редуциране на въздействието върху околната среда с 40 %.

Подобен пример е получаването на цефалексин, антибиотик, който е активен срещу Грам отрицателни бактерии и обичайно се произвежда чрез дълъг химичен процес, обхващащ 10 реакции. Понастоящем, той се произвежда

от холандската компания DSM Life Sciences Products, чрез по-кратък ферментационен процес (Frazzeto, 2003).

По-долу са посочени някои от ключовите области, в които бялата биотехнология има съществен принос и където се очаква химици и биохимици, да играят все по-голяма роля.

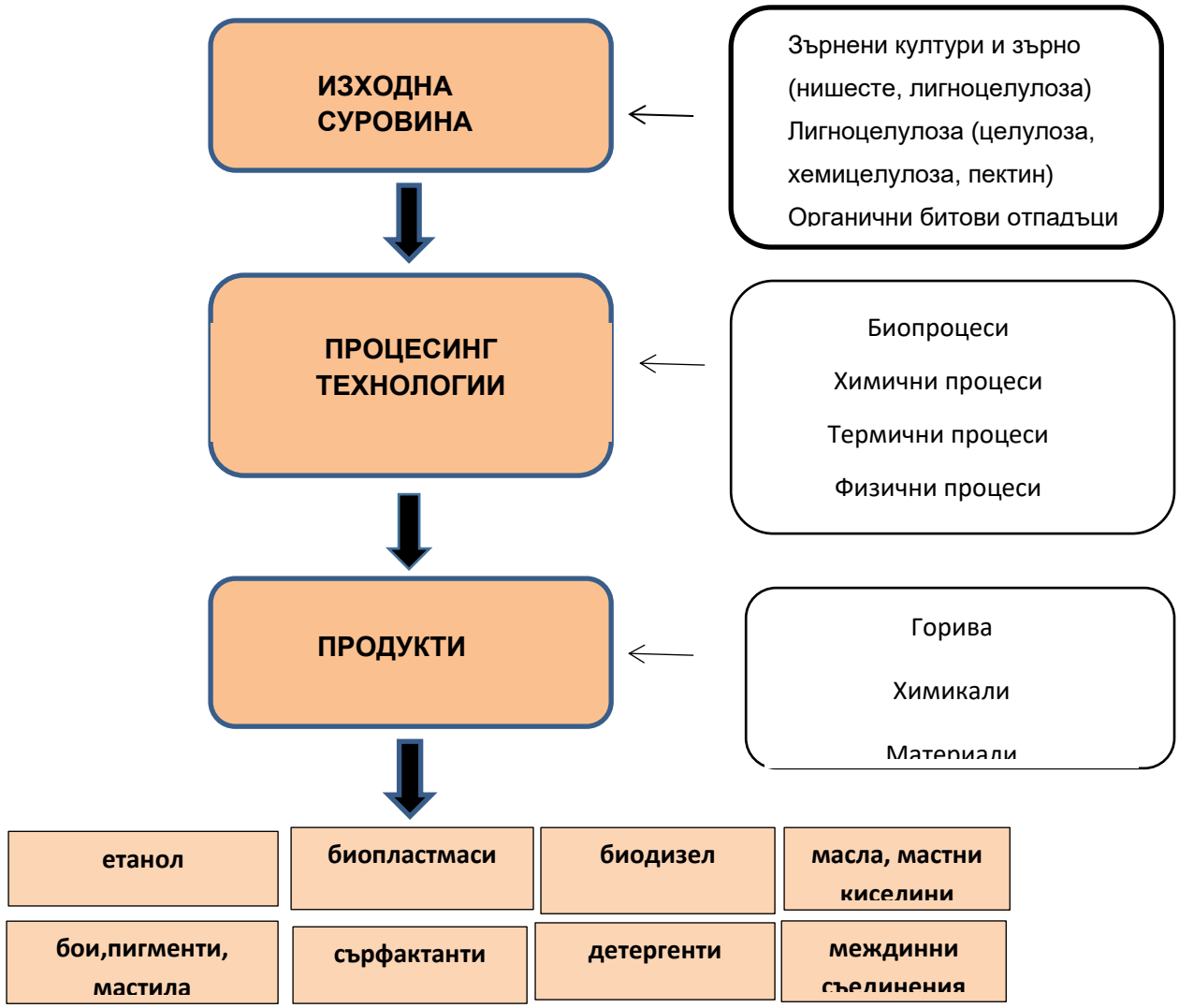
2.3.1. Биорафинерии

Биорафинериите са съоръжения, които преобразуват биомаса или биологични материали от живи или неживи организми, в продукти на биологична основа. Като примери за такива продукти могат да се посочат транспортните горива и топлинна енергия, фини химикали и материали, като пластмаси и полимери, влакна, храни и фуражи. В сравнение с петролни рафинерии, които произвеждат гориво и други основни химикали от суров петрол, биорафинерията произвежда същите продукти, но от възобновяеми източници като биомасата. Тази система съчетава разнообразни технологии за преобразуване на възобновяеми суровини в крайни продукти (Fernando S et al., 2006) (Фиг. 1).

Основната цел е да се оптимизира използването на ресурсите и да се минимизира получаването на отпадъците. Като суровина в биорафинерията може да се използва биомаса от различен произход. Като източник на биомаса могат да се използват царевица и зърнени култури, пшеница, рапица, памук, сорго, маниока и лигноцелулоза (от дърво или дървени отпадъци). Комбинираното прилагане на технологиите за генно модифициране с други технологии, позволява да се подобри добивът от културите и да се улеснят процесите на конверсия. Основните суровини (или продукти от тях), могат да се използват директно в процесите на биопреработка, или да се използват като евтини субстрати за ферментационни процеси, от които се извличат крайни продукти (Solaiman et al., 2006).

Различават се два вида биорафинерии, в зависимост от вида на използваната суровина. В най-простата система се използва само един вид суровина (например зърно) и се получава един краен продукт. По-комплексните биорафинерии използват комбинация от суровини и като резултат се произвеждат различни съединения. За да се постигне ефективна реализация на

суровината, се прилагат комбинирано механични, биокаталитични и химични обработки.



Фиг.1 Схематично представяне на основния принцип на действие на биорафинерия, заедно с примери на получени крайни продукти.

Биорафинериите могат да бъдат класифицирани в три основни групи, в зависимост от вида на биомасата, която се използва като суровина: биорафинерия с нишесте и захари (SSB), с лигноцелулоза (LCB) и с триглицериди.

Основните стъпки, които биха могли да бъдат очертани в SSB и LCB са:

- Предварителна обработка на биомасата чрез различни методи, с цел да се отстранят лигнина и хемицелулозата и да се наруши цялостта на целулозните вериги. Това ще улесни ензимната хидролиза в следващите етапи на обработка.

- Стриване и последваща ензимна хидролиза на целулозните молекули и нишестената биомаса с целулази и амилази с микробен произход.

- Ферментация на получения хидролизат, богатия на хексози, от нишестената биомаса, от естествено срещащи се дрожди (обикновено хлебни дрожди). Хидролизатът получен от лигноцелулозни суровини е по-комплексен, тъй като съдържа и пентози (ксилоза и арабиноза) и хексозни захари (глюкоза, галактоза и маноза). Ферментацията на пентозни захари е трудна и скъпа, тъй като само няколко щама дрожди осъществяват ферментацията им до етанол.

В биорафинерията на триглицериди, растителни масла и животински мазнини се използват като суровина за производство на биодизел. Производството се основава на трансестерификация на триглицериди с метанол и в резултат на този процес, се получава глицерол като страничен продукт.

2.3.2. Биоматериали

Търсенето на биоразградими полимери е нараснало в размер на 20-30% за година (Carmichael H., 2006). Биопластмасите са намерили употреба в различни компоненти на потребителска електроника. Те се използват в съединители, компютри, батерии, зарядни устройства, мобилни телефони, преносими музикални плейъри и клавиатури. Пазарните сегменти включват още градинарство, опаковане, производство на хигиенни продукти.

Един материал се счита за биоматериал, ако той, или част от суровините, използвани за производството му, са от възобновяеми източници. Най-голям

потенциал за навлизане на пазара имат биоверсии на термопластмасите полиетилен и полипропилен.

Полихидроксиалканоатите (PHA) принадлежат към групата на полиестерите, които заедно с други био-материали (полинуклеотиди, полиамиди, полизахариди, полиизопреноиди), са потенциални заместители на синтетичните пластмаси, поради техните подобни физически характеристики. Поли 3-хидроксибутиратът, най-често известен като полихидроксиалканоат, е биологично – синтезиран продукт, който се продуцира от захари, от различни представители на *Bacteria* и Archaea, които натрупват PHA в тяхната цитоплазма като резервно хранително вещество. Той служи като източник на въглерод и енергия, както и като депо на редуциращи еквиваленти при някои микроорганизми. PHA притежава висока термална стабилност, както и отлична биоразградимост. За разлика от синтетичните пластмаси, PHA се разгражда аеробно от микроорганизми до CO_2 и H_2O. Полихидроксиалканоатът е с широк спектър на приложения, които включват изработка на полимерни покрития, формовани продукти, пяна и влакна.

1,3-пропандиол (PDO) е био-производен продукт, който се получава в резултат на ферментация на захарите в зърнените култури. Мономерът се отделя от културалната среда и след това се използва директно при изготвянето на продукт или като съставна единица на полимери. Неговите основни области на приложение са козметиката, продукти за лична грижа и почистване на дома. Ефективна технология за производство на 1,3-PDO от суров глицерин е, чрез процес на ферментация с почиващи или имобилизирани клетки на *Klebsiella sp*. (Wong, et al., 2011)

1,4-бутандиол (BDO) се отнася към групата на химични съединения, които се произвеждат в голям мащаб, за да задоволят световния пазар. Той намира приложение в производството на над 2,5 милиона тона годишно ценни полимери, включително полиестери, полиуретани, ко-полиестер етери и други ко-полимери. Традиционно, той се произвежда изключително от суровини, получени от масла и въглеводороди в природния газ. Необходимостта от био-

бутандиол, получен чрез биотехнологичен процес, доведе до развитието на технология, при която крайният продукт се произвежда от устойчиви съставки, като глюкоза, ксилоза, захароза и смес от захари, получени от биомаса. Тази технология се базира на използването на генно модифициран щам *E.coli*, който е способен да произведе 18 g l^{-1} от това неприродно химично съединение. Технология на Genomatica също предлага възможност за използване на редица суровини, включително конвенционални захари, целулозна биомаса и синтетичен газ (Yim, et al., 2011).

Полимлечната киселина (PLA) е полиестер с алифатна природа, който е изграден от мономери на млечната киселина (2-хидрокси пропионова киселина). В момента той е с най-висок потенциал на приложение, поради неговата наличност на пазара и ниската му цена. Този термопластичен биополимер, подлежи на биоразграждане и компостиране и се произвежда от възобновяеми растителни материали, като нишесте и захари. Намира приложение в производството на пластмаси за хранителния сектор - съдове, обвивки, контейнери, опаковки. Европейското търсене на PLA в момента е 25 000 тона годишно, като през 2025 година може да достигне 650 000 тона годишно. Предвижда се, че бъдещите пластмаси ще се произвеждат от захари, нишесте, целулоза и растителни масла (Carmichael H., 2006).

Изобутанол - използва се като разтворител и суровина за синтез. Различните му приложения включват: разтворител на мастило за принтери, екстрахиращ агент в производството на лекарства и природни субстанции като антибиотици, хормони, витамини, алкалоиди и камфор, добавка в полиращи и почистващи препарати, препарати за подово почистване и за отстраняване на петна, разтворител в текстилната промишленост и др. Бактериите от род *Clostridium* са признати като добри природни продуценти на бутанол и се използват в индустриалното производство на разтворители. През последните години, гените от видовете *Clostridium*, участващи в биосинтезата на бутанол, се експресират в микроорганизми като *E.coli* и *Saccharomyces cerevisiae,* поради трудности при извършването на генетични манипулации с представители на род *Clostridium*. Синтезата на бутанол и изобутанол в *Saccharomyces cerevisiae,* се

осъществява, чрез конверсия на глицин през междинните съединения глиоксилат, β-етилмалат а-кетокиселини. Чрез използване на синтетичната биология, учените са конструирали дрожди, които синтезират преимуществено изобутанол, като са блокирани пътищата за производство на етанол и оцетна киселина (Atsumi et al., 2010).

Изопренът е ключово органично съединение в химическото производство на автомобилни гуми и каучук. Той се синтезира почти изцяло на базата на петролни продукти като нафта, масла или от разлагането на естествен каучук. Тези източници, прогресивно се изчерпват, поради което се търси надежден биологичен процес за производство на изопрен, с използване на възобновяеми суровини. Той ще бъде предпоставка за развитие на индустрия. Ензимът изопрен синтаза е идентифициран само в растения и производствените щамове микроорганизми не са ефективни в експресията на растителни гени. Техниките в синтетичната биология позволяват конструирането на ген, който кодира същата аминокиселинна последователност като тази на растителната изопрен синтаза, но с възможност за експресия в генно модифицирани микроорганизми. На тази основа биотехнологичната компания Genencore добавя към генома на *E. Coli* растителен ген, кодиращ растителна изопрен синтаза, ензим, който превръща прекурсора директно в изопрен (Erickson et al., 2012).

Янтарна киселина е основен градивен елемент в производството на голяма група вторични химикали, прилагани в химическата, фармацевтичната, хранителната и селскостопанската индустрия. Като алтернатива на янтарната киселина, синтезирана на основата на петролни продукти, е био- продукта, който се получава биотехнологично, с използването на микроорганизми, конструирани с помощта на метаболитно инженерство. Те синтезират янтърна киселина с високо качество, висока степен на чистота, от възобновяеми суровини като захарите. Производство на янтърна киселина чрез микробна ферментация на глюкоза, прави продукта конкурентен по отношение на цената, както и по отношение на отличната му функционалност.

Оцетната киселина се използва предимно за промишленото производство на фолио, бутилки и влакна. Биотехнологичната компания ZeaChem Inc., произвежда био-оцетна киселина с помощта на природни щамове микроорганизми. Тя се отличава с по-голяма степен на чистота от традиционния продукт (Erickson et al., 2012) .

2.3.3. Биогорива

Повечето енергийни нужди се задоволяват от изкопаемите горива (нефт, въглища и природен газ). Непрекъснатото им използване не само ще изчерпи световните петролни находища, но също така има сериозен ефект върху околната среда, води до увеличаване на риска за здравето и до глобални климатични промени ((Panwar et al., 2010). Прогнозата за изчерпване на изкопаемите горива до 2100 г. и проблемите, свързани с глобалното затопляне, определят нуждата от намиране на алтернативни горива. Интересът към биогоривата като алтернативно гориво за транспорт, се е увеличил силно от 1980 г. насам (Balat, 2010). Биогоривата са течни горива, произведени от биомаса, като захарна тръстика, зърнени храни, селскостопански остатъци, водорасли и битови отпадъци, чрез дейността на микроорганизми (Drapcho et al., 2008). Те се използват като заместители на бензина и дизеловото гориво в транспорта и са единствената съществуваща алтернатива на изкопаемите горива. Те могат да бъдат произведени от различни възобновяеми материали като растения и органични отпадъци. Голямата и разнообразна група на микроводораслите привлече голямо внимание през последните години, тъй като те могат да осигурят между 10 и 100 пъти повече масло от 0,405 ha, за разлика от други биогоривни суровини, като съдържанието на масло при някои микроводорасли надвишава 80% от сухото тегло на биомасата, което е почти 20 пъти повече от съдържанието в традиционните суровини. Този факт определя тяхната потенциална значимост като възобновяеми източници на енергия. Запасните липиди в тези едноклетъчни хетеротрофни организми, които са под формата на триацилглицероли, могат да бъдат използвани за синтезиране на биодизел чрез процес на трансестерификация. Въглехидратното им

съдържание може също да бъде превърнато в биоетанол чрез ферментация. Многобройни са предимствата на алтернативните горива, получени от водорасли. Микроводораслите са с висока продуктивност, безопасни са и биоразградими, но са необходими допълнителни експерименти, изискващи подобрения чрез методите на генното и и метаболитно инженерство, за да се постигне по-висок темп на растеж, по-високо съдържание на липиди и по-лесното им извличане от клетките.

Най-често срещаните биогорива са биодизел, биоетанол и биогаз.

Биодизелът се произвежда предимно от растително масло, чрез процес на трансестерификация. В биорафинериите се използват две категории масла. Към първата се включва чистото растително масло, извлечено от палми, соя, рапица и слънчоглед и производството му е ограничено само от земеделските условия в страната. Втората категория включва отпадъчно растително масло, например олио за готвене или животински мазнини, като основният недостатък при тяхното използване е, че са необходими допълнителни процеси на рафиниране и хидрогениране, за да стане биодизела годен за използване.

Възможността за получаване на биодизел от негодни за консумация масла, например като добиваното от растителния вид *Jatropha curcas* масло, се разглежда от развиващите се страни като допълнителна възможност, за да се отговори на техните енергийни изисквания.

Биоетанолът е течно транспортно гориво. Повече от 50% от произведения в днешно време биоетанол, е от царевица и над 1/3 от захарна тръстика, чрез ферментационни процеси. Целта на учените е да се разработи икономически ефективен биотехнологичен процес, в резултат на който етанолът да стане по-практично и конкурентно гориво, което да замести вноса на суров петрол. САЩ и Бразилия произвеждат 90% от световната продукция на биоетанол, което представлява около 34 и 24,5 милиарда $м^3$, съответно, през 2009 г. (Crago et al., 2010).

В производството на етанол обикновено се използват дрожди. Въпреки това, чрез техниките на метаболитното инженерство са създадени бактериални щамове, продуценти на етанол като *Zymomonas mobilis* и *Escherichia coli* (Sang

Yup Lee, 2006). Процесът комбинира предварителната хидролиза на целулоза и ферментационните етапи в един биореактор за получаване на високи добиви.

Съставът на биомасата, използвана в производството на биогорива, варира в голяма степен. Биомаса с високо съдържание на нишесте и захари като царевица и захарна тръстика, са примери за лесно разградима биомаса, която при хидролиза дава предимно глюкоза и захароза. Лигноцелулозната биомаса е по-сложна структура и по този начин изисква допълнителна предварителна обработка под формата на топлина, силни киселини или основи, или ензими като целулази и хемицелулази (Kosaric et al., 2001). Превръщането на нишесте / лигноцелулозни материали в захари, като субстрат за последваща ферментация за производство на етанол, получава голямо внимание, както от страна на правителствата, по отношение на инвестициите, така и от индустрията. Тъй като има огромни количества отпадъчни материали като слама, царевични кочани или дори хартиени отпадъци на разположение, се провеждат изследвания за модифициране на микроорганизми, които могат да използват тези налични отпадъци като субстрат, или за конструиране на ензими, които да разграждат ефективно целулозата до лесно-усвоима глюкоза. Успехът в тези изследвания, значително ще подобри цялостната икономика на производство на етанол.

Метан и водород

Биомаса може да се ферментира за производство на метан или водород. И двата вида газ, могат частично да заместят природния газ. Сред различните технологии за производство на водород, анаеробната ферментация на органични отпадъци, се счита за екологично чист и енергоспестяващ биологичен процес (Holladay, et al., 2009). За да бъде процесът икономически целесъобразен, трябва да се разработят възобновяеми и евтини суровини, за да се осигури рентабилно енергийно производство. Получената от биомаса енергия, с използването на биотехнологиите, се очаква да обхване все по-голям дял от световната консумация на енергия (Surinder, 2013 г.).

2.3.4. Фини химикали и фармацевтични продукти

Антибиотиците, техни междинни продукти и витамините са сред най-важните фини химикали, които се произвеждат изключително чрез ферментация

с генетично модифицирани микроорганизми. Витамин B12, съединение с много сложна структура, може да бъде синтезирано само чрез ферментация, в сравнение с витамин B2 и витамин C, които могат да бъдат произведени, както по химичен, така и по биотехнологичен път, или по-често като комбинация от двата Antibiotics, their intermediates and vitamins are among the most important fine chemicals, which are produced exclusively by fermentation with genetically improved microorganisms. Vitamin B12, which is very complicated compound could be synthesized only by fermentation in comparison to vitamin B2 and vitamin C that can be produced by either a chemical route or either a biotechnological route or more often as a combination of both.

2.3.5. Хранителни добавки

Понастоящем почти всички 20 L-аминокиселини са синтезират чрез биотехнологичен процес - ферментация или ензимна технология. Аминокиселините се прилагат като хранителни добавки в храни за хората и фуражи за животните. Сред тях глутаминовата киселина, лизин и фенилаланин се произвеждат в голям мащаб. Глутаминовата киселини се използват под формата на мононатриев глутамат като подобрител на вкуса в много храни. L-фенилаланин участва в производството на L-аспартам, който се добавя като изкуствен подсладител и е 200 пъти по-сладък от захарта. В днешно време синтезата на двата мономера на аспартама - фенилаланин и аспарагинова киселина, се основава до голяма степен на индустриалната биотехнология. Двете аминокиселини са свързват ензимен процес с помощта на бактериален ензим термолизин.

Биооцветителите са друга важна група съединения, които все повече се произвеждат чрез биотехнологични процеси, особено когато тяхното предназначение е за приложение в хранителни, фармацевтични и козметични продукти. Като пример за биооцветители са каротеноидните съединения астаксантин и зеаксантин, които се използват главно в рибата и фуражите. Розовият пигмент астаксантин първоначално и произвеждан по синтетичен път, чрез комбинирано прилагане на химически и ензимни процеси. В момента, тенденцията е насочена към производството на астаксантин чрез

ферментация с помощта на червени дрожди от вида *Xanthophyllomyces rhodochrous*. Оранжевите и червени пигменти, синтезирани от плесенните гъби от род *Monascus,* вида *Monascus purpureus,* се произвеждат индустриално само чрез ферментационен процес (Soetaert и Vandamme, 2006).

2.4. Микробна биокатализа

Биокатализата е широко използвана в индустрията и намира голям брой приложения. Процесът може да се дефинира като използване на природни ензим, с цел ускоряване на химичните реакции. Потребителите използват продукти, които са получени с помощта на биокатализатори, например хранителни съставки, или продукти, които съдържат биокатализатори, като праховете за пране. Грижата за опазване на околната среда е определяща, в използването на биотехнологиите в индустрията, не само за премахване на замърсители, но и да се предотврати бъдещо замърсяване. В този контекст процесите, с участие на биокатализатори, намират голямо приложение. В следствие на биокатализата, се произвеждат по-малко токсични отпадъци, по-малко вредни емисии и продукти, в сравнение с конвенционалните химични процеси. Те могат да действат като нетоксични катализатори във водна среда, проявяват висока субстратна специфичност и енантиоселективност и в същото време се получават продукти с висока степен на чистота. Реакциите с тяхно участие протичат при умерени условия, при нормални стойности на температура, налягане и pH, което води до намаляване на консумацията на енергия. В биокатализата се предотвратява голямата консумация на метали и органични разтворители. Въпреки че, биокаталитичните процеси са често по-екологични от химическите, за индустрията, това не е единствената причина, поради която, те заместват съществуващите химични процеси. Понякога не съществуват химични алтернативи на биотехнологичен процес.

Нови биокатализатори с подобрена селективност и активност на действие за използване в различни производствени процеси и процеси за разграждане на отпадъци стават достъпни. С оглед на тяхната селективност, те спомагат за намаляване необходимостта от пречистване на продукта от странични продукти, като по този начин се редуцира енергийното потребление и въздействието върху

околната среда. За разлика от небиологичните катализатори, биокатализаторите могат да бъдат самореплициращи се (Gavrilescu et al., 2005). Важна характеристика на биокатализаторите е тяхната стабилност, тъй като те трябва да се използват повторно, в няколко повтарящи се биокаталитични цикли. Имобилизацията на ензима често може да увеличи неговата стабилност и да позволи лесното му възстановяване за повторна употреба (Littlechild, 2015). Имобилизацията на даден ензим се дефинира като адсорбция на ензимната молекула към твърд материал-носител, при което субстратът дифундира до активния център на ензима и се превръща в продукт. Това е много стара практика и първият имобилизиран ензим е аминоацилаза, изолирана от *Aspergillus oryzae* за производство на L-аминокиселини в Япония. Има няколко предимства, които могат да бъдат посочени за процесите с имобилизирани ензими. Най-важните са: повишена функционална ефективност, повторно използванена ензима, след като продуктът е отстранен, високо съотношение субстрат ензим, минималнореакционно време, по-добър контрол на процеса, намаляване на разходите и инвестициите за процеса. Като сериозни недостатъци на имобилизираните ензими могат да се посочат: загуба на стабилност за някои ензими след имобилизиране, високата цена за изолиране, пречистване и възстановяване на активния ензим, ограничен индустриално приложение. Ензимите често са най-скъпите компоненти в промишлените биотрансформации и тяхната цена трябва да съответства на стойността на крайния продукт. По-висока стойност на оптично чисти съединения, които са важни както наркотици междинни продукти за фармацевтичната промишленост ще позволят по-висока ензимна цена. Други ензими, които са необходими за производството на насипни химикали, които се използват като добавки за битови почистващи продукти, използвани в производството на храни, или да бъдат използвани за допълване на разграждане на биомаса процеси, обикновено трябва да бъдат предлагани на пазара на по-ниска цена и се доставят в по-големи количества.

Полезна информация за налични в търговската мрежа ензими може да се търси по електронен път в най-различни начини чрез ензимен Explorer (http://www.sigma-aldrich.com/enzyme Explorer /.

Литература:

1. Atsumi, S., Wu, T.Y., Eckl, E.M., Hawkins, S.D., et al. (2010). Engineering the isobutanol biosynthetic pathway in *Escherichia coli* by comparison of three aldehyde reductase/alcohol dehydrogenase genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 85, pp. 651–657.
2. Balat, M., Balat, H. & Öz, C. (2008). Progress in bioethanol processing. *Prog Energ*
   Combust, 34, 551- 573.
3. Carmichael, H. (2006). Compost-ready packaging. C&I.20, pp. 20–22.
4. Chee J. Y., Yoga, S.S., Lau, N-S., Ling, S-C., Abed, R. M.M., Sudesh, K. (2010). Bacterially produced polyhydroxyalkanoate (PHA). Converting renewable resources into bioplastic. Chapter in book *Current research, technology, and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*.
5. Crago, C. L., Khanna, M., Barton, J., Giuliani, E. & Amaral, W. (2010). Competitiveness of Brazilian sugarcane ethanol compered to US corn ethanol. *Energ Policy*, 38, pp. 7404-7415.
6. Drapcho, C. M., Nhuan, N. P. & Walker, T. H. (2008). Biofuels Engineering Process Technology. The McGraw - Hill companies Inc, United States of America.
7. Erickson, B., Nelson, J. E., Winters P. (2012). Perspective on opportunities in industrial biotechnology in renewable chemicals. *Biotechnol J*., 7(2), pp.176–185.
8. Fernando S., Adhikari, S., Chandrapal, C., Murali, N. (2006). Biorefineries: Current Status, Challenges, and Future Direction. *Energ Fuel*, 20, pp. 1727-1737.
9. Frazzeto, J. (2003). White biotechnology, *EMBO Rep*, 4(9), pp. 835–837.
10. Gavrilescu, M., Chisti, Y. (2005). Biotechnology – a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol Adv,* 23, pp. 471-499.
11. Gupta, M., Raghava, S. (2007). Relevance of chemistry to white biotechnology. *Chem Cent J*. 2007; 1: 17.

12. Holladay, J.D., Hu, J., King, D.L., Wang, Y. (2009). An overview of hydrogen production technologies. *Catal Today*. 2009; 139:244–260.
13. Kosaric, N., Pieper, H. J., Senn, T. & Vardar- Sukan, F. (2001). The Biotechnology of Ethanol: Classical and Future Applications. Weinheim: *WILEY-VCH Verlag GmbH.*
14. Kumar, L., Awasthi, G., Singh, B. (2011). **Extremophiles: A Novel Source of Industrially Important Enzymes. *Biotechnol,* vol 10 (2), pp. 121-135.**
15. Lee, S., Jang, S. (2006). White biotechnology. APBN • Vol. 10 • No. 10
16. Littlechild, J. (2015). Archaeal Enzymes and Applications in Industrial Biocatalysts. *Archaea,* vol 2015 Article ID 147671, 10 pages.
17. Lorenz, P., Eck, J. (2005). Metagenomics and industrial applications. *Nat Rev Microbiol,* 3, 510-516
18. Mikkola, J. Evangelos Sklavounos, E., Alistair W. T., King and Pasi Virtanen (2015). The Biorefinery and Green Chemistry, chapter in *Ionic Liquids in the Biorefinery Concept: Challenges and Perspectives*, pp. 1-37
19. Panwar. N.L., Kaushik, S.C. & Kothari S. (2010). Role of renewable energy sources in environmental protection: A review. *Renew Sust Energ Rev*, 15, pp. 1513-1524.
20. Shuang Li, Yang, X., Yang, S., Zhu, M., Wang, X. (2012**).** Technology prospecting on enzymes: Application, Marketing and Engineering*. Comput Struct Biotechnol J***.** 2: e201209017.
21. Soetaert, W., Vandamme, E. (2006). The impact of industrial biotechnology. *Biotechnology J*. 1(7-8), pp. 756-769.
22. Surinder, P. Chahal. (2013). Biotechnology and its role in sustainable design.
23. Wong, C., Huang, C., Chen, W., Chang, J. (2011). Converting crude glycerol to 1, 3-propandiol using resting and immobilized *Klebsiella* sp. HE-2 cells. *Biochem Engin J*, Vol 58–59, Pages 177–183.
24. WWF (2009) - Industrial biotechnology – more than green fuel in a dirty economy
25. Yim, H., Haselbeck, R., Niu, W., Pujol-Baxley, C., Burgard, A., Boldt, J., Khandurina, J., Trawick, J., Osterhout, R., Stephen, R., Estadilla, J., Teisan, S., Schreyer, H., Andrae, Yang, T., Lee, S., Burk, M., Van

Dien, S. (2011). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1,4-butanediol, *Nat Chem Biol,* 7(7), pp. 445–452.

http://www.easybiologyclass.com/enzyme-cell-immobilization-techniques/

http://pubs.rsc.org/en/content/chapterhtml/2015/bk9781849738163-00001?isbn=978-1-84973-816-3#sect234