

Postępy w rozwoju narzędzi biologii syntetycznej do bioprodukcji analogów produktów naturalnych

mgr inż. Piotr Michałowski^{1,3},

mgr Aleksandra Bigos²,

dr Dorota Jakubczyk³✉

¹Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Politechnika Poznańska

²Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

³Pracownia Chemii Medycznej, Centrum Biologii Chemicznej, Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, Poznań

https://doi.org/10.18388/pb.2021_531

✉ autor korespondujący: djakubczyk@ibch.poznan.pl

Słowa kluczowe: metabolity wtórne, programowalna bioprodukcja analogów naturalnych, biotransformacja, mutasynteza, mutagenesa, karmienie substratowe

Wykaz stosowanych skrótów: NP – produkty naturalne (ang. *natural products*); DXP – fosforan deoksyksylulozy (ang. *deoxyxylulose phosphate*); MVA – kwas mewalonowy (ang. *mevalonic acid*); COX – cyklooksygenazy (ang. *cyclooxygenases*); NBS – N-bromoftalimid (ang. *N-bromophthalimide*); HMO – oligosacharydy mleka ludzkiego (ang. *human milk oligosaccharides*); DERA – aldoza 2-deoksy-D-5-fosforanowy (ang. *aldose 2-deoxy-D-5-phosphate*); ARTP – plama atmosferyczna i pokojowa (ang. *atmospheric and room stain*); NTG – nitro-N-nitrozoguanidyna (ang. *nitro-N-nitrosoguanidine*); EMS – metylosulfonian etylu (ang. *ethyl methylsulfonate*); TMP – trój podstawione estry trimetylopropanowe (ang. *trisubstituted trimethylpropane esters*)

STRESZCZENIE

Związki chemiczne pochodzenia naturalnego, tak zwane produkty naturalne oraz ich pochodne, stanowią podstawę leków oraz znajdują szerokie zastosowanie między innymi w branży rolniczej, weterynaryjnej, spożywczej czy też kosmetycznej. W artykule przedstawiono podział produktów naturalnych, ze szczególnym uwzględnieniem bioaktywnych metabolitów wtórnych oraz postępy w rozwoju narzędzi biologii syntetycznej do ich bioprodukcji.

WPROWADZENIE

Produkty naturalne (NP) to związki chemiczne wytwarzane na drodze biochemicznej syntezy przez organizmy żywe, np. rośliny i drobnoustroje. NP dzieli się na metabolity pierwotne i wtórne. Metabolity pierwotne to związki, które mają podstawowe znaczenie dla przeżycia organizmu, takie jak aminokwasy i węglowodany. Stanowią one również substraty do produkcji bardziej złożonych bio-cząsteczek, takich jak białka i kwasy nukleinowe. Metabolity wtórne organiczne są cząsteczkami organicznymi, które zazwyczaj pełnią funkcję zewnętrzną, tzn. wpływają głównie na inne organizmy poza ich producentem. Ukierunkowana produkcja i ekstrakcja dużych ilości metabolitów wtórnych do celów przemysłowych i/lub klinicznych stanowi wyzwanie technologiczne [1]. Metabolity wtórne nie są bezpośrednio zaangażowane we wzrost oraz rozwój danego organizmu i nie są konieczne do jego przetrwania w naturalnych warunkach, w przeciwieństwie do metabolitów pierwotnych. Metabolity wtórne pomagają ich producentowi konkurować w momencie interakcji i obrony międzygatunkowej. Ich pochodzenie biosyntetyczne klasyfikuje się według sposobu wytwarzania, przy uwzględnieniu enzymów, które często uczestniczą w metabolizmie produkcji metabolitów pierwotnych takich organizmów [2]. Stanowią podstawę farmaceutyków i środków obronnych przed patogenami, są składnikami przypraw o charakterze smakowo-zapachowym lub zapachowym, a także źródłem biopolimerów funkcjonalnych, biopestycydów i cząsteczek odżywczych [3]. Ponad połowę leków przeciwnowotworowych i blisko dwie trzecie klinicznie stosowanych antybiotyków zalicza się do NP. Wytwarzane przez organizmy metabolity cechują się selektywną zjadliwością, przez co posiadają podwyższone wskaźniki biobójczości. Dzięki temu wykorzystane są jako inhibitory lub terminatory drobnoustrojów chorobotwórczych [4].

Odkrywanie produktów naturalnych od połowy XX wieku opierało się na badaniach fenotypowych poprzez analizę wybranych materiałów biologicznych pochodzenia roślinnego i drobnoustrojowego. Zebrany materiał weryfikowano pod kątem aktywności biologicznej, oczyszczając i izolując czynne metabolity [5]. Fenotypowa identyfikacja i kierunek działania nie wykluczały uzyskiwania farmaceutyków nieskutecznych i kosztownych. Niedrogie metody sekwencjonowania i szeroki zakres danych genomowych umożliwiły aprioryczną identyfikację genów biosyntetycznych [6]. Pozwoliło to przewidywać i/lub symulować strukturę rusztowania biochemicznego, przy jednoczesnym określaniu prawdopodobnej funkcji genów. W efekcie możliwa była produkcja oraz rozwój chemicznej manipulacji biokatalizatorów w celu wytwarzania cząsteczek niespotykanych w naturze, a których bioaktywność wykazuje wysoki potencjał funkcjonalny, w szczególności przy strukturach naturalnie zmodyfikowanych [7].

Metabolity wtórne podzielono na kilka klas, w których poszukiwane są związki o działaniu antybakteryjnym, przeciwutleniającym i/lub przeciwnowotworowym. Najpopularniejszymi z nich są terpeny (terpenoidy), które składają się z pięciowęglowych jednostek izoprenowych, a osiągające nawet komponenty czterdziestowęglowe. Pochodzą głównie z roślinnych szlaków biosyntetycznych fosforanu deoksyksylulozy (DXP), zachodzących w plastydach

Tabela 1. Główne typy alkaloidów i ich zastosowanie farmaceutyczne [1]

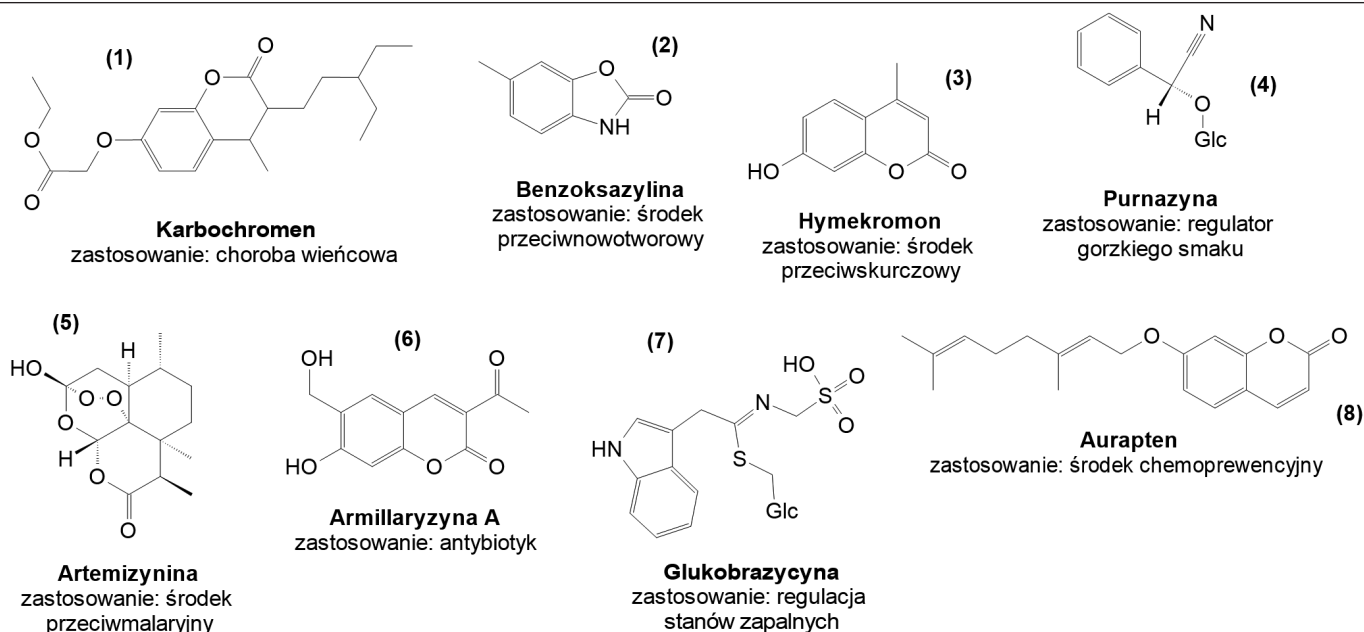
Typ alkaloidu	Źródło roślinne	Przykład związku	Zastosowanie
Izochinoliny	Mak lekarski (<i>Papaver somniferum</i>)	Kodeina, morfina	Działanie przeciwbólowe, leczenie kaszlu
Piperydyny	Kora granatu	Koniina	Unieruchomienie neuronów ruchowych
Tropiny	Pokrzyw wilcza jagoda (<i>Atropa belladonna</i>)	Kokaina, atropina	Antidotum na trucizny
Pirolidyny	Krasnodrzew pospolity (<i>Erythroxylum coca</i>)	Higiiena	Środek stymulujący, depresant
Chinoliny	Drzewo chinowe	Chinina	Leczenie malarii

oraz cytozolowego kwasu mewalonowego (MVA). Laktony seskwiterpenowe, zawierające pentacykliczną grupę laktonową, farmakologicznie wykazują działanie przeciwzapalne poprzez hamowanie czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, który pośredniczy głównie w powstawaniu stanów zapalnych oraz w odpowiedziach immunologicznych. Laktony terpenowe przyczyniają się do swoistej cytotoksyczności i alergogeniczności [1,8]. Artemizynina (5, Ryc. 1), zawierająca stabilny mostek nadtlenkowy, wykazuje działanie przeciwmalaryczne, zakłócając działanie ATPazy wapniowej, ale również redukuje alkilowanie makrocząsteczek biologicznych i wytwarzanie reaktywnych form tlenu. Przeciwrakowym diterpenem jest paklitaksel, którego inhibujące działania wykazano w odniesieniu do nowotworów piersi, jajników i płuc. Ma on zdolność wiązania się z mikrotubulami, stabilizując je przed depolimeryzacją i dzięki temu hamuje proliferację komórkową [1,9].

Grupą NP o pożądanych właściwościach bioaktywnych są nierybosomalne peptydy, do których należą w szczególności deotamidy. Są one nowoodkrytymi związkami przeciwbakteryjnymi, wytwarzanymi przez organizmy morskie. Ich przykładem jest ascidian, którego pochodne w postaci aminoalkoholi, meroterpenów i polisaccharków stanowią bazę 100 wtórnych metabolitów o zróżnicowanej budowie i nie w pełni odkrytej funkcjonalności. Pochodne

ascidianów znaleziono także w bakteriach morskich, podając je analizie przesiewowej i ustalając ich różnorodną aktywność antykancerogenną [10].

Inną grupą produktów naturalnych są związki fenolowe, których przedstawiciele, oprócz właściwości antyutleniających, wykazują także wpływ redukujący na starzenie komórkowe lub ich cykl namnażania. Kumaryny, flawonoidy i cynamoniany, dzięki centrom fenolowym, hamują wydzielanie cyklooksygenazy (COX), działając przeciwzapalnie z selektywnością > 56% oraz przeciwbólowo (ze skutecznością > 90%) w kontakcie z cytokinami zapalnymi TNF, których stężenie nie przekracza 4 mg/kg w systemie *in vivo* [11]. Polifenole (np. kurkumina, resweratrol), polisacharydy (np. lentinan), saponiny i kapsaicyna mają potencjalne działanie immunomodulujące. W systemach roślinnych szlaki syntetyczne flawonoidów wiążą się z azotowymi pochodnymi – alkaloidami (Tab. 1). Działanie przeciwskurczowe, przeciwcisnieniowe, regulujące zaburzenia psychiczne i neurologiczne, to tylko niektóre z zastosowań tych aromatycznych aminokwasowych pochodnych, które w szlakach bocznych łączą się z monoterpenami. Zaliczane są do nich atropina (antidotum na szerokie spektrum trucizn), nikotyna (stymulacja oddechowca), morfina (działanie przeciwbólowe), anabazyna (antybakteryjność) i strychnina (leczenie nadciśnieniowe) [12]. Do grupy heterocyklicznych



Rycina 1. Struktura i zastosowanie wybranych metabolitów wtórnych [8-13].

azotopochodnych należą także glukozynolany (7, Ryc. 1) i benzoksazyony (2, Ryc. 1) o działaniu owadobójczym, stanowiące odmianę naturalnych herbicydów o budowie zasad Schiffa; a także glikozydy cyjanogenne, które odgrywają rolę w obronie roślin oraz mogą być stosowane jako związek fagostymulujący [13]. Przedstawiona charakterystyka przykładów związków należących do roślinnych metabolitów wtórnych, obrazuje jak różne potrafią być ich właściwości.

Szeroka funkcjonalność NP jest konsekwencją złożoności strukturalnej, biorąc pod uwagę aspekty regio- i chemoselektywności w kontekście ilości, rodzaju grup funkcyjnych oraz ich usytuowania przestrzennego. Problem selektywnej syntezy widoczny jest na przykładzie pochodnych kumaryny, które w zależności od rodzaju oraz rozmieszczenia podstawników, mogą wpływać na wzrost efektu przeciwzaprzepowego, przeciwgruźliczego, przeciwdrgawkowego, przeciwhiperlikemicznego i przeciwnowotworowego [14]. Jednakże ich wydajna synteza oraz separacja wymagają najczęściej dużego zautomatyzowania i doboru parametrów, co niesie ze sobą koszty, a lekooporność organizmu na produkowany związek nadal nie jest wykluczona. Katalizowanie rodem, kompleksami palladowymi, N-bromoftalimidem (NBS) i peptydami związanymi z imidazolami pozwala uzyskiwać regioselektywne pochodne produktów naturalnych. Wyzwaniem są mieszaniny racemiczne wymagające oczyszczenia lub precyzyjnej ekstrakcji substancji o potencjale bioaktywnym [15]. W konsekwencji prowadzone działania syntetyczne stają się czasowo- i kosztochłonne.

W obecnym trendzie syntetycznym odchodzi się od podejścia jedna cząsteczka – jeden cel – jedna choroba. Dlatego też projektowanie sprzężonych, wielofunkcyjnych hybryd molekularnych o zdefiniowanych podjednostkach farmakoforowych, przy częstym zastosowaniu chemii *click*, stanowi nowy wymiar prac nad farmaceutykami. Jednocześnie zmniejsza ono ryzyko interakcji lekowych i minimalizuje odporność na leki, co pozwala uzyskiwać wieloczynnikowe inhibitory całych szlaków metabolicznych. Przekłada się to na skuteczność terapii, jej selektywność i precyzję. Tak pozyskiwane substancje bazują na naturalnych pochodnych metabolitów wtórnych, których klasyczną ścieżką syntezy, ze względu na różnorodność strukturalną i ich wzajemne korelacje, trudno byłoby uzyskać. Wsparcie tej ścieżki stanowią techniki biologiczne, semibiologiczne i/lub genetyczne, które wykorzystują potencjał katalizujący mikroorganizmów, enzymów i pojedynczych, naturalnych komponentów. Dzięki temu w szybszy i skuteczniejszy sposób są w stanie prowadzić procesy cykloaddycji, elektrocyklizacji, przegrupowania sigmatropowego i reakcji Dielsa-Aldera, które stanowią cztery główne reakcje chemiczne biologii syntetycznej, będące problematyczne w kontekście regio- i/lub chemoselektywności przy klasycznych metodach sprzęgania związków NP i ich pochodnych [16]. Do technik manipulacyjno syntetycznych biologii syntetycznej chemii biologicznej zalicza się biokatalizę, biotransformację, syntezę chemoenzymatyczną, mutagenezę, mutasyntezę i techniki inżynierii genetycznej, a także syntezę wymuszoną przez karmienie substratowe. Wykorzystują one szereg nowoczesnych rozwiązań w zakresie analizy, strategii eksploatacyjnej oraz przesiewowej, a także inżynierii genomu i hodow-

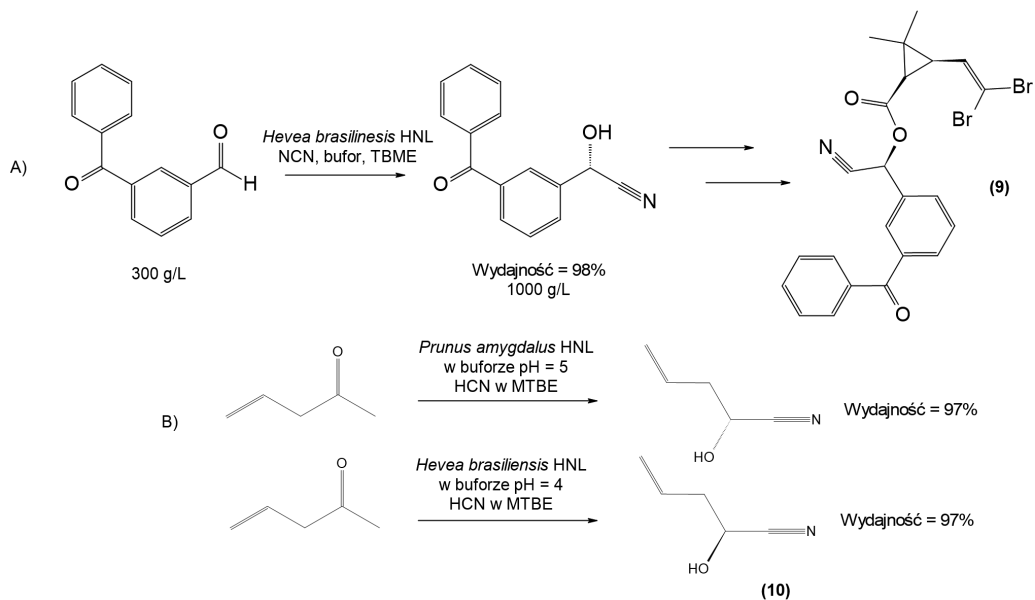
li linii komórkowych oraz drobnoustrojów. Dzięki temu techniki biologiczne pozwalają uzyskać zidentyfikowaną, bioaktywną, hitową nanocząsteczkę zgodną z założeniami projektowymi, nie redukując jednocześnie jej złożoności strukturalnej i naturalnego pochodzenia, co niesie za sobą zwiększoną biogodność środowiskową [17].

PRZEGLĄD NARZĘDZI BIOLOGII SYNTETYCZNEJ

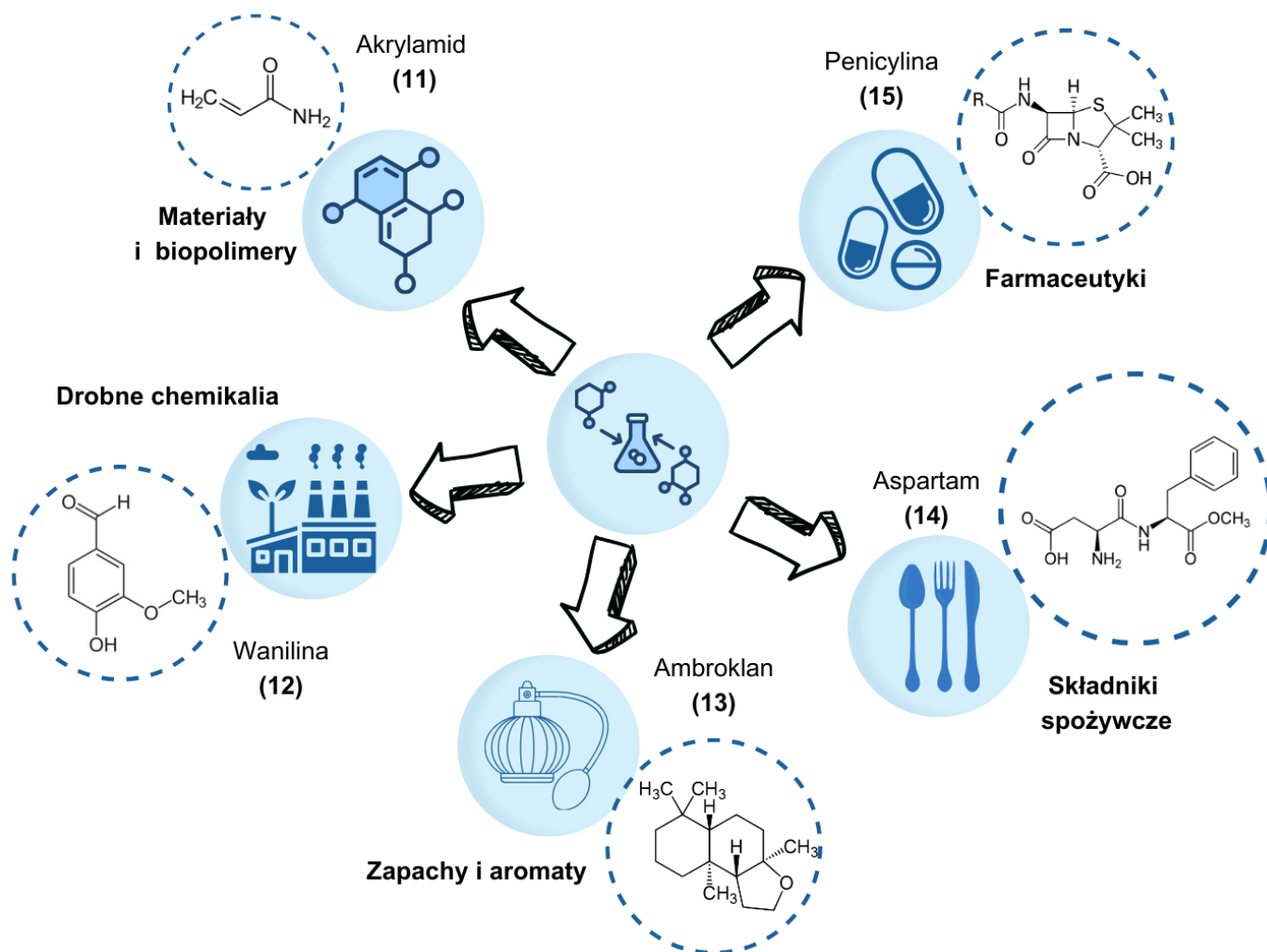
BIOTRANSFORMACJA I SYNTEZA CHEMOENZYMATYCZNA

W ciągu ostatnich stu lat badania w zakresie biokatalizy rozwijały się w trzech odrębnych falach, rozpoczynając od wykorzystania surowego ekstraktu do oczyszczonych enzymów, a następnie do rekombinowanych układów enzymatycznych. Badania przesiewowe biokatalizatorów ewoluowały od ekstrakcji ze źródeł naturalnych do eksploatacji metodami bioinformatycznymi wybranych genów. W konsekwencji rozwój biologii strukturalnej wsparł biotransformację przez strukturalną analizę sekwencyjną, przez co inżynieria biokatalizatorów ukierunkowała się na dostosowanie warunków reakcji do właściwości enzymatycznych [18]. Umożliwiło to prowadzenie pierwszych enancjoselektywnych reakcji (R)-mindelonitrylu, masowej produkcji penicyliny, a także produkcji fruktozy. Wszystkie te procesy polegały na identyfikacji odpowiednich, naturalnie występujących enzymów bez ich sztucznej modyfikacji, generując zespół produktów o szerokim zastosowaniu biochemicznym, farmaceutycznym i spożywczym [19].

Biokataliza rozwiązała także problem tworzenia wiązania C–C, które jest niezbędne do budowy węglowego szkieletu strukturalnego. Najczęściej enzymatyczna formacja wiązania C–C opiera się na ataku nukleofilowym na wybrany aldehyd lub keton, chociaż wtedy reakcje często mają niższą wydajność, ponieważ równowagi reakcji są mniej korzystne. Zasadniczo sześć nukleofilów/donorów jest obecnie stosowanych w biokatalizie, dając pochodne karbonylowe sprzęgane z cyjankami, alkoholami i kwasami [20]. Przykładem jest zespół enzymów HNL, ekstrahowanych z komórek kauczukowca brazylijskiego (*Hevea brasiliensis*), który umożliwia tworzenie oraz rozkład cyjanohydrin (Ryc. 2) [21]. Enzymy te wykorzystują różne mechanizmy biochemiczne - od katalizowanej metalem Lewisa, po klasyczną katalizę kwasowo-zasadową. Niezależnie od mechanizmu, enzymy zazwyczaj wykorzystuje się w układach dwufazowych przy niskim pH, aby stłumić niepożądaną reakcję tła i zapewnić wysokie nasycenie substratem. Oprócz cyjanku, jako nukleofil (donor), można również zastosować nitrometan. Ta nienaturalna reakcja jest możliwa, ponieważ oba nukleofile mają podobne wartości pK_a , a zatem oba pasują do miejsca aktywnego enzymu. Synteza jest zatem biokatalityczną reakcją Henry'ego [22]. Innym przykładem alkilowania i/lub tworzenia wiązania C–C lub C–H było opracowanie cytochromu P450 z 11 podstawieniami aminokwasów, w celu wysoce wydajnego przenoszenia karbenów do indoli, piroli i cyklicznych alkenów. Stosowane modyfikowane hemoproteiny stanowią alternatywę dla tradycyjnych katalizatorów metali przejściowych, prowadząc do farmakologicznej funkcjonalizacji heterocykli z wysoką kontrolą geometrii cząsteczki [23]. Katalizatory wywodzą-



Rycina 2. Przykłady biokatalitycznej syntezy wiązania C-C [20,21]. Przemysłowe zastosowanie enzymów HNL (liazy hydroksynitrylowe) w układach dwufazowych; (B) Enzymatyczna synteza (R) oraz (S)-cyjanohydryn w rozpuszczalnikach organicznych lub układach dwufazowych. TBME, MTBE - eter tert-butyloowo-metylowy, HCN - cyjanowodor.

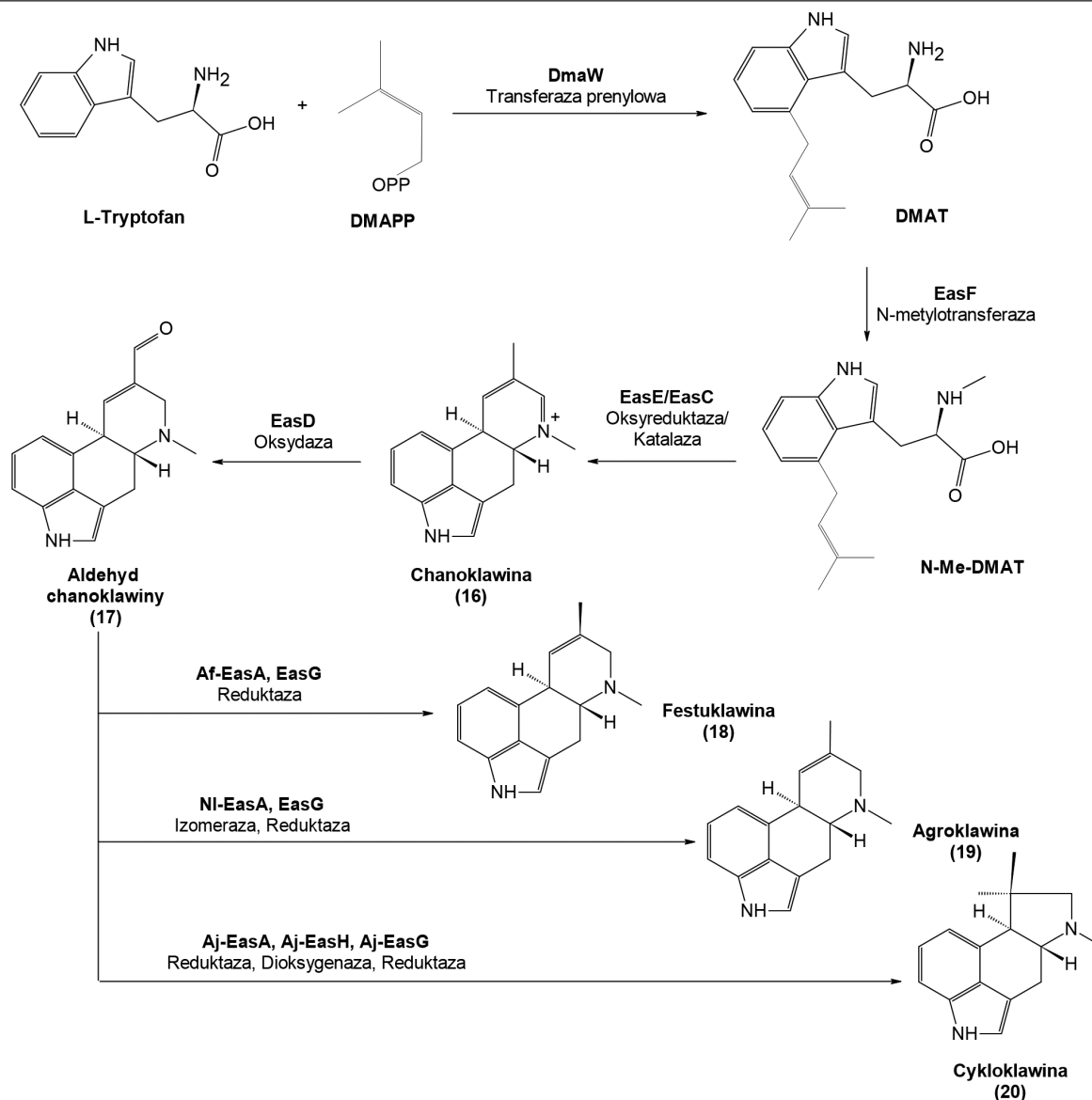


Rycina 3. Spektrum wykorzystania biokatalizy/biotransformacji [22-24]

ce się z enzymu cytochromu P450, w którym serynę (cytochrom P411) zastąpiono natywnym ligandem osiowym cysteiny (cytochrom P411), są w pełni kodowane genetycznie i produkowane w bakteriach, gdzie można je modyfikować pod kątem aktywności i selektywności poprzez ukierunkowaną ewolucję. Pozwala to generować nowe wiązania benzytowe, allilowe lub α -aminowe z dużą rotacją i selektywnością. Umożliwiło to w produkcji wcześniej stosowanych kosztownych i nieekologicznych układów iryd – porfiryna (Ryc. 3) [24].

Bazując na zrozumieniu enzymatycznych mechanizmów katalitycznych, podstawowe reakcje enzymatyczne oraz wybrane enzymy połączono w sieci biokatalityczne, tworząc wieloetapowe kaskady enzymatyczne. Kaskady te umożliwiają biosyntezę związków chemicznych o złożonej strukturze, zachowując nieodłączną chemoselektywność, regioselektywność i stereoselektywność oraz działając w powszechnym środowisku wodnym [25]. Podobnie jak w przypadku naturalnych szlaków biosyntezy, można projektować i rozwijać w pełni *de novo* nienaturalne kaskady

biokatalityczne do syntezy złożonych celów strukturalnie NP. Należy podkreślić, że kaskady biokatalityczne stają się coraz powszechniejsze ze względu na postęp w projektowaniu i budowie stosowanych do nich biokatalizatorów. Umożliwia to prowadzenie reakcji w niefizjologicznych warunkach, takich jak wysoka aktywność na podłożu nienaturalnym, wysoka temperatura, wysokie stężenie substratów oraz tolerancja na rozpuszczalniki organiczne i szeroki zakres pH [26]. Dzięki temu procesy stymulowane są bioorganicznymi katalizatorami, nie eliminując tym samym technik klasycznych. W skali przemysłowej kaskady enzymatyczne zostały użyte w produkcji oligosacharydów mleka ludzkiego (HMO), które mogą stanowić kluczowy składnik odżywczy. Zastosowany zespół multienzymów MSOPME umożliwił uzyskanie dwudziestu znakowanych HMO (83 - 155 mg) w jednym naczyniu z ponad 85% sprawność procesową [27]. Jednocześnie opracowanie ścieżki syntezy nukleozydu didanozyny udowodniło możliwość zastosowania bioretrosyntezy w układach enzymatycznych dla pochodnych metabolitów wtórnych. Od 2014 roku obserwuje się liczne



Rycina 4. Szlak biosyntezy alkaloidów sporyszu wychodzący od L-tryptofanu i pirofosforanu dimetyloallilu (DMAPP) [32].

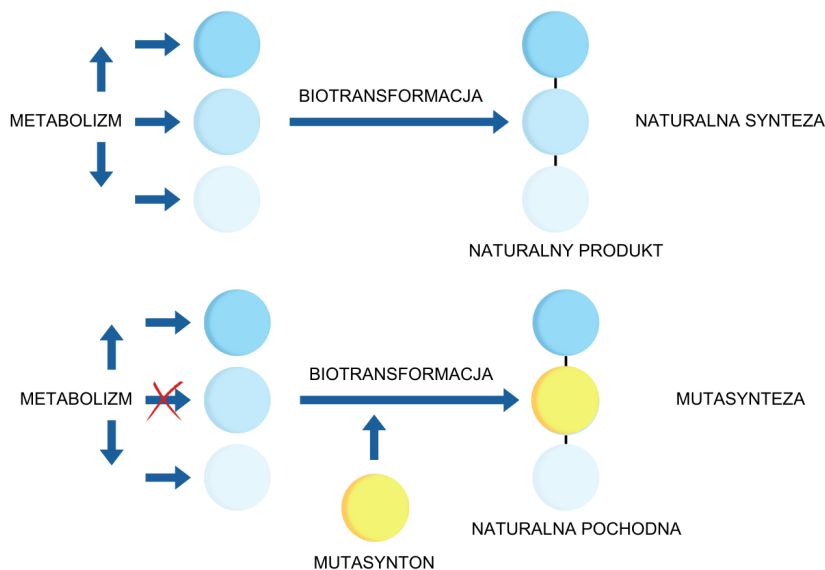
przekształcenia prostych prekursorów poprzez zerwanie wiązań i transformację syntetyczną, dzięki doborom naturalnych katalizatorów, co obrazuje synteza islatrawiru - inhibitora HIV. W jego otrzymaniu zastosowano koimmobilizowany układ kinazy patotenianowej oraz kinazy octanowej wspartej acetylofosforanem ATP do wprowadzenia grupy fosforanowej, a następnie wprowadzono aldolazę 2-deoksy-D-rybozo-5-fosforawanową (DERA), otrzymując nukleozydowy inhibitor translokacji odwróconej transkrypcji (NRTTI) [28].

Wiele naturalnych szlaków syntezy bioaktywnych związków nie zostało w pełni rozpoznanych. W połączeniu z wyzwaniem związanym z heterologiczną ekspresją enzymów, nie jest łatwo osiągnąć w każdym przypadku wydajną enzymatyczną syntezę całkowitą produktów naturalnych *in vitro* lub w modelowych komórkach-gospodarzach [29]. Wsparcie działań z tego zakresu polega na ich informatyzacji, tworzeniu sieci i intelektualizacji przy zastosowaniu sztucznej inteligencji oraz uczenia maszynowego. Umożliwia to eksplorację dużych zbiorów danych, analizę procesów relacyjnych oraz projektowanie białek *in silico*. Daje to skuteczne narzędzia do odkrywania nowych enzymów, reakcji biokatalitycznych i szlaków syntezy enzymatycznej na podstawie masowej analizy danych genowych, białkowych i chemicznych [30]. Co więcej, szybki rozwój komputerów kwantowych, automatyzacji i technologii przesiewania o ultrawysokiej przepustowości (UHTP) przyniósł nieograniczone możliwości badań biokatalizy, zwiększając wydajność ludzką o setki razy większą. Szlaki enzymatyczne projektowane przez sztuczną inteligencję uprościły otrzymywanie złożonych związków naturalnych i zostały przystosowane do modelowania komórek gospodarza. Historyczne granice między klasyczną biokatalizą (wykorzystanie izolowanych i zwykle unieruchomionych enzymów) a biotransformacją/analizą genetyczną (inżynieria mikroorganizmów pełnokomórkowych) zanikają przez powszechną integrację w celu stworzenia ścieżek „projektantów” zorientowanych na cel [31]. Przykładem takiej kompilacji jest ośmioenzymatyczny szlak biosyntezy cykloklawiny (20, Ryc. 4), która wytwarzana była przy udziale kontroli genomu grzyba nitkowatego

sporyszu - *Aspergillus japonicus*. Pochodne L-Tryptofanu stanowią klasę alkaloidów indolowych o szeregu działań farmaceutycznych i agrochemicznych. Ta synteza chemoenzymatyczna kontrolowana przez wektory ekspresyjnych genów (*easA*, *easG*, *easH*) pozwoliła opracować programowalną biotransformację do chanoklawiny (16, Ryc. 4), której wzrost produkcji ułatwia intensyfikację katalizy w kierunku agroklawiny (19, Ryc. 4), festuklawiny (18, Ryc. 4) czy cykloklawiny (20, Ryc. 4), prowadzonej przy fermentacji drożdży [32].

MUTASYNTEZA

Syntezywanie nowych analogów NP jest możliwe poprzez wykorzystanie metody mutasyntezy, która wykorzystuje zmutowane organizmy do osiągnięcia zamierzonych celów. Mają one blokadę na funkcjonowanie określonego szlaku biosyntetycznego, przez co standardowy produkt końcowy nie powstaje. Stwarza to możliwości zwiększenia udziału innych szlaków biochemicznych i/lub tworzenia nowych produktów, stosując także nienaturalne karmienie substratowe. Eliminacja naturalnie funkcjonującego szlaku jest konieczna, aby uniknąć wzajemnego współzawodniczenia szlaków i prekursorów. Zwykle stosowane są zmutowane szczepy mikroorganizmów, które pozwalają naturalnie wytwarzać antybiotyki i/lub mniej złożone mieszaniny metabolitów wtórnych. W syntezie wykorzystuje się wcześnie pólprodukty analogów w szlakach, pozostawiając organizmowi produkcyjnemu wykonanie pozostałych, trudniejszych transformacji. W typowym eksperymencie syntetyczne związki wprowadza się do pożywki wzrostowej mikroorganizmu – zwykle bakterii lub grzyba. Rezultatem pracy elementów składowych układu biosyntetycznego jest produkt o zmodyfikowanej strukturze. Konkurencja endogennych prekursorów zwykle obniża wydajność powstawania nowych cząsteczek, dlatego prekursory często łączą się z mutagenazą, aby zablokować pierwotną ścieżkę na kluczowym etapie. Dzięki temu oczyszczenie układu staje się prostsze a jego wydajność wyższa, natomiast włączenie selektywnych prekursorów generuje większe zróżnicowanie analogów (Ryc. 5) [33].



Rycina 5. Schemat ideowy mutasyntezy [33].

Jednym z najczęstszych przykładów mutasyntezy jest produkcja nowych analogów antybiotyku aminoglikozydowo – aminocyklitolowego, zwanego inaczej neomycyną. Przedmiotem wstępnych badań był szczep *Streptomyces fradiae* zdolny do naturalnej produkcji enzymatycznej neomycyny, uzupełniając pożywkę deoksystreptaminą prekursorom aminocyklitolu. Pozwoliło to wytworzyć nowe analogi neomycyny, tj. hybrymycyny A1, hybrymycyny B2. Ponadto bazując na opracowanym, funkcjonalnym szlaku biochemicznym, pomyślnie otrzymano wiele różnych klas produktów naturalnych, w tym 14- i 16-członowe antybiotyki makrolidowe, takie jak erytromycyny i platenolidy, antybiotyk aminokumarynowy, nowomycynę i antybiotyki laktamowe [34]. Inną pochodną antybiotyku (geldanamycyna) z grupy mycyn otrzymano przez manipulację mutasyntetyczną szczepu *S. hygrosopicus*, karmiąc go pochodnymi kwasu 3-aminobenzoesowego. Zaproponowane kwasy zostały dobrze zasymilowane, co umożliwiło efektywne zwiększenie skali procesu. Niemniej jednym z ograniczeń było powinowactwo nienaturalnych substratów do acetylotransferazy modułu ładującego [35], co pokazuje złożoność i wzajemną przenikalność szlaków metabolicznych.

Mutasynteza umożliwiła produkcję antybiotyku makrolaktamowego – incedninę, zawierającego ugrupowanie kwasu aminomasłowego w swoim aglikonie poliketydowym. W konsekwencji uzyskano 28-metyloincedninę poprzez wprowadzenie kwasu 3-aminopentanowego do hodowli szczepu, w którym doszło do przerwania genu glutaminianu 2,3-aminomutazy, który odpowiadał za dostarczenie kwasu. 28-metyloincednina wykazała także działanie hamujące funkcję antyapoptyczną onkoproteiny, dowodząc przydatności mutasyntezy w produkcji poliketydów zawierających β -aminokwasy [36]. Podobnie cytochalazyna, która hamuje polimeryzację aktyny tworzącej mikrofilamenty cytoszkieletu oraz transport monosacharydów przez błonę komórkową i jej pochodne bez konieczności stosowania strategii ochronnych, zostały uzyskane z mutantu *Magnaporthe grisea*. Wytworzono analogi O-alkilowe, O-allilowe oraz 4'-azydowe, prowadząc regulowaną genetycznie cykloaddycję Huisgena. Pozwoliło to uzyskać cytotoksyczne i przeciwgrzybiczne cząsteczki, mimo iż analog aminowy w ścieżce syntetycznej bioaktywnie pozostawał nieczynny [37].

MUTAGENEZA I INŻYNIERIA GENETYCZNA

Do narzędzi biologii syntetycznej zalicza się metody manipulacji organizmami poprzez edycję materiału genetycznego w zakresie zmiany kolejności zasad azotowych, co w konsekwencji prowadzi do optymalizacji procesu ukierunkowanego na osiągnięcie zamierzonego celu. Zmiana wybranych par zasad stanowi wyzwanie koncepcyjne jak również techniczne, ze względu na stabilizacyjne wiązanie wodorowe i oddziaływania warstwowe helisy.

Mutageneza i inżynieria genetyczna, polegają na różnicowaniu DNA oraz generacji nowych zmutowanych organizmów – mutantów ze zmienioną informacją genetyczną. Genetyczna modyfikacja wiąże się ze zmianą pierwotnego DNA na nowo zsyntezowany lub zmutowany fragment *in*

situ. Mutageneza występuje spontanicznie w naturze lub zachodzi w kontrolowanych warunkach mutagennych, a następnie skonwertowana informacja genetyczna przekazywana jest potomkom [38]. Zastosowana mutacja jest trwała i dziedziczna, powodując zmiany w funkcji białek i fenotypowe, dzięki: mutagenezie losowej, kombinatorycznej, inercyjnej, homologicznej oraz manipulacji CRISPR. Jej celem jest zwiększenie wydajności wydzielniczej wybranego związku NP, otrzymując tym samym siłę napędową ewolucji w zakresie eliminacji szkodliwych cech fenotypowych i generacji sprawniejszych/odporniejszych organizmów. Każda modyfikacja powinna być analizowana pod względem prawdopodobieństwa występowania chorób genetycznych. Przykładowo, zmiana aminokwasu glutaminy na walinę prowadzi do patologicznej produkcji sierpowatych komórek, co obrazuje skalę prowadzonych przemian. Inżynieria genetyczna, w przeciwieństwie do mutagenezy, bazuje na identyfikacji pożądanej cechy, jej skopiowaniu i wstawieniu do struktury DNA innego organizmu. Ostatni etap stanowi wyhodowanie genetycznie modyfikowanego organizmu. Jedną z nowszych technik w tym zakresie jest edycja wybranego genomu, w którym fragment DNA jest wstawiany, usuwany, modyfikowany lub zastępowany w genomie żywego organizmu, skracając tym samym czas procesu i eliminując okres hodowania/rozwoju organizmu [39].

Takrolimus jest poliketydowym związkiem należącym do grupy antybiotyków makrolidowych, produkowanym przez różne gatunki bakterii *Streptomyces*. Jego industrializacja i optymalizacja procesowa została przeprowadzona ze względu na wysoki wpływ immunosupresyjny. Takrolimus w porównaniu do popularnej cyklosporyny, generuje od 10 do 100 razy skuteczniejszy efekt farmaceutyczny. Stosując mutagenezę w połączeniu z optymalizacją medium fermentacyjnego, wydajność pozyskiwania poliketydu została podniesiona. Manipulacja genetyczna prowadzona była mechanizmem egzogennym, który był stymulowany naświetlaniem bakterii *Streptomyces* promieniowaniem w zakresie ultrafioletu oraz plazmą atmosferyczną o temperaturze pokojowej (ARTP). Dzięki temu pozyskano odmianę wysoko sprawnego mutantu, u którego produkcja takrolimusu wzrosła z 501 do 670 mg/l [40]. Podjęto także próby manipulacji genomu w celu weryfikacji skuteczności mutagenezy endogennej w odniesieniu do takrolimusu. Zachowując wstępne warunki środowiskowe, a następnie modyfikując genom, uzyskano wzrost produkcji metabolitu o 46 mg/l w stosunku do linii komórkowych niemodyfikowanych żadną odmianą mutagenezy [41]. Inną możliwością podwójnej mutagenezy takrolimusu było wykorzystanie mutagenów chemicznych tj. nitro-N-nitrozoguanidyny (NTG) oraz metylosulfonianu etylu (EMS) z naświetleniami ultrafioletowymi, co przyniosło wzrost produkcyjny bakterii o 72 mg/l [42].

Losowa mutageneza została użyta do produkcji zeaksantyny, która działa przeciwutleniająco i jest rekomendowana w profilaktyce chorób układu krążenia oraz niektórych odmian nowotworów. Jest to karotenoidowy barwnik stosowany w przemyśle spożywczym, który początkowo izolowano z dwóch gatunków zielonych alg i cyanobakterii. Zastosowanie chemicznego mutagenu EMS na szczepie *Du-*

naliella tertiolecta wraz z naświetleniami umożliwiło wzrost uzyskiwanej zeaksantyny z 2,4 mg/g mikroalg do zakresu 6,6–7,0 mg/g [43]. Ten sam typ mutacji genetycznej skorelowano z namnażaniem biosurfaktantów produkowanych na powierzchni komórek drobnoustrojów lub wydalanych pozakomórkowo. W skali biotechnologii produkcyjnej ich stosowanie pomaga w mikrobiologicznym odzyskiwaniu olejów (MEOR) oraz bioremediacji, wiążąc tym samym naturalne analogi z środowiskową implementacją. Prowadząc namnażanie bakterii *Bacillus subtilis* w pożywce wzbogaconej kwasem azotowym, dwukrotnie zwiększono wydajność produkcji mieszaniny biosurfaktantów. Proces wspomagano promieniowaniem ultrafioletowym, który pozwolił wyizolować cztery odmiany mutantów różniących się ilością produkowanych związków i ich skutecznością w zakresie aktywności hemolitycznej oraz działania emulgującego (wskaźniki najwyższe dla mutantu typu M2) [44].

Mutagenezę zastosowano w procesie pozyskiwania taksolu (paklitakselu), który naturalnie występuje w niewielkich ilościach w cisie pacyficznym (*Taxus brevifolia*) i wykazuje wysoką aktywność przeciwnowotworową. Do poprawy selektywności programowalnej syntezy wykorzystano szczepy bakterii *Escherichia coli*, stosując utlenianie holistyczne katalizatora CYP725A4 w etapach poprzedzających i następujących po kontakcie enzymu z substratami. Pozwoliło to uzyskać większą ilość prekursora taksolu tj. taksadien-5 α -ol [45]. Jednocześnie stosowany biokatalizator został zmodyfikowany pod względem siedmiu aminokwasów (Ser69, Thr72, Ser91, Glu322, Glu327, Glu334 i Thr368), co przyczyniło się do aktywności wzrostowej, dając perspektywę tworzenia nowych homologów przy wcześniejszym wprowadzeniu pożywek wzbogaconych o wybrane substraty [46]. W konsekwencji uzyskano dwie odmienne metody mutagennej modyfikacji, które w obu przypadkach odciążyły klasycznie prowadzoną syntezę chemiczną taksolu, kierując ją w stronę proekologicznego i niskoskalowego systemu produkcyjnego.

KARMIENIE SUBSTRATOWE

Od 2010 roku badania skupiały się na opracowaniu alternatywnych procesów produkcyjnych, mających na celu zmniejszenie kosztów produkcji. Takie alternatywne procesy obejmują nie tylko wykorzystanie strategii inżynierii genetycznej/metabolicznej w celu optymalizacji fermentacji czystych kultur, ale także mieszanych kultur drobnoustro-

jów (MMC), wymagających niższych kosztów inwestycyjnych i operacyjnych ze względu na zastosowanie systemów otwartych, które nie wymagają sterylnych warunków w połączeniu z mieszaninami substratowymi [47]. Jednakże to skład iniekcyjnych mieszanin lub pożywki, które mogą składać się z nisko-, wysokocząsteczkowych związków, czy nawet enzymów stymulujących reakcję, odgrywa najważniejszą rolę w karmieniu substratowym pod względem składu, sposobu naniesienia i podania mikroorganizmom. Tego typu działaniem było zastosowanie zimmobilizowanej lipazy zaabsorbowanej na powierzchni hydrofobowych, modyfikowanych włókien jedwabiu. Enzym był umieszczony w mieszaninie kwasów tłuszczowych, które stanowiły surowiec do syntezy trójpodstawionych estrów trimetylopropanowych (TMP) służących jako alternatywne biodegradowalne smary. Kontrolując czas reakcji, temperaturę, ilość enzymów oraz rodzaj wprowadzanych substratów, uzyskano 97,3% konwersję kwasu kaprylowego, uzyskując 95,5% wydajność produkcyjną TMP [48].

Karmienie substratowe znalazło proekologiczne zastosowanie. Na przykład materiały na bazie grzybni wytwarza się poprzez hodowanie części wegetatywnej grzybów tworzących grzyby na różnych podłożach organicznych. Kompozyty na bazie grzybni, o dostosowanych właściwościach strukturalnych, fizycznych, chemicznych, mechanicznych i biologicznych, zależą od szczepu, podłoża zasilającego i procesu produkcyjnego. Ściana komórkowa grzybni zawiera głównie chitynę, glukany, białka i lipidy, których stężenia zależą od podłoża zasilającego, ostatecznie określa właściwości syntetyzowanych materiałów. Można by potraktować to jako klasyczne hodowanie mikroorganizmów, ale podłoża zasilające mają często modyfikowany skład prowadzący do wytwarzania docelowych produktów. Dla przykładu, dodanie azotanu (V) srebra do pożywki grzyba kwasolubnego *Verticillium* prowadzi do powstania organicznych nanocząstek srebrnych (Tab. 2), które osiągnęte są dzięki reduktazie azotanowej obecnej w ścianach komórkowych. Czyste kompozyty pochodzące z grzybni o skutecznych właściwościach antybakteryjnych, przeciwutleniających i wybielających skórę torują drogę do różnych zastosowań, takich jak medycyna, budownictwo, produkcja opakowań i kosmetyków [49,50].

Tabela 2. Rodzaje nanocząstekek otrzymany karmieniem substratowym [49,50].

Nazwa gatunku mikroorganizmu	Rodzaj metalu	Rozmiar organicznej nanocząsteczki [nm]	Tryb pozyskania
<i>Verticillium</i> sp.	Au	20	Wewnątrzkomórkowy
<i>Fusarium oxysporum</i>	Au	20–40	Zewnątrzkomórkowy
<i>Neurospora crassa</i>	Pt	–	Wewnątrzkomórkowy
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Ag	5–25	Zewnątrzkomórkowy
<i>Fusarium oxysporum</i>	Ti	6–13	Zewnątrzkomórkowy
<i>Colletotrichum</i> sp.	Au	20–40	Zewnątrzkomórkowy
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Cd	1–1,5	Wewnątrzkomórkowy

PODSUMOWANIE

Biologia syntetyczna analogów produktów naturalnych jest programowalną inżynierią biologii i biochemii, która uwzględnia złożoność, stochastyczność oraz nieprzewidywalność wraz ze wszelkimi trudnościami projektowymi. Stosowane, interdyscyplinarne narzędzia pozwalają przewidywalnie projektować, kompilować nowe inicjatory oraz prekursory, przy stosunkowo szybkiej możliwości prowadzenia testów na wybrany cel o selektywnej bioaktywności. Biorąc pod uwagę ciągły postęp w zakresie złożonych i zintegrowanych narzędzi, biologia syntetyczna precyzyjnie moduluje wybrane jednostki, szlaki biochemiczne i całe metabolizmy drobnoustrojów, stosując metody biokatalityczne, mutasyntetyczne i mutagenetyczne wsparte inżynierią genetyczną oraz karmieniem substratowym. Prezentowane dane obrazują różnorodność pozyskiwanych metabolitów, których przeznaczenie lokowane jest w działach farmaceutycznych, spożywczych oraz ochronie środowiska, szerząc tym samym proekologiczny charakter tych narzędzi. Ich skala, elastyczność modulacyjna oraz selektywność pozwalają rozwijać dynamiczne systemy regulacyjne, których hitowy efekt jest osiągany przy jednoczesnej redukcji czasu i/lub kosztowności. Z przytoczonych przykładów kreuje się obraz zestawu narzędzi biochemicznych i licznych zasad projektowych, które w przyszłości prawdopodobnie obejmą interoperacyjne narzędzia strukturalne na każdym etapie cyklu projektowego, co doprowadzi do ich unifikacji i wzrostu skuteczności stosowania.

PIŚMIENNICTWO

1. Bruce S, Onyegbule F (2021) Biosynthesis of Natural Products, Bioactive Compounds - Biosynthesis. Characterization and Applications. IntechOpen
2. Smanski MJ, Zhou H, Claesen J, Shen B, Fischbach MA, Voigt ChA (2016) Synthetic biology to access and expand nature's chemical diversity. *Nat Rev Microbiol* 14(3): 135-149
3. Gao S, Song W, Guo M (2020) The Integral Role of Bioproducts in the Growing Bioeconomy. *Industrial Biotechnology* 16(1): 13-25
4. Jakubczyk D, Dussart F (2020) Selected Fungal Natural Products with Antimicrobial Properties. *Molecules* 25(4): 911
5. Nair SK, Jez JM (2020) Natural product biosynthesis: What's next? An introduction to the JBC Reviews Thematic Series. *J Biol Chem* 295(2): 335-336
6. Newman DJ, Cragg GM (2016) Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod* 79: 629-661
7. Pedrosa MC, Lima L, Alosio-Esteban JJ, Roriz CL, Barros L, Ferreira I, Carrocho M (2023) History of Secondary Metabolites: From Ancient Myths to Modern Scientific Validation. *Nat Second Metab* 3-18
8. Prado-Audelo ML, Cortes H, Caballero-Floran IH, Gonzalez-Torres M, Escutia-Guadarrama L, Bernal-Chavez SA, Giraldo-Gomez DA, Magana JJ, Leyva-Gomez G (2021) Therapeutic Applications of Terpenes on Inflammatory Diseases. *Front Pharmacol* 12: 704197
9. Huang Y, Yang Y, Liu G, Xu M (2023) New clinical application prospects of artemisinin and its derivatives: a scoping review. *Infect Dis Poverty* 12(115): 1-12
10. Vuong T (2021) Natural Products and Their Derivatives with Antibacterial, Antioxidant and Anticancer Activities. *Antibiotics (Basel)* 10(1): 70
11. Kaur B, Singh P (2022) Inflammation: Biochemistry, cellular targets, anti-inflammatory agents and challenges with special emphasis on cyclooxygenase-2. *Bioorg Chem* 121: 105663
12. Onyegbule FA, Okoli OG, Bruce SO (2019) In vivo Evaluation of the Antimalarial Activity of the Aqueous Ethanol Extract of *Monodora*

myristica Seed in Albino Mice. *International Journal of Science and Research (IJSR)* 8(6): 1-9

13. Okoye VO, Bruce SO, Onyegbule FA (2020) Phytochemical screening and pharmacognostic properties of *Peuraria phaseoloides* leaves (roxb) benth. (fabaceae). *International Journal of Public Health, Pharmacy and Pharmacology* 5(2): 11-24
14. Singh H, Singh J, Bhagat K, Gulati HK, Sanduja M, Kumar N, Kinariwala N, Sharma S (2019) Rational approaches, design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for therapeutic coumarin hybrids. *Bioorg Med Chem* 27(16): 3477-3510
15. Ramalingam V (2023) NLRP3 inhibitors: Unleashing their therapeutic potential against inflammatory diseases. *Biochem Pharm* 218: 115915
16. Walsh ChT, Tang Y (2022) Natural Product Biosynthesis. *Royal Society of Chemistry* 1: 1-21
17. Atanasov A, Zotchev S, Dirsch VM, Supuran CT (2021) Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nat Rev Drug Discovery* 20: 200-216
18. Yi D, Bayer T, Badenhorst ChPS, Wu S, Doerr M, Hohne M, Bornscheuer UT (2021) Recent trends in biocatalysis. *Chem Soc Rev* 50: 8003-8049
19. Abdelraheem EMM, Busch H, Hanefeld U, Tonin F (2019) Biocatalysis explained: from pharmaceutical to bulk chemical production. *React Chem Eng* 4: 1878-1894
20. Roddan R, Ward JM, Keep NH, Hailes HC (2020) Chemoenzymatic approaches to plant natural product inspired compounds. *Curr Opin Chem Biol* 55: 69-76
21. Winkler M, Glieder A, Steiner K (2012) *Comprehensive Chirality*. Elsevier 7: 350-371
22. Rao DHS, Chatterjee A, Padhi SK (2021) Biocatalytic approaches for enantio and diastereoselective synthesis of chiral nitroalcohols. *Org Biomol Chem* 19: 322-337
23. Brandenburg OF, Chen K, Arnold FH (2019) Directed Evolution of a Cytochrome P450 Carbene Transferase for Selective Functionalization of Cyclic Compounds. *J Am Chem Soc* 141(22): 8989-8995
24. Zhang RK, Chen K, Huang X, Wohlschlagel L, Hans R, Arnold FH (2019) Enzymatic assembly of carbon-carbon bonds via iron-catalysed sp³ C-H functionalization. *Nature* 565: 67-72
25. Huffman MA (2019) Design of an in vitro biocatalytic cascade for the manufacture of islatravir. *Science* 366: 1255-1259
26. Finnigan W (2021) RetroBioCat as a computer-aided synthesis planning tool for biocatalytic reactions and cascades. *Nat Catal* 4: 98-104
27. Bai Y, Yang X, Yu H, Chen X (2022) Substrate and Process Engineering for Biocatalytic Synthesis and Facile Purification of Human Milk Oligosaccharides. *Chem Sus Chem* 15(9): 202102539
28. Patel NR, Nawrat ChC, McLaughlin M, Xu Y, Huffman MA, Yang H, Li H, Whittaker AM (2022) Synthesis of Islatravir Enabled by a Catalytic, Enantioselective Alkynylation of a Ketone. *Org Lett* 22(12): 4659-4664
29. Camacho DM, Collins KM, Powers RK, Costello JC, Collins JJ (2018) Next-Generation Machine Learning for Biological networks. *Cell* 173(7): 1581-1592
30. Qu G, Li A, Acevedo-Rocha CG, Sun Z, Reetz MT (2020) The Crucial Role of Methodology Development in Directed Evolution of Selective Enzymes. *Angew Chem* 59(32): 13204-13231
31. Yi D, Bayer T, Badenhorst ChPS, Wu S, Doerr M, Hohne M, Bornscheuer UT (2021) Recent trends in biocatalysis. *Chem Soc Rev* 50: 8003-8049
32. Jakubczyk D, Caputi L, Hatsch A, Nielsen CA, Diefenbacher M, Klein J, Molt A, Schroder H, Cheng JZ, Naesby M, O'Connor SE (2015) Discovery and Reconstruction of the Cycloclavine Biosynthetic Pathway - Enzymatic Formation of a Cyclopropyl Group. *Angewandte Zeitschriften* 127(17): 5206-5210
33. Sun H, Liu Z, Zhao H, Ang EL (2015) Recent advances in combinatorial biosynthesis for drug discovery. *Drug Des Dev Ther* 9: 823-833
34. Hennrich O, Weinmann L, Kulik A, Harms K, Klahn P, Youn JW, Surup F, Mast Y (2023) Biotransformation - coupled mutasynthesis for

- the generation of novel pristinamycin derivatives by engineering the phenylglycine residue. *RSC Chem Biol* 4: 1050-1063
35. Maier ME (2015) Design and synthesis of analogues of natural products. *Org and Biomol Chem* 13: 5302-5343
 36. Miyanaga A, Takaku R, Takaishi M, Tashiro E, Kudo F, Eguchi T (2020) Generation of incednine derivatives by mutasynthesis. *J Antibiot* 73: 794-797
 37. Wang Ch, Lambert Ch, Hauser M, Deuschmann A, Zeilinger C (2020) Diversely Functionalised Cytochalasins through Mutasynthesis and Semi-Synthesis. *Chem Europ J* 26(60): 13578-13583
 - 38]Zhang L, Vijg J (2018) Somatic Mutagenesis in Mammals and Its Implications for Human Disease and Aging. *Annu Rev Genet* 23(52): 397-419
 39. Durland J, Ahmadian-Moghadam (2022) Genetics, Mutagenesis. Stat-Pearls Publishing
 40. Olszewska-Widdrat A, Xiros Ch, Wallenius A, Schneider R, Venus J (2023) Bioprocess optimisation for lactic and succinic acid production from a pulp and paper industry side stream. *Bioeng Biotechnol* 11: 1-8
 41. Dorr CR, Wu B, Rimmel RP, Muthusamy A, Schladt DP, Abraham JE, guan W, Mannon RB, Matas AJ, Oetting WS, Jacobson PA, Irani AK (2018) Identification of genetic variants associated with tacrolimus metabolism in kidney transplant recipients by extreme phenotype sampling and next generation sequencing. *Pharmacogenomics J* 19: 375-389
 42. Singh BP (2017) Improving Production of Tacrolimus in *Streptomyces Tacrolimicus* Through development of Novel Mutant by Dual Mutagenesis. *Braz Arch Biol Technol* 60: 17160366
 43. Minjae K, Junhak A, Hanchael J, EonSeon J (2017) Development of a *Dunaliella tertiolecta* Strain with Increased Zeaxanthin Content Using Random Mutagenesis. *Mar Drugs* 15(6): 189
 44. Bouassida M, Ghazala I, Ellouze-Chaabouni S, Ghribi D (2018) Improved Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* SPB1 Mutant Obtained by Random Mutagenesis and Its Application in Enhanced Oil Recovery in a Sand System. *J Microbiol Biotech* 28(1): 95-104
 45. Edgar S, Li FS, Qiao K, Weng JK, Stephanopoulos (2017) Engineering of Taxadiene Synthase for Improved Selectivity and Yield of a Key Taxol Biosynthetic Intermediate. *ACS Synth Biol* 6(2): 201-205
 46. Chen JJ, Liang X, Wang F, Wen YH, Chen TJ, Liu WC, Gong T, Yang JL, Zhu P (2019) Combinatorial mutation on the beta-glycosidase specific to 7-beta-xylosyltaxanes and increasing the mutated enzyme production by engineering the recombinant year. *Acta Pharm Sin B* 9(3): 626-638
 47. Albuquerqu MGE, Martino V, Pollet E, Averous L, Reis MAM (2014) Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: Effect of substrate somposition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties. *J Biotech* 151(1): 66-76
 48. Tao Y, Cui C, Shen H, Liu L, Chen B, Tan T (2014) Enhancing trimethylolpropane esters synthesis through lipase immobilized on suface hydrophobic modified support and appropriate substrate feeding methods. *Enzyme Microb Technol* 58: 60-67
 49. Manan S, Ullah MW, Ul-Islam M, Atta OM, Yang G (2021) Synthesis and applicacions of fungal mycelium-based advanced functional materials. *Journal of Bioresources and Bioproducts* 6(1): 1-10
 50. Anugrah M, Aniket S, Arpita R, Islam R (2022) Fungal- and Algal-Derived Synthesis of Various Nanoparticles and Their Applications. *Bioinorg Chem Appl* (12): 1-14

Advances in the development of synthetic biology tools for the bioproduction of natural product analogues

Piotr Michałowski^{1,3}, Aleksandra Bigos², Dorota Jakubczyk³✉

¹Institute of Technology and Chemical Engineering, Poznan University of Technology

²Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University, Poznań

³Laboratory of Medicinal Chemistry, Centre for Chemical Biology, Institute of Bioorganic Chemistry Polish Academy of Sciences, Poznań

✉corresponding author: djakubczyk@ibch.poznan.pl

Keywords: secondary metabolites, programmable bioproduction of natural analogues, biotransformation, mutasynthesis, mutagenesis, substrate feeding

ABSTRACT

Chemical compounds of natural origin, the so-called natural products and their derivatives, constitute the basis of medicines. They are widely used, among others, in the agricultural, veterinary, food and cosmetics industries. The article presents the division of natural products, with particular emphasis on bioactive secondary metabolites, and progress in the development of synthetic biology tools for their bioproduction.

