

2009年 生物工学功績賞 受賞



固体表面設計に基づく細胞制御

田谷 正仁



Cell control based on designing solid surfaces

Masahito Taya (Division of Chemical Engineering, Graduate School of Engineering Science, Osaka University, 1-3 Machikaneyama-cho, Toyonaka, Osaka 560-8531) *Seibutsu-kogaku* 88: 11-17, 2010.

はじめに

筆者らは、ここ数十年、生物反応の制御とそれに基づく生物機能の開発に取り組んできた。特に、表題の研究内容は、固体表面と細胞生理応答の相互作用を生物工学的観点からとらえ、新たなバイオプロセスの開拓を目的

とするものである。研究内容の概要を図1に示す。主な研究課題は、ヒト細胞を対象とした細胞培養面の設計と細菌などの殺菌を目的とした光殺菌触媒の設計である。これらの研究は、対象とする細胞やプロセスは異なるが、研究のコアをなす命題は、「微視的反応場としての材料開発」→「巨視的反応場としてのリアクター開発」→「細胞制御を伴うプロセス開発」である。

本稿では紙枚の制約から、後者の光殺菌触媒の設計に関する研究内容を紹介することとする。近年のインフルエンザの流行や病原性微生物の出現により、我々の健康や安全が脅かされ、経済・産業活動にも大きな影響を及ぼしていることから、殺菌・抗菌に対する関心がより高まってきている。以下では、二酸化チタンを用いた光殺菌システムについて、細菌やファージなどを対象として、死滅反応モデルに基づく殺菌速度論の確立、殺菌プロセスの定量的評価とそれに基づく複合触媒材料の調製、フォトリアクター開発、酸化ストレス応答遺伝子の活用による細胞機能制御など、生物反応工学的視点に立脚した内容を述べることにする。

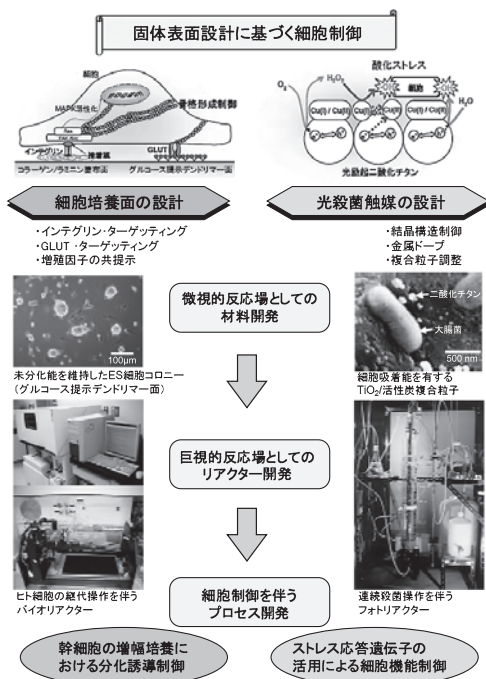


図1. 本研究「固体表面設計に基づく細胞制御」の概要

TiO₂による光殺菌速度論

TiO₂の光触媒反応の作用機構を図2に示す。半導体の一種であるTiO₂は、伝導帯、禁制帯、価電子帯からなる構造を有しており、伝導帯と価電子帯のバンドギャップポテンシャル差(約4.1 eV)以上のエネルギーをもつ波長410 nm以下の光を受けると、価電子帯から伝導帯へ

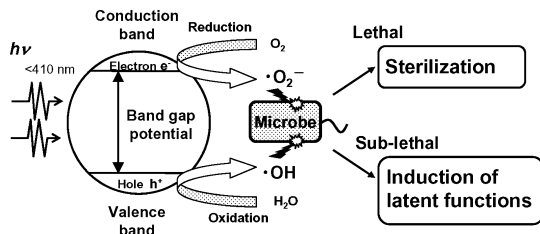
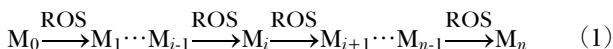


図2. TiO₂光触媒反応の作用メカニズム

の電子移動が起こり正孔と電子が生成される。TiO₂近傍の水と酸素は、正孔と電子によりそれぞれ酸化作用および還元作用を受け、活性酸素種 ROS (·O₂⁻, ·OH など) が発生し、これらが細胞に対するストレスとなり、致死あるいは非致死な効果をもたらす。TiO₂光触媒反応の特徴として以下の点が挙げられる。(1) 光強度の制御により、下は無害から上は死滅まで、細胞に対する効果をアナログ的に変化させることができる。(2) ROSの寿命は非常に短く反応系内に残留しないことから、光のON/OFF操作で、その効果を瞬時に変更できる。(3) 一定の光強度の下では反応速度は一定に保持され、細胞に対する作用を定常状態で試験できる。

このようなTiO₂光触媒反応のメカニズムに基づき、細胞の死滅過程において、ROSから受ける攻撃の程度(反応の進行程度)に従って非致死な中間状態にある細胞が存在すると考え、series-eventモデルを適用した¹⁾。このモデルによれば、初期状態の細胞 M₀ の死滅は、次に示すように、ROSとの n 段逐次反応により進行する。



ここで、M_iはROSから*i*段の攻撃を受けた生細胞であり、*n*段目のM_nが死細胞である。

各段における反応速度が、ROS濃度と細胞濃度についてそれぞれ1次であるとし、N_iをROSから*i*段の攻撃を受けた状態の細胞濃度、C_{RO}をTiO₂の光励起により生成したROS濃度とすると、M_iに関する物質収支より、細胞の死滅速度は次のように表わされる。

$$dN_i/dt = -kC_{RO}N_i \quad (i=0) \quad (2)$$

$$dN_i/dt = kC_{RO}N_{i-1} - kC_{RO}N_i \quad (i=1 \text{ to } n) \quad (3)$$

ここで、*k*は死滅速度定数であり、各段の反応において等しいものとする。

全細胞集団のうち、M₀からM_{n-1}の状態が生細胞とすると、反応時間*t*における細胞生存率N_i/N_{i=0}は、式(2)、(3)の積分より次式で与えられる。

$$\frac{N_i}{N_{i=0}} = \sum_{i=0}^{n-1} \frac{N_i}{N_{i=0}} = \exp(-k't) \sum_{i=0}^{n-1} \frac{(k't)^i}{i!} \quad (4)$$

ここで、*k'* (= *k*C_{RO}) は見かけの死滅速度定数であり、光強度一定の下ではC_{RO}について定常状態が成立し一定となる。

速度論パラメータの意義

細胞のROSに対する防御機構に関与する酵素として、superoxide dismutase (SOD) がある。そこで、大腸菌(IAM12119)のTiO₂光殺菌実験において、培養条件を変化させることにより、細胞内のSOD活性の異なる細胞を調製した(A_{SOD,0} = 2.0 × 10⁻⁸, 4.0 × 10⁻⁸ U/cell)²⁾。図3に結果を示す。図3A, C中の実線は、式(4)に基づく計算結果であり、A_{SOD,0} = 2.0 × 10⁻⁸ U/cellの細胞で*n* = 3, A_{SOD,0} = 4.0 × 10⁻⁸ U/cellの細胞で*n* = 6が得られた。図3B, Dは各段の細胞N_iの増減プロファイルであり、各ラインの和がそれぞれ図3A, Cの計算値となる。このように、*n*値は細胞のSOD活性に依存することが分かった。図4は、

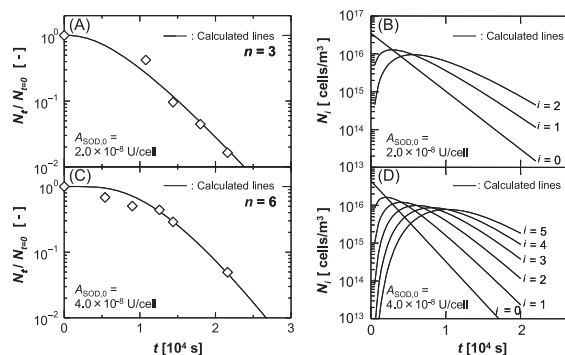


図3. 異なるSOD活性をもつ大腸菌のTiO₂光殺菌経過(光源: ブラックライト蛍光灯)。(A, B) A_{SOD,0} = 2.0 × 10⁻⁸ U/cell。(C, D) A_{SOD,0} = 4.0 × 10⁻⁸ U/cell。

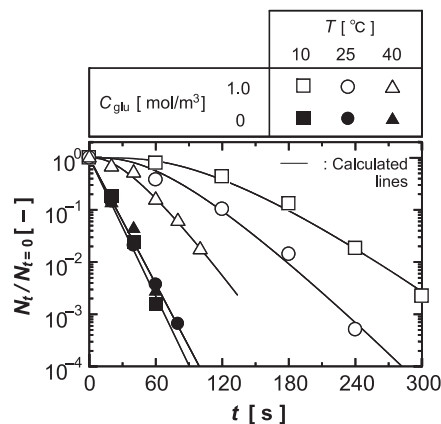


図4. ファージのTiO₂光不活化に及ぼすグルコース濃度と温度の影響(光源: ブラックライト蛍光灯)

TiO₂ 光反応によるファージ MS2 不活化の継時変化である。この場合、特に反応温度を変化させ、夾雑有機物としてのグルコースの有無の影響を試験した³⁾。グルコースを系内に加えない場合には、時間に対して $N_t/N_{t=0}$ の対数値が直線的に減少し、式 (4) で $n=1$ の 1 次反応となることが分かる。一方、グルコースが存在する場合には、 n 値は温度により変化し、 $T=10, 25, 40^\circ\text{C}$ において、それぞれ $n=5, 4, 3$ となった。これは、ファージ粒子表面にグルコースが吸着することが原因と考えられ、吸着したグルコースが楯となって、ファージ粒子を ROS の攻撃から保護するため、吸着量の大きい低温ほど大きな n 値を与えると説明される。

以上のように、式 (4) 中のパラメータ n は、細胞やファージの状態に由来する ROS に対する抵抗力を示す指標となる。

図 5A, B は、それぞれ、大腸菌 (IAM12119) とファージ MS2 を種々の平均光強度 I_{av} の下で TiO₂ 光照射した結果である。式 (4) を適用した計算により、もうひとつの速度パラメータである k' が決定される。光反応速度論に基づき、与えられた光強度の下で ROS 濃度 C_{RO} について定常状態を仮定すると次式が得られる。

$$C_{RO} = \phi_{RO} A I_{av} / V_L k_{RO} \quad (5)$$

ここで、 ϕ_{RO} は TiO₂ の量子収率、 A は照射面積、 V_L は反応液体積、 k_{RO} は ROS 減衰反応の速度定数である。式 (5) に従えば、反応条件が一定の下では、 $k' = k C_{RO}$ より k' と I_{av} の間に比例関係が成立する。図 5C, D の実験データからも式 (5) が有効であることが認められた。なお、波長スペクトルが異なる光源を用いる場合には ϕ_{RO} が変化するので、殺菌効率を同一基準で比較するためには、TiO₂ による有効光吸収量 Q_{obs} で整理することが有効である (図 6)。図 6 の結果を活用すれば、太陽光のもとでの殺菌プロファイルも予測可能となる⁴⁾。

TiO₂ による光殺菌に影響する他の因子として、TiO₂ 粒子上の標的物量を検討した⁵⁾。ファージ MS2 の TiO₂ への吸着量 q_T は、反応系内に存在するイオン種や溶液 pH により大きく変化する。しかし、図 7 に示すように、 q_T に対して点綴された k' 値は良好な直線を与え、TiO₂ の光不活化反応はファージ粒子の吸着量に強く依存することが明らかとなった。TiO₂ への細胞吸着量が重要な因子であることは、大腸菌の殺菌プロセスにおいても同様に認められたり。

光殺菌速度論に基づく反応場設計

TiO₂ の光殺菌速度論に基づき、2 つのパラメータ n と k' を提示した。前者は殺菌対象である細胞側に関するも

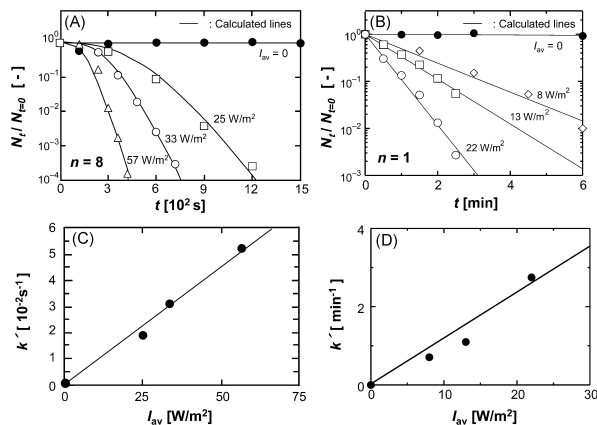


図 5. TiO₂ 光殺菌に及ぼす平均光強度の影響 (光源: ブラックライト蛍光灯). (A, C) 大腸菌, (B, D) ファージ.

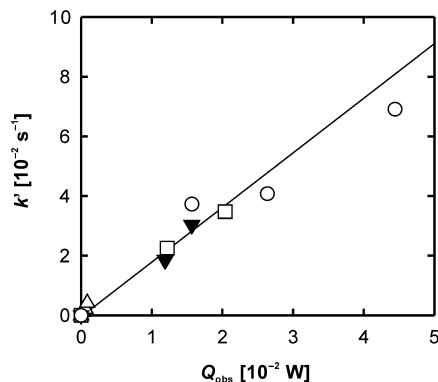


図 6. 種々の光源を用いた大腸菌の TiO₂ 光殺菌における死滅速度定数と TiO₂ 光吸収量の関係。○, ブラックライト蛍光灯; □, 複写用蛍光灯; △, 白色蛍光灯; ▼, 水銀灯.

	None	Sodium	Potassium	Calcium		
None	●					
Chloride		○ 1	■	▲		
Bromide		○ 2				
Nitrate		○ 3				
Sulfate		○ 4				
Phosphate		○ 5				
pH	3.0	5.0	6.0	7.0	8.0	10
	◎	△	◇	●	▽	□

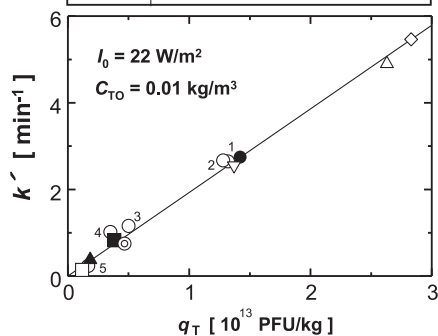


図 7. ファージの TiO₂ 光不活化における死滅速度定数とファージ吸着量の関係 (光源: ブラックライト蛍光灯)

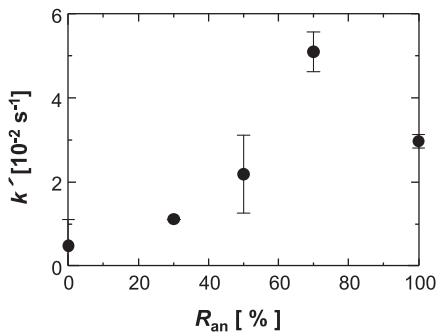


図8. アナターゼ/ルチル混合TiO₂を用いたファージの光不活化に及ぼすアナターゼ割合の影響 (光源: ブラックライト蛍光灯)

のとらえることができ、後者はTiO₂の触媒活性に関わるものと考えられる。ここで、 k' はTiO₂近傍における C_{RO} (あるいは ϕ_{RO})と q_T の関数である。以下に、このような観点に基づく殺菌効率の向上例について述べる。

量子収率 ϕ_{RO} の向上 光触媒活性を示すTiO₂の結晶構造として、ルチル型とアナターゼ型が知られている。それぞれの結晶は、光触媒反応に伴う酸化力や還元力が異なると考えられていることから、アナターゼ型 (一次粒子径: 約20 nm) とルチル型 (一次粒子径: 30–50 nm) のTiO₂混合物を用いたファージMS2の不活化を行った⁶⁾。その結果、図8に示すように、アナターゼ混合割合 $R_{an}=70\%$ で k' の値が最大となった。 $R_{an}=0, 70, 100\%$ におけるファージ吸着量の実測値は、それぞれ $q_T=3.1, 3.8, 7.6 \times 10^{13}$ PFU/kgであり、 $k'/q_T=3.0, 13.4, 2.4$ kg/(PFU·s)と算出された。ファージの吸着データでは上記の結果が説明できないことから、光強度などの操作条件を変えた条件下での速度論解析により k' 値向上の原因を検討し、TiO₂混合物の量子収率 ϕ_{RO} が増大したためと考察した。TiO₂粒子間の相互作用メカニズムには不明な点も残されているが、異なる結晶粒子の配置により、光励起された電子と正孔の再結合が抑制され、結果として量子収率が向上したものと推察した⁶⁾。

ROS濃度 C_{RO} の向上 TiO₂の光励起には410 nm以下の近紫外光が有効である (図2)。したがって、室内空間で使用されるような白色蛍光灯照射下ではROSが十分に生成されず、殺菌効率はきわめて低いものとなる。可視光応答型の触媒合成も盛んに行われているが、殺菌用途としては必ずしも十分とは言えないのが現状である。そこで、室内環境中でも高活性なTiO₂の設計を目的として、銅成分の導入とその効果について検討した⁷⁾。その結果、白色蛍光灯照射条件下においても、銅をドーブしたTiO₂ (Cu/TiO₂) では、通常のものに比べ、大腸菌 (IM303) に対する k' 値を9倍以上に増大させることがで

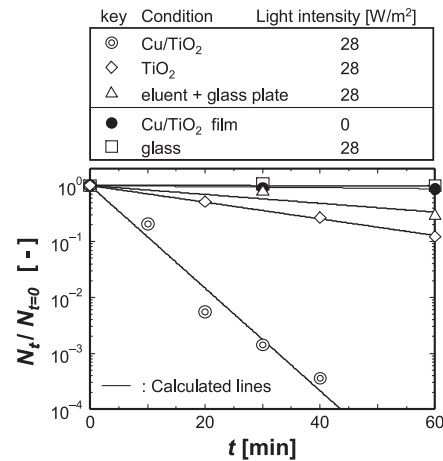


図9. 銅ドーブTiO₂ (Cu/TiO₂) を用いた大腸菌の光殺菌効率の向上 (光源: 白色蛍光灯)

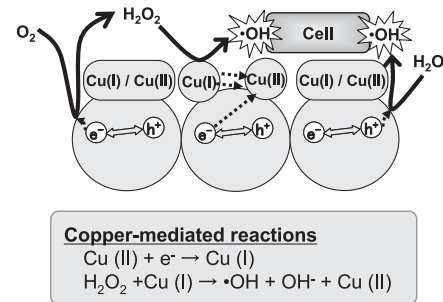


図10. 銅ドーブTiO₂における活性酸素の生成促進メカニズム

きた (図9)。暗条件下でのCu/TiO₂では細胞の死滅がほとんど見られないことから、銅、TiO₂、光の3要素による複合効果と考えられた。その殺菌機序については、TiO₂上でCu (II) が励起電子により還元を受けてCu (I) となり、このCu (I) がTiO₂表面付近のH₂O₂と反応してROSを生成しCu (II) を再生することによって殺菌が促進されるものと説明できる (図10)。なお、このような銅とTiO₂の複合効果は、反応液中に銅がイオンで存在する場合にも認められ、TiO₂は銅の光還元反応に関与していることが確かめられた⁸⁾。

TiO₂近傍での細胞濃度の向上 TiO₂粒子の反応においては、表面近傍における細胞濃度を高く保つことが重要である。そこで、ゾルゲル法によりTiO₂を活性炭に固定化し、細胞吸着能を有する複合粒子 (T/AC粒子) を調製した (図1) ⁹⁾。この複合粒子を用いて、大腸菌 (IAM12119) の光殺菌を行った結果を図11に示す。T/AC粒子濃度 $C_{T/AC}$ の増加に伴って k'/I_{av} が飽和する傾向が見られ、これは、T/AC粒子への細胞の吸着が関与していることを示している。実線は、T/AC粒子への細胞吸着を考慮した修正series-eventモデルによる計算結果であり、実測値を良好に表現することができた。図中の破線は、吸

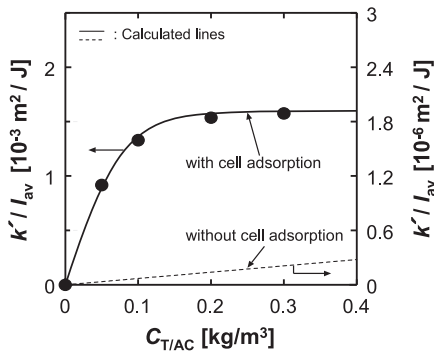


図 11. TiO₂/活性炭複合粒子を用いた大腸菌の光殺菌に及ぼす複合粒子濃度の影響 (光源: ブラックライト蛍光灯)

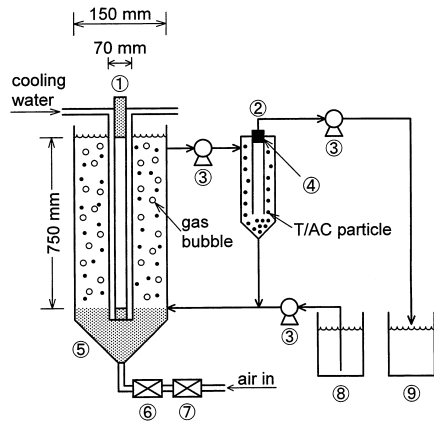


図 12. 連続殺菌操作を伴うフォトリアクターの概略図。①ブラックライト蛍光灯、②分離器、③ポンプ、④ガラスフィルター、⑤ガラスビーズ、⑥エアフィルター、⑦加湿器、⑧供給水貯槽、⑨処理水貯槽。

着項をはずした場合のモデル計算の結果である。これより、吸着のある場合の k'/I_{av} は、ない場合に比べ10,000倍のオーダーで増幅されることが示され、TiO₂による光殺菌効率は、細胞の吸着により著しく向上することが裏づけられた。さらに、TiO₂を活性炭に固定化することにより、固液分離がより容易となることから、図12に示すような連続殺菌操作を伴うフォトリアクターに適用することも可能である¹⁰⁾。

TiO₂光反応により誘導される細胞機能の利用

以上のような殺菌に関する一連の研究過程において、本来脆弱なはずの大腸菌のSOD欠損株 (IM303) では、TiO₂存在下、適度な光強度では死滅することなく、かえってその増殖速度が野生株と同等程度にまで回復するとともに、細胞内のROS含量も減少することを見いだした (図13, 14)¹¹⁾。これは、殺菌という視点からは予想外の結果であると同時に、TiO₂光反応ストレスのポジティブな効果を示す興味深い現象であった。そこで、TiO₂光ストレスの有無条件下におけるSOD欠損株の

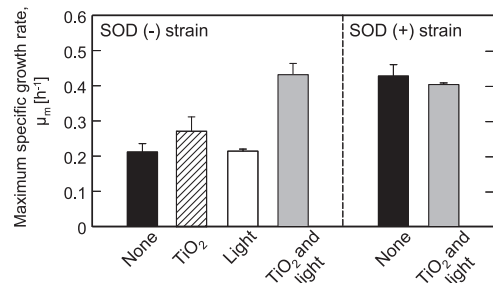


図 13. TiO₂照射下によるSOD欠損大腸菌の増殖速度の向上 (光源: ブラックライト蛍光灯)。SOD (-): SOD欠損株。SOD (+): 野生株。

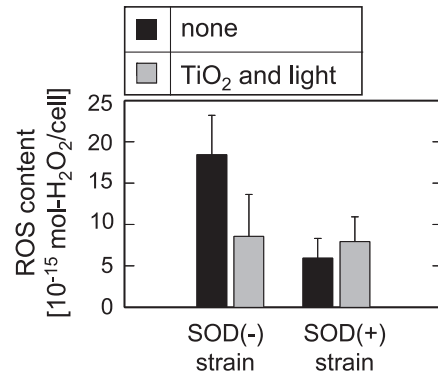


図 14. TiO₂照射によるSOD欠損大腸菌内のROS含量の低下 (光源: ブラックライト蛍光灯)。SOD (-): SOD欠損株。SOD (+): 野生株。

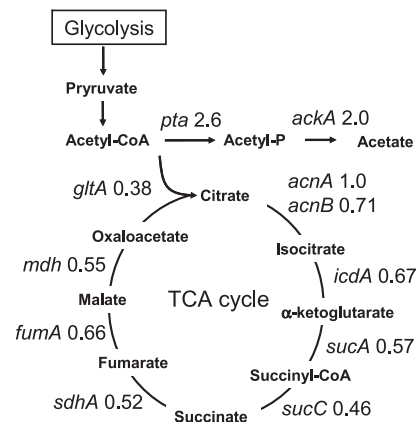


図 15. TiO₂照射下におけるSOD欠損大腸菌の遺伝子発現量 (光源: ブラックライト蛍光灯)。図中の数値は、通常培養 (暗条件下) での遺伝子発現量を1とした相対値として示す。

mRNA発現量を比較したところ、新規ストレス応答遺伝子や機能未知遺伝子などを含む多くの遺伝子の高発現が誘導され、さらにTCA回路に関わる遺伝子などの発現低下が認められた。特に後者についての検討を詳細に行ったところ、TCA回路の遺伝子は軒並みに低活性化し酢酸生成経路が増幅されていることが示された (図15)。酸化ストレスの付与により、SOD欠損株内において、中枢

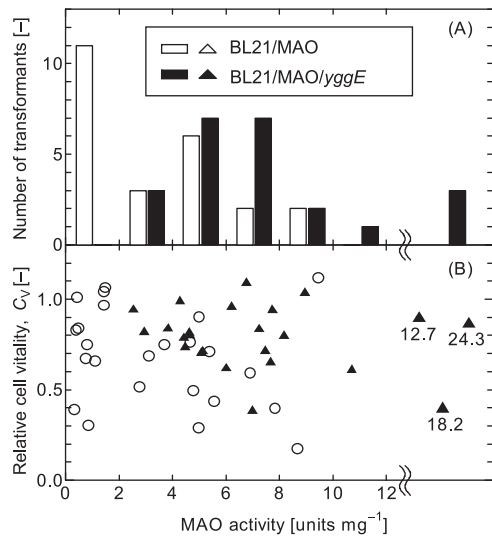


図16. MAO高発現大腸菌におけるyggE導入の効果。(A)形質転換体のMAO活性分布。(B)形質転換体の生存率とMAO活性分布。

代謝経路が好氣的反応から嫌氣的反応に移行し、細胞内ROSの発生を抑制する方向にシフトしたものと推察される¹²⁾。

TiO₂光反応に対し高発現応答が確認されたyggEの抗酸化機能を確認するため、10 μmol/dm³パラコート存在下でyggE組換え大腸菌の培養を行ったところ、その増殖阻害が緩和され、同時に細胞内ROSも減少することが確認された¹³⁾。さらに、反応生成物としてH₂O₂を発生することで細胞を損傷するmonoamine oxidase (MAO)とyggEを同時に発現する共発現系を試験したところ、図16に示すように、yggEとの共発現条件下でMAO活性が飛躍的に向上する組換え体が出現し、またその細胞生存率も高いことが示された¹⁴⁾。

SOD欠損株で高発現が確認されたストレス応答遺伝子を大腸菌に導入し、中枢代謝活性に与える影響を試験した。このうちyggB、yggG導入株では、大腸菌の主要な代謝副産物である酢酸の生成が抑制され、特にyggG導入株においては、酢酸生成経路に対して分岐代謝となるTCA回路の遺伝子発現が低下しているにもかかわらず酢酸生成が抑制され、中枢代謝経路においてボトルネックが形成されていることが推測された。

yggGの導入による中枢代謝のボトルネック形成の利

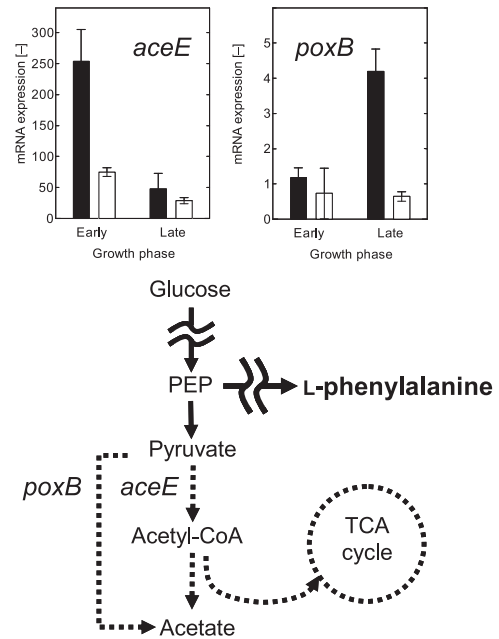


図17. yggE導入によるL-フェニルアラニン生産菌の酢酸生成フローにおけるボトルネック形成。□, AJ12741; ■, AJ12741/yggG。

用として、L-フェニルアラニン生産菌(AJ12741)に対するyggGの効果調べた。yggGの導入により、酢酸の生産を抑制し、L-フェニルアラニンの生産量と収率を約2倍に向上させることができた(表1)。yggG導入株においては、培養の全般にわたって酢酸生成に関与する遺伝子の発現が抑えられ、中枢代謝にボトルネックが形成されることで代謝フローがL-フェニルアラニン合成の方向に向かったものと考えられた(図17)¹⁵⁾。

TiO₂光触媒反応により誘引される遺伝子には機能未知のものも数多く含まれており、これらの機能解明とその応用を図ることにより、新たなバイオプロセスへの展開が期待できる。

おわりに

従来のバイオプロセスでは、微生物固定化担体や動物細胞のマイクロキャリアに見られるように、固相は細胞を局所的に高濃度に保つ場としてとらえられ、細胞の生理状態になるべく不活性な材料が望ましいとされてきた。ここで述べた内容は、固相からの細胞への「刺激」

表1. L-フェニルアラニン生産菌およびyggE導入株の培養結果(培養時間: 84 h)

Strains	Dry cell weight (g/l)	L-Phenylalanine (g/l)	Y _{phe/glu} (-)	Acetate (g/l)	Y _{ac/glu} (-)
AJ12741	3.0 ± 0.2	3.7 ± 0.2	0.09 ± 0.01	11.0 ± 2.7	0.26 ± 0.05
AJ12741/yggE	3.3 ± 0.3	6.4 ± 1.7	0.16 ± 0.03	4.5 ± 2.4	0.12 ± 0.06

を積極的に活用することにより、生物工学分野における新たな展開を目指すものである。特に、足場依存性ヒト細胞の *in vitro* 培養では、細胞が接着する固相（スキャホード）が必要であり、これが細胞の形態、増殖、分化・脱分化、組織化などの生理機能の発現と抑制に重要な環境因子であることが明らかになりつつある。本稿では、これらに関する研究内容を紹介することができなかったが、既報の論文¹⁶⁻²³⁾を参照されたい。

今回の受賞対象となった研究は、大阪大学大学院基礎工学研究科化学工学領域で行われたものであり、光反応工学に関してご教唆いただいた東稔節治教授（大阪大学名誉教授）ならびに現・旧の研究室スタッフである紀ノ岡正博博士（現大阪大学工学研究科教授）、西岡求博士（現大阪府立工業高等専門学校准教授）、真鍋匡史（現早稲田大学専任職員）、尾島由紘博士、武澤康範博士、金美海博士、さらに、共同研究者として参画いただいた学内外の多くの皆様に感謝いたします。最後に、本研究の内容は、「comrades in science and engineering games」として昼夜を問わず共に戦い続けてくれた卒業生・在学生諸氏の成果である。記して謝意を表します。

文 献

- 1) Horie, Y., David, D. A., Taya, M., and Tone, S.: *Ind. Eng. Chem. Res.*, **35**, 3920–3926 (1996).
- 2) Koizumi, Y., Yamada, R., Nishioka, M., Matsumura, Y., Tsuchido, T., and Taya, M.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **77**, 671–677 (2002).
- 3) 佐藤尚志, 田谷正仁: 化学工学論文集, **32**, 288–292 (2006).
- 4) Horie, Y., Taya, M., and Tone, S.: *J. Chem. Eng. Japan*, **31**, 577–584 (1998).
- 5) Koizumi, Y. and Taya, M.: *Biotechnol. Lett.*, **24**, 459–462 (2002).
- 6) Sato, T. and Taya, M.: *Biochem. Eng. J.*, **28**, 303–308 (2006).
- 7) Sato, T. and Taya, M.: *Biochem. Eng. J.*, **30**, 199–204 (2006).
- 8) 西岡 求, 大西恭子, 佐藤尚志, 田谷正仁: 防菌防黴, **37**, 161–167 (2009).
- 9) Horie, Y., Taya, M., and Tone, S.: *J. Chem. Eng. Japan*, **31**, 922–929 (1998).
- 10) 古泉善行, 白波瀬直孝, 紀ノ岡正博, 田谷正仁, 東稔節治: 防菌防黴, **28**, 763–766 (2000).
- 11) Kim, S. Y., Nishioka, M., and Taya, M.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **236**, 109–114 (2004).
- 12) Ojima, Y., Nishioka, M., and Taya, M.: *Biotechnol. Lett.*, **30**, 1107–1113 (2008).
- 13) Kim, S. Y., Nishioka, M., Hayashi, S., Honda, H., Kobayashi, T., and Taya, M.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 2762–2765 (2005).
- 14) Ojima, Y., Kawase, D., Nishioka, M., and Taya, M.: *Biotechnol. Lett.*, **31**, 139–145 (2009).
- 15) Ojima, Y., Komaki, M., Nishioka, M., Iwatani, S., Tsujimoto, N., and Taya, M.: *Biotechnol. Lett.*, **31**, 525–530 (2009).
- 16) Hata, N., Kim, M.-H., Isoda, K., Kino-oka, M., Kawase, M., Yagi, K., and Taya, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, 233–238 (2004).
- 17) Kim, M.-H., Kino-oka, M., Kawase, M., Yagi, K., and Taya, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **103**, 192–199 (2007).
- 18) Kim, M.-H., Kino-oka, M., Kawase, M., Yagi, K., and Taya, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 428–431 (2007).
- 19) Kim, M.-H., Kino-oka, M., Kawase, M., Yagi, K., and Taya, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **105**, 319–326 (2008).
- 20) Mashayekhan, S., Kim, M.-H., Miyazaki, S., Tashiro, F., Kino-oka, M., Taya, M., and Miyazaki, J.: *Biomaterials*, **29**, 4236–4243 (2008).
- 21) Kim, M.-H., Kino-oka, M., Morinaga, Y., Sawada, Y., Kawase, M., Yagi, K., and Taya, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **107**, 196–205 (2009).
- 22) Kim, M.-H., Kino-oka, M., Saito, A., Sawa, Y., and Taya, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **109**, 55–61 (2010).
- 23) Kim, M.-H., Kino-oka, M., and Taya, M.: *Biotechnol. Adv.*, **28**, 7–16 (2010).