



Volume 10, nomor 1, tahun 2024

Biogenerasi

Jurnal Pendidikan Biologi

<https://e-journal.my.id/biogenerasi>



REVIEW: PRODUKSI LIMONENE MELALUI REKAYASA JALUR PENTOSA FOSFAT MENGGUNAKAN CYANOBACTERIUM *Synechocystis* sp. PCC 6803

Alda Wydia Prihartini Azar, Universitas Jenderal Soedirman, Indonesia

Hasna Dyah Kusumardani, Universitas Jenderal Soedirman, Indonesia

Haris Maulani, Universitas Jenderal Soedirman, Indonesia

*Corresponding author E-mail: alda.azar@unsoed.ac.id

Abstract

This review article aims to summarize the procedures for limonene production through the modification of the pentose phosphate (PP) and methylerythritol 4-phosphate (MEP) biosynthetic pathways in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 to produce limonene. Limonene synthase (lims) obtained from *C. limon* and *M. spicata* plants was cloned and transformed into cyanobacteria to enhance limonene production. Experimental results showed that genes associated with the limonene biosynthesis pathway, including ribose 5-phosphate isomerase (rpi), ribulose 5-phosphate 3-epimerase (rpe), and geranyl diphosphate synthase (gpps), were successfully expressed in *Synechocystis*. This study demonstrates that *Synechocystis* sp. can be an efficient microbial system for limonene and other isoprene compound production, offering a more stable and environmentally friendly alternative than agricultural-based production.

Keywords: metabolic engineering, isoprene, limonene synthase, citrus, microorganisms

Abstrak

Artikel review ini bertujuan untuk merangkum prosedur produksi limonene melalui modifikasi jalur biosintesis pentosa fosfat (PP) dan methylerythritol 4-phosphate (MEP) pada cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 untuk menghasilkan limonene. Limonene synthase (lims) diperoleh dari tanaman *C. limon* dan *M. spicata* dikloning serta ditransformasikan ke dalam cyanobacteria untuk meningkatkan produksi limonene. Hasil percobaan menunjukkan bahwa gen yang terkait dengan jalur biosintesis limonene, termasuk ribose 5-phosphate isomerase (rpi), ribulose 5-phosphate 3-epimerase (rpe), dan geranyl diphosphate synthase (gpps), berhasil diekspresikan pada cyanobacteria *Synechocystis*. Penelitian ini menunjukkan bahwa *Synechocystis* sp. dapat menjadi sistem mikroba yang efisien untuk produksi limonene dan senyawa isoprene lainnya, serta menawarkan alternatif yang lebih stabil dan ramah lingkungan dibandingkan dengan produksi berbasis pertanian.

Kata Kunci: rekayasa metabolit, isoprene, limonene synthase, citrus, mikroba.

© 2025 Universitas Cokroaminoto palopo

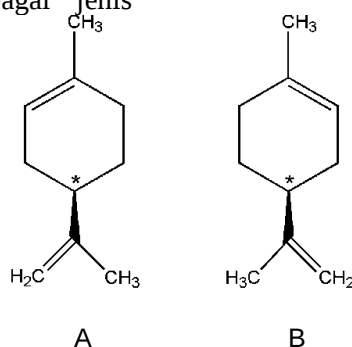
Correspondence Author :
Universitas Jenderal Soedirman

p-ISSN 2573-5163
e-ISSN 2579-7085

PENDAHULUAN

Limonene merupakan produk esensial metabolit tumbuhan berupa senyawa aromatik yang sering dijumpai pada kulit buah kelompok genus *Citrus*, seperti pada jeruk atau lemon. Senyawa ini termasuk ke dalam kelompok metabolit terpenoid. Limonene merupakan senyawa metabolit tumbuhan berupa 10-C isoprene (monoterpene) dengan rumus molekul $C_{10}H_{16}$ (Burnham, 2017; Erasto & Viljoen, 2008; Shahbazi & Shavisi, 2021). Limonene dapat dijumpai pada sekitar 300 minyak esensial dari berbagai jenis

tanaman, meliputi jeruk, lemon, mint, dan lain-lain. Limonene ini memiliki dua konformer, yaitu R(+)-Limonene dan S(-)-Limonene (Gambar 1). Masing-masing jenis limonene tersebut memiliki karakteristik dan fungsi yang berbeda. (R)-Limonene memiliki karakteristik beraroma wangi (seperti pada jeruk) sedangkan (L)-Limonene memiliki aroma yang lebih menyengat (seperti pada lemon) (Burnham, 2017; Ciriminna *et al.*, 2014; Erasto & Viljoen, 2008; Jongedijk *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2017).



Gambar 1 Stereoisomer Limonene: R-(+) limonene (A) dan S(-) limonene (B) (Ciriminna *et al.*, 2014)

Limonene umumnya bisa didapatkan sebagai produk hasil dari *cold-process* jus buah jeruk (sitrus), meliputi pemisahan sentrifugal dan destilasi uap (Ciriminna *et al.*, 2014). Kandungan limonene dalam jeruk dapat mencapai hingga 98% (Jongedijk *et al.*, 2016; Muraleedharan *et al.*, 2021; Soković *et al.*, 2010; Tranchida *et al.*, 2013). Persentase kandungan limonene dapat berbeda pada berbagai bagian tumbuhan. Pada bagian bunga - gynoecium, buah - epikarp, dan daun muda, kandungan limonene ini dapat mencapai sekitar 65%. Seiring dengan perkembangannya, persentase kandungan limonene pada daun dewasa dapat berkurang setengahnya sekitar 30%. Sementara itu, kandungan limonene pada bunga kuncup awalnya sekitar 38.9% akan naik menjadi sekitar 44.3% ketika bunga tersebut mekar. Hal ini umumnya ditujukan untuk dapat menarik polinator (Erasto & Viljoen, 2008; Flamini *et al.*, 2007).

Senyawa limonene sering dimanfaatkan dalam berbagai bidang industri, seperti sebagai pewangi, perasa, antimikroba, anti-serangga, obat, biofuel hingga dimanfaatkan sebagai bahan biomaterial. Umumnya, limonene digunakan sebagai perasa seperti pada

minuman, permen, hingga dalam produk pewangi bahan rumah tangga seperti produk pembersih dan parfum. Sebagai bahan baku tersebut, limonene memiliki nilai jual yang cukup tinggi. Limonene juga dapat dimanfaatkan sebagai pelarut pengganti benzena, toluen, ethylbenzene, atau xylene. Saat ini, limonene diketahui dapat dimanfaatkan untuk produksi minyak dan gas serta sebagai bahan bakar jet. Untuk bahan baku tersebut, limonene dibutuhkan dalam jumlah yang banyak (Behrendorff *et al.*, 2013; Chuck *et al.*, 2014; Ciriminna *et al.*, 2014; Erasto & Viljoen, 2008; Lin *et al.*, 2017; Tracy *et al.*, 2009; Shahbazi & Shavisi, 2021).

Untuk dapat meningkatkan produksi limonene agar dapat memenuhi target pasar, perlu dilakukan produksi melalui rekayasa metabolit, salah satu metode yang sudah umum digunakan adalah melalui teknik transformasi menggunakan mikroba. Rekayasa metabolit menggunakan mikroba ini bertujuan untuk mengkonversi bahan dasar seperti glukosa dan gliserol untuk dikonversikan menjadi limonene dalam skala yang besar tanpa harus bergantung pada industri/pertanian jeruk (Jongedijk *et al.*, 2016). Pemanfaatan produksi limonene menggunakan mikroba ini juga bertujuan

untuk menghindari fluktuatifnya produksi jeruk melalui pertanian akibat terjadinya penyakit yang tidak diinginkan, salah satunya penyakit yang disebabkan oleh bakteri Huanglongbing (HLB) yang pernah terjadi pada produk impor dari Brazil dan USA (Hodges & Spreen, 2012; Jongedijk *et al.*, 2016).

Beberapa penelitian sudah dilakukan pada beberapa jenis mikroba, di antaranya dengan menggunakan bakteri *Escherichia coli* (Alonso-Gutierrez *et al.*, 2013; Jongedijk *et al.*, 2016; Khanijou *et al.*, 2024). Penelitian lain juga menunjukkan bahwa peningkatan produksi limonene ini dapat dilakukan pada eukariot mikroskopis, yaitu ragi *Saccharomyces cerevisiae* (Behrendorff *et al.*, 2013; Jongedijk *et al.*, 2016; Kong *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2021). Beberapa penelitian lain menunjukkan bahwa cyanobacteria juga dapat digunakan dalam rekayasa metabolit limonene ini (Angermayr *et al.*, 2015; Jongedijk *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2017).

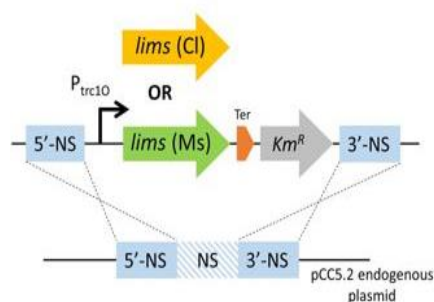
Pada umumnya, cyanobacteria diketahui menjadi salah satu sistem yang sering digunakan untuk memproduksi metabolit tertentu, termasuk salah satunya adalah kelompok isoprene (Bentley & Melis, 2012; Bentley *et al.*, 2014; Davies *et al.*, 2014; Lindberg *et al.*, 2010). Cyanobacteria ini sering digunakan untuk merekayasa metabolit karena kemampuannya untuk melakukan fotosintesis dan dapat mengarahkan karbon dari tempat penampungan menuju jalur biosintesis protein dan glikogen. Kedua jalur biosintesis ini merupakan dua jalur utama yang berperan penting dalam produksi terpenoid pada cyanobacteria (Davies *et al.*, 2014). Untuk itu, dalam review ini akan dijelaskan bagaimana cyanobacteria yang merupakan organisme fotosintetik dapat digunakan untuk

merekayasa metabolit sekunder tumbuhan kelompok isoprene, salah satunya limonene, agar didapatkan produksi yang tinggi tanpa bergantung pada produksi buah kelompok *Citrus* ataupun tanaman lain penghasil limonene. Pemanfaatan organisme fotosintetik cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 ini diharapkan dapat meningkatkan produksi limonene dan senyawa isoprene lain yang bernilai jual tinggi (Lin *et al.*, 2017).

METODE

Rekayasa genetik (manipulasi DNA, konstruksi dan transformasi)

Limonene dapat diproduksi dengan adanya *limonene synthase* (lims). *Limonene synthase* (lims) didapatkan dari tanaman lemon (*Citrus limon*) dan spearmint (*Mentha spicata*). Koding sekuens untuk lims dari kedua tanaman tersebut dioptimasi untuk *Synechocystis* 6803 dan disintesis menggunakan IDT (*Integrated DNA Technology*). *Lims* hasil isolasi dikloning pada plasmid pCC5.2 neutral-site menggunakan promoter *trc10*, kemudian ditransformasikan ke dalam *E. coli* melalui Gibson *assembly* (Gambar 2) sebelum diintroduksi pada cyanobacterium *Synechocystis*. Fragmen hasil kloning melalui Gibson *assembly* kemudian diamplifikasi menggunakan PCR. Hasil amplifikasi dipurifikasi melalui elektroforesis DNA dan DNA linear yang didapatkan kemudian ditransformasikan pada cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. Mutan hasil segregasi kemudian disubkultur pada medium BG-11 dengan antibiotik berupa 2 µg/mL kanamycin dan 5 µg/mL spectinomycin (Lin *et al.*, 2017).



Gambar 2 Gibson Assembly untuk kloning *lims* (Lin *et al.*, 2017)

Keterangan:

P _{trc1O}	=	trc1O	promoter;
NS	=	neutral	site;
Ter	=		terminator;
KmR = kanamycin resistance			

Produksi limonene pada cyanobacteria

Produksi limonene dilakukan dengan menginokulasikan *Synechocystis* 6803 yang telah ditransformasikan l_{ims}, r_{pi}, r_{pe}, dan g_p pada medium BG-11 dengan antibiotik berupa 10 µg/mL kanamycin dan 4 µg/mL spectinomycin hingga fase pertengahan log pada kondisi lingkungan 30°C dan dengan pemberian cahaya putih (50 µmol photons m⁻²s⁻¹). Sel yang telah diinkubasi kemudian disentrifugasi pada 7000 g dan dicuci menggunakan medium BG untuk menghilangkan antibiotik pada medium awal. Produksi limonene didapatkan ketika OD₇₃₀ mencapai 0.34 (~0.5 g/L dari biomassa). Sebanyak 50 mL kultur sel tersebut kemudian ditumbuhkan kembali pada erlenmeyer 250 mL pada suhu 30°C dan pemberian sinar putih (130 µmol foton m⁻²s⁻¹) secara berkelanjutan. Lakukan penambahan 10% (v/v) dodecane untuk mengurangi potensi terjadinya penguapan limonene, mengingat limonene bersifat sangat volatil (Lin *et al.*, 2017).

Produksi limonene pada cyanobacteria

Produksi limonene diuji pada hari ke-7 setelah inkubasi. Sampel limonene dipreparasi dengan melarutkannya dalam 10 µL dodecane dan 990 µL etil asetat. Analisis dilakukan menggunakan *gas chromatography* (Hewlett-Packard model 7890 A, Agilent Technologies, CA, USA). Limonene dikuantifikasi menggunakan standar (R)-limonene (Lin *et al.*, 2017).

Produksi limonene pada cyanobacteria

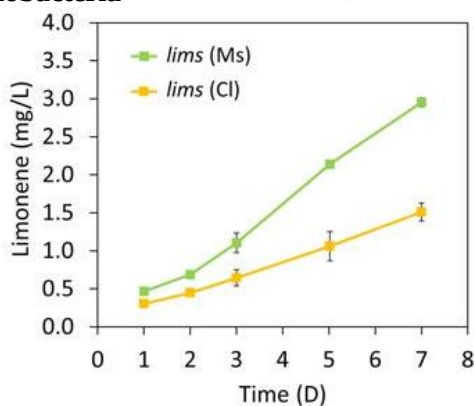
Pemodelan komputasional *Synechocystis* 6803 dilakukan melalui *iSyn731 metabolic model* dengan menggunakan algoritma OptForce (Lin *et al.*, 2017).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi limonene dari l_{ims} *C. limon* dan *M. spicata*

Pada dasarnya *l_{ims}* ini tidak hanya memproduksi limonene namun juga senyawa monoterpen lain seperti *α-pinene* and *acyclic mycene*. *L_{ims}* yang digunakan untuk kloning harus memiliki kemurnian yang tinggi. Untuk itu, percobaan produksi limonene ini menggunakan *l_{ims}* dari tanaman *C. limon* dan *M. spicata* (Behrendorff *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2017). Hasil percobaan menunjukkan bahwa ekspresi *enhanced yellow fluorescent protein* (EYFP) pada plasmid pCC5.2 meningkat sebanyak 8-14 kali dari ekspresi pada kromosom (Lin *et al.*, 2017).

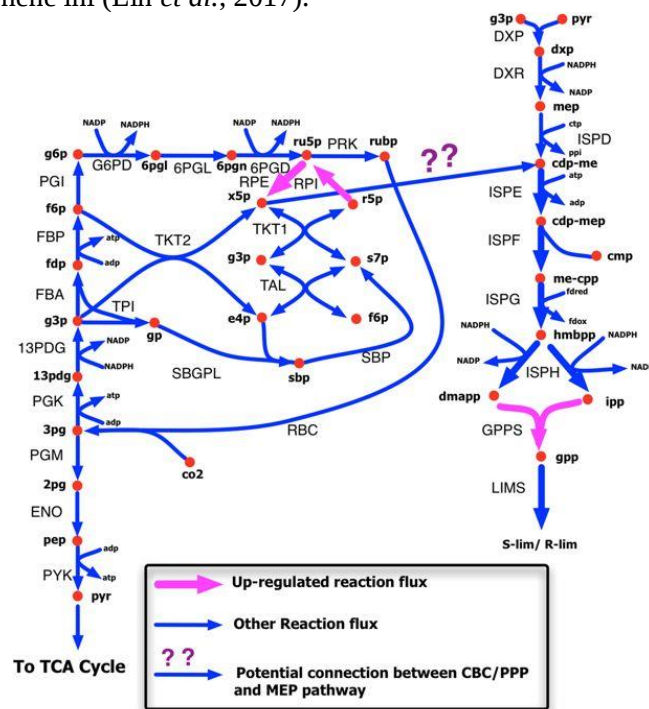
Saat *l_{ims}* dikloning pada plasmid dan ditransformasikan ke dalam *E. coli*, terjadi mutasi acak pada inang *E. coli* tersebut, diperkirakan karena limonene ini merupakan senyawa yang toksik bagi *E. coli*. Untuk itu, saat akan diintroduksi pada *Synechocystis* 6803, kloning *E. coli* dilakukan melalui Gibson *assembly*. Limonene hasil ekspresi *l_{ims}* dari *M. spicata* memiliki hasil dua kali lebih tinggi daripada ekspresi *l_{ims}* dari *C. limon*. Hal ini diperkirakan karena *l_{ims}* dari *M. spicata* memiliki aktivitas katalitik lebih tinggi pada *Synechocystis* 6803 (Gambar 3) (Lin *et al.*, 2017).



Gambar 3 Hasil kloning *lims* dari *C. limon* dan *M. spicata* (Lin *et al.*, 2017)

Pemodelan produksi limonene pada *Synechocystis* 6803

Hasil pemodelan komputasional *Synechocystis* 6803 melalui iSyn731 metabolic model dengan menggunakan algoritma OptForce menghasilkan 31 reaksi yang terjadi dan diuji fluks fotoautotrofiknya (Gambar 4). Dalam pemodelan ini dimasukkan juga hubungan antara Calvin Benson Cycle (CBC) / jalur PP dan jalur MEP. OptForce memprediksikan up-regulasi dari dua gen pada jalur PP, yaitu ribose 5-phosphate isomerase (*rpi*) dan ribulose 5-phosphate 3-epimerase (*rpe*) untuk meningkatkan produksi limonene tersebut. Limonene merupakan isoprene C10 yang berasal dari geranyl diphosphate (GPP). Untuk itu, prediksi peningkatan limonene menggunakan OptForce geranyl diphosphate synthase (*gpps*) dari *Abies grandis* juga diekspresikan pada jalur biosintesis untuk optimasi produksi limonene ini (Lin *et al.*, 2017).



Gambar 4 Hasil pemodelan komputasional *Synechocystis* 6803 melalui iSyn731 metabolic model (Lin *et al.*, 2017)

Pemodelan produksi limonene pada *Synechocystis* 6803

Studi awal mengenai penelitian dengan menggunakan *Synechocystis* 6803 menunjukkan bahwa produksi isoprene distimulasi oleh senyawa pada jalur Pentosa Fosfat (PP) dan bukan substrat dari jalur methylerythritol 4-phosphate (MEP). Biosintesis isoprene meningkat secara signifikan dengan menambahkan xylulose 5-phosphate (X5P) pada jalur PP, sedangkan penambahan G3P, pyruvate, dan MEP pada jalur MEP tidak menunjukkan peningkatan produksi isoprene. Hal ini menunjukkan bahwa jalur PP memiliki keterkaitan yang cukup

tinggi dengan produksi isoprene (Ershov *et al.*, 2002). Namun saat ini, diketahui produksi limonene pada *Synechocystis* sp. PCC 6803 menunjukkan hasil yang cukup tinggi ketika dilakukan penambahan enzim dari jalur MEP (Jongedijk *et al.*, 2016; Kiyota *et al.*, 2014). Cyanobacteria saat ini diketahui menggunakan jalur MEP untuk memproduksi isopentenyl pyrophosphate (IPP) dan dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP) yang merupakan bahan baku yang digunakan dalam biosintesis isoprenoid. IPP dan DMAPP merupakan molekul yang terdapat pada akhir jalur MEP dan akan mengalami kondensasi hingga menghasilkan substrat difosfat yang kemudian akan dikonversi menjadi isoprenoid dengan

bantuan isoprenoid synthase. Untuk meningkatkan produksi isoprenoid, perlu dilakukan penambahan jumlah kedua senyawa bahan baku tersebut dengan cara meningkatkan fluks karbon menuju jalur MEP (Lin *et al.*, 2017).

Gen yang terlibat dalam jalur MEP dan PP pada dasarnya dapat diover-ekspresikan pada *Synechocystis* 6803. Galur rekombinan menunjukkan peningkatan limonene sebesar 1.4 kali dengan konsentrasi 1 mg/L setelah 30 hari kultivasi (Kiyota *et al.*, 2014). Beberapa penelitian untuk meningkatkan fluks karbon ini sudah dilakukan pada organisme lain selain cyanobacteria, yaitu pada *Anabaena* sp. PCC 7120 (Halfmann *et al.*, 2014; Jahandideh *et al.*, 2017; Johnson *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2017). Hasil menunjukkan bahwa produksi limonene meningkat 6.8 kali dalam 12 hari, namun konsentrasi akhirnya hanya mencapai sekitar 0.5 mg/L. Untuk itu dalam penelitian ini digunakan cyanobacteria sebagai mesin produksinya. Hasil akhir menunjukkan galur rekombinan dapat meningkatkan produksi limonene hingga 2.3 kalinya dengan konsentrasi 6.7 mg/L dalam waktu 7 hari. Rekayasa metabolit sekunder ini digunakan untuk menguji fisibilitas produksi limonene pada *Synechocystis* 6803 dan dapat diaplikasikan pada produksi fototropik dari isoprene lainnya (Halfmann *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2017).

SIMPULAN DAN SARAN

Produksi limonene melalui rekayasa metabolit menggunakan cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 menunjukkan potensi yang menjanjikan untuk meningkatkan hasil produksi limonene secara efisien dan berkelanjutan. Cyanobacterium *Synechocystis* sp. dapat diprogram secara genetik untuk meningkatkan produksi limonene dengan mengkloning penghasil limonene, yaitu limonene synthase (lims) dari tanaman dengan kemurnian limonene yang tinggi seperti *C. limon* dan *M. spicata*. Pemanfaatan cyanobacteria untuk produksi limonene melalui rekayasa metabolit membuka peluang baru dalam produksi senyawa metabolit yang

lebih efisien dalam skala besar.

DAFTAR RUJUKAN

- Alonso-Gutierrez, J., Chan, R., Batth, T. S., Adams, P. D., Keasling, J. D., Petzold, C. J., & Lee, T. S. (2013). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for limonene and perillyl alcohol production. *Metabolic Engineering*, 19, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.05.004>
- Angermayr, S. A., Rovira, A. G., & Hellingwerf, K. J. (2015). Metabolic engineering of cyanobacteria for the synthesis of commodity products. *Trends in Biotechnology*, 33(6), 352–361. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.03.009>
- Behrendorff, J. B., Vickers, C. E., Chrysanthopoulos, P., & Nielsen, L. K. (2013). 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl as a screening tool for recombinant monoterpene biosynthesis. *Microbial Cell Factories*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-76>
- Bentley, F. K., García-Cerdán, J. G., and Chen, H.-C. (2013). Paradigm of monoterpene (β -phellandrene) hydrocarbons production via photosynthesis in cyanobacteria. *Bioenerg. Res.* 6, 917–929. <https://doi.org/10.1007/s12155-013-9325-4>
- Bentley, F. K., and Melis, A. (2012). Diffusion-based process for carbon dioxide uptake and isoprene emission in gaseous/aqueous two-phase photobioreactors by photosynthetic microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.* 109, 100–109. <https://doi.org/10.1002/bit.23298>
- Burnham, Paul M. (2017). Limonene - Molecule of the Month March 2008 [Archived version]. figshare. Journal contribution. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.5427154.v1>
- Chuck, C. J. & D. J. (2014). The compatibility of potential bioderived fuels with Jet A-1 aviation kerosene. *ideas.repec.org*. <https://ideas.repec.org/a/eee/appene/v118y2014icp83-91.html>
- Ciriminna, R., Lomeli-Rodríguez, M., Carà, P.

- D., Lopez-Sanchez, J. A., & Pagliaro, M. (2014). Limonene: a versatile chemical of the bioeconomy. <https://www.semanticscholar.org/paper/Limonene%3A-a-versatile-chemical-of-the-bioeconomy.-Ciriminna-Lomel%C3%AD-Rodr%C3%ADguez/54a7ce45ddfe78844ff0f50e6d957680bde6f6a7>
- Davies, F. K., Work, V. H., Beliaev, A. S., & Posewitz, M. C. (2014). Engineering Limonene and Bisabolene Production in Wild Type and a Glycogen-Deficient Mutant of *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00021>
- Erasto, P., & Viljoen, A. M. (2008). Limonene - A review: Biosynthetic, Ecological and pharmacological Relevance. *Natural Product Communications*, 3(7). <https://doi.org/10.1177/1934578x0800300728>
- Ershov, Y. V., Gantt, R. R., Cunningham, F. X., & Gantt, E. (2002). Isoprenoid Biosynthesis in *Synechocystis* sp. Strain PCC6803 Is Stimulated by Compounds of the Pentose Phosphate Cycle but Not by Pyruvate or Deoxyxylulose-5-Phosphate. *Journal of Bacteriology*, 184(18), 5045–5051. <https://doi.org/10.1128/jb.184.18.5045-5051.2002>
- Flamini, G., Tebano, M., & Cioni, P. L. (2007). Volatiles emission patterns of different plant organs and pollen of *Citrus limon*. *Analytica Chimica Acta*, 589(1), 120–124. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.02.053>
- Halfmann, C., Gu, L., & Zhou, R. (2014). Engineering cyanobacteria for the production of a cyclic hydrocarbon fuel from CO₂ and H₂O. *Green Chemistry*, 16(6), 3175–3185. <https://doi.org/10.1039/c3gc42591f>
- Hodges, A. W., Spreen, T. H. (2012). Economic impacts of Citrus greening (HLB) in Florida, 2006/07–2010/11. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Document No. FE903
- Jahandideh, A., Johnson, T. J., Esmaeili, N., Johnson, M. D., Richardson, J. W., Muthukumarappan, K., Anderson, G. A., Halfmann, C., Zhou, R., & Gibbons, W. R. (2017). Life cycle analysis of a large-scale limonene production facility utilizing filamentous N₂-fixing cyanobacteria. *Algal Research*, 23, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.01.001>
- Johnson, T. J., Jahandideh, A., Johnson, M. D., Fields, K. H., Richardson, J. W., Muthukumarappan, K., Cao, Y., Gu, Z., Halfmann, C., Zhou, R., & Gibbons, W. R. (2016). Producing next-generation biofuels from filamentous cyanobacteria: An economic feasibility analysis. *Algal Research*, 20, 218–228. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.10.020>
- Jongedijk, E., Cankar, K., Buchhaupt, M., Schrader, J., Bouwmeester, H., & Beekwilder, J. (2016). Biotechnological production of limonene in microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(7), 2927–2938. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7337-7>
- Khanijou, J. K., Hee, Y. T., Scipion, C. P. M., Chen, X., & Selvarajoo, K. (2024). Systems biology approach for enhancing limonene yield by re-engineering *Escherichia coli*. *Npj Systems Biology and Applications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41540-024-00440-7>
- Kong, X., Wu, Y., Yu, W., Liu, Y., Li, J., Du, G., Lv, X., & Liu, L. (2023). Efficient Synthesis of Limonene in *Saccharomyces cerevisiae* Using Combinatorial Metabolic Engineering Strategies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(20), 7752–7764. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c02076>
- Kiyota, H., Okuda, Y., Ito, M., Hirai, M. Y., & Ikeuchi, M. (2014). Engineering of cyanobacteria for the photosynthetic production of limonene from CO₂. *Journal of Biotechnology*, 185, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.0>

- [5.025](#)
- Lindberg, P., Park, S., and Melis, A. (2010). Engineering a platform for photosynthetic isoprene production in cyanobacteria, using *Synechocystis* as the model organism. *Metab. Eng.* 12, 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2009.10.001>
- Lin, P., Saha, R., Zhang, F., & Pakrasi, H. B. (2017). Metabolic engineering of the pentose phosphate pathway for enhanced limonene production in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17831-y>
- Muraleedharan, A., Sha, K., Kumar, S., Usha, G., Karthikeyan, P., Kumar, C. P. S., & Joshi, J. (2021). Response of Orchid Cut Flowers as Affected by Floral Preservatives on The Postharvest Quality. *Plant Archives*, 21(Suppliment-1), 1608–1620. <https://doi.org/10.51470/plantarchives.2021.v21.s1.254>
- Shahbazi, Y., & Shavisi, N. (2021). Chapter 4 - Limonene. In M. Mushtaq & F. Anwar (Eds.), *A Centum of Valuable Plant Bioactives* (pp. 77–91). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2019-0-04618-3>
- Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P. D., Brkić, D., & Van Griensven, L. J. L. D. (2010). Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs Using an in vitro model. *Molecules*, 15(11), 7532–7546. <https://doi.org/10.3390/molecules15117532>
- Tracy, N. I., Chen, D., Crunkleton, D. W. & Price, G. L. (2009). Hydrogenated monoterpenes as diesel fuel additives. *Fuel*, 88 (11): 2238–2240. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2009.02.002>
- Tranchida, P. Q., Zoccali, M., Bonaccorsi, I., Dugo, P., Mondello, L., & Dugo, G. (2013). The off-line combination of high performance liquid chromatography and comprehensive two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry: A powerful approach for highly detailed essential oil analysis. *Journal of Chromatography A*, 1305, 276–284. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.042>
- Zhang, X., Liu, X., Meng, Y., Zhang, L., Qiao, J., & Zhao, G. (2021). Combinatorial engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improving limonene production. *Biochemical Engineering Journal*, 176, 108155. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108155>