

# **Fotosynteesittisten solutehtaiden biotuotannon parantaminen fotomiksotrofian avulla**

TkK-tutkielma  
Turun yliopisto  
Bioteknologian laitos  
Biotekniikka  
Huhtikuu 2024  
Aino Kauppinen

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

TURUN YLIOPISTO

Bioteknologian laitos

AINO KAUPPINEN: Fotosynteettisten solutehtaiden biotuotannon parantaminen  
fotomiksotrofian avulla

Tutkielma, 21 s.

Biotekniikka

Huhtikuu 2024

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

---

Ilmastonmuutoksen ja maapallon väestön kasvun seurauksena etsitään vaihtoehtoisia tapoja tuottaa polttoaineita, kemikaaleja ja ravintoaineita ilman fossiilisia polttoaineita. Vaihtoehdoksi esitetään uusiutuvia tapoja tuottaa biopolttoaineita ja kemikaaleja, joiden tuotannossa mikrobit hyödyntävät esimerkiksi orgaanista jätettä ja teollisuuden sivuvirtoja.

On olemassa mikrobeja, jotka ovat heterotrofisia eli toisenvaraisia sekä autotrofisia eli omavaraisia. Heterotrofiset mikrobit eivät pysty itse tuottamaan energiaansa, vaan hankkivat energiansa pilkkomalla ravintoaineita. Omavaraiset mikrobit voivat tuottaa energiansa itse esimerkiksi fotosynteesillä. Fotosynteesissä mikrobi tuottaa hiilidioksidista ja vedestä valon energiaa hyödyntäen energiaa sisältäviä hiilihydraatteja.

Luonnossa fotomiksotrofiaan pystyvät eliöt hyödyntävät energiantuotannossaan fotosynteesiä ja sokeriaineenvaihduntaa samanaikaisesti. Fotomiksotrofisia organismeja ovat esimerkiksi osa syanobakteerieista ja mikrolevistä. Näiden eliöiden aineenvaihdunta voidaan valjastaa haluttujen yhdisteiden tuotantoon, joten eliöt muuntautuvat eläviksi solutehtaiksi. Tämän tutkielman tarkoituksena on perehtyä fotomiksotrofiaan, sen avulla tuotettaviin tuotteisiin, sen haasteisiin ja etuihin sekä keinoihin, joilla fotomiksotrofista tuotantotapaa voidaan tehostaa. Lisäksi tutkielmassa verrataan fotomiksotrofista tuotantotapaa muihin tuotantotapoihin.

Fotomiksotrofian avulla voidaan tuottaa useita erilaisia yhdisteitä. Näitä ovat esimerkiksi biopolttoaineet, kuten 2,3-butaanidioli, isopropanoli, isobutanoli ja etyleeni. Muita tuotettavia orgaanisia yhdisteitä ovat esimerkiksi poly-3-hydroksibutyraatti ja sukkiinaatti sekä ravintolisät (SCP), triasyyliglyseroli, ja rasvahapot (EPA ja DHA).

Fotomiksotrofista biotuotantoa voidaan tehostaa eliöiden geneettisellä muokkauksella tai ympäristöolosuhteita muuttamalla. Eliöiden genomista voidaan poistaa tiettyjä geenejä tai vaihtoehtoisesti ylituottaa haluttua proteiinia. Synteettisen biologian avulla näihin eliöihin voidaan rakentaa uusia aineenvaihduntareittejä, joita näillä eliöillä ei luonnostaan ole. Geneettinen muokkaus vaatii kehittyneitä työkaluja ja on tärkeässä roolissa, kun puhutaan syanobakteereiden ja mikrolevien fotomiksotrofisen tuotannon tehostamisesta. Ympäristöolosuhteita voidaan tehostaa esimerkiksi pH:ta muuttamalla ja käyttämällä lisähiililähteitä, jona voi toimia esimerkiksi ksyloosi.

Jotta fotomiksotrofiaa saataisiin sovellettua teollisessa tuotannossa, vaatii se vielä lisää tutkimusta ja kehitystä. Fotomiksotrofisella biotuotannolla on potentiaalia sekä ravinnon- että energiantuotantoon. Lisäksi on mahdollista tuottaa yhdisteitä, joiden markkina-arvo on suuri ja joita voidaan tuottaa kestävämmiin kuin nykyisellään teollisuudessa.

Asiasanat: fotomiksotrofia, fotosynteesi, elävä solutehdas, kestävä biotuotanto

## Sisällys

Sisällys .....	1
1 Johdanto .....	2
2 Fotomiksotrofisissa mikrolevissä tuotetaan yhdisteitä monipuolisesti .....	3
2.1 Polttoaineet.....	4
2.1.2 2,3-butaanidioli .....	4
2.1.2 Isopropanoli .....	4
2.1.3 Isobutanoli.....	5
2.1.4 Etyleeni .....	5
2.2 Kemikaalit .....	6
2.2.1 Poly-3-hydroksibutyraatti .....	6
2.2.2 Sukkinaatti .....	6
2.3 Ravintolisät .....	7
2.3.1 Single-cell-protein (SCP).....	7
2.3.2 Triasyyliglyseroli .....	7
2.3.3 Eikosapentaeenihappo (EPA) ja dokosaheksaeenihappo (DHA).....	8
3 Fotomiksotrofian edut verrattuna pelkkään fotosynteesiin biotuotannossa .....	8
4 Fotomiksotrofisten mikrolevien kasvatusta biotuotannossa .....	10
4.1 Bioreaktorit .....	10
4.2 Allaskasvatusta .....	10
5 Fotomiksotrofian haasteet .....	10
6 Fotomiksotrofian tehokkuuden parantaminen.....	11
6.1 Perimän muokkaus geentiteknologian menetelmin .....	11
6.2 Kasvatusolosuhteiden optimointi .....	13
7 Fotomiksotrofian tuotanto verrattuna muuhun teollisuuteen .....	14
8 Yhteenveto .....	16
Lähteet.....	17

# 1 Johdanto

Ilmastonmuutos on kasvattanut kiinnostusta uusiutuvia polttoaineita kohtaan. Tähän on vaikuttanut myös fossiilisten polttoaineiden ehtyminen. Ilmastonmuutoksen torjunta asettaa tavoitteita päästä eroon energiatuotannon ja liikenteen fossiilisista polttoaineista. Kiinnostuksen kohteina ovat toisen sukupolven biopolttoaineet, jotka hyödyntävät orgaanista jätettä ja teollisuuden sekä maatalouden sivuvirtoja, kuten lantaa. Biopolttoaineiden tuotanto on teknisesti ja taloudellisesti järkevää, jos ne ovat hinnaltaan kilpailukykyisiä fossiilisten polttoaineiden kanssa. (Rutila 2020.)

Kolmannen ja neljännen sukupolven biopolttoaineita voidaan valmistaa levillä. Ne ovat herättäneet paljon huomiota, koska niiden käsittely on suhteellisen yksinkertaista. Lisäksi ne sitovat paljon hiilidioksidia. Leviä voidaan viljellä jäte- ja merivedessä, sekä tuottamattomilla kuivilla ja syrjäisillä viljelyalueilla, jolloin ne eivät kilpaile peltomaalla tai makean veden ympäristössä viljeltävien ravintokasvien kanssa. (Abdullah ja muut 2019.)

Fotosynteesistä povataan yhtä ratkaisua ilmastonmuutokseen. Siinä solu tuottaa energiaa hiilidioksidista ja vedestä hyödyntäen valon energiaa. Fotosynteesissä auringon säteilyenergiaa muutetaan kemialliseksi energiaksi. Sokeriaineenvaihdunnassa solu pilkkoo sokeria pienemmiksi molekyyleiksi, jolloin muodostuu energiaa adenosiinitrifosfaatti-molekyylin (ATP) muodossa ja hiilidioksidia sekä vettä.

Fotomikсотrofias sa solu voi tuottaa molekyylejä hyödyntäen sekä fotosynteesiä että sokeriaineenvaihduntaa. Fotomikсотrofinen kasvu tarjoaa ylimääräisiä energian ja hiilen lähteitä mahdollistaen solujen kasvun ja kemiallisen tuotannon sekä lyhytketjuisista hiilivedyistä että hiilidioksidista. Fotoautotrofisissa olosuhteissa kasvu riippuu yksinomaan valosta ja hiilidioksidista. (Song ja muut 2021.)

Luonnossa fotomikсотrofiset solut hyödyntävät fotosynteesiä ja sokeriaineenvaihduntaa vuorotellen tai samanaikaisesti olosuhteista riippuen, eli eliö voi olla energiataloudellisesti yhtä aikaa tai vuorotellen sekä autotrofi että heterotrofi (Solymosi ja muut 2020). Autotrofit eivät tarvitse ulkopuolista energiaa, vaan saavat tehtyä oman energiansa esimerkiksi auringon valoenergiaa tai muuta pelkistysvoimaa hyödyntäen. Heterotrofit taas ovat riippuvaisia ulkopuolisista energianlähteistä, joita ovat orgaaniset

ravintoaineet, kuten glukoosi, koskaheterotrofit eivät kykene tuottamaan orgaanisia yhdisteitä epäorgaanisista aineista. (Solymosi ja muut 2020).

Fotomiksotrofiasta toivotaan ratkaisua hiilineutraaliin tuotantoon niin isossa kuin pienemmässäkin mittakaavassa. Isossa mittakaavassa voidaan tuottaa esimerkiksi biopolttoaineita ja pienessä mittakaavassa ravintolisiä. Hiilineutraaliuden lisäksi fotomiksotrofia on fotosynteesin ansiosta hyvä tapa sitoa hiilidioksidia ilmakehästä.

Fotomiksotrofiaan pystyvät eräät bakteerit ja levät. Syanobakteerit hyödyntävät valoenergiaa sitoen tehokkaasti hiilidioksidia biomassaksi, mikä tekee niistä käyttökelpoisia isäntiä öljypohjaisten tuotteiden biovaihtoehtojen tuottamiseen (Matson ja Atsumi 2018). Syanobakteereissa fotomiksotrofista kasvua pidetään lupaavana strategiana saavuttaa sekä korkea solutiheys että tuotteen kertyminen (Song ja muut 2021).

Mikrolevät voivat edistää elintarviketurvaa tuottamalla kestävästi proteiineja ja lipidejä, joita tarvitaan vastaamaan väestönkasvuun ja ympäristöhaasteisiin. Mikrolevät ovat mikro-organismeja, jotka pystyvät kasvamaan käyttämällä valoa, lannoitteita, sokereita, hiilidioksidia ja jopa merivettä. Niillä on suuri potentiaali elintarvikkeiden, rehujen, energian ja kemikaalien raaka-aineena. Tällä hetkellä maailman mikrolevien markkinat ovat noin 75 000 tonnia biomassaa. (Barbosa ja muut 2023.)

Tämän tutkielman tarkoitus on perehtyä syanobakteereiden ja mikrolevien hyödyntämiseen fotomiksotrofisissa tuotantomenetelmissä: sen mahdollisuuksiin ja haasteisiin sekä lisäksi siihen, minkälainen sen nykyinen tilanne on verrattuna perinteiseen teollisuuteen.

## 2 Fotomiksotrofisissa mikrolevissä tuotetaan yhdisteitä monipuolisesti

Soluilla, jotka hyödyntävät fotomiksotrofista aineenvaihduntatapaa, voidaan tuottaa ison mittakaavan tuotannolla kemikaaleja, kuten biopolttoaineita, sekä pienemmässä mittakaavassa olevia ravintolisiä (Tan ja muut 2022). Ison mittakaavan tuotannossa voidaan tuotannolla tuotetaan esimerkiksi biodieseliä, jota tuotetaan vuosittain lähes 9,5 miljardia litraa (Matson ja Atsumi 2018). Nykyiset tutkimukset osoittivat, että

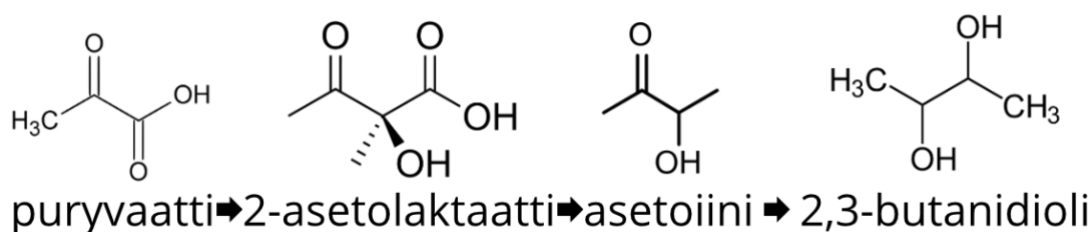
monenlaisia kemikaaleja, kuten alkoholeja, happoja ja alkaaneja, on tuotettu onnistuneesti muunnetuilla syanobakteereilla.

## 2.1 Polttoaineet

### 2.1.2 2,3-butaanidioli

2,3-butaanidioli on tärkeä polttoaineiden raaka-aine. Se on tärkeä lähtöaine myös teollisille liuottimille ja erilaisille polymeereille, kuten kumille ja muoville. (Matson ja Atsumi 2018.) Se on ihanteellinen kohdetuote, koska se on ominaisuuksiltaan suhteellisen myrkytön ja haihtumaton. Sille on vuoteen 2030 mennessä ennustettu 300 miljoonan dollarin markkinat (Gonzales ja muut 2023). Ihanteellisen siitä tekee myös sen lyhyt ja yksinkertainen biosynteesireitti pyruvaatista, joka on glykolyysin lopputuote. (Gonzales ja muut 2023.)

2,3-butaanidiolia voidaan tuottaa syanobakteereilla (Matson ja Atsumi 2018). Sen tuottaminen koostuu kolmivaiheisesta reitistä, jossa hiilidioksidia sidotaan 2,3-butaanidioliksi (kuva 1). Ensimmäisessä vaiheessa pyruvaatti muunnetaan 2-asetolaktaatiksi, joka edelleen muunnetaan asetolaktaattisyntaasin ja asetolaktaattidekarboksylaasin avulla asetoiiniksi. Sekundaarisen alkoholidehydrogenaasin avulla asetoiini pelkistyy 2,3-butaanidioliksi. (Matson ja Atsumi 2018.)

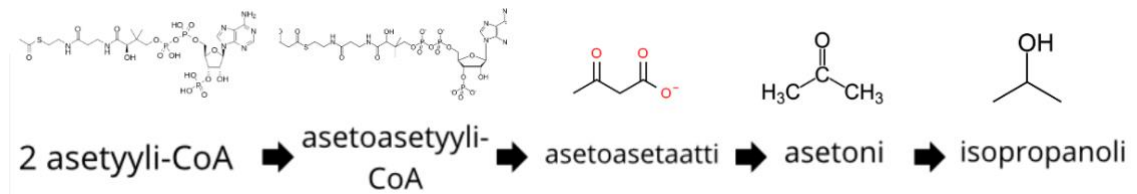


**Kuva 1.** 2,3-butaanidiolin tuoton kolmivaiheinen reitti.

### 2.1.2 Isopropanoli

Isopropanolia voidaan käyttää suoraan bensiinin korvikkeena. Jotkin mikrobit tuottavat isopropanolia luonnostaan, mutta eivät teollisesti merkityksellisissä määrin. (Matson ja Atsumi 2018.) Sitä tuotetaan nelivaiheisella biosynteesireitillä (**kuva 2**). Ensin kaksi asetyyli-CoA-molekyyliä tiivistyy asetoasetyyli-CoA:ksi, jotka siirretään asetaattiin, ja

edelleen muodostuu asetoasettaattia. (Kusakabe ja muut 2013.) Asetoasettaatti dekarboksyloityy asetoniksi, eli asetoasetaatista syntyy molekyyli, jossa on yksi hiiliatomi vähemmän. Sivutuotteena dekarboksyloinnista vapautuu hiilidioksidia. Dehydrogenoinnin avulla asetoni muutetaan isopropanoliksi ja poistetaan molekyylistä vetyatomeja. (Matson ja Atsumi 2018.)



**Kuva 2.** Isopropanolin nelivaiheinen biosynteesireitti.

### 2.1.3 Isobutanoli

Isobutanolin energiatiheys on suurempi kuin etanolin, mikä tekee siitä ihanteellisen biopolttoainekandidaatin. Sitä on tuotettu mikro-organismeissa riittävän suurina saantoina, jotta se voisi olla mahdollinen kilpailija bensiinin kanssa. (Lamsen ja Atsumi 2012.) Isobutanolia voidaan tuottaa esimerkiksi viisivaiheisella synteesireitillä syanobakteeri *Synechococcus elongatus* PCC 7942-soluissa (Atsumi ja muut 2009). Ensimmäisessä vaiheessa pyruvaatista tulee 2-asetolaktaattia, josta muodostuu edelleen 2,3-dihydroksi-isovaleraattia. 2,3-dihydroksi-isovaleraatista tulee 2-ketooivaleraattia, josta tehdään isobutyryrialdehydi. Isobutyryrialdehydistä muodostuu isobutanolia. (Atsumi ja muut 2009.)

### 2.1.4 Etyleeni

Etyleenin käyttökohteet vaihtelevat muovista polttoaineisiin (Desai ja muut 2016). Kasvit tuottavat luontaisesti etyleeniä metioniini-aminohaposta (Wang ja muut 2002). Se voi kuitenkin korkeina pitoisuuksina vahingoittaa niiden kasvua. Etyleeni esimerkiksi rajoittaa solujen pidentymistä. Tämän takia kasvit eivät ole potentiaalisia etyleenin tuotanto-organismeja. (Wheeler ja muut 1996.) Etyleeniä voidaan tuottaa syanobakteeri *Synechocystis* 6803 soluissa, jossa sen toteuttamiskelpoisen synteettinen reitti on sitruunahappokierron (TCA-syklin) välituotteen, 2-ketoglutaraatin, ja arginiinin muuntaminen etyleeniksi (Ungerer ja muut 2012).



TCA-syklion soluissa tapahtuva prosessi, jossa molekyylin hiiliatomit hapettuvat hiilidioksidiksi ja vedyt siirtyvät elektroninsiirtäjäkoentsyymille. Tässä prosessissa vapautuu energiaa. (Martínez-Reyes ja Chandel 2020.)

## 2.2 Kemikaalit

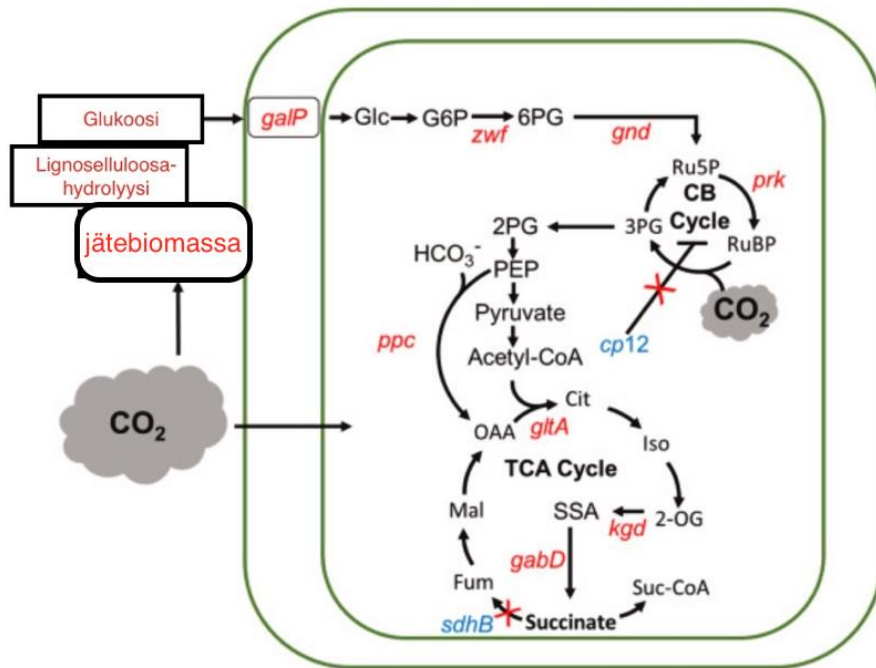
### 2.2.1 Poly-3-hydroksibutyraatti

Poly-3-hydroksibutyraatti on biohajoava polymeeri, josta saadaan vaihtoehto öljypohjaisille muoveille (G.-Q. Chen 2009). Poly-3-hydroksibutyraatin tuotannon siirtäminen syanobakteereihin mahdollistaisi sen kaupallistamisen, sillä se alentaisi tuotantokustannuksia (Matson ja Atsumi 2018). Poly-3-hydroksibutyraatin tuotanto on mahdollista kolmen entsyymattisen vaiheen biosynteesireitillä: kaksi asetyyli-CoA-molekyyliä kondensoituu asetoasetyyli-CoA:ksi, joka pelkistyy (3)-3-hydroksibutyryl-CoA:ksi, joka edelleen kondensoituu poly-3-hydroksibutyraatiksi (Khetkorn ja muut 2016).

### 2.2.2 Sukkinaatti

Sukkinaatti on tärkeä teollisuuskemikaali, jota voidaan käyttää monenlaisten tuotteiden tuottamiseen lääkkeitä biopolymeereihin (Treece ja muut 2023). Erityisesti sukkinaattipohjaisilla biomuoveilla voidaan korvata useita jokapäiväisiä tuotteita, mikä voi pienentää hiilijalanjälkeämme entisestään korvaamalla vaikeasti kierrätettäviä polymeeripohjaisia tuotteita. Sukkinaatin teolliseen tuotantoon on käytetty useita biopohjaisia alustoja, kuten heterotrofisia organismeja, jotka kykenevät suureen luonnolliseen tuotantoon, kuten *Mannheimia succiniciproducens* tai perinteisiä malliorganismeja, kuten *Escherichia coli* (Treece ja muut 2023).

Kuvassa 3 on esitelty sukkinaatin tuotantoreitti fotomikсотrofisella tuotantotavalla. Treecen ja muiden (2023) tekemä tutkimus osoittaaakin, että fotomikсотrofiaa voidaan soveltaa syanobakteereiden sukkinaattituotannon tehostamiseen.



**Kuva 3.** Fotomiksotrofisen sukkiniaanin tuotantoreitti. (muokattu kuvasta Treece ja muut, 2023).

## 2.3 Ravintolisät

### 2.3.1 Single-cell-protein (SCP)

Single-cell-protein (SCP) tarkoittaa korkean proteiinipitoisuuden omaavaa kuivattua mikro-organismimassaa, joka koostuu esimerkiksi mikrolevästä. Mahdollisia eliöitä tuottaa niitä ovat mikrolevät, sienet, hiivat tai bakteerit. Elintarvikkeiden tuotanto, mukaan lukien SCP:n, vaatii typpi- ja fosforilannoitteiden käyttöä. (Barbosa ja muut 2023.)

Erityisesti mikroleviin perustuvan SCP:n osalta viimeaikainen kehitys on tarjonnut mahdollisuuden parantaa tuottavuutta (Barbosa ja muut 2023). Uusia, kestäviä kantoja on muokattu, kuten viherlevä *Picochlorum* spp. Tämä kanta sietää korkeita lämpötiloja ja korkean intensiteetin valoa, sillä on korkea kasvunopeus (kahdentumisaika alle 2 tuntia) ja sen raportoitu proteiinipitoisuus on 40–55 %. (R. J. P. Barten ja muut 2020; R. Barten ja muut 2022; Dahlin ja muut 2019; Weissman ja muut 2018; Rasheed ja muut 2022.)

### 2.3.2 Triasyyliglyseroli

Triasyyliglyseroli (TAG) on lipidi ja sen suurin lähde on palmuöljy, joka on johtanut massiiviseen metsien hävittämiseen. Triasyyliglyserolia käytetään muun muassa biodieselissä, kosmetiikassa, henkilökohtaisessa hygieniassa ja elintarvikkeiden ainesosissa. Fotomiksotrofisesti sitä voidaan tuottaa mikrolevissä (Barbosa ja muut 2023.)

### 2.3.3 Eikosapentaeenihappo (EPA) ja dokosaheksaeenihappo (DHA)

Eikosapentaeenihappo (EPA) ja dokosaheksaeenihappo (DHA) ovat omega-3 pitkäketjuisia monityydyttymättömiä rasvahappoja, joita voidaan tuottaa mikrolevissä. Tällä hetkellä kalaöljy on tärkein kyseisten rasvahappojen lähde ihmisen ruokavaliassa. Mikrolevissä omega-3 pitkäketjuisia monityydyttymättömiä rasvahappoja tuotetaan kasvun aikana ja ne kerääntyvät soluun, pääasiassa plastidikalvoihin. (Barbosa ja muut 2023.)

## 3 Fotomiksotrofian edut verrattuna pelkkään fotosynteesiin biotuotannossa

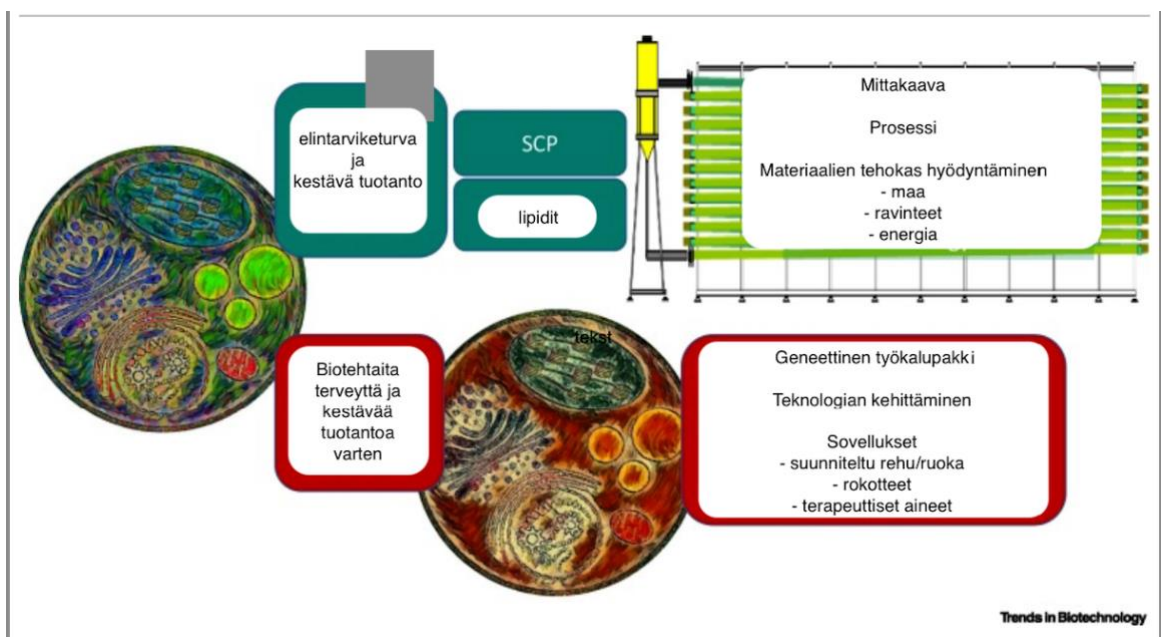
Syanobakteerien fotomiksotrofista viljelyä pidetään lupaavana strategiana, jolla voidaan saavuttaa sekä suuri solutiheys että tuotteiden kertyminen. Tämä on seurausta siitä, että syanobakteerit voivat saada hiilen ja energian lähteitä orgaanisesta aineesta hiilidioksidin ja auringonvalon lisäksi. (Yao ja muut 2022.)

Fotomiksotrofia yhdistää autotrofisen ja heterotrofisen aineenvaihdunnan. Näiden molempien troofisten tilojen läsnäolo samassa kannassa voi saavuttaa korkeammat solutiheydet tietyllä valolla, voi lisätä biomassan saantoa hiilellä, sekä yli kaksinkertaista tilavuudellista biomassan tuottavuutta. (Barbosa ja muut 2023; Abiusi ja muut 2020.) Dutt ja Srivastava (2018) tekemässä tutkimuksessa fotomiksotrofisesti kasvatettujen solujen kasvunopeus oli suurempi verrattuna fotoautotrofisesti kasvatettuihin soluihin.

Syanobakteereilla on monia teollisesti merkittäviä etuja verrattuna kasveihin: nopeampi kasvuvauhti, parempi soveltavuus geenitekniikkaan sekä korkeampi hiilidioksidin käyttöaste (Field ja muut 1998). Suolaisen veden kannat vähentävät makean veden kulutusta, eivätkä ne kilpaile viljelykasvien kanssa peltoalasta (Matson ja Atsumi 2018).

Fotosynteettisen prokaryoottien mikсотrofisen kasvatuksen huomattava etu on, että sillä voidaan välttää pelkkä riippuvuus luonnollisesta auringonvalosta, sillä fotosynteettinen aktiivisuus on vähäistä tai puuttuu kokonaan, kun solutiheyttä lisätään tai vallitsee pimeä jakso (Matson ja Atsumi 2018). Oksidatiivisen pentofosfaattireitin glykolyyttisten välituotteiden ja elintärkeiden metaboliittien solusisäiset poolikoot olivat korkeampia fotomiksotrofisissa olosuhteissa verrattuna autotrofisiin olosuhteisiin, mikä viittaa siihen, että pelkistetyn hiilen lisääminen solukasvatukseen saattaa olla arvokasta kemikaalien tuotannossa (Song ja muut 2021).

Hiilidioksidin ja orgaanisen hiilen yhteiskäyttö tarjoaa lisää rakennuspalikoita haluttujen molekyylien muodostamiselle ja energiaa, jolloin fotomiksotrofinen aineenvaihdunta on erityisen lupaavaa syanobakteerien tulevalle kaupallistamiselle. Tämä mahdollistaa tehostetun fotomiksotrofisen tuotannon, suuremman solutiheyden ja mahdollistaa siten tuotannon teollisessa mittakaavassa (Song ja muut 2021) (Saitoh ja muut 2017). Huomioitavaa on, että fotomiksotrofinen tuotanto on nostanut tuotettavien yhdisteiden tiittereitä jopa viisinkertaiseksi perinteisiin autotrofisiin olosuhteisiin verrattuna (Matson ja Atsumi 2018). Soveltaminen teollisuudessa on kuitenkin mahdollista vasta, kun tuottavuutta on parannettu entisestään. Mikrolevien biotuotteiden paletin laajentaminen vaatii tehokkaita työkaluja teollisesti merkittävien kantojen geneettiseen manipulointiin (kuva 4).



**Kuva 4.** Tärkeimmät sovellukset ja erityiset haasteet mikrolevillä. (muokattu kuvasta Barbosa ja muut, 2023).

## 4 Fotomikсотrofisten mikrolevien kasvatus biotuotannossa

Fotomikсотrofisia mikroleviä voidaan kasvattaa sekä bioreaktoreissa että allaskasvatuksissa. Kummankin kasvatustavan etuna on se, ettei se vie tilaa maataloudessa käytettäviltä peltomailta.

### 4.1 Bioreaktorit

Bioreaktorit ovat säiliöitä tai astioita, joissa kokonaiset solut tai entsyymit muokkaavat raaka-aineita biokemiallisiksi tuotteiksi tai vähemmän haitallisiksi sivutuotteiksi.

Teollisia bioreaktoreita voidaan käyttää panosreaktoreina tai jatkuvasti, aerobisesti tai anaerobisesti ja puhtailla tai sekaviljelmillä. (Erickson 2009.) Bioreaktoreiden käytössä on myös haasteita. Tärkeimpiä haasteita ovat valon tasainen jakautuminen, hapen poisto, riittävän sekoituksen aikaansaaminen ja hiilidioksidin johtaminen systeemiin. (Rutila 2020.) Bioreaktoreissa, jotka käyttävät suljettua järjestelmää, voidaan saavuttaa korkeampi tuottavuus ja ne ovat yleensä vastustuskykyisempiä kontaminaatiolle tai muille ympäristövahingoilla (Lane 2022).

### 4.2 Allaskasvatus

Mikroleväviljelyyn parhaiten soveltuva järjestely suuressa mittakaavassa on avoin lammikkoviljely. Se on kuitenkin erittäin altis biologiselle saastumiselle. (Lam ja muut 2018.) Vaikka allaskasvatusjärjestelmät on helppo rakentaa, ne ovat alttiita valorajoituksille ja ympäristön aiheuttamalle stressille, jotka haittaavat levän kasvua (Novoveská ja muut 2023). Jos avoviljelmissä valmistetaan neljännen sukupolven biopolttoaineita, niihin liittyy riskejä, jotka koskevat terveyttä ja ympäristöä (Abdullah ja muut 2019).

## 5 Fotomikсотrofian haasteet

Lisähiililähteiden kustannukset fotomiksotrofisissa olosuhteissa on yksi ratkaisevasta tekijöistä, joka vaikuttaa sen taloudelliseen toteutettavuuteen. Hiililähteitä on mahdollista lisätä esimerkiksi käyttämällä teollisuuden sivuvirtoja, joissa on mikroleville käyttökelpoisia hiiliyhdisteitä. Kuitenkin ongelmana on se, että monet kannat eivät luontaisesti kykene hyödyntämään sivuvirtoja, vaan kantoja on muokattava geneettisesti. Ksyloosi on lignoselluloosan pääkomponentti ja luonnossa esiintyvä toiseksi runsain sokeri glukoosin jälkeen, minkä vuoksi sitä on pidetty lupaavana uusiutuvana luonnonvarana biopolttoaineiden ja kemikaalien tuotannossa. (Van Dyk ja Pletschke 2012a.) (Zhao ja muut 2020.) Yhdenkään syanobakteerikannan ei kuitenkaan tiedetä luonnollisesti hyödyntävän ksyloosia (Yao ja muut 2022).

Fotomiksotrofiset kasvusaannot ovat usein suurempia kuin fotoautotrofisten ja heterotrofisten tuottojen summa (X. Chen ja muut 2016; Chojnacka ja Zielińska 2012; Liang ja muut 2009). Tämä osoittaa, että fotomiksotrofia on enemmän kuin pelkkä fotoautotrofian ja heterotrofian summa. Se on pikemminkin erilainen aineenvaihdunta. Syanobakteerien fotomiksotrofisen aineenvaihdunnan tutkiminen vaikuttaa merkitykselliseltä, koska sen kvantitatiivinen ymmärrys on avain optimoituihin solutehtaisiin (Schulze ja muut 2022.) Fotoautotrofiset tuotantonopeudet ja esimerkiksi sukkinat saannot jäävät kuitenkin huomattavasti pienemmiksi kuin heterotrofisista järjestelmistä (Ahn ja muut 2016; Lee ja muut 2011).

## 6 Fotomiksotrofian tehokkuuden parantaminen

### 6.1 Perimän muokkaus geentiteknologian menetelmin

Organismeja voidaan muokata geneettisesti poistamalla tai lisäämällä niihin geenejä. Näin organismeihin saadaan lisättyä haluttuja ominaisuuksia tai poistettua epätoivottuja ominaisuuksia. Esimerkiksi plasmidin siirrolla saadaan muokattua bakteerin DNA:ta niin, että se alkaa tuottamaan haluttua lopputuotetta. Muokattujen fotomiksotrofisten syanobakteerien systemaattinen analyysi molekyylitasolla on välttämätöntä, jotta tämän synteettisen strategian mahdollisuuksia parantaa biotuotantoa voidaan tutkia edelleen (Tan ja muut 2022).

Mikrolevälajeilla genominmuokkausmenetelmien kehittäminen on äärimmäisen tärkeää, mutta aikaa vievää. Teollisesti merkittävien mikrolevien geneettinen työkalupakki usein puuttuu verrattuna muihin mikrobeihin. Kehittynyt aineenvaihdunnan muokkaus vaatii täydellisemmän molekyylyökalupaketin, joka sisältää useita eri vahvuisia transkription promoottorielementtejä, mukaan lukien indusoituvat promoottorit, transkription terminaattorit, valintamarkkerit, geneettiset kytkimet ja translaatioelementit, kuten sisäiset ribosomien sitoutumiskohdat ja ribokytkimet. (Barbosa ja muut 2023.)

Kehittyvä genetiikka yhdistettynä tehokkaaseen genotyypitykseen ja vankkoihin suuritehoisiin seulontamenetelmiin voivat auttaa määrittämään geenitoimintoja ja tunnistamaan geenejä, jotka ovat olennaisia halutun ominaisuuden kannalta (Südfeld ja muut 2021; Lu ja muut 2021; Osorio ja muut 2019; Dahlin ja muut 2019). Vaikka lupaus tulevista geneettisistä seulontamenetelmistä on kiistaton, vain muutama mikrolevägeeni on toistaiseksi yhdistetty fenotyyppiin satunnaisten mutageneesistrategioiden avulla. Lisäksi useimmat näistä geeneistä odottavat perusteellista toiminnallista karakterisointia. (Barbosa ja muut 2023.)

Geneettisesti mikroleviä voidaan muokata tehokkaammiksi esimerkiksi lisäämällä niihin kuljetusproteiineja, joilla sokereita voidaan siirtää sekä solun sisälle että ulkopuolelle. Jotta 2,3-butaanidiolin fotomikсотrofien tuotanto olisi valojakson aikana mahdollista, asennettiin syanobakteeri *Synechococcus elongatus* PCC 7942:een glukoosin, sakkaroosin ja ksyloosin sokerinsiirtimet. Tuottavuutta saatiin parannettua 1,8-kertaiseksi, kun 2,3-butaanidiolin reitin geenin ilmentymistasoja optimoitiin muuttamalla ribosomaalisten sitoutumiskohtien voimakkuutta. (McEwen ja muut 2016.)

Glukoosin muuntamiseksi asetyyli-CoA:ksi korkealla tehokkuudella suunniteltiin ei-hapettava syklinen glykolyysireitti (NOG) syanobakteeri *Synechocystis* 6803:ssa, joka voi hajottaa yhden glukoosin teoreettisesti enintään kolmeksi asetyyli-CoA:ksi (Bogorad ja muut 2013). Tämä NOG-reitti käyttää *Bifidobacterium adolescentis*-bakteerista peräisin olevaa bifunktionaalista fosfoketolaadia, joka katalysoi fruktoosi-6-fosfaatin muuttumista asetyylifosfaatiksi ja erytroosi-4-fosfaatiksi (Meile ja muut 2001; Song ja muut 2021). Tässä tuotantostrategiassa syanobakteeriin siis tuotiin synteesireitti toisesta organismista.

Poistamalla *sytokromi(M)*-geenikierrettiin prosessi, jossa fotomikсотrofien kasvu johtaa Q(A)(-) reoksidaation asteittaiseen estymiseen ja siten valoreaktio II:n toiminnan

heikkenemiseen *Synechocystis*-solussa. Tämä prosessi vähentää fotosynteesin inhibitiota suurelta osin kasvun aikana. *Delta syntokromi(M)* -kanta eli kanta, josta *cytM*-geeni oli poistettu, säilyttiaktiivisen fotosynteesiin kasvettuaan kolme päivää fotomikсотrofisissa oloissa, mikä näkyi suurina fotosynteettisinä O(2)- ja CO(2)-virtoina sekä PSI:n ja PSII:n tehokkaina tuotoksina. Kaiken kaikkiaan tämä johti korkeampaan kasvuvauhtiin verrattuna villityyppeihin. (Solymosi ja muut 2020.)

Sigmatelijä SigE:n inaktivointi *Synechocystis* 6803:ssa vähensi glykolyysiin, oksidatiiviseen pentoosifosfaatti-reittiin ja glykokeenikataboliaan osallistuvien geenien transkriptiotasoa (Osanai ja muut 2005). Näin ollen SigE on sokerikatabolian positiivinen säätelijä (Dong ja muut 2016; Osanai ja muut 2011).

## 6.2 Kasvatusolosuhteiden optimointi

Soluja voidaan kasvattaa biotuotannon tarpeisiin ympäristössä, jonka olosuhteita voidaan hallita. Esimerkiksi bioreaktoreissa kasvatettuna solujen olosuhteita voidaan säädellä niiden tarpeiden mukaan mahdollistaen solujen optimaalisen kasvun ja niissä valon määrää ja laatua, lämpötilaa ja pH:ta voidaan muokata.

Etyleenin tuotannossa tuottavuutta saatiin lisättyä, kun lisähiililähteenä käytettiin ksyloosia. Ksyloosi lisää virtausta sitruunahappokierron läpi (Yao ja muut 2022). Ksyloosia on pidetty lupaavana uusiutuvana luonnonvarana biopolttoaineiden ja kemikaalien tuotannossa sen runsaan luonnossa esiintymisen vuoksi (Van Dyk ja Pletschke 2012; Zhao ja muut 2020). Ksyloosi on lignoselluloosan pääkomponentti. Ksyloosin hyödyntämiseksi syanobakteereissa on otettava käyttöön ksyloosispesifisiä kuljetusjärjestelmiä koodaavia geenejä, kuten *xyIE*, joka on major facilitator superfamily -kuljettaja, joka toimii suhteellisen matala-affiniteettisena ksyloosi/protonisymporтерina (Davis ja Henderson 1987; Jojima ja muut 2010). Lisäksi voidaan hyödyntää *xyIFGH*-operonia, joka on ATP:tä sitovaan transportteriperheeseen kuuluva korkea-affiniteettinen ksyloosin kuljettajakompleksi, jotta saadaan aikaan ksyloosin kuljetus soluihin. (Yao ja muut 2022). Kaikilla tämän tyyppisillä kuljetusproteiineilla on ydinrakenne, joka koostuu kahdesta transmembraanidomeenista, jotka tunnistavat substraatin ja helpottavat translokaatiota, sekä kahdesta nukleotideja sitovasta domeenista ATP:n sitomistaenergian tuottamiseksi (To ja muut 2020). Major facilitator superfamily-kuljettajat mahdollistavat välttämättömien ravintoaineiden ja ionien ottamisen, aineenvaihdunnan lopputuotteiden ja haitallisten aineiden erittymisen sekä solujen ja ympäristön välisen viestinnän. Ne ovat



myös energiaa tuottavien ja kuluttavien järjestelmien olennaisia osatekijöitä. (Pao ja muut 1998.)

Treecen ja muiden (2023) tekemässä tutkimuksessa *Synechococcus elongatus* PCC 7942 fotomiksotrofinen kanta käyttää kahta vastakkaissuuntaista protonisymporteria. Tehokas glukoosin tuonti vaatii matalan tai neutraalin pH:n ja sukkiniaattikuljettaja vaatii korkean pH:n tuotteen viemiseksi ulos solusta. Näin ollen todettiin, että tehokkaaseen sukkiniaattituotantoon tarvitaan vaihteleva pH. Tulokset tarjoavat hyödyllisiä näkemyksiä siitä, onko mahdollista laajentaa fotomiksotrofisia tuotantoalustoja biotuotannon skaalaamiseksi.

Muokattu *Synechococcus elongatus* 7942-kanta ei kyennyt tuottamaan isopropanolia aerobisissa olosuhteissa jatkuvassa valoaltistuksessa. Kun kantaan lisättiin 90 mM (5,3 g/l) asetaattia, se pystyi tuottamaan 22 mg/l isopropanolia tuottavuuden ollessa 3 mg/l/h. Asetaatin lisäämisen sijasta he luottivat kannan luonnolliseen taipumukseen käynnistää glykolyyttinen reitti anaerobisissa, pimeissä olosuhteissa ja siten tuottaa asetaattia varastoidusta glykogeenistä. (Stal ja Moezelaar 2006.) Anaerobisissa, pimeissä olosuhteissa viljelmät tuottivat korkeamman maksimitiitterin, 27 mg/l (Hirokawa ja muut 2015). Asetaatin muuntuminen isopropanoliksi on kuitenkin suurinta aerobisissa valo-olosuhteissa (Kusakabe ja muut 2013). Siten kasvatus ensin anaerobisissa, pimeissä olosuhteissa takaa lisääntyneen asetaattituotannon, minkä jälkeen siirtyminen aerobisiin, valoisiin olosuhteisiin mahdollistaa tehokkaamman asetaatin muuntamisen isopropanoliksi. Tämä lähestymistapa yhdessä pH:n ja kasvuvaiheen optimoinnin optimoinnin kanssa nosti titterit 6-kertaisiksi 146 mg/l:aan. (Matson ja Atsumi 2018.)

## 7 Fotomiksotrofinen tuotanto verrattuna muuhun teollisuuteen

Verrattuna bakteerien, sienten ja hiivojen yksisoluisen proteiinituotantoon, joka perustuu vetyyn tai sokeriin, mikrolevät ovat maankäytön kannalta tehokkaampia. Viimeisten 70 vuoden aikana mikrolevät ovat useaan otteeseen herättäneet huomiota lupaavina ehdokkaina teolliseen hyödyntämiseen elintarvikkeiden ja biopolttoaineiden valmistuksessa, koska niiden pinta-alatuottavuus on suuri verrattuna viljelykasveihin. (Barbosa ja muut 2023.)

*Synechocystis* sp. PCC 6803:n on mahdollista kasvaa ja tuottaa haluttuja yhdisteitä sekä fotoautotrofisissa että fotomiksotrofisissa olosuhteissa (Varman ja muut 2013). Fotoautotrofisissa olosuhteissa isobutanolin tuotto oli 90 mg/l, mikä on vähemmän kuin fotomiksotrofisissa olosuhteissa tuotettu määrä 114 mg/l. Etyleenä puolestaan saatiin tuotettua 25 % enemmän fotomiksotrofisissa olosuhteissa kuin fotoautotrofisissa olosuhteissa. (Matson ja Atsumi 2018.)

SCP:n fototrofisen tuotannon haasteita ovat korkeat kustannukset, jotka liittyvät alhaisiin biomassapitoisuuksiin ja alhaiseen tilavuustuottavuuteen. Kaasun poisto ja kerääminen sekä viljelmän sekoittaminen tuovat lisähaasteita kustannuksiin. SCP:n tuotanto mikсотrofisesti voi lisätä biomassan saantoa. Mikсотrofisessa tuotantotavassa fotosynteesissä syntyvä happi kulutetaan täysin soluhengityksen aikana ja orgaanisesta substraatista vapautuva hiilidioksidi käytetään lähes kokonaan uudelleen samojen solujen fotosynteettisessä aineenvaihdunnassa. Tasapainottamalla hiilen tarjonta autotrofisen hapen tuotantonopeuden kanssa voidaan saavuttaa erityinen viljelystrategia, happitasapainoinen mikсотrofia. Tämä hiilidioksidin ja hapen kierrätys vähentää merkittävästi näiden yhdisteiden ulkoisen syötön ja vastaavasti kaasunpoiston tarvetta. Koska hapen poistoa ja hiilidioksidin lisäämistä ei enää tarvita fotomiksotrofisessa viljelyssä, fotobioreaktorin toiminnan energiatarve pieneni 40 % verrattuna fototrofiseen viljelyyn. (Barbosa ja muut 2023.)

Mikrolevät voivat käyttää ravinteita 100-prosenttisesti, toisin kuin nykyisessä maatalouskäytännössä, jossa lähes 50 % lannoitteen ravinteista päätyy pinta- ja pohjaveteen aiheuttaen saastumista ja rehevöitymistä. (Pingali 2012.) Verrattuna bakteerien, sienten ja hiivojen yksisoluisen proteiinintuotantoon, mikrolevät ovat maankäytön kannalta tehokkaampia. Aurinkoenergian suoralla käytöllä SCP-tuotantoon mikrolevillä on korkein maankäyttötehokkuus verrattuna muihin mikrobiologisiin SCP-lähteisiin, joissa käytetään sokerijuurikkaan tuotantoa tai vetyä raaka-aineena. (Barbosa ja muut 2023.)

Vaikka mikrolevillä on paljon korkeampi rasvojen tuotto kuin öljypalmussa pinta-alaa kohden, mikrolevän TAG-saanto valoenergialla on käytännössä 10 kertaa pienempi kuin teoreettinen saanto (Remmers ja muut 2018). Lipidien tuottavuuden parantamisessa on valtavasti potentiaalia, mutta tieteellistä ja teollista perustaa ei vielä ole olemassa. Valvotuissa olosuhteissa tapahtuvan tuotannon tekniikka on hyvin kehittynyt, mutta ulko-olosuhteissa tuotto on edelleen liian vähäistä. Mikrolevien biotuotteiden paletin

laajentaminen vaatii tehokkaita työkaluja teollisesti merkittävien kantojen geneettiseen manipulointiin. (Barbosa ja muut 2023.)

Mikrolevät jakavat siirtogeenisten kasvien edut biologisten aineiden tuotannossa, mukaan lukien korkea resurssitehokkuus, , monimutkainen proteiinien laskostuminen ja mahdollisuus kasvimaiseen N-glykosylaatioon. Niillä on myös monia muita etuja kuten yksinkertainen biosuojaus, korkeammat kasvunopeudet, kyky erittää proteiineja ja nopea geneettinen muuntelu. Siksi mikrolevät ovat herättäneet kasvavaa kiinnostusta mahdollisina solutehtaina proteiiniterapeuttisten aineiden tuotantoon. (Barbosa ja muut 2023.)

Fotosynteettinen tuottavuus on tällä hetkellä liian alhainen vastaamaan teollisuuden vaatimuksiin verrattuna heterotrofisiin mikrobeihin. Syanobakteereiden fotosysteemit voivat tuottaa 21 mmol ATP/g biomassaa, kun taas esimerkiksi *Escherichia coli* pystyy tuottamaan 59-65 mmol ATP/g biomassaa tunnissa vapaiden rasvahappojen tuottamiseksi. (Song ja muut 2021.) Kun taas esimerkiksi fotomiksotrofisissa olosuhteissa *Synechococcus elongatus* PCC 794- kanta saavutti 2,3-butaanidiolin tuottavuuden 10 mg/l tunnissa. Fotomiksotrofisissa olosuhteissa *Synechocystis* sp. 6803 - kannan avulla tuotettiin 114 mg/l isobutanolia, mikä on hiukan enemmän kuin fotoautotrofisesti tuotettu 90 mg/l. (Matson ja Atsumi 2018.)

## 8 Yhteenveto

Fotomiksotrofiaan pystyvillä syanobakteereilla voidaan luoda tuotannollinen vaihtoehto fossiiliseen öljyyn pohjautuville yhdisteille. Mikrolevillä voidaan kestävästi tuottaa proteiineja ja lipidejä, joita voidaan käyttää raaka-aineina valmistettaessa elintarvikkeita, energiaa ja kemikaaleja. Mikrolevien kasvatus on mahdollista bioreaktoreissa ja kasvatusaltaissa.

Kuitenkin fotomiksotrofisten tuotantotapojen tuottavuutta täytyy parantaa, jotta siitä saataisiin taloudellisesti järkevä vaihtoehto. Sitä voidaan parantaa muokkaamalla eliöitä geneettisesti tai ympäristöolosuhteita optimoimalla. Tämä vaatii kuitenkin vielä lisätutkimusta.

## Lähteet

- Abdullah, B., Syed Muhammad, S. A. F., Shokravi, Z., Ismail, S., Kassim, K. A., Mahmood, A. N. & Aziz, M. M. A. (2019) Fourth generation biofuel: A review on risks and mitigation strategies. *Renew Sustain Energy Rev* **107**:37–50.
- Abiusi, F., Wijffels, R. H. & Janssen, M. (2020) Doubling of Microalgae Productivity by Oxygen Balanced Mixotrophy. *ACS Sustain Chem Eng* **8**:6065–6074.
- Ahn, J. H., Jang, Y.-S. & Lee, S. Y. (2016) Production of succinic acid by metabolically engineered microorganisms. *Curr Opin Biotechnol* **42**:54–66.
- Atsumi, S., Higashide, W. & Liao, J. C. (2009) Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde. *Nat Biotechnol* **27**:1177–1180.
- Barbosa, M. J., Janssen, M., Südfeld, C., D’Adamo, S. & Wijffels, R. H. (2023) Hypes, hopes, and the way forward for microalgal biotechnology. *Trends Biotechnol* **41**:452–471.
- Barten, R., Chin-On, R., De Vree, J., Van Beersum, E., Wijffels, R. H., Barbosa, M. J. & Janssen, M. (2022) Growth parameter estimation and model simulation for three industrially relevant microalgae: *Picochlorum*, *Nannochloropsis*, and *Neochloris*. *Biotechnol Bioeng* **119**:1416–1425.
- Barten, R. J. P., Wijffels, R. H. & Barbosa, M. J. (2020) Bioprospecting and characterization of temperature tolerant microalgae from Bonaire. *Algal Res* **50**:102008.
- Bogorad, I. W., Lin, T.-S. & Liao, J. C. (2013) Synthetic non-oxidative glycolysis enables complete carbon conservation. *Nature* **502**:693–697.
- Chen, G.-Q. (2009) A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chem Soc Rev* **38**:2434.
- Chen, X., Schreiber, K., Appel, J., Makowka, A., Fähnrich, B., Roettger, M., Hajirezaei, M. R., Sönnichsen, F. D., Schönheit, P., Martin, W. F. & Gutekunst, K. (2016) The Entner–Doudoroff pathway is an overlooked glycolytic route in cyanobacteria and plants. *Proc Natl Acad Sci* **113**:5441–5446.
- Chojnacka, K. & Zielińska, A. (2012) Evaluation of growth yield of *Spirulina* (*Arthrospira*) sp. In photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *World J Microbiol Biotechnol* **28**:437–445.
- Dahlin, L. R., Gerritsen, A. T., Henard, C. A., Van Wycken, S., Linger, J. G., Kunde, Y., Hovde, B., Starkenburg, S. R., Posewitz, M. C. & Guarnieri, M. T. (2019) Development of a high-productivity, halophilic, thermotolerant microalga *Picochlorum renovo*. *Commun Biol* **2**:388.
- Davis, E. O. & Henderson, P. J. (1987) The cloning and DNA sequence of the gene *xylE* for xylose-proton symport in *Escherichia coli* K12. *J Biol Chem* **262**:13928–13932.

- Desai, S. H., Koryakina, I., Case, A. E., Toney, M. D. & Atsumi, S. (2016) Biological conversion of gaseous alkenes to liquid chemicals. *Metab Eng* **38**:98–104.
- Dong, L.-L., Li, Q.-D., Wu, D., Sun, Y.-F., Zhou, M. & Zhao, K.-H. (2016) A novel periplasmic protein (Slr0280) tunes photomixotrophic growth of the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Gene* **575**:313–320.
- Erickson, L. E. (2009) Bioreactors. Teoksessa *Encyclopedia of Microbiology* (ss. 206–211). Elsevier.
- Field, C. B., Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T. & Falkowski, P. (1998) Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science* **281**:237–240.
- Gonzales, J. N., Treece, T. R., Mayfield, S. P., Simkovsky, R. & Atsumi, S. (2023) Utilization of lignocellulosic hydrolysates for photomixotrophic chemical production in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Commun Biol* **6**:1022.
- Hirokawa, Y., Suzuki, I. & Hanai, T. (2015) Optimization of isopropanol production by engineered cyanobacteria with a synthetic metabolic pathway. *J Biosci Bioeng* **119**:585–590.
- Jojima, T., Omumasaba, C. A., Inui, M. & Yukawa, H. (2010) Sugar transporters in efficient utilization of mixed sugar substrates: Current knowledge and outlook. *Appl Microbiol Biotechnol* **85**:471–480.
- Khetkorn, W., Incharoensakdi, A., Lindblad, P. & Jantaro, S. (2016) Enhancement of poly-3-hydroxybutyrate production in *Synechocystis* sp. PCC 6803 by overexpression of its native biosynthetic genes. *Bioresour Technol* **214**:761–768.
- Kusakabe, T., Tatsuke, T., Tsuruno, K., Hirokawa, Y., Atsumi, S., Liao, J. C. & Hanai, T. (2013) Engineering a synthetic pathway in cyanobacteria for isopropanol production directly from carbon dioxide and light. *Metab Eng* **20**:101–108.
- Lam, T. P., Lee, T.-M., Chen, C.-Y. & Chang, J.-S. (2018) Strategies to control biological contaminants during microalgal cultivation in open ponds. *Bioresour Technol* **252**:180–187.
- Lamsen, E. N. & Atsumi, S. (2012) Recent progress in synthetic biology for microbial production of C3–C10 alcohols. *Front Microbiol* **3**.
- Lane, T. W. (2022) Barriers to microalgal mass cultivation. *Curr Opin Biotechnol* **73**:323–328.
- Lee, J. W., Kim, H. U., Choi, S., Yi, J. & Lee, S. Y. (2011) Microbial production of building block chemicals and polymers. *Curr Opin Biotechnol* **22**:758–767.
- Liang, Y., Sarkany, N. & Cui, Y. (2009) Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol Lett* **31**:1043–1049.
- Lu, Y., Gan, Q., Iwai, M., Alboresi, A., Burlacot, A., Dautermann, O., Takahashi, H., Crisanto, T., Peltier, G., Morosinotto, T., Melis, A. & Niyogi, K. K. (2021) Role of an

ancient light-harvesting protein of PSI in light absorption and photoprotection. *Nat Commun* **12**:679.

Martínez-Reyes, I. & Chandel, N. S. (2020) Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat Commun* **11**:102.

Matson, M. M. & Atsumi, S. (2018) Photomixotrophic chemical production in cyanobacteria. *Curr Opin Biotechnol* **50**:65–71.

McEwen, J. T., Kanno, M. & Atsumi, S. (2016) 2,3 Butanediol production in an obligate photoautotrophic cyanobacterium in dark conditions via diverse sugar consumption. *Metab Eng* **36**:28–36.

Meile, L., Rohr, L. M., Geissmann, T. A., Herensperger, M. & Teuber, M. (2001) Characterization of the D -Xylulose 5-Phosphate/ D -Fructose 6-Phosphate Phosphoketolase Gene ( *xfp* ) from *Bifidobacterium lactis*. *J Bacteriol* **183**:2929–2936.

Novoveská, L., Nielsen, S. L., Eroldoğan, O. T., Haznedaroglu, B. Z., Rinkevich, B., Fazi, S., Robbens, J., Vesquez, M. & Einarsson, H. (2023) Overview and Challenges of Large-Scale Cultivation of Photosynthetic Microalgae and Cyanobacteria. *Mar Drugs* **21**:445.

Osanai, T., Kanesaki, Y., Nakano, T., Takahashi, H., Asayama, M., Shirai, M., Kanehisa, M., Suzuki, I., Murata, N. & Tanaka, K. (2005) Positive Regulation of Sugar Catabolic Pathways in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 by the Group 2  $\sigma$  Factor SigE. *J Biol Chem* **280**:30653–30659.

Osanai, T., Oikawa, A., Azuma, M., Tanaka, K., Saito, K., Hirai, M. Y. & Ikeuchi, M. (2011) Genetic Engineering of Group 2  $\sigma$  Factor SigE Widely Activates Expressions of Sugar Catabolic Genes in *Synechocystis* Species PCC 6803. *J Biol Chem* **286**:30962–30971.

Osorio, H., Jara, C., Fuenzalida, K., Rey-Jurado, E. & Vásquez, M. (2019) High-efficiency nuclear transformation of the microalgae *Nannochloropsis oceanica* using Tn5 Transposome for the generation of altered lipid accumulation phenotypes. *Biotechnol Biofuels* **12**:134.

Pao, S. S., Paulsen, I. T. & Saier, M. H. J. (1998) Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **62**:1–34.

Pingali, P. L. (2012) Green Revolution: Impacts, limits, and the path ahead. *Proc Natl Acad Sci* **109**:12302–12308.

Rasheed, R., Thaher, M., Younes, N., Bounnit, T., Schipper, K., Nasrallah, G. K., Jabri, H. A., Gidfuni, I., Goncalves, O. & Pruvost, J. (2022) Solar cultivation of microalgae in a desert environment for the development of techno-functional feed ingredients for aquaculture in Qatar. *Sci Total Environ* **835**:155538.

Remmers, I. M., Wijffels, R. H., Barbosa, M. J. & Lamers, P. P. (2018) Can We Approach Theoretical Lipid Yields in Microalgae? *Trends Biotechnol* **36**:265–276.

Rodrigues-Pousada, R. A., De Rycke, R., Dedonder, A., Van Caeneghem, W., Engler, G., Van Montagu, M. & Van Der Straeten, D. (1993) The Arabidopsis 1-

Aminocyclopropane-1-Carboxylate Synthase Gene 1 Is Expressed during Early Development. *Plant Cell* **5**:897–911.

Rutila, H. (2020) Mikrolevästä biokaasua: Mikrolevän kasvattaminen biokaasulaitoksen rejektivedessä. Jyväskylän ammattikorkeakoulu. Biotalouskehittämisen tutkinto-ohjelma. Opinnäytetyö.

Saitoh, S.-I., Abe, F., Kanno, A., Tanimura, N., Mori Saitoh, Y., Fukui, R., Shibata, T., Sato, K., Ichinohe, T., Hayashi, M., Kubota, K., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Kikko, Y., Katada, T., Kontani, K. & Miyake, K. (2017) TLR7 mediated viral recognition results in focal type I interferon secretion by dendritic cells. *Nat Commun* **8**:1592.

Schulze, D., Kohlstedt, M., Becker, J., Cahoreau, E., Peyriga, L., Makowka, A., Hildebrandt, S., Gutekunst, K., Portais, J., & Wittmann, C. (2022) GC/MS-based (13)C metabolic flux analysis resolves the parallel and cyclic photomixotrophic metabolism of *Synechocystis* sp. PCC 6803 and selected deletion mutants including the Entner-Doudoroff and phosphoketolase pathways. *Microb Cell Factories* **21**:69.

Solyosi, D., Nikkanen, L., Muth-Pawlak, D., Fitzpatrick, D., Vasudevan, R., Howe, C., Lea-Smith, D. & Allahverdiyeva, Y. (2020) Cytochrome cM Decreases Photosynthesis under Photomixotrophy in *Synechocystis* sp. PCC 68031[CC-BY]. *PLANT Physiol* **183**:700–716.

Song, X., Diao, J., Yao, J., Cui, J., Sun, T., Chen, L. & Zhang, W. (2021) Engineering a Central Carbon Metabolism Pathway to Increase the Intracellular Acetyl-CoA Pool in *Synechocystis* sp. PCC 6803 Grown under Photomixotrophic Conditions. *ACS Synth Biol* **10**:836–846.

Stal, L. J. & Moezelaar, R. (2006) Fermentation in cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev* **21**:179–211.

Südfeld, C., Hubáček, M., Figueiredo, D., Naduthodi, M. I. S., Van Der Oost, J., Wijffels, R. H., Barbosa, M.J. & D'Adamo, S. (2021) High-throughput insertional mutagenesis reveals novel targets for enhancing lipid accumulation in *Nannochloropsis oceanica*. *Metab Eng* **66**:239–258.

Tan, L.-R., Cao, Y.-Q., Li, J.-W., Xia, P.-F. & Wang, S.-G. (2022) Transcriptomics and metabolomics of engineered *Synechococcus elongatus* during photomixotrophic growth. *Microb Cell Factories* **21**:31.

To, K. K. W., Wu, M., Tong, C. W. S. & Yan, W. (2020) Drug transporters in the development of multidrug resistance in colorectal cancer. Teoksessa *Drug Resistance in Colorectal Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies* (ss. 35–55). Elsevier.

Treece, T. R., Tessman, M., Pomeroy, R. S., Mayfield, S. P., Simkovsky, R. & Atsumi, S. (2023) Fluctuating pH for efficient photomixotrophic succinate production. *Metab Eng* **79**:118–129.

Ungerer, J., Tao, L., Davis, M., Ghirardi, M., Maness, P.-C. & Yu, J. (2012) Sustained photosynthetic conversion of CO<sub>2</sub> to ethylene in recombinant cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Energy Environ Sci* **5**:8998.

- Van Dyk, J. S. & Pletschke, B. I. (2012a) A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol Adv* **30**:1458–1480.
- Van Dyk, J. S. & Pletschke, B. I. (2012b) A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol Adv* **30**:1458–1480.
- Varman, A. M., Xiao, Y., Pakrasi, H. B. & Tang, Y. J. (2013) Metabolic Engineering of *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 for Isobutanol Production. *Appl Environ Microbiol* **79**:908–914.
- Wang, K. L.-C., Li, H. & Ecker, J. R. (2002) Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks. *Plant Cell* **14**:S131–S151.
- Weissman, J. C., Likhogrud, M., Thomas, D. C., Fang, W., Karns, D. A. J., Chung, J. W., Nielsen, R. & Posewitz, M. C. (2018) High-light selection produces a fast-growing *Picochlorum celeri*. *Algal Res* **36**:17–28.
- Wheeler, R. M., Peterson, B. V., Sager, J. C. & Knott, W. M. (1996) Ethylene production by plants in a closed environment. *Adv Space Res* **18**:193–196.
- Yao, J., Wang, J., Ju, Y., Dong, Z., Song, X., Chen, L. & Zhang, W. (2022) Engineering a Xylose-Utilizing *Synechococcus elongatus* UTEX 2973 Chassis for 3-Hydroxypropionic Acid Biosynthesis under Photomixotrophic Conditions. *ACS Synth Biol* **11**:678–688.
- Zhao, Z., Xian, M., Liu, M. & Zhao, G. (2020) Biochemical routes for uptake and conversion of xylose by microorganisms. *Biotechnol Biofuels* **13**:21.