

**ADAPTIIVINEN LABORATORIOEVOLUUTIO  
FOTOAUTOTROFISTEN TUOTTOKANTOJEN KEHITYKSESSÄ**

TkK-tutkielma  
Turun yliopisto  
Bioteknologian laitos  
Biotekniikka  
Huhtikuu 2024  
Iida Turpeinen

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä

TURUN YLIOPISTO

Biotekniikan laitos

IIDA TURPEINEN: Adaptiivinen laboratorioevoluutio fotoautotrofisten tuotokantojen kehityksessä

Tutkielma, 15 s.

Biotekniikka

Huhtikuu 2024

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

-----

Tutkielmassa perehdytään adaptiiviseen laboratorioevoluutioon (ALE) ja menetelmän soveltamiseen mikrolevien ominaisuuksien parantamiseen. Mikroleviin kuuluvat syanobakteerit ja viherlevät. ALEssa hyödynnetään laboratorio-olosuhteissa luonnonvalinnan periaatteita, joiden tavoitteena on edistää mikrobien evoluutiota. Tällainen prosessi johtaa usein geenimutaatioihin, jotka ovat perustana evoluutiolle. Nämä mutaatiot ovat tärkeitä, jotta saadaan kehitettyä mikrobeja joille kehittyä haluttuja ominaisuuksia, kuten suurempi kasvunopeus, stressinsietokyky tai jonkin metaboliitin tehostunut tuotto. Tällaiset parannukset ovat tärkeitä biotekniikan kannalta mm. biopolttoaineiden tuotannossa, jossa mikroleviä ja syanobakteereita tarvitaan.

Käytännössä ALE-kokeissa mikrobeille luodaan sopiva selektiopaine kasvattamalla niitä tietyissä stressiolosuhteissa, kuten muutetuissa lämpötiloissa, suolapitoisuuksissa tai valo-olosuhteissa. Tämän paineen tarkoituksena on saada mikrobit adaptoitumaan eli saamaan ominaisuuksia, jotka auttavat niitä selviytymään näissä olosuhteissa. Adaptaatio voi ilmetä monin tavoin, kuten geenimutaatioina, jotka vaikuttavat säätelyproteiinien toimintaan tai biosynteesireittien säätelyyn. Nämä geenimutaatiot taas vaikuttavat mm. kasvuun, aineenvaihduntaan ja stressinsietokykyyn. ALEn onnistumisen kannalta tärkeää on sopivan valintapaineen asettaminen. Liian suuri paine voi tappaa kasvatukset, kun taas liian vähäinen paine ei johda toivottuun adaptaatioon.

ALEn haasteisiin kuuluvat kokeiden edellyttämät pitkät koeajat. Ne voivat olla useita kuukausia, ja voivat vaikeuttaa ympäristöolosuhteiden stabiilisuuden ylläpitoa. Lisäksi on mahdollista, ettei haluttua fenotyyppiä saada. ALEssa aiheutuneet mutaatiot voivat joissakin tapauksissa tehdä mikrobeista erikoistuneita tietyille ympäristöille, mikä rajoittaa niiden käyttöä muissa kuin stressiolosuhteissa.

Asiasanat: adaptiivinen laboratorioevoluutio, ALE, mikrolevät, syanobakteerit, viherlevät

## Sisällys

1	Johdanto .....	2
2	Historiaa.....	3
3	Käytännön menetelmät .....	3
3.1	ALEn käytännön kasvatusmenetelmät .....	4
3.2	Automaatio .....	5
4	Adaptiivisen laboratorioevoluution soveltaminen mikroleviin ja syanobakteereihin .....	6
4.1	Kasvun tehostaminen.....	7
4.2	Stressinsietokyvyn lisääminen.....	8
4.3	Tuoton maksimointi.....	9
4.4	Substraatin käytön lisääminen .....	10
4.5	Adaptiivinen laboratorioevoluutio syanobakteereissa .....	10
4.5.1	Lämmönsietokyvyn lisääminen.....	10
4.5.2	Valonsietokyvyn lisääminen .....	11
4.5.3	Adaptaatio liuottimiin .....	11
5	Adaptiivisen laboratorioevoluution tulevaisuus, mahdollisuudet ja haasteet .....	12
6	Yhteenveto .....	13
	Kirjallisuus.....	14

# 1 Johdanto

Adaptiivisessa laboratorioevoluutiossa (engl. *adaptive laboratory evolution*, ALE) tutkitaan, miten tuottokannat kehittyvät ja muuttuvat tietyissä olosuhteissa useiden sukupolvien ajan. Kokeissa seurataan, miten ympäristön muutokset, kuten lämpötilan, suolapitoisuuden tai pH:n muutokset vaikuttavat mikrobeihin. ALEssa mikro-organismia kasvatetaan selkeästi määritellyissä olosuhteissa pitkiä aikoja, viikoista vuosiin, mikä mahdollistaa paremman fenotyypin valinnan. Valikoiva stressi on ALEn onnistumisen ensimmäinen ja tärkein vaihe. Se voidaan jakaa kahteen pääluokkaan, joihin kuuluvat ympäristöstressi ja ravinnestressi. (LaPanse ja muut 2021.)

Mikro-organismeilla on kyky sopeutua nopeasti muuttuviin ympäristöihin. Stressitilanteeseen sopeutuminen voi tapahtua saamalla hyödyllisiä fenotyyppisiä satunnaisilla genomimutaatioilla ja sitä seuraavan positiivisen valinnan kautta (Sun ja muut 2018). Biotekniikan näkökulmasta esimerkiksi biomassan tuotto, fotosynteesin tehokkuus, lämpötilan, hapen, pH:n ja biosidien sietokyky, ovat ominaisuuksia, joita tulisi vielä kehittää (LaPanse ja muut 2021).

Fotosynteettiset eliöt käyttävät auringonvaloa hiilidioksidin ja veden muuntamiseen orgaanisiksi yhdisteiksi, jolloin sivutuotteena vapautuu happea. Tässä kandidaatintutkielmassa käsitellään ALEn käyttöä mikrolevissä ja syanobakteereissa. Mikrolevät ovat mikroskooppisen pieniä, fotosynteesiin kykeneviä yksisoluisia eukaryootteja, jotka esiintyvät yksittäin, ketjuissa tai ryhmissä. Mikroleviin kuuluu piilevät, viherleviä, punaleviä ja ruskeita leviä. Syanobakteerit ovat myös fotosynteesiin kykeneviä yksisoluisia, mutta mikrolevistä poiketen ne ovat prokaryootteja. (Parmar ja muut 2011.)

Mikroleviä hyödynnetään adaptiivisessa laboratorioevoluutiossa useista syistä. Niitä käytetään esimerkiksi biopolttoaineiden ja bioaktiivisten yhdisteiden tuotantoon, sekä jäteveden käsittelyssä. ALE on tehokas keino saada mikroleväkannoille haluttuja ominaisuuksia. Tällä menetelmällä hyödynnetään luonnonvalintaa kontrolloiduissa laboratorio-olosuhteissa, jotta saadaan kehitettyä mikroleviä kohti haluttuja fenotyyppisiä, tehden niistä tehokkaampia teollisiin sovelluksiin ja edistäen kestävien bioteknologisten prosessien kehittämistä (LaPanse ja muut 2021.) Mikrolevien ALE-kokeisiin pätevät samat edut kuin muidenkin mikrobien ALEssa – suurimalla osalla

mikrolevistä on yksinkertaiset ravinnevaatimukset, niitä on helppo kasvattaa laboratoriossa sekä niillä on lyhyet kaksinkertaistumisajat (Sun ja muut 2018).

## 2 Historiaa

Mikrolevillä on tehty useita onnistuneita ALE-kokeita. Jørgensenin 1900-luvun puolivälissä tekemissä ALE-kokeissa selvisi valon ja korkean lämpötilan sopeutumismekanismi *Skeletonema costatum*-piilevässä. Tässä levässä tapahtui muutoksia pigmenttien määrässä, entsyymipitoisuuksissa, solukoossa ja proteiinipitoisuuksissa. (LaPanse ja muut 2021.)

Coleman ja Grossman tekivät 1980-luvulla samankaltaisia kokeita *Chlamydomonas reinhardtii* -levällä. Näissä kokeissa havaittiin hiilihappoanhydraasiaktiivisuuden ja epäorgaanisen hiilen kuljetuksen vähentymistä levissä, kun ne altistettiin 5 %:n hiilidioksidille viiden tunnin ajan. (LaPanse ja muut 2021.)

Kuebler työryhmineen toteutti 90-luvun alussa matalan lämpötilan ALE-kokeen neljän kuukauden ajan käyttäen *Lomentaria baileyana* ja *Lomentaria orcadensis* -punaleviä. Eri lämpötilasietokykyjen perusteella tutkijat päättelivät, että fotosynteesin energian siirron tai elektroninsiirron häiriöt ovat tärkeitä fotosynteesin ylälämpötilarajojen asettamisessa. (LaPanse ja muut 2021.)

## 3 Käytännön menetelmät

Tietyssä populaatiossa oleva geneettinen muuntelu tuottaa vähittäisen evoluution avulla organismeja, joilla on parempi adaptaatio kasvuolosuhteisiin. Sekä mikrolevien että syanobakteerien spontaanien mutaatioiden määrä on noin  $1-10 \times 10^{-10}$  mutaatioita/nukleotidi/sukupolvi, genomin koko on 1,6-100 Mbp ja kaksinkertaistumisaika on kahdesta tunnista vuorokauteen. Tämän takia haluttu evoluutio laboratoriossa tapahtuu sopivassa ajassa. (Lapanse ja muut 2021.) Ajallisesti kokeet kestävät viikoista vuosiin (Sun ja muut 2018).

Vaikka evoluutio on jatkuva prosessi, sopeutuminen uuteen ympäristöön on aluksi yleensä nopeaa ja hidastuu sitten ajan myötä. ALE-kokeiden aikajänteet kuvataan yleensä sukupolvien tai kumulatiivisten solunjakautumien muodossa. Kumulatiivisessa

solujakautumisessa summataan kaikki solunjakautumiset, jotka tapahtuvat populaatiossa tietyn ajan kuluessa. Pitkäkestoisia, tuhansia sukupolvia kestäviä mikrolevien ALE-kokeita on tehty, mutta ALE-kokeet lopetetaan yleensä, kun kasvatuksissa ei enää ole havaittavissa merkittävää kehitystä, eli useimmiten noin 100 sukupolven jälkeen. (LaPanse ja muut 2021.)

### 3.1 ALEn käytännön kasvatustekniikat

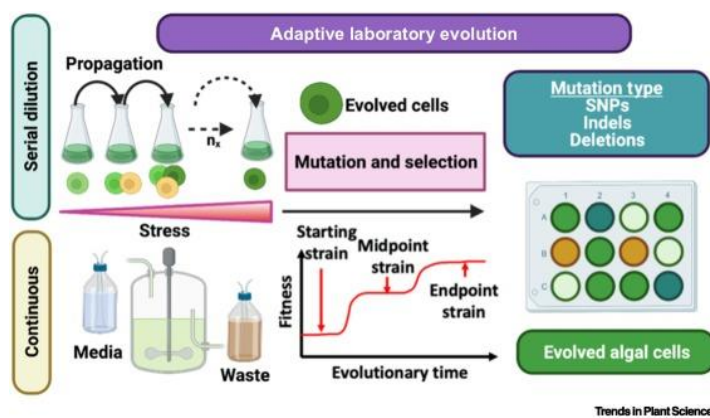
ALEssa käytetään yleisesti sarjapanoskasvatusta, jotka tehdään ravistelupulloissa tai (foto)bioreaktoreissa. Tämä menetelmä on suhteellisen yksinkertainen ja suosittu, sekä helposti skaalattavissa, erityisesti mikrolevissä. (LaPanse ja muut 2021.) Prosessiin kuuluu osan kasvatuksesta siirtäminen uuteen pulloon, jossa on tuoretta mediumia, mikä mahdollistaa jatkuvan kasvun aloittamisen uudessa syklissä säännöllisin väliajoin. Solujen jatkuva siirto on välttämätöntä, jotta saadaan ylläpidettyä jatkuvaa valintapainetta ja adaptaatiota. (Sun ja muut 2018.)

Sarjapanoskasvatuksessa on kuitenkin muutamia haittoja; kun solut menevät eri kasvuvaiheiden läpi, sisäiset (esimerkiksi aineenvaihdunnan muutokset) ja ulkoiset (esimerkiksi pH, happipitoisuus, valo, solutiheys, ravinteiden saatavuus) tekijät vaihtelevat, mikä vaikeuttaa valintapaineen vakaana pitämistä. Sarjapanoskasvatuksessa tapahtunut evoluutio voi näkyä monilla eri tavoin, esimerkiksi lyhyempänä lag-vaiheena, suurempana kasvunopeutena, sekä parempana ravinteiden hyödyntämisenä. Toisaalta huonona puolena on se, että fenotyyppi saattaa poiketa halutusta. Toinen haittapuoli on se, että kasvatusten adaptoituessa ja kasvunopeuksien kasvaessa siirtoja uuteen kasvatustekniikkaan täytyy tehdä useammin tai vaihtoehtoisesti siirrettävien solujen määrä pitää olla pienempi, jotta saadaan estettyä solujen meneminen stationäärivaiheeseen. (LaPanse ja muut 2021.)

ALEssa suosittu menetelmä on ollut myös jatkuva kasvatustekniikka. Tässä kasvatustekniikasta pidetään vakiotiheydessä, soluja poistetaan ja substraattia lisätään jatkuvasti. Jatkuvassa kasvatustekniikassa on parempi prosessinhallinta ja mahdollista ylläpitää jatkuvaa valintapainetta. Jatkuva kasvatustekniikka ei ole kuitenkaan laajalti käytetty menetelmä mikrolevien ALEssa. Jatkuva kasvatustekniikka voidaan toteuttaa kemostaatissa tai turbidostaatissa. (LaPanse ja muut 2021.) Kemostaatissa yhtä ravinnettä pidetään rajallisena. Tällainen rajoitus suosii sellaisia soluja, jotka ovat kehittyneet

hyödyntämään rajallisemmin ravinteita. Turbidostaattikasvatuksissa solut ovat aina kasvun eksponentiaalisessa vaiheessa eivätkä koe ravinnepulaa, minkä takia nämä kasvatukset ovat ihanteellisia ympäristöjä valita sellaisia soluja, joilla on parantunut maksimaalinen kasvunopeus. (Sun ja muut 2018.) Kuvassa 1 on esitelty edellä mainitut kasvatustekniikat.

Myös puolijatkuvia kasvatuksia voidaan käyttää. Puolijatkuvilla kasvatuksilla saadaan minimoitua valintapaineen vaihteluita joita esiintyy sarjakasvatuksissa. (LaPanse ja muut 2021)



**Kuva 1.** Ylempänä sarjapanoskasvatustekniikka, joka toteutetaan nestemäisessä mediumissa, jossa ravinteita on saatavilla runsaasti. Osa kasvatuksesta siirretään säännöllisin väliajoin uuteen pulloon jossa on tuoretta mediumia, jotta kasvu voi taas jatkaa. Samalla stressin määrää voidaan vähitellen lisätä. Alempana jatkuva kasvatus kemostaatissa, jossa kasvatus kasvaa jatkuvasti sekoittaen ja ilmastoiden. Tuoretta mediumia lisätään jatkuvasti tietyllä nopeudella ja kasvatusta kerätään jatkuvasti prosessin aikana. (Arora ja Philippidis 2021; Sun ja muut 2018)

### 3.2 Automaatio

Yksinkertaisen ja toistuvan työnkulun takia ALE-kokeet sopivat hyvin automatisointiin. Automaatio mahdollistaa jatkuvan seurannan, monimutkaiset mutta silti johdonmukaiset kasvatustekniikat ja samalla manuaalisen työn määrän minimoinnin. Prosessin parametrien tarkka valvonta reaaliaikaisen seurannan avulla tulokset ovat toistettavia, mikä mahdollistaa hyödyllisten mutaatioiden erottamisen neutraaleista tai negatiivisista mutaatioista. (LaPanse ja muut 2021.)



Useimmat laboratoriot käyttävät itse rakennettuja fotobioreaktoreita, joissa voi itse muokata stressitekijöitä ja muita olosuhteita. Näiden lisäksi voidaan käyttää myös pienien tilavuuksien (mikrolitroja – 2 ml) sekä automatisoituja kasvatusalustoja, esimerkiksi mikrotiitterilevyihin perustuvia reaktoreita. Automatisoidut suljetut fotobioreaktorit sopivat hyvin mikrolevien ALElle. Tällä hetkellä on olemassa fotobioreaktoreita, tilavuudeltaan 50 ml - 1 l, joissa voi olla mahdollisuus pH:n, hiilidioksidin, biomassan ja valon reaaliaikaiseen seurantaan, sekä lämmönsäätely ja kasvatusten sekoittaminen. Toisaalta, vaikka tällaisia bioreaktoreja on saatavilla, niin tällä hetkellä ei ole kuitenkaan paljoa tutkimusta näiden hyödyntämisessä ALEssa. (LaPanse ja muut 2021.)

#### 4 Adaptiivisen laboratorioevoluution soveltaminen mikroleviin ja syanobakteereihin

ALEn hyödyntämisestä mikrolevissä ja syanobakteereissa on tutkittu ja aiheesta on julkaistu muutamia kokoelma-artikkeleita. Esimerkiksi Sunin ja muiden (2018) artikkelissa käsitellään mikrolevien lipidien ja karotenoidien tuottoa ALEn avulla. Zhangin ja muiden (2021) artikkelissa taas kerrotaan ALEn vaikutuksista mikrolevien kasvuun ja muihin ominaisuuksiin. LaPanse työryhmineen (2021) kertoo artikkelissaan mikrolevien ALE-kokeiden suunnittelusta ja kasvatusmenetelmistä.

ALEa on jo käytetty vuosikymmeniä parantamaan mikrobien, enimmäkseen bakteerien, sopeutumista eri stressitekijöille. Mikrobien etuna näissä kokeissa ovat lyhyet jakaantumisaajat ja yksinkertaiset kokeelliset kasvatusolosuhteet. Olemassa olevien tutkimusten perusteella on huomattu, että ALEn periaatteet ja kokeelliset suunnitelmat, joita on hyödynnetty bakteereilla, ovat hyvin sovellettavissa myös mikroleviin. Mikrolevien ja syanobakteerien ALE-kokeet eivät kuitenkaan ole niin yleisiä ja keskittyvät useammin akkliimaatiomekanismeihin adaptaation sijaan. Akkliimaatiota tapahtuu lyhyellä aikavälillä ilman geneettisiä muutoksia, kun taas adaptaatioon kuuluu hyödyllisten mutaatioiden kertyminen ajan kanssa, jotka johtavat uusiin genotyyppeihin, jotka ovat sopeutuneet stressiin. (LaPanse ja muut 2021.)

## 4.1 Kasvun tehostaminen

Mikrolevien kasvunopeuden parantaminen on tärkeää, kun mietitään niiden mahdollisuuksia biotekniikassa. Kasvun tehostaminen lyhentää kasvatukseen vaadittavaa aikaa ja lisää biomassan tuottoa. (Zhang ja muut 2021.)

Monet ALE-kokeet liittyvät kasvun tehostamiseen. Näistä saadaan tietoa organismin mahdollisuuksista adaptoitua sekä tarvittavista geneettisistä muutoksista kasvun parantamiseksi. Iso osa mikrolevien kasvunopeuden tehostamiseksi ALE:n avulla on tehty *C. reinhardtii*-mikrolevälle. Useissa *C. reinhardtii*-ALE-tutkimuksissa on saatu 20-300% kasvunopeuden kasvu. Kasvunopeuden muutokset voivat vaikuttaa solujen biokemialliseen koostumukseen. Shin ja muut. (2017) raportoivat, että adaptoituneen *C. reinhardtii* -kannan kasvu lisääntyi 200–300 %. Tämä kanta tuotti 160 % lisää rasvahappometyyliestereitä ja samalla proteiini- ja klorofyllipitoisuudet laskivat typpivajauskasvatuksessa.

Adaptaatioissa tapahtuneiden geneettisten muutosten ymmärtämistä on helpottanut edullisen, suurikapasiteettisen sekvensoinnin saatavuus. ALE:ssa monet hyödylliset mutaatiot kertyvät ja sopeutuneissa kannoissa on havaittu yhden nukleotidin polymorfismeja (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) sekä insertio- ja deleetiopolymorfismeja solusyklin, jakautumisen ja lisääntymisen geneeissä sekä transkription ja translaatioon osallistuvissa geneeissä verrattuna villityypin genomiin. (LaPanse ja muut 2021.)

Esimerkiksi *C. reinhardtii*lle tehdyssä 17 kk kestoisessa ALE-kokeessa kannan kasvunopeus kasvoi 35 %. Adaptoituneen kannan transkriptomin tutkimuksessa huomattiin useita ylössäädelyjä geenejä. Näihin kuuluivat geenit, jotka vastaavat ribosomaalisten proteiinien, RNA-kuljetusproteiinien, RNA-polymeraasialayksiköiden (RNA-polymeraasi II alayksikkö RPB11, RNA-polymeraasi II alayksikkö RPC10) ja translationaalisten aloitusfaktorien alayksiköiden (eIF1, eIF3, eIF5, eIF2B) koodaamisesta. Nämä geneettiset muutokset yhdistettiin parantuneeseen asetaattimetaboliaan nopeammin kasvavassa, adaptoituneessa kannassa. (LaPanse ja muut 2021.)

Tutkimukset, joka liittyvät mikrolevien kasvunopeuden parantamiseen muissa kuin *C. reinhardtii*ssa, ovat harvinaisempia, mutta myös piilevillä on toteutettu ALE-kokeita. Esimerkiksi lauhkeiden merien piilevässä *Cylindrotheca fusiformis* -kannan ALE-

kokeessa kasvunopeus kasvoi 11 % 14 °C:ssa 10 kuukauden adaptaation jälkeen.

Samoin pitkäaikainen kasvatus korkeammassa lämpötilassa on johtanut kasvunopeuden kasvuun *Pseudo-nitzschia delicatissima*, *Chaetoceros criophilus* ja *Coscinodiscus* sp. -piilevissä. (LaPanse ja muut 2021.)

#### 4.2 Stressinsietokyvyn lisääminen

ALE-kokeissa on näytetty, että niiden avulla voi lisätä mikrolevien sietokykyä erilaisiin stressitekijöihin; esimerkiksi savukaasuun (sisältää CO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub>, SO<sub>x</sub>), UV-säteilyyn, valon intensiteettiin, jäteveteen (joka sisältää suuria määriä raskasmetalleja, happea ja ammoniumtyyppiä), ravinteiden puutteeseen ja korkeaan suolapitoisuuteen. Tällaiset äärimmäiset ympäristöolosuhteet joille mikrolevät voivat altistua voivat usein olla läsnä teollisissa olosuhteissa. Käytettävän stressin oikean valinnan ja voimakkuuden on oltava optimaalinen ALEn onnistumiseksi. Liian korkea stressi voi tappaa koko kasvatuksen ennen kuin se adaptoituu ja toisaalta liian alhainen stressi voi johtaa epäonnistuneeseen ALE-kokeeseen. (LaPanse ja muut 2021.)

Esimerkiksi *Nitzschia closteriumin* ja *Chlorella* sp. 12:n ALE-kokeissa, joissa käytettiin kuparia, valittu kuparipitoisuus oli liian alhainen, minkä takia ei saatu riittävän tehokasta evoluutiota, joka olisi riittänyt parantamaan sietokykyä merkittävästi kokeen keston aikana. (LaPanse ja muut 2021.)

Tämän vuoksi useimpien mikroleviin perustuvien tekniikoiden käytännön soveltamisen tehokkuus on usein rajoitettu abiottisen stressin vuoksi. Esimerkiksi korkeiden fenolipitoisuuksien myrkyllisyys estää leviää hajottamasta fenolia, mikä rajoittaa mikroleviin perustuvan bioremediaation soveltamista fenolivuotojen tapauksessa. (Zhang ja muut 2021)

Yksi yleisimmin tutkittu stressitekijä mikrolevien ALEssa on korkeat hiilidioksidipitoisuudet, mutta tulokset siitä ovat olleet hyvin vaihtelevia (LaPanse ja muut 2021). Esimerkiksi Collinsin ja Bellin (2004) *C. reinhardtiin* ALE-kokeessa se ei sopeutunut 1050 ppm hiilidioksidipitoisuudelle edes 1000 sukupolven jälkeen. Tässä tutkimuksessa joillekin kannoille kehittyi korkeampi fotosynteesitehokkuus ja klorofyllipitoisuus, ja samalla solukoko pieneni, mutta nämäkään kannat eivät olleet sopeutuneet ko. hiilidioksidipitoisuuteen. Toisaalta Li ja muut (2015) tutkimuksessa, jossa käytettiin *Chlorella* sp. -levää, saatiin vakaa fenotyyppi 97 päivää kestäneen ALE-

kokeen jälkeen. Adaptoitunut kanta kasvoi villikantaa nopeammin korkeintaan 30 % hiilidioksidin lisäyksessä.

Korkealla happipitoisuudella ja erilaisilla pH-olosuhteilla on myös tehty ALE-kokeita, vaikkakin vähemmän kuin hiilidioksidipitoisuuksien sietoon tähtääviä ALE-kokeita. Esimerkiksi *Schizochytrium* sp. -mikrolevän ALEssa niitä altistettiin korkeampiin happipitoisuuksiin 40 päivän ajan, ja adaptoituneen kannan kuivapaino oli 31 % korkeampi verrattuna villityyppiin. Samalla adaptoituneen kannan rasvahappo- ja skvaleenipitoisuudet laskivat. Genomin sekvensoinnissa huomattiin kasvua isositraattidehydrogenaasin (ICDH) aktiivisuudessa, ja samalla ATP-sitraattilyaasin aktiivisuudessa. (LaPanse ja muut 2021.)

*Synechocystis* sp:n kolmen kuukauden mittainen ALE-koe on myös tehty alhaisemmalle pH-pitoisuudelle. Siinä adaptoitunut kanta kasvoi 5,5 pH:ssa, mutta adaptoitunut kanta kasvoi hitaammin kuin villityypin kanta alkuperäisessä 8 pH:ssa. Genomianalyysissa huomattiin 11 eri mutaatiota adaptoituneessa kannassa, mm. muutoksia geenien ekspressiossa ja mutaatio F0F1-ATPaasin operonissa. (LaPanse ja muut 2021)

### 4.3 Tuoton maksimointi

ALEn avulla voidaan myös parantaa mikrolevistä saatavien metaboliittien saantoa. Kun mikroleviä kasvatetaan abioottisissa stressiolosuhteissa, arvokkaiden metaboliittien tuotanto saattaa lisääntyä. Toisaalta tämä saattaa hidastaa mikrolevien kasvua, ja sitä kautta vähentää mikrolevien yleistä tuottavuutta ja nostaa kustannuksia. (Zhang ja muut 2021.) Tärkeimpänä tuoton kohteena on mikrolevien lipidien tuotannon lisääminen. Tämä johtuu siitä, että mikrolevistä saatavien biopoltoaineiden keskeinen osa on mikrolevien soluissa tuotetut triasyyliglyserolit. Lisäksi muita kohdemetaboliitteja ovat esimerkiksi DHA, EPA, hiilihydraatit, karotenoidit ja lipidit. (Sun ja muut 2018.)

Karotenoideja tai lipidejä mikrolevät voivat tuottaa ylimäärin stressiolosuhteissa, kuten korkeammassa suolapitoisuuksissa tai ravinteiden saannin ollessa rajoitettua.

Esimerkiksi mikrolevien *Dunaliella* sp:n lipidien erityis kasvoi 70 % ja *Chlorella vulgaris*illa 21,1 % kun niitä kasvatettiin korkeammassa suolapitoisuudessa. Toisena esimerkkinä, kun suolapitoisuutta nostettiin 4 %:sta 9 %:iin, *Dunaliella salinan*  $\beta$ -karoteenin tuotto kasvoi 30-kertaiseksi. Stressin lisäämiseen perustuvat keinot metaboliittien saannon parantamiseksi vaikuttavat kuitenkin yleensä solujen kasvuun

negatiivisesti. Lisäksi reaktiivisten happiradikaalien (ROS) muodostuminen on tärkeä osa solujen vasteesta stressiolosuhteisiin. Tämän takia on kehitetty kaksivaiheisia prosesseja, jotta saadaan ylläpidettyä biomassan kasvua ja vähennettyä oksidatiivista stressiä käyttämällä fytohormoneja tai antioksidantteja. (Sun ja muut 2018.)

#### 4.4 Substraatin käytön lisääminen

Mikrolevien substraatin käytön parantamisen pääsyy liittyy yleensä saasteiden käsittelyyn. Teollisissa sovelluksissa, kuten jätevedenpuhdistuksessa ja vaarallisten kemikaalien biologisessa hajottamisessa, mikrolevien täytyy hyödyntää tehokkaasti substraatteja. Fenoli on yleisimmin käytetty orgaaninen saaste mikrolevien ALEssa. Käyttämällä 100-500 mg/l fenolia ALEssa voidaan parantaa fenolin poistonopeutta ja lyhentää sen puoliintumisaikaa ympäristössä, kun käytetään *Chlorella* sp. ja *I. galbana* Parke -leviä. (Zhang ja muut 2021.)

#### 4.5 Adaptiivinen laboratorioevoluutio syanobakteereissa

Syanobakteereilla on potentiaalia toimia autotrofisina solutehtaina biopolttoaineiden ja kemikaalien tuotannossa. Syanobakteerien käyttö tällaiseen tuotantoon on kuitenkin rajoittunutta heikon stressinsietokyvyn ja alhaisen saannon vuoksi, mikä heikentää niiden taloudellista kannattavuutta teollisessa tuotannossa. Viime vuosina syanobakteerien ALEssa on saatu hyvin edistystä kasvunopeuden optimoinnin, toleranssin lisäämisen, substraatin käytön tehostamisen ja tuotannon lisäämisen suhteen. Syanobakteerien ALE on myös edennyt syanobakteerien sietokyvyn parantamisessa korkeaan valon intensiteettiin, raskasmetalli-ioneihin, suolapitoisuuksiin ja orgaanisiin liuottimiin. ALEn tehokkuus syanobakteereissa on kuitenkin yleensä matala, eikä erilaisten stressitekijöiden sietokyvyn taustalla olevia molekyyli-tason mekanismeja ole täysin selvitetty. (Gao ja muut 2023.)

##### 4.5.1 Lämmönsietokyvyn lisääminen

ALEn avulla voidaan lisätä syanobakteerien kykyä kasvaa normaalista poikkeavissa lämpötiloissa. Eräässä *Synechocystis* sp. -syanobakteerin vuoden mittaisessa ALE-kokeessa paranneltiin lämpötilansietokykyä, ja loppuseulonnassa huomattiin, että kuusi

27:stä kannasta oli adaptoitunut paremmin korkeampiin lämpötiloihin. Lopulta adaptoituneet kannat kasvoivat vakaasti maksimilämpötilassa 45,8 asteessa. Adaptoituneessa kannoissa havaittiin mutaatioita pyruvaattikinaasi 2:ssa, *clpC*:ssä, ryhmän 3 RNA-polymeraasi sigmatekijässä ja adenyylaattisyklaasi *cya1*:ssä. Yllättäen pyruvaattikinaasi 2 (*pyk2*) -geenin muutos, joka ei suoraan liity lämmönsietokykyyn, on osoittautunut tärkeäksi. Geenien tutkimus siis auttavat havaitsemaan uusia geneettisiä muutoksia, jotka eivät olisi ilmeisiä muutoin. (LaPanse ja muut 2021.)

#### 4.5.2 Valonsietokyvyn lisääminen

ALEn avulla on kehitetty syanobakteerikantoja, jotka kestävät paremmin korkeita ja vaihtelevia valon intensiteettejä villityypin kantoja paremmin. Dann ja muut (2021) tekemässä tutkimuksessa havaittiin, että ALElla saatiin tehostettua fotosynteesiä. Tässä ALE-kokeessa kasvatettiin *Synechocystis*-kantoja, jotka kasvavat äärimmäisen korkeilla valon intensiteeteillä, jotka ylittävät luonnollisesti esiintyvän säteilyn. Valon intensiteetin sietokyvyn havaittiin liittyvän yli 100 muutokseen proteiineissa, jotka olivat mukana erilaisissa solutoiminnoissa, kuten geenien ilmentymisessä, fotosynteesissä ja aineenvaihdunnassa.

#### 4.5.3 Adaptaatio liuottimiin

Syanobakteereilla on potentiaalia toimia solutehtaina, joissa hiilidioksidia muunnetaan fotoautotrofisesti hyödyllisiksi kemikaaleiksi. Tässä solujen stressinsietokykyä lisätään asteittain, jotta solujen kasvu paranee kohti haluttua tuotetta, eli samalla menetelmällä kuin mikrolevivissäkin. Syanobakteerien ALE-kokeet erityisesti alkoholeihin ovat olleet suosittuja biopoltoainetuotannon takia. (Srivastava ja muut 2021.)

Butanolia voidaan tuottaa geneettisesti muokatuista syanobakteereista. Esimerkiksi 2014 toteutettiin ALE-koe butanolitoleranssin parantamiseksi *Synechocystis* sp:ssa. Tässä 395 päivää kestäneessä tutkimuksessa havaittiin 150 % korkeampi butanolitoleranssi. (LaPanse ja muut 2021.)

Lisäksi esimerkiksi Srivastavan ja muiden (2021) ALE-kokeessa saatiin parannettua nopeasti kasvavan syanobakteerin *Synechococcus elongatus* PCC 11801:n sietokykyä liuottimiin. Tutkimuksessa kantojen toleranssi useita alkoholeja kohtaan kasvoi, minkä

takia se voisi olla lupaava isäntä biopolttoaineiden fotosynteettiseen tuotantoon. Kokeessa adaptoituneilla kannoilla sietokyky alkoholeihin pysyi myös sen jälkeen, kun niitä oli passivoitu useita kertoja ilman alkoholia, mikä viittaa siihen, että muutokset olivat pysyviä. Koko genomien sekvensoinnissa huomattiin mutaatioita useissa stressiin reagoivissa geeneissä, jotka koodaavat translaation aloitustekijöitä, RpoB:tä ja ABC-transportterea.

## 5 Adaptiivisen laboratorioevoluution tulevaisuus, mahdollisuudet ja haasteet

Yksi isoimmista haasteista ALEssa on se, että siihen usein vaaditaan pitkä aika, mikä voi vaikeuttaa steriiliyden ylläpitoa ja aineenvaihduntareittien stabiiliutta (Lee ja Kim 2020). Lisäksi ALEssa ei välttämättä saada haluttua fenotyyppiä ja siksi onkin tärkeää suunnitella hyvin kasvuympäristö ja valintapaine, jotta saadaan todennäköisemmin toivottu fenotyyppi (Dragosits ja Mattanovich 2013).

ALE-kokeissa on myös mahdollisuus liian suureen määrään mutaatioita, mikä voi olla haitaksi, kun neutraalit tai haitalliset muutokset kasaantuvat ja yliajavat hyödylliset mutaatiot tietyissä olosuhteissa. Tällaiset mutaatiot voivat aiheuttaa erikoistuneita mikroleviä, jotka menestyvät hyvin vain tietynlaisessa ympäristöolosuhteessa.

Esimerkiksi *C. reinhardtii* -levälle toteutettiin ALE-koe, jotta se voisi kasvaa korkeissa suolapitoisuuksissa. Adaptoitunut kanta kasvoi hyvin korkeissa suolapitoisuuksissa, mutta ei enää selvinnyt kunnolla makeassa vedessä. (LaPanse ja muut 2021.) ALE syanobakteereissa voi lisätä toleranssia lisättyyn stressiin mutta haittapuolena jokin muu solun toiminto, kuten fotosynteesin tehokkuus voi samalla kärsiä ei-stressiolosuhteissa (Dann ja muut 2021).

ALElla tuotettujen kantojen kestävydestä ja pitkäikäisyydestä ei ole paljoa tutkimusta. Kun ALE-kokeiden lopullisena tavoitteena on kehittää kaupallisia kantoja, tulevaisuuden ALE-tutkimuksissa voisi olla hyödyllistä varmistaa kantojen vakaus pitkällä aikavälillä. Lisäksi mikrolevien ALE on jokseenkin rajoittunutta geenikirjastojen puuttumisen takia. (LaPanse ja muut 2021.)

ALE-kokeissa tapahtuvien mutaatioiden määrä on suhteellisen pieni verrattuna muihin mutageneesimenetelmiin. Pienemmän mutaatiomäärän takia yksittäisten, merkittävien mutaatioiden tunnistamisen helpompaa. (Sun ja muut 2018.) ALE on myös hyvä keino

lisätä kantojen stressinsietokykyä tai muita haluttuja ominaisuuksia ilman ennakkotietoja spesifisistä geneettisistä mekanismeista (LaPanse ja muut 2021).

Vaikka on olemassa monia ALE-tutkimuksia keskittyen mikrolevien adaptaatioon korkeampaan hiilidioksidipitoisuuteen, lämpötilaan ja suolapitoisuuteen, niin tutkimuksia, jotka keskittyvät niiden sopeutumiseen pH:n tai happipitoisuuden muutoksiin, on vain vähän. Tulevaisuudessa voisi siis hyödyllistä tutkia näitä vähemmän tutkittuja stressitekijöitä, sillä niistä saatava tieto voi olla arvokasta. Käyttämällä automatisoituja kasvatusmenetelmiä ja uusia DNA:n sekvensoinnin menetelmiä, tulevaisuuden ALE-kokeilla voitaisiin saavuttaa vielä monimutkaisempia adaptaatioita, jotka auttaisivat mikroleväpohjaisten biopolttoaineiden kehityksessä. (LaPanse ja muut 2021.)

## 6 Yhteenveto

ALE on osoittautunut tehokkaaksi menetelmäksi parantaa mikrolevien ja syanobakteerien ominaisuuksia. ALElla avulla voidaan kehittää kantoja, jotka sietävät paremmin stressiä, kasvavat nopeammin tai tuottavat enemmän haluttuja metaboliitteja, kuten lipidejä. Tämä on erityisen tärkeää bioteknologian ja teollisten sovellusten kannalta, joissa mikroleviä ja syanobakteereita voidaan käyttää esimerkiksi jäteveden puhdistamiseen, hiilidioksidin talteenottoon ja biopolttoaineiden.

Mikrolevien ja syanobakteerien ALEssa on kuitenkin vielä kehitettävää, sillä adaptoituneiden kantojen stabiiliutta ei juuri ole tutkittu. Tulevaisuudessa olisi hyödyllistä keskittyä myös vähemmän tutkittuihin stressitekijöihin, kuten pH:n ja happipitoisuuden muutoksiin, mikä voi avata uusia mahdollisuuksia sovellusten kehittämiseen. Varsinkin suuressa teollisessa mittakaavassa ympäristöolosuhteet voivat vaihdella enemmän, jonka takia eri ympäristöihin adaptoituneet kannat voivat olla hyödyllisiä. Lisäksi kestävän kehityksen tavoitteiden edistäminen, kuten ilmastonmuutoksen hillitseminen ja luonnonvarojen kestävä käyttö, hyötyvät suoraan ALEN tarjoamista mahdollisuuksista. ALEN avulla voidaan siis edistää ekologisesti kestäviä innovaatioita, jotka liittyvät laajempiin ympäristötavoitteisiin.



## Kirjallisuus

Arora, N., & Philippidis, G. P. (2021) Microalgae strain improvement strategies: Random mutagenesis and adaptive laboratory evolution. *Trends Plant Sci* **26**:1199–1200.

Collins, S., & Bell, G. (2004) Phenotypic consequences of 1,000 generations of selection at elevated CO<sub>2</sub> in a green alga. *Nature* **431**:566–569.

Dann, M., Ortiz, E. M., Thomas, M., Guljamow, A., Lehmann, M., Schaefer, H., & Leister, D. (2021) Enhancing photosynthesis at high light levels by adaptive laboratory evolution. *Nature Plants* **7**:681–695.

Dragosits, M., & Mattanovich, D. (2013) Adaptive laboratory evolution – principles and applications for biotechnology. *Microbial Cell Factories* **12**:64.

Gao, J., Zhu, X., Sun, T., Chen, L., & Zhang, W. (2023) Advances in using adaptive laboratory evolution technology for engineering of photosynthetic cyanobacteria. *Chin J Biotechnol* **39**:3075–3094

LaPanse, A. J., Krishnan, A., & Posewitz, M. C. (2021) Adaptive Laboratory Evolution for algal strain improvement: methodologies and applications. *Algal Research* **53**:102122.

Lee, S., & Kim, P. (2020) Current Status and Applications of Adaptive Laboratory Evolution in Industrial Microorganisms. *J Microbiol Biotechnol* **30**:793–803.

- Li, D., Wang, L., Zhao, Q., Wei, W., & Sun, Y. (2015) Improving high carbon dioxide tolerance and carbon dioxide fixation capability of *Chlorella* sp. by adaptive laboratory evolution. *Bioresour Technol* **185**:269–275.
- Parmar, A., Singh, N. K., Pandey, A., Gnansounou, E., & Madamwar, D. (2011) Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. *Bioresour Technol* **102**:10163–10172.
- Shin, S.-E., Koh, H. G., Kang, N. K., Suh, W. I., Jeong, B.-r., Lee, B., & Chang, Y. K. (2017) Isolation, phenotypic characterization and genome wide analysis of a *Chlamydomonas reinhardtii* strain naturally modified under laboratory conditions: towards enhanced microalgal biomass and lipid production for biofuels. *Biotechnol Biofuels* **10**:308.
- Srivastava, V., Amanna, R., Rowden, S. J. L., Sengupta, S., Madhu, S., Howe, C. J., & Wangikar, P. P. (2021) Adaptive laboratory evolution of the fast-growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 11801 for improved solvent tolerance. *J Biosci Bioeng* **131**:491–500.
- Sun, X.-M., Ren, L.-J., Zhao, Q.-Y., Ji, X.-J., & Huang, H. (2018) Microalgae for the production of lipid and carotenoids: A review with focus on stress regulation and adaptation. *Biotechnol Biofuels* **11**:272.
- Zhang, B., Wu, J., & Meng, F. (2021) Adaptive Laboratory Evolution of Microalgae: A Review of the Regulation of Growth, Stress Resistance, Metabolic Processes, and Biodegradation of Pollutants. *Front Microbiol* **12**:737248.