

# FAP-entsyymi osana biotulevaisuutta

TkK-tutkielma  
Turun yliopisto  
Bioteknologian laitos  
Biotekniikka  
Huhtikuu 2024  
Kirsi Härkönen

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

Tiivistelmä

TURUN YLIOPISTO

Bioteknologian laitos

KIRSI HÄRKÖNEN: FAP-entsyymi osana biotulevaisuutta

TkK-tutkielma

Biotekniikka

Joulukuu 2023

---

Vuonna 2017 mikrolevän kloroplastissa havaittiin harvinainen fotoentsyymityyppi, FAP-entsyymi, joka kykenee katalysoimaan vapaiden pitkäketjuisten rasvahappojen dekarboksylaatiota sinisen valon avulla. Reaktion lopputuloksena saadaan tuotettua alkaaneja sekä alkeeneja. Entsyymien reaktio tapahtuu valoa sitovan flaviiniadeniininukleotidi (FAD) -kofaktorin avulla, joka irrottaa elektronin rasvahapposubstraatilta katalyysin käynnistämiseksi. Tämän tutkielman tavoitteena on syventää ymmärrystä FAP-entsyymien rakenteesta, erityispiirteistä ja reaktiomekanismista. Lisäksi siinä käsitellään sen soveltuvuutta biotekniikan prosesseissa, kuten biopolttoaineiden ja biohajoavien muovien valmistuksessa.

Tutkielmassa päästiin siihen lopputulokseen, että FAP-entsyymi on lupaava biokatalyytti hiilivetypolttoaineiden tuottamisessa pitkäketjuisista rasvahapoista. Entsyymien rakenteessa on kaksi erillistä domeenia, joista toiseen sitoutuu FAD-kofaktori ja toiseen rasvahapposubstraatti. Entsyymien aktiivisen kohdan rakenne mahdollistaa sen monipuolisen käytön erilaisten karboksyylihappojen kanssa. FAP-entsyymi voi toimia tehokkaasti biohajoavien muovien kierrätyksessä, erityisesti muuttamalla alifaattisia pitkäketjuisia dikarboksyylihappoja alkaaneiksi. Tutkielma lisää tietämystä FAP-entsyymien sovellusmahdollisuuksista ja tarjoaa näkemyksiä sen mahdollisista haasteista ja rajoituksista eri sovelluksissa.

Avainsanat

biotekniikka, FAP-entsyymi, biopolttoaineet, biohajoavat muovit

# Sisällys

1 Johdanto .....	2
2 FAP-entsyymi.....	3
2.1 FAP-entsyimin rakenne.....	4
2.2 FAP-entsyimin katalysoima reaktio.....	4
2.3 Stabiilisuuden optimointi .....	6
3 FAP-entsyimin potentiaali biopolttoaineiden tuotannossa.....	7
4 FAP-entsyimin hyödyntäminen biohajoavien muovien kierrätyksessä .....	9
5 FAP-entsyimin tuottamisen tekniikat .....	9
5.1 FAP-entsyimin tuottaminen bakteerisoluiissa.....	9
5.2 OptoFAP .....	10
5.3 Huomioitavat piirteet teollisessa tuotossa.....	11
6 Rajoitteet ja tulevaisuuden näkymät .....	11
Yhteenveto .....	13
Lähteet.....	15

# 1 Johdanto

FAP-entsyymi (engl. *fatty acid photodecarboxylase*, FAP) ja sen sovellukset ovat nousseet merkittäväksi tutkimuskohteeksi, erityisesti biotekniikan ja kemian näkökulmasta. Fotoentsyymit, jotka vaativat valoa katalysoimaansa reaktioon, ovat harvinaisia luonnossa, mutta vuonna 2017 havaittiin fotoentsyymityyppi, joka kykenee katalysoimaan pitkäketjuisten rasvahappojen dekarboksylaatiota. Näin saadaan tuotettua alkaaneja sekä alkeeneja, ja nämä synteettisen biologian ja biokatalyysin viimeaikaiset edistysaskeleet ovat avanneet ovia innovatiivisille ja kestäville menetelmille esimerkiksi biopolttoaineiden sekä biomateriaalien tuottamiseen. Biokatalyytit sekä niiden tekniikka ovat keskeisiä näissä hankkeissa.

Entsyymireaktioihin perustuvat biotekniikan sovellukset ovat tärkeitä, sillä ne antavat tehokkaan ja kestävä tavan monien teollisten prosessien kehittämiseen ja parantamiseen. Niiden vahvuutena on monipuolisuus, tehokkuus, ympäristöystävällisyys ja turvallisuus. Monipuolisia niistä tekee sen, miten monenlaisiin eri reaktioihin niitä voi käyttää katalyyttinä, esimerkkinä hydrolyysi ja hapetus-pelkistysreaktiot. Tehokkuus näkyy niiden kykyinä toimia spesifisesti pystyen tunnistamaan ja muokkaamaan tiettyjä molekyyliä tarkasti. Ympäristöystävällisyys tulee mahdollisuudesta käyttää uusiutuvia raaka-aineita, jotka vähentävät yhteiskunnan tämänhetkistä riippuvuutta fossiilista raaka-aineista. Tämän lisäksi entsyymireaktiot tapahtuvat suhteellisen neutraaleissa olosuhteissa, sillä lämpötilan vaihtelu ei ole suurta eikä niiden kanssa usein käytettyjä voimakkaita emäksiä tai happoja, mikä tekee niistä samalla myös turvallisia. Entsyymejä tutkitaan jatkuvasti enemmän, joten niiden skaalaus tulee olemaan tulevaisuudessa entistä helpompaa tuotantotasolla.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena on syventää ymmärrystä FAP-entsyymin rakenteesta, reaktiomekanismista ja sen soveltuvuudesta erilaisiin bioteknologisiin prosesseihin. Ensinnäkin käsittelen entsyymin rakennetta, sen erityispiirteitä ja aktiivisuutta eri substraateilla. Tämän jälkeen tarkastelen entsyymin käyttöä biopolttoaineiden tuotannossa sekä biohajoavien muovien kierrätyspotentialiaa. Tutkimuksen tavoitteena on lisätä tietämystä FAP-entsyymin monipuolisista sovellusmahdollisuuksista ja samalla tunnistaa mahdollisia haasteita ja rajoituksia näissä sovelluksissa.

## 2 FAP-entsyymi

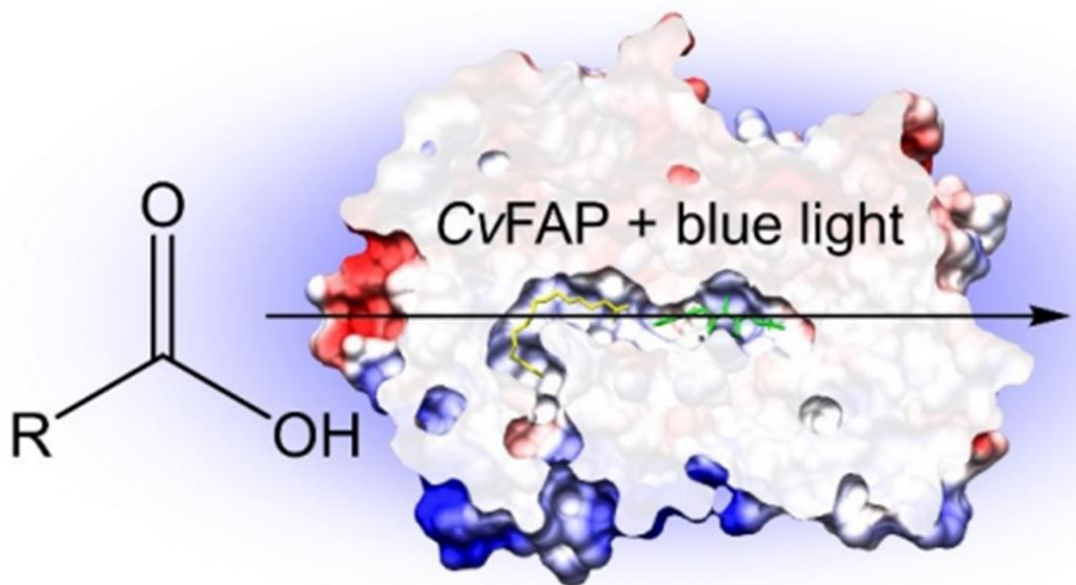
Fotoentsyymit, jotka tarvitsevat valoa katalysoimaansa reaktioon ovat luonnossa harvinaisia. Luonnossa niitä esiintyy yhteensä kolmea entsyymityyppiä, joista kaksi pitkään tunnettua ovat DNA-fotolyaasi, jonka tehtävä on korjata UV-säteilyn vaurioittamaa DNA:ta ja protoklorofyllidi, joka on klorofyllin synteesiin osallistuva oksidoreduktaasi. Vuonna 2017 tietyn mikrolevälajin, *Chlorella variabilis NC64A*, kloroplastissa havaittiin fotoentsyymityyppi, joka katalysoi pitkäketjuisia rasvahappojen dekarboksylaatiota tuottaen alkaaneja sekä alkeeneja. (Zeng ja muut 2022.) FAP-entsyymi käyttää aktivoituakseen sinistä valoa, joka on aallonpituudeltaan 400–520 nanometriä, mutta on myös herkkä inaktivoitumaan valon vaikutuksesta. Tämän takia on ehdotettu, että teollisessa käytössä sitä tulisi säilyttää ja puhdistaa pimeissä olosuhteissa aina kun mahdollista. (Sui ja muut 2023) Tarkemmin tarkasteltuna FAP-entsyymi tarvitsee valoa aktivoimaan hapettuneen FAD-kofaktorinsa, joka irrottaa katalyysin käynnistämiseksi elektronin rasvahapposubstraatilta. Syklin loppuvaiheessa FAD-kofaktori siirtää elektronin takaisin alkyylille ja protoni luovuttaa alkaanituotteen. (Moulin ja muut 2021.)

Luontaisessa ympäristössä FAP-entsyymi katalysoi *Chlamydomonas reinhardtii* viherlevän ainoan hiilivedyn, 7-heptadekaanin muodostumista. Entsyymi on kalvoassosioitunut ja yli 90 % hiilivedystä saadaan talteen kloroplastin tylakoidikalvostosta. Entsyymi on kulkenut aitotumaisten solujen plastideissa evoluution alun jälkeen ja eri leväsukujen karakterisoinnin jälkeen on voitu todeta, että FAP-entsyymien fotokemiallinen aktiivisuus on ollut läsnä puna- ja ruskolevissä eikä se ole rajoittunut yksisoluisiin lajeihin. Tämän avulla on voitu todeta, että entsyymi on säilynyt useimpien fotosynteesiä käyttävien levälinjojen evoluution mukana ja sen toiminnan olevan fotosynteettisissä kalvoissa. (Moulin ja muut 2021.)

Sen lisäksi, että FAP on harvinainen fotoentsyymi, se on lupaava biokatalyytti tulevaisuuden hiilivetytöltoaineiden tuottamisessa luonnostaan runsaista rasvahapoista (Santner ja muut 2021) sekä erikoiskemikaalien valmistuksessa. Entsyymien heikko katalyyttinen stabiilisuus on kuitenkin merkittävä rajoittava tekijä.

## 2.1 FAP-entsyymin rakenne

*Chlorella variabilis* NC64A levän FAP-entsyymin (CvFAP) rakenne sisältää kaksi erillistä domeenia, joita pitävät lähekkäin useat proteiinisilmukat (Kuva 1). FAD-kofaktori on sitoutunut entsyymin N-terminaaliseen domeeniin ja rasvahapposubstraatti kiinnittyy C-terminaaliseen domeeniin. FAP-entsyymissä on hydrofobinen substraatin sisäänmenokanava, johon mahtuu rasvahapon alkyyliketju (esim. palmitiinihapon) ja jossa substraatin karboksyyliiryhmä sijoittuu lähelle FAD-kofaktoria. (Lakavath ja muut 2020.) CvFAP-entsyymin ensisijainen rakenne koostuu 654 aminohaposta ja sen massa on noin 69 kDa (Sui ja muut 2023).



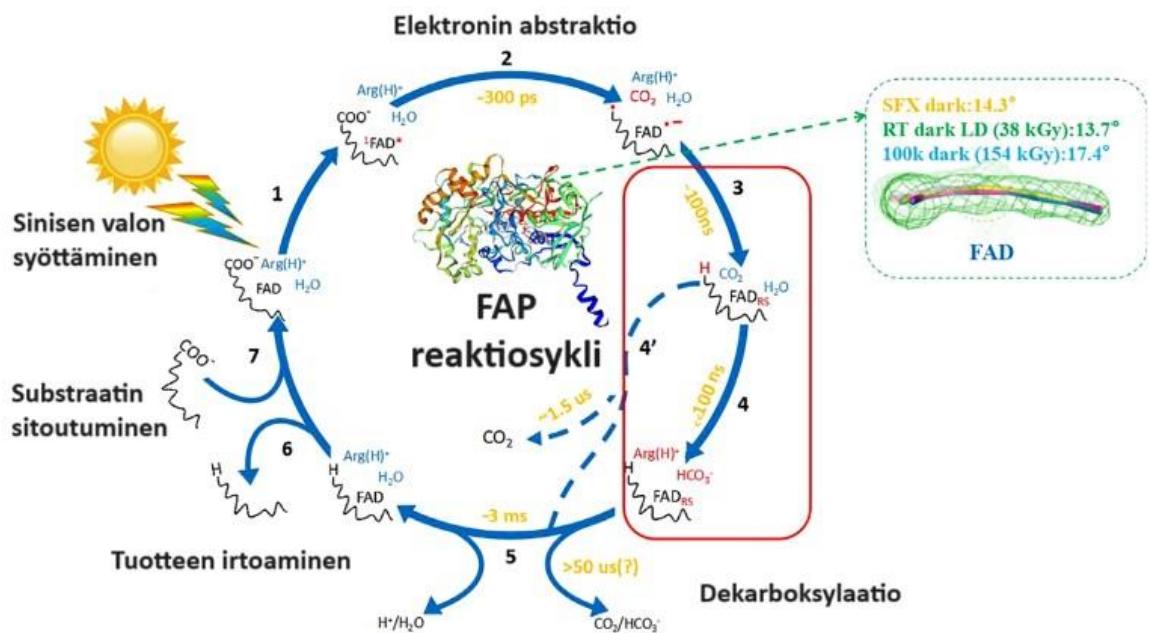
Kuva 1. Entsyymien rakenne poikkileikkäuskuvana (Santner et al. *CHEMCATCHEM* (2021), 13:4038–4046)

FAP:n aktiivisessa kohdassa on useita konservoituneita aminohappoja, jotka ympäröivät FAD-kofaktoria ja rasvahapposubstraatin karboksyylihappo-osaa. Näitä aminohappoja ovat esimerkiksi arginiini ja kysteiini, jotka voivat toimia protonin luovuttajina sekä alaniini, joka on juuri FAP-entsyymille ominainen aminohappo ja erottaa sen muista GMC-oksidoreduktaasiperheen (engl. *glucose methanol choline oxidoreductase family*) proteiineista, mihin sen luokitellaan kuuluvan. (Hedison ja muut 2022.)

## 2.2 FAP-entsyymin katalysoima reaktio

FAP-entsyymin katalyyttisen syklin käynnistyessä rasvahappo sitoutuu pitkän hydrofobista tunnelia ja karboksylaattiryhmä siirtyy lähelle FAD-kofaktoria (Kuva 2).

Sinisen valon avulla kofaktori on virittyneessä tilassa ja elektroni siirtyy substraatin karboksylaattiryhmästä FAD-kofaktoriin. Tämän myötä muodostuu anioninen FAD-kofaktori sekä karboksylaattiradikaali. Rasvahapporadikaalin dekarboksylaatio tapahtuu samanaikaisesti FAD-kofaktorin reaktion kanssa ja sitä rajoittaa hiilidioksidin vapautuminen karboksyylihapporadikaalista alkyyliradikaalin tuottaessa. (Hedison ja muut 2022.)



Kuva 2. FAP-entsyymin katalysireaktio, jossa on erikseen korostettu vihreällä FAD-kofaktorin rakennetta sekä punaisella väliaineen muodostumista ja hajoamista (muokattu kuvasta Sui ja muut, 2023)

Tutkimusten seurauksena on onnistuttu kehittämään FAP-entsyymiriippuvaisia entsyymikaskadeja, joiden avulla pystytään tuottamaan arvokkaita kemikaaleja. Proteiini- ja muokkauksen avulla entsyymien kanssa reagoivien substraattien valikoimaa saatiin laajennettua rasvahapoista hydroksihappoihin ja aminohappoihin. (Sui ja muut 2023.) Kemiaallinen reaktio on haasteellinen, koska entsyymien rasvahappojen sivureaktiot (esimerkiksi radikaalihakettuminen) voivat tapahtua helposti. FAP-entsyymiä on käytetty kaskadireaktioissa muiden entsyymien kanssa valmistettaessa pitkäketjuisia alifaattisia amiineja sekä estereitä. (Zeng ja muut 2022.)

Tutkimukset ovat osoittaneet, että FAP-entsyymi on monipuolinen, koska se pystyy sitoutumaan monenlaisten karboksyylihappojen kanssa, joiden hiiliketjujen pituus



vaihtelee viidestä kahdeksaantoista hiileen. Tämä ominaisuus lisää sen tehokkuutta entisestään. Sen suurin aktiivisuus on heksadekaanihappoa (C16) ja heptadekaania (C17) kohtaan, kun taas lyhyempiä hiiliketjuja kohtaan aktiivisuustaso on alhaisempi. (Santner ja muut 2021) FAP-entsyymi ei pysty katalysoimaan joitakin lyhytketjuisia ja haihtuvia rasvahappoja, kuten etikkahappoa (C2) ja propionihappoa (C3). Tämän arvellaan johtuvan entsyymin aktiivisen taskun (engl. *active pocket*) koosta ja vuorovaikutuksen stabiilisuudesta substraatin kanssa. (Sui ja muut 2023.)

Kokeet ovat osoittaneet, että pitkäketjuisten rasvahappojen liukoisuuden parantaminen edistää FAP-entsyymin herkkyyttä dekarboksylaatiolle ja vähentää valon vastaanottamisen heikentymistä, joka johtuu alhaisesta liukoisuudesta. Samalla osa tutkimuksista ovat osoittaneet, että rasvahappojen suurempi määrä ei ole välttämätön suuremman hiilivetyisaannon saamiseksi. (Sui ja muut 2023.)

Osa tutkijoista on todennut, että hiilivetyjen tuotannossa FAP-entsyymi suosi eniten substraattina asyylikoentsyymi-A:ta (engl. *acyl-coenzyme A*, acyl-CoA) eikä esimerkiksi vapaita rasvahappoja (engl. *free fatty acids*, FFA). Reaktiolle on ehdotettu uutta reittiä, jossa asyyli-CoA sitoutuisi ensin FAP-entsyymin aktiiviseen kohtaan ja hydrolysoitaisiin polaarilla jäännöksillä tioesterisidoksen ympärillä veden tai hydroksidin avulla. Sen jälkeen CoA irtoaa aktiivisesta kohdasta, ja tämän jälkeen vasta vapaat rasvahapot sitoutuisivat FAP-entsyymin hydrofobiseen kanavaan, jonka jälkeen seuraisi dekarboksylaatio. FAP-entsyymin affinitettivakio asyyli-CoA:lle on korkeampi kuin rasvahapoille ja asyyli-CoA käy läpi hydrolyyttisen reaktion ennen fotokemiallista sykliä. Tämä reaktiosarja on saanut aikaan parannellun ja tuotantotehokkaamman metabolisen reitin, jolla saadaan tuotettua merkittävästi enemmän hiilivetyjä. (Sui ja muut 2023.)

### 2.3 Stabiilisuuden optimointi

Teollisessa käytössä on todettu, että karboksyylihapon lisääminen esivalaisuvaiheessa auttaa parantamaan FAP-entsyymin fotostabiilisuutta. Karboksyylihapoista erityisesti oktaanihapon (C8) on todettu olevan tehokas. Tutkimusten perusteella on todistettu, että paras tapa ylläpitää entsyymin fotostabiilisuutta on antaa sille jatkuvasti substraatteja ja näin estää inaktiivisten entsyymimolekyylien kertyminen. Aerobinen ympäristö aiheuttaa happimolekyylien muodostumisen, mikä puolestaan tukahduttaa FAP-entsyymin

aktiivisuutta. Anaerobinen ympäristö puolestaan parantaa FAP-entsyymin fotostabiiliisuutta. (Sui ja muut 2023.)

Puhdistetun FAP-entsyymin aktiivisuus vähenee nopeasti yli 35°C:een lämpötilassa, mutta elävissä *Escherichia coli*lla tuotettu entsyymi säilyttää suhteellisen hyvän aktiivisuuden 40–45 °C lämpötilassa. FAP-entsyymin paranteluun on käytetty alkuperäisen sekvenssin parantelumenetelmää (engl. *ancestral sequence reconstruction*, ASR) teoreettisen fotodekarboksylaasin kladin (engl. *photodecarboxylases clade*) lämpöstabiilisuuden parantamiseksi. Tämä johti merkittävään parannukseen entsyymintuotannon saannossa ja aktiivisuudessa korkeissa lämpötiloissa. (Sui ja muut 2023.)

### 3 FAP-entsyymin potentiaali biopolttoaineiden tuotannossa

Jatkuvasti kasvavat öljyn tuotannon kustannukset sekä ympäristöhuolet sen tuotannosta ja käytöstä ovat korostaneet tarvetta kehittää uusiutuvia liikennepolttoaineita, jotka perustuvat energiarikkaisiin biomolekyyleihin, kuten alkoholeihin, rasvahappoihin ja hiilivetyihin. Esimerkiksi jotkin biomolekyylit, kuten butanoli, voivat toimia ainoastaan sekoitusaineina perinteisen dieselpolttoaineen kanssa, kun taas toiset, kuten rasva-alkoholit tai muut rasvahapot, vaativat erillisen uuttamisen käymisliemestä. Jotta teollisen prosessin kustannuksia voitaisiin laskea huomattavasti, yksi mahdollinen ratkaisu on molekyylien suora synteesi mikrobien avulla ja niiden vapauttaminen ja talteenotto solujen ulkopuolella. Hiilivedyt ovat yksi lupaavimmista polttoainemolekyyleistä, joista erityisesti alkaanit ovat myös nykyisten fossiilisten polttoaineiden pääkomponentteja. (Santner ja muut 2021.)

Viime vuosikymmeneltä lähtien monia muita rasvahappokarboksylaaseja on tutkittu laajasti kestävän drop-in-biopolttoaineen tuotannon kannalta. Muut happiriippuvaliset entsyymit vaativat jatkuvaa pelkistävien aineiden saantia ja ovat tehottomia elektronisiirron kannalta, mikä aiheuttaa sen, että niillä on haastavaa luoda toteuttamiskelpoista biokatalyyttistä prosessia. FAP-entsyymin reaktio ei puolestaan vaadi happea taikka hapetus-pelkistysreaktiota eikä sen FAD-kofaktori tarvitse ulkopuolisia elektroneja regeneroitumiseen. Toisin sanoen, FAP-entsyymin isoin etu on sen kyky käyttää valoa tuottaakseen synteettisesti vahvasti sitoutuneita alkyyliradikaaleja

rasvahapoista, joita on kaikkialla luonnossa. Sen takia juuri tämä entsyymi on lupaava vaihtoehto biopolttoaineiden tuotantoon. (Santner ja muut 2021.)

Muutama vuosi FAP-entsyymien löytämisen jälkeen siitä on tehty lupaavia havaintoja liittyen sen hyödyllisyyteen erilaisissa synteettisen kemian sovelluksissa biopolttoaineiden tuotannosta entsyymien soveltaviin ominaisuuksiin. Biopolttoaineiden kehityksen kannalta entsyymistä tarvitaan kestäviä variantteja, joiden selektiivisyys vaihtelee lyhyempiä tai pidempiä rasvahappoketjuja kohtaan. Niillä pitää olla myös suuri sitoutumisaktiivisuus, koska muodostuvan alkeenin ketjun pituuden mukaan siitä saadaan hiilivetykomponenttia erityyppisille biopolttoaineille: bensiini, lentopetroli sekä diesel. (Santner ja muut 2021.)

FAP-entsyymistä johdettuja variantteja tutkittaessa on havaittu, että joillakin niistä on hyvin suuri spesifisyys vain yhteen rasvahapposubstraattiin. Tällaiset dekarboksylaasit, joilla on korkea substraattispesifisyys, voisivat käytännössä olla käyttökelpoisia tietyn mittaisen hiilivetyketjun kohdennetussa tuotannossa rasvahappojen seoksesta, esimerkiksi jäteöljystä ja uutetusta kasviöljystä. Lisäksi niitä voitaisiin soveltaa erityisesti kohderasvahappojen eristys- ja puhdistusprosesseissa, joissa epäpuhtaat rasvahapot voidaan tehokkaasti konvertoida uuttaviksi ja eristettävissä oleviksi emäksisiksi yhdisteiksi. (Santner ja muut 2021.)

Erityisesti CvFAP-variantti nimeltä Y466F on noussut yhdeksi ihanteellisimmista vaihtoehdoista polttoaineiden kehitykseen, koska sillä on korkea aktiivisuus C18 kohtaan ja hyvin alhainen C16 kohtaan. Useat tutkimukset ovat osoittaneet, että valo vaikuttaa CvFAP-aktiivisuuteen voimakkaasti. Erityisesti puhdistettu entsyymi menettää aktiivisuutensa nopeasti altistuessaan siniselle valolle rasvahapposubstraatin puuttuessa, koska proteiinin sisällä muodostuu radikaaleja, jotka johtavat sen inaktivaatioon. Esimerkiksi tunnin jälkeen siniselle valolle altistuneet Y466F-varianttia ilmentävät kokonaiset solut alkoivat menettää aktiivisuutensa, ja yli 80 % sen aktiivisuudesta laski kahden tunnin kuluessa. Entsyymivariantin herkkä deaktivoituminen sen ollessa solun sisällä viittaa siihen, että entsyymien suojaamista ei voi tehdä pelkästään valonsuodattamista rajoittamalla, vaan siihen vaikuttavat myös solussa esiintyvät endogeeniset rasvahappoalusta-aineet, jotka voivat sitoutua FAP-entsyymiin ja estää sivureaktioiden muodostumista. Kokonaiset solut ovat näin ollen vakaampia ja välttyvät paremmin valon aiheuttamilta vaurioilta. (Santner ja muut 2021.)

## 4 FAP-entsyymin hyödyntäminen biohajoavien muovien kierrätyksessä

FAP-entsyymin reaktiota voidaan soveltaa biohajoavien muovien kierrätyksessä. Pitkaketjuiset dikarboksyylihapot (engl. *long-chain dicarboxylic acid*, LCDA) ovat biohajoavien alifaattisten polyesterimuovien komponentteja, jotka syntetisoidaan alkaanipetrokemikaaleista. On tunnistettu lukuisia entsyymejä ja eliöitä, jotka muuttavat alifaattiset polyesterit nestekideaseiksi ja dioleiksi, mutta haasteena on muuntaa LCDA:t takaisin alkaaniksi. Sen reaktion helpottamisen seurauksena kiertomuovitalouden silmukka sulkeutuisi ja samalla muovien tuottamiseen tarvittavan alkeenin petrokemian määrä vähenisi. Luonnossa esiintyvä FAP-entsyymi pystyy dekarboksyloimaan alifaattisia dikarboksyylihappoja, joiden hiiliketjun pituus on 14–20 hiiltä. Entsyymivaikutuksesta LCDA:n fotokonversion alkaaneiksi arvelaan tapahtuvan kahden katalyyttisen syklin kautta. Ensimmäisessä katalyyttisessä syklissä LCDA-substraatin karboksylaattiryhmä on sijoitettu lähelle FAD:tä mahdollistaen rasvahappotuotteen muodostuminen FAP-katalysoidulla fotodekarboksylaatiolla. Tämän jälkeen tuotettu rasvahappo vapautuu ja se sidotaan uudelleen vastakkaiseen suuntaan toisen karboksylaattiryhmän dekarboksylaation helpottamiseksi lopullisen alkaanituotteen tuottamiseksi. (Hedison ja muut 2022.)

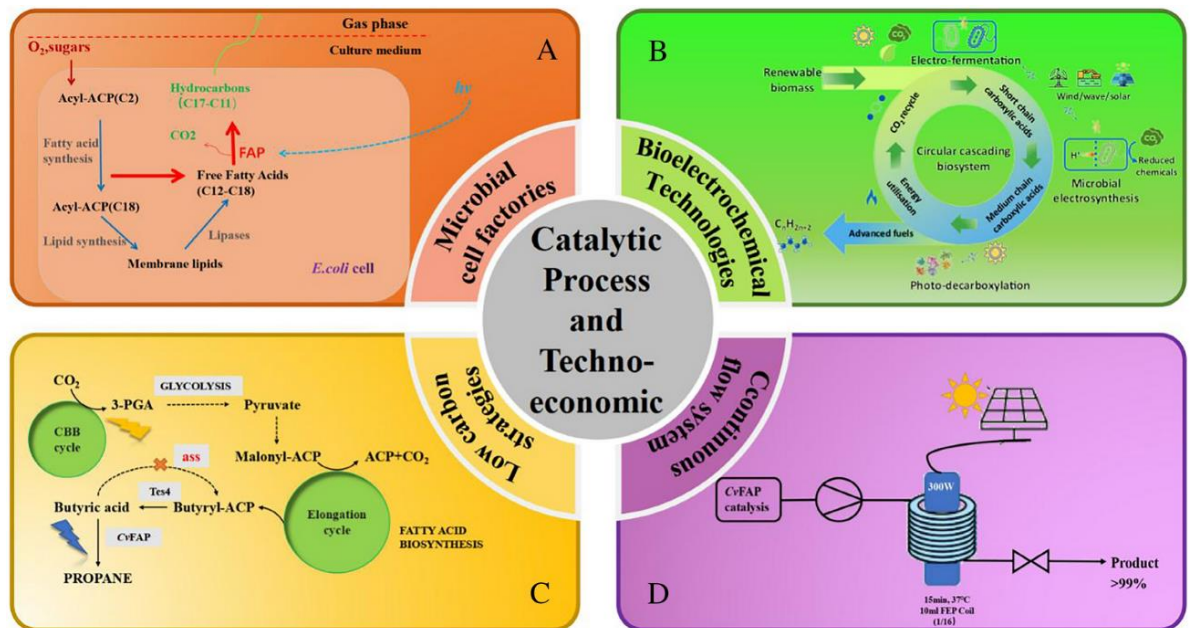
## 5 FAP-entsyymin tuottamisen tekniikat

### 5.1 FAP-entsyymin tuottaminen bakteerisoluisissa

Luonnossa mikrolevissä esiintyvässä *CvFAP*-entsyymissä on 654 aminohappoa. Teollisuudessa tästä on kehitelty variantti nimeltään FAPV1, josta puuttuu osuus, jonka avulla entsyymin sijainti kohdentuu mikrolevän kloroplastiin, ja näin ollen se sisältää koko entsyymin sekvenssistä aminohapot 62–654. Rekombinanttisesti *E. colissa* tuotettuina molemmat entsyymit osoittivat yhtäläistä entsyymiaktiivisuutta, mutta FAPV1 -varianttia voitiin tuottaa suurempia määriä. Tämän takia kokeissa käytetään usein FAP-entsyymivarianttia, jossa ei ole kloroplastisekvenssiä.

Kuva 3 havainnollistaa FAP-entsyymin erilaisia bioteknisiä sovelluksia ja mahdollisuuksia. Kuva 3A esittää aineenvaihduntareaktiota, jota käytetään hiilivetyjen

tuotantoon fotokatalyyttisesti *E. colissa*. Siinä bakteerisolua käytetään solutehtaana tuottamaan entsyymiä mahdollistaen jatkuva hiilivetyjen tuotto. Kuvassa 3B esitetään, kuinka voidaan yhdistää FAP-entsyymi ja muu biokemiallinen tekniikka ja näin tuottaa uusiutuvia polttoaineita karboksyylihaposta hyödyntäen valoa, biologista sekä elektrokemiallista katalyysia ja niiden etuja. Tällä saadaan tuotettua biomassasta hiilidioksidia ja alkaaneja samalla saaden aikaan hiilidioksidin kiertokulku. Tämän prosessin laajentamiseen teollisuutta varten tarvitaan yksityiskohtaista arviota sen ympäristövaikutuksista. Kuvassa 3C on käytetty vähähiilistä menetelmää, jossa fotosynteettinen syanobakteerisolua sitoo ilmakseen hiilidioksidia fotosynteesin avulla. Syanobakteerin sitoma hiili muutetaan tietyn CvFAP-entsyymivariantin avulla haihtuvaksi alkaaniksi, propaaniksi, jota voidaan hyödyntää polttoaineena. Kuvassa 3D on esitetty kasvatusmalli käyttäen ympäristöystävällisiä ja energiatehokkaita valonlähteitä, kuten valkoisia ja sinisiä LED-valoja sekä aurinkopaneeleja auringonvalon hyödyntämiseksi. (Sui ja muut 2023)



Kuva 3. Kaaviokuva erilaisista katalyyttisistä prosesseista ja taloudellisesta sekä teknisestä näkökulmasta (Sui ja muut 2023)

## 5.2 OptoFAP

Eräs tutkimuksissa kehitetty tekniikka, jonka avulla voidaan tuottaa FAP-entsyymiä elävissä *E. coli* soluissa, on nimeltään OptoLAC. OptoLAC menetelmää käytetään *lac*-operonin geeniekspression säätelyä sinisen valon avulla. Tätä on sovellettu

yhdistämällä OptoLAC:in ja fotokatalyysin edut, ja näin on saatu aikaan valo-ohjattu entsyymituotanto käyttäen biotransformaatiojärjestelmää nimeltä OptoFAP, jossa FAP-entsyymien tuotanto ja fotokatalyysi tapahtuu samassa tilassa elävissä soluissa kaksivaiheisesti (engl. *one-pot*). Tämä tekniikka on klassiseen entsyymituotantojärjestelmään verrattuna tehokkaampi, sillä näin saadaan mahdollistettua entsyymien tarkka tuotanto sekä vähennettyä biokatalyyttien erotteluvaiheita, kuten sentrifugointia, suodatusta ja solujen hajottamista. Tutkimuksessa käytettiin kasvualustana *E. coli* -bakteeria. OptoFAP-tekniikalla parhain saatu tulos on yli 200-kertainen verrattuna perinteisesti sinisellä valolla tuotettuun. Valon syöttö oli kasvun kannalta optimaalinen, kun se oli päällä ja poiskytkettynä kahden tunnin sykleissä. Valon ollessa päällä solussa tapahtui fotokatalyysiä ja sen ollessa pois entsyymituotantoa. (Cheng ja muut 2022.)

### 5.3 Huomioitavat piirteet teollisessa tuotossa

Jotta FAP-entsyymien valmistaminen suuressa mittakaavassa teollisuudessa olisi tehokasta ja kustannuksellisesti edullista, on olennaista optimoida olosuhteet sen katalyyttiselle aktiivisuudelle. Vaikuttavat tekijät ovat lämpötila, pH, valon intensiteetti ja substraatin pitoisuus. Lämpötilan optimointi on erityisen tärkeää, sillä tutkimuksissa FAP-entsyymi on osoittanut lämpötilariippuvaisuutta ja omaa kapean optimaalisen lämpötilan vaihtelun. FAP-entsyymistä on havaittu optimaalinen aktiivisuus pH-arvon ollessa 7,5. Valon on oltava sinistä valoa, tarkemmin tarkasteltuna aallonpituudeltaan 400–520 nanometrin väliltä. Liiallinen valolle altistaminen voi johtaa kuitenkin entsyymien inaktivaatioon, joten sitä on tarkkailtava. Substraatin pitoisuudessa suurin affiniteetti on havaittu keskipitkien ja pitkien rasvahappojen kanssa. Nämä kaikki on otettava huomioon maksimaalisen tehokkuuden saavuttamiseksi. (Sui ja muut 2023.)

## 6 Rajoitteet ja tulevaisuuden näkymät

FAP-entsyymien hyödyntämisessä teollisuudessa ollaan toistaiseksi alkuvaiheessa, mutta jo nyt tämä on näyttänyt lupaavalta fotokatalyytiltä, jota voitaisiin käyttää esimerkiksi lääkeaineiden, bioenergian ja torjunta-aineiden tuotannossa. Ennen tätä on silti pystyttävä ratkaisemaan sen herkkä inaktivaatio, joka toistaiseksi rajoittaa merkittävästi sen käyttöä

laajemmin. Samanlaista inaktivaatiota on havaittu muissakin oksidoreduktaaseissa. Tällä hetkellä tavoitteena on kehittää entsyymivariantti, joka sitoutuisi tiukasti valittuun substraattiin ja olisi mahdollisimman stabiili. Tähän astisissa varianteissa on huomattu olevan heikompi stabiilisuus kuin villityypin entsyymissä. Toivottavasti entsyymitutkimusta saataisiin siis kehitettyä tulevaisuudessa. (Hedison ja muut 2022.)

Tähän asti entsyymien haasteena on sen toistaiseksi pieni saanti, vaativat reaktioolosuhteet sekä pitkät reaktioajat. FAP-entsyymien suhteellisen rajallinen substraattivalikoima, joka on rajoittunut rasvahappoihin vaikeuttaa sen sovellusta. Muiden kemikaalien läsnäolon vaikutusta on tutkittu hieman, mutta ennen laajempaa käyttöä sitä on tutkittava lisää, koska ne voivat rajoittaa sen käyttöä käytännön sovelluksissa. Tulevaisuudessa odotetaan evoluutiotekniikoiden ja koneavusteisten entsyymisuunnittelutyökalujen ja muiden muokkaussuunnitteluohjelmien edistävän merkittävästi FAP-entsyymien fotokarboksyyliteknologian kehitystä. Suunnittelu ei saisi keskittyä kehittämään ainoastaan entsyymien toimintaa, tehokkuutta ja selektiivisyyttä, vaan myös suunnittelemaan entsyymien käyttömahdollisuutta teollisissa sovelluksissa. (Sui ja muut 2023.)

Tulevaisuudessa voitaisiin kehittää myös enemmän lyhytketjuisten rasvahappojen (C1-C6) tuottoa FAP-entsyymillä. Sitä on tutkittu tähän mennessä vähemmän, mutta on todettu, että niistä saadaan tuotettua vetyä tai  $C_{n-1}$  alkaaneja. (Liu ja Li, 2020)

## Yhteenveto

FAP-entsyymien fotodekarboksylaatio on ihanteellinen prosessi tulevaisuuden vihreää siirtymää ja biopolttoaineiden tuotantoa varten. Entsyymi kykenee käyttämään valoenergiaa suoraan ja itsenäisesti rasvahappojen dekarboksylaatioreaktiossa, jonka avulla saadaan tuotettua hiilivetyjä, kuten alkaaneja ja alkeeneja. Sillä on merkittäviä etuja perinteisiin hiilivetyjen tuotantotapoihin verrattuna, kuten uusiutuvan energialähteen hyötykäyttö sekä se, että se ei tuota myrkyllisiä sivuaineita. Reaktioon tarvittavat rasvahapot voidaan ottaa uusiutuvista resursseista tai jätteistä. FAP-entsyymien käyttömahdollisuus kasvaa lisääntyvän energiatarpeen täyttämiseksi ja samalla ympäristövaikutusten vähentämiseksi.

Entsyymikatalyyttiset ratkaisut tarjoavat tehokkaita ja ympäristöystävällisiä vaihtoehtoja teollisiin prosesseihin. Niiden monipuolisuus ja tehokkuus ovat avaintekijöitä, kun etsitään kestäviä ratkaisuja. FAP-entsyymien kohdalla sen kyky katalysoida pitkäketjuisten rasvahappojen dekarboksylaatiota valon avulla tekee siitä lupaavan biokatalyytin biopolttoaineiden tuotannossa ja erikoiskemikaalien valmistuksessa.

FAP-entsyymien parissa tehty tutkimus pyrkii ymmärtämään sen rakennetta, reaktiomekanismia ja sovellusmahdollisuuksia. Entsyymi tarvitsee valoa aktivoituaakseen ja sen rakenteeseen kuuluu kaksi domeenia, joista toinen sitoo FAD-kofaktorin ja toinen rasvahapposubstraatin. Entsyymi on osoittautunut monipuoliseksi, pystyen sitoutumaan erilaisiin hiiliketjun pituuksiin ja tuottaen erilaisia hiilivetyjä. Entsyymi on kuitenkin altis inaktivoitumiselle, mikä on rajoittava tekijä sen teollisessa käytössä. Kuitenkin karboksyylihapojen lisääminen ja anaerobinen ympäristö voivat parantaa sen stabiilisuutta. Lisäksi entsyymiä voidaan parantaa muokkaamalla sen rakennetta ja käyttämällä optimaalisia olosuhteita reaktion toteutuessa.

FAP-entsyymiä voidaan tuottaa rekombinanttisesti mikro-organismeissa, kuten *E. coli* -bakteerissa. Lisäksi on kehitetty uusia tekniikoita, kuten OptoFAP, joka yhdistää optogeneettisen säätelyn ja fotokatalyyttisen aktiivisuuden, mahdollistaen tehokkaamman ja vakaamman entsyymituotannon. Se on myös klassista entsyymituotantotapaa tehokkaampi, joten siinä on potentiaalia teollisuudessa.

FAP-entsyymi tarjoaa monipuolisen ja lupaavan lähestymistavan biotekniikan sovelluksiin, erityisesti biopolttoaineiden ja biomateriaalien tuotannossa. Sen rakenteellinen monimuotoisuus ja kyky katalysoida erilaisia reaktioita tekevät siitä



tehokkaan ja monipuolisen. Tällä hetkellä avainasemassa on löytää ratkaisu, jotta se voitaisiin ottaa käyttöön ja näin ollen ottaa askel kohti kestävämpää ja ympäristöystävällisempää teollista tuotantoa.

## Lähteet

Cheng, F., Wu, D.-Y., Liang, X.-H., Wang, C.-J., Weng, J.-Q., Zou, S.-P., ... Zheng, Y.-G. (2022) A light-controlled biocatalytic system for precise regulation of enzymatic decarboxylation. *Catal Sci Technol* **12**:3421–3425.

Hedison, T. M., Heyes, D. J. & Scrutton, N. S. (2022) Making molecules with photodecarboxylases: A great start or a false dawn? *Curr Res Chem Biol* **2**:100017.

Lakavath, B., Hedison, T. M., Heyes, D. J., Shanmugam, M., Sakuma, M., Hoeven, R., ... Scrutton, N. S. (2020) Radical-based photoinactivation of fatty acid photodecarboxylases. *Anal Biochem* **600**:113749.

Moulin, S. L. Y., Beyly-Adriano, A., Cuiné, S., Blangy, S., Légeret, B., Floriani, M., ... Beisson, F. (2021) Fatty acid photodecarboxylase is an ancient photoenzyme that forms hydrocarbons in the thylakoids of algae. *Plant Physiol* **186**:1455–1472.

Santner, P., Szabo, L. K., Chanquia, S. N., Merrild, A. H., Hollmann, F., Kara, S. & Eser, B. E. (2021) Optimization and Engineering of Fatty Acid Photodecarboxylase for Substrate Specificity. *CHEMCATCHEM* **13**:4038–4046.

Sui, Y., Guo, X., Zhou, R., Fu, Z., Chai, Y., Xia, A. & Zhao, W. (2023) Photoenzymatic Decarboxylation to Produce Hydrocarbon Fuels: A Critical Review. *Mol Biotechnol*.

Zeng, Y., Yin, X., Liu, L., Zhang, W. & Chen, B. (2022) Comparative characterization and physiological function of putative fatty acid photodecarboxylases. *Mol Catal* **532**:112717.

Liu, K. & Li, S. (2020) Biosynthesis of fatty acid-derived hydrocarbons: perspectives on enzymology and enzyme engineering. *Current Opinion in Biotechnology* **62**:7-14.