



# ASPERGILLUS-SUVUN HOMEIDEN KÄYTTÖ JA TUOTANTOPROSESSIT BIOTEKNOLOGISTEN ENTSYYMIEN VALMISTUKSESSA

TkK-tutkielma

Turun yliopisto

Bioteknologian laitos

Biotekniikka

Huhtikuu 2024

Essi Meriläinen

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

TURUN YLIOPISTO

Bioteknologian laitos

ESSI MERILÄINEN: *Aspergillus*-suvun homeiden käyttö ja tuotantoprosessit bioteknologisten entsyymien valmistuksessa

Tutkielma, 16 s.

Biotekniikka

Huhtikuu 2024

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

*Aspergillus*-suvun homeet ovat merkittävä tuotto-organismi biotekniikassa. *Aspergillus*-suvun homeet kykenevät erittämään luonnostaan suuria määriä metaboliensa tuotteita, mikä tekee niistä ihanteellisia tuottoisäntiä. Rihmamaisena sienenä *Aspergillus*-suku pystyy lisäksi glykosylaatioon, minkä takia eukaryoottisten rekombinanttiproteiinien tuottaminen on mahdollista niissä, erottaen sen bakteereista tuottoisäntänä. Suvun eri lajeja käytetään nykyään teollisuudessa hyödyksi aina elintarviketeollisuudesta entsyymiteollisuuteen, johon tämä kandidutkielma perehtyy. Tämä tutkielma on kirjallisuuskatsaus, joka keskittyy vertaisarvioituun tieteelliseen kirjallisuuteen.

Tutkimuskysymys on *Aspergillus*-suvun homeiden käyttö ja merkitys entsyymien valmistuksessa, sekä siihen, mitkä tekijät vaikuttavat fermentointiprosessin valintaan ja miten tuotantoa saadaan optimoitua.

*Aspergillus*-suvun homeiden hyvistä ominaisuuksista huolimatta teollisen mittakaavan tuotannossa on kuitenkin edelleen useita ongelmakohtia niin natiivi- kuin rekombinanttiproteiinien tuotossa. Tuotannon tehostamiseen etsitään keinoja esimerkiksi geenitekniikkaa ja koneoppimista hyödyntämällä. Geenitekniikan hyödyntämistä hidastavat tiukat GMO-lainsäädännöt sekä tarve tuntea kohdeorganismien metaboliareitit hyvin tarkasti. Näiden syiden takia klassiset muuntelumenetelmät ovat teollisuudessa suosittuimpia. Koneoppimisella pyritään puolestaan hyödyntämään matemaattisia malleja fermentointiprosessin optimoinnissa. Fermentointitavan valinta itsessään vaikuttaa merkittävästi tuottoon. Nykyään teollisuudessa suositaan vedenalaista fermentaatiota.

Entsyymimarkkinoiden odotetaan kasvavan tasaisesti tulevaisuudessa. Suurimpia markkina-alueita ovat USA ja Eurooppa. Entsyymimarkkinoiden kolme suurinta toimijaa hallitsee 75 % koko maailman entsyymimarkkinoista.

*Aspergillus*-sukua hyödynnetään jo paljon entsyymiteollisuudessa, mutta tilaa kehitykselle on vielä runsaasti. Perustutkimus suvun lajien metaboliareiteista ja GMO-lainsäädännön muutokset mahdollistaisivat geenitekniikan hyödyntämisen tuotto-organismien muokkauksessa monille aloille sopivaksi.

Asiasanat: *Aspergillus*, entsyymi, teollisuus, tuotantoprosessi, fermentointi, optimointi

## Sisällysluettelo

<b>1 Johdanto</b> .....	2
<b>2 <i>Aspergillus</i>-suvun suotuisat biologiset ominaisuudet</b> .....	3
<b>3 Tuotantoprosessit ja niiden optimointi</b> .....	6
<b>3.1 Kannan valinta ja kehitys</b> .....	6
<b>3.2 Matemaattiset mallit</b> .....	8
<b>3.3 Fermentaatio</b> .....	10
<b>4 Talous</b> .....	12
<b>5 Yhteenveto</b> .....	14
<b>Lähteet</b> .....	15

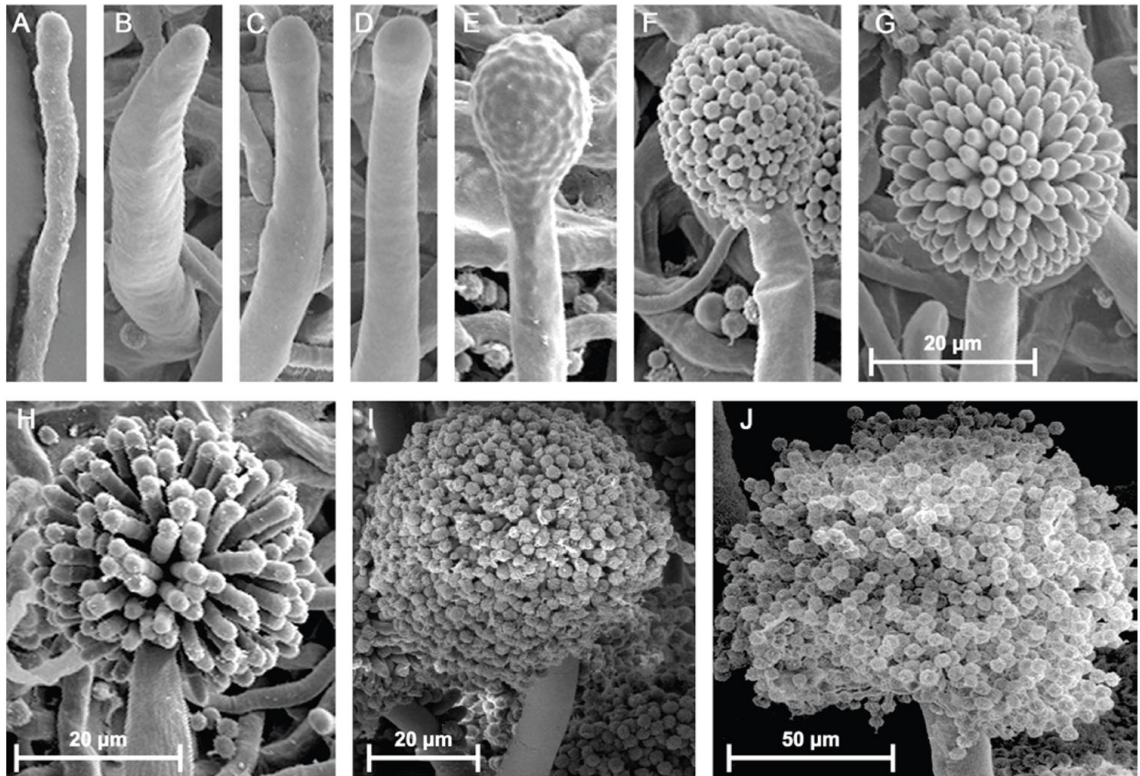
## 1 Johdanto

*Aspergillus*-homesuvun hyödyntäminen bioteknologisten tuotteiden valmistukseen sai alkunsa vuonna 1917, kun James Currie sai *Aspergillus niger* kasvatuksen erittämään suuria määriä sitruunahappoa elatusaineeseensa. Vain vuosikymmentä myöhemmin *A. niger* ohitti sitrushedelmät sitruunahapon tuottajana. (Ntana ja muut 2020) Salazar-Cerezo ja muut (2023) kutsuvat julkaisussaan *Aspergillus*-suvun lajeja teollisuuden työhevoseksi hyvästä syystä. Nykyään suvun homeita käytetään sen metaboliatuotteiden valmistuksen lisäksi monien eri natiivi- ja rekombinanttiproteiinien valmistuksessa useilla eri toimialoilla. Tämä on seurausta uusien DNA-muokkaustekniikoiden kehityksestä. *Aspergillus*-suvun homeilla voidaan muun muassa tuottaa useita teollisuuden raaka-aineita, sitä voidaan käyttää elintarviketeollisuudessa esimerkiksi soijakastikkeen valmistuksessa ja tuottaa biopolttoaineita sekä tulevaisuudessa mahdollisesti lääkeproteiineja. (Ntana ja muut 2020) *Aspergillus*-suvun homeet ovat tärkeä tuotto-organismi entsyymituotannossa (Salazar-Cerezo ja muut 2023). Tarafdar ja muiden (2021) mukaan entsyymimarkkinat ovat kasvaneet menneinä vuosina ja tulevat jatkamaan kasvua tulevaisuudessakin.

Tässä tutkielmassa keskitytään *Aspergillus*-suvun homeiden käyttöön entsyymituotannossa, tuotantoprosesseihin ja niiden optimointiin geenimuokkauksen ja matemaattisten mallien sekä fermentointiprosessien avulla. Tutkielman lopussa tarkastellaan entsyymimarkkinoiden taloudellista tilannetta sekä niiden tulevaisuuden näkymiä, selittäviä tekijöitä ja mahdollisuuksia.

## 2 *Aspergillus*-suvun suotuisat biologiset ominaisuudet

*Aspergillus*-suvun homeet ovat hyviä tuottoisäntiä erityisesti, kun tavoitteena on suuri tuottomäärä, sillä niiden solun ulkopuolinen erityys on luonnostaan tehokasta. *Aspergillus*-suvun homeet ovat rihmaisii ja suurin osa solun ulkopuolelle eritettävien tuotteiden erityksestä tapahtuu rihmojen (*engl. hypha*) päistä. Kuvassa 1 nähdään kaksi erilaista ilmarihmaston päätä, joista toinen kehittyy vesikkelin kautta *Aspergillus*-suvulle ominaiseksi nuijamaiseksi konidiksi.



**Kuva 1** A. nigerin kehitysvaiheet pyyhkäisy elektronimikroskooppikuilla esitettyinä. Kasvava sienirihmasto pystyy muodostamaan kahden laisia ilmarihmastojen päitä. Kuva A on esimerkki kasvavaa sienirihmastoa muistuttavasta päästä. B kuva edustaa toista tyyppiä, joka on paksuudeltaan 2–3-kertainen A-kuvaan verrattuna. B kuvan rihman pää voi muodostaa vesikkelin (C ja D). Vesikkelin päälle alkaa muodostua pallomaisia muotoja (E), joista kehittyy metula (F ja G). Metuloiden päälle kehittyy filajeja, jotka muodostavat konidiketjuja (I ja J). Kuva kopioitu P. Krijgheld ja muut (2013) artikkelista.

Kun tutkimuksessa glykoamylaasia tuottavan *A. nigerin* genomia muokattiin kasvattamaan noin 20 % enemmän rihmastoa, huomattiin, että glykoamylaasin erityys kasvatusmediaan nelinkertaistui. Kohtuullisesti hyperhaaroittuneilla kannoilla voidaan siis kasvattaa saantoa. (Fiedler ja muut 2018)

Rihmaston päät ovat myös *Aspergillus*-suvun homeiden kasvavat osat. Kun rihmastot pääsevät verkostoitumaan toisiinsa, muodostuu pallomaisia kasvustoja, joiden sisäosissa

ovat solujen vanhimmat osat. Reunoilla ovat nuoret ja ensi sijassa kasvavat osat. Kasvustojen koot ja erityystapa riippuvat niiden kasvuolosuhteista. (Pauline Krijgsheld ja muut 2012)

*Aspergillus*-suvun homeita voidaan kasvattaa myös vapaana nestemäisessä elatusaineessa. Pallomaisina kasvustoina kasvatettavat *Aspergillus*-kasvustot tosin vähentävät vedenalaisen fermentaation (*engl. submerged fermentation, SmF*) viskoosisuutta, parantavat sekoitettavuutta ja helpottavat puhdistusprosessia. Liian suureksi kasvavat kasvustot eivät kuitenkaan saa tarpeeksi happea tai ravintoa sisäosiin, mikä vaikuttaa negatiivisesti tuottavuuteen. (Ntana ja muut 2020) Kasvatustavan valinnalla on suuri merkitys tuottavuuden kannalta. Esimerkiksi *A. oryzae* erittää  $\alpha$ -amylaasia ja  $\beta$ -glukosidaasia ympäristöönsä kiinteäfaasifermentaatioissa (*engl. solid-state fermentation, SSF*), mutta kasvatuksen tapahtuessa SmF:ssä entsyymit jäävät jumiin soluseinän sisälle, mistä ne erittyvät hitaasti ulos. (Pauline Krijgsheld ja muut 2012) SSF:ta ja SmF:ta käsitellään tarkemmin seuraavassa luvussa. Soluseinän sisään jääneitä proteiinisynteesin tuotteita voidaan kuitenkin saada vapautettua. Krijgsheld ja muut (2012) tutkivat *A. niger* kasvatusten kvantitatiivista proteiinien tuottoa lisäämällä kasvatukseen proteiinisynteesiä inhiboivaa sykloheksimidiä. Inhibiittorin avulla saatiin tunnistettua proteiinit, jotka olivat syntetisoituneet ennen sykloheksimidin lisäystä, mutta olivat jääneet soluseinän sisälle jumiin. Sykloheksimidin lisäys johti proteiinisaannon hidastumiseen kasvustojen reunoilla mutta sisä- ja keskiosissa proteiineja vapautui paljon enemmän kuin ilman käsittelyä. Tutkimuksessa käytettiin transmissioelektronimikroskooppia määrittämään, millainen vaikutus sykloheksimidillä oli kasvustojen soluseiniin. Mikroskooppikuvista havaittiin, että sykloheksimidillä käsiteltyjen kasvustojen rihmojen sisäosien soluseinät olivat ohuempia, kuin mitä käsittelemättömien kasvatusten. Käsiteltyjen kasvustojen ulkoreunojen rihmastojen havaittiin puolestaan olevan paksumpia kuin mitä käsittelemättömillä kasvustoilla. Tutkimusryhmä päätteli näiden tulosten perusteella sykloheksimidin edistävän soluseinän hajoamista kasvustojen sisäosissa ja soluseinän paksunemista reunoilla. (Pauline Krijgsheld ja muut 2012)

*Aspergillus*-suvun homeita esiintyy luonnossa mätänevissä oloissa, minkä takia ne pystyvät luontaisesti tuottamaan orgaanista materiaa pilkkovia entsyymejä. Eri *Aspergillus*-lajeja on tutkittu käyttäen hyvin erilaisia ravinnonlähteitä, kuten höyhenjätettä (Mazotto ja muut 2013), minimimediumia (Fiedler ja muut 2018), sekä

palmuöljyn tuotannossa syntyvää jätettä (Bakar ja muut 2022). Yhteistä ravinnonlähteille on niiden sisältämät erilaiset orgaaniset yhdisteet, jolloin tuottosolulinjan metaboliareittiä ei tarvitse uusia täysin, koska on mahdollista löytää tuotto-organismi, jolta mahdollisesti löytyy substraattia pilkkova entsyymi luonnostaan. Erityisiin entsyymeihin kuuluvat myös proteaasit, jotka voivat osoittautua ongelmallisiksi heterologisten proteiinien tuotantoprosesseissa, koska ympäristöön erittyvät proteaasit voivat pilkkoa tuotetun proteiinin (Ntana ja muut 2020).

Eukaryoottisia rekombinanttiproteiineja voidaan tuottaa myös hiivoilla, mutta rihmastona kasvavien homeiden potentiaalisen erityskapasiteetin on todettu olevan suurempi (Salazar-Cerezo ja muut 2023). Muiden rihmastoina kasvavien homeiden tavoin *Aspergillus*-suvulla ei ole taipumusta translaation jälkeisissä muokkauksissa hyperglykolysoida niissä tuotettuja rekombinanttiproteiineja. Tämä yhdistettynä suuriin eritysmääriin erottaa *Aspergillus* tuottoisäntänä hyperglykosylaatioon taipuvista hiivoista ja glykolysaatioon kykenemättömistä bakteereista. (Baghban ja muut 2019; Ntana ja muut 2020)



### 3 Tuotantoprosessit ja niiden optimointi

Tuotantoprosessin optimointi on tärkeää teollisen mittakaavan entsyymituotannossa. Prosessin optimointiin vaikuttaa merkittävästi solukannan valinta, mutta mikäli fermentointiprosessia ei optimoida sopivaksi, maksimaalista entsyymituottoa ei välttämättä saavuteta. Teolliseen fermentointiprosessiin vaikuttavia tekijöitä ovat muun muassa fermentointimetodin valinta (SmF, SSF, biofilmi), lämpötila, kasvatusliuoksen pH, ravinnonlähde ja fermentointiaika. (Tarafdar ja muut 2021)

#### 3.1 Kannan valinta ja kehitys

Valitsemalla ja muokkaamalla tuotantoon sopiva solukanta voidaan varmistaa tehokas tuotantoprosessi ja mahdollisesti korkeampi saanto prosessista. Solujen muokkaamiseen käytetään joko klassisia muokkaustapoja tai geenitekniikan työkaluja. Klassiset menetelmät ovat tällä hetkellä laajemmin käytössä teollisen mittakaavan tuotannossa, koska niiden hyödyntämiseen ei vaadita syvällistä tuntemusta muokkauksen kohteena olevan organismin biosynteesireiteistä tai geneettisestä perustasta. Klassisilla menetelmillä muokattuihin organismeihin ei päde myöskään GMO-lainsäädäntö. Geenitekniikalla saadaan tosin kontrolloitua muokkauksia hyvin tarkasti, mikä ei ole mahdollista klassisilla menetelmillä. (Salazar-Cerezo ja muut 2023)

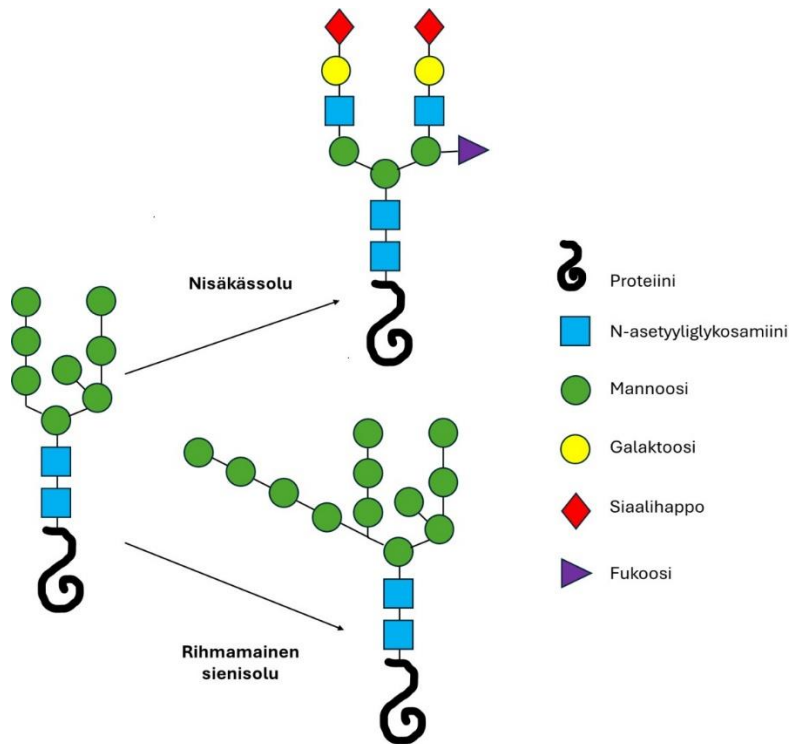
Rekombinanttiproteiinien tuottaminen *Aspergillus* -sienissä johtaa yleensä pienempään saantoon kuin mitä natiiviproteiinien tuotossa. Geenitekniikan avulla rekombinanttiproteiinien saantoa voidaan kuitenkin kasvattaa vaikuttamalla ongelmakohtiin transkriptiossa, translaatiossa ja translaation jälkeisissä muokkauksissa. (Ntana ja muut 2020)

**Transkriptio** Transkriptioon voidaan vaikuttaa valitsemalla sopiva promoottori, joka voi olla joko koko ajan aktiivinen eli konstitutiivinen tai vain osan ajasta aktiivinen eli indusoitava. Indusoitavat promoottorit ovat teollisen tuotannon suosiossa, koska geenin yliekspressio voi johtaa myrkyllisten tuotteiden syntymiseen tai solun rasittumiseen. Säätelyn avulla nämä ongelmat voidaan välttää. Indusoitavat promoottorit perustuvat johonkin ympäristötekijän signaaliin, kuten pH:hon, sokereihin tai katabolisiin entsyymeihin. *A. niger*:stä eristetty glukoamylaasi-A:n (*glaA*) promoottori on yksi ensimmäisistä rihmaisissa sienissä käyttöönotetuista indusoitavista promoottoreista. (Salazar-Cerezo ja muut 2023) Myös geenikopioiden lukumäärän on huomattu vaikuttavan saannon määrään niin rekombinantti- kuin natiiviproteiinien tuotannossa.

Kopioiden suuri lukumäärä ei kuitenkaan välttämättä korreloi ekspression kanssa, koska kopioiden sijainti genomissa ja mahdollisesti geenin vaimennusmekanismi voivat vaikuttaa ekspression lopulliseen voimakkuuteen. (Ntana ja muut 2020; Salazar-Cerezo ja muut 2023)

**Translaatio** Translaatioon voidaan vaikuttaa kodonioptimoinnin avulla. Organismista riippuen jokin tiettyä aminohappoa koodaava kodoni voi olla suositumpi kuin toinen täsmälleen samaa aminohappoa koodaava kodoni. Rekombinanttiproteiinia tuotettaessa harvinainen kodoni voidaan muuttaa tuottoisännälle suotuisammaksi kodoniksi aminohappoa muuttamatta. Kodonioptimoinnin avulla voidaan parantaa mRNA:n stabiiliutta ja tehostaa translaatiota. Kodonioptimointi on useissa *Aspergillus*-suvulla toteutetuissa tutkimuksissa johtanut rekombinanttiproteiinien parempaan saantoon. (Ntana ja muut 2020)

**Translaation jälkeiset muokkaukset** Rihmamaisina sieninä *Aspergillus*-suku kykenee glykosylaatioon, minkä takia niillä voidaan tuottaa eukaryoottien proteiineja. Nisäkäsproteiinien tuotossa haasteena on eroavuudet glykosylaatiossa. *Aspergillus*-suvun homeet tuottavat N-glykosylaatiossa yleensä korkeamannoosi N-glykaaneja, jotka ovat paljon yksinkertaisempia, kuin nisäkäsglykaanit, jotka koostuvat N-asetyyli-glukosamiinista, galaktoosista, fukoosista ja siaalihaposta. (Ntana ja muut 2020) Kuvassa 2 on esimerkki tyypillisestä nisäkässolun N-glykaanista sekä tyypillisestä rihmamaisen sienisolun tuottamasta N-glykaanista.



**Kuva 2** Nisäkäsolan ja rihmamaisen sienisolun N-glykolysaation erot. Nisäkäsolan glykaanit koostuvat N-asetyyli glykosamiinista, mannoosista, galaktoosista, fukoosista ja siaalihaposta. Aspergillus-tyyppiset rihmamaiset sienet tuottavat korkeammanmannoosi N-glykaaneja. Kuva piirretty Anyaogu ja muut (2021) kuvan pohjalta.

### 3.2 Matemaattiset mallit

Fermentoimalla tuotettavien entsyymien tuoton optimointia varten on kehitetty pilottivaiheessa oleville entsyymituotantoprosesseille sovellettavissa olevia kaavoja. Suurin osa käytössä olevista entsyymituotantoa kartoittavista malleista on joko empiirisiä tai puoliempiirisiä. Puoliempiirisissä malleissa ennalta määritettyjen muuttujien arvot määritetään kokeellisesti tiettyjä entsyymejä kohden. Empiiriset mallit perustuvat input-output-funktioihin. Niiden avulla saadaan rajallisesti tietoa entsyymiä tuottavasta systeemistä. Empiiriset mallit ovat hyödyllisiä, kun ennustetaan uuden muuttujan aikaansaamaa vastetta. (Tarafdar ja muut 2021) Fermentointiprosessi täytyy suunnitella ja optimoida jokaiselle muunnellulle kannalle. Optimointiprosessi on monivaiheinen ja välttämätön taloudelliselle ja tehokkaalle teolliselle tuotannolle. (Ntana ja muut 2020) Matemaattisia malleja hyödyntämällä saadaan laskettua fermentointiprosessin optimoinnin kustannuksia, koska niiden avulla saadaan huomattavasti laskettua testauksien lukumäärää (De Menezes ja muut 2023).

Yleensä entsyymien tuotantomalleissa tarkastellaan kolmea eri kineettistä järjestelmää: mikrobikasvun, substraatin hajoamisen ja entsyymien tuotannon kinetiikkaa. Tutkimuksessa Germec ja muut (2020) tuottivat inulinaasia käyttäen sokerijuurta substraattina ja määrittivät tuottokinetiikan Luedeking–Piret -mallilla inulinaasille ja sakkaroosille. Luedeking–Piret -malli on kinetiikan malli, jota käytetään kuvaamaan empiirisessä tutkimuksessa saatua prosessin kokeellista dataa. Mallilla ennustettiin *A. nigerin* kasvua, entsyymituotantoa ja substraatin kulutusta. Tutkimuksessa käytetty Luedeking–Piret -malli on esitetty kaavassa 1, missä entsyymien tuottoaste  $dP/dt$  (U/mL/d tai (mg/mL/d) on riippuvainen  $X$ :stä eli biomassan konsentraatiosta (g/L) ja  $dX/dt$ :stä eli *A. nigerin* kasvunopeudesta (g/L/d).  $\alpha$  on kasvuun liittyvä vakio (U/mgX tai g proteiinia/gX) ja  $\beta$  puolestaan kasvuun liittymätön vakio (U/mgX päivässä tai g proteiinia/gX päivässä).

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (1)$$

Tuloksista käy ilmi, että inulinaasin ja sakkaroosin tuotto ei ole riippuvaista *A. nigerin* kasvusta. (Germec ja muut 2020.) Luedeking-Piret-mallia on hyödynnetty useissa tutkimuksissa onnistuneesti, minkä takia sen voidaan sanoa olevan käyttökelpoinen monille eri entsyymeille ja substraateille. (Tarafdar ja muut 2021)

Entsyymituotannon optimointiin etsitään ratkaisuja myös koneoppimisen puolelta neuroverkoista (*engl. artificial neural network*, ANN), geneettisistä algoritmeista (*engl. genetic algorithm*, GA) ja adaptiivisista neurosumupäätelyjärjestelmistä (*engl. adaptive neurofuzzy inference system*, ANFIS). ANN on matemaattinen jäljitelmä ihmisaivojen hahmontunnistuksesta. Se oppii epätarkoista syötetyistä tiedoista ja ennustaa systeemille kohteena olleen tiedon käsittelemällä dataa määrätyn mekanismin perusteella. ANN:ia suositellaan käytettäväksi vain, kun data on monimutkaista, epälineaarista ja sitä on paljon, minkä takia sen hyödyntäminen ei ole yleisesti taloudellista. ANFIS koostuu viidestä kerroksesta ja se yhdistää ANN:ia ja sumupäätelyjärjestelmiä (*engl. fuzzy inference systems*, FIS). ANFIS:n avulla voidaan parantaa mallintamissysteemin virheen sietoa, nopeutta ja mukautuvuutta. (Tarafdar ja muut 2021) Tarafdar ja muut (2021) kuvaavat GA:a hakualgoritmiksi, joka valitsee muuttujat, sekoittaa ja sovittaa ne yhteen muodostaen joukon vastauksia, jonka jälkeen sykli toistetaan, kunnes pysäytysehto täyttyy. Sykleillä pyritään saamaan aikaan joukko joustavia ja tehokkaita ratkaisuja, jotka ovat edellisen syklin ratkaisuja parempia. GA:t eivät välttämättä anna vastaukseksi

parasta ratkaisua vaan paikallisen optimiratkaisun. (Tarafdar ja muut 2021) Optimiratkaisulla tarkoitetaan ratkaisua, joka täyttää pysäytysehdon algoritmillemme, vaikka kyseessä ei olisi paras mahdollinen ratkaisu.

### 3.3 Fermentaatio

Fermentaatioprosessi tapahtuu bioreaktorissa. Fermentointi voidaan toteuttaa bioreaktorissa SSF:na tai SmF:na. Membraanibioreaktorin (MBR) ja biofilmiin pohjautuvan reaktorin käyttö on myös mahdollista. (Tarafdar ja muut 2021) SSF:ssä solujen kasvatusta tapahtuu kiinteällä pinnalla eikä fermentaatioprosessissa ole mukana vettä. SSF:n etuja ovat prosessin nopeus, mahdollisuus käyttää kiinteää jätettä reaktion substraattina ja suuri saanto. Substraatin ominaispinta-ala on merkittävä tekijä SSF:ssä, koska sienisolun kehittymisen kannalta välttämättömälle ravinteiden ja kaasujen diffuusiolle on oltava riittävästi pinta-alaa, jolla adsorptio ja sienirihmojen tunkeutuminen mahtuu tapahtumaan. SSF:lla tuotetut entsyymit eivät ole alttiita inhiboitumaan substraatissa ja sietävät lämpötilan ja pH:n muutoksia. (De Menezes ja muut 2023)

Nykyään SmF:ta käytetään useimmiten teollisuusentsyymien tuotannossa, koska sen säätely- ja tarkkailusysteemit ovat niin edistyneitä. SmF:ssa kasvatusta tapahtuu upoksissa kasvatusmediumissa. SmF-bioreaktoreita on paljon erilaisia, mistä jokaisella niistä on omat etunsa ja heikkoutensa. Esimerkiksi ilmasilta bioreaktorit (*engl. airlift bioreactor*) ovat hyvin kalliita ja ne eivät kykene tehokkaaseen sekoitukseen suurissa solutiheyksissä, mutta ne myös pienentävät virrankulutusta, vähentävät soluihin kohdistuvaa leikkausrasitusta (*engl. shear stress*), parantavat sekoittumista ja massan- ja lämmönsiirtokerrointa verrattuna sekoitussäiliöbioreaktoriin. (Tarafdar ja muut 2021)

MBR:ssa on puoliläpäisevä kalvo, jota hyödyntämällä esimerkiksi tuotteet saadaan erilleen kasvatuksesta. Tämä helpottaa puhdistusprosessia kasvatusmediumista. Entsymaattisella MBR:lla voidaan tuottaa esimerkiksi glukonihappoa hyödyntämällä glukooosioksidaasia glukosin hapettamisessa. Kalvo estää glukooosioksidaasin siirtymisen puolelta toiselle, mutta sallii glukosin ja glukonihapon siirtymisen. (Liu ja Cui 2007) MBR:ssa kalvo toimii siis erottelijana ja fyysisenä esteenä. MBR:ssa katalysoiva entsyymi voi olla myös sidottuna membraaniin, mikä estää entsyymiä menettämästä aktiivisuuttaan. Entsyymiä voidaan käyttää siis uudelleen myöhemmin. MBR:n heikkoutena on biologinen likaantuminen, mikä on seurausta membraanin

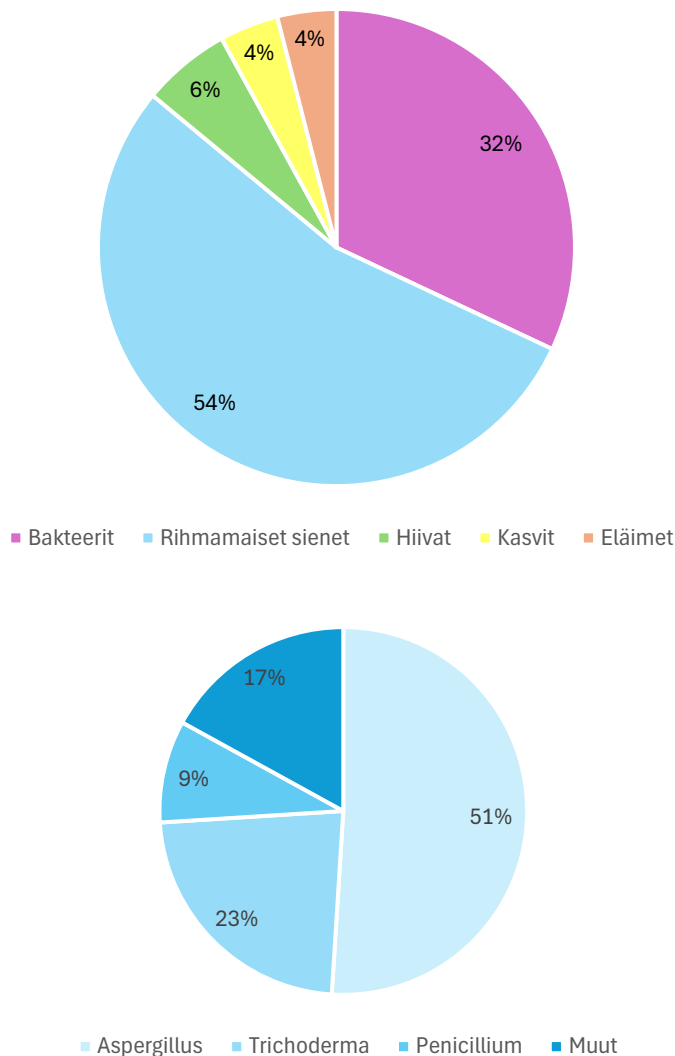
hydrofobisuudesta. Biologinen likaantuminen kasvattaa MBR:n ylläpitokuluja. (Tarafdar ja muut 2021)

Biofilmipohjaisissa reaktoreissa saadaan yhdistettyä SmF:n ja SSF:n etuja: prosessi on SmF:n tavoin hyvin hallittavissa ja kasvatettavat solut saavat pinnan, jolle kiinnittyä. Biofilmipohjaisissa reaktoreissa ei tarvitse ottaa huomioon ilmastriippausta eli haitallisten orgaanisten yhdisteiden (*engl. Volatile Organic Compound*) poistamista, biologista likaantumista (*engl. biofouling*) tai biologista erottumista. (Tarafdar ja muut 2021)

Fermentointitavan valinta riippuu kasvatettavasta solulinjasta ja tuotettavasta entsyymistä. *Aspergillus*-homeiden fermentoinnissa käytetään pääasiassa SmF ja SSF fermentointia, mutta biofilmin hyödyntämistä on myös tutkittu lupaavin tuloksin. Gamarra ja muut (2010) vertailivat *A. niger*illä tuotetun sellulaasin saantoa SmF:ssä, SSF:ssä ja biofilmissä. Tuloksena biofilmissä sellulaasin tuotto biomassayksikköä kohden oli 1,5-kertainen SmF:ään verrattuna ja 2,6-kertainen SSF:ään verrattuna (Gamarra ja muut 2010).

## 4 Talous

Vuoteen 2023 mennessä maailman entsyymimarkkinoiden on odotettu nousevan 7 miljardiin Yhdysvaltain dollariin. Markkinoiden odotetaan kasvavan, kun uusia entsyymitekologioita saadaan käyttöön ja orgaanisia yhdisteitä saadaan hyödynnettyä tuotannossa. (Tarafdar ja muut 2021) Kuvassa 3 esitetään kaupallisten entsyymien tuotto-organismien jakaumaa vuoden 2015 Association of Manufacturers and Formulators of Enzyme Products (AMFEP) -dataan perustuen (Salazar-Cerezo ja muut 2023). Kuvan mukaan rihmamaiset sienet tuottavat kaupallisista entsyymeistä jopa 54 %, josta *Aspergillus*-suvun sienet tuottavat 51 %. Aspergilluksilla tuotetut entsyymit tuottavat siis merkittävän osan kaupallisista entsyymeistä.



Kuva 3 Kaupallisten entsyymien yleisimmät tuotto-organismit. Rihmamaisten sienten suvut on eritelty tarkemmin pienemmissä ympyräkaavioissa. *Aspergillus*-suku on sienisuvuista käytetyin tuotto-organismi 51 % osuudella. Muokattu kuva Salazar-Cerezo ja muut 2023 artikkelista.

Vuonna 2019 suurin kysyntä entsyymeille oli Pohjois-Amerikassa ja Euroopassa, jotka kattoivat kysynnästä yhteensä 70 %. Novozymes, DSM, BASF ja DuPont ovat suurimmat teollisuusentsyymien tuottajat, sillä ne tuottavat 75 % koko maailman teollisuudessa käytettävistä entsyymeistä. (Tarafdar ja muut 2021.)

Entsyymien hintaan vaikuttavat monet tekijät, kuten tuotantoprosessin saanto sekä lopullisen käyttötarkoituksen mukaan määräytyvä puhdistus (Tarafdar ja muut 2021). GMO-lainsäädännön alaiset tuotteet ovat huomattavasti vaikeammin saatavissa markkinoille, mikä takia investointien määrä voi olla vähäinen ja tuotteen kaupallistaminen vaikeaa. (Salazar-Cerezo ja muut 2023.)



## 5 Yhteenveto

*Aspergillus*-suvun homeita käytetään jo nykyään paljon entsyymituotannossa ja käytön voidaan odottaa lisääntyvän tulevaisuudessa teknologisten edistysten, GMO-lainsäädännön päivittymisen ja suvun homeiden metaboliareittien paremman tuntemuksen myötä. Tulevaisuudessa teollisessa tuotannossa voidaan prosessin optimoinnissa hyödyntää tuotto-organismien kannan geneettistä muokkaamista enemmän sekä koneoppimisen keinoja, kuten ANN:ää, ANFIS:ia ja GA:ta. Geenimuuntelulla voidaan parantaa saantoa ja hallita tuottoa prosessissa. Toistaiseksi klassiset muokkausmenetelmät ovat suositumpia teollisuudessa, koska geenitekniikalla muunteluun tarvitaan paljon tietoa organismin metaboliareiteista ja ne ovat GMO-lainsäädännön alaisia. Tulevaisuudessa koneoppimista hyödyntämällä voidaan pyrkiä nopeuttamaan teolliseen mittakaavaan skaalaamista, nopeuttamaan prosessin optimointia ja laskemaan näistä aiheutuvia kustannuksia. Ennusteiden mukaan entsyymimarkkinat jatkavat kasvuaan tulevaisuudessa ihmiskunnan etsiessä vaihtoehtoja fossiilipohjaisille tuotteille. *Aspergillus*-suvun monipuolisuus mahdollistaa sen hyödyntämisen entsyymituotannon lisäksi myös monilla muilla teollisuuden aloilla, minkä takia on tärkeää jatkaa suvun eri lajien metaboliareittien tutkimista. Syvempi tuntemus metaboliareiteista mahdollistaa myös geenitekniikan hyödyntämisen kannan muokkauksessa käyttötarkoitukseen sopivaksi.

## Lähteet

- Anyao, D. C., Hansen, A. H., Hoof, J. B., Majewska, N. I., Contesini, F. J., Paul, J. T., ... Mortensen, U. H. (2021) Glycoengineering of *Aspergillus nidulans* to produce precursors for humanized N-glycan structures. *Metab Eng* **67**:153–163.
- Baghban, R., Farajnia, S., Rajabibazl, M., Ghasemi, Y., Mafi, A., Hoseinpoor, R., ... Aria, M. (2019) Yeast Expression Systems: Overview and Recent Advances. *Mol Biotechnol* **61**:365–384.
- Bakar, N. A. S. A., Khuzaini, N. A. & Baidurah, S. (2022) Co-fermentation involving *Lysinibacillus* sp. And *Aspergillus flavus* for simultaneous palm oil waste treatment and renewable biomass fuel production. *AIMS Microbiol* **8**:357–371.
- De Menezes, L. H. S., Pimentel, A. B., Oliveira, P. C., De Carvalho Tavares, I. M., Ruiz, H. A., Irfan, M., ... Franco, M. (2023) The Application of Chemometric Methods in the Production of Enzymes Through Solid State Fermentation Uses the Artificial Neural Network—A Review. *BioEnergy Res* **16**:279–288.
- Fiedler, M. R. M., Barthel, L., Kubisch, C., Nai, C. & Meyer, V. (2018) Construction of an improved *Aspergillus niger* platform for enhanced glucoamylase secretion. *Microb Cell Factories* **17**:95.
- Gamarra, N. N., Villena, G. K. & Gutiérrez-Correa, M. (2010) Cellulase production by *Aspergillus niger* in biofilm, solid-state, and submerged fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**:545–551.
- Germec, M., Gürler, H. N., Ozcan, A., Erkan, S. B., Karahalil, E. & Turhan, I. (2020) Medium optimization and kinetic modeling for the production of *Aspergillus niger* inulinase. *Bioprocess Biosyst Eng* **43**:217–232.
- Krijghsheld, P., Bleichrodt, R., Van Veluw, G. J., Wang, F., Müller, W. H., Dijksterhuis, J. & Wösten, H. A. B. (2013) Development in *Aspergillus*. *Stud Mycol* **74**:1–29.

- Krijgsheld, Pauline, Altelaar, A. F. M., Post, H., Ringrose, J. H., Müller, W. H., Heck, A. J. R. & Wösten, H. A. B. (2012) Spatially Resolving the Secretome within the Mycelium of the Cell Factory *Aspergillus niger*. *J Proteome Res* **11**:2807–2818.
- Liu, J. & Cui, Z. (2007) Optimization of operating conditions for glucose oxidation in an enzymatic membrane bioreactor. *J Membr Sci* **302**:180–187.
- Mazotto, A. M., Couri, S., Damaso, M. C. T. & Vermelho, A. B. (2013) Degradation of feather waste by *Aspergillus niger* keratinases: Comparison of submerged and solid-state fermentation. *Int Biodeterior Biodegrad* **85**:189–195.
- Ntana, F., Mortensen, U. H., Sarazin, C. & Figge, R. (2020) *Aspergillus*: A Powerful Protein Production Platform. *Catalysts* **10**:1064.
- Salazar-Cerezo, S., De Vries, R. P. & Garrigues, S. (2023) Strategies for the Development of Industrial Fungal Producing Strains. *J Fungi* **9**:834.
- Tarafdar, A., Sirohi, R., Gaur, V. K., Kumar, S., Sharma, P., Varjani, S., ... Sim, S. J. (2021) Engineering interventions in enzyme production: Lab to industrial scale. *Bioresour Technol* **326**:124771.