



Kandidaatintutkielma

Mikrobit ja aineenvaihdunnan suunnittelu

Jere Kettunen

Oulun yliopisto
Biokemian ja molekyyli lääketieteen tiedekunta
2020

Sisällysluettelo

Käytetyt lyhenteet.....	3
1. Mikrobien käytön historiaa	4
1.1. Mikrobiologian ja bioteknologian kehitys.....	4
1.2. Penisilliini.....	5
1.3. Kehitys moderniin aikaan	6
2. Nykyajan käyttökohteita	6
2.1. Elintarvikkeet ja SCP	7
2.2. Epäorgaaniset materiaalit	7
2.3. Kasvituotteet	8
2.4. Lääkeaineet ja rokotteet, vitamiinit.....	9
2.5. Tutkimus.....	10
2.6. Biopolttoaineet.....	10
2.7. Mikroleviät esimerkkinä, menetelmiä ja hyödynnettyjä tekniikoita.....	11
3. Reittien löytö, suunnittelu ja toteutus	13
3.1. Luonnolliset biosynteettiset reitit lähtökohtana	13
3.1.1. Terpenoidit esimerkkinä luonnollisten yhdisteiden monipuolisuudesta ja -mutkaisuudesta	13
3.1.2. Monimutkaisuus	15
3.2. Olemassa olevat reitit pohjana mikrobialiselle tuotannolle	16
3.3. Isännän valinta	17
3.4. Keinotekoiset synteettiset reitit, suunnittelu ja toteutus	17
3.4.1. Optimointi	18
4. Työkaluja	19
4.1. Sekvensointi	19
4.2. CRISPR	19
4.3. MAGE	20
4.4. gTME ja genomisekoitus.....	20
4.5. Laskennallinen biologia ja tekoäly	21
4.6. DNA-kasaus	21
5. Tulevaisuuden näkymiä	22
Lähteet	23

Käytetyt lyhenteet

PET	polyeteleenitereftalaatti
SCP	single cell protein
GPP	geranyylipyrofosfaatti
FPP	farnesyylipyrofosfaatti
GGPP	geranyyligeranyylipyrofosfaatti
IPP	isopentenyylipyrofosfaatti
DMAPP	dimetyyliallyylipyrofosfaatti
CYP	Sytokromi 450p
CPR	Sytokromi 450p reduktaasi
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
Cas	CRISPR-associated gene
PAM	protospacer adjacent motif
tracrRNA	trans-activating RNA
crRNA	CRISPR RNA
LCR	Ligase cycling reaction

1. Mikrobin käytön historiaa

Ihmiset ovat käyttäneet hyväksi mikrobeja jo tuhansien vuosien ajan. Vanhin tunnettu ihmisten hyödyntämä mikrobi on *Saccharomyces cerevisiae*, joka tunnetaan yleisesti myös nimeltään leivinihiiva, oluthiiva ja viinihiiva. Nimensä mukaisesti sitä on käytetty ja käytetään leivän, viinin ja oluen valmistukseen ja sen hyöty perustuu erityisesti etanolin ja hiilidioksidin valmistukseen jalostettavien tuotteiden hiilihydraateista etanolikäymisessä. Aikaisimpia arkeologisia todisteita *S. cerevisiae*en käyttämiseen on löydetty Kiinasta ajoittuen jo 7000 eaa. ja myös esimerkiksi viinin valmistusta on ajoitettu noin 6000 eaa. Mesopotamian alueelle, josta se on levinnyt muualle maailmaan (Buchholz and Collins, 2013; Legras et al., 2007). On myös arvioitu, että juuston valmistus on aloitettu samoihin aikoihin. Juuston ja monien muiden jalostettujen ja säilöttyjen tuotteiden kuten jogurtin, hapankaalin ja hapanjuuren fermentaatioissa hyödynnetään erinäisiä maitohappobakteereja eli laktobasilluksia. Nämä bakteerit hapettavat jalostettavien tuotteiden hiilihydraatteja ja tuottavat näistä erinäisiä metaboliitteja, joita pääasiassa ovat orgaaniset hapot, alkoholit ja hiilidioksidi. Näillä metaboliiteilla on tuotteille säilövä vaikutus, sillä ne ehkäisevät muita mahdollisesti haitallisia mikrobeja kasvamasta. Fermentaation myötä voi myös syntyä muita metaboliitteja, jotka vaikuttavat jalostettavien tuotteiden laatuun. Näitä ovat esimerkiksi vitamiinit, antioksidantit, bioaktiiviset peptidit sekä diasetyyli ja asetaldehydi (Paul Ross et al., 2002). Hiivojen ja muiden mikrobin käyttö oli pitkään luonnonvaraisesti aineksissa esiintyvien mikrobin varassa, sillä niiden havainnointiin tarvittavaa teknologiaa, eli mikroskooppia, ei keksitty kuin vasta 1600-luvun loppupuolella. Myös mikrobeihin liittyviä prosesseja ja toimintoja selvittäviä tutkimuksia aloitettiin vasta 1800-luvulla (Buchholz and Collins, 2013)

1.1. Mikrobiologian ja bioteknologian kehitys

Mikrobin ja fermentatiivisten prosessien välistä yhteyttä ei alettu ymmärtää kuin vasta 1700-luvun lopun ja 1800-luvun alun aika ja vasta 1830 vuosikymmenen loppupuolella eläviä soluja (hiiva) yhdistettiin etanolikäymiseen. Tässä vaiheessa prosessia ja mekanisme ei osattu vielä selittää (Buchholz and Collins, 2013). 1850-luvulla Louis Pasteur vastasi perusteellisesti kysymykseen käymisen luonteesta biologisena prosessina puhtaasti kemiallisen sijaan.

Pasteurin motivaationa näissä tutkimuksissa oli ensisijaisesti alkoholifermentaatioiden heikkenemiselle tieteellisen selityksen etsiminen. Tutkimuksien aikana hän yhdisti fermentaatiot, jotka olivat happamoituneet, normaalista poikkeaviin sauvamaisiin mikrobeihin, joita esiintyi normaalin hiivan rinnalla. Hän nimitti näitä mikrobeja maitohappo 'hiivaksi' ja tutkikin maitohappokäymistä myös tarkemmin. Hän myös selvensi ajatusta inokulaation käyttämisestä käymisen aloittamisessa. Lisäksi hän esitti käsityksen, jonka mukaan tietynlaisen käymisen voi yhdistää tietynlaiseen mikrobiin sekä ajatuksen, että kasvatusliuoksen tulee tarjota mikrobeille tarpeeksi ravintoa. Pasteur myös esitti kuinka eristää mikrobin puhtaasta viljelmästä (Buchholz and Collins, 2013; Platt, 1988). Louis Pasteur ja muut hänen aikalaisensa kuten Robert Koch, joka ensimmäisten joukossa käytti agarlevyteknikkaa mikrobien viljelyyn, loivat perusteet mikrobien tutkimiselle ja näiden hyväksikäytölle.

Pasteurin ja Kochin töiden jälkeen tieto ja ymmärrys mikrobeista ja näiden biokemiallisista prosesseista vähitellen kasvoi. 1800-luvun lopulla huomattava kehitys oli luopuminen *vis vitalis* hypoteesista, jonka mukaan biokemiallisiin prosesseihin tarvittaisiin elävä solu. Tämän ajatuksen todisti lopullisesti vääräksi Eduard Buchner, jonka tutkimukset soluttomaan fermentaatioon ansaitsivat kemian Nobel-palkinnon 1907 (Anonymous, a; Buchholz and Collins, 2013). Chaim Weizmannin kehittämä Weizmann-prosessi, eli asetyyli-butanoli-etanoli fermentaatio, on yksi esimerkki 1900-luvun alkupuolelta ensimmäisen maailman sodan ajalle sijoittuvasta kehityksestä fermentaatioprosessien valjastamisesta teollisuuden laajempaan käyttöön (Buchholz and Collins, 2013). Toinen vastaava on *Aspergillus niger*-sienen teollinen valjastaminen sitruunahapon valmistukseen ja kyseisen prosessin optimointi James Currien toimesta 1920-luvulla (May and Herrick, 1930).

1.2. Penisilliini

Yksi erityisen merkittävistä löydöistä 1900-luvun alkupuolella, vuonna 1928, oli penisilliini Alexander Flemingin toimesta, kun hän huomasi kuinka *Penicillium notatum* (nyk. *Penicillium chrysogenum*) inhiboi bakteerien kasvua. Fleming eristi kasvuliuksesta aineen, jonka hän nimesi penisilliiniksi. Penisilliinin terapeuttiset ominaisuudet huomattiin kuitenkin vasta 1940 Floreyn, Heatleyn ja Chainin toimesta (Buchholz and Collins, 2013; Bud, 2007). Flemingin, Chainin ja Floreyn löydökset ansaitsivat Nobelin lääketieteen palkinnon 1945 (Anonymous, b)

Tämä löydös laukaisi tutkimuksia koko tuotantoketjun pituudelta alkaen lajikkeen valinnasta ja jalostamisesta aina kuivaamiseen ja pakkaamiseen (Coghill, 1970). Muutaman vuoden aikana penisilliinin valmistuksen kehitys edistyi huomattavasti, saantien noustessa jopa 140 000-kertaisiksi ja näissä prosesseissa hyödynnettiin upotettua fermentaatiota ja syvä tankki fermentaatiota (Silcox, 1970). Samaan aikaan myös penisilliinin isolaatio aiheutti vaikeuksia ja tässä hyödynnettiin uusia ja paranneltuja teknologioita kuten sentrifugaatiota, kristallisaatiota ja pakastekuivausta (Perlman, 1970)

1.3. Kehitys moderniin aikaan

Alkaen 1950-luvulta bioteknologian kehitys kiihtyi huomattavasti. Kehitykset kuten DNA:n rakenteen selvittäminen Watsonin ja Crickin toimesta 1953, rekombinantti-DNA-tekniikoiden kehittyminen 1970-luvulta alkaen ja PCR:n käyttöönotto 1988 ovat muutama esimerkki tärkeistä hetkistä. Erityisesti rekombinantti tekniikat nostivat mikrobien käyttöä entistä tärkeämmäksi, sillä niihin voitiin nyt siirtää uusia ominaisuuksia esimerkiksi käsitellyn plasmidin tai virusjohdannaisen vektorin avulla. Nämä kehitykset mahdollistivat uusien tuotteiden valmistamisen, kuten insuliinin ja monien entsyymien, huomattavasti aikaisempaa tehokkaammin ja monipuolisemmin optimaalisemmissa kantajissa. Kehittyvät tekniikat mahdollistavat myös organismien optimoinnin aineenvaihdunnallisella tasolla mahdollisimman tehokkaaseen tuotantoon (Buchholz and Collins, 2013).

2. Nykyajan käyttökohteita

Mikro-organismeja on kyetty valjastamaan moniin tärkeisiin tarkoituksiin. Tässä käydään läpi joitain huomattavimmista applikaatioista, niiden kehityksestä ja esimerkkejä niihin osallistuvista mikro-organismeista. Tämä tieto ja muutama muu sovellus on myös kerätty listaksi (Taulukko 1.), joka löytyy kappaleen lopusta.

2.1. Elintarvikkeet ja SCP

Erilaiset mikrobit ovat aina olleet iso osa ihmiskunnan ruokakulttuuria, erilaisten hyötytuotteiden, kuten leivän ja viinin, valmistamisesta aina ruokatuotteiden säilömiseen. Laajimmin tunnettu tällaiseen tuotantoon käytetty mikrobi on *Saccharomyces cerevisiae*. (Legras et al., 2007). Tämän kyseisen hiivan pääasiallinen käyttökohde on muuttaa sokereita alkoholikäymisen kautta etanoliksi, hiilidioksidiksi sekä moniksi muiksi metaboliiteiksi, kuten estereiksi, karbonyyleiksi ja erinäisiksi rikkiyhdisteiksi. Käyttötarkoituksesta riippuen syntyviä metaboliitteja voidaan kontrolloida lajikkeen valinnalla, sekä kasvuympäristöä muokkaamalla (Swiegers et al., 2005). Muita ruokateollisuudessa tunnettuja mikrobeja ovat esimerkiksi *Lactobacillus plantarum*, jonka käymistuotteena syntyy pääasiallisesti maitohappoa ja täten johtaa happamiin lopputuotteisiin, ja propionibakteerit, joiden käymistuotteina on propionihappoa ja etikkahappoa. Näillä ja monilla muilla ruokateollisuudessa käytetyillä mikrobeilla syntyy myös monia muita ihmisille hyödyllisiä metaboliitteja, kuten vitamiineja, niiden aineenvaihdunnan sivutuotteina (Hugenholtz and Kleerebezem, 1999).

Eräs ajankohtainen aihe maailman väestöluvun jatkuvasti kasvaessa on riittävän ravinnon turvaaminen kaikille. Tähän liittyen on mietitty mahdollisuutta hyödyntää laajemmin mikro-organismeja ravinnon lähteenä. Monissa SCP vaihtoehdoissa on huomattavan otollinen hajonta proteiineja, välttämättömiä aminohappoja, lipidejä ja vitamiineja. Yleisemmässä käyttöönotossa kuitenkin kysymyksenä on esimerkiksi ravintoaineiden hitaampi imeytyvyys, sekä mahdollisuus kokea SCP elimistölle 'ulkopuolisena' aineena, joka voi johtaa esimerkiksi allergisiin reaktioihin (Nasseri et al., 2011). Suositujia SCP-lähteitä pitkään ovat olleet mikrolevät. Niitä on myös käytetty suoraan ravintona esimerkiksi Amerikan alkuperäiskansojen joukossa sitäkin pidempään. Eräs esimerkki näiden mikrolevien jalostamisesta pidemmälle on *Spirulina platensis*. Nämä mikrolevät, paitsi erinomainen mahdollisuus SCP:n tuottamiselle, ovat nousseet huomioon myös monipuolisina raaka-aine lähteinä esimerkiksi biopolttoaineille sekä lääke- ja kosmetiikkateollisuuksille (Lupatini et al., 2017).

2.2. Epäorgaaniset materiaalit

Mikro-organismien hyödyntäminen epäorgaanisten materiaalien käsittelyssä nyky-yhteiskunnassa on erityisen tärkeää. Mineraalien rikastaminen kaivosteollisuudessa, erilaisten

materiaalien kierrätys sekä jäteveden käsittely ovat vain muutama esimerkki käyttömahdollisuuksista. Erityisesti harvinaisten ja monille teollisuuksille tärkeiden alkuaineitten, kuten volframin, magnesiumin ja grafiitin, saatavuuden heikkeneminen niiden vähentyessä maaperässämme laaja-alaisen louhinnan seurauksena yhdistettynä jatkuvasti kasvavaan populaatioon ovat lisänneet aiheen ajankohtaisuutta (Hennebel et al., 2015). Eräs tekniikka metallien erotukseen halutusta materiaalista, kuten malmista, biologisin menetelmin kutsutaan bioliuotukseksi. Bioliotus prosessissa tiettyjen bakteerien avulla saadaan huomattavasti tehokkaammin kerättyä metalleja verrattuna perinteisempiin fysikaalisiin ja kemiallisiin menetelmiin. Lisäksi nämä prosessit ovat usein huomattavasti energiatehokkaampia ja ympäristöystävällisempiä. Eräs tunnetuimmista bakteereista bioliuotukseen liittyen on *Acidithiobacillus ferrooxidans* joiden toiminta perustuu entsyymaattiseen hapetus-pelkistys reaktioon, jota kyseinen mikrobi hyödyntää energiametaboliassaan (Nguyen et al., 2015). Toinen mielenkiintoinen käyttökohde epäorgaanisten aineiden käsittelystä biologisesti mikrobien avulla on muovien, kuten PET:n, hajottaminen. Tämän taidon omaa muutaman sienilajikkeen lisäksi bakteeri nimeltään *Idonella sakaiensis*. Tämä bakteeri kykenee käyttämään PET muovia energiakseen ja pääasiallisena hiililähteenään. Lisäksi hajotustuotteina syntyy luontoa huomattavasti PET:a vähemmän kuormittavia tereftaalihappoa ja etyleeniglykolia (Yoshida et al., 2016).

2.3. Kasvituotteet

Monet luonnolliset kasvituotteet ovat eri asteilla tärkeitä ihmisille. Näitä on käytetty esimerkiksi ruoan raaka-aineina ja tuoksuina aina lääkeaineiksi asti. Eräänä vahvana kiinnostuksen kohteena on monien mahdollisten kasvien tuottamien kemiallisten yhdisteiden hyödyntäminen terveyden edistämisessä joko esimerkiksi erilaisina lääkeaineina, niiden prekursoreina. Nämä lääkeaineina tai niiden mahdollisina raaka-aineina toimivat biologisesti aktiiviset yhdisteet ovat kuitenkin usein kasvien sekundaarisia metaboliitteja. Tämä tekee kasvien viljelemisen näitä yhdisteitä varten epäedulliseksi huonon saannin vuoksi, sillä kasvit eivät tuota näitä metaboliitteja paljoakaan (Madhavan et al., 2019). Kasvien tuottaessa näitä mahdollisesti tärkeitä yhdisteitä huonosti, on käännytty mahdollisuuteen tuottaa kyseisiä yhdisteitä mikrobeissa. Näistä yksi yleisistä vaihtoehtoista on ollut *Saccharomyces cerevisiae*, vaikkakin vaihtoehtoja on useita, kuten laajasti myöskin käytetty *Escherichia coli*. Käytettävä

mikrobi valikoituu usein tuntemuksen ja geneettisen työkalujen olemassaolon takia, jotta kyseistä mikro-organismia voidaan muokata haluttuun käyttötarkoitukseen (Pyne et al., 2019).

2.4. Lääkeaineet ja rokotteet, vitamiinit

Mikrobien käyttö, erityisesti hiivojen ja bakteerien, on jo pitkään ollut tärkeää monien muuten vaikeasti tuotettavien yhdisteiden, kuten lääkeaineitten, tuottamisessa. Malliorganismit, kuten *Saccharomyces cerevisiae* ja *Escherichia coli* ovat laajasti käytössä monien tällaisten tuotteiden valmistuksessa, sillä meillä on hyvät mahdollisuudet tuottaa esimerkiksi lääkeaineina toimivia proteiineja, kuten insuliinia, heterologisesti erilaisin rekombinantti-DNA-menetelmien avulla. Näiden tekniikoiden avulla voidaan tuottaa proteiineja suoraan ihmisen oman geneettisen tiedon pohjalta, joka takaa niiden oikeanlaisen toimivuuden verrattuna esimerkiksi toisesta eläimestä eristettyyn proteiiniin. Mikro-organismien käyttö on myös monesta muusta syystä hyödyllistä, joista yksi esimerkki on proteiinien oikeanlainen laskostuminen, joka on hyvinkin monimutkainen prosessi, ja tästä syystä edullisinta suorittaa suoraan organismin sisällä. Kehitykset bioteknologiassa mahdollistavat myös näiden bioaktiivisten lääkeaineitten rakenteen suunnittelemista ja muokkaamista entistä tehokkaammiksi ja 'ystävällisemmiksi'. Lisäksi tällaiset tekniikat mahdollistavat monien synteetisireittien optimoinnin esimerkiksi inhiboimalla jonkin toisen proteiinin toimintaa muuttamalla niiden rakennetta (Jozala et al., 2016).

Eräs esimerkki lääkeaineen tuottamisesta on malarialääke Artemisiiniin prekursorin artemisiinisen hapon tuottaminen *S. cerevisiaessa*. Tätä varten kyseisessä hiivassa muokattiin mevalonaattireittiä FPP:n tuotannon tehostamiseksi. Lisäksi hiivaan siirrettiin *A. annuasta* eli kesämarunasta, joka on luonnollisesti Artemisiiniä tuottava kasvi, ADS-entsyymiä tuottava geeni sekä sytokromi P450. Nämä yhdessä muodostavat FPP:stä artemisiinista happoa (Ro et al., 2006). Toinen vastaavanlainen mahdollisuus on antigeenien, joita voivat olla esimerkiksi polysakkaridit, nukleiinihapot tai proteiinit, tuottaminen heterologisesti esimerkiksi bakteereissa tai hiivoissa rokotteita varten. Tämä on noussut vaihtoehdoksi heikennettyjä tai inaktivoituja viruksia tai bakteereja sisältävien rokotteiden rinnalle, sillä näissä voi olla usein ei haluttuja vaikutuksia immuunipuutoksesta kärsivien kohdalla tai joskus rokotteiden sisältämien adjuvanttien vuoksi (Bill, 2015). Tällaiset prosessit kuitenkin vaativat paljon suunnittelua pelkän aineenvaihdunnan suunnittelun lisäksi, varsinkin skaalatessa prosesseja

ylöspäin. Ajateltavaa löytyy niin kasvuolosuhteista prosessien ylävirrasta aina alavirrassa tapahtuvaan haluttujen yhdisteiden keräämiseen ja puhdistamiseen (Jozala et al., 2016).

2.5. Tutkimus

Monessa biokemiallisessa tutkimuksessa monet mikro-organismit, erityisesti hiivat ja bakteerit, ovat suuressa suosiossa. Esimerkiksi vuoden 2016 fysiologian ja lääketieteen Nobel palkinto annettiin tutkimukselle, jossa käytettiin hiivaa tutkittavana organismina ja joka johti lopulta autofagosytoosin löytämiseen ja ymmärtämiseen. Tämän on mahdollistanut käsitys ja tieto siitä, kuinka geneettisesti samankaltaisia eri organismit ovat ja tästä syystä monet biokemialliset prosessit vähintäänkin hyvin samankaltaisia (Wangler et al., 2017). Toisaalta yksi suosituimmista organismeista biologisissa laboratorioissa on *Escherichia coli*. Tämä Gramnegatiivinen bakteeri on monesta syystä laajasti käytössä, joita ovat esimerkiksi sen nopea kasvukyky, helpot ja monipuoliset kasvuolosuhteet, geneettinen muokattavuus olemassa olevilla työkaluilla ja laaja biokemiallinen ja fysiologinen tieto tästä kyseisestä organismista. *E. coli* laaja käyttö ja hyödyntäminen on myös johtanut monien uusien kantojen kehittämiseen. Näistä tunnettuja on esimerkiksi Keio-kokoelma sekä B- ja K-kannat, joista jokaisella on omat käyttökohteensa (Pontrelli et al., 2018).

Sen lisäksi, että mikrobeja käytetään tutkimuksen kohteena, ne ovat myös tarjonneet paljon työkaluja tutkimukselle. Esimerkiksi modernit PCR-tekniikat ovat riippuvaisia termostabiileista DNA-polymeraaseista, kuten eräästä *Thermus aquaticus* -bakteerista, saadusta Taq polymeraasista (Soo et al., 1996). Toinen laajalti käytetty tekniikka on riippuvainen itse bakteerista, kuten esimerkiksi *Agrobacterium tumefaciens*. Tätä bakteeria käytetään hyväksi geneettisen informaation transformaatioissa kasveihin hyvinkin stabiilisti. Tämä kyseinen bakteeri kykenee siirtämään omaa geneettistä materiaaliaan virulentin plasmidi DNA:n muodossa vastaanottavalle kasville. Luonnossa tämä aiheuttaa kasveissa kasvaimia, mutta tutkimusympäristössä tätä ominaisuutta voidaan hyödyntää halutun geneettisen materiaalin siirtämisessä kohdekasville (Krenek et al., 2015).

2.6. Biopolttoaineet

Biopolttoaineet ovat viime vuosina nousseet esille ilmastonmuutoskysymysten mukana vaihtoehtoisena ratkaisuna perinteisille fossiilipolttoaineille kestävämpänä energialähteenä.

Kaupallisesti puhuen yleisin markkinoilla oleva biopolttoaine, biodiesel, on syntetisoitu eläinrasvoista, käytetyistä paistorasvoista ja kasvirasvoista (Chen et al., 2011). Vaihtoehtoisesti myös mikrobeja tutkitaan biopolttoaineiden tehokkaamman ja kestävämmän tuottamisen näkökulmasta. Esimerkiksi etanoli, jota valmistetaan sokereista ja tärkkelyksestä, on ollut yksi mahdollisuus, mutta tämä on todettu vähemmän huomattavaksi vaihtoehdoksi, sillä se aiheuttaa monissa materiaaleissa korroosiota ja vetää vettä polttoaine seokseen. Sen sijaan vaikkapa butanoli, terpenoidit ja erilaiset lipidit ovat nousseet entistä haluttavimmiksi tuotteiksi (Fischer et al., 2008).

Lipidien tuottamista erityisesti suosivat monet mikrolevät, joiden kuivapainosta jopa 50-70% voi olla öljyä ja/tai joitain lipidejä. Mikrolevien kyky kasvaa nopeasti ja sitoa hiilidioksidia tekevät niistä erinomaisen kohteen biopolttoaineiden kehitykselle (Chen et al., 2011). Kiinnostusta on herättänyt myös erinäiset öljyiset hiivat. Perinteisin näistä on sukuun *Yarrowia* kuuluvat hiivat, sillä niiden muokkaamiseen on pitkään ollut työkaluja. Esimerkiksi kuitenkin geenitekniikan kehittyessä ja tarjotessa uusia ja kehittyneitä menetelmiä, muutkin luonnollisesti lipidejä paljon tuottavat suvut kuten *Rhodospiridium*, *Trichosporon* ja *Lipomyces* ovat nousseet tarkkailun kohteeksi entistä enemmän (Shi and Zhao, 2017).

2.7. Mikroleviät esimerkkinä, menetelmiä ja hyödynnettyjä tekniikoita

Mikrolevät ovat erityisen suosittuja tutkimuskohteena niiden kyvyn sitoa epäorgaanista hiiltä fotosynteesissä ja monien lajikkeiden luonnollisten lipidien tuotto ominaisuuksien ansiosta (Chen et al., 2011). Lisäksi joitain mikroleviä voidaan käyttää korkea-arvoisten tuotteiden, kuten proteiinien, pigmenttien ja vitamiinien tuottamiseen. On huomioitava myös materiaalikustannuksina fototrofisesti kasvavien levien kasvattaminen, jossa energia saadaan valon kautta ja hiili epäorgaanisesti hiilidioksidista. Molemmat näistä saatavissa ilman ylimääräisiä kustannuksia (Chew et al., 2017). Jokseenkin löytyy lajikkeita, jotka pystyvät heterotrofiseen, miksotrofiseen tai fotoheterotrofiseen hiilen sidontaan. Yleisemmän fototrofisen valoa ja epäorgaanista hiiltä hiilidioksin muodossa käyttävän kasvatuksen ohella heterotrofisen kasvatus, jossa käytetään orgaanista hiiltä sekä lähtöaineena, että energian tuottamiseen, on ollut myös tutkinnan kohteena. Miksotrofisen ja fotoheterotrofisen eivät ole juurikaan niin suosittuja näiden vaatimien olosuhteiden ja materiaalien tehdessä näistä kasvatustyypeistä huomattavasti kalliimpia kuin hetero- ja fototrofisesta kasvattamisesta (Chen et al., 2011). Kasvatusmenetelmän lisäksi mietinnän kohteena riippuen haluttavasta

lopputuotteesta ovat erityisesti myös optimaalisen lajikkeen valinta ja oikeat raaka-aineet. Optimaalisen lajikkeen valintaan sisältyy monta tekijää. Haluttavia ominaisuuksia ovat esimerkiksi tehokas raaka-aineiden käsittely, joka johtaisi korkeampiin halutun lopputuotteen saanteihin, pH ja lämpötila kestävyys sekä lopputuotteen tai sen oheistuotteiden ollessa myrkyllisiä, sietokyky tätä kohtaan. Vaikka onkin mahdollista mikrobien laajan biodiversiteetin huomioon ottaen, että tällainen mikrobi on jo olemassa, on huomattavasti miellyttävämpää yrittää käyttää jalostamista ja esimerkiksi geenitekniikkaa tarvittavien ominaisuuksien saavuttamiseen pelkän etsimisen sijasta. Tämä ei kuitenkaan ole yksinkertainen prosessi, sillä jalostaminen usein on hidasta ja fenotyyppejä, jotka ovat useamman geenin ilmentymisen yhtälö, on hankala siirtää tai suunnitella suoraan. (Fischer et al., 2008).

Taulukko 1. Esimerkkejä mikrobeista ja niiden mahdollisista käyttökohteista.

Laji (kanta)	Käyttö	Viite
<i>S. cerevisiae</i>	Ruokatuotteet kuten viini ja leipä	[1]
<i>Spirulina platensis</i>	SCP	[2]
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Bioliuotus	[3]
<i>Idonella sakaiensis</i>	PET muovin luonnillinen hajotus	[4]
<i>S. cerevisiae</i>	Artemisiininen happo, antimalaria lääke artemisiinin prekursori	[5]
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Suosittu hiiva lipidin, erityisesti asetyyli-CoA johdannaisien, tuotantoon esimerkiksi biopoltoaineita varten	[6], [8]
<i>E.coli</i> (MG1655(DE3))	Vanilliini synteesi, käytetään makuna ja tuoksuna. Poistettu aldehydi reduktiaasi ja tuotu entsyymejä (3-dehydroshikimate -> vanilliini)	[7]
<i>E.coli</i> (BL21(DE3))	Hydrokodoni, lääkeaine. Tebainin syntaasi yhdessä tebaini 6-O-demetylaasin ja morfinoni reduktiaasin kanssa	[7]
<i>Corynebacterium glutanicum</i>	L-glutamaatin ja L-lysiinin synteesissä. Myös muokattu esimerkiksi aromaattisten kasviyhdisteiden, kuten resveratrolin ja naringeniinin synteesiin	[9]

[1](Legras et al., 2007), [2](Lupatini et al., 2017), [3] (Nguyen et al., 2015), [4] (Yoshida et al., 2016), [5](Ro et al., 2006), [6](Shi and Zhao, 2017) , [7](Pontrelli et al., 2018), [8](Pyne et al., 2019), [9](Kallscheuer et al., 2016)

3. Reittien löytö, suunnittelu ja toteutus

Mikrobien käyttökohteet ovat moninaiset ja teknologioiden kehittyessä tutkimus keskittyy olemassa olevien prosessien optimointiin ja uusien kehittämiseen. Moderni teknologia antaa jo monenlaisia työkaluja esimerkiksi tunnettujen aineenvaihdunnan reittien muokkaamiseen geneettisellä tasolla vaikkapa CRISPR/Cas-menetelmällä. Lisäksi kehittyvä tietotekniikka mahdollistaa suunnittelua ja toteutusta jatkuvasti hienojakoisempaan ja monimutkaisempaan suuntaan (Choi et al., 2019). Tällainen muokkaus kuitenkin vaatii tietoa monesta asiasta, aina aineenvaihdunnan ja biosynteesien pienimmistäkin tapahtumista ja osista, siihen miten ulkoiset tekijät kuten pH, lämpötila ja se mitä käytetään lähtöaineina vaikuttavat tapahtumien kulkuun sekä lopputuloksiin (Madhavan et al., 2019).

3.1. Luonnolliset biosynteettiset reitit lähtökohtana

Aineenvaihdunnan ja biosynteesin yleisenä lähtökohtana organismista riippumatta on lähtöaineiden, joita organismi saa ympäristöstään tai tuotteina muista aineenvaihdunnan reaktioista, muuttaminen muiksi hyödyllisiksi yhdisteiksi usein monimutkaisissa ja monivaiheisissa monien entsyymien katalysoimissa reaktiosarjoissa. Kaikki elämälle oleelliset yhdisteet syntyvät jonkin biosynteettisen reitin tuloksena, vaikkapa kaikki lipidit, nukleotidit ja loppukädessä proteiinit ja jopa DNA. Lisäksi monet sekundaariset metaboliitit, joita on pelkästään kasvikunnassa noin 200 000, ovat hyvin erikoistuneiden aineenvaihduntareittien tuotteita. Näitä metaboliitteja on hyvin monenlaisia ja tästä syystä niiden joukosta löytyy huomattava määrä hyödyllisiä yhdisteitä useisiin käyttötarkoituksiin, kuten lääkeaineiksi, makuaineiksi, tuoksuiksi ja moneen muuhun tarkoitukseen. Tämän monipuolisuuden vuoksi tarkastellaan joitain näihin sekundaarisiin metaboliittien eri ryhmiin, kuten terpenoideihin, alkaloideihin, fenyylipropanoideihin ja polyketideihin, johtavia aineenvaihdunnan reittejä esimerkkeinä (Pyne et al., 2019).

3.1.1. Terpenoidit esimerkkinä luonnollisten yhdisteiden monipuolisuudesta ja - mutkaisuudesta

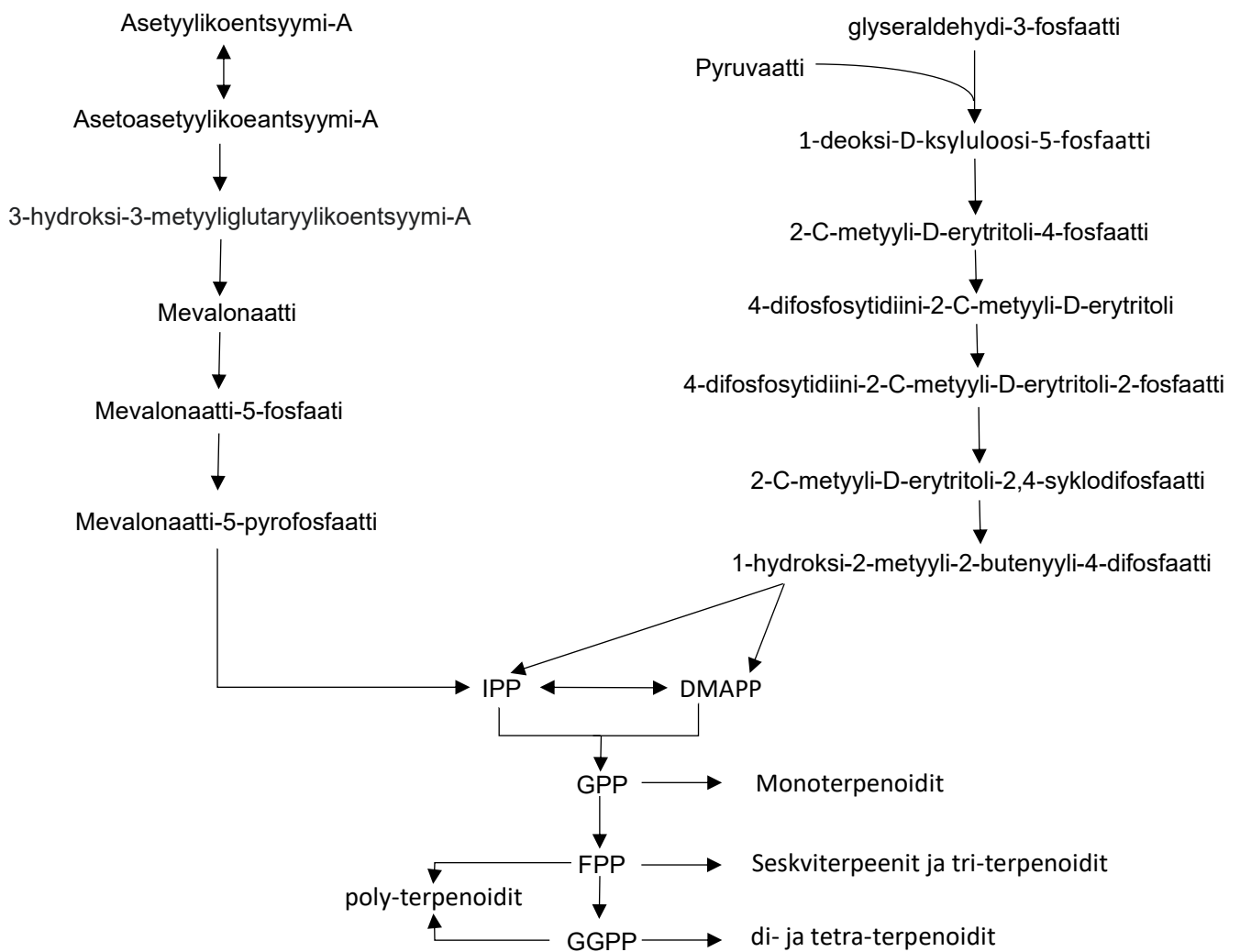
Terpenoidit ovat yksi monipuolisimmista ja laajimmista yhdisteryhmistä. Pelkästään kasvikunnassa tämän ryhmän yhdisteitä löytyy arvioiden mukaan yli 50 000 erilaista. Terpenoidien prekursoreina toimii kolme erilaista pyrofosfaattia, jotka ovat GPP (C₁₀), FPP

(C₁₅) ja GGPP (C₂₀) (Pyne et al., 2019). Näihin prekursoreihin päädytään yleensä joko mevalonaattireittiä tai MEP-reittiä pitkin, joiden tuotteina on IPP ja DMAPP. IPP:n ja DMAPP:n reaktiotuotteena on GPP (Madhavan et al., 2019). Terpenoidien tuotantoon johtava biosynteettinen reitti on kerätty Kuvaajaan 1.

Näistä prekursoreista lyhyin kymmenen hiilen rungollaan, GPP, toimii pohjana suurimmalle osalle lineaarisista ja syklistä monoterpenoideista sekä monoterpeeneille. Joitain esimerkkejä monoterpenoideista ovat esimerkiksi linaloli, jota käytetään ravintolisänä, ja mentoli, joka toimii niin makuaineena kuin ummetuslääkkeenäkin (Madhavan et al., 2019; Pyne et al., 2019). GPP myös luovuttaa prenyyli-ryhmän kannabioidien biosynteesissä, jotka ovat yhdisteitä, joilla on huomattavia lääketieteellisiä käyttökohteita (Pyne et al., 2019).

Viisitoista hiilinen FPP voi syntyä joko GPP:n ja IPP:n kondensaatioreaktiossa, esimerkiksi *S. cerevisiaessa*, tai joissakin tapauksissa, kuten kasveissa, suoraan IPP:sta ja DMAPP:sta. FPP toimii suorana prekursorina seskviterpeeneille, sekä lähtökohtana tri-terpenoidelle skvalaanin (C₃₀), joka syntyy kahden FPP:n kondensaatiosta, kautta. Skvalaani toimii myös lähtöpisteenä kaikille steroleille. FPP voi myös toimia polyterpenoidien osana yksin tai yhdessä GGPP:n kanssa (Pyne et al., 2019). Yksi esimerkki seskviterpeeneistä on amorfadieeni, josta saadaan artemisiinistä happoa. Tämä toimii prekursorina artemisiinille, jota käytetään malarialääkkeenä (Madhavan et al., 2019; Ro et al., 2006).

GGPP on isoin pääasiallisista terpenoidien prekursoreista kahdenkymmenen hiilen rungolla. FPP:n tavoin se toimii yhtenä polyterpenoidien rakenneosana. Tämän lisäksi se toimii pohjana di- ja tetra-terpenoideille. Esimerkiksi di-terpenoideista yksi huomattavimmista yhdisteistä on taksadieeni, joka toimii taksaani perheen kemoterapeuttisten lääkkeiden, kuten paklitaxelin, prekursorina (Madhavan et al., 2019; Pyne et al., 2019).



Kuvaaja 1. MEV (vasen) ja MEP (oikea) biosyntettiset reitit terpenoidien synteisiin. (Madhavan et al., 2019; Pyne et al., 2019; Ro et al., 2006)

3.1.2. Monimutkaisuus

Pelkästään jo terpenoideja tarkasteltaessa huomataan aineenvaihdunnan monitasoisuutta ja -mutkaisuutta. Aineenvaihdunnan reitit ovat monitasoisia ja haarautuvat monista kohdista, sekä organismista riippuen sama lopputulos voidaan saavuttaa eri tavoin. Tästä esimerkkinä FPP, joka saadaan *S. cerevisia*essa GPP:n ja IPP:n kondensaationa, mutta kasveissa suoraan DMAPP:n osista ja IPP:sta (Pyne et al., 2019). Reittien monimuotoisuuksien ja erojen eri organismien välillä kertoo myös erilaisten entsyymien ja isotsyymien määrästä. Näiden ymmärtäminen on tärkeää, sillä nämä entsyymit ajavat suurinta osaa biosyntettisistä ja katabolisista reaktioista, ja yksi isoimmista kysymyksistä monien reittien kohdalla on

nimenomaisesti tiedon puuttuminen erityisesti reittien loppupuolen entsyymeistä (Madhavan et al., 2019; Pyne et al., 2019). Tämä fakta on johtanut erääseen mahdolliseen taktiikkaan yhdisteiden tuottamiseen yhden tai muutaman aineenvaihduntareaktion kautta, syöttämällä tuottavalle organismille oikeaa prekursoria riippuen siitä, mistä vaiheesta reittiä 'tullaan sisään'. Tämä tapa kuitenkin vaatii organismilta kyvyn ottaa prekursoria vastaan ulkopuolelta ja liittää se oikeaan aineenvaihduntareitin asemaan. Tämä taktiikka on teollisuudessa osoittautunut monipuoliseksi vaihtoehdoksi, mikäli prekursoria on saatavilla kohtuulliseen hintaan. Tämä teollisuuden halu tuottaa haluamiaan yhdisteitä kohtuullisella hinnalla on yksi asia, mikä ajaa täydellisten aineenvaihduntareittien tutkimista. Muita syitä on esimerkiksi mahdollisuus käyttää uusiutuvia hiililähteitä, kuten glukoosia, prekursorina, joka lisäisi myös monien prosessien ympäristöystävällisyyttä (Choi et al., 2019).

3.2. Olemassa olevat reitit pohjana mikrobialiselle tuotannolle

Perinteisesti katsottuna vaikeatuottoisten yhdisteiden tuottaminen on tapahtunut jalostamalla alkuperäisiä lajeja tehokkaammiksi tuottajiksi, sekä yhdistelemällä useamman lajin käyttöä halutun tuloksen saavuttamiseksi. Kuitenkin monien meille hyödyllisten yhdisteiden ollessa spesifisiä tietyille lajille ja näiden lajien tuottaessa usein näitä äärimmäisen spesifisiä aineenvaihdunnan tuotteita marginaalisesti, teknologian ja synteettisen biologian kehittyessä on syntynyt myös mahdollisuus muokata tai siirtää geneettistä tietoa paremman tuottavuuden saavuttamiseksi (Choi et al., 2019). Monet alkuperäiset organismit voivat olla usein monimutkaisia, sisältäen esimerkiksi useita kromosomeja, tehden niiden muokkaamisesta nykyisinkien työkalujen avustamana huomattavan vaikeaksi. Tämä on yksi niistä syistä, miksi mikrobit ovat laajasti käytettyjä alustana bioyhdisteiden tuotannolle (Madhavan et al., 2019). Mikrobit, kuten *E. coli* ja *S. cerevisiae*, tarjoavat hyvän alustan näihin prosesseihin, sillä tunnemme niiden genetiikkaa ja fysiologiaa laajasti, niiden perimää on helppo muokata nykyisillä työkaluilla ja niillä on usein hyvin aktiivinen keskeinen aineenvaihdunta. Nämä antavat usein hyvät lähtökohdat. Tietenkin ymmärryksemme lisääntyessä ja työkalusalkkumme laajentuessa, monet muut mikrobit näkevät käyttöä niiden spesifisimpien aineenvaihduntojen kautta, jotka vähentävät tarvetta suunnitella ja toteuttaa monimutkaisia biosynteettisiä reittejä organismissa, jolla niitä ei ole. Tästä esimerkkinä *Streptomyces*-suvun bakteerit, jotka ovat polyketidien luonnollisia tuottajia ja näin ollen helpommin muokattavissa tuottamaan kasvi-spesifisiä polyketidejä (Pyne et al., 2019).

3.3. Isännän valinta

Isännän valitsemiseen on useita kriteerejä, jotka vaikuttavat sopivuuteen. Päälimmäisiä vaatimuksia on koko genomien tunteminen ja geneettisten työkalujen saatavuus. Kuitenkin prekursorien saatavuuden helppous on yksi tärkeimmistä tekijöistä sopivan isännän valitsemisessa. Joskus hyvin saatavien prekursorien, kuten asetyyli-CoA:n, ollessa saatavilla, voidaan tehokkaasti ohittaa jopa kokonaisten aineenvaihduntareittien uudelleen suunnittelu ja optimointi. Optimaalisen isännän valitsemisessa on myös huomioitava parhaimman kannan valinta, sillä tästä johtuvat fenotyyppien erilaisuudet voivat vaikuttaa reaktioiden tehokkuuteen ja geneettisen manipuloinnin vaikutuksiin (Pyne et al., 2019). Geneettisen manipuloinnin avulla, kuten yli-ilmentämällä joitain entsyymejä ja heikentämällä toisten toimintaa, voidaan parantaa tuottavuutta. Lisäksi voidaan esimerkiksi tuoda toisista organismeista tehokkaampia entsyymejä ajamaan reaktioita. Tästä eräs esimerkki hiivassa on yli-ilmentää alkoholi- ja aldehydidehydrogenaasit, poistaa asetyyli-CoA:ta synteesissä käyttävät peroksisomaalinen sitraatti syntaasi sekä sytosolinen malaatti syntaasi ja tuoda *Salmonella entericiasta* asetyyli-CoA syntaasi. Näillä muutoksilla kyetään optimoimaan asetyyli-CoA:n synteesi ja aktivoimaan suuremmissa määrin mevalonaattireittiä, jonka tuotteita voidaan käyttää haluttuihin prosesseihin, kuten terpenoidien synteesiin (Madhavan et al., 2019).

3.4. Keinotekoiset synteettiset reitit, suunnittelu ja toteutus

Uusien reittien suunnittelussa ja toteutuksessa on otettava huomioon monia asioita, sillä organismien aineenvaihdunnat ovat monimutkaisia. Tämän takia uusien biosynteettisten reittien siirtäminen mikrobiin, joka ei omista kyseistä reittiä, ei ole suoraviivainen prosessi. Ensimmäinen vaihe on tuntea koko reitti ja siihen vaikuttavat geenit, jonka jälkeen se voidaan siirtää valittuun isäntäorganismiin (Madhavan et al., 2019). Tätä tuntemista varten käytetään esimerkiksi sekvensointitekniikoita, joilla saadaan tietoa organismin genomista. Tämän informaation avulla voidaan selvittää, mistä geneistä siirrettävät osat koostuvat, vertaamalla proteomiseen tietoon. Tässä apuna toimivat myös monet laskennalliset menetelmät ja työkalut (Choi et al., 2019). Tämän jälkeen informaatio pitää myös siirtää valitulle organismille. Tähän on perinteisesti voitu käyttää esimerkiksi plasmideja, mutta tuoreempana kehityksenä esimerkiksi CRISPR/Cas-systeemillä on mahdollisuus muokata genomia suoremmin. Tällä on mahdollisuus lisätä prosessin tehokkuutta perinteisiin plasmideihin verrattuna, joiden

transformaation onnistuvuus pitää vielä erikseen tarkistaa (Choi et al., 2019; Pyne et al., 2019). Siirtäessä uutta geneettistä tietoa organismiin on huomioitava myös asioita, kuten transkriptionaalinen kontrolli, translaation jälkeinen kontrolli ja lokalisaatio, jotka kaikki voivat vaikuttaa haluttuun toimintaan. Eräs huomattava esimerkki on CYP-entsyymit yhdessä CPR-parien kanssa, jotka yhdessä katalysoivat monia monimutkaisia kasvien sekundaarisia metaboliitteja. Vaikeuksia näiden kanssa tuo näiden entsyymien monipuolisuus, joissain kasveissa on vain muutamia CPR:ja ja jopa satoja CYP-entsyymejä, mikä tekee näiden toiminnan yhteisestä optimoinnista hankalaa (Pyne et al., 2019).

3.4.1. Optimointi

Organismia optimoidessa haluttua biosynteettistä reittiä varten huomioidaan myös monia asioita, jotka keskittyvät paljon metabolisen virtauksen ympärille. Tässä prosessissa pyritään poistamaan tai vähentämään mahdollisten aineenvaihdunnallisten pullonkaulojen vaikutusta aineenvaihdunnan tehoon. Asioita, jotka voivat vaikuttaa tähän, ovat pääasiassa entsyymien heikko toiminta tai tarvittavien yhdisteiden siirtyminen toisille reiteille. Näihin ongelmiin pitkälti saadaan ratkaisuja olemassa olevien entsyymien manipuloinnilla. Voidaan lisätä reaktionopeutta määrittelevän entsyymin määriä, esimerkiksi lisäämällä koodaavan geenin ekspressiota (Pyne et al., 2019). Voidaan myös tutkia mahdollisuutta käyttää vaihtoehtoisia entsyymiä toisesta organismista, joka toimii tehokkaammin tai on muuten suotuisampi. Tämä voidaan ottaa huomioon myös isäntäorganismia valittaessa ja monet jalostustaktiikat myös tähtäävät mahdollisimman tehokkaan aineenvaihdunnan saavuttamiseen (Choi et al., 2019; Madhavan et al., 2019). Toinen tapa parantaa virtausta on vähentää tarvittavien metaboliittien siirtymistä pois halutulta reitiltä esimerkiksi poistamalla häiritsevien entsyymien toimintaa, jotka käyttävät näitä metaboliitteja. Tällaisia entsyymejä voivat olla organismin omat ja myös mahdollisesti heterologiset entsyymit (Pyne et al., 2019).

4. Työkaluja

4.1. Sekvensointi

Geneettinen tuntemus on pohjana monille muille tekniikoille. Kyky kohdentaa prosesseja oikeisiin pisteisiin tai mahdollisuus analysoida, simuloida ja ennustaa vaikkapa rakenteita tarvitsee tarkkaa tietoa kohteen geneettisestä informaatiosta (Choi et al., 2019; Pontrelli et al., 2018). Sekvensointiteknologiat, jotka tekevät tämän datan saamisen mahdolliseksi, ovat kehittyneet huomattavasti vuodesta 2003, jolloin ihmisen genomiprojekti (Human Genome Project) saatiin päätökseen. Nämä kehitykset ovat nopeuttaneet sekvensointiprosesseja, lisäten kapasiteettia jopa 100 – 1 000 kertaiseksi, ja tehneet niistä suhteessa jopa 50 000 kertaa halvempia. Näitä uusia teknologiaa kutsutaan NGS-teknologioiksi ja ne pääasiassa jakautuvat kahteen kategoriaan: pitkä luku ja lyhyt luku -menetelmiin. Nämä myös jakautuvat vielä omiin tarkempiin kategorioihinsa, kuten SBL, SBS ja SMRT. Näistä NGS-teknologioista huomattavaa kuitenkin on, että vaikka ne tarjoavat tehokkaampaa ja halvempaa sekvensointia, niissä usein voi ilmetä virheitä ja erityisesti lyhyt luku -menetelmissä lukupituudet ovat yleensä lyhyempiä verrattuna aikaisempiin Sangerin menetelmään perustuneisiin tekniikoihin (Goodwin et al., 2016).

4.2. CRISPR

CRISPR on suhteellisen uusi tekniikka, joka tarjoaa huomattavaa tarkkuutta genomien editoinnissa. Tämän tekniikan avulla kyetään esimerkiksi tarkkoihin pistemutaatioihin, poistogeenien luomiseen ja aineenvaihduntareittien tuomiseen. CRISPR-systeemiä on löydetty useista bakteereista osana niiden immuunipuolustusta. Tämä systeemi, CRISPR yhdessä Cas-entsyymin kanssa, kykenee luomaan hyvin paikkaspesifisiä DNA-katkoksia (Pontrelli et al., 2018). Tämän perusteella olemassa olevista CRISPR/Cas-systeemeistä on kehitetty käyttöön muihin vastaaviin systeemeihin verrattuna yksinkertaisempi CRISPR/Cas9, joka juontuu *S. pyogenes* -bakteerista. Tässä systeemissä tällä hetkellä yksinkertaisimmillaan käytetään sgRNA:ta, joka sisältää 20 emäsparin komplementaarisen alueen ja PAM-sekvenssin, joka voidaan muokata sekvenssispesifiseksi. Tämä sgRNA vastaa systeemissä crRNA:ta ja tracrRNA:ta. Tämän RNA toimii yhdessä Cas9-endonukleasin kanssa leikatakseen DNA:ta oikeasta kohdasta (Cong et al., 2013; Pontrelli et al., 2018).

4.3. MAGE

Tämä teknologia tarjoaa mahdollisuuden ajaa systemaattisesti ja tehokkaasti solujen evoluutiota aiheuttamalla erilaisia mutaatioita, kuten insertioita, deleetioita ja mismatch-kohtia, joka tarjoaa huomattavia etuja aikaisempiin rekombinaatiomenetelmiin, joissa on voitu suorittaa tehokkaasti mutaatioita vain yksi kerrallaan. MAGE:ssa näitä mutaatioita voidaan tehdä samanaikaisesti useassa eri kohdassa solun genomia ja usein myös mahdollistetaan usean erilaisen mutaation syntymahdollisuus yhdessä pisteessä (Wang et al., 2009). Tämän tekniikan toiminta alkaa lyhyiden yksijuosteisten DNA-oligojen, jotka ovat homologisia jollekin genomikohteelle, siirtämisellä isäntäsoluun elektroporaation avulla. Tämän yksijuosteisen DNA:n hajoaminen estetään proteiini β :n avulla, jonka tuotantoa isäntäsolussa on tehostettu. Tämä proteiini sitoutuu oligoihin ja estää hajoamisen, mahdollistaen homologisen rekombinaation oligon ja kohdegeenin välillä, johtaen mutaatioon. Usein oligot suunnitellaan rekombinaatioon jälkijuosteessa, joka lisää tehokkuutta 10-100-kertaiseksi verrattuna rekombinaatioon johtajuosteessa (Pontrelli et al., 2018). Huomattavaa on myös, että koko prosessi on automaattinen ja syklinen, yhden syklin viedessä noin 2-2,5 tuntia. Tämän prosessin avulla kyetään luomaan laajoja heterogeenisiä ja monimuotoisia populaatioita, joita voidaan käyttää haluttuihin tarkoituksiin, kuten tutkia optimaalisia mutaatioita paremman aineenvaihdunnan saavuttamiseen halutussa käyttökohteessa (Pontrelli et al., 2018; Wang et al., 2009).

4.4. gTME ja genomisekoitus

gTME-tekniikassa mutatoidaan globaaleja transkriptiotekijöitä, muokaten näin suurempaa transkriptioprofiilia. Näin ollen saadaan luotua uusia fenotyyppisiä, joita voidaan seuloa haluttuja ominaisuuksia varten (Choi et al., 2019). Mutaatiot perustuvat geenikirjastoihin, joita luodaan virhealttiin PCR:n avulla ja sen jälkeen siirtää tutkittavaan organismiin esimerkiksi rekombinantti plasmidissa halutulla menetelmällä. Tällä tekniikalla voidaan hyvin tutkia mutaatioiden vaikutuksia yhdessä geenissä ja näin ollen pyrkiä löytämään esimerkiksi miten yksi geeni voi vaikuttaa organismin etanolitoleranssiin, kuten Tan *et al.* tutkimuksessa (2016).

Toinen tapa lisätä geneettistä monimuotoisuutta on geneettisen sekoittamisen avulla. Tässä tekniikassa kokonaisia kromosomeja kyetään sekoittamaan protoplastifusion avulla, yhdistelemällä monia kantoja. Tässä tekniikassa syntyy myös useita mutaatioita, jotka lisäävät fenotyyppien monimuotoisuutta entisestään (Choi et al., 2019; Gong et al., 2009).

4.5. Laskennallinen biologia ja tekoäly

Tietotekniikan kehittyessä syntyy jatkuvasti uusia sovelluksia, jotka auttavat tutkimusta siirtämällä suunnittelua ja tiedon keräämistä pois manuaalisesta käsittelystä ja automatisoivat osia prosesseista. Esimerkiksi PRISM ja RoDEO, jotka auttavat geenien löytämistä ja rakenteiden ennustamista. Ohjelmia on myös aineenvaihdunnan ja biosynteettisten reittien suunnitteluun, ennustamiseen ja simulointiin, kuten RetroPath, RetroRules ja merlin (Choi et al., 2019). Myös viime vuosien aikana kerätty biologinen massadata on tullut entistä saatavimmille. Tämä yhdessä kehityksien muiden systemaattisen metabolian osa-alueilla, kuten kantavan lajikkeen valinnassa, aineenvaihdunta reittien uudelleenrakentamisessa, metabolisen virtauksen optimoinnissa ja fermentaatioissa, on mahdollistanut koneoppimisen käyttämisen monien näiden prosessien kehittämisessä ja optimoinnissa hyvinkin tehokkaasti. Koneoppimisen osa-alue, syväoppiminen, joka perustuu neuroverkkoihin, on erityisesti myös ollut monien sovellusten kehityksen pohjalla (Kim et al., 2020).

4.6. DNA-kasaus

DNA-kasaustekniikat kuten Golden Gate ja LCR ovat kehittyneet moderneiksi tavoiksi yhdistää DNA-osia halutuiksi kokonaisuuksiksi (Choi et al., 2019). Golden Gate-menetelmä hyödyntää tyypin IIS restriktioentsyymejä yhdistääkseen maksimissaan 24 DNA-fragmenttia DNA-ligaasilla Watson-Crick-parillisten ulokkeiden mukaan (Potapov et al., 2018). LCR-tekniikka taas toimii lämpösykliä ajamana (vrt. PCR). Tässä käytetään kaksoisjuosteisia DNA-osia, joita on yleensä maksimissaan 20 ja kukin näistä on enintään 20 tuhatta emästä. Prosessi alkaa denaturaatiolla 94:ssä °C, josta lämpötila lasketaan sitoutumista varten 55:een °C. Tässä sitoutumisprosessissa yksijuosteinen 'silta' DNA-oligo yhdistää halutut DNA-osat yhteen. Tästä lämpötila nostetaan 65:een °C, jossa termostabiili ligaasientsyymi yhdistää halutut DNA-osat yhteen. Tämän jälkeen ajetaan useampi lämpösykli, joiden aikana loput erilliset osat saadaan yhdistettyä yhdeksi kokonaisuudeksi (Kok et al., 2014).

5. Tulevaisuuden näkymiä

Mikrobien hyödyntäminen on ollut pitkään osa ihmiskunnan kehitystä. Pystymme hyödyntämään monia luonnollisia mikro-organismeja hyötytuotteiden tuotannossa ja monissa tutkimuksen applikaatioissa. Olemme pystyneet suuremmassakin mittakaavassa hyödyntämään organismeja, joiden luonnollisia biosynteettisiä reittejä on pystytty tehostamaan esimerkiksi perinteisillä jalostustekniikoilla ja nykyisin tehostetusti esimerkiksi laskennallisen biokemian, mahdollistaen *in silico* simulaatiot, ja modernien tekniikoiden, kuten MAGEn, avulla (Choi et al., 2019). Huomattavaa on myös teknologian kehittyessä ja ymmärryksen lisääntyessä mahdollisuudet muokata olemassa olevia ja jopa luoda uusia proteiineja. Näiden avulla luodaan mahdollisuus toteuttaa luovia ratkaisuja haluttujen yhdisteiden tuottamista varten sekä mahdollisesti luomaan täysin uusia sovelluksia (Cravens et al., 2019).

Kuitenkin erityisesti rekombinantti-DNA-tekniikalla tuotettujen mikrobien ja monien muiden bioprosessien siirtäminen laboratorioista laajempaan teolliseen käyttöön on ollut hankalaa esimerkiksi biosynteettisten reittien huonon tuntemuksen tai vaikeasti mikrobeissa ilmaistavien geenien vuoksi (Choi et al., 2019; Madhavan et al., 2019). Tätä ongelmaa vastaan taistelee esimerkiksi teknologioiden kehittyminen, kuten high-throughput sekvensoinnin ja koneoppimisen hyödyntäminen, ja siitä johtuva prosessien halventuminen, joka johtaa tehostettuun tiedon keräämiseen ja ymmärtämiseen. Tällaisella pohjalta on helpompi ja nopeampi suunnitella ja toteuttaa uusia sovelluksia mikro-organismeissa ja mahdollisesti siirtää niitä teolliseen käyttöön (Cravens et al., 2019).

Lähteet

The Nobel Prize in Chemistry 1907. (a) Available at:

<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1907/summary/>.

The Nobel Prize in Physiology Or Medicine 1945. (b) Available at:

<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1945/summary/>.

Bill RM (2015) *Recombinant Protein Subunit Vaccine Synthesis in Microbes: A Role for Yeast?* .

Buchholz K and Collins J (2013) The roots - A short history of industrial microbiology and biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(9): 3747-3762.

Bud R (2007) *Penicillin: Triumph and Tragedy.* : Oxford University Press on Demand.

Chen C-, Yeh K-, Aisyah R, Lee D- and Chang J- (2011) Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology* 102(1): 71-81.

Chew KW, Yap JY, Show PL, Suan NH, Juan JC, Ling TC, et al. (2017) Microalgae biorefinery: High value products perspectives. *Bioresource Technology* 229: 53-62.

Choi KR, Jang WD, Yang D, Cho JS, Park D and Lee SY (2019) Systems Metabolic Engineering Strategies: Integrating Systems and Synthetic Biology with Metabolic Engineering. *Trends in Biotechnology* 37(8): 817-837.

Coghill RD (1970) The development of penicillin strains. *AIChE* (1970) pp. 14–21

Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. (2013) *Multiplex Genome Engineering using CRISPR/Cas Systems.*

Cravens A, Payne J and Smolke CD (2019) Synthetic biology strategies for microbial biosynthesis of plant natural products. *Nature Communications* 10(1).

Fischer CR, Klein-Marcuschamer D and Stephanopoulos G (2008) Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production. *Metabolic Engineering* 10(6): 295-304.

Gong J, Zheng H, Wu Z, Chen T and Zhao X (2009) Genome shuffling: Progress and applications for phenotype improvement. *Biotechnology Advances; Biotechnology for the Sustainability of Human Society* 27(6): 996-1005.

Goodwin S, McPherson JD and McCombie WR (2016) Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics* 17(6): 333-351.

Hennebel T, Boon N, Maes S and Lenz M (2015) *Biotechnologies for Critical Raw Material Recovery from Primary and Secondary Sources: R&D Priorities and Future Perspectives.*

Hughenoltz J and Kleerebezem M (1999) Metabolic engineering of lactic acid bacteria: Overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations. *Current Opinion in Biotechnology* 10(5): 492-497.

Jozala AF, Geraldes DC, Tundisi LL, Feitosa VDA, Breyer CA, Cardoso SL, et al. (2016) *Biopharmaceuticals from Microorganisms: From Production to Purification*.

Kallscheuer N, Vogt M, Stenzel A, Gätgens J, Bott M and Marienhagen J (2016) Construction of a *Corynebacterium glutamicum* platform strain for the production of stilbenes and (2S)-flavanones. *Metabolic Engineering* 38: 47-55.

Kim GB, Kim WJ, Kim HU and Lee SY (2020) Machine learning applications in systems metabolic engineering. *Current Opinion in Biotechnology* 64: 1-9.

Kok Sd, Stanton LH, Slaby T, Durot M, Holmes VF, Patel KG, et al. (2014) Rapid and Reliable DNA Assembly via Ligase Cycling Reaction. *ACS Synthetic Biology* 3(2): 97-106.

Krenek P, Samajova O, Luptovciak I, Doskocilova A, Komis G and Samaj J (2015) *Transient Plant Transformation Mediated by Agrobacterium Tumefaciens: Principles, Methods and Applications*.

Legras J-, Merdinoglu D, Cornuet J- and Karst F (2007) Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Molecular Ecology* 16(10): 2091-2102.

Lupatini AL, Colla LM, Canan C and Colla E (2017) *Potential Application of Microalga Spirulina Platensis as a Protein Source*.

Madhavan A, Arun KB, Sindhu R, Binod P, Kim SH and Pandey A (2019) Tailoring of microbes for the production of high value plant-derived compounds: From pathway engineering to fermentative production. *Biochimica Et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1867(11).

May OE and Herrick HT (1930) Some Minor Industrial Fermentations. *Industrial and Engineering Chemistry* 22(11): 1172-1176.

Nasseri AT, Rasoul-Amini S, Morowvat MH and Ghasemi Y (2011) *Single Cell Protein: Production and Process*.

Nguyen VK, Lee MH, Park HJ and Lee J- (2015) *Biobleaching of Arsenic and Heavy Metals from Mine Tailings by Pure and Mixed Cultures of Acidithiobacillus Spp.*

Paul Ross R, Morgan S and Hill C (2002) Preservation and fermentation: Past, present and future. *International Journal of Food Microbiology* 79(1-2): 3-16.

Perlman D (1970) The evolution of penicillin manufacturing process. *AIChE*, pp. 24–30

Platt D (1988) Memoire sur la fermentation appelée lactique (Louis Pasteur). *Delaware Medical Journal* 60(1): 23-24.

Pontrelli S, Chiu T-, Lan EI, Chen FY-, Chang P and Liao JC (2018) *Escherichia Coli as a Host for Metabolic Engineering*.

Potapov V, Ong JL, Kucera RB, Langhorst BW, Bilotti K, Pryor JM, et al. (2018) Comprehensive Profiling of Four Base Overhang Ligation Fidelity by T4 DNA Ligase and Application to DNA Assembly. *ACS Synthetic Biology* 7(11): 2665-2674.

Pyne ME, Narcross L and Martin VJJ (2019) Engineering plant secondary metabolism in microbial systems. *Plant Physiology* 179(3): 844-861.

Ro D-, Paradise EM, Quellet M, Fisher KJ, Newman KL, Ndungu JM, et al. (2006) Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* 440(7086): 940-943.

Shi S and Zhao H (2017) Metabolic engineering of oleaginous yeasts for production of fuels and chemicals. *Frontiers in Microbiology* 8(NOV).

Silcox HE (1970) The importance of innovation. *AIChE*, pp. 74–77

Soo HE, Wang J and Steitz TA (1996) Structure of Taq polymerase with DNA at the polymerase active site. *Nature* 382(6588): 278-281.

Swiegers JH, Bartowsky EJ, Henschke PA and Pretorius IS (2005) Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11(2): 139-173.

Tan F, Wu B, Dai L, Qin H, Shui Z, Wang J, et al. (2016) *Using Global Transcription Machinery Engineering (gTME) to Improve Ethanol Tolerance of Zymomonas Mobilis*. : BioMed Central.

Wang HH, Isaacs FJ, Carr PA, Sun ZZ, Xu G, Forest CR, et al. (2009) *Programming Cells by Multiplex Genome Engineering and Accelerated Evolution*.

Wangler MF, Yamamoto S, Chao H-, Posey JE, Westerfield M, Postlethwait J, et al. (2017) *Model Organisms Facilitate Rare Disease Diagnosis and Therapeutic Research*.

Yoshida S, Hiraga K, Takehana T, Taniguchi I, Yamaji H, Maeda Y, et al. (2016) *A Bacterium that Degrades and Assimilates Poly(Ethylene Terephthalate)*.