

Opinnäytetyö (YAMK)

Kemiantekniikka ja bioteknologia

2021

Toni Paasikallio

ENTSYYMITUOTTOPOSENTIAALIN
SELVITYS ERILAISIA RAAKA-AINEITA
KÄYTTÄEN *Trichoderma reesei* -
HOMEELLA

OPINNÄYTETYÖ (YAMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Kemiantekniikka ja bioteknologia

2021 | 71 sivua, 7 liitesivua

Ohjaaja: Kiira Vuoristo, VTT

Toni Paasikallio

ENTSYYMITUOTTOPOSENTIAALIN SELVITYS ERILAISIA RAAKA-AINEITA KÄYTTÄEN TRICHODERMA REESEI -HOMEELLA

Trichoderma reesei -homeetta voidaan hyödyntää teollisuudessa entsyymien tuotto-organismina, ja se voidaan geneettisesti muuntelemalla saada tuottamaan myös erilaisia heterologisia tai homologisia rekombinanttiproteiineja. Sen luontaisesti tuottamia sellulaaseja ja hemisellulaaseja voidaan hyödyntää esimerkiksi toisen sukupolven bioetanolin tuotantoprosesseissa, mutta lignosellulolyttisten entsyymien muodostamat kustannukset ovat pysyneet näiden prosessien osalta varsin korkeina. Tehokkaampien tuottokantojen muodostaminen ja uusien edullisempien entsyymien tuottoon soveltuvien raaka-aineiden löytäminen voivat auttaa alentamaan toisen sukupolven bioetanolin tuotantoprosesseissa tarvittavien entsyymien muodostamia kustannuksia. Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää erityisten geneettisesti muunneltujen *Trichoderma reesei* -kantojen entsyymituottopotentiaalia erilaisia raaka-aineita hyödyntäen.

Työssä käytettiin kahta erilaista geneettisesti muunneltua kantatyyppiä, joista toinen edusti isäntäkantana perinteisempää kantalinjaa, jotka tyypillisesti tarvitsevat erityiset indusoidut raaka-aineet entsyymien tuottamiseksi. Toisella kantatyyppillä voitiin tuottaa entsyymejä myös glukoosipohjaista tuotantoprosessia hyödyntäen, mikä ei ole ollut perinteisillä kannoilla normaalisti mahdollista. Kokeet suoritettiin bioreaktoreissa hallituissa olosuhteissa panosyöttöprosesseina. Bioreaktorikasvatuksista otetuista näytteistä mitattiin näytteiden kiintoainepitoisuus, tiettyjen liukoisten substraattien määrä sekä kasvuliukseen eritettyjen proteiinien kokonaismäärä. Käsitys kantojen tuottamasta entsyymiprofiilista ja niiden keskinäisistä eroavaisuuksista muodostettiin analysoimalla kantojen kasvuliukseen tuottamia proteiineja SDS-PAGE-geelien avulla.

Tulosten perusteella käytetyillä raaka-aineilla saatiin tuotettua entsyymejä, mutta tuotetut proteiinimäärät, saannot sekä tuottavuudet vaihtelivat suuresti kantatyyppien ja eri raaka-aineiden välillä. SDS-PAGE-geelien analyysin perusteella tuotetuista entsyymiprofiileista nähtiin eroavaisuuksia eri kantojen ja raaka-aineiden välillä, mutta selkein eroavaisuus vaikutti olevan glukoosipohjaisessa tuotantoprosessissa, jossa käytetyt kannat näyttivät tuottaneen ksylanaasi I ja ksylanaasi II entsyymejä isäntäkantoja enemmän. Työssä käytettyjen tuotantoprosessien osalta tarvittaisiin kuitenkin vielä optimointia, jotta saadaan tietoa johtuvien eroavaisuuksien tuloksissa esimerkiksi käytettyjen raaka-aineiden lisäksi myös niiden keskinäisestä määrästä tai käytetyistä syöttönopeuksista, vai onko kyseessä enemmän tuottokantoihin liittyvät rajoittavat ominaisuudet.

ASIASANAT:

Bioreaktori, entsyymit, indusori, hemisellulaasi, sellulaasi, *Trichoderma reesei*

MASTER'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Master's Degree Programme in Chemical Engineering and Biotechnology

2021 | 71 pages, 7 pages in appendices

Supervisor: Kiira Vuoristo, VTT

Toni Paasikallio

STUDY OF ENZYME PRODUCTION POTENTIAL FROM DIFFERENT RAW MATERIALS BY *TRICHODERMA REESEI*

The filamentous fungus *Trichoderma reesei* can be used as a production organism in industrial scale enzyme production and it can also be genetically engineered to produce various types of heterologous or homologous recombinant proteins. Cellulases and hemicellulases it produces naturally can be utilized for example in second-generation bioethanol production processes but the cost of lignocellulolytic enzymes needed in these processes has remained relatively high. The development of more efficient production hosts and discovery of new low-cost feedstock materials can help to reduce the enzyme costs in second generation bioethanol production processes. The aim of this thesis was to examine enzyme production potential of specific genetically engineered *Trichoderma reesei* strains using various feedstocks.

Two genetically engineered strain types were used. The first represented more conventional strain type as a host strain which usually requires specific inducing feedstocks to produce enzymes. The second strain type enabled enzyme production using a glucose-based production process which has not been normally possible with conventional strain types. The experiments were carried out in bioreactors under controlled conditions as fed-batch processes. Solid's content, the amount of certain soluble substrates and the total amount of proteins secreted into the growth medium, were measured from the cultivation samples. An understanding of the enzyme profile produced by the strains and the differences between them was obtained by SDS-PAGE analysis of the proteins secreted into the growth medium.

The results indicate that enzymes could be produced with the tested feedstocks, but the total amount of protein produced, the yields and the productivities varied greatly between the strain types and different feedstocks. SDS-PAGE analysis showed differences in the produced enzyme profiles between the used strain types and feedstocks but the clearest difference seemed to be in the glucose-based production process where the strains appeared to produce more xylanase I and xylanase II enzymes than the host strains. However, further optimization would be needed regarding the used processes to understand whether the differences in results are due not only to the used feedstock materials but also to the quantities or used feed rates or whether they are more due to the limiting characteristics of the strains.

KEYWORDS:

Bioreactor, enzymes, inducer, hemicellulose, cellulase, *Trichoderma reesei*

SISÄLTÖ

LYHENTEET	6
1 JOHDANTO	8
2 ENTSYYMITEOLLISUUS	9
2.1 Teollisuusentsyymien tuotanto	9
2.2 Entsyymien käyttö elintarvikkeissa ja rehuissa – regulaatio lyhyesti	13
3 TRICHODERMA REESEI -HOME	15
3.1 <i>Trichoderma reesei</i> proteiinien tuotto-organismina	16
3.2 Tuottoprosessit	24
3.2.1 Pääasialliset raaka-aineet	26
3.2.2 Typpilähteet	29
3.2.3 Epäorgaaniset yhdisteet ja hivenaineet	31
3.3 Glukoosin hyödyntäminen – uudet tutkimustulokset	32
3.4 Toisen sukupolven bioetanoli – sellulaasien tuotantokustannukset	33
4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	37
4.1 Kantojen valinta	37
4.2 Itiösuspensioiden valmistelu	37
4.3 Esikasvatukset	38
4.4 Transglykosylaatioliuoksen valmistus	38
4.5 Bioreaktorikasvatukset	39
4.6 Analyysit	42
4.6.1 Näytteiden kiintoainepitoisuus	42
4.6.2 Sokereiden analysointi	42
4.6.3 Proteiinimittaukset	43
4.6.4 Entsyymiprofiilin määrittäminen SDS-PAGE:lla	43
5 TULOKSET JA TARKASTELU	45
5.1 Transglykosylaatioliuos	45
5.2 Bioreaktorikasvatukset – tulosten käsittely ja normalisointi	45
5.2.1 Bioreaktorikasvatukset 1-6 – Kantatyyppi A	46
5.2.2 Bioreaktorikasvatukset 7-12 – Kantatyyppi B	51
5.2.3 Normalisoidut proteiinimittaukset	55

5.2.4 Normalisoitu suurin proteiinipitoisuus, saanto ja tuottavuus	56
5.3 Bioreaktorikasvatukset - entsyymiprofiilit	59
6 YHTEENVETO JA POHDINTA	62
LÄHTEET	64

LIITTEET

- Liite 1. Alustakomponentit
- Liite 2. Bioreaktorikasvatuksien mittauskäyrät

LYHENTEET

ABF I	α -l-arabinofuranosidaasi
AMFEP	The Association of Manufacturers and Formulators of Enzyme Products. Entsyymituotteiden valmistajien ja formuloidijien yhdistys.
BGL I	β -glukosidaasi I
BGL II	β -glukosidaasi II
BSG	Brewer's spent grain. Panimoprosessien sivutuotteena muodostuva rankki eli mäski.
BXL	β -ksylosidaasi
CaLB	<i>Candida antarctica</i> lipase B
CBH I	Sellobiohydrolaasi I
CBH II	Sellobiohydrolaasi II
CSL	Corn steep liquor. Maissin liotusneste.
CSS	Corn steep solids. Kuivattu maissin liotusneste.
DDGS	Distiller's dried grains with solubles. Etanolin fermentointiprosessin valmistuksessa sivutuotteena muodostuva kuivattu rankki.
DNA	Deoksiribonukleiinihappo.
EG I	Endoglukanaasi I
EG II	Endoglukanaasi II
EG III	Endoglukanaasi III
EG V	Endoglukanaasi V
FDA	Food and Drug Administration. Yhdysvaltojen elintarvike- ja ruokavirasto.
GRAS	Generally Recognized As Safe. Yleisesti tunnustettu turvalliseksi.
HPIC	High Pressure Ion Chromatography. Korkeapaineionikromatografia.

HPLC	High Performance Liquid Chromatography. Korkean erotuskyvyn nestekromatografia.
kDa	Kilodalton. Proteiinikoko.
LPMO	Lyyttinen polysakkaridimono-oksigenaasi
Man I	β -mannanaasi
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. Natriumdodekyylisulfaattipolyakryliamidigeelielektroforeesi.
SES	Synthetic Expression System. SES-järjestelmä. Geeniekspression yleistyökalu.
SGAB	Sub-Group on Advanced Biofuels
US DOE	United States Department of Energy. Amerikan Yhdysvaltojen energiaministeriö.
XYN I	Ksylanaasi I
XYN II	Ksylanaasi II
XYN III	Ksylanaasi III
XYN IV	Ksylanaasi IV

1 JOHDANTO

Tutkimustyön tarkoituksena oli selvittää erityisten geneettisesti muunneltujen *Trichoderma reesei* -homekantojen entsyymituottopotentiaalia pääasiassa sellulaasien ja ksy-lanaasien osalta käyttäen erilaisia raaka-aineita.

T. reesei on yksi merkittävistä teollisuusentsyymien tuottamiseen käytetyistä tuotto-organismeista. Sen osalta on tehty hyvin kattavaa tutkimustyötä ja kannankehitystä jo useiden vuosikymmenten ajan. Toimivien, edullisten ja helposti sekä riittävässä määrin saatavissa olevien raaka-aineiden hyödyntäminen esimerkiksi sellulaasien ja hemisellulaasien tuottamiseksi kannattavasti lignoselluloosapitoisia biomassoja hyödyntävien toisen sukupolven bioetanolin tuottoprosesseja varten on ollut haaste jo pitkään. Tarvittavien entsyymien korkeat kustannukset ovatkin todennäköisesti toimineet yhtenä merkittävänä rajoittavana tekijänä sille, että toisen sukupolven bioetanolin tuotannon osuus on pysynyt suhteellisen alhaisena verrattuna ensimmäisen sukupolven bioetanolituotantoon. Tutkimus *T. reesei* -homeen ympärillä jatkuu kuitenkin edelleen, ja viimeisimpien tutkimussaavutuksien myötä sitä on entsyymien tuottamisen sijaan myös mahdollista hyödyntää esimerkiksi elintarvikekäyttöön kelpaavien ruokaproteiinien tuottamiseen.

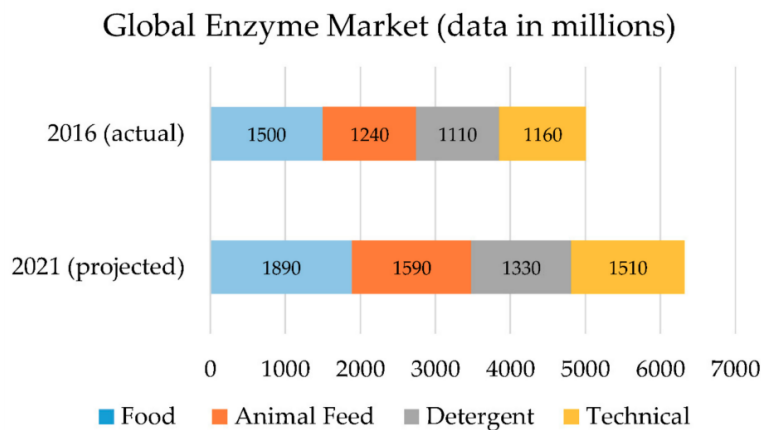
Työ suoritettiin Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy:n sisäisenä projektina bioprosessiteknikan ryhmässä. Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy on Suomen valtion kokonaan omistama voittoa tavoittelematon erityistehtäväyhtiö, jonka tehtävänä on edistää tutkimuksen ja teknologian hyödyntämistä ja kaupallistamista elinkeinoelämässä ja yhteiskunnassa. VTT omaa pitkän historian biotekniikan tutkimuksessa ja etenkin *T. reesei* -homeen osalta.

Kirjallisuusosiossa käsitellään entsyymiteollisuutta ja teollisuusentsyymien tuotantoa yleisesti, sekä tuodaan esiin *T. reesei*:n roolia tuotto-organismina pyrkien käsittelemään myös viimeisimpiä tutkimusjulkaisuja. Kokeellisessa osuudessa uusien raaka-aineiden kelpoisuutta arvioitiin mittaamalla bioreaktorikasvatuksista otetuista näytteistä liuokseen tuotettu proteiinipitoisuus, minkä katsottiin edustavan tuotettujen entsyymien määrää. Lisäksi määritettiin solujen alustaan tuottamia proteiineja SDS-PAGE:lla. Tulosten avulla laskettiin lisäksi arviot saannoista ja tuottavuudesta. Salassapitovelvollisuuden takia numeeriset tulokset on normalisoitu. Lisäksi käytettyjä *Trichoderma reesei* -kantoja sekä kaikkia raaka-aineita tai niiden pitoisuuksia ei kerrota työssä tarkemmin, vaan ne on eritelty toisistaan koodeilla.

2 ENTSYYMITEOLLISUUS

2.1 Teollisuusentsyymien tuotanto

Teollisuusentsyymien maailmanlaajuiset markkinat ovat kasvaneet viimeisten vuosikymmenien aikana merkittävästi. Vuonna 2000 arviot markkinoiden koosta olivat noin 1,5 miljardia dollaria (Cherry ym., 2003, s. 438) ja vuosina 2012-2014 arviolta 3,75-4,2 miljardia dollaria (Ferreira ym., 2014, s.245; Paloheimo ym., 2016, s.24; Singh, R ym., 2016, s.1). Vuoden 2017 osalta arviot maailmanlaajuisista markkinoista olivat noin 6 miljardia dollaria ja ennustettu vuotuinen kasvuvauhti kehittyvien markkinoiden osalta 6 % (Arnau ym., 2020, s. 179). Kuvassa 1 on esitetty Chapman ym. (2018) julkaisun perusteella arviot maailmanlaajuisista entsyymimarkkinoista vuonna 2016 ja ennuste vuoden 2021 osalta.

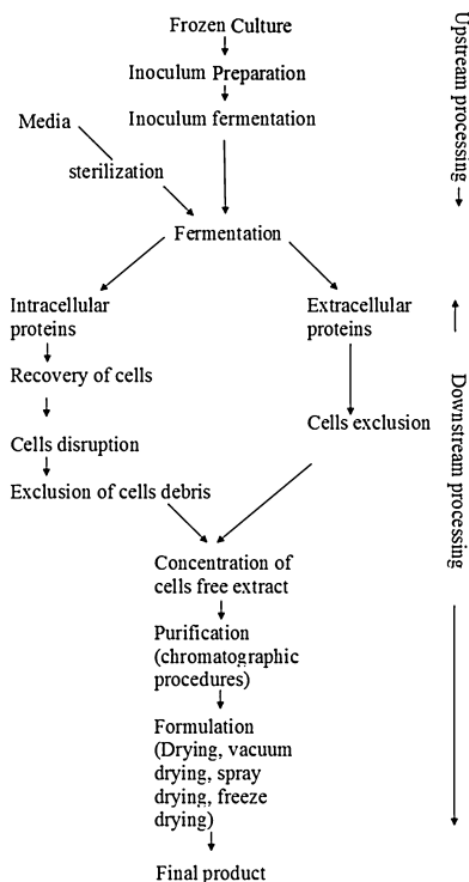


Kuva 1. Arvioita entsyymimarkkinoista (milj. USD, \$) ruoka-, rehu-, pesuaine- ja teknisten entsyymien markkinat eroteltuina. (Chapman ym., 2018, s.3)

Entsyymit ovat proteiineja, jotka toimivat biologisina katalyytteinä solujen sisällä ja ulkopuolella mahdollistaen ja nopeuttaen biokemiallisia reaktioita jo pieninä pitoisuuksina (Lalli & Reuter, 2016, s.23). Entsyymien toimintaa reaktion katalyyttinä kutsutaan entsyymien aktiivisuudeksi ja sen toiminta on hyvin spesifistä, minkä takia entsyymien katalysoiman reaktion tuotteet ovat tarkkaan ennalta määrättyjä. Kansainvälisen biokemian ja molekyylibiologian liiton (IUBMB) entsyymiluokituksen mukaisesti entsyymit voidaan määritellä yksiselitteisesti nelinumeroisen EC-numeron perusteella, joka kuvaa tarkasti entsyymien katalysoimaa reaktiota. Pääluokat jaoteltiin pitkään kuuden eri pääluokan mukaan, joita olivat oksidoreduktaasit, transferaasit, hydrolaasit, lyaasit, isomeraasit ja

ligaasit, mutta vuonna 2018 mukaan lisättiin uusi entsyymiluokka nimeltään translokaasit (Tipton, 2018). EC-numeroinnissa ensimmäinen numero kertoo pääluokan entsyymien katalysoimien reaktioiden perusteella, minkä lisäksi pääluokat sisältävät erilaisia alaluokkia sen mukaan minkälaisia substraatteja entsyymit käyttävät ja mitä reaktioita ne katalysoivat näiden substraattien välillä. (Aittomäki ym.,2002, s.54-55; Chapman ym., 2018, s. 2; Tipton & McDonald, 2018)

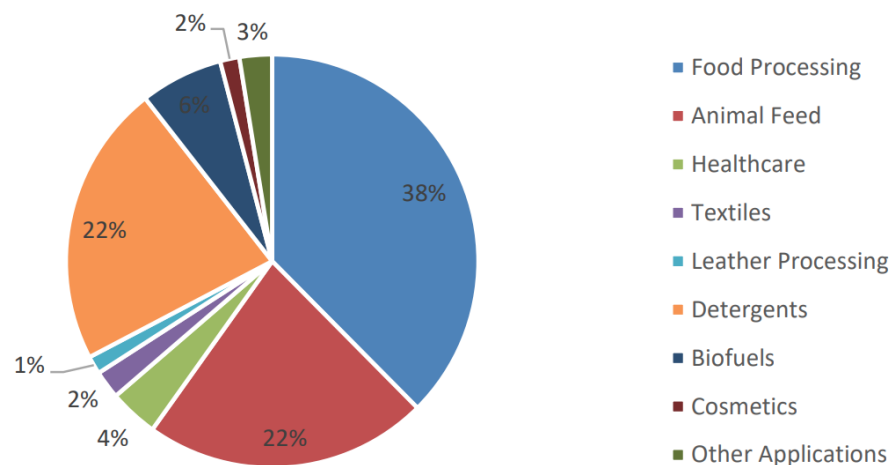
Teollisuusentsyymien tuotantoprosessit ja kasvatusolosuhteet vaihtelevat käytettävän tuotto-organismien ominaisuuksien mukaan, mutta yleisesti ottaen prosessi on mahdollista jakaa tiettyihin päävaiheisiin, jotka on esitetty kuvassa 2. Päävaiheiksi voidaan eritellä esikasvatus, tuottokasvatus sekä jälkikäsittelyt sen mukaan onko tuote solunulkoisesti vai solunsisäisesti tuottuva proteiini. Lopuksi tuotteelle tarvitaan usein myös konsentroidin- ja puhdistusvaihe sekä formulointi. Kun lopputuotteena on nestemäinen entsyymiliuos, sille ei tavallisesti suoriteta kuvassa 2 esitettyä kuivausta, mutta se voidaan esimerkiksi stabiloida erilaisia aineita käyttäen. (Aittomäki ym.,2002, s.147, 200-203, 339)



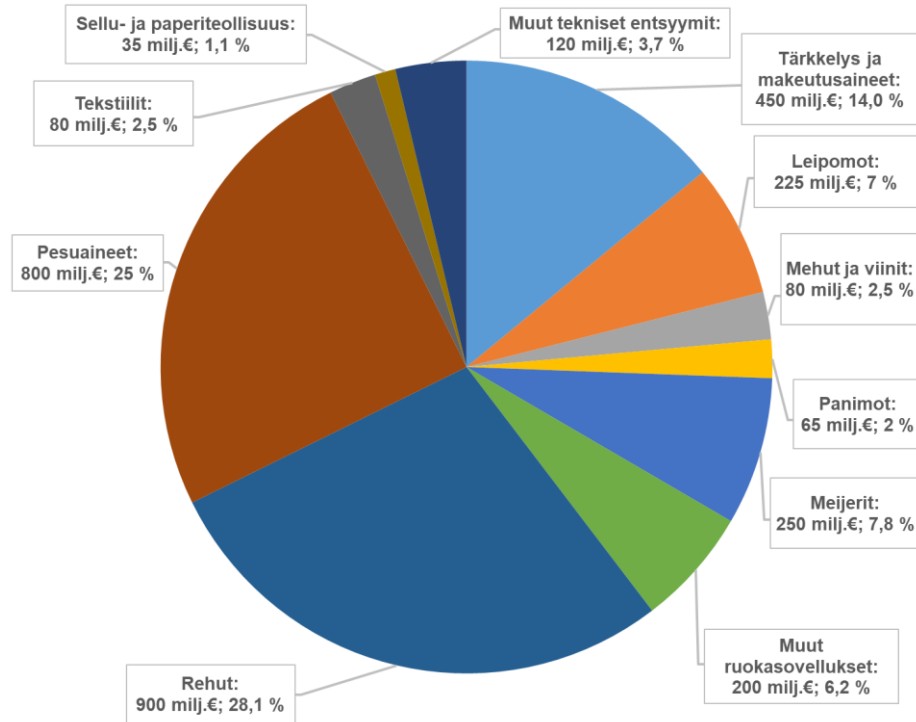
Kuva 2. Havainnekuva tuottoprosessin päävaiheista. (Singh.R ym., 2016, s. 174).

Julkaisuissa Chapman ym. (2018), Gudynaite-Savitch & White (2016) sekä Singh.R ym. (2016) on esitelty yleisesti ottaen erilaisten teollisuusentsyymien käyttökohteita ja ominaisuuksia sekä niiden tuottamiseen käytettyjä tuotto-organismeja varsin kattavasti. Gudynaite-Savitch & White (2016) mukaan noin 75 % teollisuusentsyymeistä on ominaisuuksiltaan hydrolyyttisiä, jotka hajottavat useita erilaisia luonnollisia aineita. Näihin kuuluvat muun muassa proteaasit, lipaasit ja hiilihydraatteja hydrolysoivat entsyymit kuten sellulaasit, ksylanaasit, amylaasit ja pektinaasit. Hiilihydraatteja hydrolysoivia entsyymejä käytetään esimerkiksi ruoissa- ja rehuissa sekä teknisissä sovellutuksissa tekstiili-, pesuaine-, polttoaine- sekä sellu- ja paperiteollisuuden osalta. Proteiineja hajottavia proteaaseja käytetään puolestaan esimerkiksi pesuaine- ja ruokateollisuudessa. Pesuaineteollisuudessa esimerkiksi fosfaattien käyttöä on voitu korvata proteaaseilla ja sellulaaseilla. Amylaaseilla ja pektinaaseilla on tekstiiliteollisuudessa voitu korvata esimerkiksi natriumhydroksidin käyttöä. Lipaaseja voidaan käyttää esimerkiksi ruokasovelluksissa, jossa niiden avulla on voitu korvata esimerkiksi kemiallisia emulgointiaineita. Kuvissa 3 ja 4 on esitetty eri lähteiden perusteella arvioita entsyymimarkkinoista jaoteltuna tarkemmin eri sovellusalueiden kesken. Lisäksi Kuvassa 5 on esitetty entsyymimarkkinoiden isoimmat toimijat ja niiden arvioidut markkinaosuudet vuoden 2016 julkaisun perusteella. (Ferreira ym., 2014, s.245; Gudynaite-Savitch & White, 2016, s.395-401)

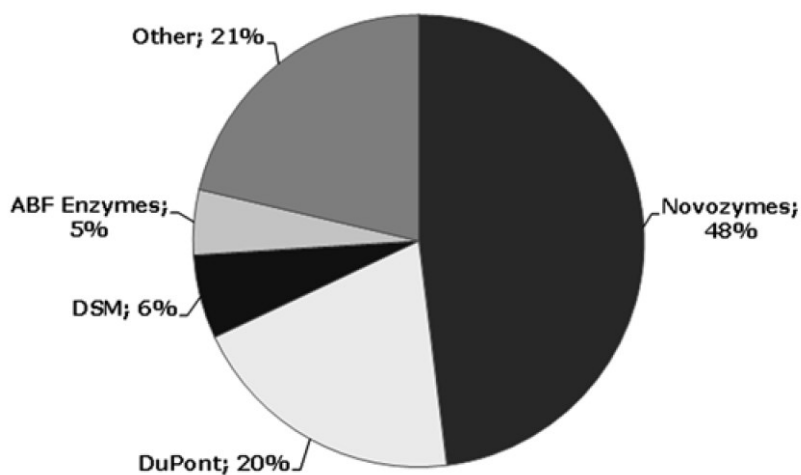
Global Industrial Enzyme Market: US\$ 5.5 billion



Kuva 3. Esitettyjä arvioita entsyymimarkkinoiden osuuksista eri sovellusalueiden osalta vuoden 2020 julkaisun perusteella. (Ferreira & Petrides., 2020, s.3)



Kuva 4. Esitettyjä arvioita teollisuusentsyymien osuuksista eri sovellusalueiden osalta vuoden 2016 julkaisun perusteella. (Paloheimo ym., 2016, s.25, muokattu)



Kuva 5. Entsyymimarkkinoiden isoimmat toimijat ja niiden arvioidut markkinaosuudet vuoden 2016 julkaisun perusteella. (Paloheimo ym., 2016, s.25)

Kuvia 3 ja 4 vertaamalla voidaan muodostaa yleiskuva teollisuusentsyymien osa-alueista ja markkinoista sekä markkinoiden kehityksestä viimeisten vuosien aikana. Lähteistä johtuen jaottelut eivät kuitenkaan ole täysin yhteneviä. Kuvasta 5 nähdään etenkin Novozymesin erittäin suuri (lähes 50 %) markkinaosuus toimijoiden osalta.

2.2 Entsyymien käyttö elintarvikkeissa ja rehuissa – regulaatio lyhyesti

Eri valtioiden lainsäädännöt sääntelevät entsyymien käyttöä esimerkiksi rehuissa ja elintarvikkeissa. Vaatimukset ja lupaprosessit vaihtelevat maailmalla esimerkiksi EU:n, Yhdysvaltojen ja yleisesti ottaen eri valtioiden kesken. Esimerkiksi EU:n sisällä geneettisesti muunnelluilla kannoilla tuotettujen entsyymien osalta vaaditaan kattava selvitys, miten tuottokanta on muodostettu julkisesti saatavilla olevasta isäntäkannasta. Monien erilaisten turvallisuuteen liittyvien vaatimusten lisäksi, yksi selkeä vaatimus on tarve osoittaa geneettisesti muunnellun tuotto-organismien ja sen DNA:n poissaolo lopullisesta entsyymivalmisteesta. (Arnau ym., 2020, s.202-203)

EU:n osalta elintarvike-entsyymejä on aikaisemmin säännelty valmistuksen apuaineina jäsenvaltioiden lainsäädännön nojalla, tai niitä ei ole säännelty laisinkaan. Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 1332/2008 elintarvike-entsyymeistä mukaan tulevaisuudessa vain hyväksytyjen entsyymien luetteloon sisällytetyt elintarvike-entsyymejä on mahdollista tuoda markkinoille sellaisinaan ja käyttää elintarvikkeissa annettujen edellytysten mukaisesti. Asetus ei kuitenkaan koske elintarvikelisiä aineina käytettyjä entsyymejä, joille on olemassa erilliset vaatimuksensa EU:ssa asetus (EY) N:o 1333/2008 mukaan. Vaikka (EY) N:o 1332/2008 asetusta sovelletaankin jo muilta osin EU:n alueella, hyväksytyjen elintarvike-entsyymien osalta sen on tarkoitus tulla voimaan vasta luettelon valmistumisen jälkeen. Euroopan elintarviketurvallisuusvirasto (EFSA) vastaa luettelon laatimisesta ja julkaisusta hyväksytyjen entsyymien osalta ja kirjoitushetkellä luetteloa ei ole vielä julkaistu, mutta sen odotetaan tapahtuvan vielä vuoden 2021 aikana (Arnau ym., 2020, s.202). Tällä hetkellä EU:ssa hyväksytyt elintarvike-entsyymejä olivat invertaasi (E1103 / EC 3.2.1.26), lysotsyymi (E1105 / EC 3.2.1.17) sekä ureaasin, beta-glukanaasin ja lysotsyymien käyttö viinissä. Entsyymien käyttöä rehujen lisäaineena säädellään myös eri tavalla riippuen valtiosta, ja EU:n sisällä tätä säädellään asetuksen (EY) N:o 1831/2003 mukaisesti, jonka lisäksi komissio ylläpitää sallituista rehun lisäaineista erillistä rekisteriä ”European Union Register of Feed Additives”. (Arnau ym., 2020, s.202-203; EY 1332/2008)

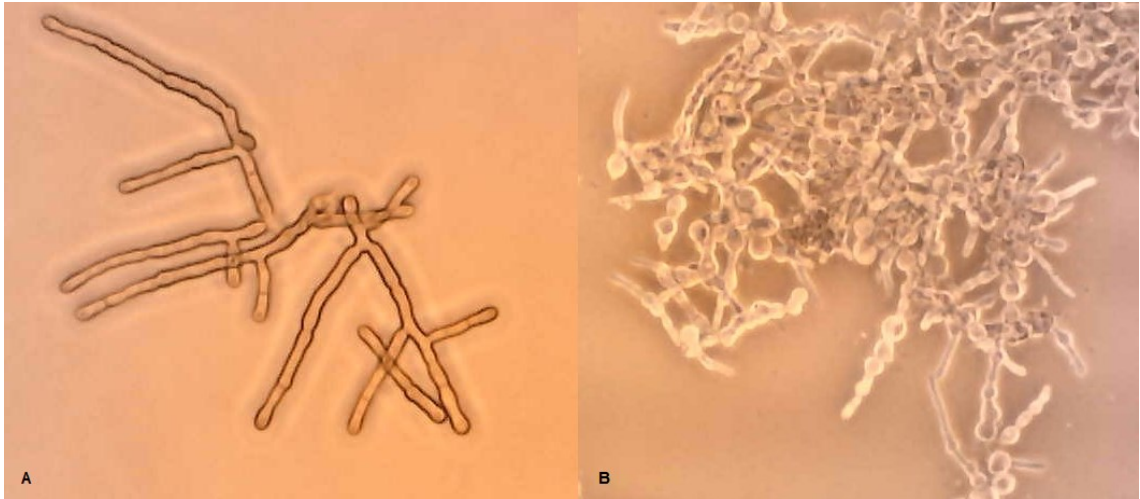
Riippuen käytetystä termistöstä ja luokittelusta eri maiden välillä, elintarvike-entsyymit jaetaan yleisesti ottaen joko valmistuksen apuaineisiin tai lisäaineiksi. Sääntelyn näkökulmasta ratkaisevaa on luokittelu apuaineen ja lisäaineen välillä, mikä vaikuttaa merkittävästi sovellettaviin määräyksiin. Näistä valmistuksen apuaineen toimivia entsyymejä käytetään jotakin teknologista tarkoitusta varten esimerkiksi raaka-aineiden,

elintarvikkeiden tai niiden ainesosien käsittelyssä tai prosessoinnissa ilman, että sillä on teknologista vaikutusta lopputuotteeseen, eikä sitä kuluteta varsinaisena elintarvikkeena. Niitä voi kuitenkin esiintyä lopputuotteessa jäämänä, josta ei aiheudu vaaraa terveydelle. Esimerkkinä mehun valmistuksessa käytetty pektinaasientsyymi, joka pilkkoo pektiiniä, ja irrottaa mehun mäskistä paremmin (Ruokavirasto, 2019 s.64). Lisäaineena entsyymejä käytetään jonkinlaista teknologista tarkoitusta varten esimerkiksi parantamaan ominaisuuksia, rakennetta tai ravintoarvoja ja ne sisältyvät lopulliseen tuotteeseen. Suurin osa elintarviketeollisuuden käytössä olevista elintarvike-entsyymeistä on käytössä valmistuksen apunaineena. (Ruokavirasto, 2020, s.5; Gryshyna ym., 2016, s.442)

3 TRICHODERMA REESEI -HOME

Alkujaan toisen maailmansodan aikana Salomonsaarilta löydetty rihmasieni *Trichoderma reesei* eristettiin Yhdysvaltain armeijan telttakankaasta. Se kuitenkin tunnistettiin aluksi *Trichoderma viride* lajiin kuuluvaksi, mutta havaittiin lopulta eri lajiksi ja nimettiin yhden päätutkijoista, Elvyn T. Reese, mukaan. Kuvassa 6 on esitetty varsin tyypillistä *Trichoderma reesei* -homeen rihmastoa. Pian löytymisensä jälkeen *T. reesei*:n sellulolyttisten ominaisuuksien havaittiin johtuvan etenkin selluloosaa ja hemiselluloosaa hajottavien entsyymien vaikutuksesta. Varsinaisen kannankehityksen voidaan sanoa alkaneen 70-luvulla sattumanvaraisen mutageneesin ja kantojen seulontojen avulla, jolloin erilaisten sellulaasien tuotantoa pyrittiin parantamaan selluloosapitoisten raaka-aineiden muuntamiseksi fermentoitaviksi sokereiksi. Varsinainen yksittäinen eristetty QM6a nimetty kanta on edelleen alkuperäinen isäntäkanta, josta kaupallisesti kehitetyt tuottokannat ovat saaneet alkunsa. (Gryshyna ym., 2016, s.443-444; Paloheimo ym., 2016, s.23-24; Saloheimo ym., 2014, s.81)

Varsinaiset perustavanlaatuiset saavutukset sellulaasien tuotannon ja selluloosan hydrolyysin osalta juontavat juurensa 70-luvun energiakriiseihin. Tuolloin fossiilisten polttoaineiden kustannusten nousu ja riippuvaisuus Lähi-idän epävakasta politiikasta käynnistivät mittavan julkisen rahoituksen vyöryn alan tutkimukseen esimerkiksi bioetanoli-prosessien kehittämiseksi. Kaikesta huolimatta taloudellisesti kannattavia selluloosan hydrolyysin perustuvia prosesseja ei saavutettu ja fossiilisten polttoaineiden hintojen lasku lopulta johti myös tutkimusrahoituksen supistumiseen. Sen sijaan sopivia sovelluksia *T. reesei*:n entsyymien osalta löydettiin esimerkiksi tekstiili-, rehu-, pesuaine-, sekä sellu- ja paperiteollisuuden saralla, joissa ei välttämättä vaadita entsyymien vaikutuksen osalta lähtöaineiden täydellistä hydrolysointia. 2000-luvun alussa ilmastonmuutokseen liittyvät huolet nostivat jälleen kiinnostusta yleisesti ottaen toisen sukupolven biopolttoaineita kohtaan ja etenkin toisen sukupolven bioetanoliuottoprosessien kehittämiseksi kannattavalle tasolle. Viimeisten vuosien aikana yhtenä potentiaalisena uutena sovellusalueena on noussut esiin *T. reesei*:n hyödyntäminen tuotto-organismina elintarvikekäyttöön soveltuvien proteiinien tuotannossa. (Ferreira ym., 2014, s.253–257; Ercili-Cura & Barth, 2020, kappale 3.1.2)



Kuva 6. *Trichoderma reesei* -homeen rihmastoa bioreaktorikasvatuksen alussa (A) sekä tuottovaiheen aikana (B), jossa nähdään erityisesti juuri tuottovaiheessa tyypillisesti esiintyvää pallomaista muotoa rihmastossa. Kuvantaminen suoritettiin tässä työssä suoritetuista bioreaktorikasvatuksista.

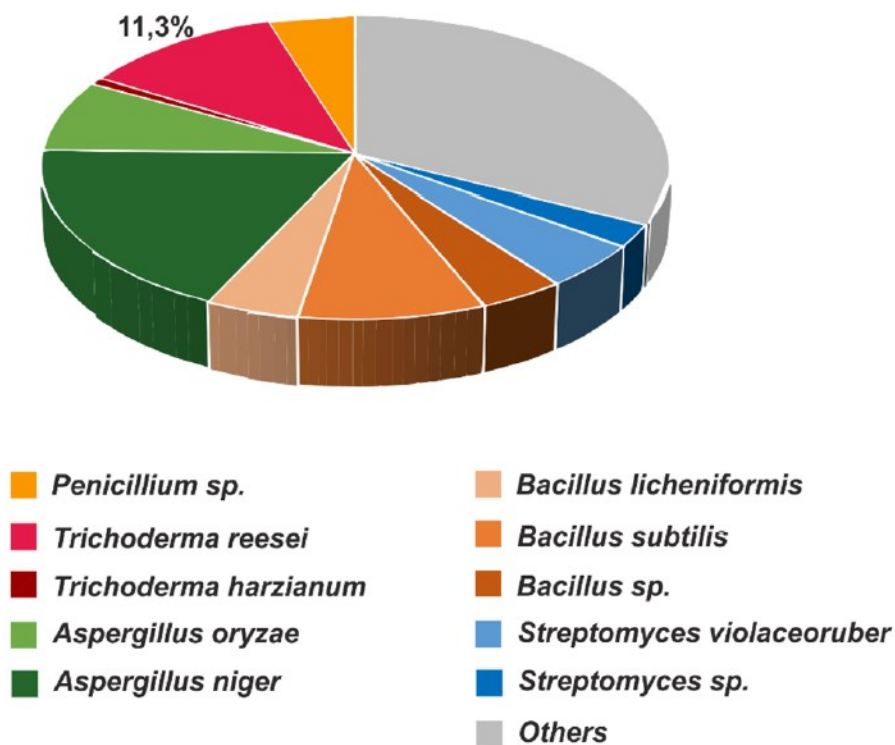
3.1 *Trichoderma reesei* proteiinien tuotto-organismina

Trichoderma reesei on yksi eniten tutkituista sellulolyttisistä homeista ja sitä hyödynnetään teollisuudessa etenkin hydrolyyttisiin entsyymeihin kuuluvien sellulaasien osalta esimerkiksi sellobiohydraasien, sekä hemisellulaasien osalta ksylanaasien tuottamiseen (Aro, 2003, s. 3). *T. reesei*:n käyttö tuotto-organismina perustuu sen kykyyn tuottaa suurina määrinä sellulolyttisiä entsyymejä, sekä muihin hyviin ominaisuuksiin, jotka täyttävät teolliseen tuotantoon tarvittavat vaatimukset. Entsyymejä suurina pitoisuuksina tuottavia mutatoituneita *T. reesei* kantoja on käytetty teollisuudessa jo 1970-luvulta lähtien ja sen pitkä historia tuotto-organismina täyttää vaatimukset osoittamaan riittävän turvallisuuden kaupallisen käytön osalta. *T. reesei* osalta ei ole raportoitu esimerkiksi mykotoksiinien tuottoa (Frisvad ym., 2018, s. 9489), ja se on saanut Yhdysvaltojen elintarvike- ja ruokavirastolta (FDA) GRAS-tason (Generally Recognized As Safe) luokituksen. Alkujaan alkuperäistä QM6a kannasta perinteisiä mutageneesimenetelmiä hyödyntäen onnistuttiin luomaan sellulaaseja suurina määrinä tuottavia kantoja, kuten esimerkiksi kannat Rut-C30 ja QM9414. Nykyään *T. reesei* kantoja käytetään mitä suuremmissa määrin geneettisesti muunneltuina tuottoisäntinä tuottamaan myös homologisia ja heterologisia rekombinanttiproteiineja. (Gryshyna ym., 2016, s. 442-444; Paloheimo ym., 2016, s.28-34; Saloheimo ym., 2014, s.81-82)

Proteiineja voidaan tuottaa hyödyntämällä organismeja, jotka tuottavat luontaisesti haluttuja proteiineja (non-recombinant production). Lisäksi yhdistelmä-DNA tekniikan (recombinant DNA technology) avulla proteiineja voidaan tuottaa myös geneettisesti muunneltuja organismeja hyödyntäen (recombinant protein production). (Walsh, 2014, s.65) Geneettisesti muunnellulla tarkoitetaan geenitekniikan keinoin muunneltua organismia, jossa organismiin on siirretty geneettistä materiaalia toisesta eliöstä, tai sen oman perintöaineksen toimintaa on muutettu tavalla, joka ei toteudu luonnossa paritumisen tuloksena tai luonnollisena yhdistelmänä. (Lalli & Reuter, 2016, s.26) Rekombinanttiproteiineilla tarkoitetaan geenitekniikan avulla tuotettuja proteiineja, joiden tuottamiseksi tarvittava informaatio sisältävä geeni on siirretty organismiin, joka tuottaa geenin sisältämän informaation avulla kyseistä proteiinia. (Lalli & Reuter, 2016, s.36) Jos kyseessä on proteiini, jota organismi ei kykene tuottamaan luontaisesti, puhutaan vierasperäisistä eli heterologisista proteiineista. Vastaavasti organismin luontaisesti tuottamien proteiinien kohdalla puhutaan homologisista proteiineista. Suurin osa yhdistelmä-DNA tekniikan avulla tuotetuista proteiineista on heterologisia rekombinanttiproteiineja, mutta homologisia proteiineja tuotetaan myös silloin, kun niiden tuottaminen on osoittautunut riittäväksi jo luontaisesti tuotettuna, tai proteiinin tuottaminen on jostain syystä osoittautunut erittäin hankalaksi vierasta organismia käyttäen. Tällainen tilanne voi olla esimerkiksi silloin, kun tuotettava proteiini ei vieraassa organismissa muodostu oikein, eikä näin ollen omaa haluttua biologista aktiivisuutta, tai jos vierasperäisen proteiinin tuottaminen osoittautuu liian myrkylliseksi tuottamiseen käytetylle vieraalle organismille. Homologisesta rekombinanttiproteiinista voidaan puhua esimerkiksi silloin, kun proteiinituoton parantamiseksi organismiin viedään yhdistelmä-DNA tekniikan avulla useampia kopioita sen luontaisesti tuottuvan proteiinin ilmentymiseen vaikuttavasta geenistä. (Aittomäki ym.,2002, s.58-60; Walsh, 2002, s.58; Walsh, 2014, s.65-68)

T. reesei:llä pystytään tuottamaan teollisuusentsyymejä edullisia ja helposti saatavilla olevia raaka-aineita käyttäen teollisen tuotantomittakaavan ollessa jopa yli 100 m³ ilman tuottavuuden merkittävää heikentymistä. Se pystyy tuottamaan luontaisesti suuria määriä sellulaaseja, ja erilaisten kantojen on raportoitu pystyvän tuottamaan kasvualustaan entsyymejä 40-100 g/l pitoisuuksina. Kuvassa 7 on esitetty *T. reesei*:n osuus entsyymituotteiden valmistajien ja formuloijien yhdistyksen (AMFEP) rekisteröityjen teknisten entsyymivalmisteiden tuottamiseen käytetyistä tuotto-organismeista vuonna 2014. *T. reesei* omaa esimerkiksi luontaisesti hyvin vahvan *cbh1* promoottorin, joka ohjaa pääsellulaasi sellobiohydraasi I (CBH I) entsyymien koodaamisesta vastaavan geenin ilmentymistä (ekspressoituminen). Kyseistä promoottoria hyödyntämällä erityskapasiteettia voidaan

ohjata kohti tiettyjä haluttuja entsyymejä. Lisäksi kannoista voidaan myös geenejä poistamalla saada erilaisia ei-toivottuja sivuaktiivisuuksia poistettua. Yksitumaisten itiöiden ansiosta kantojen kloonien ylläpito sekä kloonien seulonta uudistamista varten on mahdollista suorittaa luotettavasti. Taulukossa 1 on esitetty eri lähteistä koottuja esimerkkejä *T. reesei*:n käytöstä tuotto-organismina erilaisten entsyymien tai proteiinien osalta. Ne voivat olla homologisia eli luontaisesti tuottuvia, mutta myös heterologisia tai homologisia rekombinanttiproteiineja. Erilaisia *T. reesei*:llä tuotettuja heterologisia proteiineja on esitelty esimerkiksi julkaisussa Nevalainen & Peterson (2014). (Gryshyna ym., 2016, s. 444-445; Paloheimo ym., 2016, s.28-34)



Kuva 7. *T. reesei*:n prosentuaalinen osuus rekisteröityjen teknisten entsyymivalmisteiden tuottamiseen käytetyistä tuotto-organismeista vuonna 2014 (Bischof ym., 2016, s.3). Osuudet eivät kuvaa tuotantomääriä tai markkinaosuuksia.

Taulukko 1. Tuotettuja entsyymejä *T. reesei* -hometta käyttäen eri sovellusalueiden mukaan eri lähteistä koottuna.

Entsyymityyppi / proteiini	Vuonna 2015 AMFEP rekisteröity kaupalli- nen entsyymi eri so- vellusalueiden osalta			Esimerkkejä <i>T. reesei</i> tuotto-organismina erilaisten tuotettujen entsyymien tai proteiinien osalta sekä niiden käyttökohteista	Lähde
	Ruoka	Rehu	Tekninen		
α -Amylaasi (EC 3.2.1.1)	x	x	x	Tärkkelyksen prosessointi (fermentoitavia sokereita tärkkelyk- sestä); valmistuksen apuaine esimerkiksi oluen (pääasiassa mäskäyksessä) ja alkoholin valmistuksessa (esikäsittely, nes- teytys, sakkarifikaatio) tärkkelyspitoisten substraattien konver- toimiseksi fermentoitaviksi sokereiksi	Paloheimo ym. (2016); Application A1195 (2019)
Sellulaasi/ β -1,4-endo- glukanaasi (EC 3.2.1.4)	x	x	x	Tekstiilit (värien haalentaminen, biologinen viimeistely); alko- holi- ja muiden juomien valmistus (beetaglukaanin entsyymat- tinen pilkkominen, tärkkelyksen ja gluteenin parempi erotus)	Paloheimo ym. (2016); GRAS Notice No. 756 (2018)
Endo-1,3(4)- β -gluka- naasi (EC 3.2.1.6)	x	x	x	Oluen valmistus (suodatuksen tehostaminen, viskositeetin laskeminen); 2-sukupolven biopolttoaineet (fermentoitavia so- kereita lignoselluloosasta); rehut (ravintoaineiden vapauttami- nen, prebioottinen vaikutus); pesuaineet (kuitujen hoito, har- mautumisen esto); sellu- ja paperiteollisuus (energiasäästöt jauhatuksessa)	Paloheimo ym. (2016)
Glukoamylaasi (EC 3.2.1.3)	x		x	Tärkkelyksen hajottaminen glukoosiksi; maissisiirapin (HFCS) valmistus; 1-sukupolven biopolttoaineet; maitohapon valmis- tus; oluen- ja alkoholijuomien valmistus	GRAS Notice No. 372 (2011); Paloheimo ym. (2016)

Taulukko 1 (jatkuu)

Ruoka Rehu Tekninen					
α -Glukosidaasi (EC 3.2.1.20)	x			Valmistuksen apuaine natriumglutamaatin; orgaanisten happojen ja alkoholin (ei-fermentoitavien sokereiden hajotus) valmistuksessa; isomalto-oligosakkaridisiirapin ja makeutusainesten valmistus tärkkelyksestä	Application A1169 (2018)
β -Glukosidaasi (EC 3.2.1.21)		x		2-sukupolven bioetanoli (sellobioosin sello-oligosakkaridien hajotus glukosiksi); viinien valmistus (aromaattisten yhdisteiden vapautuminen); glykolipidien hajotus	Do Vale ym. (2014); Ferreira ym. (2014); Singh, G ym. (2016)
Lakkaasi (EC 1.10.3.2)		x		Tekstiilit (valkaisu); ligniinin hajotus; erilaisten yhdisteiden hajoaminen	Paloheimo ym. (2016)
Endo-1,4- β -mannanaasi (EC 3.2.1.78)		x	x	Hemiselluloosan hajotus (mannaasin hajotus); mehujen ja vihannesten prosessointi (esimerkiksi ananas, mikä sisältää suhteessa runsaasti mannaania); pikakahvin valmistus (viskositeetin alentaminen valmistuksessa yhdessä pektinaasien ja sellulaasien kanssa, uutto-prosessin parantaminen); siemenöljyjen uutto ja prosessointi (soluseinien hajotus mannaanin ja sellulaasien yhteisvaikutuksesta)	Kunamneni ym. (2014); GRAS Notice No. 566. (2015)
Pektiinilyaasi (EC 4.2.2.10)	x	x	x	Hedelmien ja vihannesten prosessointi (pektiinin hajotus yhdessä muiden entsyymien kanssa); mehujen kirkastus; viskositeetin alentaminen	GRAS Notice No. 32 (1999); GRAS Notice No.557. (2014)
Pektiinieraasi (EC 3.1.1.11)	x	x	x	Hedelmien ja vihannesten prosessointi (pektiinin hajotus yhdessä muiden entsyymien kanssa); viinin valmistus; viljojen käsittely; kahvin valmistus; viskositeetin alentaminen; saantojen parantaminen	GRAS Notice No.557. (2014); GRAS Notice No. 558 (2014)

Taulukko 1 (jatkuu)

	Ruoka	Rehu	Tekninen		
Pektinaasi (EC 3.2.1.15)	x	x	x	Hedelmien ja vihannesten prosessointi (pektiinin hajotus yhdessä muiden entsyymien kanssa); viinin valmistus (maseeroinnin saannon parantaminen); viljojen käsittely; kahvin valmistus; mehujen kirkastaminen; viskositeetin alentaminen; saantojen parantaminen	GRAS Notice No.557. (2014); Paloheimo ym. (2016); Gudynaite-Savitch & White (2016)
Fosfolipaasi A2 (EC 3.1.1.4)	x	x	x	Sellu- ja paperiteollisuus (öljyjen degumming); vehnäperäisen glukoosisiirapin valmistus	Paloheimo ym. (2016)
Fosfolipaasi B (EC 3.1.1.5)	x	x		Sellu- ja paperiteollisuus (öljyjen degumming); vehnäperäisen glukoosisiirapin valmistus; vehnä- ja maissitärkkelyksen käsittelyominaisuuksien parantaminen	Paloheimo ym. (2016); GRAS Notice No. 653
Fytaasi (EC 3.1.3.26)	x	x	x	Rehut (fosforin vapauttaminen fytaattihaposta); käyttö tislattujen alkoholijuomien valmistusprosesseissa	Paloheimo ym. (2016); EFSA Journal 2019;17(10):5826
Proteaasit (EC 3.4.2x.xx)	x		x	Pesuaineet (proteiinitahrojen poisto); lihan mureuttaminen; eläin- ja kasviperäisten proteiinien hydrolysointi (EC 3.4.21.65); kymosiinin (EC 3.4.23.4) käyttö heran erotukseen	Paloheimo ym. (2016); Gudynaite-Savitch & White (2016); GRAS Notice No. 817 (2018); GRAS Notice No. 230 (2007)
Ksylanaasi (EC 3.2.1.8)	x	x	x	Leivonta (leivän tilavuuden kasvattaminen, parempi taikinan käsiteltävyys, veden poisto pastasta); rehut (ravintoaineiden vapauttaminen, prebioottinen vaikutus); sellu- ja paperiteollisuus (sulfaattimassan valkaisuun parantaminen); monet ruokateollisuuden sovellukset, joissa tarvitaan kasviperäisen raaka-aineen hajoamista; hemiselluloosan hajotus (ksylo-oligomeereiksi)	Paloheimo ym. (2016); Gudynaite-Savitch & White (2016); GRAS Notice No. 628 (2016); GRAS Notice No. 675 (2016); EFSA Journal 2021;19(4):6539

Taulukko 1 (jatkuu)

Sellobiohydraasi I ja II (EC 3.2.1.91)	Ei AMFEP* rekisteröity vuonna 2015	2-sukupolven bioetanoli (selluloosan hajotus oligosakkariideiksi kuten esimerkiksi sellobioosiksi); valmistuksen apuaine ruokasovelluksissa	Saloheimo ym. (2014); Ferreira ym. (2014); GRAS Notice No. 891 (2019)
β -Ksylosidaasi (EC 3.2.1.37)	Ei AMFEP* rekisteröity vuonna 2015	Hemiselluloosan hajotus (ksylo-oligomeerin hajotus ksyloosiksi)	Gomes, E ym. (2016); Kunamneni ym. (2014)
Glukoosioksidaasi (EC 1.1.3.4)	Ei AMFEP* rekisteröity vuonna 2015	Glukoosin tai hapen poistaminen esimerkiksi erilaisista ruoka- tuotteista	GRAS Notice No. 707 (2017)
α -Arabinofuranosidaasi (EC 3.2.1.55)	Ei AMFEP* rekisteröity vuonna 2015	Hemiselluloosan hajotus (ksytaanin hajotus); ksytaanin hajotus esimerkiksi eri viljojen jyivistä niiden erottamiseksi alkioksi, tärkkelykseksi, gluteeniksi ja kuiduiksi	GRAS Notice No. 680 (2016)
α -Glukosidaasi (EC 3.2.1.20) + transgluko- sidaasi (EC 2.4.1.24) yhteisvalmiste	Ei AMFEP* rekisteröity vuonna 2015	Alkoholijuomat; orgaanisten happojen muodostaminen; natriumglutamaatin valmistus; isomalto-oligosakkaridisiirapin valmistus	GRAS Notice No. 703 (2017)
Trehalaasi (EC 3.2.1.28)	Ei AMFEP* rekisteröity vuonna 2015	Valmistuksen apuaine alkoholijuomien, orgaanisten happojen, natriumglutamaatin valmistuksessa (trehaloosin hajottaminen glukoosiksi)	GRAS Notice No. 727 (2017)
Lipaasi (EC 3.1.1.3)	Ei AMFEP* rekisteröity vuonna 2015	Leivonta (taikinoiden käsittelyn ja ominaisuuksien parantaminen); valmistuksen apuaine erilaisissa ruoka- ja rehusovelluksissa ja alkoholijuomien valmistuksessa.	GRAS Notice No. 631. (2016); GRAS Notice No. 808 (2018)

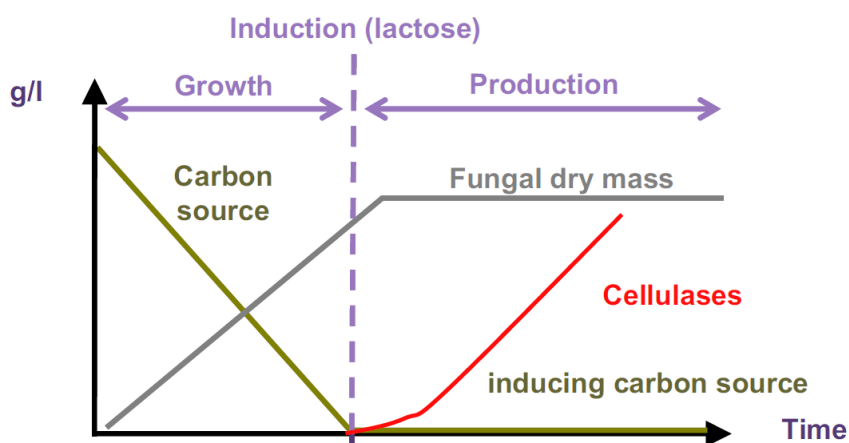
Taulukko 1 (jatkuu)

Lysotsyymi / murami- daasi (EC 3.2.1.17)	Ei AMFEP* rekisteröity vuonna 2015	Valmistuksen apuaine esimerkiksi ksantaani- ja gellaanikumin sekä hiivauutteen valmistuksessa poistamaan solujäänteitä (bakteerien soluseinän peptidoglykaanin hajotus); rehujen li- säaine	GRAS Notice No. 853 (2019); EFSA Journal 2018;16(7):5342
Sellulaasi yhteisval- miste: Sellobiohydro- laasi I (EC 3.2.1.176) + β-Glukosidaasi (EC 3.2.1.21) + Endoglukanaasi I (EC 3.2.1.4)	Ei AMFEP* rekisteröity vuonna 2015	Hedelmien ja vihannesten prosessointi; viinien prosessointi; täkkelyksen ja viljan prosessointi; oluen ja viljapohjaisten juo- mien valmistusprosessi; alkoholin valmistusprosessi; polttoai- neiden valmistusprosessi	GRAS Notice No. 891 (2019)
Transglukosidaasi (EC 2.4.1.24)	Ei AMFEP* rekisteröity vuonna 2015	Isomalto-oligosakkaridisiirappien valmistus täkkelyksestä; al- koholin valmitus melassista (ei-fermentointavien sokereiden pilkkominen)	GRAS Notice No. 315. (2010).
β-laktoglobuliini (ei entsymaattista vaiku- tusta)	Ei entsyymivalmiste	Ei-eläinperäinen heraproteiini elintarvikekäyttöön	GRAS Notice No. 863 (2019)

T. reesei:n käyttö tuotto-organismia elintarvikkeiksi kelpaavien proteiinien osalta on myös noussut viimeisten vuosien aikana esiin muun muassa lehmän maitoa korvaavien tuotteiden valmistuksessa. Esimerkiksi yhdysvaltalainen startup-yritys Perfect Day on onnistunut tuottamaan yhtä heran sisältämistä proteiineista, β -laktoglobuliinia, geneettisesti muunneltua *T. reesei* kantaa hyödyntäen. Tämä *T. reesei*:tä hyödyntäen tuotettu elintarvikekäyttöön tarkoitettu rekombinanttiproteiini on saanut Yhdysvalloissa FDA:n hyväksynnän vuonna 2019 (GRAS Notice No. 863). Kyseessä on kuitenkin uuselintarvike ja kirjoitushetkellä sillä ei ollut käyttö- tai myyntilupaa esimerkiksi EU:n alueella. Myös Teknologian tutkimuskeskus VTT on kertonut onnistuneensa tuottamaan rekombinanttiproteiiniina β -laktoglobuliinia sekä kananmunaproteiini ovalbumiinia geenimuunneltuja *T. reesei* kantoja hyödyntäen. (Ercili-Cura & Barth, 2020, kappale 3.1.2; Nordlund, 2019, s.27)

3.2 Tuotto- prosessit

T. reesei:n osalta erilaisten tuotto-protokollien ja -prosessien kehitys alkoi aktiivisesti jo 1980-luvulla. Yksi perinteisistä panosprosesseista oli käyttää lignoselluloosaa sisältäviä raaka-aineita kuten esimerkiksi puhdasta selluloosaa. Selluloosa ei kuitenkaan ole veden liukeneva raaka-aine, ja sen käytön osalta yhdeksi ongelmaksi muodostui korkea viskositeetti suurempina pitoisuuksina, mikä esti prosessin skaalaamisen teolliseen käyttöön. Viskositeettiongelman ratkaisuksi pyrittiin kehittämään panosyöttöprosesseja, joissa syötettävä kiintoainepitoinen raaka-aine steriloidaan erikseen bioreaktoreissa, mutta tämäkään lähestymistapa ei saavuttanut teollista mittakaavaa. Lisäksi jatkuvatoimisia prosesseja on käytetty fysiologisiin tutkimuksiin ja teollisten prosessien optimointiin. (Ferreira ym., 2014, s.248-249; Paloheimo ym., 2016, s.30) Esimerkiksi Bailey & Tähtiharju (2003) esittelivät laktoosia hyödyntävän jatkuvatoimisen tuotto- prosessin, jossa substraatin, eli tässä tapauksessa laktoosin, syöttönopeuden säätö tapahtuu automaattisesti kasvatuksen emäskulutuksen mukaisesti. Lisäksi julkaisussa todettiin vastaavan säätömekanismin toimivan myös panosyöttökasvatuksen (fed-batch) kanssa. Kuvassa 8 on esitetty laktoosin käyttöön perustuvan panosyöttökasvatuksen periaate. Lisäksi esimerkiksi pH:lla ja kasvatuslämpötilalla on selkeä vaikutus entsyymien tuottoon ja *T. reesei*:n osalta optimilämpötilan on tutkimusten mukaan todettu olevan 28 °C. (Bazafkan ym., 2014, s.295-296) Tutkimuksessaan Bailey ym. (1993) totesivat Rut-C30 kantaa käyttäen alhaisemman pH:n soveltuvan paremmin sellulaasien tuottoon, mutta havaitsivat vastaavasti korkeamman pH:n parantavan puolestaan ksylanaasien tuottoa.



Kuva 8. Havainnekuva *T. reesei*:n panossyöttökasvatuksen periaatteesta sellulolyttisten entsyymien tuottamiseksi käyttäen laktoosia indusorina. (Ferreira ym., 2014, s.254)

Sellulaasien tuotto-prosessien kustannuksiin vaikuttavat esimerkiksi käytettävät tuotantoprotokollat, tarvittavat alustakomponentit ja raaka-aineet, sekä tuotantokantojen ominaisuudet. Prosessissa saavutettavalla tuottavuudella (g tuotetta/litra/tunti) on yhteys esimerkiksi prosessin pääomakustannuksiin, sillä se määrittää muun muassa tarvittavan tuotantoreaktorin koon ja tarvittavan ajan, jossa saavutetaan haluttu määrä tuotetta. Saannolla (g tuotetta/g substraattia) sekä saavutettavalla tuotteen pitoisuudella (g tuotetta/l) on puolestaan yhteys prosessin operointikustannuksiin, sillä ne määrittävät esimerkiksi tarvittavan substraatin määrän ja siitä muodostuvan kustannuksen suhteessa muodostuvaan määrään itse tuotetta, sekä vaikuttavat tarvittaviin jälkikäsitteilyihin. Operointikustannuksiin vaikuttavat myös prosessissa käytettävän tuottokannan tarvitsema hapen määrä ja reaktorin hapensiirtokyky. Nämä vaikuttavat puolestaan prosessin pääoma- ja operointikustannuksiin, sillä ne määrittävät esimerkiksi reaktorilta vaadittavan sekoitustehon lisäksi myös energiankulutuksen hapensiirron osalta itse prosessissa. *T. reesei* vaatii kasvaakseen happea (aerobinen home) joten on tärkeää, että prosessin hapensiirto on tarpeeksi tehokasta. Sen filamenttisuus voi johtaa varsin viskooseihin kasvatusliuoksiin, mikä tekee ilmastuksesta hankalaa. Tämä vaikuttaa merkittävästi myös prosessin operointikustannuksiin esimerkiksi sekoitukseen tarvittavan energiamäärään osalta. (Ferreira ym., 2014, s.249)

T. reesei:n kasvualustaan luontaisesti tuottamien proteaasien on todettu olevan yksi heterologisten proteiinien stabiilisuutta, tuottoa sekä saantoa selvästi heikentävä tekijä. (Nevalainen & Peterson, 2014, s. 94; Paloheimo ym., 2016, s.35; Saloheimo ym., 2014, s.83) Proteaasien tarkoituksena on esimerkiksi hajottaa erilaisia proteiineja, jotta

organismi voi hyödyntää niitä edelleen typpilähteenä biomassan kasvua varten, etenkin silloin kun olosuhteet ovat typpirajoitteiset (Sun ym., 2021, s.129; Qian ym., 2019, s.2). *T. reesei:n* osalta proteaasien tuottamisesta vastaavia geenejä onkin pyritty tunnistamaan, ja erilaisten kantojen selektiomenetelmien avulla sekä kantoja geneettisesti muuntelemalla luontaisesti tuottuvien proteaasien erittymistä on saatu vähennettyä merkittävästi. Tällä tavoin on saatu muodostettua esimerkiksi sellulaaseja paremmin tuottavia kantoja. Lisäksi käytettäviä raaka-aineita optimoimalla ja oikeilla kasvatusolosuhteilla proteaasien tuottoa saadaan vähennettyä tai estettyä. (Paloheimo ym., 2016, s.35; Sun ym., 2021, s.123-124)

Qian ym. (2019) havaitsivat tutkimuksessaan maissin liuotusnestettä typpilähteenä käyttäessään selvästi suurempina määrinä tuottuneita proteaaseja kasvatuksien lopussa verrattuna ammoniumsulfaatilla kasvatettuihin kokeisiin. Tämän epäiltiin johtuvan proteaasien mahdollisesti indusoimisesta maissin liuotusnesteen sisältämien komponenttien ansiosta etenkin kasvatuksen myöhemmässä vaiheessa, jolloin helposti saatavilla olevat typenlähteet on jo mahdollisesti käytetty loppuun. Tutkimuksessaan Qian ym. (2019) saivat muodostettua erityisen geneettisesti muunnellun *T. reesei:n* kannan, josta proteaasien tuottumista oli saatu vähennettyä huomattavasti maissin liuotusnestettä käytettäessä. Sun ym. (2021) selvittivät tutkimuksessaan hiilenlähteenä joko glukoosia tai laktoosia käyttäen erilaisten typpilähteiden vaikutusta solunulkoisten proteaasien tuottumiseen. Tuloksissa havaittiin eroja käytetyn hiilenlähteen ja typpilähteen välillä, ja orgaanisen typpilähteen todettiin vaikuttavan selvästi proteaasien tuottumiseen lisäävästi. Tutkimuksessa typpirajoitteisuudella arveltiin olevan merkittävämpi rooli proteaasien tuottamisessa hiilirajoitteisuuden sijaan.

3.2.1 Pääasialliset raaka-aineet

Luonnollisissa oloissa *T. reesei* erittää sellulaaseja konvertoidakseen selluloosaa glukoosiksi, mitkä organismi käyttää energia- ja hiililähteenä. Perinteisillä kannoilla esimerkiksi glukoosin, sakkaroosin ja fruktoosin aiheuttaman katabolisen repressioon tiedetään estävän sellulaasien tehokkaan tuotannon ja suosivan biomassan kasvua. Teollisissa kannoissa tämä toiminta on saatu vaimennettua huomattavasti kantojen kehityksen avulla, mutta siltikin sellulaasien tuotto on pysynyt pitkään heikkona yksinkertaisten sokereiden läsnä ollessa. Tehokkaan tuottoprosessiin tulisikin sisällyttää tarpeeksi tehokas indusori, sekä riittävän alhaisen määrän repressiota aiheuttavia yksinkertaisia sokereita.

(Aro, 2003, s. 15-16; Ellilä ym., 2017, s.2-4; Ferreira ym., 2014, s.248-249) Sakkaroosia sisältävien raaka-aineiden osalta on huomioitava, että *Trichoderma reesei* ei luonnostaan kykene tuottamaan esimerkiksi sakkaroosin pilkkomiseen tarvittavaa invertaasientsyymiä, mutta tämä voidaan ratkaista yhdistelmä DNA-tekniikan avulla lisäämällä kantaan invertaasi esimerkiksi *Aspergillus niger* -organismista. (Ellilä ym., 2017, s.2-4; Paloheimo ym., 2016, s.34)

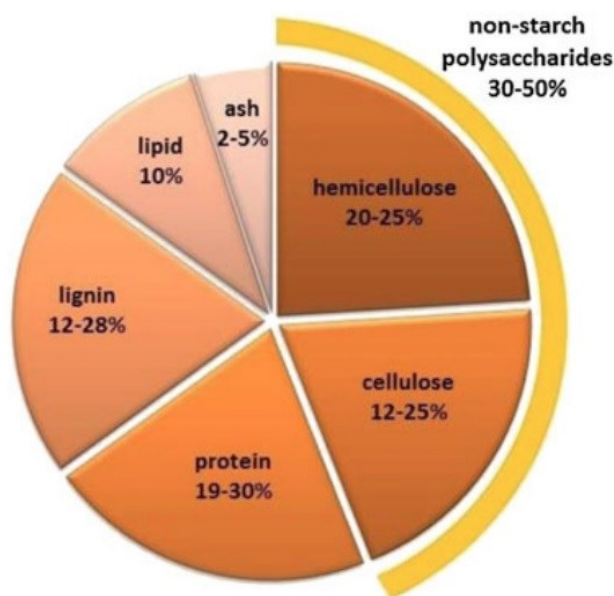
Tutkimusten tavoitteena on pitkään ollut löytää riittävän liukoisia ja kustannustehokkaita entsyymituottoa aktivoivia, eli indusoivia yhdisteitä, indusoreita. *T. reesei*:n sellulaasien geenien ekspressoitumisen osalta indusoiva vaikutus on selluloosan lisäksi todettu esimerkiksi laktoosin, soforoosin, sellobioosin, β -glukaanin, ksylaanin, L-sorboosin, L-arabitolin ja ksylobioosin, laminaribioosin ja gentiobioosin osalta (Aro, 2003, s. 15-16; Bazfkan ym., 2014, s.292-294; Ilmen ym., 1997, s.1304; Paloheimo ym., 2016, s.30; Ramoni ym., 2016, s. 11) Bailey ym. (1993) kuitenkin totesivat tutkimuksessaan sellulaasien tuoton olevan varsin heikkoa esimerkiksi ksylaanin osalta. *T. reesei* kykenee hyödyntämään esimerkiksi glyserolia ja sorbitolia kasvua varten, mutta tutkimusten mukaan niiden ei ole todettu muodostavan indusoivaa vaikutusta sellulaasien geenien ekspressoitumisen osalta. Glyserolin ja sorbitolin ei ole myöskään todettu estävän sellulaasien geenien ekspressoitumista muun indusoivan yhdisteen (esimerkiksi soforoosi) läsnä ollessa. (Aro, 2003, s. 15)

T. reesei:n hemisellulaasien geenien ekspressoitumisen osalta indusoiva vaikutus on puolestaan todettu esimerkiksi ksylaanin, selluloosan, soforoosin, ksylobioosin ja L-arabitolin osalta. (Aro, 2003, s. 20) Tutkimusten mukaan ksyloosin osalta sellulaasien aiheuttama geenien ekspressoitumista ei ole havaittu, mutta hemisellulaasien kuten ksylanaasien geenien ekspressoitumisen osalta sopivaksi indusoinnin aiheuttavaksi pitoisuudeksi ksyloosin osalta on raportoitu olevan noin 10 g/l. (Mach-Aigner ym., 2010, s.1775) Mach-Aigner ym. (2010) toivat tutkimuksessaan esiin ksyloosin pitoisuuden olevan yhteydessä indusoinnin voimakkuuteen siten, että selvästi pienempien pitoisuuksien todettiin ekspressoivan ksylanaasien tuottumista suurempia ksyloosipitoisuuksia paremmin. Toisessa tutkimuksessaan Mach-Aigner ym. (2011) eivät havainneet ksylitolin aiheuttamaa indusoivaa vaikutusta ksylanaasien osalta, ja samalla esittivät tulosten perusteella hypoteesin, jossa ksylanaasien ekspressio liittyisi L-arabitoliiin.

Laktoosin indusoiva vaikutus havaittiin jo 60-luvulla, mutta sen potentiaalinen käyttökelpoisuus raaka-aineena nousi esiin vasta myöhemmin tuottoprotokollien kehittymisen myötä. Laktoosin käytön osalta heikkoutena on sen alhainen liukoisuus (25 %), minkä

takia sen käyttö syöttöliuoksena voi osoittautua haasteelliseksi tavoiteltaessa korkeita tuottopitoisuuksia (Paloheimo ym., 2016, s.30). Vaikka disakkaridit kuten sellobioosi ja soforoosi ovat havaittu tehokkaiksi indusoreiksi, niiden oletetaan olevan kuitenkin liian kalliita teolliseen käyttöön. (Bazafkan ym., 2014, s.292-294; Ferreira ym., 2014, s.248-249) Soforoosin voimakkaan indusoivan vaikutuksen myötä sen valmistaminen esimerkiksi glukosista transglykosylaatioreaktion avulla on patentoitu (US 7713725B2, 2010) erityisellä menetelmällä käyttäen *T. reesei*:llä tuotettua entsyymiseosta, ja muodostettua soforoosia sisältävää liuosta voidaan hyödyntää edelleen entsyymien tuottamisessa.

Edellä mainittujen entsyymituottoa indusoivien ja ei-indusoivien raaka-aineiden lisäksi *T. reesei*:n entsyymien tuotossa voidaan hyödyntää myös erilaisia kompleksisia raaka-aineita kuten esimerkiksi rankkia (spent grain). (Saloheimo ym., 2012, s. 47) Rankilla tarkoitetaan pääasiassa etanolin fermentointiprosessin valmistuksessa muodostuvan tislauksen pohjatuotetta, ja sitä voidaan käyttää yleisesti ravinteena mikrobikasvatuksissa myös typpilähteenä sekä hivenainelähteenä. (Aittomäki ym., 2002, s.429) Etanolin fermentointiprosessin valmistuksessa sivutuotteena muodostuva rankki (distiller's dried grains with solubles, DDGS) on yleensä joko maissi- tai vehnäpohjaista sisältäen lisäksi selluloosaa ja hemiselluloosaa vaihtelevissa määrin riippuen käytetystä prosessista. (Iram ym., 2020, s. 6119; Villegas-Torres ym., 2015, s. 607) Lisäksi panimoprosessien sivutuotteena muodostuva ohrapohjainen rankki (brewer's spent grain, BSG), eli mäski, soveltuu selluloosaa ja hemiselluloosaa sisältävänä raaka-aineena hyvin *T. reesei*:n entsyymien tuottoon, mutta sen koostumus vaihtelee usein eri panimoprosessien mukaan. Kuvassa 9 on esitetty esimerkki panimomäskin sisältämästä koostumuksesta ja niiden vaihteluista. (Lynch ym., 2016, s. 553-555) Erilaiset rankit sisältävät usein myös ligniiniä, mutta tutkimusten mukaan *T. reesei* ei kykenisi luontaisesti hajottamaan ligniiniä kokonaisuudessaan. (Ellilä ym., 2017, s. 3; Saloheimo ym., 2012, s 47; Wilson 2012, s. 2) Toisaalta, Adav ym. (2012) selvittivät tutkimuksessaan *T. reesei*:n ravistelupullokasvatuksissa tuottamia entsyymejä käyttäen hiilenlähteenä, eli pääraaka-aineena, joko selluloosaa, sahajauhoja tai maissin korjuujäännöstä, ja löysivät analyysien perusteella myös ligniiniä hajottavia entsyymejä.



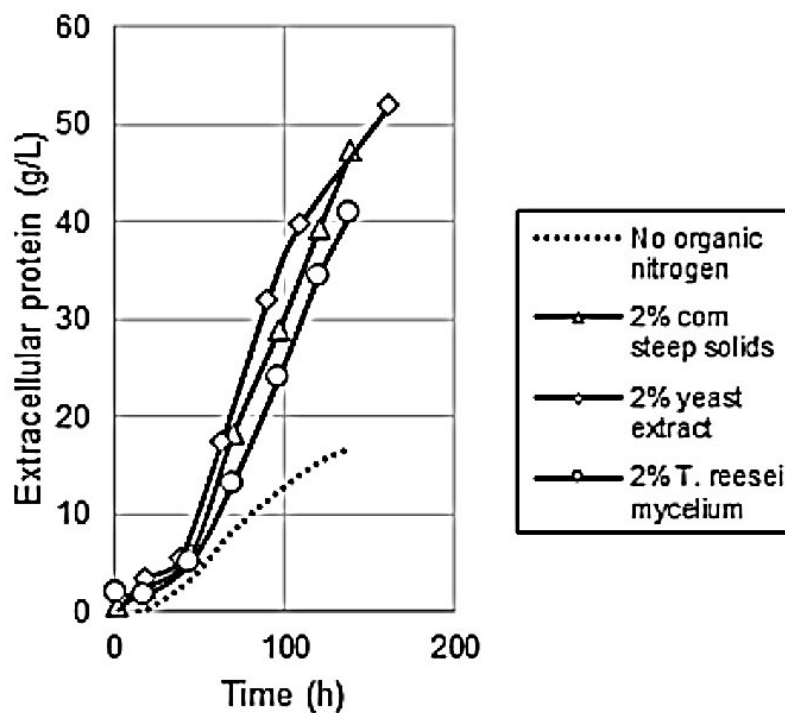
Kuva 9. Panimomäskin pääasiallinen koostumus. (Lynch ym., 2016, s. 555)

Muita potentiaalisista *T. reesei*:n entsyymituottoon soveltuvia raaka-aineita on esitelty esimerkiksi julkaisussa Ellilä ym. (2017), jossa esitetyt arviot mahdollisista soveltuvista raaka-aineista niiden riittävän saatavuus ja hinta huomioiden olivat soijan kuoret (soybean hulls), sokeriruo'on puristejäte (sugarcane bagasse), sokeriruo'on olki (sugarcane straw). Lisäksi arviot raaka-aineiksi soveltuvista, mutta alhaisemman saatavuuden ja korkeamman hinnan osalta edellä mainittuihin verrattuna, olivat esimerkiksi hera (milk whey), puuvillasiemenkuitujäten (cotton linter) sekä eukalyptuspuun massa (eucalyptus pulp).

3.2.2 Typpilähteet

Filamenttihomeilla kompleksisia typenlähteitä, kuten esimerkiksi maissin liuotusnestettä (CSL, corn steep liquor) ja hiivauutetta voidaan käyttää orgaanisen typenlähteenä tehostamaan solukasvua. (Qian ym., 2019, s.4) Rodrigues ym. (2013) selvittivät ammoniumsulfaatin, soijapeptonin sekä eräiden aminohappojen vaikutusta kasvuun ja totesivat ammoniumsulfaatin olevan riittävä typenlähde solukasvuun ja sellulaasien tuottamiseksi. Ellilä ym. (2017) selvittivät tutkimuksessaan entsyymien tuottoa ravistelupulloissa soijan kuoria sekä erilaisia mineraalialustojen yhdistelmiä käyttäen, ja havaitsivat ammoniumsulfaatin poistamisen alustasta vaikuttavan selvästi proteiinien tuottoon heikentävästi.

Lisäksi Ellilä ym. (2018) selvittivät epäorgaanisen ja kompleksisten orgaanisen typenlähteiden vaikutusta glukoosiperusteiseen entsyymien tuottoon erityistä geenimuunneltua *T. reesei* kantaa käyttäen. Selvityksen kohteena olivat epäorgaanisena typenlähteenä käytetty ammoniumsulfaatti ja sen vertaaminen kompleksisiin orgaanisiin typenlähteisiin kuten hiivauute, kuivattu maissin liotusneste (CSS, corn steep solids) sekä *T. reesei*:n myseelistä valmistettu uute. Tulokset on esitetty kuvassa 10, ja niistä voidaan havaita selvästi heikompi tuotto epäorgaanista typpeä sisältäneellä kasvatusalustalla. Tutkimuksissa on myös selvitetty, että esimerkiksi orgaaninen typenlähteenä käytettävä peptoni lisää biomassan kasvua, mutta sillä ei ole havaittu olevan suoraa indusoivaa vaikutusta sellulaasien tuoton osalta. (Ilmen ym., 1997, s.1299) Lisäksi on syytä huomioida, että pH:n säädössä voidaan käyttää ammoniumhydroksidia tuomaan typpeä kasvatusalustaan kasvatuksen aikana (Ellilä ym., 2017, s.3).



Kuva 10. Epäorgaanisen ja kompleksisten orgaanisen typenlähteiden vaikutuksen vertailu glukoosipohjaisen entsyymituottoon osalta. (Ellilä ym., 2018, s.188)

3.2.3 Epäorgaaniset yhdisteet ja hivenaineet

Epäorgaanisten yhdisteiden osalta magnesiumin ja kalsiumin on todettu lisäävän sellulaasien tuottoa, mutta liiallisella magnesiumilla on todettu olevan myös entsyymien tuottoa inhiboiva vaikutus. Hivenaineista rauta, mangaani, koboltti ja sinkki ovat osoittautuneet hyödyllisiksi ja niiden osalta on havaittu myös kompensoivaa ominaisuutta jonkin metalliyhdisteen puuttuessa. Koboltilla on puolestaan havaittu olleen sellulaasien geenien ilmentymistä edistävä vaikutus sen ollessa ainut hivenaine. Koboltin vaikutus sellulaasien geenien ekspressoitumisen osalta vaikuttaisi lisäksi olevan uniikki ominaisuus, eikä vastaavaa ole raportoitu muilla homeilla. Poikkeavan mekanismin arvellaan johtuvan *T. reesei*:n entsyymijärjestelmän adaptoitumisesta kasvien jäännösten korkeampaan kobolttipitoisuuteen Salomonsaarien vulkaanisesta maaperästä johtuen. (Bazafkan ym., 2014, s.296) Ellilä ym. (2017) selvittivät tutkimuksessaan myös epäorgaanisten yhdisteiden ja hivenaineiden vaikutusta proteiinien tuottoon soijan kuorilla mineraalialustalla ravistelupullokasvatuksissa ja havaitsivat, että suurin osa näistä oli poistettavissa ilman merkittävää vaikutusta proteiinien tuottoon. Tosin, tarkasteltaessa soijan kuorien koostumusta julkaisun Piepenbrink ym. (2004, s.1077) perusteella nähdään, että kuoret sisältävät jo itsessään monia *T. reesei*:n mineraalialustan sisältämiä yhdisteitä.

Rikkiyhdisteiden roolia *T.reesei*:n osalta on tutkittu ilmeisesti varsin vähän, mutta jo alkuperäiset kasvatusalustat sellulaasien tuottamiseksi ovat sisältäneet sulfaatteja ja esimerkiksi peptonia tuoden näin epäorgaanisen sekä orgaanisen rikin lähteen kasvualustaan. Rikin saantiin ja aineenvaihduntaan liittyvät prosessit ovat kuitenkin tärkeitä monille organismeille ja rikkiä sisältävät yhdisteet kuten kysteini ja metioniini sekä S-adenosyyli-metioniini ovat osallisina monien proteiinien muodostuksessa. (Bazafkan ym., 2014, s.295; Gremel ym., 2008, s.2) Gremel ym. (2008) havaitsivat tutkimuksessaan sulfaattien saatavuuden ja käytön olevan tärkeää normaalille biomassan kasvulle kasvatettaessa selluloosalla valon läsnä ollessa, mutta vastaavaan yhteyttä ei kuitenkaan havaittu glukoosilla kasvatettaessa. Lisäksi metioniinilla havaittiin olevan myös valosta riippuvainen rooli sellulaasien geenien ekspressoitumisen osalta. Myös Pakula ym. (2016) nostavat tutkimuksessaan kysteiniin ja metioniinin metaboliaan liittyvän roolin esiin sellulaasien tuottoon liittyen. (Gudynaite-Savitch & White, 2016, s.408)

3.3 Glukoosin hyödyntäminen – uudet tutkimustulokset

Uusimpien tutkimusjulkaisujen perusteella kuten Ellilä ym. (2017), Ellilä ym. (2018), Fonseca ym. (2020) sekä tämän työn tuloksista on nähtävissä, että erityisten geneettisesti muunneltujen *T. reesei* kantojen myötä etenkin glukoosin aiheuttamasta voimakkaasta katabolisesta repsessiosta on mahdollista päästä eroon, mikä mahdollistaa entsyymien tuottamisen *T. reesei*:llä myös pääasiassa glukoosia hyödyntäen. Derntl ym. (2013) raportoivat jo lähes 10 vuotta sitten erityisestä pistemutaatiosta Xyr1 geenissä ja havaitsivat, että mutaatio saa aikaan sellulaasien tuottoa glukoosilla. Ellilä ym. (2017) raportoivat selkeästä entsyymien tuottamisesta glukoosilla ravistelupullokasvatuksissa. Lisäksi Ellilä ym. (2018) raportoivat bioreaktoreissa suoritettujen glukoosiperusteisen tuottoprosessin osalta tuotetuksi proteiinipitoisuudeksi 53 g/l noin 90 tunnin kohdalla. Fonseca ym. (2020) puolestaan raportoivat sokeriruokomelassia hyödyntävän prosessin saavuttaneen 80 g/l proteiinipitoisuuden noin 350 tunnin kohdalla. *Trichoderma reesei* -hometta käsittelevissä artikkeleissa ja tutkimuksissa on jo vuosien ajan viitattu Cherry ym. (2003) julkaisuun, jossa kerrotaan saavutettavan proteiinien osalta kasvatusalustaan tuotettuna jopa 100 g/l pitoisuus. Kyseisessä Cherry ym. (2003) julkaisussa ei kuitenkaan kerrota esimerkiksi millaisella prosessilla, tai millä aikavälillä kyseinen pitoisuus on saavutettu. Edellä mainitut julkaisut Ellilä ym. (2018) ja Fonseca ym. (2020) ovatkin mahdollisesti kirjoitushetkellä korkeimmat julkisesti raportoidut tulokset tuotettujen proteiinipitoisuuksien osalta, joissa on myös kerrottu minkälaisia raaka-aineita, prosessia ja kantoja käyttäen näihin tuloksiin on päästy.

Rantasalo ym. (2018) esittelivät tutkimuksessaan Teknologian tutkimuskeskus VTT:n kehittämän SES-järjestelmän (Synthetic Expression System) avulla geneettisesti muunnellun *T. reesei* kannan, ja tuottivat sellobiohydraasi I:tä (CBH I) sellulaaseja indusoidulla laktoosia ja rankkia sisältävällä alustalla, sekä erikseen glukoosia ja hiivauutetta sisältävällä alustalla. Laktoosia ja rankkia sisältävällä alustalla käytetty kanta tuotti useita erilaisia entsyymejä, mutta glukoosia ja hiivauutetta sisältävällä alustalla tuotetut entsyymit olivat pääasiassa sellobiohydraasi I:tä. Vastaavasti isäntäkannalla ei havaittu sellobiohydraasi I:tä glukoosia ja hiivauutetta sisältävällä alustalla kasvatettuna, mikä on tyypillistä perinteisillä kannoilla, joilla on glukoosin aiheuttama katabolinen repessio etenkin sellulaasien tuoton osalta. Lisäksi Rantasalo ym. (2019) esittelivät samaista SES-järjestelmää hyödyntäen geenimuokatun *T. reesei* kannan, jolla onnistuttiin

tuottamaan *Candida antarctica* lipaasi B:tä (CalB) varsin puhtaana käyttäen glukosipohjaista kasvatusalustaa.

3.4 Toisen sukupolven bioetanoli – sellulaasien tuotantokustannukset

Vuonna 2015 sellulolyyttisen bioetanolin vuotuinen tuotantomäärä oli arvioiden mukaan 480,5 miljoonaa litraa, josta noin 80 % (380,5 miljoonaa litraa) olisi tuotettu *T. reesei*:n entsyymiseoksia hyödyntäen (Bischof ym., 2016, s.2), ja vuoden 2019 osalta globaalin bioetanolin tuotantomäärän on arvioitu olleen noin 110 000 miljoonaa litraa (Susmozas ym., 2020). Sharma ym. (2020) tuovat esiin arvion, jonka mukaan vain alle 3 % vuotuisesta tuotetusta bioetanolista olisi tehty 2-sukupolven bioetanoli-prosessia (2G-bioetanoli) hyödyntäen, jossa hyödynnetään lignoselluloosaa sisältävää biomassaa raaka-aineena ja sellulolyyttisiä entsyymejä pilkkomaan näitä raaka-aineita sokereiksi varsinaista etanolifermentointia varten. Biomassaa hydrolysoivien entsyymien tuottaminen toisen sukupolven bioetanolia varten poikkeaa merkittävästi tavanomaisesta teollisuusentsyymien tuotannosta, koska suhteessa isoilla entsyymimäärillä pyritään tuottamaan alhaisen arvon omaavaa tuotetta, etanolia. Jos toisen sukupolven biopolttoaineiden entsyymimarkkinat saadaan kasvuun, siitä voi muodostua yksi suurimmista markkinoista, mikä puolestaan tekisi *T. reesei*:stä johtavan tuotantoalustan (Paloheimo ym., 2016, s.28).

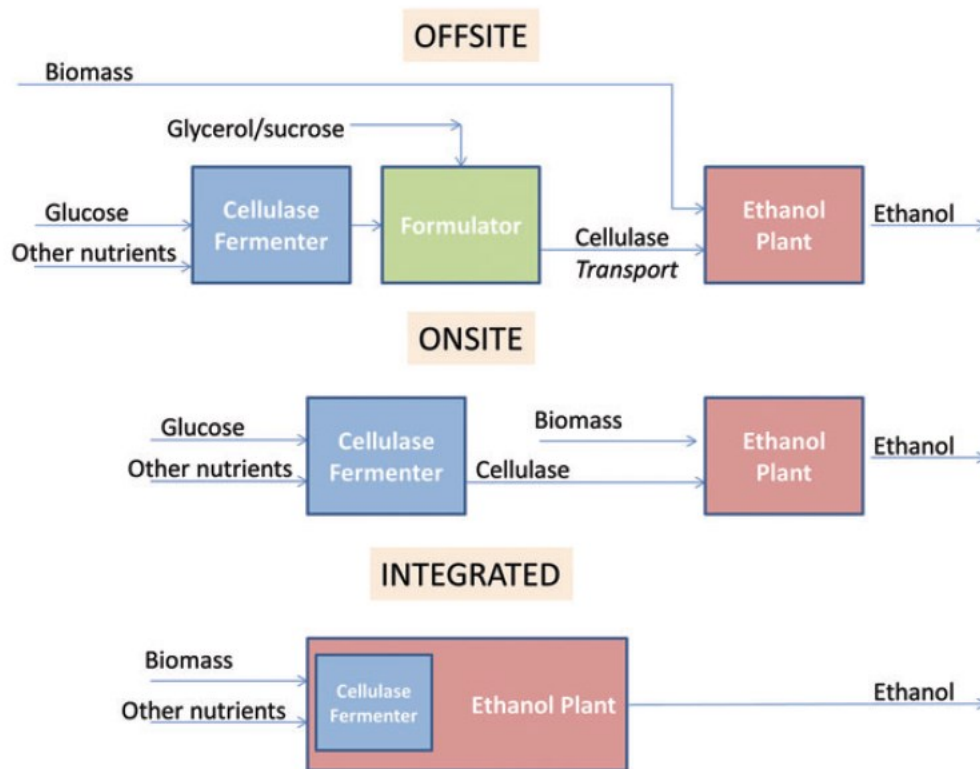
Kannattavan lignoselluloosaperäisen bioetanolit tuotannon osalta merkittävän roolin muodostavat käytettävien entsyymien kustannukset sekä tarvittava entsyymien määrä per tuotettu litra etanolia. Erityisesti lignoselluloosaperäisen etanolin tuotannossa entsyymikustannukset ovat olleet suuria, ja 2000-luvun alussa Yhdysvaltain energiaministeriön (US DOE) arvion mukaan entsyymien osuuden kustannuksista olisi pitänyt olla alle 0,026 €/l¹ (0,12 \$/gallona) etanolia, jotta lignoselluloosaa sisältävistä raaka-aineista tuotettu etanoli olisi kilpailukykyistä (Ferreira ym., 2014, s.257). Vuonna 2005 esitettyjen arvioiden mukaan sellulaasien markkinahinta oli välillä 0,08-0,13 €/l jokaista tuotettua etanolilitraa kohden, ja arvioita entsyymien kustannuksiksi oli raportoitu esimerkiksi 0,06 €/l etanolia, sekä arvioitu tuotantokustannusten laskeneen jopa tasolle 0,03 €/l etanolia. Lisäksi entsyymituottajien mukaan entsyymikustannusten oli arvioitu putoavan jopa tasolle 0,02 €/l

¹Muunnokset €/l ja \$/gallona välillä ovat suuntaa antavia: Muunnoksissa käytettiin arvoa 1,2036 USD\$/€ (<https://www.exchangerates.org.uk/EUR-USD-spot-exchange-rates-history-2021.html> Average exchange rate in June 2021: 1.2036). Inflaation vaikutusta ei ole huomioitu muunnoksissa, mutta vuosien 2000-2020 välillä keskimääräinen vuotuinen inflaatio oli USD, \$ osalta 2,14% sekä € osalta 1,73% (<https://www.inflationtool.com>). Gallona muunnos: 3,785 l/US gallona.

etanolia vuoteen 2012 mennessä (Suokko 2010, s.40-42). Toisaalta vuonna 2007 entsyymien kustannukseksi oli ilmoitettu noin 0,088 €/l (0,4 \$/gallona), mutta kustannusten lasku on silti merkittävä verrattuna vuoden 2001 raportoituun yli 0,66 €/l (3 \$/gallona) tasoon (Osborne 2007, s.6).

Vuonna 2004 Genencor ilmoitti saavuttaneensa kustannusmallin avulla tason, jossa sellulaasien kustannusten osuudeksi oli arvioitu 0,022-0,044 €/l (0,1-0,2 \$/gallona) (Singhania 2011, s.193). Kuitenkin vielä vuonna 2011 suuret entsyymituottajat Novozymes ja Genencor kertoivat entsyymien muodostaman kustannustason olevan todellisuudessa arviolta 0,11 €/l (0,5 \$/gallona) tuotettua etanolia (Humbird ym., 2010, s. 40). Maniatis ym. (2017) kertovat vastaavasti raportissaan Novozymesin ilmoittaneen kustannusarvoksi noin 0,083-0,166 €/l (0,1-0,2 \$/l). Tarkasteltaessa viimeaikaisimpia kirjallisuusläheteitä ja niissä suoritettuja kustannusmallinnuksia, huomataan lignoselluloosaperäisen etanolituoton entsyymikustannuksien olevan erilaisten arvioiden mukaan edelleenkin hyvin vaihtelevia. Esitetyt arviot asettuvat kuitenkin pääasiassa välille 0,022-0,154 €/l (0,1-0,7 \$/gallona) riippuen lähteestä (Ellilä ym., 2018; Gomes ym., 2021; Klein-Marcuscharmer., 2012; Liu ym., 2016; Maniatus ym., 2017; Olofsson ym., 2017). Raportissaan Brown ym. (2020, s. 21) tuovat puolestaan esiin kolme erilaista SGAB:n (Sub-Group on Advanced Biofuels) muodostamaa kustannusarviota lignoselluloosaperäisen bioetanolin tuotantokustannuksista, jossa annettujen lukujen perusteella entsyymien prosentuaaliseksi osuudeksi tuotantoprosessin osalta saadaan noin 15-19 %.

Onkin esitetty arvioita, että pelkästään entsyymituottoa tehostamalla kustannustavoitetta ei pystyttäisi saavuttamaan ja tarvitaan uudenlaisia ratkaisuja. Sen sijaan, että entsyymit hankitaan erikseen tai tuotetaan erillisessä tuotantolaitoksessa (off-site) ja käsitellään sekä kuljetetaan rahtina bioetanolin tuotantolaitokselle, voidaan ratkaisuna arvioida entsyymituotannon siirtämistä bioetanolituotantolaitoksen välittömään läheisyyteen itsenäisenä tuotantoyksikkönä (on-site) toimivaksi, tai entsyymituotannon integroimista toimivaksi suoraan bioetanolituotantoprosessin (integrated) yhteydessä (Ellilä ym., 2017, s.2; Johnson, 2016, s.165). Johnson (2016) mallinsi entsyymikustannuksia kyseisiä prosessityyppejä käyttäen teollisessa mittakaavassa saaden kustannusarvioiksi off-site ratkaisulle 0,171 €/l (0,78 \$/gal), on-site ratkaisulle 0,127 €/l (0,58 \$/gal) ja integroidulle ratkaisulle 0,05 €/l (0,23 \$/gal). Kuvassa 11 on havainnollistettu tarkemmin edellä mainittujen entsyymien tuotantotapojen keskeiset eroavaisuudet bioetanolin tuotantoprosessin osalta.



Kuva 11. Havainnekuva entsyymien tuottotavoista sellulaaseja hyödyntävän bioetanolin tuotantoketjussa. (Johnson 2016, s.165)

Mantis ym. (2017) käsittelivät selvityksessään Johnsonin (2016) tekemää mallinnusta arvioiden edelleen kyseisten vaihtoehtojen kustannuksia. On-site tuotantovaihtoehdolle on esitetty arvioita 23 % (Maniatus ym., 2017, s. 45) ja 30 % (Liu ym., 2021, s.1) laskua entsyymien kustannuksien osalta verrattuna off-site tyyppiseen tuotantoon, ja jopa 70 % säästöä verrattuna erikseen ostettuun entsyymiseokseen (Liu ym., 2021, s.1). Vastavasti integroidun entsyymituotannon osalta muodostui arvio 52 % alhaisemmista kustannuksista entsyymien osalta on-site tuotantoon verrattuna, ja jopa yli 70 % alhaisempia kustannuksia off-site tuotantoon verrattuna, kun huomioidaan kokonaisuudessaan tuotantolaitoksen toiminnasta tulevat kustannukset (Maniatus ym., 2017, s. 45). Lisäksi muita esitettyjä ratkaisuja ovat olleet mm. esikäsitteilyjen parantaminen, tarvittavien entsyymien määrän vähentäminen edelleen parempien entsyymien ja tehokkaamman hydrolyysin myötä, sekä tehokkaammat hiivat ja varsinaisen etanolifermentointiprosessin tehostaminen. (Brown ym., 2020, s.35–36; Ferreira ym., 2014, s.258; Liu ym., 2021, s.1)

Ellilä ym. (2018) arvioivat uudenlaisen glukoosiperusteisen entsyymituottoprosessin kokonaiskustannuksia erityistä geneettisesti muunneltua *T. reesei* kantaa hyödyntäen. Pohjana käytettiin NREL 2011 biojalostamon kustannusmallia (Humbird ym., 2010)

siten, että entsyymien tuotanto tapahtuisi bioetanolilaitoksen luona (on-site) säästätenäin entsyymiliuosten käsittely- ja kuljetuskustannuksissa. Lisäksi mallinnuksessa käytettiin laboratoriomittakaavassa suoritettujen bioreaktorikasvatuskokeiden saatuja tuloksia. Kokeiden perusteella entsyymiseos soveltui hyvin esimerkiksi sokeriruohon olkien (sugarcane straw) sekä maissin korjuujäännösten (corn stover) hydrolysointiin, joita voitaisiin hyödyntää bioetanolin tuotannossa. Saatujen tulosten perusteella mallinnuksen laskennallinen arvio tuottoprosessin saannon osalta oli 0,3 g entsyymiä/g glukoosia, ja prosessin tuottavuudeksi arvioitiin 0,3 g/l/h. Tuottavuuden osalta oli huomioitu mallin mukaisesti kahden vuorokauden tuotantotauko reaktoreiden puhdistamisen ja tuotantoprosessin uudelleenkäynnistyksen osalta. Lopullinen arvio entsyymiseoksen kokonaiskustannuksen osalta tämän mallinnuksen perusteella oli noin 0,052 €/l (0,06 \$/l) tuotettua etanolia. (Ellilä ym., 2018, s. 185-192)

4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

4.1 Kantojen valinta

Työssä käytetyt geneettisesti muunnellut *Trichoderma reesei* -homekannat saatiin käytettäväksi työtä varten Teknologian tutkimuskeskus VTT:n Principal Scientist, tohtori, Nina Arolta. Kyseisiä kantoja kasvatettiin ensimmäistä kertaa bioreaktoreissa, joten niiden mahdollisesta tuottopotentialista ei ollut selvyyttä ennen työn aloitusta. Kannat olivat kuitenkin jo pitkälle geneettisesti muunneltuja siten, että niiden oletettaisiin olevan mahdollisesti hyviä tuottokantoja tuottaen tehokkaan entsyymiseoksen etenkin sellulaasien osalta. Työssä käytettiin neljää erilaista kantaa, joista kaksi edustivat erityistä Xyrmut-kantatyyppiä, jotka on nimetty työssä koodein "Kanta A1" ja "Kanta A2". Toista kantatyyppiä edustivat Xyrmut-kantojen isäntäkannat, jotka on nimetty työssä koodeilla "Kanta B1" ja "Kanta B2". Isäntäkantatyypeistä puuttuivat Xyrmut-kantojen sisältämät erityiset geenimuokkaukset. Pääasiallinen ero kantatyyppien välillä tiedettiin kuitenkin liittyvän Xyrmut-kantojen oletettuun kykyyn tuottaa entsyymejä tehokkaasti myös glukosia sisältävillä alustoilla, kun vastaavasti perinteisempää kantatyyppiä edustavien isäntäkantojen osalta tiedettiin liiallisen glukosin aiheuttaman katabolisen repression estävän entsyymien tuottoa, jolloin tuotto-olosuhteet vaatisivat perinteisemmän indusoivan alustan. Tarkempia tietoja kantojen geneettisistä muunnoksista ei ole kerrottu niiden salassapidettävyyden takia.

4.2 Itiösuspensioiden valmistelu

Kasvatuksia varten jo valmiiksi puhdistetut kannat itiöitettiin alkuperäisistä itiöampulleista uudelleen erillisillä perunadekstroosiagar-maljoilla. Maljojen saavutettua visuaalisesti sopivan itiöimisasteen 4-5 vuorokauden jälkeen, kerättiin itiöitä maljoilta säilytysliuokseen ja säilöttiin itiösuspensiot -80 °C pakkasasteessa myöhempää käyttöä varten. Näin varmistettiin, että kaikki kasvatukset aloitettiin samasta itiöerästä. Itiöampullien varsinaista itiöpitoisuutta ei laskettu, eikä esikasvatuksiin lisättyjen itiöiden määrää näin normalisoitu keskenään, koska tällä ei katsottu olevan merkittävää vaikutusta kasvatuksien tuloksiin muista kasvatusvaiheista johtuen.

4.3 Esikasvatukset

Esikasvatukset suoritettiin ravistelukasvatuksina 250 ml erlenmayer pulloissa. Pulloihin lisättiin 50 ml:aa jokaisen kasvatuksen osalta tiettyä erityistä esikasvatusalustaa ja lisättiin 0,2 ml:aa sulatettua ja hyvin sekoitettua itiösuspensiota. Pulloja inkuboitiin 28 °C lämpötilassa, 200 rpm sekoituksella 48-72 tuntia riippuen kannasta ja käytetystä esikasvatusalustasta. Inkuboinnin jälkeen biomassaa konsentroidtiin 50 ml putkissa sentrifugomalla (3500rpm, 15 minuuttia), jotta myseeli saatiin laskeutumaan putkien pohjalle. Sopiva siirrostustilavuus saavutettiin pipetoimalla tietty määrä nestefaasia pois myseelin päältä. Yhteensä konsentroidun esikasvatuksen tilavuuden osuus oli noin 10-12 % varsinaisen bioreaktorikasvatuksen aloitustilavuudesta siten, että esikasvatuksen siirrostustilavuus sisältyi jo varsinaiseen aloitustilavuuteen. Konsentroidinnilla saavutettiin suurempi aloitusbiomassa tarkoituksena näin saavuttaa bioreaktorikasvatuksien alkuun nopeampi kasvuvaihe. Esikasvatusalustojen tiedot ovat taulukoissa 2 ja 3.

4.4 Transglykosylaatioliuoksen valmistus

Transglykosylaatioliuos valmistettiin glukoosista β -glukosidaasientsyymiä käyttäen yhdistelemällä julkaisuissa Gao ym. (2017) ja Li ym. (2016) esitettyjä valmistustapoja seuraavasti:

Transglykosylaatioliuos tehtiin valmistamalla 420 ml:aa 60 % (paino/tilavuus) glukoosiliuosta 0,05 M sitruunahappopuskuriin, jonka pH oli säädetty arvoon 4,8. Liuokseen lisättiin tämän jälkeen 5000U β -glukosidaasientsyymiä (Sigma G0395) ja inkuboitiin liuosta jatkuvalla sekoituksella 65 °C vesihauteessa 72 tunnin ajan. Tämän jälkeen muodostunut liuos sterilointiin ja entsyymiaktiivisuus inaktivoitiin autoklavoimalla (121 °C, 20 minuuttia). Varsinainen bioreaktorikasvatuksessa käytetty syöttöliuos saatiin yhdistämällä autoklavoitua transglykosylaatioliuosta ja erillistä glukoosiliuosta keskenään.

4.5 Bioreaktorikasvatukset

Työssä suoritettiin yhteensä 12 bioreaktorikasvatusta, joista 6 tehtiin Xyrmut-kantoja käyttäen ja toiset 6 isäntäkantoja käyttäen. Tarkempi erittely suoritetuista kasvatuksista ja niiden tavoitteista on esitetty taulukoissa 2 ja 3. Kaikkia alustakomponentteja tai niiden tarkkoja määriä tai pitoisuuksia ei ole työssä kerrottu niiden salassapidettävyyden takia. Työhön käytettävissä olevien rajattujen resurssien myötä kasvatuksista ei tehty toistokokeita, mikä on huomioitava puuttuvana tekijänä toistettavuuden suhteen.

Bioreaktorikasvatukset suoritettiin Biostat Qplus (Sartorius AG, Saksa, 1 L käyttötilavuus), Biostat B-DCU (Sartorius AG, Saksa, 1,5 L käyttötilavuus) ja Biostat CT2-DCU (B. Braun Biotech International GmbH, Saksa, 2 L käyttötilavuus) bioreaktoreita käyttäen. Kasvatuksien poistokaasut mitattiin jatkuvatoimisesti käyttäen Prima Pro massaspektrometriä (Thermo Scientific, Englanti). Kasvatuksien alustakomponentit ja olosuhteet olivat seuraavat:

- Kasvatuksien eri alustakomponentit on esitetty tarkemmin taulukossa 2 ja 3 sekä liitteessä 1.
- Kasvatustilavuus: 28 °C
- Liuennut happitaso: $\geq 10\text{--}30\%$, cascade-säätö sekoitusnopeuteen (600-1500 rpm) liitettynä.
- Ilmastustasona pidettiin vakioilmastus 0,5 vvm (L ilmaa minuutissa / L kasvatuksen tilavuus) perustuen kasvatuksen aloitustilavuuteen. Kasvatustilavuuden muutosta ei huomioitu ilmastustasoon kasvatuksen aikana. Tarvittaessa ilmastustasoa voitiin nostaa, jos sille katsottiin olevan tarvetta.
- Kasvatuksien pH pidettiin noin 4,5 +/- 0,2 sisällä. Säätöä varten happona käytettiin 15 % fosforihappoliuosta ja emäksenä 12,5 % ammoniumhydroksidiliuosta.
- Kasvatuksien vaahdonestoon käytettiin erityistä vaahdonestoainetta, jota lisättiin suoraan kasvatusalustaan tietty määrä ennen alustan sterilointia, sekä tarvittaessa kasvatuksen aikana.

Taulukko 2. Bioreaktorikasvatukset 1-6

Kasvatus nro.	Kantatyyppi	Esikasvatus	Bioreaktorikasvatus	Syöttöliuos	Tarkoitus
Kasvatus 1	Kanta A1 (Xyrmut)	Glukoosi + hiivauute	Glukoosi + hiivauute	Glukoosiliuos	Kantojen A1 ja A2 vertailu
Kasvatus 2	Kanta A2 (Xyrmut)	Glukoosi + hiivauute	Glukoosi + hiivauute	Glukoosiliuos	Kantojen A1 ja A2 vertailu
Kasvatus 3	Kanta A2 (Xyrmut)	Glukoosi + "Komponentti A"	Glukoosi + "Komponentti A"	Glukoosiliuos	"Komponentti A":n testaus
Kasvatus 4	Kanta A2 (Xyrmut)	Glukoosi + hiivauute	Glukoosi + "Komponentti A"	Transglykosylaatioliuos	Transglykosylaatioliuoksen ja "Komponentti A":n testaus
Kasvatus 5	Kanta A2 (Xyrmut)	Glukoosi + "Komponentti A"	Glukoosi + "Komponentti A" + "Komponentti B"	Glukoosiliuos	"Komponentti A":n ja "Komponentti B":n testaus
Kasvatus 6	Kanta A2 (Xyrmut)	Glukoosi + hiivauute	Glukoosi + hiivauute + "Komponentti B"	Glukoosiliuos	"Komponentti B":n testaus

Taulukko 3. Bioreaktorikasvatukset 7-12

Kasvatus nro.	Kantatyyppi	Esikasvatus	Bioreaktorikasvatus	Syöttöliuos	Tarkoitus
Kasvatus 7	Kanta B1 (isäntä)	Glukoosi + hiivauute	"Indusoiva yhteisalusta" + hiivauute	Laktoosiliuos	Kantojen B1 ja B2 vertailu
Kasvatus 8	Kanta B2 (isäntä)	Glukoosi + hiivauute	"Indusoiva yhteisalusta" + hiivauute	Laktoosiliuos	Kantojen B1 ja B2 vertailu
Kasvatus 9	Kanta B1 (isäntä)	Laktoosi + rankki	Laktoosi + rankki	Laktoosiliuos	Vertailukasvatus
Kasvatus 10	Kanta B1 (isäntä)	Laktoosi + "Komponentti A"	Laktoosi + "Komponentti A"	Laktoosiliuos	"Komponentti A":n testaus
Kasvatus 11	Kanta B1 (isäntä)	"Komponentti A" + "Komponentti B"	"Komponentti A" + "Komponentti B"	Laktoosiliuos	"Komponentti A":n ja "Komponentti B":n testaus
Kasvatus 12	Kanta B1 (isäntä)	Laktoosi + "Komponentti A" + "Komponentti B"	Laktoosi + "Komponentti A" + "Komponentti B"	Laktoosiliuos	"Komponentti A":n ja "Komponentti B":n testaus

4.6 Analyysit

4.6.1 Näytteiden kiintoainepitoisuus

Bioreaktorista otetun näytteen solujen ja mahdollisten hajoamattomien kiintoainepartikkelien muodostama kiintoainepitoisuus (kuiva-aine, kuivapaino) mitattiin suodattamalla välittömästi näytteenoton jälkeen hyvin sekoitettu kokonaisnäytettä tiedetty määrä vakuumin avulla esipunnitun lasikuitusuodattimen (Whatman GF/B) läpi. Suodatin ja siihen jäänyt kiintoaine pestiin tämän jälkeen tislattulla vedellä vähintään kolmesti käyttäen jokaisella pesukerralla paperille annosteltua näytetilavuutta. Näin poistettiin muut liukoiset yhdisteet paperiin jääneen kiintoaineen joukosta. Pesun jälkeen lasikuitupaperi näytteen kuivattiin uunissa vakiopainoon 105 °C asteessa vähintään vuorokauden ja punnittiin. Kuivapaino laskettiin kuivauksen jälkeen saadun punnitustuloksen ja esipunnituksen erotuksena huomioiden paperille annosteltu näytetilavuus.

4.6.2 Sokereiden analysointi

Kasvatusnäytteiden sokeripitoisuuksia analysoitiin Alliance 2695 HPLC-laitteistolla (Waters, Yhdysvallat) Waters 410 RI-detektorilla (Waters, Yhdysvallat) käyttäen. Liikkuvan faasiin eluenttina käytettiin 5mM rikkihappoliuosta virtausnopeudella 0,3 ml/min ja yhdisteiden erotukseen Aminex HPX-87H (BioRad, Saksa) kolonnilla lämpötilassa 35 °C. Entsyymiaktiivisuuden inaktivointi suoritettiin keittämällä lasikuitusuodattimen läpi (Whatman GF/B) suodatettu näyte 15 minuuttia välittömästi näytteenoton jälkeen.

Käytössä olleen HPLC-laitteiston erotuskyvyn riittämättömyyden takia autoklavoitu transglykosylaatioliuos analysoitiin Thermo Scientific™ Dionex™ ICS-6000 HPIC korkeapaineionikromatografilaitteistolla (Thermo Scientific, Englanti) erityisiä ajoparametreja käyttäen, jossa erotukseen käytettiin Dionex CarboPac SA10-4µm kolonnilla (Thermo Scientific, Englanti).

4.6.3 Proteiinimittaukset

Proteiinimittauksia varten kasvatusnäytettä suodatettiin välittömästi näytteenoton jälkeen lasikuitusuodattimen läpi (Whatman GF/B) ja suodos pakastettiin -20 °C myöhemmin suoritettavaa mittausta varten. Proteiinimittaukset perustuivat muunneltuun Lowry menetelmään (Lowry ym. 1951) sisältäen asetonisaostuksen. Näytteet laimennettiin sopivaan pitoisuuteen siten, että laimennettu näyte sisälsi 50 mM pH 5,0 natriumsitraattipuskuria. 200 µl laimennettua näytettä ja 800 µl jääkylmää asetonia yhdistettiin ja sekoitettiin välittömästi sekä annettiin saostua -20 °C lämpötilassa vähintään tunnin ajan. Näyte sentrifugoitiin ja nestefaasi poistettiin varoen rikkomasta putken pohjalle saostunutta pellettiä. Putken reunoilla ja pohjalle jääneen asetonin annettiin haihtua putkista vähintään 30 minuutin ajan, jonka jälkeen putkiin lisättiin 200 µl erityistä puskuriliuosta ja varmistettiin, että pelletti oli liuennut kunnolla. Varsinainen proteiinipitoisuus määritettiin spektrofotometrisesti Bio-Rad DC Protein Assay -ohjeen (Bio-Rad LIT448 Rev D) mukaisesti. Absorbanssimittaus suoritettiin Multiskan Ex kuoppalevylukijalla (Labsystems, Suomi) käyttäen 690nm aallonpituutta menetelmäohjeessa olevan 750 nm sijaan laiteteknisistä syistä johtuen. Standardina käytettiin naudan seerumin albumiinia (Bovine Serum Albumin, Sigma A8022).

4.6.4 Entsyymiprofiilin määrittäminen SDS-PAGE:lla

Elektroforeesiin perustuvassa erotusmenetelmässä näytteen sisältämät proteiinit kulkeutuvat polyakryliamidigeelin läpi sähkökentässä samaan suuntaan erottuen molekyylin ominaisuuksien ja koon perusteella. Alkuperäiseen PAGE-menetelmään (polyacrylamide gel electrophoresis) verrattuna SDS-PAGE menetelmä on huomattavasti tehokkaampi proteiinien erotusmenetelmä, jossa SDS (sodium dodecyl sulfate) varmistaa näytteen sisältämien proteiinien kunnollisen denaturoitumisen. Tämä vaikuttaa proteiinien muotoon, sähköiseen varaukseen tehden siitä negatiivisen, sekä keskinäiseen vuorovaikutukseen tehostaen erottumista geelillä huomattavasti, jolloin näytteen sisältämien proteiinien erotukseen vaikuttavat pääasiassa proteiinien molekyylipaino, käytetyn erotusgeelin ominaisuudet sekä varsinaiset ajo- ja värjäysmenetelmät. (Westermeier, 2016, s. 798i-798l)

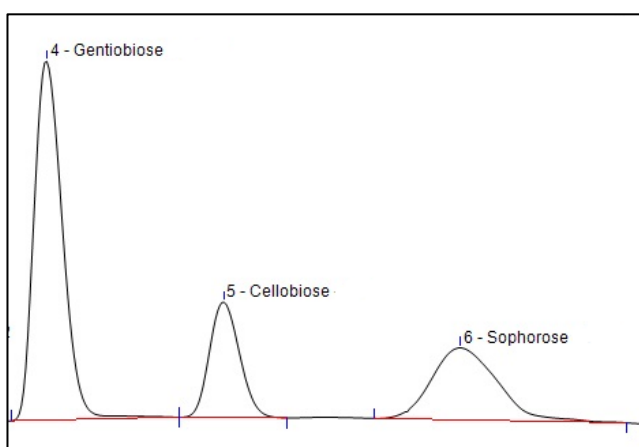
Bioreaktorikasvatuksissa kantojen tuottamat proteiinit analysoitiin kasvatusnäytteistä proteiinin erotukseen tarkoitetulla yleisesti käytössä olevalla SDS-PAGE menetelmällä

elektroforeesia käyttäen. Näytteet laimennettiin sopivaan pitoisuuteen proteiinipitoisuusmittausten perusteella ja käsiteltiin ennen geeliajoa erityisellä "SDS-MIX"-liuoksella proteiinien denaturoitumisen varmistamiseksi ja keitettiin 5 minuutin ajan. Erotuksessa käytettiin valmista kaupallista ajogeeliä Bio-Rad Any kD™ Criterion™ TGX Stain-Free™ Protein Gel (Bio-Rad #5678124) ja molekyylikoon standardina Precision Plus Protein™ Unstained Standards (Bio-Rad #1610363). Erotuslaitteena käytettiin Criterion™ Cell and PowerPac™ Basic Power Supply (Bio-Rad, Saksa) ja ajopuskurina 10x Tris/Glycine/SDS (Bio-Rad #1610772) laimennettuna 1:10 MilliQ-veteen. Käsiteltyä näytettä pipetoitiin geelille tietty määrä välttämällä liiallista proteiinimäärän lisäämistä kaivoon. Ajojännitteenä käytettiin 200 V ja ajoaikana noin 30 minuuttia. Geeliajon jälkeen proteiinien ilmentymisen parantamiseksi geeleille suoritettiin Coomassie-värijäys ohjeiden mukaisesti käyttäen Bio-Safe Coomassie Stain (Bio-Rad #1610787) -liuosta sisältäen "Fix"-käsittelyn. Värijäyksen jälkeen geelit kuvattiin Odyssey CLx (LI-COR Biosciences, Saksa) laitteella aallonpituudella 700 nm ja kuvat analysoitiin Image Studio Lite 5.2 ohjelmistolla. Näytteiden osalta ei ajettu varsinaisia standardeja oletettujen tuotettujen entsyymien osalta.

5 TULOKSET JA TARKASTELU

5.1 Transglykosylaatioliuos

Kohdassa 4.4 esitetyllä menetelmällä transglykosylaatiossa onnistuttiin muodostamaan liuos, joka sisälsi mm. gentiobioosia, sellobioosia sekä sofroroosia. Reaktiossa muodostuneita tarkkoja pitoisuuksia ei kerrota tässä työssä, mutta HPIC kromatogrammi yhdisteiden osalta on esitetty kuvassa 12.



Kuva 12. Autoklavoidun transglykosylaatioliuoksen kromatogrammi gentiobioosin (4), sellobioosin (5) ja sofroroosin (6) osalta HPIC:llä (nC).

5.2 Bioreaktorikasvatukset – tulosten käsittely ja normalisointi

Kasvatukset 1-6 suoritettiin käyttäen Xyrmut-kantoja, ja kasvatukset 7-12 käyttämällä edellisten kantojen ns. isäntäkantoja. Kantojen osalta tiedot on esitetty kappaleessa 4.1 ja kasvatuksien tarkemmat tiedot kappaleessa 4.5.

Saatujen tulosten osalta työssä esitetyt mittaustulokset ja laskentojen tulokset normalisointiin varsinaisten lukuarvojen häivyttämiseksi työhön liittyvän salassapidettävyyden vuoksi. Normalisointi pyrittiin tekemään siten, että esitetyistä tuloksista on mahdollista muodostaa selkeä kuva työn kokonaisuudesta ja tuloksista. Bioreaktorikasvatukset voivat olla keskenään vaihtelevia esimerkiksi biologisista syistä johtuen, joten on syytä huomioda, että työn osalta bioreaktorikasvatuksista ei suoritettu toistokokeita eikä kasvatuksien toistettavuuden osalta ei ole tietoa. Toistokokeiden poisjättäminen oli tietoinen

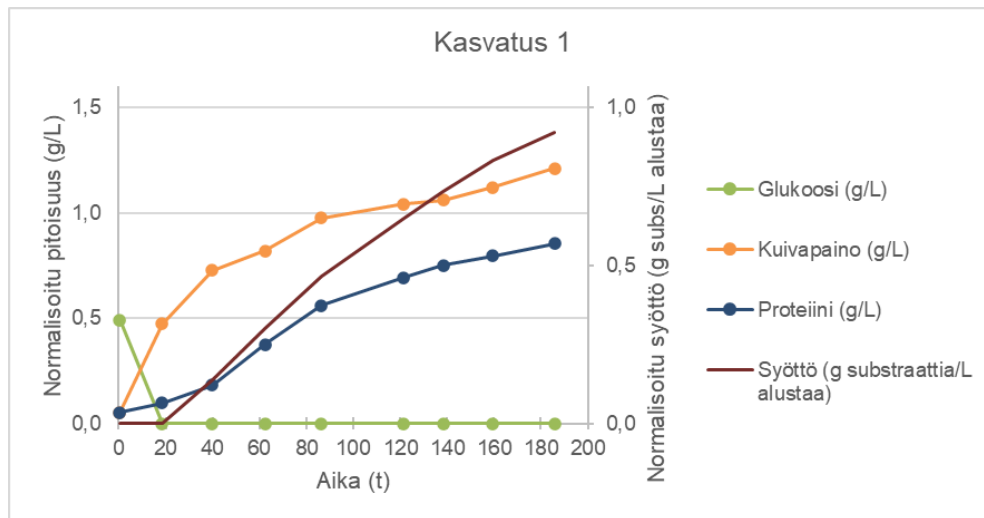
valinta työn suunnittelun ja kokonaisuuden osalta, sillä yksittäisillä kasvatuksilla oli mahdollista saada riittävän kattava käsitys käytettyjen kantojen ja raaka-aineiden ominaisuuksista mahdollisia jatkotutkimuksia varten. Lisäksi on syytä huomioida, että teollisessa mittakaavassa esimerkiksi esikasvatus ennen varsinaista tuottokasvatusta suoritettaisiin suurella todennäköisyydellä bioreaktorissa optimoiduissa olosuhteissa ja siirrostus varsinaiseen tuottoreaktoriin tehtäisiin juuri sopivassa kasvuvaiheessa. Työn sisältämien bioreaktorikasvatuksien osalta ei kuitenkaan ollut mahdollista suorittaa esikasvatuksia erikseen bioreaktoreissa, vaan ne suoritettiin ravistelupullokasvatuksina kuten on esitetty aikaisemmin kohdassa 4.3.

Jotta bioreaktorikasvatuksien kuvaajat (kuvat 13-24) saatiin paremmin esitettävään muotoon, normalisoitiin kuvaajissa esitetyt mittaustulokset kasvatuksen 2 korkeimman mitatun proteiinipitoisuuden mukaisesti, mikä edusti samalla kaikkien kasvatuksien osalta suurinta mitattua proteiinipitoisuutta. Kuvaajien kaikki syöttömäärät normalisoitiin kasvatuksessa 2 syötetyn suurimman puhtaan substraattimäärän mukaisesti siten, että syötetyn substraatin määrä oli suhteutettu kasvatustilavuuteen, jotta arvot saatiin vertailukelpoisiksi vaihtelevien kasvatustilavuuksien kesken. Kasvatuksessa 2 syötetyn substraatin määrä oli määrällisesti suurin kaikkien kasvatuksien osalta. Bioreaktorikasvatuksien osalta laitteiden ja antureiden keräämä mittausdata ja niistä muodostetut mittauskäyrät on esitetty jokaisen kasvatuksen osalta liitteessä 2 ilman normalisointeja. Liitteen 2 mittauskäyristä selviää esimerkiksi kasvatuksien happo- ja emäskulutukset sekä poistokaasumittausten hiilidioksidipitoisuudet. Happo- ja emäskulutusten osalta tuloksia ei ole suhteutettu käytetyn kasvatustilavuuden mukaan, ja ne eivät näin ollen ole vertailukelpoisia sen osalta, kun kasvatuksessa käytetty bioreaktori ja tilavuus on vaihtunut. Työssä ei ole kerrottu tarkkoja kasvatustilavuuksia eri kasvatuksien välillä.

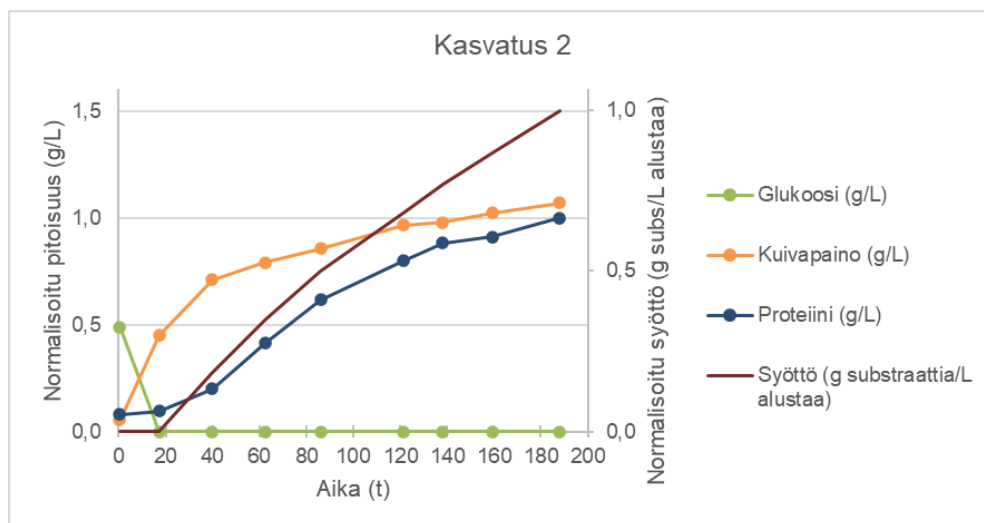
5.2.1 Bioreaktorikasvatukset 1-6 – Kantatyypit A

Kasvatuksien 1 ja 2 osalta mittaustulokset on esitetty kuvissa 13-14. Suurempi mitattu proteiinipitoisuus saavutettiin kasvatuksessa 2, ”Kanta A2” käyttäen. Pääasiallinen proteiinien tuottovaihe molempien kantojen osalta alkoi yhtenevästi syöttövaiheen aloituksesta panosvaiheen glukoosin loputtua, ja jatkui kasvatuksen lopetukseen saakka. Molemmilla kasvatuksilla biomassan muodostuminen oli tasaista koko kasvatuksen ajan, mutta jäi kasvatusta 2 osalta kuitenkin pienemmäksi indikoiden näin paremmasta

proteiinien tuottopotentialista. Saatujen tulosten perusteella jatkokasvatuksiin 3-6 valittiin kasvatuksessa 2 käytetty "Kanta A2".



Kuva 13. Kasvatus 1 normalisoidut mittaustulokset ja syöttö. Muut kasvatuksen mittauskäyrät on esitetty liitteessä 2 (liite 2, kuva 1).

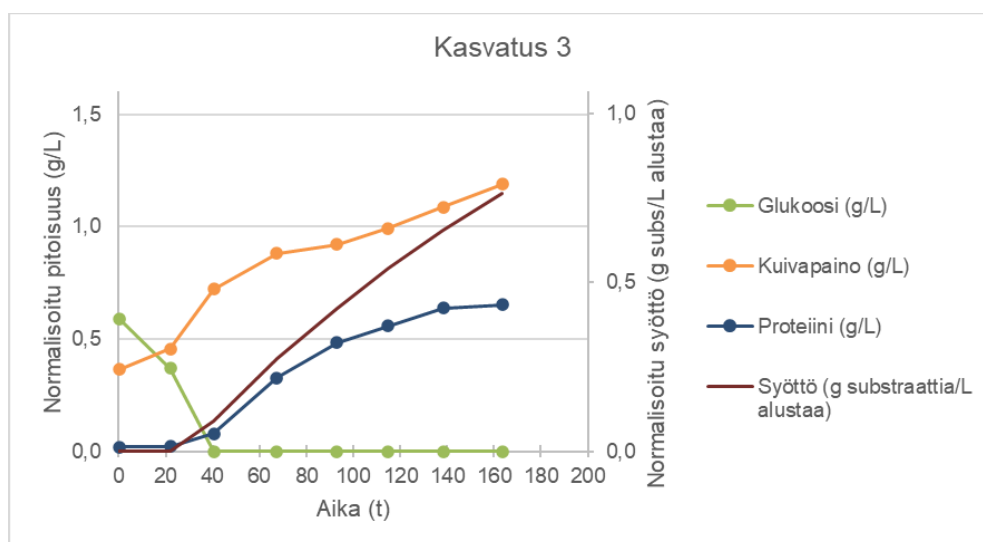


Kuva 14. Kasvatus 2 normalisoidut mittaustulokset ja syöttö. Muut kasvatuksen mittauskäyrät on esitetty liitteessä 2 (liite 2, kuva 2).

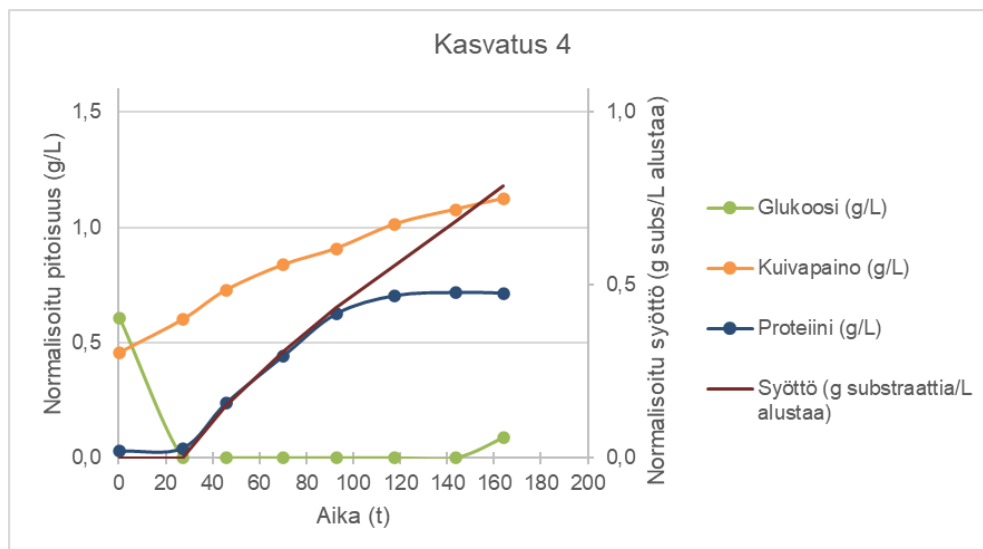
Kasvatuksien 3 ja 4 osalta mittaustulokset on esitetty kuvissa 15-16. Kasvatuksissa 3 ja 4 saavutettiin selkeä tuottovaihe syöttövaiheen aloituksen jälkeen panosvaiheen glukosin loputtua, mutta kasvatus 3 osalta panosvaiheen kesto oli selvästi pidempi verrattuna kasvatuksiin 1, 2 ja 4. Kasvatuksen 4 esikasvatusalustassa käytettiin "Komponentti A":n sijaan hiivauutetta, mikä on saattanut mahdollistaa paremman kasvun

esikasvatusvaiheessa, ja tämä vaikutus on kantanut edelleen bioreaktorikasvatuksen alkuvaiheisiin. Tämä indikoisi sitä, että ”Komponentti A” ei ole biomassan kasvun ja nopeuden kannalta täysin hiivauutteen veroinen raaka-aine esimerkiksi typpilähteen osalta.

Kasvatus 3 osalta proteiinituotto näyttäisi hidastuvan noin vuorokausi ennen kasvatuksen lopetusta, mutta kasvatus 4 osalta selkeä proteiinintuoton hidastuminen alkoi jo selvästi aikaisemmin. Kasvatuksessa 4 kuitenkin saavutettiin suurempi proteiinipitoisuus nopeammin ja parempi tuottavuus verrattuna kasvatukseen 3. Lisäksi kasvatus 4 lopussa havaittiin glukoosin kertymistä kasvatusalustaan, mikä voi indikoida liian nopeasta syöttönopeudesta. Kasvatuksessa 4 käytetty transglykosylaatioliuos soveltui näin ollen syöttöliuokseksi ja on voinut tuoda proteiinituottoon tehostusta kasvatukseen 3 verrattuna. Kasvatus 4 osalta esikasvatuksen mukana siirtyneen hiivauutteen määrä varsinaiseen kasvatusalustaan oli suhteessa varsin vähäinen, ja oletettavasti sen vaikutus on rajoittunut lähinnä nopeampaan biomassan kasvuun kasvatuksen alussa, mutta mahdollista yhteisvaikutusta yhdessä transglykosylaatioliuoksen kanssa ei voida sulkea pois. Kasvatus 4 osalta on myös mahdollista, että syöttönopeus ei ole ollut täysin optimi, kun huomioidaan transglykosylaatioliuoksessa glukoosin lisäksi olleet sellobioosi, gentiobioosi ja soforoosi, joiden käyttö alustasta ei ole välttämättä yhtä nopeaa kuin glukoosin.



Kuva 15. Kasvatus 3 normalisoidut mittaustulokset ja syöttö. Muut kasvatuksen mittauskäyrät on esitetty liitteessä 2 (liite 2, kuva 3).

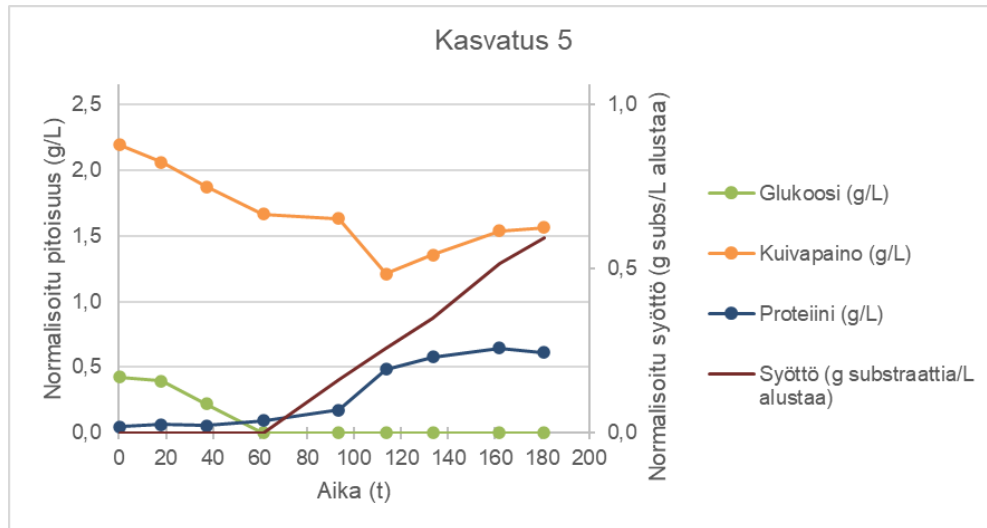


Kuva 16. Kasvatus 4 normalisoidut mittaustulokset ja syöttö. Muut kasvatuksen mittauskäyrät on esitetty liitteessä 2 (liite 2, kuva 4).

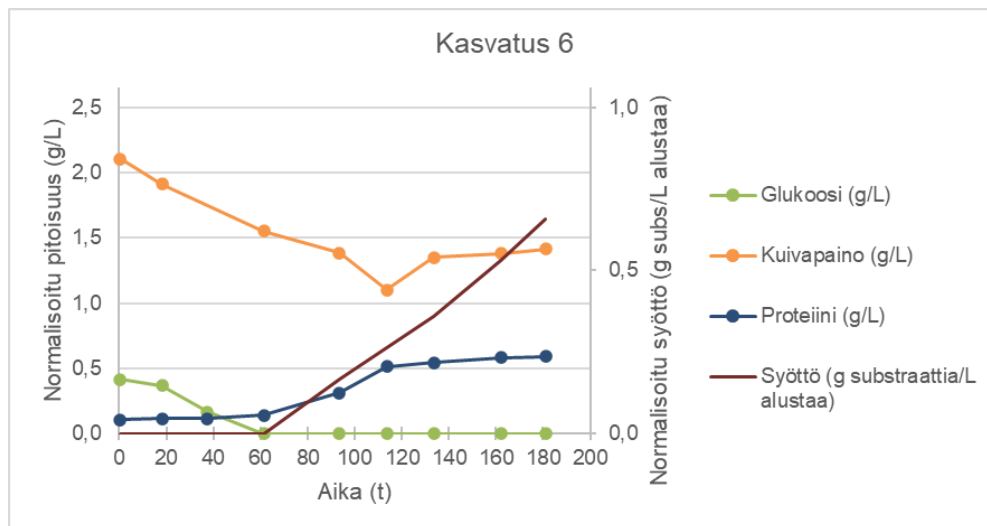
Kasvatuksien 5 ja 6 osalta mittaustulokset on esitetty kuvissa 17-18. Kasvatuksien 5 ja 6 osalta panosvaiheessa havaittiin selkeästi hitaampi glukoosin kulutus verrattuna kasvatuksiin 1-4. Näytteistä mitatut kuivapainot kasvatuksissa 5 ja 6 kuitenkin laskivat panosvaiheen aikana selvästi kertoen ”Komponentti B”:n sisältämän kiintoaineen hajoamisesta, mutta samaan aikaan kummassakaan kasvatuksessa ei nähty proteiinipitoisuuksissa merkittävää nousua. Tämä voi indikoida, että ”Komponentti B” ei indusoi ”Kanta A2”:n entsyymien tuottoa tehokkaasti, mutta kuitenkin siinä määrin, että tuotetut entsyymit riittävät kiintoaineen hajoamiseen jollakin tasolla. Kasvatuksissa nähtiin kuitenkin selkeä tuottovaihe noin vuorokausi syöttövaiheen aloituksesta, mikä voi indikoida, että indusointi on tapahtunut enemmän glukoosin vaikutuksesta syöttövaiheesta, eikä esimerkiksi ”Komponentti A”:n tai ”Komponentti B”:n vaikutuksesta. Loppua kohden myös kuivapainojen osalta nähtiin molempien kasvatuksien osalta nousua, mutta näiden osalta kiintoainepitoisuudet olivat hiilidioksidituottoon (liite 2, kuvat 5 ja 6) suhteutettuna sen verran korkeat, että ”Komponentti B”:n sisältämien eri yhdisteiden täydellinen hajoaminen on saattanut jäädä tapahtumatta, ja tämä näkyy näytteissä korkeampana kuivaainepitoisuutena.

Kasvatus 5 osalta hitaampi glukoosin käyttö olisi voinut olla selitettävissä ”Komponentti A”:n mahdollisesti liian vähäisellä typpipitoisuudella, mistä nähtiin viitteitä kasvatuksessa 3. Tarkasteltaessa lähemmin kasvatus 6 hidasta glukoosin käyttöä ja huomioiden kasvatusalustassa oleva hiivauute, olisi kasvatusalustan pitänyt sisältää ravintoaineet ja

riittävästi tyypeä hyvään panosvaiheen biomassan kasvuun. Näin ei kuitenkaan jostain syystä tapahtunut, mikä saattaa johtua siitä, että ”Komponentti B” sisältää jotakin kasvua tai glukoosin käyttöä hidastavaa yhdistettä. Tämä on siten voinut vaikuttaa myös kasvat-
 tus 5 etenemiseen heikentävästi.



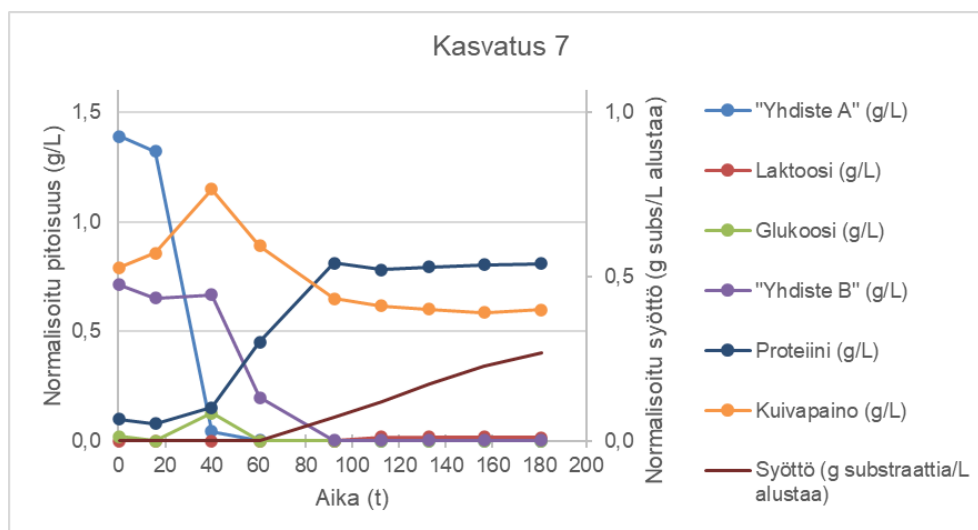
Kuva 17. Kasvatus 5 normalisoidut mittaustulokset ja syöttö. Muut kasvatuksen mittauskäyrät on esitetty liitteessä 2 (liite 2, kuva 5).



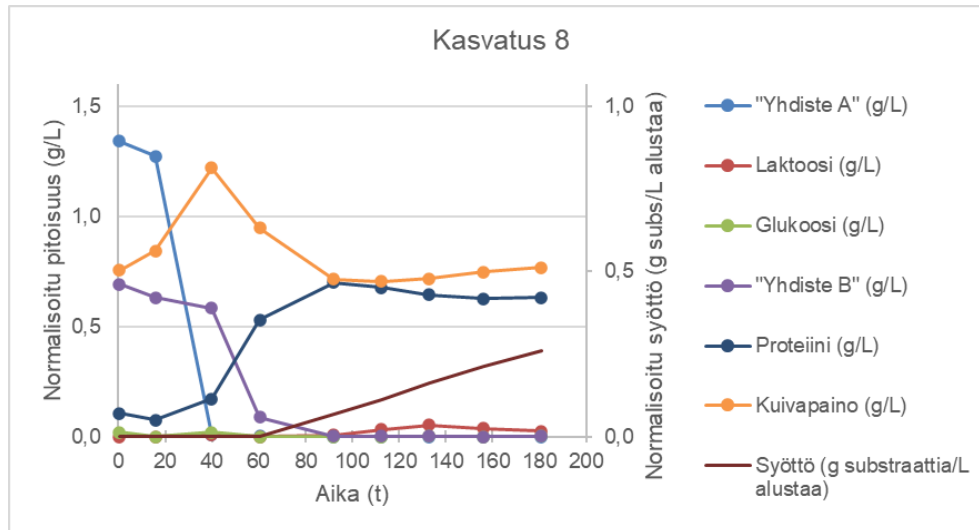
Kuva 18. Kasvatus 6 normalisoidut mittaustulokset ja syöttö. Muut kasvatuksen mittauskäyrät on esitetty liitteessä 2 (liite 2, kuva 6).

5.2.2 Bioreaktorikasvatukset 7-12 – Kantatyypit B

Kasvatuksien 7 ja 8 osalta mittaustulokset on esitetty kuvissa 19-20. Kasvatuksien 7 ja 8 osalta suurempi mitattu proteiinipitoisuus saavutettiin kasvatuksessa 7, ”Kanta B1” käyttäen. Molempien kasvatuksien osalta ”Yhdiste A” ja ”Yhdiste B” kulutukset näyttivät mittausten perusteella olevan lähes yhteneviä. Kasvatuksien alussa tapahtuva kiintoaineen nousu indikoi biomassan kasvua, ja myöhemmin nähtävä kiintoaineen voimakas lasku ”Yhdiste A”:n loppumisen jälkeen kertoo liukenemattoman kiintoainepitoisen ”Yhdiste C”:n hajoamisesta. Samalla molempien kasvatuksien osalta nähdään myös selkeää proteiinien tuottovaiheen alkaminen ja nopeampi ”Yhdiste B”:n kulutus. Syöttövaihe aloitettiin ”Yhdiste B”:n loputtua, jonka jälkeen tuottovaihe ja ”Yhdiste C”:n hajoaminen jatkuvat vielä jonkin aikaa. Tämän jälkeen havaitaan selkeää tuottovaiheen loppuminen syöttövaiheesta huolimatta, mikä voi indikoida väärästä syöttönopeudesta tai syöttöliuoksen riittämättömästä indusoivasta vaikutuksesta kyseisillä kannoilla. Kasvatus 8 osalta havaittiin myös vähäistä laktoosin kertymistä loppua kohden, mikä voi indikoida kannan heikommasta kyvystä käyttää laktoosia substraatikseen. Kasvatuksessa 7 käytetty ”Kanta B1” saavutti korkeamman proteiinipitoisuuden sekä alhaisemman kuivapainon kasvatuksessa 8 käytettyyn ”Kanta B2” verrattuna, ja tästä syystä ”Kanta B1” valittiin käytettäväksi jatkokasvatuksiin 9-12.

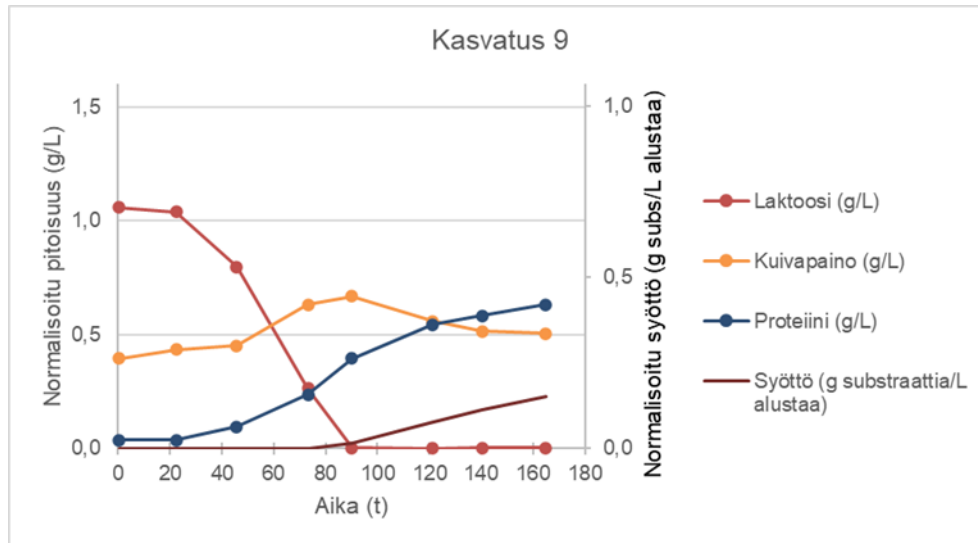


Kuva 19. Kasvatus 7 normalisoidut mittaustulokset ja syöttö. Muut kasvatuksen mittauskäyrät on esitetty liitteessä 2 (liite 2, kuva 7).

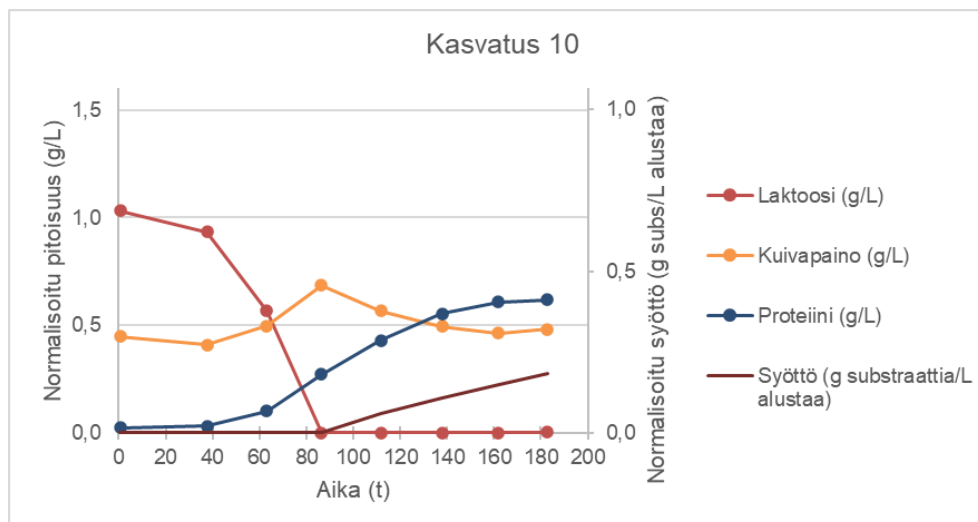


Kuva 20. Kasvatus 8 normalisoidut mittaustulokset ja syöttö. Muut kasvatuksen mittauskäyrät on esitetty liitteessä 2 (liite 2, kuva 8).

Kasvatuksien 9 ja 10 osalta mittaustulokset on esitetty kuvissa 21-22. Molempien kasvatuksien osalta panosvaiheen laktoosin kulutus mitattujen tulosten mukaan oli lähes yhtenevää ja tuottovaihe alkoi molempien kasvatuksien osalta jo ennen panosvaiheen loppua jatkuen edelleen myös syöttövaiheen aikana. Panosvaiheen lopussa nähdään molemmissa kasvatuksissa kiintoainepitoisuuden nousua kertoen biomassan kasvusta, minkä jälkeen kiintoainepitoisuus lähtee laskuun indikoiden kasvatus 9 kohdalla rankin sisältämän kiintoaineen hajoamisesta, sekä kasvatuksen 10 kohdalla "Komponentti A":n sisältämän kiintoaineen hajoamista. Tulosten perusteella kasvatuksessa 10 käytetyn "Komponentti A":n voidaan indikoida soveltuvan raaka-aineeksi korvaamaan kasvatuksessa 9 käytettyä rankkia indusoivan alustan tarvitsevan "Kanta B1" osalta.



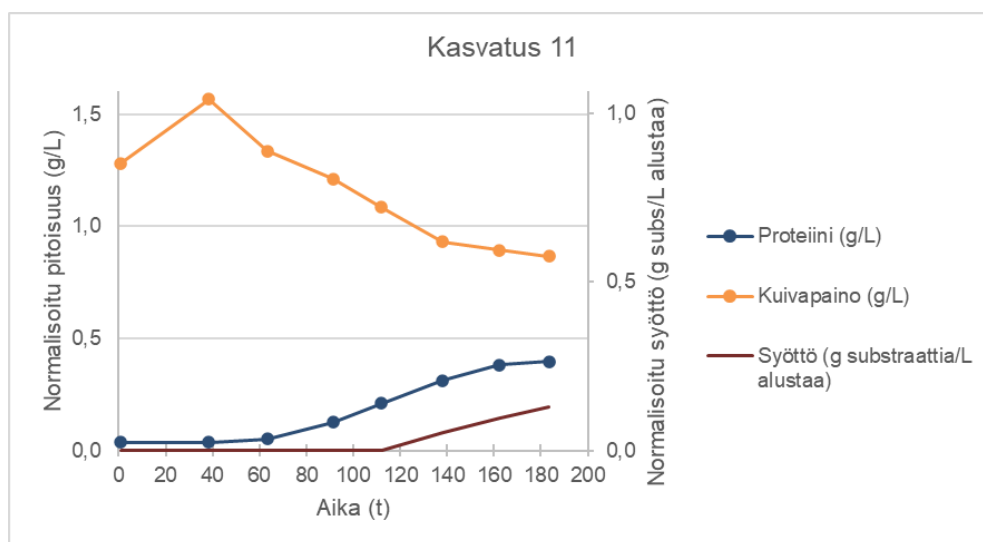
Kuva 21. Kasvatus 9 normalisoidut mittaustulokset ja syöttö. Muut kasvatuksen mittauskäyrät on esitetty liitteessä 2 (liite 2, kuva 9).



Kuva 22. Kasvatus 10 normalisoidut mittaustulokset ja syöttö. Muut kasvatuksen mittauskäyrät on esitetty liitteessä 2 (liite 2, kuva 10).

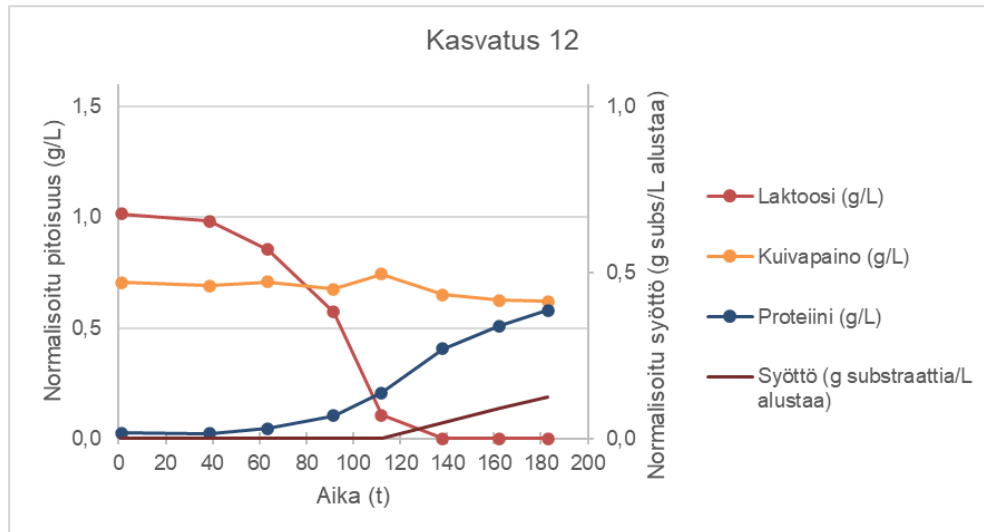
Kasvatuksen 11 mittaustulokset on esitetty kuvassa 23. Kasvatus 11 osalta kasvu oli hyvin hidasta ensimmäisten päivien ajan, mikä nähdään seuraamalla hiilidioksidin muodostumista (liite 2, kuva 11). Kuivapainoissa tapahtuva nousu alussa indikoi kuitenkin mahdollisesti biomassan kasvua, mutta näytteenoton osalta mittausvirheen mahdollisuutta ei voida täysin sulkea johtuen korkeasta kuiva-ainepitoisuudesta kasvatuksessa, ja sen mahdollisesta vaikutuksesta näytteenoton edustavuuteen. Myöhemmin kasvatuksen aikana nähdään kuitenkin selkeä kuiva-ainepitoisuuden lasku, mikä kertoo

”Komponentti A”:n ja ”Komponentti B”:n sisältämän kiintoaineen hajoamisesta. Tuottovaihe alkaa jo ennen syöttövaihetta, mikä kertoo ”Komponentti A” ja ”Komponentti B” indusoivasta vaikutuksesta myös ilman laktoosia. Tuottovaihe jatkuu lähes kasvatuksen loppuun saakka mitatun proteiinipitoisuuden jäädessä kuitenkin selvästi alhaisemmalle tasolle edellisiin kasvatuksiin verrattuna. Kasvatuksen lopussa mitattu suhteessa korkea kuivapaino muihin kasvatuksiin verrattuna, sekä hiilidioksidin perusteella arvioitu kasvuvauhti (liite 2, kuva 11) kuitenkin indikoivat, että raaka-aineiden kiintoaine ei ole hajonnut loppuun saakka.



Kuva 23. Kasvatus 11 normalisoidut mittaustulokset ja syöttö. Muut kasvatuksen mitauskäyrät on esitetty liitteessä 2 (liite 2, kuva 11).

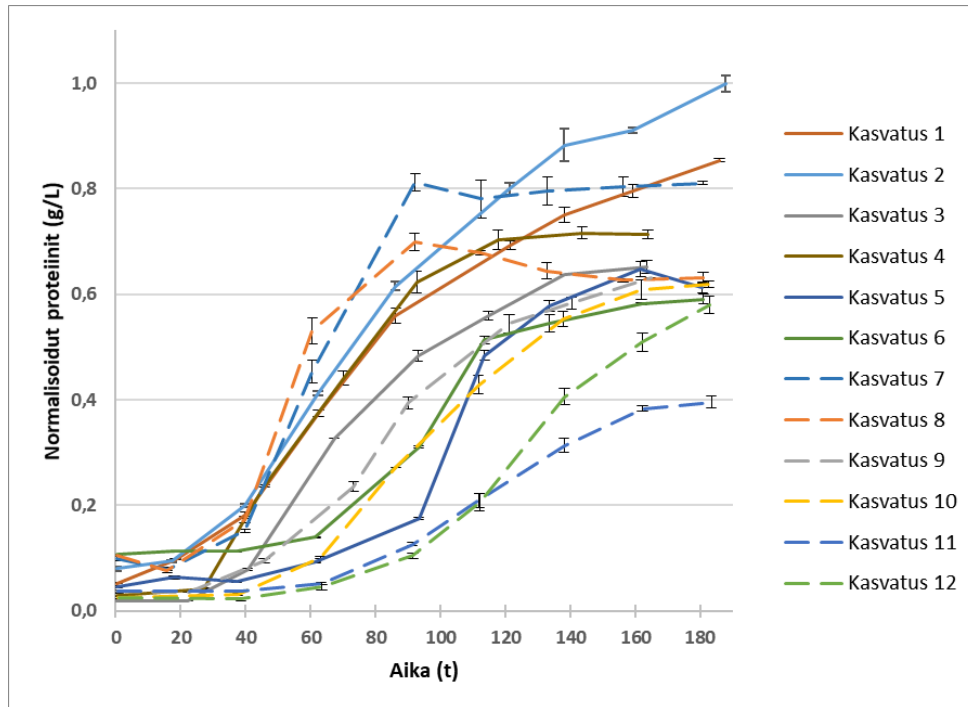
Kasvatuksen 12 mittaustulokset on esitetty kuvassa 24. Kasvatus 12 kohdalla kasvu oli hidasta ensimmäisten päivien ajan ja panosvaiheessa laktoosin kulutus alkoi selvästi myöhemmin kuin kasvatuksissa 9 ja 10. Tämä voi johtua ”Komponentti B”:n sisältämistä yhdisteistä, joilla voi olla jokin hidastava vaikutus, mikä nähtiin esimerkiksi kasvatuksen 6 kohdalla. Tuottovaihe alkaa jo panosvaiheessa jatkuen myös syöttövaiheen aikana. Kuivapainon osalta nähdään pieni nousu kasvatuksen keskivaiheilla kertoen biomassan kasvusta, mutta kyseessä voi olla myös mittausvirhe. Kuivapainon muutoksen perusteella suhteutettuna hiilidioksidin muodostumiseen kasvatuksen aikana (liite 2, kuva 12) on kuitenkin mahdollista, että kiintoaine ei ole hajonnut täydellisesti.



Kuva 24. Kasvatus 12 normalisoidut mittaustulokset ja syöttö. Muut kasvatuksen mitauskäyrät on esitetty liitteessä 2 (liite 2, kuva 12).

5.2.3 Normalisoidut proteiinimittaukset

Työssä suoritettujen 12 bioreaktorikasvatuksen mitatut proteiinipitoisuudet ovat esitetty normalisoituna kuvassa 25. Normalisointi suoritettiin kasvatuksesta 2 (kuva 14) mitatun suurimman proteiinipitoisuuden mukaan. Tulokset kuvaavat näytteestä mitatun proteiinipitoisuuden määrää, mitä tässä työssä pidettiin edustavana kuvaamaan kokonaisuudessaan tuotettujen entsyymien määrää. Kuvan 25 normalisoiduista tuloksista nähdään selkeitä eroja tuotettujen proteiinien määrissä eri kasvatuksien välillä.



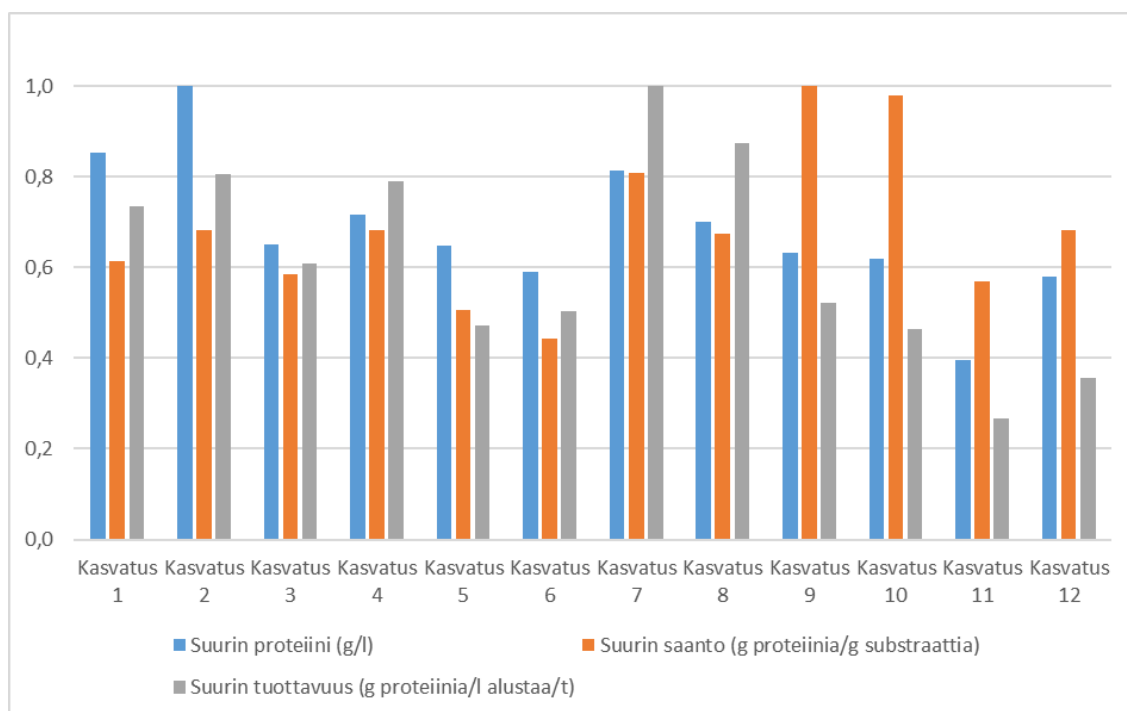
Kuva 25. Normalisoidut mitatut proteiinipitoisuudet. Proteiinimittaukset normalisoitiin kasvatus 2 suurimman mitatun proteiinipitoisuuden mukaan. Tulokset muodostettiin mittausten keskiarvona ja lisäksi on esitetty mittausten keskihajonta (n=3).

Näytteenkäsittelyssä proteiinipitoisuuksien mittauksen osalta ei huomioitu bioreaktorista otetun näytteen sisältämän biomassan ja kiintoaineen tilavuusprosenttia, mikä tuo proteiinipitoisuuksiin virhettä nostaten mitattuja arvoja ylöspäin. Tilavuusprosentti voidaan huomioida esimerkiksi mittaamalla kiintoaineen volumetrinen osuus näytteessä, tai laimentamalla näytettä tarpeeksi ja ottamalla tämä huomioon laskennallisesti myöhemmin. Virheen määrä korostuu lähinnä niissä kasvatuksissa, joissa on keskenään suuret erot kuivapainojen osalta.

5.2.4 Normalisoitu suurin proteiinipitoisuus, saanto ja tuottavuus

Kuvan 26 pylväskaaviossa on esitetty yhteenveto normalisoiduista tuloksista suurimpien mitattujen proteiinipitoisuuksien, sekä laskettujen saantojen ja tuottavuuksien osalta keskinäistä vertailua varten. Kuvassa sininen pylväs esittää suurinta mitattua proteiinipitoisuutta (g/l) jokaisen kasvatuksen osalta, ja ne normalisoitiin kasvatuksessa 2 mitatun suurimman proteiinipitoisuuden mukaan. Oranssi pylväs esittää jokaisen kasvatuksen osalta kasvatuksen aikana tietyllä aikavälillä saavutettua suurinta saantoa (g proteiinia/g

substraattia), ja ne normalisoitiin kasvatuksessa 9 saavutetun suurimman saannon mukaan. Harmaa pylväs puolestaan esittää jokaisen kasvatuksen osalta kasvatuksen aikana tietyllä aikavälillä saavutettua suurinta tuottavuustasoa (g proteiinia/l alustaa/tunti), ja ne normalisoitiin kasvatuksessa 7 saavutetun suurimman tuottavuuden mukaan.



Kuva 26. Normalisoidut tulokset yhteenvedona suurimpien proteiinipitoisuuksien, saantojen sekä tuottavuuksien osalta.

Kuvassa 26 saantojen (oranssi pylväs) osalta laskennassa huomioitiin kasvatusalustan sisältämät pääkomponentit/raaka-aineet sekä syöttöjen sisältämät substraatit, joita olivat joko glukoosi, laktoosi tai transglykosylaatioliuoksen sisältämä glukoosi sekä muut sokerit. Saantojen laskuista jätettiin huomioimatta alustan sisältämät suolat, hivenaineet ja vaahdonestoaine (liite 1), koska näiden osuus oli suhteessa pieni ja kaikkien kasvatusten osalta sama. Tuotettujen proteiinien kokonaismäärä saantojen osalta laskettiin mitattuja proteiinipitoisuuksia hyödyntäen siten, että laskennassa huomioitiin reaktorin kasvatus tilavuus ja näytteenottojen mukana poistettu proteiinin määrä tietyllä aikavälillä. Kasvatus tilavuudet muodostettiin laskennallisesti huomioiden näytteenotot, happo- ja emäskulutus sekä syötön määrä. Tilavuuksien osalta ei huomioitu mahdollista reaktorista tapahtunutta haihtumista kasvatuksen aikana.

Suurimman tuottavuuden laskennassa proteiinien määrä laskettiin samalla tapaa kuin saantojen kanssa, ja tilavuuden osalta huomioitiin laskennallinen kasvatus tilavuus

aikavälin lopussa. Koska näytteenkäsittelyssä ei huomioitu biomassan ja kiintoaineen tilavuusprosenttia, ovat mitatut proteiinipitoisuudet todellista korkeampia. Tämä vaikuttaa myös laskettuihin proteiinimääriin siten, että laskennalliset proteiinimäärät olivat todellista korkeammat. Yleisesti ottaen suuremman kuivapainon omaavien kasvatuksien voidaan olettaa omaavan suuremman tilavuusprosentin, mikä pienentää kasvatuksesta saatavan todellisen nestemäisen liuoksen määrää. Varsinaisen entsyymintuotto-prosessin kohdalla tilavuusprosentin muodostamaa hukkaa voidaan kuitenkin pyrkiä pienentämään erilaisten jälkikäsittelytekniikoiden avulla esimerkiksi puristamalla biomassaa ja kiintoaine kasaan, sekä huuhtelemalla niihin tarttunut entsyymiliuos.

Suurimman saannon ja suurimman tuottavuuden osalta esitetyt arvot edustavat yksittäisen kasvatuksen aikana saavutettua korkeinta saantoa tai tuottavuutta tietyllä aikavälillä alkaen kasvatuksen aloituksesta siihen pisteeseen, kun proteiinipitoisuuksissa voidaan nähdä selkeä tasoittuminen tai lasku. Ne eivät kaikkien kasvatuksien osalta siis välttämättä edusta suoritettujen kasvatuksien ”alusta loppuun” saantoja tai tuottavuutta, eivätkä edusta yksittäisten peräkkäisten näytepisteiden välisiä saantoja tai tuottavuutta. Tällä on tarkoitus tuoda esiin vertailukelpoiset arvot tilanteessa, jossa optimoitu prosessi lopetetaan ennen saannon tai tuottavuuden laskettua liikaa. Esitetyt arvoja on kuitenkin pyritty tasoittamaan panosvaiheen ja näytteenottoajankohtien vaihteluiden osalta siten, että kolmen ensimmäisen kasvatusvuorokauden tuloksia ei ole huomioitu. Saantojen osalta tuottavuuden selvästi heikentyessä myös saanto putoaa nopeasti syötön jatkuessa, jolloin kasvatuksen jatkaminen ei välttämättä ole enää järkevää. Yksi vaihtoehtoinen esitystapa olisi laskea tuottavuus vain siltä aikaväliltä, kun suoritettujen mittausten osata havaitaan selkeä tuottovaihe, mutta tällöin näytteenoton tulisi osua kohdalleen tuottovaiheen aloituksen kanssa.

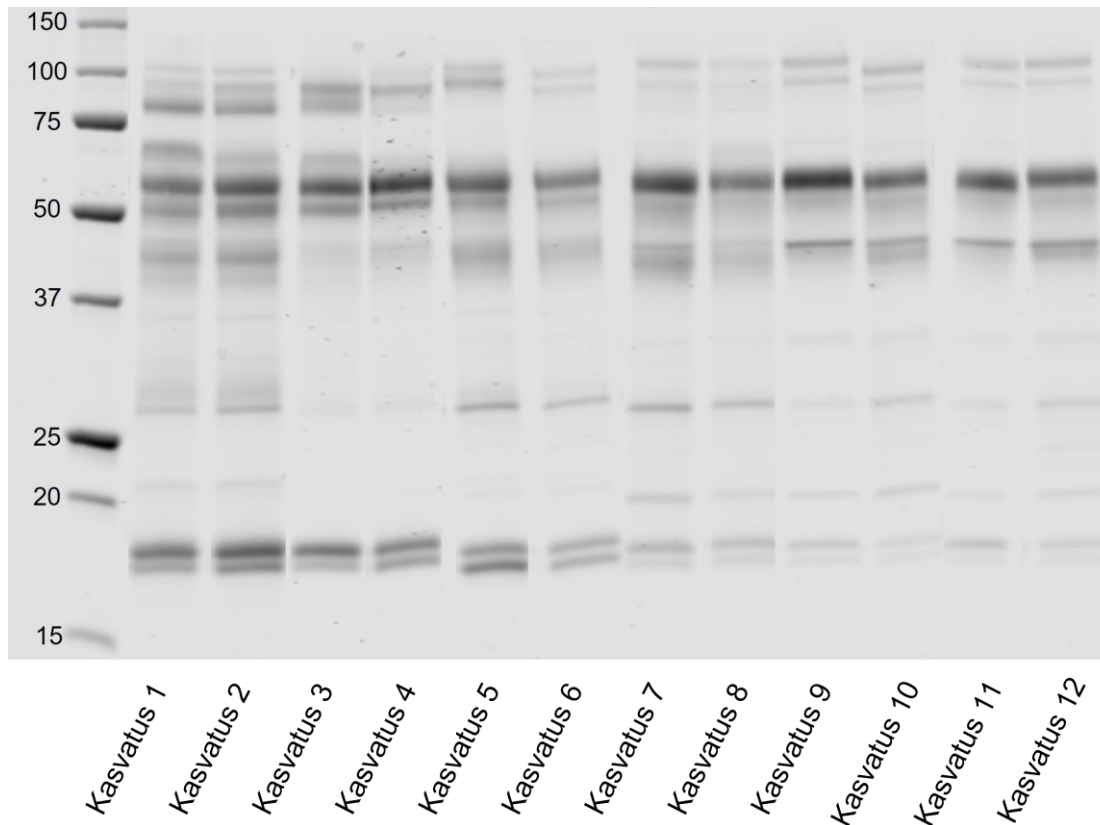
Työssä käytettyyn esitysmuotoon saantojen ja tuottojen osalta päädyttiin siitä syystä, että kasvatuksien tuottojen osalta nähtiin selkeitä eroja ja pyrittiin tuomaan esiin optimoidun prosessin kaltaista esitysmuotoa. Tämä nähdään hyvin esimerkiksi kasvatuksien 3, 7 ja 8 kohdalla, joiden proteiinipitoisuuksissa nähdään selkeä tuottovaiheen loppuminen kesken kasvatuksen. Kyseisten kasvatuksien osalta prosessin lopetus olisi siis järkevintä tehdä siinä kohtaa, kun tuotto selvästi tasaantuu. Tämän esitystavan voidaan kuitenkin katsoa heikentävän sellaisten kasvatuksien tuottavuuksia, joiden osalta on kasvatuksen alussa ollut selkeä pitkä tuottamaton vaihe. Tällaisia kasvatuksia olivat esimerkiksi kasvatukset 11 ja 12. Prosessikehityksen myötä alustoja ja syöttöjen määrää pyritäisiin optimoimaan, sekä mahdolliset tuottamattomat vaiheet pyritäisiin saattamaan

mahdollisimman lyhyiksi. Myös esikasvatuksien osalta olosuhteet ja esikasvatusalustat eivät välttämättä ole olleet täysin optimaaliset, mikä on voinut vaikuttaa bioreaktorikasvatuksien alkuvaiheisiin heikentävästi verrattuna tilanteeseen, jossa myös esikasvatus olisi suoritettu bioreaktorikasvatuksena optimoiduissa kasvatusolosuhteissa.

Erilaisten tulosten esitys- ja laskentatapojen osalta ei kuitenkaan voida poissulkea tilanteita, joissa esimerkiksi tunnetun prosessin tuottamaton vaihe halutaan selkeästi erottaa omaksi kokonaisuudekseen prosessiteknisistä syistä, ja näin keskittyä vain tuottovaiheen vertailuun. Tällainen tilanne voi olla esimerkiksi prosessissa, jossa tuottovaiheen käynnistää selkeästi jonkinlaisen indusorin lisääminen kasvatusalustaan kesken kasvatuksen. Kuvan 26 tuloksista nähdään varsin vaihtelevia tuloksia erilaisten raaka-aineiden tai kantatyyppien suhteen. Vaikka kasvatuksessa 2 saavutettiin suurin mitattu proteiinipitoisuus, sen saanto oli esimerkiksi selvästi kasvatusta 9 alhaisempi. Ratkaisevia tekijöitä prosessin kannattavuuden osalta liittyvätkin lopputuotteen markkinahinnan lisäksi erilaisten raaka-aineiden hankintakustannuksiin ja raaka-aineen vaikutuksiin liittyen prosessin kestoon ja jälkikäsitteilyihin suhteessa prosessin operointikustannuksiin. Entsyymien kohdalla myös tuotetun entsyymin tai entsyymiseoksen erilaiset ominaisuudet kuten esimerkiksi pH- ja lämpötilaoptimi sekä entsyymiaktiivisuus ovat ratkaisevassa asemassa. Tässä työssä ei arvioida tai vertailla kasvatuksissa käytettyjen raaka-aineiden ja yhdisteiden kustannuksia tarkemmin keskenään niiden salassapidettävyyden takia.

5.3 Bioreaktorikasvatukset - entsyymiprofiilit

Kuvassa 27 on esitetty SDS-PAGE geelien Coomassie-värjätyistä tuloksista muodostettu yhteenveto jokaisen bioreaktorikasvatuksen suurimman mitatun proteiinipitoisuuden omaavan näytteen osalta. Laimennettua näytettä pipetoitiin geelille aina saman verran, mutta näytteiden laimennoksien osalta ei ole huomioitu eri proteiinipitoisuuksia näytteiden välillä. Näin ollen suurimman pitoisuuden omaavan näytteen osalta myös pitoisuutta kuvaava värisävy on samassa suhteessa tummempi. Taulukossa 4 on esitetty *T. reesei*:n tuottamia entsyymejä eri molekyylipainon mukaan, ja taulukkoa voidaan käyttää apuna arvioimaan kuvassa 27 näkyviä entsyymiprofiileita.



Kuva 27. Coomassie-värjätyistä SDS-PAGE geeleistä muodostettu yhteenveto kasvatuksien suurimpien proteiinipitoisuuden omaavien näytteiden osalta. Vasemmalla lukuarvoina molekyylistandardin molekyyllipainot.

Kuvan 27 perusteella jokaisen kasvatuksen osalta voidaan todeta tapahtuneen tyypillistä *T. reesei*:n sellulaasien tuottoa, ja näin ollen kasvatuksissa käytetyt kannat sekä raaka-aineet ovat toimineet. Taulukon 4 perusteella ja proteiinipitoisuuksien erot huomioiden, voidaan kuitenkin todeta kasvatuksien 1-6 tuottaneen enemmän 15-20 kDa molekyyllipainon alueella olevia hemisellulaaseihin kuuluvia ksylanaaseja verrattuna kasvatuksiin 7-12. Lisäksi kasvatuksien 3 ja 4 osalta havaitaan alueella 20-50 kDa jokseenkin poikkeava entsyymiprofiili muihin kasvatuksiin verrattuna. Myös muiden kasvatuksien osalta on nähtävissä eroavaisuuksia entsyymiprofiilien välillä. Entsyymiprofiilien osalta ei suoriteta tarkempaa analyysiä tässä työssä entsyymiaktiivisuusmittausten ja spesifisten standardien puuttumisen vuoksi.

Taulukko 4. Esimerkkejä *T. reesei*:n erittämistä sellulaaseista ja hemisellulaaseista molekyylipainon mukaan.

Entsyymi	Molekyylipaino (kDa)	Lähde
β -ksylosidaasi (BXL)	100	Poutanen & Puls (1988)
β -glukosidaasi I (BGL I / Cel3A)	75 / 71	Kunamneni ym. (2014); Palonen (2004).
Sellobiohydraasi I (CBH I / Cel7A)	59-68	Kunamneni ym. (2014); Palonen (2004)
Sellobiohydraasi II (CBH II / Cel6A)	50-58	Kunamneni ym. (2014); Palonen (2004).
Lyyttinen polysakkaridimono-oksigenaasi (LPMO / Cel61A)	55	Kunamneni ym. (2014); Pierce ym. (2017)
Endoglukanaasi I (EG I / Cel7B)	50-55	Kunamneni ym. (2014); Palonen (2004).
α -l-arabinofuranosidaasi (ABF I)	53	Poutanen (1988)
Endoglukanaasi II (EG II / Cel5A)	48	Kunamneni ym. (2014); Palonen (2004).
β -mannanaasi (Man I / Man5A)	44-48	Arisan-Atac ym. (1993)
Ksylanaasi IV (XYN IV)	43	Kunamneni ym. (2014)
Ksylanaasi III (XYN III)	32	Kunamneni ym. (2014)
Endoglukanaasi III (EG III / Cel12A)	25	Kunamneni ym. (2014); Palonen (2004).
Endoglukanaasi V (EG V / Cel45A)	23	Kunamneni ym. (2014); Palonen (2004).
Ksylanaasi II (XYN II)	20	Kunamneni ym. (2014)
Ksylanaasi I (XYN I)	19	Kunamneni ym. (2014)

Taulukko 4 sisältää vain osan tunnetuista *T. reesei*:n tuottamista entsyymeistä. Taulukosta on jätetty pois esimerkiksi β -glukosidaasi II (BGL II/Cel1A), jonka on todettu tutkimuksissa olevan mitä todennäköisimmin *T. reesei*:n osalta vain solunsisäisesti tuottuva entsyymi (Saloheimo ym., 2002, s. 4552).

6 YHTEENVETO JA POHDINTA

Työssä selvitettiin erilaisten raaka-aineiden käyttökelpoisuutta entsyymien, kuten esimerkiksi sellulaasien ja hemisellulaasien tuottamiseksi geneettisesti muunneltuja *Trichoderma reesei* -kantoja käyttäen. Työssä käytettiin kahta erilaista *T. reesei* -kantalinjaa, joista toinen edusti uudenlaista glukoosilla entsyymejä tuottavaa kantatyyppiä, ja toinen perinteisempää kantatyyppiä. Perinteisemmällä kantalinjalla ei saada aikaan tehokasta entsyymien tuottoa glukoosilla, ja ne tarvitsevat siten erityiset indusoivat raaka-aineet tuottaakseen entsyymejä tehokkaasti.

Glukoosilla kasvatetut kannat saatiin tuottamaan entsyymejä glukoosipohjaisella prosessilla kaikkia raaka-aineita käyttäen. Tällä kantatyyppillä ”Komponentti A”:n ja ”Komponentti B”:n suora vaikutus indusoivana raaka-aineena jäi kuitenkin epäselväksi, koska tuottovaihe näytti alkaneen vasta glukoosisyötön aloittamisen jälkeen. ”Komponentti A”:n todettiin myös soveltuvaksi korvaamaan esimerkiksi typenlähteenä hiivauutetta. Transglykosylaatioliuoksen sisältämän glukoosin takia liuosta käytettiin vain glukoosilla entsyymejä tuottavalla kantatyyppillä yhdessä ”Komponentti A”:n kanssa, ja sen avulla onnistuttiin myös tuottamaan entsyymejä.

Toisella perinteisempää kantatyyppiä edustavilla kannoilla onnistuttiin tuottamaan entsyymejä kaikilla testatuilla raaka-aineilla. ”Komponentti A”:n ja ”Komponentti B”:n osalta todettiin selkeämpää entsyymien tuottoa, ja ”Komponentti A”:n todettiin soveltuvan korvaamaan käytettyä rankkia. Lisäksi ”Komponentti B”:n osalta havaittiin bioreaktorikasvatuksissa selvästi hitaampi alkuvaihe molemmilla kantatyypeillä, mutta syy hitaammalle alkuvaiheelle jäi epäselväksi. On mahdollista, että ”Komponentti B” on jo itsessään sisältänyt jotakin kasvua estävää tai hidastavaa tuntemattomaksi jäänyttä yhdistettä, jolloin tarvittaisiin pidempi adaptoitumisaika soluille esikasvatusvaiheessa, tai mahdollisesti jonkinlainen esikäsitteily ”Komponentti B”:lle.

Suoritettujen bioreaktorikasvatuksien osalta saatiin varsin vaihtelevia tuloksia tuotetun proteiinimäärän (kuvaa tässä työssä tuotettujen entsyymien määrää), saantojen ja tuotavuuksien osalta kuten yhteenvedosta kuvassa 26 nähtiin. Joidenkin kasvatuksien osalta nähtiin myös selkeä tuottovaiheen loppuminen kesken kasvatuksen. Syynä voivat olla tuoton osalta epäedulliseksi muuttuneet kasvatusolosuhteet esimerkiksi syötetyn substraatin määrässä suhteessa biomassaan, tai mahdollisesti kantoihin geenitasolla

liittyvät ongelmat eri entsyymien tuoton säätelyn osalta. Näiden selvittämiseksi tarvittaisiin lisätutkimuksia tuottoprosessien optimoimiseksi.

SDS-PAGE geelien avulla saatiin alustava tieto kantojen tuottamasta entsyymiprofiilista ja niiden eroavaisuuksista. Kaikkien kasvatuksien osalta oli nähtävissä sellulaasien ja hemisellulaasien tuottoa, mutta glukoosilla entsyymejä tuottavan kantatyypin kohdalla nähtiin esimerkiksi ksylanaasi I ja ksylanaasi II osalta perinteisempää kantatyyppiä suurempi tuotto. On kuitenkin syytä huomioida, että todellisen näytteen sisältämän entsyymin varmistamiseksi tarvittaisiin SDS-PAGE geelin osalta jokaisen entsyymin kohdalle oma spesifinen standardi, ja lisäksi olisi hyvä suorittaa erilliset entsyymiaktiivisuusmääritykset halutun entsyymin tai koko entsyymiseoksen osalta. Entsyymien tehokkuutta kuvaavat entsyymiaktiivisuusmääritykset jätettiin työmäärän rajaamisen vuoksi työn ulkopuolelle, mutta bioreaktorikasvatuksien aikana otetut kasvatusnäytteet säilöttiin mahdollisia myöhempiä jatkotutkimuksia varten. Työn resurssien osalta haluttiin maksimoida mahdollisimman laajat alustavat kokeet, joiden tulosten pohjalta voitaisiin päättää olisiko työssä käytettävillä raaka-aineilla ja kannoilla suurempaa potentiaalia mahdollisiin jatkokekeisiin.

Uusien geenimuuntelutekniikoiden myötä, kuten esimerkiksi CRISPR-Cas9-menetelmällä uusien kantojen muodostaminen on nopeutunut ja tullut helpommaksi. Tämä avaa edelleen uusia mahdollisuuksia *T. reesei*:n osalta, jotta kantoja saadaan valjastettua tuottamaan heterologisia tai homologisia rekombinanttiproteiineja entistä tehokkaammin ja puhtaampina. Nopeutuneiden geenimuokkaustekniikoiden myötä muodostettavien geneettisesti muunneltujen kantojen määrä kuitenkin kasvaa. Pitkien bioreaktorikasvatuksien suorittaminen on varsin työlästä, jolloin nopeat ja luotettavat ensimmäisen vaiheen seulontamenetelmät (esimerkiksi automaation ja robotiikan lisääminen kasvatuksissa) todennäköisesti tulevat nousemaan entistä tärkeämpään rooliin parhaimpien tuotokantojen tunnistamiseksi. Tämä tulee olemaan tärkeää etenkin *T. reesei*:n osalta, jonka erilaiset tuottomekanismit voivat olla hyvin tarkkaan säädelyjä ja voivat vaatia varsin optimoidut olosuhteet toimiakseen kunnolla.

Kirjallisuudessa ei tiettävästi ole vielä raportoitu *T. reesei*:n osalta pääasiassa glukoosin käyttöön perustuvaa entsyymituottoa teollisessa mittakaavassa, mutta glukosin ja erilaisten melassien hyödyntämiseen perustuvat tuottoprosessit voi hyvinkin tulevaisuudessa osoittautua tehokkaaksi tavaksi tuottaa proteiineja, jos tuotokantoja ja prosessiolosuhteita onnistutaan optimoimaan riittävästi.

LÄHTEET

Adav, S. S., Chao, L. T., & Sze, S. K. (2012). Quantitative secretomic analysis of *Trichoderma reesei* strains reveals enzymatic composition for lignocellulosic biomass degradation. *Molecular & cellular proteomics*, 11(7), M111-012419. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.012419>

Aittomäki, E., Eerikäinen, T., Leisola, M., Ojamo, H., Suominen, I., & von Weymarn, N. (2002). *Bioprosessiteknikka*. Werner Söderström Osakeyhtiö. Porvoo

AMFEP (Association of Manufacturers and Formulators of Enzyme Products). (2015). List of commercially available enzymes. Verkkodokumentti. <https://amfep.org/_library/_files/Amfep_List_of_Enzymes_update_May_2015.pdf>. Luettu 6.8.2021.

Application A1169. (2018). An Alpha-glucosidase enzyme from a recombinant strain of *Trichoderma reesei*. <https://www.foodstandards.gov.au/code/applications/Pages/A1169.aspx>

Application A1195. (2019). An Alpha-Amylase Enzyme from a recombinant strain of *Trichoderma reesei*. <https://www.foodstandards.gov.au/code/applications/Pages/A1195.aspx>

Arisan-Atac, I., Hodits, R., Kristufek, D., & Kubicek, C. P. (1993). Purification, and characterization of a β -mannanase of *Trichoderma reesei* C-30. *Applied microbiology and biotechnology*, 39(1), 58-62. <https://doi.org/10.1007/BF00166849>

Arnau J., Yaver D., Hjort C.M. (2020). Strategies and Challenges for the Development of Industrial Enzymes Using Fungal Cell Factories. In: Nevalainen H. (eds) *Grand Challenges in Fungal Biotechnology. Grand Challenges in Biology and Biotechnology*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-29541-7_7

Aro, N. (2003). Characterization of novel transcription factors ACEI and ACEII involved in regulation of cellulase and xylanase genes in *Trichoderma reesei*: Dissertation. VTT Technical Research Centre of Finland. <http://www.vtt.fi/inf/pdf/publications/2003/P488.pdf>

Bailey, M. J., Buchert, J., & Viikari, L. (1993). Effect of pH on production of xylanase by *Trichoderma reesei* on xylan- and cellulose-based media. *Applied microbiology and biotechnology*, 40(2), 224-229. <https://doi.org/10.1007/BF00170371>

Bailey M., Tähtiharju J. (2003). Efficient cellulase production by *Trichoderma reesei* in continuous cultivation on lactose medium with a computer-controlled feeding strategy. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1276-9>

Bazafkan, H., Tisch, D., & Schmoll, M. (2014). Regulation of glycoside hydrolase expression in *Trichoderma*. *Biotechnology and biology of Trichoderma*, 291-308. <https://doi.org/10.1016/B9780-444-59576-8.00020-5>

Bischof, R.H., Ramoni, J. & Seiboth, B. (2016). Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. *Microb Cell Fact* 15, 106. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0507-6>

Bio-Rad. A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection. Verkkodokumentti. <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf>. Luettu 15.7.2021.

Bio-Rad LIT448 Rev D. DC Protein Assay Instruction Manual. Verkkodokumentti. <<https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT448.pdf>>. Luettu 23.7.2021.

Brown, A., Waldheim, L., Landälv, I., Saddler, J., Ebadian, M., McMillan, J. D., Bonomi, A., & Klein, B. (2020). Advanced Biofuels—Potential for Cost Reduction. *IEA Bioenergy*, 88.

Verkkodokumentti. <https://www.ieabioenergy.com/wp-content/uploads/2020/02/T41_CostReductionBiofuels-11_02_19-final.pdf>. Luettu 6.8.2021.

Chapman, J., Ismail, A. E., & Dinu, C. Z. (2018). Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts*, 8(6), 238. <https://doi.org/10.3390/catal8060238>

Cherry, J. R., & Fidantsef, A. L. (2003). Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current opinion in biotechnology*, 14(4), 438-443. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00099-5](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00099-5)

Derntl, C., Gudynaite-Savitch, L., Calixte, S., White, T., Mach, R. L., & Mach-Aigner, A. R. (2013). Mutation of the Xylanase regulator 1 causes a glucose blind hydrolase ex-pressing phenotype in industrially used *Trichoderma* strains. *Biotechnology for biofuels*, 6(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-62>

Do Vale, L. H., Edivaldo Filho, X. F., Miller, R. N., Ricart, C. A., & de Sousa, M. V. (2014). Cellulase systems in *Trichoderma*: an overview. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, 229-244. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00016-3>

EFSA Journal 2018;16(7):5342. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., Bastos, M. D. L., ... & Cocconcelli, P. S. (2018). Safety and efficacy of muramidase from *Trichoderma reesei* DSM 32338 as a feed additive for chickens for fattening and minor poultry species. *EFSA Journal*, 16(7), e05342. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5342>

EFSA Journal 2021;19(4):6539. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), Bampidis, V., Azimonti, G., Bastos, M. D. L., Christensen, H., Dusemund, B., ... & Pettenati, E. (2021). Safety and efficacy of the feed additive consisting of endo-1, 4-beta-xylanase produced by *Trichoderma reesei* CBS 143953 (Danisco Xylanase 40000 G/L) for poultry and porcine species (Danisco Animal Nutrition). *EFSA Journal*, 19(4), e06539.

EFSA Journal 2019;17(10):5826. EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids (CEP), Silano, V., Barat Baviera, J. M., Bolognesi, C., Cocconcelli, P. S., Crebelli, R., ... & Chesson, A. (2019). Safety evaluation of the food enzyme 4-phytase from a genetically modified *Trichoderma reesei* (strain DP-Nzt55). *EFSA Journal*, 17(10), e05826.

Ellilä, S., Kujanpää, L., Marjamaa, K., Paasikallio, T., Saloheimo, M., & Aro, N. (2018). Cost-efficient sugar-based cellulase production. In E. Hytonen, & J. Vepsäläinen (Eds.), *NWBC 2018: Proceedings of the 8th Nordic Wood Biorefinery Conference* (pp. 185-192). VTT Technical Research Centre of Finland. VTT Technology No. 340. <https://www.vtt.fi/inf/pdf/technology/2018/T340.pdf>

Ellilä, S., Fonseca, L., Uchima, C., Cota, J., Goldman, G. H., Saloheimo, M., Sacon, V., & Siika-Aho, M. (2017). Development of a low-cost cellulase production process using *Trichoderma reesei* for Brazilian biorefineries. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0717-0>

Ercili-Cura, D., & Barth, D. (2021). *Cellular Agriculture: Lab Grown Foods*. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.infocus.7e4007>

EY 1332/2008. Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1332/2008 elintarvike-entsyymeistä. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FI/TXT/?uri=CELEX:32008R1332>

EY 1333/2008. Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1333/2008 elintarvikelisiä aineista. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/fi/TXT/?uri=CELEX:32008R1333>

EY 1831/2003. Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1831/2003 eläinten ruokinnassa käytettävistä lisäaineista. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FI/TXT/?uri=CELEX:32003R1831>

Ferreira, N. L., Margeot, A., Blanquet, S., & Berrin, J. G. (2014). Use of cellulases from *Trichoderma reesei* in the twenty-first century—part I: current industrial uses and future applications in the production of second ethanol generation. In *Biotechnology and biology of Trichoderma* (pp. 245-261). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00017-5>

Ferreira, R., Petrides, D. (2020). Industrial Enzymes Production - Process Modeling and Techno-Economic Assessment (TEA) using SuperPro Designer. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.19188.09604>

Fonseca, L. M., Parreiras, L. S., & Murakami, M. T. (2020). Rational engineering of the *Trichoderma reesei* RUT-C30 strain into an industrially relevant platform for cellulase production. *Biotechnology for biofuels*, 13, 1-15. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01732-w>

Frisvad, J. C., Møller, L. L., Larsen, T. O., Kumar, R., & Arnau, J. (2018). Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(22), 9481-9515. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9354-1>

Gao, J., Qian, Y., Wang, Y., Qu, Y., & Zhong, Y. (2017). Production of the versatile cellulase for cellulose bioconversion and cellulase inducer synthesis by genetic improvement of *Trichoderma reesei*. *Biotechnology for biofuels*, 10(1), 1-16. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0963-1>

Gomes D, Cunha J, Zanuso E, Teixeira J, Domingues L. (2021). Strategies towards Reduction of Cellulases Consumption: Debottlenecking the Economics of Lignocellulosics Valorization Processes. *Polysaccharides.*; 2(2):287-310. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides2020020>

Gomes E., de Souza A.R., Orjuela G.L., Da Silva R., de Oliveira T.B., Rodrigues A. (2016) Applications and Benefits of Thermophilic Microorganisms and Their Enzymes for Industrial Biotechnology. In: Schmoll M., Dattenböck C. (eds) *Gene Expression Systems in Fungi: Advancements and Applications*. Fungal Biology. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27951-0_21

GRAS Notice No. 32. (1999). Pectin lyase derived from *Trichoderma reesei* carrying a gene encoding pectin lyase from *Aspergillus niger*. <http://wayback.archive-it.org/7993/20171031055001/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm265974.pdf>

GRAS Notice No. 230. (2007). Chymosin enzyme preparation from *Trichoderma reesei* expressing the bovine prochymosin B gene. <http://wayback.archive-it.org/7993/20171031055001/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm264067.pdf>

GRAS Notice No. 315. (2010). Transglucosidase enzyme preparation from *Trichoderma reesei* expressing the gene encoding transglucosidase from *Aspergillus niger*. <http://wayback.archive-it.org/7993/20171031055001/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm269484.pdf>

GRAS Notice No. 372. (2011). Glucoamylase enzyme preparation from *Trichoderma reesei* expressing the glucoamylase gene from *T. reesei* (glucoamylase enzyme preparation). <http://wayback.archive-it.org/7993/20171031055001/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm274592.pdf>

GRAS Notice No.557. (2014). Polygalacturonase from *Aspergillus tubingensis* expressed in *Trichoderma reesei*. <http://wayback.archive-it.org/7993/20171031055001/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm439605.pdf>

GRAS Notice No. 558. (2014). Pectin esterase from *Aspergillus tubingensis* expressed in *Trichoderma reesei*. <http://wayback.archive-it.org/7993/20171031055001/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm438821.pdf>

GRAS Notice No. 566. (2015). Mannanase from *Trichoderma reesei*. <http://wayback.archive-it.org/7993/20171031055001/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm441270.pdf>

GRAS Notice No. 628. (2016). Endo-1,4-beta-xylanase from *Trichoderma reesei*. <https://wayback.archive-it.org/7993/20190208035755/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm505388.pdf>

GRAS Notice No. 631. (2016). Triacylglycerol lipase from *Fusarium oxysporum* produced in *Trichoderma reesei*. <https://wayback.archive-it.org/7993/20190208035755/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm505390.pdf>

GRAS Notice No. 653. (2016). Lysophospholipase from *Aspergillus nishimurae* expressed in *Trichoderma reesei*. <https://www.fda.gov/media/99768/download>

GRAS Notice No. 675. (2016). Xylanase enzyme preparation produced by *Trichoderma reesei* carrying a xylanase gene from *Talaromyces leycettanus*. <https://www.fda.gov/media/101642/download>

GRAS Notice No. 680. (2016). Alpha-L-arabinofuranosidase from *Talaromyces pinophilus* produced by *Trichoderma reesei*. <https://www.fda.gov/media/102936/download>

GRAS Notice No. 703. (2017). Alpha-glucosidase from *Aspergillus niger* produced by *Trichoderma reesei*. <https://www.fda.gov/media/109107/download>

GRAS Notice No. 707. (2017). Glucose oxidase from *Penicillium* produced in *Trichoderma reesei*. <https://www.fda.gov/media/106976/download>

GRAS Notice No. 727. (2017). Trehalase from *Trichoderma reesei* produced in *Trichoderma reesei*. <https://www.fda.gov/media/111841/download>

GRAS Notice No. 756. (2018). Endo-1,4-beta-glucanase from *Trichoderma reesei*. <https://www.fda.gov/media/122556/download>

GRAS Notice No. 808. (2018). Lipase from *Aspergillus tubingensis* produced in *Trichoderma reesei*. <https://www.fda.gov/media/133990/download>

GRAS Notice No. 817. (2018). Serine endopeptidase from *Malbranchea cinnamomea* produced in *Trichoderma reesei*. <https://www.fda.gov/media/135209/download>

GRAS Notice No. 853. (2019). Lysozyme produced by *Trichoderma reesei*. <https://www.fda.gov/media/135212/download>

GRAS Notice No. 863. (2019). β -lactoglobulin produced by *Trichoderma reesei*. <https://www.fda.gov/media/136754/download>

GRAS Notice No. 891. (2019). Cellulase produced by *Trichoderma reesei*. <https://www.fda.gov/media/138476/download>

Gremel, G., Dorrer, M., & Schmoll, M. (2008). Sulphur metabolism and cellulase gene expression are connected processes in the filamentous fungus *Hypocrea jecorina* (anamorph *Trichoderma reesei*). *BMC microbiology*, 8(1), 1-18. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-174>

Gryshyna A., Kautto L., Peterson R., Nevalainen H. (2016). On the Safety of Filamentous Fungi with Special Emphasis on *Trichoderma reesei* and Products Made by Recombinant Means. In: Schmoll M., Dattenböck C. (eds) *Gene Expression Systems in Fungi: Advancements and Applications*. Fungal Biology. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27951-0_20

Gudynaite-Savitch L., White T.C. (2016) Fungal Biotechnology for Industrial Enzyme Production: Focus on (Hemi)cellulase Production Strategies, Advances and Challenges. In: Schmoll M.,

- Dattenböck C. (eds) *Gene Expression Systems in Fungi: Advances and Applications*. Fungal Biology. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27951-0_19
- Humbird, D, Davis, R, Tao, L, Kinchin, C, Hsu, D, Aden, A, Schoen, P, Lukas, J, Olthof, B, Worley, M, Sexton, D, & Dudgeon, D. (2011). Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol: Dilute-Acid Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover. United States. <https://doi.org/10.2172/1013269>
- Ilmen, M., Saloheimo, A. N. U., Onnela, M. L., & Penttilä, M. E. (1997). Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Applied and environmental microbiology*, 63(4), 1298-1306. <https://doi.org/10.1128/aem.63.4.1298-1306.1997>
- Iram, A., Cekmecelioglu, D., & Demirci, A. (2020). Distillers' dried grains with solubles (DDGS) and its potential as fermentation feedstock. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 6115-6128. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10682-0>
- Johnson, Eric. (2016). Integrated enzyme production lowers the cost of cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 10: 164–174. <https://doi.org/10.1002/bbb.1634>
- Klein-Marcuschamer, D., Oleskowicz-Popiel, P., Simmons, B.A. and Blanch, H.W. (2012), The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. *Biotechnol. Bioeng.*, 109: 1083–1087. <https://doi.org/10.1002/bit.24370>
- Kunamneni, A., Plou, F. J., Alcalde, M., & Ballesteros, A. (2014). *Trichoderma* enzymes for food industries. In *Biotechnology and biology of Trichoderma* (pp. 339–344). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00024-2>
- Lalli, M., Reuter, L. (2016). *Bioteekniikan neuvottelukunta, Biosanasto, 2016*, Helsinki. Verkko-dokumentti. <<http://www.btnk.fi/files/pdf/Julkaisu/Biosanasto.pdf>>. Luettu 7.10.2021
- Li, Y., Liu, C., Bai, F., & Zhao, X. (2016). Overproduction of cellulase by *Trichoderma reesei* RUT C30 through batch-feeding of synthesized low-cost sugar mixture. *Bioresource technology*, 216, 503-510. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.108>
- Liu, G., Zhang, J., & Bao, J. (2016). Cost evaluation of cellulase enzyme for industrial-scale cellulosic ethanol production based on rigorous Aspen Plus modeling. *Bioprocess and biosystems engineering*, 39(1), 133–140. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1497-1>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193, 265-275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Lynch, K. M., Steffen, E. J., & Arendt, E. K. (2016). Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(4), 553-568. <https://doi.org/10.1002/jib.363>
- Maniatis K, Landalv I, Waldheim L, van den Heuvel E and Kalligeros S. (2017). Building Up the Future - Cost of Biofuel. European Commission, Luxembourg. <https://doi.org/10.2832/163774>
- Mach-Aigner, A. R., Pucher, M. E., & Mach, R. L. (2010). D-Xylose as a repressor or inducer of xylanase expression in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Applied and environmental microbiology*, 76(6), 1770-1776. <https://doi.org/10.1128/AEM.02746-09>
- Mach-Aigner, A. R., Gudynaite-Savitch, L., & Mach, R. L. (2011). L-Arabitol is the actual inducer of xylanase expression in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Applied and environmental microbiology*, 77(17), 5988-5994. <https://doi.org/10.1128/AEM.05427-11>
- Nevalainen, H., & Peterson, R. (2014). Heterologous expression of proteins in *Trichoderma*. In *Biotechnology and biology of Trichoderma* (pp. 89-102). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00007-2>

Nordlund, E. (2019). Innovation for protein selfsufficiency in Finland. Verkko-dokumentti. <https://www.vyr.fi/document/1/907/f916414/protei_1cf5274_Nordlund_Innovation_for_protein_self_sufficie.pdf>. Luettu 30.8.2021

Olofsson, J., Barta, Z., Börjesson, P. et al. Integrating enzyme fermentation in lignocellulosic ethanol production: life-cycle assessment and techno-economic analysis. *Biotechnol Biofuels* 10, 51 (2017). <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0733-0>

Osborne, S. (2007). Energy in 2020: assessing the economic effects of Commercialization of cellulosic ethanol. U.S. Department of Commerce, International Trade Administration. Verkko-dokumentti. <https://www.trade.gov/sites/default/files/2020-12/Energy%20in%202020_Assessing%20the%20Economic%20Effects%20of%20Commercialization%20of%20Cellulosic%20Ethanol.pdf>. Luettu 29.7.2021.

Paloheimo M., Haarmann T., Mäkinen S., Vehmaanperä J. (2016). Production of Industrial Enzymes in *Trichoderma reesei*. In: Schmoll M., Dattenböck C. (eds) *Gene Expression Systems in Fungi: Advancements and Applications*. Fungal Biology. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27951-0_2

Palonen, H. (2004). Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose: Dissertation. VTT Technical Research Centre of Finland. <http://www.vtt.fi/inf/pdf/publications/2004/P520.pdf>

Pakula, T. M., Nygren, H., Barth, D., Heinonen, M., Castillo, S., Penttilä, M., & Arvas, M. (2016). Genome wide analysis of protein production load in *Trichoderma reesei*. *Bio-technology for bio-fuels*, 9(1), 1-26. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0547-5>

Piepenbrink, M. S., Marr, A. L., Waldron, M. R., Butler, W. R., Overton, T. R., Vázquez-Añón, M., & Holt, M. D. (2004). Feeding 2-hydroxy-4-(methylthio)-butanoic acid to peri-parturient dairy cows improves milk production but not hepatic metabolism. *Journal of dairy science*, 87(4), 1071-1084. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73253-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73253-1)

Pierce, B. C., Agger, J. W., Wichmann, J., & Meyer, A. S. (2017). Oxidative cleavage and hydrolytic boosting of cellulose in soybean spent flakes by *Trichoderma reesei* Cel61A lytic polysaccharide monooxygenase. *Enzyme and microbial technology*, 98, 58-66. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.12.007>

Poutanen, K. (1988). An α -L-arabinofuranosidase of *Trichoderma reesei*. *Journal of biotechnology*, 7(4), 271-281. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(88\)90039-9](https://doi.org/10.1016/0168-1656(88)90039-9)

Poutanen, K., & Puls, J. (1988). Characteristics of *Trichoderma reesei* β -xylosidase and its use in the hydrolysis of solubilized xylans. *Applied microbiology and biotechnology*, 28(4), 425-432. <https://doi.org/10.1007/BF00268208>

Qian, Y., Zhong, L., Sun, Y., Sun, N., Zhang, L., Liu, W., ... & Zhong, Y. (2019). Enhancement of cellulase production in *Trichoderma reesei* via disruption of multiple protease genes identified by comparative secretomics. *Frontiers in microbiology*, 10, 2784. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02784>

Ramoni, J., Seidl-Seiboth, V., Bischof, R. H., & Seiboth, B. (2016). Gene Expression Systems in Industrial Ascomycetes: Advancements and Applications. In *Gene Expression Systems in Fungi: Advancements and Applications* (pp. 3-22). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27951-0_1

Rantasalo, A., Landowski, C. P., Kuivanen, J., Korppoo, A., Reuter, L., Koivistoinen, O., Valkonen, M., Penttilä, M., Jäntti, J., & Mojzita, D. (2018). A universal gene expression system for fungi. *Nucleic Acids Research*, 46(18), e111. <https://doi.org/10.1093/nar/gky558>

Rantasalo, A., Vitikainen, M., Paasikallio, T., Jäntti, J., Landowski, C. P., & Mojzita, D. (2019). Novel genetic tools that enable highly pure protein production in *Trichoderma reesei*. *Scientific Reports*, 9(1), [5032]. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41573-8>

Ruokavirasto. (2019). Elintarviketieto-opas elintarvikevalvojille ja elintarvikealan toimijoille. Ruokaviraston ohje 17068/2. Verkkodokumentti. <https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/tietoa-meista/asiointi/oppaat-ja-lomakkeet/yritykset/elintarvikeala/elintarvikealan-oppaat/elintarviketieto_opas_fi.pdf>. Luettu 27.8.2021.

Ruokavirasto. (2020). Elintarvikeparanteiden valvontaohje -lisäaineet, aromit ja entsyymit. Ohje 5731/04.02.00.01/2020/5. Verkkodokumentti. <https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/tietoa-meista/asiointi/oppaat-ja-lomakkeet/yritykset/elintarvikeala/kemialliset-vaatimukset/valvonta-ohje_lisaaineet_aromit_entsyymit_5731_5_ja_liite_fi.pdf>. Luettu 27.8.2021.

Saloheimo, M., Kuja-Panula, J., Ylösmäki, E., Ward, M., & Penttilä, M. (2002). Enzymatic properties and intracellular localization of the novel *Trichoderma reesei* β -glucosidase BGLII (Cel1A). *Applied and environmental Microbiology*, 68(9), 4546-4553. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4546-4553.2002>

Saloheimo, M., & Pakula, T. M. (2012). The cargo and the transport system: secreted proteins and protein secretion in *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*). *Microbiology*, 158(1), 46-57. <https://doi.org/10.1099/mic.0.053132-0>

Saloheimo, M., Pakula, T., Aro, N., & Joensuu, J. (2014). Protein production: Quality control and secretion stress responses in *Trichoderma reesei*. In: Gupta VK, Schmolli M, Herrera-Estrella A, Upadhyay RS, Druzhinina I, Tuohy M (eds) *Biotechnology and biology of Trichoderma*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00006-0>

Sharma, B., Larroche, C., & Dussap, C. G. (2020). Comprehensive assessment of 2G bioethanol production. *Bioresource technology*, 313, 123630. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123630>

Singh, G., Verma, A. K., & Kumar, V. (2016). Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of β -glucosidases. *3 Biotech*, 6(1), 3. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0328-z>

Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6(2), 174. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8>

Singhania, R. R. (2011). Production of cellulolytic enzymes for the hydrolysis of lignocellulosic biomass. In *Biofuels* (pp. 177-201). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385099-7.00008-5>

Sun, Y., Qian, Y., Zhang, J., Wang, Y., Li, X., Zhang, W., ... & Zhong, Y. (2021). Extracellular protease production regulated by nitrogen and carbon sources in *Trichoderma reesei*. *Journal of Basic Microbiology*, 61(2), 122-132. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000566>

Susmozas, A., Martín-Sampedro, R., Ibarra, D., Eugenio, M. E., Iglesias, R., Manzanares, P., & Moreno, A. D. (2020). Process strategies for the transition of 1G to advanced bioethanol production. *Processes*, 8(10), 1310. <https://doi.org/10.3390/pr8101310>

Suokko, A. (2010). Lignoselluloosaetanoliin ja synteetisikaasusta fermentoitujen polttonesteiden teknologiatarkastelu. Verkkodokumentti. VTT Technical Research Centre of Finland. VTT Tiedotteita - Research Notes No. 2533. <<http://www.vtt.fi/inf/pdf/tiedotteet/2010/T2533.pdf>>. Luettu 25.7.2021.

Tipton, K. (2018). Translocases (EC 7): A new EC Class. Verkkodokumentti. <<https://iubmb.org/wp-content/uploads/sites/10116/2018/10/Translocases-EC-7.pdf>>. Luettu 7.10.2021

Tipton, K., McDonald, A. (2018). NC-IUBMB Enzyme List. Verkkodokumentti. <<https://iubmb.org/wp-content/uploads/sites/10116/2018/11/A-Brief-Guide-to-Enzyme-Classification-and-Nomenclature-rev.pdf>>. Luettu 7.10.2021

US 7713725B2. (2010). Induction of gene expression using a high concentration sugar mixture. Danisco US Inc, Yhdysvallat. (England, G., Kelley, A., Mitchinson, C.) 10/660,123, 10.9.2003. Julk. 24.6.2004. 16 s.

Villegas-Torres, M. F., Ward, J. M., & Lye, G. J. (2015). The protein fraction from wheat-based dried distiller's grain with solubles (DDGS): extraction and valorization. *New biotechnology*, 32(6), 606-611. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.01.007>

Walsh, G. (2002). *Proteins: Biochemistry and Biotechnology*. John Wiley & Sons Ltd, Englanti

Walsh, G. (2014). *Proteins: Biochemistry and Biotechnology*. John Wiley & Sons, Incorporated, ProQuest Ebook Central.

Westermeier, Reiner. (2016). *Electrophoresis in Practice: A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations*, John Wiley & Sons, Incorporated, ProQuest Ebook Central.

Wilson, D. B. (2011). Microbial diversity of cellulose hydrolysis. *Current opinion in microbiology*, 14(3), 259-263. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.04.004>

Alustakomponentit

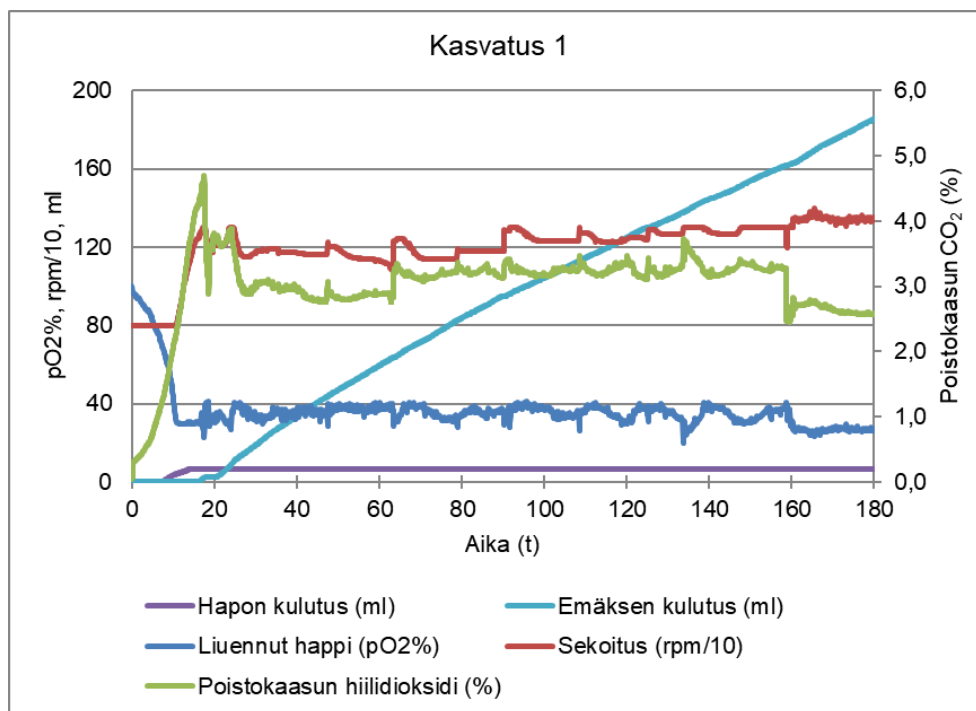
Kasvatusalustojen suolat, hivenaineet sekä vaahdonestoaine pitoisuuksineen:

KH_2PO_4	15,0 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5,0 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,59 g/l
CaCl_2	0,45 g/l
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,0 mg/l
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3,7 mg/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,4 mg/l
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,6 mg/l
Vaahdonestoaine	2,0 ml/l

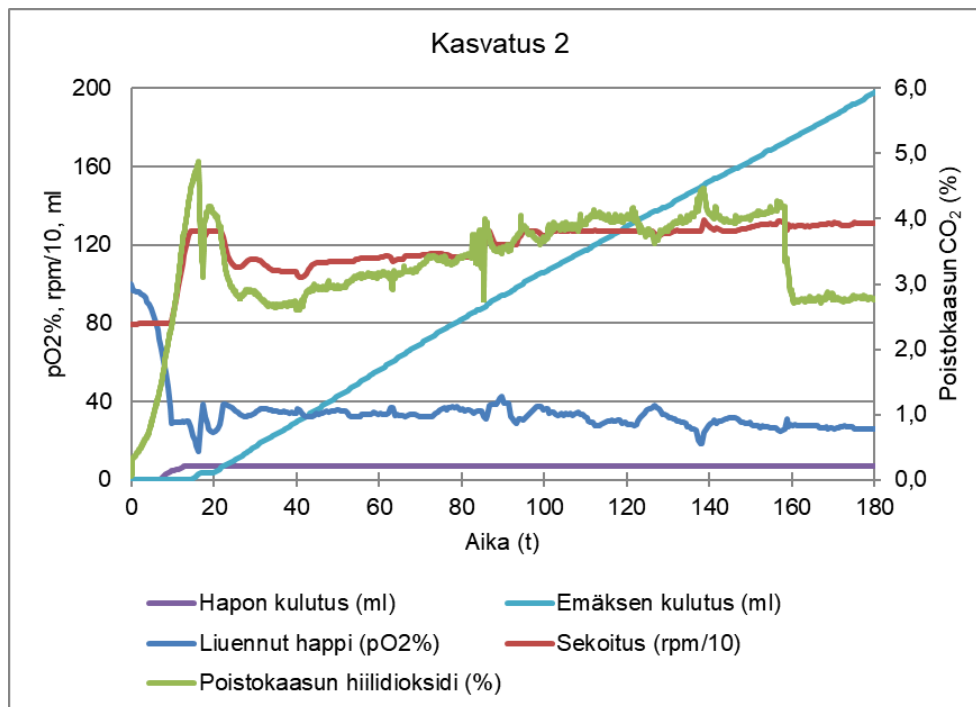
Kasvatuskohtaiset alustakomponentit ilman tarkkoja pitoisuuksia:

- Glukoosi: liukoinen alustakomponentti.
- Laktoosi: liukoinen alustakomponentti.
- Hiivauute: liukoinen kompleksinen alustakomponentti sisältäen orgaanisen typpilähteen.
- Rankki: kompleksinen alustakomponentti sisältäen kiintoainetta ja liukoisia yhdisteitä sekä orgaanisen typpilähteen.
- ”Komponentti A”: kompleksinen alustakomponentti sisältäen kiintoainetta ja liukoisia yhdisteitä sekä orgaanisen typpilähteen.
- ”Komponentti B”: kompleksinen alustakomponentti sisältäen pääasiassa liukenemattomia kiintoainetta.
- ”Indusoiva yhteisalus”:
 - ”Yhdiste A”: erityinen yksittäinen liukoinen alustakomponentti.
 - ”Yhdiste B”: erityinen yksittäinen liukoinen alustakomponentti.
 - ”Yhdiste C”: erityinen yksittäinen liukenematon kiintoainetta sisältävä alustakomponentti.

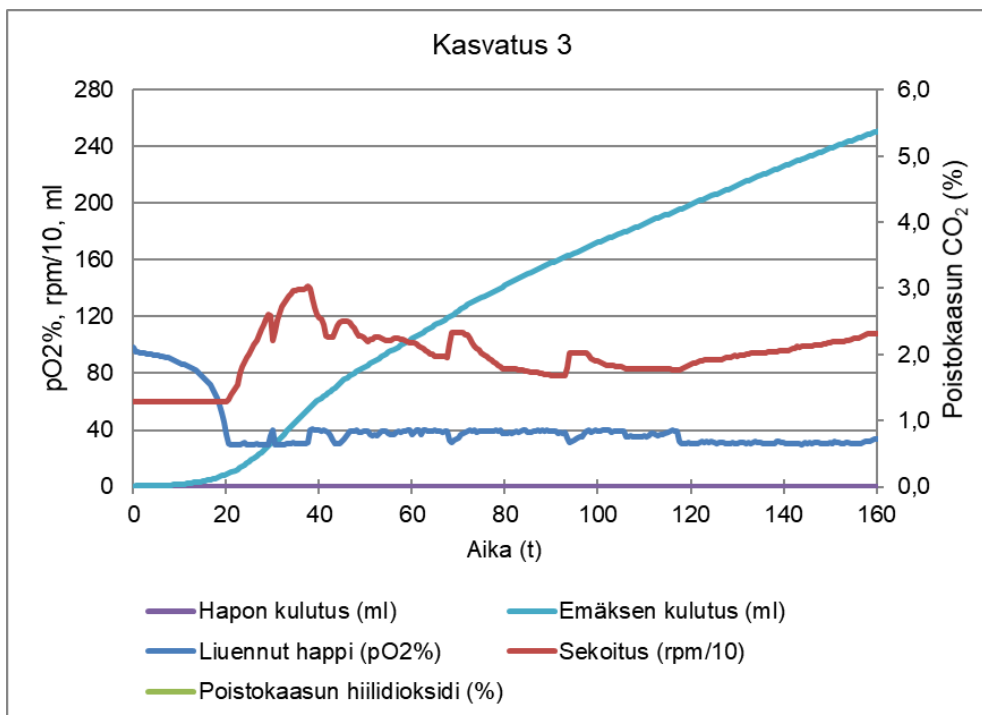
Bioreaktorikasvatuksien mittauskäyrät



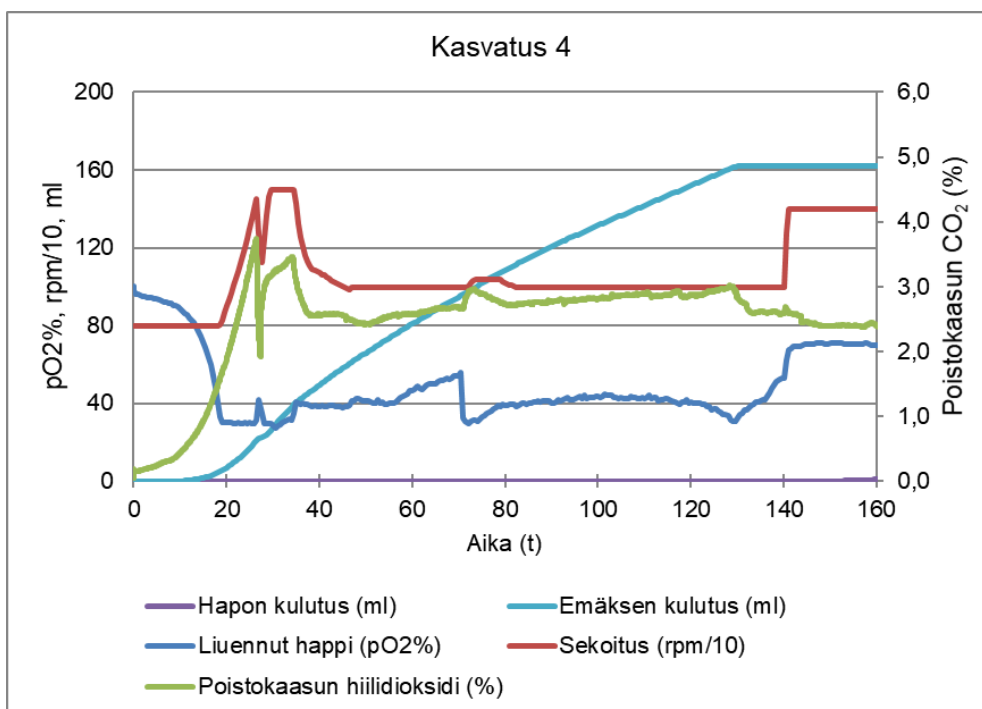
Kuva 1. Kasvatus 1 mittauskäyrät.



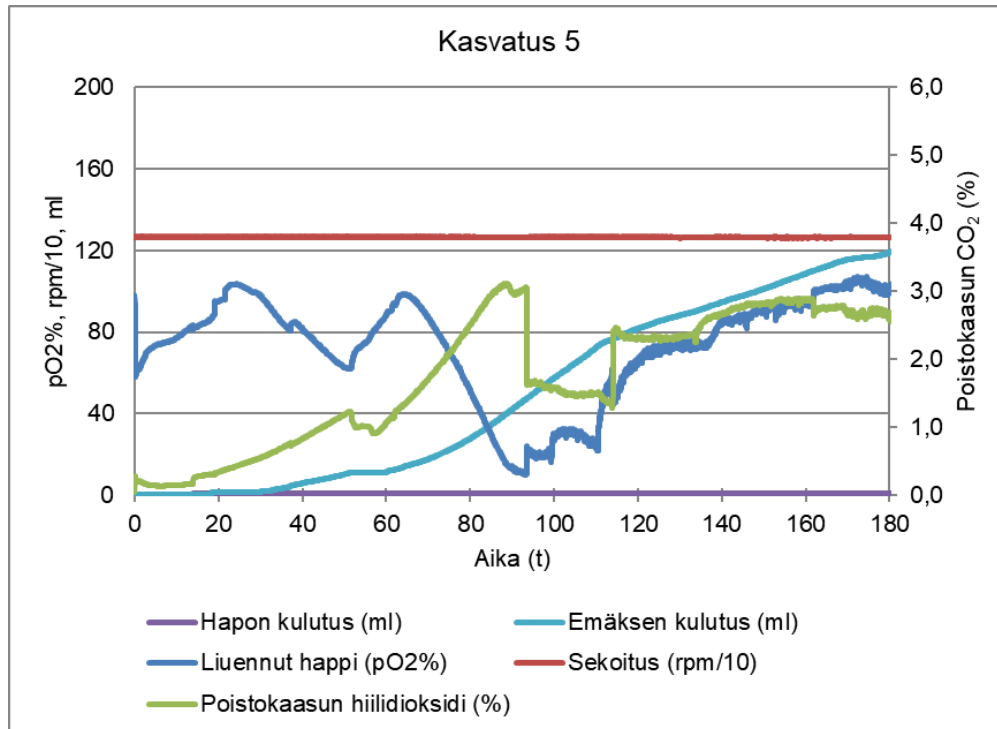
Kuva 2. Kasvatus 2 mittauskäyrät.



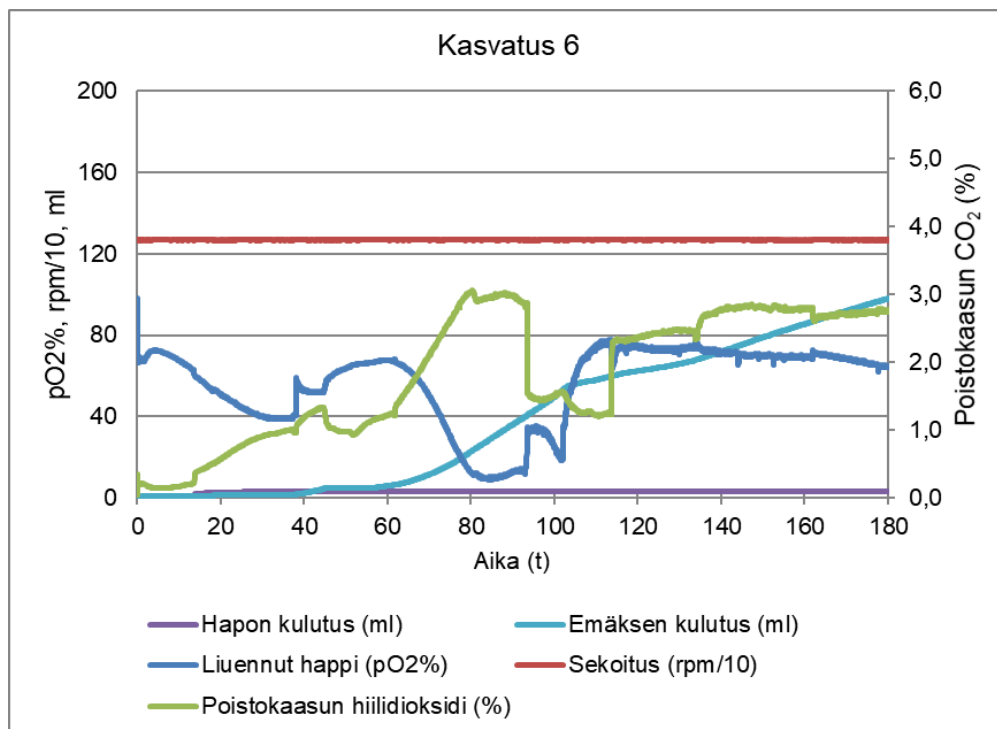
Kuva 3. Kasvatus 3 mittauskäyrät. Poistokaasun hiilidioksidia ei saatu mitattua kasvatuksen osalta laiterikon takia.



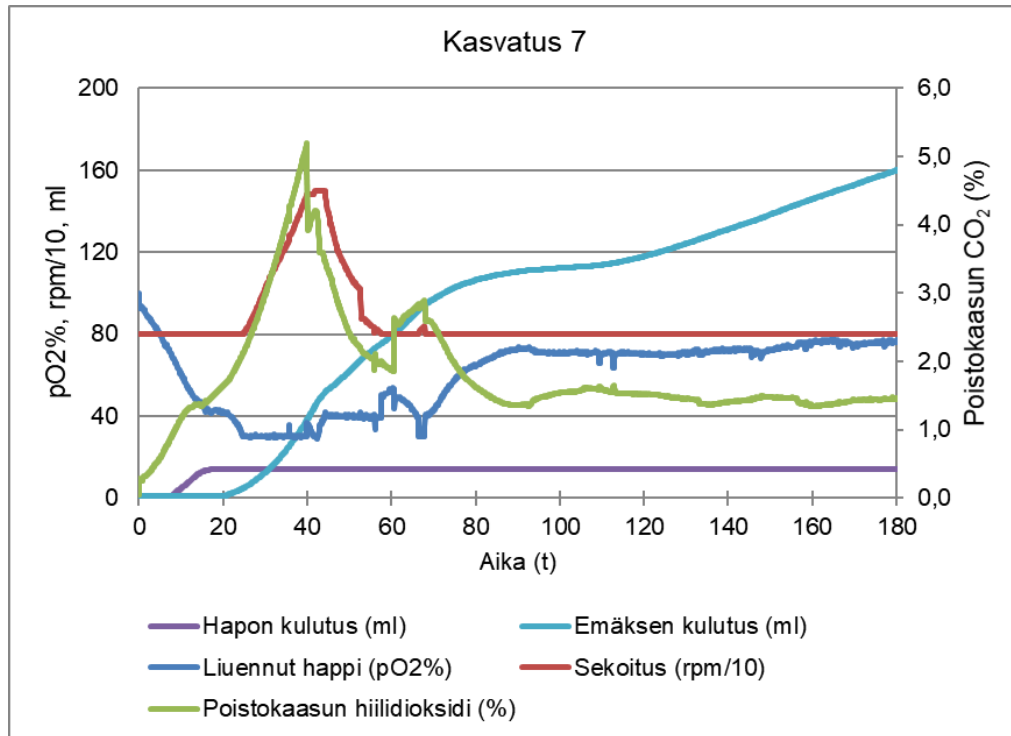
Kuva 4. Kasvatus 4 mittauskäyrät.



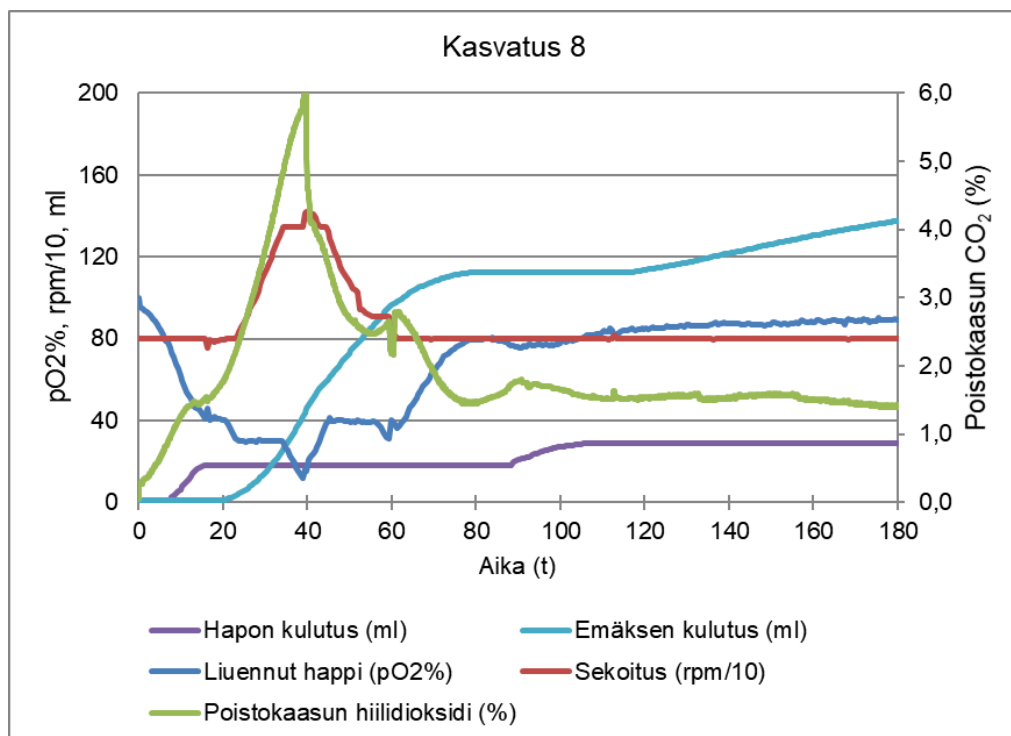
Kuva 5. Kasvatus 5 mittauskäyrät.



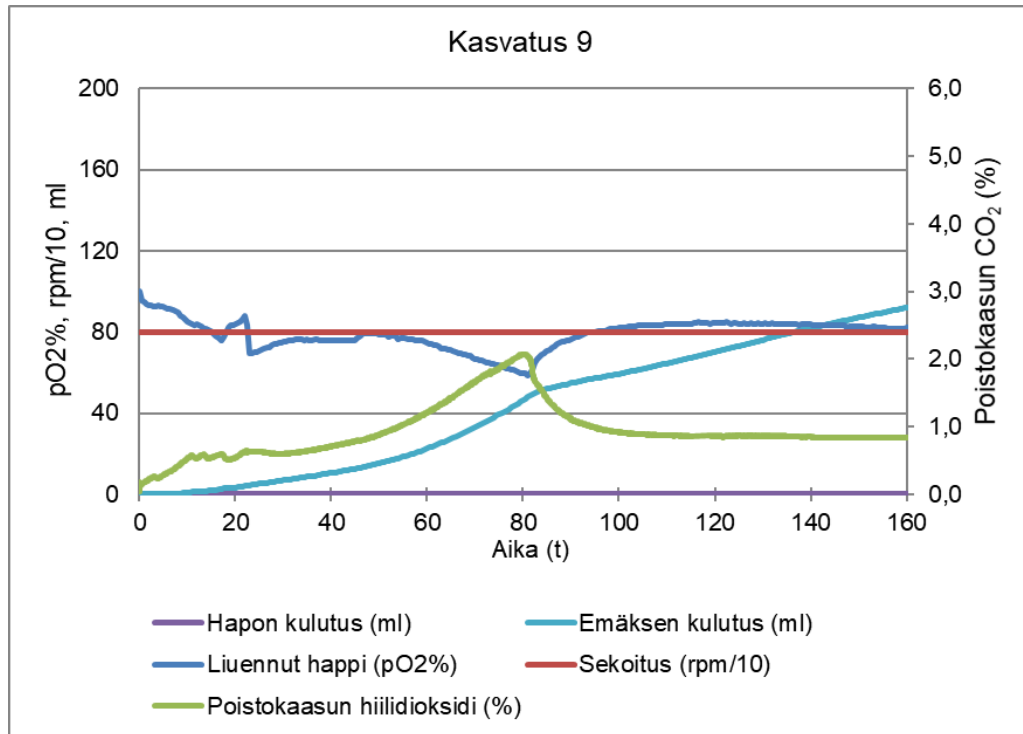
Kuva 6. Kasvatus 6 mittauskäyrät.



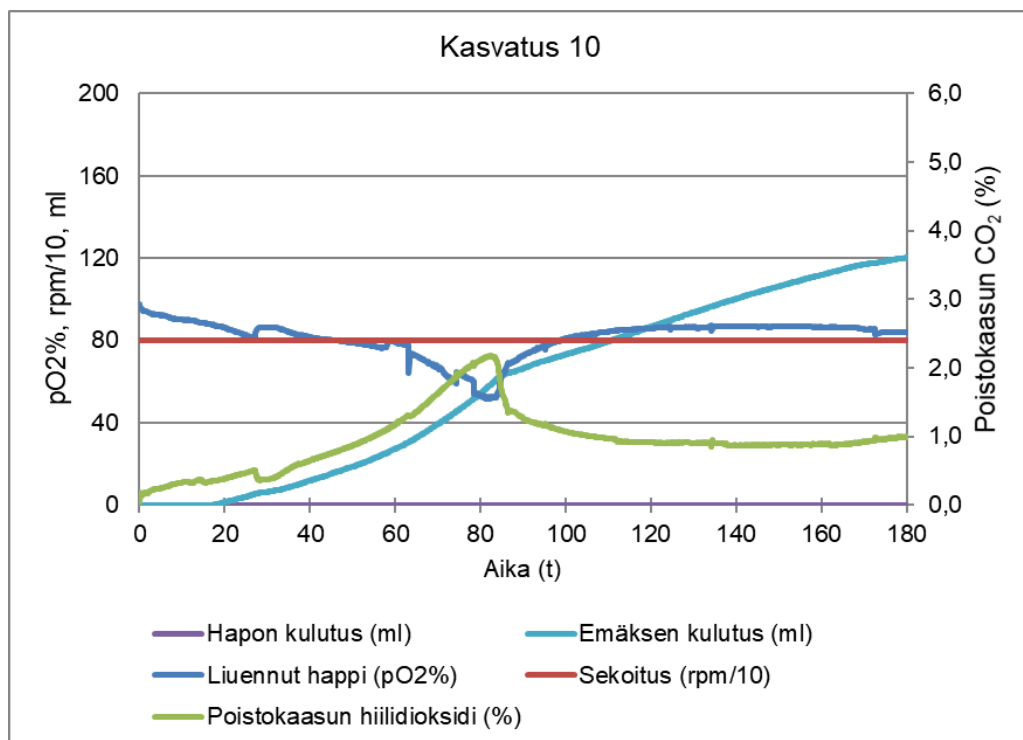
Kuva 7. Kasvatus 7 mittauskäyrät.



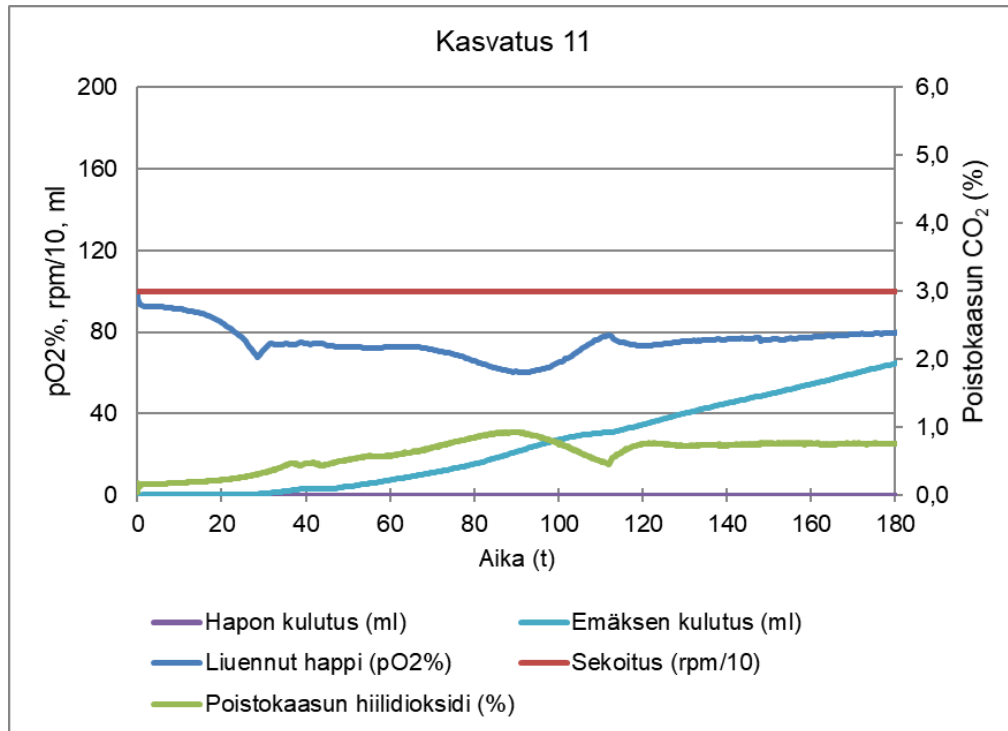
Kuva 8. Kasvatus 8 mittauskäyrät.



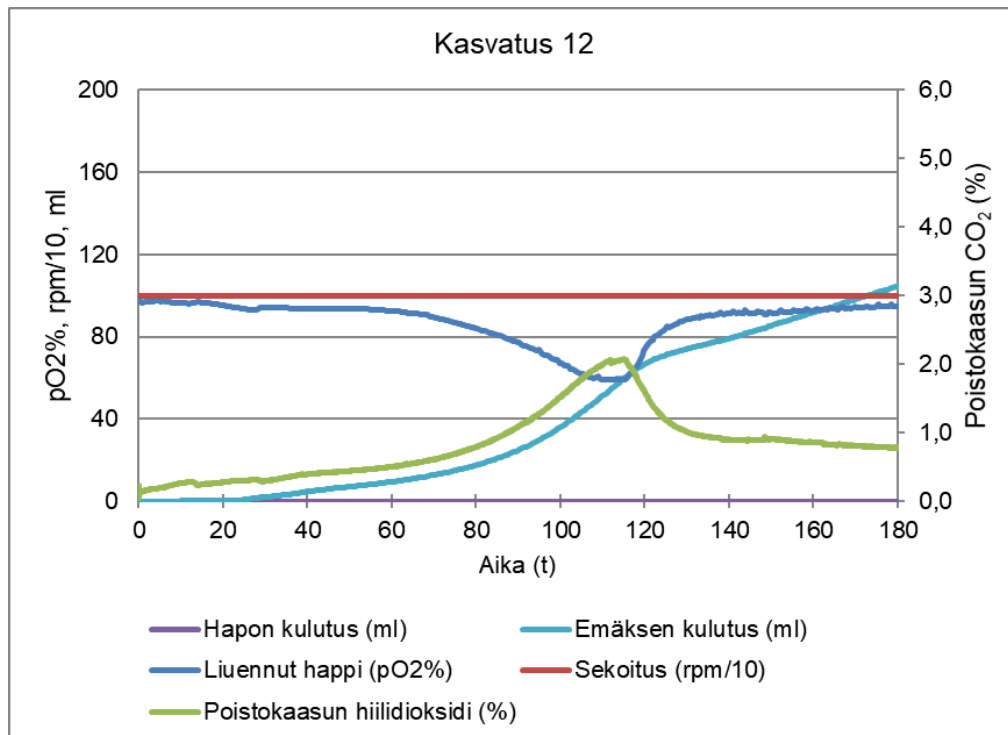
Kuva 9. Kasvatus 9 mittauskäyrät.



Kuva 10. Kasvatus 10 mittauskäyrät.



Kuva 11. Kasvatus 11 mittauskäyrät.



Kuva 12. Kasvatus 12 mittauskäyrät.