

Sara Nieminen

EKSTREMOFIILIIEN POTENTIAALI TEOLLISESSA PHA-YHDISTEIDEN TUOTANNOSSA

Kandidaatintyö
Tekniikan ja luonnontieteiden tiedekunta
Johanna Rinta-Kanto
2/2024

TIIVISTELMÄ

Sara Nieminen: Ekstremofiilien potentiaali teollisessa PHA-yhdisteiden tuotannossa
The potential of extremophiles in industrial production of PHA compounds
Kandidaatintyö
Tampereen yliopisto
Ympäristö-, energia- ja biotekniikka
2/2024

Polyhydroksialkanoaatit eli PHA:t ovat monipuolinen joukko kestäviä biomuoveja, joita voidaan syntetisoida erilaisilla mikro-organismeilla. Biomuovit ovat muoveja, jotka ovat joko biopohjaisia eli ne on tuotettu uusiutuvista raaka-aineista, biohajoavia eli ne hajoavat ympäristössä täysin mikro-organismien toimesta tai molempia näistä. Biomuoveja tutkitaan tällä hetkellä perinteisten öljypohjaisten muovien korvaajiksi. PHA-tuotanto on kuitenkin vielä vähäistä, koska niiden tuottaminen ei ole yhtä kannattavaa kuin petrokemiallisten muovien. Niiden kannattavuutta laskevat korkeat tuotantokustannukset ja materiaalin epävakaa ominaisuudet. Ratkaisua näihin ongelmiin etsitään seuraavan sukupolven teollisen bioteknologian (NGIB) menetelmistä, jotka perustuvat nopeasti kasvaviin ja kontaminaatiota kestäviin ekstremofiilisiin mikro-organismikantoihin.

Tässä työssä tutkitaan, kuinka ekstremofiilisten mikro-organismien käyttö PHA-tuotannossa voisi tehdä siitä taloudellisesti kannattavampaa. Lisäksi tarkastellaan PHA:ta materiaalina ja sitä, mihin käyttötarkoituksiin se soveltuisi parhaiten. Tuotantoa sekä sen optimointia tarkastellaan myös kiertotalouden näkökulmasta. Työssä keskitytään halofiilisiin eli korkeissa suolapitoisuuksissa eläviin ja termofiilisiin eli korkeissa lämpötiloissa eläviin mikro-organismikantoihin, koska ne ovat ekstremofiileista potentiaalisimpia PHA-tuotantoon. Lisäksi työssä tutkitaan näiden kykyä ottaa käyttöön erilaisia teollisuuden sivuvirtoja PHA-synteesiin. Työ on tehty kirjallisuuskatsauksena käyttäen eri tutkimusartikkeleita aiheeseen liittyen.

Ekstremofiiliset isäntäsolut tarjoavat tuotantoon uusia tekniikoita, joiden avulla tuotantokustannuksia saadaan laskettua. Halofiilit ja termofiilit voivat tuottaa PHA:ta avoimissa fermentointiastioissa, koska niiden kasvatusliuokset eivät ole herkkiä kontaminaatioille. Halofiilisten isäntäsolujen käyttö tarjoaa myös mahdollisuuden käyttää merivettä tuotantoprosessissa. Termofiilien käyttöönoton etuna on tuotantoprosessin lämmityskustannusten lasku. Sekä halofiilit että termofiilit pystyvät käyttämään myös erilaisia sivuvirtoja hiilenlähteenä. PHA-tuotantoon voidaan käyttää sivuvirtoja, joille ei ole olemassa vielä relevantteja käyttökohteita, kuten juustoteollisuuden herajäte ja jäteglyseroli. Halofiilit pystyvät käyttämään hyvin laajasti erilaisia sivuvirtoja. Termofiilit sen sijaan osoittavat suurta potentiaalia jäteglyserolin käyttöön hiilenlähteenä PHA-tuotannossa.

Työn tuloksiksi saatiin, että ekstremofiilisten kantojen käyttöönotto on selkeä seuraava askel PHA-tuotannon kehittämisessä. Ekstremofiilien avulla saadaan vähennettyä PHA-tuotannon kustannuksia. Kustannuksia vähentäviä tekijöitä ovat esimerkiksi fermentaatiovaiheen pienempi energiankulutus, edulliset substraatit ja meriveden hyödyntäminen. Lisäksi käyttämällä tuotannossa substraatteina sivuvirtoja, saataisiin PHA-tuotanto toteuttamaan kiertotalousmallia. PHA:n biohajoavuus tekee siitä helposti kierrätettävän materiaalin. Jotta tuotannosta saataisiin vielä kannattavampaa, täytyy seuraavaksi keskittyä oikeanlaisten ekstremofiilisten mikrobikantojen löytämiseen ja niiden aineenvaihduntareittien paranteluun geenimanipulaatiolla. Myös uusien laitteistojen kehittäminen on tärkeää tuotannon mahdollistamiseksi tulevaisuudessa.

Avainsanat: PHA, polyhydroksialkanoaatti, biomuovi, kiertotalous, NGIB, ekstremofiilit, halofiilit, termofiilit, sivuvirrat

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check –ohjelmalla.

SISÄLLYSLUETTELO

1.JOHDANTO.....	1
2.POLYHYDROKSIALKOAATIT (PHA)	3
2.1 PHA:n ominaisuudet.....	3
2.2 Biohajoavuus ja kiertotalous.....	7
2.3 PHA:n käyttökohteet.....	9
3.PHA:N TEOLLINEN TUOTANTO	11
3.1 PHA:n biosynteesi ja tuotantoprosessi.....	11
3.2 Nykyiset PHA:n tuotannon haasteet.....	16
4.PHA:N TUOTANTO EKSTREMOFIILIEN AVULLA	18
4.1 Halofiilit.....	18
4.2 Termofiilit.....	19
4.3 Ekstremofiilien edut ja ongelmat PHA-tuotannossa.....	20
4.4 Teollisuuden sivuvirtojen käyttöönotto PHA-tuotantoon	23
5.JOHTOPÄÄTÖKSET	26
LÄHTEET	28

LYHENTEET JA MERKINNÄT

PHA	Polyhydroksialkanoaatti
PHB	Poly-3-hydroksibutyraatti
CIB	Current industrial biotechnology
NGIB	Next generation industrial biotechnology
scl-PHA	Lyhyt ketjuinen PHA
mcl-PHA	Keskipitkä ketjuinen PHA
lcl-PHA	Pitkä ketjuinen PHA
PHBV	Poly(3-hydroksibutyraatti-ko-3-hydroksivaleraatti)
P3HB4HB	Poly((R)-3-hydroksibutyraatti-ko-4-hydroksibutyraatti)
PHBHHx	3-hydroksibutyraatin (HB) ja HHx:n kopolyesteri
T_m	Sulamislämpötila
T_g	Lasittumislämpötila

1. JOHDANTO

Muovi on merkittävä raaka-aine, jolla on monia eri käyttökohteita. Kyseisen materiaalin suuri menestys johtuu siitä, että sitä on edullista sekä tehokasta valmistaa. Kuitenkin muovituotteita on vaikea kierrättää, jonka vuoksi niistä on muodostunut suuri ympäristöongelma viime vuosien aikana. Muovijäte on tällä hetkellä todellinen ongelma esim. tällä hetkellä meressä arvioidaan olevan noin 79–199 miljoonaa tonnia kierrättämätöntä muovijätettä (United Nations Environment Programme 2021, s. 14). Tämän takia biohajoavat muovit sekä erityisesti biomuovit ovat kasvattaneet kysyntää muovien markkinoilla. Biomuovit ovat muoveja, jotka ovat valmistettu kokonaan tai osittain uusiutuvista luonnon raaka-aineista, tai muoveja, jotka ovat biohajoavia tai näitä molempia. Vuonna 2027 odotetaan, että biomuovien tuotantomäärä nousisi noin 6,3 miljoonaan tonniin vuodessa (europeanbioplastics 2022). Tällä hetkellä tutkitaan erilaisten biomuovien soveltuvuutta perinteisten muovien korvaajiksi sekä sitä, kuinka niiden tuotannosta saataisiin kilpailukykyisempää (Khatami et al. 2021).

Ekstremofiilisten mikro-organismien kuten halofiilien ja termofiilien potentiaali ympäristöystävällisinä biomuovin tuottajina on jo alettu tutkimaan viime vuosien aikana (Obruča et al. 2022). Ekstremofiileillä voidaan tuottaa biomuovia nimeltä polyhydroksialkanoaatti eli PHA. Suurimpia haasteita tällä hetkellä PHA-tuotannon yleistymisessä on tuotantoprosessin kalleus. Perinteisiä muoveja on vielä edullisempaa valmistaa uusiutumattomista raaka-aineista kuin biomuoveja uusiutuvista tai kierrätetyistä raaka-aineista. PHA-tuotannon hintaa yritetään laskea löytämällä edullisimpia hiilenlähteitä mikrobikannoille, käyttämällä ekstremofiilisiä mikrobikantoja tuotannossa (Tan et al. 2021), hyödyntämällä merivettä prosessissa talousveden sijasta, käyttää useita mikrobi kantoja fermentaatioprosessissa tuottamaan PHA:ta yhtäaikaisesti sekä avoimien fermentaatioprosessien hyödyntäminen (Chen & Jiang 2018).

Tässä työssä tutkitaan, kuinka PHA:n teollisesta tuotannosta saataisiin kannattavampaa, kun prosesseissa hyödynnettäisiin ääriolosuhteita, kuten korkeaa lämpötilaa ja suolapitoisuutta sietäviä bakteeri ja arkeoni kantoja. Tutkitaan erityisesti, mitkä eri sivuvirrat voivat toimia ravinnonlähteenä ja olisiko näiden sivuvirtojen käyttö kestävä ja kannattavaa PHA-tuotantoa varten. Sivuvirtojen käyttäminen PHA:n tuotannossa tekisi tuotannosta kiertotalousaatteiden mukaisempaa, joten se toisi

kilpailukykyä uusille PHA:n tuotantolaitosinnovaatioille. Lisäksi tässä työssä selvitetään meriveden käyttöönottomahdollisuutta puhtaan makean veden sijasta sekä tarkastellaan avoimen fermentointiprosessin hyötyjä ja sen mahdollista toteutustapaa pilottikoon laitoshankkeissa. Lisäksi tutkimuksessa tarkastellaan PHA:ta materiaalina kaupallisesta sekä kiertotalouden näkökulmasta. Selvitetään PHA:n mahdollisuudet raaka-aineena ja millaisia tuotteita siitä saadaan valmistettua. Nykyisin tuotteen kaupallisuuteen vaikuttaa hinnan lisäksi myös paljon sen ympäristöystävällisyys, joten työssä tarkastellaan PHA:n ympäristövaikutuksia sekä potentiaalia perinteisten muovimateriaalien korvaajana.

Luvussa 2 tutustutaan ensin PHA-yhdisteiden rakenteeseen, materiaalin mekaanisiin ominaisuuksiin ja biohajoavuuteen. Mekaanisia ominaisuuksia vertaillaan kappaleessa perinteisen muovien kanssa ja biohajoavuutta tarkastellaan materiaalille kiertotalouden näkökulmasta. Lisäksi kartoitetaan, millaisia tuotteita PHA-yhdisteistä voidaan valmistaa. Kappaleessa 3 tutustutaan PHA-synteesiin, -tuotantoon ja siihen liittyviin nykyisiin haasteisiin. Kappaleessa 4 selvitetään PHA-tuotantoon sopivat ekstremofiilit. Kappaleessa kartoitetaan mitä hyötyjä ja haittoja ekstremofiilien käytössä voi olla. Lisäksi tutkitaan ekstremofiilien kykyä hyödyntää sivuvirtoja hiilen lähteenä PHA-tuotannossa. Kappaleessa 5 esitetään työn johtopäätökset.

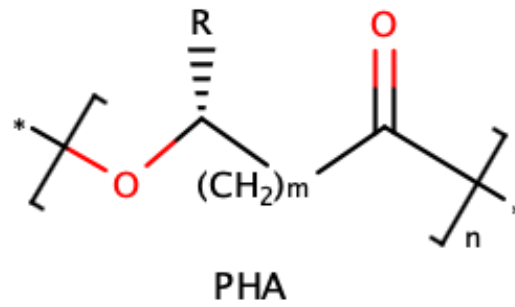
2. POLYHYDROKSIALKOAATIT (PHA)

Polyhydroksialkanoaatti eli PHA on mikro-organismien tuottama biohajoava biomuovipolymeeri. Ensimmäinen mikro-organismi, jonka tunnistettiin tuottavan PHA:ta, löydettiin vuonna 1925. Tällä hetkellä tunnetaan jo yli 90 eri sukuun kuuluvaa mikro-organismia, joilla on kyky tuottaa PHA:ta (Raza et al. 2018). PHA:n ensisijainen merkitys mikro-organismeille on toimia hiilenlähteen varastona. Mikro-organismit hajottavat sisään varastoitunutta PHA:ta energiaksi, silloin kun ravintoa on vähän. On myös havaittu, että PHA auttaa mikro-organismeja suojautumaan epäsuotuisissa olosuhteissa. PHA-jyväset soluissa suojaavat mikro-organismejaan esimerkiksi äärimmäisiltä lämpötiloilta, kuten pakkaselta, osmoottiselta ja oksidatiiviselta paineelta, UV-säteilyltä, etanolilta, kuivumiselta, vetyperoksidilta tai raskasmetalleilta (Obruca et al. 2018).

Polyhydroksialkanoaatit ovat herättäneet huomiota muovituotteiden uutena raaka-aineena. PHA-polymeereistä valmistettavat muovituotteet ovat biohajoavia, joten niiden turvallinen hävittäminen tekee niistä houkuttelevia monille eri aloille ja lisäksi niitä voidaan valmistaa uusiutuvista biomassoista (Koller 2019). PHA-yhdisteiden käyttöä biomuovien raaka-aineena on haluttu kasvattaa suuremmaksi osaksi, koska se on osoitettu toimivan korvaajaksi perinteisille kemiallisille muoveille kuten polyeteenille (PE), polypropeenille (PP) ja polyeteenitereftalaatille (PET). PHA käyttö muovin raaka-aineena ratkaisisi nykyiset muovituotteiden aiheuttamat saastuttamisongelmat. (Tan et al. 2021) Tällä hetkellä muutamat yritykset tuottavat PHA:ta teollisessa mittakaavaavassa ja uskotaan, että sen markkina-arvo sekä tuotantomäärät tulevat kasvamaan tulevaisuudessa, kun uusia teknologioita kehitetään (Sharma et al. 2021; Tan et al. 2021).

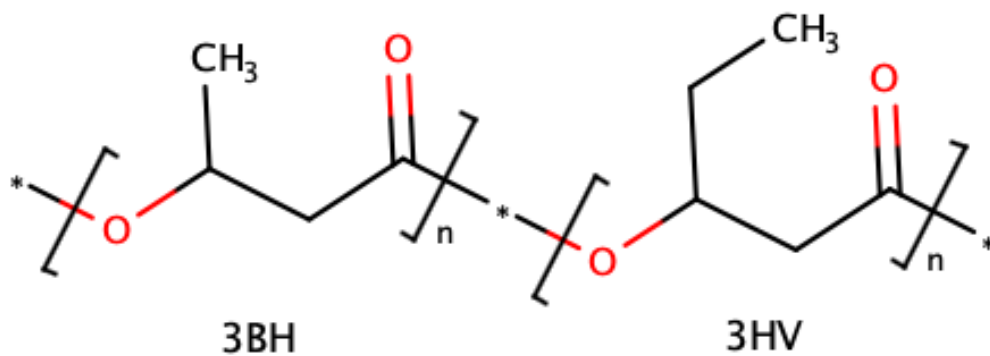
2.1 PHA:n ominaisuudet

PHA ei kuvaa yhtä tietyn tyyppistä monomeeria vaan se on kattokäsite. Polyhydroksialkanoaatit ovat joukko lineaarisia biohajoavia polyestereitä. PHA-yhdisteiden edut verrattuna tavallisiin muoviyhdisteisiin ovat niiden biohajoavuus, biokompatibiliteettisyys eli materiaali on yhteensopivaa elävän kudoksen kanssa, monipuoliset rakenteet ja ominaisuudet, syötävyys ja myrkyttömät hajoamistuotteet, mukaan lukien oligomeerit ja monomeerit (Tan et al. 2021). Kuvassa 1 on esitelty PHA:n perusrakenne.



Kuva 1. PHA-polymeerin kemiallinen rakenne, jossa n kuvaa monomeeriä eli polymeerin yhtä yksikköä ja R sivuketjua, joka vaihtelee eri PHA-polymeereissä. Kuva muokattu lähteestä (Sharma et al. 2021, s. 2)

Tunnetuimpia PHA:ita ovat biohajoava biopolymeeri on poly-3-hydroksibutyraatti eli P(3HB) tai PHB sekä sen kopolymeeri poly(3-hydroksibutyraatti-ko-3-hydroksivaleraatti) eli PHBV (Kumar & Abe 2010; Keskin et al. 2017). Näiden kahden polymeerin rakenteet ovat esitetty kuvassa 2. PHB biopolymeeri löydettiin ensimmäisenä, ja sen sovelluksia tavallisten muovituotteiden tilalle on tutkittu eniten. Muita yleisiä PHA:n sekä kaupalliseen käyttötarkoitukseen tuotettavia PHA-yhdisteitä, joiden biohajoavuutta tutkitaan myös, ovat poly(3-hydroksibutyraatti-ko-3-hydroksiheksanoaatti) (PHBHx) ja poly(3-hydroksibutyraatti-ko-3-hydroksioktanoaatti) (PHBO) (Meereboer et al. 2020).



Kuva 2. 3HB- ja 3HV-monomeereista kopolymeroidun PHBV:n rakenne. Kuva muokattu lähteestä (Keskin et al. 2017)

Biokemialliset prosessit mikro-organismeissa ovat tunnetusti hyvin spesifejä verrattuna esimerkiksi kemiallisiin synteeseihin. Sen vuoksi PHA:ta tuottava biokemiallinen prosessi tuottaa tiukasti isotaktisia PHA:ta, joissa on yksinomaan R-konfiguraatio pääketjun kiraalisessa stereokeskuksessa (Reichardt & Rieger 2011).

Kuitenkin PHA-monomeereillä on vaihtelevuutta sekä erilaisia mekaanisia ominaisuuksia. Näihin ominaisuuksiin vaikuttavat, mitä kuvassa 1 esitetyn sivuketju R:n paikalla on monomeerissä sekä hiiliketjun pituus.

PHA:t voidaan luokitella kolmeen alaluokkaan niiden hiiliketjun pituuden avulla. On *sci*-PHA eli lyhytketjuista PHA, joka muodostuu 3–5 hiiliatomista kuten jo aiemmin esitelty PHB, jota pystyvät tuottamaan monet bakteerikannat ja PHV eli poly(3-hydroksyvaleraatti), jota tuottaa *Cupriavidus necator* (Li et al. 2016). *Sci*-PHA polymeerit ovat tyypillisesti rakenteeltaan hauraita ja jäykkiä (Sharma et al. 2021). Keskipitkä-ketjuinen PHA eli *mcl*-PHA ovat 6–14 hiiliatomia pitkiä. Tällaisia ovat esim. hydroksyoktaanaatti (PHO), jota tuottaa *Pseudomonas mendocina*. Keskipitkät PHA ketjut ovat elastomeerisiä ominaisuuksiltaan, mutta niillä on hyvin alhainen mekaaninen vahvuus, joka heikentää niiden laajempaa sovellettavuutta (Sharma et al. 2021; Reichardt & Rieger 2011). Kuitenkin *mcl*-PHA on löydetty sovelluskohteita lääketieteellisen tekniikan saralta esim. siitä on muokattu kudosta (Rai et al. 2011). Viimeinen joukko on pitkä-ketjuiset-PHA:t eli *lcl*-PHA, joissa on 15 tai enemmän hiiliatomeita kuten poly(3-hydroksipentadekaanaatti) (Sharma et al. 2021; Zinn & Hany 2005).

PHA:lla on samanlaisia ominaisuuksia kuin synteettisillä termoplasteilla eli kestumuoveilla (Volova et al. 2019). Termoplastit ovat polymeerityyppi, jossa on yksinkertaisia molekyyliarakenteita, mitkä muodostuvat kemiallisesti itsenäisiä makromolekyyleistä. Lämmittämällä ne pehmenevät tai sulavat, mikä mahdollistaa niiden helpon muotoilun sekä monipuolisen käytettävyyden. (Thermoplastics and Thermoplastic Composites 2018) Taulukosta 1 voidaan nähdä, että yleisesti käytettyjen termoplastien PP ja PE mekaaniset ominaisuudet verrattuna eri PHA-yhdisteisiin.

Taulukko 1. PHA:n ja sen yleisimpien scl-PHA polymeerien PHB:n ja PHBV:n ja mcl-PHA:n mekaanisia ominaisuuksia verrattuna perinteisiin käyttömuoveihin polypropeeni eli PP ja polyeteeni eli PE. Taulukossa T_m tarkoittaa sulamislämpötilaa ja T_g lasittumislämpötilaa.

Polymeeri	Kiteisyysaste			Kimmo	Murtovenymä	Murtolujuus	Lähde
	(%)	T_m (°C)	T_g (°C)	moduuli (Gpa)	(%)	(Mpa)	
PHA	ei saatavilla	60-177	-50-4	Joustava	2-1000	17-104	Chen 2010
PHB	60	175	4	3,5	5	4	Keskin et al. 2017
PHVB	40-60	145	-1	0,8	50	20	Keskin et al. 2017
mcl-PHA	14-30	43,2-5,2	-39,4-(-52,7)	25,3-10,8	184-20	1-2,8	Dartiailh et al. 2021
PP	50	170	-10	1,5	400	38	Keskin et al. 2017
PE	50	110	-110	0,2	600	10	Keskin et al. 2017

Fyysisiä ominaisuuksia tarkasteltaessa taulukon 1 arvoilla, voidaan huomata scl- ja mcl-PHA:lla on eroavaisuuksia. Mcl-PHA polymeerit ovat termoelastomeereja, joilla on matala kiteisyys, alhainen vetolujuus ja korkea venymä murtoon. Toisaalta scl-PHA:lla on laajempi ominaisuusalue riippuen monomeeri koostumuksesta. Esimerkiksi P(3HB) on erittäin kiteinen, hauras ja jäykkä, ja sen vetolujuus vastaa polypropeenin lujuutta. Toisaalta P(4HB), jolla on T_m 54 °C ja T_g 49 °C, on muovailtavaa termoplastista materiaalia, jonka vetolujuus vastaa polyeteenin lujuutta. (Rai et al. 2011) Vaikka PHA-yhdisteet eivät ole täysin kilpailukykyisiä tavallisiin muoviyhdisteihin verrattuna, koska niillä on heikommat lämpö- ja mekaaniset ominaisuudet, laajempi molekyylipainojakauma (M_w), vaikeampaa saada tiettyä haluttua M_w :ta sekä yhdisteen jälkikiteytyminen (Tan et al. 2021).

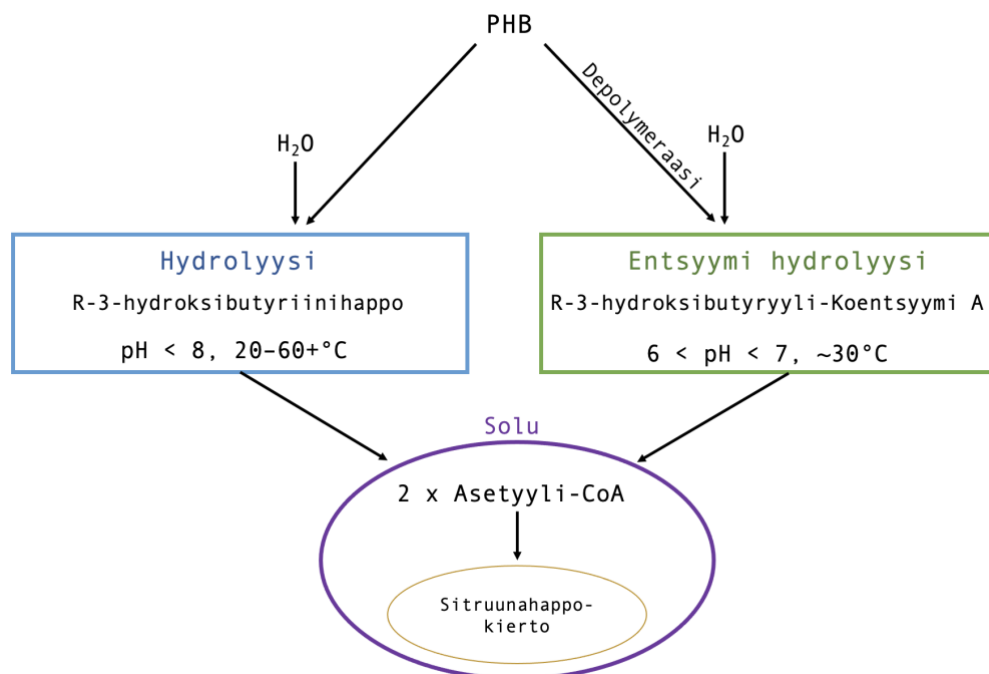
2.2 Biohajoavuus ja kiertotalous

PHA-yhdisteistä valmistavien muovituotteiden yksi merkittävimmistä ominaisuuksista on niiden biohajoavuus. Tämä ominaisuus on herättänyt huomiota kyseistä materiaali kohtaan, koska PHA:sta valmistettavia tuotteiden kierrättäminen on täten helpompaa ja ympäristöystävällisempää, kuin tavallisten muovituotteiden. Monet luonnossa esiintyvät mikro-organismit pystyvät hajottamaan PHA:ta PHA-depolymeraasi entsyymien avulla. Noin 90 % bakteereista, jotka pystyvät hajottamaan tärkkelystä pystyvät hajottamaan myös PHB:ta täydellisesti. Monet eri bakteerit pystyvät hajottamaan scl- ja mcl-PHA:ta kuten esimerkiksi sukujen *Actinomyces*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Aspergillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Comamonas*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Gracilibacillus*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pimelobacter*, *Planococcus*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Staphylococcus*, *Streptomyces* ja *Variovorax*. (Akaraonye et al. 2010) Mutta myös sienet voivat hajottaa PHA:ta kuten PHVB:ta, ja niiden on huomattu olevan jopa tehokkaampia PHA-hajottajia verrattuna bakteereihin (Sang, K. Hori, Y. Tanji, H. Unno 2002). PHA:n biohajoaminen voi tapahtua kolmen eri reitin avulla, jotka ovat foto-oksiditaatio, hydrolyysi ja entsyymi hydrolyysi. Kuvassa 3 on esitetty kuinka PHB hajoaa optimaalisissa olosuhteissa luonnollisessa ympäristössä hydrolyysin ja entsyymi hydrolyysin avulla. Foto-oksiditaatio tapahtuu PHB:lle kun säteilyn aallonpituus on 280 – 330 nm ja happea on läsnä (Meereboer et al. 2020).

Kuitenkin mikro-organismien kyky hajottaa PHA:ta näiden entsyymien avulla riippuu polymeerin koostumuksen, kiteisyyden, lisäaineiden ja pinta-alasta. Hajomisnopeuteen voidaan kuitenkin vaikuttaa ympäristötekijöillä, kuten lämpötilalla, kosteudella ja pH-arvolla. Täten on huomattu, että scl-PHA:t biohajoavat luonnossa

helpommin sekä nopeammin, kuin keskipitkä ja monimutkaisemman rakenteet omaavat PHA:t (Meereboer et al. 2020). Soluväliaineen PHA-depolymeraasit hajottavat PHA:n vesiliukoiseksi oligomeereiksi ja monomeereiksi ja käyttävät sitten syntyneitä tuotteita ravinteina biomassan kertymiseen. Esimerkiksi 4-hydroksibutyraattia (4HB) sisältävät PHA-kopolymeerit hajoavat nopeammin kuin P(3HB) tai P(3HB-co-3HV) -kopolymeerit. Aerobisissa olosuhteissa PHA:n hajoamisen lopputuotteena syntyy hiilidioksidia ja vettä, kun taas anaerobisissa olosuhteissa se on metaania.(Akaraonye et al. 2010)

PHA:n biohajoamista on tutkittu maaperässä, merivedessä ja komposteissa ja näistä kolmesta paikasta PHA hajoaa parhaiten kompostissa. Tämä ei kuitenkaan ole yllättävää, sillä kompostin olosuhteeseen voidaan vaikuttaa, joten materiaalin biohajoaminen voidaan optimoida. Kontrolloidussa kompostissa PHA valmistettu muovipussi hajoaa noin 180 päivän kuluessa. Lisäksi materiaalilla kuten PHB ja PHBV ja PH4B on noin 80–100 % biohajoamisprosentti kompostissa. Maaperässä, joka on mesofiilisten bakteerien elinolosuhteiden mukainen sopii parhaiten luonnossa PHA hajoamisympäristöksi ja se hajoaminen maaperässä kestää noin 176 päivää. PHA pystyy myös biohajoamaan merivedessä, että makeassa vedessä melkein täydellisesti. Parhaiten merivedessä hajoaa PHVB ja PHB, joiden biohajoamisprosentti on noin 90 %. (Meereboer et al. 2020)



Kuva 3. Hydrolyysi ja entsyymi hydrolyysi hajoamisreitit ja optimaaliset olosuhteet PHB:n hajoamiselle aerobisissa olosuhteissa ja bioassimilaatiolle luonnonympäristöissä. Kuva muokattu lähteestä (Meereboer et al. 2020).

PHA-yhdisteiden tuotanto voitaisiin integroida kiertotalouden malliin alusta alkaen perinteisiin muovituotteisiin verrattuna. PHA yhdisteet valmistetaan uusiutuvista raaka-aineista, joita esiintyy luonnossa tai voidaan käyttää teollisuuden sivuvirtoja. PHA:n biohajavan ominaisuuden ansiosta siitä valmistetut tuotteet voidaan loppu käsitellä kiertotalouden mallin tapaan, kun ne päätyvät oman elinkaarensa loppuun. Ne voidaan hajottaa komposteissa biomassaksi ja hiilidioksidiksi. Hiilidioksidi, joka kompostoinnissa vapautuu voi sitoutua uudelleen vihreiden kasvien fotosynteesin avulla uudelleenrakentaen alun perin biopolymeerisynteesiin käytetyt uusiutuvat raaka-aineet, mikä sulkee biopolymeerien raaka-aineiden anabolian ja katabolian kierron (Koller 2019). Biomassaa voidaan käyttää lannoitteena tai jatko käsitellä polttoaineeksi, jota voidaan käyttää energian lähteenä esim. lämmitykseen (Chia et al. 2020). Näin PHA-yhdisteistä tuotettujen tuotteiden elinkaari voisi olla kiertotalouden mallin mukainen.

2.3 PHA:n käyttökohteet

PHA-yhdisteistä valmistettuja tuotteita käytetään ja tutkitaan eniten lääketieteellisiin sovelluksiin sekä maatalouteen. Tämä johtuen siitä, että yhdisteiden ominaisuudet ovat olleet huomattavasti halutumpia näillä sektoreilla pääasiassa niiden biohajoavuuden, myrkyttömyyden ja biokompatibiliteettisuuden vuoksi. (Akaraonye et al. 2010; Sharma et al. 2021). Lääketieteellisiä sovelluksia, joihin PHA-yhdisteitä on hyödynnetty ovat esim. lääkkeen kuljettimet, keinotekoinen solukalvo ja haavojen suojaaminen. PHA-yhdisteiden muita lääketieteellisiä sovelluksia ovat muun muassa pehmytkudoksen regenerointi, hermojen korjaus ja sydän- ja verisuonihoidot. Sovelluksia maatalousalalla ovat esimerkiksi biohajoavat muovikalvot kasvien suojaksi, siementen kapselointi ja lannoitteiden kapselointi. PHA:n on myös todettu parantavan kasvien ravinto-ominaisuuksia ja säilyvyyttä stressaavissa ympäristöissä. (Sharma et al. 2021) Lisäksi PHA:n biohajoavuuden ansiosta siitä voidaan valmistaa lisä- ja ravintoaineita sisältäviä kate kalvoja, jotka voivat vapauttavat näitä aineita hitaasti hajoamisen yhteydessä (Meereboer et al. 2020). Yksi erikoissovellus käyttäen P(3HB):ta maataloudessa on torjunta-aineiden ja hyönteismyrkkyjen hallittu vapauttaminen. (Sharma et al. 2021) PHB:ta on tutkittu ja vahvistettu turvalliseksi rehun lisäaineeksi merilohikaloille ja emästä vierotetuille porsaille. Tämän vuoksi PHA:lla rehuaineena on lupaava potentiaali vähentää esim. mykyisten rehuaineiden aiheuttamia mikromuovipilaantumista, joka on haitallista sekä meri- että maaeläimille. (Tan ym. 2021)

Kuten aiemmin on jo nostettu esiin, PHA-yhdisteistä valmistetaan biomuoveja, jotka tekevät niistä sopivia korvaajia monille sovelluksille, jotka nykyisin hoidetaan öljypohjaisilla muoveilla, tarjoten siten valtavan markkinapotentiaalin. Niiden pääasialliset käyttötarkoitukset näkyvät pakkaus- ja ruokapalveluissa niiden biohajoavuuden, liukenemattomuuden, läpäisemättömyyden ja joustavuuden vuoksi. PHA:ta kehitetään pääasiassa pakkauskalvoina, joita käytetään muun muassa ostoskasseissa, paperipinnoitteissa, kupissa, vaipoissa, matoissa jne. Monia tuotteita on nyt saatavana PHA-pinnoitettuna laatikoina, papereina, levyinä ja tauluina. (Sharma et al. 2021)

Kuitenkin PHA:n käyttöönotto raaka-aineeksi ei kuiteinkaan onnistu neitseellisenä PHA materiaalina. PHA:n sekaan tyypillisesti sekoitetaan muita aineita, jotta siitä saataisiin käyttökelpoisempaa eri sovelluksiin. Esimerkiksi scl-PHA:t ovat vielä itsestään liian jäykkiä tai hauraita, että ne voisivat kilpailla perinteisten muovimateriaalien kanssa (Sharma et al. 2021; Reichardt & Rieger 2011). Ongelmia ilmenee scl-PHA polymeerin muodostumisvaiheessa kuten materiaalin hidaskiteytyminen, mahdollisten toissijaisten kiteytymisten tapahtuminen ja suurien sferuliittien muodostuminen vaikuttava materiaalin jatkokäsittelyyn negatiivisesti (Wang et al. 2016). Kuitenkin ratkaisuja näihin ei haluttuihin mekaanisiin ominaisuuksiin on saatu kemiallisella muokkauksella tai sekoittamalla scl-PHA:n kanssa muita aineita kuten tärkkelystä tai selluloosan johdannaisia (Li et al. 2016). Erilaisilla muokkauksilla on onnistuttu vaikuttamaan materiaalin sulamispisteeseen, lämpöstabilisuuteen ja kristallisoitumiseen (Wang et al. 2016).

3. PHA:N TEOLLINEN TUOTANTO

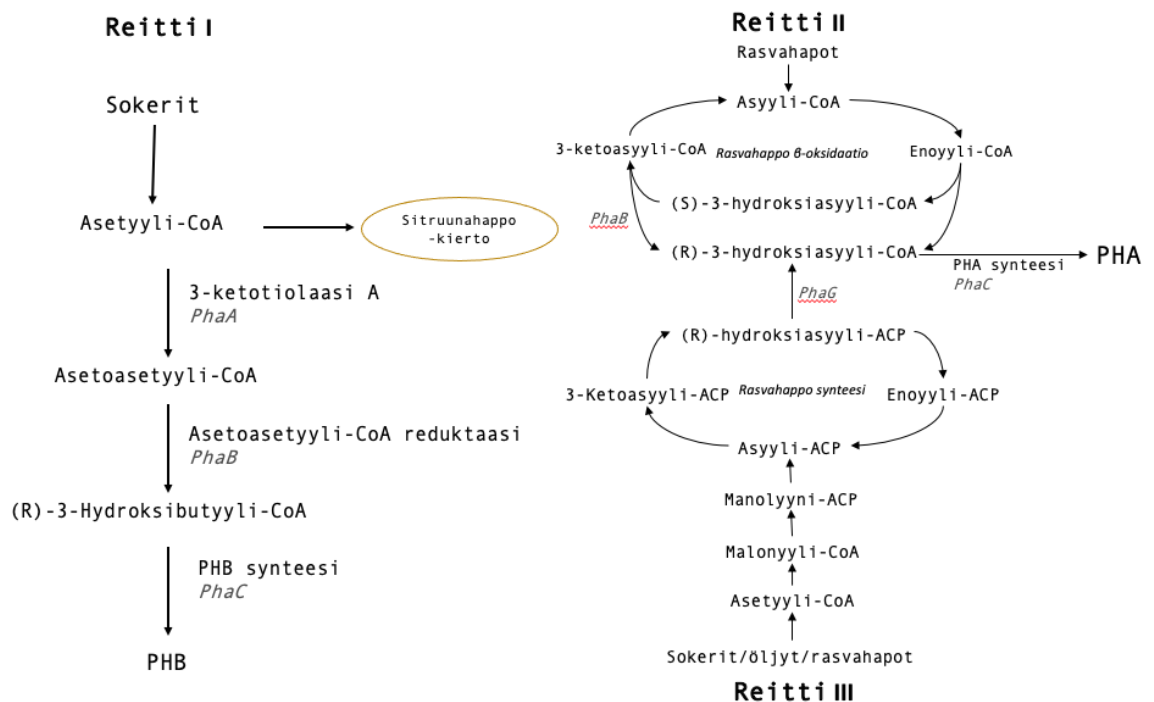
PHA-tuotantoa on jo onnistuttu laajentamaan teolliselle tasolle ja tällä hetkellä maailmassa on noin 24 eri yritystä, jotka valmistavat PHA:ta teollisessa mittakaavassa (Tan et al. 2021). PHA:ta valmistavia yrityksiä on esitelty taulukossa 2. Yritykset tuottavat eniten PHA perheeseen kuuluvia yhdisteitä kuten PHB:ta sekä erilaisia kopolymeerejä, kuten PHBV, P3HB4HB ja PHBHHx. Suurin osa näistä yrityksistä käyttää CIB (current industrial biotechnology) niiden PHA tuotannossa eli prosessi toteutetaan perinteisen teollisen fermentoinnin keinoin. (Tan et al. 2021) Tuotannon optimointia ja materiaalin kaupallista käyttöönottoa varten PHA:n biosynteesi on tutkittu vuosien ajan eri mikro-organismeissa. Koska monet eri mikro-organismit voivat tuottaa PHA, on olemassa eri metabolisia reittejä, jotka käyttävät eri substraatteja PHA:n valmistamiseen solussa. Mikro-organismien PHA-tuotannon metabolinen reitti ei siis ole rajoittunut siten, että vain yhdentyypinen substraatti sopisi PHA:n biosynteesiin. Mikro-organismit pystyvät tuottamaan PHA:ta erilaisten, jopa edullisten hiililähteiden avulla, kuten glukoosin, sakkaroosin, laktoosin tai jopa xylitolin (Sharma et al. 2021; Kourilova et al. 2020). Tässä kappaleessa tutustutaan PHA-biosynteesiin, tuotantoprosessiin ja sen nykyisiin haasteisiin.

3.1 PHA:n biosynteesi ja tuotantoprosessi

Monet mikro-organismit kykenevät syntetisoimaan PHA:ta. Tuotantotarkoituksiin soveltuvaa PHA-synteesiä on tutkittu kasveilla, että bakteereilla. Bakteerit ovat osoittautuneet paremmaksi tähän tarkoitukseen, sillä ne voivat tuottaa PHA:ta jopa 90% omaan kuivamassansa verrattuna (Verlinden et al. 2007). PHA:n tuotannossa eniten hyödynnetty ja tutkituin PHA:ta tuottava bakteerikanta on *Cupriavidus necator* (Verlinden et al. 2007).

Synteesireittejä PHA:lle on olemassa monia ja niistä kolme tunnetuinta sekä tutkituinta metaboliareittiä on esitetty kuvassa 4. Reitti I kuvaa tunnetuinta PHA-synteesi reittiä, jossa glukoosista muodostetaan asetyyli-CoA entsyymiä, joka muunnetaan siten PHB:ksi biosynteettisen entsyymien PhaA, PhaB ja PhaC toimesta (Verlinden et al. 2007). *Cupriavidus necator* tunnetaan tuottavan esimerkiksi PHB:ta glukoosista tämän synteesireitin kautta. Osa mikro-organismeista voi tuottaa PHA:ta myös rasvahappojen avulla, jolloin biosynteesi tapahtuu reitin II kautta. Tässä biosynteesissä rasvahapoista muodostetaan asetyyli-CoA entsyyminä, joka rasvahappo β -oksidation kautta saadaan muutettua (R)-hydroksiasyyli-CoA, joka

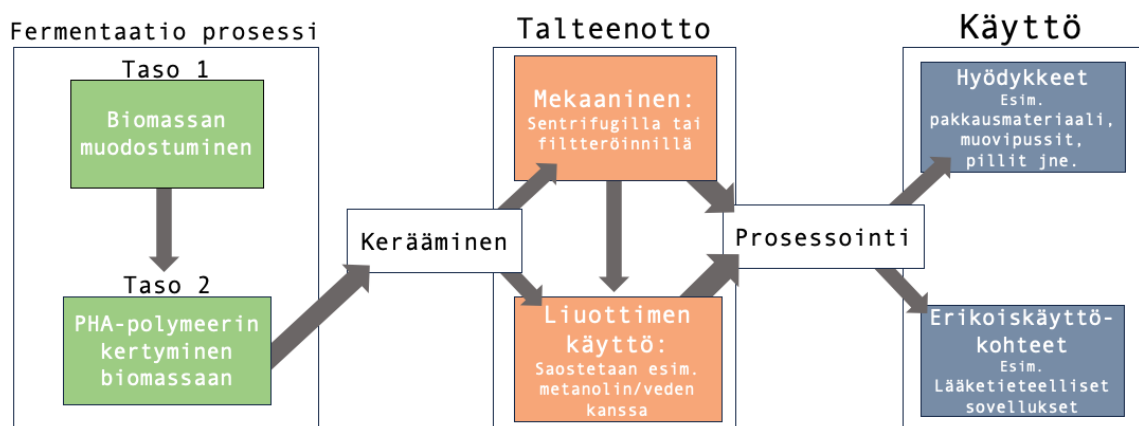
PhaC:n avulla muutetaan PHA synteesissä siten PHA:ksi (Chavan et al. 2021). Reitin II avulla mikro-organismit tuottavat tyypillisesti kopolymeerejä ja mcl-PHA-yhdisteitä. Kopolymeerjä syntyy kuitenkin synteesissä, jos kahta tai useampaa eri substraattia on ollut läsnä synteesissä (Verlinden et al. 2007). PHA-synteesin tuloksena mikro-organismien solun sisälle muodostuu PHA-jyväsia. PHA-jyvästen luonnollinen tarkoitus mikro-organismille on toimia hiilivarastonlähteenä ja niiden pinnan muodostaa fosfolipidi- ja proteiinikerros (Verlinden et al. 2007). Tuotannossa saatavaan PHA laatuun voidaan vaikuttaa, kun tunnetaan mikro-organismien käyttämä PHA-synteesireitti ja mitä substraattia sille tuotannossa syötetään.



Kuva 4. Reitti I kuvaa PHB:n metabolista tuotanto reittiä. PHA-synteesi reitit II ja III. Reitissä II rasvahapoista muodostetaan PHA rasvahapon β-oksidaation avulla ja reitissä III rasvahappojen synteesin avulla, joko sokereita, öljyistä tai rasvahapoista. Kuva on muokattu lähteiden (Chavan et al. 2021; Prieto et al. 2016; Verlinden et al. 2007) avulla.

Yksinkertaistettu malli PHA-tuotannosta on esitelty kuvassa 5. PHA-tuotantoprosessi koostuu fermentaatiovaiheesta ja talteenottovaiheesta, jonka jälkeen suoritetaan polymeerin käsittely haluttuun käyttökohteeseen. (Kessler et al, 2001) PHA:ta tuotetaan vieläkin pääosin käyttämällä puhtaita bakteerikantoja, joita ruokitaan puhtaalla substraatilla, kuten glukoosilla (Fu et al. 2023; Gurieff & Lant 2007). Tuotantokanta valitaan sitä mukaan, mitä millaista PHA-tyyppi halutaan prosessissa valmistaa. Tuotannossa käytetyimmät bakteerikannat ovat *Cupriavidus necator*,

Pseudomonas aeruginosa sekä *E. coli* (Chavan et al. 2021). Puhtaiden bakteerikantojen käyttö on kallista, joten viime aikoina on tutkittu myös sekaviljelmien hyödyntämistä PHA:n tuotannossa. PHA:ta tuotettaisiin kasvatusliuoksessa, jossa olisi useampi kuin yksi mikrobikantoja. Sekaviljelmien käyttö mahdollistaisi edullisten hiilenlähteiden kuten, ruokajätteen, heran ja lignoselluloosan käyttöä. (Fu et al 2023) Sekaviljelmiä ei ole vielä hyödynnetty teollisella tuotanto tasolla, mutta muutamia pilottikoon testauksia on toteutettu. Esimerkiksi P(3HB-co-HV) kopolymereriä tuotettu sekaviljelmän avulla hedelmämähajätteestä (Sousa et al. 2021) ja mcl-PHA:ta on tuotettu Kiinassa sekaviljelmien avulla ruokajätteestä (Wu et al. 2023).



Kuva 5. Yksinkertaistettu ja yleistetty fermentointi prosessi PHA-yhdisteiden tuotannosta. Kuva on muokattu lähteestä (Kessler et al. 2001).

Substraattien käsittely on prosessin virallinen ensimmäinen vaihe. Tyypillisesti tuotannossa käytetään substraatteina glukoosia, orgaanisia happoja ja ruokaöljyjä, mutta valinta substraatista tehdään tuotannossa käytettävän mikrobin perusteella. (*Polyhydroxyalkanoates (PHAs)* 2014) Seuraavana vaiheena on kuvassa 5 esitetty fermentointi, jonka aikana mikro-organismit muodostavat PHA-jyväsiä. PHA-jyväset muodostuvat solun sisälle.

Teollisessa mittakaavassa PHA tuotetaan suurikokoisissa bioreaktoreissa, joissa tapahtuu fermentaatioreaktioita. Reaktiossa oleva kasvatusliuos sisältää fosfaattisuoloja ja ylimäärin substraatista peräisin olevaa hiiltä. PHA-synteesi saadaan aikaan fermentaatioreaktiossa, kun tiettyjä ravinteita (yleensä tyyppiä) rajoitetaan, jolloin tämän valitun ravinteen ehtyminen käynnistää aineenvaihdunnallisen muutoksen mikro-organismeissa ja saa aikaan PHA:n kertymisen hiilen ja energian varastoksi solussa. (Kumar and Abe 2010). Kasvuliuksen tyyppitoisuus vaikuttaa asetyyliCoA:n virtaukseen PHA-biosynteesissä ja ylimääräisen tyyppiä on huomattu

estävän PHA:n biosynteesin tapahtuvan (Liong 2011 s. 57). PHA:n biosynteesin kestää yleensä noin 24–96 tuntia (Kumar and Abe 2010).

Mikrobien tehokasta kasvatusta käytetään yleensä yksi- tai kaksivaiheista kasvatusta. Yksivaiheisessa kasvatuksessa solujen kasvu ja PHA:n kertyminen tapahtuvat samanaikaisesti. Kaksivaiheisessa kasvatuksessa sen sijaan soluja ensin kasvatetaan ravintorikkaassa kasvatusliuoksessa. Kun mikrobeja on saatu kasvatettu tarpeeksi, ne siirretään niukkaravinteiseen kasvatusliuokseen, jossa PHA:n kertymisvaihe mikrobien solujen sisällä voi alaa, johtuen ravinteiden puutteesta. Viljelytapa valitaan aina mikrobikannan mukaan, koska eri mikrobikannat suosivat eri menetelmiä. (Kumar & Abe 2010) Suurikokoiset tai teollisuuden mittakaavan tuotantosysteemit käyttävät yleensä panos-syöttöprosessia (Liong 2011 s. 57). Muita viljelytapoja on myös arvioitu, kuten pH-menetelmä, jossa hiilen lähde syötetään kasvatusliuoksen pH-arvon vaihtelun perusteella, ja kemostaatti-menetelmä, jossa jatkuvassa kasvatuksessa steriiliä kasvatusliuosta syötetään bioreaktoriin jatkuvasti samalla kun käytettyä poistetaan. (Kumar & Abe 2010)

PHA-jyvästen talteenotto mikro-organismeista voidaan toteuttaa mekaanisesti tai kemiallisesti käyttäen liuottimia kuten kloroformi, metyleenikloridi, propyleenikarbonaatti, dikloorietaani. (Kessler et al. 2001, s. 175) Mekaanista talteenottoa on hyödynnetty esimerkiksi, kun PHVB-jyväsiä on tuotettu halofiileilla. PHHVB-jyväset erotettiin kasvatusliuoksesta sentrifugoinnilla ja uuttamalla. Sentrifugointia ja uuttamista toistettiin muodostuneelle biomassalle niin kauan, kunnes se oli saatu erille halofiilistä. Uuttaessa käytettiin natriumdodekyylidikloridin vesiliuosta. (Wang et al. 2021) Kuitenkin liuottimilla toteutettu PHA-jyvästen erottelu on ollut suosituin metodi teollisuudessa (Kessler et al. 2001, s. 175). Muita menetelmiä PHA-jyvien talteenottoon on entsyymien kuten hydrolaasien käyttö tai liuottimen avulla uuttaminen biomassasta (Obruča et al. 2022).

Taulukko 2. Kaupallisia PHA-tyyppejä valmistavia yrityksiä, niiden käyttämät tuotantokannat, menetelmät, substraatit, valmistuskapasiteetti ja sovelluskohteet esitettynä.

Yritys	PHA- tyyppi	Menetelmä	Kanta	Määrä (tonnia/vuodessa)	Substraatti	Sovellus kohteet	Lähde
PHABuilder	kaikki	NGIB	<i>Halomonas</i> spp.	10000	glukoosi, maissirankki, gammabutyrolaktoni ja 3-hydroksivaleraatti lähtöaineet	lääketiede, meikit ja kauneudenhoito tuotteet, kuidut ja tekstiilit	Tan et al. 2021
Medpha	P3HB4HB	NGIB	<i>Halomonas bluephagenesis</i> spp. (Kanta TD40)	100	glukoosi, maissirankki ja gammabutyrolaktoni	Lääketiede	Tan et al. 2021
COFCO	PHB	NGIB	<i>Halomonas bluephagenesis</i> spp. (suola järvestä eristetty kanta)	1000	glukoosi	Biohajoavat muovimateriaalit	Tan et al. 2021
Bluepha	PHBHHx	BIG	<i>R. eutropha</i>	1000	Vaihtoehtoisia hiilen lähteitä kuten viljelyskasvit ja elintarvikejäte	kertakäyttöiset muovituotteet, pakkausmateriaalit, maatalous, tekstiilit ja kuidut, eristemateriaalit	Koller & Mukherjee 2022
TianAn Biopolymer	PHBV	BIG	<i>R. eutropha</i>	2000	glukoosi ja 3-hydroksivaleraatti lähtöaineet	Termoplasteja, kuidut ja tekstiilit, denitrifikaatioon (vedenkäsittely)	Koller & Mukherjee 2022
GreenBio	P3HB4HB	BIG	<i>E. coli</i>	10000	glukoosi ja 1,4-butaanidioli (4HB lähtöaine)	Biohajoavat muovimateriaalit	Koller & Mukherjee 2022
Danimer Scientific	PHBHHx	BIG	<i>R. eutropha</i>	10000	Edulliset öljyt, jotka ovat peräisin kasvien kuten rypsiöljy ja soijaöljy	Erilaiset kertakäyttöiset muovituotteet, liimat ja vaippojen vuoraukset	Koller & Mukherjee 2022

3.2 Nykyiset PHA:n tuotannon haasteet

Vaikka teollista tuotantoa toteutetaan jo useamman yrityksen toimesta, ei se ole vielä yhtä kilpailukykyinen kaikilla sovellusalueilla kuin perinteiset muovit. Muutamia yrityksiä, jotka valmistavat PHA:ta on esitetty taulukossa 2 sekä heidän vuotuiset tuotantomääränsä. Taulukosta voidaan huomata, että PHA:n tuotanto ei ole samalla tasolla määrällisesti kuin PE tia PP tuotanto. Vuonna 2022 polypropeenit tuotettiin noin 74 miljoonaa tonnia (ChemAnalyst 2023). PHA:n kilpailukykyä markkinoilla pienentää sen tuotannon kalleus, epävakaa materiaalikoostumus sekä tuotteen heikot lämpö- ja mekaaniset ominaisuudet (Tan et al. 2021). Polymeerien kuten PP ja PE valmistaminen maksaa noin US\$0,60-0,78/lb, kun PHA polymeerintuottaminen CIB menetelmällä maksaa noin US\$2,25-2,75/lb, joka on noin 3–4 kertaa kalliimpaa (Koller 2017, s. 9). Nämä ongelmat ovat suurimaksi osaksi samoja, mitä monet muutkin CIB tavoilla tuotetut biotuotteet kohtaavat. Näitä ongelmia aiheuttavat tarkemmin substraattien kalleus, puhtaan veden tarve, jäteveden käsittely kustannukset, monimutkaiset sekä tarkkaa kontrollia vaativat prosessit, prosessin sterilisaatio, sivuvirtojen käyttö ja tuotteen puhdistus (Yu et al. 2019).

PHA:ta tuotetaan käyttäen puhtaita luonnosta eristettyjä tai geenimanipuloituja mesofiilisiä bakteerikantoja ja puhtaita substraatteja (Koller 2017, s. 18). Vaikka geenimanipuloimalla bakteerikantoja on saatu myös lupaavia tuloksia, kun halutaan käyttöönottaa edullisia hiilenlähteitä niin esimerkiksi *Cupriavidus necatorin* heikkous, kun on haluttu tutkia sen kykyä käyttöön sivuvirtoja ravintonaan, että se pystyy tosi heikosti käyttämään melassi, hera tai tärkkelys jätettä (Verlinden et al. 2007). PHA tuotannon tekee kalliiksi substraatit. Nykyisissä menetelmissä mikro-organismeja ruokitaan puhtailta substraateilla. Tuotantomallin tehostamisen kannalta olisi tehokasta, että prosessissa valmistettaisiin matalamman arvon lähtöaineesta korkea-arvoista tuotetta kuten esim. jätteistä käyttötavaraa. Materiaalin epävakaa fysiologiset ominaisuudet sekä fermentoinnissa syntyneen tuotteen määrään vaikuttavat fermentaation kontaminaatio riskit. Fermentaatioprosessit ovat herkkiä kontaminaatioille. (Tan et al. 2021) Bioprosessin steriilinä pitäminen lisää myös suuria kustannuksia prosessiin. Kontaminaatio riskit ovat suuri ongelma, koska vain vähäinen määrä vierasta mikrobio prosessiin pilaa kokonaan yhden tuotanto erän. Ongelma on myös siinä, että monet prosessissa käytettävät mikro-organismit pitävät olosuhteista, jotka ovat myös suotuisia monille muille mikro-organismeille.

Sopivan hiilenlähteen valinta on yksi keskeisistä tekijöistä, jotka voivat vähentää PHA-tuotannon kustannuksia. Aikaisemmin tehdyt tutkimukset osoittavat, että substraatin

kustannusosuus on noin 28–50 % verrattuna kokonaiskustannuksiin (Kumar & Abe 2010). Yhdysvalloissa tuotetun PHA:n tuotantoprosessi kustantaa noin 4000–15,000 US\$/tonni ja noin 50 % tuotannon kuluista muodostuu substraateista, joten tonnia PHA:ta kohden kuluu noin 2000–7500 US\$ substraattien hankintaan (Fu et al. 2023). Täten merkittäviä kustannuksia laskevia ratkaisuja voidaan tehdä, kun substraatti olisi edullista. On tunnistettava sopivia ja suhteellisen edullisia hiilen lähteitä PHA:n kustannustehokkaan tuotannon maksimoimiseksi. Tällaisia hiilenlähteitä voivat olla esimerkiksi kokkausrasvat (Pernicova et al. 2019), hera (Mozejko-Ciesielska et al. 2022), melassi (Kumar & Abe 2010), triasyyliglyserolit (Chavan et al. 2021) ja lignoselluloosa (Luo et al. 2022).

4. PHA:N TUOTANTO EKSTREMOFIILIIEN AVULLA

Ekstremofiilit ovat mikro-organismeja, jotka menestyvät äärimmäisissä olosuhteissa kuten korkeissa ja matalissa lämpötiloissa, happamissa, suolaisissa tai emäksissä ympäristöissä, jotka olisivat elinkelvottomia ympäristöjä mesofiilisille mikro-organismeille. (Park & Allaby 2017)

4.1 Halofiilit

Halofiilit ovat luokka mikro-organismeja, jotka elävät korkeassa suolapitoisuudessa. Tyypillisesti niitä löydetään luonnosta suolaisilta vesialueilta kuten meristä sekä suolaisista maaperistä. Suolainen elinympäristö on eilinehto tälle ryhmälle mikro-organismeja, koska ne vaativat tietyn määrää suolaa kasvamiseen sekä elintoimintojensa ylläpitämiseen. (Gerday, Glansdorff & American Society for Microbiology 2007) Halofiilejä ja erittäin suolatolerantteja mikro-organismeja voidaan löytää jokaisesta elämän kolmesta pääkunnasta, jotka ovat Arkeonit, Bakteerit ja Eukaryootit (Oren 2002). Halofiilien ominaisuutta kestää suolaisia ympäristöjä kutsutaan halotoleranssiksi. Eri halofiileillä esiintyy erilaisia halotoleransseja. Meressä elävien halofiilien halotoleranssin on tyypillisesti 3,5 % (w/v) NaCl, kohtalaisten halofiilien toleranssi on luokkaa 3% - 15% (w/v) NaCl ja äärimäisiä olosuhteita kestävä halofiilit sietävät jopa 30 % (w/v) NaCl pitoisuutta liuoksessa (Rao et al. 2022).

Halofiileillä ja erityisesti korkeita suolapitoisuuksia kestäville halofiileille on kyky sietää suurta osmoottista painetta. Tavallisesti solut tuhoutuvat suolaisissa ympäristöissä suolaisuudesta aiheutuvan osmoottisen paineen vuoksi. Halofiiliset aerobiset arkeonit *Halobacteriales*-lahkosta pystyvät ylläpitämään solulimassaan korkeaa kaliumkloridipitoisuutta, joka autattaa niitä mukautumaan korkean natriumkloridi pitoisuuden aiheuttamaan osmoottiseen paineeseen. (Oren 2002; Gerday, Glansdorff & American Society for Microbiology 2007) Toinen selviytymisstrategia osmoottiselta paineelta on suolojen poistaminen sytoplasmasta. Solu pyrkii sulkemaan mahdollisimman paljon natriumkloridia ulos solusta ja keräämään soluun sisälle ympäristössä olevia orgaanisia aineita osmoottisen tasapainon aikaansaamiseksi. Tätä mekanismia esiintyy halofiilisten arkeonien, bakteerien ja eukaryoottien keskuudessa. (Oren 2002)

Arkeoneilla ja bakteereilla on erilaisia keinoja, kuinka ne suojautuvat ulkoisiin stressitekijöihin. On huomattu, että halofiiliset bakteerit ja arkeonit suojautuvat

stressitekijöiltä kuten osmoottiselta-shokilta, UV-säteilyltä sekä lämpötilan äkkinäisiltä muutoksilta PHA:n avulla. On huomattu, että PHA-synteesi aktivoituu saman aikaisesti, kuin solun shokki tila osmoottisen paineen muutoksen seurauksesta (Sedlacek et al. 2019). Tästä syystä on päätelty, että PHA-synteesin tapahtuminen organismeissa tarkoituksena on myös suojella soluja osmoottiselta shokki reaktiolta. UV-säteilyltä suojaamine on myös yksi erittäin hyödyllinen PHA:n ominaisuus mikro-organismille. Solut, joissa on ollut suurempi konsentraatio PHA:ta ovat selviytyneet paremmin UV-säteilyn haitoilta. PHA-jyväsillä on uniikki kyky taittaa valon eri taajuuksia. Kun UV-säteily osuu jyväseen, se hajaantuu eikä tule niin suuri energisenä kohti solun herkkiä osia kuten sen genomia. Täten solu voi suojata sen genomia vaurioitumista UV-säätelyltä PHA-jyvästen avulla. (Koller & Rittmann 2022)

4.2 Termofiilit

Termofiilit ovat luokka mikro-organismeja, jotka menestyvät ympäristöissä, joissa on korkea lämpötila. Termofiiliksi voidaan luokitella organismi, jonka optimaalinen lämpötila on yli 45 °C. (Park & Allaby 2017) Kuitenkin termofiilien kasvun ja elämisen kannalta optimaalinen lämpötilahaarukka on laaja. Termofiilit jakautuvat luokkiin: kohtalaiset termofiilit, äärimmäiset termofiilit ja hypertermofiilit. Kohtalaiset termofiilit kasvavat optimaalisesti 45–70 °C välillä, äärimmäiset termofiilit kasvavat optimaalisesti 70 °C ja sitä korkeammassa lämpötilassa, ja hypertermofiilit kasvavat optimaalisesti 80 °C ja sitä korkeammassa lämpötilassa. (Zeldes et al. 2015) Verrattuna mesofiilisiin mikro-organismeihin, joiden optimi kasvu lämpötila on luokkaa 20–45 °C, voidaan huomata, että termofiilien optimilämpötilat voivat olla jopa nelinkertaiset mesofiileihin verrattuna (Gerday et al. 2007). Tyypillisesti termofiilisiä sekä hypertermofiilisiä mikro-organismeja löytyy kuumista lähteistä, mutta niitä voi myös esiintyä ihmisen tekemissä ympäristöissä, kuten kompostointilaitoksissa. Lisäksi tunnetaan myös termofiilejä, jotka voivat selviytyä äärimmäisen korkeissa pH:ssa sekä suolapitoisuuksissa. (Urbieta et al. 2015)

Termofiilien kyky sopeutua korkeisiin lämpötiloihin on kompleksinen prosessi, johon yleensä vaikuttivat useat selviytymisstrategiat näissä organismeissa. Monissa tapauksissa uskotaan, että termofiilien kyky selviytyä kuumissa olosuhteissa johtuu pääosin niissä olevien proteiinien rakenteista, jotka tarjoavat suurta sisäistä vakautta korkeissa lämpötiloissa (Gerday et al. 2007). Toinen tärkeä fysiologinen ominaisuus, mikä auttaa termofiileja selviytymään on niiden solukalvonrakenne. Niiden solukalvot toimivat tehokkaasti läpäisevyysuojana, säädellen matalamolekyyliipainoisten yhdisteiden sisäänpääsyä ja ulospääsyä. Kasvulämpötilan muuttuessa, kalvon lipidien

rasvahappokoostumus mukautuu samalla lämpötilaan sopivaksi. Nämä lipidit ovat myös kemiallisesti hyvin stabiileja, joten termofiiliset bakteerit pystyvät kasvamaan korkeissa lämpötiloissa ilman että solukalvon hajoaa. Lisäksi näiden organismien rRNA- ja tRNA-molekyylit sisältävät korkeamman G+C-pitoisuuden, mikä parantaa niiden RNA-molekyylien lämpöstabiilisuutta. (Mehta et al. 2016)

Kuten halofiileillä myös termofiilit hyötyvät PHA:sta muutenkin kuin vain energianvarastona. PHA voi auttaa termofiileja selviytymään osmoottiselta-shokilta, UV-säteilyltä ja lämpötilan muutoksilta. Kuitenkin PHA:n vaikutusta termofiileissä stressitekijöiltä ei ole tutkittu suoraan, joten voidaan vain olettaa, että PHA voi toimia näin myös termofiileissä. PHA:n tarkoitus termofiileille on toimia pääasiassa energiavarastona (Obruča et al. 2022).

4.3 Ekstremofiilien edut ja ongelmat PHA-tuotannossa

Halofiiliset mikro-organismit ovat viime vuosien aikana herättäneet kiinnostusta teollisen biotekniikan puolella (Ye et al. 2023). Teollisen mittakaava bioteknillisiin prosesseihin tämän luokan mikro-organismit ovat tarjonneet kustannuksia laskevia ratkaisuja (Yin et al. 2015). Niiden kyky kasvaa korkeasuolaisissa ympäristöissä, missä suurin osa mikro-organismeista ei selviä, tekee niiden kasvuympäristöstä valikoivan. Täten halofiilien kasvatuksessa voidaan käyttää avointa fermentaatiota. Avoin fermentaatio on prosessi, jossa fermentointia tapahtuu avoimessa astiassa. Tavallisesti fermentaatio toteutetaan suljetussa astiassa, että voidaan välttyä kontaminaatioilta. Suljettu fermentaatio sekä isäntäsolujen suojeleminen kontaminaatiolta on korkea kustanteista. Korkeat kustannukset johtuvat prosessin steriloinnista, suuresta makean veden kulutuksesta, katkollisesta fermentoinnista mikrobirtuntojen välttämiseksi sekä puhtaista substraateista (Yin et al. 2015). Kuitenkin, jos isäntäsoluina käytettäisiin halofiileja ja erityisesti korkeita suolapitoisuuksia sietäviä halofiileja, kuten arkeoneja, kontaminaatio riskit olisivat huomattavasti pienemmät tai melkein olemattomat. Tämä johtuu siitä, että monet bakteerit eivät voi elää halofiilin kasvuliuksessa, koska se suolapitoisuus on liian korkea bakteerien selviytymiseen. Avoimella fermentaatiolla on saatu tuotettua tehokkaasti PHA:ta. Muokatulle *H. alkalicola* bakteerikantaa kasvatettiin epästeriileissä olosuhteissa ja se onnistui tuottamaan näissä olosuhteissa lignoselluloosaa PHA:ksi (Luo et al. 2022). Nämä tulokset osoittavat, että on mahdollisuus kasvattaa halofiilejä bakteereja onnistuneesti avoimen fermentaation menetelmillä PHA-tuotannossa.

Toinen kustannuksia laskeva sovellus, jota voidaan hyödyntää, kun isäntäsoluina toimivat halofiilit on meriveden käyttö. Halofiilien kasvatukseen ei tarvitse käyttää makeaa talousvettä, vaan mikro-organismit viihtyvät ja kasvavat mieluusti merivedessä. Rekombinantti *Halomonas camppanias* LS21 on onnistuneesti saatu tuottamaan PHB:ta avoimella fermentaatiolla, kun käytettiin merivettä imitoivaa kasvuliuosta (Yue et al. 2014). Tässä tutkimuksessa todettiin myös, että näissä olosuhteissa rekombinantti isäntäsolu pystyi käyttämään hiilenlähteenä edullisia substraatteja, kuten keittiöjätettä, joka koostui liuenneista ja liukenemattomasta selluloosasta, proteiineista, rasvoita ja tärkkelyksestä. 65-päivän fermentaatio prosessin jälkeen rekombinantti oli tuottanut 70 % PHB omaan kuivapainoonsa verrattuna. Meriveden käyttö ei vaikuttanut PHB:n laatuun, joten sen hyödyntämien tuotantoprosesseissa olisi kannattavaa. Meriveden saatavuudesta ei ole pulaa samalla tavalla kuin puhtaasta makeasta vedestä. Merivettä tulee vain suodataa ennen käyttöönottoa, joten sen kustannukset muodostuvat pääosin suodatuksesta ja kuljetuksesta teollisuus alueelle. Lisäksi meriveden käyttöönoton sopivuus voidaan varmistaa siten, että PHA:ta tuottava isäntäsolu on merestä eristetty halofiilit. Meriveden suolapitoisuutta on myös tarvittaessa helppo kasvattaa pienemmillä suola lisäyksillä, kuin puhtaan makean veden.

PHA:n talteenottoa ja siitä syntyvän sivuvirran prosessointivaihetta, voidaan helpottaa käyttämällä äärihalofiilisiä PHA-tuotantokantoja. Niiden korkea solunsisäinen osmoottinen paine mahdollistaa solujen kätevän hajottamisen, kun ne altistetaan hyptonisille väliaineille kuten deionisoidulle vedelle Tämä tarjoaa tehokkaan ja yksinkertaisen tavan ottaa talteen puhtaasti kokonaisia. (Obruča et al. 2022) Kuvassa 5 esiteltiin PHA:n talteenotto menetelmiä tyypillisessä PHA:n tuotantoprosessissa. Nykyiset menetelmät, jotka tukeutuvat kemialliseen solujen hajotukseen erilaisten voimakkaiden hapettimien avulla ovat erittäin ympäristöä rasittavia menetelmiä. Lisäksi yleisesti käytetyt mekaaniset menetelmät solujen hajottamiseen ja tuotteet keräykseen eivät aina kaikkea tuotetta puhtaana ulos.

Halofiilien käyttöönotto ei kuitenkaan ole täysin mutkatonta. Halofiilisiä isäntäsoluja ei voida alkaa kasvattamaan jo olevissa bioreaktoreissa, koska niiden suolainen kasvuliuos aiheuttaisi ajan kuluessa korroosiota nykyisissä laitteistoissa. Korroosiota kestävät bioreaktorit, kuten esim. PEEK bioreaktori, joka valmistetaan korkealaatuisista korroosiota kestävästä materiaaleista (Hezayen et al., 2000) ovat kalliita hankintoja. Jotta tämänkaltaisen bioreaktorin hankkiminen olisi kannattavaa PHA:ta valmistavalle yritykselle, tulisi heidän käyttää geenimanipuloituja halofiilikantoja, että tuotettava materiaalin saanti voitaisiin taata tarpeeksi suurena.

Kuitenkin halofiilien kyky kasvaa ilman kontaminaatioita epästeriileissä kasvatusastioissa, tarjoaa mahdollisuuden kehittää edullisempia ratkaisuja. Halofiilit todennäköisesti pystyisivät tuottamaan PHA:ta vaatimattomammassa olosuhteissa mesofiilisiin katoihin verrattuna. Bioreaktori materiaaleiksi on tutkittu edullisimpia vaihtoehtoja, kuten muovia, keraamia tai sementtiä (Chen, G.-Q. & Jiang 2018). Tätä varten kuitenkin on tärkeää, että luonnosta eristetyistä halofiileistä kehitetään kontaminaatioon kestäviä kantoja (Tan et al. 2021). Kestävien kantojen sekä tuottavimpien kantojen kehittäminen on tärkeä askel PHA-tuotannon tehostamisessa. Luonnosta eristetyt halofiilit eivät ole tehokkaita PHA-tuottajia suurissa mittakaavoissa. Rekombinanttikannat ovat huomattavasti tuottavampia, kuin luonnosta eristetyt halofiilikannat. Esimerkiksi aiemmin mainittu *Halomonas campanian* LS21 pystyi tuottamaan 70 % kuivapainonsa verran PHA:ta kun taas sen alkuperäinen kanta tuotti vaan 25 % samoissa oloissa (Yue et al. 2014).

Termofiilien käyttäminen isäntäsoluina teollisen mittakaavan PHA-tuotannossa tarjoavat etuja mesofiilisiin isäntäsoluihin verrattuna. Samalla tavalla kuin halofiilien käyttäminen teollisissa bioprosesseissa, termofiilien käyttäminen vähentäisi prosessin kontaminaatio riskiä. Korkeampien lämpötilojen käyttö teollisissa prosesseissa on todettu minimoivan mikrobitartuntojen riskiä (Atalah et al. 2019). PHA-synteesin genotyyppiä on löydetty eniten kohtalaisista termofiilisistä bakteereista (Obruča et al. 2022). Kohtalaisten termofiilien kasvulämpötilat kuten noin 50 °C viljelylämpötila oli riittävän korkea estämään kontaminaatoriskin fermentaatio vaiheessa (Ibrahim & Steinbüchel 2010).

Vaikka termofiilisten bakteerien käyttäminen bioprosesseissa tarkoittaakin suurempien lämpötilojen ylläpitämistä käymisprosessin aikana, ei korkeiden lämpötilojen ylläpitäminen lisää huomattavasti prosessin kustannusta. Kustannuksia saadaan jopa alennettua, kun käytetään termofiilisiä isäntäsoluja. Jäähdytysvaihe on tyypillisesti yksi korkea kustanteisista vaiheista teollisen mittakaavan fermentaatio prosesseissa (Tan et al. 2021). Jäähdyttämiseen kuluu paljon energiaa ja vettä, koska mesofiiliset bakteerit tulee saattaa lämpötilaan, joka on matalampi kuin tyypillinen huoneenlämpötila, että kasvu saadaan loppumaan reaktioastiassa. Ekstremofiilien käytössä ei tarvitse erillistä viilennys systeemiä, koska niiden kasvu pysähtyy huoneenlämpötilassa, johtuen siitä, että niiden kasvu tapahtuu korkeammassa lämpötiloissa. Lisäksi termofiilisten mikro-organismien omat prosessit ovat eksotermisiä, joten prosessi pystyy ylläpitämään itsestään korkeaa lämpötilaa. (Obruča et al. 2022) Termofiilien bioprosessin käyttökustannukset ovat 3,8 – 5 \$/kg

PHA:ta, kun mesofiilisten bakteeri bioprosessin kustannus on 4,9 – 6,1 \$/kg PHA:ta (Chavan et al. 2021).

PHA-tuotannon kannalta kannattaa tarkastella pääosin PHA:ta tuottavia termofiilisiä bakteereita. Tällä hetkellä PHA-tuotantoon suosittaisiin Gram-negatiivisia bakteerikantoja pääasiassa niiden tarjoamien suhteellisen suurien PHA saantojen sekä joidenkin bakteerikantojen kyvyn syntetisoida PHA:ta ei ravinteita rajoittavissa ympäristöissä (Obruča et al. 2022). Lisäksi termofiilisiä bakteereja käyttäessä voidaan hiilenlähteinä hyödyntää edullisia sekä uusiutuvia hiili- (ja/tai typpi) substraatteja biokonversioissa. Näitä ovat esimerkiksi jo aiemmin mainitut maatalouden ja teollisuuden sivuvirtojen tuotteet sekä jätteet. (Kaur 2015) Kuitenkin Gram-positiivisilla bakteereilla tuotetulla PHA:lla on omat etunsa. Vaikka tällä hetkellä PHA saannot ovat pienempiä Gram-positiivisilla bakteereilla, soveltuvat niillä tuotetut PHA:t paremmin lääketieteellisiin sovelluksiin. Tämä johtuu siitä, että Gram-positiivisten tuottamassa PHA:ssa ei löydy jäämiä lipopolysakkarideista, jotka ovat endotoksiineja. Ihmisen altistuminen endotoksiineille voi aiheuttaa haitallisia vaikutuksia, kuten tulehdusreaktioita, sokkeja tai muita ei toivottuja oireita. (Pernicova et al. 2020; Obruča et al. 2022)

4.4 Teollisuuden sivuvirtojen käyttöönotto PHA-tuotantoon

Monet teollisuuden prosessit tuottavat hiilirikkaita sivuvirtoja. Kiertotalouden kulutus- ja tuotantomallin tullessa sekä ympäristötietoisuuden kasvaessa monet yritykset ovat alkaneet keskittämään resurssejansa siihen, kuinka kiertotaloutta voi soveltaa nykyiseen tuotanto malliin. Yleinen kehityskohde on tuotannon sivu- sekä jätevirtojen käyttöönotto. Sivuvirtojen uudelleen hyödyntäminen, jossain toisessa teollisuudenprosessissa raaka-aineena on ympäristöystävällinen teko sekä mahdollinen lisätulon lähde tai säästämiskeino yritykselle.

Halofiilillä mikro-organismeilla on kyky käyttää monenlaisia substraatteja ravinnonlähteinä. Ne voivat tuottaa PHA:ta rasvahappoista tai hiilihyaateista (erityisesti glukoosista) ja näitä substraatteja löytyy paljon erilaisista sivuvirroista. PHA-tuotannon kannattavuuden lisäämiseksi, on suurietu, jos voidaan käyttää edullisia substraatteja tuotannossa. Halofiilit pystyvät saamaan tarvittavan hiilen myös lähteistä, joihin ei ole kilpailua kuten maatalouden ja elintarviketeollisuuden hiilirikkaista sivuvirroista. Kyky kasvaa suolaisissa ympäristöissä, antaa mahdollisuuden käyttää erilaisia sivuvirtoja, joita mesofiiliset isäntäsolut eivät kykenisi käyttämään, mikä avaa oven tehokkaampaan ja kestävämpään PHA-tuotantoon.

PHA:n tuottamiseen on tällä hetkellä onnistettu käyttämään halofiileille, laboratoriomittakaavan testeissä, hiilenlähteenä esimerkiksi lignoselluloosaa (Luo et al. 2022), maitoteollisuuden hera jätettä (Mozejko-Ciesielska et al. 2022) ja teollisuus- sekä yhdyskuntajäteveettä (Morgan-Sagastume et al. 2014). Tällä hetkellä herajätteelle ei tunneta paljoa käyttökohteita ja lisäksi sen käsittely on kallista nykyisten ympäristömääräysten puitteissa (Mozejko-Ciesielska et al. 2022). Herajätteen käyttöönotto PHA-tuotantoon, voisi olla tapa saada juustotuotanto sopeutumaan kiertotalouden malliin. *Paracoccus homiensis* on onnistuneesti pystynyt tuottamaan kopolymeeri P(3HB-co-3HV) juustoteollisuuden herajätteestä (Mozejko-Ciesielska et al. 2022). Heran käytöstä subsraattina on myös tehty noin 100 litran pilottilaitostesti käyttäen haloarkaalista tuotantokantaa *Haloferax mediterranei* (Koller 2019). Halofiileillä on myös kyky käyttää öljyjätettä ravinnonlähteenä. Esimerkiksi arkeoni *Haloferax mediterranei* kykenee käyttämään oliiviöljyn puristamon jäteveettä PHBV:n tuotantoon. (Alsafadi and Al-Mashaqbeh, 2017). Lisäksi Tutkimusten avulla on havaittu, että *Halomonas campaniensis* LS21 -halofiilibakteeri kykenevät muodostamaan PHB:ta avoimen fermentoinnin aikana hyödyntämällä monipuolisia substraatteja, kuten elintarvikejätettä. (Cai et al. 2021).

Termofiilien joukosta on löydetty myös bakteerikantoja, jotka voivat käyttää sivuvirtoja ja jätevirtoja PHA-tuotantoon. Erilaiset kasviöljyt ovat olleet sovelluksen kohteena edulliseksi hiilenlähteeksi termofiileille. Esimerkiksi on todettu, että termofiili *Schlegelella thermodepolymeransia* pystyi valmistamaan PHA:ta käytetystä paistoöljystä prosessissa, jonka lämpötila oli 50 °C (Kourilova et al. 2020). Glycerolia, jota syntyy esim. biodieselintuotannosta on tutkittu myös hiilenlähteeksi termofiileille (Chavan et al. 2021). Biodiesel tuotannosta saatava jäteglyseroli on vaikea substraatti, koska se sisältää useita mikrobiologisia inhibiittoreita, joka estää sen käytön hiilenlähteenä. Vuonna 2020 tehdyssä tutkimuksessa rekombinantille termofiilille *Aneurinibacillus sp.* H1 osoitettiin, että se kesti hyvin inhibiittoreita, jotka ovat läsnä jäteglyserolissa. PHB tuotantopitoisuudet jäteglyserolissa olivat vain noin 20% pienemmät kuin puhtaassa glyserolissa (1,70 g/L puhtaassa ja 1,42 g/L jäteglyserolissa), ja polymeeripitoisuudet biomassassa olivat hyvin samankaltaiset (51,97 ja 49,45% CDM:stä puhtaassa ja jäteglyserolissa, vastaavasti) (Pernicova et al. 2020). Glycerolin tehokas uudelleen käyttöönotto olisi merkittävää kiertotalouden ja ympäristön kannalta.

On myös tutkittu bakteerien kykyä tuottaa PHA petrokemiallisesta muovijätteestä kuten polyeteenistä. Vuonna 2017 on onnistuttu tuottamaan PHA:ta syöttämällä polyeteenijätettä *Cupriavidus necator* nimiselle bakteerille, joka on mesofiilinen

bakteeri ja löytyy vedestä ja maaperästä. (Johnston et al. 2017) Tämä tutkimus tuloksen pohjalta, voidaan kehittää hypoteesi, että ekstremofiilitkin olisi mahdollista käyttää muovijätettä, kuten polyeteeniä, PHA:n raaka-aineena. Tätä hypoteesia tukee tieto siitä, että on löydetty ekstremofiilisiä bakteerikantoja esim. halofiileistä ja termofiileistä, jotka ovat onnistuneet hajottamaan ei biohajoavia muoveja (Atanasova et al. 2021). Termofiilit ovat onnistuneet hajottamaan tehokkaammin biohajoaviamuoveja ja ei biohajoaviamuovia verrattuna halofiileihin. Täten muovijätteen käyttöönotossa PHA-tuotantoon kannattaa tutkia termofiileja ensisijaisena isäntäsoluna tälle prosessille.

Vaikka jätevirtojen sekä muiden sivuvirtojen käyttö tarjoaa paljon mahdollisuuksia, on niiden käyttöönotossa myös omat haasteensa. Tyypillisesti jätevirrat voivat olla monimutkaisia, koska niissä voi esiintyä epäpuhtauksia tai isäntäsoluja inhiboivia aineita. Jäte- ja sivuvirtojen koostumus tulee tuntea hyvin ennen käyttöönottoa sekä ekstremofiilisiä isäntäkantoja tulee kehittämään kestävämpään suuntaan. Tulevaisuuden tutkimuspyrkimykset tulisi kohdistua näiden haasteiden ylipääsemiseen ja ekstremofiilisten kantojen ominaisuuksien parantamiseen.

5. JOHTOPÄÄTÖKSET

Muovituotteiden tarve lähitulevaisuudessa tulee todennäköisesti pysymään samalla tasolla kuin nykyään. Kuitenkin uudet innovatiiviset ja ympäristöystävälliset ratkaisut tulevat yhä tärkeämmäksi eri lainsäädösten ja yhteisten ilmastotavoitteiden vuoksi. Lisäksi kiertotalous vaikuttaa suuresti uusien innovaatioiden kannattavuuteen ja niiden käyttöönottoon. Erilaiset biomuovit kuten PHA nousevat meille tärkeiksi materiaaleiksi tuottaa tulevaisuudessa, että siirtyminen kertakäyttöisistä muovituotteista kestävämpään ratkaisuihin olisi helpompaa. PHA:ta voidaan valmistaa kiertotalouden mallin mukaan ja sen tuotanto voitaisiin teoriassa linkittää osaksi prosessia, josta saataisiin hiilirikkaita sivuvirtoja. PHA:sta valmistetuille tuotteille löytyy paikka tulevaisuuden markkinoilta, vaikka se on vielä kohtuullisen kallis materiaali verrattuna perinteisiin muoveihin kuten polypropeeniin ja polyeteeniin.

Tämän työn tavoitteena oli selvittää, miten ekstreemofiilisten mikrobikantojen avulla PHA-tuotannon saataisiin kannattavampaa ja kilpailukykyisempää. Tyypillinen ongelma uusien ympäristöystävällisten vaihtoehtojen yleistymiselle markkinoilla on ollut niiden kallis tuotanto verrattuna perinteisiin vaihtoehtoihin. Ekstreemofiilien hyödyntämien bioteollisuudessa ja erityisesti PHA:n tuotannossa on kannattavaa. Ekstreemofiilien kuten halofiilien ja termofiilien avulla saadaan laskettua tuotannon kustannuksia, joka voisi auttaa materiaalin yleistymisessä markkinoilla. Nykyisillä teollisenbiotekniikan menetelmillä PHA:n tuottaminen on noin neljä kertaa kalliimpaa kuin perinteisten muovimateriaalien kuten PP: ja PE:n valmistaminen. Kuitenkin uusien innovaatioiden ja NGIB-sovellusten avulla tuotannon hintaa ollaan saamassa koko ajan alaspäin.

Työssä saatiin selville, että eri halofiilisten ja termofiilisten mikrobikantojen käyttöönotto tällaisiin bioprosesseihin pienentäisi tuotannon kustannuksia. Energiakustannuksia saataisiin laskettua avoimella fermentaatiolla, jonka käyttäminen on mahdollista, koska ekstreemofiilisten kantojen kasvatusliuokset ja kasvuolosuhteet ovat ei mieluisia kontaminaatioita aiheuttaville mikrobikannoille. Halofiilien kanssa tuotannossa voidaan puhtaan makean veden sijasta prosesseissa käyttää merivettä, joka on edullisempaa. Termofiilit sen sijaan mahdollistavat energian kulutuksen pienentämisen jäädytys vaiheessa, sillä se voidaan toteuttaa huoneenlämmössä. Halofiilisiä kantoja on tutkittu paljon enemmän sekä niitä on onnistuttu muokkaamaan geenitekniikalla tuottavammiksi.

Termofiileille tutkimus ei ole edennyt yhtä pitkälle ja nyt ollaan vasta tunnistamassa eri termofiili kantoja, jotka voisivat tuottaa PHA:ta.

Hiilirikkaiden sivuvirtojen käyttöönotto PHA-tuotantoon on mahdollista niin halofiilisten, kuin termofiilisten kantojen kanssa. Halofiilien kyky sietää suolaisia kasvuliukoja antaa mahdollisuuden käyttää korkeasuolaisia sivuvirtoja ilman suurempia esikäsittelyjä. Halofiilit loistavat esim. herajätteen käyttöönottajina PHA tuotannossa. Termofiilit sen sijaan ovat onnistuneet käyttämään ravintonaan biodieselin tuotannosta tulevaa glyseroli sivuvirtaa. Materiaalin laatuun voidaan vaikuttaa geenimanipulaatiolla sekä erilaisten täyteaineiden avulla. PHA on kuitenkin hyvin monipuolinen materiaali, joten siitä saadaan käsittelyllä muokattua monenlaisia muovimateriaali eri käyttötarkoituksiin.

Yhteenvetona voidaan todeta, että jätevirtojen hyödyntäminen ekstreemofiilien ravintona tarjoaa kiinnostavan näkökulman kohti kestävä bioteknologiaa. Tämä lähestymistapa ei ainoastaan edistä resurssitehokkuutta, vaan myös tukee kiertotalouden periaatteiden mukaista toimintaa. Samalla se avaa uusia mahdollisuuksia kehittää innovatiivisia bioteknologisia sovelluksia, kuten PHA-tuotantoa, jotka voivat olla keskeisiä kestävä kehityksen tavoitteiden saavuttamisessa. PHA-muoveilla on monia eri käyttömahdollisuuksia. Niistä voidaan valmistaa kertakäyttöisiä pakkausmuovituotteita, joka auttaisi nykyisen muovijäte ongelman kanssa. PHA materiaalina loistaa kuitenkin eniten lääketieteellisissä ja maatalouden sovelluksissa. Näissä sovelluksissa sen uniikit ominaisuudet tarjoavat haluttavia ominaisuuksia. Esim. sen biokompabiiliteetti tekee siitä hyvän lääketieteeseen ja biohajoavuus sekä myrkyttömyys maatalouteen. Lisäksi PHA valmistetut tuotteet hajoava luonnollisissa ympäristöissä melkein kokonaan niin maaperässä kuin meressä ja 100 % kompostissa.

LÄHTEET

- Akaraonye, E., Keshavarz, T., Roy, I., 2010. Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. *J of Chemical Tech & Biotech* 85, 732–743. <https://doi.org/10.1002/jctb.2392>
- Alsafadi, D., Al-Mashaqbeh, O., 2017. A one-stage cultivation process for the production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) from olive mill wastewater by *Haloferax mediterranei*. *New Biotechnology* 34, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.05.003>
- Atalah, J., Cáceres-Moreno, P., Espina, G., Blamey, J.M., 2019. Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts. *Bioresource Technology* 280, 478–488. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.008>
- Atanasova, N., Stoitsova, S., Paunova-Krasteva, T., Kambourova, M., 2021. Plastic Degradation by Extremophilic Bacteria. *IJMS* 22, 5610. <https://doi.org/10.3390/ijms22115610>
- Cai, S., Wu, Y., Li, Y., Yang, S., Liu, Z., Ma, Y., Lv, J., Shao, Y., Jia, H., Zhao, Y., Cai, L., 2021. Production of Polyhydroxyalkanoates in Unsterilized Hyper-Saline Medium by Halophiles Using Waste Silkworm Excrement as Carbon Source. *Molecules* 26, 7122. <https://doi.org/10.3390/molecules26237122>
- Chavan, S., Yadav, B., Tyagi, R.D., Drogui, P., 2021. A review on production of polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters by thermophilic microbes using waste feedstocks. *Bioresource Technology* 341, 125900. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125900>
- Chen, G.-Q., Jiang, X.-R., 2018. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 50, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.11.016>
- Chia, W.Y., Chew, K.W., Le, C.F., Lam, S.S., Chee, C.S.C., Ooi, M.S.L., Show, P.L., 2020. Sustainable utilization of biowaste compost for renewable energy and soil amendments. *Environmental Pollution* 267, 115662. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115662>
- Dartailh, C., Blunt, W., Sharma, P.K., Liu, S., Cicek, N., Levin, D.B., 2021. The Thermal and Mechanical Properties of Medium Chain-Length Polyhydroxyalkanoates Produced by *Pseudomonas putida* LS46 on Various Substrates. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 617489. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.617489>
- Fu, X., Xu, H., Zhang, Q., Xi, J., Zhang, H., Zheng, M., Xi, B., Hou, L., 2023. A review on polyhydroxyalkanoates production from various organic waste streams: Feedstocks, strains, and production strategy. *Resources, Conservation and Recycling* 198, 107166. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2023.107166>
- Gerday, C., Glansdorff, N., American Society for Microbiology (Eds.), 2007. *Physiology and biochemistry of extremophiles*. ASM Press, Washington, D.C.
- Gurieff, N., Lant, P., 2007. Comparative life cycle assessment and financial analysis of mixed culture polyhydroxyalkanoate production. *Bioresource Technology* 98, 3393–3403. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.046>
- Hezayen, F.F., Rehm, B.H.A., Eberhardt, R., Steinbüchel, A., 2000. Polymer production by two newly isolated extremely halophilic archaea: application of a novel corrosion-resistant bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54, 319–325. <https://doi.org/10.1007/s002530000394>
- Johnston, B., Jiang, G., Hill, D., Adamus, G., Kwiecień, I., Zięba, M., Sikorska, W., Green, M.,

Kowalczyk, M., Radecka, I., 2017. The Molecular Level Characterization of Biodegradable Polymers Originated from Polyethylene Using Non-Oxygenated Polyethylene Wax as a Carbon Source for Polyhydroxyalkanoate Production. *Bioengineering* 4, 73. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4030073>

Kaur, G., 2015. Strategies for Large-scale Production of Polyhydroxyalkanoates. *Chem.Biochem.Eng.Q.* 29, 157–172. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2014.2255>

Keskin, G., Kızıl, G., Bechelany, M., Pochat-Bohatier, C., Öner, M., 2017. Potential of polyhydroxyalkanoate (PHA) polymers family as substitutes of petroleum based polymers for packaging applications and solutions brought by their composites to form barrier materials. *Pure and Applied Chemistry* 89, 1841–1848. <https://doi.org/10.1515/pac-2017-0401>

Kessler, B., Weusthuis, R., Witholt, B., Eggink, G., 2001. Production of Microbial Polyesters: Fermentation and Downstream Processes, in: Babel, W., Steinbüchel, A. (Eds.), *Biopolyesters, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 159–182. https://doi.org/10.1007/3-540-40021-4_5

Khatami, K., Perez-Zabaleta, M., Owusu-Agyeman, I., Cetecioglu, Z., 2021. Waste to bioplastics: How close are we to sustainable polyhydroxyalkanoates production? *Waste Management* 119, 374–388. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.10.008>

Koller, M., 2019. Switching from petro-plastics to microbial polyhydroxyalkanoates (PHA): the biotechnological escape route of choice out of the plastic predicament? *The EuroBiotech Journal* 3, 32–44. <https://doi.org/10.2478/ebtj-2019-0004>

Koller, M., 2017. *Advances in Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production*. MDPI, Basel, Switzerland.

Koller, M., Mukherjee, A., 2022. A New Wave of Industrialization of PHA Biopolyesters. *Bioengineering* 9, 74. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9020074>

Koller, M., Rittmann, S.K.-M.R., 2022. Haloarchaea as emerging big players in future polyhydroxyalkanoate bioproduction: Review of trends and perspectives. *Current Research in Biotechnology* 4, 377–391. <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2022.09.002>

Kourilova, X., Pernicova, I., Sedlar, K., Musilova, J., Sedlacek, P., Kalina, M., Koller, M., Obruca, S., 2020. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a thermophilic strain of *Schlegelella thermodepolymerans* from xylose rich substrates. *Bioresource Technology* 315, 123885. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123885>

Kumar, S., Abe, H., 2010. *Practical guide to microbial polyhydroxyalkanoates*. ISmithers, Shawbury, Shropshire.

Li, Z., Yang, J., Loh, X.J., 2016. Polyhydroxyalkanoates: opening doors for a sustainable future. *NPG Asia Mater* 8, e265–e265. <https://doi.org/10.1038/am.2016.48>

Liong, M.-T. (Ed.), 2011. *Bioprocess sciences and technology*, *Biochemistry research trends*. Nova Science Publ, New York, NY.

Luo, C.-B., Li, H.-C., Li, D.-Q., Nawaz, H., You, T.-T., Xu, F., 2022. Efficiently unsterile polyhydroxyalkanoate production from lignocellulose by using alkali-halophilic *Halomonas alkalicola* M2. *Bioresource Technology* 351, 126919. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126919>

Meereboer, K.W., Misra, M., Mohanty, A.K., 2020. Review of recent advances in the biodegradability of polyhydroxyalkanoate (PHA) bioplastics and their composites. *Green Chem.* 22, 5519–5558. <https://doi.org/10.1039/D0GC01647K>

Mehta, R., Singhal, P., Singh, H., Damle, D., Sharma, A.K., 2016. Insight into thermophiles and their wide-spectrum applications. *3 Biotech* 6, 81. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0368->

Z

Morgan-Sagastume, F., Valentino, F., Hjort, M., Cirne, D., Karabegovic, L., Gerardin, F., Johansson, P., Karlsson, A., Magnusson, P., Alexandersson, T., Bengtsson, S., Majone, M., Werker, A., 2014. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sludge and municipal wastewater treatment. *Water Science and Technology* 69, 177–184. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.643>

Mozejko-Ciesielska, J., Marciniak, P., Moraczewski, K., Rytlewski, P., Czaplicki, S., Zadernowska, A., 2022. Cheese whey mother liquor as dairy waste with potential value for polyhydroxyalkanoate production by extremophilic *Paracoccus homiensis*. *Sustainable Materials and Technologies* 33, e00449. <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2022.e00449>

Obruča, S., Dvořák, P., Sedláček, P., Koller, M., Sedlář, K., Pernicová, I., Šafránek, D., 2022. Polyhydroxyalkanoates synthesis by halophiles and thermophiles: towards sustainable production of microbial bioplastics. *Biotechnology Advances* 58, 107906. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107906>

Oren, A., 2002. Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. *J Ind Microbiol Biotech* 28, 56–63. <https://doi.org/10.1038/sj/jim/7000176>
Park, C., Allaby, M., 2017. *Fragile or Historic Lands*, 3. ed. ed. Oxford University Press.

Pernicova, I., Kucera, D., Nebesarova, J., Kalina, M., Novackova, I., Koller, M., Obruca, S., 2019. Production of polyhydroxyalkanoates on waste frying oil employing selected *Halomonas* strains. *Bioresource Technology* 292, 122028. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122028>

Pernicova, I., Novackova, I., Sedlacek, P., Kourilova, X., Kalina, M., Kovalcik, A., Koller, M., Nebesarova, J., Krzyzanek, V., Hrubanova, K., Masilko, J., Slaninova, E., Obruca, S., 2020. Introducing the Newly Isolated Bacterium *Aneurinibacillus* sp. H1 as an Auspicious Thermophilic Producer of Various Polyhydroxyalkanoates (PHA) Copolymers–1. Isolation and Characterization of the Bacterium. *Polymers* 12, 1235. <https://doi.org/10.3390/polym12061235>

Polyhydroxyalkanoates (PHAs): biosynthesis, industrial production and applications in medicine, 2014. , Nanotechnology science and technology. Nova Science Publishers, Inc, New York, New York.

Prieto, A., Escapa, I.F., Martínez, V., Dinjaski, N., Herencias, C., De La Peña, F., Tarazona, N., Revelles, O., 2016. A holistic view of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology* 18, 341–357. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12760>

Rai, R., Keshavarz, T., Roether, J.A., Boccaccini, A.R., Roy, I., 2011. Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. *Materials Science and Engineering: R: Reports* 72, 29–47. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2010.11.002>

Rao, A.S., Nair, A., Nivetha, K., More, V.S., Anantharaju, K.S., More, S.S., 2022. Molecular adaptations in proteins and enzymes produced by extremophilic microorganisms, in: *Extremozymes and Their Industrial Applications*. Elsevier, pp. 205–230. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90274-8.00002-2>

Reichardt, R., Rieger, B., 2011. Poly(3-Hydroxybutyrate) from Carbon Monoxide, in: Rieger, B., Künkel, A., Coates, G.W., Reichardt, R., Dinjus, E., Zevaco, T.A. (Eds.), *Synthetic Biodegradable Polymers, Advances in Polymer Science*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 49–90. https://doi.org/10.1007/12_2011_127

Sang, K. Hori, Y. Tanji, H. Unno, B.-I., 2002. Fungal contribution to in situ biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) film in soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58, 241–247. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0884-5>

Sedlacek, P., Slaninova, E., Koller, M., Nebesarova, J., Marova, I., Krzyzanek, V., Obruca, S., 2019. PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances. *New Biotechnology* 49, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.10.005>

Sharma, V., Sehgal, R., Gupta, R., 2021. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Properties and Modifications. *Polymer* 212, 123161. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2020.123161>

Sousa, B.V., Silva, F., Reis, M.A.M., Lourenço, N.D., 2021. Monitoring pilot-scale polyhydroxyalkanoate production from fruit pulp waste using near-infrared spectroscopy. *Biochemical Engineering Journal* 176, 108210. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108210>

Tan, D., Wang, Y., Tong, Y., Chen, G.-Q., 2021. Grand Challenges for Industrializing Polyhydroxyalkanoates (PHAs). *Trends in Biotechnology* 39, 953–963. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.11.010>

Thermoplastics and Thermoplastic Composites, 2018. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2017-0-01099-6>

Urbietta, M.S., Donati, E.R., Chan, K.-G., Shahar, S., Sin, L.L., Goh, K.M., 2015. Thermophiles in the genomic era: Biodiversity, science, and applications. *Biotechnology Advances* 33, 633–647. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.04.007>

Verlinden, R.A.J., Hill, D.J., Kenward, M.A., Williams, C.D., Radecka, I., 2007. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J Appl Microbiol* 102, 1437–1449. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x>

Volova, T., Kiselev, E., Zhila, N., Shishatskaya, E., 2019. Synthesis of Polyhydroxyalkanoates by Hydrogen-Oxidizing Bacteria in a Pilot Production Process. *Biomacromolecules* 20, 3261–3270. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00295>

Wang, K., Hobby, A.M., Chen, Y., Chio, A., Jenkins, B.M., Zhang, R., 2021. Techno-Economic Analysis on an Industrial-Scale Production System of Polyhydroxyalkanoates (PHA) from Cheese By-Products by Halophiles. *Processes* 10, 17. <https://doi.org/10.3390/pr10010017>

Wang, S., Chen, W., Xiang, H., Yang, J., Zhou, Z., Zhu, M., 2016. Modification and Potential Application of Short-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate (SCL-PHA). *Polymers* 8, 273. <https://doi.org/10.3390/polym8080273>

Wu, M., Gong, X., Liu, X., Tu, W., Yu, P., Zou, Y., Wang, H., 2023. Comprehensive Techno-environmental Evaluation of a Pilot-Scale PHA Production from Food Waste in China. *Environ. Sci. Technol.* 57, 1467–1478. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c05976>

Ye, J.-W., Lin, Y.-N., Yi, X.-Q., Yu, Z.-X., Liu, X., Chen, G.-Q., 2023. Synthetic biology of extremophiles: a new wave of biomanufacturing. *Trends in Biotechnology* 41, 342–357. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.11.010>

Yin, J., Chen, J.-C., Wu, Q., Chen, G.-Q., 2015. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. *Biotechnology Advances* 33, 1433–1442. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.008>

Yu, L., Wu, F., Chen, G., 2019. Next-Generation Industrial Biotechnology-Transforming the Current Industrial Biotechnology into Competitive Processes. *Biotechnology Journal* 14, 1800437. <https://doi.org/10.1002/biot.201800437>

Zeldes, B.M., Keller, M.W., Loder, A.J., Straub, C.T., Adams, M.W.W., Kelly, R.M., 2015. Extremely thermophilic microorganisms as metabolic engineering platforms for production of fuels and industrial chemicals. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01209>

Zinn, M., Hany, R., 2005. Tailored Material Properties of Polyhydroxyalkanoates through Biosynthesis and Chemical Modification. *Adv. Eng. Mater.* 7, 408–411. <https://doi.org/10.1002/adem.200500053>