

Clostridium butyricum:n 1,3-propaanidiolioperonin promoottorin kloonaus
ja säätelyn toiminta *Escherichia coli*:ssa ja *Bacillus subtilis*:ssa

Pro gradu -tutkielma
Tampereen yliopisto
Lääketieteellisen teknologian instituutti
Maaliskuu 2008
Lassi Liljeroos

KIITOKSET

Tämän *Pro gradu* -tutkielman kokeellinen osuus toteutettiin Tampereen teknillisessä yliopistossa, Bio- ja ympäristötekniikan laitoksella. Haluan kiittää Ville Santalaa asiantuntevasta ja ystävällisestä työn ohjaamisesta, tutkielman tarkastamisesta sekä myös opiskelijan omien mielipiteiden ja ideoiden huomioimisesta työn ohjauksessa. Lisäksi haluan kiittää professori Matti Karpia erinomaisista neuvoista ja tutkimuspuitteiden luomisesta. Kiitos myös muille ryhmän jäsenille inspiroivista juttelutuokioista työn lomassa. Lopuksi, erityinen kiitos tyttöystävälleni, perheelleni sekä muille ystäväilleni kestämisestä ja kannustamisesta.

Helsinki, maaliskuu 2008

Lassi Liljeroos

PRO GRADU -TUTKIELMA

Paikka:	TAMPEREEN YLIOPISTO Lääketieteellinen tiedekunta Lääketieteellisen teknologian instituutti
Tekijä:	LILJEROOS, LASSI JUHO PETTERI
Otsikko:	<i>Clostridium butyricum</i> :n 1,3-propaanidiolioperonin promoottorin kloonaus ja säätelyn toiminta <i>Escherichia coli</i> :ssa ja <i>Bacillus subtilis</i> :ssa
Sivumäärä:	59 s.
Ohjaaja:	FT Ville Santala Tampereen teknillinen yliopisto, Luonnontieteiden ja ympäristötekniikan tiedekunta, Kemian ja biotekniikan laitos
Tarkastajat:	Prof. Markku Kulomaa, FT Ville Santala
Aika:	Maaliskuu 2008

TIIVISTELMÄ

Tutkimuksen tausta ja tavoitteet

Vetyä pidetään ympäristöystävällisyytensä vuoksi yhtenä tulevaisuuden polttoaineista. Sen ympäristöystävällisyys riippuu kuitenkin tuotantotavoista, jotka nykyisellään eivät ole ekologisesti kestäviä. Biologinen vedyntuotto tarjoaa mahdollisuuden tuottaa vetyä uusiutuvista energianlähteistä kuten auringonvalosta ja biojätteestä. Biologinen vedyntuotto ei kuitenkaan toistaiseksi ole taloudellisesti kannattavaa, joten tuottoa pyritään parantamaan geneettisellä muokkauksella. Tämän tutkimuksen tavoitteena oli kloonata pimeäfermentatiivisen vedyntuottajan *Clostridium butyricum*:n vedyntuottoon liittyvän 1,3-propaanidiolioperonin promoottori säätelytekijöineen ja tutkia sen toimintaa *E. coli*:ssa ja *B. subtilis*:ssa.

Tutkimusmenetelmät

Kloonauksissa käytettiin molekyylibiologian yleisiä työmenetelmiä. Promoottorin säätelyä tutkittiin lusiferaasireportterin avulla. Kokeet toteutettiin lisäämällä solukasvatuksiin oletettuja indusoreita glyserolia sekä 1,3-propaanidiolia ja seuraamalla tuotetun lusiferaasin määrää luminesenssimittauksin.

Tutkimustulokset

Promoottori säätelytekijöineen saatiin kloonattua ja *E. coli* sekä *B. subtilis* transformoitua rakennetulla vektorilla. Promoottori osoittautui molemmissa lajeissa aktiiviseksi, mutta glyserolilla tai 1,3-propaanidiolilla ei havaittu olevan merkittävää vaikutusta sen aktiivisuuteen.

Tulosten tarkastelu

Aiempien tutkimusten perusteella oletettiin, että 1,3-propaanidiolioperonin transkriptio on ylävirran kahden komponentin signaalinvälitysjärjestelmän säätelyn alaista. Hypoteesina oli, että transkriptio indusoituu glyserolin tai 1,3-propaanidiolin sitoutuessa sensoriproteiiniin. *E. coli*:ssa ja *B. subtilis*:ssa näin ei kuitenkaan todettu tapahtuvan. Tämä saattaa johtua signaalinvälitysjärjestelmän virheellisestä toiminnasta näissä lajeissa. On myös mahdollista, että sensori tunnistaa jonkin muun *C. butyricum*:n glyseroliaineenvaihdunnalle ominaisen tekijän kuin itse glyserolin tai 1,3-propaanidiolin, ja saadut tulokset johtuvat kyseisen tekijän puuttumisesta tutkituissa lajeissa.

Johtopäätökset

C. butyricum:n 1,3-propaanidiolioperonin promoottorin ei todettu aktivoituvan glyserolilla tai 1,3-propaanidiolilla *E. coli*:ssa tai *B. subtilis*:ssa. Luotettavamman tiedon promoottorin säätelystä saamiseksi olisi pyrittävä tutkimaan sen toimintaa jossakin *C. butyricum*:n lähisukulaislajissa kuten *C. acetobutylicum*:ssa.

MASTER'S THESIS

Place: UNIVERSITY OF TAMPERE
Faculty of Medicine
Institute of Medical Technology

Author: LILJEROOS, LASSI JUHO PETTERI

Title: Cloning and function of regulation of 1,3-propanediol operon promoter from *Clostridium butyricum* in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*

Pages: 59 p.

Supervisor: Dr. Ville Santala, PhD
Tampere University of Technology, Faculty of Science and
Environmental Engineering, Department of Chemistry and
Bioengineering

Reviewers: Prof. Markku Kulomaa, Dr. Ville Santala

Date: March 2008

ABSTRACT

Background and aims

Hydrogen is considered one of future's environmentally friendly fuels. However present methods for producing hydrogen are not environmentally sustainable. Biohydrogen can be produced from renewable energy sources such as sunlight and biowaste. In order to make biohydrogen economically viable a large amount of effort is exerted on metabolic engineering of microorganisms able to produce hydrogen. The aim of this study was to clone the promoter of 1,3-propanediol operon from *Clostridium butyricum* along with its putative regulator genes, and study the function of the promoter in *E. coli* and *B. subtilis*.

Methods

Standard molecular biology methods were used in cloning. The function of the promoter was studied using firefly luciferase as a reporter molecule. Putative inducers glycerol and 1,3-propanediol were added to cell cultures and the level of luciferase activity was then monitored by measuring luminescence.

Results

The promoter with its putative regulators was successfully cloned in *E. coli*. Also *B. subtilis* was successfully transformed with the constructed vector. The promoter was found to be active in both species but neither glycerol nor 1,3-propanediol had a significant effect on the activity.

Discussion

Basing on previous studies it was assumed that the transcription of 1,3-propanediol operon is controlled by a two-component signal transduction system the genes of which reside immediately upstream of the operon. The sensor kinase of the signal transduction system was hypothesized to be activated by glycerol or 1,3-propanediol. In *E. coli* or *B. subtilis* this was not found to be true. This could be due to improper functioning of the regulation system in these species or that the sensor recognizes some factor other than the compounds hypothesized present in *C. butyricum* when metabolizing glycerol.

Conclusion

The 1,3-propanediol operon promoter of *C. butyricum* could not be activated by glycerol or 1,3-propanediol in *E. coli* or *B. subtilis*. To attain more reliable information on the regulation of the promoter in *C. butyricum* the study should be performed also in some close relative species of *C. butyricum*, such as *Clostridium acetobutylicum*.

SISÄLLYSLUETTELO

LYHENTEET JA SYMBOLIT	7
1 JOHDANTO.....	8
2 KIRJALLISUUSKATSAUS	10
2.1. Vety tulevaisuuden energiamuotona	10
2.2. Biologinen vedyntuotto	11
2.2.1. Fotosynteesiin kykenevät vedyntuottajat	12
2.2.1.1. <i>Syanobakteerit</i>	13
2.2.1.2. <i>Viherlevät</i>	14
2.2.1.3. <i>Anoksigeeniset fotosynteettiset vedyntuottajat</i>	15
2.2.2. Fermentoivat vedyntuottajat	17
2.3. Vedyntuotto biodieseltuotannon jäteglyserolista	19
2.3.1. Yleistä	19
2.3.2. <i>Clostridium butyricum</i> ja <i>Clostridium acetobutylicum</i> biodieseltuotannon jätteiden hyödyntämisessä	20
2.3.3. Rekombinanttiproteiinien tuotto <i>Clostridium</i> -suvun bakteereissa.....	22
2.3.4. 1,3-propaanidiolioperoni.....	22
2.4. Menetelmien teoriaa	27
2.4.1. Pohjois-Amerikan tulikärpäsen (<i>Photinus pyralis</i>) lusiferaasi reportteriproteiinina	27
3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET.....	31
4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	32
4.1. Bakteerikannat ja kasvuolosuhteet	32
4.2. Vektorin rakentaminen	33
4.3. <i>B. subtilis</i>:n transformaatio.....	36
4.4. Induktiokokeet	37
4.4.1. Induktiokokeet aerobisissa olosuhteissa	37
4.4.2. Induktiokokeet anaerobisissa olosuhteissa.....	37

5	TULOKSET	38
	5.1. Vektorin rakentaminen	38
	5.2. <i>B. subtilis</i> :n transformaatio.....	40
	5.3. Induktiokokeet	41
6	POHDINTA	45
7	JOHTOPÄÄTÖKSET	51
	LÄHDELUETTELO	52

LYHENTEET JA SYMBOLIT

BRET	bioluminesenssin resonanssienergian siirto (bioluminescence resonance energy transfer)
CoA	koentsyymi-A
CheY	kemotaksisproteiini, vasteensäätelijöiden N-terminaalisen osan malliproteiini
DhaA	vasteensäätelijä (todennäköisesti P _{1,3-pd} :n säätelyssä)
DhaB1	1,3-propaanidiolioperonin glyserolidehydrataasi
DhaB2	1,3-propaanidiolioperonin glyserolihydrataasia aktivoiva proteiini
DhaS	sensoriproteiini (todennäköisesti P _{1,3-pd} :n säätelyssä)
DhaT	1,3-propaanidiolioperonin 1,3-propaanidiolidehydrogenaasi
EGTA	etyleeniglykolitetra-asettaatti
EtBr	etidumbromidi
Fd	ferredoksiini
GFP	vihreä fluoresoiva proteiini (Green Fluorescent Protein)
<i>lucFF</i>	<i>Photinus pyralis</i> :n (Pohjois-Amerikan tulikärpänen) lusiferaasigeeni
LuxAB	<i>Vibrio fischeri</i> :n lusiferaasisysteemi
NAD ⁺	nikotinamidiadeniinidinukleotidi
NADP ⁺	nikotinamidiadeniinidinukleotidifosfaatti
P _{1,3-pd}	1,3-propaanidiolioperonin promoottori
PocR	<i>Salmonella typhimurium</i> :n transkriptiotekijä, DhaS:n homologi
PQ	plastokinoni
PSI	fotosysteemi I
PSII	fotosysteemi II
Q	kinoni

1 JOHDANTO

Vetyä pidetään yhtenä tulevaisuuden energiamuotona. Sen etuina fossiilisiin polttoaineisiin verrattuna pidetään yleensä sitä, että sen palamisen lopputuotteena syntyy ainoastaan vettä ja sen energiakapasiteetti suhteessa painoon on erittäin suuri (143 GJ / tonni) (Boyles, 1984). Vety toimii kuitenkin vain energian varastomuotona, joten vedynkäytön ympäristöystävällisyys riippuu täysin sen tuotantotavasta. Yleensä vedyntuotossa on käytetty metaania ja muita uusiutumattomia luonnonvaroja (Elam ym., 2003), jolloin vedyntuotosta syntyy hiilidioksidipäästöjä. Biologinen vedyntuotto on noussut lupaavaksi keinoksi tuottaa vetyä uusiutuvista luonnonvaroista. Uusiutuvia luonnonvaroja käytettäessä ilmakehän kokonaishiilidioksidin määrä ei pitkällä aikavälillä kasva ja vedyntuottoon käytettävä energia tulee suoraan tai välillisesti kasvien kautta auringosta. Yksi biologisen vedyntuoton keinoista on hyödyntää anaerobisia bakteereita, jotka pystyvät tuottamaan vetyä fermentaation avulla monista orgaanisista yhdisteistä. Bakteerien kyky käyttää hiili- ja energianlähteenään useita eri orgaanisia yhdisteitä mahdollistaa vedyn tuottamisen monipuolisista lähtömateriaaleista ja jätteistä. Eräs tällainen jäte tulee biodieselin tuotannon kasvun myötä olemaan sen tuotannossa syntyvä teknillinen glyseroli (Frost & Sullivan, 2006).

Biodiesel tuotetaan transesterifikaatioreaktion avulla triasyyliglyseroleista ja metanolista tai etanolista. Tässä reaktiossa yhtä triasyyliglyserolimoolia kohden vapautuu yksi mooli glyserolia. Syntyvä jäte ei kuitenkaan ole puhdasta glyserolia vaan siinä on usein jäänteenä muita orgaanisia yhdisteitä, vettä, natriumsuoloja, metalleja ja raskasmetalleja (Gonzalez-Pajuelo ym., 2004). Raakaglyserolin käyttäminen hiililähteenä anaerobifermentaatiossa on toistaiseksi onnistunut ainoastaan muutamilla lajeilla, esimerkiksi *Clostridium butyricum*:lla, muilla tutkituilla lajeilla raakaglyserolin jäännesuolat estävät kasvun (Papanikolaou ym., 2000). Toisaalta suurimmat raportoidut vetysaannot on saatu käyttämällä juuri *Clostridium*-suvun bakteereita kuten *Clostridium butyricum*:a. *C. butyricum*:n vedyntuotto kuitenkin loppuu lähes kokonaan kun hiililähteenä toimii glyseroli. Tämä johtuu aineenvaihdunnan säätelystä, missä vedyntuotantoon johtava reitti suljetaan glyserolin toimiessa hiililähteenä (Saint-Amans ym., 2001).

Eri *Clostridium*-lajeilla vedyntuoton säätelyn on havaittu tapahtuvan eri kohdissa aineenvaihduntareittejä (Gonzalez-Pajuelo ym., 2006), joten on mahdollista että yhdistämällä kahdesta eri lajista aineenvaihduntareittien osia, voitaisiin saada aikaan bakteeri, joka pystyy tuottamaan vetyä kasvaessaan teknillinen glyseroli hiililähteenä. Tämä tilanne voitaisiin saavuttaa

yli-ilmentämällä vedyntuotosta vastaavaa hydrogenaasientsyymiä *C. butyricum*:n glyseroli hiililähteenä kasvaessa aktivoituvan promoottorin avulla *Clostridium acetobutylicum*:ssa.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli kloonata *C. butyricum*:n glyseroli hiililähteenä kasvaessa aktivoituvan 1,3-propaanidiolioperonin promoottori ($P_{1,3-pd}$) *Escherichia coli*:ssa ja tutkia pystytäänkö promoottori aktivoimaan glyserolilla tai glyseroliaineenvaihduntareitin lopputuotteella 1,3-propaanidiolilla *E. coli*:ssa, *Bacillus subtilis*:ssa ja *C. acetobutylicum*:ssa. Rakennettavaa vektoria voitaisiin myöhemmissä tutkimuksissa käyttää $P_{1,3-pd}$ -hydrogenaasi -konstruktiin rakentamiseen, jolla voitaisiin transformoida *C. acetobutylicum* ja tutkia sen kasvua sekä vedyntuottoa.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1. Vety tulevaisuuden energiamuotona

1900-luvun aikana maailman energiankulutus kasvoi yli kymmenkertaiseksi populaation kasvaessa samassa ajassa nelinkertaiseksi. Maailman primaarienergiankäyttö oli vuonna 1972 238 EJ ja vuonna 2004 jo 464 EJ. Maailman energiankulutus kasvaa noin 2,4 % vuosittain, suurimman kasvualueen ollessa Aasia, jossa vuosittainen kasvu viimeisen 14 vuoden ajalta oli 3,2 % / vuosi. Lisäksi energiantuotannon hiilidioksidipäästöt ovat kasvaneet yli 1,5 % vuosivauhtia vuoden 1990 20 Gt:sta vuoden 2005 yli 26 Gt:iin. Fossiilisten polttoaineiden käyttöä pyritään vähentämään sekä öljy- ja maakaasuvarantojen hupenemisen että ilmaston lämpenemisen seurauksena ja sen jatkumisen ehkäisemiseksi. Kasvavan energiantarpeen tyydyttämiseksi tarvitaan uusiutuvia kasvihuonekaasuja päästämättömiä energianlähteitä. Uusiutuvat energianlähteet ovat toistaiseksi energian tuotantomäärältään pienin, mutta kuitenkin nopeimmin kasvava energiantuotannon sektori. (Sims ym., 2007).

Uusiutuvista energianlähteistä saatava energia on aina suoraan tai välillisesti lähtöisin auringosta. Nykyisin energiantuotannossa käytettäviä uusiutuvia energianlähteitä ovat vesi, tuuli, biomassa, suora aurinkoenergia ja maalämpö. Aurinkoenergiaa on saatavilla huomattavasti kaikkia muita uusiutuvia energianlähteitä enemmän. Maapallon pinnalle tulee säteilyä noin 178000 TW säteilyenergiaa vuodessa, joka on yli 13000-kertainen määrä nykyiseen vuosittaiseen energiankulutukseen verrattuna (Rupprecht ym., 2006). Auringon säteilyenergian valtava määrä tekee siitä soveltuvan laajan skaalan energiantuotantoon, mutta sen käyttöä primaarisena energianlähteenä rajoittaa sen pieni efektiivinen energiatiheys (energia / pinta-ala), joka on parhaimmillaankin vain noin 1 kW / m² (Miyamoto, 1997). Auringon energian talteenottaminen fotosynteesisten organismien avulla on mahdollista pienelläkin efektiivisellä energiatheydellä, mikä mahdollistaa niiden hyväksikäytön säteilyenergian talteenotossa ja suuren skaalan puhtaan polttoaineen tuotannossa.

Vetyä pidetään yhtenä lupaavimmista tulevaisuuden polttoaineista (Abraham, 2002). Sen etuina ovat puhtaus ja suuri energiakapasiteetti suhteessa painoon. Vety palaa vedeksi seuraavan yhtälön mukaisesti: $2 \text{H}_2(\text{g}) + \text{O}_2(\text{g}) \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O}(\text{l})$. Reaktio on eksotermiäinen ja sen $\Delta H = -572 \text{ kJ / mol}$. Vedyn

polttoaineena käyttämisen puhtaus on kuitenkin täysin riippuvaista sen tuotantotavasta. Toisaalta tuotantotavan tulee olla myös kustannustehokas ja soveltua suuren skaalan tuotantoon, jotta vetyä voitaisiin yleisesti käyttää polttoaineena. Perinteisesti vedyn tuotossa on käytetty mm. maakaasun reformointia, kivihiilen kaasuunnuttamista ja veden elektrolyysiä, jotka kaikki ovat runsaasti energiaa kuluttavia menetelmiä (Nath & Das, 2004).

Maakaasun reformoinnissa metaanikaasu tai muu kaasumainen hiilivety reagoi kuumassa lämpötilassa (700-1100 °C) nikkelikatalyytin avulla veden kanssa muodostaen hiilimonoksidia ja vetyä ($\text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO} + 3 \text{H}_2$, $\Delta H = -191,7 \text{ kJ / mol}$). Syntynyt hiilimonoksidi voidaan vielä jatkokäsitellä matalammassa lämpötilassa (n. 130 °C), missä se reagoi jälleen veden kanssa, jolloin lopputuotteina syntyy hiilidioksidia ja vetyä ($\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2$, $\Delta H = 40,4 \text{ kJ / mol}$). Koska prosessi on riippuvainen fossiilisesta metaanista, ei sitä voida pitää ekologisesti kestävästä ratkaisuna vedyn tuotossa. Uutena sovelluksena tälle menetelmälle on kehitetty vesifaasissa matalassa lämpötilassa (n. 300 °C) tapahtuva biomassan reformaatio, missä hiilivedyt (esim. glukoosi, glyseroli) reagoivat platinakatalyytin avulla veden kanssa muodostaen vetyä (Cortright ym., 2002). Tällä menetelmällä voidaan saada aikaan systeemi, joka on energieettisesti neutraali.

Kivihiilen kaasuunnuttamisessa jauhettu kivihiili reagoi korkeassa lämpötilassa (yli 1300 °C) hapen kanssa muodostaen raakakaasua, joka koostuu vedystä, hiilimonoksidista ja hiilidioksidista. Reaktiossa syntyy myös jonkin verran metaania ja raakakaasuun jää lisäksi epäpuhtauksia. Raakakaasu jatkokäsitellään kuten maakaasun reformoinnissa, jolloin lopputuloksena saadaan pääosin hiilidioksidia ja vetyä. Tämäkin menetelmä on täysin riippuvainen maaperästä louhittavasta kivihiilestä, eikä siten ole hiilidioksidineutraali. Veden elektrolyysissä esikäsitelty demineralisoitu vesi altistetaan sähkövirralle, mikä saa aikaan vesimolekyylin hajoamisen vedyksi ja hapeksi. Tämä menetelmä ei vaadi suoraan fossiilisen hiilen käyttöä, mutta suuren energiantarpeensa vuoksi ei ole ekologisesti kestävä. (Mueller-Langer ym., 2007).

2.2. Biologinen vedyntuotto

Vedyn tuottaminen biologisesti uusiutuvista materiaaleista tarjoaa ekologisesti kestävä vaihtoehdon fossiilisia varantoja käyttäville menetelmille. Biologinen vedyntuotto tarkoittaa joko

vedyn tuottamista biomassan reformaatiolla tai mikrobien hyödyntämistä vedyn tuotossa. Biologinen vedyntuotto on kaikissa tapauksissa riippuvaista fotosynteesistä joko suoraan ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2$) tai välillisesti ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{hiilihydraatti} \rightarrow \text{H}_2$). Yleensä fotosynteesiin kykenevät organismit käyttävät auringon säteilyenergiasta saamansa energian hiilidioksidin fiksaamiseen ilmakehästä ja sitä kautta hiilihydraattien synteesiin. Hiilihydraatit toimivat muiden tehtävien lisäksi energiavarastona (tärkkelys, glykogeeni), joita organismit käyttävät aerobisissa olosuhteissa ATP:n tuotantoon käyttäen happea lopullisena elektronin vastaanottajana. Anaerobisissa olosuhteissa hapen pelkistämiseen päätyvät elektronikuljetusreitit ovat estyneitä, jolloin vetyä tuottavilla organismeilla lopullisena elektronin vastaanottajana toimivat protonit, jotka pelkistyvät vetykaasuksi ($2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$). Tämä yksinkertainen reaktio tapahtuu pääosin hydrogenaasientsyymien avulla. Itse reaktio tapahtuu hydrogenaasien aktiivisen kohdan monimutkaisessa metallikompleksissa. Diatsotrofisilla eli molekulaarisen typpikaasun fiksaamiseen kykenevillä organismeilla (esim. monet syanobakteerit) vetyä muodostuu myös typen fiksaation yhteydessä nitrogenaasientsyymien toimesta (Schütz ym., 2004). Mikrobiaalinen vedyntuotto voidaan jakaa fotosynteettiseen ja fermentatiiviseen vedyntuottoon. (Rupprecht ym., 2006). Seuraavissa osioissa kuvataan tarkemmin molempia tuottotapoja ja vertaillaan niiden mahdollisuuksia sekä rajoituksia.

2.2.1. Fotosynteesiin kykenevät vedyntuottajat

Fotosynteesi voidaan jakaa oksigeeniseen (happea tuottava) ja anoksigeeniseen (ei happea tuottava) fotosynteesiin. Oksigeenistä fotosynteesiä esiintyy ennen kaikkea kasveilla ja syanobakteereilla, anoksigeenista esimerkiksi purppurabakteereilla ja vihreillä rikkibakteereilla. Oksigeeniset organismit keräävät auringon säteilyenergiaa pystyäkseen hajottamaan vesimolekyylejä hapeksi, protoneiksi ja elektroneiksi, joita tarvitaan hiilidioksidin fiksatioon ilmasta. Anoksigeeniset organismit eivät pysty kehittämään tarvittavaa hapetuspotentiaalia vesimolekyylin hajottamiseksi vaan saavat hiilidioksidin fiksatioon tarvittavat elektronit ja protonit muilta substraateilta kuin vedeltä (esimerkiksi H_2S vihreillä rikkibakteereilla) (Rupprecht ym., 2006). Oksigeeniseen fotosynteettiseen vedyntuottoon liittyy kaikissa tunnetuissa organismeissa eräs merkittävä ongelma: Fotosysteemi II:n (PSII) hapettaessa vettä vapautuu väistämättä happea, joka toimii hyvin tehokkaana hydrogenaasien ja nitrogenaasien inhibiittorina. Tämä asettaa suuria haasteita oksigeenisen fotosynteesin suoraan soveltamiseen vedyntuottoon.

Oksigeeniseen fotosynteesiin kykenevillä organismeilla on aina kaksi sarjaan kytkettyä fotosysteemiä (PSII ja PSI), kun taas anoksigeeniseen fotosynteesiin kykenevillä on vain yksi fotosysteemi. Syanobakteerien ja kasvien fotosysteemien uskotaan yleisesti kehittyneen anoksigeenisten fotosysteemien fuusiolla. Purppurabakteerien fotosysteemi on tyyppiä II ja vihreiden rikkibakteerien tyyppiä I. Tyypin II fotosysteemissä on syklinen elektroninkierto: Elektroni virittyy ylemmälle energiatasolle reaktiokeskuksen absorboidessa antennimolekyyleillään fotonin, kulkee feofytiinin ja kinonin kautta sytokromi bc_1 -kompleksille, joka siirtää elektronin sytokromi c_2 :lle, joka taas palauttaa elektronin takaisin reaktiokeskukselle. Elektronin viritystilän purkautumisesta vapautuva energia mahdollistaa sytokromi bc_1 :n protonien pumppaamisen ulos soluista. Syntyvä protonigradientti toimii bakteerin energianlähteenä ATP-synteesissä. Tyypin I fotosysteemissä on pääpiirteittäin vastaava syklinen elektroninkierto, mutta osa elektroneista siirtyy virittyessään reaktiokeskuksesta rauta-rikkiproteiini ferredoksiinille, jonka ferredoksiini–NAD-reduktaasi hapettaa samalla pelkistäen NAD^+ :n NADH:ksi. Syklistä näin poistuvat elektronit korvataan hapettamalla H_2S HSO_4^{2-} :ksi. (Hauska ym., 2001; Vermeaglio & Joliot, 1999).

2.2.1.1. Syanobakteerit

Monet syanobakteerit kykenevät oksigeeniseen vedyntuottoon fotoautotrofisesti eli käyttäen energianlähteenä ainoastaan auringonvaloa ja hiililähteenä ainoastaan ilmakehän hiilidioksidia. Vedyntuottoon kykeneviä syanobakteereita on löydetty ainakin 14 syanobakteerisuvusta monissa eri viljelyolosuhteissa (Lopes Pinto ym., 2002). Syanobakteereissa vedyn tuottaminen tapahtuu kahden eri entsyymin toimesta anaerobisissa olosuhteissa. Nitrogenaasi tuottaa vetyä typen fiksaation yhteydessä sivutuotteena ja hydrogenaasi tuottaa vetyä pelkistämällä protoneita hapetus-pelkistystasapainon säilyttämiseksi (kuva 2.1.). Nitrogenaasin kautta tapahtuva vedyntuotto on huomattavasti tehottomampaa kuin hydrogenaasin kautta tapahtuva tuotto. Tämä johtuu siitä että typen fiksaatio on ATP:tä kuluttava prosessi, jossa vetyä syntyy ainoastaan sivutuotteena. (Rupprecht ym., 2006).

Syanobakteerien hydrogenaasientsyymit ovat NiFe -tyyppiä. NiFe-hydrogenaasit ovat yksi kolmesta tunnetusta hydrogenaasityypistä. NiFe-hydrogenaaseilla on dinukleaarinen aktiivinen kohta, jossa on sekä nikkeli- että rauta-atomi, kun muiden hydrogenaasityyppien aktiivisessa kohdassa on ainoastaan rauta-atomi tai -atomeita (Fe-hydrogenaasit ja FeFe-hydrogenaasit) (Shima & Thauer, 2007). NiFe-hydrogenaasit ovat tehottomampia vedyntuotossa kuin vain rautaa sisältävät

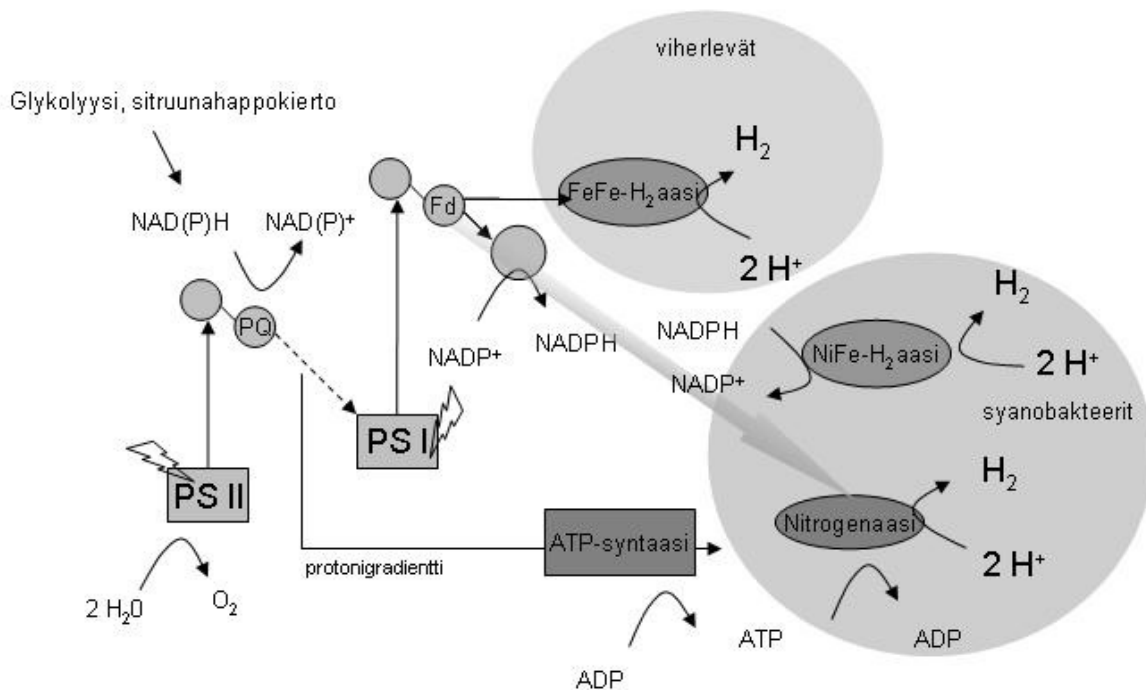
hydrogenaasit, mutta ne kestävät paremmin hapettavaa ympäristöä ja inaktivoituvat palautuvasti hapen läsnäollessa, toisin kuin Fe-hydrogenaasit, jotka inaktivoituvat palautumattomasti (Cournac ym., 2004). Tämä on tärkeää syanobakteereilla, joiden fotosynteesi on oksigeenistä. Syanobakteereilla vedyntuotosta vastaavan kaksisuuntaisen NiFe-hydrogenaasin substraattina toimii parhaiten NADPH, joka yhdessä NADH:n kanssa toimii syanobakteereilla universaalina elektroninluovuttajana hydrogenaasivälitteisessä vedyntuotossa. Syanobakteerit pystyvät tuottamaan NADPH:ta kolmella tapaa: normaalilla fotosynteesillä (fotosysteemi II ja I molemmat käytössä), pimeäfermentoimalla fotosynteesillä tuotettuja hiilihydraatteja tai fotofermentaatiolla, jossa NADP⁺ pelkistetään käyttäen ainoastaan fotosysteemi I:tä, joka saa tarvittavat elektronit ja protonit fermentaatiossa pelkistyvästä plastokinonilta. Syanobakteerien käyttö vedyn tuottamisessa on houkuttelevaa, koska ne pystyvät tuottamaan sitä vedestä pelkistään auringonsäteilyn energialla. Niiden tuottotehoa heikentävät kuitenkin niiden vetyä kuluttavat hydrogenaasit sekä fotosynteesissä vapautuva happi, joka inhiboi sekä nitrogenaaseja että hydrogenaaseja. (Nath & Das, 2004; Rupprecht ym., 2006) .

2.2.1.2. Viherlevät

Myös tietyt eukaryootiset fototrofiset viherlevät (esimerkiksi *Chlamydomonas reinhardtii* ja *Chlorella vulgaris*) pystyvät tuottamaan vedestä vetyä. Aerobisissa olosuhteissa nämä levät käyttävät koko fotosysteemiä (PSII ja PSI) ja syntetisoivat hiilidioksidia fiksaamalla hiilihydraatteja, joita solut käyttävät energiantuotantoon glykolyysin, sitruunahappokierron ja oksidatiivisen fosforylaation avulla. Anaerobisissa olosuhteissa oksidatiivinen fosforylaatio mitokondrioissa ei toimi ja kertyvä ylimääräinen pelkistyspotentiaali kanavoidaan plastokinonille, josta elektronit ohjataan fotosysteemi I:n kautta ferredoksiinille. Ferredoksiini pelkistää hydrogenaasin, joka vuorostaan pelkistää protoneita vetykaasuksi (kuva 2.1.) (Melis & Happe, 2001).

Viherlevien hydrogenaasit ovat FeFe-hydrogenaaseja, jotka inaktivoituvat palautumattomasti pienilläkin happipitoisuuksilla (Ghirardi ym., 2007). Näiden hydrogenaasien k_{cat} on kuitenkin noin 100-kertainen muihin hydrogenaaseihin verrattuna (Adams, 1990). FeFe-hydrogenaasien herkkä inaktivoituminen hapen läsnäollessa tekee viherlevien käytöstä vedyntuotossa hankalaa, koska fotosysteemi II tuottaa happea hajottaessaan vettä. Leväviljelmä saadaan kuitenkin tuottamaan vetyä, kun erotetaan ajallisesti hiilihydraattisynteesi ja fermentatiivinen vedyntuotto (Melis ym.,

2000). Fotosysteemi II inaktivoituu rikin puutteessa, joten estämällä viljelmän rikinsaanti, happi kulutetaan loppuun ja viljelmästä tulee anaerobinen. Anaerobisissa olosuhteissa syntetisoitu hydrogenaasi pysyy aktiivisena, joten fermentaatiossa syntyvä liika pelkistyspotentiaali purkautuu vedyntuotona. Viherlevien tehokkuutta vedyntuotossa voitaisiin kuitenkin parantaa vielä huomattavasti fotoneja absorboivan antennin kokoa pienentämällä (Polle ym., 2002) ja vähentämällä hydrogenaasin happiherkkyyttä molekyylibiologian keinoin (Rupprecht ym., 2006).



Kuva 2.1. Syanobakteerien ja viherlevien vedyntuotto. Vetyä tuotetaan vain kun PSII ei ole toiminnassa ja plastokinoni saa elektroninsa fermentaatiosta. Nitrogenaasivälitteiseen vedyntuottoon kykenevät ainoastaan syanobakteerit. Syanobakteerien hydrogenaasi on NiFe-tyyppiä ja viherlevien FeFe-tyyppiä. Lyhenteet: PQ plastokinoni, Fd ferredoksiini. (Mukaiillen Melis & Happe, 2001; Rupprecht ym., 2006).

2.2.1.3. Anoksigeeniset fotosynteettiset vedyntuottajat

Anoksigeeniset fotosynteettiset vedyntuottajat ovat pääasiassa joko purppurabakteereita tai vihreitä rikkibakteereita. Näilläkin organismeilla fotosysteemit vastaavat fotonien absorboimisesta sekä energian ja elektronien siirrosta protonigradienitin luomiseen ja rikkibakteereilla myös NADP^+ :n pelkistämiseen. Purppurabakteerit kasvavat parhaiten ftoheterotrofisesti (hiililähteenä orgaaniset

molekyylit, energianlähteenä valo), mutta pystyvät kasvamaan myös fotoautotrofisesti (hiililähteenä CO₂, energianlähteenä valo) (Tabita, 1995), aerobisella tai anaerobisella respiraatiolla (orgaaniset molekyylit sekä hiili- että energianlähteenä, lopullisena elektronin vastaanottajana muu kuin aineenvaihdunnan tuote, esimerkiksi NO₃) (Satoh ym., 1976) sekä fermentaatiolla (Gurgun ym., 1976). Vetyä tuottuu kuitenkin ainoastaan ftoheterotrofisessa kasvussa (Koku ym., 2002). Purppurabakteereilla vedyntuotosta vastaa pääosin tai kokonaan nitrogenaasi reaktioyhtälön $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- + 4\text{ATP} \rightarrow \text{H}_2 + 4\text{ADP} + 4\text{Pi}$ mukaisesti, kun molekulaarista tyypeä ei ole saatavilla (Nandi & Sengupta, 1998). Nitrogenaasin ensisijainen inhibiittori on happi, joka saa aikaan irreversiibelin inhibition, mutta myös ammonium-ionit repressoivat nitrogenaasisynteesiä ja nitrogenaasia reversiibelisti (Jones & Monty, 1979).

Purppurabakteereilla on useimmiten myös hydrogenaaseja, mutta nämä toimivat pääosin vetyä hapettavina entsyymeinä ja ovat siten nitrogenaasin tuottamaa vetyä kuluttava tekijä (Koku ym., 2002). Useissa tutkimuksissa onkin todettu hydrogenaasimutatoitujen kantojen tuottavan huomattavasti villityyppiä enemmän vetyä (Jahn ym., 1994; Kern ym., 1994; Ooshima ym., 1998). Anoksigeeniset fotosynteettiset vedyntuottajat pystyvät tuottamaan vetyä hyvällä saannolla (substraatin vetymäärä suhteessa tuotettuun vetymäärään), koska ne pystyvät hapettamaan orgaaniset molekyylit kokonaan hiilidioksidiksi ja vedyksi. Orgaaniset hiililähteet hapetetaan sitruunahappokierrossa ja elektronit kuljetetaan elektroninsiirtoketjussa NAD/NADH:n ja ferredoksiinin kautta nitrogenaasille, joka pelkistää niillä protoneja vedyksi. Kokonaisprosessi on endergoninen, ja siihen tarvittava energia saadaan fotosynteesin avulla tuotetusta ATP:stä. (Rupprecht ym., 2006) .

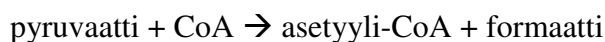
Fotosynteesin jokaisessa vaiheessa valokvantin absorboimisesta glukoosin synteesiin tapahtuu energiahukkaa. Optimaalisissa olosuhteissa systeemi voi toimia n. 27 % tehokkuudella, mutta tyypillisesti tehokkuus on n. 5 % (Kruse ym., 2005). Näin ollen mahdollisimman tehokkaan vedyntuoton aikaansaamiseksi välivaiheet veden hajotuksesta protonien pelkistämiseen tulisi minimoida. Välivaiheiden minimoimiseksi on pyritty kehittämään myös puoliksi keinotekoisia fotosysteemeitä ja hydrogenaaseja hyödyntäviä komplekseja, joissa viherlevän happea tuottava PSII liitettäisiin keinotekoiseen tai biologiseen elektronikuljettajaan ja PSI:een. Johtimen toiselle puolelle muodostettaisiin FeFe-hydrogenaasikerros, joka pelkistäisi protonit johtimesta saaduilla elektroneilla vedyksi. Näin vältettäisiin ylimääräiset välivaiheet ja herkästi hapettumisesta inhiboituva FeFe-hydrogenaasi saataisiin eristettyä happea tuottavasta PSII:sta (Esper ym., 2006). Yhtenäistä systeemiä, jossa fotosysteemit ja hydrogenaasi olisi saatu tuottamaan vetyä vedestä ei ole

vielä pystytty rakentamaan. Hydrogenaasi on kuitenkin saatu immobilisoitua ja tuottamaan vetyä sähkövirrasta (Noda ym., 1998) ja PSII immobilisoitua Langmuir–Blodgett-kalvona ja tuottamaan sähkövirtaa (Badura ym., 2006). Näiden puoliksi keinotekoisien systeemien kuten kokonaan biologisten vedyntuottosysteemienkin kehittymiseksi olisi tärkeää kehittää tai löytää paremmin happea sietävä tehokas FeFe-hydrogenaasi, jolloin hapellisen ja hapettoman tilan täydellinen eristäminen ei olisi yhtä kriittistä systeemin toimivuuden kannalta.

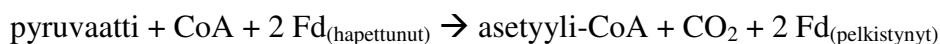
2.2.2. Fermentoivat vedyntuottajat

Monet obligatorisesti tai fakultatiivisesti anaerobiset bakteerit pystyvät fermentoimaan hiilihydraatteja tuottaen vetyä. Fermentaatioissa vedyntuotto on pääasiassa pakoreitti, jolla hiilihydraattien hapetuksessa syntyvä ylimääräinen pelkistyspotentiaali saadaan purettua. Suurin osa fermentatiivisesta vedyntuotosta aiheutuu glykolyysissä syntyvän pyruvaatin anaerobisesta hapetuksesta kahdella vaihtoehdoisella tavalla:

1. Pyruvaatti–formaattilyaasi enteerisillä bakteereilla:



2. Pyruvaatti–ferredoksiinioksidoreduktaasi obligatorisilla anaerobibakteereilla:

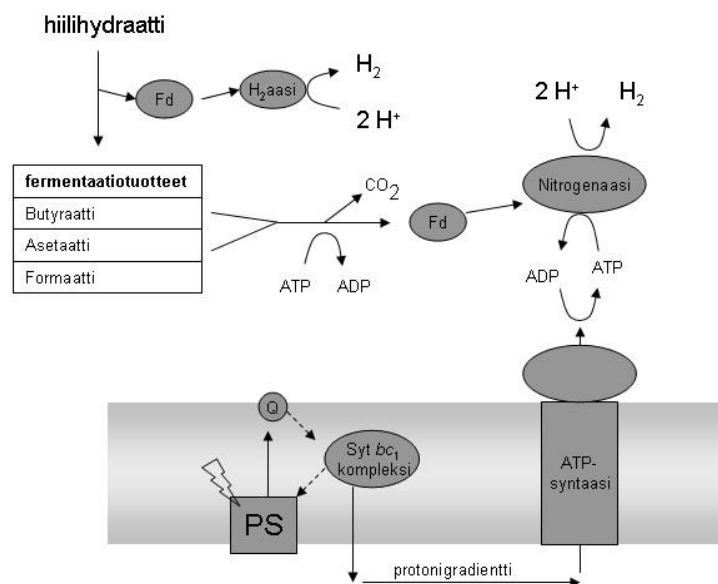


Enteerisillä bakteereilla formaatti–vetylyaasi hapettaa formaatin ja siirtää elektronin hydrogenaasille, joka pelkistää protoneita vedyksi (Maeda ym., 2007). Obligatorisilla anaerobeilla pelkistynyt ferredoksiini luovuttaa elektronit suoraan hydrogenaasille. Näiden prosessien vetysaannot ovat melko pieniä, vain yhdestä (fakultatiiviset anaerobit) kahteen (obligatoriset anaerobit) vetymolekyylä pyruvaattimolekyylä kohden. Fakultatiivisten anaerobien etuna huonommasta saannosta huolimatta on kuitenkin niiden parempi hapensietokyky. Pyruvaatin hapetuksessa syntynyt Asetyyli-CoA käytetään ATP:n tuotantoon jatkoreaktioissa, joissa lopputuotteena syntyy alkoholeja tai orgaanisia happoja. (Hallenbeck & Benemann, 2002).

Fermentatiivisen vedyntuoton etuina valosta riippuvaisiin menetelmiin nähden ovat prosessin jatkuvuus (ei riippuvainen valosta), lopputuotteena syntyvät arvokkaat metaboliitit (esimerkiksi butyraatti, laktaatti, asetaatti), anaerobisuus (suuren skaalan prosessit helpompia toteuttaa, koska ei tarvitse huolehtia hapensaannista) ja ennen kaikkea vedyntuotantoon kelpaavien hiililähteiden

monipuolisuus. Lisäksi fermentatiiviset bakteerit kasvavat nopeasti ja niiden vedyntuottonopeus on suuri. Fermentaation haittupuolina ovat kuitenkin sen heikohko saanto (teoreettinen maksimi 4 mol H_2 / mol glukoosi) ja se että fermentaatioissa syntyy CO_2 - H_2 -kaasuseos, josta vety täytyy erottaa (Nath & Das, 2004). Hiililähteiden monipuolisuus mahdollistaa kuitenkin fermentaation käyttämisen erilaisten hiilihydraatteja sisältävien jätteiden muuntamisessa vetyenergiaksi. Tällaista jätettä syntyy erityisesti elintarviketeollisuudesta (Yokoi ym., 2002; Yu ym., 2002), maa- ja metsätaloudesta (Kapdan & Kargi, 2006), kunnallisesta jätehuollosta ja enenevässä määrin biodieselin tuotannosta (Frost & Sullivan, 2006). Elintarviketeollisuuden sekä maa- ja metsätalouden fermentointiin kelpaavat jätteet ovat pääasiassa tärkkelystä ja selluloosaa kun taas biodieseltuotannon jäte on pääosin glyserolia.

Tehokkaat pimeäfermentoivat vedyntuottajat kuten *Clostridium butyricum* eivät kykene hajottamaan fermentaatioissa lopputuotteena syntyviä liukoisia rasvahappoja kuten butyraattia ja asetaattia jatkometabolian endergonisuuden johdosta, mutta anoksigeeniset fotosynteettiset fermentoijat kuten puppurabakteerit kykenevät valoenergian avulla hapettamaan myös orgaaniset hapot vedyksi ja hiilidioksidiksi. Pimeäfermentoijien ja anoksigeenisten fotosynteettisten fermentoijien yhteisfermentaatiolla onkin saatu lupaavia tuloksia (kuva 2.2.) (Lee ym., 2002; Yokoi ym., 1998).



Kuva 2.2. Anoksigeenisten fotosynteettisten fermentoijien ja pimeäfermentoijien vedyntuotto. Pimeäfermentatiiviset bakteerit tuottavat aineenvaihdunnan lopputuotteena liukoisia rasvahappoja, joita fotofermentatiiviset bakteerit pystyvät edelleen hajottamaan fotosynteesistä saadun energian avulla hiilidioksidiksi ja käyttämään elektronit vedyntuottoon. Lyhenteet: Q kinoni, Fd ferredoksiini. (Mukaiillen Rupprecht ym., 2006).

2.3. Vedyntuotto biodieseltuotannon jäteglyserolista

2.3.1. Yleistä

Vuonna 2003 EU15:n biodieseltuotanto oli noin 1,4–1,5 miljoonaa tonnia (Bozbas, 2008; EBB, 2007). Vuonna 2006 EU25:n luku oli kasvanut 4,9 miljoonaan tonniin ja kasvu vuodesta 2005 oli 54 % (EBB, 2007). Biodiesel tuotetaan transesterifikaatioreaktiolla triasyyliglyserolin ja metanolin tai etanolin välillä, jolloin lopputuotteena saadaan rasvahappojen metyyliestereitä ja glyserolia. Prosessissa tuottuu glyserolia noin 100 kg biodieseltonnia kohti. Glyserolin ylituotanto biodieselin tuotannon kasvusta johtuen on saanut aikaan sen hinnan putoamisen noin kymmenesosaan vuosien 2004-2006 välillä. Toisin kuin aikaisemmin, sen katsotaan olevan yhä enemmän jäte kuin arvokas raaka-aine. Eräät anaerobibakteerit pystyvät kuitenkin fermentoimaan raakaglyserolia teollisesti arvoikkaiksi yhdisteiksi (asetoni, butanoli, 1,3-propaanidioli, vety). On arvioitu, että biodiesellaitosten yhteyteen rakennettavien fermentaation avulla toimivien glyserolinjalostamoiden avulla saataisiin biodieselin tuotannosta taloudellisesti kannattavampaa ja samalla päästäisiin eroon ylimääräisestä jäteglyserolista. (Yazdani & Gonzalez, 2007).

Glyseroli on glukoosia pelkistyneempi yhdiste. Sen hapettaminen esimerkiksi pyruvaatiksi tuottaa kaksinkertaisen määrän NADH:ta glukoosiin verrattuna (Niehlsen ym., 2003). Monet bakteerit pystyvät käyttämään glyserolia ainoana hiililähteenä aerobisissa olosuhteissa, missä glyserolin hapetuksessa syntyvä ylimääräinen pelkistyspotentiaali voidaan purkaa elektroninsiirtoreittejä pitkin hapen pelkistämiseksi vedeksi. Anaerobisissa olosuhteissa sitä vastoin vain suhteellisen pieni joukko lajeja erityisesti *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Klebsiella* ja *Lactobacillus* -suvuista kykenee fermentoimaan glyserolia (Yazdani & Gonzalez, 2007). Näillä lajeilla on 1,3-propaanidiolia tuottava aineenvaihduntareitti, joka toimii ylimääräisen pelkistyspotentiaalin purkureittinä mahdollistaen elintärkeän hapetus-pelkistystasapainon säilymisen (Bouvet ym., 1995). Kuitenkin jotkut lajit *Propionibacterium* (Bories ym., 2004) ja *Anaerobiospirillum* (Lee ym., 2001) -suvuista kykenevät kasvamaan anaerobisesti glyseroli-fermentaatiolla ilman 1,3-propaanidiolia tuottavaa aineenvaihduntareittiä. Näiden lisäksi myös *Eschericia coli*:n on havaittu pystyvän fermentoimaan glyserolia tuottaen pääasiassa etanolia ja sukkiinaattia ilman 1,3-propaanidiolin tuottoa aineenvaihdunnan lopputuotteena (Dharmadi ym., 2006). Tämä on tärkeä havainto, sillä *E. coli*:n soveltamisesta fermentaatioprosesseihin on paljon aikaisempaa kokemusta ja sille on olemassa muita lajeja kehittyneempiä rekombinantti-DNA-tekniikoita.

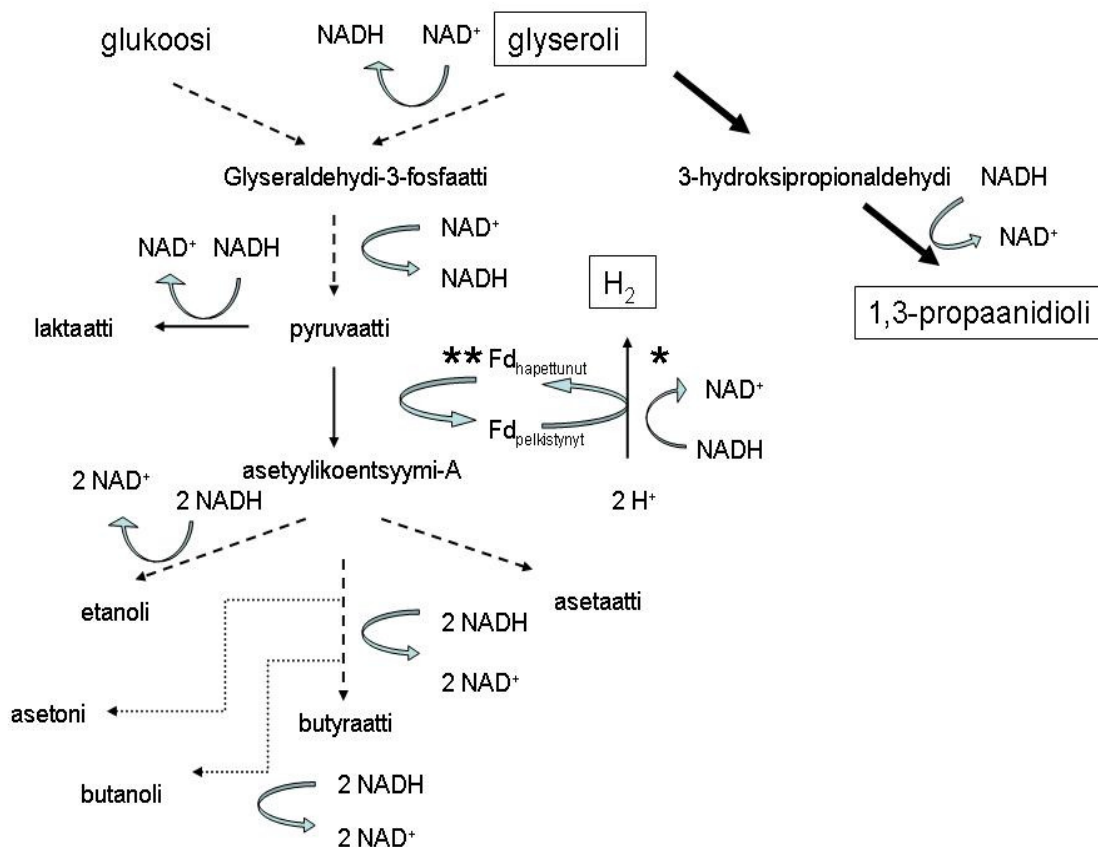
2.3.2. *Clostridium butyricum* ja *Clostridium acetobutylicum* biodieseltuotannon jätteiden hyödyntämisessä

Clostridium-suvun bakteerit ovat gram-positiivisia, anaerobisia, itiöiviä bakteereita. Suvun bakteereista erityisesti *C. acetobutylicum*:a on käytetty menestyksekkäästi monien teollisesti arvokkaiden kemikaalien kuten asetonin, butanolin ja etanolin tuotannossa (Qureshi & Maddox, 1995). Monet *Clostridium*-suvun bakteerit ovat hyviä vedyntuottajia (Lin ym., 2007) ja osa suvun lajeista pystyy kasvamaan glyseroli ainoana hiililähteenä tuottaen 1,3-propaanidiolia (Biebl & Sproer, 2002). *C. acetobutylicum*:n katsotaan olevan suvun lajeista parhaiten tunnettu ja sille on kehitetty suhteellisen paljon rekombinantti-DNA-tekniikoita. *C. acetobutylicum* ei kuitenkaan kykene kasvamaan glyseroli ainoana hiililähteenä, koska siltä puuttuu 1,3-propaanidiolin tuottamisen mahdollistavan aineenvaihduntareitin geenit (Nolling ym., 2001). *C. butyricum*:lla sen sijaan on 1,3-propaanidiolioperoni ja se pystyy kasvamaan glyseroli ainoana hiililähteenä tuottaen runsaasti 1,3-propaanidiolia (Raynaud ym., 2003). 1,3-propaanidioli on arvokas raaka-aine erilaisten polykondensaattien kuten polyestereiden synteesissä ja *C. butyricum*:a onkin tutkittu enemmän 1,3-propaanidiolintuoton kuin vedyntuoton kannalta (Biebl ym., 1999; Gonzalez-Pajuelo ym., 2005; Gonzalez-Pajuelo ym., 2004). Nytemmin kiinnostus lajia kohtaan on kasvanut myös sen tehokkaan vedyntuoton osalta.

Kasvaessaan glyseroli pääasiallisena hiililähteenä *C. butyricum*:n hydrogenaasiaktiivisuus putoaa noin viidesosaan verrattuna aktiivisuuteen kun hiililähteenä on glukoosi (Saint-Amans ym., 2001). Tällöin glyserolin hapetuksessa muodostuva NADH käytetään pääasiassa 3-hydroksipropionaldehydin pelkistämiseen 1,3-propaanidioliksi. Tästä syystä *C. butyricum* ei ole hyvä laji vedyntuottoon glyserolista ainakaan siihen asti kunnes saadaan kehitettyä sille soveltuvia geneettisiä työkaluja, joilla voidaan muokata sen aineenvaihduntaa. Toistaiseksi *C. butyricum*:lle ei ole raportoitu edes toimivaa transformaatiomenetelmää.

Vaikka *C. acetobutylicum* ei pystykään kasvamaan glyseroli ainoana hiililähteenä, on sen fysiologiaa glukoosia pelkistyneemmällä hiililähteellä kasvaessa pystytty tutkimaan glukoosi-glyserolisekoituksilla. On huomattu, että glukoosi-glyserolisekoituksella myös sen, kuten *C. butyricum*:n, vedyntuotto vähenee huomattavasti (Vasconcelos ym., 1994). Näillä kahdella lajilla vedyntuoton vähenemisen on havaittu johtuvan kuitenkin eri syistä (Gonzalez-Pajuelo ym., 2005). Gonzalez-Pajuelo ym. siirsivät *C. butyricum* VPI 3266 -kannalta 1,3-propaanidiolioperonin koodaavan osan (pSPD5) *C. acetobutylicum* DG1 -kantaan ja havaitsivat, että transformaation

jälkeen tämä pystyi kasvamaan glyseroli ainoana hiililähteenä tuottaen 1,3-propaanidiolia. Vertaillen *C. butyricum* VPI 3266 ja *C. acetobutylicum* DG1(pSPD5) -kantoja Gonzalez-Pajuelo ym. huomasivat, että *C. butyricum*:lla vedyntuoton väheneminen johtui hydrogenaasiaktiivisuuden vähenemisestä, kun taas *C. acetobutylicum*:lla väheneminen johtui NADH–ferredoksiinireduktaasin ja ferredoksiini–NAD-reduktaasin aktiivisuuksien suhteen muutoksesta (Gonzalez-Pajuelo ym., 2006). NADH–ferredoksiinireduktaasin aktiivisuus glyserolin toimiessa pääasiallisena hiililähteenä oli matala ja ferredoksiini–NAD-reduktaasin aktiivisuus korkea – päinvastoin kuin *C. butyricum*:lla. Näin ollen *C. acetobutylicum*:lla pelkistynyt ferredoksiini ohjautuu pääasiassa NAD⁺:n pelkistämiseen NADH:ksi, eikä protonien pelkistämiseen vedyksi (kuva 2.3.). Gonzalez-Pajuelo ym. arvelivat tutkimuksessaan tämän johtuvan ferredoksiini–NAD-reduktaasin hydrogenaasia suuremmasta katalyyttisestä tehokkuudesta.



Kuva 2.3. *C. butyricum*:n, *C. acetobutylicum*:n ja *C. acetobutylicum* DG1(pSPD5):n keskusaineenvaihduntareitit. *C. butyricum* ei tuota asetonia eikä butanolia, 1,3-propaanidiolia tuottavat *C. butyricum* ja *C. acetobutylicum* DG1(pSPD5). * Vedyntuoton säätelykohta *C. butyricum*:ssa ** Vedyntuoton säätelykohta *C. acetobutylicum*:ssa. Lyhenteet: Fd ferredoksiini. (Mukaiillen Gonzalez-Pajuelo ym., 2006; Saint-Amans ym., 2001; Vasconcelos ym., 1994).

On mahdollista, että yli-ilmentämällä *C. acetobutylicum*:ssa hydrogenaasientsyymiä voitaisiin kompensoida hydrogenaasin ferredoksiini–NAD-reduktaasia heikompaan tehokkuutta ja ohjata elektroneita vedyntuotantoon. Tällöin solun ylimääräinen pelkistyspotentiaali pääsisi paremmin purkautumaan ja *C. acetobutylicum* pystyisi mahdollisesti kasvamaan glyseroli ainoana hiililähteenä ja tuottamaan vetyä. Hydrogenaasin yli-ilmentäminen voitaisiin toteuttaa käyttämällä *C. butyricum*:n 1,3-propaanidiolioperonin promoottoria, jonka tiedetään aktivoituvan *C. butyricum*:ssa kun pääasiallisena hiililähteenä on glyseroli (Raynaud ym., 2003).

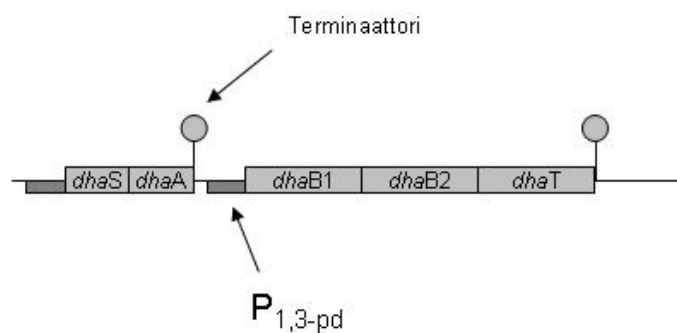
2.3.3. Rekombinanttiproteiinien tuotto *Clostridium*-suvun bakteereissa

Rekombinanttiproteiinien tuottoon *Clostridium*-suvun lajeissa soveltuvia promoottoreita tunnetaan vain muutamia. *C. acetobutylicum*:ssa on menestyksekkäästi käytetty xyloosilla indusoituvaa *Staphylococcus xylosus*:n promoottoria (Girbal ym., 2003) ja konstitutiivista *C. acetobutylicum*:n tiolaasigeenin promoottoria (Gonzalez-Pajuelo ym., 2005). Lisäksi *C. perfringens*:n ferredoksiinigeenin promoottori on todettu käyttökelpoiseksi sialidaasientsyymien tuotossa (Takamizawa ym., 2004). Näistä ainoastaan xyloosilla indusoidulla promoottorilla pystytään kontrolloimaan rekombinanttigeenin ilmentämismäärää ja -aikaa. Tarkka säätelymahdollisuus on erittäin hyödyllistä monissa rekombinanttiproteiinituotoissa, erityisesti jos tuotettu proteiini on haitallinen tuottoorganismille. *C. butyricum*:n 1,3-propaanidiolioperonin promoottorin soveltumista rekombinanttiproteiinien ja erityisesti glyseroliaineenvaihdunnan yhdisteiden tuottoon kannattaa selvittää, sillä glyseroli on käyttökelpoinen ja halpa indusori suurenkin luokan fermentaatioissa. Hydrogenaasin yli-ilmentäminen $P_{1,3-pd}$:n avulla loisi onnistuessaan tilanteen, jossa vedyntuoton substraatti itse säätelee vedyntuottoa.

2.3.4. 1,3-propaanidiolioperoni

Clostridium butyricum:n glyserolista 1,3-propaanidiolin tuottoon johtavan aineenvaihduntareitin geenit ovat polykistronisesti organisoituneena 1,3-propaanidiolioperoniin (Raynaud ym., 2003). Operoni koostuu kolmesta geenistä *dhaB1*, *dhaB2* ja *dhaT* (kuva 2.4.). *DhaB1*:n uskotaan olevan glyserolidehydrataasi, *DhaB2*:n sitä aktivoiva proteiini ja *DhaT*:n 1,3-propaanidiolidehydrogenaasi. Raynaud ym. osoittivat Northern blot -analyysillä, että operoni aktivoituu kun hiililähteenä on glyseroli-glukoosi-sekoitus (27 g / l glyseroli, 3 g / l glukoosi). Toistaiseksi ei kuitenkaan tiedetä mikä molekyyli tai solunsisäinen tapahtuma transkription aktivoitumisen indusoi. Aktivoituminen

näky myös entsyymitasolla: Glyserolidehydraasin aktiivisuus oli 45–kertainen ja 1,3-propaanidiolidehydrogenaasin noin 280–kertainen glukoosi-glyserolisekoituksella verrattuna pelkkään glukoosiin (Saint-Amans ym., 2001). Promoottorista ylävirtaan sijaitsevat kahden geenin, *dhaA* ja *dhaS*, sekvenssit. Sekvenssianalyysin perusteella nämä kaksi geeniä muodostavat yhdessä promoottorinsa kanssa operonin (kuva 2.4.). Näiden geenien tuotteiden sekvensseillä on merkittävää homologiaa prokaryooteilla yleiseen kahden komponentin signaalinvälitykseen osallistuvien proteiinien kanssa ja niiden uskotaan toimivan 1,3-propaanidiolioperonin transkription säätelyssä. (Raynaud ym., 2003).



Kuva 2.4. *C. butyricum*:n 1,3-propaanidiolioperoni. Todennäköisten säätelytekijöiden geenit *dhaS* ja *dhaA* sisältävä operoni sijaitsee P_{1,3-pd}:stä ylävirtaan. (Mukaillen Raynaud ym., 2003).

Vastaavaa operonia ei ole karakterisoitu muilta lajeilta kuin *C. butyricum*:lta, mutta sekvenssivertailu *Clostridium novyi* NT:n genomisekvenssin (GenBank CP000382) kanssa paljastaa vastaavanlaisen geeniryppään. Viiden geenin ryppäessä on 1,3-propaanidiolioperonia vastaava kolmen geenin alue, joiden koodamista proteiineista löytyy homologiaa 1,3-propaanidiolioperonin proteiinien kanssa seuraavasti:

YP_877302 (RefSeq) – DhaT: 78 % identtisyys, 90 % samankaltaisuus

YP_877303 – DhaB1: 78 % identtisyys, 88 % samankaltaisuus

YP_877304 – DhaB2: 67 % identtisyys, 83 % samankaltaisuus.

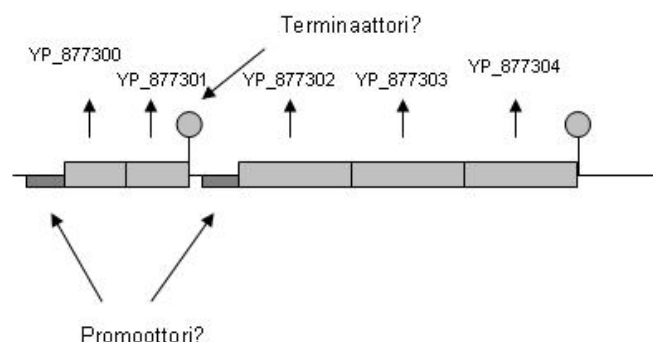
Lisäksi operonista ylävirtaan löytyy kaksi peräkkäistä geeniä, joiden koodaamilla proteiineilla on merkittävää homologiaa DhaS:n ja DhaA:n kanssa seuraavasti:

YP_877300 – DhaS: 48 % identtisyys, 67 % samankaltaisuus

YP_877301 – DhaA: 43 % identtisyys, 63 % samankaltaisuus.

Jokaista geeniä edeltää mahdollinen ribosomin sitoutumiskohta ja YP_877304:n jälkeen sekvenssistä löytyy mahdollinen Rho-riippumattomaan terminaatioon liittyvä varsi-lenkkirakenne (10 nukleotidin varsi, $\Delta G = -12,0$ kcal / mol), jota seuraa usean tyymiinukleotidin jono. Sen sijaan YP_877301:n jälkeen vastaavaa Rho-riippumattomaan terminaatioon viittaavaa varsi-lenkkirakennetta ei löytynyt. *C. butyricum*:n sekvenssistä tällainen löytyy heti *dhaA*:sta alavirtaan (Raynaud ym., 2003). On yllättävää, ettei terminaatiolenkkiä *C. novyi* NT:stä löytynyt, sillä YP_877301:n geenin lopetuskodonin ja YP_877302:n geenin aloituskodonin välillä on melko pitkä 205:n nukleotidin ei-koodaava alue, ja on todennäköistä, että alle 10 % *Clostridium*-suvun bakteerien terminaattoreista on muita kuin Rho-riippumattomia terminattoreita (de Hoon ym., 2005).

Geenin YP_877300 lopetuskodonin ja YP_877301:n aloituskodonin välillä on vain 12 nukleotidia, mikä viittaisi niiden operoniorganisaatioon. Samoin geenien YP_877302, YP_877303 ja YP_877304 välillä on vain 22–24 nukleotidia, mikä viittaisi myös näiden kolmen geenin operoniorganisaatioon (kuva 2.6.). *C. novyi* NT:n sekvenssin erona *C. butyricum*:n 1,3-propaanidiolioperoniin ja sen oletettuun säätelijäoperoniin on siis, että *C. novyi* NT:llä ei ole selkeää terminaatiolenkkiä mahdollisen säätelyoperonin alavirrassa, ja lisäksi *C. butyricum*:n DhaT homologin YP_877302:n geeni sijoittuu DhaB1:n ja DhaB2:n homologien YP_877303:n ja YP_877304:n geenien eteen, kun *C. butyricum*:ssa *dhaT* on operonissa viimeisenä. Sekvenssianalyysin perusteella on mahdollista, että *C. novyi* NT:llä on vastaava glyserolin aineenvaihduntareitti kuin *C. butyricum*:lla, mutta se on toistaiseksi täysin karakterisoimaton biokemiallisesti.



Kuva 2.6. *C. novyi* NT:n mahdollinen 1,3-propaanidiolioperoni.

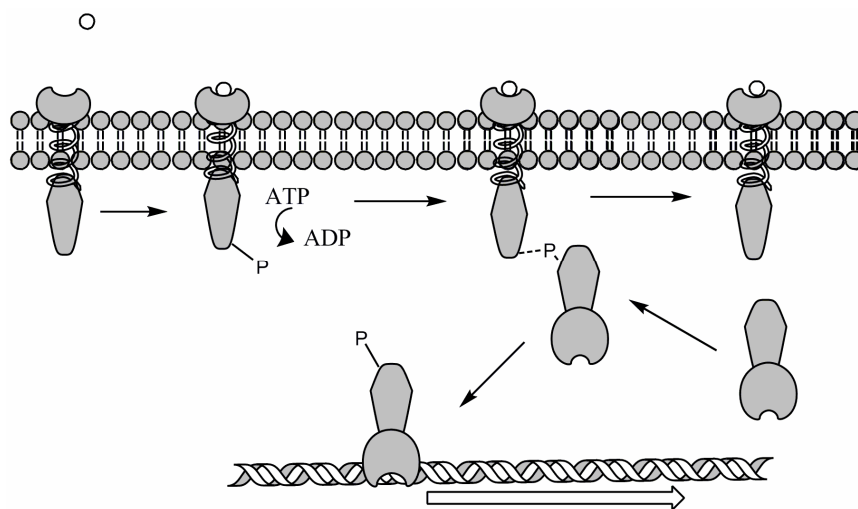
2.3.5. Kahden komponentin signaalinvälitys

Bakteerit pystyvät aistimaan ympäristöstään monia selviytymisen kannalta tärkeitä seikkoja kuten osmoottista aktiivisuutta, ionipitoisuuksia, pH:ta, lämpötilaa sekä ravinto- ja haitta-aineiden pitoisuuksia. Aistiminen tapahtuu yleensä transmembraaniproteiinien avulla, jotka tunnistavat signaalin ja siirtävät sen solukalvon läpi, mikä johtaa solussa signaalivasteeseen. Kaikki sensoriproteiinit eivät ole kuitenkaan transmembraanisia. Kahden komponentin signaalinvälitysreitissä on nimensä mukaisesti kaksi proteiinia, joista toinen toimii sensorina ja toinen vasteensäätelijänä. Klassisessa kahden komponentin signaalinvälityksessä sensoriproteiini on histidiinikinaasi, joka aktivoi signaalin tunnistessaan vasteensäätelijän, joka toimii useimmiten geeni-ilmentymisen säätelijänä. Muutokset geenien ilmentämisessä saavat aikaan solun vasteen signaalille. Muutos voi signaalista riippuen olla esimerkiksi aineenvaihdunnan reittien aktivoituminen (McKessar & Hakenbeck, 2007) tai solun kemotaktinen liike (Foyne ym., 2000). Molemmat komponentit koostuvat kahdesta domeenista: sensori N-terminaalista sensoriosasta ja C-terminaalista välittäjäosasta, vasteensäätelijä N-terminaalista signaalin vastaanottajaosasta ja C-terminaalista efektoriosasta. (Mascher ym., 2006).

Sensorit voidaan jakaa kolmeen ryhmään niiden sijainnin solussa perusteella. Suurin näistä ryhmistä on periplasmiset (tai ekstrasellulaariset) histidiinikinaasit, toiseksi suurin sytoplasmiset (liukoiset ja membraanikiinnitteiset) ja kolmantena membraaniproteiinit, joiden signaalintunnistus tapahtuu joko pelkästään membraaninlävistävässä kohdissa tai yhdessä niiden ja lyhyiden solunulkoisten lenkkien kanssa (Mascher ym., 2006). *C. butyricum*:n DhaS:ssä ei ole selkeitä membraaninlävistäviä sekvenssejä (Raynaud ym., 2003), joten se kuuluu mahdollisesti sytoplasmisten sensorihistidiinikinaasien ryhmään. Kahden komponentin signaalinvälitys tapahtuu kolmen fosforylaatioreaktion avulla. Ensimmäisessä vaiheessa sensorihistidiinikinaasi autofosforyloi C-terminaalisisessa välittäjäosassa olevan konservoituneen histidiinitähteen, toisessa vaiheessa fosforyyliryhmä siirtyy vastaanottajaproteiinille N-terminaalisen pään konservoituneeseen aspartaattitähteeseen ja kolmannessa vaiheessa tämä aspartaattitähde defosforyloidaan vastaanottajan, kinaasin tai erillisen fosfataasin toimesta (kuva 2.5.) (Perego ym., 1994; Stock ym., 2000).

Sensoriproteiinissa N-terminaalinen tunnistusosa on hyvin vaihteleva eri sensorien välillä, mikä kuvastaa niiden laajaa aktivaattorikirjoa. Sen sijaan C-terminaalinen välittäjäosa on hyvin konservoitunut ja domeenissa on yleensä kuusi erityisen konservoitunutta aluetta: H, X N, D, F ja G

-laatikot. Fosforyloituva histidiinitähde sijaitsee H-laatikossa. *C. butyricum*:n DhaS:n välittäjädomeni muodostaa ainoan tunnetun poikkeuksen, sen H-laatikossa histidiinitähden tilalla on lysiniinitähde. Lisäksi sekvenssivertailun perusteella vaikuttaisi, ettei *C. novyi* NT:n DhaS homologissakaan (YP_877300) olisi kyseistä histidiinitähdettä vaan glutamaatti vastaavalla paikalla. DhaS:n N-terminaalisen domeenin on merkittävää homologiaa YP_877300:n lisäksi muun muassa *C. acetobutylicum*:n metyylin vastaanottavan kemotaksisproteiinin ja *Salmonella typhimurium*:n 1,2-propaanidiolia ja glyserolia tunnistavan säätelijäproteiini PocR:n kanssa (Chen ym., 1994). (Raynaud ym., 2003).



Kuva 2.5. Kahden komponentin signaalinvälityksen periaate. Indusorin sitoutuminen sensoriproteiinin tunnistusosaan saa aikaan autofosforylaation. Fosforyyliryhmä siirretään vasteensäätelijäproteiinille. Tämän seurauksena vasteensäätelijäproteiini sitoutuu DNA:han ja säätelee transkriptiota. Kolmannessa vaiheessa vasteensäätelijä defosforyloidaan, mikä johtaa sen irtoamiseen DNA:sta (ei näy kuvassa). Kaikki sensoriproteiinit eivät ole kalvoproteiineja, ja kalvoproteiineillakin on vaihteleva määrä kalvon lävistäviä α -kierteitä.

Vasteensäätelijäproteiineissa yleensä N-terminaalinen domeeni on konservoitunut ja C-terminaalinen efektoriosa on vaihteleva. Suurin osa vasteensäätelijöistä on DNA:han sitoutuvia transkriptiotekijöitä, mutta joissakin tapauksissa C-terminaalinen osa toimii entsyyminä. Tällaisia ovat esimerkiksi kemotaksismetyyliesteri CheB (Simms ym., 1985) ja *Dictyostelium*:n cAMP-fosfodiesteri RegA (Shaulsky ym., 1996). On myös löydetty vasteensäätelijöitä, joilta C-terminaalinen efektoridomeeni puuttuu kokonaan. *C. butyricum*:n DhaA:n N-terminaalinen vastaanottajadomeeni on hyvin konservoitunut ja siitä löytyy paljon yhtäläisyyksiä kemotaksisproteiini CheY:n kanssa, jota pidetään vasteensäätelijäproteiinien N-terminaalisen osan

malliproteiinina (Lange ym., 1999; Raynaud ym., 2003; Stock ym., 1989). DhaA kuitenkin eroaa CheY:stä siinä että DhaA:lla ei ole CheY-proteiinien toiminnalle välttämätöntä hydroksyyliiryhmän sisältävää aminohappoa (Ser/Thr) kohdassa 87 (Lange ym., 1999), vaan sen korvaa isoleusiini-83 (Raynaud ym., 2003).

DhaA:n C-terminaalinen oletettavasti DNA:han sitoutuva efektoriosa on sekvenssiltään samankaltainen AraC / XylS -tyypin DNA:han sitoutuvien transkriptiofaktoreiden kanssa (Raynaud ym., 2003). Tämän tyypin transkriptiofaktoreilla on kaksi α -kierre-käännös- α -kierre-domeenia, jotka tunnistavat konsensussekvenssin AGCN₇TCCATA, jonka kaltainen sekvenssi myös 1,3-propaanidiolioperonin promoottorin -35 alueelta löytyy. AraC / XylS -tyypin transkriptiofaktorit toimivat yhtä tunnettua poikkeusta lukuunottamatta (CelD *E. coli*:ssa) transkription aktivaattoreina ja säätelevät pääasiassa hiiliaineenvaihduntaan, stressivasteisiin ja patogeneesiin liittyviä genejä. Esimerkiksi AraC säätelee yleisesti arabinoosikataboliaan ja XylS alkyylibentsoaattikataboliaan liittyviä genejä. *S. typhimurium*:n 1,2-propaanidioliaineenvaihduntaa säätelevä PocR kuuluu myös tyypin AraC / XylS transkriptiofaktoreihin. AraC / XylS -tyypin transkriptiofaktorit ovat yksi yleisimmistä transkriptiofaktoriryhmistä, mutta vasteensäätelijäproteiinina kahden komponentin signaalinvälityksessä niitä on toistaiseksi löydetty vain muutamia (Lange ym., 1999). (Gallegos ym., 1997).

2.4. Menetelmien teoriaa

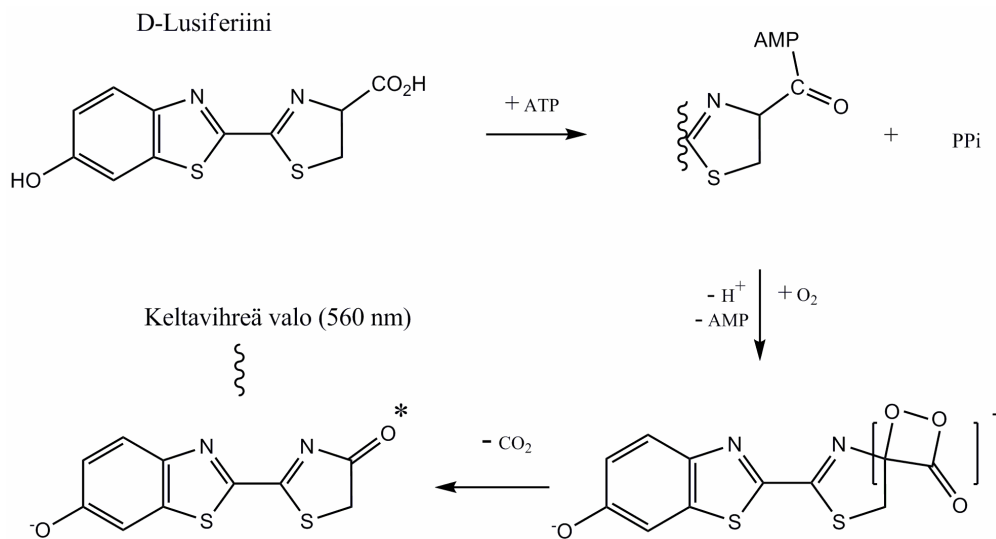
Suurin osa työstä koostui vektorikonstruktion rakentamisesta, joten käytetyt menetelmät olivat pääosin molekyylibiologian yleisiä työmenetelmiä. 1,3-propaanidiolioperonin promoottorin aktiivisuutta tutkittiin lusiferaasireportterin avulla, jonka teoreettista taustaa kuvataan seuraavaassa.

2.4.1. Pohjois-Amerikan tulikärpäsen (*Photinus pyralis*) lusiferaasi reportteriproteiinina

Lusiferaasit ovat valoa tuottavia reaktioita katalysoivia entsyymejä. Ne katalysoivat avainreaktioita valoa tuottavissa reaktiosarjoissa hapettaen substraattejaan lusiferiineja peroksidivälituotteiksi, joiden spontaani hajoaminen tuottaa elektronisesti virittyneitä tuotteita, joiden viritystila purkautuu näkyvän aallonpituuden fotonina. Bioluminesenssisysteemeitä on löydetty hyvin monilta evolutionaarisesti hyvinkin kaukana toisistaan olevilta organismeilta. Bioluminesenssin uskotaankin syntyneen itsenäisesti jopa 30 kertaa evoluution aikana monessa eri fylogeneettisessä haarassa eikä

esimerkiksi bakteerien ja tulikärpästen lusiferaasientsyymien välillä ole homologiaa (Hastings, 1983). Yhdistävänä tekijänä kaikille tunnetuille bioluminesenssi-ilmioille on lusiferaasin katalysoima molekulaarisen hapen reaktio lusiferiinisubstraatin kanssa. Aikaisissa arvioissa oletettiin, että hapen kertyminen ilmakehään oksidatiivisen fotosynteesin kehittymisen seurauksena aiheutti evolutiivisen paineen hapen detoksifikaatioon kykenevien systeemien kehittymiselle ja luminesenssi olisi syntynyt vain sivutuotteena tässä prosessissa. Nykyinen käsitys on kuitenkin, että mahdollisesti bakteereita lukuunottamatta lusiferaasit ovat kehittyneet vasta paljon myöhemmin, ehkä vasta näkökyvyn kehittymisen jälkeen (Hastings, 1983). Bioluminesenssisysteemien kehittyminen ja säilyminen olisi siis nimenomaan luminesenssi-ilmion antamien etujen seurausta, esimerkiksi tulikärpäksillä bioluminesenssi on tärkeässä roolissa pariutumisessa. Bioluminesenssin solubiologiallinen ja molekulaarinen toiminta sekä säätely vaihtelevat eri organismeissa. Bakteerit tuottavat valoa jatkuvasti, kun taas monilla muilla, kuten tulikärpäksillä, valontuotto tapahtuu lyhyissä noin 0,1–10 sekunnin väläyksissä. (Wilson & Hastings, 1998; Viviani, 2002).

Hyönteiset ovat suurin ja vaihtelevin bioluminesenssiin kykenevien organismien luokka. Hyönteisten joukossa bioluminesenssia esiintyy hyppyjalkaisissa (Collembola), kärpäksissä (Diptera) ja kovakuoriaisissa (Coleoptera). Tulikärpästen lusiferaasit ovat parhaiten tutkittu joukko lusiferaaseja ja *Photinus pyralis*:n (Conti ym., 1996) sekä *Luciola cruciata*:n (Nakatsu ym., 2006) molekulaarinen rakenne on selvitetty. Lusiferaasien substraattimolekyylit lusiferiinit ovat lusiferaasien tavoin hyvin vaihtelevia rakenteeltaan eri organismeissa. Tulikärpäksellä lusiferiini on bentsotioatsoli, jonka lusiferaasi adenyloi reaktiosarjan ensimmäisessä vaiheessa. Reaktiossa adenyyli-ryhmä liitetään D-lusiferiinin karboksyyli-ryhmään. Tarvittava energia tähän saadaan MgATP:n hydrolysoitumisesta. Seuraavassa vaiheessa lusiferaasi katalysoi hapen liittämisen adenyyli-lusiferaasiin muodostaen dioksietanoni-välituotteen. Dioksietanonin syklisen rakenteen hajotuksessa vapautuva energia virittää oksilusiferiinin singlettitilaan. Viritystila purkautuu nopeasti ($<10^{-9}$ s) elektronin palautuessa perustilaan ja samalla emittoituu foton spektrin keltavihreällä aallonpituudella (kuva 2.6.). (Wilson & Hastings, 1998; Viviani, 2002). Emittoituvan valon aallonpituus riippuu lusiferaasin rakenteesta ja kohdennetuilla mutaatioilla onkin saatu aikaan myös punaista valoa emittoiva tulikärpäksen lusiferaasi (Nakatsu ym., 2006). Tarkkaa kuvaa rakenteen ja aallonpituuden riippuvuudesta ei kuitenkaan vielä ole saatu selville.



Kuva 2.6. Tulikärpäsen lusiferaasin katalysoima valoa tuottava reaktiosarja. Reaktiot on kuvattu tarkemmin tekstiosassa. (Mukailleen Wilson & Hastings, 1998; Viviani, 2002).

Bioluminesenssi on hyvin käyttökelpoinen ilmiö monissa bioteknologian sovelluksissa. Tulikärpäsen lusiferaasiin perustuvat menetelmät ovat poikkeuksellisen herkkiä, mikä johtuu itse reaktion hyvästä kokonaistehokkuudesta (noin yksi foton / oksilusiferiini) (Wilson & Hastings, 1998), valosignaalin erittäin hyvästä mitattavuudesta (muutama foton riittää signaalin havaitsemiseen) (Roda ym., 2004) ja lähes olemattomasta taustasignaalista. Lisäksi sillä saavutetaan jopa 7-8 kertaluokan lineaarinen mitta-alue (Naylor, 1999). Lusiferaasien sovelluksia ovat ennen kaikkea geenien ilmentymisen tutkiminen lusiferaasi reportterimolekyylinä, sekä erilaiset biosensorit (Immonen & Karp, 2007; Leskinen ym., 2005), mutta myös muun muassa proteiininuorovaikutusten tutkiminen BRET:n (Bioluminescence resonance energy transfer) avulla, immunomääritykset ja lääketieteellinen kuvantaminen (Roda ym., 2004). Geeniekspressiota tutkittaessa solut transformoidaan joko replikoituvalla tai integroituvalla vektorilla, jossa tutkittavan geenin promoottoriin eteen on liitetty lusiferaasigeeni. Kun promoottori aktivoituu, transkriptoidaan lusiferaasigeeniä vastaavalla tiheydellä kuin tutkittavaa geeniä normaalisti. Tuotetun lusiferaasiproteiinin määrää voidaan mitata lisäämällä vakiomäärä lusiferiiniä ja mittaamalla luminometrillä emittoituvan valon määrää.

Tulikärpäsen lusiferaasin lisäksi *Clostridium*-suvun lajeissa on käytetty useita muita reportteriproteiineja. Näitä ovat *E. coli*:n β -glukuronidaasi (Girbal ym., 2003),

Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes:n β -galaktosidaasi (Feustel ym., 2004), *C. perfringens*:n plasmidi pIP401:n koodaama kloramfenikoliasetyylitransferaasi (Matsushita ym., 1994), *Vibrio fischeri*:n LuxAB-systeemi (Phillips-Jones, 1993) ja *C. acetobutylicum* P262:n β -1,4-endoglukanaasi (Quixley & Reid, 2000). LuxAB-systeemin on todettu toimivan kvantitatiivisena reportterina suhteellisen aerotolerantissa *C. perfringens*:ssä (Phillips-Jones, 1993), mutta aerosensitiivisessä *C. botulinum* tyyppi B:ssä LuxAB ei toiminut reportterina. Lusiferaasimäärän mittaamien vaati tuntien inkuboinnin hapellisissa olosuhteissa, mikä aiheutti mittauksiin liiallista epätarkkuutta (Davis ym., 2000). Tulikärpäsen lusiferaasin sen sijaan on todettu toimivan hyvin aerosensitiivisessä *C. acetobutylicum*:ssa ja soveltuvan kvantitatiiviseksi reportteriksi tässä lajissa (Feustel ym., 2004).

3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Tutkimuksen tavoitteena oli kloonata *Clostridium butyricum*:n 1,3-propaanidiolioperonin promoottori säätelytekijöineen ja rakentaa vektorikonstrukti, jolla promoottori pystyttäisiin transformoimaan *Escherichia coli*:iin sekä gram-positiivisiin *Bacillus subtilis*:iin ja *Clostridium acetobutylicum*:iin. Lisäksi tavoitteena oli tutkia tulikärpäsen lusiferaasin avulla pystytäänkö promoottori aktivoimaan glyserolilla tai 1,3-propaanidiolilla *Escherichia coli*:ssa, *Bacillus subtilis*:ssa ja *C. acetobutylicum*:ssa. *Photinus pyralis*:n lusiferaasia ei ole aiemmin käytetty *B. subtilis*:ssa anaerobisissa olosuhteissa, joten samalla haluttiin tutkia sen toimivuutta tässä lajissa anaerobisissa olosuhteissa.

4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

4.1. Bakteerikannat ja kasvuolosuhteet

Vetyä tuottavasta bioreaktorista eristetty *C. butyricum* (Koskinen ym., 2007), *C. butyricum* DSM10702 (DSMZ, Braunschweig, Saksa) ja *C. acetobutylicum* DSM729 (DSMZ) kasvatettiin 2xYT:ssä 37°C anaerobisissa olosuhteissa. Anaerobiset olosuhteet luotiin huuhtelemalla elatusainetta 15 min typpikaasulla ja sulkemalla kasvatuspullot kumikorkilla ennen steriloimista autoklaavissa. Vetyä tuottavasta bioreaktorista eristetty *E. coli* (Koskinen ym., 2007) sekä *E. coli* KRX (Promega, Madison, WI), ER2267, ER2925 (New England Biolabs, Ipswich, MA) ja ER2267 / pAN1 (Philippe Soucaille, INSA, Toulouse, Ranska) kasvatettiin kloonauksissa Luria-Bertani (LB) -elatusaineessa 37°C. Induktiokokeissa *E. coli* KRX kasvatettiin 30°C M9-elatusaineessa, jossa oli lisäksi 0,1 % (paino/tilavuus) Bacto Casamino Acids -kaseiinihydrolysaattia (BD, Helsinki, Suomi) ja hiililähteenä 1 % Na₂-sukkinaatti aerobisissa olosuhteissa sekä 0,5 % glukoosi anaerobisissa olosuhteissa.

B. subtilis 1A754 (BGSC, Columbus, OH) kasvatettiin rutiinisti LB:ssä 37°C. Induktiokokeissa *B. subtilis* kasvatettiin SpC:ssä (Sonenshein ym., 1974) 30°C hiililähteenä 1% Na₂-sukkinaatti aerobisissa olosuhteissa ja 0,44 % pyruvaatti anaerobisissa olosuhteissa. SpC:n koostumus oli litraa vettä kohti seuraava: 2 g (NH₄)₂SO₄, 18,3 g K₂HPO₄ · 3H₂O, 6 g KH₂PO₄, 1 g Na₃ sitraatti · 2H₂O, 0,2 g MgSO₄ · 7H₂O, 2 g Bacto Yeast Extract -hiivauutetta (BD) ja 0,25 g Bacto Casamino Acids -kaseiinihydrolysaattia. *B. subtilis*:lle anaerobisissa olosuhteissa elatusaineeseen lisättiin vielä elektronin vastaanottajiksi fumaraatti 0,43 % ja KNO₃ 0,2 %. *B. subtilis*:n transformaatiossa käytetty SpII oli muuten kuten SpC, mutta koostumus poikkesi seuraavasti: 0,8 g MgSO₄ · 7H₂O, 1 g Bacto Yeast Extract -hiivauutetta, 0,1 g Bacto Casamino Acids -kaseiinihydrolysaattia ja lisäksi lisättiin 0,5 mM CaCl₂. SpII + EGTA oli kuten SpII, mutta CaCl₂:n tilalla oli 2 mM EGTA. Tarvittaessa elatusaineisiin lisättiin vielä ampisilliini (40 µg / ml) tai erytromysiini (1 µg / ml). Anaerobikasvatuksissa käytettiin redox-indikaattorina Resazurin:a.

4.2. Vektorin rakentaminen

Vektorin rakentamisessa käytettiin pääosin molekyylibiologian yleisiä työmenetelmiä (Sambrook ym., 1990). 1,3-propaanidiolioperonin promoottori monistettiin puolisisäkkäisellä PCR:llä (semi-nested PCR) käyttäen *C. butyricum*:n E.Z.N.A. Bacterial DNA -puhdistussarjalla (Omega Bio-Tek, Norcross, GA) eristettyä genomista DNA:ta templaattina ja Phusion (Finnzymes, Espoo, Suomi) DNA-polymeraasia. Alukkeet (taulukko 4.1.) suunniteltiin julkaistun *C. butyricum* VPI1718 -kannan 1,3-propaanidiolioperonin sekvenssin (GenBank AY112989) perusteella. Puolisisäkkäistä PCR:ää käytettiin koska toinen promoottorin monistavan amplikonin alukkeista sitoutui epäspesifisesti ilman edeltävää pidemmän alueen monistamista. Ensimmäisen PCR:n ohjelma oli seuraava: 98°C 3 min, 25 kierrosta 98°C 10 s, 52°C 25 s, 72°C 3 min ja lopussa 72°C 5 min. Toiseen reaktioon otettiin templaatiksi 4 µl ensimmäisen reaktion tuotetta ja PCR-ohjelma oli kuten ensimmäisessä, mutta pidentymisaika laskettiin kolmesta minuutista kahteen minuuttiin ja monistuskierrokset nostettiin 25:stä 35:een. Tuotteen oikea pituus (2707 bp) varmistettiin elektroforeesilla käyttäen 0,8 % EtBr-värjättyä agarosigeeliä. PCR-tuote puhdistettiin NucleoSpin Extract II -puhdistus-sarjalla (Macherey-Nagel, Düren, Saksa), digestoititiin sopivilla restriktioentsyymeillä, puhdistettiin ja ligatoitiin pUC19 vektoriin ja konstruktilla transformoitiin *E. coli* (kuva 4.1.).

E. coli:n transformaatioissa käytettiin sekä kemiallisesti kompetentteja soluja lämpöshokkitransformaatioon että elektrokompetentteja soluja elektrotransformaatioon. Elektrotransformaatiot tehtiin käyttäen Micropulser -elektroporaattoria (Bio-Rad, Hercules, CA). Rakennetun p13PDUC19:n sisältävät solut valikoitiin LB-antibioottimaljalla ja maljalta valittiin viisi pesäkettä nestekasvatukseen. Plasmidien eristyksissä käytettiin E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit II (Omega Bio-tek) ja GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich Finland, Helsinki, Suomi) -puhdistussarjoja. p13PDUC19 eristettiin nestekasvatuksesta ja insertin koko varmistettiin restriktioentsyymidigestion avulla. Digestiossa käytettiin molempia kloonauksessa käytettyjä restriktioentsyymejä, jolloin agarosigeelielektroforeesilla voitiin tarkistaa irtoavan fragmentin koko. Lisäksi insertti sekvensoitiin molemmista päistään liitoskohtien yli. Sekvensoinnissa käytettiin Macrogen Inc:n (Soul, Korea) sekvensointipalveluja (alukkeet taulukossa 4.1.).

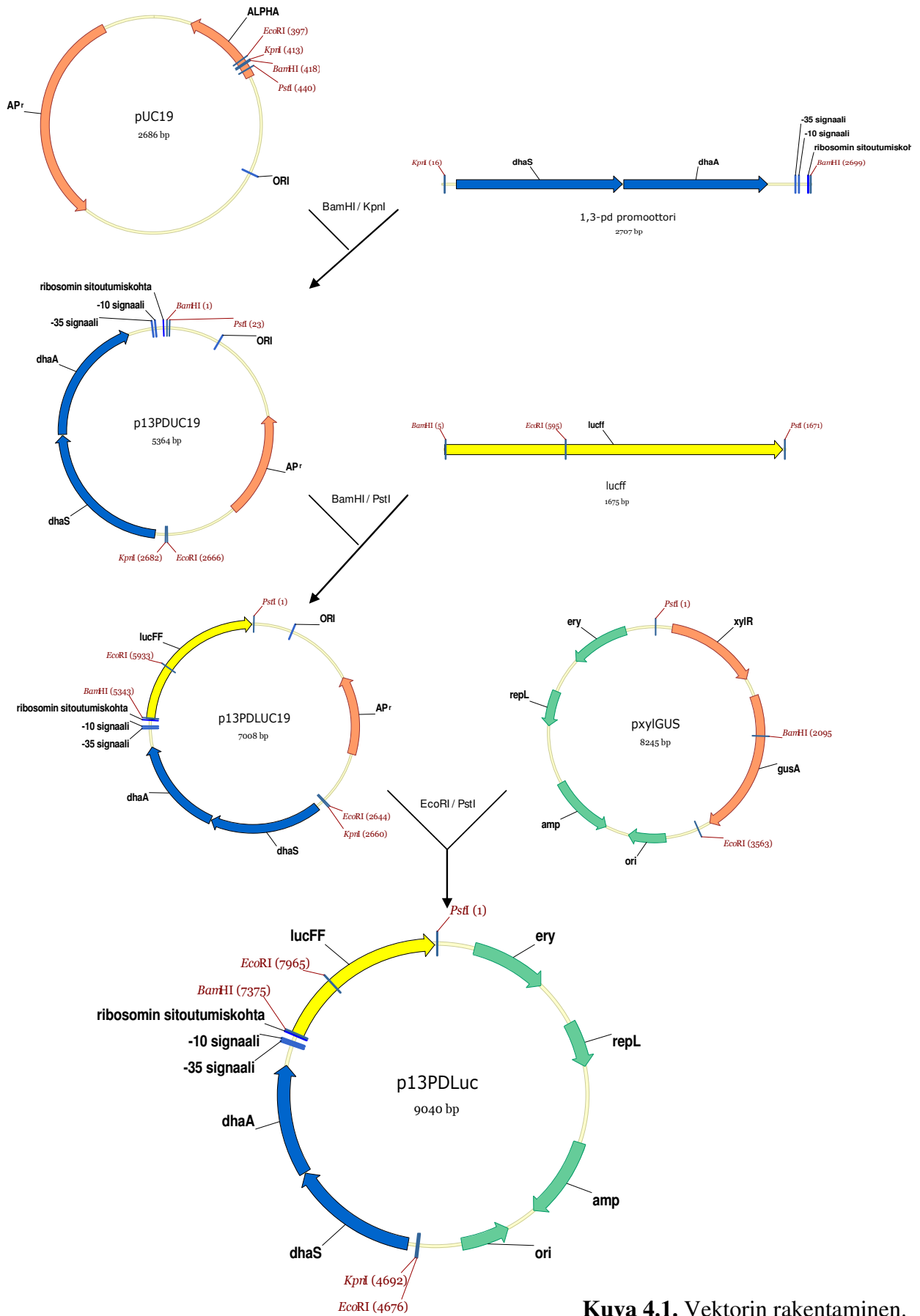
Lusiferaasigeenin (*lucFF*) koodaava osa monistettiin pBESTluc -vektorista (Promega) PCR:llä käyttäen seuraavaa ohjelmaa: 98°C 3 min, 35 kierrosta 98°C 10 s, 50°C 20 s, 72°C 30 s ja lopussa

72°C 5 min (alukkeet taulukossa 4.1.). Tuote puhdistettiin, digestoitiin sopivilla restriktioentsyymeillä, ajettiin 0,8 % agarosigeelille, puhdistettiin geeliltä, ligatoitiin p13PDUC19 -vektoriin P_{1,3-pd}:n alle ja ligaatioseos käytettiin *E. coli*:n transformaatioon. Solut valikoitiin LB-antibioottimaljalla, valittiin viisi pesäkettä nestekasvatukseen ja eristettiin kavatuksista plasmidit. Vektorin oikeellisuus varmistettiin digestoimalla samoilla restriktioentsyymeillä kuin kloonaukseen oli käytetty.

1,3-propanidiolioperonin promoottorin ja lusiferaasigeenin sisältävä kasetti digestoitiin irti p13PDLUC19 -vektorista kasetin siirtämiseksi p_{xy}IGUS (P. Soucaille) -sukulavektoriin. p13PDLUC19 digestoitiin kahdella restriktioentsyymillä, joista toisella (EcoRI) osittaisdigestiolla, koska myös lusiferaasigeenin keskellä oli tunnistussekvenssi tälle entsyymille. Osittaisdigestiossa määritettiin valmistajan katalogin (Fermentas, Burlington, Canada) antaman entsyymiaktiivisuusyksikön määritelmän mukaisesti 1 µg:n plasmidia tunnissa digestoimiseen tarvittava entsyymimäärä ja tehtiin tästä määrästä laimennossarja. Plasmidia digestoitiin 1 h eri entsyymimäärillä ja näytteet ajettiin agarosigeelille. Geeliltä valittiin näyte, jossa oli eniten oikean kokoista fragmenttia ja tämä fragmentti puhdistettiin. Myös p_{xy}IGUS digestoitiin samoilla restriktioentsyymeillä, ajettiin geelille ja puhdistettiin haluttu fragmentti. Kasetti ja vektoriselkäranka ligatoitiin ja ligaatioseos käytettiin transformaatioon. Antibioottimaljalta valittiin lusiferaasiaktiivisuuden perusteella kaksi pesäkettä nestekasvatukseen. Kasvatuksista eristettiin plasmidit ja varmistettiin konstruktin oikeellisuus EcoRI-digestiolla.

Taulukko 4.1. Alukkeet.

PCR-alukkeet	Sekvenssi (5'-3')
1,3-pd I sense	ATATCTCGAGGGTACCGTACAGGCATTCATATTTTATAAGTAAGT
1,3-pd I antisense	CATGAATTCATCAAAGGATTTTCATT
1,3-pd II antisense	CTTCGGATCCCCTCATATGTTACTCCTCCAATCACATTCTTACTTG
lucFF sense	AGGGGATCCGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAG
lucFF antisense	ATATCTGCAGCTCGAGTTACAATTTGGACTTTCCGCCCTTC
Sekvensointialukkeet	
1,3-pd-S sense	GTTTTCCCAGTCACGAC
1,3-pd-S antisense	CAGGAAACAGCTATGAC



Kuva 4.1. Vektorin rakentaminen.

Konstruktin metyloitiin ER2267 / pAN1 -kannassa ja metyloidulla vektorilla yritettiin transformoida *C. acetobutylicum* aikaisemmin kuvatulla menetelmällä (Mermelstein ym., 1992). Tämä ei kuitenkaan onnistunut, antibioottimaljoille ei saatu kasvamaan plasmidin sisältäviä pesäkkeitä.

4.3. *B. subtilis*:n transformaatio

Bacillus subtilis:n transformaatioissa käytettiin hyväksi luonnollista kompetenssia. Transformaatioon käytetyllä p13PDLuc:lla transformoitiin ensin *E. coli* ER2267, ER2925 sekä reaktorista eristetty villityypin kanta elektroporaatiolla. Solut siirrettiin nestekasvatukseen, jossa antibiootin avulla valikoitiin transformoituneet solut ja kasvatuksista eristettiin plasmidit. Eristettyjä DNA:ta käytettiin *B. subtilis*:n transformaatioon. Kompetenttien solujen valmistus ja transformaatio tehtiin kuten aiemmin on kuvattu (Dubnau & Davidoff-Abelson, 1971). Pääpiirteittäin protokolla oli seuraava:

Kompetenttien solujen valmistus:

1. Kasvatettiin 37°C:ssa solut 20 ml:ssa SpC:tä stationäärivaiheen alkuun
2. Kaadettiin koko kasvatus 200 ml:aan 37°C SpII:ta
3. 90 min kasvatuksen jälkeen sentrifugoitiin solut pohjaan 5 min 8000 x g
4. Resuspensoitiin pelletti 17 ml:aan supernatanttia ja lisättiin 2 ml 70 % glyserolia

Transformaatio:

1. 0,5 ml:aan solususpensiota lisättiin 0,5 ml SpII + EGTA ja 2 µg DNA
2. 30 min 37°C inkuboinnin jälkeen lisättiin erytromysiiniä siten että konsentraatioksi tuli 0,1 µg / ml resistenssigeenin indusoimiseksi
3. 40 min 37°C inkuboinnin jälkeen maljattiin 1 µg / ml erytromysiinimaljalle

Maljalta valittiin kaksi lusiferaasia ilmentävää pesäkettä, nämä otettiin nestekasvatukseen ja kasvatuksista eristettiin plasmidit. P_{1,3-pd}-*lucFF* -kasetin eheys varmistettiin PCR:llä käyttäen alukkeita 1,3pd I sense ja lucFF antisense (taulukko 4.1.). PCR-ohjelma oli 98°C 2 min, 35 kierrosta 98°C 10 s, 53°C 25 s, 72°C 2 min 30 s.

4.4. Induktiokokeet

4.4.1. Induktiokokeet aerobisissa olosuhteissa

Solut esikasvatettiin eksponentiaaliseen kasvuvaiheeseen 50 ml:n kasvatuksissa, kasvatus jaettiin putkiin, joihin lisättiin glyseroli (5 g / l) tai 1,3-propaanidioli (1 g / l). Lisäyksen jälkeen näytteitä inkuboitiin 30 °C:ssa 300 kierrosta / min ravistelulla. Induktiota mitattiin luminesenssimittauksilla 1 -2 h välein. Luminesenssimittauksiin otettiin 50 µl 1:100 solukasvatuslaimennosta kuoppalevyille, kuoppiin lisättiin 50 µl 1 mM D-lusiferiiniliuosta (0,1 M Na-sitraattipuskuri, pH 4,0) (Aboatox, Turku, Suomi), kuoppalevyä ravistettiin liuosten sekoittamiseksi ja mitattiin luminesensi 1,0 s integraatiolla. Mittauksissa käytettiin 96 MicroWell Plate -kuoppalevyjä (Nunc, Roskilde, Tanska) ja Plate CHAMELEON mikrolevynlukijaa (Hidex, Turku, Suomi).

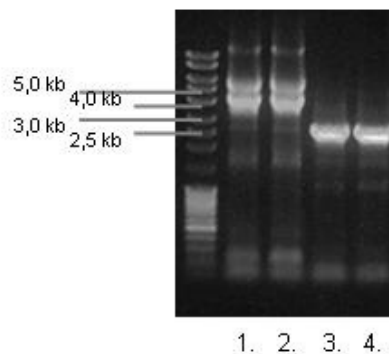
4.4.2. Induktiokokeet anaerobisissa olosuhteissa

B. subtilis:lle induktiokokeet tehtiin kuten aerobisissa olosuhteissa, mutta kasvatus ja induktiot tehtiin anaerobisissa olosuhteissa anaerobikaapissa (80 % N₂, 10 % H₂ ja 10 % CO₂). Luminesenssimittauksiin otettiin 50 µl 1:10 solukasvatuslaimennosta, jonka päälle lisättiin 50 µl lusiferiiniliuosta. Näytteitä inkuboitiin anaerobikaapin ulkopuolella huoneenlämmössä 5 min ennen lusiferiinin lisäystä hapen liukenemiseksi näytteeseen. *E. coli*:n induktiokokeissa elatusaineen glukoosista eroon pääsemiseksi solut jaettiin esikasvatuksesta putkiin, sentrifugoitiin pohjaan 1 min 11000 x g, poistettiin supernatantti ja resuspensoitiin pelletti anaerobiseen M9-elatusaineeseen ennen testiyhdisteiden lisäämistä. Kontrollinäytteisiin lisättiin glukoosia (5 g / l). Luminesenssimittaukset tehtiin kuten *B. subtilis*:lle, poiketen ainoastaan siinä että mittauksiin otettiin 50 µl laimentamatonta näytettä 1:10 laimennoksen sijaan.

5 TULOKSET

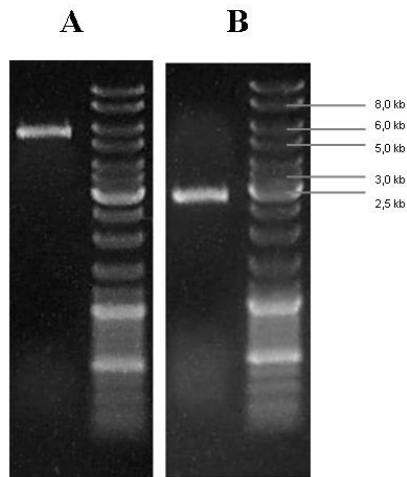
5.1. Vektorin rakentaminen

1,3-propaanidiolioperonin promoottorin ja sen oletettujen säätelytekijöiden monistaminen *C. butyricum*:n genomista onnistui ainoastaan vetyä tuottavasta reaktorista eristetystä kannasta puolisisäkkäisellä PCR:llä. Monistunut tuote vastasi sekvenssin perusteella oletetun tuotteen kokoa (2707 bp, kuva 5.1.). Kannasta DSM10702 puolisisäkkäinenkin PCR tuotti ainoastaan epäspesifistä tuotetta.



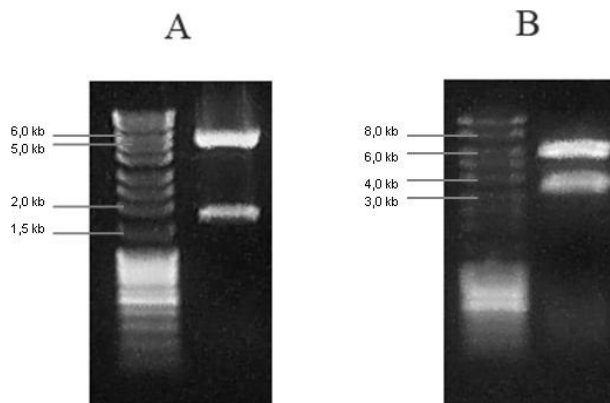
Kuva 5.1. 1,3-propaanidiolioperonin promoottori-PCR *C. butyricum*:n genomisesta DNA:sta. Kaivot 1 ja 2: *C. butyricum* DSM10702, kaivot 3 ja 4: reaktorista eristetty *C. butyricum*.

Monistetun fragmentin kloonaukseen *E. coli* KRX:ssä yritettiin usealla vektorilla, mutta ainoastaan pUC19-vektori osoittautui tässä toimivaksi. Lisäksi yritettiin PCR-tuotteen kloonaukseen GeneJET -kloonaussarjalla (Fermentas), mutta tällä menetelmällä ei saatu insertin sisältäviä pesäkkeitä. Plasmidin oikeellisuus varmistettiin restriktioentsyymidigestiolla (Kuva 5.2.). Kahden pesäkkeen plasmidien insertit sekvensoitiin molemmista päistä ja sekvenssivertailun perusteella promoottorialueen 5'-pään 650 ensimmäistä nukleotidiparia oli 98,5 % identtisiä ja 3'-pään 650 ensimmäistä nukleotidia 99,2 % identtisiä *C. butyricum* VPI1718 -kannan sekvenssin kanssa. Keskenään kahden pesäkkeen sekvenssit olivat täysin identtiset.



Kuva 5.2. A) p13PDUC19 BamHI digestoituna B) p13PDUC19 BamHI / KpnI digestoituna.

Lusiferaasigeenin koodaava osa liitettiin konstruktiin P_{1,3-pd}:n 3'-päähän ja kloonattiin *E. coli* KRX:ssä. Antibioottimaljalta valittujen viiden pesäkkeen plasmideista neljässä oli lusiferaasi-insertti (kuva 5.3.A). p13PDLUC19:n P_{1,3-pd}-lusiferaasi-kasetti irrotettiin pUC19 -selkärangasta ja liitettiin pxyLGUS -selkärankaan. Tämä plasmidi kloonattiin jälleen *E. coli* KRX:ssä ja konstruktin oikeellisuus varmistettiin restriktioentsyymidigestioilla (kuva 5.3.B).



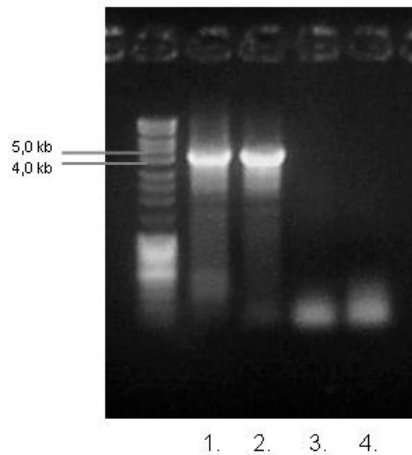
Kuva 5.3. A) p13PDLUC19 BamHI / PstI digestoituna B) p13PDLuc EcoRI digestoituna

5.2. *B. subtilis*:n transformaatio

B. subtilis:n transformaatio elektroporaatiolla ei onnistunut. Tämä saattaa johtua transformoitavan plasmidin suurehkosta koosta. Sen sijaan hyödyntämällä lajille ominaista luonnollista kompetenssia transformaatioissa antibioottialjalle saatiin kasvamaan plasmidin sisältäviä pesäkkeitä. *B. subtilis*:n luonnollinen transformaatio on riippuvainen homologisesta rekombinaatiosta ja siten tehokkaan transformaation edellytyksenä on joko plasmidin homologia kromosomin kanssa tai multimeerinen plasmidi, joka voi rekombinoitua itsensä kanssa (Bensi ym., 1981; Canosi ym., 1978). Koska transformoitavalla vektorilla ei ollut homologiaa *B. subtilis*:n kromosomin kanssa, täytyi vektorista tuottaa multimeereja siihen soveltuvassa *E. coli* -kannassa. Multimeeristen plasmidien muodostuminen *E. coli*:ssa tapahtuu homologisella rekombinaatiolla kahden tai useamman plasmidikopion kesken (Potter & Dressler, 1977). Tästä syystä multimeerisen *B. subtilis*:n transformointiin soveltuvan plasmidin tuotto toteutettiin *E. coli* ER2925 -kannassa, jolla on toimiva RecA1-rekombinaasi. Lisäksi kokeiltiin multimeerien tuottamista vetyä tuottavasta reaktorista eristetyllä villityypin kannalla.

B. subtilis:n transformaatio ER2925 -kannasta eristetyllä DNA:lla tuotti plasmidin sisältäviä pesäkkeitä. Sen sijaan ER2267 (*recA1*⁻) -kannasta ja villityypistä eristetyllä DNA:lla ei saatu plasmidia sisältäviä pesäkkeitä. Villityypistä saatiin eristettyä vain pieni määrä plasmidi-DNA:ta, joten *B. subtilis*:n transformaatioon käytettävä DNA-määrä oli luultavasti liian pieni. Luonnolliseen kompetenssiin perustuva transformaatio oli huono tehokkuudeltaan, joten tarvittava DNA-määrä oli kohtuullisen suuri (2 µg). Näinkin suurella DNA-määrällä oli positiivisten pesäkkeiden määrä hyvin pieni, alle 20. Tämä johtui luultavasti siitä, että *E. coli* *recA*⁺ -kannoillakin vain pieni osa plasmidi-DNA:sta on multimeereina (Potter & Dressler, 1977). Koska *B. subtilis*:sta ei saatu eristettyä riittävästi plasmidi-DNA:ta restriktioentsyymidigestioanalyysiin, varmistettiin kasetin läsnäolo soluissa PCR:llä käyttäen templaattina eristettyä plasmidi-DNA:ta. PCR:ssä monistui oikean kokoinen, 4150:n emäsparin tuote (kuva 5.4.).

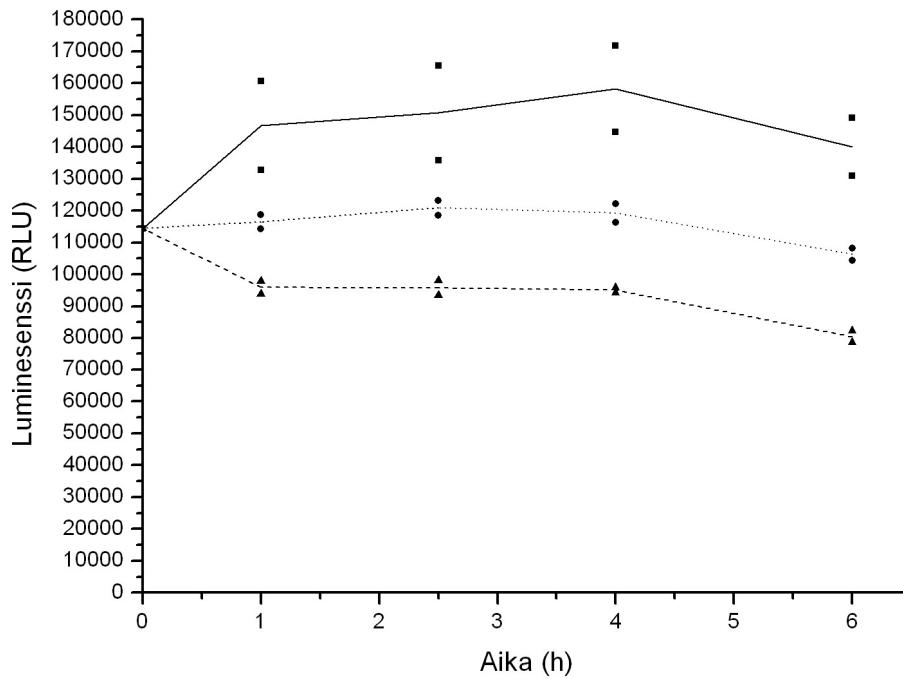
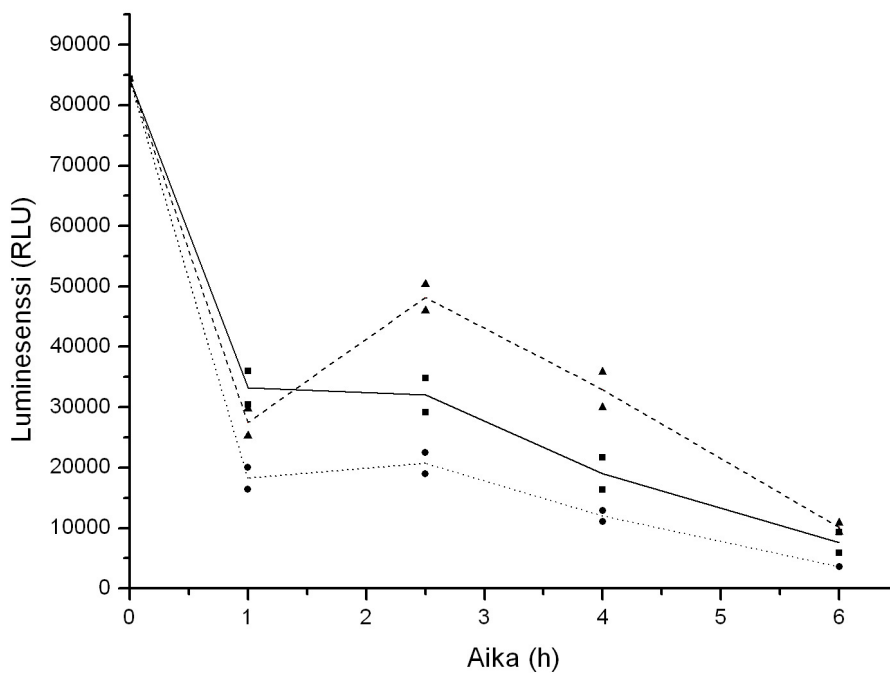
C. acetobutylicum:n transformaatio konstruktilla ei onnistunut. Tästä syystä P_{1,3-pd}:n toimintaa ei voitu tutkia tässä lajissa.



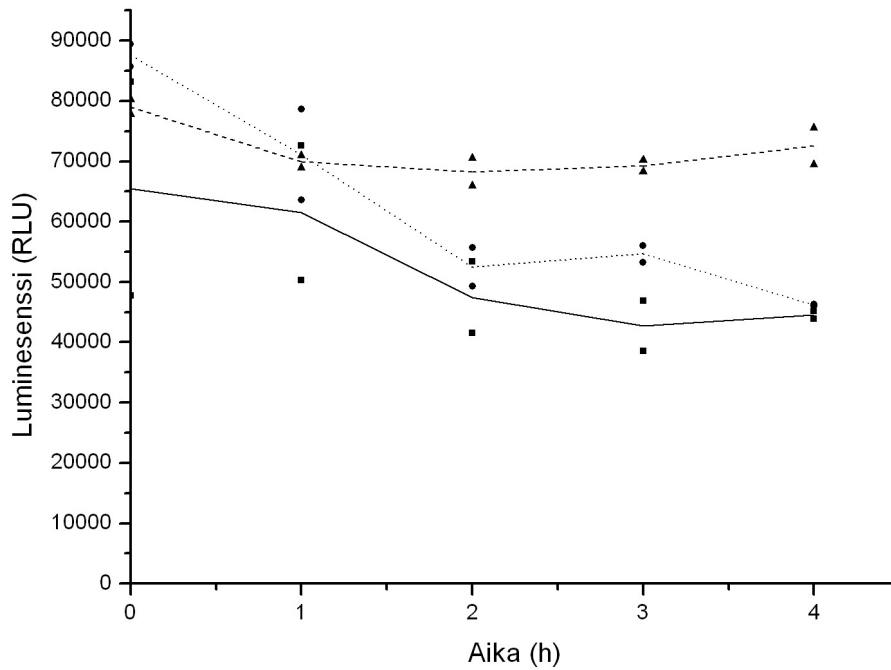
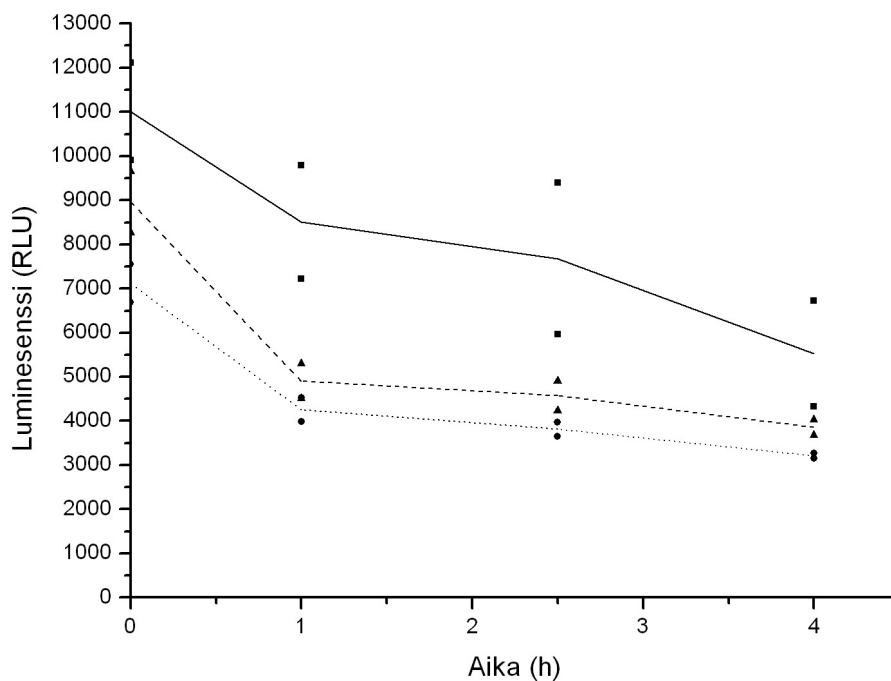
Kuva 5.4.. Kasetin monistaminen *B. subtilis*:sta eristetystä p13PDLuc:sta. 1. p13PDLuc (*B. subtilis*) 2. p13PDLuc (*E. coli*, positiivinen kontrolli) 3. pxyLGUS (negatiivinen kontrolli) 4. vesi

5.3. Induktiokokeet

$P_{1,3-pd}$:n indusoitumista glyserolilla tai 1,3-propaanidiolilla *E. coli*:ssa ja *B. subtilis*:ssa tutkittiin mittaamalla promoottorin perään liitetyn lusiferaasigeenin ilmentämistä näiden yhdisteiden solukasvatukseen lisäämisen jälkeen. Glyserolin ajateltiin mahdollisesti toimivan promoottorin indusorina, koska tiedetään että 1,3-propaanidiolioperonin transkriptio indusoituu *C. butyricum*:ssa kun hiililähteenä on glyseroli ja $P_{1,3-pd}$:a todennäköisesti säätelevän kahden komponentin signaalinvälitysjärjestelmän sensoriproteiinilla on merkittävää homologiaa toisen pienen polyolin, 1,2-propaanidiolin, tunnistavan *S. typhimurium*:n PocR:n kanssa (Raynaud ym., 2003). Glyserolin soluihinotto ja käyttö hiililähteenä induktiokokeissa pyrittiin varmistamaan käyttämällä kasvatuksessa hiililähteenä glukoosia huonompia hiililähteitä sukkiinaattia tai pyruvaattia. Kokeet tehtiin sekä aerobisissa (kuva 5.5.) että anaerobisissa (kuva 5.6.) olosuhteissa. Promoottori todettiin vuotavaksi molemmissa tutkituissa lajeissa, koska luminesenssisignaali oli jo lähtötasoltaan korkea.

A**B**

Kuva 5.5. Glyserolin ja 1,3-propaanidiolin vaikutus $P_{1,3\text{-pd}}$:n aktiivisuuteen aerobisissa olosuhteissa. A) *E. coli* B) *B. subtilis*. ▲, glyseroli, ●, 1,3-propaanidioli, ■, kontrolli. Mittaukset tehtiin kahdelle rinnakkaiselle kasvatukselle, symbolien väliset kuvaajat kulkevat mittausarvojen keskiarvojen kautta.

A**B**

Kuva 5.6. Glyserolin ja 1,3-propanidiolin vaikutus $P_{1,3\text{-pd}}$:n aktiivisuuteen anaerobisissa olosuhteissa. A) *E. coli* B) *B. subtilis*. ▲, glyseroli, ●, 1,3-propanidioli, ■, kontrolli. Mittaukset tehtiin kahdelle rinnakkaiselle kasvatukselle, symbolien väliset kuvaajat kulkevat mittausarvojen keskiarvojen kautta.

Aerobisissa olosuhteissa *E. coli*:lla glyserolin tai 1,3-propaanidiolin lisääminen aiheutti signaalitasojen laskun 20-30 %:lla kontrollinäytteisiin verrattuna. Signaalitasojen muutos näkyi jo ensimmäisessä mittauspisteessä tunnin kohdalla. Tästä eteenpäin signaalitasot pysyivät lähes muuttumattomina kaikissa näytteissä. *B. subtilis*:lla aerobisissa olosuhteissa tunnin kuluttua glyserolin tai 1,3-propaanidiolin lisäämisestä kaikkien näytteiden signaalit laskivat huomattavasti alkupisteestä. 2,5 tunnin kohdalla glyserolinäytteiden signaalit olivat nousseet noin 75 % edellisestä aikapisteestä. Kontrolli- ja 1,3-propaanidiolinäytteissä vastaavaa signaalitason nousua ei näkynyt. 2,5 tunnin aikapisteen kohdalla glyserolinäytteiden signaalitaso oli noin 1,5-kertainen kontrollinäytteisiin verrattuna kun tunnin aikapisteessä glyserolinäytteiden signaalitasot olivat hieman kontrollinäytteitä matalampia. Seuraavissa aikapisteissä kaikkien näytteiden signaalit laskivat lähestyen toisiaan ja kuuden tunnin kohdalla erot olivat jo merkityksettömän pienet.

Anaerobisissa olosuhteissa *E. coli*:lla kontrolli- ja 1,3-propaanidiolinäytteiden signaalien trendi oli hieman laskeva kun taas glyserolinäytteiden signaalit pysyttelivät lähellä lähtötasoa nousten hieman loppua kohti. *B. subtilis*:lla koe- ja kontrollinäytteiden kuvaajat ovat samankaltaisia, kaikissa trendi on loivasti laskeva. Kontrollinäytteiden signaalit olivat kokeen alkupisteestä lähtien neljän tunnin aikapisteeseen saakka koenäytteiden signaaleja suurempia.

6 POHDINTA

Clostridium butyricum on parhaimpia tunnettuja fermentatiivisia vedyntuottajia. Sen käyttäminen biodieseltuotannon jäteglyserolin fermentoimiseen vedyn tuottamiseksi on kuitenkin toistaiseksi mahdotonta, koska glyseroli aiheuttaa vedyntuottoreitin alassäätelyn. Lähtökohtaisesti suoraviivaisin tapa lähestyä ongelmaa olisi muokata *C. butyricum*:n aineenvaihduntareittejä kohdennetuin mutaatioin ja yli-ilmentää hydrogenaasigeeniä. Lajin geneettinen muokkaus on kuitenkin vielä mahdotonta, koska lajille ei ole pystytty kehittämään toimivaa transformaatiomenetelmää. Tästä syystä geneettisessä muokkauksessa on toistaiseksi keskityttävä muiden suvun lajien kuten *C. acetobutylicum*:n aineenvaihduntareittien muokkaamiseen. Myös *C. acetobutylicum*:n geneettinen muokkaaminen on huomattavasti esimerkiksi *E. coli*:n muokkaamista hankalampaa johtuen muun muassa sen äärimmäisestä happiherkkyydestä. Tässä tutkimuksessa ei onnistuttu *C. acetobutylicum*:n transformaatioissa, joten 1,3-propaanidiolioperonin promoottorin toimintaa pystyttiin tutkimaan ainoastaan *E. coli*:ssa ja *B. subtilis*:ssa. *C. acetobutylicum*:n transformaatio epäonnistui mahdollisesti siksi, ettei kompetenttien solujen valmistuksessa pystytty ylläpitämään riittävän anaerobisia olosuhteita ja liian pieni osa soluista säilyi elinkykyisenä pesuvaiheiden ja elektroporaation jälkeen. On epätodennäköistä, että epäonnistumisen syy olisi vektorissa, koska samaa pxyLGUS -selkärankaa on käytetty aiemminkin *C. acetobutylicum*:n transformaatioissa (Girbal ym., 2003) ja transformaatiota yritettiin siinä onnistumatta myös muilla pienemmillä sukkulavektoreilla.

E. coli:a käytettiin P_{1,3-pd}:n kloonauksessa ja konstruktin rakentamisessa sen ylivoimaisesti muita lajeja kehittyneempien ja helpompikäyttöisten rekombinantti-DNA-menetelmien takia. P_{1,3-pd}:n toimintaa haluttiin tutkia myös gram-positiivisten bakteerien mallilajissa *B. subtilis*:ssa erityisesti koska P_{1,3-pd} ei *E. coli*:ssa osoittautunut odotetulla tavalla toimivaksi. Kokeet tehtiin ensin aerobisissa olosuhteissa toteutuksen yksinkertaisuuden vuoksi. Koska induktiota ei havaittu, tehtiin kokeet myös anaerobisissa olosuhteissa. Anaerobisten olosuhteiden arveltiin olevan tarpeellisia kahden komponentin signaalireitin proteiinien toiminnan ja laskostumisen kannalta sekä pelkistyneen solunsisäisen ympäristön aikaansaamisessa.

Reportterimolekyylinä käytetyn lusiferaasin toimimisen esteenä anaerobisissa olosuhteissa on yleensä pidetty sen katalysoiman reaktion tarvitseman hapen puuttumista. On kuitenkin osoitettu, että lusiferaaseja on mahdollista käyttää myös anaerobisissa olosuhteissa tehtävissä tutkimuksissa

esimerkiksi *C. acetobutylicum*:ssa kun näytteitä inkuboidaan hapellisissa olosuhteissa ennen lusiferiinin lisäämistä ja luminesenssimittausta (Feustel ym., 2004). Tässä tutkimuksessa osoitettiin ensimmäisen kerran, että *P. pyralis*:n lusiferaasi on käyttökelpoinen reporterimolekyylillä myös *B. subtilis*:ssa anaerobisissa olosuhteissa. Viiden minuutin inkubaatio anaerobikaapin ulkopuolella hapellisissa olosuhteissa osoittautui riittäväksi ajaksi hapen liukenemiseksi näytteeseen. Anaerobisten kokeiden kontrollinäytteiden signaalit olivat noin kymmenesosaluokkaa aerobisten kokeiden kontrollinäytteiden signaaleista *B. subtilis*:ssa (mittausarvojen keskiarvojen suhde korjattuna laimennuskertoimilla ja kasvatusten optisilla tiheyksillä). Signaalitasojen ero voi promootorin aktiivisuuden eron lisäksi johtua esimerkiksi lusiferaasin erilaisesta laskostumistehokkuudesta ja ATP:n pienemmästä pitoisuudesta solussa anaerobisissa olosuhteissa.

Kummassakaan lajissa promootorin aktiivisuus ei muuttunut merkittävässä määrin kummankaan tutkitun yhdisteen lisäämisen seurauksena aerobisissa eikä anaerobisissa olosuhteissa. *C. butyricum*:lla 1,3-propaanidiolireitin entsyymiaktiivisuudet glyserolin toimiessa pääasiallisena hiililähteenä ovat 45–280-kertaiset verrattuna aktiivisuuksiin kun hiililähteenä toimii glukoosi (Saint-Amans ym., 2001). Näin ollen olisi oletettavaa että myös ekspressiotaso kasvaisi vastaavan suuruisesti kun tiedetään että 1,3-propaanidiolioperoni on säädelty ekspressiotasolla (Raynaud ym., 2003). Kokeissa induktiota ei *B. subtilis*:ssa 2,5 h:n kohdalla näkyvän 1,8-kertaisen signaalitason nousua lukuun ottamatta näkynyt. On mahdollista, että tämäkin signaalitason nousu johtuu muista tekijöistä kuin varsinaisesta induktiosta kuten esimerkiksi glyseroliaineenvaihdunnan tuloksena mahdollisesti muuttuvasta solun ATP-määrästä. *E. coli*:lla anaerobisissa olosuhteissa glyseroli sai aikaan signaalitason hienoisen nousun viimeistä mitattua aikapistettä kohti. Tämä johtuu luultavasti solumäärän lisääntymisestä niin sanotun viivevaiheen (lag-phase) jälkeen eikä induktiosta, koska nousu on hyvin pientä ja tapahtuu vasta tuntien kuluttua glyserolin lisäämisestä. Myös kontrollinäytteissä, joissa hiililähteenä on glukoosi, näkyy signaalitason nousua neljän tunnin aikapisteen kohdalla. Glyseroli- ja kontrollinäytteissä signaalitaso luultavasti jatkaisi nousuaan neljän tunnin jälkeenkin solumäärän kasvaessa. 1,3-propaanidiolinäytteiden signaalit sen sijaan luultavasti jatkaisivat laskemistaan, koska 1,3-propaanidioli ei toimi hiililähteenä *E. coli*:ssa.

Anaerobisissa induktiokokeissa signaalin lähtötason erot johtuvat luultavasti solumäärien epätasaisesta jakautumisesta koeputkiin, erityisesti *E. coli* -kokeissa sentrifugoitaessa soluja pelletit olivat hyvin pienet ja osa soluista luultavasti menetettiin supernatantin poistamisen yhteydessä. Aerobisissa olosuhteissa lähtösignaalit mitattiin ennen solujen jakamista koeputkiin, joten

mahdolliset solumäärien epätasaiset jakautumiset eivät tuloksissa näy. Seuraavassa pohditaan joitakin mahdollisia, todennäköisimmiksi katsomiani syitä saaduille tuloksille.

Tutkimuksen hypoteesina oli, että 1,3-propaanidiolioperonin promoottori aktivoituu kun glyseroli tai mahdollisesti 1,3-propaanidioli sitoutuu DhaS:n tunnustusosaan ja saa aikaan DhaA:n sitoutumisen promoottoriin. Glyserolia pidettiin todennäköisempänä indusorina, mutta ajateltiin 1,3-propaanidiolin olevan myös mahdollinen indusori, koska operonia ilmennetään matalalla perustasolla ilman glyserolin läsnäoloakin (Saint-Amans ym., 2001) ja näin ollen soluun tullut glyseroli voitaisiin muuttaa 1,3-propaanidioliksi. 1,3-propaanidioli voisi siten periaatteessa aktivoida omaa tuottoaan. Tämä kuitenkin johtaisi itseään toistavaan sykliin myös tilanteessa, jossa glyserolia ei enää ole saatavilla, joten glyseroli tuntui 1,3-propaanidiolia todennäköisemmältä indusorilta. Myös aineenvaihduntareitin välituote 3-hydroksipropionaldehydi voisi mahdollisesti olla $P_{1,3-pd}$:n indusori vastaavasti kuin allolaktoosi *E. coli*:n hyvin tunnetun laktoosioperonin säätelyssä. 3-hydroksipropionaldehydin vaikutusta promoottorin aktiivisuuteen voisi tutkia transformoimalla *E. coli*:iin toisen plasmidin, jossa olisi konstitutiivisen promoottorin alla 1,3-propaanidiolioperonin geenit *dhaB1*, *dhaB2* ja *dhaT*. Näiden geenien koodaamien entsyymien on aiemmin todettu toimivan *E. coli*:ssa (Raynaud ym., 2003). Näin saataisiin solujen sisälle 3-hydroksipropionaldehydiä kun käytettäisiin hiililähteenä glyserolia.

On myös mahdollista, että 1,3-propaanidiolireitin molekyylien sijasta DhaS tunnistaa jonkin muun tekijän, kuten glyserolin vaihtoehdoisen glykolyysiin johtavan hajotusreitin välituotteen dihydroksiasetonin. Dihydroksiasetonia saattaa kertyä glyserolin hajotuksessa kun glykolyysi alkaa tukkeutua NADH-määrän kasvaessa. *E. coli*:lla ja *B. subtilis*:lla dihydroksiasetoni ei ole glyserolikatabolian välituote, mikä selittäisi induktion puuttumisen näissä lajeissa (Mindich, 1968; Truniger & Boos, 1994). DhaS saattaisi mahdollisesti tunnistaa myös glyseroliaineenvaihdunnan seurauksena kasvavan pelkistyspotentiaalın, vaikkakin homologia *S. typhimurium*:n 1,2-propaanidiolia tunnistavan PocR:n kanssa viitaisi ennemmin glyseroli-, 1,3-propaanidioli-, 3-hydroksipropionaldehydi- tai dihydroksiasetoni-induktioon. Esimerkkinä suuren NADH-pitoisuuden ja redox-potentiaalın aktivoimista geneistä ja histidiinikinaaseista ovat muun muassa *E. coli*:n alkoholidehydrogenaasi *adhE* (Leonardo ym., 1996) ja *Rhodobacter capsulatus*:n histidiinikinaasi RegB (Elsen ym., 2004).

Vaikka *S. typhimurium*:n PocR:llä onkin homologiaa DhaS:n kanssa, ei niiden toiminnalla kuitenkaan ole välttämättä paljoakaan yhteistä seuraavista syistä: PocR ei ole kahden komponentin

signaalinvälityssysteemin histidiinikinaasi vaan siinä on sekä sensoriosa että DNA:han sitoutuva osa, sen rooli on säädellä 1,2-propanidiolin eikä glyserolin käyttöä hiililähteenä ja lisäksi *S. typhimurium* on hyvin kaukana *Clostridium*-suvusta fylogeneettisesti. Kokeissa pyrittiin saamaan aikaan pelkistyneet olosuhteet käyttämällä anaerobi-induktioissa hiililähteenä pelkkää glyserolia (*E. coli*) tai glyserolia ja pyruvaattia (*B. subtilis*). Glukoosia huonomman hiililähteen käytön ajateltiin edesauttavan glyserolin soluunottoa ja sen käyttöä hiililähteenä. *S. typhimurium*:lla tehdyissä tutkimuksissa PocR:n aktivaation edellytyksenä oli glukoosia hapettuneemman hiililähteen käyttö: sukkinatti aerobisissa olosuhteissa ja pyruvaatti anaerobisissa olosuhteissa (Bobik ym., 1992). On mahdollista, että *E. coli*:ssa ja *B. subtilis*:ssa pelkistymisaste ei kuitenkaan nouse riittävän korkeaksi induktion aikaansaamiseksi. Erityisesti *B. subtilis*:ssa tätä on syytä epäillä, sillä laji kasvaa vain heikosti anaerobisissa olosuhteissa ja kasvun edellytyksenä on ylimääräinen elektronin vastaanottaja NO_3^- . Nitraatin tarve tarkoittaa sitä että *B. subtilis* kasvaa anaerobirespiraatiolla eikä fermentaatiolla, jolloin solunsisäinen ylimääräinen pelkistyspotentiaali pääsee purkautumaan nitraatille. Tästä syystä *B. subtilis* ei ollut optimaalinen laji $P_{1,3\text{-pd}}$:n säätelyn tutkimisessa. Muutenkin *B. subtilis*:n anaerobisesta kasvusta tiedetään melko vähän, sillä sitä pidettiin pitkään obligatorisesti aerobisena lajina. Ensimmäinen raportti sen anaerobisesta kasvusta julkaistiin vasta vuonna 1995 (Hoffmann ym., 1995).

On myös mahdollista, että DhaS-DhaA -säätelysysteemi ei toimi tai toimii eri tavalla *E. coli*:ssa ja *B. subtilis*:ssa kuin *C. butyricum*:ssa. Ei tiedetä laskostuvatko säätelytekijät oikein muodostaen toiminnallisia proteiineja, toimiiko *dhaS-dhaA*-operonin promoottori riittävällä tehokkuudella tai lokalisoituvatko proteiinit oikeaan paikkaan (sytoplasmaan, periplasmaan tai solun ulkopuolelle). Proteiinien oikeaa laskostumista voitaisiin tutkia *in vivo* Waldo ym. julkaisemalla menetelmällä, jossa tutkittavan proteiinin geeni liitetään mutatoituun GFP-geeniin. Kun tätä fuusiogeneeniä ilmennetään, oikein laskostuva, ei aggregoituva fuusioproteiini on fluoresoiva. (Waldo ym., 1999).

Itse $P_{1,3\text{-pd}}$ osoittautui toimivaksi myös *E. coli*:ssa ja *B. subtilis*:ssa, sillä lusiferaasigeeniä ilmennettiin melko korkeallakin tasolla. Oletettua korkeampi ilmentämistaso ilman indusointia johtunee plasmidin korkeasta kopioluvusta (noin 200 / solu) (Projan ym., 1987) verrattuna *C. butyricum*:n genomien mahdollisesti yhteen operonikopioon. On hyvinkin mahdollista, että korkea lähtösignaali peittää alleen induktion aiheuttaman lusiferaasimäärän kasvun, koska plasmidin kopioluvun ollessa suuri on indusorimolekyylien määrä suhteessa promoottorin kopiolukuun pieni. Lisäksi on mahdollista, vaikkakin epätodennäköistä, että DhaA sitoutuu *E. coli*:ssa ja *B. subtilis*:ssa promoottoriin ilman indusorin aikaansaamaa signaalinvälitystä ja aktivoi promoottoria jatkuvasti.

Tämän mahdollisuuden poissulkeminen onnistuisi *dhaA*:n inaktivoivan mutatoinnin avulla. Säätelyn toimimattomuuden syistä ei voida myöskään poissulkea PCR-virhettä promoottorin kloonauksen alkuvaiheessa, koska koko monistettua aluetta ei sekvensoitu. Toisaalta *C. butyricum* VPI1718:n julkaistu sekvenssi ei ole identtinen tässä tutkimuksessa käytetyn kannan sekvenssin kanssa, joten vaikka koko kloonattu sekvenssi olisi sekvensoitu, ei kunnollista vertailusekvenssiä olisi ollut käytettävissä.

Eräs sääteleytekijöiden mahdolliseen toimimattomuuteen ja siten induktion puuttumiseen vaikuttava seikka saattaa olla sääteleyoperonin geenien kodonien yhteensopimattomuus *E. coli*:n ja *B. subtilis*:n tRNA-kirjon kanssa. *Clostridium*-suvun bakteerien genomisekvenssit ovat hyvin AT-painotteisia, esimerkiksi *C. acetobutylicum* ATCC 824:n genomisekvenssin GC-pitoisuus on vain 30 %, kun *E. coli* K12:n ja *B. subtilis* 168:n vastaavat luvut ovat 50 % ja 43 % (Blattner ym., 1997; Kunst ym., 1997; Nolling ym., 2001). Tästä johtuen myös geenien kodonit ovat AT-painotteisia *Clostridium*-suvun lajeissa ja osa niistä on harvinaisia muissa lajeissa. Tiedetään, että *E. coli*:ssa harvinaisia kodoneita sisältävät heterologiset proteiinit ilmentyvät huonosti, koska solussa ei ole riittävästi harvinaisia kodoneita vastaavia tRNA:ta. On mahdollista, että *E. coli* ei kykene sääteleyoperonin mRNA:n oikeaan translaatioon, koska operonin geenit sisältävät solussa harvinaisia kodoneita. Esimerkiksi kaikki *dhaS*:n ja *dhaA*:n arginiinikodonit ovat *E. coli*:ssa kaikkien aminohappojen kaikista kodoneista harvinaisimpia AGG, AGA tai CGA -kodoneita. (Kane, 1995). Myöskään *B. subtilis*:ssa nämä kodonit eivät ole optimaalisia arginiinikodoneita (Kanaya ym., 1999) Tarvittavien tRNA:den vähäisyyden ja plasmidin korkean kopioluvun yhteisvaikutuksena on hyvinkin mahdollista, että oikein ilmentyneitä sääteleytekijöitä ei muodostu *E. coli*:ssa tai *B. subtilis*:ssa riittävää määrää induktion havaitsemiseksi. Kodonierojen vaikutuksen aktivaatioon poissulkemiseksi kannattaisi tutkia induktiota myös *E. coli* -kannassa, johon on lisätty harvinaisten tRNA:den geenikopioita. Tällaisia kantoja on saatavissa kaupallisesti, koska myös monien muiden organismien kodonipainotus on *E. coli*:sta poikkeava.

Tiedetään myös, että *C. butyricum*:ssa solunsisäinen pH laskee kun hiililähteenä on glyseroli (Saint-Amans ym., 2001). Ei ole täysin poissuljettua, etteikö myös tämä voisi toimia DhaS:n aktivoivana tekijänä. Ei tiedetä tapahtuuko vastaava pH:n muutos myös *E. coli*:ssa ja *B. subtilis*:ssa kun hiililähteenä on glyseroli. Tämän kaltaisesta säätelystä ei kuitenkaan löydy näyttöä kirjallisuudesta, vaikkakin tunnetaan monia solunulkoisen pH:n säätelimiä genejä. Esimerkiksi *E. coli*:ssa näitä on yli 30 (Seputiene ym., 2003).

Koska 1,3-propanidiolioperonin promoottorin ei todettu idusoituvan *E. coli*:ssa ja *B. subtilis*:ssa oletetuilla indusoreilla, olisi sen säätelyn luotettavammaksi tutkimiseksi sitä pystyttävä tutkimaan myös *C. acetobutylicum*:ssa tai muussa *C. butyricum*:n lähisukulaisessa. Mikäli promoottori ei tällöinkään aktivoituisi glyserolilla tai 1,3-propanidiolilla, on todennäköistä, että sen aktivoitumiseen vaikuttavat DhaS:n ja DhaA:n lisäksi myös muu/muut proteiinit tai että indusorina toimii jokin muu tekijä kuin tutkitut yhdisteet. Jos promoottori aktivoituisi *C. acetobutylicum*:ssa glyseroli hiililähteenä, voisi glyserolin suoraa roolia aktivoitumisessa tutkia glyseroliaineenvaihdunnan geenien knockout-mutaatioilla, esimerkiksi mutatoimalla aineenvaihduntareitin ensimmäisen entsyymin glyserolikinaasin geenin. Tällä voitaisiin poissulkea glyserolin hajottamisen välituotteiden ja hapetus-pelkistystilan vaikutus aktivaatioon.

Myös *Clostridium novyi* NT:n kasvua glyserolilla ja vedyn- sekä 1,3-propanidiolintuottoa kannattaisi tutkia ja vertailla *C. butyricum*:iin ja *C. acetobutylicum*:iin. *C. novyi* on patogeeni, joten sen käyttö vedyntuotossa on mahdotonta. Sen sijaan *C. novyi* NT on muokattu kanta, josta toksiinigeenin sisältämä faagiepisomi on poistettu (Dang ym., 2001) ja se voisi mahdollisesti soveltua vedyntuottoon. *C. novyi* NT on kehitetty, koska on huomattu että *C. novyi*:llä on tuumoreita tuhoavia vaikutuksia, mutta tappavan patogeenisuutensa vuoksi sitä ei ole voitu tutkia syövän hoidossa. Koska *C. novyi* on patogeeni ja *C. novyi* NT suhteellisen uusi kanta, ei niiden aineenvaihdunnallisia ominaisuuksia ole juurikaan tutkittu.

7 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkimuksessa kloonattiin onnistuneesti *Clostridium butyricum*:n 1,3-propaanidiolioperonin promoottori ja sen oletettujen säätelytekijöiden geenit sisältävä operoni sekä osoitettiin, että *Photinus pyralis*:n lusiferaasi on toimiva reportterimolekyylillä *B. subtilis*:ssa anaerobisissa olosuhteissa. 1,3-propaanidiolioperonin promoottorin toimintaa tutkittiin *E. coli*:ssa ja *B. subtilis*:ssa lusiferaasin avulla. Lusiferaasigeeniä ilmennettiin molemmissa tutkituissa lajeissa yllättävän korkealla perustasolla eikä oletetulla indusorilla glyserolilla ollut vaikutusta ilmentämistasoon. Myöskään toinen mahdollisena indusorina pidetty molekyylillä 1,3-propaanidioli, ei indusoinut lusiferaasigeenin transkriptiota. Näin ollen gram-negatiivisten ja gram-positiivisten bakteerien mallilajeissa *E. coli*:ssa ja *B. subtilis*:ssa glyserolin tai 1,3-propaanidiolin ei havaittu toimivan P_{1,3-pd}:n indusorina aerobisissa eikä anaerobisissa olosuhteissa. Tulos oli yllättävä, koska etukäteen pidettiin todennäköisenä, että promoottori indusoituu glyserolilla. Saaduista tuloksista huolimatta on mahdollista, että *C. butyricum*:ssa P_{1,3-pd} indusoituu glyserolilla, vaikka *E. coli*:ssa ja *B. subtilis*:ssa säätely ei tutkimuksen koeasetelmassa toiminut. Koska *C. butyricum*:lle ei ole raportoitu transformaatiomenetelmää, kannattaisi promoottorin toimintaa yrittää tutkia *C. acetobutylicum*:ssa, jolle on kehitetty transformaatiomenetelmä ja muita geneettisiä työkaluja.

LÄHDELUETTELO

Abraham S. Toward a more secure and cleaner energy future for America: national hydrogen energy roadmap; production, delivery, storage, conversion, applications, public education and outreach. Washington, DC, U.S. Department of Energy, 2002.

Adams MWW. The structure and mechanism of iron-hydrogenases. *Biochim Biophys Acta* 1990;1020:115-145.

Badura A, Esper B, Ataka K, Grunwald C, Woll C, Kuhlmann J, Heberle J, Rogner M. Light-driven water splitting for (bio-)hydrogen production: photosystem 2 as the central part of a bioelectrochemical device. *Photochem Photobiol* 2006;82:1385-90.

Bensi G, Iglesias A, Canosi U, Trautner TA. Plasmid transformation in *Bacillus subtilis*. The significance of partial homology between plasmid and recipient cell DNAs. *Mol Gen Genet* 1981;184:400-4.

Biebl H, Menzel K, Zeng AP, Deckwer WD. Microbial production of 1,3-propanediol. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999;52:289-297.

Biebl H, Sproer C. Taxonomy of the glycerol fermenting clostridia and description of *Clostridium diolis* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 2002;25:491-7.

Blattner FR, Plunkett G, ym. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 1997;277:1453-&.

Bobik TA, Ailion M, Roth JR. A single regulatory gene integrates control of vitamin B12 synthesis and propanediol degradation. *J Bacteriol* 1992;174:2253-66.

Bories A, Himmi E, Jauregui J, Pelayo-Ortiz C, Gonzales V. Glycerol fermentation with *Propionibacteria* and optimisation of the production of propionic acid. *Sci Aliments* 2004;24:121-135.

Bouvet OMM, Lenormand P, Ageron E, Grimont PAD. Taxonomic diversity of anaerobic glycerol dissimilation in the Enterobacteriaceae. *Res Microbiol* 1995;146:279-290.

Boyles D. Bioenergy technology-Thermodynamics and costs, Wiley, New York, 1984.

Bozbas K. Biodiesel as an alternative motor fuel: Production and policies in the European Union. *Renew Sustain Energ Rev* 2008;12:542-552.

Canosi U, Morelli G, Trautner TA. The relationship between molecular structure and transformation efficiency of some *S. aureus* plasmids isolated from *B. subtilis*. *Mol Gen Genet* 1978;166:259-67.

Chen P, Andersson DI, Roth JR. The control region of the pdu/cob regulon in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 1994;176:5474-82.

- Conti E, Franks NP , Brick P. Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure* 1996;4:287-98.
- Cortright RD, Davda RR , Dumesic JA. Hydrogen from catalytic reforming of biomass-derived hydrocarbons in liquid water. *Nature* 2002;418:964-967.
- Cournac L, Guedeney G, Peltier G , Vignais PM. Sustained Photoevolution of Molecular Hydrogen in a Mutant of *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 Deficient in the Type I NADPH-Dehydrogenase Complex. *J Bacteriol* 2004;186:1737-1746.
- Dang LH, Bettegowda C, Huso DL, Kinzler KW , Vogelstein B. Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:15155-15160.
- Davis TO, Henderson I, Brehm JK , Minton NP. Development of a transformation and gene reporter system for group II, non-proteolytic *Clostridium botulinum* type B strains. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2000;2:59-69.
- de Hoon MJL, Makita Y, Nakai K , Miyano S. Prediction of transcriptional terminators in *Bacillus subtilis* and related species. *PLoS Comput Biol* 2005;1:212-221.
- Dharmadi Y, Murarka A , Gonzalez R. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. *Biotechnol Bioeng* 2006;94:821-9.
- Dubnau D , Davidoff-Abelson R. Fate of transforming DNA following uptake by competent *Bacillus subtilis*: I. Formation and properties of the donor-recipient complex. *J Mol Biol* 1971;56:209-221.
- EBB. Statistics: The EU biodiesel industry. Luettu 25.01. 2008. <http://www.ebb-eu.org/stats.php>.
- Elam CC, Padro CEG, Sandrock G, Luzzi A, Lindblad P , Hagen EF. Realizing the hydrogen future: the International Energy Agency's efforts to advance hydrogen energy technologies. *Int J Hydrogen Energy* 2003;28:601-607.
- Elsen S, Swem LR, Swem DL , Bauer CE. RegB/RegA, a highly conserved redox-responding global two-component regulatory system. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68:263-79.
- Esper B, Badura A , Rogner M. Photosynthesis as a power supply for (bio-)hydrogen production. *Trends Plant Sci* 2006;11:543-549.
- Feustel L, Nakotte S , Durre P. Characterization and Development of Two Reporter Gene Systems for *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:798-803.
- Foynes S, Dorrell N, Ward SJ, Stabler RA, McColm AA, Rycroft AN , Wren BW. *Helicobacter pylori* possesses two CheY response regulators and a histidine kinase sensor, CheA, which are essential for chemotaxis and colonization of the gastric mucosa. *Infect Immun* 2000;68:2016-23.
- Frost , Sullivan. What is the Global Market Outlook for Glycerine in 2006? Luettu 28.01. 2008. <http://www.frost.com/prod/servlet/market-insight-top.pag?docid=70283330>.

Gallegos MT, Schleif R, Bairoch A, Hofmann K , Ramos JL. Arac/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997;61:393-410.

Ghirardi ML, Posewitz MC, Maness P-C, Dubini A, Yu J , Seibert M. Hydrogenases and hydrogen photoproduction in oxygenic photosynthetic organisms. *Annu Rev Plant Biol* 2007;58:71-91.

Girbal L, Mortier-Barriere I, Raynaud F, Rouanet C, Croux C , Soucaille P. Development of a sensitive gene expression reporter system and an inducible promoter-repressor system for *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:4985-8.

Gonzalez-Pajuelo M, Andrade JC , Vasconcelos I. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 using a synthetic medium and raw glycerol. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2004;31:442-6.

Gonzalez-Pajuelo M, Andrade JC , Vasconcelos I. Production of 1,3-Propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in continuous cultures with high yield and productivity. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2005;32:391-6.

Gonzalez-Pajuelo M, Meynial-Salles I, Mendes F, Andrade JC, Vasconcelos I , Soucaille P. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol. *Metab Eng* 2005;7:329-36.

Gonzalez-Pajuelo M, Meynial-Salles I, Mendes F, Soucaille P , Vasconcelos I. Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol: physiological comparison of a natural producer, *Clostridium butyricum* VPI 3266, and an engineered strain, *Clostridium acetobutylicum* DG1(pSPD5). *Appl Environ Microbiol* 2006;72:96-101.

Gurgun V, Kirchner G , Pfennig N. Fermentation of pyruvate by 7 species of phototrophic purple bacteria. *Z Allg Mikrobiol* 1976;16:573-86.

Hallenbeck PC , Benemann JR. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *Int J Hydrogen Energy* 2002;27:1185-1193.

Hastings JW. Biological diversity, chemical mechanisms, and the evolutionary origins of bioluminescent systems. *J Mol Evol* 1983;19:309-21.

Hauska G, Schoedl T, Remigy H , Tsiotis G. The reaction center of green sulfur bacteria. *Biochim Biophys Acta* 2001;1507:260-277.

Hoffmann T, Troup B, Szabo A, Hungerer C , Jahn D. The Anaerobic Life of *Bacillus-Subtilis* - Cloning of the Genes Encoding the Respiratory Nitrate Reductase System. *FEMS Microbiol Lett* 1995;131:219-225.

Immonen N , Karp M. Bioluminescence-based bioassays for rapid detection of nisin in food. *Biosens Bioelectron* 2007;22:1982-1987.

Jahn A, Keuntje B, Dorffler M, Klipp W , Oelze J. Optimizing photoheterotrophic H₂ production by *Rhodobacter capsulatus* upon interposon mutagenesis in the *hupL* gene. *Appl Microbiol Biotechnol* 1994;40:687-90.

- Jones BL , Monty KJ. Glutamine as a feedback inhibitor of the *Rhodospseudomonas sphaeroides* nitrogenase system. *J Bacteriol* 1979;139:1007-13.
- Kanaya S, Yamada Y, Kudo Y , Ikemura T. Studies of codon usage and tRNA genes of 18 unicellular organisms and quantification of *Bacillus subtilis* tRNAs: gene expression level and species-specific diversity of codon usage based on multivariate analysis. *Gene* 1999;238:143-155.
- Kane JF. Effects of Rare Codon Clusters on High-Level Expression of Heterologous Proteins in *Escherichia-Coli*. *Curr Opin Biotechnol* 1995;6:494-500.
- Kapdan IK , Kargi F. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme Microb Technol* 2006;38:569-582.
- Kern M, Klipp W , Klemme J-H. Increased Nitrogenase-Dependent H₂ Photoproduction by hup Mutants of *Rhodospirillum rubrum*. *Appl Environ Microbiol* 1994;60:1768-1774.
- Koku H, Eroglu I, Gunduz U, Yucel M , Turker L. Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. *Int J Hydrogen Energy* 2002;27:1315-1329.
- Koskinen PEP, Kaksonen AH , Puhakka JA. The relationship between instability of H₂ production and compositions of bacterial communities within a dark fermentation fluidized-bed bioreactor. *Biotechnol Bioeng* 2007;97:742-58.
- Kruse O, Rupprecht J, Mussgnug JH, Dismukes GC , Hankamer B. Photosynthesis: a blueprint for solar energy capture and biohydrogen production technologies. *Photoch Photobio Sci* 2005;4:957-70.
- Kunst F, Ogasawara N, ym. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 1997;390:249-256.
- Lange R, Wagner C, de Saizieu A, Flint N, Molnos J, Stieger M, Caspers P, Kamber M, Keck W , Amrein KE. Domain organization and molecular characterization of 13 two-component systems identified by genome sequencing of *Streptococcus pneumoniae*. *Gene* 1999;237:223-234.
- Lee C-M, Chen P-C, Wang C-C , Tung Y-C. Photohydrogen production using purple nonsulfur bacteria with hydrogen fermentation reactor effluent. *Int J Hydrogen Energy* 2002;27:1309-1313.
- Lee PC, Lee WG, Lee SY , Chang HN. Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using glycerol as a carbon source. *Biotechnol Bioeng* 2001;72:41-8.
- Leonardo MR, Dailly Y , Clark DP. Role of NAD in regulating the adhE gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1996;178:6013-8.
- Leskinen P, Michelini E, Picard D, Karp M , Virta M. Bioluminescent yeast assays for detecting estrogenic and androgenic activity in different matrices. *Chemosphere* 2005;61:259-266.
- Lin P-Y, Whang L-M, Wu Y-R, Ren W-J, Hsiao C-J, Li S-L , Chang J-S. Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*: Metabolic study and mathematical model simulation. *Int J Hydrogen Energy* 2007;32:1728-1735.

- Lopes Pinto FA, Troshina O , Lindblad P. A brief look at three decades of research on cyanobacterial hydrogen evolution. *Int J Hydrogen Energy* 2002;27:1209-1215.
- Maeda T, Sanchez-Torres V , Wood T. Enhanced hydrogen production from glucose by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007;77:879-890.
- Mascher T, Helmann JD , Uden G. Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2006;70:910-38.
- Matsushita C, Matsushita O, Koyama M , Okabe A. A *Clostridium perfringens* Vector for the Selection of Promoters. *Plasmid* 1994;31:317-319.
- McKessar SJ , Hakenbeck R. The two-component regulatory system TCS08 is involved in cellobiose metabolism of *Streptococcus pneumoniae* R6. *J Bacteriol* 2007;189:1342-50.
- Melis A , Happe T. Hydrogen production. Green algae as a source of energy. *Plant Physiol* 2001;127:740-8.
- Melis A, Zhang L, Forestier M, Ghirardi ML , Seibert M. Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 2000;122:127-36.
- Mermelstein LD, Welker NE, Bennett GN , Papoutsakis ET. Expression of cloned homologous fermentative genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Bio/Technology* 1992;10:190-5.
- Mindich L. Pathway for oxidative dissimilation of glycerol in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 1968;96:565-6.
- Miyamoto K. Renewable biological systems for alternative sustainable energy production. Osaka, Food and Agriculture Organization (FAO), United Nations, 1997.
- Mueller-Langer F, Tzimas E, Kaltschmitt M , Petevs S. Techno-economic assessment of hydrogen production processes for the hydrogen economy for the short and medium term. *Int J Hydrogen Energy* 2007;32:3797-3810.
- Nakatsu T, Ichiyama S, Hiratake J, Saldanha A, Kobashi N, Sakata K , Kato H. Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence. *Nature* 2006;440:372-376.
- Nandi R , Sengupta S. Microbial production of hydrogen: an overview. *Crit Rev Microbiol* 1998;24:61-84.
- Nath K , Das D. Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004;65:520-9.
- Naylor LH. Reporter gene technology: the future looks bright. *Biochem Pharmacol* 1999;58:749-757.
- Niehlsen J, Villadsen J , Liden G. *Bioreaction Engineering Principles*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2003.

Noda K, Zorin NA, Nakamura C, Miyake M, Gogotov IN, Asada Y, Akutsu H , Miyake J. Langmuir-Blodgett film of hydrogenase for electrochemical hydrogen production. *Thin Solid Films* 1998;327-329:639-642.

Nolling J, Breton G, ym. Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol* 2001;183:4823-38.

Ooshima H, Takakuwa S, Katsuda T, Okuda M, Shirasawa T, Azuma M , Kato J. Production of hydrogen by a hydrogenase-deficient mutant of *Rhodobacter capsulatus*. *J Ferment Bioeng* 1998;85:470-475.

Papanikolaou S, Ruiz-Sanchez P, Pariset B, Blanchard F , Fick M. High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain. *J Biotechnol* 2000;77:191-208.

Perego M, Hanstein C, Welsh KM, Djavakhishvili T, Glaser P , Hoch JA. Multiple protein-aspartate phosphatases provide a mechanism for the integration of diverse signals in the control of development in *B. subtilis*. *Cell* 1994;79:1047-55.

Phillips-Jones MK. Bioluminescence (lux) expression in the anaerobe *Clostridium perfringens*. *FEMS Microbiol Lett* 1993;106:265-70.

Polle JEW, Kanakagiri S, Jin E, Masuda T , Melis A. Truncated chlorophyll antenna size of the photosystems--a practical method to improve microalgal productivity and hydrogen production in mass culture. *Int J Hydrogen Energy* 2002;27:1257-1264.

Potter H , Dressler D. On the mechanism of genetic recombination: the maturation of recombination intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:4168-72.

Projan SJ, Monod M, Narayanan CS , Dubnau D. Replication Properties of Pim13, a Naturally-Occurring Plasmid Found in *Bacillus-Subtilis*, and of Its Close Relative Pe5, a Plasmid Native to *Staphylococcus-Aureus*. *J Bacteriol* 1987;169:5131-5139.

Quixley KW , Reid SJ. Construction of a reporter gene vector for *Clostridium beijerinckii* using a *Clostridium endoglucanase* gene. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2000;2:53-7.

Qureshi N , Maddox IS. Continuous production of acetone-butanol-ethanol using immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum* and integration with product removal by liquid-liquid extraction. *J Ferment Bioeng* 1995;80:185-189.

Raynaud C, Sarcabal P, Meynial-Salles I, Croux C , Soucaille P. Molecular characterization of the 1,3-propanediol (1,3-PD) operon of *Clostridium butyricum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:5010-5.

Roda A, Pasini P, Mirasoli M, Michelini E , Guardigli M. Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence. *Trends Biotechnol* 2004;22:295-303.

Rupprecht J, Hankamer B, Mussgnug JH, Ananyev G, Dismukes C , Kruse O. Perspectives and advances of biological H₂ production in microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006;72:442-9.

Saint-Amans S, Girbal L, Andrade J, Ahrens K , Soucaille P. Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* VPI 3266 grown on glucose-glycerol mixtures. *J Bacteriol* 2001;183:1748-54.

Sambrook J, Fritsch EF , Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1990.

Satoh T, Hoshino Y , Kitamura H. *Rhodopseudomonas sphaeroides* forma sp. *denitrificans*, a denitrifying strain as a subspecies of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Arch Microbiol* 1976;108:265-9.

Schütz K, Happe T, Troshina O, Lindblad P, Leitão E, Oliveira P , Tamagnini P. Cyanobacterial H₂ production — a comparative analysis. *Planta* 2004;218:350-359.

Seputiene V, Motiejunas D, Suziedelis K, Tomenius H, Normark S, Melefors O , Suziedeliene E. Molecular characterization of the acid-inducible *asr* gene of *Escherichia coli* and its role in acid stress response. *J Bacteriol* 2003;185:2475-84.

Shaulsky G, Escalante R, Loomis WF, Shaulsky G, Escalante R , Loomis WF. Developmental signal transduction pathways uncovered by genetic suppressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:15260-5.

Shima S , Thauer RK. A third type of hydrogenase catalyzing H₂ activation. *Chem Rec* 2007;7:37-46.

Simms SA, Keane MG , Stock J. Multiple forms of the CheB methyltransferase in bacterial chemosensing. *J Biol Chem* 1985;260:10161-8.

Sims REH, Schock RN, Adegbulugbe A, Fenhann J, Konstantinaviciute I, Moomaw W, Nimir HB, Schlamadinger B, Torres-Martínez J, Turner C, Uchiyama Y, Vuori SJV, Wamukonya N , Zhang X. Energy supply. In *Climate Change 2007: Mitigation*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA., 2007.

Sonenshein AL, Cami B, Brevet J , Cote R. Isolation and characterization of rifampin-resistant and streptolydigin-resistant mutants of *Bacillus subtilis* with altered sporulation properties. *J Bacteriol* 1974;120:253-65.

Stock AM, Mottonen JM, Stock JB , Schutt CE. Three-dimensional structure of CheY, the response regulator of bacterial chemotaxis. *Nature* 1989;337:745-9.

Stock AM, Robinson VL , Goudreau PN. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* 2000;69:183-215.

Tabita FR. The biochemistry and metabolic regulation of carbon metabolism and CO₂ fixation in purple bacteria., *Kluwer Academic Publishers Dordrecht*, 1995, pp. 885-914.

- Takamizawa A, Miyata S, Matsushita O, Kaji M, Taniguchi Y, Tamai E, Shimamoto S , Okabe A. High-level expression of clostridial sialidase using a ferredoxin gene promoter-based plasmid. *Protein Expr Purif* 2004;36:70-5.
- Truniger V , Boos W. Mapping and cloning of *gldA*, the structural gene of the *Escherichia coli* glycerol dehydrogenase. *J Bacteriol* 1994;176:1796-800.
- Waldo GS, Standish BM, Berendzen J , Terwilliger TC. Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 1999;17:691-5.
- Vasconcelos I, Girbal L , Soucaille P. Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH on mixtures of glucose and glycerol. *J Bacteriol* 1994;176:1443-50.
- Vermeaglio A , Joliot P. The photosynthetic apparatus of *Rhodobacter sphaeroides*. *Trends Microbiol* 1999;7:435-440.
- Wilson T , Hastings JW. BIOLUMINESCENCE. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998;14:197-230.
- Viviani VR. The origin, diversity, and structure function relationships of insect luciferases. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:1833-1850.
- Yazdani SS , Gonzalez R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Curr Opin Biotechnol* 2007;18:213-219.
- Yokoi H, Maki R, Hirose J , Hayashi S. Microbial production of hydrogen from starch-manufacturing wastes. *Biomass Bioenerg* 2002;22:389-395.
- Yokoi H, Mori S, Hirose J, Hayashi S , Takasaki Y. H₂ production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Rhodobacter* sp. M[h]19. *Biotechnol Lett* 1998;20:895-899.
- Yu H, Zhu Z, Hu W , Zhang H. Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures. *Int J Hydrogen Energy* 2002;27:1359-1365.