



TEKNILLINEN TIEDEKUNTA

VETYÄ HAPETTAVIEN BAKTEERIEN TUOTTAMAT ARVOTUOTTEET

Merja Perätalo

PROSESSITEKNIIKAN TUTKIMUSOHJELMA

Kandidaatintyö

Toukokuu 2020

TIIVISTELMÄ

Vetyä hapettavien bakteerien tuottamat arvotuotteet

Merja Perätalo

Oulun yliopisto, Prosessitekniikan tutkinto-ohjelma

Kandidaatintyö, toukokuu 2020, 36 s. + 2 liitettä

Työn ohjaaja yliopistolla: Ville-Hermann Sotaniemi

Ilmastonmuutos ja ravinnon puute ovat suuria ongelmia maailmanlaajuisesti. Fossiilisten polttoaineiden käyttäminen lisää hiilidioksidipäästöjä ilmakehään, ja siten nopeuttaa ilmastonmuutosta. Ruoantuotanto pohjautuu vahvasti maanviljelyyn, joka kuluttaa maaperää. Eläinperäinen proteiinituotanto lisäksi lisää hiilidioksidipäästöjä.

Näitä ongelmia voidaan mahdollisesti lieventää vetyä hapettavien bakteerien tuottamien tuotteiden avulla. Vetyä hapettavat bakteerit sitovat ilmakehästä hiilidioksidia, jota ne voivat käyttää ainoana hiililähteenään. Energiansa ne saavat hapettamalla vetyä. Vetyä hapettavat bakteerit tarvitsevat aineenvaihduntaansa yksinkertaisia yhdisteitä, kuten vetyä ja hiilidioksidia. Bakteerien avulla yhdisteiden tuotanto onnistuu ilman fossiilisia polttoaineita, joten tuotanto voi vähentää hiilidioksidipäästöjä.

Tämän työn tavoitteena oli saada selville mitä tuotteita vetyä hapettavat bakteerit tuottavat, miten tuotanto tapahtuu ja kuinka tehokasta se on. Vetyä hapettavien bakteerien tuotteet on jaettu neljään ryhmään: biomuovit, poly-3-hydroksibutyraatin johdannaiset, kemikaalit ja yksisoluproteiinit. Näiden kaikkien tuotantoprosesseja on mahdollista kehittää siten, että teollinen tuotanto on kannattavaa.

Vetyä hapettavilla bakteereilla tuotetut biomuovit ovat biohajoavia ja bioyhtheensopivia kestopuoveja, joiden ominaisuudet ovat hyvin samankaltaisia kuin fossiilisesta öljystä valmistettujen muovien. Nämä biomuovit voisivat korvata öljyyn pohjautuvia puoveja. Lisäksi biomuovista saadaan katalyyttisellä jalostuksella tuotettua hiilivetyöljyä, josta voidaan valmistaa nestemäistä biopolttoainetta. Nestemäiset biopolttoaineet kuuluvat poly-3-hydroksibutyraatin johdannaisiin. Niillä voitaisiin suoraan korvata fossiilisia polttoaineita. Fossiilisten polttoaineiden käyttämisestä aiheutuvien

hiilidioksidipäästöjen tiedetään kiihdyttävän ilmastonmuutosta ja merten happamoitumista. Vetyä hapettavien bakteerien avulla valmistetut arvotuotteet voisivat olla yksi ratkaisu ilmastonmuutoksen hillitsemiseksi.

Vetyä hapettavien bakteerien avulla voidaan tuottaa useita kemikaaleja. Tällaisia kemikaaleja ovat esimerkiksi asetoini, isobutanoli, isopropanoli, 2-hydroksibutyyraattihappo ja metyyliketonit. Näistä erityisesti asetoini on merkittävä tuote, koska se toimii lähtömateriaalina useiden muiden kemikaalien tuotannolle. Joidenkin kemikaalien biotuotannossa ongelmana on syntyvän kemikaalin myrkyllisyys. Myrkyllisillä kemikaaleilla on inhiboiva vaikutus tuottaville mikrobeille, jolloin mikrobien tuottavuus laskee.

Biomuovien ja kemikaalien lisäksi vetyä hapettavat bakteerit tuottavat yksisoluproteiinia. Bakteerit omaavat korkeamman proteiinipitoisuuden kuin muut mikro-organismit, jonka vuoksi niitä käytetään yksisoluproteiinin tuottamiseen. Yksisoluproteiinia voidaan käyttää ravinnon proteiinilähteenä. Yksisoluproteiinituotanto voi siten olla maailmanlaajuisen ruoantuotannon ongelmien osaratkaisu. Tällä hetkellä rehun kasvatukseen käytettäviä maa-alueita olisi mahdollista vapauttaa esimerkiksi ruokakasvien ja biotuotannon raaka-aineiden viljelyyn tai metsittää hiilinieluiksi, jos osa proteiinituotannosta tapahtuisi bakteereita hyödyntämällä.

Asiasanat: vetyä hapettavat bakteerit, biomuovit, biopoltoaineet, ilmastonmuutos, yksisoluproteiinit

ABSTRACT

Value-added products produced by hydrogen oxidizing bacteria

Merja Perätalo

University of Oulu, Degree Programme of Process Engineering

Bachelor's thesis, May 2020, 36 pp. + 2 Appendixes

Supervisor at the university: Ville-Hermanni Sotaniemi

Climate change and lack of nutrition are large and global problems. The use of fossil fuels increases carbon dioxide emissions to the atmosphere and thus accelerates climate change. The food production is strongly based on agriculture, which erodes soil. In addition, animal protein production increases carbon dioxide emissions.

It is possible that these problems can be reduced with the products produced by hydrogen oxidizing bacteria. The hydrogen oxidizing bacteria fix carbon dioxide from atmosphere and can utilize it as their sole carbon source. They gain energy by oxidizing hydrogen. The hydrogen oxidizing bacteria use simple compounds for their metabolism, such as hydrogen and carbon dioxide. Production of value-added products is possible without fossil fuels with help of these bacteria. This kind of production can decrease carbon dioxide emissions.

The objective of this work was to investigate what products the hydrogen oxidizing bacteria produce, how does the production take place and how high is the production efficiency. The products produced by the bacteria have been divided into four groups: bioplastics, derivatives of poly-3-hydroxybutyrates, chemicals and single cell proteins. These production processes can be developed to make them more suitable for industrial production.

Bioplastics produced by bacteria are biodegradable and biocompatible thermoplastics, and their properties are similar with the oil-based plastics. Bioplastics could replace part of the oil-based plastics. In addition, bioplastics can be refined catalytically, resulting in hydrocarbon oil. Hydrocarbon oil is raw material for liquid biofuels. With biofuel it is possible to replace fossil fuels. It is known that the use of fossil fuels accelerates climate

change and ocean acidification. Industrial production of value-added products from carbon dioxide could decrease the amount of greenhouse emissions.

Multiple chemicals can be produced with hydrogen oxidizing bacteria. For example, acetoin, isobutanol, isopropanol, 2-hydroxybutanoic acid and methyl ketones are this kind of chemicals. Acetoin is a significant product because it is a platform chemical for production of several other chemicals. Some bio-produced chemicals are toxic and these toxic products act as an inhibitor for microbes. This causes decrease in productivity of microbes.

In addition to bioplastics and chemicals, the hydrogen oxidizing bacteria produce single cell protein. Bacteria have higher protein concentration than other microorganisms. Therefore, they are used for production of single cell proteins. Single cell protein can be used as a protein source of nutrition. The production of single cell proteins by hydrogen oxidizing bacteria can be the partial solution in global food production. If a part of protein production were executed with bacteria, it would be possible to free land from feed cultivation to food plant cultivation. It would also be possible to transform fields to forests, which act as carbon sinks.

Keywords: hydrogen oxidizing bacteria, bioplastics, biofuels, climate change, single cell protein

ALKUSANAT

Työn tarkoituksena oli selvittää, mitä tuotteita vetyä hapettavien bakteerien avulla voidaan tuottaa. Työ toteutettiin kirjallisuuskatsauksena, joten tähän työhön on koottuna pääpiirteittäin tuotteet, joita tähän mennessä on onnistuttu tuottamaan kyseisillä bakteereilla. Aihe valikoitui muutamasta Oulun yliopiston kemiallisen prosessitekniikan tutkimusyksikön tarjoamasta vaihtoehdosta kiinnostavuutensa vuoksi. Lisäksi aiheesta löytyy niukasti tietoa suomen kielellä, joten tällaiselle koosteelle oli kirjoittajan mielestä tarvetta.

Työ kirjoitettiin Ville-Hermanni Sotaniemen ohjauksessa syksyn 2019 ja kevään 2020 aikana. Työn alkuvaiheessa ohjaajana toimi Petri Tervasmäki. Haluan osoittaa kiitokset molemmille ohjaajille ja kaikille minua työssä tukeneille perheenjäsenille ja ystäville.

Oulu, 29.04.2020

Merja Perätalo
Merja Perätalo

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ

ABSTRACT

ALKUSANAT

| | |
|--|----|
| 1 Johdanto | 7 |
| 2 Vetyä hapettavat bakteerit | 8 |
| 2.1 Luokittelu | 8 |
| 2.2 Elinolosuhteet | 10 |
| 2.3 Aineenvaihdunta | 10 |
| 2.4 Vaaditut kasvatusolosuhteet | 13 |
| 3 Tuotteet | 15 |
| 3.1 Biomuovit | 15 |
| 3.1.1 Polyhydroksialkanoaatit | 15 |
| 3.1.2 Polyhydroksibutyraatti | 15 |
| 3.1.3 Biomuovien tuotanto glyseroli -substraatilla | 16 |
| 3.2 Poly-3-hydroksibutyraatin johdannaiset | 18 |
| 3.3 Kemikaalit | 19 |
| 3.3.1 Asetoiini | 19 |
| 3.3.2 Muut kemikaalit | 20 |
| 3.4 Yksisoluproteiinit | 21 |
| 4 Pohdinta | 24 |
| 5 Yhteenveto | 27 |
| LÄHDELUETTELO | 29 |

LIITEET:

Liite 1. Taulukko vetyä hapettavien bakteerien PHB:n tuotannosta kemolitoautotrofisella kasvatusmenetelmällä.

Liite 2. Taulukko vetyä hapettavien bakteerien PHB:n tuotannosta hetero- ja kemolitoautotrofisen kasvatusmenetelmän yhdistelmällä.

MERKINNÄT JA LYHENTEET

| | |
|-----------------------|---|
| 3HB | 3-hydroksibutaanihappo |
| ADP | Adenosiinidifosfaatti |
| ATP | Adenosiinitrifosfaatti |
| ATPase | ATP-syntaasi |
| BHI | Brain Heart Infusion |
| BSCM | Soybean rhizosphere soil, pond water, and biogas slurry of chicken manure (ravinne) |
| CBB-kierto | Calvin-Benson-Bassham -kierto |
| DCM | Kuiva solumassa (dry cell mass) |
| MH | Membraaniin sidottu hydrogenaasi (membrane bounded hydrogenase) |
| NADH/NAD ⁺ | Nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi (kofaktori) |
| NADPH | Nikotiiniamidiadeniinidinukleotidifosfaatti (kofaktori) |
| P3HB | Poly-3-hydroksibutyraatti |
| PGA | 3-fosfoglyseriinihappo |
| PHA | Polyhydroksialkanoaatit |
| PHB | Polyhydroksibutyraatti |
| RH | Hengitysketju (respiration chain) |
| Rubisco | Ribuloosi-1,5-bisfosfaattikarboksyylaasi |
| SCP | Yksisoluproteiini (single cell protein) |
| SH | Soluliman liukoinen hydrogenaasi (soluble hydrogenase) |

1 JOHDANTO

Ilmaston lämpeneminen ja ravinnon puute ovat maailmanlaajuisia ongelmia, joiden ratkaisemisesta on käyty keskustelua jo pidemmän aikaa. Fossiiliseen öljyyn pohjautuvien muovien valmistus ja fossiilisten polttoaineiden käyttö lisäävät hiilidioksidipäästöjä ilmakehään, ja siten nopeuttavat ilmastonmuutosta. Lisäksi muut teollisuudesta vapautuvat myrkylliset kemikaalit saastuttavat ympäristöä, ja voivat aiheuttaa ihmisille monenlaisia negatiivisia terveysvaikutuksia. Maatalouden käytössä olevien maa-alueiden kuluminen ja maaperän ravinteikkuuden väheneminen aiheuttavat ongelmia ruoantuotannolle, jonka vaatimukset ovat kasvaneet maapallon populaation kasvun seurauksena. Eläinperäiseen proteiinituotantoon liittyy myös hiilidioksidipäästöjä, joita on pyritty vähentämään.

Hiilidioksidipäästöjen vähentämiseksi tarvitaan ekologisia tuotantomenetelmiä, joilla voitaisiin tuottaa esimerkiksi biohajoavia muoveja, fossiilivapaita kemikaaleja ja proteiinia ilman eläinperäistä tuotantoa ja suurta maankulutusta. Tällaisia tuotteita saadaan tuotettua esimerkiksi vetyä hapettavien bakteerien avulla. Vetyä hapettavat bakteerit saavat energiansa hapettamalla vetyä, ja ne sitovat ilmakehästä hiilidioksidia aineenvaihduntansa lähtöaineeksi.

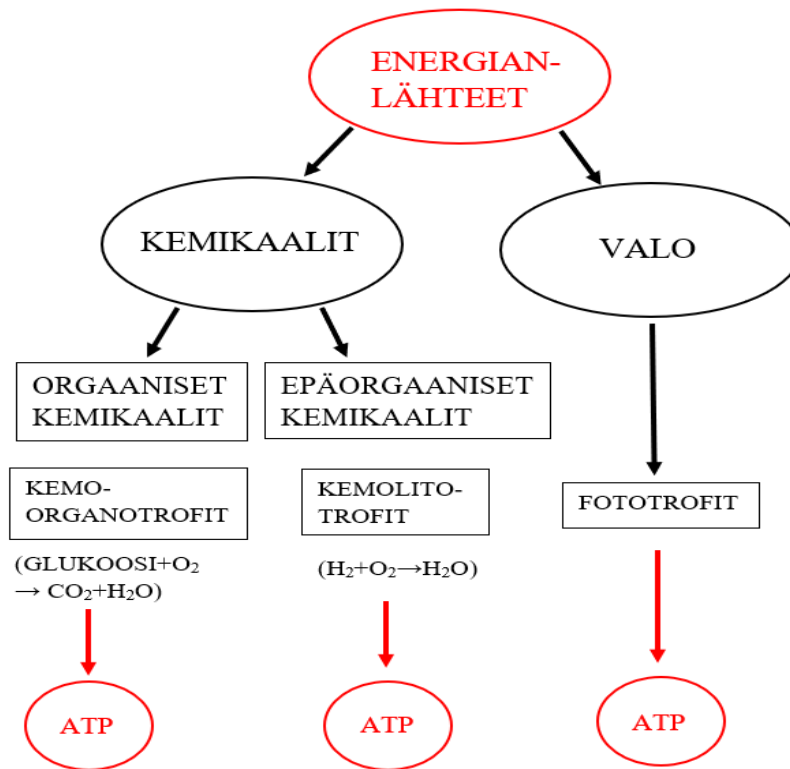
Vetyä hapettavien bakteerien tuottamia tuotteita on mahdollista tuottaa kaupalliseen tarkoitukseen. Koska vetyä hapettavat bakteerit sitovat ilmakehästä hiilidioksidia, voi niiden avulla tuotettujen yhdisteiden teollinen tuotanto vähentää kasvihuonekaasupäästöjen määrää. Tässä työssä esitellään lyhyesti tähän mennessä vetyä hapettavilla bakteereilla tuotettuja tuotteita, sekä pohditaan, minkälaisia sovellusmahdollisuuksia tuotteilla on tulevaisuudessa.

2 VETYÄ HAPETTAVAT BAKTEERIT

2.1 Luokittelu

Vetyä hapettavat bakteerit luokitellaan kemolitotrofeiksi, jolla viitataan eliöihin, jotka saavat energiansa hapettamalla epäorgaanisia elektronin luovuttajia. Suurin osa kemolitotrofeista on autotrofeja. Vetyä hapettavat bakteerit voivat käyttää ainoana hiililähteenään hiilidioksidia, mutta saavat tarvitsemansa energian hapettamalla vetyä. (Madigan et al. 2019, s. 448) Yleisesti kemotrofeilla tarkoitetaan organismeja, jotka saavat energiansa kemikaaleista. (Madigan et al. 2015, s. 103) Autotrofeilla puolestaan tarkoitetaan omavaraisia eliöitä, jotka tuottavat orgaanisia yhdisteitä käyttäen energianlähteenään joko auringon valoa tai epäorgaanista yhdistettä, ja hiililähteenään hiilidioksidia. (Jokipii et al. 1990, s. 47) Vertailun vuoksi on muistettava, että heterotrofit ovat toisenvaraisia eliöitä, jotka eivät kykene itse tuottamaan orgaanisia yhdisteitä ravinnokseen, vaan solun hiili on peräisin jostakin orgaanisesta kemikaalista. (Madigan et al. 2015, s. 103) Pelkkää hiilidioksidia hiililähteenään käyttävät organismit tarvitsevat kasvaakseen myös adenosiinitrifosfaattia (ATP) ja pelkistysenergiaa (Madigan et al. 2015, s. 417). Joiltakin kemolitotrofeilta puuttuvat autotrofiset ominaisuudet, jolloin niitä kutsutaan mikсотrofeiksi. Mikсотrofit käyttävät energianlähteenään epäorgaanisia yhdisteitä, mutta hyödyntävät orgaanista hiiltä hiililähteenään. (Madigan et al. 2019, s. 448)

Energianlähteenä mikrobit voivat käyttää joko auringon valoa tai kemikaaleja. Niitä mikrobeja, jotka käyttävät valoa, kutsutaan fototrofeiksi. Ne mikrobit, jotka käyttävät kemikaaleja, ovat joko kemo-organo- tai kemolitotrofeja riippuen siitä, käyttääkö mikrobi orgaanisia vai epäorgaanisia kemikaaleja. Energiametabolian tuotteena syntyy aina ATP:a, jota solut voivat käyttää eri tehtäviin. (Madigan et al. 2015, s. 103) Kuvassa 1 on esitetty mikrobien eri energiantuotantotapoja:



Kuva 1. Mikrobin energiametabolia. Energiantuotanto on kemo-organotrofista, kemolitotrofista tai fototrofista riippuen energianlähteestä (mukailien Madigan et al. 2015, s. 103).

Energiantuotantotapojen lisäksi bakteereja luokitellaan usein niiden soluseinien rakenteen perusteella, joka voidaan selvittää gram-värjäyksen avulla. Värjäyksen tuloksen mukaan bakteeri on joko gram-positiivinen tai gram-negatiivinen. Sekä gram-negatiivisia että gram-positiivisia vetyä hapettavia bakteereita tunnetaan. (Madigan et al. 2015, s. 483) Värjäyksen periaatteena on kristallivioletti -väriaineen kyky värjätä bakteerin soluseinä. Gram-positiivisissa soluissa kristallivioletti värjää solun pysyvästi. Gram-negatiivisissa soluissa väri ei pysy, vaan se poistuu huuhdeltaessa. Gram-positiivisten solujen värjäytyminen johtuu soluseinässä olevista useista päällekkäisistä mureiinikerroksista, jotka päästävät väriaineen lävitseen. Gram-negatiivisten solujen soluseinässä puolestaan on vain yksi mureiinikerros, mutta tämän lisäksi niillä on ulkokalvo, joka estää väriaineen pääsyn syvemmälle soluun, ja ei näin ollen värjää solua pysyvästi. (Korhola et al. 2008; Jyväskylän yliopisto et al. 2006)

2.2 Elinolosuhteet

Vetyä hapettavat bakteerit ovat fakultatiivisia kemolitotrofeja (Madigan et al. 2015, s. 418), jolla tarkoitetaan niiden kykyä kasvaa kemolitotrofisuuden lisäksi myös kemoorganotrofisesti orgaanisten komponenttien toimiessa energianlähteinä (Madigan et al. 2015, s. 483). Vetyä hapettavat bakteerit ovat lisäksi fakultatiivisia aerobeja, eli ne voivat pilkkoa orgaanisia komponentteja joko ilman happea tai hapen läsnä ollessa (Madigan et al. 2015, s. 103). Useimmat aerobiset vetyä hapettavat bakteerit kasvavat parhaiten mikroaerobisissa olosuhteissa, koska vetyä hapettavien bakteerien sisältämät hydrogenaasientsyymit ovat tyypillisesti hapelle hyvin herkkiä. Hydrogenaasientsyymien tehtävä on sitoa vetyä ja käyttää sitä joko tuottamaan ATP:a tai pelkistysenergiaa autotrofista kasvua varten. Mikroaerobisissa olosuhteissa happipitoisuus on 5-10 %. (Madigan et al. 2015, s. 482-483) Selviytyminen vähähappisissa olosuhteissa tekee niistä erittäin kilpailukykyisiä bakteereita aerobisten ja anaerobisten kasvuolosuhteiden rajapinnoilla, missä vetyä on enemmän, ja sen saanti on siten jatkuvampaa kuin täysin hapellisissa olosuhteissa (Madigan et al. 2019, s. 449).

Esimerkiksi *Cupriavidus necator* (*C. necator*, tunnetaan myös nimillä *Alcaligenes eutrophus* ja *Ralstonia eutropha*) on gram-negatiivinen vetyä hapettava bakteeri, joka elää maaperässä ja puhtaassa vedessä aerobisen ja anaerobisen elinympäristön rajapinnassa (Yu 2018). Aerobisissa olosuhteissa se sitoo hiilidioksidia Calvin-Benson-Bassham -kierron (CBB-kierto) avulla, käyttäen ainoana energianlähteenään vetyä (Badger & Bek 2008). *C. necator* kykenee vaihtamaan hengityksensä anaerobiseksi, jos ympäristön happi loppuu. Tällöin se vaihtaa myös luonnettaan autotrofista heterotrofiksi. (Pohlmann et al. 2006)

2.3 Aineenvaihdunta

Vetyä hapettavat bakteerit sitovat hiilidioksidia CBB-kierron avulla. CBB-kierto on sarja biosynteettisiä reaktioita, joiden avulla suurin osa fototrofeista ja useat kemolitotrofit muuttavat hiilidioksidia orgaanisiksi yhdisteiksi. (Madigan et al. 2019, s. 137) Araganon ja Schelegelin artikkelissa (1981) kerrotaan, että vetyä hapettavilla bakteereilla on kyky hyödyntää hiilidioksidin sidonnassa vetyä elektronien luovuttajana, ja happea elektronien vastaanottajana. Kaavassa (1) esitetään kemolitotrofinen

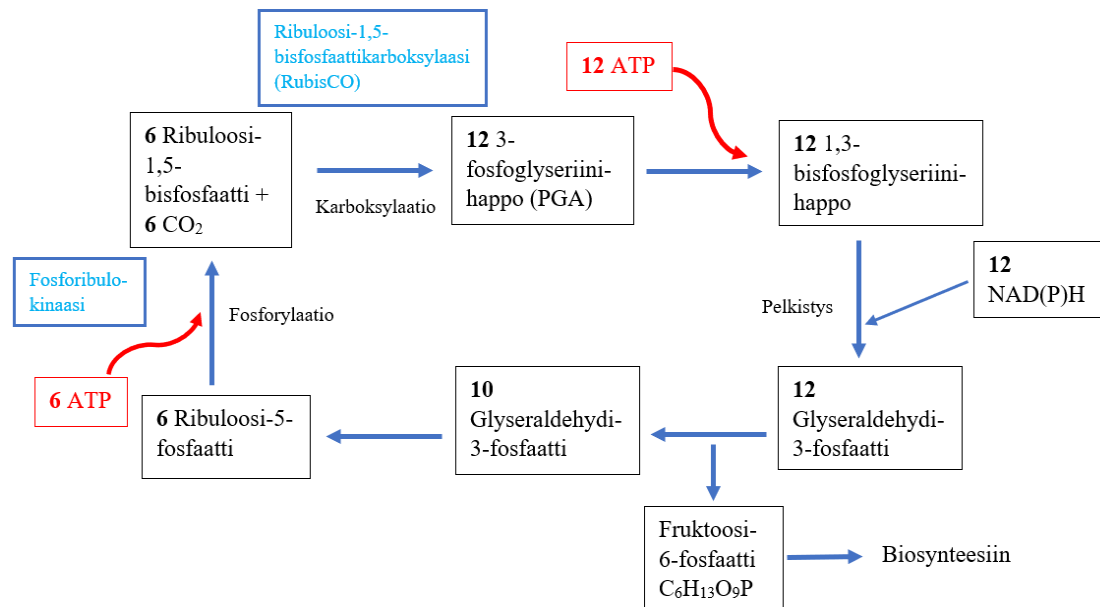
reaktioyhtälö vedyn hapettamiselle, jota katalysoi hydrogenaasientsyymi (Madigan et al. 2015, s. 482):



ΔG^0 = Gibbsin energian muutos

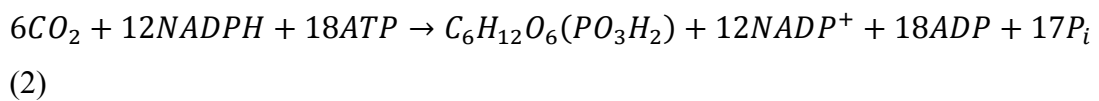
Gibbsin energian muutos ΔG^0 on riippuvainen lämpötilasta ja paineesta. Koska Gibbsin energia on negatiivinen kaavassa (1) esitetystä reaktiosta, tapahtuu reaktio spontaanisti. (Atkins 2006)

Hiilidioksidin sidonta CBB-kierron avulla alkaa hiilen sidonnalla. Ensimmäisessä vaiheessa ribuloosi-1,5-bisfosfaatista ja hiilidioksidista muodostuu kaksi 3-fosfoglyseriinihappo (PGA) -molekyyliä ribuloosi-1,5-bisfosfaattikarboksylaasin (rubisco) katalysoidessa reaktiota. Toisessa vaiheessa PGA fosforyroidaan 1,3-bisfosfaattiglyseraattiksi, ja pelkistetään glyseraldehydi-3-fosfaatiksi, joka on myös glykolyysin tärkein välituote. (Madigan et al. 2015, s. 414-415) Pelkistimenä toimii nikotiiniamidiadeniinidinukleotidifosfaatti (NADPH) (Heino & Vuento 2014, s.132). Glyseraldehydi-3-fosfaattia käytetään sokerien valmistukseen ja ribuloosi-1,5-bisfosfaatin uudelleen tuottamiseen (Madigan et al. 2015, s. 414-415; Heino & Vuento 2014, s.132). Kaksi glyseraldehydi-3-fosfaatti -molekyyliä irtautuu käytettäväksi biosynteesiin, joissa se voidaan muuntaa hiilihydraateiksi (CH_2O), solumassaksi ($CH_{1,7}O_{0,5}N_{0,2}$) ja polyhydroksibutyraatiksi ($CH_{1,5}O_{0,5}$). (Yu et al. 2013) Viimeisessä vaiheessa muodostetaan 1,5-ribuloosibisfosfaattia fosforyloimalla ribuloosi-5-fosfaattia fosforibulokinaasin avulla. Kuudesta hiiliatomista, kahdestatoista NADPH:sta kahdeksastatoista ATP:sta ja kuudesta hiilidioksidista saadaan CBB-kierron avulla valmistettua yksi glukoosimolekyyli. (Madigan et al. 2015, s. 414-415) Kuvassa 2 on esitetty CBB-kierto pääpiirteittäin:

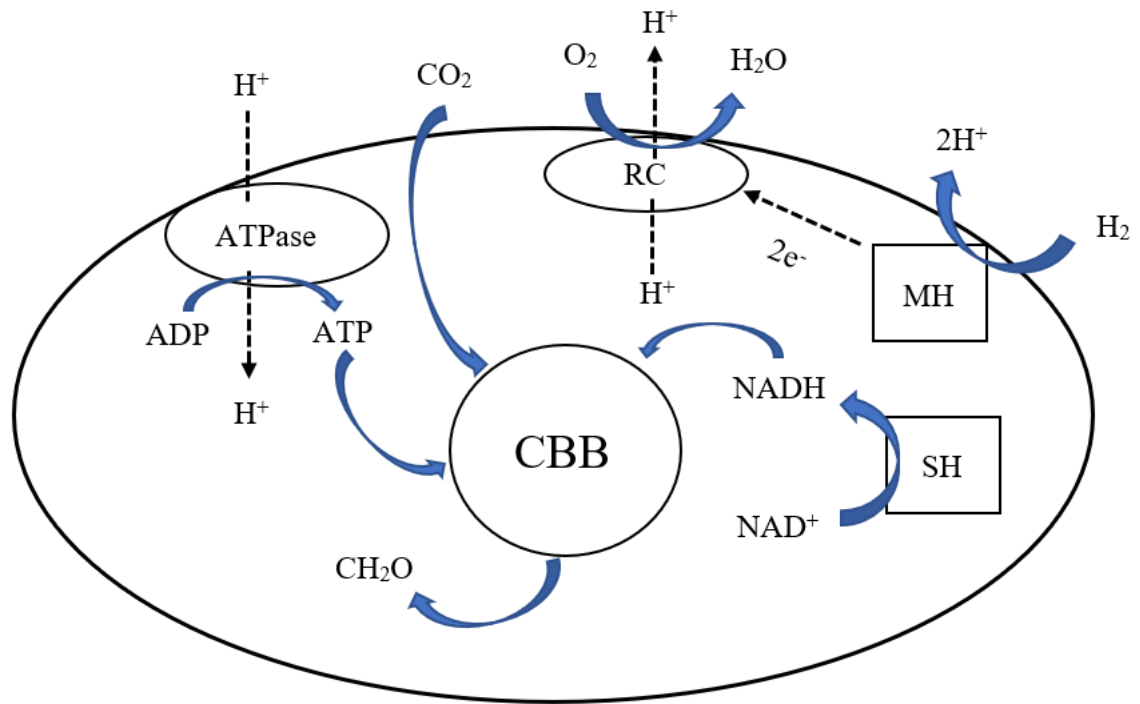


Kuva 2. Calvin-Benson-Bassham -kierto. Entsyymit on merkitty kehän ulkopuolelle sinisellä ja systeemiin menevä energia punaisella (mukaiillen Madigan et al. 2015, s. 415).

CBB-kierto kuluttaa 12 NADPH:a ja 18 ATP:a, kuten kiertoa kuvaava yhtälö (2) osoittaa:



Yhtälöstä (2) siis nähdään, että yhden hiilidioksimolekyylin sitominen vaatii vähintään kaksi NADPH:a ja kolme ATP:a. (Madigan et al. 2015, s. 415) NADH ja ATP on tuotettu hapettamalla vetyä kahden itsenäisen hydrogenaasientsyymin katalysoimana. (Burgdorf et al. 2005) Sytoplasmassa oleva liukoinen hydrogenaasientsyymi (SH) muodostaa NADH:n pelkistämällä NAD^+ :n kuluttaen vetyä. Samalla membraaniin sidottu hydrogenaasientsyymi (MH) yhdistää vedyn hapettamisen hengitysketjuun (RC). (Bernhard et al. 1997) Hengitysketjussa, eli souluhengityksessä, solu ottaa ympäristöstään happea ja yhden protonin solusta, jolloin solusta erittyy ulos vettä. Soluhengityksen vaiheet ovat glykolyysi, sitruunahappokierto ja elektroninsiirtoketju. (Madigan et al. 2015, s. 118) Elektroninsiirtoketju saa aikaan protonimotorisen voiman (eng. proton motive force), jonka avulla protonit pääsevät läpäisemään membraanin, jonka ioneiden läpäisevyys on rajoitettu. Protonimotorisen voiman vaikutuksesta ATP-syntaasi -entsyymi valmistaa ATP:a. (Haddock & Jones 1977) Kuvassa 3 on esitetty edellä selitetyt vetyä hapettavan bakteerin metaboliareaktiot hiilidioksidin sidonnassa, jossa CBB-kierto on keskeisessä roolissa.



Kuva 3. Vetyä hapettavan bakteerisolun metaboliareaktiot hiilidioksidin sidonnassa (mukaillen Yu et al. 2013).

2.4 Vaaditut kasvatusolosuhteet

Bakteerien kasvatusalustana toimii ravintoliuos, jota käytetään mikro-organismien kasvatukseen. Kasvatusalustan valinta ja valmistelu on erittäin tärkeä osa onnistunutta laboratorioviljelmää. Mikrobiologiassa käytetään kahta kasvatusalustan päätyyppiä; määritelty (defined) ja kompleksinen (complex) kasvualusta. Määritelty kasvualusta valmistetaan lisäämällä tietyt määrät puhtaita orgaanisia tai epäorgaanisia kemikaaleja tislattuun veteen. Täten määritellyn kasvualustan tarkka koostumus tiedetään. Jos viljellään useita mikro-organismeja samalla alustalla, ei ravintoliuoksen tarkkaa koostumusta ole välttämättä tarpeellista tietää. Tällöin voidaan käyttää kompleksista kasvualustaa, joka on valmistettu mikrobi-, eläin- tai kasvipärisestä tiivisteestä, kuten kaseiinista, soijapavuista, hiivasoluista tai muista korkean ravintoarvon omaavista ainesosista. (Madigan et al. 2015, s. 100)

Kasvatusolosuhteet määräytyvät mikrobin aineenvaihdunnan ja sen myötä luonnollisten elinolosuhteiden mukaan. Kuten kappaleessa 2.3. esitetyistä vetyä hapettavien bakteerien elinolosuhteista ilmenee, vetyä hapettavat bakteerit kasvatetaan yleensä mikroaerobisissa olosuhteissa (Madigan et al. 2015, s. 482-483). Energianlähteeksi

niille tarjotaan vetyä ja hiililähteeksi hiilidioksidia kemolitotrofisuuden vuoksi (Madigan et al. 2019, s. 448).

Esimerkiksi maaperästä eristetyn *C. necator* 13513 tyyppikannan kasvualustana voidaan käyttää joko mediumia 1 tai 215. Medium 1 (ravinne agar) sisältää 5,0 g peptonia, 3,0 g lihauutetta ja tarvittaessa 15,0 g agaria, jotka lisätään 1000,0 ml:aan tislattua vettä. Medium 215 (BHI medium) sisältää 37,0 g aivo-sydän -infuusiota, joka lisätään 1000,0 ml:aan tislattua vettä. Optimaalinen kasvatuslämpötila tälle kannalle on 26°C. (DSMZ 2020)

3 TUOTTEET

Vetyä hapettavat bakteerit tuottavat useita arvotuotteita. Osa tuotteista syntyy bakteerien luonnollisen metabolian kautta, ja osa saadaan tuotettua geneettisen muokkauksen avulla. Merkityksellisimmät tässä työssä esitellyt tuotteet voidaan jakaa neljään pääryhmään: biomuoveihin, poly-3-hydroksibutyraatin johdannaisiin, kemikaaleihin ja yksisoluproteiineihin.

3.1 Biomuovit

3.1.1 Polyhydroksialkanoaatit

Tärkeitä vetyä hapettavien bakteerien tuottamia tuotteita ovat polyhydroksialkanoaatit (PHA), jotka ovat biohajoavia ja bioyhteensopivia kestomuoveja. Niiden ominaisuudet ovat samankaltaisia kuin öljyyn pohjautuvien muovien, kuten polystyreenin ja polyetyleenin, ominaisuudet. (Philip et al. 2007) PHA:t toimivat useiden bakteerien hiili- ja energiavarastoina. Bakteerit tuottavat PHA:ta solunsisäisesti, kun hiiltä on tarjolla ylimäärin, ja kun muiden välttämättömien ravinteiden – kuten hapen, fosforin ja typen - saanti on rajoitettua. Solut kykenevät varastoimaan PHA:ta suurina pitoisuuksia sisäänsä, kunhan ne eivät muuta solun osmoottista tilaa. (Anderson & Dawes 1990) PHA:n ominaisuuksiin kuuluvat muiden muassa pietsosähköisyys, optinen aktiivisuus, hydrofobisuus, termoplastisuus ja myrkyttömyys. Ne ovat myös elastomeereja ja inerttejä. (Laylock et al. 2014)

3.1.2 Polyhydroksibutyraatti

Ensimmäinen paljon tutkittu PHA-ryhmän jäsen on polyhydroksibutyraatti (PHB). *C. necator* on eniten tutkittu vetyä hapettava bakteeri, joten se on hyvä malliorganismi PHB:n tuotannon tutkimiseen (Windhorst & Gescher 2019). *C. necator* tuottaa luontaisesti PHB:tä varastopolymeeriksi kaikissa kasvuolosuhteissa ja kaikenlaisissa ravintoliuoksissa. (Volodina et al. 2016) *C. necator* tuottaa polyhydroksibutyraatteihin kuuluvaa poly-3-hydroksibutyraattia (P3HB), joka on lupaava biomuovi, koska se on kokonaan mikrobisolun hyödynnettävissä. P3HB on homopolyesteri, joka on täysin biohajoava (Volova et al. 2013). Biohajoavuutensa vuoksi sille voi löytyä useita ympäristöystävällisiä käyttökohteita (Bugnicourt et al. 2014). P3HB:n ominaisuuksiin kuuluu korkea stereosäännöllisyys, jonka vuoksi sen kiteisyysaste on korkea (65-75 %).

Sen seurauksena P3HB on jäykkä muovi. (Laylock et al. 2014) Sellaisenaan tuotantoa ei kuitenkaan ole kehitetty eteenpäin sen huonojen mekaanisten ja fysikaalisten ominaisuuksien vuoksi. Tällaisia ominaisuuksia ovat muiden muassa hauraus ja jäykkyys. (Koller et al. 2016) Näiden muovien taipuisuutta voidaan parantaa liittämällä monomeereja polyesterirunkoon. Tällaisia monomeereja ovat muiden muassa 3-hydroksivalerianaatti (3HV), 3-hydroksiheksanoaatti (3HHx), 4-hydroksibutyraatti (4HB) ja 4-hydroksivalerianaatti (4HV) (Volova et al. 2013). Esimerkiksi yhdistettäessä 3-hydroksivalerianaattia (3HV) polyhydroksibutyraattiin, on saatu muodostettua kopolymeeri P(3HB-co-HV), jolla on paremmat fysikaaliset ja mekaaniset ominaisuudet, kuten parempi joustavuus ja kovuus. (Cavalheiro et al. 2012; Wang et al. 2013) Kopolymeerin terminen prosessoitavuus ja elastisuus ovat paljon paremmat kuin PHB:llä yksinään. (García et al. 2013) Vuonna 1970 Imperial Chemical Industries Ltd. kaupallisti P(3HB-co-3HV):n tuotannon tuotenimellä Biopol™ (Holmes 1985).

P3HB:tä voidaan tuottaa esimerkiksi vetyä hapettavilla *C. necatorilla* ja *Ideonella*-suvun kannalla O-1. Kanta O-1 yhteyttää autotrofisissa olosuhteissa käyttäen substraattina vetyä, happea ja hiilidioksidia. Sen ominainen kasvunopeus (specific growth rate) on suurempi kuin *C. necatorin*. Kannan sietokyky korkeille happi- ja hiilimonoksidipitoisuuksille on hyvä, sillä se voi kasvaa happipitoisuuden ollessa yli 30 % (v/v), ja jopa 70 %:n (v/v) hiilimonoksidipitoisuuksissa. Vastaavasti *C. necator* ei kasva enää hiilimonoksidipitoisuuden ollessa yli 5 % (v/v). Tutkimuksessa *Ideonella* kantaa O-1 viljeltiin käyttäen substraattina vedyn, hapen ja hiilidioksidin kaasuseosta, joiden suhdeluvut edellä mainitussa järjestyksessä olivat 7:1:1. Kuivan solumassan pitoisuudeksi saatiin 24 tunnin viljelyn jälkeen 6,75 g/l ja P3HB:n pitoisuudeksi 5,26 g/l. P3HB -pitoisuus soluseinissä oli 77,9 % (w/w). (Tanaka et al. 2011) Rajoitettaessa liuenneen hapen määrää P3HB:n muodostus ei vähene, mutta kokonaisvaltainen aineenvaihdunta hidastuu (Lu & Yu 2017).

3.1.3 Biomuovien tuotanto glyseroli -substraatilla

Jätteglyserolin käyttöä PHA-muovien tuotannossa on tutkittu viime vuosina käyttäen eri isäntäorganismeja. Raakaglyserolia syntyy erityisen paljon biodieselin tuotannossa. (Gahlawat & Soni 2017) Raaka- ja kaupallisen glyserolin pitoisuuden vaikutuksia on tutkittu *C. necator* DSM 545 -viljelmän kasvunopeuteen sekä biomass- ja biopolymeerisaantoihin. Kaupallisen glyserolin pitoisuutta kasvatettiin 10 g/l:sta pitoisuuteen 60 g/l. Kasvunopeuden vaihteluväli oli tällöin 0,21-0,28 h⁻¹. Suurin

kasvunopeus todettiin glyserolipitoisuuden ollessa 20 g/l. Raakaglyserolin pitoisuudella havaittiin olevan suurempi merkitys kasvunopeuteen kuin kaupallisen glyserolin pitoisuudella; raakaglyserolin kasvunopeuden vaihteluväli oli 0,12-0,26 h⁻¹. Suurin kasvunopeus havaittiin glyserolipitoisuuden ollessa 20-30 g/l. Artikkelissa tutkittiin biomass- ja biopolymeerisaantoja käyttäen kaupallisen- ja raakaglyserolin pitoisuutena omissa viljelmissään 20 g/l. PHB:n ja kuivan solumassan (DCM) pitoisuudet, sekä PHB:n saannot on esitetty taulukossa 1. (Gahlawat & Soni 2017)

Taulukko 1. Kaupallisen ja raakaglyserolin käytön vertailu biomassan ja PHB:n tuotannossa *C. necator* -kannalla. CG=kaupallinen glyseroli, WG=raakaglyseroli (mukaillen Gahlawat & Soni 2017).

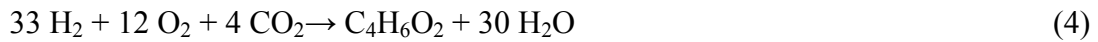
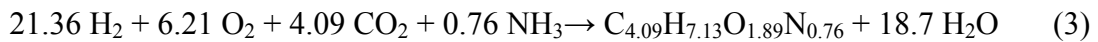
| | | DCM [g/l] | PHB [g/l] | PHB saanto [%] | PHB tuottavuus [g/l/h] |
|----|---------|-----------|-----------|----------------|------------------------|
| CG | Päivä 1 | 3,75 | 1,84 | 49,12 | 0,08 |
| | Päivä 2 | 6,69 | 4,33 | 64,72 | 0,09 |
| WG | Päivä 1 | 2,8 | 1,25 | 44,64 | 0,052 |
| | Päivä 2 | 5,7 | 3,42 | 59,8 | 0,07 |

Taulukosta 1 nähdään, että viljelyn lopuksi kokonaisbiomassan konsentraatio oli 6,69 g/l, ja PHB:n konsentraatio 4,33 g/l käytettäessä kaupallista glyserolia. Vastaavasti kokonaisbiomassan konsentraatio oli 5,7 g/l ja PHB:n konsentraatio 3,42 g/l käytettäessä raakaglyserolia. Tutkimus osoitti, että *C. necator* kykenee muodostamaan huomattavan määrän PHB:a käyttäen hiililähteenään myös raakaglyserolia, joka on peräisin biodieselin tuotantoketjusta. (Gahlawat & Soni 2017)

Samassa tutkimuksessa tutkittiin myös *C. necator* DSM 545 -kannan kykyä muodostaa poly(3-hydroksibutyyraatti-ko-3-hydroksivaleraatti) -kopolymeeriä (P(3HB-co-3HV)) eri happojen avulla. Testatuista orgaanisista hapoista vain valeriaanihappo ja propionihappo saivat aikaan P(3HB-co-3HV) -kopolymeerin muodostumisen. Korkeimmat biomassan ja P(3HB-co-3HV):n saannot saatiin käytettäessä valeriaanihappoa ja substraattina jäteglyserolia. Biomassaa muodostui 6,76 g/l ja kopolymeeriä 4,84 g/l. (Gahlawat & Soni 2017)

Garcia-Gonzalezin et al. (2015) artikkelissa kerrotaan, että *C. necatorilla* voidaan tuottaa PHB:tä kahden kasvatusmenetelmän yhdistelmällä hyödyntäen hiilidioksidia. Yleisimmin käytetty on kemolitoautotrofinen menetelmä, joka hyödyntää hiilidioksidin, vedyn ja hapen kaasuseosta sekä solumassan että PHB:n tuotantoon. Solumassan

muodostuksen stoikiometria on esitetty kaavassa (3), ja PHB:n tuotannon stoikiometria kaavassa (4). (Ishizaki et al. 2001) Reaktoriin syötettyjen kaasujen suhdeluvut ovat 7:2:1 (H₂:O₂:CO₂) (Garcia-Gonzalez et al. 2015).



Kahden kasvatusmenetelmän yhdistelmässä solumassan tuotanto tapahtuu heterotrofisissa olosuhteissa (Mozumder et al. 2014b) ja sen jälkeen PHB:n tuotanto autotrofisissa olosuhteissa kaavan (4) mukaan, kuten ensimmäisessä menetelmässä. Kahden kasvatusmenetelmän yhdistelmän etu kemolitoautotrofiseen kasvatukseen verrattuna on, että solumassan tuotannon aikana saavutetaan korkea solumassakonsentraatio ja tuottavuus ilman hapen konsentraation rajoitusta. Autotrofisessa vaiheessa PHB:n tuotanto aktivoituu, kun hapen konsentraatio laskee alle kriittisen arvon (3 %). (Tanaka et al. 1995)

Molempien edellä mainittujen kasvatusmenetelmien tuloksia on esitelty liitteissä 1 ja 2. Liitteestä 1 nähdään, että kemolitoautotrofisella viljelymenetelmällä korkein PHB-pitoisuus on ollut 62 g/l. Ravintoaineista hapen määrää on rajoitettu. (Tanaka et al. 1995) Liitteestä 2 nähdään, että käyttämällä heterotrofisen ja kemolitoautotrofisen kasvatuksen yhdistelmää, korkein PHB-pitoisuus (28 g/l) saavutetaan jäteglyserolin toimiessa substraattina. Ravintoaineista typen ja hapen määrää on rajoitettu. (Garcia-Gonzalez et al. 2015) Molemmissa taulukoissa on lisäksi mainittu korkein PHB-pitoisuus heterotrofisella kasvatuksella sekä jäteglyserolin että glukoosin ollessa erikseen substraatteina. Jäteglyserolin tapauksessa korkein PHB-pitoisuus on ollut 66 g/l (Mozumder et al. 2014a) ja glukoosin tapauksessa 121 g/l (Kim et al. 1994).

3.2 Poly-3-hydroksibutyraatin johdannaiset

Poly-3-hydroksibutyraatti (P3HB) toimii pohjamateriaalina useille kemikaaleille. Siitä voidaan valmistaa esimerkiksi 3-hydroksibutyraattihappoa (3HB), krotonihappoa, asetoetikkahappoa ja 1,3-butaanidiolia. (Yu 2014) Krotonihappoa tai 3-metakryylihappoa voidaan valmistaa katalyyttisellä P3HB:n hajottamisella

saantoprosentin ollessa yli 99 (m-%) (Ariffin et al. 2010). 3HB:a voidaan valmistaa katalyyttisen hydrolyysin avulla P3HB:sta (Yu et al. 2005).

P3HB:n katalyyttisellä jalostuksella voidaan tuottaa hiilivetyöljyä, joka sisältää pääasiassa alkeeneja ja betseenejä, joista voidaan jatkojalostaa orgaanisia liuottimia. Hiilivetyöljyn valmistuksen välituotteena syntyy pääosin krotonihappoa. (Kang & Yu 2015a) Kiinteällä fosforihappokatalyytillä voidaan puhtaudeltaan 87-98 m-% P3HB:ta muuttaa hiilivedyiksi dekarboksylaation ja hapenpoiston avulla. (Kang & Yu 2015b) Tästä korkealaatuisesta öljystä saadaan nestemäistä biopolttoainetta, jolla voidaan suoraan korvata bensiiniä ja biodieseliä. Nestemäisten polttoaineiden markkinat ovat suuret, joten niiden tuotannolla on suuri merkitys kasviuonekaasupäästöihin. (Kang & Yu 2015a)

3.3 Kemikaalit

3.3.1 Asetoiini

Asetoiini, $C_4H_8O_2$, on aromiaineena tunnettu yhdiste, joka luokitellaan alkoholeihin ja ketoneihin. Asetoiini on esimerkiksi yleinen ruokien lisäaine elintarviketeollisuudessa sen voita muistuttavan maun vuoksi. Se on myös lähtömateriaali useiden muiden kemikaalien tuotannolle, joten sille löytyy paljon mahdollisia sovelluskohteita. Tällä hetkellä asetoiinin tuotanto tapahtuu pääsääntöisesti fossiilisten raaka-aineiden ja kemiallisten prosessien avulla. (Xiao & Lu 2014)

Asetoiinin tuotanto bakteerisolussa on kaksivaiheinen: ensin tapahtuu asetolaktaattisynteesi, jossa kaksi pyruvaattimolekyyliä kondensoituu katalyytin avustuksella asetolaktaatiksi. Samalla vapautuu yksi hiilidioksidimolekyyli. (Pohlmann et al. 2006) Toisessa vaiheessa asetolaktaattidekarboksylaasin aktiivisuus aiheuttaa asetoiinin muodostumisen, ja toisen hiilidioksidimolekyylin vapautumisen. (Zhang et al. 2013)

Tällä hetkellä synteesikaasujen fermentointiprosesseihin käytetään enimmäkseen asetogeneja, koska ne ovat tehokkaita katalyyttejä. Asetogeenien kasvu on kuitenkin energiallyisesti rajoittunutta verrattaessa *C. necator* -kantaan. Lisäksi asetogeenien geneettinen muokkaus on usein hankalaa, mikä hankaloittaa metabolian ohjaamista haluttua lopputuotetta kohti. (Heinrich et al. 2018) *C. necator* käyttää hiilidioksidin

sidontaan CBB-kiertoa, joka on sekä etu että haitta. Etuna on, että CBB-kierto ohjaa hiilivirran kolmen hiilen ketjuina glykolyysiin tai glykoneogeneesiin, joka mahdollistaa monimutkaisten yhdisteiden muodostumisen. CBB-kierron hankaluus on sen oksygenaasi-entsyymin aktiivisuus rubiscossa. Se voi ohjata huomattavan määrän elektroneja hapen pelkistykseen, kun sen haluttaisiin pelkistävän hiilidioksidia. (Windhorst & Gescher 2019)

Windhorstin & Gescherin (2019) tutkimuksessa tutkittiin asetoiinin tuotantoa sekä hetero- että autotrofisissa olosuhteissa. Tutkimuksessa käytettiin *C. necator* H16 -kantaa, jota muokattiin geneettisesti. Paras asetoiinin saanto heterotrofisesti kasvattamalla saatiin eräällä geenimuokatulla kannalla, jolla saanto oli 89,9 % kulutettua fruktoosia kohden (mol/mol). (Windhorst & Gescher 2019)

Windhorstin & Gescherin artikkelin (2019) tutkimuksessa autotrofisesti *C. necatoria* kasvatettasessa havaittiin, että happikonsentraation kasvatuksella arvosta 3,8 % arvoon 20 % ei ollut huomattavaa vaikutusta kasvunopeuteen, mutta happikonsentraation ollessa yli 25 %, kasvu alkoi estyä. Keskimääräisen kasvunopeuden huomattiin kuitenkin olevan suurin happikonsentraation ollessa 15-20 %. Tutkimuksessa päädyttiin käyttämään autotrofisessa kasvatuksessa kaasuseosta suhdeluvuilla 0,75 H₂: 0,05 CO₂: 0,18 O₂: 0,02 N₂. Paras asetoiinin tuotto autotrofisella kasvatuksella saavutettiin myös käyttämällä geenimuokattua kantaa, jolla asetoiinin tuotoksi saatiin 0,32 mol yhtä hiilidioksimoolia kohti, eli 3,9 g/l asetoiinia. Tutkimuksen loppupäätelmä oli, että *C. necatoria* voidaan käyttää tehokkaasti lähtömateriaalina toimivien kemikaalien biotuotannossa, vaikka se käyttää CBB-kiertoa hiilidioksidin sidontaan (Windhorst & Gescher 2019).

3.3.2 Muut kemikaalit

C. necatorilla on saatu tuotettua useita eri kemikaaleja useissa eri tutkimuksissa. Tällaisia kemikaaleja ovat esimerkiksi isobutanoli, isopropanoli, 2-hydroksibutyraattihappo ja metyyliketonit (Yu 2018).

Isobutanoli on alkoholi, jota käytetään yleisesti liuottimena. Lisäksi sitä käytetään Suomessa muiden muassa kasvinsuojeluaineissa, korroosionestoaineissa, jäätymisenestoaineissa, painomusteissa, polttoaineissa ja pesuloiden tahrannoistoaaineissa. Sen kemiallinen kaava on C₄ H₉ OH. (Työterveyslaitos 2017)

Isobutanolia tuotetaan teollisesti propyleenin karbonylaatiolla tai isobutyryyaldehydin hydruuksella. Isobutanolin biotuotantoon liittyy kuitenkin ongelmia, kuten substraattien hintavuus ja luonnollisten tuottajien vähäinen määrä. Lisäksi isobutanoli on myrkyllinen ja sillä on inhiboiva vaikutus tuottavaan mikrobiin, josta aiheutuu pieni tuottavuus. (Ezeji et al. 2014) Geenimuokatulla *C. necator* -kannalla on saatu tuotettua 100 mg/l -pitoisuus isobutanolia (Li et al. 2012).

Lisäksi geenimuokatulla kannalla on saatu tuotettua 216 mg/l -pitoisuus isopropanolia (Torella et al. 2015), 3,2 g/l 2-hydroksibutyraattihappoa (eng. 2-hydroxybutyric acid) Przybylski et al. 2015), 80 mg/l metyyliketoneita (Müller et al. 2013) ja 4,4 mg/l alkeeneja (Crépin et al. 2016).

Isobutanolia, 3-metyyli-1-butanolia ja isopropanolia voidaan tuottaa geenimuokatun *C. necator* -kannan avulla. Käytettäessä fruktoosia substraattina, geenimuokattu *C. necator* on tuottanut isobutanolia yli 14 g/l 50 päivässä (Lu et al. 2012). Puolestaan sähkön ja hiilidioksidin ollessa ainoat energia- ja hiililähteet, isobutanolia on saatu tuotettua 140 mg/l (Li et al. 2012)

Kun synteettinen tuotantoreitti suunnitellaan siten, että muokattu *C. necator* ei kykene tuottamaan PHB:tä. vaan sen sijaan hiilivirta ohjataan isopropanolin tuotantoon, muokattu *C. necator* on kyennyt tuottamaan 3,44 g/l isopropanolia. (Grousseau et al. 2014) Samalla *C. necator* -kannalla isopropanolia on saatu tuotettua pelkistämällä hiilidioksidia vedyllä, joka on saatu veden hajotuksesta. Tällä menetelmällä isopropanolia on saatu tuotettua 216 mg/l. (Torella et al. 2015)

3.4 Yksisoluproteiinit

Bakteerien proteiinipitoisuus on korkea verrattaessa muihin mikro-organismeihin. Esimerkiksi levien kuivamassan keskimääräinen proteiinipitoisuus on 40-60 %, hiivojen 45-55 % ja sienten 30-45 %, kun taas bakteerien vastaava osuus on 50-65 %. (Miller & Litsky 1976) Siksi bakteerit soveltuvat hyvin yksisoluproteiinin eli mikro-organismien kuivattujen solujen (engl. single cell protein, SCP) tuotantoon. Vetyä hapettavien bakteereiden tuottama PHB toimii prebioottina (Matassa et al. 2015). Yksisoluproteiiniin yhdistetty prebiootti on ravitsemuksellisesti arvokkaampaa kuin muiden mikrobien yksisoluproteiinit (Anupama & Ravindra 2000), joten vetyä

hapettavia bakteereita voidaan käyttää proteiinilisanä eläinrehussa (Jalasutram et al. 2013)

Mikro-organismit kykenevät hyödyntämään edullisia raaka-aineita ja jätteitä hiili- ja energialähteinään tuottaakseen biomassaa, proteiinitäivistettä tai aminohappoja (Nasseri et al. 2011). Yksisoluproteiinia voidaan tuottaa autotrofisissa, heterotrofisissa sekä mikсотrofisissa olosuhteissa (Pohlmann et al. 2006). Taulukossa 2 on esitetty kolmen eri bakteerikannan proteiini-, perimä-, hiilihydraatti- ja lipidipitoisuudet. Taulukosta nähdään, että kasvustojen proteiinipitoisuudet ovat korkeat. Lisäksi kasvustojen koostumukset ovat keskenään hyvin samankaltaisia.

Taulukko 2. Eri bakteerikantojen proteiini-, perimä-, hiilihydraatti- ja lipidipitoisuudet (mukaillen Volova & Barashkov 2010).

| Kasvusto | Proteiinit [%] | DNA ja RNA [%] | Hiilihydraatit [%] | Lipidit [%] |
|-----------------------------|----------------|----------------|--------------------|-------------|
| A. eutrophus Z1 | 74,2 | 12,8 | 5 | 6 |
| S. carboxydohydrogena Z1062 | 71,3 | 11,2 | 6,7 | 9,1 |
| C. necator B5786 | 75,6 | 12,3 | 6,4 | 7,2 |

Doun et al. artikkelissa (2019) esitettiin kahden vetyä hapettavan bakteerin yksisoluproteiinin tuotanto auto-, hetero- ja mikсотrofisissa kasvuolosuhteissa. Kantoina olivat *Paracoccus denitrificans* (*P. denitrificans*) Y5 ja *Paracoccus versutus* (*P. versutus*) D6, jotka kykenevät hiilidioksidin sidonnan lisäksi sitomaan tyypeä SCP-tuotantoa varten. Molemmilla kannoilla optimaalinen kasvulämpötila on 30°C ja optimaalinen pH on 7,0. Taulukosta 3 nähdään, että DCM:n tilavuudellinen tuottavuus molemmilla kannoilla oli paras heterotrofisissa olosuhteissa ja huonoin autotrofisissa olosuhteissa. Autotrofisissa olosuhteissa SCP-saanto oli parhaimmillaan 73,73 %, heterotrofisissa olosuhteissa 72,21 % ja mikсотrofisissa olosuhteissa 69,58 %. Substraattina heterotrofisissa ja mikсотrofisissa olosuhteissa käytettiin BSCM-ravinnetta (engl. soybean rhizosphere soil, pond water and biogas slurry of chicken manure). (Dou et al. 2019) Parhaiden tuottavuuksien kohdalle taulukkoon on laskettu SCP-pitoisuus (g/l).

Taulukko 3. Kantojen *P. denitrificans* (Y5) ja *P. versutus* (D6) kasvatus erilaisissa kasvuolosuhteissa (mukaillen Dou et al. 2019).

| Autotrofinen kasvatus | DCM:n tilavuudellinen tuottavuus [mg/(l/d)] | DCM [g/l] | SCP-saanto [%] | SCP [g/l] |
|-------------------------|---|-----------|----------------|-----------|
| Y5b | 286 | - | 63,65 | - |
| Y5 | 424 | 2,12 | 73,73 | 1,56 |
| D6b | 271 | - | 63,05 | - |
| D6 | 384 | - | 71,22 | - |
| Heterotrofinen kasvatus | | | | |
| Y5 | 1034 | 5,17 | 72,21 | 3,73 |
| D6 | 898 | - | 70,83 | - |
| Mikсотrofinen kasvatus | | | | |
| Y5 | 400 | 3,19 | 69,58 | 2,22 |
| D6 | 413 | 3,3 | 67,34 | 2,22 |

4 POHDINTA

Monet vetyä hapettavien bakteerien tuottamista tuotteista ovat yhteiskunnallisesti erittäin merkittäviä, mutta niistä vain osaa tuotetaan tällä hetkellä mikrobeilla teollisesti. Usein esteenä kaupalliseen tuotantoon on tuotannon korkea hinta. Vetyä hapettavien bakteerien tuottamat arvotuotteet voisivat korvata esimerkiksi osan fossiilisten polttoaineiden käytöstä. Fossiilisten polttoaineiden käyttämisestä aiheutuvat hiilidioksidipäästöt kiihdyttävät ilmastonmuutosta ja merten happamoitumista, joten arvotuotteiden valmistus hiilidioksidista teollisesti voisi vähentää kasvihuonekaasupäästöjä (Yu 2018). Tuotteiden tuottaminen vetyä hapettavilla bakteereilla vaikuttaisi olevan usean tuotteen kohdalla ympäristöystävällisempi tuotantotapa verrattuna tällä hetkellä käytössä oleviin prosesseihin.

PHA:n tuotanto on tällä hetkellä kallista, joka on esteenä sen tuottamiselle suuremmassa mittaluokassa (Grothe et al. 1999 ja Rodríguez-Contreras et al. 2015). Kuitenkin useampi yritys tuottaa PHA:ta kaupalliseen tarkoitukseen (Chen 2010). Tuotannon kokonaiskustannukset riippuvat useista eri tekijöistä, kuten käytetystä substraatista, saannosta ja tuottavuudesta, sekä uutto- ja puhdistusprosesseista (Khanna & Srivastava 2005 ja Naranjo et al. 2013). Heterotrofisessa kasvatuksessa hiilisubstraatin osuus PHA:n tuotannon kuluista on 20-45 % (Nath et al. 2008). Osuus on verrattain suuri, joten voidaan päätellä, että edullisen hiililähteen löytyminen tuotantoteollisuuden sivuvirroista laskisi tuotantokustannuksia merkittävästi.

Käytettäessä PHB:n tuotannossa hiilisubstraattina edullista jäteglyserolia, on PHB-pitoisuudeksi saatu 3,42 g/l ja tuottavuudeksi 0,07 g/l/h (Gahlawat & Soni 2017). Perinteisellä glukoosisubstraatilla PHB-pitoisuudeksi on saatu 121 g/l ja tuottavuudeksi 2,420 g/l/h (Kim et al. 1994). Verrattaessa jäteglyserolin ja glukoosin käyttöä substraatteina, ovat PHB-pitoisuus ja tuottavuus alhaisia jäteglyserolin tapauksessa. Myös autotrofisella kasvatuksella, jossa hiililähteenä käytetään pelkästään hiilidioksidia, on saatu tuotettua korkeita PHA-pitoisuuksia. Kemolitoautotrofisella kasvatuksella PHB:n tuottavuus on ollut 1,548 g/l/h PHB-pitoisuuden ollessa 62 g/l. (Tanaka et al. 1995) PHB:n tuotantonopeus autotrofisella kasvatuksella on siten korkeampi kuin heterotrofisella kasvatuksella käytettäessä substraattina jäteglyserolia. Lisäksi käytettäessä autotrofista kasvatusta tuotantokustannukset voisivat laskea verrattuna heterotrofiseen kasvatukseen.

PHA-biomuoveja voidaan mahdollisesti tulevaisuudessa käyttää lääketieteen sovellutuksiin. Tällaisia käyttökohteita voivat olla esimerkiksi haavansidonta ja kudosten korjaus (Luef et al. 2015). Testeissä on havaittu, että P3HB on biohyteensopiva ja sen myrkyllisyys on alhainen (Valappil et al. 2006), joten siltä osin ongelmaa sen hyödyntämiseen lääketieteen sovelluksissa ei ole. Lisäksi katalyyttisellä hydrolyysillä P3HB:stä voidaan valmistaa 3-hydroksibutaanihappoa (3HB) (Yu et al. 2005), joka on elimistön rasva-aineenvaihdunnan välituote. Täten potentiaalisia sovelluskohteita löytyy mm. syömiskäyttäytymisen ja neurologisten sairauksien hallinnassa (Laeger et al. 2010), sekä entsyymien suoja-aineena korkeissa lämpötiloissa ja hapettavissa olosuhteissa. Suojattavia entsyymejä ovat mm. lipaasi ja lysotsyymi. (Obruca et al. 2016) Lisäksi on tutkittu mahdollisuutta käyttää P3HB:tä eläinrehun komponenttina, jolloin se kasvattaisi rehun energiasisältöä. Lisäämällä kokonaisia bakteerisoluja ja P3HB-granuleita rehuun on mahdollista, että ne muokkaavat eläimen suolen flooraa tuottamalla 3HB:tä. (Boon et al. 2010)

Vetyä hapettavilla bakteereilla on saatu tuotettua useita kemikaaleja, esimerkiksi asetoiniä, isobutanolia, isopropanolia, 2-hydroksibutyyraattihappoa ja metyyliiketoneita (Yu 2018). Näistä asetoini toimii lähtömateriaalina monien muiden kemikaalien tuotannolle, joten se on merkittävä tuote. (Xiao & Lu 2014) Kemikaalien tuotannossa ongelmana voi olla tuotteen myrkyllisyys tuottavalle mikrobille. Tällainen tuote toimii inhibiittorina bakteerille, jonka seurauksena niiden tuottavuus laskee. (Ezeji et al. 2014) Myrkyllisiä yhdisteitä on täten saatu tuotettua vetyä hapettavilla bakteereilla vain pieniä määriä.

Lisääntyneestä proteiinin tarpeesta on tullut yksi maapallon suurimmista ongelmista. Mikrobista biomassaa on harkittu perinteisten ravitsemuksellisten proteiinilähteiden vaihtoehdoksi jo pidemmän aikaa. Yksisoluproteiinien teollisessa tuotannossa on huomattu, että mahdollisten tuotantoon käytettävien raaka-aineiden ja mikro-organismien kirjo on laaja. Lisäksi tuottavuuden on havaittu olevan korkea nopeasti kasvavilla mikro-organismeilla. (Nasseri et al. 2011) Yksisoluproteiinit voivat tulevaisuudessa korvata osan perinteisestä ruoantuotannosta. Yksisoluproteiinien tuotanto on vähemmän riippuvaista maasta kuin maatalous, joten bakteerien käyttäminen ruoantuotannossa vähentäisi maatalouden aiheuttamaa kuormaa maaperälle (Anupama & Ravindra 2000). Täten myös tällä hetkellä rehun viljelyyn käytettävää

maata vapautuisi joko metsitettäväksi - ja siten hiilinieluiksi - tai muun muassa ruokakasvien ja biopolttoaineiden raaka-aineiden viljelyyn.

5 YHTEENVETO

Vetyä hapettavat bakteerit voidaan luokitella muun muassa niiden energiantuotantotavan ja soluseinän rakenteen perusteella. Vetyä hapettavista bakteereista suurin osa on fakultatiivisia kemolitotrofeja, eli ne voivat muuttaa energiantuotantotapaansa riippuen elinympäristön olosuhteista. Lisäksi ne ovat fakultatiivisia aérobeja, eli ne voivat toimia sekä ilman happea, että hapen läsnä ollessa. Useimmat vetyä hapettavat bakteerit kuitenkin suosivat mikroaerobisia olosuhteita, jossa ne kasvavat parhaiten.

Bakteerisolujen metabolia koostuu useista reaktioista, mutta arvotuotteiden tuottamisen kannalta vetyä hapettavien bakteerien aineenvaihdunnan tärkein osa on hiilidioksidin sidonta CBB-kierron avulla. Vetyä hapettavilla bakteereilla on kyky hyödyntää hiilidioksidin sidonnassa vetyä elektronien luovuttajana, ja happea elektronien vastaanottajana. Hiilidioksidista muodostetaan orgaanisia yhdisteitä, jotka toimivat bakteerien energianlähteinä.

Vetyä hapettavat bakteerit tuottavat paljon erilaisia tuotteita joko luonnollisen metaboliensa kautta tai geenimuokkauksen tuloksena. Merkittävimmät vetyä hapettavien bakteerien tuottamat arvotuotteet on tässä työssä jaoteltu neljään pääryhmään: biomuoveihin, poly-3-hydroksibutyraatin johdannaisiin, kemikaaleihin ja yksisoluproteiineihin. Näiden tuotteiden jatkokehitys voi vähentää ympäristöön vapautuvia päästöjä.

Vetyä hapettavat bakteerit tuottavat luonnollisen metaboliensa kautta PHA:ta varastopolymeereiksi. Ne ovat biohajoavia ja bioyhteensopivia kestopolymeereja, ja niillä on samankaltaiset ominaisuudet kuin öljyyn pohjautuvilla muoveilla. PHB on PHA:n eniten tutkittu alaryhmä, josta voidaan muiden muassa jatkojalostaa nestemäisiä polttoaineita. Näillä vetyä hapettavien bakteerien tuottamilla biomuoveilla ja polttoaineilla voitaisiin korvata fossiilisia polttoaineita. Fossiilisten polttoaineiden käyttäminen aiheuttaa hiilidioksidipäästöjä, jotka kiihdyttävät ilmastonmuutosta ja merten happamoitumista. Täten tuotteiden valmistus hiilidioksidista teollisesti voisi vähentää kasvihuonekaasupäästöjä. PHB:stä voidaan jatkojalostaa polttoaineiden lisäksi myös muita kemikaaleja.

Vetyä hapettavat bakteerit saadaan myös suoraan tuottamaan joitakin kemikaaleja geenimuokkauksen avulla. Soluille myrkyllisten kemikaalien tuotanto ei kuitenkaan onnistu, koska myrkyllisillä yhdisteillä on mikrobeihin inhiboiva vaikutus. Tämän seurauksena mikrobin tuottavuus laskee merkittävästi.

PHA-muovien ja niiden johdannaisten sovelluskohteita lääketieteen saralla voivat tulevaisuudessa olla haavansidonta ja kudosten korjaus. P3HB:stä johdetulla 3HB:llä on mahdollisia sovelluskohteita syömiskäyttäytymisen ja neurologisten sairauksien hallinnassa ja entsyymien suojelemisessa korkeilta lämpötiloilta ja hapettumiselta. Lisäksi P3HB-granuleita voi olla mahdollista käyttää eläinrehun komponenttina energiasisällön kasvattamiseen, jolloin ne yhdessä kokonaisten bakteerisolujen kanssa voisivat muokata eläimen suolen flooraa tuottamalla 3HB:tä.

PHA:n tuotanto bakteereilla on tällä hetkellä suhteellisen kallista. Tuotteiden korkea hinta voi johtua esimerkiksi käytetyn substraatin korkeasta hinnasta, alhaisesta saannosta ja tuottavuudesta sekä pienistä markkinoista. On todettu, että hiilisubstraatin osuus PHA:n tuotannon kuluista on 20-45 %, joten edullisen hiilisubstraatin löytyminen laskisi tuotteen hintaa merkittävästi.

Yksisoluproteiinia eli mikro-organismien kuivattuja soluja voidaan tuottaa erilaisissa kasvuolosuhteissa. Vetyä hapettavien bakteerien proteiinipitoisuus on korkea verrattuna sieniin, leviin ja hiivoihin, jonka vuoksi niitä voidaan käyttää ravinnon proteiini-lähteenä. Käyttämällä bakteerien tuottamaa proteiinia ravintona voitaisiin vähentää maatalouden aiheuttamaa kuormitusta maaperälle ja vapautuvien päästöjen määrää.

LÄHDELUETTELO

Anderson, A.J. & Dawes, E.A., 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, 54, S. 450-472.

Anupama, & Ravindra, P., 2000. Value-added food: single cell protein. *Biotechnology Advances*, 18(6), S. 459–479.

Aragno, M. & Schlegel, H., 1981. The hydrogen-oxidizing bacteria. *The Prokaryotes*, S. 865-893.

Ariffin, H., Nishida, H., Shirai, Y. & Hassan, M.A., 2010. Highly selective transformation of poly[R-3-hydroxybutyric acid] into trans-crotonic acid by catalytic thermal degradation. *Polymer Degradation and Stability*, 95, S. 1375–1381.

Atkins, P. & de Paula, J., 2006. *Atkins' physical chemistry*. 8. painos. Oxford University Press, (1064)s. ISBN: 0-19-8700725.

Badger, M. R. & Bek, E. J., 2008. Multiple Rubisco forms in proteobacteria: their functional significance in relation to CO₂ acquisition by the CBB cycle. *Journal of Experimental Botany*, 59(7), S. 1525-1541.

Bernhard, M., Benelli, B., Hochkoepler, A., Zannoni, D. & Friedrich, B., 1997. Functional and structural role of the cytochrome b subunit of the membrane-bound hydrogenase complex of *Alcaligenes eutrophus* H16. *European Journal of Biochemistry*, 248(1), S. 179-186.

Burgdorf, T., Lenz, O., Buhrke, T., van der Linden, E., Jones, A. K., Albracht, S. P. J. & Friedrich, B., 2005. [NiFe]-hydrogenases of *Ralstonia eutropha* H16: modular enzymes for oxygen-tolerant biological hydrogen oxidation. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 10(2-4), S. 181-196.

Chen, G.-Q., 2010. *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*. ISBN: 978-3-642-03286-8.

Crépin, L., Lombard, E. & Guillouet, S.E., 2016. Metabolic engineering of *Cupriavidus necator* for heterotrophic and autotrophic alka(e)ne production. *Metabolic Engineering*, 37, S. 92–100.

Darani, K. K.; Vasheghani-Farahani, E. & Tanaka, K., 2006. Hydrogen oxidizing bacteria as poly (hydroxybutyrate) producers. *Journal of Biotechnology*, 4, S. 193–196.

Dou, J., Huang, Y., Ren, H., Li, Z., Cao, Q., Liu, X. & Li, D., 2019. Autotrophic, Heterotrophic, and Mixotrophic Nitrogen Assimilation for Single Cell Protein Production by Two Hydrogen-Oxidizing Bacterial Strains. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 187, S. 338–351.

DSMZ, 2020. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH. [verkkodokumentti]. Saatavissa: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-13513> [viitattu 17.1.2020].

Ezeji, T.C. Qureshi, N. & Ujor, V., 2014. *Bioenergy Research: Advances and Applications*, Chapter 7 - Isobutanol Production from Bioenergy Crops. Waltham (Massachusetts): Elsevier. S. 109-118.

Gahlawat, G. & Soni, S. K., 2017. Valorization of waste glycerol for the production of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer by *Cupriavidus necator* and extraction in a sustainable manner. *Bioresource Technology*, 243, S. 492-501.

García, I.L., López, J.A., Dorado, M.P., Kopsahelis, N., Alexandri, M., Papanikolaou, S., Villar, M.A. & Koutinas, A.A., 2013. Evaluation of by-products from the biodiesel industry as fermentation feedstock for poly (3-hydroxybutyrate-co-3- hydroxyvalerate) production by *Cupriavidus necator*. *Bioresource Technology*, 130, S. 16–22.

Garcia-Gonzalez, L., Mozumder, S. I., Dubreuil, M., Volcke, E.I.P. & De Wever, H., 2015. Sustainable autotrophic production of polyhydroxybutyrate (PHB) from CO₂ using a two-stage cultivation system. *Catalysis Today*, 257(2), S. 237-245.

Grothe, E., Moo-Young, M. & Chisti, Y., 1999. Fermentation optimization for the production of poly(b-hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. *Enzyme and Microbial Technology*, 25, S. 132–141.

Grousseau, E., Lu, J., Gorret, N., Guillouet, S.E. & Sinskey, A.J., 2014. Isopropanol production with engineered *Cupriavidus necator* as bioproduction platform. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, S. 4277–4290.

Haddock, B. & Jones, C., 1977. Bacterial respiration. *Bacteriological Reviews*, 41(1), S. 47-99.

Heino, J. & Vuento, M., 2014. Biokemian ja solubiologian perusteet. 3. painos. Helsinki: Sanoma Pro Oy, (365)s. ISBN: 978-952-63-2332-9.

Heinrich, D., Raberg, M. & Steinbüchel, A., 2018. Studies on the aerobic utilization of synthesis gas (syngas) by wild type and recombinant strains of *Ralstonia eutropha* H16. *Microbial Biotechnology*, 11(4), S. 647-656.

Holmes, P.A., 1985. Applications of PHB – a microbially produced biodegradable thermoplastic. *Physics in Technology*, 16, S. 32–36.

Ishizaki, A., Tanaka, K. & Taga, N., 2001. Microbial production of poly-D-3-hydroxybutyrate from CO₂. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, S. 6–12.

Jalasutram, V., Kataram, S., Gandu, B., & Anupoju, G., 2013. Single cell protein production from digested and undigested poultry litter by *Candida utilis*: optimization of process parameters using response surface methodology. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 15(2), 265–273.

Jokipii, P., Saarinen, T. & Sivelä, C. & V. M.-L., 1990. Laborantin mikrobiologia. 1.-2. painos. Helsinki: Valtion painatuskeskus, (193)s. ISBN: 951-860-206-9.

Jyväskylän yliopisto, Itä-Suomen yliopisto, Oulun yliopisto, Tampereen yliopisto, Turun yliopisto & Åbo Akademi., 2006. Solunetti, Gram-värjäys [verkkodokumentti]. Saatavissa: <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/gram-varjays/2/> [viitattu 28.1.2020]

Kang, S. & Yu, J., 2015a. Reaction routes in catalytic reforming of poly(3-hydroxybutyrate) into renewable hydrogen carbon oil. *RSC Advances*, 5, S. 30005–30013

Kang, S. & Yu, J., 2015b. A gasoline-grade biofuel formed from renewable polyhydroxybutyrate on solid phosphoric acid. *Fuel*, 160, S. 282–290

Khanna, S. & Srivastava, A. K., 2005. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, 40 (2), S. 607–619.

Kim, B.S., Lee, S.C., Lee, S.Y., Chang, H.N., Chang, Y.K. & Woo, S.I., 1994. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. *Biotechnology and Bioengineering*, 43(9), S. 892-898.

Korhola, M., Schauman, K., Kivisalmi, V., Rasimus, S., Salmela, H. & Björklöf, K., 2008. *Mikrobiologian sanasto. 1. painos*. Tampere: Mikrobiologikilta ry, (124)s. ISBN: 978-951-98554-2-4.

Laylock, B., Halley, P., Pratt, S., Werker, A. & Lant, P., 2014. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Progress in Polymer Science*, 39, S. 397–442.

Li, H., Opgenorth, P.H., Wernick, D.G., Rogers, S., Wu, T.-Y., Higashide, W., Malati, P., Huo, J.C., Cho, K.M. & Liao, J.C., 2012. Integrated electromicrobial conversion of CO₂ to higher alcohols. *Science*, 335, S. 1596.

Lu, J., Brigham, C.J., Gai, C.S., Sinskey, A.J., 2012. Studies on the production of branched-chain alcohols in engineered *Ralstonia eutropha*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96, S. 283–297.

Lu, Y. & Yu, J., 2017. Comparison analysis on the energy efficiencies and biomass yields in microbial CO₂ fixation. *Process Biochemistry* 62, S. 151–160.

Luef, K.P., Stelzer, F. & Wiesbrock, F., 2015. Poly(hydroxy alkanoate)s in medical applications. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 29(2), S. 287-297.

- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M. & Stahl, D. A., 2019. Brock biology of microorganisms. 15. painos. NY(NY): Pearson, (1058)s. ISBN: 978-1-292-23510-3.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H. & Stahl, D. A., 2015. Brock biology of microorganisms. 14. painos. Boston: Pearson, (1030)s. ISBN: 978-1-292-01831-7.
- Miller, B., M. & Litsky, W., 1976. Single Cell Protein in Industrial Microbiology. McGraw-Hill Book Co., New York.
- Mozumder, S.I., De Wever, H., Volcke, E. & Garcia-Gonzalez, L., 2014a. A robust fed-batch feeding strategy independent of the carbon source for optimal polyhydroxybutyrate production. *Process Biochemistry*, 49(3), S. 365-373.
- Mozumder, S.I., Goormachtigh, L., Garcia-Gonzalez, L., De Wever, H. & Volcke, E., 2014b. Modeling pure culture heterotrophic production of polyhydroxybutyrate (PHB). *Bioresource Technology*, 155, S. 272-280.
- Naranjo, J. M., Posada, J. A., Higueta, J. C. & Cardona, C. A., 2013. Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*. *Bioresource Technology*, 133, S. 38–44.
- Nasseri, A.T., Rasoul-Amini, S., Morowvat M.H. & Ghasemi, Y., 2011. Single Cell Protein: Production and Process. *American Journal of Food Technology*, 6, S. 103-116.
- Nath, A., Dixit, M., Bandiya, A., Chavda, S. & Desai, A.J., 2008. Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24. *Bioresource Technology*, 99, S. 5749–5755.
- Philip, S., Keshavarz, T., Roy, I., 2007. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 82, S. 233–247.
- Peralta-Yahya, P., Zhang, F., delCardayre, S. & Keasling, J., 2012. Microbial engineering for the production of advanced biofuels. *Nature*, 488(7411), S. 320-328.

Pohlmann, A., Fricke, W. F., Reinecke, F., Kusian, B., Liesegang, H., Cramm, R., Eitinger, T., Ewering, C., Pötter, M., Schwartz, E., Strittmatter, A., Voß, I., Gottschalk, G., Steinbüchel, A., Friedrich, B. & Bowien, B., 2006. Genome sequence of the bioplastic-producing "Knallgas" bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nature Biotechnology*, 24(10), S. 1257–1262.

Rodríguez-Contreras, A., Koller, M., Miranda-de.Sousa Dias, M., Calafell-Monfort, M., Braunegg, G. & Marqués-Calvo, M.S., 2015. Influence of glycerol on poly (3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* and *Burkholderia sacchari*. *Biochem. Eng. J.* 94, 50–57.

Sonnleitner, B., Heinzle, E., Braunegg, G. & Lafferty, R.M., 1979. Formal kinetics of poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) production in *Alcaligenes eutrophus* H 16 and *Mycoplana rubra* R 14 with respect to the dissolved oxygen tension in ammonium-limited batch cultures. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, 7:1–10.

Sugimoto, T., Tsuge, T., Tanaka, K. & Ishizaki, A., 1999. Control of acetic acid concentration by pH-stat continuous substrate feeding in heterotrophic culture phase of two-stage cultivation of *Alcaligenes eutrophus* for production of P(3HB) from CO₂, H₂, and O₂ under non-explosive conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 62(6), S. 625-631.

Taga, N., Tanaka, K. & Ishizaki A., 1997. Effects of rheological change by addition of carboxymethylcellulose in culture media of an air-lift fermentor on poly-D-3-hydroxybutyric acid productivity in autotrophic culture of hydrogen-oxidizing bacterium, *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 53(5), S. 529-33.

Tanaka, K. & Ishizaki, A., 1994. Production of poly-d-3-hydroxybutyric acid from carbon dioxide by a two-stage culture method employing *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697T. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 77(4), S. 425-427.

Tanaka, K., Ishizaki, A., Kanamaru, T. & Kawano, T., 1995. Production of poly(D-3-hydroxybutyrate) from CO₂, H₂, and O₂ by high cell density autotrophic cultivation of *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 45(3), S. 268-275.

Tanaka, K., Miyawaki, K., Yamaguchi, A., Khosravi-Darani, K. & Matsusaki, H., 2011. Cell growth and P(3HB) accumulation from CO₂ of a carbon monoxide-tolerant hydrogen-oxidizing bacterium, *Ideonella* sp. O-1. *Applied Microbiology and Biotechnology* 92(6), S. 1161–1169.

Torella, J.P., Gagliardi, C.J., Chen, J.S., Bediako, D.K., Colón, B., Way, J.C., Silver, P.A. & Nocera, D.G. 2015. Efficient solar-to-fuels production from a hybrid microbial - water-splitting catalyst system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(8), S. 2337–2342.

Työterveyslaitos, 2017. Onnettomuuden vaaraa aiheuttavat aineet -turvallisuusohjeet. [verkkodokumentti]. Saatavissa: <https://www.ttl.fi/ova/isobutanoli.html> [viitattu 17.1.2020].

Volodina, E., Raberg, M. & Steinbüchel, A., 2016. Engineering the heterotrophic carbon sources utilization range of *Ralstonia eutropha* H16 for applications in biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36, S. 978–991.

Volova, T.G. & Barashkov, V.A., 2010. Characteristics of Proteins Synthesized by Hydrogen-Oxidizing Microorganisms. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiya*, 46(6), S.624-9.

Volova, T.G., Kalacheva, G.S., Gorbunova, O.V. & Zhila, N.O., 2004. Dynamics of Activity of the Key Enzymes of Polyhydroxyalkanoate Metabolism in *Ralstonia eutropha* B5786. *Applied Biochemistry and Microbiology* 40, S.170-177.

Volova, T.G. & Voinov, N.A., 2003. Kinetic Parameters of a Culture of the Hydrogen-Oxidizing Bacterium *Ralstonia eutropha* Grown under Conditions Favoring Polyhydroxybutyrate Biosynthesis. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 39, S. 166–170.

Windhorst, C. & Gescher, J., 2019. Efficient biochemical production of acetoin from carbon dioxide using *Cupriavidus necator* H16. *Biotechnology for Biofuels*, 12.

Xiao, Z. & Lu, J. R., 2014. Strategies for enhancing fermentative production of acetoin: a review. *Biotechnology Advances*, 32(2), S. 492-503.

Yu, J., 2014. Bio-based products from solar energy and carbon dioxide. *Trends in Biotechnology* 32(1), S. 5–10.

Yu, J., 2018. Fixation of carbon dioxide by a hydrogen-oxidizing bacterium for value-added products. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34:89.

Yu, J., Dow, A. & Pingali, S., 2013. The energy efficiency of carbon dioxide fixation by a hydrogen-oxidizing bacterium. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(21), S. 8683-8690.

Yu, J., Plackett, D. & Chen, L.X.L., 2005. Kinetics and mechanism of the monomeric products from abiotic hydrolysis of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] under acidic and alkaline conditions. *Polymer Degradation and Stability*, 89(2), S. 289–299.

Zhang, Z., Zhang, R., Yang, J., Xu, M. & Li, H., 2013. Mutation breeding of acetoin high producing *Bacillus subtilis* blocked in 2,3-butanediol dehydrogenase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29, S. 1783-1789.

Liite 1. Taulukko vetyä hapettavien bakteerien PHB:n tuotannosta kemolitoautotrofisella kasvatusmenetelmällä (mukailten Garcia-Gonzalez et al. 2014).

| Orgaaninen substraatti | H ₂ :O ₂ :CO ₂ (vol %) | Kanta | DCM [g/l] | PHB [g/l] | Rajoitus | Lähde |
|------------------------|---|--------------------------|-----------|-----------|----------------|-------------------------|
| - | 70:10:10 | Ideonella sp. strain O-1 | 7 | 5 | N | Tanaka et al. 2011 |
| - | 60:20:10 | C. necator B-5786 | 12 | 8 | N | Volova et al. 2004 |
| - | 70:20:10 | C. necator ACM 1296 | 16 | 6 | O ₂ | Darani et al. 2006 |
| - | 60:20:10 | C. necator ATCC 17699 | 18 | 14 | N | Sonnleitner et al. 1979 |
| - | ei annettu | C. necator ATCC 17697 | 27 | 16 | N | Tanaka & Ishizaki 1994 |
| - | 60:20:10 | C. necator B-5786 | 30 | 22 | N | Volova & Voinov 2003 |
| - | 75:15:10 | C. necator ATCC 17697 | 60 | 36 | O ₂ | Tanaka & Ishizaki 1994 |
| - | 85:05:10 | C. necator ATCC 17697 | 59 | 46 | O ₂ | Taga et al. 1997 |
| - | 85:05:10 | C. necator ATCC 17697 | 60 | 49 | O ₂ | Taga et al. 1997 |
| - | 85:05:10 | C. necator ATCC 17697 | 69 | 56 | O ₂ | Taga et al. 1997 |
| - | 85.2:6.3:8.3 | C. necator ATCC 17697 | 91 | 62 | O ₂ | Tanaka et al. 1995 |
| Jätglyseroli | ei annettu | C. necator DSM 545 | 105 | 66 | N | Mozumder et al. 2014a |
| Glukoosi | ei annettu | C. necator NCIMB 11599 | 164 | 121 | N | Kim et al. 1994 |

Liite 2. Taulukko vetyä hapettavien bakteerien PHB:n tuotannosta hetero- ja kemolitoautotrofisen kasvatusmenetelmän yhdistelmällä (mukaillen Garcia-Gonzalez et al. 2014).

| Orgaaninen substraatti | H ₂ :O ₂ :CO ₂ (vol %) | Kanta | DCM [g/l] | PHB [g/l] | Rajoitus | Lähde |
|------------------------|---|------------------------|-----------|-----------|--------------------|------------------------------|
| Jätglyseroli | 84.0:2.8:13.2 | C. necator DSM 545 | 31 | 0,9 | N + O ₂ | Garcia-Gonzalez et al. 2014 |
| Glukoosi | 84.0:2.8:13.2 | C. necator DSM 545 | 29 | 0,1 | N + O ₂ | Garcia-Gonzalez et al. 2014 |
| Glukoosi | 84.0:2.8:13.2 | C. necator DSM 545 | 27 | 11 | N + O ₂ | Garcia-Gonzalez et al. 2014 |
| Etikkahappo | 86.5:6.5:10 | C. necator ATCC 17697 | 23 | 13 | O ₂ | Sugimoto et al. 1999 |
| Jätglyseroli | 84.0:2.8:13.2 | C. necator DSM 545 | 18 | 13 | N + O ₂ | Garcia-Gonzalez et al. 2014 |
| Fruktoosi | 83.0:5.3:10.6 | C. necator ATCC 17697 | 27 | 15 | O ₂ | Tanaka & Ishizaki 1994 |
| Glukoosi | 84.0:2.8:13.2 | C. necator DSM 545 | 21 | 16 | N + O ₂ | Garcia-Gonzalez et al., 2014 |
| Fruktoosi | 86.5:4.9:9.8 | C. necator ATCC 17697 | 26 | 22 | O ₂ | Tanaka & Ishizaki 1994 |
| Fruktoosi | 84.1:6.7:10.3 | C. necator ATCC 17697 | 43 | 24 | O ₂ | Tanaka & Ishizaki 1994 |
| Jätglyseroli | 84.0:2.8:13.2 | C. necator DSM 545 | 46 | 28 | N + O ₂ | Garcia-Gonzalez et al. 2014) |
| Jätglyseroli | - | C. necator DSM 545 | 105 | 66 | N | Mozumder et al. 2014a |
| Glukoosi | - | C. necator NCIMB 11599 | 164 | 121 | N | Kim et al. 1994 |