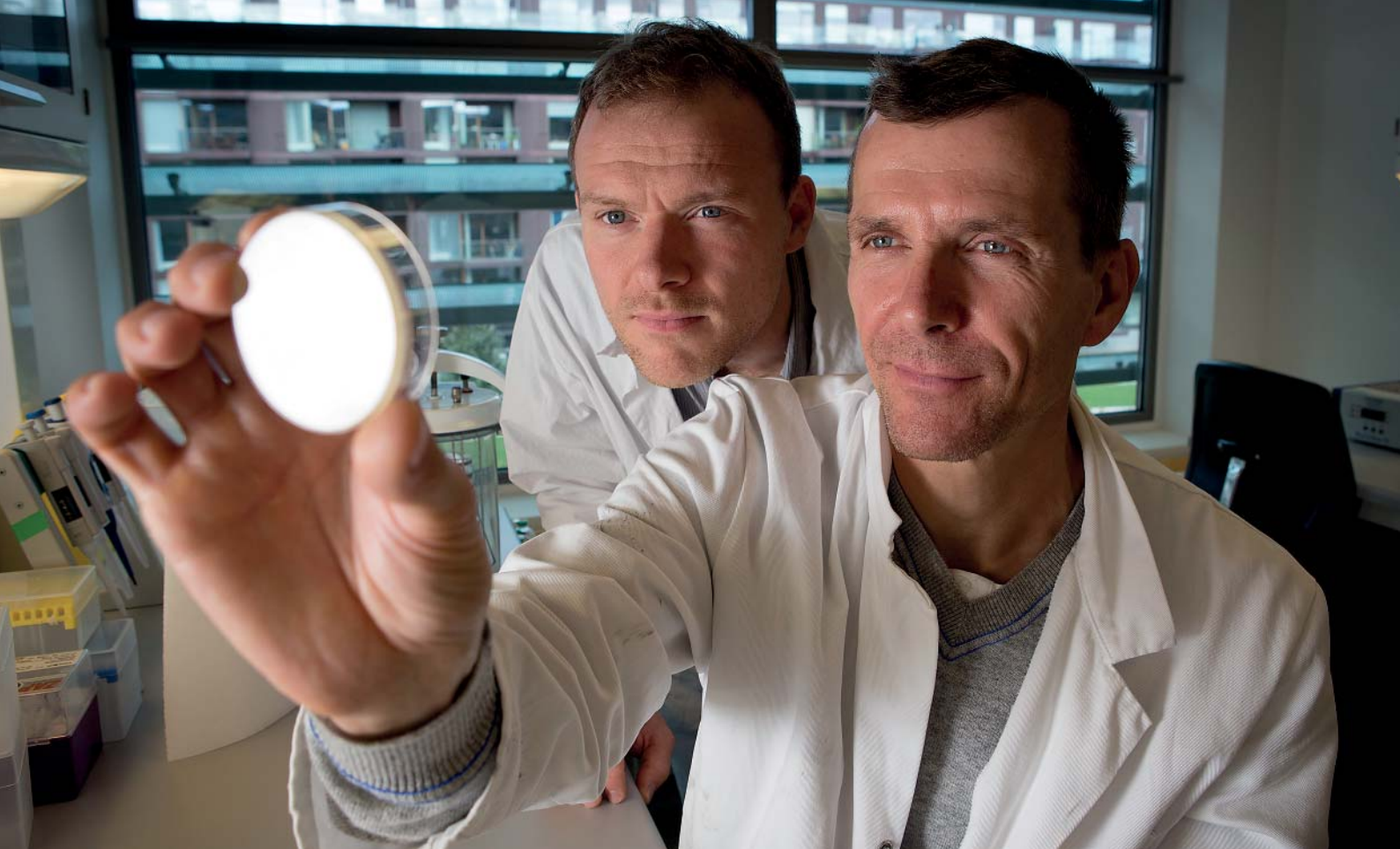




# Bakterier kan frigøre os fra olie

En gammelkendt industriel fermenteringsproces kaldet ABE-processen til bæredygtig produktion af kemikalier og brændstof er blevet aktuel igen. Det skyldes mulighederne for at "forbedre" de *Clostridium*-bakterier, processen bygger på.

Bakterier af slægten *Clostridium* forbinder vi ofte med sygdom, død og ødelæggelser. Toksiner (gift) fra disse bakterier kan påvirke kroppens nerve-signaler og forårsage koldbrand, stivkrampe, pøseforgiftning (botulisme) og akut diarre. Et af de mest potente giftstoffer, vi kender til, er således Botulinumtoksin eller BTX, som stammer fra bakterien *Clostridium botulinum*. Stoffet hindrer frigivelse af signalstoffet acetylcholin og blokerer dermed signaloverførsel mellem nervecelle og muskelcelle, hvilket hurtigt medfører kvælningsdøden. Der skal blot 50 gram af det naturlige giftstof til at slå hele menneskeheden ihjel! At der sjældent er noget, der er så skidt, at det ikke er godt for noget, illustreres af, at man i dag anvender giftstoffet i meget små doser som lægemiddel mod muskelspasmer, og det bruges også til kosmetiske behandlinger kendt under navnet Botox.

I virkeligheden er langt hovedparten af de over 100 kendte arter af *Clostridium* fredsommelige, og de byder på et væld af muligheder for os mennesker. Der findes endda arter, som kan være med til at gøre fremtidens samfund både bæredygtigt og mindre afhængig af fossil olie. I denne artikel skal vi se nærmere på en af disse arter, *Clostridium acetobutylicum*, og dens kæmpe potentiale indenfor det ypperste af moderne fermenteringsbioteknologi med industrielle ambitioner.

## Pionérbakterie i industriel bioteknologi

*Clostridium*-bakterier er stavformede organismer med en længde på ca. 5 µm. Cellerne udnytter mange forskellige substrater (kulstofkilder) til vækst, og de er alle anaerobe – dvs. de kræver iltfrie vækstbetingelser. I industriel bioteknologi er det en

### Om forfatterne

Torbjørn Ølshøj Jensen  
postdoc,  
Novo Nordisk Foundation  
Center for Biosustainability,  
Danmarks Tekniske  
Universitet (DTU)  
tolje@biosustain.dtu.dk

Ivan Baumann,  
ph.d.-studerende,  
Sektion for Bæredygtig  
Bioteknologi, Institut for  
Kemi og Biovidenskab,  
Aalborg Universitet, Kbh.  
ivan.baumann@gmail.com

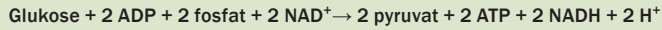
## Ilt eller ikke ilt?

Sammenlignet med aerobe bakterier har anaerobe bakterier flere fordele i industriel øjemed. Det skyldes bl.a. den måde, som cellen producerer energi. Energiproduktion målt i ATP fra omsætning af glukose under både aerobe og anaerobe forhold er listet i nedenstående formler.

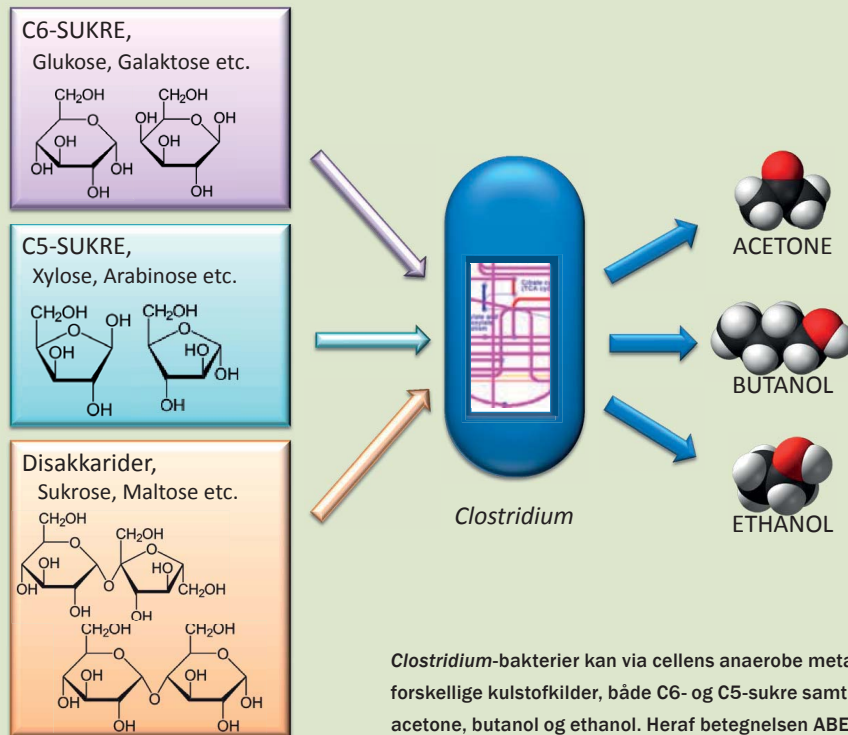
Aerob omsætning af glukose:



Anaerob omsætning af glukose:



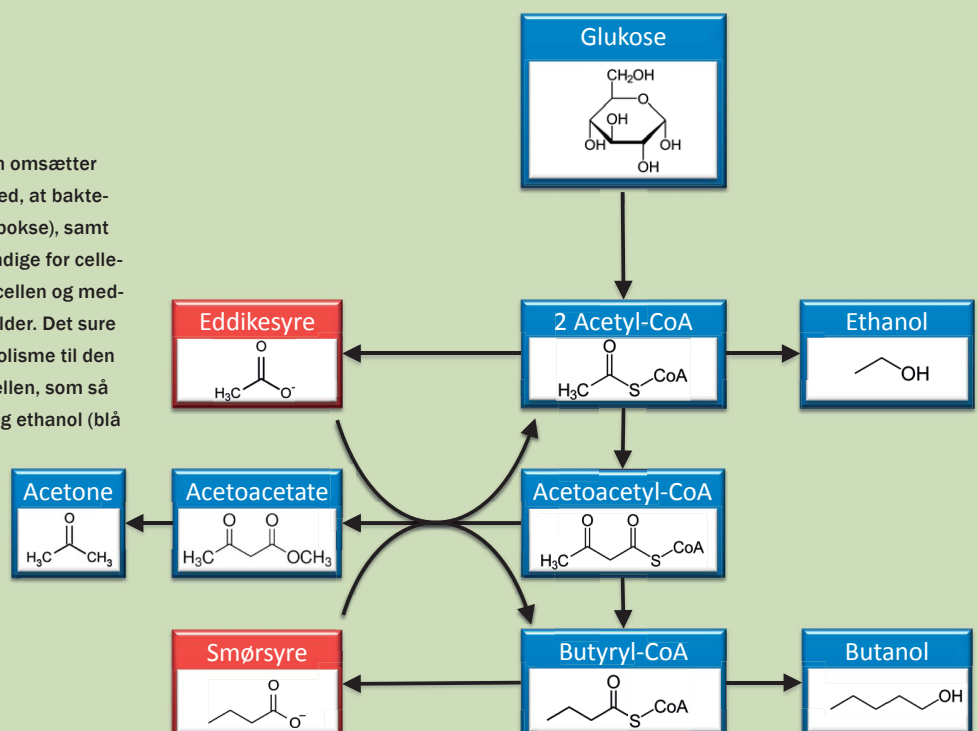
Ved anaerob omsætning bliver pyruvat omsat til produkter som organiske syrer, opløsningsmidler og gasser. Imidlertid er effektiviteten af aerobe organismer mere end 15 gange så stor som de anaerobe målt i ATP, hvilket medfører, at anaerobe bakterier omsætter mere glukose og dermed producerer langt flere produkter for at danne en tilsvarende mængde energi. Desuden udnytter anaerobe bakterier glukose mere effektivt mht. kulstof (de danner mindre  $\text{CO}_2$ ), og netop disse forhold udnyttes kommercielt.



*Clostridium*-bakterier kan via cellens anaerobe metabolisme omsætte en bred vifte af forskellige kulstofkilder, både C6- og C5-sukre samt nogle disaccharider, og producere acetone, butanol og ethanol. Heraf betegnelsen ABE-fermentering.

## Bi-faset fermentering

*C. acetobutylicum* vokser i to faser, når den omsætter sukker. Den første fase er karakteriseret ved, at bakterien danner eddikesyre og smørsyre (røde bokse), samt ATP-molekyler, der er energirige og nødvendige for cellevækst og celledeling. Syrerne udskilles af cellen og medfører, at dens omgivelser forsures og pH falder. Det sure miljø stresser cellen, så den skifter metabolisme til den anden fase, hvori syrerne genoptages af cellen, som så producerer alkoholerne acetone, butanol og ethanol (blå bokse). I denne fase er cellens energitudbytte lille, og cellen kan ikke opretholde denne fase i længere tid, da alkoholerne opløser både celledækkende membran og membranbundne proteiner, så cellen i sidste ende dør.



fordel at bruge anaerobe bakterier, fordi der generelt dannes flere produkter ved anaerob vækst, og fordi iltning af bioreaktorer koster meget energi. (se boks)

*C. acetobutylicum* er modelorganisme til produktion af biokemikalier og biobrændstoffer. Det betyder, at bakterien benyttes i mange laboratorier overalt i verden, og at dens genetik og metabolisme (stofomsætning) er nogenlunde velforstået. Allerede før 1. verdenskrig blev bakterien isoleret med henblik på dens evne til at producere biokemikalier. Den blev optimeret til at omsætte stivelse og producere butanol, som blev anvendt til produktion af gummi, der skulle bruges til fremstilling af bildæk. Foruden butanol producerer den også acetone og ethanol, hvorfor fermenteringsprocessen med bakterien blev kendt som ABE-fermentering. Senere er processen også kendt som Weizmann-processen efter kemikeren Chaim Weizmann, som først isolerede stammen.

Fermenteringen er meget karakteristisk for arten, og den er opdelt i to faser. Først omsættes glukose via pyruvat til eddikesyre og smørsyre, hvorved pH falder, og når den kommer under pH 6, skifter metabolismen. Dernæst optages syrerne, og cellen producerer nu acetone, butanol og ethanol. I løbet af den anden fase dannes også sporer, som udgør et hvilestadium for bakterierne, hvor metabolismen stopper. Et sådant "produktionsstop" er selvfølgelig uønsket i en industriel sammenhæng. For at omgå dette anvendte man i de tidlige forsøg med ABE-fermentering en strategi, hvor mange mindre reaktorer i forskellige stadier var placeret sammen, hvorved man opnåede en næsten kontinuerlig produktion af alkoholer uden fermenteringsstop. Produkterne blev traditionelt adskilt fra fermenteringsvæsken ved destillation, da kogepunkterne for produkterne (med undtagelse af butanol) er lavere end vands kogepunkt. Industriel udnyttelse af ABE-processen voksede frem til 1950'erne, men lave oliepriser på verdensmarkedet bevirkede, at produktionen efterhånden blev udkonkurreret af en produktionsform, som var baseret på olie, og de sidste industrielle fermenteringsanlæg lukkede i 1980'erne.

### Bæredygtig ABE

Nu er ABE-processen kommet til ære og værdighed igen med *C. acetobutylicum* i centrum. Det skyldes processens potentiale for at kunne fremstille bæredygtige brændstoffer og kemikalier til erstatning for tilsvarende produkter fremstillet ud fra olie. Produkterne acetone og butanol har et stort eksisterende marked som kemikalier, både som opløsningsmidler og som byggestensmolekyler til eksempelvis produktion af plastik. Ydermere er butanol et godt alternativ til den benzin, vi tanker bilen op med. Da egenskaberne minder om benzins, vil butanol kunne erstatte benzin med kun få modifik-

tioner af vores biler og på landets tankstationer. Oprindeligt var ABE-processen baseret på stivelse, men for at opfylde det 21. århundredes krav til bæredygtighed skal processen ikke blot være økonomisk- og ressourcemæssig effektiv, den skal samtidig udnytte rest- og affaldsprodukter, som er uegnet til menneskeføde. Det kan være biomasse fra land- og skovbrug som lignin- og celluloseholdige produkter fra eksempelvis halm og træ, der i dag hovedsageligt brændes af til varmeproduktion. Bakteriell omsætning af lignocellulose er en naturlig proces, men for at der sker en effektiv omsætning og produktion af kemikalier eller brændstoffer kræver det bl.a., at bakterierne er "forbedrede" ved genetisk modifikation. En anden udfordring er, at vores laboratorieforsøg viser, at bakterierne hæmmes af stoffer, som dannes, når vi nedbryder cellulosen til sukre. Vi har løst dette ved langvarig tilvæning.

### "Opgradering" af *C. acetobutylicum*

Vores viden om bakterier og værktøjer til at manipulere dem er blevet væsentligt forbedret siden 1980'erne, og DNA-sekventering har bidraget betydeligt og fremmet udviklingen. Genomet fra *C. acetobutylicum* blev sekventeret i 2001 og har gjort det muligt at finde gener, der er oplagte mål for genetisk manipulation, hvis man ønsker at fremme eller hæmme specifikke egenskaber. Men der er en række forhold, som generelt gør det svært at genmanipulere *Clostridium*-bakterier. Fx er bakteriens tykke cellevæg en barriere for at indføre fremmed DNA i bakterien. Desuden har bakterien et enzymeredskab, der beskytter cellen mod indtrængende DNA ved at genkende specifikke DNA-sekvenser og "klippe" det fremmede DNA i stykker. Det er lykkedes os at overkomme nogle af disse udfordringer i beslægtede stammer ved at kortlægge beredskabets "klippemønstre" og derefter modificere DNA'et, så det beskyttes, inden det transformeres. På denne måde er der efterhånden etableret en solid værktøjskasse til at arbejde med *C. acetobutylicum*s gener.

### *C. acetobutylicum* version 2.0

For at øge bakteriens omsætning af forskellige sukre direkte til det ønskede produkt som eksempelvis butanol, er gener, som koder for de vigtige enzymer i syntesevejen til butanol, blevet opreguleret. Samtidig er enzymer i konkurrerende synteseveje til biprodukterne eddikesyre og smørsyre blevet nedreguleret. Desuden er genet *Spo0A*, som koder for enzymer til sporedannelse, blevet inaktiveret. Derved har vi opnået en mutant, som ikke danner sporer, og som giver konstant produktion af butanol i højere koncentrationer end vild-typen. Senest har engelske forskere indsat flere gener fra den varmeelskende slægtning *Clostridium thermocellum* i *C. acetobutylicum*. Disse gener koder for et enzym-kompleks, som kaldes et cellulosem og som har flere virkningsmekanismer. Inden-



## Chaim Weizmann: fra bioteknolog til statsmand



Chaim Weizmann

Udbruddet af 1. Verdenskrig i 1914 øgede straks efterspørgslen på kordit, som man benyttede til fremføring af ammunition. Fremstilling af kordit kræver bl.a. acetone, som dengang blev produceret vha. mikrobiel fermentering. Den store efterspørgsel på kordit betød derfor, at produktionen af acetone måtte effektiviseres – den skulle sættes i system af videnskabsfolk med stor indsigt i bioteknologisk produktion.

Kemikeren Chaim Weizmann (1874-1952) havde i 1912 indsendt en patentansøgning på en forbedret metode til fremstilling af butanol og acetone vha. bakteriel fermentering. Metoden var baseret på den anaerobe bakterie *Clostridium acetobutylicum* med kartoffelstivelse som substrat. Winston Churchill (1874-1965), som på det tidspunkt var britisk flådeminister, anmodede derfor Weizmann om at opskalere sin fermenteringsproces for at undersøge, om den kunne imødekomme kravet om industriel storskalaproduktion af acetone til krigsindustrien.

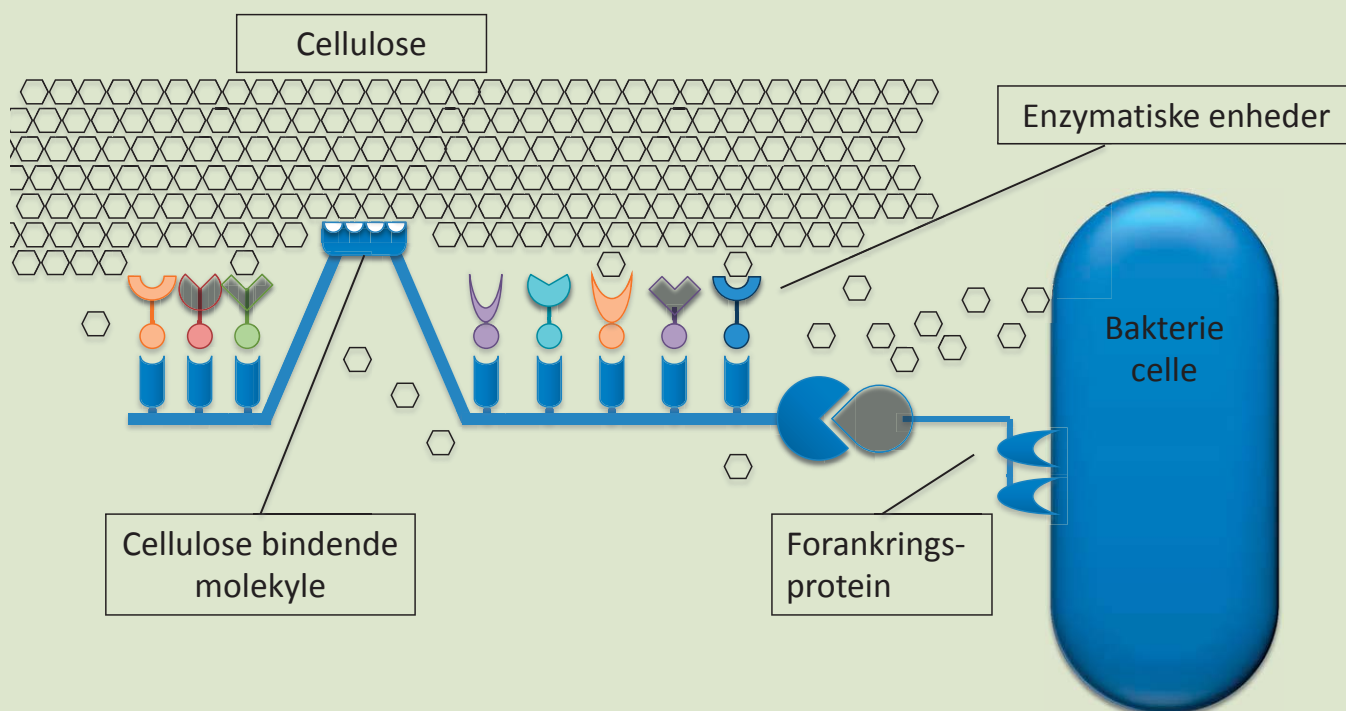
Weizmann accepterede, hvorefter han forlod universitetet i Manchester for at danne et team af unge videnskabsfolk. Et pilotforsøg på et destilleri i London gav tilstrækkeligt lovende

resultater til, at Churchill besluttede at opføre et fermenteringsanlæg til industriel produktion af acetone vha. Weizmann-processen. Metoden blev yderligere effektiviseret ved at benytte majsstivelse som substrat til fermenteringen. Senere i krigen blev majs og andre stivelsesprodukter en mangelvare, hvorfor Weizmann forsøgte sig med kastanjer, som blev indsamlet af skolebørn over hele Storbritannien. Det viste sig imidlertid, at kastanjer hæmmede fermenteringsprocessen, og en egentlig produktion i stor skala blev flyttet til Canada, hvor der var stivelse at få.

Da amerikanerne trådte ind i 1. Verdenskrig i 1917 iværksatte de også fremstilling af acetone vha. Weizmann-processen, og faciliteterne blev placeret i det amerikanske Midtvesten, hvor der også dengang var stor majsproduktion og dermed adgang til stivelse.

Efter krigen ville den britiske regering hædre Weizmann for hans afgørende bidrag til briternes krigsindsats. Han afslog dog personlig hæder, men undlod ikke at fremføre sin vision om en jødisk stat i Palæstina. Mange år senere (i 1948) blev Chaim Weizmann staten Israels første præsident.

## Cellulosomet



Den seneste modifikation af *C. acetobutylicum*, har været at integrere det såkaldte cellulosom fra den termofile organisme *Clostridium thermocellum*. Cellulosomet består i hovedtræk af 3 dele: En forankringsdel, som binder cellulosomet til plantecellen, en cellulosebindende del og de enzymatisk aktive enheder. Cellulosomet bringer bakterien i tæt kontakt med cellens sukkersubstrater, som dannes af de enzymatiske enheder ved nedbrydning af cellulose.

for bakteriens cellemembran bliver generne aktiveret, aflæst og oversat til enzymer, som derefter transporteres ud af cellen, hvor de bliver samlet til et aktivt enzymkompleks. Cellulosomet består af flere aktive enheder, hvoraf nogle genkender og binder enzymkomplekset til cellulose, mens andre bryder glukosebindingerne. Det sidste medfører, at cellulose og hemicellulose i planters cellevægge bliver spaltet til mono og di-sakkarider, som *C. acetobutylicum* derefter optager og fermenterer til butanol.

### Fremtidens ABE-proces

Der arbejdes nu på at øge både mængden og aktiviteten af cellulosomet i bakterien, og lykkes dette, vil den genmodificerede bakterie være i stand til både at nedbryde og omsætte lignocellulose, der er en meget kompleks kulstofkilde. Derved kan plantebiomasse med lignin, cellulose og hemicellulose blive nedbrudt uden kemisk og termisk forbehandling og uden tilsætning af kostbare enzymer, da bakteriecellen klarer det hele. Forbehandling er både energikrævende og dyrt, og derfor vil *C. acetobutylicum* i denne forbedrede version bidrage til at gøre ABE-fermentering både miljømæssig bæredygtig og økonomisk attraktiv. På den måde kan den tidligere så udbredte ABE-fermentering blive genintroduceret

i en ny industriel version, hvor omdannelse af ligninholdige rest- og affaldsprodukter er en integreret del af organismens stofomsætning til produktion af biobrændstoffer. Og hvor bakteriens metabolisme er optimeret således, at produktion af det energirige butanol "står på maksimum" og kun en minimal mængde kulstof går til produktion af produkter med mindre energitæthed som eksempelvis ethanol.

På processiden betyder bakteriens ændrede egenskaber, at frigørelse og fermentering af sukre kan forløbe i én og samme reaktortank. Fx ved at hakke halm i småstykker, tilsætte vand og derefter varme "halmsuppen" op til 37 °C, som *C. acetobutylicum* gror bedst ved. Efter podning med bakterien, kan processen nu følges ved bl.a. at undersøge sukker- og butanolkoncentrationen over tid.

Med nutidens efterspørgsel på bæredygtige kemikalier og brændstoffer tyder meget på, at *C. acetobutylicum* eller beslægtede *Clostridier* kan blive aktuelle igen. *C. acetobutylicum*'s rolle som modelorganisme har drevet udviklingen fremad inden for især genmanipulation af anaerobe bakterier og har dermed været med til at fremme udviklingen af bæredygtige alternativer til olie. ■

### Videre læsning:

Svampen på toiletbrættet - en videnskabelig succes  
Aktuel Naturvidenskab nr. 5/2011.

Tracy, B.P. et al (2012): Clostridia: the importance of their exceptional substrate and metabolite diversity for biofuel and biorefinery applications. Curr. Opin. Biotechnol. 23:364-381.

Jensen, T. Ø., T. Kvist, M. J. Mikkelsen & P. Westermann. Rapid and reliable method for identification of associated endonuclease cleavage and recognition sites. Lett Appl Microbiol 2014 Jun 11;58(6):576-81.