

Fra petrokemisk til biobaseret ravsyreproduktion

Stigende oliepriser og teknologiske fremskridt betyder, at der verden over arbejdes med at erstatte petroleumbaserede processer med bioteknologiske. Anvendelse af en avanceret teknologiplatform har muliggjort, at Center for Mikrobiel Bioteknologi for nylig har fået et gennembrud i mikrobiel produktion af ravsyre

Af professor Lisbeth Olsson, ph.d.-studerende José Manuel Otero, adjunkt Kiran Patil og professor Jens Nielsen, Center for Mikrobiel Bioteknologi, BioCentrum-DTU

De senere år har der været fokus på udvikling af biobaseret produktion af produkter, der traditionelt er blevet produceret i kemiske processer. En af drivkræfterne for denne udvikling er de stigende oliepriser og den mindske tilgang til olie, samtidig med et stigende energiforbrug. Olieprisen steg med næsten 150% mellem januar 2001 og 2006 (baseret på prisen for råolie på verdensmarkedet), og det forudsiges, at det globale energiforbrug vil stige med 57% fra 2002 til 2025. Ved produktion af basiskemikalier udgør råmaterialet en af de største omkostninger, og derfor er anvendelse af alternative råmaterialer til olie attraktivt. En biobaseret produktion vil kunne tage udgangspunkt i en række vedvarende råmaterialer, såsom affald fra landbrug, industri og skovbrug. Både i USA og Europa er der en stærk fokusering på forskning og udvikling inden for dette område

(mere information omkring industriel bioteknologi på europæisk plan kan findes på www.epobio.net og www.suschem.org). Bioteknologiske processer har også den fordel, at de er miljøvenlige, da de foregår under »milde« procesforhold.

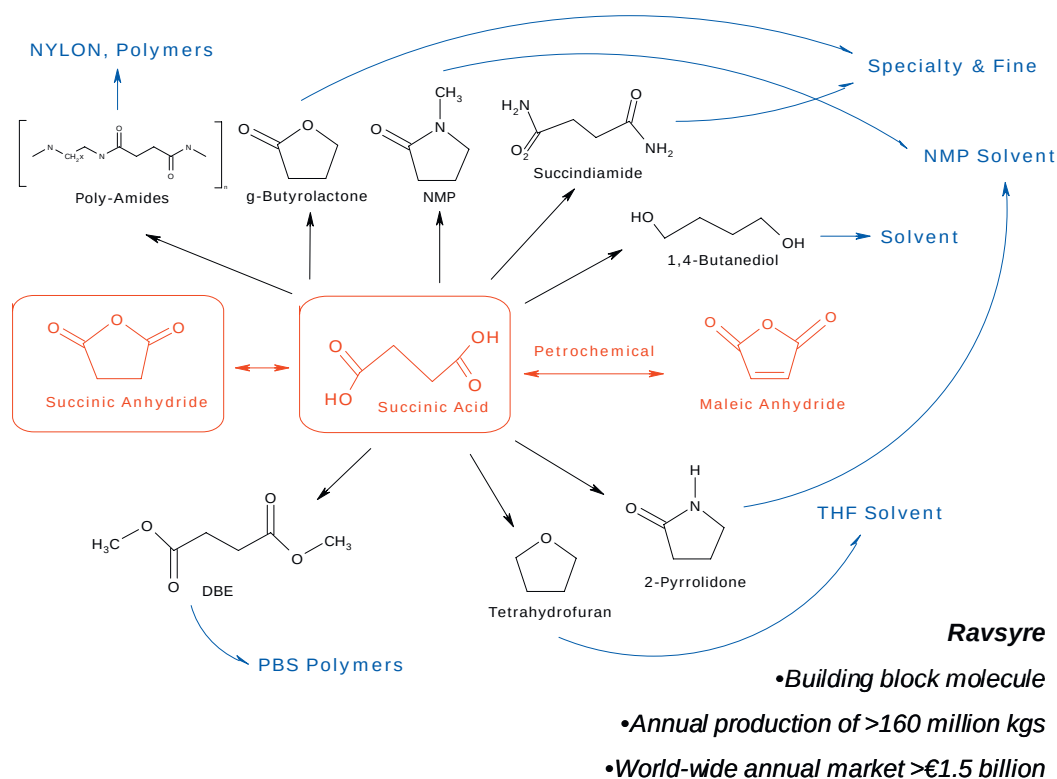
Hvorfor er ravsyre interessant?

Den kemiske industri er opbygget omkring en række kemiske forbindelser, som er udgangspunkt for en bred vifte af produktionsprocesser. Department of Energy i USA har identificeret de 12 vigtigste kemiske stoffer for den kemiske industri, som også kan produceres i biobaserede processer (<http://www.eere.energy.gov/biomass/progs/searchdb2.cgi?8674>). Ravsyre, som er en forbindelse med fire kulstofatomer, er med på den liste. Stoffet er udgangskomponent for produktion af en række

kemiske forbindelser (figur 1), der finder anvendelse inden for polymerproduktion, produktion af solventer og en række produkter inden for special- og finkemikaliesektoren. I dag produceres ravsyre fra maleicanhydrid, der produceres petrokemisk. Markedet for ravsyre er voksende, og på nuværende tidspunkt bliver der produceret mere end 160 mio. kg årligt til en værdi af mere end 1.5 mia. euro. På den baggrund ville det være gavnligt for både miljø og verdens oliebeholdning, hvis man fandt en bioteknologisk produktionsform.

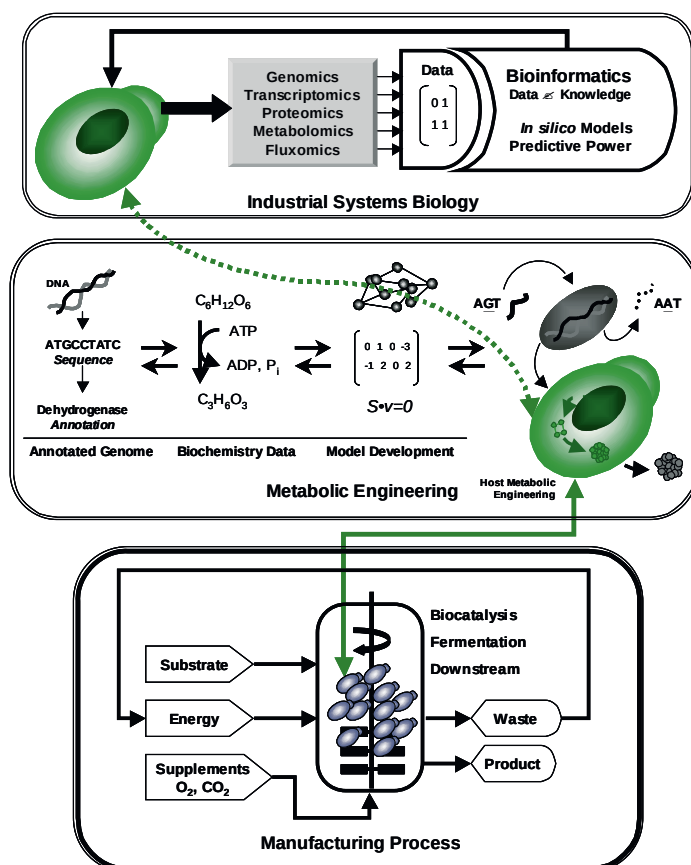
Cellefabrikker der kan producere ravsyre

Der findes p.t. ikke nogen industriel produktion af ravsyre vha. mikroorganismer (cellefabrikker). Forklaringen er, at der ikke findes nogen velegnede mikroorganismer til en sådan biobaseret produktion. Verden over foregår der



Figur 1. Ravsyre og dens anvendelse som byggesten til andre kemiske forbindelser.

Boks A



Industriell bioteknologi omfatter celledfabrikker, procesdesign og -optimering. Udviklingen af nye effektive celledfabrikker sker ved anvendelse af metabolic engineering, hvor der foretages målrettede genetiske ændringer med henblik på at forbedre egenskaberne af celledfabrikken. Procesdesign og -optimering omfatter detaljeret analyse af, hvordan celledfabrikken responderer til det omgivende miljø. Systembiologi spiller en rolle i både metabolic engineering, procesdesign og -optimering, idet metoder udviklet inden for systembiologi kan anvendes til at identificere de rette mål for gensplejsning samt til at kortlægge detaljerede mekanismer bag cellernes respons til deres miljø, f.eks. til ændringer i sukkerkoncentrationen.

dog intens forskning og udvikling mhp. at udvikle en effektiv ravsyreproducerende mikroorganisme. En mulighed, der ligger langt fremme, er den velkendte mikroorganisme *Escherichia coli*, som er blevet designet til at producere ravsyre. En anden mulighed er den nyopdagede mikroorganisme *Mannheimia succinogenes* (den er blevet isoleret fra en koreansk ko) [1]. Begge mikroorganismer kan producere ravsyre til industrielt relevante niveauer, men det største problem er, at de ikke kan producere ravsyre ved et pH, hvor ravsyren er uprotoneret. Derfor vil disse processer kræve dyre oprensningstrin.

Ved CMB har vi valgt den anden angrebsvinkel. Ved at arbejde med gær som produktionsorganisme kan der produceres uprotoneret ravsyre. Gær er en veletableret og robust industriel mikroorganisme. Det eneste problem er, at gær naturligt kun producerer spormængder af ravsyre.

Hvis man anskuer gær som en fabrik, hvor en række biosyntetiske ruter leder til det ønskede produkt, så er opgaven at redesigne systemet, så biprodukterne ikke bliver producerede, og vi kan danne produktet hurtigt og effektivt. Det er en meget

stor opgave, da gær normalt kun producerer store mængder af produkter med et eller to kulstofatomer (hhv. kuldioxid og ethanol). Det vil derfor være en omfattende designopgave, der vil kræve mange ændringer og brug af en række værktøjer inden for metabolic engineering [2,3].

Værktøjskassen til udvikling af effektive celledfabrikker

De seneste års biologiske forskning har muliggjort, at store datamængder kan genereres med detaljeinformationer om alle trin på vejen fra DNA til metabolitter. Denne information gør, at vi kan få information omkring hele det system en celle udgør, såkaldt systembiologi (beskrevet i boks A). Denne information kan, ved kombination med matematiske modeller og algoritmer (beskrevet i boks B, side 26), bruges til at forudsige, hvilke ændringer der skal laves i det metaboliske netværk for at kunne redesigne systemet til effektiv produktion af f.eks. ravsyre. Ændringerne kan være deletion af visse gener, hvilket vil afbryde en metabolisk vej, eller introduktion af nye gener, der vil muliggøre, at nye metaboliske veje tages i brug, eller eksisterende veje bliver mere effektive. CMB har taget en meget aktiv del i at udvikle flere værktøjer og har i dag en meget stærk teknologiplatform.

Gennembruddet der f k gær til at producere ravsyre

Gennem et teoretisk studie, hvor man brugte matematiske værktøjer (se boks B), fandt vi en række muligheder for gensplejsning af gær med sigte på at forbedre ravsyreproduktionen. Disse strategier omfattede forandringer i vidt forskellige dele af metabolismen, og det interessante ved resultaterne fra den teoretiske analyse var, at mindst tre genetiske ændringer var påkrævede, før der ville ske en mærkbar ændring. Flere af strategierne blev gennemført eksperimentelt, hvorefter stammerne blev evalueret ved fermenteringsforsøg. Resultatet viste, at udbyttet af ravsyre kunne øges med ni gange, men desværre kunne den nye stamme ikke vokse uden tilsætning af aminosyren glycine, hvilket ikke vil være procesteknologisk acceptabelt. Ved at bruge naturens egen strategi¹ – overlevelse af den bedst egnede stamme – kunne den ravsyreproducerende stamme vokse uden glycine og samtidig producere ravsyre. I næste trin forbedredes væksthastigheden yderligere til et niveau, der kun er noget lavere end i vildtypen. Den resulterende stamme producerer 70 gange mere ravsyre end en almindelig gær kan. Kombinationen af de teknologier, der er rygraden i industriel systembiologi (boks A), har ledt frem til et gennembrud, der samlet set har ført til et udbytte af ravsyre på 0.03 g ravsyre/g glucose.

Der er dog stadigvæk et stykke vej, inden ravsyreproduktionen har nået industrielt relevante niveauer, men arbejdet demonstrerer styrken af industriel systembiologi, hvor man på kort tid (få mandår) har opnået det gennembrud, der er blevet præsenteret her. Økonomiske beregninger har vist, at med et udbytte der er en 10 gange større, end det vi har opnået i de

SKANLAB

MM 301 Svingmølle

Retsch
Reproducerbar formaling
og kornstørrelsesanalyse

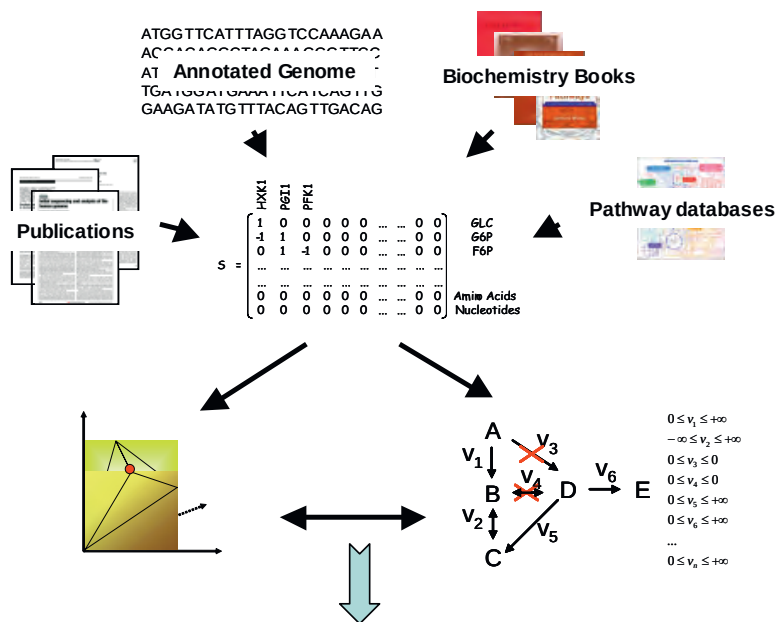


Velegnet til
nedbrydning
af biologiske
celler i f.m.
DNA/RNA
undersøgelser.

Tlf. 47 38 10 14 www.skanlab.com

Boks B

In silico design af mikroorganismer



Rekonstruktion

Først etableres der en metabolisk model for den cellefabrik, der arbejdes med. Dette kan ske ved at kombinere information fra artikler, databaser, lærebøger og et annoteret genom. Når information er indsamlet i form af en detaljeret støkiometrisk model, kan denne anvendes til simulering af vækst og produkt dannelse.

Design og formulering

Når der forefindes en metabolisk model for cellefabrikken kan denne anvendes til simulering af vækst og produkt dannelse under forskellige vækstbetingelser. Metaboliske modeller er lineære, og der findes løsninger ved anvendelse af lineær programmering. Her søges der efter en løsning, der giver optimal vækst.

In silico design til eksperimentel verifikation

Når der er opstillet en pålidelig model, kan denne anvendes til at finde mål for gensplejsning med henblik på at forbedre produkt dannelsen. Her kan anvendes forskellige optimeringsalgoritmer, f.eks. genetisk programmering.

initiale studier, vil processen kunne konkurrere med en petroleumsbaseret proces.

Fremtidige perspektiver for industriel bioteknologi

Mikroorganismer som produktionsplatform rummer mange fremtidige muligheder. Dels kan flere og flere processer konkurrere prismæssigt med mere traditionelle processer, i betragtning af at teknologien for brug af vedvarende råmateriale

er under intens udvikling. Denne udvikling er drevet af det udvidede brug af biobrændsler, men det danner samtidig et fundament for yderligere biobaserede processer til produktion af lavværdiprodukter. En rapport fra McKinsey fra 2003 forudsiger en eksponentiel vækst for området, hvor 10-20% af alle kemikalier i 2010 bliver produceret i bioteknologiske processer. For mere dybdegående informationer om mulige fremtidige anvendelsesområder henvises til [4].

Den anden afgørende faktor er de teknologiske muligheder, hvor de moderne værktøjer inden for den industrielle systembiologi gør, at vi kan opbygge cellefabrikker, så vi kan producere interessante stoffer i de mikroorganismer, der har den robusthed, som kræves for at være egnet til industriel produktion.

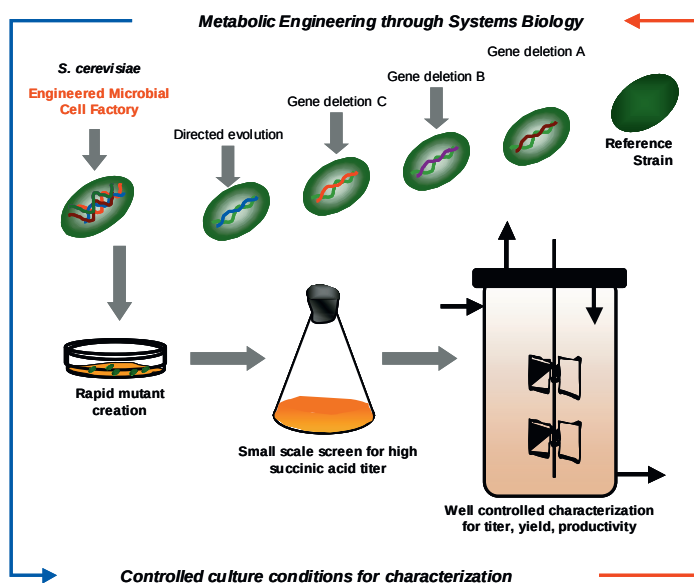
E-mail-adresser
Lisbeth Olsson: lo@biocentrum.dtu.dk
José Manuel Otero:jomo@biocentrum.dtu.dk
Kiran Patil: krp@biocentrum.dtu.dk
Jens Nielsen: jn@biocentrum.dtu.dk

Fodnote

¹⁾ Denne teknologi benævnes directed evolution og bruges når man vil ændre på egenskaber på i cellefabrikken, for hvilke man ikke kender den molekylære biologiske baggrund.

Referencer:

1. H. Song, S.Y. Lee (2006) Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 352-361
2. M. R. Andersen, M. L. Nielsen, J. Nielsen (2006) Genomet-systembiologiens rygrad. *Dansk kemi* 3: 15-17
3. J. Højer-Pedersen, J. Smedsgaard, J. Nielsen (2006) Metabolomet: et indirekte produkt af genomet. *Dansk kemi* 3:18-20
4. M. Gavrilescu, Y. Chisti (2005) Biotechnology – a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnology Advances*, 23: 471-499.



Figur 2. Skematisk oversigt for stamudviklingsprocessen, hvor genetiske forandringer ved metabolic engineering eller directed evolution gentages i en iterativ proces, til det ønskede mål er nået.