

# Præcisionsfermentering

Mikroorganismer i store ståltanke kan producere medicin, kemikalier, fødevarer ingredienser og brændstof uden brug af dyrehold og med et markant lavere forbrug af CO<sub>2</sub>, vand og land i forhold til traditionel produktion.

Af Majse Nafisi, science manager, Advanced Protein Solutions, Novonosis A/S

Fermentering har været kendt i mange år, for eksempel ved fremstilling af vin og øl, hvor mikroorganismer omdanner sukkerstoffer til en række andre stoffer, deriblandt alkohol og smagsgivere. Præcisionsfermentering adskiller sig fra traditionel fermentering ved, at de mikroorganismer, der indgår, er blevet designet til formålet, for eksempel ved hjælp af genmodificering i et laboratorium. Værtsorganismen bliver derved en "cellefabrik", der producerer store mængder af det ønskede protein eller molekyle.

## Hvilke muligheder er der?

Præcisionsfermentering gør det muligt at producere proteiner fra andre organismer i mikroorganismer, og man kan derved opnå store mængder rent protein fra ellers svært tilgængelige kilder. Et eksempel på dette er insulin. Uden brug af præcisionsfermentering skulle der



Foto: Wikimedia Commons

Proteiner fremstillet ved præcisionsfermentering finder blandt andet anvendelse i vegansk is.

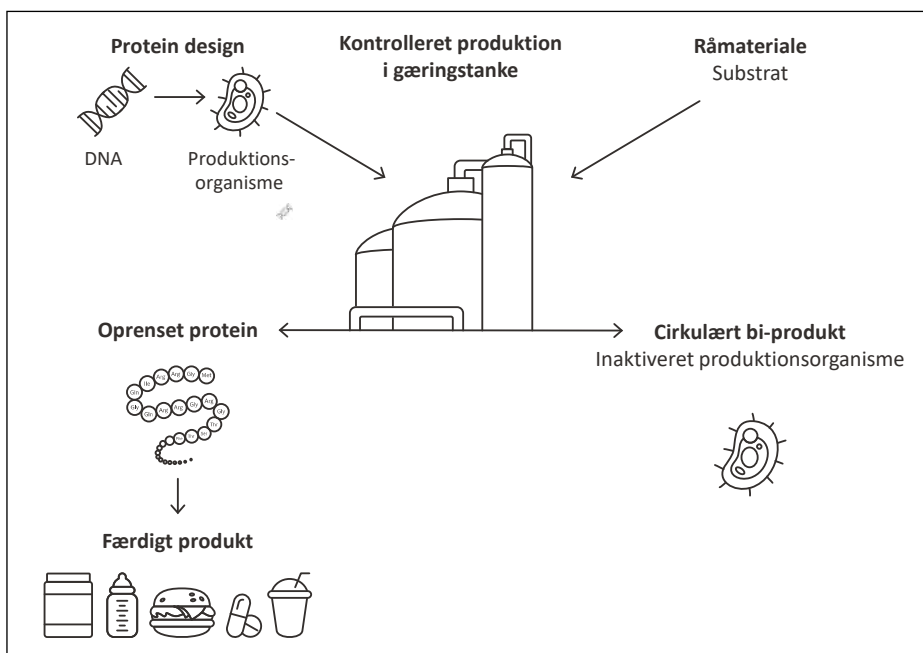
bruges mere end 1 milliard svinekirtler årligt for at dække den globale efterspørgsel. Et andet eksempel er enzymet osteløbe, der bruges til at koagulere mælk under osteproduktion. Tidligere blev osteløbe oprenset fra kalvemaver, men produceres nu i mikroorganismer, hvorved animalsk produktion undgås.

Det er allerede i dag muligt at produ-

cere mælke- eller æggeproteiner, som vil kunne bruges i fødevarer og dermed erstatte de konventionelle animalske kilder. Et eksempel er mælkeproteinets  $\beta$ -lactoglobulin, der hos amerikanske Perfect Day fermenteres i svampeceller og bruges til fremstilling af vegansk is.

De nye proteiner kan være identiske i forhold til den oprindelige sekvens eller have forbedrede egenskaber såsom lavere allergenicitet eller bedre næringsindhold. Ved brug af præcisionsfermentering er det nemlig muligt at ændre på proteinets aminosyresammensætning, hvorved nye egenskaber kan opnås. Dermed er det også muligt at ændre på enzymers aktivitet, substratspecificitet og stabilitet, hvilket kan have stor betydning for deres robusthed i forskellige processer.

Præcisionsfermentering kan også bruges til at udtrykke en række proteiner, der danner en hel biosyntesevej, hvorved mikroorganismen kan producere stoffer som antibiotika, lipider, farvestoffer samt smags- og aromastoffer. Afhængig af biosyntesevejen kan det være en kompliceret proces, hvor mange komponenter skal spille sammen på en koordineret måde for at kunne danne et produkt. Som eksempel er der ved mikrobiel produktion af "human milk oligosaccharides" (HMOs) i *E. coli* indsat fire nye gener og muteret 14 endogene gener [1].



Figur 1. Fermenteringsproces. DNA indsættes i værtsorganismen, der dyrkes i gæringstanke under optimale forhold. Efter endt gæring, høstes proteinerne og adskilles fra værtsorganismen, og resultatet er et oprenset protein med høj renhed, der kan bruges som ingrediens i for eksempel fødevarer.

## Processen

Når en mikroorganisme skal omdannes

til en "cellefabrik", foregår det i praksis ved, at genet, der koder for det ønskede protein indsættes i værtsorganismens DNA, som nu kan producere det nye (heterologe) protein enten konstitutivt (hele tiden) eller ved inducering. Mikroorganismene dyrkes i store gærings-tanke, der indeholder næringsmedium (substrat), og vækstbetingelser såsom temperatur, pH og iltmætning holdes under nøje kontrol. Når gæringen er slut, og høje koncentrationer af det ønskede protein er opnået, bliver proteinerne høstet og oprenset (figur 1). Under oprensningen adskilles proteinet fra værtscellen, og det oprensede protein indeholder derfor ikke DNA.

Mikroorganismer bruges ofte som værtsorganismer, da disse nemt kan dyrkes i gæringsstanke, har en kort fordoblingstid og forholdsvis nemt kan udtrykke proteiner, der er nye for dem. Populære værtsorganismer er bakterier (som for eksempel *Bacillus* sp, *Escherichia coli*), gær (*Pichia* sp, *Saccharomyces* sp) og filamentøse svampe (*Aspergillus*, *Trichoderma*). Mange års forskning har gjort disse organismer til gode værter ved at forstå og optimere processer inden for blandt andet gen-modificering, proteinudtrykkelse og gæring. Der er dog også fokus på at udvikle nye værtsorganismer, hvor produktion i planter har interessante perspektiver i forhold til at kunne bruge sollys, og dermed fotosyntesen, som kulstofkilde.

Flere faktorer er vigtige ved valg af værtsorganisme, men en af de afgørende er værtsorganismens mulighed/evne til at udføre post-translational modifikation (PTM). Mange proteiner bliver ændret efter translationen, hvorved der for eksempel påsættes sukkermolekyler eller sker phosphorylering og dette kaldes post-translational modifikation (PTM - se faktaboks). PTM kan modulere et proteins aktivitet, lokalisering samt interaktion med andre cellulære komponenter som proteiner, lipider og DNA.

Baseret på værtsorganismens PTM-maskineri, kan der ske ændringer i det udtrykte protein; aminosyresekvensen vil være ens, men glycosyleringsmøn-stret kan for eksempel være forskelligt. Det kan være, at der er påsat andre sukkermolekyler, end der var på det oprindelige protein, eller måske er der slet ikke sket en glycosylering, hvor der skulle have været. For eksempel er det humane glycosyleringsmønster forskelligt fra det i mikroorganismer, hvilket kan være en udfordring, da mange af de proteiner, der bruges til medicinske formål, er glycosylerede.



## Hvilke proteiner kan udtrykkes?

Det kan være svært at vide på forhånd, hvilke proteiner der kan udtrykkes i heterologe systemer. Proteinerne skal både udtrykkes i høje koncentrationer, men også i en funktionel form, hvor korrekt foldning og PTM spiller vigtige roller. Som tidligere nævnt er det vigtigt at kende behovet for PTM for det ønskede protein. Et andet aspekt er nødvendigheden af intracellulære forhold som blandt andet pH og redoxpotentiale. Det kan også være, at der er brug for særlige cofaktorer til dannelse af proteinet, som værtsorganismen ikke selv kan producere. Membranproteiner kan være særligt vanskelige, da de sidder forankret i cellemembraner, hvor for eksempel lipidkomposition kan være afgørende for funktionaliteten.

## Hvilke begrænsninger er der?

Som nævnt er valg af værtsorganisme en vigtig parameter i forhold til, hvilke proteiner og stoffer der kan produceres. En anden begrænsning er relateret til pris, da det i dag er dyrt at producere proteiner ved fermentering. Hvis brugen af præcisionsfermentering skal bredes ud til helt nye former for proteiner og måske erstatte proteiner fra animalske produkter, kan det være, at der skal findes nye produktionsorganismer og produktionsmetoder, der kan levere store mængder rent protein af god kvalitet.

Når brugen af præcisionsfermentering bevæger sig fra enzym/farma-området til fødevaringredienser, kræves meget større produktionskapacitet, hvilket kræver betydelige investeringer. I den sammenhæng er der formentlig behov for alternative finansieringsmuligheder gennem statslig eller privat støtte fra store investorer (se faktaboks for eksempel på sådan et projekt). Derud-

over er der på nuværende tidspunkt også udfordringer med at få nye proteiner hurtigt på markedet på grund af en langsom og godkendelsesproces for nye fødevarer i EU (novel food). Det vil særligt være en stor udfordring for mindre virksomheder.

E-mail:

Majse Nafisi: [MNAF@novonesis.com](mailto:MNAF@novonesis.com)

## Reference

1. Bych K, Mikš MH, Johanson T, Hederos MJ, Vignæs LK, Becker P. Production of HMOs using microbial hosts - from cell engineering to large scale production. *Curr Opin Biotechnol.* 2019;130-137. Doi: 10.1016/j.copbio.2018.11.003.

## Fra CO<sub>2</sub> til fødevarerproteiner

I et konsortium, støttet af Novo Nordisk Fonden og Bill & Melinda Gates Foundation, undersøges mulighederne for at bruge fermentering til at producere proteiner på en mere bæredygtig måde. Ved hjælp af biologiske og elektrokemiske processer vil partnerne i konsortiet forarbejde CO<sub>2</sub> og omdanne det til acetat (eddike), der kan bruges fra kulstofkilde for mikroorganismer under fermentering. Mikroorganismene kan derved, via præcisionsfermentering, bruge acetat og producere nye proteiner til brug i fødevarer. Konsortiet består af følgende partnere: Novonesis A/S, Topsoe A/S, Washington University og Novo Nordisk Foundation CO<sub>2</sub> research Center ved Aarhus Universitet. For yderligere information: CO<sub>2</sub> as a sustainable raw material in our future food production - Novo Nordisk Fonden.