

Vilma Ovaskainen

# BIOTUOTTEIDEN VALMISTAMINEN HIILIDIOKSIDISTA MIKROBEILLA

Kandidaatintyö  
Luonnontieteiden ja tekniikan tiedekunta  
Tarkastaja: Suvi Santala  
huhtikuu 2020

# TIIVISTELMÄ

Vilma Ovaskainen: Biotuotteiden valmistaminen hiilidioksidista mikrobeilla. The use of microorganisms to manufacture bioproducts from carbon dioxide.

Kandidaatintyö  
Tampereen yliopisto  
Bio- ja ympäristötekniikka  
huhtikuu 2020

---

Kasvihuonekaasupäästöjen pienentäminen ilmastonmuutoksen estämiseksi on motivoinut tutkijoita ympäri maailman kehittämään uusia menetelmiä tuottaa polttoaineita ja kemikaaleja. Useat mikrobit sitovat luontaisesti hiilidioksidia ilmakehästä ja muuntavat sen biomassaksi. Luontaisen hiiltä sitovan ominaisuuden vuoksi mikrobin käyttö tuotantoalustana on potentiaalinen vaihtoehto päästöjä sitovaan polttoaine- ja kemikaaliteollisuuteen. Mikrobeilla on monia hiilidioksidia sitovia aineenvaihduntareittejä. Esimerkiksi asetogeeniset bakteerit tuottavat hiilidioksidista energiaa ja biomassaa Wood-Ljungdahl-aineenvaihdunnalla. Tämän työn tarkoituksena on selvittää, miten mikrobeilla voidaan tuottaa hiilidioksidista biotuotteita sekä arvioida tällaisen bioteknisen prosessin kestävyyttä verrattuna fossiilisista raaka-aineista valmistettuihin tuotteisiin.

Kaasufermentaatio on prosessi, jossa kaasumuotoinen raaka-aine, kuten hiilidioksidi tai hiilimonoksidi muunnetaan mikrobin vaikutuksesta kemikaaleiksi tai polttoaineiksi. Asetogeenit ovat osoittautuneet kaasufermentaatioon sopiviksi bakteereiksi, koska ne pystyvät luontaisesti valmistamaan hiilidioksidista muun muassa asetaattia, etanolia ja 2,3-butaanidiolia. Asetogeenien luontaisia tuotteita voidaan hyödyntää kemianteollisuudessa sellaisenaan tai muiden yhdisteiden esiasteina. Verrattuna fossiilisista raaka-aineista valmistettuihin tuotteisiin, kaasufermentaatiolla valmistettujen biotuotteiden kasvihuonekaasupäästöt ovat pienemmät, koska raaka-ainekaasu on peräisin jätevirrasta.

Kaasufermentaatiosta on olemassa variaatioita, joita ovat esimerkiksi elektrobiosynteesi ja integroidut mikrobisysteemit. Elektrobiosynteesissä mikrobi saa pelkistysvoimaa (elektroneja) aineenvaihduntaansa katodilta ja hiilenlähteen hiilidioksidista. Integroidut mikrobisysteemit yhdistävät kaksi fermentaatioprosessia, joista ensimmäisessä hiilidioksidista tuotetaan asetaattia asetogeenisellä bakteerilla. Jälkimmäisessä fermentaatiossa raaka-aineena käytetään ensimmäisessä fermentaatiossa tuotettua asetaattia.

Tällä hetkellä kaasufermentaatiolla voidaan kaupallisessa mittakaavassa tuottaa ainakin etanolia. Tulevaisuudessa kaasufermentaatiolla voidaan potentiaalisesti tuottaa myös arvokkaampia lopputuotteita kuten lipidejä ja pitkäketjuisia hiilivety-yhdisteitä. Kaasufermentaation haasteita ovat asetogeenien hidas kasvu, tuotesaantojen kasvattaminen ja kaasusubstraatin massansiirron tehostaminen nestefaasiin. Geenimuokkauksella voidaan optimoida tuottajaorganismien aineenvaihduntaa esimerkiksi eliminoimalla ei-haluttuja sivutuotteita ja yliekspressoimalla hyödyllisiä geenejä.

Avainsanat: kaasufermentaatio, biotuote, hiilidioksidi, asetogeeni, mikrobi, Wood-Ljungdahl

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla.

# SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO .....	1
2. HIILIDIOKSIDIA SITOAVAT MIKRO-ORGANISMIT .....	3
2.1 Calvinin kierto .....	3
2.2 Asetogeenit ja Wood-Ljungdahl-reitti .....	4
3. KAASUFERMENTAATIO BIOTUOTTEIDEN VALMISTUSMENETELMÄNÄ .....	8
3.1 Kaasufermentaatioprosessi .....	8
3.2 Elektrobiosynteesi .....	10
3.3 Integroidut mikrobisysteemit .....	11
3.4 Uuden sukupolven geenimuokatut mikrobisysteemit .....	13
3.5 Prosessiesimerkki kaasufermentaation hyödyntämisestä: etanolintuotanto .....	15
4. KAASUFERMENTAATION HAASTEET JA MAHDOLLISUUDET .....	17
5. JOHTOPÄÄTÖKSET .....	20

## LYHENTEET JA MERKINNÄT

ABE	Asetoni-Butanoli-Etanoli
ACS	Asetyylikoentsyymi-A syntaasi
adh	Alkoholi gedyhrogenaasi-geeni
AdhE	Aldehydi/alkoholi dehydrogenaasi
AOR	Aldehydi:ferredoksiini oksidoreduktaasi
Asetyyli-KoA	Asetyylikoentsyymi-A
ATJ	Alcohol-to-Jet
ATP	Adenosiinitrifosfaatti
CCU	Carbon capture and utilization
CHP	Combined heat and power
CODH	CO-dehydrogenaasi
CSTR	Continuous stirred-tank reactor
CRISPR/Cas9	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/ Crispr associated protein 9
DC/4HB	Dikarboksyylaatti/4-hydroksibutyyraatti
ECH	Energy conserving hydrogenase
EET	Extracellular electron transfer
Fd	Ferredoksiini
IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change
LCA	Life cycle assessment
MES	Microbial electrosynthesis
NAD <sup>+</sup>	Nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi
NADPH	Nikotiiniamidiadeniinidinukleotidifosfaatti
pta	Fosfotransasetyylaasi-geeni
RNF	<i>Rhodobacter</i> nitrogen fixation
Rubisco	Ribuloosi-1,5-bisfosfaattikarboksyylaasi
rTCA	Reductive tricarboxylic acid cycle
THF	Tetrahydrofolaatti
WL	Wood-Ljungdahl
3HP	3-hydroksipropionaatti
3HP/4HB	3-hydroksipropionaatti/4-hydroksibutyyraatti

# 1. JOHDANTO

Hallitustenvälisen ilmastonmuutospaneelin (IPCC) viimeisimmän ilmastoraportin mukaan antropogeenisten CO<sub>2</sub>-päästöjen tulisi laskea noin 45 % vuoteen 2030 mennessä ja hiilineutraalius tulisi saavuttaa vuoteen 2050 mennessä, mikäli ilmaston lämpeneminen halutaan rajoittaa 1,5 °C:seen (IPCC 2018). Ilmastoraportin mukaan päästöjen vähentäminen vaaditulle tasolle merkitsee ennennäkemättömiä muutoksia ihmiskunnan tapoihin tuottaa energiaa ja polttoaineita. Yhdysvaltain energiaministeriön laitoksen EIA:n (Energy Information Administration) arvioiden mukaan maapallon energiatarve tulee kasvamaan vuoteen 2050 mennessä lähes 50 % johtuen pääasiassa Aasian nopeasta talouskasvusta (Energy Information Administration 2019). Globaali tarve pienentää ilmakehän hiilidioksidia ja siirtää teollista tuotantoa pois fossiilisista luonnonvaroista on kiihdyttänyt kehitystä teknologioissa, jotka poistavat hiilidioksidia ilmakehästä ja hyödyntävät sitä teollisuuden raaka-aineena. Carbon capture and utilisation -teknologioita (CCU) on esitetty keinoksi lieventää ilmastonmuutosta esimerkiksi tuottamalla hiilidioksidista uusiutuvia polttoaineita (Martens *et al.* 2017).

Tämän kandidaatintyön tavoitteena on selvittää kirjallisuuskatsauksena, miten hiilidioksidista voidaan mikrobiologisesti tuottaa kemikaaleja ja polttoaineita. Kandidaatintyössä käsitellään asetogeenisten mikro-organismien aineenvaihduntaa ja niiden käyttöä kemikaalien ja polttoaineiden tuotantoalustana. Kandidaatintyössä selvitetään, mitä tuotteita nykyisillä menetelmillä voidaan valmistaa ja mitä tuotteita voidaan mahdollisesti valmistaa tulevaisuudessa. Työssä tarkastellaan menetelmien haasteita ja mahdollisia ratkaisuja niihin sekä arvioidaan bioteknisen hiilidioksidia hyödyntävän prosessin kestävyyttä verrattuna fossiilisiin tuotteisiin.

Luvussa 2 perehdytään hiilidioksidia sitoviin mikrobeihin ja keskitytään asetogeenisten bakteerien aineenvaihduntaan. Kolmannessa luvussa siirrytään aineenvaihdunnan sovelluksiin biotuotteiden valmistuksessa kaasufermentaatiomenetelmällä. Luvussa tutustutaan kaasufermentaatioprosessiin ja sen variaatioihin. Lisäksi esitellään esimerkkien avulla geenimuokkauksen mahdollisuuksia kaasufermentaation kehittämisessä ja perehdytään etanolintuotantoon esimerkkisovelluskohteena. Luvussa 4 kartoitetaan kaasufermentaatioon liittyviä haasteita ja niiden mahdollisia ratkaisuja. Lopuksi johto-

päätöksissä pohditaan kaasufermentaation käyttöönoton ympäristövaikutuksia ja kannattavuutta ilmastonmuutoksen näkökulmasta sekä arvioidaan menetelmän tulevaisuudennäkymiä.

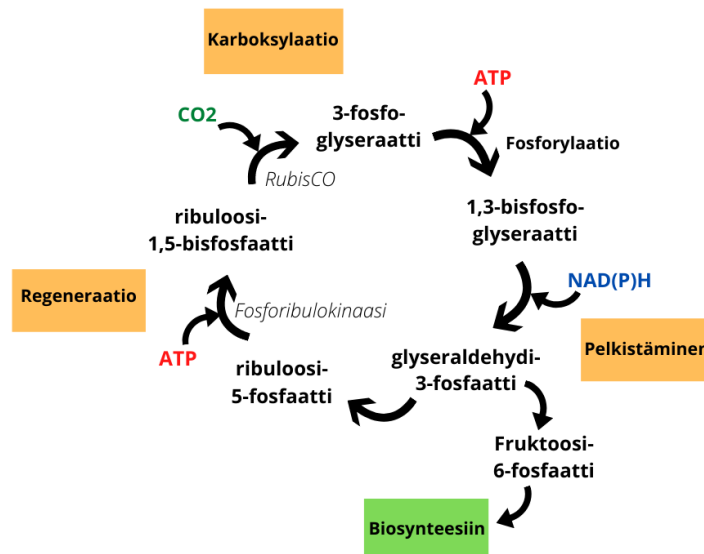
## 2. HIILIDIOKSIDIA SITOVAT MIKRO-ORGANISMIT

Mikro-organismit eli mikrobit luokitellaan niiden käyttämän hiilenlähteen perusteella autotrofeihin ja heterotrofeihin. Autotrofiset mikrobit voivat hyödyntää hiilenlähteenä epäorgaanista hiiltä kuten hiilidioksidia, josta ne valmistavat (assimilate) solun rakennusainetta eli biomassaa. Heterotrofeilla biomassan hiili on peräisin orgaanisista yhdisteistä. Energianlähteen perusteella mikrobit jaetaan kolmeen kategoriaan: kemo-organotrofit, kemolitotrofit ja fototrofit. Kemo-organotrofien energia on peräisin orgaanisten yhdisteiden hapettamisesta, kun taas kemolitotrofit saavat energiaa hapettamalla epäorgaanisia yhdisteitä. Fototrofit pystyvät hyödyntää energianlähteenä auringon säteilyenergiaa. (Madigan *et al.* 2019, s. 114)

Tähän päivään mennessä tunnetaan yhteensä kuusi luontaista autotrofista aineenvaihduntareittiä, joista yleisin on Calvinin kierto. Calvinin kiertoa käyttävät mm. viherkasvien ja levien lisäksi syanobakteerit ja useimmat kemolitotrofiset bakteerit. (Madigan *et al.* 2019, s. 441, Saini *et al.* 2011) Muita autotrofisia aineenvaihduntareittejä ovat Wood-Ljungdahl-reitti (WL), käänteinen sitruunahappokierto (rTCA), 3-hydroksipropionaatti-reitti (3HP), 3-hydroksipropionaatti/4-hydroksibutyraatti-reitti (3HP/4HB) ja dikarboksylaatti/4-hydroksibutyraatti-reitti (DC/4HB) (Saini *et al.* 2011). Tässä luvussa keskitytään tarkemmin yleisyytensä takia Calvinin kiertoon ja WL-reittiin asetogeenisillä bakteereilla, joita voidaan käyttää kaasufermentaation tuottajaorganismeina.

### 2.1 Calvinin kierto

Calvinin kierto, toiselta nimeltään Calvin-Benson-Bassham-reitti (CBB) on syklinen reaktiosarja, jonka kaksi tärkeintä entsyymiä ovat ribuloosi-1,5-bisfosfaattikarboksylaasi (Ru-bisco) ja fosforibulokinaasi (Madigan *et al.* 2019, s. 441). Kuvassa 1 esitetään yksinkertaistettu versio Calvinin kierrosta.



**Kuva 1.** Calvinin kierto yksinkertaistettuna, adenosiinitrifosfaatti (ATP), nikotiiniamiidieniidinukleotidifosfaatti (NADPH) (Muokattu lähteestä Madigan et al., 2019, s. 441).

Calvinin kierron alussa Rubisco-entsyymi katalysoi ribuloosi-1,5-bisfosfaatin karboksylaation 3-fosfoglyseraatiksi. Tämän jälkeen 3-fosfoglyseraatti fosforyloidaan ja pelkistetään glyseraldehydi-3-fosfaatiksi. Osa glyseraldehydi-3-fosfaatista ohjataan tässä vaiheessa solun muihin biosynteeseihin. Jäljellä oleva glyseraldehydi-3-fosfaatti regeneroidaan takaisin ribuloosi-1,5-bisfosfaatiksi useilla entsyymeillä muun muassa fosforibulokinaasilla. Yhteensä 13 entsyymiä osallistuu Calvinin kierron reaktioiden katalysointiin. (Saini *et al.* 2011) Calvinin kierto on fotosynteesin toisessa vaiheessa tapahtuva reaktiosarja, mikä tekee siitä hyvin merkittävän aineenvaihduntareitin globaalien hiilensidonnan kannalta.

## 2.2 Asetogeenit ja Wood-Ljungdahl-reitti

Asetogeenit ovat anaerobisia bakteereita, jotka pelkistävät hiilidioksidia solunrakennusaineeksi ja energiantuotantoon Wood-Ljungdahl (WL) aineenvaihduntareitin, toiselta nimeltään asetyylikoentsyymi-A (Asetyyli-KoA) -reitintä kautta. Asetogeenit tuottavat tyypillisesti aineenvaihdunnassaan asetaattia (asetogeneesi), mutta se ei ole välttämättömyys eikä siksi ole osa asetogeenin määritelmää. (Drake *et al.* 2008) Suurin osa tutkituista asetogeneista kuuluu *Acetobacterium*- ja *Clostridium*-suvun bakteereihin. Asetogeenit voivat CO<sub>2</sub>:n lisäksi käyttää hiilenlähteenä mm. hiilimonoksidia (CO), mutta ne pystyvät kasvamaan myös heterotrofisesti orgaanisilla substraateilla (miksotrofia). (Müller 2003)



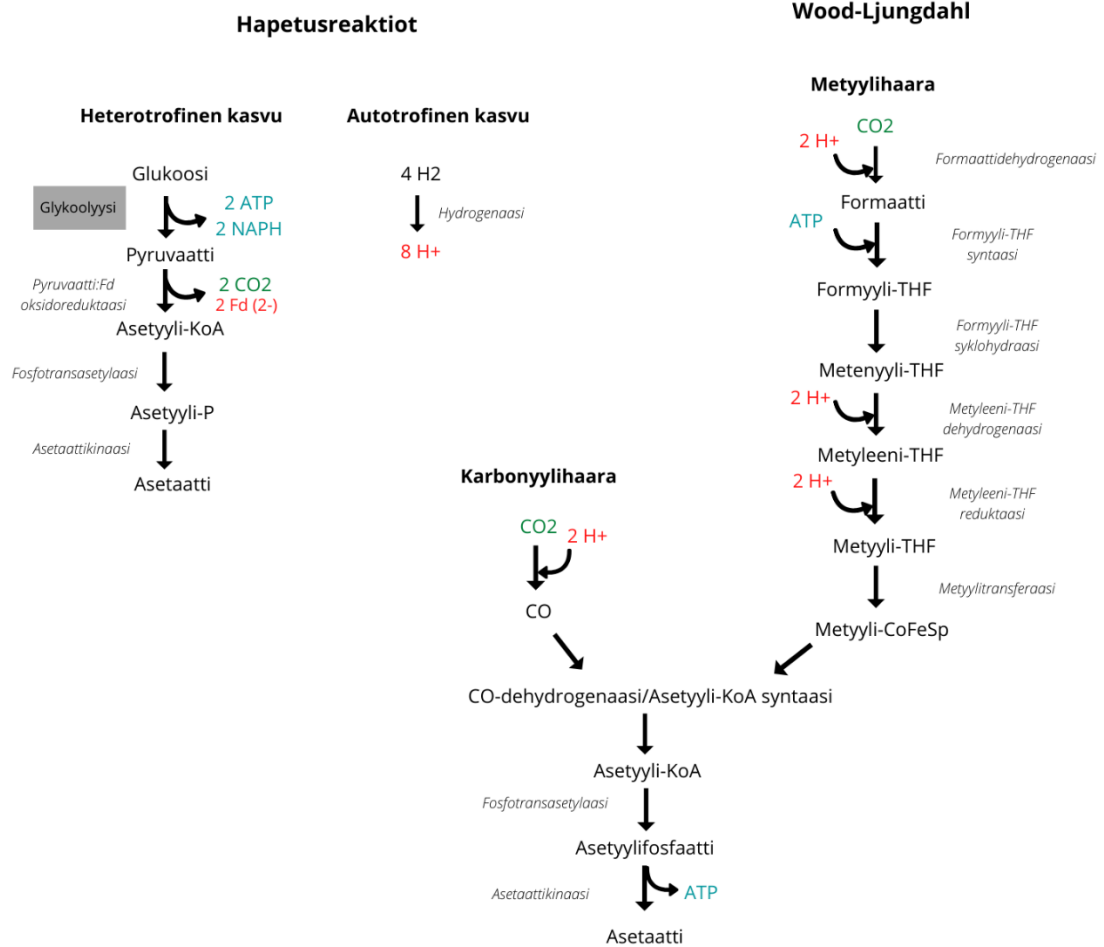
Heterotrofisen kasvun aineenvaihduntaan ei perehdytä tässä kandidaatintyössä, mutta se on esitetty WL-reitin kanssa kuvassa 2.

Autotrofisen kasvun aikana asetogeenit saavat pelkistysvoimaa (elektroneja) vetykaasusta, josta ne tuottavat protoneja hydrogenaasi-entsyymillä. Mikäli asetogeeni kasvaa pelkällä hiilimonoksidilla, pelkistysvoimaa saadaan hapettamalla hiilimonoksidi ensin hiilidioksidiksi vesi-kaasu-reaktiossa (biological water-gas shift reaction) CO-dehydrogenaasin (CODH) vaikutuksesta (Köpke *et al.* 2011). Koska autotrofinen kasvu asetogeenineillä ei itsessään vapauta energiaa solujen biomassan tuotantoon, netto-ATP:n tuotanto on WL-reitissä poikkeuksetta kytkettynä ionigradietti-välitteiseen energiantuotantoon ATP-syntaasilla (Schuchmann & Müller 2014).

WL-reittiä pidetään vanhimpana hiilidioksidia sitovista metaboliareiteistä, peräisin ajalta, jolloin maapallon ilmakehässä ei ollut vielä happea. Toisin kuin muut hiilidioksidia sitovat reitit, se on lineaarinen ja kohtalaisen yksinkertainen käyttämiensä entsyymien lukumäärän (kahdeksan entsyymiä) suhteen. (Drake *et al.* 2008) WL-reitti jakautuu kahteen lineaariseen haaraan, joista toinen tuottaa asetaatin karbonyyliosan (carbonyl branch) ja toinen metyyliosan (methyl branch).

Metyylihaarassa ensimmäisenä hiilidioksidi pelkistyy formiaatiksi, joka liitetään tetrahydrofolaattiin (THF) muodostaen yhdisteen formyyli-THF. Seuraavaksi formyyli-THF pelkistyy metenyli-THF:ksi ja siitä edelleen metyleeni-THF:n kautta metyyli-THF:ksi. Lopuksi metyyli-THF:n osaksi CO-dehydrogenaasi/asetyyli-KoA syntaasi -entsyymikompleksin (CODH/ACS) alayksikköä. (Schuchmann & Müller 2014)

Karbonyylihaarassa hiilidioksidi pelkistyy hiilimonoksidiksi CODH:n vaikutuksesta. WL-reitin tärkein väliaine asetyyli-KoA muodostetaan hiilimonoksidista, metyylistä ja kofaktori KoA:sta CODH/ACS:n katalysoimalla reaktiolla. Viimeisessä vaiheessa asetyyli-KoA muunnetaan asetaatiksi fosfotransasetyylaasin ja asetaattikinaasin vaikutuksesta. Fosfotransasetyylaasin katalysoimassa substraattitaso fosforylaatioon vapautuu yksi ATP, joka kuluu metyylihaaran formyyli-THF:n synteesiin. (Schuchmann & Müller 2014) Kuvassa 2 on esitetty WL-reitin vaiheet ja niitä katalysoivat entsyymit. Yhden asetaattimolekyylin tuottaminen vaatii siis kaksi hiilidioksidimolekyylä, kahdeksan protonia ja yhden ATP:n.



**Kuva 2.** Wood-Ljungdahl aineenvaihduntareitti (muokattu lähteestä Schuchmann & Müller 2014).

Kuten aiemmin mainittiin, asetogeneesi ei vapauta netto-ATP:tä solujen käyttöön, koska yksi substraattitason fosforylaatiolla syntyvä ATP kuluu formyyli-THF:n muodostumiseen kuvan kaksi mukaisesti. Energiantuotantoon solut hyödyntävät asetatiin synteesin kytettyä kemiosmoottista mekanismia, jossa energiaa saadaan solukalvolle syntyvällä ionigradientilla. Ionigradientti muodostetaan RNF (Rhodobacter nitrogen fixation)- tai ECH-kompleksilla (Energy conserving hydrogenase). (Schuchmann & Müller 2014) RNF-kompleksi on entsyymi, joka kytkee pelkistyneen ferredoksiiniin (Fd<sup>2-</sup>) hapettumisen NAD<sup>+</sup>:n pelkistämiseen (Westphal *et al.* 2018). ECH-kompleksi puolestaan on entsyymi, joka kytkee pelkistyneen ferredoksiiniin hapettamisen ja H<sup>+</sup>:n pelkistymisen. Reaktioissa vapautuva energia käytetään solukalvon ionigradientin muodostamiseen. Ionigradientti voi muodostua joko vety- tai natriumioneilla. Ionigradientin aikaansaama elektrokemiallinen potentiaali antaa energian ATP-syntaasin toimintaan. Vastoin kuin aiemmin on ajateltu, Schoelmerich *et al.* mukaan energian varastoinen ATP:ksi on mahdollista myös käyttämällä sekaionigradienttia, jossa kaksi erillistä ATP-syntaasia toimii toinen RNF-

kompleksin välityksellä  $\text{Na}^+$ -ioneilla ja toinen ECH-kompleksin välitteisesti  $\text{H}^+$ -ioneilla. (Schoelmerich *et al.* 2020)

Jotta ferredoksiini voi luovuttaa elektroneja RNF-kompleksille (tai ECH-kompleksille), sen on oltava pelkistyneessä muodossa ( $\text{Fd}^{2-}$ ). Ferredoksiini voidaan pelkistää hiilimonoksidilla suoraan, koska redox-parin  $\text{CO}/\text{CO}_2$  pelkistyspotentiaali on matalampi kuin  $\text{Fd}_{\text{ox}}/\text{Fd}^{2-}$  (Bertsch & Müller 2015). Jos redox-parin elektronilähde on vetykaasu, on ferredoksiinin pelkistäminen termodynaamisesti epäsuotuisa reaktio, koska  $\text{Fd}_{\text{ox}}/\text{Fd}^{2-}$ :n pelkistyspotentiaali on suurempi kuin  $2 \text{H}^+/\text{H}_2$ :n pelkistyspotentiaali. Tässä tapauksessa ferredoksiinin pelkistäminen tapahtuu elektronibifurkaatioissa, joka kytkee eksergonisen reaktion ( $\text{NAD}^+$  pelkistymisen) endergoniseen reaktioon ( $\text{Fd}_{\text{ox}}$  pelkistyminen). Elektronibifurkaatioissa hydrogenaasi-entsyymien flaviini-kofaktori vastaanottaa kerrallaan kaksi elektronia vetykaasulta ja luovuttaa toisen niistä  $\text{NAD}^+$ :lle ja toisen  $\text{Fd}_{\text{ox}}$ :lle. Sen takia yhteensä kaksi molekyyliä vetykaasua vaaditaan pelkistämään yksi  $\text{Fd}_{\text{ox}}/\text{Fd}^{2-}$ :ksi. (Madigan *et al.* 2019, s. 463) Mikäli asetogeenin elektronilähde on vetykaasu, tuottaa yhden asetaatin biosynteesi yhteensä 0,3 ATP:tä ja jos elektronilähde on hiilimonoksidi, tuottaa yhden asetaatin biosynteesi 1,5 ATP:tä (Bertsch & Müller 2015).

## 3. KAASUFERMENTAATIO BIOTUOTTEIDEN VALMISTUSMENETELMÄNÄ

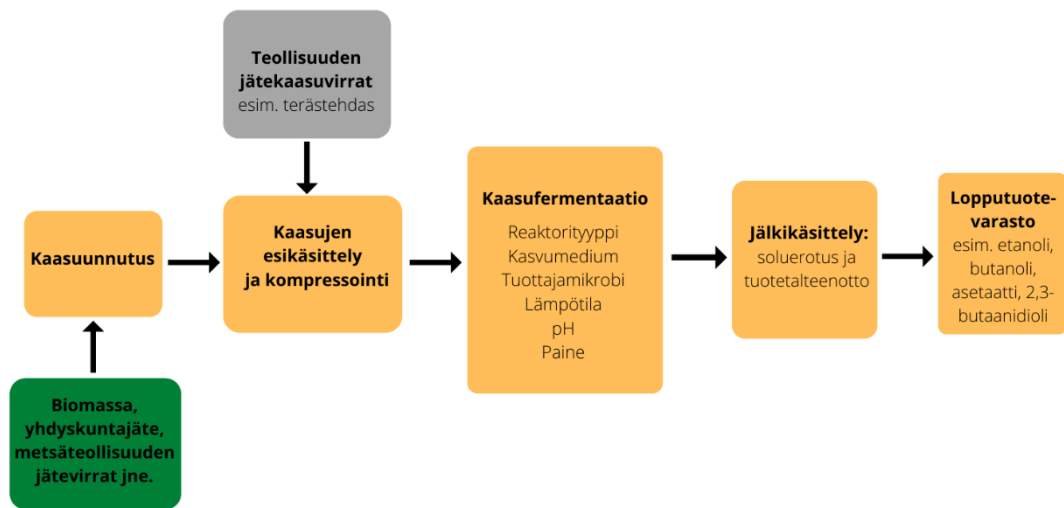
Asetogenejä tutkitaan kemikaalien ja biopolttoaineiden tuotantoalustana paljon, koska niiden käyttämä WL-reitti on kuudesta hiilidioksidia sitovasta aineenvaihduntareitistä tehokkain (Humphreys & Minton 2018). Tämän lisäksi ne mahdollistavat fossiilisista raaka-aineista riippumattoman kemikaalien ja polttoaineiden tuotannon. Hiilidioksidipohjaiset biopolttoaineet eivät myöskään kilpaile ruoantuotannon kanssa kuten ensimmäisen sukupolven biopolttoaineet, jotka valmistetaan perinteisesti sokerista tai muista viljelykasvista, mitkä vaativat runsaasti maa-aluetta viljelyyn (Lee & Lavoie 2013). Bakteerilajista riippuen WL-reitin luontaisia lopputuotteita ovat asetaatti, etanoli, butyraatti, butanoli ja 2,3-butaanidioli. Etanolia ja butanolia voidaan käyttää polttoaineissa, kun taas asetaatti ja 2,3-butaanidioli ovat hyödyllisiä esiasteyhdisteitä kemianteollisuudessa. (Daniell *et al.* 2012)

### 3.1 Kaasufermentaatioprosessi

Kaasufermentaatio on prosessi, jossa kaasumaisia raaka-aineita muunnetaan fermentaatioissa muiksi kemiallisiksi yhdisteiksi. Biokatalyyysissä mikrobi muuntaa aineenvaihduntareaktioidensa kautta lähtöaineen lopputuotteeksi. Kaasufermentaation raaka-aineina käytetään tyypillisesti synteetikaasua (syngas), joka on seos hiilidioksidia, hiilimonoksidia ja vetykaasua (Teixeira *et al.* 2018). Synteetikaasua voidaan tuottaa maakaasusta, hiilestä tai vaihtoehtoisesti biomassassa ja jätevirroista kaasuunnuttamalla. Esimerkiksi yhdyskuntajätettä voidaan käyttää raaka-aineena kaasuunnuttamalla. (National Energy Technology Laboratory 2014) Synteetikaasujen lisäksi kaasufermentaation raaka-aineena voidaan käyttää teollisuuden savukaasuja esimerkiksi terästeollisuudesta (Liew *et al.* 2016). Haasteena teollisuuskaasujen ja kaasuunnutetun biomassan käytössä raaka-aineena ovat epäpuhtaudet, jotka saattavat inhiboida mikrobien aineenvaihduntaa ja siten häiritä fermentaatioprosessia. Kaasusubstraatin esikäsitteilytarve vaihtelee riippuen kaasusubstraatin laadusta ja koostumuksesta. Esimerkiksi synteetikaasuista löydetty epäpuhtaudet, kuten ammoniakki, typpioksidi ja tervapienihiukkaset, aiheuttavat haittavaikutuksia fermentaatioprosessiin. (Xu *et al.* 2011) Koska asetogeeniset bakteerit ovat anaerobisia, on kaasusubstraatin sisältämä happi poistettava ennen fermentointia. Kemiallisen hapenpoiston lisäksi on esitetty biologisia kahden mikrobin

systemejä, joista toinen bakteerilaji hyödyntää kaasuseoksen hapen ja tuottaa bioreaktoriin aineenvaihdunnallaan muun muassa hiilidioksidia, jota asetogeeninen bakteeri pystyy hyödyntämään. (Wu *et al.* 2016, Mohr *et al.* 2019)

Kuvassa 3 esitetään tyypillinen kaasufermentaation prosessikaavio. Prosessin pääpiirteet ovat vastaavanlaisia kuin tavanomaisessa fermentaatioprosessissa. Prosessi alkaa kaasun esikäsitteilyllä ja kompressoinnilla, josta se johdetaan fermentoriin tuottajaorganismien käyttöön. Fermentoinnin jälkeen lopputuote erotellaan soluista ja kasvumediumista ja puhdistetaan. Tämän jälkeen lopputuote voidaan varastoida tai siirtää jatkojalostukseen.



**Kuva 3.** Kaasufermentaation prosessikaavio (muokattu lähteestä Köpke *et al.* 2011).

Kaasufermentaatioon käytetään tuottajaorganismina tyypillisesti *Clostridium*-suvun bakteereita, joista erityisesti *C. ljungdahlii* ja *C. autoethanogenum* ovat osoittautuneet hyviksi tuottajaorganismeiksi kaupalliselle etanolin tuotannolle (Köpke *et al.* 2010). Niiden aineenvaihdunnan mallina voidaan käyttää paremmin tunnettuja ABE-fermentaatioissa (acetone-butanol-ethanol) sokeria ja tärkkelystä fermentoivia muita *Clostridia*-bakteereja (Liew *et al.* 2013).

Kaasufermentaatio tarjoaa useita etuja verrattuna kemialliseen synteesiin kuten Fischer–Tropsch-prosessiin, jossa synteesikaasu muunnetaan metallikatalyytin avulla termokemiallisesti hiilivedyiksi. Biokatalyyysi ei vaadi tarkkaa kaasusubstraatin H<sub>2</sub>/CO-suhdetta ja sietää paremmin kaasusubstraatin epäpuhtauksia verrattuna kemialliseen synteesiin, mikä vähentää kaasun esikäsitteilytarvetta. Toleranssi epäpuhtauksiin on erityi-

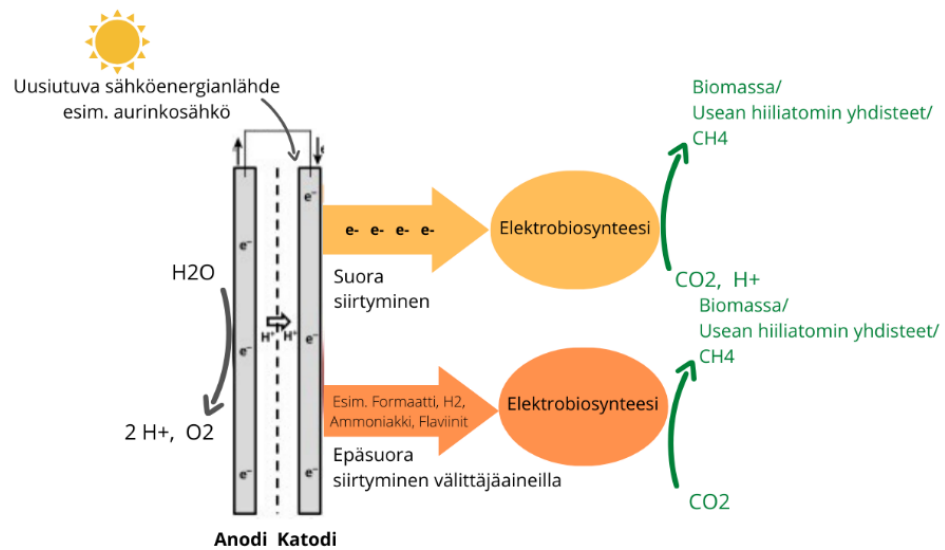
sen hyödyllistä silloin, kun raaka-aineena käytetään yhdyskuntajätteestä kaasuunnettua substraattia, jonka koostumus voi vaihdella paljon. Prosessin käyttökustannusten näkökulmasta fermentaatio on edullisempi prosessi, koska biokatalyysi voidaan suorittaa matalassa lämpötilassa ja paineessa, kun taas kemialliset katalyytit tyypillisesti vaativat korkean lämpötilan ja paineen. (Griffin & Schultz 2012)

### 3.2 Elektrobiosynteesi

Elektrobiosynteesi (microbial electrosynthesis, MES) on prosessi, jossa mikrobi vastaanottaa elektrokemiallisen kennon katodilta elektroneja, joilla se pelkistää hiilidioksidia orgaanisiksi yhdisteiksi. Mikrobi voi kasvaa katodin pinnalla biofilminä tai kasvatusmediumissa, johon katodi on upotettu. (PrévotEAU *et al.* 2020) Erona kaasufermentaatioon on elektronien lähde, joka on katodi. Elektrobiosynteesissä hiilenlähteenä käytetään kuitenkin kaasusubstraattia, minkä takia elektrobiosynteesi voidaan luokitella yhdeksi kaasufermentaation osa-alueeksi.

Useat asetogeeniset bakteerit, kuten *Sporomusa ovata*, *S. silvacetica*, *S. sphaeroides*, *C. ljungdahlii*, *C. acetivum* ja *Moorella thermoacetica* pystyvät hyödyntämään katodia ulkoisena elektronidonorina hiilidioksidin pelkistämisessä asetaatiksi (Nevin *et al.* 2011). Asetaatin lisäksi myös etanolia, butanolia, 2,3-butaanidiolia, butaanihappoa (voihappo), heksanolia ja kapronihappoa on tuotettu MES-prosessilla (PrévotEAU *et al.* 2020). Jourdin *et al.* (2015) raportoivat vuonna 2015 asetaatin siihen saakka korkeimman tuotantotehon ( $685 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ).

Elektronien siirtymistä katodilta soluun kutsutaan solunulkoiseksi elektronisiirtymiseksi (extracellular electron transfer, EET). Sen mekanismiksi on esitetty ns. suoraa siirtymistä (direct electron transfer) ja epäsuoraa siirtymistä (mediated) välittäjäaineilla, jotka ovat tyypillisesti pienikokoisia redox-välittäjäyhdisteitä. (Tremblay *et al.* 2016) Kuva 4 havainnollistaa elektronien siirtymistä katodilta soluun ja antaa esimerkkejä mahdollisista aineista/yhdisteistä, jotka voivat toimia elektronisukkulana katodin ja solun välillä. Elektronien siirtymismekanismi katodilta soluun ei kuitenkaan tunneta vielä täysin.



**Kuva 4.** Solunulkoinen elektronisiirtyminen. Elektrobiosynteesissä toimiva mikrobi voi vastaanottaa elektroneja katodilta suoraan tai välittäjäaineiden kautta. Suorassa siirtymisessä pelkästään elektronit siirtyvät. Välittäjäaineilla siirtyvät elektronit osallistuvat yhdisteen redox-reaktioon ja välittävät sitä kautta elektroneja soluun. (Muokattu lähteestä Tremblay et al. 2016)

Elektrobiosynteesin suurimmat haasteet menetelmän kaupallistamisen kannalta ovat lopputuotteiden matala saanto ja tuotantoteho sekä heikko selektiivisyys muilla lopputuotteilla kuin asetaatilla. Ei-haluttujen tuotteiden, kuten ylimääräisen asetaatin, kertyminen bioreaktoriin heikentää prosessin tehokkuutta ja lisää jälkikäsittelyn tarvetta, joka puolestaan nostaa prosessin hintaa. Matalat tuotesaannot johtuvat pääasiassa ongelmista elektronien siirtymisessä tai niiden matalasta käyttöasteesta solussa. (Prévot et al. 2020)

### 3.3 Integroidut mikrobisysteemit

Pitkäketjuisten hiiliyhdisteiden tuottaminen on energieettisesti raskasta, ja siksi niitä on haastavaa tuottaa asetogeeneillä, joiden aineenvaihdunta tuottaa vain vähän ATP:tä (Rabaey et al. 2011). Mahdollinen ratkaisu kyseiseen ongelmaan voisi löytyä yhdistämällä kahden mikrobin vahvuudet siten, että toinen sitoo hiilidioksidia asetaatiksi (asetogeeni) ja toinen (aerobinen bakteeri) tuottaa asetaatista arvokkaampia lopputuotteita.

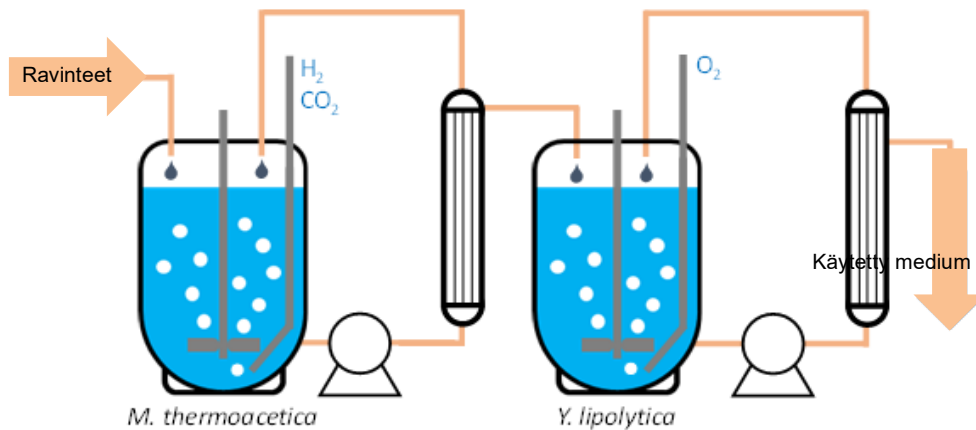
Pitkäketjuisten hiilivetyjen tuotantoa kahden mikrobin systeemillä on tutkittu esimerkiksi *Acetobacterium woodiilla* ja geneettisesti muokatulla *Acinetobacter baylyi* ADP1 -kannalla. Lehtinen et al. muokkasivat *A. baylyi* ADP1 -kannan ilmentämään entsyymejä,

jotka osallistuvat hiilivetyketjun biosynteesiin. Pitkäketjuisten hiilivetyjen tuotanto mikrobeilla on mielenkiintoinen tutkimuksen kohde, koska niitä voidaan käyttää drop-in-polttoaineina korvaamaan esimerkiksi lentopetrolia. (Lehtinen *et al.* 2018) Drop-in-polttoaineilla tarkoitetaan sellaisia polttoaineita, joita voidaan käyttää suoraan autojen nykyisillä moottoreilla. Myös vahaesterien (pitkäketjuisia rasvahappoestereitä) tuotanto on toteutettu käyttämällä kahden mikrobin systeemiä. Systeemin ensimmäisessä vaiheessa käytettiin elektrobiosynteesiä asetaatin tuotantoon, minkä jälkeen asetaatti muunnettiin vahaestereiksi *A. baylyi* ADP1 -kannalla. (Lehtinen *et al.* 2017)

Hu *et al.* toteuttivat integroidun gas-to-lipids-bioprosessin käyttäen *Moorella thermoaceticaa* asetaatin tuotantoon ja *Yarrowia lipolyticaa* lipidien synteesiin. Asetaatin korkein tuottavuus saavutettiin käyttämällä yhdistelmää kaasusubstraateilla CO<sub>2</sub> ja H<sub>2</sub>/CO. Yhdistetyn prosessin asetaatti- ja lipidipitoisuudet olivat 25 g/L ja 18 g/L. Erityisesti lipidipitoisuus laski yhdistetyssä prosessissa verrattuna yksivaiheiseen prosessiin (46 g/L), mutta tutkimus osoittaa, että yhdistetty bioprosessi on toteuttamiskelpoinen hiilidioksidin muuntamiseksi lipideiksi esimerkiksi biodieselin jalostukseen. (Hu *et al.* 2016) Tähän mennessä pitkäketjuisten hiiliyhdisteiden tuotantoa bakteereilla on toteutettu ainoastaan laboratoriomittakaavassa.

Kuvassa 5 esitetään integroidun mikrobisysteemin toiminta, missä ensimmäinen bioreaktori on anaerobinen ja jälkimmäinen on aerobinen. Anaerobiseen bioreaktoriin syötetään synteesisikaasua ja kasvumediumia, joka sisältää tuottajaorganismien kasvuun tärkeitä ravinteita. Bioreaktoreiden sisältöä sekoitetaan jatkuvasti. Ensimmäisestä bioreaktorista ohjataan asetaattipitoista biomassaa aerobiseen bioreaktoriin, josta voidaan fermentoinnin päätyttyä eritellä käytetty kasvumedium ja lopputuote toisistaan. Aerobisessa fermentorissa syntyvää hiilidioksidia voidaan kierrättää takaisin ensimmäisen bioreaktorin lähtöaineeksi. Prosessissa syntyvä hiilidioksidin määrä on pienempi kuin prosessiin sitoutuva hiilidioksidi, joten kokonaisuudessa se sitoo hiilidioksidia. (Hu *et al.* 2016) Yksivaiheisessa prosessissa lopputuote erotellaan jo ensimmäisen fermentoinnin jälkeen.





**Kuva 5.** Integroidun bioprosessin kaaviokuva gas-to-lipid-prosessista CSTR-bioreaktorilla (continuous stirred-tank reactor). Anaerobisen fermentorin (ensimmäinen) asetaattipitoista kasvumediumia kierrätetään aerobiseen fermentoriin (toinen) lähtöaineeksi lipidisynteesille. (Muokattu lähteestä Metabolic Engineering Laboratory 2017)

Kun tavoiteltavaa lopputuotetta ei voida valmistaa tai valmistus on vaikeaa yksinomaan mikrobisysteemeillä, voidaan biokatalyyysi kytkeä kemialliseen katalyyysiin. Esimerkiksi kaasufermentaatiolla tuotetut lyhytketjuiset alkoholit kuten etanoli ja butanoli voidaan jatkojalostaa lentopetroliksi alcohol-to-jet (ATJ) -valmistusmenetelmällä. (Liew *et al.* 2016) Kaasufermentaatiolla tuotettu etanoli ja 2,3-butaanidioli voidaan puolestaan jatkojalostaa kemiallisella prosessilla butadieeniksi, jota käytetään raaka-aineena muovien ja synteettisen kumin valmistuksessa (Makshina *et al.* 2012, Duan *et al.* 2015).

### 3.4 Uuden sukupolven geenimuokatut mikrobisysteemit

Yksi bioteknologisen tuotannon suurimmista eduista on, että mikrobeja voidaan geneettisesti muokata valmistamaan kaupallisesti arvokkaampia lopputuotteita, mitä ne luontaisesti tuottaisivat (Humphreys & Minton 2018). Mitä suurempi arvonlisäys tuotantoprosessilla saavutetaan, sitä kannattavampaa tuotannosta tulee. Metaboliamuokkausta voidaan hyödyntää täysin uusien lopputuotteiden lisäämiseen tuottajaorganismien aineenvaihduntaan (synteettiset aineenvaihduntareitit) tai optimoimaan aineenvaihduntareittiä tuottajaorganismien luontaisilla lopputuotteilla.

Ensimmäinen proof-of-concept-tutkimus asetogeenien geneettisestä muokkauksesta julkaistiin vuonna 2010 (Köpke *et al.* 2010). Tutkimuksessa isäntäsoluun (*C. ljungdahlii*) lisättiin synteettinen plasmidi, joka sisälsi butanolin biosynteesin geenejä *C. acetobutylicum*sta. Rekombinantti *C. ljungdahlii* tuotti butanolia 2 mM. Vuotta myöhemmin eri promootoria hyödyntäen butanolinkonsentraatio nousi korkeimmillaan 25,66 mM:iin (Köpke

& Liew 2011). Butanoli on ominaisuuksiltaan muihin perinteisiin biopolttoaineisiin verrattuna lupaava vaihtoehto käytettäväksi liikenteessä (Jin *et al.* 2011). Butanolin lisäksi muitakin ei-natiiveja lopputuotteita kuten liuottimia on valmistettu geneettisesti muokatuilla mikrobeilla. Esimerkiksi asetonia on valmistettu *A. woodiilla* muokkaamalla siihen asetonin biosynteesireitti *C. acetobutylicumsta*. Korkein asetonikonsentraatio tutkimuksessa oli  $15,2 \pm 3,4$  mM. (Hoffmeister *et al.* 2016).

Asetaatin syntymistä sivutuotteena pyritään välttämään, koska se heikentää prosessin tehokkuutta, kun osa substraatista kuluu ei-toivotun tuotteen valmistamiseen. Sivutuotteiden eliminointiin tähdännyt metaboliamuokkaus on ensimmäisen kerran raportoitu vuonna 2012. Eliminoidakseen asetaatin valmistuksen etanolituotannossa Berzin *et al.* (2012) inaktivoivat fosfotransasetylaasi-geenin (pta), joka katalysoi asetyyli-KoA:n muuntamista asetaatiksi käyttämällä ns. ”suicide-plasmidia”, joka ei pysty replikoitumaan itsenäisesti. Lisäksi yliekspressoimalla alkoholidehydrogenaasi-geeniä (adh) saavutettiin etanolituotannon kasvu 590 mM:iin ilman asetaattia sivutuotteena. Alkuperäinen muokkaamaton *Clostridium*-kanta tuotti 250 mM etanolia ja 273 mM asetaattia. (Berzin *et al.* 2012) Vuonna 2017 Liew *et al.* raportoi kasvattaneensa etanolituotantoa *C. autoethanogenumissa* parhaimmillaan 180 % ja vähentäneen ei-toivotun asetaatin kertymää 38%. Tutkijat hyödynsivät ClosTron-mutageneesiä ja alleelivaihtoa aldehydi/alkoholi dehydrogenaasi-geenin (AdhE) inaktivaatiossa. (Liew *et al.* 2017)

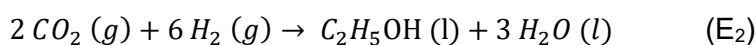
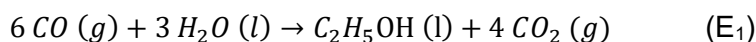
Myös CRISPR-tekniologiaa (Clustered regularly interspaced palindromic repeats) (Lino *et al.* 2018) on kehitetty ja hyödynnetty asetogeneille sopivaksi. Tutkimuksissa Huang *et al.* (2016) ja Nagaraju *et al.* (2016) tutkijat onnistuivat tehostamaan geenideleetioiden tarkkuutta parhaimmillaan 100 %:iin kehittämällä CRISPR/Cas9-systeemin ilmentymistä sääteleviä promoottoreita.

Asetogeenien käyttöön tuotantoalustana liittyy haasteita, joihin ei vielä olla löydetty täysin toimivaa ratkaisua (haasteita käsitellään luvussa 4). Sen takia on myös tutkittu lähestymistapaa, jossa synteettinen autotrofia muokataan heterotrofiseen mikrobiin, joka on teollisessa biotekniikassa laajasti käytetty ja aineenvaihdunnaltaan asetogenejä paremmin tunnettu. Tällaisia mikrobeja ovat esimerkiksi *Escherichia coli* ja hiivat. (Liew *et al.* 2016) Vuonna 2019 paljon mielenkiintoa herättivät läpimurtotutkimukset, joissa heterotrofi mikrobi muunnettiin aineenvaihdunnaltaan autotrofiksi. Näin perustavanlaatuisista aineenvaihdunnan uudelleenohjelmointia ei olla aiemmin onnistuttu tekemään. Tutkimuksissa Gassler *et al.* ja Geizer *et al.* isäntäsoluihin onnistuttiin luoda ja ylläpitää synteettinen autotrofia, jossa hiilidioksidia sitoo CBB-sykli tai sen muokattu versio. Gassler *et al.* muokkasi teollisessa biotekniikassa paljon käytetyn hiivan *Pichia pastoriksen*

käyttämään ainoana hiilenlähteenään hiilidioksidia poistamalla kolme alkuperäistä geeniä ja lisäämällä sen genomiin kahdeksan heterologista geeniä. Geenimuokkaukset kromosomiin tuotettiin CRISPR/Cas9-välitteisellä homologisella rekombinaatiolla. Vastavasti, Geizer *et al.* muunsi *E. coli*n käyttämään aineenvaihdunnan substraatteina hiilidioksidia ja formiaattia siten, että biomassan hiili on yksinomaan peräisin hiilidioksidista ja pelkistysvoima sekä energia formiaatista. Autotrofinen *E. coli* tuotettiin poistamalla kolme alkuperäisen aineenvaihdunnan geeniä ja lisäämällä neljä heterologista geeniä käyttäen P1-transduktiota. Rekombinanttinen *E. coli* saavutti autotrofian 200 päivän laboratorioevoluution jälkeen. (Gassler *et al.* 2019, Gleizer *et al.* 2019) Edellä kuvatut tutkimukset osoittavat, että mikrobien aineenvaihdunta on erittäin joustavaa ja sopeutuvaa, ja että metaboliamuokkauksella on mahdollista saada aikaan teollisuudelle hyödyllisiä bakteerikantoja, jotka eroavat merkittävästi luonnonkannasta, mutta ovat silti elinkykyisiä.

### 3.5 Prosessiesimerkki kaasufermentaation hyödyntämisestä: etanolintuotanto

Etanolin valmistusta asetogeneeilla on tutkittu eniten *Clostridium*-suvun bakteereilla kuten *C. ljungdahlii*, *C. autoethanogenum* ja *C. ragsdalei*. Etanolia voidaan valmistaa kahta reittiä pitkin: Suoraan WL-reitin välituotteesta asetyyli-KoA:sta asetaldehdydin kautta aldehydi/alkoholi dehydrogenaasilla (AdhE) tai epäsuorasti asetaatin kautta aldehydi:ferredoksiini oksidoreduktaasilla (AOR) ja alkoholi dehydrogenaasilla (Adh) (Liew *et al.* 2017). Etanolin valmistus hiilimonoksidista tai hiilidioksidista ja vetykaasusta tapahtuu stoikiometristen kaavojen  $E_1$  ja  $E_2$  mukaisesti.



ABE-fermentaatiosta tiedetään *Clostridium*-bakteerien fysiologian jakautuvan kahteen vaiheeseen: asidogeneesiin ja solventogeneesiin. Asidogeneesissä bakteerit kasvattavat biomassaa, jolloin metaboliatuotteena syntyy pääasiassa asetaattia. Solventogeneesin aikana kasvu on rajoitettua (ravinteiden loppuminen, matala pH), jolloin metabolia tuotteena syntyy etanolia. (Richter *et al.* 2016)

Etanolin tuotantoa on pyritty tehostamaan optimoimalla kasvualustan ominaisuuksia. Saxena & Tanner (2011) paransivat etanoli-asetaaatti-suhdetta *C. ragsdaleilla* nelinkertaiseksi optimoimalla hivenainemetalli-ionien (esim.  $Cu^{2+}$  ja  $Ni^{2+}$ ) konsentraatioita. Eta-

nolituotannon lisääntyminen perustui bakteerien tehostuneeseen kasvuun ja metalloent-syymien toiminnan lisääntymiseen optimoiduilla hivenainemetalli-ioni-konsentraatioilla. Toisaalta, Richter *et al.* (2016) havaitsivat etanolin tuottamiseen (*C. ljungdahlii*) tarvitta-vien entsyymien pysyvän aktiivisena myös asidogeneesin aikana. Siirtyminen solvento-geneesiin perusteltiin geneettisen regulaation sijaan termodynaamisella mallinnuksella. Tuloksista voidaan päätellä, että useat tekijät vaikuttavat bakteerin aineenvaihdunnan siirtymiseen asidogeneesistä solventogeneesiin. Lisätutkimus asetogeenien aineenvaih-dunnasta ja geeneistä on tarpeellista ymmärryksen lisäämiseksi.

Kaasufermentaation hyödyntäminen etanolin tuotannossa on ottanut merkittäviä edistys-askelia viimeisen viiden vuoden aikana. Vuonna 2018 yritys LanzaTech (LanzaTech Inc., [www.lanzatech.com](http://www.lanzatech.com)) avasi ensimmäisen kaupallisen mittakaavan (vuosikapasi-teetti 60 miljoonaa litraa etanolia) tuotantolaitoksen Kiinaan (LanzaTech 2018). Lanza-Techin tehdas on jälkiasennettu terästehtaan välittömään läheisyyteen ja hyödyntää sen savukaasuja fermentointiprosessin raaka-aineena. LanzaTech käyttää etanolin valmis-tukseen rekombinantista *C. autoethanogenum*-kanta, jolle se on myös kehittänyt gee-nimuokkauksen työkaluja optimoimaan etanolin tuotantoprosessia (Nagaraju *et al.* 2016, Díaz 2019).

Kaasufermentaatiolla tuotettu etanoli vähentää merkittävästi kasvihuonekaasupäästöjä verrattuna perinteiseen fossiiliseen bensiiniin. LanzaTechin etanolin tuotantoprosessille suoritettun elinkaarianalyysin (life cycle assesment) mukaan kaasufermentaation päästöt ovat vähintään 60% pienemmät teollisuuskaasuja substraattina käyttävässä skenaar-iossa ja lähes 90 % pienemmät, kun kaasusubstraatti valmistetaan biomassasta kaa-suunnuttamalla. LCA-analyysin oletuksena on, että ilman hyötykäyttöä kaasufermentaatiolla, teollisuuskaasut päätyisivät ilmakehään hiilidioksidipäästöinä. Biomassan kaa-suunnutuksessa syntyvällä ylimääräisellä lämmöllä voidaan tuottaa höyryä, jota voidaan käyttää prosessiin suoraan tai se muuntaa sähköksi CHP-systeemillä (combined heat and power). Lisäksi prosessissa syntyvät jätevirrat voidaan minimoida hyödyntämällä esimerkiksi veden sisäistä kiertoa bioreaktorin ja jälkikäsittelyn välillä. Kaasufermentaation suorat hiilidioksidipäästöt ilmakehään muodostuvat bioreaktorin poistokaasuvirrasta ja biologisen kiintoainejätteen anaerobisesta mädätyksestä. (Handler *et al.* 2016)

## 4. KAASUFERMENTAATION HAASTEET JA MAHDOLLISUUDET

Kaasufermentaatio on vielä kohtalaisen uusi menetelmä, minkä takia sen käyttöön liittyy haasteita, joiden ratkaisemiseksi tarvitaan vielä lisää tutkimusta. Toisaalta kaasufermentaatio tarjoaa myös merkittäviä etuja muihin menetelmiin verrattuna. Haasteita ja mahdollisuuksia on listattu taulukkoon 1.

**Taulukko 1.** Yhteenveto kaasufermentaation haasteista ja mahdollisuuksista

Haasteet	Edut ja mahdollisuudet
Asetogeenit kasvavat hitaasti ja niiden aineenvaihdunta ei luontaisesti tuota paljon ATP:tä biomassan kasvattamiseen.	Sitomalla kasvihuonekaasupäästöjä käyttöhyödykkeisiin voidaan lieventää ilmastonmuutosta ja edistää kiertotaloutta.
Pitkien hiiliketjujen/korkeaenergisten yhdisteiden tuottaminen on hankalaa asetogeenillä.	Polttoaine- ja kemikaalituotanto voidaan kytkeä irti fossiilisista ja ruoaksi kelpaavista raaka-aineista.
Tuotantomikrobien substraattikäyttö jää matalaksi, jos kaasu–neste-massansiirto ei ole tarpeeksi tehokasta. Tämä johtaa mataliin tuotesaantoihin.	Teollisuuden jätekaasut ovat edullisia raaka-aineita ja niillä on hyvä saatavuus. Kaasuunnuksella voidaan tuottaa raaka-ainetta monista eri materiaallivirroista.
Kaasusubstraatit voivat sisältää biokatalyyysiä inhiboivia epäpuhtauksia.	Metaboliamuokkaus mahdollistaa laajan tuotevalikoiman ja biosynteesireittien optimoinnin.
Suuren mittakaavan tuotantolaitoksia ei ole vielä tarpeeksi vastaamaan kysyntään. Uusien tuotantolaitosten perushankintakustannukset ovat korkeita.	Verrattuna kemiallisiin synteesireitteihin (esimerkiksi Fischer–Tropsch), prosessin käyttökustannukset ovat matalammat ja biokatalyyysin sietää paremmin kaasusubstraatin vaihtelevaa koostumusta ja epäpuhtauksia.

Asetogeeniset bakteerit ovat tyypillisesti hitaita kasvamaan. Hitaan kasvun taustalla on bakteerisolun energiantuotannon romahtaminen korkeissa asetaattipitoisuuksissa, jolloin solun pH laskee, mikä estää ionigradientin muodostamista, mikä lopulta johtaa ATP-synteesin romahtamiseen (Baronofsky *et al.* 1984). Pelkistävän metabolian tehostamiseen tutkijat ovat esittäneet eri substraattien cofeeding-menetelmää. Menetelmän ideana on lisätä pääsubstraatin (hiilidioksidi) joukkoon rajoitetusti ns. lisäravinteena yhdistettä (dopantti), jota mikrobi suosii substraattina luontaisesti, kuten glukoosia. Park *et al.* havaitsivat dopantin lisäämisen kasvumediumiin tehostavan ATP- ja NADPH-synteesiä ilman pääsubstraatin inhibitiota. Cofeeding-menetelmällä lopputuotesaanto oli korkeampi kuin erikseen kasvatetuilla yhden substraattien viljelmillä yhteensä. (Park *et al.* 2019)

Toinen merkittävä haaste ja pullonkaulatekijä kaasufermentaatioissa on substraatin kaasu–neste-massansiirto. Kaasusubstraatin rajoittunut liukeneminen kasvumediumiin johtaa substraatin matalaan käyttöasteeseen mikrobeilla, mikä puolestaan johtaa prosessin huonoon tuottavuuteen. (Munasinghe & Khanal 2010) Synteesikaasun massansiirto ( $\text{CO}$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ ) on alhaisempaa kuin perinteisessä aerobisessa fermentoinnissa hapen massansiirto, koska hiilimonoksidin ja vetykaasun liukoisuus nesteeseen on matalampi kuin hapella (Liew *et al.* 2013). Lämpötilaa laskemalla voidaan parantaa kaasujen liukoisuutta nesteeseen, mutta se on myös oleellinen tekijä mikrobien kasvun kannalta. Mesofiilisten bakteerien optimaalinen kasvulämpötila on 30-40 °C, joten lämpötilan merkittävä lasku alle optimilämpötilan heikentäisi mikrobien kasvua. (Munasinghe & Khanal 2010) Kaasu–neste-massansiirtoa on tehostettu esimerkiksi lisäämällä nanopartikkeleita kasvumediumin joukkoon. Tutkimuksessa Kim *et al.* (2014) kuudesta testatusta nanopartikkelista hydrofobinen metyyliiryhmällä funktionalisoitu silikapohjainen partikkeli paransi kaasujen liukoisuutta nesteeseen eniten.  $\text{CO}$ :n,  $\text{CO}_2$ :n ja  $\text{H}_2$ :n liukoisuudet parantivat 272,9 %, 200,2% ja 156,1% verrattuna muokkaamattomaan synteesikaasuun, mikä kasvatti etanolin tuotantoa 166,1 %.

Myös bioreaktorisuunnittelulla voidaan optimoida kaasusubstraatin massansiirtoa neste-faasiin. Bioreaktorin valinnassa tärkeitä ominaisuuksia ovat korkea massansiirtoteho, matalat käyttökustannukset ja mahdollisuus hyödyntää bioreaktoria suurissa volyyymeissa. Kaasufermentaation yleisin reaktorimalli on jatkuvatoiminen sekoitusreaktori (CSTR), jossa kasvumediumia sekoitetaan jatkuvasti mekaanisella sekoittajalla ja kaasusubstraatin syöttö reaktoriin on jatkuvatoimista. Muita reaktorityyppejä ovat esimerkiksi kuplakolonnireaktori (bubble column reactor) ja immobilisoitu solukolumnireaktori (Immobilized cell column reactor) ja tihkupetireaktori (Trickle-bed reactor). (Munasinghe & Khanal 2010)

Kaasufermentaation suurin potentiaali tulevaisuudessa on arvonluominen jätevirralle (CO<sub>2</sub>, CO) ja päästöjen sitominen ilmakehästä. Fossiilisten polttoaineiden käyttö vapauttaa ilmakehään hiilidioksidia, jonka sitominen takaisin fossiiliseksi biomassaksi kestää kauan. Kaasufermentaatiolla tuotettu polttoaine puolestaan ei lisää ilmakehän päästökuormaa, koska sen hiili on peräisin jätevirrasta, joka ilman kaasufermentointia vapautuisi ilmakehään hiilidioksidina. Tästä näkökulmasta tarkasteltuna kaasufermentaation voidaan ajatella olevan hiilineutraali tuotantoprosessi.

Käyttökustannuksiltaan kaasufermentaatio on luultavasti edullisempi kuin hiilidioksidia hyödyntävät kemialliset synteetit, koska sitä voidaan operoida matalassa lämpötilassa ja paineessa, mikä pienentää prosessin energiankulutusta ja aiheuttaa siksi vähemmän kuluja. Lisäksi kaasufermentaation käyttämät raaka-aineet ovat edullista ja helposti saatavilla. Fossiiliset luonnonvarat kuten maakaasu ja öljyt ovat rajallisia ja siksi niitä ei voida hyödyntää loputtomiin. Fossiilisten materiaalivirtojen kytkeminen irti talouskasvusta on tärkeä osa kiertotalousmallia ja sen mukaisen neitseellisen materiaalikäytön vähentäminen on mahdollista toteuttaa ilman taloudellisia haittoja (Schandl *et al.* 2016). Kaasufermentaatio on tuotantoprosessi, joka tukee talouden kytkemistä irti ehtyvistä luonnonvaroista.

Tuotantomäärien osalta kaasufermentaatio ei yksinään tällä hetkellä pysty vastaamaan tuotteiden, kuten etanolin kysyntään. Vuoden 2019 etanolin tuotantomääriä tarkastellessa (noin 29 000 miljoonaa gallonia (RFA 2019)) voidaan sanoa kaasufermentaation osuuden olevan hyvin pieni markkinoiden kysynnästä. Kysyntään vastaaminen kaasufermentaatio-menetelmällä vaatisi siis uusien tuotantolaitosten rakentamista ja investointeja. Nykyisten sokerifermentaatiota hyödyntävien etanolilaitosten muuntaminen kaasufermentaatiolaitoksiksi voisi laskea kuluja verrattuna täysin uusien tuotantolaitosten rakentamiseen. Teollisuuspäästöjä hyödyntävien kaasufermentointilaitosten jälkiasennus päästölähteen läheisyyteen puolestaan vähentää raaka-ainekuljetuksista aiheutuvia kuluja ja päästöjä.

## 5. JOHTOPÄÄTÖKSET

Hiilidioksidia voidaan hyödyntää kemikaalien ja polttoaineiden tuotannossa käyttämällä asetogeenisiä bakteereita tuottajaorganismeina kaasufermentaatioprosessissa. Asetogeeniset bakteerit käyttävät Wood-Ljungdahl-aineenvaihduntareittiä, jolla voidaan tuottaa muun muassa asetaattia ja etanolia. Kaasufermentaatioissa voidaan käyttää raaka-aineena esimerkiksi biomassasta kaasuunnettua synteetikaasua tai teollisuuden jätokaasuja, jotka ovat edullisia ja saatavuudeltaan hyviä raaka-aineita. Kaasufermentaation hyödyntäminen kemikaalien ja polttoaineiden tuotannossa on ympäristölle parempi vaihtoehto kuin perinteiset valmistusmenetelmät, koska se sitoo hiilidioksidia eikä käytä fossiilisia raaka-aineita.

Kaasufermentaatioon liittyy myös haasteita, joita selittää osittain teknologian nuori ikä. Asetogeenit eivät tuota aineenvaihdunnallaan paljon energiaa, minkä takia korkeanergisten yhdisteiden, kuten hiilivetyjen ja lipidien, tuotanto on haastavaa. Yhdistämällä kaksi mikrobisysteemiä voidaan tulevaisuudessa mahdollisesti tuottaa myös edellä mainittuja arvokkaampia yhdisteitä. Bioprosessin toimivuutta voi myös heikentää kaasusubstraatin sisältämät epäpuhtaudet, jotka voivat ainakin osittain inhiboida tuottajaorganismien kasvua. Lisäksi kaasusubstraatin massansiirron tehostaminen vaatii lisätutkimusta, jotta tuottajaorganismien hiilen käyttöaste on riittävällä tasolla kannattavaan tuotantoon nähden.

Kaasufermentaation tärkeimmät tulevaisuuden kehitysalueet ovat asetogeenien energiatuotannon tehostaminen ja tuotesaantojen kasvattaminen. Energiantuotannon tehostaminen esimerkiksi cofeeding-menetelmällä on antanut lupaavia tuloksia. Myös nopeasti kehittyvät geenimuokkausmenetelmät tarjoavat ratkaisuja asetogeenien ja muiden tuottajaorganismien aineenvaihdunnan optimointiin. Kuten kaikkien uusien teknologioiden myös kaasufermentaation vakiinnuttaminen teollisuudessa vaatii kehitystyötä. Ennen kaikkea sen käyttöönotto vaatii kuitenkin hiilidioksidia hyödyntävien menetelmien arvottamista ja yhteiskunnallista tahtotilaa siirtyä pois fossiilisia luonnonvaroja hyödyntävistä menetelmistä.



## LÄHTEET

- Baronofsky, J.J., Schreurs, W.J.A. & Kashket, E.R. 1984, "Uncoupling by Acetic Acid Limits Growth of and Acetogenesis by *Clostridium thermoaceticum*", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 48, no. 6, pp. 1134–1139.
- Bertsch, J. & Müller, V. 2015, "Bioenergetic constraints for conversion of syngas to biofuels in acetogenic bacteria", *Biotechnology for biofuels*, vol. 8, no. 1, pp. 210.
- Berzin, V., Kiriukhin, M. & Tyurin, M. 2012, "Elimination of Acetate Production to Improve Ethanol Yield During Continuous Synthesis Gas Fermentation by Engineered Biocatalyst *Clostridium* sp. MTEtOH550", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 167, no. 2, pp. 338–347.
- Daniell, J., Köpke, M. & Simpson, S. 2012, "Commercial Biomass Syngas Fermentation", *Energies*, vol. 5, no. 12, pp. 5372–5417.
- Díaz, E. 2019, *Scaling the green tech revolution: LanzaTech goes industrial size*. Available: <https://synbiobeta.com/lanzatech-spearheads-the-green-tech-revolution/>, accessed January 31 2020.
- Drake, H.L., Gosharpner, A.S. & Daniel, S.L. 2008, "Old Acetogens, New Light", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1125, no. 1, pp. 100–128.
- Duan, H., Yamada, Y. & Sato, S. 2015, "Efficient production of 1,3-butadiene in the catalytic dehydration of 2,3-butanediol", *Applied Catalysis A: General*, vol. 491, pp. 163–169.
- Energy Information Administration 2019, *International Energy Outlook 2019 with Projections to 2050*.
- Gassler, T., Sauer, M., Gasser, B., Egermeier, M., Troyer, C., Causon, T., Hann, S., Mattanovich, D. & Steiger, M.G. 2019, "The industrial yeast *Pichia pastoris* is converted from a heterotroph into an autotroph capable of growth on CO<sub>2</sub>", *Nature Biotechnology*.
- Gleizer, S., Ben-Nissan, R., Bar-On, Y.M., Antonovsky, N., Noor, E., Zohar, Y., Jona, G., Krieger, E., Shamshoum, M., Bar-Even, A. & Milo, R. 2019, "Conversion of *Escherichia coli* to Generate All Biomass Carbon from CO<sub>2</sub>", *Cell*, vol. 179, no. 6, pp. 1255–1263.e12.
- Griffin, D.W. & Schultz, M.A. 2012, "Fuel and chemical products from biomass syngas: A comparison of gas fermentation to thermochemical conversion routes", *Environmental Progress & Sustainable Energy*, vol. 31, no. 2, pp. 219–224.
- Handler, R.M., Shonnard, D.R., Griffing, E.M., Lai, A. & Palou-Rivera, I. 2016, "Life Cycle Assessments of Ethanol Production via Gas Fermentation: Anticipated Greenhouse Gas Emissions for Cellulosic and Waste Gas Feedstocks", *Industrial & Engineering Chemistry Research*, vol. 55, no. 12, pp. 3253–3261.
- Hoffmeister, S., Gerdom, M., Bengelsdorf, F.R., Linder, S., Flüchter, S., Öztürk, H., Blümke, W., May, A., Fischer, R., Bahl, H. & Dürre, P. 2016, "Acetone production

with metabolically engineered strains of *Acetobacterium woodii*", *Metabolic Engineering*, vol. 36, pp. 37–47.

- Hu, P., Chakraborty, S., Kumar, A., Woolston, B., Liu, H., Emerson, D. & Stephanopoulos, G. 2016, "Integrated bioprocess for conversion of gaseous substrates to liquids", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 113, no. 14, pp. 3773–3778.
- Huang, H., Chai, C., Li, N., Rowe, P., Minton, N.P., Yang, S., Jiang, W. & Gu, Y. 2016, "CRISPR/Cas9-Based Efficient Genome Editing in *Clostridium ljungdahlii*, an Autotrophic Gas-Fermenting Bacterium", *ACS Synthetic Biology*, vol. 5, no. 12, pp. 1355–1361.
- Humphreys, C.M. & Minton, N.P. 2018, "Advances in metabolic engineering in the microbial production of fuels and chemicals from C1 gas", *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 50, pp. 174–181.
- IPCC 2018, "Global Warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty".
- Jin, C., Yao, M., Liu, H., Lee, C.F. & Ji, J. 2011, "Progress in the production and application of n-butanol as a biofuel", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 15, no. 8, pp. 4080–4106.
- Jourdin, L., Grieger, T., Monetti, J., Flexer, V., Freguia, S., Lu, Y., Chen, J., Romano, M., Wallace, G.G. & Keller, J. 2015, "High Acetic Acid Production Rate Obtained by Microbial Electrosynthesis from Carbon Dioxide", *Environmental Science & Technology*, vol. 49, no. 22, pp. 13566–13574.
- Kim, Y., Park, S.E., Lee, H. & Yun, J.Y. 2014, "Enhancement of bioethanol production in syngas fermentation with *Clostridium ljungdahlii* using nanoparticles", *Biore-source Technology*, vol. 159, pp. 446–450.
- Köpke, M., Held, C., Hujer, S., Liesegang, H., Wiezer, A., Wollherr, A., Ehrenreich, A., Liebl, W., Gottschalk, G. & Dürre, P. 2010, "*Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 29, pp. 13087–13092.
- Köpke, M. & Liew, F. 2011, *Recombinant microorganism and methods of production thereof*.
- Köpke, M., Mihalcea, C., Bromley, J.C. & Simpson, S.D. 2011, "Fermentative production of ethanol from carbon monoxide", *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 22, no. 3, pp. 320–325.
- LanzaTech 2018, *World's First Commercial Waste Gas to Ethanol Plant Starts Up*. Available: <https://www.lanzatech.com/2018/06/08/worlds-first-commercial-waste-gas-ethanol-plant-starts/>, accessed January 30 2020.

- Lee, R.A. & Lavoie, J. 2013, "From first- to third-generation biofuels: Challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity", *Animal Frontiers*, vol. 3, no. 2, pp. 6–11.
- Lehtinen, T., Efimova, E., Tremblay, P., Santala, S., Zhang, T. & Santala, V. 2017, "Production of long chain alkyl esters from carbon dioxide and electricity by a two-stage bacterial process", *Bioresource Technology*, vol. 243, pp. 30–36.
- Lehtinen, T., Virtanen, H., Santala, S. & Santala, V. 2018, "Production of alkanes from CO<sub>2</sub> by engineered bacteria", *Biotechnology for Biofuels*, vol. 11, no. 1, pp. 228.
- Liew, F., Köpke, M. & Simpson, S.D. 2013, "Gas Fermentation for Commercial Biofuels Production", ed. Zhen Fang, InTech.
- Liew, F., Henstra, A.M., Köpke, M., Winzer, K., Simpson, S.D. & Minton, N.P. 2017, "Metabolic engineering of *Clostridium autoethanogenum* for selective alcohol production", *Metabolic Engineering*, vol. 40, pp. 104–114.
- Liew, F., Martin, M.E., Tappel, R.C., Heijstra, B.D., Mihalcea, C. & Köpke, M. 2016, "Gas Fermentation—A Flexible Platform for Commercial Scale Production of Low-Carbon-Fuels and Chemicals from Waste and Renewable Feedstocks", *Frontiers in Microbiology*, vol. 7.
- Lino, C.A., Harper, J.C., Carney, J.P. & Timlin, J.A. 2018, "Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches", *Drug Delivery*, vol. 25, no. 1, pp. 1234–1257.
- Madigan, M.T., Bender, K.S., Buckley, D.H., Sattley, W.M., Stahl, D.A. & Brock, T.D. 2019, *Brock biology of microorganisms*, Fifteenth edition, global edition edn, Pearson Education Limited, New York, NY.
- Makshina, E.V., Janssens, W., Sels, B.F. & Jacobs, P.A. 2012, "Catalytic study of the conversion of ethanol into 1,3-butadiene", *Catalysis Today*, vol. 198, no. 1, pp. 338–344.
- Martens, J.A., Bogaerts, A., De Kimpe, N., Jacobs, P.A., Marin, G.B., Rabaey, K., Saeys, M. & Verhelst, S. 2017, "The Chemical Route to a Carbon Dioxide Neutral World", *ChemSusChem*, vol. 10, no. 6, pp. 1039–1055.
- Metabolic Engineering Laboratory 2017, *Gas Fermentation* [Homepage of Massachusetts Institute of Technology], Available: <https://stephanopouloslab.org/gas-fermentation/>, accessed March 21 2020.
- Mohr, T., Infantes, A., Biebinger, L., de Maayer, P. & Neumann, A. 2019, "Acetogenic Fermentation From Oxygen Containing Waste Gas", *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 7.
- Müller, V. 2003, "Energy Conservation in Acetogenic Bacteria", *Applied and environmental microbiology*, vol. 69, no. 11, pp. 6345–6353.
- Munasinghe, P.C. & Khanal, S.K. 2010, "Biomass-derived syngas fermentation into biofuels: Opportunities and challenges", *Bioresource Technology*, vol. 101, no. 13, pp. 5013–5022.

- Nagaraju, S., Davies, N.K., Walker, D.J.F., Köpke, M. & Simpson, S.D. 2016, "Genome editing of *Clostridium autoethanogenum* using CRISPR/Cas9", *Biotechnology for biofuels*, vol. 9, no. 1, pp. 219.
- National Energy Technology Laboratory 2014, *1.3. Coal & biomass - alternatives/supplements to coal - feedstock flexibility*. Available: <http://www.netl.doe.gov/research/Coal/energy-systems/gasification/gasifipedia/feedstock>, accessed January 27 2020.
- Nevin, K.P., Hensley, S.A., Franks, A.E., Summers, Z.M., Ou, J., Woodard, T.L., Snoeyenbos-West, O.L. & Lovley, D.R. 2011, "Electrosynthesis of Organic Compounds from Carbon Dioxide Is Catalyzed by a Diversity of Acetogenic Microorganisms", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 77, no. 9, pp. 2882–2886.
- Park, J.O., Liu, N., Holinski, K.M., Emerson, D.F., Qiao, K., Woolston, B.M., Xu, J., Lazar, Z., Islam, M.A., Vidoudez, C., Girguis, P.R. & Stephanopoulos, G. 2019, "Synergistic substrate cofeeding stimulates reductive metabolism", *Nature Metabolism*, vol. 1, no. 6, pp. 643–651.
- PrévotEAU, A., Carvajal-Arroyo, J., Ganigué, R. & Rabaey, K. 2020, "Microbial electrosynthesis from CO<sub>2</sub>: forever a promise?", *Current opinion in biotechnology*, vol. 62, pp. 48–57.
- Rabaey, K., Girguis, P. & Nielsen, L.K. 2011, "Metabolic and practical considerations on microbial electrosynthesis", *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 22, no. 3, pp. 371–377.
- RFA 2019, *Annual Ethanol Production*.
- Richter, H., Molitor, B., Wei, H., Chen, W., Aristilde, L. & Angenent, L.T. 2016, "Ethanol production in syngas-fermenting *Clostridium ljungdahlii* is controlled by thermodynamics rather than by enzyme expression", *Energy & Environmental Science*, vol. 9, no. 7, pp. 2392–2399.
- Saini, R., Kapoor, R., Kumar, R., Siddiqi, T.O. & Kumar, A. 2011, "CO<sub>2</sub> utilizing microbes — A comprehensive review", *Biotechnology Advances*, vol. 29, no. 6, pp. 949-960.
- Saxena, J. & Tanner, R. 2011, "Effect of trace metals on ethanol production from synthesis gas by the ethanologenic acetogen, *Clostridium ragsdalei*", *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, vol. 38, no. 4, pp. 513–521.
- Schandl, H., Hatfield-Dodds, S., Wiedmann, T., Geschke, A., Cai, Y., West, J., Newth, D., Baynes, T., Lenzen, M. & Owen, A. 2016, "Decoupling global environmental pressure and economic growth: scenarios for energy use, materials use and carbon emissions", *Journal of Cleaner Production*, vol. 132, pp. 45-56.
- Schoelmerich, M.C., Katsyv, A., Dönig, J., Hackmann, T.J. & Müller, V. 2020, "Energy conservation involving 2 respiratory circuits", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 117, no. 2, pp. 1167–1173.

- Schuchmann, K. & Müller, V. 2014, "Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenic bacteria", *Nature reviews. Microbiology*, vol. 12, no. 12, pp. 809–821.
- Teixeira, L.V., Moutinho, L.F. & Romão-Dumaresq, A.S. 2018, "Gas fermentation of C1 feedstocks: commercialization status and future prospects", *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, vol. 12, no. 6, pp. 1103–1117.
- Tremblay, P., Angenent, L.T. & Zhang, T. 2016, "Extracellular Electron Uptake: Among Autotrophs and Mediated by Surfaces", *Trends in Biotechnology*, vol. 35, no. 4, pp. 360–371.
- Westphal, L., Wiechmann, A., Baker, J., Minton, N.P. & Müller, V. 2018, "The Rnf Complex Is an Energy-Coupled Transhydrogenase Essential To Reversibly Link Cellular NADH and Ferredoxin Pools in the Acetogen *Acetobacterium woodii*", *Journal of bacteriology*, vol. 200, no. 21.
- Wu, P., Wang, G., Wang, G., Børresen, B.T., Liu, H. & Zhang, J. 2016, "Butanol production under microaerobic conditions with a symbiotic system of *Clostridium acetobutylicum* and *Bacillus cereus*", *Microbial Cell Factories*, vol. 15.
- Xu, D., Tree, D.R. & Lewis, R.S. 2011, "The effects of syngas impurities on syngas fermentation to liquid fuels", *Biomass and Bioenergy*, vol. 35, no. 7, pp. 2690–2696.