

2018:05:14

Etanolbildande acetogener för syngasfermentering – en jämförande studie

BBTX01-18-01

Författare: Emil Frithiofson, Fahim Hadi, Carl-Johan Landström, Karl Larsson, Sara Mårtenson, Emma Stavås



CHALMERS

Handledare: Yvonne Nygård, Pawel Piatek, Nikolaos Xafenias
Avdelningen för Industriell bioteknik

Institutionen för Biologi och bioteknik
Avdelningen för Industriell bioteknik

CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA
Göteborg, Sverige 2018

Abstract

The use of fossil fuels contributes to global warming, which is one of the biggest problems in today's society. An alternative to reduce the use of fossil fuels is to instead use renewable fuels, such as bioethanol. One way to produce bioethanol is to allow anaerobic microorganisms to ferment syngas, a mixture of carbon monoxide, carbon dioxide and hydrogen gas. The purpose of the work, "Ethanol Producing Acetogens for Syngas Fermentation – A Comparative Study", was to evaluate and rank microorganisms, which by fermentation of syngas, have the greatest potential for high ethanol production.

A literature review gathered information of around 100 microorganisms to find the organisms with the greatest potential for ethanol production. The results showed that *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium coskatii*, *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium ragsdalei* were the microorganisms with the greatest potential.

In addition to the literature study, an experiment was performed where inhibitor tolerance was examined. The inhibitor ammonia was added to *C. ljungdahlii*, *C. autoethanogenum* and *C. carboxidivorans*. These three organisms were deemed to have high potential in the literature review and were available at the institution. The result showed that no organism grew at 100 mM of ammonia. *C. ljungdahlii* showed the highest tolerance as neither ethanol formation nor growth decreased significantly at 50 mM and below. The ethanol production of *C. autoethanogenum* decreased already at 35 mM. The ethanol production *C. carboxidivorans* decreased at 50 mM ammonia.

The work was carried out at Chalmers University of Technology.

Keywords: ethanol production, syngas, syngas fermentation, acetogens, *Clostridium*, ammonia.

Sammanfattning

Användningen av fossila bränslen bidrar till den globala uppvärmningen, som är ett av de största problemen i dagens samhälle. Ett alternativ för att minska användandet av fossila bränslen är att istället använda förnyelsebara bränslen, till exempel bioetanol. Ett sätt att producera bioetanol är att låta anaeroba mikroorganismer fermentera syngas, en blandning av kolmonoxid, koldioxid och vätgas. Syftet med arbetet var att utvärdera och rangordna mikroorganismer som genom fermentering av syngas har störst potential för hög etanolproduktion.

Genom en litteraturstudie samlades information om ungefär 100 mikroorganismer, för att hitta de organismer med störst potential för etanolproduktion. Resultaten visade att *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium coskatii*, *Clostridium ljungdahlii* och *Clostridium ragsdalei* var de mikroorganismer med störst potential.

Utöver litteraturstudien utfördes även en laboration med avseende på inhibitortolerans. Inhibitorn ammoniak tillsattes till *C. ljungdahlii*, *C. autoethanogenum* och *C. carboxidivorans*. Dessa tre organismer bedömdes ha stor potential i litteraturstudien och fanns tillgängliga på institutionen. Resultatet visade att ingen organism växte vid 100 mM ammoniak. *C. ljungdahlii* visade högst tolerans då varken etanolbildning eller tillväxt minskade signifikant vid 50 mM och lägre. Etanolproduktionen hos *C. autoethanogenum* minskade redan vid 35 mM. *C. carboxidivorans* etanolproduktion minskade vid 50 mM ammoniak.

Arbetet utfördes på Chalmers tekniska högskola.

Nyckelord: etanolproduktion, syngas, syngasfermentering, acetogener, *Clostridium*, ammoniak.

Förkortningar

- ACS** - Acetyl-CoA-syntas
- ADH** - Alkoholdehydrogenas
- AOR** - Aldehyd ferredoxin oxidoreduktas
- CoA** - Koenzym A
- CODH** - Kolmonoxiddehydrogenas
- CoFeSP** - Korrinoid-järn-sulfatprotein
- FDH** - Formatdehydrogenas
- HPLC** - High performance liquid chromatography
- MES** - Mikrobiell elektrolytes
- OD** - Optisk densitet
- THF** - Tetrahydrofolat
- WLR** - Wood-Ljungdahl-reaktionsvägen
- YTF** - Yeast-tryptone-fructose

Innehåll

1	Inledning	1
1.1	Syfte	1
2	Teoribakgrund	2
2.1	Framställning och användning av syngas	2
2.2	Acetogener	2
2.3	Wood-Ljungdahl-reaktionsvägen	2
2.3.1	Metylgrenen	3
2.3.2	Karbonylgrenen	4
2.3.3	Från metyl-THF och kolmonoxid till acetat	5
2.3.4	Energiutvinning från WLR	5
2.3.5	Etanolbildning i acetogener	5
2.4	Genetisk modifiering	6
2.5	Faktorer som påverkar syngasfermentering	6
2.5.1	Tillväxtmedium	6
2.5.2	pH	7
2.5.3	Temperatur och tryck	7
2.5.4	Föroreningar och inhibitorer	7
3	Metod	9
3.1	Litteraturstudie	9
3.2	Laboration	10
3.2.1	Medium och odlingförhållanden	10
3.2.2	Tillväxt	10
3.2.3	pH- och produktmätning	11
3.2.4	Analys av resultat	11
4	Resultat och diskussion	12
4.1	Litteraturstudie	12
4.1.1	<i>Alkalibaculum bacchi</i>	13
4.1.2	<i>Blautia hydrogenotrophica</i>	13
4.1.3	<i>Clostridium autoethanogenum</i>	13
4.1.4	<i>Clostridium carboxidivorans</i>	14
4.1.5	<i>Clostridium coskatii</i>	14
4.1.6	<i>Clostridium drakei</i>	15
4.1.7	<i>Clostridium ljungdahlii</i>	15
4.1.8	<i>Clostridium ragsdalei</i>	16
4.1.9	<i>Clostridium scatologenes</i>	16
4.1.10	<i>Clostridium</i> sp. Ag4f2, sp. F5a15, sp. M5a3	17
4.1.11	<i>Eubacterium aggregans</i>	17
4.1.12	<i>Sporomusa ovata</i>	17
4.2	Evaluering av acetogeners potential för syngasfermentering	17
4.2.1	Acetogener med bevisad potential	18
4.2.2	Acetogener med en viss potential	19

Innehåll

4.2.3	Acetogener att ha i åtanke	20
4.3	Laboration	20
4.3.1	Fast medium	20
4.3.2	Flytande medium	20
4.3.2.1	<i>C. carboxidivorans</i>	23
4.3.2.2	<i>C. ljungdahlii</i>	24
4.3.2.3	<i>C. autoethanogenum</i>	25
4.3.3	Jämförelse av data för <i>C. carboxidivorans</i> , <i>C. ljungdahlii</i> och <i>C. autoethanogenum</i>	26
5	Slutsatser	27
	Litteraturförteckning	28
A	Appendix	I
A.1	YTF-medium	I
A.2	PETC-medium (ATCC 1754)	I
A.3	Acetatbildande organismer	II
A.4	Datavärden från HPLC samt OD- och pH-mätningar	V
A.4.1	<i>C. carboxidivorans</i>	V
A.4.2	<i>C. ljungdahlii</i>	VI
A.4.3	<i>C. autoethanogenum</i>	VII
A.5	T-test för avnitt 4.3.2	VIII

1 | Inledning

Stora mängder gasutsläpp bildas vid användning av fossila energikällor [1]. Detta har bidragit till ett av vår tids största problem, den globala uppvärmningen, som är ett resultat av en ökning av växthuseffekten [2]. En fjärdedel av Europas växthusgasutsläpp orsakas av transportsektorn [3]. En möjlighet för att reducera användningen av fossila energikällor i transportsektorn är att skapa etanol från biomassa. Etanol är ett bra alternativ till bensin tack vare att den är vattenfri, syrehaltig och har högt oktanhåll [1]. Med hjälp av ny teknik och cirkuläritet i användning av jordens resurser kan vårt ekologiska avtryck på jorden förminskas.

En relativt ny teknik för etanolproduktion är fermentering av syngas [4]. Syngas är en gasblandning bestående av kolmonoxid (CO), vätgas (H₂), och koldioxid (CO₂) [2]. En fördel med fermentering av syngas jämfört med traditionell etanolproduktion är att syngas kan framställas genom att förgasa vilket kolhaltigt material som helst, såsom biomassa eller biologiska avfallsprodukter [5]. Syngas kan även tas tillvara från industriella avgaser. Mikroorganismer som har egenskapen att fixera syngas kan sedan genom fermentering omvandla syngasen till kemikalier, exempelvis etanol [5]. Det pågår ett intensivt arbete kring optimeringen av denna process och därmed finns ett stort intresse för mer effektiva mikroorganismer [6].

1.1 Syfte

Syftet med arbetet var att utvärdera och rangordna mikroorganismer som genom fermentering av syngas har störst potential för etanolproduktion. I en litteraturstudie undersöktes mikroorganismernas förmåga att växa på syngas, etanolproduktion och utbyte av etanol. Inga genmodifierade mikroorganismer inkluderades i utvärderingen. Som ett komplement till litteraturstudien undersöktes mikroorganismerna *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* och *Clostridium carboxidivorans* laborativt med avseende på tolerans mot ammoniak.

2 | Teoribakgrund

I detta kapitel redovisas relevanta delar av den nuvarande kunskapen inom området för studien. Detta inkluderar framställningen av syngas, väsentlig information rörande mikroorganismerna av intresse och syngasfermenteringen.

2.1 Framställning och användning av syngas

Syngas är som tidigare nämnt en gasblandning bestående av kolmonoxid, vätgas och koldioxid [2]. Den framställs genom förgasning av kolhaltiga material, vid temperaturer runt 600-900°C eller högre [7]. En stor fördel med förgasning är att det går att använda i princip vilka kolbaserade råmaterial som helst [2] såsom vegetabilisk och animalisk biomassa, gas från raffinaderier samt andra organiska restprodukter [8]. Detta ger möjlighet att använda avfallsgaser från industrier, men även hushållssopor [5]. Däremot används fortfarande fossila bränslen såsom kol vid produktion av syngas, eftersom kol har lågt fukttinnehåll, hög densitet och är mer energirikt jämfört med biomassa [8]. Det beräknas att cirka 55 procent av syngasproduktionen år 2008 härstammade från kol [8]. Vanligen förgasas en blandning av kol och biomassa. Detta minskar kostnad, innehållet av svavel samt utsläpp av koldioxid och kväveoxider (NO_x) [8].

För tillfället finns det tre stora aktörer som kommersiellt producerar bioetanol från syngas. Dessa är LanzaTech [9], Synata Bio (tidigare Coskata) [10] och Frankens Energy LLC (tidigare INEOS Bio) [11]. De företag som arbetar på kommersiell skala har ofta problem med låg etanolkoncentration (2 procent), att rena processen, föroreningar och att det fortfarande är en dyr process med höga driftkostnader [6].

2.2 Acetogener

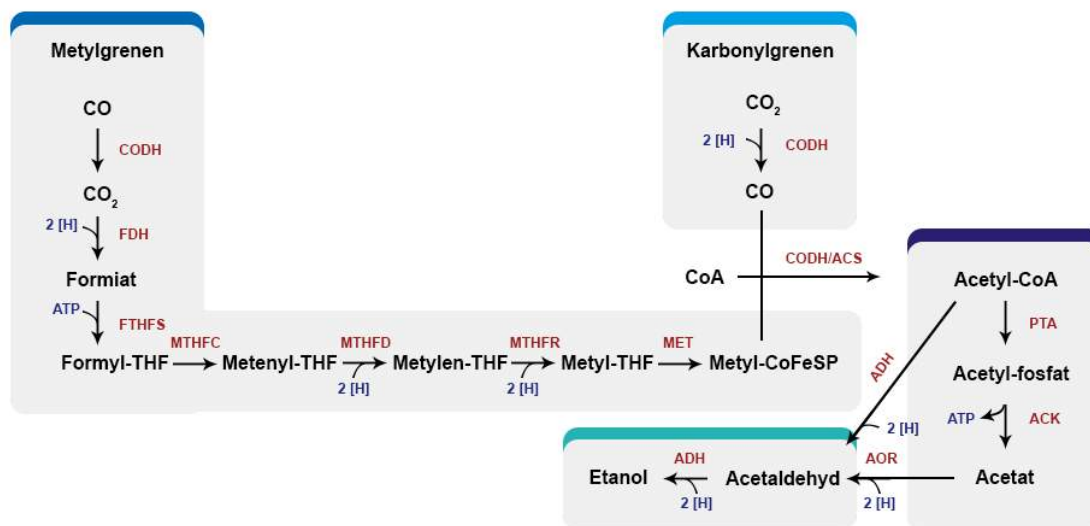
Acetogener är samlingsnamnet för strikt anaeroba mikroorganismer som via Wood-Ljungdahl-reaktionsvägen, WLR, kan bilda acetyl-koenzym A, acetyl-CoA [12]. Acetyl-CoA är en intermediär som reagerar vidare till framför allt acetat men även etanol [13]. Mikroorganismens produktion av energi måste även vara kopplad till WLR för att den ska klassas som en acetogen [12]. Acetogener växer kemoautolitotroft på kolmonoxid eller vätgas och koldioxid [14], men kan också tillgodogöra sig vanliga sockerarter som till exempel fruktos och glukos [12]. Naturligt återfinns de i miljöer som exempelvis jord, slam, sediment och fekalier [15]. De två mest välstuderade av de 22 för närvarande kända släktena av acetogener är *Clostridium* och *Acetobacterium* [15, 16].

2.3 Wood-Ljungdahl-reaktionsvägen

Wood-Ljungdahl-reaktionsvägen är en metabolisk reaktionsväg som acetogener använder [17]. I figur 2.1 finns WLR schematiskt avbildad. Reaktionsvägen har antingen kolmonoxid eller koldioxid och vätgas som substrat. Via olika reduceringar bildas den viktiga intermediären acetyl-CoA, och vidare acetat [17]. Reaktionsvägen är uppdelad i två olika grenar, metylgrenen och karbonylgrenen [18]. Beroende på vilken typ av substrat som

2. Teoribakgrund

används, kolmonoxid eller koldioxid och vätgas, blir reaktionsvägarna till acetyl-CoA olika [17]. Då enbart kolmonoxid används som substrat går det direkt in i karbonylgrenen. För att kunna användas i metylgrenen måste kolmonoxid däremot först oxideras till koldioxid. Om istället koldioxid används tillsammans med vätgas reduceras koldioxid till kolmonoxid i karbonylgrenen medan det går rakt in i metylgrenen [17].



Figur 2.1: Etanolbildning via Wood-Ljungdahlsreaktionsvägen. Enzym är markerade i rött, reduceringsekvivalenter [H] och ATP är markerade i blått. THF står för tetrahydrofolat, CODH för kolmonoxiddehydrogenas, FDH för formiatdehydrogenas, FTHFS för formyl-THF-syntetas, MTHFC för metenyl-THF-cyklohydroklas, MTHFD för metylen-THF-dehydrogenas, MTHFR för metylen-THF-reduktas, MET för metyltransferas, CoA för koenzym A, ACS för acetyl-CoA-syntas, PTA för fosfotransacetylas, ACK för acetatkinas, AOR för aldehyd:ferredoxinoxidoreduktas, ADH för alkoholdehydrogenas.

WLR kan sammanfattas med hjälp av ekvation (2.1) då kolmonoxid används som substrat och med hjälp av ekvation (2.2) då koldioxid och vätgas används som substrat [19]. WLR kan variera hos olika acetogener med exempelvis olika reduceringsekvivalenter, men här redovisas WLR som den rapporterats i *Moorella thermoacetica* [20].



2.3.1 Metylgrenen

Längs metylgrenen sker en rad reaktioner till den slutgiltiga produkten metyltetrahydrofolat, metyl-THF [17]. Den första reaktionen i metylgrenen sker då kolmonoxid används som substrat och katalyseras av enzymet kolmonoxiddehydrogenas, CODH. Reaktionen sker eftersom det först måste oxideras till koldioxid enligt ekvation (2.3). En så kallad ping-pong-reaktion ingår i mekanismen för CODH där CODH reduceras av kolmonoxid för att sedan oxideras av exempelvis proteinet ferredoxin [20].

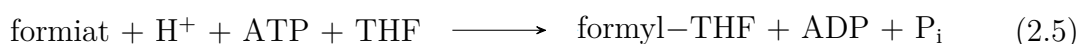
2. Teoribakgrund



I nästa reaktion reduceras koldioxid till formiat, enligt ekvation (2.4) [18]. Reduktionen katalyseras av enzymet formatdehydrogenas, FDH, och NADPH används som reduceringsagent [20].



Formiat slås sedan samman med tetrahydrofolat, THF, för att bilda formyl-THF i en ATP-beroende reaktion som katalyseras av enzymet formyl-THF-syntetas enligt ekvation (2.5). Reaktionen kräver 1 ATP [17, 18].



Det nästkommande steget skiljer sig åt mellan olika acetogener, men resulterar i samma produkt [17, 18]. Formyl-THF omvandlas till metylen-THF via metenyl-THF-cyklohydrolas och metylen-THF-dehydrogenas [17, 20]. Dessa två enzym är antingen delar av samma bifunktionella proteinkomplex eller åtskilda som monofunktionella proteiner [17]. Reaktionerna som de två enzymerna katalyserar ges av ekvation (2.6) respektive (2.7) [20].



Metylen-THF-reduktas reducerar därefter metylen-THF till metyl-THF enligt ekvation (2.8) [18, 20]. I denna reaktion kan reducerat ferredoxin användas som reduceringsekvivalent [18]. I och med detta steg är metylgreden avslutad.



2.3.2 Karbonylgrenen

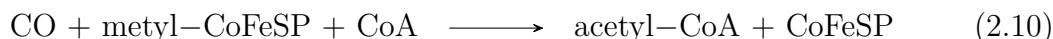
I karbonylgrenen bildas en karbonylgrupp. Den används i reaktionen som bildar acetyl-CoA. I karbonylgrenen tas kolmonoxid in direkt medan koldioxid först reduceras till kolmonoxid enligt ekvation (2.9). Reduceringen av koldioxid sker med hjälp av det bifunktionella enzymkomplexet CODH/ACS [17].



CODH i det bifunktionella enzymkomplexet är nästan detsamma som det monofunktionella CODH i metylgreden [20]. Enzymerna är väldigt lika, men CODH katalyserar oxidationen av kolmonoxid till koldioxid medan CODH i CODH/ACS-komplexet katalyserar reduktionen av koldioxid till kolmonoxid [20]. Acetyl-CoA-syntas, ACS, katalyserar kombineringsreaktionen av metylgruppen och karbonylgruppen till acetyl-CoA [18]. Det är effektivt för acetogener att CODH och ACS är parade, då kolmonoxid som bildats i det aktiva centrumet i CODH enkelt kan ta sig till det aktiva centrumet i ACS [18, 20].

2.3.3 Från metyl-THF och kolmonoxid till acetat

Metylgruppen från metyl-THF förs över till ett korrinoid-järn-sulfatprotein, CoFeSP, med hjälp av enzymet metyltransferas [17]. Där binder den till kobaltcentrumet. CoFeSP binder sedan till ACS och metylgruppen kan därmed levereras [18]. CoA tillkommer också och reaktionen enligt ekvation (2.10) kan då katalyseras med hjälp av ACS [20].



Acetyl-CoA omvandlas sedan via fosfotransacetylas till acetyl-fosfat och vidare till acetat via acetatkinas. I det sista steget utvinns 1 ATP [17].

2.3.4 Energiutvinning från WLR

En förbrukad ATP i metylgrenen och en producerad ATP i det sista steget i WLR innebär att nettoproduktionen av ATP via substratnivåfosforylering är noll [18, 21]. Substratnivåfosforylering innebär att ATP bildas via direkt addition av en fosfatgrupp till ADP. Det är istället via oxidativ fosforylering som acetogener får en nettoproduktion av ATP [21]. Oxidativ fosforylering innebär att en kemiosmotisk gradient över cellmembranet utnyttjas för att bilda ATP. En kemiosmotisk gradient uppstår när det finns en koncentrationskillnad över membranet. I och med detta uppstår även en skillnad i laddning över membranet [22].

Olika acetogener bygger upp olika kemiosmotiska gradienter [21]. Det finns tre modellorganismer bland acetogenerna för studering av energiutvinning [21]. Dessa är *Acetobacterium woodii*, *C. ljungdahlii* och *M. thermoacetica*. I *C. ljungdahlii* utnyttjas det reducerade ferredoxinet från WLR för att aktivera ett så kallat Rnf-komplex [5]. Rnf-komplexet sitter i cellmembranet och skapar den kemiosmotiska gradienten över membranet genom att pumpa ut vätejoner (H^+) ur cellen [17]. Även ATPase sitter i cellmembranet hos alla tre modellorganismer [21]. Det utnyttjar den kemiosmotiska gradienten och bildar ATP. Rnf-komplex används likaså hos *A. woodii*, men här pumpas natriumjoner (Na^+) istället för vätejoner. Hos *M. thermoacetica* används dock så kallade Ech-komplex som pumpar vätejoner [21]. Ech-komplexet aktiveras likt Rnf-komplexet av reducerat ferredoxin men skillnaden är att Ech-komplexet självt reducerar vätejoner i cellen medan Rnf-komplexet reducerar NAD^+ till NADH [17, 21].

2.3.5 Etanolbildning i acetogener

Alla acetogener bildar acetat som produkt vid syngasfermentering [15]. Dock kan en mängd andra produkter bildas, såsom etanol [6]. Många av de etanolbildande acetogenerna återfinns i bakteriesläktet *Clostridium* [6], men det finns även andra släkter som bildar etanol via WLR, såsom *Alkalibaculum* [23] och *Sporomusa* [24]. Utgångspunkten för att bilda etanol är acetyl-CoA [17], vilket ses i figur 2.1. Acetyl-CoA reduceras och bildar intermediären acetaldehyd via enzymet alkoholdehydrogenas. Samma enzym reducerar därefter acetaldehyd till etanol [17]. En alternativ reaktionsväg för etanolproduktion är via acetat [25]. Acetat omvandlas till acetaldehyd via aldehyd:ferredoxinoxidoreduktas och sedan via reaktion med alkoholdehydrogenas bildas etanol [25].

2.4 Genetisk modifiering

Genetisk modifiering av acetogener har en stor potential för höjd produktivitet och ett bredare produktspektra. Genom genetisk modifiering har till exempel etanolproduktionen höjts hos *C. autoethanogenum* [5] och butanol har producerats med *C. ljungdahlii* [16].

Acetogener är generellt sett svåra att genmodificera. Det beror på att merparten är Gram-positiva och har ett aktivt restriktionsmodifikationssystem [5, 26]. Restriktionsmodifikationssystemet använder igenkänningssekvenser för att klyva främmande nukleotidsekvenser, med andra ord förstörs sekvensen som sätts in [26]. De vanligaste metoderna att transformera acetogener är med elektroporering och konjugation [5, 26]. Konjugation innebär att en värdcell, exempelvis *Escherichia coli*, först transformeras med en plasmid som innehåller den önskade sekvensen. Sedan överförs värdcellerna till en lösning med de acetogener som ska transformeras. En andel av värdcellerna kommer då att överföra sina plasmider till acetogenerna [27].

De genetiska verktyg som har använts för acetogener är bland annat:

- Antisens-RNA för att hämma gener [5, 26].
- Homolog rekombination för exempelvis inaktivering av gener med för- och motselektierbara sekvenser [5].
- CRISPR-Cas9 för inaktivering eller insättning av gener på specifika platser [5, 28].
- ClosTron, vilket är en intronbaserad metod för genmodifiering i acetogener tillhörande släktet *Clostridium* [5, 29, 30].

2.5 Faktorer som påverkar syngasfermentering

Syngasfermentering är en fermenteringsprocess där syngas används för att bilda olika kemikalier med hjälp av acetogener [8]. Det har visats att odlingförhållanden och odlings-tekniker kan påverka olika acetogeners tillväxt, produktbildning och produktmängder [31, 32]. Nedan redovisas viktiga parametrar och deras inverkan på syngasfermentering.

2.5.1 Tillväxtmedium

Det medium som används för att odla acetogener innehåller följande komponenter: mineralösning, vitaminlösning, spårmetaller, en buffert, cystein-sulfid som reduktionsmedel och resazurin som pH-, oxidation- och reduktionsindikator [13, 19, 33, 34]. Mediumet som används kan signifikant påverka vilka produkter som bildas och produktmängderna [34]. Att använda ett definierat medium är dyrt, och försök har gjorts för att minska kostnaderna genom att använda komplext medium istället [31, 35].

En ökad mängd av vissa metalljoner, exempelvis nickel, har visats ha en direkt positiv effekt på produktionen av etanol i *Clostridium ragsdalei* [33]. Detta är troligtvis på grund av att många av de enzym som krävs för syngasfermentering är metalloenzym, och därför kräver metalljoner för aktivitet [33]. En liknande situation gäller för ammoniumjoner och mineraler som magnesium, som krävs i vissa enzymer för celltillväxt [34].

2.5.2 pH

Det optimala pH-värdet för tillväxt av acetogener ligger generellt mellan 6.7 och 7.7 [36]. Olika organismer har olika pH-optimum för tillväxt, och förändring av pH har en signifikant effekt på etanolproduktionen hos exempelvis *C. ragsdalei* [19] och *C. carboxidivorans* [32]. I försök med *C. ragsdalei* i batchreaktor har störst etanolproduktion uppnåtts utan att kontrollera pH-värdet, jämfört med en kontroll där buffert hade tillsatts [19]. Det förklaras av att lägre pH generellt leder till minskad biomassaproduktion och ökad etanolproduktion [32, 37]. Bufferten är ofta ekonomiskt kostsam vilket leder till att produktion utan den är att föredra [19].

2.5.3 Temperatur och tryck

Acetogener växer optimalt och har varierande produktivitet vid olika odlingstemperaturer [38]. De tre acetogenerna *C. autoethanogenum*, *C. carboxidivorans* och *C. ljungdahlii* som undersöktes experimentellt i detta arbete är mesofila med tillväxtoptimum vid 37-38°C [39, 40, 41]. Temperaturen påverkar också acetogenernas tillgänglighet till substratet då gaser i mediumet har försämrade löslighet vid högre temperatur, enligt Henrys lag [19]. Särskilt kolmonoxid och vätgas har dålig löslighet i vatten [19, 42]. Det är därmed ytterst viktigt att uppnå hög överföring av substratgasen till organismerna [37], då gasen används för energiutvinning och produktbildning [12].

Experiment har gjorts där acetogener har producerat mer etanol vid lägre temperatur än tillväxtoptimum, möjligtvis på grund av förbättrad löslighet av kolmonoxid och vätgas [19]. Det betyder att optimum för tillväxt inte måste korrelera med optimum för etanolbildning. En åtgärd för att öka mängden löst gas är att höja partialtrycket i reaktorn [31], något som har visats ge högre etanol- och cellmängd [43]. Överföring av gas kan även förbättras med olika reaktortyper. Det har gjorts studier för att avgöra vilken reaktortyp som är bäst för syngasfermentering [44].

2.5.4 Föroreningar och inhibitorer

I laboratorier används ren syngas till skillnad från kommersiellt bruk då industriellt framställd syngas används. Ett stort problem vid användning av industriellt framställd syngas är att den innehåller föroreningar som exempelvis tjära och kol [8]. Vissa föroreningar är enzyminhämmande inhibitorer i WLR som till exempel cyanid (CN), kväveoxid (NO) och ammoniak (NH₃). Föroreningarna bidrar även till celltoxicitet samt förändringar i osmolaritet och pH [8]. Föroreningar och inhibitorer är ett stort problem på industriell skala. Bland annat Frankens Energy LLCs anläggning har haft mycket lågt utbyte av etanol på grund av höga nivåer av inhibitorn vätecyanid [5].

Som nämns i kapitel 2.5.3 har kolmonoxid och vätgas låg löslighet, vilket är en nackdel eftersom många inhibitorer har högre löslighet. Exempelvis ammoniak är mycket lösligt [8]. När ammoniak löser sig kan ammoniumjonen (NH₄⁺) bildas. Jonen ackumuleras över tid och inhiberar enzymet ADH i WLR [8]. ADH är viktigt för att erhålla en hög etanolproduktion. Ammoniaks inverkan har även studerats på *C. ragsdalei* [45]. Resultatet visade att ammoniak kan ha en negativ effekt genom att bland annat försämra tillväxten av cellerna. Det har gjorts relativt lite forskning kring de inhiberande föroreningarnas inverkan på mikroorganismer [46]. Det har däremot visats att det i flera fall endast krävs

2. Teoribakgrund

spårmängder av föroreningen för att mikroorganismerna ska påverkas negativt [8]. Däremot är mikroorganismerna inte lika känsliga mot spårmängder av ammoniak. Det har visats att det krävs höga koncentrationer, runt 215 mM, för att ammoniak ska ha toxiska effekter på organismerna [8].

Det finns många metoder för syngasrening. Däremot är de beroende av ekonomiska möjligheter [6] och förmågan att identifiera föroreningen. Det är viktigt att erhålla en effektiv rening av gasen för kommersiell produktion, och rengöringsmetoden beror på vilka föroreningar som syngasen innehåller [8]. De vanligaste reningsmetoderna för att minska partiklar, inhibitorer, kol och tjära är vatten- eller oljeskrubber och filter [6]. För att avlägsna ammoniak används vattenskrubber [7]. Vattenskrubber är en teknik där föroreningar i en gasström löser sig i ett absorberande ämne exempelvis vatten. Det fungerar däremot endast när föroreningarna är lösliga i det absorberande ämnet [47].

3 | Metod

Arbetet bestod av två delmoment: en litteraturstudie och en laborationsdel. Eftersom laborationen delvis baserades på litteraturstudien inleddes den först då litteraturstudien var avslutad.

3.1 Litteraturstudie

Litteraturstudien inleddes med att studera och samla fakta från ett stort antal översiktsartiklar inom området syngasfermentering, acetogener och etanolproduktion. Under tiden noterades alla acetogener som förekom i artiklarna, vilket uppgick till ungefär 100 olika organismer. Som det inledande steget valdes ett antal faktorer ut för att samla information om de olika acetogenerna. Faktorerna valdes utifrån arbetets syfte och vad som uppkommit som relevanta faktorer under litteraturstudien. Följande faktorer beaktades:

- Tillväxttemperatur
- pH spektrum
- Produktspektrum
- Substratspektrum
- Patogenicitet
- Mediumkrav
- Kommersiell tillgänglighet
- Tillgänglighet av genomsekvens
- Eventuella immateriella rättigheter

Faktorerna temperatur och pH valdes med laborationen i åtanke, för att undvika att hantera besvärliga temperaturer och pH. Eftersom syftet med arbetet var att undersöka etanolproduktion valdes produktspektrum att undersökas. Dessutom är substratet av relevans då det ingår i syftet att acetogenerna har möjlighet att växa på syngas. Patogenicitet är av största vikt då patogena mikroorganismer är en risk i industriell skala. Utöver detta är kommersiell tillgänglighet och tillgänglig genomsekvens relevanta faktorer för att ha möjlighet till laborativt arbete och genetisk modifiering. Slutligen valdes även immateriella rättigheter som en relevant faktor, eftersom företag kan ha patent av intresse.

Information om dessa faktorer samlades in för alla organismer. Sedan skedde ett urval av organismerna utifrån ett antal bestämda kriterier. Kriterierna valdes för att organismerna skulle vara enkla att hantera både i laborativ och industriell skala, men även uppfylla arbetets syfte. Organismerna skulle uppfylla följande kriterier:

- Mesofilitet
- Tillväxt vid pH mellan 5-8
- Produktion av etanol, acetat eller bådadera
- Användning av syngas som substrat
- Organismen bör inte uppvisa patogenicitet

3. Metod

Alla organismer som producerar etanol som produkt visas i tabell 4.1 och organismer som producerar acetat och inte etanol placerades i appendix A.3, tabell A.3. Acetat och etanol är båda produkter som produceras av acetogener. Detta innebär att det finns möjligheter att genom genmodifiering få en mikroorganism att tillverka etanol istället för acetat. För framtida forskning och till följd av att acetat är den mest förekommande produkten för acetogener, inkluderas därför de organismer som tillverkar acetat i appendix A.3, tabell A.3. Organismerna i tabell 4.1 studerades sedan ingående för att kunna utvärdera deras potential för etanolbildning via syngasfermentering. Detta presenteras i kapitel 4.1.1-4.1.12.

I litteraturstudien samlades även information om vanliga inhibitorer för organismerna. Informationen användes för att välja ut en inhibitor som undersöktes närmare i laborationen.

3.2 Laboration

Syftet med laborationen var att undersöka tillväxthastighet, produktbildning och inhibertolerans hos tre acetogener; *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* och *C. carboxidivorans*. Acetogenerna valdes ut baserat på litteraturstudiens resultat och för att de redan fanns tillgängliga i laboratoriet.

3.2.1 Medium och odlingförhållanden

Agarplattor och serumflaskor preparerades under anaeroba förhållanden i en anaerob kammare med konstant temperatur; 37°C. Gasblandningen i kammaren var 10:80:10 H₂:N₂:CO₂. För agarplattorna användes mediumet YTF, som står för "yeast-tryptone-fructose medium". Receptet för YTF finns listat i appendix A.1, tabell A.1. Inkubering skedde i anaerobkammaren. Agarplattorna gjordes i två serier per organism, med fem plattor vardera. Ammoniumhydroxid (NH₄OH) tillsattes i koncentrationer 0, 20, 50, 100 och 200 mM. För serumflaskorna användes mediumet PETC, även kallat ATCC 1754, utvecklat för stammen *C. ljungdahlii* PETC. Receptet för PETC finns listat i appendix A.2, tabell A.2. Serumflaskorna förbereddes inuti anaerobkammaren och autoklaverades sedan. D-fruktos, L-cystein och ammoniak tillsattes samtidigt. D-fruktos tillsattes till flaskorna efter autoklavering för att undvika reaktion mellan kolhydrater och aminosyror. L-cystein tillsattes först då flaskan var försluten för att minimera kontakt med syre. Ammoniakkoncentrationerna i serumflaskorna valdes till 0, 20, 35, 50 och 100 mM, utifrån observerad tillväxt på agarplattorna. Även här gjordes två serier. Serumflaskorna inkuberades vid 37°C under skakning på 220 rpm.

3.2.2 Tillväxt

Acetogenerna odlades på agarplattorna för att få en indikation över vilka inhibitor-koncentrationer som var lämpliga att använda till odling i serumflaskorna. Efter en vecka bedömdes tillväxten på plattorna kvalitativt vid de olika ammoniakkoncentrationerna. Serumflaskor utan ammoniak inokulerades sedan med en kultur från 0 mM-plattorna. Efter fyra dagar användes denna flaska för att inokulera flaskorna som innehöll ammoniak. Tillväxten mättes kontinuerligt genom att prover togs från serumflaskorna, varpå den optiska densiteten vid 660 nm, OD₆₆₀, mättes. 660 nm valdes eftersom resazurin har en absorbanstopp vid 600 nm [48]. Acetogenerna odlades i serumflaskorna i tio dagar. Prover

3. Metod

togs vid inokulering samt efter tre och sex dagar. Vid andra provtagningen undersöktes acetogenernas morfologi och viabilitet under mikroskop.

3.2.3 pH- och produktmätning

Proverna från serumflaskorna undersöktes med elektronisk pH-mätare och high-performance liquid chromatography, HPLC, för att mäta produktkoncentrationer. Efter varje provtagning mättes pH på alla proverna. Proverna centrifugerades och supernatanten sparades. Proverna från första provtagningen centrifugerades inte eftersom cellkoncentrationen var låg. Proverna frystes in och sparades efter varje provtagning. Efter sista provtagningen mättes proverna med HPLC. Ur proverna mättes halterna av acetat, etanol, laktat och fruktos.

3.2.4 Analys av resultat

Resultaten analyserades med ett dubbelsidigt parat t-test. P-värden beräknades för etanolproduktion, acetatproduktion, OD_{660} och pH för respektive koncentrationer ammoniak vid 20, 35, 50 och 100 mM jämfört med etanolproduktion, acetatproduktion, OD_{660} och pH vid 0 mM ammoniak. T-testet gjordes först med signifikansnivån 5 procent och om resultaten inte var signifikanta gjordes det även för 10 procent. Detta på grund av få mätpunkter i experimentet.

4 | Resultat och diskussion

Resultaten från litteraturstudien respektive laborationen presenteras separat och diskuteras sedan gemensamt.

4.1 Litteraturstudie

I detta arbete studerades acetogener som producerar acetat och etanol. Acetogenerna som har fått fokus i arbetet är de som utan genmodifiering kan tillverka etanol genom WLR i enlighet med arbetets syfte. De etanolproducerande acetogenerna presenteras i tabell 4.1 och i detalj i avsnitt 4.1.1-4.1.12.

Acetogenerna i appendix A.3, tabell A.3 undersöktes inte djupare. De inkluderas ändå eftersom acetat är den vanligaste produkten för acetogener. Dessutom kan det vara av intresse för framtida forskning att med hjälp av genmodifiering möjliggöra etanolproduktion med dessa organismer.

Tabell 4.1: *Organismer som bildar acetat och etanol. Listat är temperatur- (Temp) och pH-intervall för tillväxt (om tillgängligt), substratspektrum, om organismen finns kommersiellt tillgänglig (Kom.) och om genomet är sekvenserat (Gen.)*

Organismnamn	Temp [°C]	pH	Substrat	Kom.	Gen.	Källa
<i>Alkalibaculum bacchi</i>	15-40	6,5-10,5	H ₂ /CO ₂ , CO	Ja	Draft	[23, 4]
<i>Blautia hydrogenotrophica</i>	30-45	6,0-7,0	H ₂ /CO ₂	Ja	Ja	[49, 50]
<i>Clostridium autoethanogenum</i>	20-44	4,5-6,5	H ₂ /CO ₂ , CO	Ja	Ja	[51, 39, 37, 52, 53]
<i>Clostridium carboxidivorans</i>	24-42	4,4-7,6	H ₂ /CO ₂ , CO	Ja	Ja	[41, 54, 55, 56]
<i>Clostridium coskatii</i>	26-43	4,0-8,0	H ₂ /CO ₂ , CO	Ja	Ja	[51, 52, 57]
<i>Clostridium drakei</i>	5-35	3,9-7,0	H ₂ /CO ₂ , CO	Ja	Draft	[58, 41, 59]
<i>Clostridium ljungdahlii</i>	30-40	4,0-7,0	H ₂ /CO ₂ , CO	Ja	Ja	[40, 60, 52, 61, 57]
<i>Clostridium ragsdalei</i>	18-37	4,0-8,5	H ₂ /CO ₂ , CO	Ja	Ja	[62, 57]
<i>Clostridium scatologenes</i>	18-42	4,6-8,0	H ₂ /CO ₂ , CO	Ja	Ja	[41, 63, 58]
<i>Clostridium</i> sp. Ag4f2	37	-	H ₂ /CO ₂	Nej	Nej	[64]
<i>Clostridium</i> sp. f5a15	37	-	H ₂ /CO ₂	Nej	Nej	[64, 65]
<i>Clostridium</i> sp. m5a3	30	7,0	H ₂ /CO ₂	Ja	Nej	[64, 65]

4. Resultat och diskussion

<i>Eubacterium aggregans</i>	20-42	6,0-9,0	H ₂ /CO ₂	Ja	Ja	[16, 66, 67]
<i>Sporomusa ovata</i>	15-43	5,3-7,2	H ₂ /CO ₂	Ja	Ja	[24, 14, 68]

4.1.1 *Alkalibaculum bacchi*

A. bacchi är Gramnegativ [23] till skillnad från merparten av acetogener som är Grampositiva. *A. bacchi* bildar etanol vid högre pH än andra organismer på grund av ett högre pH-optimum [4] vid 8,0-8,5 [23]. Av litteratur som undersökts har det varit svårt att avgöra om ett högre pH-optimum är en fördel eller en nackdel, men det särskiljer den från de andra acetogenerna. Med glukos som substrat bildar *A. bacchi* endast spårmängder av etanol, medan den bildar högre koncentration etanol med kolmonoxid som substrat [23].

A. bacchi har studerats ingående av en forskargrupp [4, 69, 70]. De använde en blandning av vätgas och koldioxid samt kolmonoxid som substrat. En specifik stam, CP15, har en tillväxthastighet på 0,12 h⁻¹ och etanolutbyte upp till 76 procent av det teoretiska utbytet [4]. Detta är ett högt etanolutbyte, högre än för både *C. carboxidivorans* och *C. ragsdalei*, men inte lika högt som för *C. ljungdahlii* [71]. Stammen CP15 var den bästa av undersökta stammar av *A. bacchi* [4]. 1,7 g/l etanol uppnåddes i fed-batchflaskor där nästan all acetat omvandlades till etanol [4]. I kontinuerlig reaktor med återcirkulering av celler kunde en etanolkoncentration på 6 g/l hållas [70]. Detta är lägre koncentration än vad som uppnåddes med exempelvis *Clostridium coskatii* [51].

4.1.2 *Blautia hydrogenotrophica*

B. hydrogenotrophica (tidigare *Ruminococcus hydrogenotrophicus*) har inte kunnat växa med kolmonoxid som substrat utifrån litteratur som undersökts. *B. hydrogenotrophica* växer betydligt långsammare på vätgas och koldioxid jämfört med fruktos [49]. Dess generationstid med vätgas och koldioxid som substrat har uppmätts till 26,4 timmar, jämfört med 3 timmar med fruktos som substrat [49]. 26,4 timmar är en lång generationstid jämfört med många andra acetogener [16], vilket kan tyda på att syngas inte är den föredragna kolkällan för *B. hydrogenotrophica*. Andra acetogener, såsom till exempel *C. drakei*, växer nästan lika bra på både syngas och fruktos [41].

En annan nackdel utifrån ett etanolproduktionsperspektiv är att vätgas och koldioxid som substrat ger acetat som enda produkt [49]. Samma studie visar däremot att med glukos och fruktos som substrat bildas framförallt acetat, men även etanol och laktat. Det tillverkades 17,3 mmol etanol per 100 mmol fruktos [49], vilket är betydligt mindre mängd etanol än den ofta använda *C. carboxidivorans* producerar [41].

4.1.3 *Clostridium autoethanogenum*

C. autoethanogenum kan använda bland annat vätgas och koldioxid, kolmonoxid samt fruktos som substrat, men inte glukos [39]. *C. autoethanogenum* är en av de mest studerade organismerna för syngasfermentering [52] och har använts av företaget LanzaTech [72]. Organismen har förmågan att växa utan tillsats av jästextrakt, en förmåga som inte alla acetogener besitter [52]. Det innebär att ett billigare medium kan användas [52].

C. autoethanogenum har ett snävt pH-intervall (4,5-6,5) [39] jämfört med många andra acetogener. Jämfört med *C. coskatii* försämras *C. autoethanogenum*s tillväxt kraftigt då pH minskar [51]. En annan studie bekräftar samma sak; *C. autoethanogenum* producerade mindre etanol och växte långsammare vid lågt pH än *C. ljungdahlii* [52]. Eftersom lågt pH är en faktor för omslag från acetat- till alkoholproduktion [19] kan detta vara en nackdel för *C. autoethanogenum*. En studie utförd med syngas som substrat jämförde producerade produkter mellan fyra acetogener. Där producerade *C. autoethanogenum* 85 mM acetat och 40 mM etanol, vilket var mer än *C. ljungdahlii*, *C. ragsdalei* och *C. coskatii* som alla bildade mellan 30-80 mM acetat och 2-35 mM etanol [57].

Genmodifiering via CRISPR/Cas9-tekniken har använts för *C. autoethanogenum* [53] och dessutom har gener hittats för ett eget CRISPR-system i denna bakterie, något som inte hittats hos andra acetogener i släktet *Clostridium* [73]. I en studie introducerades CRISPR-systemet från en annan organism i *C. autoethanogenum* [53]. Resultatet blev slutligen en genmodifieringseffektivitet på högre än 50 procent för gendeletion, vilket gör CRISPR/Cas9 till ett effektivt verktyg för genmodifiering.

4.1.4 *Clostridium carboxidivorans*

Det har gjorts många studier på *C. carboxidivorans* för syngasfermentering [74], och den har använts av företaget Synata Bio [75]. Organismen bildar acetat, etanol, butanol och hexanol [74]. Inga andra acetogener än *C. carboxidivorans* har rapporterats producera hexanol utan genmodifiering, men produktmängderna är för låga för industriell användning [74]. Förhållandet mellan alkohol och acetat kan ökas hos *C. carboxidivorans* vid tillsats av molybden [31]. Molybden misstänks användas i aktiva säten för många enzym, specifikt AOR vid etanolbildning [31]. Metallen används också i FDH hos många organismer [76] inklusive vissa acetogener [77].

I en studie växte *C. carboxidivorans* fortare med kolmonoxid jämfört med *C. drakei* och *C. scatologenes*, men långsammare än *C. drakei* med vätgas [41]. Tillväxthastigheten var ungefär hälften så stor med syngas som substrat jämfört med fruktos [41]. Med fruktos som substrat var tillväxthastigheten 0.32 h^{-1} , med kolmonoxid och koldioxid var tillväxthastigheten 0.16 h^{-1} och med vätgas och koldioxid var tillväxthastigheten 0.12 h^{-1} [41]. I en annan studie jämfördes *C. carboxidivorans* med *C. ljungdahlii* [78]. Acetogenerna hade samma tillväxthastighet med syngas som substrat, $0,063 \text{ h}^{-1}$, men *C. ljungdahlii* producerade mer acetat och etanol. Mediumet var dock anpassat för *C. ljungdahlii* [78], vilket innebär att den hade en fördel näringsmässigt.

4.1.5 *Clostridium coskatii*

C. coskatii används av företaget Synata Bio [17] och är väldigt lik *C. ljungdahlii* gällande ribosomalt DNA, rDNA [51]. I patentförsök användes syngas bestående av antingen vätgas och kolmonoxid, vätgas och koldioxid eller koldioxid, kolmonoxid och vätgas i en kontinuerlig tankreaktor [51]. Resultatet visade koncentrationer på cirka 35 g/l etanol och 13,5 g/l acetat. Det är ett högre resultat jämfört med 6 g/l etanol som erhöles med *Alkalibaculum bacchi* [70]. *C. coskatii* kan växa vid etanolkoncentrationer av åtminstone 60 g/l, vilket är dubbelt så mycket som den vanligtvis minst föredragna nivån [51]. Även *C. ragsdalei* är livsdulig vid 60 g/l etanol [62].

I ett annat experiment gjort med batchodling producerade *C. coskatii* en låg koncentration etanol, ungefär 2 mM, och istället en hög acetatkoncentration [57]. Detta var betydligt mindre jämfört med andra organismer i samma studie, där etanolkoncentrationen blev minst 20 mM. Det kan bero på att *C. coskatii* saknar två AOR-gener i sin genomsekvens [52]. Det visar att AOR-enzymerna är viktiga för etanolbildning, då AOR-enzymerna omvandlar acetat till acetaldehyd som sedan omvandlas till etanol [57]. *C. coskatii* har visat varierande resultat i olika experiment. Den verkar exempelvis bättre lämpad för kontinuerlig odling, där högre etanolkoncentration uppnåtts [51] än i batchodling [57].

4.1.6 *Clostridium drakei*

C. drakei är en acetogen med potential för fermentering av syngas [59] som inte är lika väl undersökt inom området som många andra *Clostridium*. Det har rapporterats att en stam av *C. drakei* visats vara tolerant mot mindre mängder syre, upp till 4 procent [79]. Detta är en unik egenskap då de flesta acetogener är strikta anaerober [12] och en fördel då den inte är lika känslig mot kontaminering av syre. En annan skillnad är att *C. drakei* är livsduglig vid lägre temperaturer, 5-35 °C [58], än många andra acetogener inom släktet *Clostridium* [41]. Detta kan vara en fördel då lägre temperatur ger bättre löslighet av kolmonoxid och vätgas [19]. Noterbart är emellertid att den optimala tillväxttemperaturen för *C. drakei* är 25-30 °C [58].

C. drakei kan producera både etanol och butanol, i ungefär samma mängder som acetat [41]. I en studie upptäcktes att 100 mmol fruktos omvandlades till 50 mmol etanol och 70 mmol acetat [41]. Det är ungefär samma mängd etanol som *C. scatologenes* producerar enligt samma studie [41], men mer än vad exempelvis *B. hydrogenotrophica* producerar [49]. I samma studie bestämdes även tillväxthastigheter med olika substrat. Med fruktos som substrat blev tillväxthastigheten 0.29 h⁻¹, med kolmonoxid och koldioxid blev tillväxthastigheten 0.12 h⁻¹ och med vätgas och koldioxid blev tillväxthastigheten 0.20 h⁻¹. Syngas verkar vara ett bra substrat för organismen, då den växer nästan lika fort med koldioxid och vätgas samt kolmonoxid som med fruktos [41]. Detta är en fördel vid syngasfermentering. Studien visade jämförelsevis att *C. scatologenes* hade en låg tillväxthastighet på syngas [41].

4.1.7 *Clostridium ljungdahlii*

C. ljungdahlii är möjligtvis den mest studerade syngasfermenterade bakterien [1]. Den har använts av Frankens Energy LLC [80]. *C. ljungdahlii* kan utföra mikrobiell elektrolyt, MES, [81] som har potentiellt högt värde för framtida forskning [82]. MES innebär att organismen kan använda sig av elektrisk ström som elektronkälla för att reducera koldioxid och tillverka olika produkter genom WLR [82].

I en studie med artificiell syngas producerades 19 g/l etanol under 10 dagar [52], vilket var den högsta mängden etanol som producerades i studien och även mer än *C. autoethanogenum*. Det belystes däremot av författarna att experimentet var näringsbegränsat och att ökad utspädningshastighet troligtvis också skulle leda till ökad etanolproduktionen [52]. I en annan studie utfördes en kemostatodling där substratet var kolmonoxid eller syngas med en sammansättning som skulle efterlikna syngas producerad från växtbiomassa [83]. Den maximala etanolbildningen med syngas som substrat i kemostat var 3,75 g/l [83], vilket är mindre jämfört med resultatet i tidigare nämnd studie med *C. ljungdahlii*

[52]. Experimentet visade även att det producerades mer etanol med syngas som substrat jämfört med kolmonoxid som substrat [83].

Flera lyckade studier med genetisk modifiering av *C. ljungdahlii* har rapporterats [81, 84]. Med hjälp av genmodifiering har elektronflödet i WLR omdirigerats vilket ger möjlighet till produktion av andra produkter än acetat [81]. Med hjälp av CRISPR/Cas9-teknik har en effektivitet på mellan 50 och 100 procent uppnåtts för gendeletion [84].

4.1.8 *Clostridium ragsdalei*

*C. ragsdalei*s högsta tillväxthastighet ($0,222 \text{ h}^{-1}$) har rapporterats erhållas med xylos som substrat, vilket kan indikera att det är organismens föredragna kolkälla [62]. Det kan vara en nackdel om acetogenen ska användas till syngasfermentering då det är optimalt att dess föredragna kolkälla är syngas. *C. ragsdalei* producerar etanol och acetat vid fermentering av kolmonoxid, med etanol som den största produkten [62]. Den kan även tillverka etanol från substraten kolmonoxid och vatten samt vätgas och koldioxid [62]. Med vätgas och koldioxid som substrat tillverkas nästan enbart acetat [62].

I en studie uppmättes utbytet till 48 mol etanol/100 mol fruktos [62]. En annan studie visade att *C. ragsdalei* producerar mindre etanol i jämförelse med *C. autoethanogenum* [57]. *C. ragsdalei* bildade däremot stor mängd etanol i förhållande till dess biomassa, utbytet per g biomassa var dubbelt så stort som för *C. autoethanogenum* [57]. Den högsta koncentrationen av etanol som producerats av *C. ragsdalei* med kolmonoxid som substrat i batchodling är 11,6 g/l, rapporterat i patentförsök [62]. Detta är mer än vad som nåtts med *C. carboxidivorans* [54], *C. coskatii* [51] eller *C. ljungdahlii* [60] i motsvarande patent. *C. ragsdalei* är viabel vid etanolkoncentrationer på åtminstone 60 g/l [62], vilket är samma koncentration som *C. coskatii* är viabel vid [51].

I ett patentförsök av Synata Bio [17] tillsattes en metabolisk inhibitor, trifluoroacetat (TFA), för att studera effekten på produktbildning [62]. Vid tillsats av 30 mM TFA ökade etanolproduktionen och acetatproduktionen minskade. Anledningen till detta tycks inte vara kartlagd. Etanolkoncentrationen uppmättes till 46,6 mM jämfört med 39,05 mM i kontrollprovet som inte innehöll TFA [62]. Tillsats av TFA skulle alltså eventuellt kunna utnyttjas för att öka etanolproduktion i *C. ragsdalei*. I undersökt litteratur har inget stöd för bredare tillämpning hittats.

4.1.9 *Clostridium scatologenes*

För *C. scatologenes* har tillväxthastigheten med fruktos som substrat mätts till $0,39 \text{ h}^{-1}$, med kolmonoxid och koldioxid, $0,09 \text{ h}^{-1}$ och med vätgas och koldioxid, $0,04 \text{ h}^{-1}$ [41]. Denna tillväxthastighet var långsammare jämfört med *C. drakei* och *C. carboxidivorans* med syngas som substrat. Däremot var tillväxten snabbare med fruktos som substrat [41]. Det belystes även i en äldre studie som rapporterade svårigheter att odla bakterierna med enbart gas som substrat [58]. Från 100 mmol fruktos bildades 200 mmol acetat och 50 mmol etanol [41]. *C. scatologenes*, *C. drakei* [41] och *C. ragsdalei* [62] producerar nästan lika mycket etanol. Inga andra alkoholer bildades [41]. För användning av syngas är den inte lika välstuderad och används framförallt för andra studier i dagsläget [85].

4.1.10 *Clostridium* sp. Ag4f2, sp. F5a15, sp. M5a3

Dessa tre acetogener bildade endast acetat med vätgas och koldioxid som substrat. Acetat och etanol producerades med glukos som substrat. Ag4f2 bildade 96,0 mM etanol på 100 mM glukos [64]. Ag4f2 producerade högst halter av etanol av de tre stammarna [64]. En nackdel är att tillväxtdata och produktbildning för Ag4f2 på syngas inte hittats i studerad litteratur. I en annan studie med acetogenerna M5a3 och F5a15 odlades de på vätgas och koldioxid som substrat. Resultatet visade att de två stammarna tillverkade väldigt små mängder av acetat [65] jämfört med Ag4f2s acetatbildning på glukos [64]. Utifrån den information som kunnat hittats har endast två studier gjorts på dessa stammar av *Clostridium* [64, 65]. Eftersom stammarna uppfyller de utvalda kriterier angivna i avsnitt 3.1 är de inkluderade för evaluering i detta avsnitt, de få antal studierna till trots.

4.1.11 *Eubacterium aggregans*

E. aggregans kan producera etanol från fruktos och glukos [66]. Däremot har det inom ramen för detta arbetets litteraturstudie inte kunnat verifierats att den kan tillverka etanol från syngas. Dessutom krävdes jästextrakt för tillväxt [67], vilket är en nackdel kostnadsmässigt för storskalig produktion [5]. I en studie blev utbytet 0,17 mol etanol per mol glukos [66] vilket är mycket mindre än de flesta acetogener, bland annat *B. hydrogenotrophica* [49]. Precis som för stammarna i avsnitt 4.1.10 har de valda kriterierna i 3.1 uppfyllts för *E. aggregans*, vilket är varför acetogenerna inkluderats i detta avsnitt.

4.1.12 *Sporomusa ovata*

S. ovata skiljer sig från de Grampositiva *Clostridium* då den är Gramnegativ [24]. Den har visats tillverka etanol med vätgas och koldioxid som substrat [14]. Tidigare studier visar att den endast tillverkar små mängder etanol utan genmodifiering [14, 24]. En studie föreslår att *S. ovata* kan reoxidera etanolen den producerat till acetaldehyd [14]. Detta är ett hinder om hög etanolmängd eftersöks. *S. ovata* har vidare visats vara den mest effektiva elektroautotrofen för MES [82]. MES kan även utföras av *C. ljungdahlii* [81] som beskrivet i avsnitt 4.1.7, vilket är en förmåga som skiljer dem från de andra acetogenerna. Även denna acetogen är inkluderad i detta avsnitt, trots att det bara kunnats hittas få studier med den, eftersom kriterierna i 3.1 var uppfyllda.

4.2 Evaluering av acetogeners potential för syngasfermentering

Det är svårt att jämföra tillväxt- och produktdata mellan olika studier på grund av skillnader i förhållanden, mätmetoder och hur data presenteras. Med detta sagt delades de etanolbildande organismerna in i tre kategorier utifrån vilka för- och nackdelar de har för syngasfermentering.

4.2.1 Acetogener med bevisad potential

C. autoethanogenum, *C. carboxidivorans*, *C. coskatii*, *C. ljungdahlii*, *C. ragsdalei*

Dessa fem organismer är välstuderade för syngasfermentering, och är generellt de som nämns i studier som lovande organismer för syngasfermentering [52, 74]. *C. autoethanogenum* har använts av en av de största aktörerna inom syngasfermenteringsindustrin, LanzaTech [72]. *C. carboxidivorans* [75], *C. ragsdalei* [17] och *C. coskatii* har använts av Synata Bio [51]. *C. ljungdahlii* har använts av Frankens Energy LCC [80]. Att dessa acetogener använts industriellt innebär att det finns mycket forskning bakom dem, vilket ses som en positiv faktor till potentialen för syngasfermentering i vår studie. I industrin finns ett ekonomiskt syfte och därmed önskas en stor etanolproduktion till en låg kostnad. Till exempel har många studier gjorts för att optimera medium och odlingsförhållanden [31, 19, 37, 34] för att sänka kostnader och öka produktiviteten.

Denna kategori av acetogener har den stora fördelen att de har bevisats ha förmåga att växa på syngas som substrat [52, 39, 41, 51, 62]. *C. ljungdahlii* har till och med rapporterats producera mer etanol på syngas än med kolmonoxid [83]. De fem acetogenerna som beskrivs i detta stycke producerar dessutom störst mängd etanol jämfört med andra acetogener [52, 62, 57, 41]. *C. autoethanogenum* rankades som den acetogen som producerade mest etanol i en studie jämfört med *C. ljungdahlii*, *C. ragsdalei* och *C. coskatii*. På andra plats i samma studie var *C. ragsdalei*, tredje plats *C. ljungdahlii* och sist var *C. coskatii* [57]. Dock varierar resultaten mellan studier; *C. ljungdahlii* har i andra studier visats producera mer etanol än både *C. autoethanogenum* [52] och *C. carboxidivorans* [78].

Acetogenerna med mest potential för etanolproduktion från syngas producerar dessutom andra produkter av intresse, exempelvis längre kolkedjor [31, 57]. *C. autoethanogenum*, *C. coskatii*, *C. ljungdahlii* och *C. ragsdalei* har visats bilda 2,3-butandiol [57]. *C. carboxidivorans* bildar dessutom både butanol och hexanol, en unik egenskap bland acetogener [31]. Längre kolkedjor än etanol har högre energiinnehåll, vilket gör att dessa i framtiden också har potential att fungera som alternativa biobränslen [70]. Jämförande studier har gjorts mellan många av dessa organismer. Resultaten från dessa är dock inte alltid samma eftersom olika processer användes och olika odlingsförhållanden rådde i studierna [37, 52, 57, 78].

Alla fem acetogener har känd genomsekvens [52, 57, 86, 87] vilket underlättar eventuell genetisk manipulation. De är även kommersiellt tillgängliga vilket ger möjlighet till fler studier. Verktöget ClosTron, som används för att inaktivera gener hos arter i släktet *Clostridium* [29, 30], kan användas för dessa fem då alla tillhör detta släkte. För *C. autoethanogenum* [86], *C. carboxidivorans* [56] och *C. ljungdahlii* [61] finns detaljerade studier av genomet. Även för de andra två finns även enklare studier på dess genom [57, 52]. Eftersom *C. autoethanogenum*, som tidigare nämnts, har ett eget system för CRISPR/Cas9 [73] har denna acetogen ett möjligt övertag gentemot övriga acetogener när det kommer till genmodifiering. CRISPR-system från *Streptococcus pyogenes* har använts i både *C. autoethanogenum* [53] och *C. ljungdahlii* [84]. Vid deletion av genen för ADH i båda organismerna visade *C. ljungdahlii* högre effektivitet, 75 procent jämfört med 50 procent. Nämnvärt är även att *C. ljungdahlii* har visats nå högre etanolproduktion via genmodifiering [81]. Förutom etanolproduktion genom syngasfermentering kan *C. ljungdahlii*

användas vid MES [81], vilket kan vara en möjlig framtidsindustri för produktion av etanol.

4.2.2 Acetogener med en viss potential

A. bacchi, *C. drakei*, *C. scatologenes*, *S. ovata*

Det är bevisat att *C. drakei* och *C. scatologenes* kan växa på syngas [41], däremot har det i detta arbete inte funnits information om produktbildning. Det är en starkt bidragande faktor till varför de kategoriseras i detta avsnitt och inte i avsnitt 4.2.1. *C. drakei* och *C. scatologenes* har endast påvisats bilda etanol med fruktos som substrat [41]. De två acetogenerna producerar ungefär samma mängd etanol, vilket också är en anledning till att de är kategoriserade i samma avsnitt [41]. *C. drakei* har fördelen att den växer nästan lika bra på syngas som med fruktos [41]. Däremot växer *C. scatologenes* bättre på fruktos [41] och i äldre studier har det funnits svårigheter att få den att växa på syngas över huvud taget [58]. *C. drakei* och *C. scatologenes* har jämförts med *C. carboxidivorans* från avsnitt 4.2.1, och det har rapporterats att de växer sämre på syngas än *C. carboxidivorans* [41]. Det är ännu ett argument för deras placering i denna kategori.

C. drakei har dessutom fördelen att den är tolerant mot en mindre mängd syre [79] vilket ger fördelen att den blir enklare att arbeta med. *C. drakei* har även fördelen att den har en lägre tillväxttemperatur [58] jämfört med andra acetogener. En lägre temperatur innebär en bättre löslighet av kolmonoxid och vätgas [42]. Detta har visats kunna ge bättre etanolproduktion [19], och bör vara en fördel för syngasfermentering.

C. drakei, *C. scatologenes* [41] och *S. ovata* [14] bildar större mängder acetat än etanol, till skillnad från exempelvis *C. ragsdalei* från avsnitt 4.2.1 som bildar mer etanol än acetat [57]. Studier har dessutom visat att *S. ovata* tillverkar små mängder av etanol [14, 24], vilket är anledningen till dess kategorisering. Därutöver kan *S. ovata* även reoxidera etanol till acetaldehyd [14]. Detta är inte en bra egenskap om syftet är en hög producerad etanolmängd.

A. bacchi bildar jämfört med *C. drakei*, *C. scatologenes* och *S. ovata* mer etanol än acetat [4] på syngas [4, 69, 70]. Vid experiment i kontinuerlig reaktor med *A. bacchi* [70] blev etanolproduktionen sämre jämfört med *C. coskatii* [51] och andra organismer i avsnitt 4.2.1 [71], vilket är en anledning till att *A. bacchi* hamnar i detta avsnitt. *A. bacchi* har nyligen studerats för syngasfermentering [70], men övriga acetogener som behandlas i detta avsnitt har övergetts och används nu för andra ändamål [85]. *S. ovata* kan exempelvis, likt *C. ljungdahlíi* [81], utföra MES [82] och *C. drakei* kan användas för att bilda butanol från fruktos [41]. Detta är som tidigare nämnts en fördel eftersom längre kolkedjor har ett högre energiinnehåll.

C. scatologenes och *S. ovata* har känd genomsekvens [63, 68] medan genomen för *A. bacchi* [88] och *C. drakei* [59] är ännu inte kompletta, vilket är ett hinder för eventuell genmodifiering. Nuvarande potential för genmodifiering är alltså sämre för *A. bacchi* och *C. drakei* än för organismerna i avsnitt 4.2.1.

4.2.3 Acetogener att ha i åtanke

B. hydrogenotrophica, *E. aggregans*, *Clostridium* sp. Ag4f2, sp. F15a5, sp. M5a3

Dessa fem acetogener har förmåga att bilda etanol från sockerarter [67, 64, 49], men ingen litteratur som stödjer etanolbidning från syngas har hittats i denna studie. *E. aggregans* krävde dessutom jästextrakt för tillväxt [67], vilket är nackdel ekonomiskt [34]. Inga av organismerna har undersökts med kolmonoxid som substrat utan endast vätgas och koldioxid [67, 64, 49], enligt resultatet av denna litteraturstudie. Det är därför oklart hur organismerna skulle växa med syngas, då kolmonoxid kan inhibera enzymer i vissa acetogener [21]. *B. hydrogenotrophica* växer dessutom långsammare på vätgas och koldioxid jämfört med fruktos [49]. Det kan jämföras med *C. drakei* som växer nästan lika bra på både syngas som fruktos [41] och kategoriserats som en acetogen med viss potential i 4.2.2.

Studierna som redovisar produktbildning för acetogenerna i detta avsnitt är svåra att jämföra med studiens andra acetogener. Många av studierna är gamla och kanske inte aktuella då exempelvis odlingstekniker har förbättrats. Det finns dessutom få studier på varje acetogen. Tillgänglig data visar låga tillväxthastigheter och produktbildning [65], förutom Ag4f2 som bildar acetatmängder [64] jämförbara med tidigare organismer. Ag4f2 och F15a5 finns inte heller kommersiellt tillgängliga vilket försvårar vidare forskning.

B. hydrogenotrophica [50] och *E. aggregans* [89] har sekvenserade genom likt organismerna i tidigare avsnitt, vilket är en fördel för genmodifiering. De tre organismerna tillhörande *Clostridium* har dock inget sekvenserat genom, vilket är en nackdel och en anledning till att de hamnar i detta avsnitt. Eftersom det finns oklarheter kring organismernas förmåga att fermentera syngas till etanol, kan *B. hydrogenotrophica*, *E. aggregans* och *Clostridium* sp. Ag4f2, sp. F15a5 samt sp. M5a3 anses vara de minst lämpade acetogenerna för syngasfermentering av de som studerats närmre i denna studie. De kan ändå vara värda att ha i åtanke för framtida studier eftersom de tillverkar etanol och växer på syngas.

4.3 Laboration

I detta avsnitt presenteras resultatet från laborationen och en jämförelse mellan *C. autoethanogenum*, *C. carboxidivorans* och *C. ljungdahlii*.

4.3.1 Fast medium

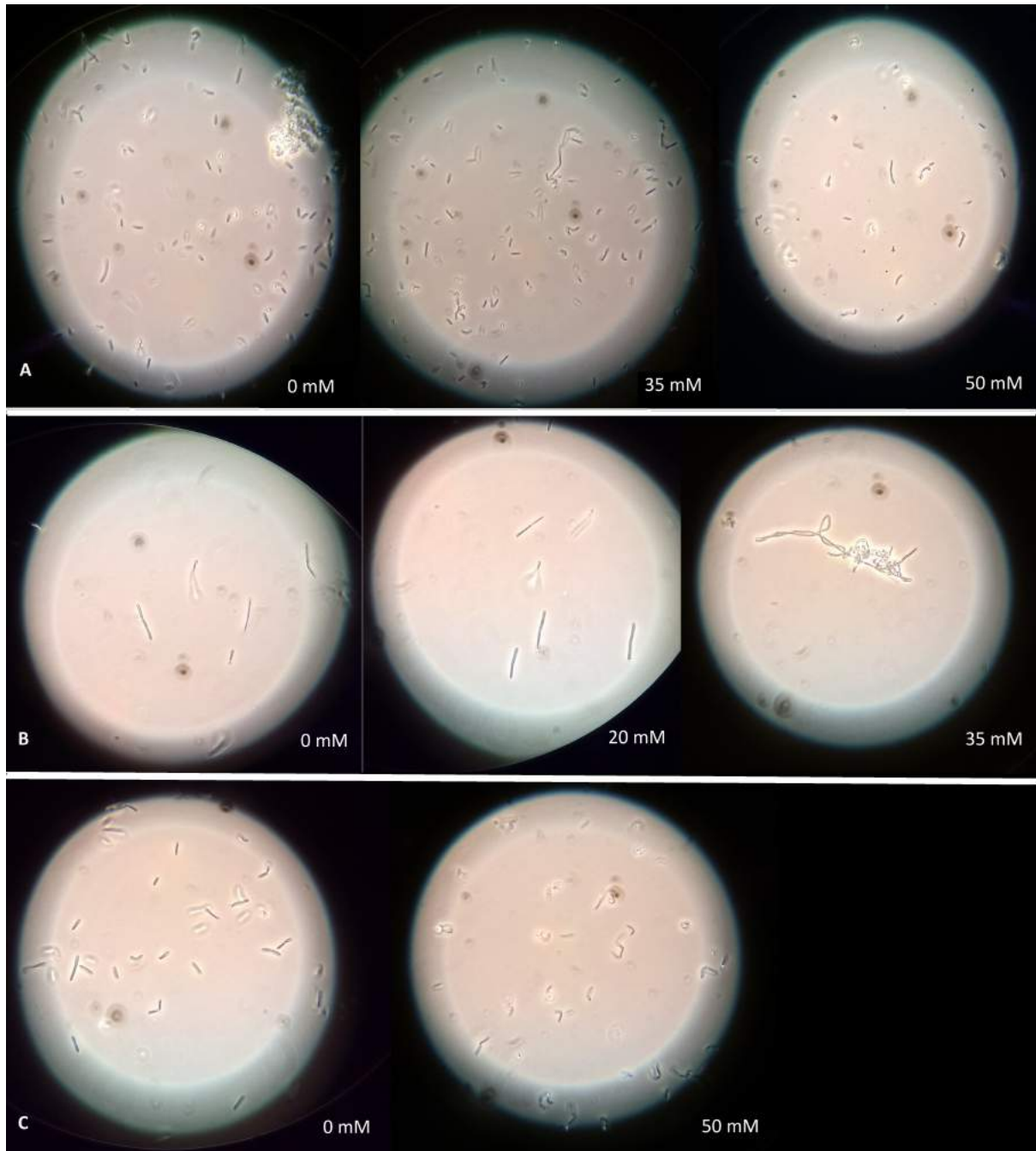
Tre dagar efter utstryk på agarplattorna växte acetogenerna *C. carboxidivorans* och *C. ljungdahlii* på YTF-medium i närvaro av 0 samt 20 mM ammoniak. *C. autoethanogenum* växte endast utan ammoniak. När acetogenerna på agarplattorna undersöktes med mikroskop noterades att *C. carboxidivorans* morfologi inte påverkades av 20 mM ammoniak. *C. carboxidivorans* behöll form, viabilitet och mängd jämfört med kulturen utan ammoniak. Det noterades att *C. ljungdahlii* växte synbart sämre vid 20 mM ammoniak, då bakterierna var klart mer långsmala och krokiga än då de växte utan ammoniak.

4.3.2 Flytande medium

I figur 4.1 kan ammoniaks effekt vid olika koncentrationer observeras. *C. autoethanogenum* fick förändrad morfologi vid 35 mM ammoniak enligt figur 4.1.A, och rörde sig även

4. Resultat och diskussion

mindre jämfört med 0 mM. Vid 50 mM ammoniak kunde det också ses att antalet celler av *C. autoethanogenum* minskat. 20 mM ammoniak hade inte någon märkbar effekt på *C. carboxidivorans* i jämförelse med 0 mM ammoniak, vilket kan ses i figur 4.1.B. *C. carboxidivorans* observerades dock bli avlånga och aggregerade vid 35 mM ammoniak. Figur 4.1.C visar att *C. ljungdahlii* likt *C. autoethanogenum* fick förändrad morfologi och blev färre till antal vid 50 mM. De rörde sig även mindre jämfört med lägre koncentrationer ammoniak. Det är inte klart varför organismerna växte vid högre ammoniakkoncentration i flytande medium mot fast medium. En hypotes är att näring i flytande medium är mer lättillgängligt än i fast medium.



Figur 4.1: Mikroskopibilder tagna på acetogener som växer i PETC-medium. A) *C. autoethanogenum* vid 0 mM, 35 mM och 50 mM ammoniak. B) *C. carboxidivorans* vid 0 mM, 20 mM och 35 mM ammoniak C) *C. ljungdahlii* vid 0 mM och 50 mM ammoniak.

4. Resultat och diskussion

I figur 4.2 kan en viss grumlighet observeras i serumflaskorna. Grumligheten korrelerar mot antalet celler i mediumet och indikerar därmed tillväxt. Samtliga serumflaskor med 100 mM ammoniak hade klart medium, vilket således antyder att ingen tillväxt hade skett. Ytterligare en observation som gjordes var en tydlig svart fällning som bildats hos alla acetogener. Fällningen förekom i olika grad för de olika ammoniakkoncentrationerna hos acetogenerna. För *C. autoethanogenum* samt *C. ljungdahlii* ses fällningen tydligast vid 50 mM ammoniak, se figur 4.2.A och 4.2.C. Hos *C. carboxidivorans* fanns inget tydligt mönster mellan mängden fällning och ammoniakkoncentration, men fällningen var synlig vid alla koncentrationer förutom vid 100 mM ammoniak, se figur 4.2.B.



Figur 4.2: Serumflaskor med de tre acetogenerna innehållandes, från vänster till höger; 100, 100, 50, 50, 35, 35, 20, 20, 0 och 0 mM ammoniak. I A ses *C. autoethanogenum*, i B ses *C. carboxidivorans* och i C ses *C. ljungdahlii*.

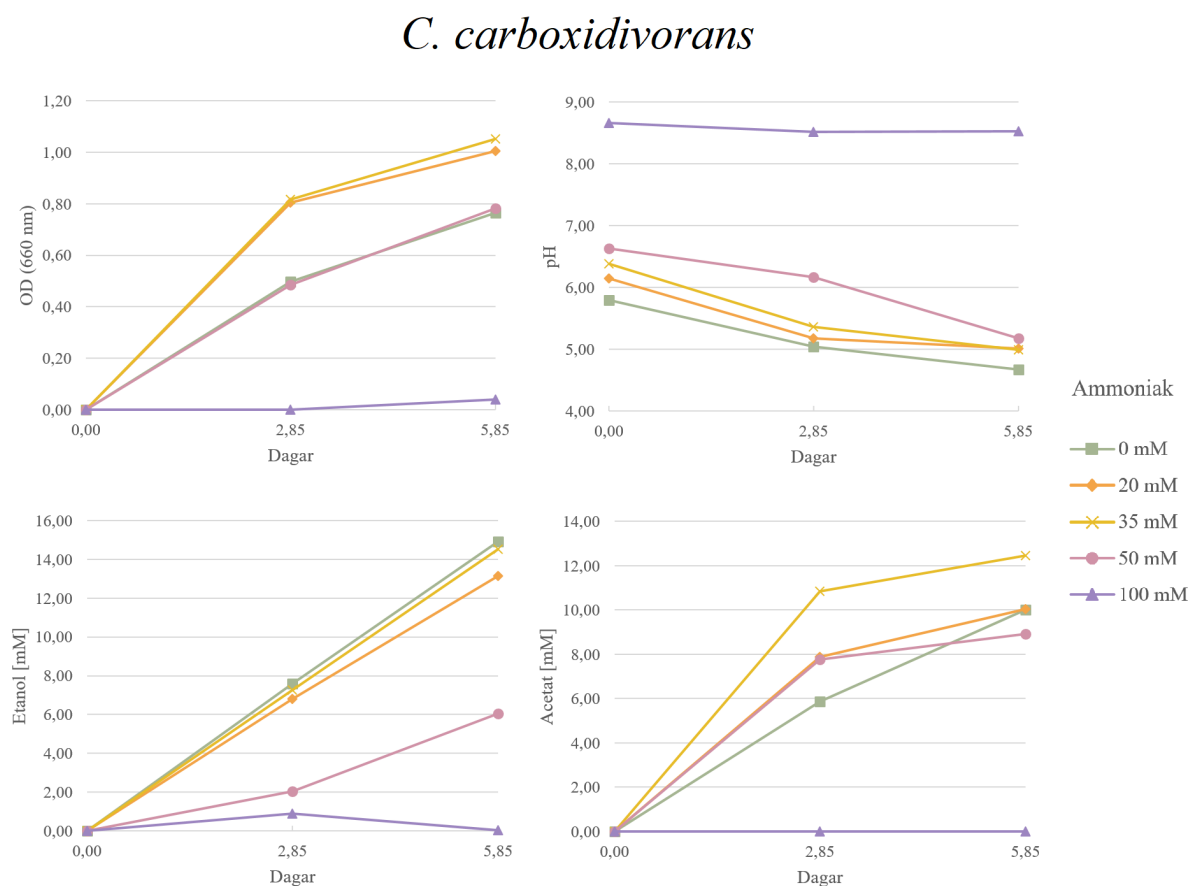
Det är oklart vad den svarta fällningen i serumflaskorna bestod av, men en hypotes är att det var järnsulfid (FeS). Liknande fällning har observerats i andra studier med anaeroba bakterier, exempelvis i en studie där experiment utfördes med sulfatreducerande mesofila bakterier [90]. I det fallet bestod fällningen av just järnsulfid. En alternativ förklaring är att fällningen istället bestod av svartmalm (Fe_3O_4). I en studie med den järnreducerande bakterien *Geobacter metallireducens* utvecklades en svart fällning i form av svartmalm. I studien drogs slutsatsen att bakteriens metabolism krävdes för att fällning skulle bildas [91]. Det överensstämmer med trenden som ses i figur 4.2 eftersom fällning inte uppstått i de serumflaskor med 100 mM ammoniak där tillväxt till synes uteblivit.

4. Resultat och diskussion

Att fällningen i denna studies experiment också är en järnfällning är troligt då serumflaskorna med *C. carboxidivorans* innehöll mycket mer fällning än de andra flaskorna. PETC-medium innehåller sex gånger så mycket ammoniumjärn(II)sulfat hexahydrat ($\text{Fe}(\text{SO}_4)_2(\text{NH}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) som i medium bättre anpassat för *C. carboxidivorans* [31]. Det innebär att det finns ett överskott av järn som kan bilda fällning.

4.3.2.1 *C. carboxidivorans*

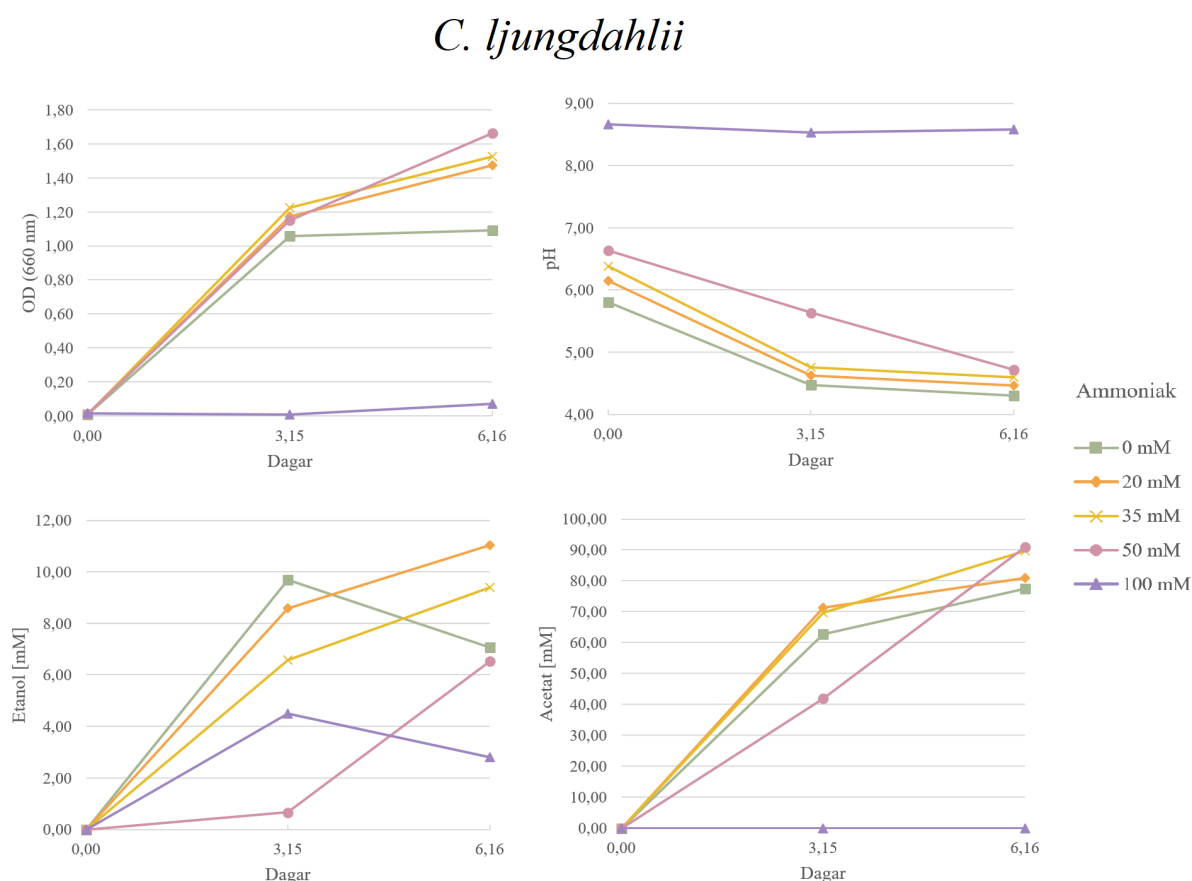
Vid signifikansnivån 5 procent, $\alpha=0,05$, kan det konstanteras att 100 mM ammoniak hämmade tillväxt, acetat- och etanolproduktion, vilket kan ses i figur 4.3. Vid $\alpha=0,05$ hämmades etanolproduktionen av 50 mM ammoniak. Vid $\alpha=0,10$ främjades tillväxten av 20 och 35 mM ammoniak. Med $\alpha=0,10$ kunde ammoniakkoncentrationerna 20 och 35 mM inte visas ha effekt på etanol- och acetatproduktionen. Se appendix A.4.1, tabell A.4-A.7 för de datapunkter figur 4.3 illustrerar och appendix A.5, tabell A.16 för beräknade p-värden.



Figur 4.3: Mätdata för *C. carboxidivorans* som odlades i serumflaskor vid ammoniak-koncentrationerna 0, 20, 35, 50 och 100 mM. OD vid 660 nm, pH, etanolproduktion och acetatproduktion i mM på y-axeln. På x-axeln ses tiden i antal dagar.

4.3.2.2 *C. ljungdahlii*

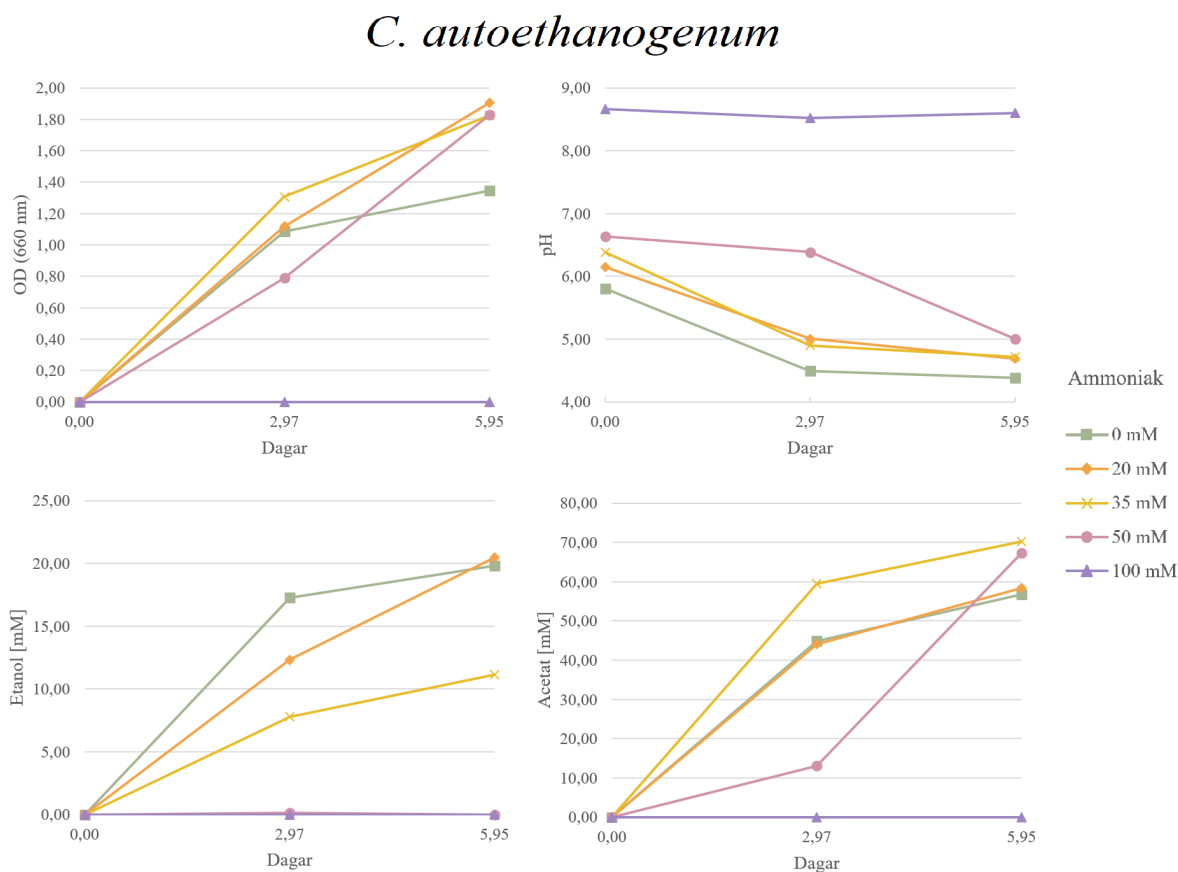
Med $\alpha=0,05$ kan det konstateras att 100 mM ammoniak inhiberade tillväxt och acetatproduktion, detta kan även ses i figur 4.4. Vid $\alpha=0,10$ har 20 och 35 mM ammoniak en främjande effekt på tillväxt. Acetatproduktion främjas av 35 mM och 50 mM ammoniak. Dock kan ingen effekt av 20 mM ammoniak på acetatproduktionen påvisas. Ingen effekt på etanolproduktionen kan heller påvisas vid någon av ammoniakkoncentrationerna, inte ens vid 100 mM. Troligtvis beror detta på få datapunkter, då ingen tillväxt skedde vid 100 mM ammoniak. Se appendix A.4.2, tabell A.8-A.11 för de datapunkter figur 4.4 illustrerar och appendix A.5, tabell A.17 för beräknade p-värden.



Figur 4.4: Mätdata för *C. ljungdahlii* som odlades i serumflaskor vid ammoniakkoncentrationerna 0, 20, 35, 50 och 100 mM. OD vid 660 nm, pH, etanolproduktion och acetatproduktion i mM på y-axeln. På x-axeln ses tiden i antal dagar.

4.3.2.3 *C. autoethanogenum*

Vid $\alpha=0,05$ kunde en inhiberande effekt på etanolproduktion ses vid 35 mM, 50 mM och 100 mM ammoniak. Detta förtydligas i figur 4.5. Acetatproduktion och tillväxt gynnades vid 35 mM ammoniak, medan de inhiberades vid 100 mM. 50 mM ammoniak kunde inte visas ha någon effekt på tillväxt eller acetatproduktion vid $\alpha=0,10$. 20 mM ammoniak kunde inte heller visas ha någon effekt på etanol- eller acetatproduktion samt tillväxthastighet. Se appendix A.4.3, tabell A.12-A.15 för de datapunkter figur 4.5 illustrerar och appendix A.5, tabell A.18 för beräknade p-värden.



Figur 4.5: Mätdata för *C. autoethanogenum* som odlades i serumflaskor vid ammoniak-koncentrationerna 0, 20, 35, 50 och 100 mM. OD vid 660 nm, pH, etanolproduktion och acetatproduktion i mM på y-axeln. På x-axeln ses tiden i antal dagar.

4.3.3 Jämförelse av data för *C. carboxidivorans*, *C. ljungdahlii* och *C. autoethanogenum*

pH ökar med ökande ammoniakkoncentrationer för alla organismer vid $\alpha=0,05$, vilket är tydligt i figur 4.3, figur 4.4 och figur 4.5. Detta är förklarligt, då ammoniak är en bas. pH sjunker även signifikant med tiden vid $\alpha=0,05$ för alla organismer, då organismerna bildar acetat. Även detta är tydligt i figurerna.

Vid $\alpha=0,10$ kunde en trend ses hos *C. carboxidivorans* och *C. ljungdahlii*. 20 mM och 35 mM ammoniak höjde tillväxt medan 50 mM inte kunde urskiljas från kultur utan ammoniak. Det har tidigare rapporterats att en annan acetogen, *C. ragsdalei*, växt bättre med ammoniak i mediet än utan [34]. Den främjande effekten på tillväxt skulle kunna bero på att acetogenerna kan använda kvävet från ammoniak som näring [8] upp till en viss koncentration, då den inhiberande effekten blir för stark. Ytterligare en förklaring är att ammoniak kan fungera som en pH-buffert. Ammoniak skulle då kunna bidra till att bibehålla ett gynnsamt pH-värde när organismen producerar acetat som sänker pH-värdet. *C. autoethanogenum* skiljer sig från de två andra acetogenerna som undersöktes. Ingen främjande effekt på tillväxt går att observera vid 20 mM ammoniak. Samtliga organismer inhiberades fullständigt vid 100 mM ammoniak, då ingen tillväxt observerades.

Den organism vars etanolproduktion inhiberades vid lägst ammoniakkoncentrationer var *C. autoethanogenum*. Vid $\alpha=0,05$ inhiberades etanolproduktionen av 35 mM ammoniak. Med samma signifikansnivå inhiberades *C. carboxidivorans* först vid 50 mM ammoniak och ingen signifikant effekt på etanolproduktionen kunde påvisas hos *C. ljungdahlii* vid någon koncentration ammoniak. Resultatet tyder på att *C. autoethanogenums* etanolbildning påverkas mer av ammoniak än de andra två, medan *C. ljungdahlii* är mer tolerant.

Ingen effekt av ammoniakkoncentrationerna 20 mM, 35 mM och 50 mM på *C. carboxidivorans* acetatproduktion kunde påvisas vid $\alpha=0,10$. Vid $\alpha=0,10$ ökar dock acetatproduktionen vid 35 och 50 mM ammoniak hos *C. ljungdahlii*. En ökning kan även ses hos *C. autoethanogenum* vid 35 mM ammoniak vid $\alpha=0,05$.

Anledningen till att acetatproduktion gynnas och etanolproduktionen hämmas av ammoniak kan bero på ammoniaks inhiberande effekt på enzymet ADH. ADH-enzymet är ansvarigt för att katalysera omvandlingen av acetyl-CoA till etanol [8], se avsnitt 2.3, figur 2.1. När ADH inhiberas kan det därför bildas mindre etanol eftersom en reaktionsväg blockeras. Då mindre acetyl-CoA omvandlas till etanol är det möjligt att det istället bildas mer acetat.

5 | Slutsatser

En bidragande åtgärd till den globala uppvärmningen kan vara att ersätta fossila bränslen med biobränslen. Acetogener kan användas för att bilda etanol från biomassa eller avfallsgaser, och det finns ett antal företag som arbetar med detta kommersiellt [5]. Det finns många acetogener, men långt från alla växer vid normala förhållanden, på syngas eller producerar etanol som slutprodukt.

Med detta i åtanke är ett av de mest betydelsefulla resultaten i denna studie en bedömning av vilka organismer som visar störst potential för fermentering av syngas till etanol, utifrån tillgänglig forskning. Utifrån för- och nackdelarna diskuterade i 4.2 blev slutsatsen att acetogenerna *C. autoethanogenum*, *C. carboxidivorans*, *C. coskatii*, *C. ljungdahlii*, *C. ragsdalei* har högst potential. För kommersiella ändamål bör en av dessa organismer vara det bästa valet, vilket även stöds då de används av de stora aktörerna på marknaden [17].

Slutsatsen av laborationen var att ammoniak inte är ett särskilt stort problem för *C. carboxidivorans* och *C. ljungdahlii* vid koncentrationer på 50 mM och lägre. Det var ingen av de tre organismerna som växte vid 100 mM ammoniak. *C. autoethanogenum* tolererar ammoniak sämre än de andra acetogenerna, medan *C. ljungdahlii* verkar vara mest ammoniaktolerant. Inhibitorer är ett område som behöver studeras ytterligare eftersom det är ett hinder för effektiv syngasfermentering. Detta experiment kan användas som utgångspunkt för framtida undersökningar av inhibering med ammoniak.

I den laborativa delen av studien finns brister. Mediumet var inte optimerat för *C. carboxidivorans* och *C. autoethanogenum*. Det innebär att resultaten inte är från optimala förhållanden. OD-mätningarna kan ha gett ett missvisande resultat på grund av den svarta fällningen som bildades och icke viabla celler. Utöver dessa felkällor ska det även poängteras att den statistiska analysen gjordes med få mätpunkter. Det är då svårt att få pålitliga resultat.

Resultaten från denna studie kan användas för att göra nya studier och vidareutveckla området syngasfermentering. Genetisk modifiering tycks vara framtiden för utvecklingen av nya produktionsorganismer. Många patentansökningar angående syngas handlar om just specifika modifieringar för acetogener i kommersiell syngasfermentering. Ett exempel är ett patent där reaktionsvägen till acetat omdirigeras till etanolbildningsvägen [75]. Framtida studier bör därför även ta rekombinanta organismer i hänsyn, då dessa troligen kommer resultera i hög produktbildning. Andra produkter med högt industriellt värde är även ett möjligt område för vidare studier.

Litteraturförteckning

- [1] Abubackar HN, Veiga MC, Kennes C. Biological conversion of carbon monoxide: Rich syngas or waste gases to bioethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2011;5(1):93–114. doi:10.1002/bbb.256.
- [2] Latif H, Zeidan AA, Nielsen AT, Zengler K. Trash to treasure: Production of biofuels and commodity chemicals via syngas fermenting microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*. 2014 jun;27:79–87. doi:10.1016/j.copbio.2013.12.001.
- [3] Europeiska Kommissionen. A European Strategy for Low-Emission Mobility, SWD 244 final [Internet]; Bryssel: Europeiska Kommissionen; 2016. [citerad 2018-04-26]. Tillgänglig från: http://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:e44d3c21-531e-11e6-89bd-01aa75ed71a1.0002.02/DOC_1&format=PDF.
- [4] Liu K, Atiyeh HK, Tanner RS, Wilkins MR, Huhnke RL. Fermentative production of ethanol from syngas using novel moderately alkaliphilic strains of *Alkalibaculum bacchi*. *Bioresource Technology*. 2012 jan;104:336–41. doi:10.1016/J.BIORTECH.2011.10.054.
- [5] Liew FM, Martin ME, Tappel RC, Heijstra BD, Mihalcea C, Köpke M. Gas Fermentation-A flexible platform for commercial scale production of low-carbon-fuels and chemicals from waste and renewable feedstocks. *Frontiers in Microbiology*. 2016 maj;7:336–41. doi:10.3389/fmicb.2016.00694.
- [6] Acharya B, Roy P, Dutta A. Review of syngas fermentation processes for bioethanol. *Biofuels*. 2014 sep;5(5):551–64. doi:10.1080/17597269.2014.1002996.
- [7] Richardson Y, Blin J, Julbe A. A short overview on purification and conditioning of syngas produced by biomass gasification: Catalytic strategies, process intensification and new concepts. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2012 dec;38(6):765–81. doi:10.1016/j.pecs.2011.12.001.
- [8] Xu D, Tree DR, Lewis RS. The effects of syngas impurities on syngas fermentation to liquid fuels. *Biomass and Bioenergy*. 2011 jul;35(7):2690–6. doi:10.1016/j.biombioe.2011.03.005.
- [9] Karlson B, Bellavitis C, France N. Commercializing LanzaTech, from waste to fuel: An effectuation case. *Journal of Management & Organization*. 2018 jan;s. 1–22. doi:10.1017/jmo.2017.83.
- [10] Lane J. Coskata’s technology re-emerges as Synata Bio. *Biofuels Digest*. [Internet]; 24 januari 2016. [citerad 17 februari 2018]. Tillgänglig från: <http://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2016/01/24/coskatas-technology-re-emerges-as-synata-bio/>.
- [11] Wixon C. Former INEOS bioenergy plant sold to Texas company in Indian River County. *TCPalm*. [Internet]; 24 januari 2018. [citerad 17 februari 2018]. Tillgänglig från: <https://www.tcpalm.com/story/news/local/indian-river-county/2018/01/24/former-ineos-bioenergy-plant-sold-county-talks-new-owner-over-possible-partnership-promises-great-pl/1060002001/>.
- [12] Schuchmann K, Müller V. Energetics and application of heterotrophy in acetogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 2016 jul;82(14):4056–69. doi:10.1128/AEM.00882-16.

- [13] Drake HL, Küsel K, Matthies C. Acetogenic prokaryotes. I: The Prokaryotes: Prokaryotic Physiology and Biochemistry. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013. s. 3–60. doi:10.1007/978-3-642-30141-4_61.
- [14] Ammam F, Tremblay PL, Lizak DM, Zhang T. Effect of tungstate on acetate and ethanol production by the electrosynthetic bacterium *Sporomusa ovata*. *Biotechnology for Biofuels*. 2016 dec;9(1):1–10. doi:10.1186/s13068-016-0576-0.
- [15] Drake HL, Gößner AS, Daniel SL. Old acetogens, new light. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008 mar;1125(1):100–28. doi:10.1196/annals.1419.016.
- [16] Schiel-Bengelsdorf B, Dürre P. Pathway engineering and synthetic biology using acetogens. *FEBS Letters*. 2012;586(15):2191–8. doi:10.1016/j.febslet.2012.04.043.
- [17] Bengelsdorf FR, Straub M, Dürre P. Bacterial synthesis gas (syngas) fermentation. *Environmental Technology*. 2013;34:1639–51. doi:10.1080/09593330.2013.827747.
- [18] Ragsdale SW, Pierce E. Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO₂fixation. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. 2008 dec;1784(12):1873–98. doi:10.1016/j.bbapap.2008.08.012.
- [19] Kundiyana DK, Wilkins MR, Maddipati P, Huhnke RL. Effect of temperature, pH and buffer presence on ethanol production from synthesis gas by *Clostridium ragsdalei*. *Bioresource Technology*. 2011;102(10):5794–9. doi:10.1016/j.biortech.2011.02.032.
- [20] Ragsdale SW. Enzymology of the Woods-Ljungdahl pathway of acetogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008;1125:129–36. doi:10.1196/annals.1419.015.Enzymology.
- [21] Schuchmann K, Müller V. Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenic bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. 2014 dec;12(12):809–21. doi:10.1038/nrmicro3365.
- [22] Mathews CK, van Holde KE, Appling DR, Anthony-Cahill SJ. 4 rev. uppl. Toronto: Prentice Hall; 2013. Kapitel 12, Chemical Logic of Metabolism. s. 475–515.
- [23] Allen TD, Caldwell ME, Lawson PA, Huhnke RL, Tanner RS. *Alkalibaculum bacchi* gen. nov., sp. nov., a CO-oxidizing, ethanol-producing acetogen isolated from livestock-impacted soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2010 okt;60(10):2483–9. doi:10.1099/ijs.0.018507-0.
- [24] Möller B, Oßmer R, Howard BH, Gottschalk G, Hippe H. *Sporomusa*, a new genus of gram-negative anaerobic bacteria including *Sporomusa sphaeroides* spec. nov. and *Sporomusa ovata* spec. nov. *Archives of Microbiology*. 1984 nov;139(4):388–96. doi:10.1007/BF00408385.
- [25] Dürre P. Butanol formation from gaseous substrates. *FEMS Microbiology Letters*. 2016;363(6):1–7. doi:10.1093/femsle/fnw040.
- [26] Pyne ME, Bruder M, Moo-young M, Chung DA, Chou CP. Technical guide for genetic advancement of underdeveloped and intractable *Clostridium*. *Biotechnology Advances*. 2014;32(3):623–41. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.04.003.
- [27] Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. 6 rev. uppl. New York: Garland Science; 2015. Kapitel 23, Pathogens and Infection. s. 1263–96.
- [28] Humphreys JR, Daniel R, Poehlein A. Genome sequence of the homoacetogenic, Gram-negative, endospore-forming bacterium *Sporomusa acidovorans* DSM 3132. *Genome Announcements*. 2017 sep;5(38):1–2. doi:10.1128/genomeA.00981-17.
- [29] Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, Carter GP, Minton NP. The ClosTron: A universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *Journal of Microbiological Methods*. 2007 sep;70(3):452–64. doi:10.1016/j.mimet.2007.05.021.

- [30] Heap JT, Kuehne SA, Ehsaan M, Cartman ST, Cooksley CM, Scott JC, et al. The ClosTron: Mutagenesis in *Clostridium* refined and streamlined. *Journal of Microbiological Methods*. 2010 jan;80(1):49–55. doi:10.1016/j.mimet.2009.10.018.
- [31] Phillips JR, Atiyeh HK, Tanner RS, Torres JR, Saxena J, Wilkins MR, et al. Butanol and hexanol production in *Clostridium carboxidivorans* syngas fermentation: Medium development and culture techniques. *Bioresource Technology*. 2015 aug;190:114–21. doi:10.1016/j.biortech.2015.04.043.
- [32] Fernández-Naveira Á, Abubackar HN, Veiga MC, Kennes C. Efficient butanol-ethanol (B-E) production from carbon monoxide fermentation by *Clostridium carboxidivorans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016 apr;100(7):3361–70. doi:10.1007/s00253-015-7238-1.
- [33] Saxena J, Tanner RS. Effect of trace metals on ethanol production from synthesis gas by the ethanologenic acetogen, *Clostridium ragsdalei*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2011 apr;38(4):513–21. doi:10.1007/s10295-010-0794-6.
- [34] Saxena J, Tanner RS. Optimization of a corn steep medium for production of ethanol from synthesis gas fermentation by *Clostridium ragsdalei*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012 apr;28(4):1553–61. doi:10.1007/s11274-011-0959-0.
- [35] Wilkins MR, Atiyeh HK. Microbial production of ethanol from carbon monoxide. *Current Opinion in Biotechnology*. 2011 jun;22(3):326–30. doi:10.1016/J.COPBIO.2011.03.005.
- [36] Drake HL. *Acetogenesis*. New York: Chapman & Hall; 1994. doi:10.1007/978-1-4615-1777-1.
- [37] Cotter JL, Chinn MS, Grunden AM. Influence of process parameters on growth of *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium autoethanogenum* on synthesis gas. *Enzyme and Microbial Technology*. 2009 maj;44(5):281–8. doi:10.1016/j.enzmictec.2008.11.002.
- [38] Daniell J, Köpke M, Simpson S. Commercial biomass syngas fermentation. *Energies*. 2012 dec;5(12):5372–417. doi:10.3390/en5125372.
- [39] Abrini J, Naveau H, Nyns EJ. *Clostridium autoethanogenum*, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide. *Archives of Microbiology*. 1994 apr;161(4):345–51. doi:10.1007/BF00303591.
- [40] Tanner RS, Miller LM, Yang D. *Clostridium ljungdahlii* sp-Nov, an acetogenic species in Clostridial ribosomal-RNA homology group-I. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1993 apr;43(2):232–6. doi:10.1099/00207713-43-2-232.
- [41] Liou JSC, Balkwill DL, Drake GR, Tanner RS. *Clostridium carboxidivorans* sp. nov., a solvent-producing clostridium isolated from an agricultural settling lagoon, and reclassification of the acetogen *Clostridium scatologenes* strain SL1 as *Clostridium drakei* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2005 sep;55(5):2085–91. doi:10.1099/ij.s.0.63482-0.
- [42] Sander R. Compilation of Henry’s law constants (version 4.0) for water as solvent. *Atmos Chem Phys*. 2015;15:4399–981. doi:10.5194/acp-15-4399-2015.
- [43] Hurst KM, Lewis RS. Carbon monoxide partial pressure effects on the metabolic process of syngas fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 2010 jan;48(2):159–65. doi:10.1016/j.bej.2009.09.004.

- [44] Munasinghe PC, Khanal SK. Syngas fermentation to biofuel: Evaluation of carbon monoxide mass transfer coefficient (kLa) in different reactor configurations. *Biotechnology Progress*. 2010 nov;26(6):1616–21. doi:10.1002/btpr.473.
- [45] Xu D, Lewis RS. Syngas fermentation to biofuels: Effects of ammonia impurity in raw syngas on hydrogenase activity. *Biomass and Bioenergy*. 2012 okt;45:303–10. doi:10.1016/j.biombioe.2012.06.022.
- [46] Munasinghe PC, Khanal SK. Biomass - derived syngas fermentation into biofuels: Opportunities and challenges. *Bioresource Technology*. 2010;101(13):5013–22. doi:10.1016/j.biortech.2009.12.098.
- [47] Phuphuakrat T, Namioka T, Yoshikawa K. Absorptive removal of biomass tar using water and oily materials. *Bioresource Technology*. 2011;102(2):543–9. doi:10.1016/j.biortech.2010.07.073.
- [48] Perrot S, Dutertre-Catella H, Martin C, Warnet JM, Rat P. A new nondestructive cytometric assay based on resazurin metabolism and an organ culture model for the assessment of corneal viability. *Cytometry A*. 2003 sep;55(1):7–14. doi:10.1002/cyto.a.10067.
- [49] Bernalier A, Willems A, Leclerc M, Rochet V, Collins MD. *Ruminococcus hydrogenotrophicus* sp. nov., a new H₂/CO₂-utilizing acetogenic bacterium isolated from human feces. *Archives of Microbiology*. 1996 sep;166(3):176–83. doi:10.1007/s002030050373.
- [50] Rey FE, Faith JJ, Bain J, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Newgard CB, et al. Dissecting the in vivo metabolic potential of two human gut acetogens. *The Journal of biological chemistry*. 2010 jul;285(29):22082–90. doi:10.1074/jbc.M110.117713.
- [51] Zahn JA, Saxena J, uppfinnare; Coskata Inc., patentinnehavare. Novel ethanologenic species *Clostridium coskatii*. Amerikanskt patent US8143037B2; 2012-03-27. Tillgänglig från: <https://patents.google.com/patent/US8143037B2/en?q=clostridium&q=carboxidivorans&oq=clostridium+carboxidivorans>.
- [52] Martin ME, Richter H, Saha S, Angenent LT. Traits of selected *Clostridium* strains for syngas fermentation to ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*. 2016 mar;113(3):531–9. doi:10.1002/bit.25827.
- [53] Nagaraju S, Davies NK, Walker DJF, Köpke M, Simpson SD. Genome editing of *Clostridium autoethanogenum* using CRISPR/Cas9. *Biotechnology for Biofuels*. 2016 dec;9(1):1–8. doi:10.1186/s13068-016-0638-3.
- [54] Lewis RS, Tanner RS, Huhnke RL, uppfinnare; Oklahoma State University; University of Oklahoma, patentinnehavare. Indirect or direct fermentation of biomass to fuel alcohol. Amerikansk patentansökan US20070275447A1; 2007-11-29. Tillgänglig från: <https://patents.google.com/patent/US20070275447A1/en?q=clostridium&q=carboxidivorans&oq=clostridium+carboxidivorans>.
- [55] Paul D, Austin FW, Arick T, Bridges SM, Burgess SC, Dandass YS, et al. Genome sequence of the solvent-producing bacterium *Clostridium carboxidivorans* strain P7T. *Journal of Bacteriology*. 2010 okt;192(20):5554–5. doi:10.1128/jb.00877-10.
- [56] Bruant G, Lévesque MJ, Peter C, Guiot SR, Masson L. Genomic analysis of carbon monoxide utilization and butanol production by *Clostridium carboxidivorans* strain P7. *PLoS ONE*. 2010 sep;5(9):1–12. doi:10.1371/journal.pone.0013033.
- [57] Bengelsdorf FR, Poehlein A, Linder S, Erz C, Hummel T, Hoffmeister S, et al. Industrial acetogenic biocatalysts: A comparative metabolic and genomic analysis. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7:1–15. doi:10.3389/fmicb.2016.01036.

- [58] Küsel K, Dorsch T, Acker G, Stackebrandt E, Drake HL. *Clostridium scatologenes* strain SL1 isolated as an acetogenic bacterium from acidic sediments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2000 mar;50(2):537–46. doi:10.1099/00207713-50-2-537.
- [59] Jeong Y, Song Y, Shin HS, Cho BK. Draft genome sequence of acid-tolerant *Clostridium drakei* SL1T, a potential chemical producer through syngas fermentation. *Genome Announcements*. 2014 maj;2(3):1–2. doi:10.1128/genomeA.00387-14.
- [60] Gaddy JL, uppfinnare; INEOS Bio Ltd.; Fox Ridge Enterprises Inc., patentinnehavare. *Clostridium* stain which produces acetic acid from waste gases. Amerikanskt patent US5593886A; 1997-01-14. Tillgänglig från: <https://patents.google.com/patent/US5593886A/en?q=peptostreptococcus&q=productus&oq=peptostreptococcus+productus>.
- [61] Kopke M, Held C, Hujer S, Liesegang H, Wiezer A, Wollherr A, et al. *Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(29):13087–92. doi:10.1073/pnas.1004716107.
- [62] Huhnke RL, Lewis RS, Tanner RS, uppfinnare; Oklahoma State University; University of Oklahoma, patentinnehavare. Isolation and Characterization of novel *Clostridial* Species. Amerikanskt patent US7704723B2; 2008-04-27. Tillgänglig från: <https://patents.google.com/patent/US7704723B2/en?q=Isolation&q=characterization&q=newel&q=clostridial&q=species&oq=Isolation+and+characterization+of+novel+clostridial+species>.
- [63] Zhu Z, Guo T, Zheng H, Song T, Ouyang P, Xie J. Complete genome sequence of a malodorant-producing acetogen, *Clostridium scatologenes* ATCC 25775T. *Journal of Biotechnology*. 2015 okt;212:19–20. doi:10.1016/J.JBIOTECH.2015.07.013.
- [64] Bernalier A, Rochet V, Leclerc M, Dore J, Pochart P. Diversity of H₂/CO₂-utilizing acetogenic bacteria from feces of non- methane-producing humans. *Current Microbiology*. 1996 aug;33(2):94–9. doi:10.1007/s002849900081.
- [65] Leclerc M, Elfoul-Bensaid L, Bernalier A. Effect of yeast extract on growth and metabolism of H₂-utilizing acetogenic bacteria from the human colon. *Current Microbiology*. 1998 okt;37(3):166–71. doi:10.1007/s002849900358.
- [66] Majors PD, McLean JS, Scholten JCM. NMR bioreactor development for live in-situ microbial functional analysis. *Journal of Magnetic Resonance*. 2008;192(1):159–66. doi:10.1016/j.jmr.2008.02.014.
- [67] Mechichi T, Labat M, Woo TH, Thomas P, Garcia JL, Patel BK. *Eubacterium aggregans* sp. nov., a new homoacetogenic bacterium from olive mill wastewater treatment digester. *Anaerobe*. 1998;4(6):283–91. doi:10.1006/anae.1998.0179.
- [68] Poehlein A, Gottschalk G, Daniel R. First Insights into the genome of the Gram-negative, endospore forming organism *Sporomusa ovata* strain H1 DSM 2662. *Genome Announcements*. 2013 sep;1(5):1–2. doi:doi:10.1128/genomeA.00734-13.
- [69] Liu K, Atiyeh HK, Stevenson BS, Tanner RS, Wilkins MR, Huhnke RL. Mixed culture syngas fermentation and conversion of carboxylic acids into alcohols. *Bioresource Technology*. 2014 jan;152:337–46. doi:10.1016/J.BIORTECH.2013.11.015.
- [70] Liu K, Atiyeh HK, Stevenson BS, Tanner RS, Wilkins MR, Huhnke RL. Continuous syngas fermentation for the production of ethanol, n-propanol and n-butanol. *Bioresource Technology*. 2014 jan;151:69–77. doi:10.1016/J.BIORTECH.2013.10.059.

- [71] Devarapalli M, Atiyeh HK. A review of conversion processes for bioethanol production with a focus on syngas fermentation. *Biofuel Research Journal*. 2015 sep;2(3):268–80. doi:10.18331/BRJ2015.2.3.5.
- [72] Burton F. New Computer Model Harnesses Ancient Biology for Climate Change Solution [Internet]. Lanzatech; 2017 [uppdaterad 2017-06-07, citerad 2018-05-02]. Tillgänglig från: <http://www.lanzatech.com/new-computer-model-harnesses-ancient-biology-climate-change-solution/>.
- [73] Brown SD, Nagaraju S, Utturkar S, De Tissera S, Segovia S, Mitchell W, et al. Comparison of single-molecule sequencing and hybrid approaches for finishing the genome of *Clostridium autoethanogenum* and analysis of CRISPR systems in industrial relevant Clostridia. *Biotechnology for Biofuels*. 2014 mar;7(1):1–18. doi:10.1186/1754-6834-7-40.
- [74] Fernández-Naveira Á, Abubackar HN, Veiga MC, Kennes C. Production of chemicals from C1 gases (CO, CO₂) by *Clostridium carboxidivorans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2017;33(3):1–11. doi:10.1007/s11274-016-2188-z.
- [75] Reeves A, uppfinnare; Synata Bio Inc, patentinnehavare. Recombinant microorganisms having modified production of alcohols and acids. Amerikansk patentansökan US20100151543A1; 2010-06-17. Tillgänglig från: <https://patentimages.storage.googleapis.com/81/74/9e/931301b8b76f67/US20100151543A1.pdf>.
- [76] Zhu X, Tan X. Metalloproteins/metalloenzymes for the synthesis of acetyl-CoA in the Wood-Ljungdahl pathway. *Science in China Series B: Chemistry*. 2009 dec;52(12):2071–82. doi:10.1007/s11426-009-0082-3.
- [77] Ljungdahl LG. Formate Dehydrogenases: Role of molybdenum, tungsten and selenium. I: Coughlan MP, redaktör. *Molybdenum and Molybdenum-Containing Enzymes*. Elsevier; 1980. s. 463–86. doi:10.1016/B978-0-08-024398-6.50020-1.
- [78] Ramió-Pujol S, Ganigué R, Bañeras L, Colprim J, Ganigué R. Impact of formate on the growth and productivity of *Clostridium ljungdahlii* PETC and *Clostridium carboxidivorans* P7 grown on syngas. *International Microbiology*. 2014;17:195–204. doi:10.2436/20.1501.01.222.
- [79] Gößner AS, Picardal F, Tanner RS, Drake HL. Carbon metabolism of the moderately acid-tolerant acetogen *Clostridium drakei* isolated from peat. *FEMS Microbiology Letters*. 2008 okt;287(2):236–42. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01313.x.
- [80] Gaddy JL, uppfinnare; Bioengineering Resources Inc., patentinnehavare. Biological production of acetic acid from waste gases with *Clostridium ljungdahlii*. Amerikanskt patent US5807722A; 1998-09-15. Tillgänglig från: <https://patents.google.com/patent/US5807722A/en>.
- [81] Aklujkar M, Leang C, Shrestha PM, Shrestha M, Lovley DR. Transcriptomic profiles of *Clostridium ljungdahlii* during lithotrophic growth with syngas or H₂ and CO₂ compared to organotrophic growth with fructose. *Scientific Reports*. 2017;7(1):1–14. doi:10.1038/s41598-017-12712-w.
- [82] Tremblay PL, Zhang T. Electrifying microbes for the production of chemicals. *Frontiers in Microbiology*. 2015 mar;6:1–10. doi:10.3389/fmicb.2015.00201.
- [83] Acharya B, Dutta A, Basu P. Ethanol production by syngas fermentation in a continuous stirred tank bioreactor using *Clostridium ljungdahlii*. *Biofuels*. 2017;s. 1–17. doi:10.1080/17597269.2017.1316143.
- [84] Huang H, Chai C, Li N, Rowe P, Minton NP, Yang S, et al. CRISPR/Cas9-based efficient genome editing in *Clostridium ljungdahlii*, an autotrophic

- gas-fermenting bacterium. *ACS Synthetic Biology*. 2016 dec;5(12):1355–61. doi:10.1021/acssynbio.6b00044.
- [85] Doerner KC, Cook KL, Mason BP. 3-Methylindole production is regulated in *Clostridium scatologenes* ATCC 25775. *Letters in Applied Microbiology*. 2009 jan;48(1):125–32. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02502.x.
- [86] Humphreys CM, McLean S, Schatschneider S, Millat T, Henstra AM, Annan FJ, et al. Whole genome sequence and manual annotation of *Clostridium autoethanogenum*, an industrially relevant bacterium. *BMC Genomics*. 2015;16(1):1–10. doi:10.1186/s12864-015-2287-5.
- [87] Nagarajan H, Sahin M, Nogales J, Latif H, Lovley DR, Ebrahim A. Characterizing acetogenic metabolism using a genome-scale metabolic reconstruction of *Clostridium ljungdahlii*. *Microbial Cell Factories*. 2013;12:1–13. doi:10.1186/1475-2859-12-118.
- [88] DOE Joint Genome Institute. *Alkalibaculum bacchi* DSM 22112 [Internet]. DOE Joint Genome Institute; 2017 [uppdaterad 2017-12-21, citerad 2018-04-06]. Tillgänglig från: <https://gold.jgi.doe.gov/projects?id=Gp0290503>.
- [89] DOE Joint Genome Institute. *Eubacterium aggregans* SR12 [Internet]. DOE Joint Genome Institute; 2015 [uppdaterad 2015-05-15, citerad 2018-05-06]. Tillgänglig från: <https://gold.jgi.doe.gov/projects?id=Gp0115158>.
- [90] Thamdrup B, Finster K, Hansen JW, Thamdrup BO, Finster KM, Hansen JW. Bacterial disproportionation of elemental sulfur coupled to chemical reduction of iron or manganese. *Applied and Environmental Microbiology*. 1993;59(1):101–8. Tillgänglig från: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC202062/>.
- [91] Lovley DR, Stolz JF, Nord GL, Phillips EJP. Anaerobic production of magnetite by a dissimilatory iron-reducing microorganism. *Nature*. 1987;330(6145):252–4. doi:10.1038/330252a0.
- [92] Sleat R, Mah RA, Robinson R. *Acetoanaerobium noterae* gen. nov., sp. nov.: an anaerobic bacterium that forms acetate from H₂ and CO₂. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1985;35(1):10–5. doi:10.1099/00207713-35-1-10.
- [93] Davydova-Charakhch'yan I, Mileeva A, Mityushina L, Belyaev S. Acetogenic bacteria from oil fields of Tataria and wester Siberia. *Mikrobiologiya*. 1992;61:208–15.
- [94] Le Van TD, Robinson JA, Ralph J, Greening RC, Smolenski WJ, Leedle JAZ, et al. Assessment of reductive acetogenesis with indigenous ruminal bacterium populations and *Acetitomaculum ruminis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998 sep;64(9):3429–36. Tillgänglig från: <http://aem.asm.org/content/64/9/3429.long>.
- [95] Kotsyurbenko OR, Simankova MV, Nozhevnikova AN, Zhilina TN, Bolotina NR, Lysenko AM, et al. New species of psychrophilic acetogens: *Acetobacterium bakii* sp. nov., *A. paludosum* sp. nov., *A. fimetarium* sp. nov. *Archives of Microbiology*. 1995;163:29–34. doi:10.1007/BF00262200.
- [96] Hwang S, Song Y, Cho BK. Draft genome sequence of *Acetobacterium bakii* DSM 8239, a potential psychrophilic chemical producer through syngas fermentation. *Genome Announcements*. 2015 sep;3(5):1–2. doi:10.1128/genomeA.01070-15.
- [97] Traunecker J, Preuß A, Diekert G. Isolation and characterization of a methyl chloride utilizing, strictly anaerobic bacterium. *Archives of Microbiology*. 1991;156:416–21. doi:10.1007/BF00248720.

- [98] Tanaka K, Pfennig N. Fermentation of 2-methoxyethanol by *Acetobacterium malicum* sp. nov. and *Pelobacter venetianus*. *Archives of Microbiology*. 1988;149(988):181–7. doi:10.1007/BF00422003.
- [99] Krumholz LR, Harris SH, Tay ST, Suffita JM. Characterization of two subsurface H₂-utilizing bacteria, *Desulfomicrobium hypogeium* sp. nov. and *Acetobacterium psammolithicum* sp. nov., and their ecological roles. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999 jun;65(6):2300–6. Tillgänglig från: <http://aem.asm.org/content/65/6/2300.long>.
- [100] Inoue K, Kageyama S, Miki K, Morinaga T, Kamagata Y, Nakamura K, et al. Vitamin B₂ production by *Acetobacterium* sp. and its tetrachloromethane-resistant mutants. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1992 jan;73(1):76–8. doi:10.1016/0922-338X(92)90238-P.
- [101] Bainotti AE, Nishio N. Growth kinetics of *Acetobacterium* sp. on methanol-formate in continuous culture. *Journal of Applied Microbiology*. 2000 feb;88(2):191–201. doi:10.1046/j.1365-2672.2000.00854.x.
- [102] Dörner C, Schink B. Fermentation of mandelate to benzoate and acetate by a homoacetogenic bacterium. *Archives of Microbiology*. 1991 sep;156(4):302–6. doi:10.1007/BF00263002.
- [103] Sembiring T, Winter J. Demethylation of aromatic compounds by strain B10 and complete degradation of 3-methoxybenzoate in co-culture with *Desulfosarcina* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1990 maj;33(2):233–8. doi:10.1007/BF00176531.
- [104] Schramm E, Schink B. Ether-cleaving enzyme and diol dehydratase involved in anaerobic polyethylene glycol degradation by a new *Acetobacterium* sp. *Biodegradation*. 1991;2:71–9. doi:10.1007/BF00114597.
- [105] Wagener S, Schinkt B. Fermentative degradation of nonionic surfactants and polyethylene glycol by enrichment cultures and by pure cultures of homoacetogenic and propionate-forming bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 1988;54(2):561–5. Tillgänglig från: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC202491/pdf/aem00107-0289.pdf>.
- [106] Frings J, Schink B. Fermentation of phenoxyethanol to phenol and acetate by a homoacetogenic bacterium. *Archives of Microbiology*. 1994;162:199–204. doi:10.1007/BF00314475.
- [107] Frings J, Wondrak C, Schink B. Fermentative degradation of triethanolamine by a homoacetogenic bacterium. *Archives of Microbiology*. 1994;162(1):103–7. doi:10.1007/BF00264381.
- [108] Speranza G, Morelli CF, Cairoli P, Müller B, Schink B. Mechanism of anaerobic degradation of triethanolamine by a homoacetogenic bacterium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006 okt;349(2):480–4. doi:10.1016/J.BBRC.2006.08.001.
- [109] Simankova MV, Kotsyurbenko OR, Stackebrandt E, Kostrikina NA, Lysenko AM, Osipov GA, et al. *Acetobacterium tundrae* sp. nov., a new psychrophilic acetogenic bacterium from tundra soil. *Archives of Microbiology*. 2000;174(6):440–7. doi:10.1007/s002030000229.
- [110] Braun M, Gottschalk G. *Acetobacterium wieringae* sp. nov., a new species producing acetic acid from molecular hydrogen and carbon dioxide. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene: I Abt Originale C: Allgemeine, ange-*

- wandte und ökologische Mikrobiologie. 1982 jul;3(3):368–76. doi:10.1016/S0721-9571(82)80017-3.
- [111] Sharak BR, Bryant MP. Additional characteristics of one-carbon-compound utilization by *Eubacterium limosum* and *Acetobacterium woodii*. *Applied Environmental Biology*. 1987;53(3):471–6. Tillgänglig från: <http://aem.asm.org/content/53/3/471.long>.
- [112] Poehlein A, Schmidt S, Kaster Ak, Goenrich M, Vollmers J, Bertsch J, et al. An ancient pathway combining carbon dioxide fixation with the generation and utilization of a sodium ion gradient for ATP synthesis. *PLoS ONE*. 2012;7(3):1–8. doi:10.1371/journal.pone.0033439.
- [113] Balch WE, Schoberth S, Tanner RS, Wolfe RS. *Acetobacterium*, a new genus of hydrogen-oxidizing, carbon dioxide-reducing, anaerobic bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1977;27(4):355–61. doi:10.1099/00207713-27-4-355.
- [114] Sikorski J, Lapidus A, Chertkov O, Lucas S, Copeland A, Glavina Del Rio T, et al. Complete genome sequence of *Acetohalobium arabaticum* type strain (Z-7288). *Standards in Genomic Sciences*. 2010 aug;3(1):57–65. doi:10.4056/sigs.1062906.
- [115] Chen S, Beeby M, Murphy GE, Leadbetter JR, Hendrixson DR, Briegel A, et al. Structural diversity of bacterial flagellar motors. *The EMBO Journal*. 2011 jun;30(14):2972–81. doi:10.1038/emboj.2011.186.
- [116] Kane MD, Breznak JA. *Acetonema longum* gen.nov.sp.nov., an H₂/CO₂ acetogenic bacterium from the termite, *Pterotermes occidentis*. *Archives of Microbiology*. 1991 aug;156(2):91–8. doi:10.1007/BF00290979.
- [117] Liu C, Li J, Zhang Y, Philip A, Shi E, Chi X, et al. Influence of glucose fermentation on CO₂ assimilation to acetate in homoacetogen *Blautia coccoides* GA-1. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2015 sep;42(9):1217–24. doi:10.1007/s10295-015-1646-1.
- [118] Garzetti D, Brugiroux S, Bunk B, Pukall R, McCoy KD, Macpherson AJ, et al. High-quality whole-genome sequences of the oligo-mouse-microbiota bacterial community. *Genome Announcements*. 2017 okt;5(42):1–2. doi:10.1128/genomeA.00758-17.
- [119] Vega JL, Klasson KT, Kimmel DE, Clausen EC, Gaddy JL. Sulfur gas tolerance and toxicity of co-utilizing and methanogenic bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1990 mar;24(1):329–40. doi:10.1007/BF02920257.
- [120] Lorowitz WH, Bryant MP. *Peptostreptococcus productus* strain that grows rapidly with CO as the energy source. *Applied and Environmental Microbiology*. 1984 maj;47(5):961–4. Tillgänglig från: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC240027/>.
- [121] Misoph M, Drake HL. Effect of CO₂ on the fermentation capacities of the acetogen *Peptostreptococcus productus* U-1. *Journal of Bacteriology*. 1996 jun;178(11):3140–5. doi:10.1128/JB.178.11.3140-3145.1996.
- [122] Rieu-Lesme F, Movan B, Collins MD, Fonty G WA. A new H₂/CO₂-using acetogenic bacterium from the lumen : Description of *Ruminococcus schinkii* sp . nov . av. *FEMS Microbiology Letters*. 1996;140:281–6. doi:10.1016/0378-1097(96)00195-4.
- [123] Braun M, Mayer F, Gottschalk G. *Clostridium aceticum* (Wieringa), a microorganism producing acetic acid from molecular hydrogen and carbon dioxide. *Archives of Microbiology*. 1981;128(3):288–93. doi:10.1007/BF00422532.

- [124] Sim JH, Kamaruddin AH, Long WS, Najafpour G. Clostridium aceticum—A potential organism in catalyzing carbon monoxide to acetic acid: Application of response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007 apr;40(5):1234–43. doi:10.1016/J.ENZMICTEC.2006.09.017.
- [125] Poehlein A, Bengelsdorf FR, Schiel-Bengelsdorf B, Gottschalk G, Daniel R, Dürre P. Complete genome sequence of Rnf- and cytochrome-containing autotrophic acetogen Clostridium aceticum DSM 1496. *Genome Announcements*. 2015 jul;3(4):1–2. doi:10.1128/genomeA.00786-15.
- [126] Wieringa KT. The formation of acetic acid from carbon dioxide and hydrogen by anaerobic spore-forming bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1939;6(1):251–62. doi:10.1007/BF02146190.
- [127] Karl MM, Poehlein A, Bengelsdorf FR, Daniel R, Dürre P. Complete genome sequence of the autotrophic acetogen Clostridium formicaceticum DSM 92 T using nanopore and illumina sequencing data. *Genome Announcements*. 2017 maj;5(21):1–2. doi:10.1128/genomeA.00423-17.
- [128] Gottschalk G. Clostridium formicoaceticum nov. spec. Isolation, description and distinction from C. aceticum and C. thermoaceticum. *Archives of Microbiology*. 1970;174:154–74. doi:10.1007/BF00409521.
- [129] Bomar M, Hippe H, Schink B. Lithotrophic growth and hydrogen metabolism by Clostridium magnum. *FEMS Microbiology Letters*. 1991 okt;67(3):347–9. doi:10.1111/j.1574-6968.1991.tb04488.x.
- [130] Uhlig R, Poehlein A, Fischer RJ, Daniel R, Bahl H. Genome sequence of the autotrophic acetogen Clostridium magnum DSM 2767. *Genome Announcements*. 2016 jun;4(3):1. doi:10.1128/genomeA.00464-16.
- [131] Schink B. Clostridium magnum sp. nov., a non-autotrophic homoacetogenic bacterium. *Archives of Microbiology*. 1984;137:250–5. doi:10.1007/BF00414553.
- [132] Mechichi T, Labat M, Patel BK, Woo TH, Thomas P, Garcia JL. Clostridium methoxybenzovorans sp. nov., a new aromatic o-demethylating homoacetogen from an olive mill wastewater treatment digester. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1999;49:1201–9. doi:10.1099/00207713-49-3-1201.
- [133] Schnurer A, Schink B, Svensson BH. Clostridium ultunense sp. nov., a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a hydrogenotrophic methanogenic bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1996 okt;46(4):1145–52. doi:10.1099/00207713-46-4-1145.
- [134] Henstra AM, Sipma J, Rinzema A, Stams AJ. Microbiology of synthesis gas fermentation for biofuel production. *Current Opinion in Biotechnology*. 2007 jun;18(3):200–6. doi:10.1016/j.copbio.2007.03.008.
- [135] Zhilina TN, Zavarzina DG, Panteleeva AN, Osipov GA, Kostrikina NA, Tourova TP, et al. Fuchsiella alkaliacetigena gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic, lithoautotrophic homoacetogen from a soda lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2012 jul;62(7):1666–73. doi:10.1099/ij.s.0.034363-0.
- [136] Kuznetsov BB, Zavarzina DG, Detkova EN, Zhilina TN, Patutina EO. Fuchsiella ferrireducens sp. nov., a novel haloalkaliphilic, lithoautotrophic homoacetogen capable of iron reduction, and emendation of the description of the genus Fuchsiella. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2015 aug;65(8):2432–40. doi:10.1099/ij.s.0.000278.

- [137] Krumholz LR, Bryant MP. *Clostridium pfennigii* sp. nov. Uses Methoxyl Groups of Monobenzenoids and Produces Butyrate. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1985 okt;35(4):454–6. doi:10.1099/00207713-35-4-454.
- [138] Henderson G, Naylor GE, Leahy SC, Janssen PH. Presence of novel, potentially homoacetogenic bacteria in the rumen as determined by analysis of formyltetrahydrofolate synthetase sequences from ruminants. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010 apr;76(7):2058–66. doi:10.1128/AEM.02580-09.
- [139] Bengelsdorf FR, Poehlein A, Schiel-Bengelsdorf B, Daniel R, Dürre P. Genome sequence of the acetogenic bacterium *Oxobacter pfennigii* DSM 3222T. *Genome Announcements*. 2015 dec;3(6):1–2. doi:10.1128/genomeA.01408-15.
- [140] Ollivier B, Cordruwisch R, Lombardo A, Garcia JL. Isolation and characterization of *Sporomusa acidovorans* sp. nov., a methylotrophic homoacetogenic bacterium. *Archives of Microbiology*. 1985;142:307–10. doi:10.1007/BF00693409.
- [141] Boga HI, Ludwig W, Brune A. *Sporomusa aerivorans* sp. nov., an oxygen-reducing homoacetogenic bacterium from the gut of a soil-feeding termite. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003;53:1397–1404. doi:10.1099/ijs.0.02534-0.
- [142] Dehning I, Schink B. Anaerobic degradation of malonate via malonyl-CoA by *Sporomusa malonica*, *Klebsiella oxytoca*, and *Rhodobacter capsulatus*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1994;66:343–50. doi:10.1007/BF00882771.
- [143] Dehning I, Stieb M, Schink B. *Sporomusa malonica* sp. nov., a homoacetogenic bacterium growing by decarboxylation of malonate or succinate. *Archives of Microbiology*. 1989;151:421–6. doi:10.1007/BF00416601.
- [144] Hermann M, Popoff MR, Sebald M. *Sporomusa paucivorans* sp. nov., a Methylotrophic Bacterium That Forms Acetic Acid from Hydrogen and Carbon Dioxide. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1987 apr;37(2):93–101. doi:10.1099/00207713-37-2-93.
- [145] Gößner AS, Küsel K, Schulz D, Trenz S, Acker G, Lovell CR, et al. Trophic interaction of the aerotolerant anaerobe *Clostridium intestinale* and the acetogen *Sporomusa rhizae* sp. nov. isolated from roots of the black needlerush *Juncus roemerianus*. *Microbiology*. 2006 apr;152(4):1209–19. doi:10.1099/mic.0.28725-0.
- [146] Kuhner CH, Frank C, Griebzhammer A, Schimttroth M, Acker G, Gößner A, et al. *Sporomusa silvacetica* sp. nov., an Acetogenic Bacterium Isolated from Aggregated Forest Soil. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1997 apr;47(2):352–8. doi:10.1099/00207713-47-2-352.
- [147] Humphreys JR, Daniel R, Poehlein A. Insights into the genome of the anaerobic acetogen *Sporomusa silvacetica* DSM 10669. *Genome Announcements*. 2017 sep;5(38):1–2. doi:10.1128/genomeA.00983-17.
- [148] Rosencrantz D, Rainey FA, Janssen PH. Culturable populations of *Sporomusa* spp. and *Desulfovibrio* spp. in the anoxic bulk soil of flooded rice microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999 aug;65(8):3526–33. Tillgänglig från: <http://aem.asm.org/content/65/8/3526.long>.
- [149] Villamizar GAC, Daniel R, Poehlein A. First insights into the genome sequence of the strictly anaerobic homoacetogenic *Sporomusa sphaeroides* Strain E (DSM 2875). *Genome Announcements*. 2017 mar;5(12):1–2. doi:10.1128/genomeA.00037-17.

- [150] Breznak JA, Switzer JM, Seitz HJ. *Sporomusa termitida* sp. nov., an H₂/CO₂-utilizing acetogen isolated from termites. *Archives of Microbiology*. 1988;50:282–8. doi:10.1007/BF00407793.
- [151] Graber JR, Breznak JA. Physiology and nutrition of *Treponema primitia*, an H₂/CO₂-acetogenic spirochete from termite hindguts. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004 mar;70(3):1307–14. doi:10.1128/AEM.70.3.1307-1314.2004.
- [152] Rosenthal AZ, Matson EG, Eldar A, Leadbetter JR. RNA-seq reveals cooperative metabolic interactions between two termite-gut spirochete species in co-culture. *The ISME Journal*. 2011 jul;5(7):1133–42. doi:10.1038/ismej.2011.3.

A | Appendix

A.1 YTF-medium

Ingredienser för YTF-medium (yeast-tryptone-fructose) är listade i tabell A.1.

Tabell A.1: *Ingredienser för YTF-medium, per liter.*

Ämne	Per 1 l
Jästextrakt	10 g
Pepton	16 g
D-Fruktos	10 g
NaCl	0,2 g
Acid Stock Soln. (1000X)	1 ml
Base Stock Soln. (1000X)	1 ml
Wolfes vitaminlösning	1 ml
Resazurin 0,1 %	1 ml
Agar	15 g

A.2 PETC-medium (ATCC 1754)

Ingredienser för PETC-medium är listade i tabell A.2. D-fruktos tillsattes till flaskorna efter autoklavering för att undvika reaktion mellan kolhydrater och aminosyror vid hög temperatur. L-cystein tillsattes först då flaskan var försluten. Detta gjordes samtidigt som D-fruktos tillsattes.

Tabell A.2: *Ingredienser för PETC-medium, per liter. MES är bufferten 2-(N-morfolin)etansulfonsyra.*

Ämne	Per 1 l
Nitrilotriacetic acid (NTA)	0,05 g
MES monohydrat	20 g
NH ₄ Cl	1 g
KCl	0,1 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g
Fe(SO ₄) ₂ (NH ₄) ₂ · 6H ₂ O	0,05 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,02 g
Casein Hydrolysat	1,5 g
Spårmetallösning (x100)	10 ml
Wolfe's vitaminlösning (x1000)	1 ml
Resazurin 0,1 %	1 ml
D-Fruktos 3 M	17 ml
L-Cystein 4 % (w/v)	10 ml

A.3 Acetatbildande organismer

Här listas de acetogener, och deras egenskaper, som inte bevisats producera etanol, men som producerar acetat.

Tabell A.3: *Organismer som bildar acetat. Listat är temperatur- och pH-intervall för tillväxt (om tillgängligt), substratspektrum, om organismen finns kommersiellt tillgänglig (Kom.) och om genomet är sekvenserat (Gen.), * innebär att enstaka värden och inget intervall har undersökts.*

Organismnamn	Temp [°C]	pH	Substrat	Kom.	Gen.	Källa
<i>Acetoanaerobium noterae</i>	35-37*	6,6-8,4	H ₂ /CO ₂	Ja	Ja	[16, 92]
<i>Acetoanaerobium romashkovii</i>	30-60	6,0-9,0	H ₂ /CO ₂	Nej	Nej	[13, 93]
<i>Acetoanaerobium ruminis</i>	34-43	6,4-7,3	H ₂ /CO ₂	Nej	Nej	[16, 94]
<i>Acetobacterium bakii</i>	1-30	5,5-8,5	H ₂ /CO ₂ , CO	Ja	Draft	[16, 95, 96]
<i>Acetobacterium carbinolicum</i>	15-42	7,0-7,2	H ₂ /CO ₂	Ja	Nej	[16]
<i>Acetobacterium dehalogenans</i>	23-35	7,3-7,7*	H ₂ /CO ₂ , CO	Ja	Ja	[16, 97]
<i>Acetobacterium fimetarium</i>	1-35	6,0-8,5	H ₂ /CO ₂ , CO	Ja	Nej	[16, 95]
<i>Acetobacterium malicum</i>	30*	7,5-8,0	H ₂ /CO ₂	Ja	Nej	[16, 98]
<i>Acetobacterium paludosum</i>	1-30	5,0-8,0	H ₂ /CO ₂ , CO	Ja	Nej	[16, 95]
<i>Acetobacterium psammolithicum</i>	23-37*	6,8-7,9*	H ₂ /CO ₂	Nej	Nej	[99]
<i>Acetobacterium</i> sp. 69	30*	7,2*	H ₂ /CO ₂	Nej	Nej	[100, 101]
<i>Acetobacterium</i> sp. amman1	4-32	5,9-8,0	H ₂ /CO ₂	Nej	Nej	[102]
<i>Acetobacterium</i> sp. b10	34-37*	-	H ₂ /CO ₂	Nej	Nej	[103]
<i>Acetobacterium</i> sp. ha1	30*	7,1-7,3*	H ₂ /CO ₂	Nej	Nej	[104]
<i>Acetobacterium</i> sp. kob58	-	7,2-7,4*	H ₂ /CO ₂	Nej	Nej	[105]
<i>Acetobacterium</i> sp. luphet1	12-37	6,0-8,0	H ₂ /CO ₂	Nej	Nej	[106]
<i>Acetobacterium</i> sp. LuTria 3	12-37	6,0-8,2	H ₂ /CO ₂	Ja	Nej	[107, 108]
<i>Acetobacterium tundrae</i>	20-26	6,0-8,0	H ₂ /CO ₂ , CO	Ja	Nej	[16, 109]
<i>Acetobacterium wieringae</i>	30*	7,6*	H ₂ /CO ₂	Ja	Ja	[16, 110]

A. Appendix

<i>Acetobacterium woodii</i>	30*	6,8*	H ₂ /CO ₂ , CO	Ja	Ja	[111, 112, 113]
<i>Acetohalobium arabaticum</i>	38-40	7,6-8,0	H ₂ /CO ₂ , CO	Ja	Ja	[16, 114]
<i>Acetonema longum</i>	19-40	6,4-8,6	H ₂ /CO ₂	Ja	Ja	[5, 115, 116]
<i>Blautia coccoides</i>	20-50	7,0*	H ₂ /CO ₂	Ja	Ja	[16, 117, 118]
<i>Blautia producta</i>	37*	6,7-7,0*	H ₂ /CO ₂ , CO	Ja	Ja	[119, 120, 121]
<i>Blautia schinkii</i>	20-45	5,3-8,2	H ₂ /CO ₂	Ja	Ja	[16, 122]
<i>Clostridium aceticum</i>	22-45	7,0-10,5	H ₂ /CO ₂ , CO	Ja	Ja	[123, 124, 125, 126]
<i>Clostridium formicoaceticum</i>	22-44	-	CO	Ja	Ja	[5, 127, 128]
<i>Clostridium magnum</i>	15-45	6,0-7,8	H ₂ /CO ₂	Ja		[129, 5, 130, 131]
<i>Clostridium methoxybenzovorans</i>	20-45	5,5-9,0	H ₂ /CO ₂	Ja	Ja	[5, 132]
<i>Clostridium ultunense</i>	15-50	5,0-10,0	H ₂ /CO ₂		Nej	[133]
<i>Eubacterium limosum</i>	38-39*	7,0-7,2*	H ₂ /CO ₂ , CO	Ja	Ja	[134, 5]
<i>Fuchsiella alkaliacetigena</i>	20-45	8,5-10,5	H ₂ /CO ₂	Ja	Nej	[135]
<i>Fuchsiella ferrireducens</i>	25-45	8,5-10,7	H ₂ /CO ₂	Ja	Nej	[136]
<i>Oxobacter pfennigii</i>	23-39	6,3-8,0	CO	Ja	Ja	[137, 6, 138, 139]
<i>Sporomusa acidovorans</i>	20-40	5,4-7,5	H ₂ /CO ₂	Ja	Ja	[16, 140, 28]
<i>Sporomusa aerivorans</i>	19-35	6,2-8,2	H ₂ /CO ₂	Ja	Nej	[16, 141]
<i>Sporomusa malonica</i>	15-38	6,0-8,5	H ₂ /CO ₂	Ja	Ja	[16, 142, 143]
<i>Sporomusa paucivorans</i>	34*	6,7*	H ₂ /CO ₂	Ja	Nej	[144]
<i>Sporomusa rhizae</i>	10-50	5,5-9,0	H ₂ /CO ₂	Ja	Nej	[16, 145]
<i>Sporomusa silvacetica</i>	10-35	5,5-7,7*	H ₂ /CO ₂	Ja	Ja	[146, 147]
<i>Sporomusa</i> sp. dr1/8	15-25*	6,8*	H ₂ /CO ₂	Nej	Nej	[148]
<i>Sporomusa</i> sp. dr6	15-25*	6,8*	H ₂ /CO ₂	Nej	Nej	[148]
<i>Sporomusa sphaeroides</i>	15-45	5,7-8,7	H ₂ /CO ₂	Ja	Ja	[24, 149, 144]

A. Appendix

<i>Sporomusa termitida</i>	19-37	7,2*	H ₂ /CO ₂ , CO	Ja	Nej	[16, 150]
<i>Terrisporobacter glycolicus</i>	37*	7,0-7,5*	CO	Ja	Ja	[5]
<i>Terrisporobacter mayombeii</i>	15-45	5,5-9,3	H ₂ /CO ₂	Ja	Nej	[5, 116]
<i>Treponema primitia</i>	23-32*	6,5-7,8	H ₂ /CO ₂	Ja	Ja	[151, 152]

A.4 Datavärden från HPLC samt OD- och pH-mätningar

Nedan presenteras den data som graferna i avsnitt 4.3.2 baseras på.

A.4.1 *C. carboxidivorans*

I tabell A.4, A.5, A.6 och A.7 kan datavärden från HPLC för producerad mängd etanol och acetat samt mätningar av OD respektive pH utläsas.

Tabell A.4: Uppmätt mängd producerad etanol [mM] av *C. carboxidivorans* vid tillsats av 0 mM, 20 mM, 35 mM, 50 mM och 100 mM ammoniak i respektive serumflaska. HPLC-mätningar skedde 2,85 och 5,85 dagar efter referenstidpunkten (ref).

	0 mM	20 mM	35 mM	50 mM	100 mM
Ref.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2,85 dagar	7,59	6,79	7,27	2,03	0,87
5,85 dagar	14,91	13,14	14,53	6,03	0,03

Tabell A.5: Uppmätt mängd producerad acetat [mM] av *C. carboxidivorans* vid tillsats av 0 mM, 20 mM, 35 mM, 50 mM och 100 mM ammoniak i respektive serumflaska. HPLC-mätningar skedde 2,85 och 5,85 dagar efter referenstidpunkten (ref).

	0 mM	20 mM	35 mM	50 mM	100 mM
Ref.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2,85 dagar	5,86	7,87	10,84	7,75	0,00
5,85 dagar	10,01	10,05	12,45	8,92	0,00

Tabell A.6: OD_{660} uppmätt för *C. carboxidivorans* vid tillsats av 0 mM, 20 mM, 35 mM, 50 mM och 100 mM ammoniak i respektive serumflaska. Mätningar skedde 2,85 och 5,85 dagar efter referenstidpunkten (ref).

	0 mM	20 mM	35 mM	50 mM	100 mM
Ref.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2,85 dagar	0,50	0,80	0,82	0,49	0,00
5,85 dagar	0,76	1,00	1,05	0,78	0,04

Tabell A.7: pH uppmätt för *C. carboxidivorans* vid tillsats av 0 mM, 20 mM, 35 mM, 50 mM och 100 mM ammoniak i respektive serumflaska. Mätningar skedde 2,85 och 5,85 dagar efter referenstidpunkten (ref).

	0 mM	20 mM	35 mM	50 mM	100 mM
Ref.	5,80	6,15	6,38	6,63	8,66
2,85 dagar	5,04	5,18	5,36	6,17	8,52
5,85 dagar	4,67	5,01	4,99	5,17	8,53

A.4.2 *C. ljungdahlii*

I tabell A.8, A.9, A.10 och A.11 kan datavärden från HPLC för producerad mängd etanol och acetat samt mätningar av OD respektive pH utläsas.

Tabell A.8: Uppmätt mängd producerad etanol [mM] av *C. ljungdahlii* vid tillsats av 0 mM, 20 mM, 35 mM, 50 mM och 100 mM ammoniak i respektive serumflaska. HPLC-mätningar skedde 3,15 och 6,16 dagar efter referenstidpunkten (ref).

	0 mM	20 mM	35 mM	50 mM	100 mM
Ref.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3,15 dagar	9,68	8,59	6,57	0,66	4,50
6,16 dagar	7,07	11,04	9,39	6,52	2,80

Tabell A.9: Uppmätt mängd producerad acetat [mM] av *C. ljungdahlii* vid tillsats av 0 mM, 20 mM, 35 mM, 50 mM och 100 mM ammoniak i respektive serumflaska. HPLC-mätningar skedde 3,15 och 6,16 dagar efter referenstidpunkten (ref).

	0 mM	20 mM	35 mM	50 mM	100 mM
Ref.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3,15 dagar	62,70	71,38	69,79	42,01	0,00
6,16 dagar	77,43	80,90	89,81	90,93	0,00

Tabell A.10: OD_{660} uppmätt för *C. ljungdahlii* vid tillsats av 0 mM, 20 mM, 35 mM, 50 mM och 100 mM ammoniak i respektive serumflaska. Mätningar skedde 3,15 och 6,16 dagar efter referenstidpunkten (ref).

	0 mM	20 mM	35 mM	50 mM	100 mM
Ref.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3,15 dagar	1,06	1,17	1,22	1,15	0,00
6,16 dagar	1,09	1,48	1,53	1,67	0,07

Tabell A.11: pH uppmätt för *C. ljungdahlii* vid tillsats av 0 mM, 20 mM, 35 mM, 50 mM och 100 mM ammoniak i respektive serumflaska. Mätningar skedde 3,15 och 6,16 dagar efter referenstidpunkten (ref).

	0 mM	20 mM	35 mM	50 mM	100 mM
Ref.	5,80	6,15	6,38	6,63	8,66
3,15 dagar	4,47	4,63	4,76	5,64	8,53
6,16 dagar	4,30	4,47	4,59	4,72	8,58

A.4.3 *C. autoethanogenum*

I tabell A.12, A.13, A.14 och A.15 kan datavärden från HPLC för producerad mängd etanol och acetat samt mätningar av OD respektive pH utläsas.

Tabell A.12: Uppmätt mängd etanol [mM] producerad av *C. autoethanogenum* vid tillsats av 0 mM, 20 mM, 35 mM, 50 mM och 100 mM ammoniak i respektive serumflaska. HPLC-mätningar skedde 2,97 och 5,95 dagar efter referenstidpunkten (ref).

	0 mM	20 mM	35 mM	50 mM	100 mM
Ref.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2,97 dagar	17,26	12,32	7,77	0,15	0,00
5,95 dagar	19,80	20,45	11,15	0,00	0,00

Tabell A.13: Uppmätt mängd acetat [mM] producerad av *C. autoethanogenum* vid tillsats av 0 mM, 20 mM, 35 mM, 50 mM och 100 mM ammoniak i respektive serumflaska. HPLC-mätningar skedde 2,97 och 5,95 dagar efter referenstidpunkten (ref).

	0 mM	20 mM	35 mM	50 mM	100 mM
Ref.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2,97 dagar	44,84	44,04	59,52	13,09	0,00
5,95 dagar	56,73	58,35	70,29	67,24	0,00

Tabell A.14: OD_{660} uppmätt för *C. autoethanogenum* vid tillsats av 0 mM, 20 mM, 35 mM, 50 mM och 100 mM ammoniak i respektive serumflaska. Mätningar skedde 2,97 och 5,95 dagar efter referenstidpunkten (ref).

	0 mM	20 mM	35 mM	50 mM	100 mM
Ref.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2,97 dagar	1,09	1,12	1,31	0,79	0,00
5,95 dagar	1,35	1,91	1,83	1,83	0,07

Tabell A.15: pH uppmätt för *C. autoethanogenum* vid tillsats av 0 mM, 20 mM, 35 mM, 50 mM och 100 mM ammoniak i respektive serumflaska. Mätningar skedde 2,97 och 5,95 dagar efter referenstidpunkten (ref).

	0 mM	20 mM	35 mM	50 mM	100 mM
Ref.	5,80	6,15	6,38	6,63	8,66
2,97 dagar	4,50	5,01	4,90	6,39	8,52
5,95 dagar	4,38	4,69	4,72	5,00	8,60

A.5 T-test för avnitt 4.3.2

I detta avsnitt redovisas de beräknade p-värden som användes för att analysera mätvärdena i avsnitt 4.3.2.

Tabell A.16: Beräknade p-värden för *C. carboxidivorans*. Etanolproduktion, acetatproduktion, OD_{660} och pH för respektive koncentrationer NH_3 vid 20, 35, 50 och 100 mM jämfört med etanolproduktion, acetatproduktion, OD_{660} och pH vid 0 mM NH_3 .

	20 mM NH_3	35 mM NH_3	50 mM NH_3	100 mM NH_3
Etanol	0,73628	0,70279	0,04512	0,00132
Acetat	0,81535	0,22445	0,38023	0,01853
OD_{660}	0,06878	0,06109	0,58797	0,02486
pH	0,07181	0,02531	0,02182	0,00011

Tabell A.17: Beräknade p-värden för *C. ljungdahlii*. Etanolproduktion, acetatproduktion, OD_{660} och pH för respektive koncentrationer NH_3 vid 20, 35, 50 och 100 mM jämfört med etanolproduktion, acetatproduktion, OD_{660} och pH vid 0 mM NH_3 .

	20 mM NH_3	35 mM NH_3	50 mM NH_3	100 mM NH_3
Etanol	0,98566	0,58372	0,12627	0,06793
Acetat	0,14848	0,05475	0,05475	0,02653
OD_{660}	0,07176	0,05333	0,10999	0,02571
pH	0,00007	0,00004	0,04091	0,00009

Tabell A.18: Beräknade p-värden för *C. autoethanogenum*. Etanolproduktion, acetatproduktion, OD_{660} och pH för respektive koncentrationer NH_3 vid 20, 35, 50 och 100 mM jämfört med etanolproduktion, acetatproduktion, OD_{660} och pH vid 0 mM NH_3 .

	20 mM NH_3	35 mM NH_3	50 mM NH_3	100 mM NH_3
Etanol	0,45828	0,04976	0,01483	0,01483
Acetat	0,93040	0,04027	0,42229	0,02736
OD_{660}	0,20668	0,04647	0,66914	0,02736
pH	0,05168	0,01217	0,04191	0,00001