

dansk kemi

Nummer 6/7 - Juni 2017 / 98. årgang

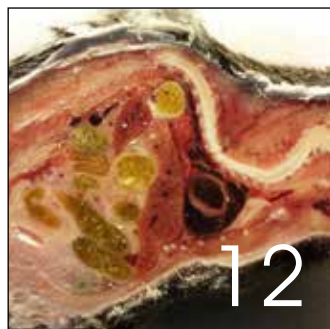
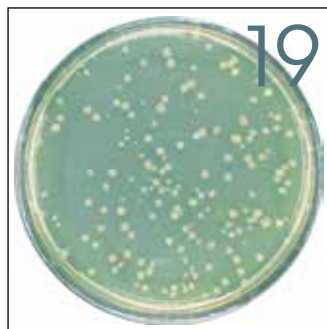
Kemisk Forening - Kemiingeniørgruppen

I kamp mod
antibiotikaresistens

Metode til måling
af lægemidler i væv

Udvikling
af moderne
slangemodgift

INDHOLD



1 Forside:
Andreas Hougaard Laustsen er i fuld gang med at udvikle moderne slangemodgift. Læs om princippet bag i artiklen på side 8. Foto: Michael Barrett Boesen.

8 Udvikling af moderne slangemodgift
Andreas Hougaard Laustsen arbejder med at udvikle moderne slangemodgift. En kompliceret og udfordrende opgave - det er ikke uden grund, at man i dag stadig fremstiller modgifte baseret på en teknik fra 1895.

12 Billeddannende massespektrometri
Metoden gør det muligt at følge lægemidler og deres omdannelse i organismen. Den er med succes benyttet til at følge et lægemiddels fordeling og metabolisme i en mus og et lægemiddels penetration gennem hud.

16 Bakterier deler gener i kampen mod antibiotika
Evolutionen har udrustet bakterierne med et bredt arsenal af mobile resistensgener. Ny forskning tyder dog på, at der er grænser for spredningen af resistens.

19 Hurtigere måling af antibiotikaresistens i tarmen
Mikrober i vores tarme kan nedbryde antibiotika, så behandlingen ikke virker. En ny, hurtig metode til påvisning af antibiotikaresistensgener kan føre til bedre behandling - og ultimativt til personlige antibiotikakure for den enkelte patient.

22 Sikring af risikovirksomheder
Nu skal risikovirksomheder udføre en sårbarhedsvurdering. Det er en følge af regeringens terrorhandlingsplan. En vejledning har netop været i høring.

26 Apotekerhaven, dyrk dine egne medicinske planter
Kan morgenfruer bruges mod betændelse i huden? Er chili smertegivende eller smertestillende? Er katteurt et naturskabt myggemiddel? Læs anmeldelsen af ny bog.

28 Geler stabiliseret af actin-myosin proteiner: Pølsefars
Den stabile gel, som fremstilles for at gøre emulgerede pølser saftige ved at binde vand i kødfarsen, er i familie med gelatine-gelen; men den er alligevel anderledes, da den er varmestabil.

TechMedia

Naverland 35
2600 Glostrup
Telefon 43 24 26 28
Fax 43 24 26 26
info@techmedia.dk
www.techmedia.dk

Redaktion:
Katrine Meyn (ansvarshavende)
km@techmedia.dk
Lektor Søren Kiil
sk@kt.dtu.dk
Ph.d. Kristian B. Krogh
kbk@novozymes.com
Professor Henrik Skov
hsk@envs.au.dk
Maria Bech Poulsen
mabp@envs.au.dk

ISSN 0011-6335 (tryk)
ISSN 1902-360x (online)

Ledelse:
Adm. direktør Peter Christensen
Direktør Rikke Marott Schelde
Direktør Susanne Eine

Redaktionskomité:
Professor Anne S. Meyer (formand)
Professor, dr. scient. Mikael Bols
Professor Morten J. Bjerrum
(Kemisk Forening)
Fagkonsulent i kemi Keld Nielsen
Lektor, dr. phil. Carl Th. Pedersen
Lektor, ph.d. Peter Szabo
(Kemiingeniørgruppen)
Professor, forskningschef Lars Wiebe
Lektor, civilingeniør, ph.d. Merete
Norsker Bergsøe
Vibeke Richter Foersom
(Næstformand, Kemilærerforeningen)
Konsulent Nikolai Stubkjær Nilsen
Procesindustrien
Seniorforsker, PhD.
Peter Have Rasmussen

**Redaktionssekretær/
Leverandørregister:**
Heidi Thode
ht@techmedia.dk

Annoncer:
Johnny Elmeskov,
tlf. 43 24 26 65
je@techmedia.dk

Annonceproduktion:
Marianne Dieckmann,
tlf. 43 24 26 82
md@techmedia.dk

Hjemmeside:
www.kemifokus.dk

Layout:
Morten Malmgren
og Trine Plass

Trykt på miljøvenligt
papir med vegetabiliske
miljøfarver.

Tryk:
PE offset A/S

Abonnement:
Ændring/opsigelse sendes til:
abonnement@techmedia.dk
Bestil abonnement direkte på:
www.techmedia.dk

Oplag: 5.245
Ekspl. heraf 4.803
i betalt abonnement.
Online læsere: 3.296

Citater fra artikler i Dansk Kemi skal ske med tydelig kildeangivelse. Enhver form for gengivelse af artikler, herunder illustrationer, forudsætter udgiverens skriftlige tilladelse. Redaktionen kan ikke påtage sig ansvaret for materiale, der indsendes uopfordret.

UK: Huson European Media -
Tel.: (+44) 1932-564999
USA, New York: Huson International Media
Tel.: +1 212 268 3344
USA, California: Huson International Media
Tel.: +1 408 879 6666
Germany: Huson International Media
Tel.: (+49) 89-9500-2778



Scan og hent Dansk Kemi's
medieinformation 2017 her!
Hent QR Scanner,
hvor du normalt henter apps.



MASTER OF INDUSTRIAL DRUG DEVELOPMENT

Get insight into the entire drug development process from molecule to market access

- Developed in close collaboration between University of Copenhagen and the pharmaceutical industry
- Courses combine outstanding academic-based research with an extensive contribution from leading experts from the pharmaceutical industry

Enroll in the full programme or take individual courses

Read more at mind.ku.dk or e-mail master@sund.ku.dk

Courses in 2017/2018

- Biopharmaceuticals Drug Development
- Quality by Design (QbD) in Pharmaceutical Development
- Market Access for Pharmaceutical Products – trends and challenges
- QA, QC, GXP for Pharmaceutical Production
- Clinical Pharmacology and Biostatistics
- Discovery and Development of Medicines
- Drug Discovery
- Non-Clinical Safety and Toxicology

MASTER OF MEDICINES REGULATORY AFFAIRS

Become the expert that can help secure a safe, coherent and successful regulatory process

The Master will give you

- Thorough insight into the regulatory process at all stages during the development of medicines
An overview of the differences in regulatory demands globally
- The competencies to analyse, predict and advise on medicines regulations and directives

The Master programme is offered in collaboration with Medicademy – part of Lif Education.

Enroll in the full programme or take individual courses

Courses in 2017/2018

- Regulatory Science – Perspectives on Clinical Development
- Global Medicines Legislation and Guidelines
- Regulatory Affairs in the EU
- Ethics in Regulatory Affairs of Pharmaceutical Products – Dilemmas in Decision-makings
- Safety of Medicines – From Non-clinical Development to Pharmacovigilance
- Quality – Active Substance and Medicinal Product
- Biopharmaceuticals – Quality Development and Documentation
- Clinical Development – Efficacy of Medicines
- Regulatory Affairs in the USA

Read more at mra.ku.dk or e-mail master@sund.ku.dk



Cirkulær Økonomi og Bioraffinering

” Den nye cirkulære og biologiske tilgang er grobund for en spændende udvikling i grænsefladen mellem bioteknologi, kemi, kemisk analyse, miljø- og kemiteknik

I 2016 nedsatte regeringen et Advisory Board for Cirkulær Økonomi med det kommissorium at udarbejde anbefalinger til, hvordan dansk erhvervslivs omstilling til en cirkulær økonomi mest hensigtsmæssigt kan understøttes¹. Helt kort drejer den cirkulære økonomi sig om at genanvende og recirkulere materialer og produkter med mindst muligt værditab. En Cirkulær Økonomi dagsorden er kolossalt positiv på mange fronter, og næppe mange er uenige i antagelsen om, at der er, udover store miljø- og klimagevinster, et betydeligt økonomisk vækstpotentiale og nye beskæftigelsesmuligheder i den Cirkulære Økonomi.

Helt overordnet er den cirkulære tilgang også arbejdsgrundlaget i den biobaserede økonomi (bioøkonomien).

Der er et stort fællesskab mellem Cirkulær Økonomi og bioøkonomi via bioraffinering². Bioraffinering er et koncept, som kan defineres på flere måder, men som i korthed vedrører bæredygtig forarbejdning af biomasse til et spektrum af produkter, dvs. fødevarer/fødevareingredienser, foder, kemikalier og/eller materialer og til bioenergi, dvs. biobrændsel og/eller varme, men innovativ fremdrift inden for bioraffinering er ikke nødvendigvis afhængig af produktion af bioenergi fra biomasse. De nuværende lave oliepriser har bremset noget af udviklingen inden for bioraffinering, da mange af de nye bioraffineringstiltag har haft fokus på produktion af bioenergi. Det er vigtigt ikke at stoppe udviklingen af nye bioraffineringskoncepter og teknologier på grund af lave oliepriser, da der, uagtet hvordan energiproduktionen bliver i fremtiden, skal udvikles nye veje til produktionen af biobaserede, og herunder bionedbrydelige produkter i den fossil-frie fremtid. Udover recirkulering skal råmaterialernes værdi udnyttes fuldt ud og spild skal minimeres, især ved at oparbejde eller genanvende de strømme/produkter som i øjeblikket opfattes som rest- eller lav-værdi sidestrømme.

Den nye cirkulære og biologiske tilgang er grobund for en spændende udvikling i grænsefladen mellem bioteknologi, kemi, kemisk analyse, miljø- og kemiteknik. Det er håbet, at der udover recirkulering af bl.a. elektronikaffald også investeres betydelige forskningsmidler i at udvikle nye bioraffineringsprocesser og -produkter baseret på forskellige typer biomasse og nuværende industrielle sidestrømme med fokus på Cirkulær Økonomi. Det er en ambition, at Dansk Kemi bliver en formidlingsplatform for at tilvejebringe information om disse aktiviteter, som i øvrigt involverer kemi på et meget højt niveau.

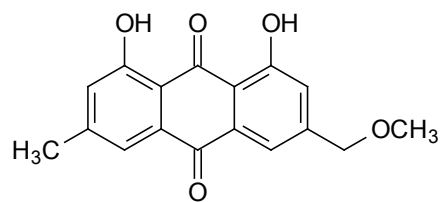
Anne S. Meyer, Institut for Kemiteknik, DTU

¹ <http://mfvm.dk/nyheder/nyhed/nyhed/nyt-advisory-board-skal-raadgive-regeringen-om-cirkulaer-oekonomi/>

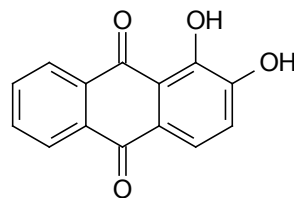
² <https://www.ellenmacarthurfoundation.org/circular-economy/interactive-diagram>

Nyt om ...

... Lavfarvestof mod cancer



PARIETIN



ALIZARIN

Et udbredt orange farvestof parietin i lav'er af slægten *Caloplaca* og i rabarber har vist sig at have virkning mod humane leukæmiceller. Det er også vist, at det beskytter lav, der gror i stor højde mod skadevirkningen af UV-B lys. Som det ses af formelen, er det nært beslægtet med krapfarvestoffet alizarin.

Carl Th.

6-Phosphogluconate dehydrogenase links oxidative PPP, lipogenesis and tumor growth by inhibiting LKB1-AMPK signalling. *Nature Cell Biology*, 2015, DOI: 10.1038/ncb3255.

ATEX - sikkerhed i dit arbejdsmiljø

Køle- og fryseskabe til miljøer hvor eksplosive gasser kan forekomme

Sikkerhed

Uegnet udstyr kan være årsag til antændelse af eksplosive gasarter i arbejdsmiljøet.

Med et støt stigende fokus på arbejdsmiljø, hvor eksplosive gasarter potentielt kan opstå, er udstyr placeret deri blevet en kritisk del af risikovurderinger.

Mulighed for udstyr i ATEX Zoner

Gram BioLines produktserie er i fuld overensstemmelse med ATEX internt og eksternt. Med opfyldelse af DS/EN 60079-15 er det muligt at placere Gram BioLine produkter i kategori 3, zone 2 områder, hvor eksplosive gasser kan forekomme.

ATEX skaber bedre sikkerhed for dig og bedre beskyttelse af emner og arbejdsmiljøet.

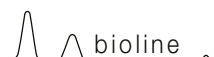
Gram BioLine skabe er produceret i Danmark, designet til at imødekomme de høje krav forbundet med opbevaring af temperaturfølsomt materiale.

Alle skabe er bestykket efter dine behov. Kontakt os for at lære videre om mulighederne for en sikker opbevaringsløsning.



ATEX er det eneste europæiske direktiv (94/9/EF) for udstyr bestemt til anvendelse i eksplosionsfarlig atmosfære.

Se mere på www.gram-bioline.com



Gram Commercial A/S | Aage Grams Vej 1 | DK-6500 Vojens | Tlf. 7320 1300 | info@gram-bioline.com | www.gram-bioline.com

GRAM
Biostorage you can depend on



Prisvinderen Ole Hassager. Foto: Tom Jersø/ATV.

Elastyrenprisen 2017 til professor Ole Hassager

Professor ved Dansk Polymer Center på DTU, Ole Hassager, modtog ved ATV's årsmøde den 26. april Den danske polymerpris - ATV | Elastyrenprisen 2017. Prisen tildeles som en anerkendelse af Ole Hassagers lange forsknings- og undervisningskarriere inden for polymerer og plast, hvor han både har leveret forskning på højt niveau og er kendt som en fremragende underviser.

- Du har udmærket dig på DTU som en fantastisk formidler. Du er medforfatter til lærebogs-klassikeren Dynamics of Polymer Liquids, som også anvendes i udlandet. Og internationalt er du anerkendt som en af pionererne inden for præcisionsmåling af komplekse smelters reologi, lød det fra formand for priskomiteen, dekan ved AU Niels Chr. Nielsen, da han overrakte prisen til Ole Hassager.

I motivationen for prisuddelingen fremhæves blandt andet

Ole Hassagers indsats inden for reologi, der er læren om flyde- og deformationsegenskaber hos materialer under påvirkning af mekaniske kræfter.

Pris for nytænkning og markante resultater

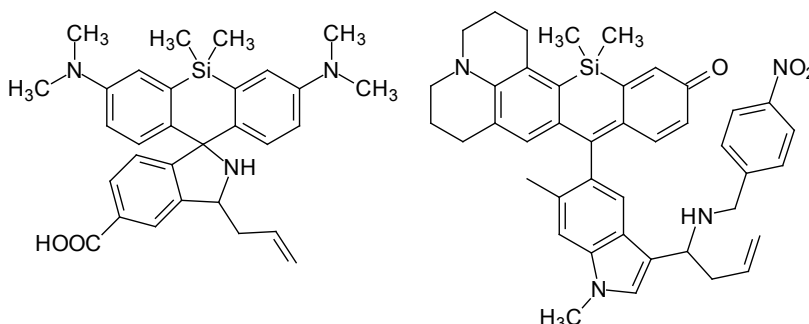
Den danske polymerpris - ATV | Elastyrenprisen er på 100.000 kroner og gives til en forsker, der har udmærket sig gennem nytænkning og markante resultater inden for kemisk forskning i og udvikling af syntetiske eller biologiske polymerer til medicinsk anvendelse - herunder arbejde inden for elastomere materialer.

Prisen er indstiftet efter ønske af afdøde ATV-medlem, civilingeniør Torbjørn Grenness. ATV's præsidium uddeler prisen efter indstilling fra en komité af eksperter inden for polymerteknologi.

Nyt om ...

... Formaldehyd i levende organismer

Tilstedeværelsen af formaldehyd har ofte været konstateret i forbindelse med en række sygdomme som f.eks. Alzheimers demens. På grund af formaldehyds store reaktivitet, har det været vanskeligt at måle det i levende organismer. Man har nu designet to molekyler, vist her, som ved reaktion med formaldehyd giver anledning til dannelsen af stærkt fluorescerende stoffer. Begge er baseret på en Si-analog af farvestoffet rhodamin. De er selv kun svagt fluorescerende og reagerer begge med formaldehyd under dannelse af iminer, som efter en omlejring hydrolyseres og danner stærkt fluorescerende stoffer. De er begge specifikke for formaldehyd og giver ikke reaktion med andre aldehyder.



Man har kunnet påvise formaldehyd i så lave koncentrationer som 200 μM med dem.

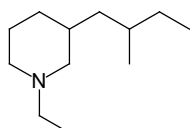
Carl Th.

A Reaction-Based Fluorescent Probe for Imaging of Formaldehyde in Living Cells, *Journal of the American Chemical Society*, 137, 2015 side 10890. DOI: 10.1021/jacs.5b05339 og An Aza-Cope Reactivity-Based Fluorescent Probe for Imaging Formaldehyde in Living Cells, *Journal of the American Chemical Society*, 137, 2015 side 10886. DOI: 10.1021/jacs.5b05340.

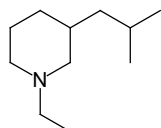
Nyt om ...

... Bille med kemisk redningskrans

En rovbille *Stenus comma* jager sit bytte af mindre insekter ved bredden af åer og søer. Under denne jagt sker det, at billen falder i vandet. Her er den prisgivet andre rovinsekter som



STENUSIN



NORSTENUSIN



Ved at udskille to hydrophobe piperidinalkaloider kan rovbillen *Stenus comma* surfe sikkert i land, selvom den ikke kan svømme.

f.eks. skøjteløbere eller drukner, da den hverken kan svømme eller gå på vandet. Den stikker da bagkroppen ned i vandet og udskiller en blanding af de to hydrophobe piperidinalkaloider stenusin (*N*-ethyl-3-(2-methylbutyl)piperidin) og norstenusin, herved formindskes overfladespændingen, og vand strømmer fra området foran billen, hvor overfladespændingen er højere til området bag den. Billen udnytter nu som en surfer den opståede bølge til at komme i land. Den kan på denne måde bevæge sig med en hastighed på 0,4-0,7 m/s og bevæge sig ca. 15 cm ind til bredden.

Carl Th.

The Role of Surface Viscosity in the Escape Mechanism of the *Stenus* Beetle, *Journal Physical Chemistry B*, 2016, 120, side 7143, DOI: 10.1021/acs.jp-cb.6b04871.

SIKKER OG DOKUMENTERET KEMI TIL PHARMA-MEDICO

- Toksikologiske risiko- og sikkerhedsvurderinger
- Håndtering og registrering af problematiske stoffer
- Dokumentation af biosafety og ISO 10993
- Mikrobiologiske og økotoksikologiske test jf. GLP og ISO

www.tox.dhi.dk

DHI
Agern Allé 5, DK-2970 Hørsholm
Tel: 45 16 9200
dhi@dhigroup.com

The expert in **WATER ENVIRONMENTS**





Udvikling af moderne slangemodgift

Andreas Hougaard Laustsen er blot 29 år og har allerede været med til at starte flere virksomheder. I øjeblikket arbejder han med at udvikle moderne slangemodgift. En kompliceret og udfordrende opgave - det er ikke uden grund, at man i dag stadig fremstiller modgifte baseret på en teknik fra 1895.

Af Katrine Meyn, km@techmedia.dk

Da Andreas Hougaard Laustsen påbegyndte arbejdet med at udvikle en modgift mod den sorte mambas gift i Brian Lohses laboratorium, kendte man på verdensplan kun til otte beskrevne toksiner i giften (der er over halvtreds i alt). Det var heller ikke engang beskrevet, hvor meget af de enkelte komponenter, der var til stede. Så det var umuligt at vide, om de var vitale for giftvirkningen.

- Vores første opgave var derfor at afdække, hvilke toksiner der skulle neutraliseres i en modgift, fortæller Andreas Hougaard Laustsen og fortsætter:

- Det udgjorde første halvdel af min ph.d. Vi har beskrevet, hvad giften består af, og hvor meget der er af hver komponent (toksin). Og så har vi testet alle toksinerne for at se, hvor toksiske de er.

Til det udviklede Andreas Hougaard Laustsen en simpel matematisk formel, der rangerer alle toksinerne efter, hvor

medicinsk relevante de er. Hvis der er meget af et toksin, og det er meget potent, så får det en høj score og omvendt. Vha. den metode kan man ret hurtigt evaluere en slangegift.

Alle giftanalyserne foregik sammen med professorerne José María Gutiérrez og Bruno Lomonte på Instituto Clodomiro Picado, University of Costa Rica, hvor de er eksperter i at analysere gifte. De er også gode til at lave modgift på den traditionelle metode vha. serum fra immuniserede heste.

Det lykkedes at afdække, hvilke toksiner (ca. seks-otte forskellige) der er essentielle at neutralisere i den sorte mambas gift. Nogle af toksinerne minder så meget om hinanden, at Andreas Hougaard Laustsen mener, at man med ét antistof formentligt vil kunne neutralisere to-tre toksiner samtidigt.

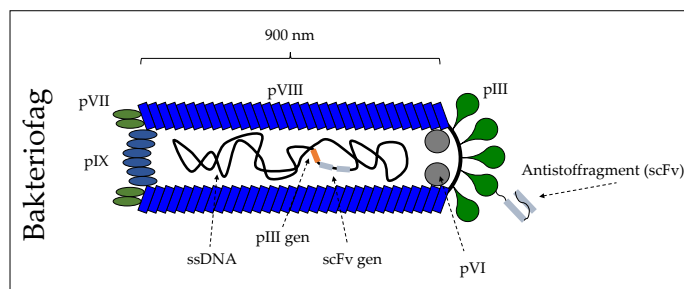
- Jeg tror, at man muligvis med 10-30 antistoffer vil kunne dække de farligste slangegiftoksiner i Afrika, fortæller han.

Hvor skal antistofferne findes?

Nu var målet at komme til Cambridge i England, hvor tidligere universitetsforsker John McCafferty har startet antistoffirmaet IONTAS. Han har opfundet Antibody Phage Display-teknologien, som har resulteret i mange succesrige lægemidler, heri-



Lige fra sin tidligste barndom har Andreas Hougaard Laustsen været meget ude i naturen. Han har vandret meget og været med på en række spændende ferier i tropiske egne. Og altid var den der – den store forkærlighed for naturens dyr – især de farlige. At det senere var slangerne, han fokuserede på, skyldes bl.a. den oplevelse, han havde i Tanzania. Her så han to børn, der hhv. havde mistet en arm og et ben, fordi de var blevet bidt af slanger og ikke behandlet med slangemodgift. Det gjorde et meget stærkt indtryk på ham. Foto: Michael Barrett Boesen.



Figur 1.

blandt Humira, der er verdens mest sælgende lægemiddel. Ideen var vha. den metode at finde brugbare menneskelige antistoffer til modgiftene.

- Jeg var heldig at komme gennem nåleøjet og få gjort ham interesseret i projektet. Det betød, at jeg fik mulighed for at arbejde i hans laboratorie, hvor de har et af verdens bedste phage display antistof-biblioteker. Det indeholder mere end 10 mia. forskellige antistoffer, som man kan screene igennem på en uge. Alene fordi der er så mange, og det er så divers, er sandsynligheden for, at man finder et antistof, der binder til et toksin næsten 100%. Dette lykkedes dog ikke under selve Andreas' ph.d.-ophold, men samarbejdet mellem Andreas og John (og Aneesh Karatt-Vellatt fra Johns firma) fortsatte efter ph.d.'en, hvor det lykkedes dem at finde interessante antistoffer vha. denne metode.

Phage display-teknologien

Andreas Hougaard Laustsen medbragte toksiner i ren form fra kobraer og mambaer. Og så var det ellers bare at gå i gang. Phage display-teknologien er en laboratorieteknik til bl.a. at finde antistoffer, der kan binde til proteiner. Teknikken er særlig velegnet i modgiftsforskningen, da det er en forudsætning for toksin-neutraliserende antistoffer, at det kan binde stærkt til et toksin.

I phage display benytter man sig af bakteriofager, som indeholder genet for et antistoffragment, samtidig med at de fremviser (display'er) antistoffragmentet på ydersiden af deres kappe, se figur 1. På denne måde haves et link mellem genotype (antistoffgenet) og fænotype (antistoffragmentet), hvilket gør det muligt at udvælge antistoffragmentet baseret på fænotype og at DNA-sekventere det baseret på genotype. Ved at indsætte generne for millioner til milliarder af antistoffragmenter kan man således lave et antistoffbibliotek, der kan bruges til screening for antistoffer mod alle mulige forskellige proteiner (inkl. slange-toksiner) vha. phage display-teknologien.



Pipetteservice

Akkrediteret kalibrering
Reparation • Vedligeholdelse

Gilson Center of Excellence • Certificerede teknikere • 20 års erfaring
• Alle førende fabrikater • Elektroniske certifikater • Serviceaftaler



Biolab A/S,
Sindalsvej 29, DK-8240 Risskov,
Tlf: 8621 2866 Fax: 8621 2301
E-mail: pipetteservice@biolab.dk
www.biolab.dk



DANAK
Cal. Reg. Nr. 482

Mange projekter

Inden Andreas Hougaard Laustsen fandt ud af, at han ville arbejde med at udvikle slangemodgifte, satte han mange andre skibe i søen. Han var i Paris som udvekslingsstuderende, han var med til at starte biotekselskabet Biosyntia, der beskæftiger sig med fermentering af fødevarer ingredienser og er anerkendt som et af Europas mest innovative biotekstartups. Han var med til at starte en organisation for unge biotek-entreprenører, REBBLS, og i den forbindelse var han også med til at arrangere REBBLS Venture Cup Challenge. Her skulle deltagerne komme med en biotek-idé, skrive en business-plan og prøve at afgøre, om der rent forretningsmæssigt var hold i den. En af Andreas' ideer var udvikling af slangemodgift baseret på humane antistoffer. Sammen med kollegaerne Mikael, Jens og Alexandra startede han også firmaet VenomAb.

I Andreas' forsøg fraktioneres giften i forskellige elementer (toksiner) vha. kromatografi. Disse toksiner bruges som "targets" i phage display, se figur 2.

1. Toksinet sættes fast i bunden af en brønd, antistofbiblioteket, bestående af bakteriofager, der både indeholder DNA for et givent antistoffragment, samtidig med at de fremviser fragmentet, bliver hældt udover.
2. Når bakteriofagerne hældes ud over toksinet, vil nogle binde til toksinet, mens andre ikke gør.
3. De bakteriofager, der ikke er bundet til noget toksin, vaskes væk. Nu er der kun dem, der binder, tilbage.
4. Bakteriofagerne, som binder til toksinet, elueres ved at bryde bindingen mellem bakteriofagen og toksinet.

5. Da der er tale om bakteriofager kan disse inficere *E. coli*, hvorved *E. coli*-cellerne begynder at producere flere bakteriofager (bakteriofagerne amplificeres). Hvis man ønsker, kan man køre en runde til og dermed finde frem til de bakteriofager, som indeholder de allerbedste antistoffragmenter, der binder stærkest til toksinet.
6. Ellers kan man analysere de forskellige bakteriofager, som er blevet selekteret i ens phage display-eksperiment.

I phage display-eksperimentet får antistoffragmenterne lov til at konkurrere med hinanden. De, der binder bedst, udvælges. Oprindeligt er der måske 10-20 mia. Efter runde et ryger man potentielt ned på 10-100 mio., hvilket stadig er lidt for mange at analysere i detaljer. I runde 2 kommer man videre ned på nogen hundrede tusinder. Og kører man en tredje runde, kommer man ned på nogen tusinde. Det tager tre dage at lave en runde og fem dage at lave tre runder.

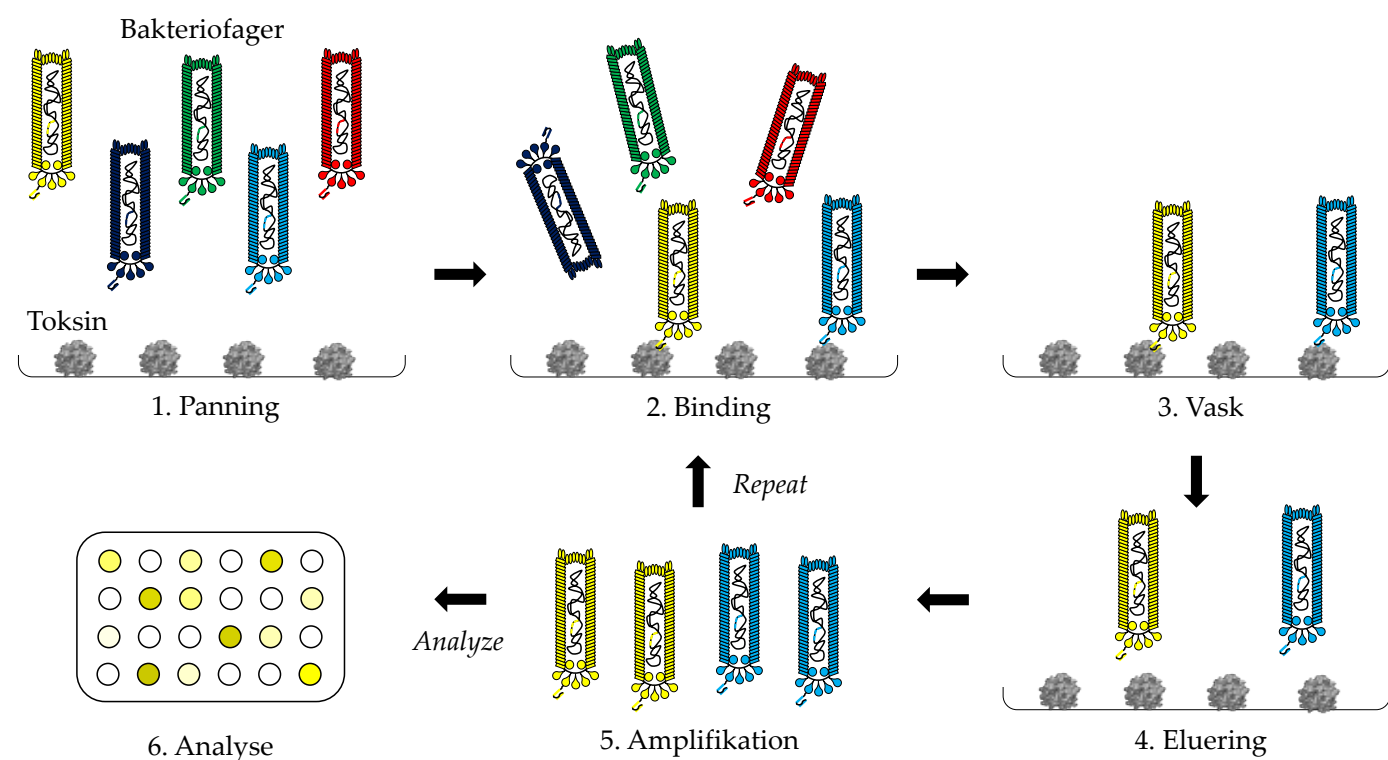
Herefter skal hvert enkelt antistof undersøges nærmere for at se, hvilket der er bedst? Hvilket er mest stabilt? Kan det krydsreagere med andre af de relevante toksiner? Hvis man har meget strikse kriterier, kan det betale sig at køre mange tusinder af antistoffragmenterne igennem.

- Jeg ønsker generelt at få antistoffer, der kan binde bredt til

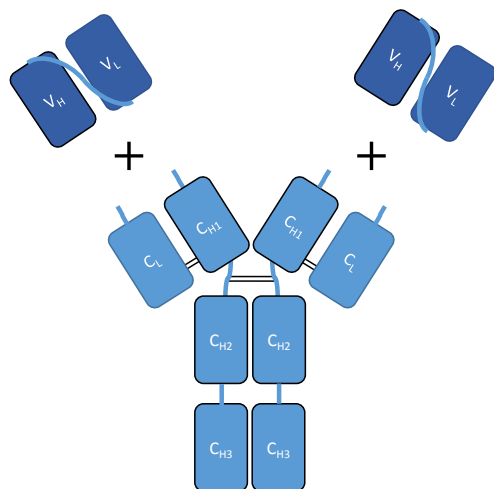
Hvordan opnår man et succesfuldt projekt?

"Gode ingeniører tænker ikke kun over små tekniske detaljer, men har øje for helheden. Hvad skal der til for at opnå et succesfuldt projekt? Det er essentielt, at man kommunikerer omkring sin forskning, og det er essentielt, at man kan samle passionerede samarbejdspartnere og studerende omkring sig, der har mod på at hjælpe med at lave en masse arbejde"

Figur 2.

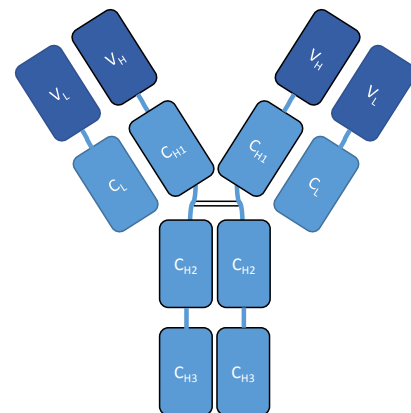


Antistoffragment (scFv)



Antistof scaffold

Antistof



Figur 3.

den samme gruppe af toksiner. Til gengæld er vi begrænsede på økonomiske midler, så der er grænser for hvor meget screening, vi kan lave bagefter. Det varierer også fra eksperiment til eksperiment, forklarer Andreas og fortsætter:

- Det er kun spidsen af antistoffet (antistoffragmentet), vi screener i første omgang. Det gør det noget nemmere at arbejde med. Men når man skal producere et rigtigt humant antistof, vil man gerne have det som IgG-format, der er det naturlige, menneskelige format af et fuldt antistof, se figur 3.

Afprøvning af 1. generations antistoffer

De fundne antistoffer bliver testet i mus. Indtil videre ser det lovende ud.

- Vi har netop afprøvet 16 antistoffer målrettet mod toksiner i neurotoksiske slangers (kobraer, mambaer m.fl.) gifte. Her udviste flere af dem evnen til at neutralisere toksinerne. Det er meget spændende resultater, som vi nu skal arbejde videre med. Vi har dog en række udfordringer. 16x5 mg antistoffer kostede os ca. ½ mio. kr at producere, så det er virkelig dyrt. Derfor bruger vi de mest sensitive assays til at vurdere, hvilke antistoffer der er bedst. Det skal vi også have med i vores overvejelser, når vi bestemmer, hvilken vej vi nu skal gå.

Tror vi, at disse antistoffer er gode nok, eller skal vi bruge tid på at finde nogle, der er endnu bedre, inden vi bruger penge på at producere en ny batch? Eller skal vi vælge at udføre forskellige engineering-teknikker for at optimere dem inden? Det skal vi have diskuteret, når vi har nærstuderet data.

■ Andreas Hougaard Laustsen

- Tog sin kandidatgrad som civilingeniør med et gennemsnit på 12.
- Brugte to år på sin ph.d.
- Blev i 2014 kåret som Danmarks sejeste ingeniør af Engineer the future.
- Blev i 2016 kåret som en af Europas top 10 biotekentreprenører under 30 år.
- Blev i 2017 kåret som en af Europas "30 under 30" af Forbes.

■ Den sorte mamba

Den sorte mamba er en af verdens farligste slanger. Dens gift er meget potent, og så er den i stand til at angribe lynhurtigt flere gange i træk, inden man kan nå at komme væk. Derudover er den sorte mamba en af verdens største giftslanger, hvilket betyder, at den kan sprøjte en stor mængde gift ind i sit offer.

Den sorte mambas gift er primært neurotoksisk. Udover en række proteiner og toksiner, som kun er til stede i meget små mængder, består den sorte mambas gift primært af tre komponenter:

- *Dendrotoksiner*: Findes kun i mambagifte. Giften påvirker kaliumkanaler, således at nerver og muskler overreager og man bevæger sig ukontrolleret og spjættende.
- *Alfa-neurotoksiner*: Blokerer acetylcholinreceptoren, så man ikke længere kan bevæge sine muskler. Det medfører, at man ikke kan holde sine øjne åbne, bevæge sine ben og arme, og at man til sidst dør, fordi man ikke kan trække vejret. Umiddelbart har de fleste neurotoksiske slanger (kobraer, mambaer, koralslanger, havslanger, etc.) alfa-neurotoksiner som en vigtig del af deres gift.
- *Adenosin*: Er et nucleosid (en byggesten i DNA), som i sig selv ikke er giftigt. Det får blodkarrene til at udvide sig, således at mere blod kan strømme igennem.

Retsch
Solutions in Milling & Sieving
part of VERDER scientific

The revolution in ultra-fine grinding:
The new Emax achieves finer and faster grinding results than any other ball mill!

SKANLAB
NEW!

Kvinderupvej 30 · 3550 Slangerup · Tlf: 4738 1014 · www.retsch.dk

Billeddannende massespektrometri

- stofspecifik imaging af lægemidler og metabolitter i væv

Billeddannende massespektrometri gør det muligt at følge lægemidler og deres omdannelse i organismen. Metoden er med succes benyttet til at følge et lægemiddels fordeling og metabolisme i en mus og et lægemiddels penetration gennem hud.

Af Christian Janfelt, Institut for Farmaci, Københavns Universitet

Billeddannende massespektrometri (MSI, eng: Mass spectrometry imaging) er en særlig disciplin inden for massespektrometri, hvor man udnytter ioniseringsteknikker, der kan ionisere stoffer direkte fra overflader til at optage billeder, som viser fordelingen af stoffer på en overflade. Idet billederne baserer sig på data opnået med massespektrometri, deler MSI en række fordele med mere konventionelle MS-teknikker såsom LC-MS, nemlig en høj grad af selektivitet i analysen kombineret med muligheden for at identificere ukendte stoffer i forbindelse med analysen samt muligheden for at måle på prøver uden at skulle tænke på forudgående mærkning med f.eks. fluorescens eller radioaktivitet.

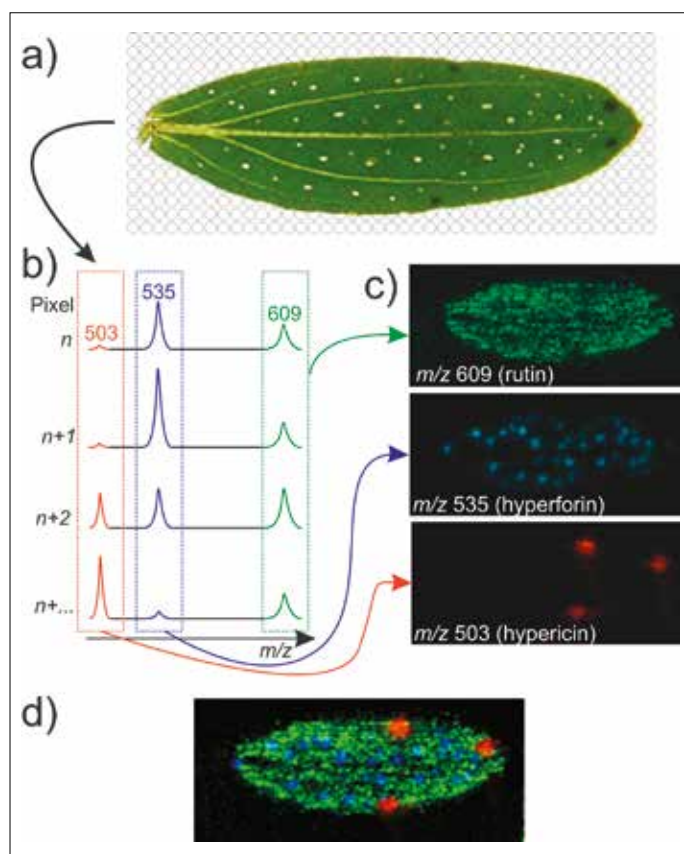
MSI er tidligere beskrevet i to artikler i Dansk Kemi, som beskrev anvendelsen inden for bl.a. planteanalyse [1] og vævsprøver [2], sidstnævnte dog med vægt på analysen af endogene stoffer i væv. I denne artikel vil vi fokusere på brugen af MSI til at følge lægemidler og deres omdannelse i organismen med udgangspunkt i to studier af hhv. et lægemiddels fordeling i en mus [3] og et lægemiddels penetration gennem hud [4].

Hvorfor undersøge fordelingen af lægemidler?

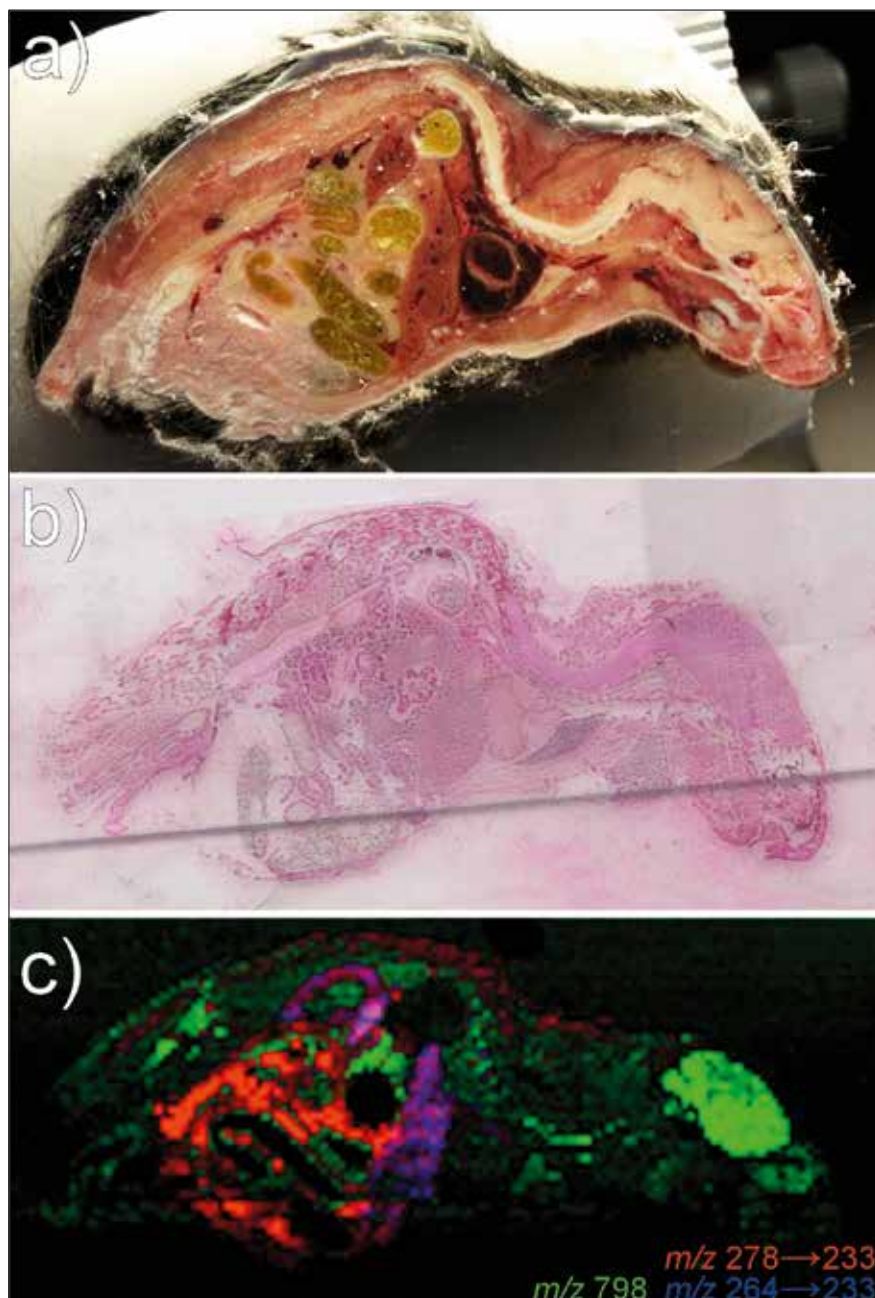
I udviklingen af lægemidler er det af største betydning at kunne undersøge lægemidlers optagelse og kunne redegøre for deres fordeling og omdannelse i organismen. Dette har betydning i discovery-fasen, hvor forskellige lægemiddelkandidater undersøges, og der søges svar på, om lægemidlet er i stand til at trænge igennem de forskellige barrierer i kroppen (f.eks. tarmvæggen eller blod-hjerne barrieren), om det nedbrydes i leveren, inden det har nået at udøve sin effekt, og hvor i organismen de forskellige metabolitter af lægemidlet dannes. Det er også af betydning i development-fasen, hvor det valgte lægemiddel skal formuleres (f.eks. som tablet eller i en creme), hvor den valgte formulering kan have betydning for, hvorledes det aktive stof frigives til organismen.

Der er en udbredt brug af radioaktivt mærkede lægemidler i distributions- og metabolismestudier, idet den detekterede radioaktivitet i f.eks. plasma- og urinprøver kan henføres til det oprindeligt indgivne lægemiddel eller metabolitter af dette. Ligeledes bliver fordelingen af lægemiddel i forsøgsdyr ofte

undersøgt ved brug af Kvantitativ whole-body autoradiografi (QWBA), hvor en radioaktivt mærket udgave af lægemidlet (f.eks. ved udskiftning af et af carbon-atomerne med et ^{14}C)



Figur 1. Princippet i billeddannende massespektrometri (her vist med data fra et billede af et blad fra prikbladet perikon). Prøven scannes således, at der optages et massespektrum i hvert punkt i prøven; hvert massespektrum ender som en pixel i det endelige billede (a). For hver top i massespektrene (b) kan der ud fra intensiteterne af den pågældende masse genereres et billede, som viser fordelingen af stoffet (c). Disse billeder kan kombineres ved at bruge forskellige farver til hvert af stofferne, hvorved der opnås en meget nøje sammenligning af fordelingen af forskellige stoffer i prøven (d). Figuren er fra [5].



Figur 2. DESI-MSI analyse af en mus som har fået en intraperitoneal injektion (i bughulen) af 500 µg af det antidepressive lægemiddel amitriptylin 15 minutter før aflivning. Musen snittes på en cryo-microtom (a), og herved opnås 30 µg tynde vævssnit, som kan analyseres med DESI-MSI. Figuren viser vævssnittet efter en H&E farvning med henblik på opnåelse af bedre optisk kontrast (b). Farvningen er udført efter DESI-MSI analysen. DESI-MSI analysen (c) viser tilstedeværelsen af amitriptylin (vist med rødt) i bughulen samt visse steder i fedtlaget under huden. Metabolitten nortriptylin (vist med blåt) ses i leveren og i nyren. For at vise konturen af dyret er et endogent fosfolipid (fosfatidylcholin(34:1)) afbilledet med grønt. Pixelstørrelsen er 480 µm. Figuren er fra [3].

doseres til en rotte, som efter et givent tidsrum aflives. Derpå fryses rotten ned, og der laves tynde vævssnit af dyret, som placeres på en fotografisk film, hvorved der som følge af de radioaktive henfald fremkommer et billede, som viser fordelingen af det indgivne lægemiddel. QWBA er ligesom de fleste teknikker, som baserer sig på radioaktivitet, særdeles følsom og kvantitativ, men teknikken har to væsentlige begrænsninger. Dels baserer den sig på en radioaktivt mærket udgave af lægemidlet, som er både kostbar og tidskrævende at fremstille, og dels viser QWBA-billeder ikke nødvendigvis fordelingen af det aktive lægemiddel, men blot fordelingen af den radioaktive

label. Det kan således ligeså vel være metabolitter af det oprindelige lægemiddel, som optræder i QWBA-billedet, og i hvor høj grad det er tilfældet afsløres ikke ved et QWBA-studie alene.

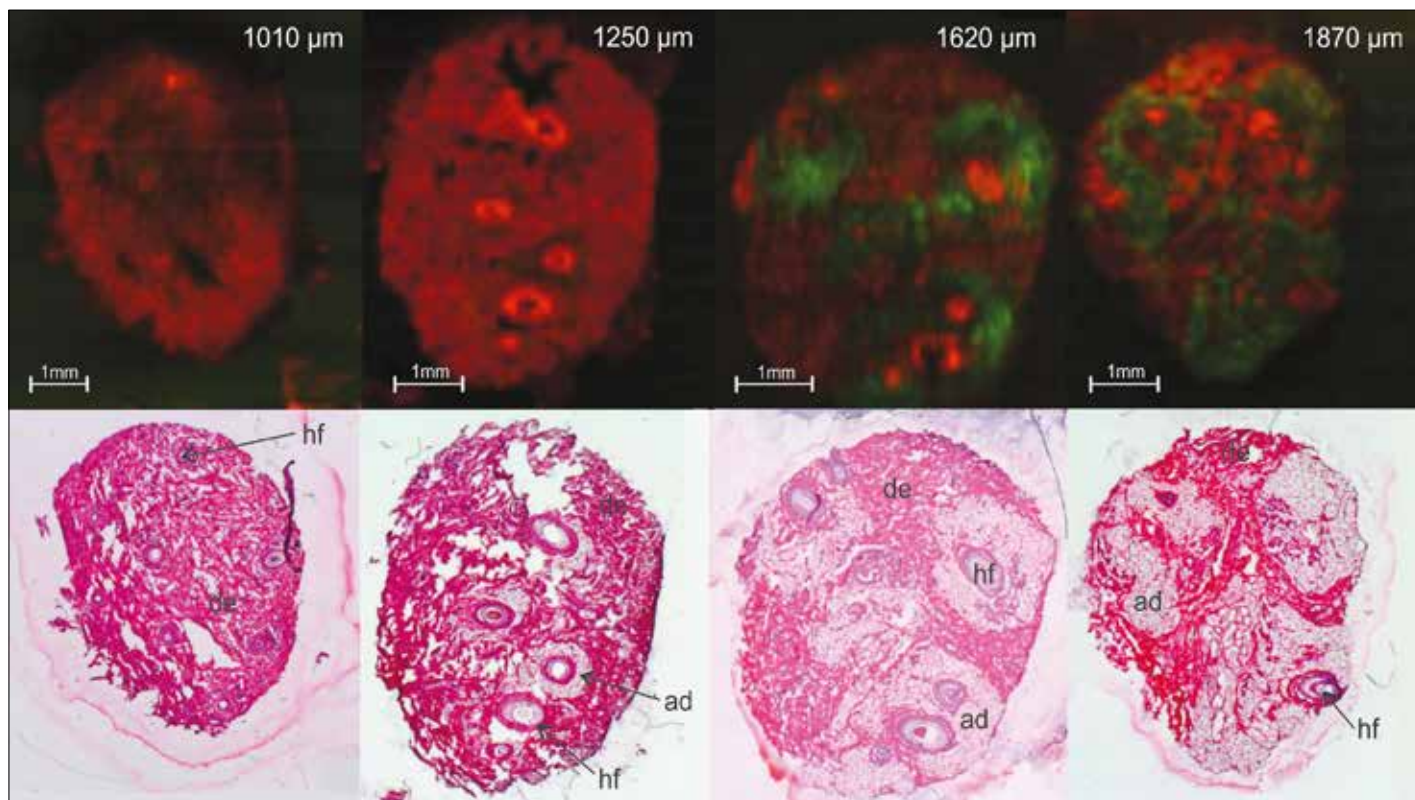
Billeddannende massespektrometri (MSI)

Princippet i MSI er skitseret i figur 1. En prøve scannes linje for linje og punkt for punkt under det sted i massespektrometeret, hvor ioniseringen foregår, og der optages således under eksperimentet et massespektrum i hvert punkt af prøven. Efter et sådant eksperiment af nogle timers varighed har man en samling på tusindvis af massespektre, og ligesom man efter en LC-MS kørsel kan generere adskillige ekstraherede ion-chromatogrammer, som viser, hvornår de forskellige stoffer eluerer, kan man med MSI generere billeder for hvert af stofferne – jo højere intensiteten er for det målte stof i et punkt, jo kraftigere farveintensitet i den pågældende pixel. Når et højopløsende massespektrometer som f.eks. en Orbitrap benyttes, kan der ofte genereres flere hundrede billeder fra ét eksperiment. Derpå kan man, for at vise fordelingen af stoffer relativt til hinanden, lave kombinerede billeder, hvor man viser op til tre stoffer sammen, men i hver sin farvekanal (rød, grøn og blå).

En af fordelene ved MSI er, at man ikke på forhånd behøver at vide, hvad man kigger efter. Man kan optage et billede i den positive ion-mode, og derpå i sin software bladde igennem de forskellige masser, mens fordelingerne af de forskellige detekterede stoffer flyver forbi på skærmen. Hvis en interessant fordeling viser sig, kan man derpå forsøge at identificere, hvilket stof der gemmer sig bag den målte masse (her kan nøjagtig masse-måling og MS/MS være til stor hjælp). En afgørende fordel ved MSI i forhold til andre imaging-teknikker er selektiviteten i teknikken; selv stoffer med meget store ligheder i strukturen kan skelnes, når blot de har forskellig masse. Det betyder, at når vi laver billeder af lægemidler i forsøgsdyr, så er vi sikre på, at det er det pågældende lægemiddelstof, vi ser, og ikke en metabolit af dette, ligesom vi kan lave separate billeder for hver af de enkelte metabolitter.

MSI kan basere sig på forskellige ioniserings-teknikker, og de to mest anvendte ioniserings-teknikker til MSI-analyse af biologiske prøver er MALDI og DESI. DESI-MSI benytter sig

af en elektropray, som udfører en særdeles lokal ekstraktion af analyt fra overfladen efterfulgt af ionisering meget lig den almindelige elektropray ionisering, hvor stoffer ioniseres direkte fra væskefase. Anvendelsen af en spray til ioniseringen er samtidig anledning til den væsentligste begrænsning ved DESI-imaging, nemlig detaljeringsgraden i billederne, som begrænser sig til ca. 50 µm pga. størrelsen på ioniseringspunktet fra sprayen. MALDI-MSI benytter en laser til ioniseringen, og herved opnås en detaljeringsgrad på typisk ca. 20 µm (men i visse tilfælde helt ned til 2 µm). MALDI-MSI afhænger dog (til forskel fra DESI-MSI) af, at man forud for imaging af prøven ►



Figur 3. DESI-MSI analyse af grisehud, som er blevet påført en 5% creme med det lokalbedøvende stof lidokain; figuren viser horisontale snit fra forskellige dybder i huden. Øverst ses DESI billeder med lidokain vist med rødt og metabolitten 3-OH-lidokain vist med grønt. Nederst ses H&E farvn timer af de analyserede vævssnit. Det ses, at penetrationen af lidokain er særligt udtalt ved hårfolliklerne (markeret med hf), og at metabolitten især findes i fedtvævet i de dybere lag (markeret med ad). Pixelstørrelsen er 100 µm. Figuren er fra [4].

påfører den et lag matrixmolekyler, som absorberer UV-lyset fra laseren og hjælper med ioniseringen af analytter i prøven.

Whole-body imaging med DESI-MSI

QWBA har været anvendt i mere end 50 år, og det var derfor oplagt i takt med at de forskellige MSI-teknikker vandt frem inden for de sidste 10-15 år, at teste dem i forhold til den konventionelle QWBA på samme vævssnit. Der er således allerede en række studier, både med DESI- og MALDI-MSI, som netop demonstrerer den markant bedre selektivitet med MSI, men desværre også en følsomhed, som ikke er på niveau med QWBA, idet man ved QWBA i tilfælde af meget små mængder blot kan lade prøven fremkalde i længere tid.

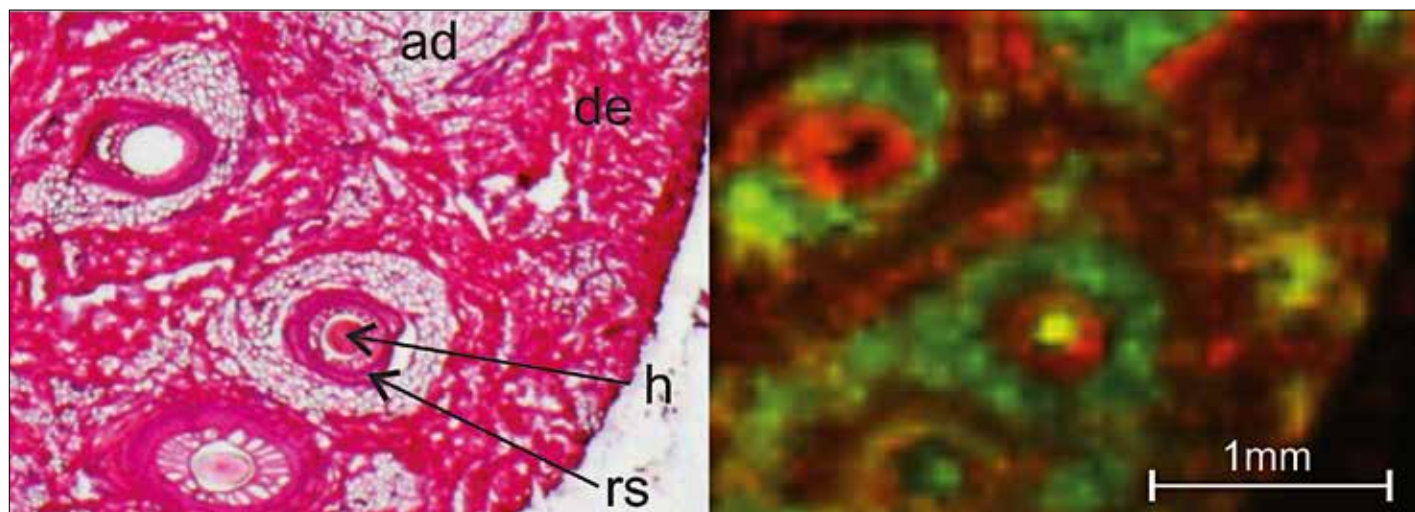
Vi havde et ønske om ikke kun at lave MSI på enkelte organer som hidtil i vores arbejde, men også at kunne måle på hele dyr, så helt andre typer studier blev mulige. Udfordringen i denne sammenhæng var ikke selve MSI-analysen – den er ikke så meget anderledes end ellers, blot kører man med noget grovere detaljeringsgrad, da det er en større prøve, som scannes. I stedet var udfordringen fremstillingen af frysensnit, som er meget større og mere heterogene, end når der snittes biopsier eller enkelte organer. I de hidtidige whole-body-studier var frysensnittene blevet lavet på en cryo-microtom, som er et væsentligt større og dyrere apparat end de cryo-microtomer, som findes på de fleste hospitaler og i mange biomedicinske laboratorier til fremstilling af frysensnit af biopsier og mindre stykker væv. Vi ønskede at udvikle en metode, som kunne fungere med en almindelig cryo-microtom, og løsningen blev at indkøbe en særlig wolframcarbide-klinge, som skærer gennem både knogler og tænder og at opsamle frysensnittene på tape. Metoden begrænser sig til dyr på ca. syv cm længde, hvilket f.eks. gør den anvendelig på voksne hun-mus af C57BL/6 racen.

For at få optimal følsomhed udviklede vi en DESI-MSI-me-

tode, hvor de endogene stoffer blev målt i full-scan, og sideløbende blev der på samme prøve optaget billeder af lægemiddelstof og en metabolit i MS/MS modus, hvorved disse blev målt med markant højere følsomhed.

Et eksempel på resultaterne ses i figur 2, side 13, som viser billeder af en mus doseret med 500 µg af det antidepressive lægemiddel amitriptylin. Lægemidlet blev indgivet i bughulen som en IP-injektion og dyret blev aflivet efter 15 minutter. Det ses, at amitriptylin (vist med rødt) på det tidspunkt primært befinder sig i bughulen, hvor det blev injiceret, men at noget af det allerede har søgt hen i fedtvævet under huden ved ryggen, hvilket kan forklares ved, at amitriptylin er meget lipofilt og ophobes i fedtvæv. Der blev også lavet billeder af nortriptylin (vist med blå), som er den primære metabolit af amitriptylin, og det viste sig, at den allerede efter 15 minutter er at finde i lever og nyrer. En dosis på 500 µg er i forhold til musens størrelse noget over almindelig terapeutisk dosis, men ret normal i denne type studier, bl.a. pga. metodernes begrænsede følsomhed. I et andet forsøg blev dosis sat ned til 50 µg, hvilket svarer til almindelig terapeutisk dosis (om end denne normalt indgives oralt og ikke IP). Også i dette tilfælde kunne vi detektere både lægemiddelstoffet og metabolitten, hvilket demonstrerer tilstrækkelig følsomhed til klinisk relevante studier.

Vi har altså udviklet en særdeles selektiv metode, som kan bruges ved lokalisering af lægemidler og metabolitter i hele dyr, og som er i stand til at afbillede disse sammen med forskellige endogene stoffer, der kan fungere som biomarkører for forskellige vævstyper. Metoden baserer sig på en cryo-microtom til snitning af væv og et ionfælde massespektrometer med DESI-MSI, hvilket også er et billigt instrument i forhold til de fleste MALDI-TOF systemer. Der er alt i alt tale om en relativt low-cost metode til studier, som ellers almindeligvis er forbundet med høje omkostninger.



Figur 4. Samme type prøve og analyse som i figur 3, med et snit fra 1290 μm dybde, men denne gang analyseret med en pixelstørrelse på 50 μm , som giver en højere detaljeringsgrad. Figuren er fra [4].

DESI-MSI studier af transport og metabolisme af lidokain i hud

I et andet projekt benyttede vi DESI-MSI til at undersøge transporten af lægemiddel gennem hud. Det har været diskuteret, hvor stor en rolle folliklerne (hårsækkene) i huden spiller for transporten af lægemidler; nogle har argumenteret for, at de udgør en ubetydelig lille del af hudens overflade og derfor ikke spiller nogen rolle, og andre har hævdet, at de er åbne kanaler ned igennem huden. For at undersøge dette tog vi nogle grise-ører, barberede dem og smurte dem med en 5% lidokainsalve, og lod det trække over 24 timer. Derpå lavede vi frysensnit af vævet, både som tværsnit og som horisontale snit i forskellige dybder.

I vores DESI-MSI analyse af vævet så vi målrettet efter m/z 235, hvor vi ville forvente signalet for lidokain, men i dataanalysen blev vi også opmærksomme på en interessant fordeling af et stof ved m/z 251. Nærmere analyse med MS/MS skulle afsløre, at der var tale om 3-OH-lidokain, altså en metabolit af lidokain, som især lå fordelt i fedtvævet i den dybere del af huden. Dette er eksempel på, hvorledes MSI med sine uventede resultater til tider giver svar på spørgsmål, man end ikke har stillet, idet vi på det tidspunkt mest opfattede metabolisme som noget, der primært sker i leveren og ikke noget, vi havde tænkt os at undersøge i hud. Figur 3 viser horisontale snit af hud i forskellig dybde med fordelingen af lidokain angivet med rød og 3-OH-lidokain i grøn. Som det ses, er det for de dybere snit især omkring folliklerne, at lidokain ses, ligesom det er i fedtvævet i de dybere lag, at 3-OH-lidokain detekteres. Billederne i figur 3 er lavet med en detaljeringsgrad på 100 μm , mens et tilsvarende billede lavet med 50 μm detaljeringsgrad for et snit i 1290 μm dybde ses i figur 4.

Billederne viser, hvorledes MSI kan finde anvendelse i drug-delivery studier i forskellige vævstyper. Den rumlige opløsning er ikke på niveau med, hvad der kan opnås med f.eks. fluorescensmikroskopi, men billederne er væsentlig mere stofspekifikke og kan laves for stort set alle lægemidler, uanset om de fluorescerer eller ej.

Konklusion

Vi har her vist eksempler på, hvor MSI med fordel kan finde anvendelse i moderne lægemiddeludvikling. I whole-body studier er der ikke det store behov for høj detaljeringsgrad, men i stedet høj følsomhed, og her viser DESI-MSI i MS/MS modus sig at være særdeles velegnet. I andre studier inden for drug-

delivery vil det være ønskeligt at kunne se mindre detaljer i billedet end de ca. 50 μm , som DESI tillader. Til sådanne studier har vi gavn af nyligt anskaffet udstyr til MALDI imaging med en detaljeringsgrad på helt ned til 5 μm i pixelstørrelse kombineret med en fremragende selektivitet i analysen takket være koblingen til et Orbitrap massespektrometer. Med dette udstyr har vi således igangsat studier af drug delivery gennem hud (fra gris og menneske), kindslimhinde (gris) og tarm (rotte). I sådanne studier kan man følge lægemiddelstoffets vej igennem barrieren og se, hvilken betydning formuleringen har for penetrationen af lægemiddelstoffet. I den sammenhæng er det unikt for MSI, at det er muligt at visualisere fordelingen af ikke kun lægemiddelstoffet, men også eventuelle kemiske penetrationsfremmere i formuleringen sammen med biomarkører for de forskellige celletyper i prøven. Tilsammen giver disse informationer et væsentligt bedre billede af vekselvirkningen mellem stofferne og dermed nye muligheder for at optimere formuleringerne i udviklingen af mere effektive lægemidler i fremtiden.

Tak

Forfatteren ønsker at takke Forskningsrådet for Natur og Univers (FNU), Forskningsrådet for Sundhed og Sygdom (FSS) og Carlsbergfondet for støtte til anskaffelse af hhv. DESI-MSI ionkilden, MALDI-MSI ionkilden og massespektrometrene benyttet i de omtalte studier.

E-mail:

Christian Janfelt: christian.janfelt@sund.ku.dk

Referencer

1. C. Janfelt, J. Thunig, B. Li, S.H. Hansen, Billeddannende massespektrometri. Dansk Kemi 2012, 93/6-7, 12-14.
2. C. Janfelt, N. Wellner, J. Thunig, H.S. Hansen, S.H. Hansen, Billeddannende massespektrometri til analyse af vævsprøver. Dansk Kemi 2012, 93/8, 20-23.
3. S. Okutan, H.S. Hansen, C. Janfelt, A simplified approach to cryo-sectioning of mice for whole-body imaging of drugs and metabolites with Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging. Proteomics 2016, 16, 1634-1641.
4. J. D'Alvise, R. Mortensen, S.H. Hansen, C. Janfelt, Detection of follicular transport of lidocaine and metabolism in adipose tissue in pig ear skin by DESI Mass Spectrometry Imaging. Anal. Bioanal. Chem. 2014, 406, 3735-3742.
5. N. Bjarnholt, B. Li, J. D'Alvise, C. Janfelt, Mass spectrometry imaging of plant metabolites – principles and possibilities. Nat. Prod. Rep. 2014, 31, 818-837.

Bakterier deler gener i kampen mod antibiotika

Evolutionen har udrustet bakterierne med et bredt arsenal af mobile resistensgener. Ny forskning tyder dog på, at der er grænser for spredningen af resistens.

Af Andreas Porse og Morten O.A. Sommer, DTU, The Novo Nordisk Foundation Center for Biosustainability

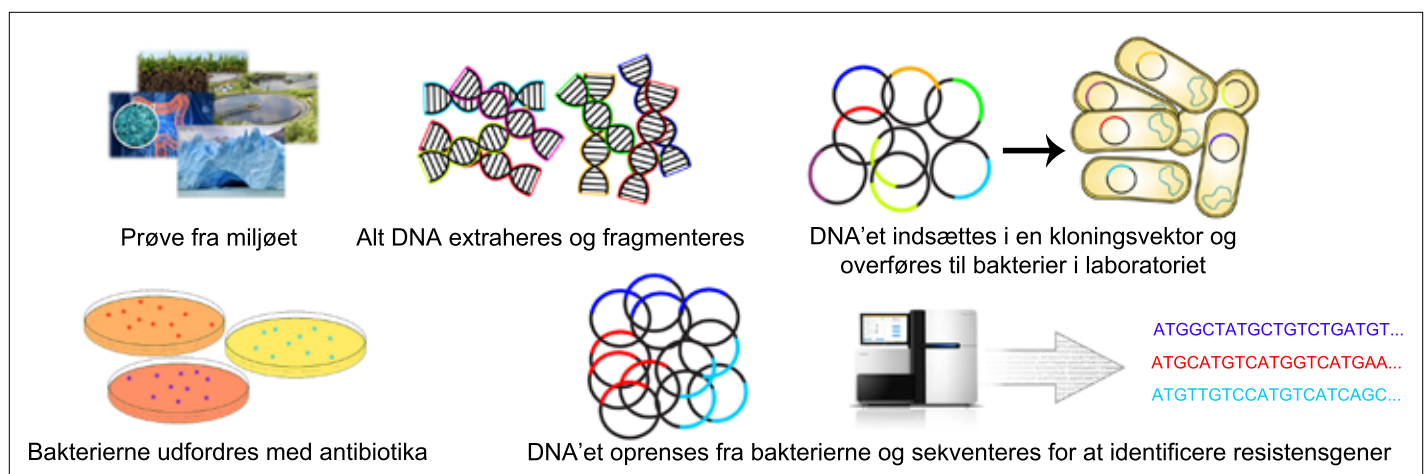
Antibiotikaresistens er et stigende problem i behandlingen af infektionssygdomme. Imens vi desperat leder efter nye antibiotika, opruster bakterierne. Selvom bakterierne er hurtige til at udvikle og dele deres resistensgrænser, er der heldigvis genetiske barrierer for, hvor meget generne kan sprede sig. En bedre forståelse af disse barrierer kan benyttes til vores fordel. Antibiotika er uden tvivl et af medicinalindustriens største bedrifter. Banale infektioner, som før var fatale, kan nu behandles nemt og billigt uden de store bivirkninger. Siden Alexander Flemmings opdagelse af penicillin i 1929, er mere end 150 forskellige antibiotika blevet introduceret, og forbruget af antibiotika er fortsat stigende [1]. Størstedelen af de antibiotika vi bruger i dag, blev udviklet i de første årtier efter Alexander Flemmings opdagelse, men introduktionen af nye antibiotika er faldet drastisk siden. Denne stilstand i opdagelsen af nye antibiotika begyndte omkring 1970, hvor mange var overbeviste om, at vi havde vundet kampen imod bakterierne. Man brugte antibiotika rundhåndet til både mennesker og dyr, fordi man på daværende tidspunkt ikke kunne forestille sig, at resistensevolution hastigt ville gøre disse stoffer virkningsløse [2].

I dag ved vi, at vores forbrug af antibiotika har bevirket en hastig berigelse af antibiotikaresistente bakterier, som truer med at bringe vores sundhedssystem tilbage til før Alexan-

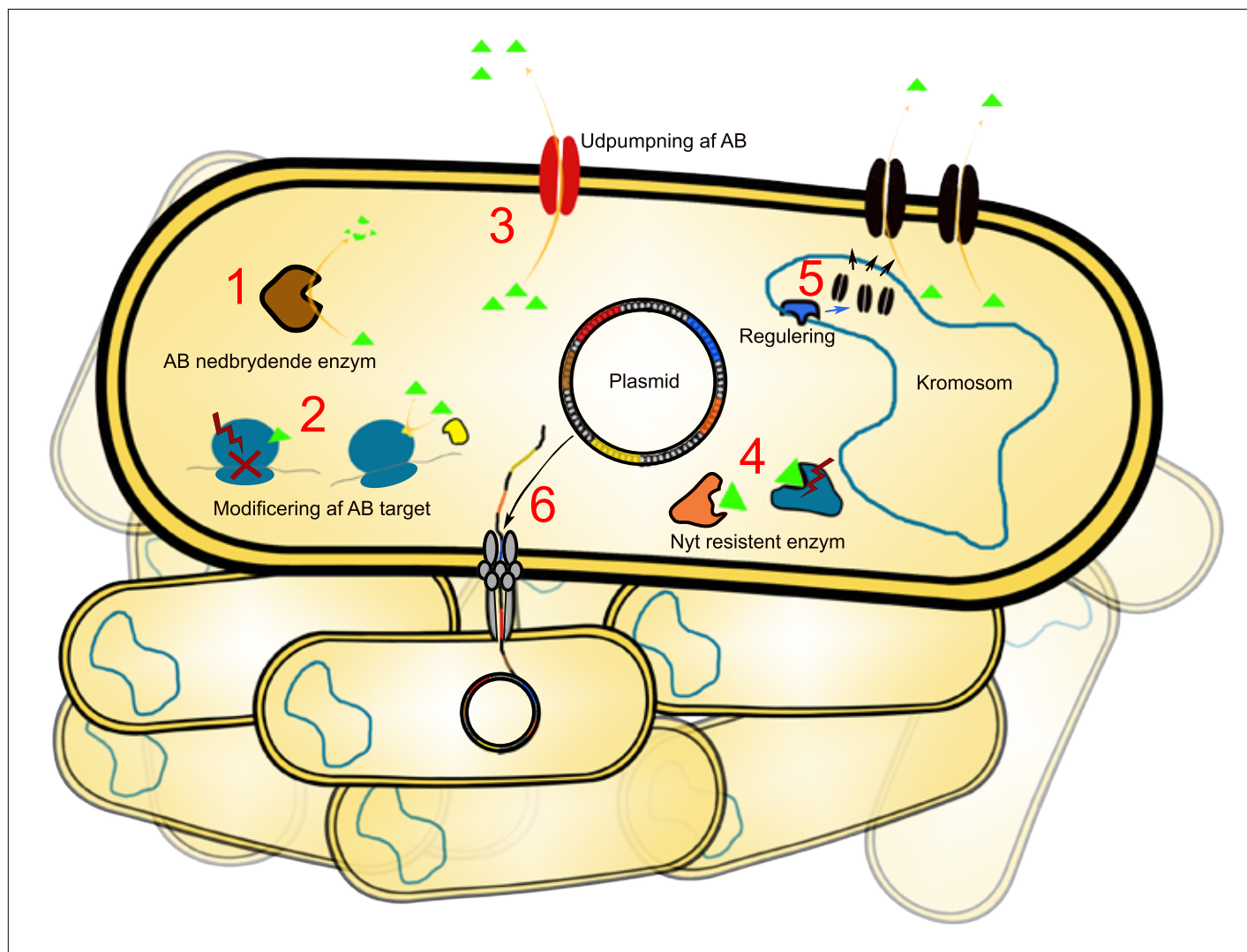
der Flemmings tid. Vi oplever et stigende antal tilfælde af infektioner forårsaget af multiresistente bakterier, hvor mulighederne for effektiv behandling er stærkt begrænsede. I en nylig rapport fra den britiske regering vurderes det, at antibiotikaresistens vil koste 10 millioner menneskeliv årligt i 2050, hvis ikke vi gør noget ved problemet. Dette er flere dødsfald end kræft og diabetes forårsager tilsammen i dag [3].

Antibiotikaresistens er oldgammelt og findes overalt

Langt de fleste antibiotika oprinder fra naturprodukter, som produceres af bakterier eller skimmelsvampe. Derfor har bakterier sandsynligvis været eksponeret til antibiotika i naturen, længe før mennesket tog det i brug til behandling af sygdomme [4]. I den tid har bakterierne opbygget et bredt arsenal af forsvarsmekanismer. Man har f.eks. fundet gener, som koder for antibiotikaresistens i 30.000 år gammel permafrost og i klippehuler, som aldrig før har været i kontakt med mennesker [4,5]. Vi og andre forskningsgrupper har ved hjælp af moderne DNA-sekventeringsteknikker, dokumenteret den rige udbredelse af resistensgener i jord, spildevand og vores egen tarmflora [6-8]. Dette sætter os i stand til at identificere resistensgener uden nødvendigvis at dyrke bakterierne i laboratoriet først. Tilmed er DNA-sekventering ved at blive så billig og lettilgængelig, at det snart vil kunne anvendes direkte af læger til at opnå hurtig viden om hyppigheden af resistensgener i for eksempel tarmflo-



Figur 1. Funktional selektion og sekventering af antibiotikaresistensgener fra miljøet. Først ekstraheres DNA fra det miljø, som ønskes undersøgt. Herefter fragmenteres DNA'et til mindre stykker, som indsættes i en kloningsvektor og overføres til bakterier i laboratoriet. Disse bakterier kan nu udfordres med forskellige antibiotika og kun dem som tilfældigvis har modtaget et resistensgen, vil overleve. På den måde kan man selekttere og efterfølgende sekventere den fraktion af den samlede mængde DNA fra et givent miljø, som potentielt kan give antibiotikaresistens i sygdomsfremkaldende bakterier.



Figur 2. Plasmider kan bære på flere forskellige resistensgener og sprede sig mellem bakterier. Den hyppigste måde, hvorpå bakterier kan opnå multiresistens, er ved at modtage et plasmid fra andre bakterier i nærheden. Denne overførsel sker igennem en proteinkanal, som plasmidet selv koder for (1). Plasmidet kan udtrykke gener, som giver bakterien resistens via forskellige mekanismer. Enzymatisk modifikation af den struktur, eksempelvis ribosomet, som antibiotikummet rammer i cellen, forhindrer stoffet i at binde og giver derved resistens (2). En af de hyppigste resistensmekanismer, som spredes af plasmider, er enzymer, som neutraliserer antibiotika ved enten at modificere eller nedbryde det (3). En anden udbredt mekanisme er aktiv udpumpning af antibiotikummet fra cellen, således at det aldrig når at binde til sit mål (4). Dette kan også opnås via regulatoriske proteiner, der f.eks. opregulerer cellens egne pumpesystemer (5). Hvis antibiotika rammer et vigtigt enzym, som bidrager til cellens metabolisme, kan plasmider også udtrykke "erstatningsgener", som varetager samme metaboliske funktion, men ikke inhiberes af antibiotikamolekylet (6).

raen hos patienter, for således at kunne individualisere antibiotikabehandlingen [9].

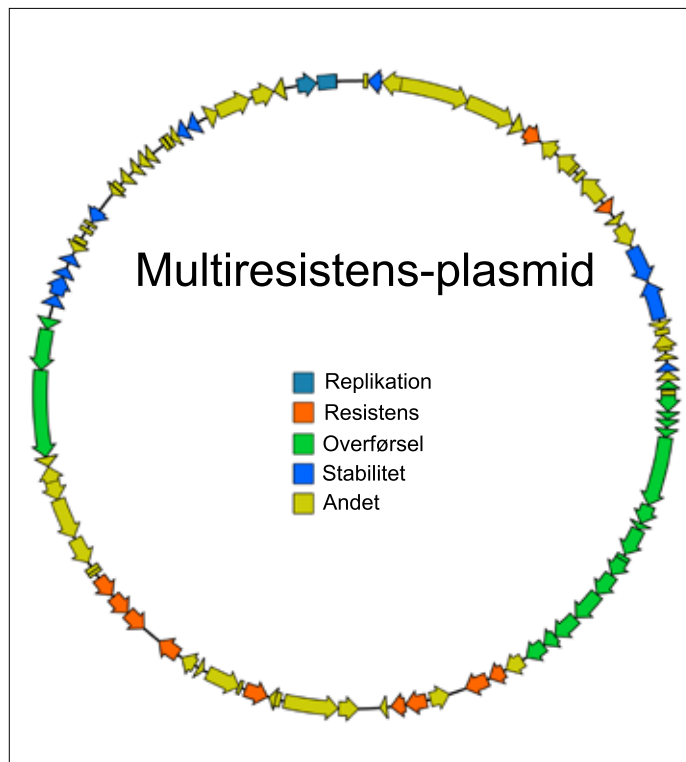
Kun en brøkdelen af resistensgener i miljøet skaber problemer hos mennesker

På trods af den store mangfoldighed af resistensgener i naturen er vores viden om miljøet, som et potentielt reservoir for resistensgener, stadig begrænset. Mange bakterier, som ikke normalt er associeret med mennesker eller hospitaler, har resistensgener, som ligner dem, vi kender fra de bakterier, der gør os syge. Heriblandt er for eksempel *Stafylokokker* (herunder MRSA), *Escherichia coli* og *Klebsiella pneumonia*. Det er dog langt fra alle resistensgener i miljøet, som skaber problemer på hospitalerne. En nyttig metode til at identificere de gener, som er i stand til at give resistens i klinisk relevante bakterier, er ved såkaldt funktionel genetisk selektion, figur 1. Her indsætter vi små bidder af DNA fra miljøet i en ny bakterie, som efterfølgende udfordres med forskellige antibiotika under kontrollerede laboratorieforhold. Disse undersøgelser har ført til opdagelsen

af talrige funktionelle resistensgener i miljøet [10]. Disse resistensgener kan overføres til sygdomsfremkaldende bakterier og gøre dem resistente, men ofte sker dette ikke. Derfor tyder det på, at der er andre barrierer end funktionalitet for spredningen og fiksering af resistensgener i de bakterier, man bekymrer sig om på hospitalerne.

Delbare DNA-molekyler er afgørende for spredningen af resistensgener

Hvordan flytter resistensgener sig fra miljøet til de bakterier, der gør os syge? Den mest udbredte mekanisme er via cirkulære DNA-molekyler kaldet plasmider - en slags delbare genetiske værktøjskasser. Plasmider eksisterer uafhængigt af bakteriens kromosom og kan ses som en slags parasitter, som typisk også bærer på gavnlige gener for bakterien; for eksempel antibiotikaresistens, figur 2. Herudover udnytter mange plasmider værtsbakteriens ressourcer til at lave en tunnel, som gør dem i stand til at sprede sig til andre bakterier i nærheden. Da plasmider kan have mange resistensgener på én gang, er de



Figur 3. Plasmid med 11 antibiotikaresistensgener. Det 73.152 basepar store multiresistensplasmid er isoleret fra en *Klebsiella pneumoniae* bakterie, fundet i en patient på Hvidovre Hospital. Udover resistensgener bærer plasmidet også på gener involveret i dets replikation, overførsel og stabilitet.

ofte skyld i multiresistens hos bakterier. For eksempel findes der plasmider hos nogle bakterier, der giver resistens over for så mange antibiotika, at bakterier med disse plasmider stort set ikke kan behandles længere [11]

Vi har arbejdet med et plasmid, der bærer på 11 forskellige resistensgener, figur 3, og som er i stand til at overføre sig til mange forskellige arter af sygdomsfremkaldende bakterier [11]. Her opdagede vi, at bakterier kan reagere vidt forskelligt på at modtage et nyt plasmid. Nogle bakterier bliver så hårdt belastede af det fremmede DNA, at de hurtigt smider det væk igen og derved også mister fordelene ved plasmidets resistensgener. En sådan tendens virker umiddelbart lovende, men desværre så vi også, at plasmidet kunne tilpasse sig til en ny vært og overleve i meget længere tid. Heldigvis var det ikke alle bakterier, plasmidet nemt kunne tilpasse sig til, og nogle bakterier var derfor mindre tilbøjelige til at beholde deres resistensgener, når antibiotika ikke var til stede. Den hyppigste måde plasmidet tilpassede sig på, var ved at fjerne de gener, som er involveret i plasmidets overførsel mellem bakterier. Det vil sige, at selvom plasmidet blev mere stabilt i én værtsbakterie, var det på bekostning af dets evne til at sprede sig til nye bakterier.

Vi må forstå spredningen af resistens, hvis vi vil forhindre den

Hvis vi vil resistens til livs, handler det i høj grad om at styre vores forbrug af antibiotika. Dog kan vi ikke regne med, at de gener, som allerede findes i mennesker, og f.eks. dyrehold i landbruget, forsvinder af sig selv, hvis vi mindsker brugen af antibiotika [12]. Hvor antibiotikaforbruget hos mennesker er af afgørende betydning, tyder nyere forskning på, at de miljøer som udsættes for antibiotika, f.eks. landbrugsdyr og spildevandsanlæg, kun er problematiske,

hvis resistensgenerne nemt kan spredes mellem miljø og mennesker [7,13].

Vores ultimative mål er at kunne forudsige risikoen for, at nuværende og nye resistensgener skaber problemer i fremtiden. I øjeblikket arbejder vi på at forstå de faktorer, som har betydning for spredningen og overlevelsen af resistens i miljø og mennesker. Selvom vores resultater tyder på, at bakterier foretrækker nogle typer af resistensgener frem for andre, så er specielt den genetiske kontekst generne befinder sig i vigtig for, om genet nogensinde finder vej til en bakterie, som gør os syge. Her spiller plasmider en stor rolle, fordi resistensgenets fremtid i høj grad afhænger af plasmidets evne til at tilpasse sig nye værtsbakterier.

Hvis vi vil forhindre spredningen af resistens, bliver vi nødt til at forstå de vigtigste evolutionære mekanismer, som kommer i spil, når bakterierne deler DNA som plasmider. Denne viden vil kunne inddrages, når nye antibiotika skal udvikles, fordi vi på den måde kan undvige de resistensmekanismer, som er nemmest for bakterierne at dele med hinanden. Et andet potentiale i at kende de afgørende mekanismer for spredningen af resistens er, at vi kan begynde at udvikle lægemidler, som rammer spredningen af resistensgenerne frem for bakterien selv. F.eks. vil de proteinstrukturer, som plasmider anvender til at replikere, stabilisere eller overføre sig selv med, kunne fungere som mål for nye lægemidler, der potentielt kan gøre gamle antibiotika anvendelige igen og forlænge levetiden af nye antibiotika.

E-mail:

Andreas Porse: anpor@biosustain.dtu.dk

Morten Sommer: msom@bio.dtu.dk

Referencer

1. T.P. Van Boeckel, S. Gandra, A. Ashok, Q. Caudron, B.T. Grenfell, S.A. Levin, and R. Laxminarayan, "Global antibiotic consumption 2000 to 2010: An analysis of national pharmaceutical sales data", *Lancet Infect. Dis.*, vol. 14, no. 8, pp. 742-750, 2014.
2. G. Dantas and M. Sommer, "How to Fight Back Against Antibiotic Resistance," *Am. Sci.*, vol. 102, 2014.
3. J.O'Neill, "Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations," *Rev. Antimicrob. Resist.*, no. May, p. 84, 2016.
4. V.M. D'Costa, C.E. King, L. Kalan, M. Morar, W.W.L. Sung, C. Schwarz, D. Froese, G. Zazula, F. Calmels, R. Debruyne, G.B. Golding, H.N. Poinar, and G.D. Wright, "Antibiotic resistance is ancient," *Nature*, vol. 477, no. 7365, pp. 457-61, Sep. 2011.
5. K. Bhullar, N. Waglechner, A. Pawlowski, K. Koteva, E.D. Banks, M.D. Johnston, H.A. Barton, and G.D. Wright, "Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome," *PLoS One*, vol. 7, no. 4, pp. 1-11, 2012.
6. M.O. A. Sommer, G. Dantas, and G.M. Church, "Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora," *Science*, vol. 325, no. 5944, pp. 1128-1131, 2009.
7. C. Munck, M. Albertsen, A. Telke, M. Ellabaan, P.H. Nielsen, and M.O.A. Sommer, "Limited dissemination of the wastewater treatment plant core resistome," *Nat. Commun.*, vol. 6, p. 8452, 2015.
8. K.J. Forsberg, S. Patel, M.K. Gibson, C.L. Lauber, R. Knight, N. Fierer, and G. Dantas, "Bacterial phylogeny structures soil resistomes across habitats," *Nature*, vol. 509, no. 7502, pp. 612-6, 2014.
9. E. van der Helm, L. Imamovic, M.M. Hashim Ellabaan, W. van Schaik, A. Koza, and M.O.A. Sommer, "Rapid resistome mapping using nanopore sequencing," *Nucleic Acids Res.*, vol. 69, p. gkw1328, Jan. 2017.
10. K.J. Forsberg, A. Reyes, B. Wang, E.M. Selleck, M.O.A. Sommer, and G. Dantas, "The Shared Antibiotic Resistome of Soil Bacteria and Human Pathogens," *Science* (80-.), vol. 337, no. 6098, pp. 1107-1111, 2012.
11. A. Porse, K. Schønning, C. Munck, and M.O.A. Sommer, "Survival and Evolution of a Large Multidrug Resistance Plasmid in New Clinical Bacterial Hosts," *Mol. Biol. Evol.*, vol. 33, no. 11, pp. 2860-2873, 2016.
12. D.I. Andersson and D. Hughes, "Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance?," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 8, no. 4, pp. 260-71, Apr. 2010.
13. B.A.D. Van Bunnik and M.E.J. Woolhouse, "Modelling the impact of curtailing antibiotic usage in food animals on antibiotic resistance in humans," *R. Soc. opensci.*, vol. 4, no. 161067, 2016.

Ny metode kan give hurtigere måling af antibiotikaresistens i tarmen

Mikrober i vores tarme kan nedbryde antibiotika, så behandlingen ikke virker. En ny, hurtig metode til påvisning af antibiotikaresistensgener kan dog føre til bedre behandling - og ultimativt til personlige antibiotikakure for den enkelte patient.

Af Eric van der Helm og Anne Lykke,
The Novo Nordisk Foundation
Center for Biosustainability

Hvert år dør 700.000 mennesker på verdensplan af resistente infektioner. Siden opdagelsen af penicillin i 1928 har antibiotika været anvendt rutinemæssigt i sundhedsvæsenet til behandling af bakterielle infektioner. For nyligt opdagede forskere dog, at mikrober i den normale tarmflora besidder resistensgener – samlet set kaldet resistomet – som kan ødelægge effekten af antibiotika.

En sund tarm indeholder ca. 30 billioner mikrober - eller omtrent så mange celler som hele kroppen består af [1]. Mikroberne hjælper f.eks. med at fordøje maden i tarmen. Nogle af de gavnlige mikrober huser naturligt antibiotikaresistensgener, som gør dem i stand til at overleve, hvis de udsættes for antibiotika. Tarmen kan dog også blive invaderet af sygdomsfremkaldende organismer kaldet patogener, f.eks. hvis man spiser fordærvet mad. Men patogenerne kan også

erhverve sig resistensgener fra de gavnlige tarmmikrober, så de skadelige mikrober pludseligt ikke længere kan bekæmpes med antibiotika.

Samtidig er langt størstedelen af de gavnlige mikroorganismer ikke resistente overfor antibiotika og vil derfor blive udslettet, når en patient bruger antibiotika, hvilket kan have negative virkninger for helbredet. Derfor er der stor interesse i at forstå sammensætningen af tarmens resistom, især hos indlagte patienter.

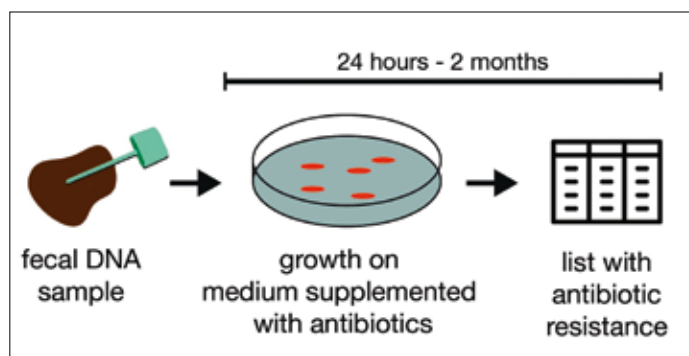
Test af gener for antibiotikaresistens kan tage to måneder

En måde at finde frem til resistensgenerne er f.eks. ved at tage en blodprøve på patienten. Prøven deles op i mindre portioner, og hver af disse tilsættes forskellige antibiotika og dyrkes. Mikroorganismer i blodet vil på den måde kun være i stand til at vokse, hvis de indeholder et resistensgen, som gør det muligt for dem at overleve antibiotikaen, se figur 1.

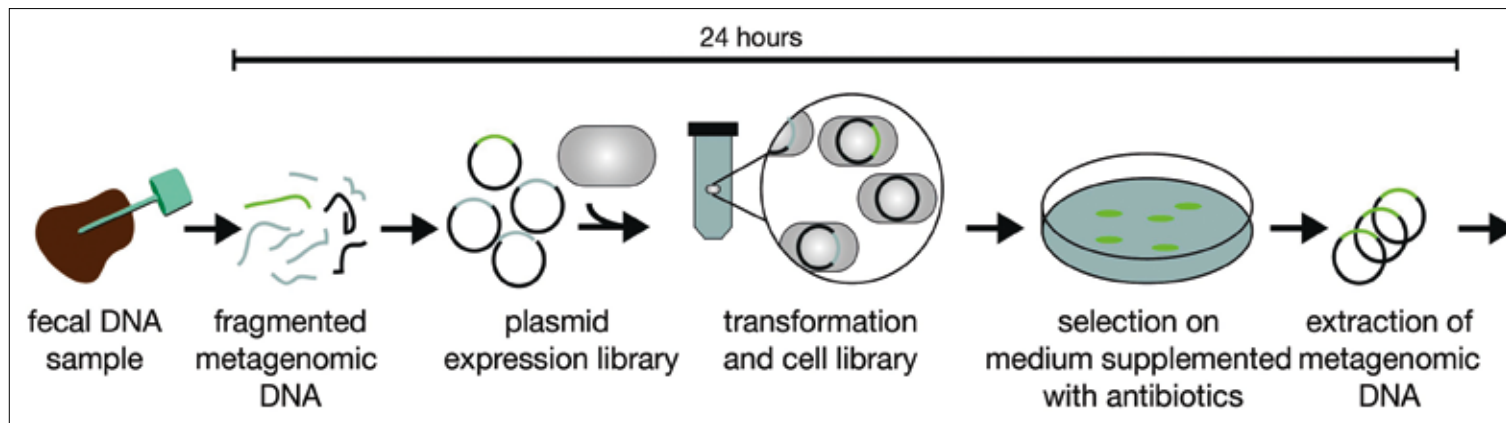
Den metode vil dog kun fortælle en læge, at en patient bærer på en resistent mikroorganisme, men ikke hvilket eksakt resistensgen der er ansvarligt. Et mere presserende problem er, at testen tager relativt lang tid at udføre, da mikroorganismerne skal dyrkes i et laboratorium. Det tager f.eks. op mod to måneder, før *Mycobacterium tuberculosis* - den mikroorganisme, der forårsager tuberkulose - kan identificeres med denne metode.

En metode, som omgår den langsommelige dyrkning, kaldes funktional metagenomik, figur 2, side 20. I stedet for at dyrke bakterierne, udtrækker en forsker alt DNA'et fra en fæcesprøve fra patienten og placerer det i en hurtigtvoksende laboriebakterie, f.eks. *E. coli*. Colibakterierne indeholder nu DNA-fragmenter fra tarmens mikroorganismer, og nogle af dem vil derfor indeholde resistensgener.

Colibakterierne opdeles nu i små mængder, og der tilsættes igen forskellige antibiotika til prøverne, hvorefter bakterierne vokser i ca. 16 timer, figur 3. Kun colibakterier, der indeholder et resistensgen, er i stand til at vokse og danne synlige kolonier i en petriskål. Denne proces tager mindre end en dag og er



Figur 1. For at bestemme patientens modtagelighed overfor en bestemt type antibiotika lader man en patientprøve - f.eks. mikrober fra fæces eller blod - vokse i en petriskål. Nogle mikroorganismer vokser meget langsomt, så det kan tage op til to måneder at dyrke dem.



Figur 2. Vores nye metode kan identificere de resistensgener, der er til stede i en prøve fra en patient.

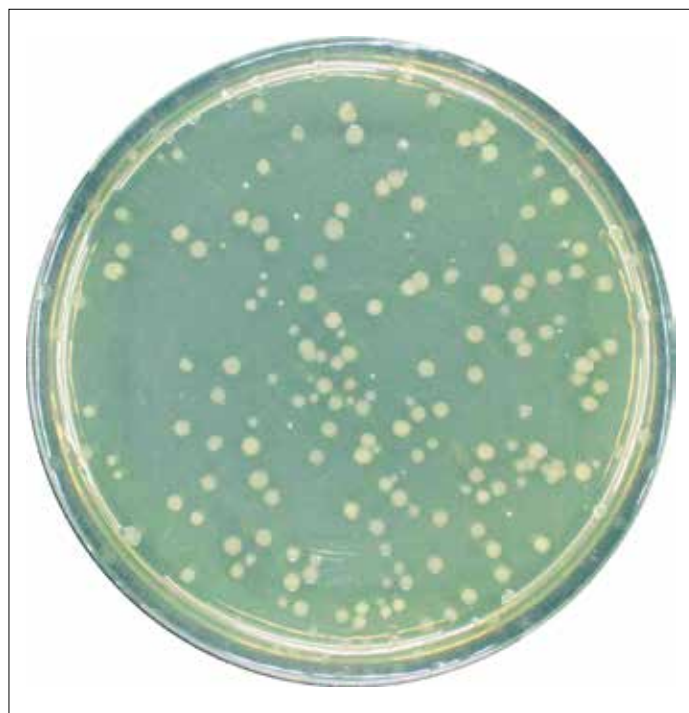
langt hurtigere end at dyrke de patogene mikroorganismer. Det næste trin er at forstå og identificere nøjagtigt hvilke gener, der forårsager antibiotikaresistensen. Denne viden er vigtig for at kunne skræddersy behandlingen.

Hurtig og billig sekventering åbner nye muligheder

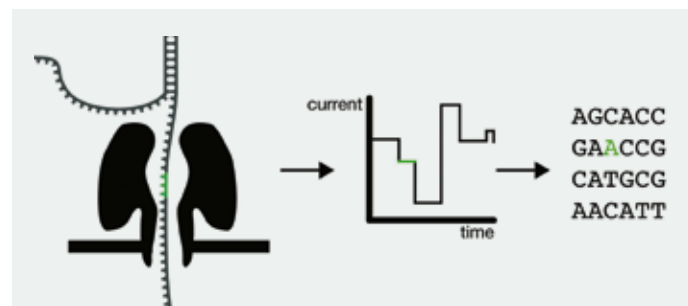
Den mest præcise måde at identificere resistensgener på er ved hjælp af DNA-sekventering. I dag findes der et utal af forskellige teknologier til sekventering af DNA, hvor den ældste metode kaldes Sanger-sekventering – opkaldt efter Nobelpriervinderen Fred Sanger. Selvom Sanger-sekventering er meget præcist, er det dyrt at opskalere. Nye teknologier, kaldet Next Generation Sequencing (NGS), er kommet ind på markedet og tilbydes af virksomheder som Illumina og PacBio. Med NGS kan man sekventere store mængder DNA på kort tid og en af de nyeste kommercielt tilgængelige NGS-teknologier er nanopore-sekventering, der tilbydes af Oxford Nanopore Technologies. Deres nanopore-sekventeringsmaskine, MinION, koster i omegnen af 1.000 dollars. Til sammenligning koster en konventio-

nel NGS-maskine op mod 50.000-1.000.000 dollars. Den lave indkøbspris betyder bl.a., at nanopore-sekventering også kan udføres i ulande.

I forsøget undersøgte vi fem fækale prøver fra en intensivpatient, der havde gennemgået en lungetransplantation på grund af lungesygdommen KOL. Under opholdet på hospitalet blev patienten behandlet forebyggende med fem forskellige antibiotika. Vi anvendte funktionel metagenomik for at få DNA – og dermed identificere puljen af resistensgener – fra de fækale prøver. Derefter sekventerede vi DNA'et fra de synlige bakteriekolonier med MinION nanopore-sekventeringsmaskinen. Til sidst anvendte vi en bioinformatisk analysemetode, som vi udviklede



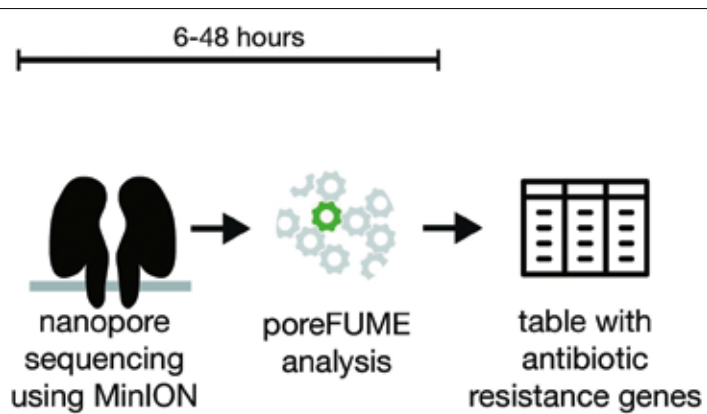
Figur 3. Dette er et billede af en af vores laboratorie-*E. coli*-stammer, der indeholder metagenomisk DNA, og som er dyrket i en petriskål med et bestemt antibiotikum.



Sådan virker nanopore-sekventering

MinION sekventeringsmaskinen (en enhed på størrelse med en USB-nøgle) virker ved at detektere variationer i elektroniske strømme, når DNA-baserne glider forbi:

1. For at finde resistomet isoleres først alt det DNA fra mikroberne, der er involveret i at give resistens. DNA'et nedbrydes til to strenge, og en enkelt streng føres ned gennem MinION-sekventeringsmaskinen, som indeholder såkaldte nanoporer.
2. Hver nanopore er kun et par nano-meter bred og kan kun indeholde én DNA-streng ad gangen.
3. Der tilføres en elektrisk strøm til maskinen, og hver nanopore måler nu ændringerne i de elektriske impulser fra DNA'ets forskellige byggesten, som er placeret inde i poren.
4. De elektriske impulser sendes til en computer, hvor avanceret software oversætter signalerne til den genetiske kode.
5. Når alle DNA-strenge i prøven har passeret gennem nanoporen, samler computeren alle generne i resistomet.



til netop denne teknologi. Den bioinformatiske analysemetode er tilgængelig på https://github.com/EvdH0/poreFUME_paper, så alle kan efterprøve analysen.

Nøjagtigheden af resistensgen-identifikationen sammenlignet med Sanger-metoden var ca. 97%. Alligevel kunne vi med metoden identificere de 26 forskellige resistensgener, der var til stede i patientens tarm. Det viste sig, at nogle af generne gav resistens over for nogle af de antibiotika, som patienten blev behandlet med under opholdet på intensivafdelingen. Resultaterne og metoden blev offentliggjort i januar i det videnskabelige tidsskrift *Nucleic Acid Research* [2].

Nanopore-sekventering kan føre til personlig behandling

Kombinationen af funktionel metagenomik og nanopore-sekventering er et lovende alternativ til andre sekventeringsteknologier og kan bruges til hurtigt at give en resistensgen-profil, f.eks. i tarmsystemet. En sådan profil kan føre til personlig antibiotikabehandling hos patienter med høj risiko for at udvikle resistens. Med mere målrettet behandling, hvor lægerne udvælger medicin, der ikke ”tricker” bestemte resistensgener i tarmen, vil man få en langt mere effektiv behandling og formentligt undgå at accelerere udviklingen af antibiotikaresistens.

For at personlig behandling skal blive virkelighed, er der dog brug for flere undersøgelser af, hvordan antibiotikabehandling påvirker resistens-profilen samt hvordan den efterfølgende personlige behandling påvirker resistens-profilen. Men konklusionen lader til at være, at nanopore-sekventering er et effektivt værktøj til at udføre sådanne undersøgelser hurtigt og effektivt.

E-mail:

Eric van der Helm: evand@biosustain.dtu.dk

Anne Lykke: annly@biosustain.dtu.dk

Referencer

1. Sender, R., Fuchs, S. & Milo, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biol.* 14, 1-14 (2016).
2. van der Helm, E. et al. Rapid resistome mapping using nanopore sequencing. *Nucleic Acids Res.* (2017). doi:10.1093/nar/gkw1328

LabDays 2017

Fagmesse for laboratorieteknik



- LSB Temamøde
- Laborarieudstyr
- Diagnostik
- Bioteknologi
- Forskning
- Kvalitetskontrol
- Fagkonferencer
- Over 85 udstillere

Århus 20. - 21. september
labdays.dk

Sikring af risikovirksomheder

Nu skal risikovirksomheder udføre en sårbarhedsvurdering.
Det er en følge af regeringens terrorhandlingsplan.
En vejledning har netop været i høring.

Af Frank Huess Hedlund

En række virksomheder har oplag af store mængder af farlige stoffer. Per definition er de derved farlige. Rationalet er, at alene det faktum, at stofferne findes på stedet i store mængder, bevirker, at et eventuelt uheld kan få alvorlige konsekvenser. Disse virksomheder (risikovirksomhederne) er derfor omfattet af den såkaldte risikobekendtgørelse, der implementerer et europæisk direktiv, som har taget navn efter en alvorlig ulykke i den italienske by Seveso, hvor der i 1976 var et uheld med dioxin.

Sevesodirektivet kræver, at virksomhederne dokumenterer,



Regeringsbygningen i Oslo efter bombeangrebet i 2011. Terrorister søger at skabe angst og utryghed, og de hjælpes dygtigt af mediernes flokhysteri. Erfaringsmæssigt foretrækker de simple sprængstoffer, som kræver begrænsede kundskaber. Vi bør huske på Franklin D. Roosevelts ord fra 1932, at det eneste vi skal frygte, er frygten selv. Foto: Wikipedia.org.

at mulige uheldsscenarier er kortlagt, samt at der er truffet de nødvendige foranstaltninger, både til at forebygge at der sker ulykker og til at afhjælpe konsekvenserne, hvis en ulykke alligevel skulle ske.

I jargonen inden for dette lille fagområde, hvor undertegnede har sit daglige virke, skal virksomhederne altså godtgøre, at risikoen er lav. Virksomhederne bliver selvfølgelig ved med at være farlige, da dette per definition kun afgøres af, om nogle bestemte stoffer findes på stedet i mængder, der overstiger en vis tærskelmængde.

Den samme terminologi findes i øvrigt inden for det arbejdsmiljøkemiske område. Visse stoffer er farlige, det afgøres af nogle stofegenskaber. Stofferne kan eksempelvis være giftige, men ved passende forholdsregler kan eksponeringen styres, således at risikoen ved håndtering af stofferne er lille. Stofferne bliver selvfølgelig ved med at være farlige, selvom risikoen ved håndtering nu er lille.

Begreberne har således en lidt anden betydning end i daglig tale. Når meteorologen siger, at der er risiko for regn, betyder det, at der nok kommer regn (altså at sandsynligheden er høj). Når vi fortæller vores børn, at det er farligt at balancere på en tagryg, mener vi, at muligheden for at komme slemt til skade er overhængende, altså at risikoen er alt for stor.

Sikring

I 2012 blev en tredje udgave af det europæiske Sevesodirektiv vedtaget, i daglig tale Seveso-III [1]. Medlemslandene skulle implementere direktivet senest i 2015. I 2016, altså et år for sent, blev direktivet implementeret i den danske risikobekendtgørelse [2]. I den danske revision af bekendtgørelsen er valgt at indføre krav om terrorsikring, hvilket ikke var en del af det europæiske Seveso-III.

Igen lidt terminologi: Når en virksomhed sikrer sig mod ulykker, forbedrer den sikkerheden. Når en virksomhed sikrer sig mod bevidst skadevoldende handlinger, forbedrer den sikringen. I engelsk terminologi skelner man mellem safety og security. På dansk skelner vi tilsvarende mellem sikkerhed og sikring.

Nødvendige foranstaltninger

Det Europæiske Fællesskabs (EFs) ministerråd vedtog i 1982 det første Sevesodirektiv. I 1985 udkom den første betænkning om betydelige risici [3], som stadig er særdeles læsværdig. Det er vanskeligt inden for såkaldt rimelig tid at søge i disse gamle kilder, men undertegnede er ganske sikker på, at gennemførelsen af det første Sevesodirektiv var begrundet i Rom-traktatens (1957) bestemmelser om fjernelse af handelshindringer.

Den underliggende antagelse var, at høj sikkerhed koster penge og derfor ikke kan betale sig, i hvert fald ikke på kort

sigt. De medlemslande, som kræver, at den nationale industri har et unormalt højt sikkerhedsniveau, vil derfor være udsat for unfair priskonkurrence fra medlemslande, som har et lavere sikkerhedsniveau. Det kan man af gode grunde ikke acceptere i et fælles marked, og løsningen, begrundet i Rom-traktaten, var derfor at kræve, at alle medlemslande skulle have det samme sikkerhedsniveau. Rent teknisk var kravet, at alle medlemslande skulle sikre, at deres virksomheder tog de nødvendige foranstaltninger mod større uheld.

Uheldigvis, kan man mene, eller måske netop af gode pragmatiske årsager og politisk tæft, undlod ministerrådet at komme nærmere ind på, hvad der var nødvendigt. Direktivet kunne derfor vedtages, idet det stod alle medlemslande frit for at definere, hvad de selv mente, var "nødvendige foranstaltninger". Politik er som bekendt det muliges kunst.

Denne tågesnak om nødvendige foranstaltninger har plaget den praktiske implementering lige siden, og er i øvrigt bibeholdt i Seveso-III og den seneste danske risikobekendtgørelse. I praksis har afgørelser om, hvad der er nødvendigt, været delegeret til det yderste led i sagsbehandlerhierarkiet, ofte ude i en lille kommune hvor der kun er en enkelt risikovirksomhed, og været præget af tøven og usikkerhed. Og området har, for nu at sige det mildt, ikke haft myndighedernes allerhøjeste prioritet.

Vejledninger ønskes

Den seneste revision af risikobekendtgørelsen er kraftigt revideret, hvilket den afgjort har vundet ved. Mange uklare passager er blevet tydeligere og sproget mere mundret.

Mange væsentlige spørgsmål er dog stadig åbne for fortolk-

ning. En virksomhed skal eksempelvis anmelde de maksimale mængder af et farligt stof, "som er eller kan være til stede på et hvilket som helst tidspunkt".

Ifølge en tidligere vejledning fra Arbejdstilsynet [4] (senest udgivet i 2006) skulle det fortolkes således, at alle beholdere var helt fulde. Det har været en kilde til diskussion blandt visse virksomheder, som eksempelvis har genbrugt eksisterende (store) beholdere, men kun har behov for at fylde dem delvist. Selvom beholderne havde fyldestop eller andre tekniske anordninger, og selvom virksomheden ikke havde tilladelse til at have oplagsmængder svarende til fyldte beholdere, skulle de altså alligevel regnes som værende fyldt til randen.

Netop dette har særligt givet problemer for ammoniak-køleanlæg. I den nye revision af bekendtgørelsen er det præciseret, at for lige netop disse anlæg skal ammoniak-mængden kun opgøres ved den maksimale fyldning, hvor anlægget kan opretholde normal drift.

Eksemplet er medtaget for at vise, at der frem til 2016, altså ca. 30 år efter den første bekendtgørelse trådte i kraft, stadig har været uklarhed om noget så grundlæggende, som hvorledes mængderne af farlige stoffer skulle opgøres.

Situationen er dog langsomt blevet bedre. Miljømyndighederne har efterhånden et konsistent grundlag for at træffe afgørelser om risikopåvirkning, selvom den praktiske implementering ude i kommunerne stadig er overordentlig tøvende.

Arbejdstilsynets praksis er dog stadig præget af stor uforudsigelighed. Med udgivelsen af risikohåndbogen i 2016 ligger årsagen hertil nu til offentligt skue. Arbejdstilsynet forholder sig kun til, om forholdene er "fuldt forsvarlige". Altså en kosmetisk ►

GERSTEL

 **Agilent Technologies**

LECO
Delivering the Right Results

Alpha
M.O.S.
Multi On-line Analytic Systems

MARKES
International

Ot-Analytical
a xylem brand

komplette og fuldt automatiserede

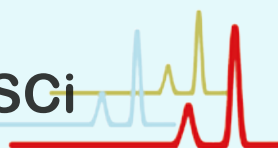
GC-og GCMS-løsninger tilpasset dine behov

- Med de stærkeste spillere på markedet.
- Fra simpel GC-FID...
- ...til avanceret sample-prep-GCxGC-TOFMS.

Totalløsninger til laboratoriet:

- Instrumentsalg og -service
- Metodeudvikling og rådgivning
- Undervisning/træning/kurser
- Analyser

Kontakt: Jens Glastrup/Tore Vulpius

MSCi 

omskrivning af det i forvejen uklare begreb ”nødvendige foranstaltninger”. Denne nok så vanskelige afgørelse for komplicerede anlæg, en vurdering som netop er direktivets kerne og dets raison d’être, er så delegeret helt ned til den enkelte sagsbehandler. Det er umulige arbejdsbetingelser for sagsbehandlerne. Der er en del eksempler på, at disse stakler, forventeligt, træffer arbitrære afgørelser.

Sårbarhedsvurdering

Men for at vende tilbage til udgangspunktet for dette indlæg skal myndighederne nu også vurdere, om de såkaldt store (kolonne 3) risikovirksomheder har truffet de nødvendige foranstaltninger mod bevidst skadevoldende handlinger. Virksomhederne skal lave en sårbarhedsvurdering og måske, hvis politiet ønsker det, også en sikringsplan.

Høring

Virksomhederne skal indsende deres sårbarhedsvurdering til politiet senest 1. juni 2017. I april 2017 sendte rigspolitiet et udkast til en vejledning i høring og i skrivende stund, primo maj 2017, altså små tre uger før virksomhederne skal indsende deres sårbarhedsvurdering, foreligger vejledningen stadig ikke i en endelig udgave.

Alene af den grund kommer vejledningen derfor næppe til at udfylde sin tiltænkte funktion som vejledning. Derudover har høringsudkastet til vejledningen en række skavanker. Undertegnede afgav et høringssvar, og dele af dette svar gengives herunder.

A) Hvilke farlige stoffer?

Udgangspunktet for ønsket om sikring af risikovirksomheder er anbefaling 42o i regeringens handlingsplan for terrorbekæmpelse [5]. Det er væsentligt at gøre sig klart, hvad der forstås ved ”farlige stoffer” i terrorsammenhæng.

Der er i EU-regi gjort forskellige overvejelser. Blandt andet foreligger der en EU CBRN handlingsplan for ”high-risk chemicals and high-risk chemical facilities”. Sammen med blandt andet Beredskabsstyrelsens CBRN-institut gennemførte COWI (og undertegnede) en undersøgelse i 2012 for EU-Kommissionen om sikring og sikkerhed [6]. I denne sammenhæng konstaterede vi, at der eksisterer en såkaldt C-liste med 34 farlige stoffer, som er særlig relevante i terrorøjemed. Listen er dog ikke offentligt tilgængelig.

Men det er væsentligt, at risikobekendtgørelsen arbejder med en betydelig bredere definition af farlige stoffer end C-listen, herunder stoffer som er miljøfarlige. Her kan eksempelvis peges på diesel, fyringsolier og svær brændselsolie. Disse blev i Seveso I og II slet ikke betragtet som farlige stoffer, da de er svære at antænde. Men i slutningen af 00’erne blev de omfattet af bagvejen, idet deres miljøklassifikation blev ændret (til Chronic Aquatic Toxicity 2 under CLP, NR51/53), således, at stofferne blev omfattet af Seveso II direktivets meget lave tærskelværdi for miljøfarlige stoffer.

COWI (og undertegnede) lavede i 2010 et studie for EU-Kommissionen (DG ENV) om overgangen fra Seveso II til III [7], som blandt andet omhandlede netop dette. Løsningen i Seveso III blev at lade dem være et navngivet stof med en højere tærskelmængde.

Men det væsentlige er, at disse stoffer er medtaget for deres miljøfare, særligt herunder faren for uopdaget lækage og grundvandsforurening. Disse farlige stoffer er i øvrigt tilgængelige i fri handel i ubegrænsede mængder. Men er sådanne stoffer (og for den sags skyld grundvandsforurening) relevant i terrorsammenhæng? EU’s C-liste er meget mere selektiv.

Det samme rationale gør sig gældende for eksempelvis konsumfyrværkeri (herunder bordbomber, som er klassificeret

som HD 1.4S). Stofferne kan købes i fri handel i ubegrænsede mængder og lagrene er placeret langt fra naboer i henhold til NATOs regler for ammunitionsdepoter. Er disse stoffer så relevante i terrorsammenhæng?

Der vil være en række praktiske problemstillinger af denne type, som sagsbehandlerne vil skulle tage stilling til, og der er derfor stort behov for en vejledning. Men vejledningen nævner ikke problemstillingen.

B) Hvilke mængder?

Risikobekendtgørelsen opererer med to beslutninger. Den ene er, om der findes farlige stoffer på virksomheden, den anden om mængderne overstiger en tærskelværdi. Disse to beslutninger er adskilt.

I praksis betyder det, at en virksomhed kan blive omfattet på grund af oplag af et miljøfarligt stof. Så skal virksomheden i henhold til risikobekendtgørelsen kortlægge og risikovurdere samtlige farlige stoffer på virksomheden, også for de farlige stoffer som ikke overstiger tærskelværdien. Det er helt almindeligt, at denne kortlægning identificerer, at det er scenarier med disse andre stoffer, som er de væsentligste, fordi de worst-case kan påvirke området uden for virksomheden. Dette er blandt praktikere en velkendt kilde til betydelig uklarhed og langtrukken sagsbehandling af risikovirksomheder.

Men det betyder, at politiet kommer til at sagsbehandle sårbarhedsvurderinger for virksomheder med små mængder af farlige stoffer. Udelukkende fordi der findes et andet stof på virksomheden, som måske har meget begrænset relevans i terrorøjemed, men som medfører, at virksomheden er omfattet.

Vejledningen tager ikke stilling til dette. Tværtimod skriver den, at: ”Baggrunden [for at omfatte virksomheden] er, at det netop er disse virksomheder, hvor de største mængder farlige stoffer er til stede, og hvor der dermed også er størst potentiale for skade ved en eventuel terrorhandling” samt at andre virksomheder ikke er omfattet ”på grund af det mindre potentiale for skade som følge af de mindre mængder farlige stoffer på virksomhederne”. Denne skelnen eksisterer ikke i praksis.

Der er derfor stort behov for en vejledning på dette punkt. Men vejledningen nævner ikke problemstillingen.

C) Sammenhæng mellem anden terrorlovgivning

Der er to hovedformål med at sikre Seveso-anlæg med farlige stoffer omfattet af risikobekendtgørelsen, se eksempelvis den relativt korte reference [8].

- For at begrænse adgangen til farlige stoffer således, at de kan anvendes til terrorhandlinger andetsteds.
- Fordi visse typer af anlæg har så store mængder af farlige stoffer, at de kan være terrormål i sig selv.

Vejledningen nævner disse to, men arbejder med et bredere begreb ”tab af kontrol” med de farlige stoffer.

Formålet med sikringen af Seveso-anlæg med farlige stoffer er af en anden karakter end formålet med sikringen af såkaldt samfundskritiske installationer, som er omfattet af the European Critical Infrastructure (ECI) Directive. Her er bekymringen en afbrydelsesrisiko - at samfundskritisk infrastruktur, eksempelvis kraftværker, sættes ud af kraft, og forsyningen afbrydes. ECI er et eksisterende EU-direktiv, som allerede er implementeret i anden lovgivning. Ikke desto mindre inddrager denne vejledning tilsyneladende også ECI-anlæg, idet den skriver: ”De konsekvenser, som skal medtages i risikovurderingen, er konsekvenser for samfundet og de samfundskritiske funktioner, som betegner de aktiviteter, varer og tjenesteydelser, som udgør grundlaget for samfundets funktionsdygtighed”.

Er mulige sammenfald gennemtænkt? Skal virksomheder, som allerede er omfattet af ECI, og har fået godkendt sikrings-

niveauet, men samtidig også er Seveso-virksomheder, igennem en ny godkendelsesprocedure?

Argumenter pro kunne være, at bekymringen er en anden, tyveri og terrormål, og ikke kun ECI-direktivets fokus på afbrydelsesrisiko af en service. Argumenter contra kunne være, at sikringsniveauet allerede er godkendt. Men vejledningen nævner ikke dette relevante overlap.

Omvendt nævner vejledningen det mindre relevante overlap med ISPS (International Ship and Port Facility Security Code), at "kravene ikke gælder for risikovirksomheder, som er omfattet af bekendtgørelsen om sikring af havnefaciliteter".

Men formålet med sikring af havnefaciliteter er af en helt tredje karakter, at sikre at skibstransport ikke anvendes til transport af farlige stoffer, altså at transportmidlet ikke anvendes i terrorøjemed. Så vidt vi forstår, kan havne omfattet af ISPS således ophæve sikringstiltagene, når der ikke ligger skibe i havnen, hvilket er logisk i forhold til ISPS. Men så er det ikke helt logisk, at kravene ikke gælder for Seveso-virksomheder, hvis de ligger i et ISPS-område.

Behov for vejledninger

Som tidligere nævnt har risikoområdet, for nu at sige det mildt, ikke haft myndighedernes allerhøjeste prioritet. Praksis på området har været præget af tøven og usikkerhed. Der har været flere gode anledninger til at skabe lidt mere klarhed, eksempelvis en kontrovers om et gaslager i Køge i begyndelsen er 00'erne. Men selvom den risikomæssige del af retsforklaringen kan måle sig med selv de største søforklaringer, er sagerne desværre blevet anskuet snævert og afgjort på rent juridiske spidsfindigheder. Opfølgningen på Seest-ulykken i 2004 var også håbløs [9].

Der er dog sket lidt efter Seest-ulykken i 2004. I 2007 [10] blev der udarbejdet forslag til, hvilke koncentrationsgrænser der skal anvendes i konsekvensanalyser. Problemstillingen havde da været aktuel (og akut) i 20 år. I 2008 blev der udgivet en arbejdsrapport [11] om acceptkriterier for risiko, et andet område, hvor det også kan være nyttigt med lidt konsensus. COWI (og undertegnede) havde blot fire år tidligere gennemført et større

■ Risikobekendtgørelsen

"Det er en kendsgerning, at der [...] fra tid til anden indtræffer særdeles alvorlige ulykker [...] Disse ulykker indtræffer på trods af en stærkt accelererende teknologisk viden - eller måske snarere ofte som følge af, at denne viden ikke omsættes i praksis i et sådant tempo og i sådant et omfang, at der endnu ikke foreligger en tilstrækkelig erkendelse af uønskede, men mulige konsekvenser. Dette medfører, at forebyggende sikkerhedsforanstaltninger ikke træffes i nødvendigt omfang [...]"

Det spørgsmål rejser sig derfor, om samfundet - for på bedste måde at sikre sig mod alvorlige ulykker [...] ikke burde placere den forebyggende indsats i en større sammenhæng". Sådan lød kommissoriet til at ekspertudvalg nedsat i 1981 [3]. Baggrunden var en række meget alvorlige ulykker med farlige stoffer i 1970'erne. Der var politisk ønske om at regulere området, hvilket ledte til det første EU risikodirektiv i 1982 og den første danske risikobekendtgørelse i 1984. En række absurd spektakulære ulykker 1980'erne gav yderligere legitimitet til initiativet.

Der er stadig behov for en større sammenhæng i indsatsen, der sker stadig ulykker med helt uacceptable konsekvenser og erfaringer [12-14] viser, at en eller anden form for regulering af området er helt nødvendig.

kursusforløb for risikomyndighederne i Letland, hvor repræsentanter for danske myndigheder delagtiggjorde de lettiske ditto i, hvorfor man overhovedet ikke ville have kvantitative kriterier. Ikke tale om! Nix.

Det var derfor uventet, at der med arbejdsrapporten få år senere pludselig blev indført kvantitative kriterier. Praksis vendte 180 grader på en tallerken, et paradigmeskift, men uden at reflektere synderligt over det. Der var vist kommet nye folk i styrelserne. Det er en god arbejdsrapport, men der er stadig behov for afklaring af mange grundlæggende problemstillinger. Eksempelvis kan begrebet sikkerhedsafstand nemt misforstås, og det har helt forskellige betydninger i forskellig dansk lovgivning.

Det kan undre, at de virksomheder, som er omfattet af bekendtgørelsen, og som ikke sjældent udtrykker varierende grader af frustration, somme tider desperation, over den, er passive og ikke søger en mere aktiv rolle. Der mangler lederskab.

Der er behov for vejledninger, og rigspolitiet skal have en ca-deau for at lave en sådan. Men man kunne nok godt have brugt lidt flere kræfter på den.

Epilog

Artiklen er skrevet som frivilligt arbejde og har ikke modtaget nogen støtte. Jeg udtaler mig som privatperson, ikke på vegne af mine arbejdsgivere, eller andre.

Frank Hedlund er risikoekspert i COWI og ekstern lektor på DTU i risk management.

E-mail:

Frank Huess Hedlund: fhhe@cowi.com

Referencer

1. Directive 2012/18/EU of the European Parliament and of the Council of 4 July 2012 on the control of major-accident hazards involving dangerous substances, amending and subsequently repealing Council Directive 96/82/EC, Off. J. Eur. Union. (2012).
2. Bekendtgørelse om kontrol med risikoen for større uheld med farlige stoffer (Risikobekendtgørelsen). BEK nr. 372 af 25/04/2016, Miljø- og Fødevareministeriet, 2016.
3. Betænkning om betydelige risici (betænkning nr. 1045), Arbejdsministeriet, 1985.
4. AT Vejledning C.0.3. Kontrol med risikoen for større uheld med farlige stoffer, Arbejdstilsynet, 2006.
5. Regeringen, Regeringens handlingsplan for terrorbekæmpelse, Statsministeriet, 2005.
6. Lot 1: Study on the applicability of existing chemical industry safety provisions to enhancing security of chemical facilities. Final report, COWI, TAUW, C&E, CBRN-instituttet (Beredskabsstyrelsen) for the European Commission Directorate-General Home Affairs, 2013.
7. Impact assessment study into possible options for amending the Seveso Directive, COWI for the European Commission Directorate-General Environment, 2010.
8. F.H. Hedlund, Do provisions to advance chemical facility safety also advance chemical facility security? - An analysis of possible synergies, in: K. Paturej, V. Rehn, P. Runn (Eds.), OPCW Int. Meet. Chem. Saf. Secur. 8-9 Novemb. 2012. Proc., Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons (OPCW), Tarnów, Poland, 2012: pp. 73-82.
9. F.H. Hedlund, Voldsom eksplosion på fyrværkerivirksomhed, Dansk Kemi. 95 (2014) 12-15.
10. R. Taylor, Afdækning af muligheder for etablering af standardværktøjer og/eller -kriterier til vurdering af sundheds- og miljørisici i forbindelse med større uheld (gasudslip) på risikovirksomheder, Rambøll for Miljøstyrelsen, 2007.
11. N.J. Duijm, Acceptkriterier i Danmark og EU, DTU for Miljøstyrelsen, 2008.
12. F.H. Hedlund, Dødsdart effektivisering. Kan markeder regulere sig selv? Atomkraftindustrien gør dette helt centrale spørgsmål inden for økonomisk videnskab ekstra væsentligt, Weekendavisen. 11. feb. (2011) Ideer p7.
13. F.H. Hedlund, Kronik: Texas' laissez faire-mentalitet giver stof til eftertanke, Ingeniøren. 14. juni (2013) 1. sek. p17.
14. J. Hackitt, Process Safety Summit II 2015 - speech by Judith Hackitt, HSE Chair, (2015). <http://www.hse.gov.uk/aboutus/speeches/transcripts/hackitt210115.htm>.



Apotekerhaven,

Dyrk dine egne medicinske planter

Kan morgenfruer bruges mod betændelse i huden? Er chili smertegivende eller smertestillende? Er katteurt et naturskabt myggemiddel? Køb bogen og få svarene og mange andre praktiske råd om, hvordan du erstatter/supplerer apotekets medicin med dine egne produkter.

Anmeldt af Michael Koefoed

Elizabeth Millard har med Apotekerhaven kombineret en beskrivelse af anvendelsen og virkningen af lægeurter, folkets egen medicin med en vejledning i dyrkning, høst af samme urter og buskes blomster, bær, blade og rødder. Julie A. Swane har på nænsom vis oversat og justeret indholdet til danske forhold.

Bogen er struktureret i seks kapitler. I to indledende kapitler vejledes generelt i processer: dyrkning, høst og forarbejdning af urter. 36 urter beskrives i kapitlerne køkkenhave, lægeurter, bær og buske samt de vilde planter.

For hver urt består opslaget af urtens navn på dansk og latin, tekst med historisk perspektiv og anvendelse af urten. Teksten suppleres med flotte farvefotos, en tjekliste i margen om nøgleoplysninger vedr. dyrkning, samt faktabokse med biokemiske

oplysninger inkl. detaljerede referencer. Disse faktabokse er nærmest skræddersyet underholdning for Dansk Kemi læsere.

At et udtræk af kamilleblomster kan helbrede næsten alle skavanker er ikke ny folkeviden, men ikke alle læsere ved, at:

- Timian-olie er mere antibakteriel end brintoverilte (hydrogenperoxyd), mere smertestillende end ibuprofen og anvendes bl.a. mod menstruationssmerter.
- Fennikel er godt for kvinders knogleskørhed og spædbørnsskolik. Chili kan anvendes udvortes, og capsaicin-indholdet dæmper smerter i led og nerver.
- Oregano kan anvendes mod hundes lopper.

Bagerst i bogen er et afsnit med nødvendigt udstyr, et stikordsregister (kaldet indholdsfortegnelse), samt en liste med urterne beskrevet i den oprindelige amerikanske udgave af bogen.

Bogen kan anbefales som introduktion til alle med interesse for dyrkning og anvendelse af plantemedicin som erstatning og supplement til medicinbranchens syntetiserede produkter. De mere nørdede læsere, der vil længere ned i biokemien henvises enten til ældre danske phamakoper, eller til to bøger på engelsk udgivet i og om Sydafrika af tre professorer i medicin, botanik og anvendelse af plantedele, og farmakologi ("peoples plants" og "medicinal plants of South Africa"), se amazon.com. Kun en del af de beskrevne planter kan findes i Danmark.

Apotekerhaven, Dyrk dine egne medicinske planter. Elizabeth Millard og Julie A. Swane, 2017. 176 sider ISBN: 978-87-406-1230-1, forlaget Turbine. Fås i boghandel. vejl. pris 227 kr. Set som plusbog.dk tilbud til 169 kr.

Michael Koefoed er civ.ing. i kemi. Han har brugt plantemedicin i mange år på ophold og rejser i Ulande.

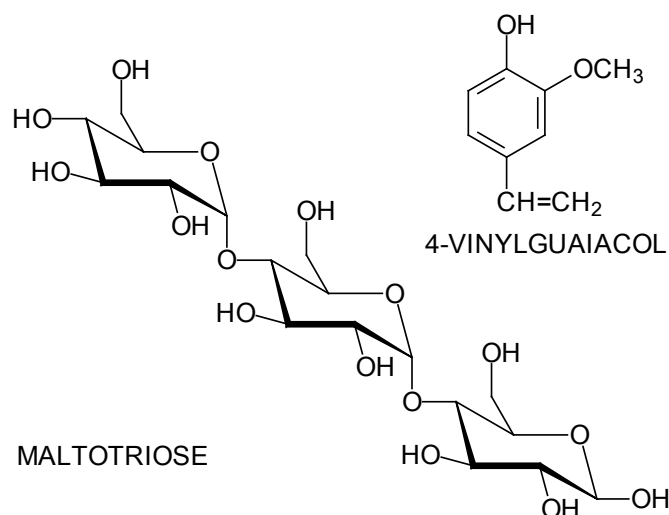


Nyt om ...

... Ølgær har vænnet sig til menneskene

Længe før mennesket fandt ud af, at mikroorganismer eksisterede, tæmmede menneskene gær til at lave øl, der var værd at drikke, mod at de så til gengæld forsynede gæren med næringsstoffer. En grundig genetisk og phenotypisk undersøgelse af 157 *Saccharomyces cerevisiae* gærtyper, der bruges i gæringsindustrien, afslører, at ølproducerende gærtyper stammer fra nogle ganske få forfædre, som hurtigt udviklede evnen til at tilfredsstille brygmestrene. En hollandsk gruppe har vist, at ølgær har gener, der i modsætning til vildgær hjælper den til at nedbryde maltotriose, der findes i ølurten. Mange typer ølgær har også udviklet evnen til at undertrykke dannelse af 4-vinylguaiacol (4-ethenyl-2-methoxyphenol), der giver en bismag til øllet.

Carl Th.



Domestication and Divergence of *Saccharomyces cerevisiae* Beer Yeasts, *Cell* 2016, 166, side 1397. DOI: 10.1016/j.cell.2016.08.020.

Geler stabiliseret af actin-myosin proteiner: Pølsefars

Af Jens Folke

I de foregående artikler i Dansk Kemi her i 2017 om disperse systemer, har vi set på olie-i-vand og vand-i-olie emulsioner (DK 2017 (1/2)), herunder brugen af stabilisatorer som stivelse (DK 2017 (3)), andre polysaccharider og gelatine (DK 2017 (4)). Den stabile gel, som fremstilles for at gøre emulgerede pølser saftige ved at binde vand i kødfarsen, er i familie med gelatine-gelen; men den er alligevel anderledes, da den er varmestabil. Gelatine er nemlig nedbrydningsproduktet fra kogning af collagen-holdigt bindevæv, f.eks. brusk, og kan smelte.

Hvorimod *emulgerede* pølser i sin basis faktisk ikke er en olie-i-vand emulsion, men er baseret på komplekse, vandopløselige proteiner, som kan udtrækkes af actin-myosin komplekset fra tværstribet muskulatur og laves en stabil, vandig gel af ved lave temperaturer fra 3°C til maks. 15°C.

Gode emulgerede pølser kræver i fremstillingen en stabil gel-dannelse, som er temperaturrestant op til ca. 75°C, der er den bedste serveringstemperatur, uanset om man griller eller varmer sine pølser. Det duer ikke, hvis gelen nedbrydes af varme og smider vandet under opvarmningen. Det er i slagtekredse og blandt professionelle pølsemagere velkendt, at en slagtevarm svinebov er blandt det bedste kød overhovedet til at danne en sådan stabil gel. Det skyldes, at kødet ikke har gennemgået *rigor mortis*, altså dødsstivhed. Før *rigor mortis* er der lettilgængelige phosphater i musklerne relateret til ATP↔ADP omsætningen. Actin↔myosin-komplekset er ikke stivnet, så de 1-2% salt, som tilsættes småkødet før hakning, trækker phosphaterne og de vandopløselige proteiner ud af farsen og danner den attraktive, stabile gel, når krydderier og isvand tilsættes pøsefarsen. I kender det fra mormors frikadeller, hvor farsen *røres sej* med salt før mel og æg tilsættes.

Det står ikke i litteraturen, men det er min egen spekulation, om ikke også glykogen spiller en rolle i denne sammenhæng, da denne netop er intakt i det varme slagtekød, hvis slagtingen er foregået ustresset og dyrevenligt. Det er jo glykogenet, som er energikilden i modningen af kødet i dagene og ugerne efter *rigor mortis*. Min spekulation styrkes af, at den bindefars, som fremstilles for at binde farsen, når kødet ikke længere er helt friskt, ofte tilsættes kartoffelmel for at stabilisere pøsefarsen. Som jeg tidligere har skrevet (DK 2015(1/2)), er de gode, hjemmelavede pølser som regel en blanding af en næsten mayonnaiseagtig bindefars og en mere grofthakket pøsefars i forholdet ca. 1:2. Hvis temperaturen stiger over 10-15°C under fremstillingen af pøsefarsen, skiller den og kan ikke reddes. Det skyldes, at den mekaniske bearbejdning kan få fedtet til at smelte, hvilket forstyrrer dannelsen af vandgelen. Man kan stadig få frikadellefars ud af processen ved at tilsætte æg og mel, hvor stivelsen binder det smeltede fedt, men det bliver ikke til velmagende pølser, selv om man stopper dem i et pøsekind eller en tarm. Derfor bruges isvand ved fremstillingen af pøsefarsen.

Evnen til at danne gel er specielt stor i grisekød, men kalv, okse, lam, får, rejer, hummer, fisk, blod m.m. kan alle danne geler til pøsefremstilling. Derimod kan organkød normalt kun anvendes som proteinfyld i pølserne - med lever som en mulig undtagelse. Gelatine-holdige fonde hjælper ikke på

229

Wienerpølser.

Fortegnelse over Raamaterialer til Fremstilling af Wienerpølser.

Blandingsforhold:		Eksempler:		
Til Fremstilling af 5-6 kg Pølser:		15-18 kg	25-30 kg	7½-9 kg
1 kg	Kalve- eller Oksepillekød (ansaltet)	3 kg	5 kg	1½ kg
1¾ »	Flæskpillekød, magert (ansaltet)	5¼ »	8¾ »	2¾ »
750 g	Fedtafpuds (fersk)	2¼ »	3¾ »	1¼ »
750 »	røgede, fede Snitter eller andet røget Fedt.....	2¼ »	3¾ »	1¼ »
Ialt ..		12¾ kg	21¼ kg	6½ kg

5 »	Krydderiblanding pr. kg			
	Kød og Fedt	64 g	107 g	32 g
4 »	st. Melis pr. kg Kød og Fedt	48 »	86 »	24 »
	Sød Tørmælk	1275 »	2100 »	638 »
	Skinkelage			

Hertil ca. 1½ Bd. Lammearme à 100 Yards
Hertil ca. 2 Bd. Lammearme à 100 Yards
Hertil ca. ¾ Bd. Lammearme à 100 Yards

Wienerpøsefarskrydderiblanding:

1 Del st. Paprika	f. Eks. 10 g
1½ » » Kardemomme	» 15 »
7½ » » Muskatnød	» 75 »
10 » » Peber	» 100 »
200 g	

Farsen stoppes i Lammearme, der er 24-26 mm brede.

Til Røgning anvendes tørt Bøgesmuld og Bøgebrænde samt knust Enebær.

Røgovnen maa helst være indrettet med 2 indlagte Gasrør.

processen, da det smelter ved opvarmning og kan få pølserne til at skille. Det kan anbefales at bruge grøntsagsbouillon med tørrede krydderurter i stedet for kalvefond eller fond fra kogning af flæskesvær.

Fedt i pølser er et emneområde for sig. Gode pølser har ofte en del fedt (20-30%), så de er meget næringsrige. Dette bør man tænke på, når man ser på tilbehør til pølserne (se DK 2016 (6/7) for nordisk køkkeninspiration til tilbehør). Der er forskel på det rene fedt, altså triglyceriderne, som findes intramuskulært, f.eks. i cellemembraner, og så egentligt fedtvæv, f.eks. spæk, som kan smeltes til fedt og fedtegrever. Den første type fedt udgør den største fare for geldannelsen, da det kan smelte, hvis temperaturen stiger lokalt pga. den mekaniske bearbejdning. Derfor skal temperaturen holdes nede i geldannelsesprocessen. Industrielt kan det varmebestandige natrium kaseinat udvundet fra mælk tilsættes til at lave en egentlig emulgering af fedtet og dermed gøre det muligt at forøge fedtindholdet i pølserne ud over det sundhedsmæssigt forsvarlige.

Så hvad gør en stakkels amatør, der ikke har adgang til slagtevarmt forkød?

1. Tilsæt de 1-2% salt til det udskårne småkød og lad det hvile i køleskab (< 5°C) 4-48 timer, gerne vakuumpakket, hvis man har apparaturet til det. Herved udtrækkes de geldannende proteiner fra muskelfævet¹.
2. Skalfrys kødet før det kommes i kødhakkeren; tilsæt krydderier til farsen, uden at den kører varm. Sæt evt. farsen tilbage i køleskab eller fryser en tid, før der røres isvand i farsen.
3. Brug gerne nakke- og rygspæk som fedtkilde; det har et højere smeltepunkt, end andre fedttyper på grisen. Hak det separat på 4-6 mm og i små batch, så det ikke smelter.
4. Lav en bindefars til støtte for processen, når man hverken har varmt slagtekød eller industrielle tilsætningsstoffer til rådighed (se DK 2015 1/2).

Uden at forstå den biokemiske baggrund for geldannelsen, er ovennævnte lærdom videregivet slagtere i generationer. Derfor kommer her en opskrift på Wienerpølser fra Slagtebogen anno 1942, som jeg afprøvede på et pølsekursus, jeg lavede for Zentropa omkring jul. De har et meget kompetent køkkenfesthold med Peter Ålbæk i spidsen.

E-mail:

Jens Folke: jens.folke@lean6sigma.eu

Kilder

Slagtebogen. Teknologisk Instituts Forlag, 1942.

Bindefars: <https://klardigselv.wordpress.com/2016/08/24/bindefars-paa-2-maader/>

Anders Pølsemaker, Selvforsyningsskolen – personlig kommunikation.

Meyers Pølsemakeri. Meyers Madhus. Lindhardt & Ringhof. 2016.

Wienerpølser i lammetarm

250 g kalvesmåkød (bov)

400 g svinesmåkød (bov)

175 g rygspæk (her kan godt spares lidt på kalorierne i moderne tid, da bovkoedet også indeholder fedt; brug evt. en mindre mængde koldrøget rygspæk og undlad bacon)

175 g røget bacon (jeg bruger mit eget tørsaltede og røgede bacon og justerer saltmængden tilsvarende)

Ca. 3 dl kalvebouillon (eller vand)

15 g salt (evt. 1/3 nitratsalt for farve)

½ g paprika

1½ g kardemomme

3¼ g muskatnød

5 g sort peber

4 g muscovadosukker

3 dl suppe, grøntsagsbouillon uden for meget gelatine (iskold)

Bindemiddel tilsættes til bindefarsen, f.eks. kartoffelmel, mel, rasp, havregryn, udblødt franskbrød

Ca. 4 meter lammetarm

Røgsmuld

Kogende vand

Fremgangsmåde:

1. Bacon hakkes, mens det er skalfrosset (3 mm skive).
2. Kødtyperne skæres i terninger og ansaltes i køleskab i 1-2 døgn iblandet det hakkede bacon.
3. Kød og kødhakker skal være meget kolde; kalv og flæsk hakkes hver for sig (3 mm skive).
4. Kalvekødet udrøres med halvdelen af svinekødet og lidt suppe til en ikke for tynd fars.
5. Fedtet hakkes sammen med bacon (5 mm skive, så 3 mm).
6. Bindefars laves af halvdelen af svinekødet (se DK 2015 (1/2)).
7. Resten af de 3 dl suppe bruges til dette formål.
8. Fedtet blandes i bindefarsen, som derefter iblandes farsen med kalve- og svinekødet.
9. Lammetarme udvandes i en halv time.
10. Pølserne afdrejes i 10-15 cm stykker.
11. Luftbobler prikkes; pølserne bør så hænges på stokke i otte timer (næste dag?).
12. Herefter kan pølserne varmrøges, til de er smukt lysebrune - ca. 20 min. (pas på de ikke springer); men det er ikke nødvendigt med røget spæk/bacon.
13. Pølserne kommes nu i kogende vand, som derefter afkøles til 75-80°C og står i ca. 10 min. og serveres som varme eller grillede pølser.
14. Ellers afkøles hurtigt og sættes i køleskab/fryser.
15. Opvarmes på dagen inden servering ved 75°C.

Tips

- Pølserne efter denne gamle opskrift er ikke overkrydrede; tilsæt evt. mere af krydderierne.
- Tilsæt lidt rom, der er trukket på enebær i en måneds tid for mere pikant smag.

Leverandørregister

Analyse

A

Automatisk steril prøveudtagning



Svanholm.com
Nordisk Pharma og Analyzer Center
Tlf. 70 26 58 11 - Fax 69 80 31 33
mail@svanholm.com
www.svanholm.com
Automatisk steril udtag og håndtering af prøver fra Upstream og Downstream

E

Elektrospinning og elektrospinning



Svanholm.com
Nordisk Pharma og Analyzer Center
Tlf. 70 26 58 11 - Fax 69 80 31 33
mail@svanholm.com
www.svanholm.com
Coating af partikler/dråber som fibre og Nano/mikro-partikler. Fra Lab til GMP

F

Fermentering og cellekultur-udstyr



Svanholm.com
Nordisk Pharma og Analyzer Center
Tlf. 70 26 58 11 - Fax 69 80 31 33
mail@svanholm.com
www.svanholm.com
Nordens største sensor og analyzer udvalg til lab, pilot og proces

FTIR-udstyr



Bruker Optics Scandinavia AB
Vallgatan 5
SE-17067 Solna
Tlf. +46 8 655 25 10 -
Fax +46 8 655 25 99
www.bruker.com

L

Laboratoriearmaturer

Broen LAB A/S
Drejervænget 2
5610 Assens
Tlf. 63 76 63 76
lab@broen-lab.com
www.broen-lab.com

M

Massespektrometre, proces



Svanholm.com
Nordisk Pharma og Analyzer Center
Tlf. 70 26 58 11 - Fax 69 80 31 33
mail@svanholm.com
www.svanholm.com
Svanholm.com er distributør af Thermo Scientific proces MS

Massespektrometre



Svanholm.com
Nordisk Pharma og Analyzer Center
Tlf. 70 26 58 11 - Fax 69 80 31 33
mail@svanholm.com
www.svanholm.com
MS til fermenterings-offgas samt styring af farmaceutisk vakuummørring

N

NIR-analyse/-udstyr



Bruker Optics Scandinavia AB
Vallgatan 5
SE-17067 Solna
Tlf. +46 8 655 25 10 -
Fax +46 8 655 25 99
www.bruker.com



Svanholm.com
Nordisk Pharma og Analyzer Center
Tlf. 70 26 58 11 - Fax 69 80 31 33
mail@svanholm.com
www.svanholm.com
Online proces NIR til R&D og GMP i pulvertørring og pulver-opblanding

O

Opvaskemaskiner



KEN HYGIENE SYSTEMS A/S
Bøgebjergvej 60, Brobyværk
5672 Broby
Tlf. 62 63 10 91
www.ken.dk

R

RAMAN-udstyr



Svanholm.com
Nordisk Pharma og Analyzer Center
Tlf. 70 26 58 11 - Fax 69 80 31 33
mail@svanholm.com
www.svanholm.com
Håndholdte (ID) + transportable Raman spektrometre med høj nøjagtighed

Sterile CO₂-inkubator arbejdsbænke



Svanholm.com
Nordisk Pharma og Analyzer Center
Tlf. 70 26 58 11 - Fax 69 80 31 33
mail@svanholm.com
www.svanholm.com
Baker Ruskinn hypoxia Workbench kombinerer LAF og CO₂-inkubator

Produktion

E

Etikettering

LSS Etikettering A/S
Normansvej 8
8920 Randers NV
Tlf. 70 20 25 00 - Fax 70 20 10 44
info@lss-dk.com
www.lss-dk.com

Ø

Øjenskyl



Help Care Company ApS
Industrivej 19
8881 Thorsø
Tlf. 22 20 30 64
info@helpcarecompany.dk
www.helpcarecompany.com

Service & miljø

P

Patenter



Chas. Hude A/S
H.C. Andersens Boulevard 33
1780 København V
Tlf. 33 19 34 00 - Fax 33 19 35 00
chashude@chashude.com
www.chashude.dk

Software

A

Arbejdspladsbrugs- anvisninger og etiketter



CHYMEIA ApS

Universitetsparken 2
4000 Roskilde
Tlf. 72 40 16 22
info@chymeia.dk
www.chymeia.dk
APB/SDS software med beregning af
CLP klassificeringer



KEMISK FORENING

Universitetsparken 5
DK-2100 København Ø

www.chemsoc.dk

The Danish Chemical Society
Founded 1879

Mødekalender (6/7) 2017

- 15.6. 2017** Kemisk Forening, Årsmøde 2017, Syddansk Universitet, Odense. Se dk 2017 (5).
- 2.7.-5.7. 2017** Kemisk Forening, Sektionen for Uorganisk Kemi, 4th EuCheMS Inorganic Chemistry Conference, Københavns Universitet Southern Campus, Karen Blixenvej 3.

Nyt om ...

... Toksiner fra blågrønne alger

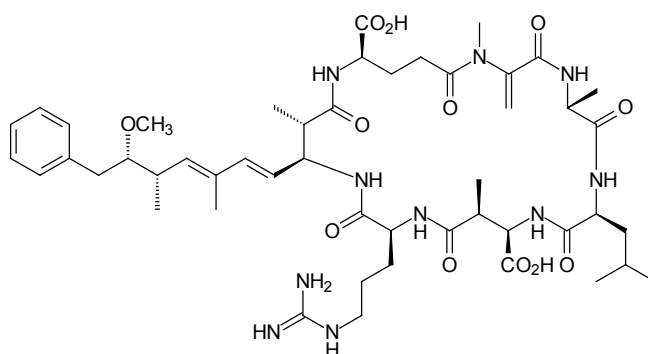
I varme somre sker der ofte en opblomstring af blågrønne alger, også kaldet cyanobakterier i vandet. Der findes en lang række af disse forskellige alger, der producerer et væld af forskellige toksiner.

Denne store opblomstring er afhængig af et passende højt indhold af fosfor og nitrogen i vandet, hvilket betyder, at en begrænsning af udledningen af disse to grundstoffer kan nedsætte algeforureningen. Nedenfor er vist eksempler på fire forskellige toksiner fra cyanobakterier. Microcystin forårsager

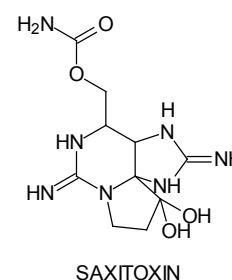
blødninger i leveren, som hurtigt fører til døden. Saxitoxin er en natriumkanalblokker, som lammer åndedrættet; den er så giftig, at den har været overvejet til biologisk krigsførelse. Anatoxin-a er et neurotoksin, der også lammer åndedrættet. Cylindrospermopsin angriber lever og nyrer. De fører alle i passende høje doser til døden.

Carl Th.

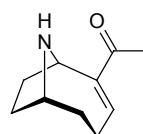
Taming toxic algal blooms, *Chemical & Engineering News*, 94 (12) March 21, 2016, side 21.



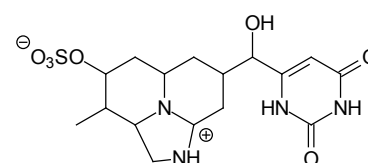
MICROCYSTIN - LR



SAXITOXIN



ANATOXIN-a



CYLINDROSPERMOPSIN

**Har du spørgsmål ang.
leverandørregistret,
så kontakt venligst
Heidi Thode på enten
tlf. 43 24 26 62 eller på
ht@techmedia.dk**

**Du kan også finde mere
information på vores
hjemmeside:
www.techmedia.dk**

**Du kan også finde
dansk kemi her:**

www.kemifokus.dk

**www.facebook.com/
UNG.KEMI**

Skal vi være PARTNERE?

Bliv FOKUSpartner på
Dansk Kemi's digitale medie

KEMIFOKUS

- Udgiv ubegrænset antal
nyheder og pressemeddelelser...
- Få dit budskab på hjemmesiden
og i nyhedsbrevet til branchen...
- inkl. firmanavn og logo!