

Enzymatisk forflydning af biomasse ved højt tørstof

Muligheden for effektivt at omsætte biomasse til fermenterbart sukker ved højt tørstof er vigtig for fremtidig bioteknologisk udnyttelse af biomasse

Af Henning Jørgensen og Claus Felby, Skov & Landskab, KVL, Jan Larsen, Elsam Engineering A/S

Biomasse i form af restprodukter fra skov og landbrug (halm, træflis, etc.) samt husholdningsaffald er rig på kulhydrat i form af cellulose og hemicellulose. Nedbrydning af disse til deres respektive monomerer og efterfølgende fermentering åbner mulighed for at udnytte biomasse som en billig og vedvarende kulstofkilde til fremstillingen af en lang række kemiske produkter. Som omtalt i foregående nummer af Dansk Kemi deltager KVL sammen med Elsam i et større europæisk projekt omkring udnyttelsen af halm til fremstilling af ethanol, kaldet IBUS-projektet [1]. Men, der er uanede muligheder for fremstilling af fermenteringsprodukter. Et andet oplagt produkt er mælkesyre, der kan anvendes til produktionen af polylaktat, som er ved at vinde stor udbredelse som biologisk nedbrydelig plast.

Opbygningen af lignocellulose

Biomasse består i hovedtræk af cellulose, hemicellulose og lignin, hvorfor det også under et kaldes lignocellulose. Cellulose er en lineær homogen polymer af op til 15.000 glucose-enheder bundet sammen med β -1,4-glucosidbindinger.

Hemicellulose er derimod en heterogen forgrenet polymer med en længde på op til 200 enheder, som kan bestå af f.eks. arabinose, xylose, galactose, mannose og glucose, samt yderligere være modificeret via methylering eller acetylering. Lignin udgør et netværk dannet ved polymerisering af monomererne *p*-coumarylalkohol, coniferylalkohol og sinapylalkohol. Det komplekse netværk af lignin omkapsler og er med til at binde cellulose og hemicellulose sammen. Herved forstærkes strukturen af plantecellevæggen og den beskyttes mod nedbrydning i naturen, f.eks. svampe- eller insektangreb.

Generelt indeholder lignocellulose ca. 35-50% cellulose, 20-30% hemicellulose og 15-30% lignin. Der er dog stor forskel på de forskellige planters indhold, ligesom sammensætningen af hemicellulose og lignin er meget artsbestemt. Generelt indeholder træ mere lignin og mindre hemicellulose end halm, og hvor hemicellulose i halm hovedsagelig består

af arabinose og xylose, indeholder den i nåletræ mest mannose og kun lidt xylose.

Enzymatisk hydrolyse af lignocellulose

Udnyttelse af lignocellulose som substrat for diverse fermenteringsprocesser forudsætter en forudgående nedbrydning af cellulose og

hemicellulose til deres respektive monomerer. Som omtalt i sidste nummer af Dansk Kemi er det første trin i denne proces en termisk behandling af lignocellulosen, hvorved hemicellulose delvis opløses og cellulosen gøres mere tilgængelig for enzymerne [1]. Enzymerne til nedbrydning af lignocellulose kan inddeles i to hovedgrupper – cellulaser og hemicellulaser. Cellulaser kan endvidere inddeles i endoglucanaser og exoglucanaser. Endoglucanaserne spalter tilfældige β -1,4-D-glucosidbindinger inde i cellulosekæden, hvorimod exoglucanaser, også kaldet cellobiohydrolaser, fraspalter cellobioseenheder fra enderne af cellulosekæden. Det sidste trin i nedbrydningen af cellulose er spaltningen af cellobiose til to glucosemolekyler med enzymet β -glucosidase. Hemicelluloses mere heterogene struktur betyder, at der kræves et større antal forskellige enzymer for at nedbryde det fuldstændigt. Som for cellulaser findes endo- og exoenzymer, f.eks. endoxylanase, endomannanase, β -xylosidase og β -mannosidase. Endvidere findes enzymer til at fjerne sidegrupper, f.eks. α -L-arabinofuranosidase og acetylxylanesterase [2].

Processering af lignocellulose ved højt tørstof

I forbindelse med IBUS-projektet har muligheden for at gennemføre processen ved højt tørstofindhold (over 20% tørstof (w/w)) været en vigtig parameter. Det skyldes bl.a., at man her ved minimerer vandforbruget og udledningen af spildevand. Mindre vand giver også lavere investeringsomkostninger pga. mindre udstyr, tanke mv. Endelig er en meget vigtig faktor, at det højere tørstofindhold reducerer energiforbrug under processen, f.eks. skal en mindre mængde materiale opvarmes til omkring 200°C i forbehandlingen. Men det højere tørstof giver også en mere koncentreret sukkerstrøm og endelig højere ethanolconcentration i fermenteringsvæsken. Det giver et betydeligt mindre energiforbrug i forbindelse med destilleringen. Ved en ethanolconcentration på under 4% (w/w) stiger energiforbruget til destilleringen betragteligt [3], hvorfor en ethanolconcentration over 4% er ønskelig. Biomasse indeholder ca. 75% kulhydrat, heraf udgøres omkring 30% af pentoser (xylose og arabinose), som på nuværende tidspunkt ikke kan omsættes til ethanol med nær samme udbytte som glucose (teoretisk 0,51 g ethanol pr. g glucose). Teoretisk skal tørstofindholdet derfor være omkring 10% for at resultere i en fermenteringsvæske med 4% ethanol. I praksis skal man ikke forvente at opnå mere end 80% af det teoretisk mulige udbytte af hele processen. Sammenholdt med det lavere udbytte af ethanol fra pentoserne bliver det derfor interessant at kunne operere processen ved over 20% tørstof. Set ift. at ud-

4916 3388

CLAUS DAMM

Udstyr til:

- ★ steril produktion
- ★ bioteknologi
- ★ forskning

www.clausdamm.dk



Figur 1. Hvedehalm før og efter forbehandling i IBUS-forbehandlingsanlægget [1]. Efter forbehandlingen er meget af den oprindelige struktur af halmen stadig intakt. Tørstofindholdet i den forbehandlede halm er omkring 30%.

nytte sukkerstrømmen fra hydrolysen til andre fermenteringsformål er det også interessant at kunne producere en koncentreret sukkeropløsning med over 10% sukker.

Traditionelt er forsøg med enzymatisk hydrolyse i laboratorieskala blevet udført i rystekolber og i pilotskala i alm. omrørte reaktorer med et tørstofindhold på 2-15%. Pga. strukturen af lignocellulose har det ikke været muligt effektivt at omrøre/mikse materiale med over 15% tørstof. Problemet er, at lignocellulose er i stand til at opsuge store mængder vand. Som eksempel indeholder frisk træ kun omkring 50% tørstof, og halm er i stand til at absorbere vand svarende til et tørstofindhold på under 30%. Selv ved et lavt tørstofindhold vil materialet inden den enzymatiske hydrolyse derfor være meget viskøst. I IBUS-processen er strukturen af halmen efter forbehandling endvidere stadig delvis bevaret (figur 1). Omrøring/miksning af dette materiale, som i starten kan betragtes som meget fugtig halm, er derfor ikke muligt i de systemer, som man traditionelt har anvendt.

Reaktor til miksning af lignocellulose ved højt tørstof

For at kunne behandle materialet fra IBUS-processen er der derfor blevet udviklet en speciel reaktor, der er i stand til 1) at håndtere store/lange partikler (snittet halm), 2) at håndtere materiale med højt tørstofindhold. Reaktoren er forsynet med fem separate kamre omrørt vha. en horisontalt placeret aksel forsynet med tre blade i hvert kammer (figur 2). Omrøringshastigheden kan styres mellem 3,3 og 16 rpm. For at sikre en optimal temperatur for enzymerne (omkring 50°C) er reaktoren forsynet med en varmekappe, som tillader temperaturkontrol op til 80°C.

I princippet er reaktoren ikke designet til anaerobe gæringsforsøg, da den ikke er helt tæt, og prøveudtagning medfører introduktion af luft. Alligevel er der blevet udført gæringsforsøg i reaktoren for at teste, om halmen kunne omsættes af gær til ethanol. Som omtalt i foregående artikel om IBUS [1], så medfører forbehandlingen dannelse af en række nedbrydningsprodukter, der er toksiske for gæren. Da det høje tørstofindhold samtidig kan give anledning til osmotisk stress af gæren, var det interessant at teste, om det var muligt for gæren at gro og gære i et materiale med et tørstofindhold på over 20%.

Forflydning, forsukring og gæring

Ved anvendelse af denne reaktor har det været muligt at udføre forsøg med forbehandlede hvedehalm med helt op til 35% tørstof. Som det fremgår af figur 1, vil materialet fra start have en struktur som fugtig halm. Men ret hurtigt efter tilsæt-

ning af enzymer begynder strukturen at forsvinde, og materialet får karakter af en tyk homogen grød/pasta (figur 3a). Over tid falder viskositeten yderligere, og materialet får konsistens af en mere eller mindre tyktflydende væske (figur 3b og 3c) – dette er naturligvis afhængig af tørstofindholdet. Hastigheden for forflydningen (overgang fra et fast mate-



Figur 2. Reaktor til forflydning og forsukring af forbehandlede lignocellulose ved højt tørstofindhold. De fem separate kamre giver mulighed for udførelse af fem parallelle forsøg.



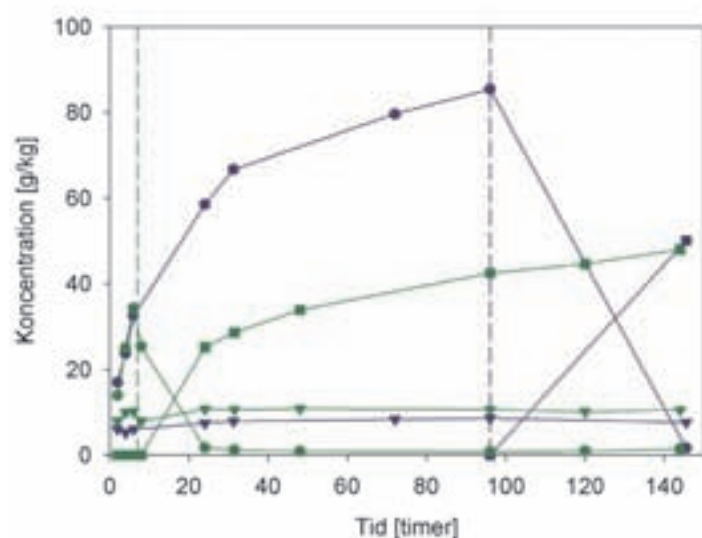
Figur 3. Forflydningen af forbehandlet halm i reaktoren. Billederne viser materialet efter hhv. A) 5 og B+C) 96 timer.

riale til en flydende masse) er afhængig af flere faktorer. Mængden af tilsat enzym er meget afgørende, men forbehandlingen er også af stor betydning. Rå (ubehandlet) halm omsættes kun meget langsomt. Under normale forhold (tørstof på 30% og en enzymdoserings på 7 filterpapirenheder pr. g tørstof og en omrøringshastighed på 7 rpm) ses en tydelig ændring i materialets karakter allerede efter en time og efter 2-4 timer haves en homogen tyktflydende masse. Efter 5-10 timer er det normalt muligt at pumpe materialet over i en traditionel fermenteringstank, hvor sukkeret kan forgæres.

Samtidig med forflydningen, hvor strukturen af materialet nedbrydes, hydrolyserer enzymerne også cellulose og hemicellulose til frit sukker (forsukring). Enzymerne og specielt cellulaserne inhiberes dog af den stigende koncentration af sukker under forsukringen, hvorfor hastigheden af denne falder. Da sukkeret i sidste ende skal gæres til ethanol, har

man procesmæssigt forsøgt at overkomme problemet med produktinhibering ved samtidig med forsukringen at gære sukkeret til ethanol. Man skelner derfor mellem »separat forsukring og gæring«, hvor man producerer mest muligt sukker inden gæringen startes, eller »simultan forsukring og gæring«, hvor man forgærer sukkeret samtidig med, at det frigives fra cellulose og hemicellulose. En ulempe ved den sidste metode er, at enzymerne virker bedst ved 50°C, hvori gæringen helst skal ske ved 32-35°C. Der er derfor fordele og ulemper ved begge metoder.

Ved forsøg med højt tørstofindhold er problemet med produktinhibering endnu mere udtalt. Der har derfor været udført forsøg med begge metoder. På figur 4 ses koncentrationen af glucose, xylose og ethanol, når processen køres som hhv. separat forsukring og gæring (blå kurver) og simultan forsukring og gæring (grønne kurver) (værdier opgivet i g pr. kg materiale, da det i starten ikke giver mening at tale om volumen). Ved den separate metode blev halmen først forsukret i 96 timer, hvorefter temperaturen blev sænket og gæren tilsat. Ved den simultane metode blev gæren tilsat efter kun 8 timer. På trods af en høj glucosekoncentration på over 80 g/kg ved den separate forsukring og gæring opnås der med begge metoder næsten den samme ethanolkoncentration. Alm. bagegær (*Saccharomyces cerevisiae*) er ikke i stand til at forgære xylose til ethanol, hvorfor xylosekoncentrationen forbliver næsten uændret efter tilsætningen af gær.



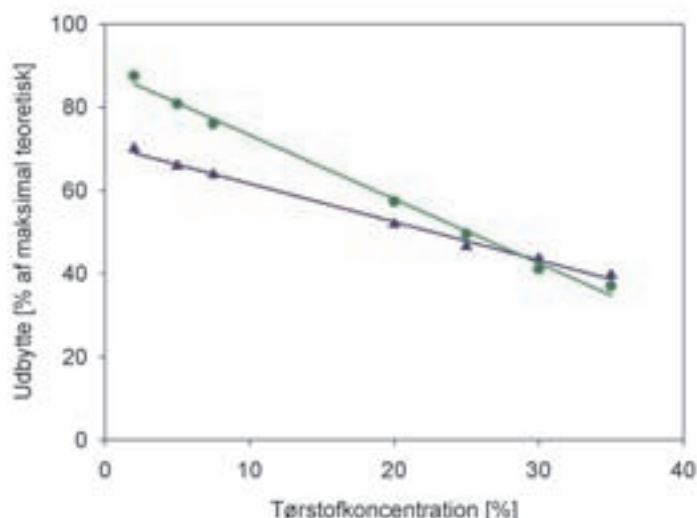
Figur 4. Koncentration af glucose (●), xylose (▲) og ethanol (■) under forflydning, forsukring og gæring af forbehandlet hvedehalm med 35% (start) tørstofindhold. Blå viser forløbet, når processen udføres som en separat hydrolyse og gæring, mens grøn viser forløbet under en simultan forsukring og gæring.

Effekt af tørstof på udbytte af sukker

Som det ses af figur 4, er det muligt at opnå ethanolkoncentrationer på næsten 5%, hvilket er over grænsen for at gøre destillationen rentabel. Dette blev dog opnået med 35% tørstof. Gennemførelse af en række forsøg med tørstofkoncentrationer fra 2 til 35% viser, at forsukringen tydeligvis bliver hæmmet ved stigende grad af tørstof (figur 5). Hvor det i en meget tynd opløsning er muligt på 96 timer at omdanne 88% af cellulosen til glucose, er udbyttet kun 37% ved 35% tørstof. En del af forklaringen er den stigende grad af produktinhibering, og at materialet muligvis også indeholder andre stoffer, f.eks. phenoliske forbindelser dannet under forbehandlingen, som kan hæmme enzymerne. Koncentrationen af disse stiger også

med det stigende tørstofindhold. Endelig er det uklart, hvordan tilstedeværelse af vand påvirker enzymerne.

Gennemførelse af det tilsvarende forsøg som simultan forsykning og gæring giver et tilsvarende billede – det endelige udbytte af ethanol falder som funktion af stigende tørstofindhold. Hvor produktinhiberingen af enzymerne mindskes, tyder resultaterne på, at gæren stresses mere, når tørstofindholdet øges. Glucosen omsættes derfor til ethanol med et lavere



Figur 5. Udbytte af glucose (●) og xylose (■) efter 96 timers forflydning og forsykning ved forskellige grader af tørstofindhold.

udbytte. Igen skyldes det en kombination af stigende koncentration af inhibitorer samt det højere osmotiske stress af gæren. Endelig har test vist, at enzymerne også til en vis grad inhiberes af ethanol.

Effektiv omsætning ved højt tørstof

Hidtil har det ikke været muligt at udføre forsøg med enzymatisk forflydning og forsykning ved så høje koncentrationer af tørstof. De enzymblandinger, der er kommercielt tilgængelige, er derfor ikke optimeret til disse forhold. Der sker dog en løbende udvikling af nye og bedre enzymer til omsætningen af lignocellulose. På KVL arbejdes der nu på at afklare hvilke faktorer, der påvirker enzymernes aktivitet, når tørstofindholdet øges.

Med muligheden for at studere aktiviteten af enzymerne ved høje tørstofkoncentrationer åbnes der mulighed for at få ny indsigt i enzymernes virkemåde. Det må derfor inden for den nærmeste fremtid anses for muligt at kunne omsætte lignocellulose ved højt tørstof med samme effektivitet, som det på nuværende tidspunkt er muligt ved lavere tørstofkoncentrationer.

E-mail-adresse
Henning Jørgensen: hnj@kv1.dk

Referencer:

1. Jørgensen, H. et al. (2006) Fra halm og affald til morgendagens brændstof til biler. Dansk Kemi 87 (2), 23-26.
2. Sørensen, H.R. et al. (2005) Enzymatisk hydrolyse af hemicellulose. Dansk Kemi 86 (3), 26-29.
3. Galbe, M., Zacchi, G. (2002) A review of the production of ethanol from softwood. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59, 618-628.

I n v i t a t i o n

Seminar om Vakuum Destillation

Med fokus på biodiesel, voks i bitumen, fedtsyre-koncentrater, ekstraktion af aroma-stoffer, molekylær destillation, fjernelse af miljøgifte mm.

UIC GmbH er den førende leverandør af anlæg til skånsom destillation under vakuum og arrangerer nu 2 seminarer:

- 25. april 2006 på DTU i Lyngby.
- 27. april 2006 i Gøteborg.

Her får du en grundig indføring i principperne for vakuum destillation, de typiske applikationer og de favorable økonomiske aspekter samt en gennemgang af UIC's anlæg fra lab til produktion.

Mere information på www.dax-consult.dk

For yderligere oplysninger kontakt:

- Jens Peter Graverholt, Dax Consult ApS
- Telefon: +45 2045 2859
- E-mail: jpg@dax-consult.dk

UIC GmbH

Dax Consult



chemometec

Chemometec A/S
Phone: +45 4813 1020
Fax: +45 4813 1021
www.chemometec.com

- Analysis in 30 sec.
- High precision
- Easy to use
- Calibration free
- Maintenance free
- Portable

Technology that counts