

Fermentering af sukkerstoffer fra lignocellulose (træstof) til ethanol (sprit) og andre værdifulde produkter

For at få en økonomisk rentabel proces baseret på lignocellulose er det vigtigt, at både glucose og hemicellulose omdannes til ethanol. *Mucor indicus* har stort potentiale som mikroorganisme i denne produktion

Af Mette Hedegaard Thomsen og Jasper Neergaard Jacobsen, Afdelingen for Biosystemer, Forskningscenter Riso

Bioethanol (sprit) er det flydende biobrændstof, der produceres mest af i verden. Biobrændstoffer er flydende eller gasformige brændstoffer (bioethanol, biogas, biodiesel, planteolie eller biobrint) til transportsektoren fremstillet især ved fermentering.

Biobrændstof er en vedvarende energibærer, da energikilden er solenergi lagret i plante-biomasse i form af kemisk energi, især sukker, hvor kulstoffet er fikseret fra luftens kuldioxid ved fotosyntese. Det resulterer i, at anvendelse af biobrændstoffer, i modsætning til olie, kul og naturgas, ikke giver en nettoforøgelse af atmosfærens indhold af kuldioxid. Kulstoffet/sukkeret i biomassen kan omdannes af mikroorganismer til energi og nyttige fermenteringsprodukter såsom ethanol.

Lignocellulosematerialer (træstof), der udgør en stor bestanddel af restprodukter (halm, roetop, husdyrgødning, frugt og grønsagsfibre, savsmuld og andet træaffald), produkter (afgrøder som korn, roer, kartofler, raps, kløvergræs) og biprodukter (agroindustrielt affald, husholdningsaffald, slam) fra landbrugsindustrien og den almindelige husholdning, repræsenterer en stor ressource som råmateriale i produktionen af fremtidens energikilder, herunder bioethanol. Lignocellulose består af: Cellulose (35-40%), hemicellulose (25-35%), lignin (3-30%), ikke-cellevægsmateriale (NCWM) (10-20%) og aske (1-10%).

En forbehandlingsprocedure for lignocellulose er nødvendig for at kunne omsætte det ved fermentering. Forbehandlingen består i at opvarme biomassen til høje temperaturer (170-210°C) i en vandig opløsning, evt. med tilsætning af katalysatorer såsom ilt, syre (H_2SO_4 , SO_2) og/eller base (Na_2CO_3 , NH_3) [1], [2], hvorved lignocellulosestrukturen åbnes, og polysacchariderne (cellulose og hemicellulose) spaltes (hydrolyseres) til simple sukkerer ved tilsætning af de rette enzymer. Cellulosen bliver til glucose, der er en 6-kulstof sukker (C-6), og hemicellulose bliver til pentoser, hovedsageligt xylose, der er 5-kulstof sukker (C-5). Forbehandlingen er beskrevet i det forrige nummer af Dansk Kemi, og den enzymatiske hydrolyse af sukkerne er uddybet i artiklen: »Enzymatisk forflydning af biomasse ved højt tørstof« på side 28.

Ethanolfermentering med bagergær

Almindeligt bagergær (*Saccharomyces cerevisiae*) er i dag den mest benyttede mikroorganisme til fremstilling af bioethanol. Den bruges både til produktion af alkohol (øl, vin og destilleret alkohol) samt til industriel ethanol og brændselsethanol.

Gær er den mest benyttede industrielle mikroorganisme i

verden, og i 1990 var produktionen af gær på 82.000 tons [3]. Gær er en meget robust mikroorganisme, der generelt klarer sig godt i konkurrence med andre mikroorganismer og i komplekse fermenteringsmedier. Når lignocellulose (eksempelvis halm) opvarmes til de meget høje temperaturer ved forbehandlingen, sker der frigivelse af eddikesyre fra hemicellulosen og en nedbrydning af nogle af sukkerstofferne til organiske syrer og furaner (furfural og hydroxymethyl furfural (HMF)). Derudover nedbrydes en del af ligninet, der er en kompleks aromatisk polymer, til phenoler. Disse stoffer er giftige for mikroorganismer, men gæren kan tåle dem til en vis grad og er endda i stand til at fjerne eddikesyre og furan fra fermenteringsvæsken. Det giver typisk en længere lagfase, hvor der ikke produceres ethanol. Gær kan dyrkes i medier med høje sukkerkoncentrationer, og det har en høj tolerance for sit eget fermenteringsprodukt – ethanolen. Det betyder, at der kan opnås et højt ethanoludbytte ved fermentering med gær i sammenligning med mange andre ethanolproducerende mikroorganismer.

Traditionelt fremstilles ethanol ud fra C-6 sukkerer fra sukkerrør eller stivelse fra cerealie-kerner. På verdensmarkedet bruges primært kerner fra majs, men også afgrøder som hvede og byg anvendes. Derfor er brugen af gær så udbredt. Men sukker fra sukkerrør eller roer (mere relevant på vore breddegrader) og cerealier udgør også vigtige fødekilder. Halm fra hvede og byg, majshalm (stængler og blade) og en del af sukkerrørerne består af lignocellulose, som ikke traditionelt og direkte indgår som fødekilde til mennesker. Halm kan derved vise sig at blive en vigtig potentiel ressource i fremtidens bæredygtige ethanolproduktion. For at få en økonomisk rentabel bioethanolproces baseret på halm og andre biomassebiprodukter er det vigtigt, at både cellulose- (C-6) og hemicellulosesukkerne (C-5) omdannes til ethanol. Desværre findes der ingen naturlige stammer af bagergær, der kan omsætte C-5 sukker.

Fermentering med gær

Der er to forskellige metoder til ethanolfermentering med gær, SHF (Separat Hydrolyse og Fermentering) og SSF (Samtidig forsukring (Saccharification) og Fermentering).

I SHF-processen hydrolyseres cellulosen ved optimumstemperaturen for cellulase-enzymene (ca. 50°C) i 5-7 dage, hvorved 80-95% af cellulosen spaltes til glucose. Derefter tilsættes gæren til sukkeropløsningen evt. sammen med en række næringsstoffer, og fermenteringen udføres ved optimumstempera-

turen for gæren (28-30°C) i endnu 4-7 dage. Fordelen ved SHF er, at både enzymhydrolysen og fermenteringen kan udføres ved den optimale temperatur. Ulempen er, at glucosen virker inhiberende på cellulase-enzymene, hvorved den stigende glucose-koncentration under hydrolysen reducerer enzymernes aktivitet og det endelige udbytte (produktinhibering). Desuden er der ved SHF-processen en højere risiko for kontaminering af substratet med uønskede mikroorganismer såsom mælkesyrebakterier, da sukkeret ikke med det samme omdannes til ethanol. Desuden kan den meget høje sukkerkoncentration efter hydrolysen virke reducerende på gærvæksten (substratinhibering).

I SSF-processen tilsættes gæren sammen med enzymene, og procestemperaturen må derfor være et kompromis mellem de to temperaturoptima. Da gæren ikke vokser ved 50°C vælges en lavere temperatur tæt på gærens optimum, ved lavere temperaturer er den enzymatiske hydrolyse dog langsommere.

SSF udføres i praksis ved at lave en for-hydrolyse, hvor enzymene får lov at virke ved 50°C i 24 timer, hvorefter der tilsættes en ny enzymdosis og gær. Fermenteringen udføres herefter ved 30°C i 4-7 dage. Fordelen ved SSF er, at produktinhiberingen af enzymene og substratinhibering af gæren undgås. Ulempen er, at enzymene kun får lov at virke i kort tid ved den optimale temperatur.

Ethanolfermentering med gær har altså to alvorlige ulemper. Gæren kan ikke udnytte C-5 sukker, og optimumtemperaturen for gærvæksten ligger langt fra optimumtemperaturen for enzymhydrolysen. Der forskes meget i at løse disse problemer og finde den optimale mikroorganisme til industriel produktion af ethanol fra lignocellulose. Genteknologi benyttes til at modificere gær til at kunne optage og fermentere C-5 sukker eller modificere bakterier (der kan fermentere C-5 sukker, men har andre metabolitter end ethanol, f.eks. termofile stammer af *Bacillus* eller *E. coli*) til at producere ethanol [4]. Udfordringen ved brug af disse specialiserede organismer kan være, at de ikke er robuste nok i en industriel proces. Et alternativ til den genteknologiske løsning er at finde naturligt forekommende mikroorganismer, der kan producere ethanol fra C-5 sukker (pentose).

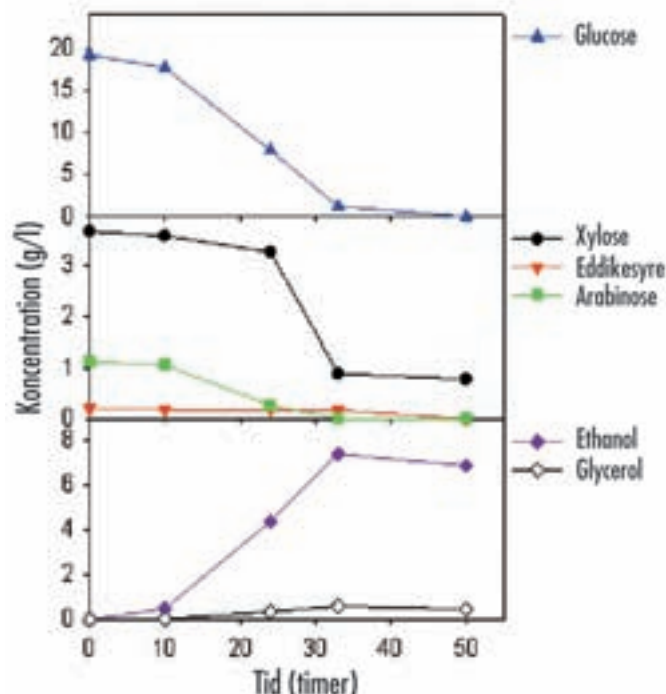
Pentoseforgæring med *Mucor indicus*

M. indicus er en mugsvamp, der kan omsætte både C-6 og C-5 sukker til cellebiomasse og ethanol. Det er en robust mikroorganisme, der er i stand til at vokse og producere ethanol ved højere temperaturer end gær (35-40°C). Præliminære forsøg viser, at temperaturoptimum for cellemasseproduktion ligger ved 30°C, mens der produceres mest ethanol ved 35°C (tabel 1).

En svensk forskningsgruppe har for nylig undersøgt ni forskellige svampe i jagten på en ethanolproducerende og pentoseforgærende mikroorganisme, og de fandt, at *M. indicus* producerede mere ethanol ud fra pentosesukker end nogle af de andre stammer i undersøgelsen [5]. *M. indicus* er i stand til at udnytte

Temperatur [°C]	Biomasse [g TS/liter]	Ethanol [g/liter]
30	2,7	7,1
32	2,2	6,0
35	1,9	11,5
37	1,3	5,6

Tabel 1. Opnået cellemasse og ethanol ved fermentering i rysteflaske med *Mucor indicus* i syntetisk medium ved temperaturer fra 30-37°C.



Figur 1. Aerob ethanolfermentering ved 30°C med *Mucor indicus* i et substrat af vådoxidert (195°C, 10 min, 12 bar O₂) kløvergræs.

forbehandlet lignocellulose som substrat og har (ligesom gær) været i stand til at nedbryde de mest almindelige inhibitorer såsom eddikesyre, furfural og hydroxymethylfurfural (HMF) i toksiske lignocellulose-hydrolysater [5].

Figur 1 viser fermenteringskurver, hvor forbehandlet kløvergræs bruges som substrat ved ethanolfermentering med *M. indicus*. Der er en lagfase på ca. 10 timer, hvor svampen danner cellemasse og vænner sig til mediet, hvorefter den begynder at producere ethanol ud fra både glucose og xylose i substratet. Det ses af figuren, at *M. indicus* også kan udnytte eddikesyre. *M. indicus* har ingen eller kun meget lav produktion af uønskede biprodukter såsom glycerol, xylitol og mælkesyre. I dette forsøg blev der dannet en smule glycerol, men ingen xylitol eller mælkesyre. Ethanoludbyttet var 0,32 g ethanol pr. g sukker (gær har et ethanoludbytte på 0,51 g ethanol pr. g glucose).

Flere stammer af *Mucor*-svampen kan have forskellig morfologi, afhængigt af hvordan svampen dyrkes. Den kan vokse som en gær, hvor separate celler i fermenteringsvæsken deler sig og derved bliver til flere, eller ved at danne mycelium hvor cellen danner hyfer, der vokser ud fra cellen og bliver til et kompliceret hårlignende netværk (ligesom den hvide mugsvamp man kan finde på for gamle fødevarer). Fra hyferne dan-

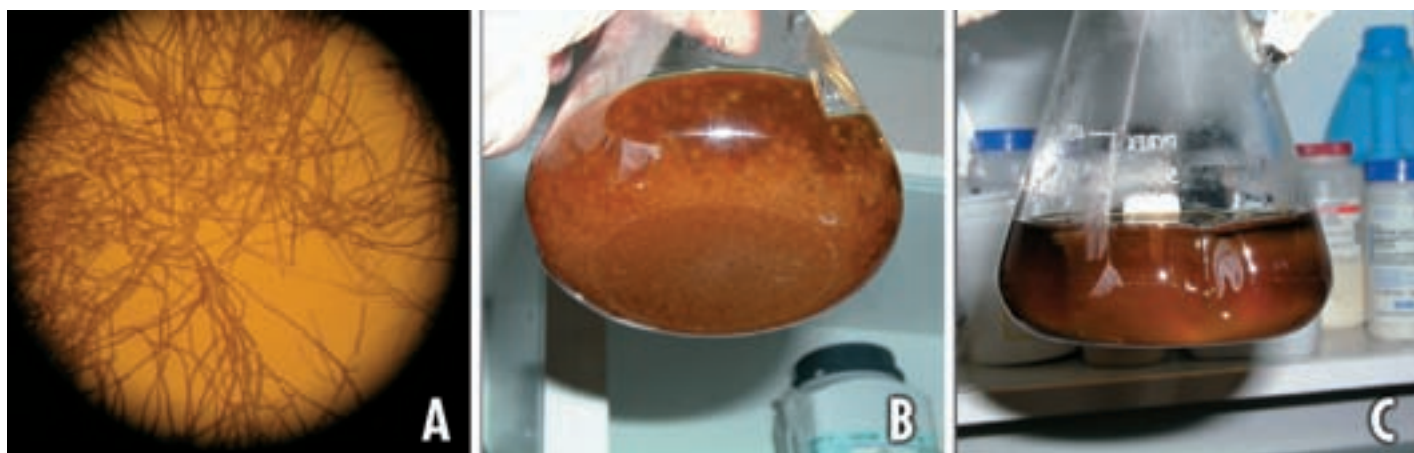
SKANLAB
MM 301 Svingmølle



Reproducerbar formaling og kornstørrelsesanalyse

Velegnet til nedbrydning af biologiske celler i f.m. DNA/RNA undersøgelser.

Tlf. 47 38 10 14 www.skanlab.com



Figur 2. Billeder af *Mucor indicus* dyrket i syntetisk medium. A: Mikroskopi af mycelium. B: Rysteflaske med mycelier. C: Rysteflaske med gærvækst.

nes der svampesporer, der gør det muligt for svampen at migrere til et nyt sted, en spore udvikler sig så til et nyt mycelium. Figur 2 viser billeder af *M. indicus*, hvor den vokser på begge måder samt mikroskopi af mycelium. Svampen gror kun som en gær under fuldstændig anaerobe betingelser, dvs. hvis der ikke er ilt til stede i fermenteringsvæsken. Mycelium kan dannes både ved aerob eller anaerob dyrkning af svampen. Dannelsen afhænger af dyrkningsbetingelser, som f.eks. hvilke næringsstoffer der tilsættes fermenteringssubstratet [7,8]. Anaerob vækst (både ved gærvækst og mycelium) er forbundet med høj ethanolproduktion, mens aerob vækst er forbundet med kraftig produktion af cellebiomasse, nogle stammer af *Mucor* producerer dog også betydelige mængder af ethanol under aerobe forhold. Det gælder bl.a. for *M. indicus* [9,10].

Mucor indicus – en værdifuld biomasse i bioraffinaderiet

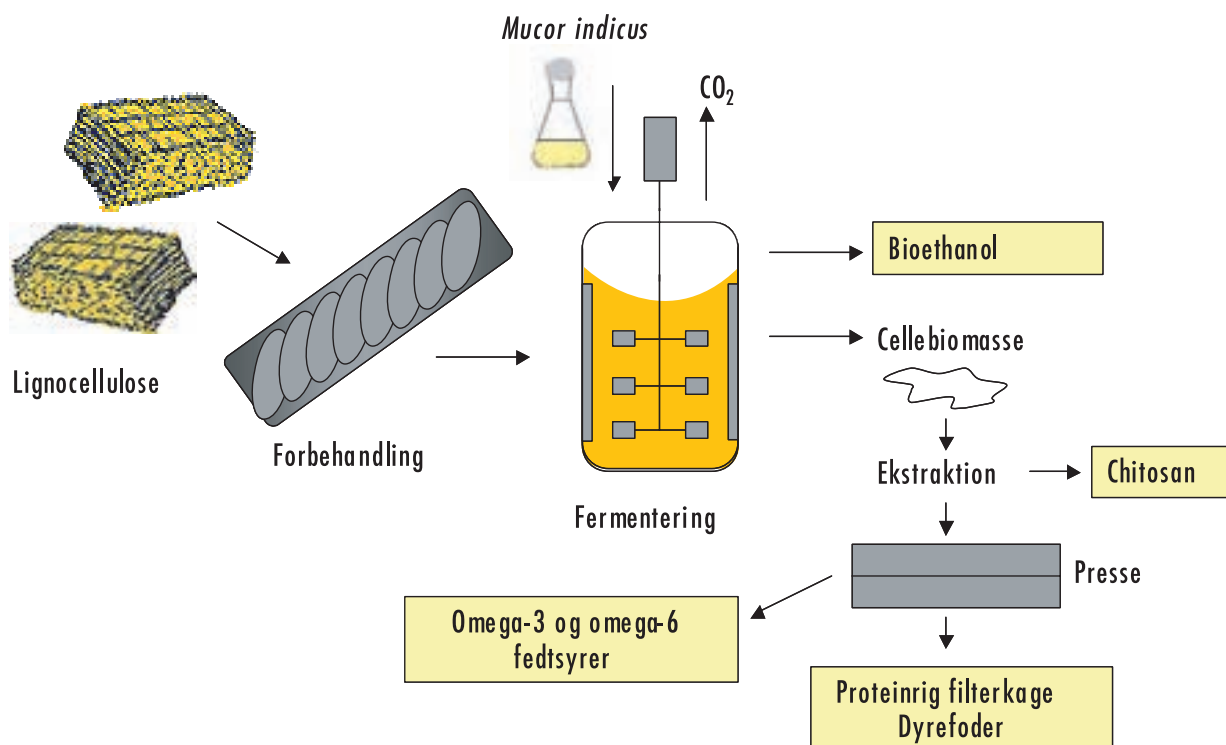
Et bioraffinaderi er defineret som en bioteknologisk fabrik, hvor afgrøder og biprodukter fra landbrugsindustrien samt affald fra husholdning m.v. vha. bioteknologiske metoder og biokemiske enhedsoperationer omdannes til brugbare produkter

på en bæredygtig måde, så der ikke dannes nye restprodukter eller affald.

Konceptet i bioraffinaderiet er at omdanne al biomasse til nye produkter i flere procestrin. Det primære produkt er ofte et lavpris bulkkemikalie som f.eks. ethanol eller mælkesyre, og de øvrige produkter kan bidrage til processens økonomi.

Chitosan er et strukturelt polysaccharid, der findes i cellevæggen hos nogle mugsvampe. Det er en lineær polymer af β -1,4-glucosamin, og der findes mange industrielle anvendelsesmuligheder for denne polymer. Chitosan er ugiftigt, bionedbrydeligt og har antimikrobielle egenskaber og kan anvendes til f.eks. konservering af fødevarer, klaring af frugtjuice, coating af korn og frø, fjernelse af tungmetaller i vand, sårheling og til kosmetik [14]. *Mucor*-cellevæggen indeholder signifikante mængder af chitosan (7-35% af tørstof), der nemt kan ekstraheres fra cellemassen [15]. Chitosan er et værdifuldt biprodukt, der kan produceres ved bioethanolfermentering med *M. indicus* (figur 3).

M. indicus bruges i Sydøstasien som starterkultur til naturlig konservering af fødevarer [11], og den er ufarlig for mennesker og dyr. Cellebiomassen har en favorabel sammensætning af vig-



Figur 3. Bioraffinaderi hvor lignocelluloseholdige råmaterialer og *Mucor indicus* bruges som basis for produktion af flere værdifulde produkter.

tige essentielle aminosyrer, der fungerer som byggesten i dannelsen af nye proteiner, samt et højt indhold af sunde omega-6 og omega-3 fedtsyrer, hvor 35-60% af disse fedtsyrer er gamma-linolensyre (GLA) [12]. Mangel på GLA kan give symptomer som forhøjet blodtryk, eksem, leddegigt, overvægt ect. [13]. Fedtsyrerne kan presses ud af biomassen og sælges som et værdifuldt kosttilskud, der kan forbedre økonomien i bioethanolprocessen. Oliekagen, der er tilbage efter presning af cellebiomassen, kan endvidere sælges som et proteinrigt dyrefoder (figur 3).

Konklusion

Lignocellulosematerialer (træstof) udgør en stor ressource som råmateriale i produktionen af fremtidens energikilder, herunder bioethanol. For at kunne få en økonomisk rentabel bioethanolproces baseret på disse materialer er det vigtigt, at både glucose (C-6) og hemicellulose (C-5) omdannes til ethanol. *M. indicus* har stort potentiale som mikroorganisme til produktion af ethanol ud fra lignocelluloseholdige råmaterialer. Den kan i modsætning til bagergær udnytte både C-6 og C-5 sukker i lignocellulose-hydrolysater, og den kan vokse og producere ethanol ved højere temperaturer. I et bioraffinaderi kan den cellebiomasse, der produceres ved ethanolfermenteringen, omdannes til værdifulde produkter såsom chitosan, sunde omega-3 og omega-6 fedtsyrer og næringsrigt foder til dyr. En ulempe ved *M. indicus* er, at cellevæksten kan være svær at styre i en industriel proces, især ved filamentøs vækst (hvor der dannes mycelier). Forsøg har dog vist, at denne type vækst ikke dominerer, når svampen dyrkes i lignocellulose-hydrolysater.

E-mail-adresse

Mette Hedegaard Thomsen: mette.hedegaard.thomsen@risoe.dk

Referencer

1. Bjerre A B, Olesen A B, Fernquist T, Plöger A, Schmidt A S (1996) Pre-treatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose. *Biotechnol Bioeng* 49: 568-577.
2. Tengborg C, Galbe M, Zacchi G (2001) Reduced inhibition of enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. *Enzyme and Microbial Technology* 28: 835-844.
3. Jacques K, Lyons T P, Kelsall D R (1999) *The Alcohol Textbook*, Nottingham University Press, Nottingham.
4. Hahn-Hägerdal B (1996) *Ethanol Fermentation of Lignocellulose Hydrolysates*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 57/58, 195-199.
5. Millati R, Edebo L, Taherzadeh M J (2005) Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor*, and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose, and wood hydrolysates. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 294-300.
6. Saxena R K, Malhotra B, Batra A (2003) Commercial importance of some fungal enzymes. In: *Handbook of fungal biotechnology*. New York: Marcel Dekker: 287-95.
7. Sypherd PS, Borgia PT, Paznokas JL (1978) The biochemistry and dimorphism of the fungus *Mucor*. *Adv Microb Physiol* 18: 67-104.
8. Orlowski M (1991) *Mucor* dimorphism. *Microbiol Rev* 55: 234-258.
9. McIntyre M, Breum J, Arnau J, Nielsen J (2002) Growth physiology and dimorphism of *Mucor circinelloides* (syn. *racemosus*) during submerged batch cultivation. *Appl Microbiol Biotechnol* 58: 495-502.
10. Lübbehüsen TL, Nielsen J, McIntyre M (2004) Aerobic and anaerobic ethanol production by *Mucor circinelloides* during submerged growth. *Appl Microbiol Biotechnol* 63: 543-548.
11. Lee A C, Fujio Y (1999) Microflora of banh men, a fermentation starter from Vietnam. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 15: 57-62.
12. Weete J D, Shewmaker F, Gandhi S R (1998) Gamma-linolenic acid in zygomycetous fungi: *Syzygites megalocarpus*. *Journal of The American oil Chemists Society* 75: 1367-1372.
13. Holford P (1997) *The Optimum Nutrition Bible*, Judy Piatkus Ltd., London.
14. [14] Chatterjee S, Adhya M, Guha A K, Chatterjee B P (2005) Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization, *Process Biochemistry*, 40, 395-400.
15. Synowiecki J, Al-Khateeb N A A Q (1997) Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan.

FREE YOUR MIND

MILLIPORE

Ingen begrænsninger

med det nye Milli-Q® Advantage system.

Ultra rent vand, når og hvor det passer dig.

Se mere på www.millipore.com/advantage