

Fremstilling af bioethanol

– nutidens teknologi og fremtidens udfordringer

Bioethanol¹ til brændstofbrug fremstilles i dag primært ud fra sukkerrør eller stivelsesholdige afgrøder. En stor vækst i bioethanolproduktionen kræver overgang til råmaterialer såsom halm, papiraffald og træ. Disse råmaterialer er svært nedbrydelige og deres udnyttelse til ethanolproduktion er en teknologisk udfordring

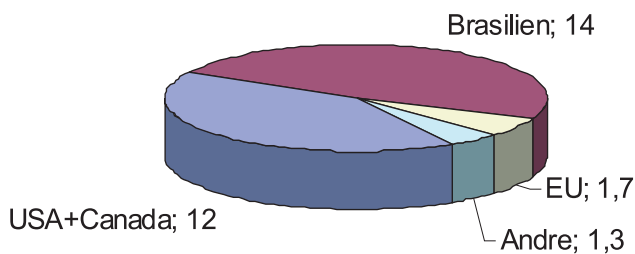
Af Rasmus Devantier og Sven Pedersen, Novozymes A/S og Lisbeth Olsson, Center for Mikrobiel Bioteknologi, BioCentrum-DTU

Ethanol er et af mange mulige alternativer til fossile brændstoffer. Ethanol fremstillet ud fra plantemateriale reducerer CO₂-udledningen, idet den mængde CO₂, der dannes ved forbrænding, modsvarer af den mængde, der fikseres af de anvendte planters fotosyntese [1]. Den mest energieffektive udnyttelse af plantemateriale ville være industriel forbrænding i et kraftværk, men som transportabelt brændstof egner ethanol sig godt. Ethanol kan bruges som en oktanhæver og erstatte f.eks. det forurenende MTBE (methyltertiærbutylether) ved tilsæt-

Hvordan fremstilles bioethanol i dag?

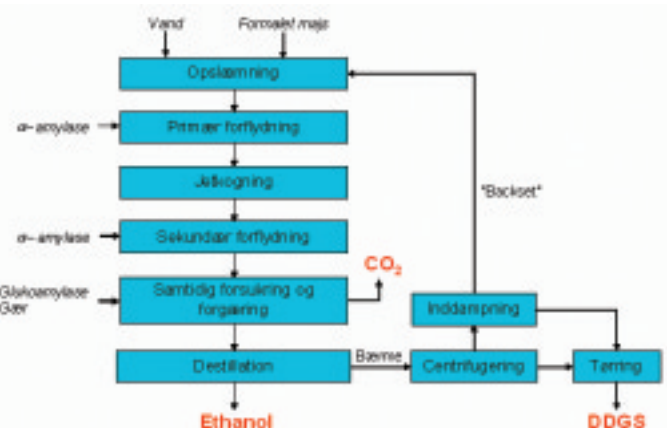
I Brasilien er den nuværende produktion baseret på sukkerrør, mens den i USA hovedsageligt er baseret på majs. Der findes to hovedtyper af majsbaserede processer, vådformaling og tørformaling. I vådformalingsprocessen separeres kim, fiber, protein og stivelse. Under de senere års mange nybygninger af ethanolfabrikker, har tendensen været at satse på tørformaling, idet etableringsomkostningerne er mindre som følge af simple procesudstyr.

Ved tørformaling formales majs til en partikelstørrelse på omkring 1 mm og opslættes i vand. Opslætningen opvarmes til over stivelsens forklistringstemperatur (65-90°C) og tilsættes en varmemstabil α-amylase, der hydrolyserer stivelsen til en kortere kædelængde og derved reducerer viskositeten. For at gøre al stivelse tilgængelig for α-amylasen jet-koges blandingen nu ved 105-120°C. Jet-kogningen bevirker store forskydningskræfter, der er med til at frigøre stivelsen fra fibre og proteiner. Den høje temperatur inaktiverer dog også α-amylasen, så en ny dosis tilsættes i den sekundære forflydning (figur 2). I den forflydige mæsk vil stivelsen nu være omsat til oligosaccharider med forskellige kædelængder. Pga. et relativt højt tørstofindhold er mæsken dog stadig nærmest at sammenligne med majsgrød (figur 3). Jo højere tørstofindhold mæsken har, desto større kapacitet vil en fabrik med et givet tank-volumen



Figur 1. Produktionen af bioethanol i 2003 (mio. m³). Data fra [1].

ning af 5-10% til almindelig benzin. En blanding alle biler kan køre på uden ændringer. Ved mindre ændringer af motoren kan de fleste biler køre på blandinger med op til 85% ethanol. Tilsætning af ethanol giver en renere forbrænding med lavere emission af carbonmonoxid, flygtige organiske forbindelser, hydrocarboner og NO_x; sidstnævnte dog kun ved blandinger over 50% ethanol. Politisk er der på verdensplan stigende fokus på bioethanol, hvilket også kan aflæses af, at verdens produktion af bioethanol til transportbrug fra 2000 til 2003 er steget med 65% til 29 mio. m³ [1]. En fortsat stor vækst kræver overgang til andre råmaterialer såsom halm, papiraffald, træ m.m. Som det ses i figur 1 produceres der relativt lidt ethanol i EU, men EU-Kommissionen har vedtaget et direktiv, der foreskriver at 2% af benzin og diesel skal være erstattet med bio-brændsel inden udgangen af 2005 og 5,75% i 2010 [2]. Der blev i EU i 2002 brugt omkring 120 mio. ton benzin til transport [3], så 2% svarer til 2,4 mio. ton eller 3 mio. m³ ethanol, hvilket næsten er det dobbelte af bioethanolproduktionen i EU i 2003 på 1,7 mio. m³ (figur 1). Mht. biodiesel blev der i EU i 2003 produceret 1,6 mio. m³ svarende til 1% af EU's diesel-forbrug [1]. Da transportsektoren samtidig er i vækst, kræves der en ret stor vækst i produktionen af biobrændsel for at nå direktivets mål.



Figur 2. Proces til ethanol fremstilling ved tørformaling af majs. Se teksten for detaljer. DDGS: Distiller's Dried Grains with Solubles. Modificeret efter [5].

have. Derfor har der været en stadig udvikling mod højere tørstofindhold, så man nu typisk opererer med 33-37% w/w tørstof, også kaldet »very high gravity« (VHG)-teknologi. Disse

høje tørstofindhold kræver bl.a. en meget effektiv α -amylase, der er i stand til at nedsætte viskositeten i den primære forflydning (figur 2), for at mæsken overhovedet kan pumpes, jet-koges osv.

I næste trin nedbrydes oligosacchariderne med glucoamylase til glucose, som gær (*Saccharomyces cerevisiae*) omsætter til ethanol. De to processer udføres normalt samtidig, det kaldes da SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation/samtidig forsukring og forgæring). Denne proces varer typisk 2 døgn. Et eksempel, på hvordan oligosaccharider (dextrin) nedbrydes enzymatisk, maltose og glucose dannes og forbruges, og gær, ethanol og glycerol produceres gennem en SSF-gæring, kan ses i figur 4, side 28. De høje tørstofniveauer gør, at også den anvendte gærstamme må være tolerant over for de høje koncentrationer af glucose og maltose i starten af gæringen og den følgende høje koncentration af ethanol i slutningen af processen [4]. Samtidig forsukring og forgæring har nogle fordele frem for at køre de to processer separat: For det første spares et procestrin (en tank), for det andet holdes niveauet af hydrolyseprodukterne - glucose og maltose - nede ved gærens samtidige forbrug. Derved bremses enzymreaktionen ikke af høje produktkoncentrationer, og gæren udsættes ikke for så høje glucose- og maltosekoncentrationer, at de giver anledning til at gæren påvirkes af osmotisk stress.

I et samarbejdsprojekt mellem Novozymes og Center for Mikrobiel Bioteknologi ved BioCentrum-DTU er et system til karakterisering af disse gæringer sat op (figur 4). Det er bl.a. konstateret, at gærstammen skal være stresstolerant for at kunne omsætte al substratet til ethanol. Selv stresstolerante stammer stresses dog i nogen grad af de høje koncentrationer af maltose og glucose, men denne stress fører faktisk til en højere ethanol-dannelseshastighed. Det er også vist, at omkring halvdelen af ethanolen dannes efter at gæren er overgået til stationær fase (figur 4). At gæren ikke fortsætter med at vokse under hele gæringen øger andelen af substrat, som omsættes til ethanol ift. gær-biomasse og derved fås et højere ethanoludbytte. De næste skridt i projektet er måling af intracellulære metabolitters koncentration og ekspressionsniveau af samtlige gener for at opnå yderligere forståelse af gærens fysiologi under disse gæringer og derved blive i stand til at optimere procesbetingelserne og/eller gæren.

Efter gæringen destilleres ethanolen fra. Nogle fabrikker opsamler den dannede carbondioxid, som renses og sælges. De uopløselige dele i bærmen (destillationsresten, på engelsk »stillage«) fjernes ved centrifugering. Den resterende væske inddampes, og koncentratet sprayes på de uopløselige dele under tørring af disse. Derved fås »distiller's dried grains with solubles« (DDGS), der sælges som et fiber- og proteinrigt foder. Det vand, som fjernes ved inddampningen, genbruges ved at føre det tilbage i processen til opslæmningstrinnet. Ofte er



Figur 3. Opsætning til karakterisering af ethanolgæringer fra tørformalet majs. Mæsken er grødagtig med opslæmmede grove partikler.

inddamperen ikke dimensioneret til at håndtere hele strømmen, og en del »thin stillage« returneres ligeledes som »backset stillage«.

Fremtidens ethanolproduktion fra fiberholdige råmaterialer

En fortsat vækst i ethanolproduktionen kan ikke kun baseres på stivelsesholdige afgrøder, bl.a. fordi afgrøderne også har andre anvendelser (fødevarer og foder), så prisen vil stige med efterspørgslen. Fiberrige affaldsprodukter såsom halm, papiraffald, træ (flis, spåner) er tilgængelige i store mængder, de er billige og har ikke mange alternative anvendelsesmuligheder. Lignocellulose er en fællesbetegnelse for de vigtigste bestanddele af plantefibre: Cellulose, hemicellulose og lignin. Cellulose er lange kæder af glucoseenheder. Hemicellulose er et heterogent polysaccharid, som består af både pentoser (xylose, arabinose) og hexoser (glucose, galactose og mannose). Lignin er polymerer af forskellige aromatiske forbindelser [6]. Det er monosacchariderne, som fås ved hydrolyse af cellulose og hemicellulose, der kan omdannes til ethanol. Det er dog ikke ligetil, idet lignocellulosen er svært nedbrydelig, og der findes ikke en mikroorganisme, der effektivt kan omsætte alle monosacchariderne til ethanol. Derfor forskes der rundt om i verden intenst i både effektiv hydrolyse af plantefibre og effektive mikroorganismer til omdannelse af de forskellige monosaccharider, bl.a. ved Novozymes og Center for Mikrobiel Bioteknologi.

Tre hovedudfordringer ved fiberbaseret ethanolproduktion

Hovedudfordringerne ved at anvende lignocelluloseholdige råmaterialer til ethanolproduktion er forbehandling, enzymatisk hydrolyse og forgæring [7,8].



Proces udstyr

Scanding

leverer løsninger, komponenter
og produkter i rustfrit stål.

Vi står for kompromisløs kvalitet
og stor pålidelighed og leverer
fuld back-up.


FDA


Scanding

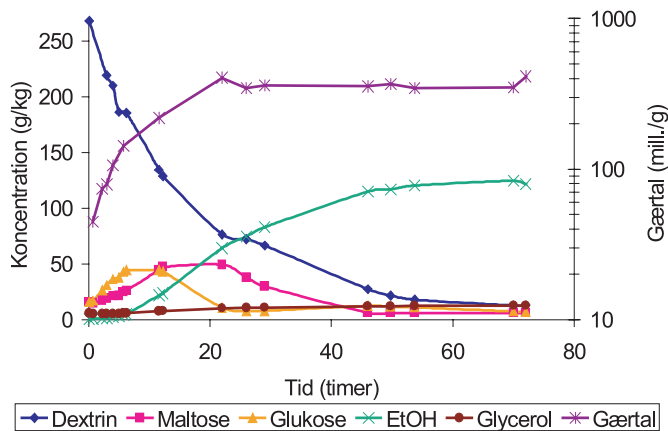
RUSTFRI PROCESTUDSTYR

Scanding A/S • Djursgade 31 • 8500 Grenaa

Afdelingskontor / Aalborg

Tlf.: 87 59 22 22 • Fax: 87 59 22 23

scanding@scanding.dk • www.scanding.dk



Figur 4. Eksempel på koncentrationerne af oligosaccharider (dextrin), maltose, glucose, gær, ethanol og glycerol gennem en SSF-gæring af majsmed med 35% total tørstof bestemt i laboratorieopsætningen i figur 3.

Forbehandling

Forbehandlingen har til formål at gøre lignocellulosestrukturen modtagelig for enzymatisk nedbrydning. Forbehandling af lignocellulose kræver en noget hårdere behandling end ved forflydning af stivelse. Efter findeling af råvaren er der flere muligheder, f.eks. behandling med fortyndet syre ved høj temperatur (180-230°C), koncentreret syre tæt ved stuetemperatur, damp-eksplosion, ammoniak-fryseeksplosion eller vådoxidation. Hver af disse har fordele og ulemper mht. processens kompleksitet, genanvendelse af dyre reagenser, nedbrydning af monomerer og dannelse af inhibitorer for de enzymer og mikroorganismer, der skal bruges senere. Eksempelvis sker damp-eksplosion ved dampopvarmning til 160-250°C under tryk og pludselig trykkudligning. Hemicellulose hydrolyseres herved delvist, og lignin redistribueres og fjernes delvist fra cellulosen. Lignin er dog stadig en fysisk barriere for enzymerne og kan også irreversibelt adsorbere dem, så det skal helst fjernes. I Danmark har Forskningscenter Risø og DTU udviklet vådoxidation, som ved tilsætning af 10-12 bar ilt og opvarmning til 170-200°C gør processen exoterm. Herved opløses en stor del af ligninen og hemicellulosen, og ved at holde processen basisk mindskes dannelsen af inhibitorer [7].

Enzymatisk hydrolyse

Cellulose optræder delvist krystallinsk og er derfor den sværest nedbrydelige del af lignocellulose. Et helt sæt af cellulaser (endoglucanaser, exoglucanaser/cellobiohydrolaser og β -glucosidaser) er nødvendige for at nedbryde cellulose til glucose. Endoglucanaser kløver tilfældigt inde i cellulosekæder i den amorfe del og frigør derved flere ender, som cellobiohydrolaser kan frigøre cellobiose fra. Cellobiohydrolase kan desuden frigøre cellobiose fra enderne af krystallinsk cellulose. Cellobiose hydrolyseres til glucose af β -glucosidase. Cellobiohydrolaserne er inhiberet af cellobiose, så hydrolysen af cellobiose er vigtig for cellobiohydrolaseaktiviteten. Samspillet mellem cellulaserne er komplekst og endnu langt fra forstået [7]. Der findes kommercielle cellulaseprodukter, men deres høje pris har hidtil været en væsentlig forhindring for en rentabel ethanolproduktion. Et større forskningsprogram under USA's Department of Energy (DOE) har ved kontrakt med bl.a. Novozymes reduceret prisen på cellulaser til ethanolproduktion med en faktor 20, hvilket er et stort skridt på vejen mod en rentabel ethanolproduktion fra lignocellulose [9].

Forgæring

For at udnytte substratet skal både glucose og pentoserne fra hemicellulosen omsættes til ethanol. *S. cerevisiae*, der er den

mest velkendte mikroorganisme til ethanolproduktion, kan omsætte hexoser, men ikke pentoser. Det har man forsøgt at råde bod på ved at indsætte gener for pentoseudnyttelse fra andre mikroorganismer i *S. cerevisiae* og termotolerante gær eller ved at udvikle genetisk modificerede stammer af bl.a. *Zymomonas mobilis*, *E. coli* eller termofile bakterier. Man er kommet langt i denne udvikling, men endnu er produktiviteten (ethanol dannet pr. tid og volumen) kun på 25-50% af, hvad man i dag opnår med *S. cerevisiae* under industrielle forhold [7].

Andre vanskelige aspekter ved fiberbaseret ethanolproduktion

Ud over de beskrevne hovedudfordringer ved fiberbaseret ethanolproduktion kan man ved sammenligning med den beskrevne tørformalingsproces, der er optimeret gennem mange år, finde andre udfordringer. F.eks. kan man ikke umiddelbart arbejde med så høje tørstofniveauer, da lignocellulose giver endnu højere viskositet end stivelse. Det har konsekvenser for kapaciteten af procesanlæg og for vand- og energiforbruget. Muligheden for genanvendelse af vand kan også begrænses af dannede inhibitorer. Der skal findes en passende måde at komme af med restprodukter på. En realistisk måde er forbrænding på stedet til delvis dækning af processens energibehov.

Alt i alt er der en lang række teknologiske vanskeligheder, som skal overvindes, inden fiberbaseret ethanolproduktion kan ske komercielt og i stor skala. Det forklarer, hvorfor udviklingen ikke går hurtigere, og hvorfor investorer er tilbageholdende [10]. Med moderne værktøjer inden for bioteknologi er det bestemt muligt at overvinde vanskelighederne, men integrationen til en robust og rentabel proces vil stadig tage tid. I Danmark er der flere lokale initiativer, der arbejder for denne procesintegration. Ved Elsam i Odense er der som en del af et større EU-projekt opført et stort pilotanlæg. En del EU-støttede forskningsprojekter inden for biobrændstof har også dansk deltagelse af Elsam, Novozymes, DTU, Risø og KVL.

For nylig er Danish Center for Biofuels (www.biofuels.dk) dannet som et fælles forum for forskningsgrupper på DTU, Risø og KVL, for at fremme viden og udviklingen inden for biobrændstoffer.

Novozymes - Unlocking the magic of nature

Novozymes er en af de førende bioteknologiske virksomheder inden for enzymer og mikroorganismer. Firmaets løsninger er baseret på naturens egen teknologi. Målet er hele tiden at udvide grænserne for, hvordan biologiske løsninger kan fremme industriens muligheder over hele verden.

Mottoet er *Better lives on a greener Earth!* Aldrig har efterspørgslen efter bioethanol været større, end den er i dag. Der arbejdes til stadighed på nye enzymteknologier, som vil gøre det muligt at producere bioethanol fra organiske affaldsprodukter som halm, træspåner og majsstængler.

E-mail-adresser

Rasmus Devantier: rdev@novozymes.com
Sven Pedersen: svp@novozymes.com
Lisbeth Olsson: lo@biocentrum.dtu.dk

Fodnote

¹⁾Med bioethanol menes der her ethanol til transportbrug (fuel ethanol) fremstillet ud fra ethvert biologisk materiale. I andre sammenhænge anvendes bioethanol kun om ethanol, der er fremstillet ud fra fiberholdige råmaterialer såsom halm, papiraffald, træ og ikke fra stivelses- eller sukkerholdige afgrøder.

Referencer

1. http://library.iea.org/dbtw-wpd/Textbase/speech/2004/If_biofuels_iaea.pdf (29-10-2004)
2. Europarådets direktiv 2003/30/EF om fremme af anvendelsen af biobrændstoffer og andre fornyelige brændstoffer til transport.
3. <http://epp.eurostat.cec.eu.int/pls/portal> (02-11-2004)
4. Ingledew, W.M. 1993. Yeasts for Production of Fuel Ethanol. I: The Yeasts. Vol. 5. Yeast Technology, 2nd edition. Red: Rose, A.H., Harrison, J.S. Academic Press, Redding, England.
5. Novozymes A/S 2000. Liquezyme SC/Termamyl SC for whole-grain liquefaction. Anvendelsesblad nr. 2000-13157-01. Novozymes A/S, Bagsværd.
6. Jørgensen, H., Olsson, L. 2002. Produktion af lignocellulosenedbrydende enzymer i skimmelsvampe. Dansk Kemi, 11, 20-24.
7. Olsson, L., Jørgensen, H., Krogh, K., Roca, C. 2004. Bioethanol production from lignocellulosic material. Kapitel 42, pp 957-993 i: Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility, 2nd edition. Red: Dumitriu, S. Marcel Dekker, Inc., New York.
8. Wheals, A.E., Basso, L.C., Alves, M.G.D., Amorim, H.V. 1999. Fuel ethanol after 25 years. TIBTECH 17, 482-487.
9. Novozymes A/S 2004. Novozymes og NREL melder om fremgang inden for biomasse-til-ethanol-projektet. Pressemeldelse af 26. april 2004.
10. Bungay, H.R. 2004. Confessions of a bioenergy advocate. TIBTECH 22 (2), 67-71.

Ph.d.-projekt Enzymproduktion i *Aspergillus*-familien fra forskellige carbonkilder

Afhandlingen beskriver resultater fra studier af metabolismen af forskellige sukkerer i skimmelsvampe fra familien *Aspergillus*, og hvordan metabolismen af disse sukkerer er relateret til enzymproduktion. Xylose er en attraktiv, alternativ kulstofkilde til industrielle fermenteringsprocesser, idet dette sukker er til stede i store mængder i lignocellulose, der er en billig råvare. Det er dog nødvendigt at forbedre udnyttelsen af xylose, og endvidere er der problemer med glucose-repression af udnyttelsen af xylose.

I den første del af studiet blev kulstofmetabolismen af xylose og glucose undersøgt.

Kontrol af fluxen igennem den pathway, hvor xylose metaboliseres, blev undersøgt ved brug af metabolisk kontrolanalyse. Analysen viste, at fluxkontrol for det meste er ved det første enzymatiske trin, ved xylose-reduktase. Det er umiddelbart paradoksalt da xylitol (der dannes af xylose-reduktase) findes i relativt høje koncentrationer i cellen. Under vækst på glucose-xylose-blandinger blev det fundet, at proteinet CREA er ansvarlig for glucose-repression af xylose-metabolismen, og at CREA er involveret i repression af enzymproduktion, både ved vækst på glucose og xylose.

I den anden del af studiet blev TAKA-amylase promoteren fra skimmelsvampen *Aspergillus oryzae* anvendt til at drive udtrykkelse af heterologe gener i skimmelsvampen *Aspergillus niger*. Høje produktiviteter af svampelipaser kunne opnås ved brug af denne promoteren i *Aspergillus niger*. Det var muligt at opnå en effektiv udskillelse af lipaser til det ekstracellulære medium i *Aspergillus niger*, hvis der blev anvendt en preprosekvens for lipase B fra *Candida antartica*.

Wai Prathumpai, BioCentrum-DTU

Ny europæisk politik mod bioterrorisme

I december 2001 igangsatte EU et program til beskyttelse af borgernes sikkerhed – et program der omfatter radioaktive, biologiske eller kemiske trusler.

Med dette udgangspunkt har New Defence Agenda, NDA, <http://www.newdefenceagenda.org/> netop afviklet en offentlig debatrunde i Bruxelles. NDA er et diskussionsforum, der bl.a. inddrager EU og NATO i debatten om aktuelle sikkerheds- og forsvarstemaer.

Spørgsmålene lød bl.a.: Hvilke ressourcer har Europa til at imødegå et angreb af koppevirus? Hvordan kan disse ressourcer bedst anvendes? Hvor langt kan de europæiske lande skabe enighed omkring bioterrorberedskabet? Hvad kan vi lære fra de seneste kriser omkring nyopståede sygdomme som SARS og fjerkræsinfluenza?

Mødet førte til formuleringen af adskillige overordnede rekommandationer for den europæiske politik.

I sin konklusion af møderne opstillede direktøren for NDA, Giles Merrit, tre overordnede målsætninger for gennemførelsen af en fælles politik:

- Forbedret national beskyttelse mod bioterroristangreb er nødvendig – specielt inden for laboratoriekapacitet, patogener overvågningsprogrammer, øgede ressourcer samt forskning og udvikling.
- Der er behov for regional og international koordination af krisestyringen.
- Der er brug for udviklingen af hurtigere rapporterings-systemer i tilfælde af sygdomsudbrud.



Vi sprænger rammerne

Højtrykshomogenisering – op til 1.500 bar

Niro Soavi leverer et af markedets mest fleksible produktprogrammer af højtrykshomogenisatorer til den farmaceutiske, bioteknologiske og kosmetiske industri til:

- Cellesprængning
- Stabile emulsioner og suspensioner
- Injektionsvæsker
- Højtrykspumper
- Højtrykshomogenisatorer/Microsizerer
- Højtryksteknologi (VHP) op til 1.500 bar
- Laboratorie- og industrimaskiner
- CIP- og SIP-design
- Aseptisk design
- ISO 9001 - 2000 certificeret
- cGMP valideringsmanual



**Niro Soavi Nordic
Salg og servicecenter**

Nørskovvej 1b
DK-8660 Skanderborg
Tlf. 70 15 22 00
Fax 70 15 22 44
Email hb@niro-soavi.dk
www.niro-soavi.it



Niro Soavi Lab. Homogenisator
NS1001L 2K
10l/h - 1.500 Bar