

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.

Ophbygningen 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 glucoseenheder 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

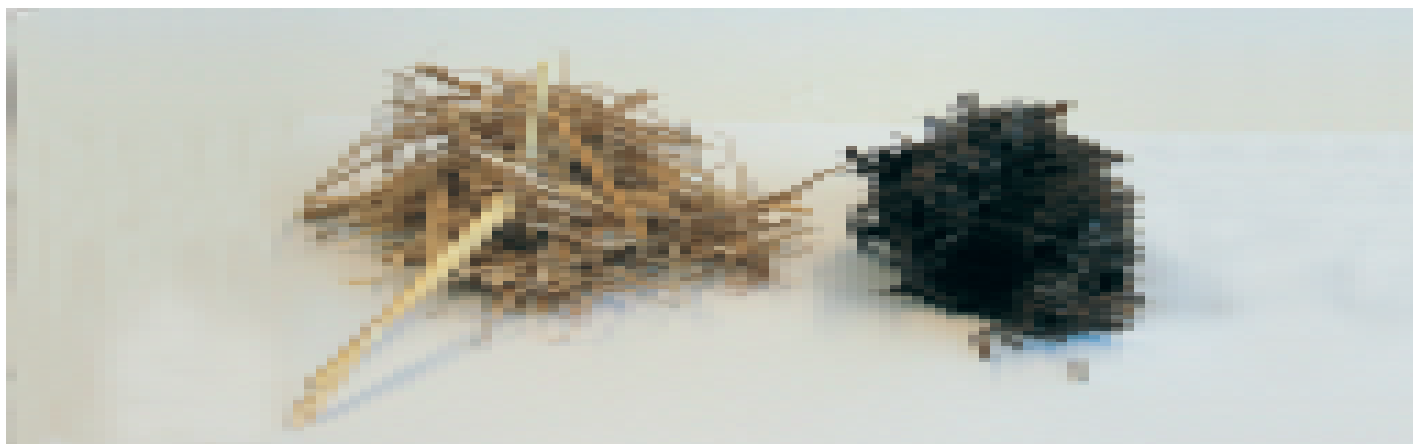
Udnyttelse af lignocellulose som substrat for diverse fermenteringsprocesser forudsætter en forudgående nedbrydning af cellulose og

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.



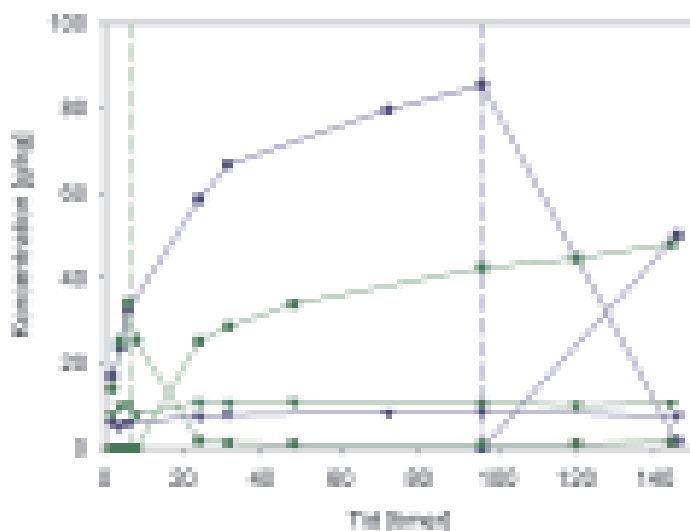
Figur 3. Forflydningen af forbehandlet halm i reaktoren. Billederne viser materialet efter hhv. A) 5 og B+C) 96 timer.

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 enzymdosering 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 havs 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, hvimod 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.



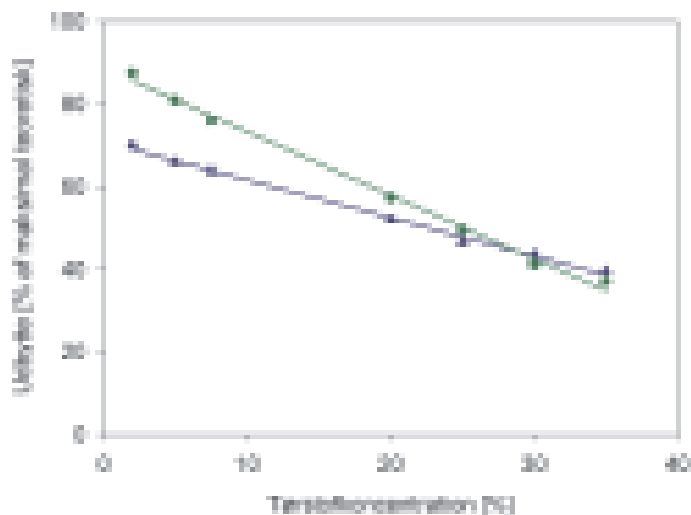
Figur 4. Koncentration af glucose (●), xylose (▲) og ethanol (■) under forflydning, forsukring og gæring af forbehandlet hvedehalm med 35% (start) tørstofindhold. Blå viser forløbet, når processen udføres som en separat hydrolyse og gæring, mens grøn viser forløbet under en simultan forsukring og gæring.

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 enzytblendinger, 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 enzymerne's aktivitet, når tørstofindholdet øges.

Med muligheden for at studere aktiviteten af enzymerne ved høje tørstoffkoncentrationer åbnes der mulighed for at få ny indsigt i enzymerne's 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 tørstoffkoncentrationer.

E-mail-adresse
Henning Jørgensen: hj@kvl.dk

Referencer:

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

Invitation

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 Göteborg.

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

U·I·C
UIC GmbH

Dax
Consult



- Automatisk tilgang
- Ingen programmer
- Easy to use
- Callcenter log
- Rapportering log
- Flexibelt

chamotec

Skovvej 17
8240 Skovbo
Tlf: +45 70 10 10 10
www.chamotec.dk

Marketing & Sales

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 bibrændstof, 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 glucosekoncentration 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 processtemperaturen 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 optimumstemperaturen for gærvæksten ligger langt fra optimumstemperaturen 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).

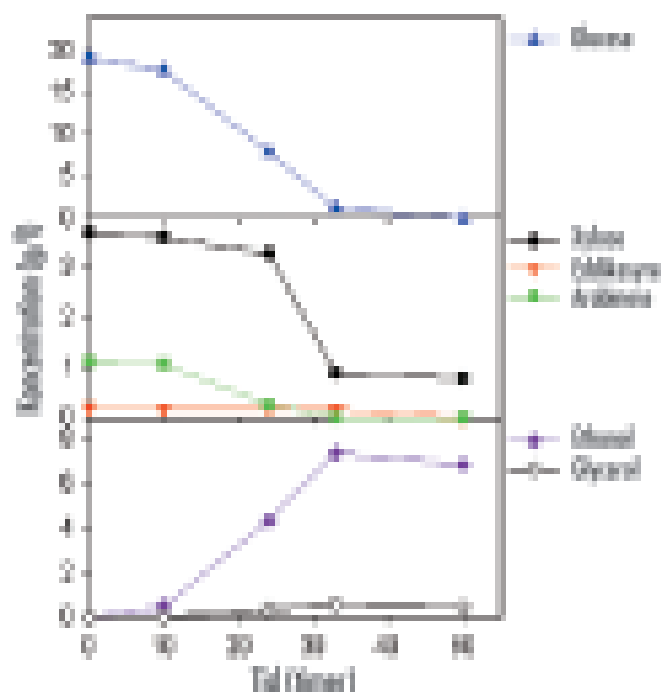
Pentoseforgæring med *Mucor indicus*

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 vådoxideret (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 MH 301 Svingsmelle



Velgnet til nedbrydning af biologiske celler i f.eks. DNA/RNA undersøgelser.

Retsch
Reproducerer fordeling og kornstørrelseanalyse

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

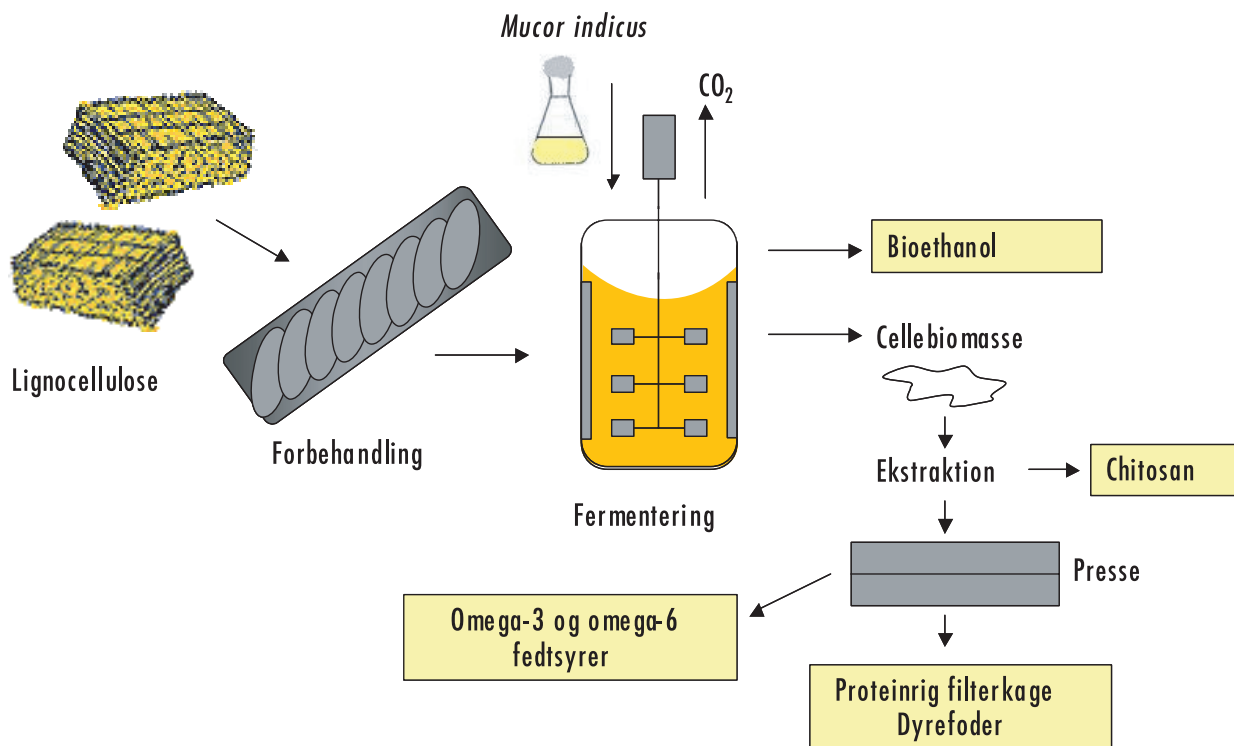
Et bioraffinaderi er defineret som en bioteknologisk fabrik, hvor afgrøder og biprodukter fra landbrugsindustrien samt affald fra husholdning m.v. vha. bioteknologiske metoder og biokemiske enhedsoperationer omdannes til brugbare produkter

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 celledmassen [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 byggestenen 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. Orłowski 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.

The advertisement is a vertical banner with an orange and white color scheme. At the top left, the text 'FREE YOUR MIND' is written in large, white, block letters on an orange background. To the right of this, the word 'MILLIPEDIA' is visible in a blue, stylized font. The central part of the banner features a close-up, slightly blurred photograph of a man's face, looking upwards and to the right. Below the photograph, there is a block of text in a light, sans-serif font, which is mostly illegible due to blurring. At the bottom of the banner, there are two illustrations: on the left, a piece of laboratory glassware (a flask or beaker on a stand), and on the right, a blue and white laboratory instrument, possibly a pipette or a small reactor. The overall design is clean and professional, typical of a scientific or educational publication.