

Fra halm til alkohol

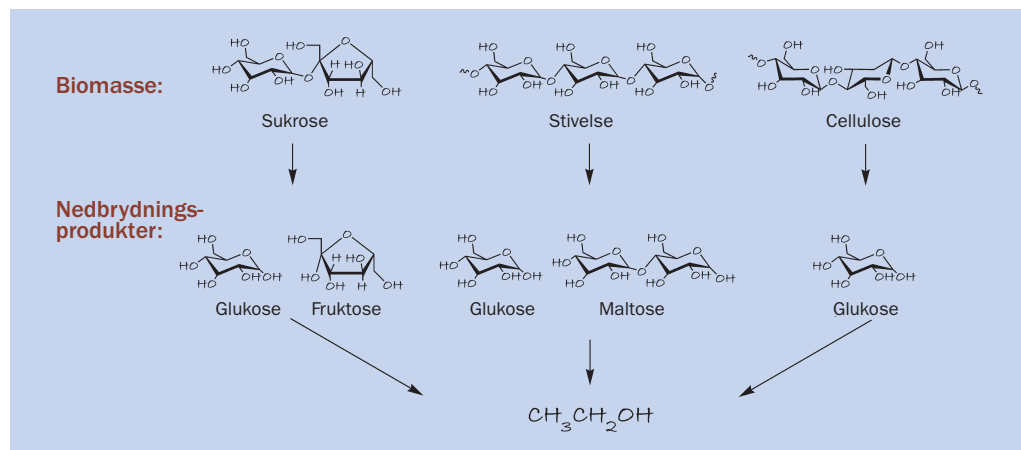
Moderne motorer kan i vid udstrækning køre på alkohol, der er produceret ud fra biologisk materiale.

Den stigende efterspørgsel på biobrændstof gør halm interessant som kilde til alkoholproduktion.

Men det kræver, at man kan finde bedre enzymer, der kan nedbryde halmene.

Af Lisa Rosgaard, Sven Pedersen og Anne Meyer

■ Kan Ferrarier og Skodaer køre på halm? Ja! For halm kan nedbrydes til glukose, der kan forgæres til alkohol (ethanol), som kan fungere som motorbrændstof i biler. Alle biler produceret fra 1972 har motorer, der kan køre med op til 10 % ethanol i benzinen. I nyere motorer kan helt op til 85 % af benzinen erstattes med ethanol. Derfor er der en stigende interesse for at finde billige kilder til produktion af ethanol – og en af disse kilder er netop halm. Hvis halm skal blive en vigtig ressource for fremtidens brændstoffungrende biler, må man udvikle en proces, der effektivt omdanner halm til ethanol. Et vigtigt element i en sådan proces er selve nedbrydningen af cellulosen i halm til glukose. Nedbrydningen kan finde sted med enzymer, men de eksisterende enzymer er ikke effektive nok. For at processen kan betale sig, kræver det, at man finder nye enzymer, der kan katalysere hurtig spaltning af cellulosen til glukose. Vi arbejder i øjeblikket på netop dette i et projektsamarbejde med flere internationale partnere.



Figur 1. Nedbrydningsprodukter fra forskellige biomasser, der kan omdannes til ethanol.

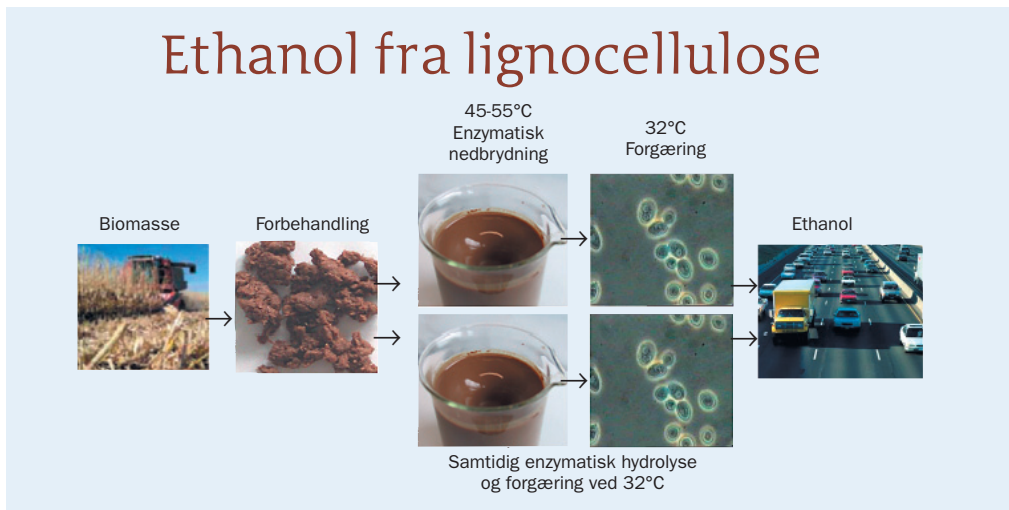
Stort behov for biobrændstof

Ethanol lavet ud fra et biologisk udgangsmateriale betegnes "bioethanol". Udgangsmaterialet er typisk afgrøder, der er rige på stivelse og sukker samt halm og træ. I for eksempel Brasilien er sukrose fra sukkerrør, dvs. almindeligt strøssukker, udgangspunkt for produktion af ethanol, der bl.a. bruges som brændstoftilsætning. I USA og i flere lande i Europa laves der også bioethanol til brændstoftilsætning. Det sker ud fra hhv. majsstivelse og hvedestivelse, som ved hjælp af enzymer nedbrydes

til maltose og glukose, der igen omdannes til ethanol af almindeligt bagegær (figur 1).

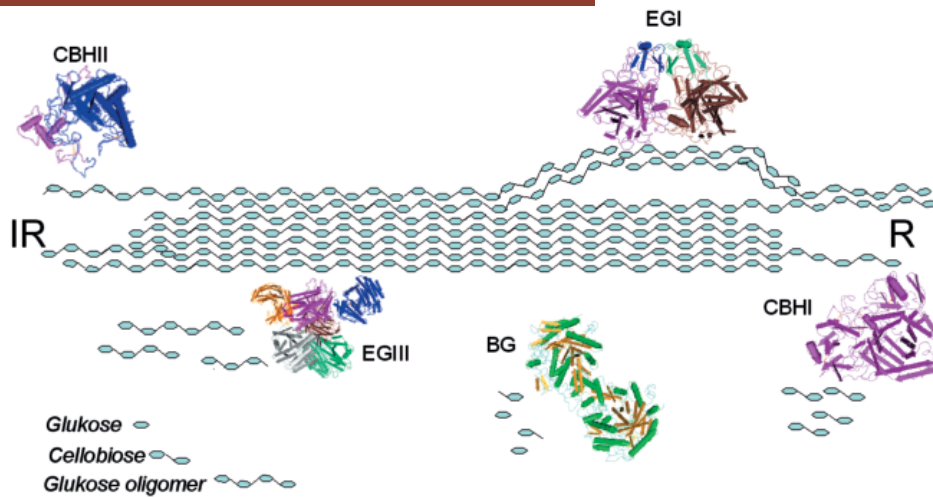
Brasilien og USA leverer over 90 % af det bioethanol, der produceres i verden, og der arbejdes hele tiden på at øge produktionen. I de sidste par år er der på verdensplan produceret ca. 30 millioner liter bioethanol om året ud fra stivelse og sukrose. Denne mængde udgør kun lige under 3% af verdens samlede behov for motorbrændstof. Hvis man fuldt ud skulle erstatte brændstofforbruget med bioethanol ville det kræve så store mængder stivelse, at der vil

blive mangel på majs og korn til dyrefoder og fødevarer. En del af behovet for bioethanol kunne i stedet dækkes via produktion fra cellulose ud fra billige udgangsmaterialer med højt indhold af cellulose, eksempelvis træflis og/eller halm (figur 1 og 2). Cellulose er ligesom stivelse opbygget af lange kæder af glukose (figur 1). Men glukosen er bundet sammen på forskellig måde i stivelse og cellulose. Forskellen betyder, at de kemiske bindinger, der binder de enkelte glukosemolekyler sammen i cellulose, er sværere at nedbryde end bindingerne i stivelse, og dermed også



Figur 2. Procesdesign ved separat og simultan enzymatisk hydrolyse og fermentering.

Enzymatisk nedbrydning cellulose (boks 1)



Den mest anvendte enzymproducerende skimmelsvamp til nedbrydning af cellulose er *Trichoderma reesei*. Kommercielle produkter af enzymkoncentrat fra *Trichoderma* anvendes i vid udstrækning til nedbrydning af forskellige celluloseholdige restprodukter i forbindelse med produktion af

bioethanol. For at få nedbrudt ren cellulose til glukose kræves som minimum 3 enzymaktiviteter:

- 1) cellobiohydrolase (CBH), der katalyserer fraspaltning af to glukoseenheder (cellobiose) ad gangen fra enderne af cellulosekæden
- 2) endoglucanase (EG), der katalyserer spaltning midt i

kæden og som frigiver længere kæder af glukose

- 3) β -glucosidase (BG) nedbryder cellobiose til glukose.

Trichoderma er specielt god til at producere store mængder af disse tre enzymaktiviteter.

sværere at spalte med enzymer. Ydermere sidder cellulose i halm og træ sammen med lignin (se boks). Lignin er en kompleks sammensat substans, der fungerer som en slags molekylær lim, som gør halm og træ ekstra hårdt og robust ude i naturen. Lignin kan kun vanskeligt nedbrydes, og lignins tilstedeværelse gør enzymernes arbejde med spaltning af cellulose i halm og træ ekstra vanskelig.

Nedbrydning af halm med enzymer

Cellulose kan nedbrydes til glukose af en gruppe enzymer kaldet cellulaser (se boks). Faktisk nedbryder enzymerne ikke selv cellulose, men fungerer som katalysatorer, dvs. de speeder processen op. Uden enzymer er nedbrydningen af cellulose til glukose uendelig langsom. Det kræver flere forskellige enzymer at nedbryde cellulose, fordi

de enkelte enzymer katalyserer spaltningen på forskellig måde og i forskellige områder af cellulosen. Skimmelsvampen *Trichoderma reesei* udskiller nogle af de mest anvendte og mest undersøgte cellulose-spaltende enzymer. Oprindeligt blev den stamme af *Trichoderma*, der benyttes til industriel produktion af disse enzymer og som til stadighed bruges til at katalysere cellulose-nedbrydning, isoleret

på Salomon øerne i den sydlige del af Stillehavet, under 2. verdenskrig af E. T. Reese (heraf efternavnet *reesei*). *T. reesei* blev opdaget under en efterforskning af årsagen til den amerikanske hærs store problemer med mugangreb og forrådnelse af deres telte, faldskærme med mere, der alle var lavet af bomuld (en ren form af cellulose).

I dag er udviklingen af processer til nedbrydning af halm til brug for produktion af bioethanol på et stadie, hvor der skal tilsættes relativt store mængder enzymer for at opnå den ønskede nedbrydning. Det høje enzymbehov får prisen på den endelige bioethanol til at blive højere end prisen på benzin. Prisen er også højere end for bioethanol baseret på stivelse og sukkerholdige afgrøder. Det er derfor klart, at en vigtig forudsætning for at komme videre i udviklingen af nye processer til bioethanolproduktion er at identificere bedre enzymer til effektiv nedbrydning af cellulose.

Bedre enzymblanding søges!

Vi arbejder derfor på at finde en enzymblanding, der mere effektivt kan nedbryde cellulosen fra halm – eller rettere sagt, fra forbeholdt halm. Forbehandling af halmen spiller en vigtig rolle, fordi halmen indeholder komponenter, herunder lignin, der ikke umiddelbart kan laves til ethanol (se boks). Med udgangspunkt i et kommercielt enzympræparat med enzymer fra *Trichoderma*, undersøger vi om andre skimmelsvampe producerer enzymer, der kan forbedre virkningen af enzymerne fra *Trichoderma*. Dette gøres ved at tilsætte enzymer ekstraheret fra andre skimmelsvampe til det kommercielle *Trichoderma*-enzympræparat og måle, hvor meget cellulose der nedbrydes i forhold til det der kom ud af at bruge det oprindelige enzympræparat. Vores mål er at identificere nye enzymaktiviteter, som er mere effektive og mere stabile, og derfor resulterer i en hurtigere og/eller højere nedbrydningsgrad af cellulose.

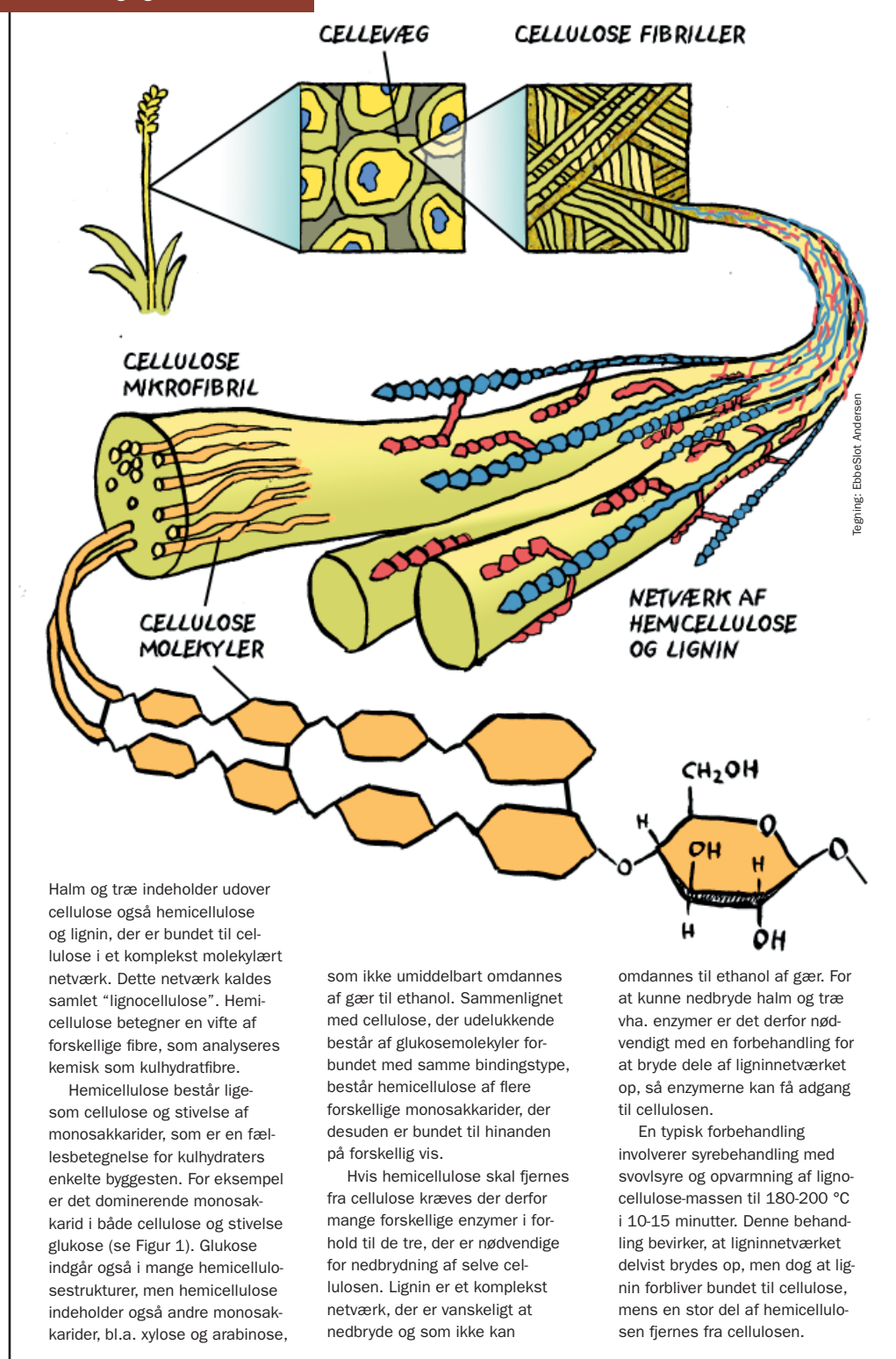
Afprøvning af nye enzymer

En måde at gøre "biomasse-til-ethanol" processen effektiv er således at gøre enzymerne mere effektive. Dels kan *sammensætningen* af enzymblandingen forbedres, så de forskellige enzymer er til stede i et optimalt forhold, og dels kan de enkelte enzymeres *effektivitet* og *robusthed*, specielt deres stabilitet under høje temperaturer, forbedres. Forholdet imellem de forskellige enzymer må formodes at være optimalt for *Trichoderma* i naturen til nedbrydning af cellulose i dødt plantemateriale. Men i forbindelse med produktion af bioethanol, er det forbedret cellulose, man ønsker nedbrudt ved højere temperatur og meget hurtigere end det vil foregå i naturen. Når nye enzymer ekstraheret fra andre skimmelsvampe end *Trichoderma* skal testes, må det ske ved betingelser, hvor det vil være muligt at se en effekt af de nye enzymer. Derfor tilsættes enzymerne i tilpas lav mængde, så der levnes plads til forbedring af cellulosenedbrydningen. Det er også vigtigt at overveje, hvilke reaktionsbetingelser testen skal foregå ved, da andre typer skimmelsvampe kan virke bedre ved andre betingelser end *Trichoderma*-enzymene. Vha. forskellige statistiske forsøgsdesign kan man afprøve forskellige reaktionsbetingelser og ud fra resultaterne bestemme, hvilke betingelser der er optimale, og hvilke, der afhænger af hinanden.

En eller to processer

Som hovedregel vil enzymeres reaktionshastighed øges og ofte fordobles for hver gang temperaturen øges med 10 °C. Dog kun indtil en vis grænse, hvor enzymet ødelægges på grund af for høj varme. Den øgede reaktionshastighed ved høje temperaturer betyder, at de processer, som enzymerne speeder op, bliver ekstra hurtige. På grund af den øgede reaktionshastighed af enzymer ved høje temperaturer, tilstræber man selvfølgelig, at nedbrydningen af cellulose foregår ved så høje temperaturer som muligt. Det er derfor mest interessant at afprøve

Cellulose og lignin



Halm og træ indeholder udover cellulose også hemicellulose og lignin, der er bundet til cellulose i et komplekst molekylært netværk. Dette netværk kaldes samlet "lignocellulose". Hemicellulose betegner en vifte af forskellige fibre, som analyseres kemisk som kulhydratfibre.

Hemicellulose består ligesom cellulose og stivelse af monosakkarider, som er en fællesbetegnelse for kulhydraters enkelte byggesten. For eksempel er det dominerende monosakkarid i både cellulose og stivelse glukose (se Figur 1). Glukose indgår også i mange hemicellulosestrukturer, men hemicellulose indeholder også andre monosakkarider, bl.a. xylose og arabinose,

som ikke umiddelbart omdannes af gær til ethanol. Sammenlignet med cellulose, der udelukkende består af glukosemolekyler forbundet med samme bindingstype, består hemicellulose af flere forskellige monosakkarider, der desuden er bundet til hinanden på forskellig vis.

Hvis hemicellulose skal fjernes fra cellulose kræves der derfor mange forskellige enzymer i forhold til de tre, der er nødvendige for nedbrydning af selve cellulosen. Lignin er et komplekst netværk, der er vanskeligt at nedbryde og som ikke kan

omdannes til ethanol af gær. For at kunne nedbryde halm og træ vha. enzymer er det derfor nødvendigt med en forbehandling for at bryde dele af ligninnetværket op, så enzymerne kan få adgang til cellulosen.

En typisk forbehandling involverer syrebehandling med svovlsyre og opvarmning af lignocellulose-massen til 180-200 °C i 10-15 minutter. Denne behandling bevirker, at ligninnetværket delvist brydes op, men dog at lignin forbliver bundet til cellulose, mens en stor del af hemicellulosen fjernes fra cellulosen.

enzymer fra såkaldte "termofile skimmelsvampe", dvs. skimmelsvampe, der kan tåle temperaturer helt op til 50-65 °C, og som derfor højest sandsynligt også producerer enzymer, der kan virke ved disse høje

temperaturer. Desuden skal skimmelsvampene helst være isoleret fra steder, hvor det har været nødvendigt eller fordelagtigt for skimmelsvampen at kunne nedbryde cellulose, ligesom *T. reesei* oprindeligt

blev isoleret fra bomuldstele. Derfor tester vi enzymer fra mange forskellige slags skimmelsvampe.

Som nævnt foregår produktionen af bioethanol ud fra cellulose i to trin, hvor cellu-



Halm kan blive et af fremtidens råmaterialer til bioethanol.

Energipolitik og bioethanol

Udviklingen af bioethanol foregår i hele verden og drives både af myndigheder, universiteter og via store forskningsprogrammer i industrien. Inden for EU satses der meget på udvikling af forskellige biobrændstoffer, herunder bioethanol, som en metode til at reducere CO₂ (kuldioxid) niveauet. I øjeblikket vurderer man i EU, at udstødningsgasserne, der kommer i forbindelse med bilkørsel på benzin og diesel tegner sig for 84% af transportsektorens udledning af CO₂. På grund af dette problem er det Europakommissionens erklærede mål at have erstattet 20% af det konventionelle motorbrændstof til biler, dvs. benzin og diesel, med alternative brændstoffer, bl.a. bioethanol, i år 2020. Faktisk har man siden 1998 ønsket at øge markedsandelen for biobrændstoffer med en takt på 2% om året.

Danmark ligger med fremme i front i forbindelse med forskningen i alternative biobrændstoffer og nye bioethanolprocesser, samt inden for udviklingen af nye cellulosededbrydende enzymer. Forskningen sker bl.a. ved ELSAM, Novozymes, Risø Forskningscenter, og på Danmarks Tekniske Universitet. I forhold til Sverige er vi dog bagefter med rent praktisk at fremme mulighederne for at tanke bioethanol på bilen, for slet ikke at tale om besluttet at markedsføre bioethanoldrevne biler, som man dog har gjort i Sverige – med succes – i de sidste par år.

losen først nedbrydes til glukose (denne proces kaldes også hydrolyse), hvorefter glukosen forgæres til ethanol. Det er muligt at køre begge disse trin i én produktionsgang ved at tilsætte enzymer og gær samtidig til cellulosen (simultan proces, figur 2). Herved opnår man, at

gæren forbruger glukosen lige så snart enzymerne har frigivet den fra cellulosen. Dette er en fordel, da enzymerne aktivitet hæmmes af den glukose, de frigiver. Men der er også en bagside af medaljen: De fleste tilgængelige gærtyper arbejder ikke særlig effektivt ved tem-

peraturer højere end 32 °C, og man må derfor gå på kompromis med temperaturen og dermed med enzymerne aktivitet, hvis man lader de to processer forløbe samtidig. I stedet kan man først udføre den enzymatiske nedbrydning ved høj temperatur for at give enzymerne optimale reaktionsbetingelser, og dernæst sænke temperaturen, så gæren får optimale betingelser til selve omdannelsen af glukose til ethanol (separat proces, se figur 2).

Hvilken processtype, der er mest effektiv, afhænger i sidste ende af, om det er mest favorabelt at:

- 1) forhindre enzymerne i at blive hæmmet af deres produkt, glukosen, og lade processen forløbe over længere tid *eller*
- 2) at dele processen op i to (dvs. hydrolyse efterfulgt af forgæring) og dermed opnå høje koncentrationer af glukose ved kortere reaktionstid.

Når man leder efter nye typer af enzymer må man derfor overveje, hvilken type proces enzymerne skal bruges til, idet det vil være ligegyldigt at jage enzymer, der kan fungere ved høj temperatur, hvis processen skal forløbe ved ca. 32 °C på grund af gæren.

Stadig rum for forbedringer!

Når man tager i betragtning, at den mest kendte og benyttede skimmelsvamp til produktion af cellulosededbrydende enzymer blev isoleret for næsten 60 år siden fra bomuldsstof i et varmt klima, er det nærliggende at forestille sig, at det vil være muligt at isolere nye mere effektive skimmelsvampe i naturen. Ved Novozymes har vi undersøgt mange forskellige typer skimmelsvampe af forskellig oprindelse i jagten på bedre og mere effektive enzymer til at nedbryde cellulose. Denne jagt har allerede resulteret i en kraftig reduktion i omkostningerne til enzymkatalyseret nedbrydning af cellulose. Processen og designet heraf kan dog stadig gøres mere effektiv, og det arbejder vi derfor ufortrødent videre på! ■

Om forfatterne



Lisa Rosgaard er cand. agro, ph.d. studerende på BioCentrum-DTU på et projekt finansieret af Novozymes A/S og EU.

E-mail: LRSRG@novozymes.com

Sven Pedersen er afdelingsleder, ph.d., Starch, Novozymes A/S, 2880 Bagsværd.



Anne Meyer er lektor, BioCentrum-DTU, DTU 2800 Kgs. Lyngby.

E-mail: am@biocentrum.dtu.dk

Videre læsning:

Bioenergi er blevet moderne, *RisøNyt*, 4, december 2003.

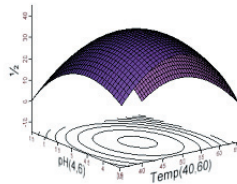
Produktion af lignocellulose nedbrydende enzymer i skimmelsvampe. Jørgensen, H., Olsson, L. *Dansk kemi*. Årg. 83, nr. 11 (2002).

Bioalcohol Fuel Foundation (BAFF). Newsletter No.1. Maj 2004.

Bioenergi i brændpunktet *Momentum*, 3, 2004.

EU direktiv 2003/30/EC, 8. maj 2003, Om: Fremme af brugen af biobrændstoffer i transportsektoren" [sprog: engelsk]; http://europa.eu.int/eurlex/en/liffrg/en_register_07.html

udelades....



for lille...

Figur 3. Modellering af nedbrydning af cellulose med enzymkoncentrat fra *Trichoderma* som funktion af pH og temperatur. Eksemplet viser nedbrydningen af forbeholdt bygalm vha. *Trichoderma* enzymproduktet Celluclast®. Figuren er resultatet af en test af sammenhængen imellem temperatur og pH, og hvordan nedbrydningen af cellulose påvirkes når pH og/eller temperatur ændres. På toppen af modellens flade findes den optimale kombination af pH og temperatur (pH 4,8; 50 °C). Vha. modellen kan man få et bud på, hvad nedbrydningsgraden af cellulose vil være til enhver kombination af temperatur og pH. I undersøgelser af enzymekstrakter fra andre typer svampe end *Trichoderma* vil modellens overflade ændres, afhængigt af hvorvidt enzymekstraktet fungerer bedre ved andre betingelser – f.eks. højere temperatur eller lavere pH.