Fremstilling af bioethanol fra halm

En øvelsesvejledning. Version 6.0 – 26/6-08

Forord

Denne øvelsesvejledning er udformet primært på baggrund af vejledninger til biologisktekniske forsøg, som er forfattet af Jørgen Braad Jørgensen og tilgængelige via EMU. En meget stor tak lyder herfra til Jørgen Braad Jørgensen – Tornbjerg Gymnasium. Ligeledes var gennemarbejdning og optimering af denne øvelsesvejledning ikke sket uden den hjælp som Birgit Justesen – Nærum Gymnasium samt Ph.D. Hans Sejr Olsen – Novozymes A/S har bidraget med. Mange tak.

Christoffer Norn
Ekstern vejleder på
Lyngby Tekniske Gymnasium

Simon Guldberg Poulsen
MSc Eng at DTU Biosys
Biotech Academy

Introduktion

Formålet med denne øvelse er at fremstille bioethanol ud fra halm eller andre celluloseholdige substrater som papir. Som beskrevet i det tilknyttede projekt på **biotechacademy.dk**, er nedbrydningen af lignocellulose til monosaccharider en vanskelig og energisk krævende proces. Der kræves en grov forbehandling af halmen, før enzymer kan udføre det finere arbejde med at nedbryde polymerer af glukose og andre monosaccharider. Disse ting vil du selv få lejlighed til at prøve af.

I øvelsen får du således mulighed for selv at simulere hele processen fra halm til bioethanol. Et substrat klippes eller blendes i småstykker og koges i syre. Hernæst tilsættes de rette industrielle enzymer til suppen, og den, over tid, frigivne glukose måles. Når substratet er nedbrudt, er det tid til at fermentere glukosen til ethanol – hertil vil gæren Saccharomyces cerevisiae anvendes. Under den anaerobe vækst omdanner gæren langsomt glukose til ethanol, CO2 og energi til egen vækst. Du vil kunne følge dannelsen af bioethanol via gaschromatografi. Endelig destilleres den dannede ethanol fra og derefter kan du finde udbyttet i forhold til det teoretisk mulige.

Såfremt det af økonomiske, tidsmæssige eller andre årsager ikke er muligt at gennemføre hele forsøget fra start til slut, kan de enkelte delmomenter snildt tilpasses til at stå alene. Alt efter mulighederne, kan man vælge til og fra blandt de beskrevne muligheder for målinger og også køre øvelsen i flere forskellige sværhedsgrader.

Hvis du har spørgsmål af enhver art til øvelsen, er du meget velkommen til at kontakte forfatterne via vores site. Så vil vi forsøge at hjælpe bedst muligt, hurtigst muligt.

Rigtig god fornøjelse!

Formalia

I det følgende gives en liste over apparatur, kemikalier, substrater og enzymer som bruges i øvelsen. Desuden gennemgås de nødvendige sikkerhedshensyn. Bemærk, at hvis nogle ting ikke er tilgængelige for jer, kan man i nogle passager godt nøjes med egne kreative metoder. Erfaringsmæssigt er forbehandlingen af halmen dog meget vigtig, hvortil en autoklave er nødvendig. Haves en sådan ikke, kan man forsøge at bruge papir i stedet for halm og så koge i svag syre i en ildfast beholder (et bægerglas er at foretrække for at undgå opløsning af eventuel metalbeholder) (jf. punktet 1 på side 5).

>> Apparatur

- Laboratoriekitler. Desuden mindst ét sæt beskyttelsesbriller og -handsker.
- Autoklave + sølvpapir og autoklavetape. Eller gasflamme og ildfast beholder, fx en gryde.
- Termostateret vandbad (30-60°C) med omrystning, alternativt omrøring vha. magnetomrører. Ellers kan et varmeskab bruges.
- Glukometer. Købes relativt billigt på apoteket med tilhørende målesticks.
- Vægt. Gerne en nøjagtig analysevægt.
- Ionbytter. Demineraliseret vand vil være en fordel at have til rådighed.
- Indikatorpapir eller pH-meter.
- Koniske kolber eller bluecap flasker 500 mL, gerne én af hver pr. forsøg man vil lave. Skruelåg eller propper til disse, meget gerne med plastik gæringsrør. Bluecap falsker er gode at bruge under forbehandlingen (punkt 1 og 2 nedenfor), mens fermenteringen (punkt 3) fungerer bedst i tætte kolber med gæringsrør.
- Engangspipetter. Autoklaveres gerne inden brug.
- Målekolber eller måleglas på mindst 1 L.
- Eppendorfrør eller små plastik reagensglas med skruelåg.
- Blender, sakse, morter med pistil alt efter valg af substrater. Se punkt 1 nedenfor.
- Fintnettet si eller Büchnertragt til skylning af forbehandlet substrat.
- Opstilling til destillation (jf. afsnit 4.3-5 s 6). Et pygnometer eller analysevægt er nødvendigt, samt et antiskum-middel (Sigma A8311).

EKSTRA, er ikke nødvendigt udstyr (jf. punkt 4)

- Gaschromatograf (GC) til måling af ethanolkoncentrationen under fermenteringen.

  ~ Ved brug af GC skal fermenteringsprøverne filtreres og mikrofiltre samt sprøjter er derfor nødvendige. Hver prøve suges op fra Eppendorfrøret (se punkt 3 nedenfor) og filtreres ned i et nyt rør. Hernæst injiceres få µL til GC kolonnen, hvori en inert bæregas driver stofferne i prøven frem. En kemikyndig skal være tilknyttet for at gennemføre disse målinger og hjælpe til ved analysen af de resulterende chromatogrammer mod en intern standard. For teorien bag GC henvises til de gængse undervisningsbøger i kemi i gymnasiet.

>> Substrater, gær og kemikalier

- Fermenteringsorganisme: Et par pakker almindelig frisk pressegær eller tilsvarende tørgær (bagegær, Saccharomyces cerevisiae). Podning og fermentering sker ved 30°C og der bruges 10 g pr. flaske.
- Substrater: For at gøre øvelsen mest muligt realistisk, er det bedst at bruge halm som substrat. Mange andre celluloseholdige biomasser, fx bomuld, hvidt toiletpapir, filterpapir eller skrivepapir, kan dog også prøves af. Disse vil være lettere at hydrolysere end halm, hvorfor de kan være en mulighed hvis man ikke er i besiddelse af en autoklave. Der skal bruges 15 g substrat pr. flaske.
- Koncentreret svovlsyre, 98% H_2SO_4 (R35 S1/2 S26 S30 S45). OBS: Alvorlig ætsningsfare! Syre hældes i vand, aldrig omvendt! Svovlsyren håndteres alene af læreren. Brug beskyttelsesbriller og handsker. Mindre koncentrerede opløsninger kan anvendes, idet der så blot beregnes rumfanget heraf, for at give en 1 vol.% H_2SO_4 opløsning i 150 mL (jf. punkt 1 nedenfor).
- Citronsyre, $C_6H_8O_7$ (R36/38 S24/25). En biologisk kompatibel 0,1 M citrat puffer laves heraf ved at opløse 20 g citronsyre pr. 1 L demineraliseret vand i målekolbe eller -glas og tage denne opløsning op til pH = 5 med tilsætning af 2 M NaOH. Bemærk at der skal bruges 500 mL puffer pr. flaske.
- 2M NaOH (R35 S1/2 S26 S37/39 S45) og 2M HCl (R34 R37 S26 S36 S45) til justering af pH. Andre koncentrationer af syren og basen kan anvendes.
- Gærekstrakt. Det forbedrer fermenteringen, men er nok ikke strengt nødvendigt.

>> Enzymer

Følgende to hydrolaser, som er produceret af Novozymes A/S, kan rekvireres via dette link http://www.easj.dk/enzymer/. Såfremt der ikke er mulighed for indkøb af begge enzymer, anbefales det at Celluclast anvendes alene.

Substrat	Enzym	Temperatur, °C	pH
Celluloseholdigt	N. Novozym 188 C. Celluclast 1,5 L FG	50-65 40-60	4,5-5,5 4-6

Novozym 188 er en β-glucosidase – Skærer β-1,4 bindinger i cellobiose og andre oligosaccharider under frigivelse af glukose. Celluclast 1,5 L FG er et cellulasekompleks – Dette kompleks af enzymenheder katalyserer nedbrydning af cellulose til glucose og cellobiose samt længere oligosaccharider. Du kan læse om disse enzym-typer i afsnittet Nedbrydning af lignocellulose på projekts side på biotechacademy.dk.

>> Sikkerhedskrav

Generelt almindelige laboratorieregler (Agesen et al., 1991). De anvendte enzymer er begge mere eller mindre potente allergener. Derfor håndteres disse fornuftigt, hvilket vil sige at berøring med enzymopløsningerne og indånding af aerosoler herfra undgås. Dette gøres i praksis ved at anvende handsker under håndteringen og undgå unødvendig rystning af

opløsningerne når disse er åbne. Hvis arbejdspladser med udsug haves skal disse anvendes. Luk alle flasker før rystning og fjern spild med fugtig engangsklud (Olsen, 2006).

Observér følgende Risiko/Sikkerhedssætninger for de anvendte kemikalier.

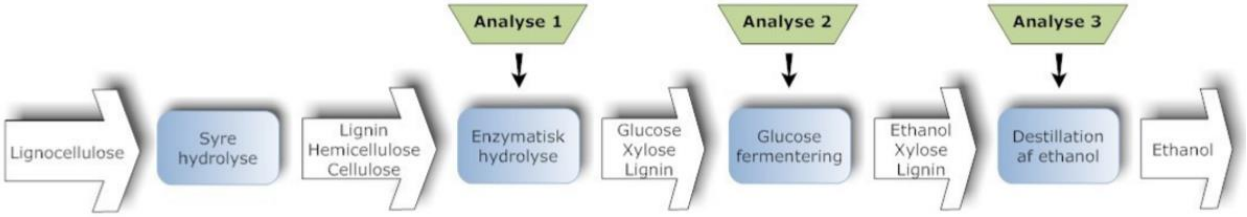
Ved brug af koncentreret svovlsyre er den det farligste kemikalie: Håndteres alene af læreren (Husk: Syre hældes i vand, ikke omvendt.). Brug beskyttelsesbriller og syrefaste handsker! De andre kemikalier: Undgå berøring eller indånding heraf. Brug kittel og gerne beskyttelsesbriller og handsker.
Generelt gælder det at man ved spild på hud eller tøj skyller med rigelige mængder vand.

R34 Ætsningsfare
R35 Alvorlig ætsningsfare!
R36/38 Irriterer øjnene og huden

S24/25 Undgå kontakt med huden og øjnene
S26 Kommer stoffet i øjnene, skylles straks grundigt med vand og læge kontaktes.
S30 Hæld aldrig vand på eller i produktet.
S36 Brug særligt arbejdstøj (dvs. kittel, briller og handsker)
S37/39 Brug egnede beskyttelseshandsker og -briller/ ansigtsskærm under arbejdet.
S45 Ved ulykkestilfælde eller ved ildebefindende er omgående lægebehandling nødvendig; vis etiketten, hvis det er muligt.

Fremstilling af bioethanol

Så starter selve showet!! Det bemærkes, at de indgående forsøgsmomenter nødvendigvis må løbe over et antal dage, men at der er tale om venten mens den enzymatiske hydrolyse og senere fermenteringen kører. Udtagning af prøver i disse tidsrum kan ske helt afhængig af, hvad der er tid til og praktisk mulighed for. Vi anbefaler dog, at man i begge perioder tager prøver mindst én gang om dagen i de første 3 dage efter at hhv. enzymatisk hydrolyse og fermentering er startet.



Figur 1 – *Oversigt over de indgående forsøgstrin og analyser. Hvert moment er beskrevet nedenfor, og det skal bemærkes, at man, alt efter detilstedeværende muligheder, kan vælge at udføre hele øvelsen eller et mindre antal trin og analyser.*

0. Generelle retningslinjer og forberedelser

a. I det følgende arbejde skal der flere gange udtages prøver fra kolberne. Hver gang en flaske åbnes er der en vis risiko for kontaminering med fremmede bakterier og svampesporer i flasken – dette er naturligvis uønsket. Grundet brugen af høje temperaturer, syre og til sidst høj koncentration af gær under selve fermenteringen, er risikoen dog ikke så stor. Podning og prøveudtagning kan derfor ske uden særlig hensyntagen til sterilitet.

1. Grov forbehandling med svovlsur hydrolyse

a. 15,0 g af hvert af de ønskede substrater klippes, blendes og/eller stødes i småstykker og opslemmes i 150 mL vand + 1,5 mL konc. svovlsyre (giver 1 vol.%) i flaske eller kolbe. Opslæmningerne skal være flydende nok til at omrøring kan ske.
b. Opslæmningerne autoklaveres i 1 time ved 120°C, hvorefter pH justeres til 4,8 med 2M NaOH. Det forbehandlede substrat hældes nu på en fin si og skylles et par gange med vand for at fjerne sulfaten og andre salte generelt. Dette kan også gøres i en Büchnertragt med filterpapir i.
c. Den skyllede masse kommes tilbage i flasken og 500 mL puffer tilsættes (jf. Citronsyre s. 3).

2. Enzymatisk hydrolyse af cellulosen til monosakkarider

a. Tilsæt til hver flaske 1 mL Novozym 188 og 4 mL Celluclast 1,5 L FG og luk flaskerne. Ryst dem dernæst grundigt. Noter tidspunktet. Kolberne/flaskerne placeres nu i vandbad med omrøring/rystebad eller i varmeskab ved 50°C i mindst 4 dage. Jo længere tid jo bedre.

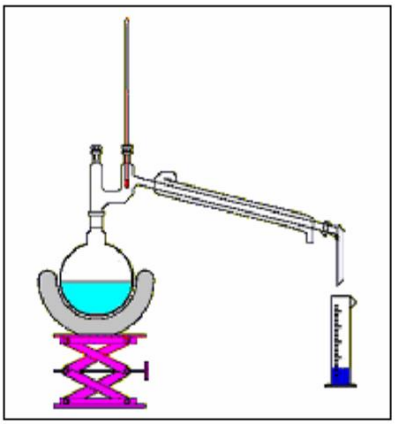
b. Ryst jævnligt flaskerne og tag prøver (en gang om dagen hvis det er muligt) a 0,5 mL ud med engangspipetter og mål glukosekoncentrationen med glukometeret. En fortynding af prøven, bemærk fortyndingsfaktoren, er formentlig nødvendig, idet glukose koncentrationen hurtigt vil overskride analysegrænsen for apparatet. Noter tidspunkt og koncentration i dataarket (jf. Databehandling og analyse s. 7). Dette er analyse 1, jf. Figur 1.
c. Efter de 4 dage er glukose frigivelsen nået langt og fermenteringen kan startes.

3. Fermentering – forgæring af hexoser

a. Kolberne med hydrolyseret substrat afkøles til 30°C og 1 g gærekstrakt tilsættes eventuelt til hver flaske. Dette er et must hvis der bruges papir substrater, idet disse ikke indeholder salte og næringsstoffer for gæren. pH forbliver uændret.
b. Mål startkoncentrationen af glukose før fermenteringen.
c. Tilsæt 10 g gær til hver flaske og ryst indtil klumpen er opløst. Noter tidspunktet. Overfør dernæst indholdet til koniske kolber.
d. Luk kolberne med propper med gæringsrør og placer dem i vandbad uden omrøring eller i varmeskab ved 30°C i mindst 4 dage – gerne længere tid. Glukosekoncentrationen skal gerne falde helt til nul.
e. Ryst jævnligt kolberne og udtag mindst 3, gerne flere, prøver a 0,5 mL med engangspipetter fra hver kolbe gennem fermenteringen. Glukosekoncentrationen i prøverne måles igen med glukometeret. Noter tidspunkt og koncentration i dataarket (jf. Databehandling og analyse s. 7). Dette er analyse 2, jf. Figur 1.
f. Man kan vælge at følge dannelsen af ethanol i stedet for forbruget af glukose. Hvis man ønsker det, udtages i stedet 1,5 mL prøver hver gang. Disse overføres til Eppendorfrør og undersøges dernæst for ethanolindhold ved gaschromatografi, jævnfør punkt 4. Hvis det er muligt, spinnes cellerne i prøven ned i en centrifuge. Prøverne kan med fordel løbende udtages og fryses i lukkede Eppendorfrør, indtil de alle kan tøs op og analyseres på én gang. Det er vigtigt at holde prøverne lukkede og kolde for at minimere fordampningen af ethanol.

4. Destillation og kvantificering af den dannede ethanol

a. Hele den fermenterede blanding overføres til en rundkolbe, som placeres i en varmekappe. Bemærk:
   i. At rundkolben ikke må være mere end halvt fuld.
   ii. Destilleres kun en del af den fermenterede blanding så husk at notere volumen af den udtagne fraktion.
b. Tilsæt få dråber antiskum-middel.
c. En destillationsopstilling samles, lignende den afbilledet til højre. Målekolben til højre skal gerne kunne aflæses præcist til to decimaler!
d. Der destilleres til destillatet har et volumen på omkring 30 ml. Det tager omkring en time. Al ethanol antages at overføres. Noter volumenet af destillat.



e. Herefter bestemmes densiteten af destillatet med et pygnometer. Alternativt kan man udtage et nøjagtigt volumen med pipette, som derefter afvejes på analysevægt. HUSK, at lave mindst dobbeltbestemmelse af densiteten. Densitet = masse/volumen eller $\rho = m/V$. Dette er analyse 3, jf. Figur 1.
f. På baggrund af tabelværdier omregnes den fundne densitet til %-ethanol (se Dataark.xls).
g. Når mængden af dannet ethanol kendes i gram og dermed mol, kan man regne tilbage og finde udbyttet af ethanol og sammenligne den teoretisk mulige mængde (se Dataark.xls).

I stedet for at destillere, eller som supplement hertil, kan man vælge at følge dannelsen af ethanol gennem fermenteringen (jf. punkt 3.6 ovenfor). Hertil anvendes gaschromatografi, og der henvises til punktet EKSTRA under Apparatur ovenfor.

Databehandling og analyse

I det følgende findes tabeller, hvori I kan notere jeres optagne målinger. Al efterfølgende databehandling foregår på siderne Måledata, Destillation samt Beregninger på Dataark.xls.

1. Enzymatisk hydrolyse (et eksempel er givet på Dataark.xls)

	Glukose koncentration i mM eller g/L				
Tid / timer	C_{glu}A	C_{glu}B	C_{glu}C	C_{glu}D	C_{glu}E
0	0	0	0	0	0

A, B, C osv. svarer til de forskellige anvendte substrater eller gruppernes flasker hvis I har brugt ét substrat. Tidspunktet t = 0 er ved tilsætning af enzymer, punkt 2 ovenfor.
Enzymer tilsat: kl. _____ dato _____.

2. Dataark for fermenteringen

	Glukose koncentration i mM eller g/L				
Tid / timer	C_{glu}A	C_{glu}B	C_{glu}C	C_{glu}D	C_{glu}E
0	0	0	0	0	0

Tidspunktet t = 0 er ved tilsætning af gær, punkt 3 ovenfor. **Gær tilsat**: kl. _____ dato _____.

Disse målinger overføres til Excel-arket Dataark.xls, som er tilgængeligt fra projektets side på biotechacademy.dk. Dermed opnås et billede af hydrolysen og fermenteringen mod tiden. Hvis der udføres gaschromatografi, og ethanol-koncentration dermed er målt under fermenteringen, kan disse data også indsættes.

3. Destillation

Af den fermenterede blanding udførtes destillation på (a)_____ mL af i alt (b)_____ mL. Hvis kun en fraktion anvendes må mængden af ethanol ganges med b/a.

Densiteten af destillatet måltes til _____ g/L. I alt var der _____ mL destillat.

Ud fra densiteten findes masse% af ethanol i destillatet. Sammen med volumenet af destillat er det dernæst muligt at beregne massen af dannet ethanol. Denne databehandling foregår på siderne Måledata, Destillation samt Beregninger på Dataark.xls. Spørgsmål til besvarelse er tilgængelige i et separat dokument, som findes på projektets side på biotechacademy.dk.

Kilder

Agesen, H., Fredtoft, E., Girnth, C., Hammelev, D., Hansen, G., Ingvardsen, P., Johnsen, K., Leer, J., Lund, J.P., Nielsen, T.D., Petersen, J.B. & Wilken, B. (eds) 1991, Eksperimentel genteknologi, 1. udgave, 2. oplag edn, Nucleus Forlag ApS, Århus, Danmark.

Olsen, Hans Sejr, Ph.D. August 2006, Anvendelser af enzymer i forbindelse med fremstilling af ethanol, Oplæg til stivelse - ethanol gruppen ved kurset "Praktisk bioteknologi", Erhvervsakademi Roskilde, Novozymes A/S Brewing & Alcoholic Beverages - Bagsværd, Danmark.