



PSO-6412 projektet

Biomasse til biobrændsel og bioethanol i pilotskala

Slutrapport
juli 2006 – april 2009

Udarbejdet af
Jan Larsen



Klippehagevej 22, 7000 Fredericia

1 Projektets forudsætninger og mål

Fremtidens energiforsyning og Kyoto-forpligtelsen til at reducere udledningen af drivhusgasser er for alvor kommet på den globale dagsorden. De fossile energiresourcer, specielt oliereserverne, er begrænsede, og den kraftige vækst i Asien øger efterspørgslen efter energi. Vedvarende energiresourcer (VE) er vigtige ressourcer i fremtidens energiforsyning, og alle ressourcer - sol, vind, bølge, vandkraft, geotermisk og biomasse - må i spil for at sikre fremtidens bæredygtige energiforsyning.

Dansk jordbrug og dets følgeindustrier leverer allerede en betydelig mængde vedvarende energi i form af biomasse til samfundet. Det er især halm, træflis, brænde, biodiesel samt biogas fra husdyrgødning og organisk affald til produktion af el og varme. Biomasse udgjorde i 2003 ca. 55 PJ ud af et samlet energiforbrug i Danmark på 830 PJ. Både for land- og skovbruget er der et stort udviklingspotentiale for biomasseudnyttelse og tilhørende bioteknologikoncepter for produktion af bioenergi – både til el og varme og biobrændstoffer til transport, hvis jordbrug, industri og forskning får de rette rammebetingelser.

DONG Energy (Elsam) var gennem perioden 2003 - 2006 koordinator for et EU projekt (IBUS), der førte frem til en forbehandlingsmetode til halm/helsæd/affald, der muliggør produktion af et alkali- og klorfrit biobrændsel til forbrænding, bioethanol og et foderprodukt. IBUS projektet medførte også opbygning af et af verdens største pilotanlæg til dette formål.

Formålet med dette PSO projekt var at udvikle og optimere en række procesområder ud fra et holistisk processynspunkt, før IBUS processen kan opskaleres til produktionsskala. Processen er kompleks, og optimering af udbytte i et procestrin er ikke nødvendigvis den optimale løsning for processen som helhed.

Med det unikke forsøgsanlæg på Skærbækværket i centrum og et forskningssamarbejde med de samlede danske forskningskræfter indenfor biofuels området (DTU, Risø og Københavns Universitet (KU)) har det gennem dette forskningsprogram af 2½ års varighed været muligt at bringe teknologien til et niveau for videre opskalering. Inbicon er i øjeblikket ved at opføre et demonstrationsanlæg i Kalundborg, hvor op til 4 tons halm i timen kan konverteres til bioethanol, alkali- og klorfrit biobrændsel og C5 melasse. Forskningsprogrammet har bestået af en række forsøgskørsler på IBUS pilotanlægget i Skærbæk samt laboratoriarbejde på de tilknyttede forskningsinstitutioner.

Der er sket en del navneskift på partnerne i løbet af projektet. Elsam blev til DONG Energy, som har udskilt sine IBUS aktiviteter i datterselskabet Inbicon. Landbohøjskolen blev til Københavns Universitet og Risø og DTU blev slået sammen til Risø DTU. Det har dog ikke haft betydning for fremdriften i projektet.

2 Resultater

PSO 6412 projektet har omfattet følgende delprojekter:

2.1 *Hydrotermisk forbehandling af biomasse*

Afdelingen for Planteforskning (BEM), Forskningscenter Risø, har mere end 12 års erfaring med forbehandling af plantebiomasse til ethanol fremstilling. Gennem et mangeårigt samarbejde med DTU har gruppen udviklet analysemetoder til bestemmelse af komponenter i plantebiomasse, herunder bestemmelse af ethanol potentialet, samt karakterisering af produkter fra forbehandling og fermentering. Gruppen har desuden erfaring i procesoptimering og massebalancer. BEM råder over forskelligt udstyr til forbehandling af biomasse og det nyeste analyseudstyr (HPLC, GC, GC/MS) til måling af ønskede komponenter herunder sukkerarter, inhibitorer og fermenteringsprodukter, samt biologiske assays til vurdering af den behandlede biomasse.

I samarbejde med Inbicons teknikere er gennemført en optimering af den hydrotermiske forbehandling. Forbehandlingen udføres i et reaktorsystem, hvor det er muligt at variere temperatur og tryk, samt modstrømsudvaske hemicellulose med vand i forskellige flow systemer. Parametrene cellulose, hemicellulose, lignin, kalium, klorid og inhibitorer har indgået i optimeringen.

2.2 *Enzymatisk hydrolyse ved høje tørstofkoncentrationer*

Afdeling Skov & Landskab (S&L) på Københavns Universitet (KU) har igennem de sidste 10 år forsket i anvendelsen af plantebiomasse til energi. Forskningen har koncentreret sig om biomasse som fastbrændsel til CHP samt produktion af bioethanol på baggrund af land- og skovbrugsafgrøder. S&L har ligeledes stor ekspertise indenfor planters grundlæggende kemi og fysiologi samt kemisk, fysisk og bioteknologisk processering af plantebiomasse. Gruppen ved S&L er blandt de førende indenfor anvendelse af træ som grundlag for CHP, og kan støtte denne viden med grundlæggende forskning af samspillet mellem plantecellens carbonhydrater og lignin. Gruppen har endvidere en omfattende viden omkring processerne i produktionen af træ- og halmpiller til biobrændsel.

Forbehandlet halm produceret ved varierende forbehandlingsbetingelser er testet med hensyn til enzymatisk konverterbarhed og efterfølgende forgæring med bagegær. Der er udført en optimering af enzymatisk hydrolyse af fiberfraktion ved høje tørstofkoncentrationer. Optimeringen omfatter parametrene: cellulose konvertering, reduktion af enzymforbrug, valg af enzymmix, recirkulering af enzymer, adsorption af enzymer på lignin og tilsætning af detergenter.

2.3 Test af mikroorganismer som både kan omsætte C5 og C6 sukre

BioCentrum-DTU er Europa's førende institut inden for bioteknologi og herunder "grøn kemi"- omdannelse af kulhydrater fra biomasse til værdifulde produkter. Afdelingen for Biofuels and Bioprocesses (BB) har en stærk position omkring fermentering af forbe-handlet biomasse til biofuels såsom bioethanol, hydrogen og methan. I gruppen er ud-viklet nye termofile produktionstammer, som kan fermentere i biomassehydrolysat un-der høje sukkerkoncentrationer og med høje yields. Gruppen arbejder endvidere med udvikling af produktionsstammer (gær og bakterier), som foruden selv udtrykker de nød-vendige enzymer, således at hydrolyse og fermentering udføres i et procestrin. En ræk-ke patenter er udviklet i forbindelse med gruppens arbejde.

Lignocelluloseholdige biomasser som halm, nedbrydes til både C6 (glucose) og C5 (xy-lose) sukre. Almindeligt bagegær kan kun omsætte C6. BB vil gennemføre fermenterin-ger med forskellige andre mikroorganismer (gær og bakterier), som kan omsætte både C5 og C6. BB vil være ansvarlig for fermentering med forskellige andre mikroorganismer (gær og bakterier) af forbehandlet biomasse (væske og fiberfraktioner), som produceres under opti-meringen af forbehandlingen. Enzymatisk hydrolyse vil blive udført på basis af standardmetoder med kommercielle enzymer efterfulgt af fermentering med forskellige kombinationer af mikroor-ganismer.

2.4 Separation og anvendelse af alkali- og klorfrit biobrændsel i produkti-on af brændelsespiller

Efter hydrotermisk forbehandling, enzymatisk behandling og fermentering adskilles ethanol fra restfraktionen, som hovedsageligt består af lignin. I Elsams IBUS laboratoriu-m er der arbejdet med udvikling af egnede separationsmetoder til adskillelse af væske-fraktionen fra ligninresten samt karakterisering af brændelsesegenskaberne af den tørre ligninrest. Ligninresten er rensat for kalium og klorid og velegnet som biobrændsel. Det-te restprodukt vil også kunne anvendes som additiv i produktionen af træ- og halmpiller, hvor det ville kunne effektivisere produktionen og forbedre slutproduktet. Anvendelse af ligninresten i pilleproduktion er testet på KU.

2.5 Ensretning af analysemetoder på danske laboratorier

Ved beregning af massebalance efter analyse af råvare prøver, var der ofte ca. 20 % af biomassen der ikke kunne findes som sukker, lignin eller aske. For at prøve at klarlæg-ge noget af denne residual, samt sikre at der ikke "gemmer" sig sukker i lignin-residualen, blev følgende analyser udført: Bestemmelse af ethanol ekstraktiver i resi-dualen (Soxhlet), dobbelt stærk syrehydrolyse, hvor lignin resten hydrolyseres og analy-seres ved HPLC 2. gang for at detektere eventuelle sukre i lignin fraktionen, samt analy-tisk flash pyrolyse med efterfulgt GC-MS på lignin resten igen for at analysere denne for glukaner.

3 Hydrotermisk forbehandling

Der blev kørt en række optimeringsforsøg på IBUS anlægget. I disse forsøg blev proces "severity" varieret ved at variere temperatur og opholdstid, og beregnet ved hjælp af nedenstående ligning:

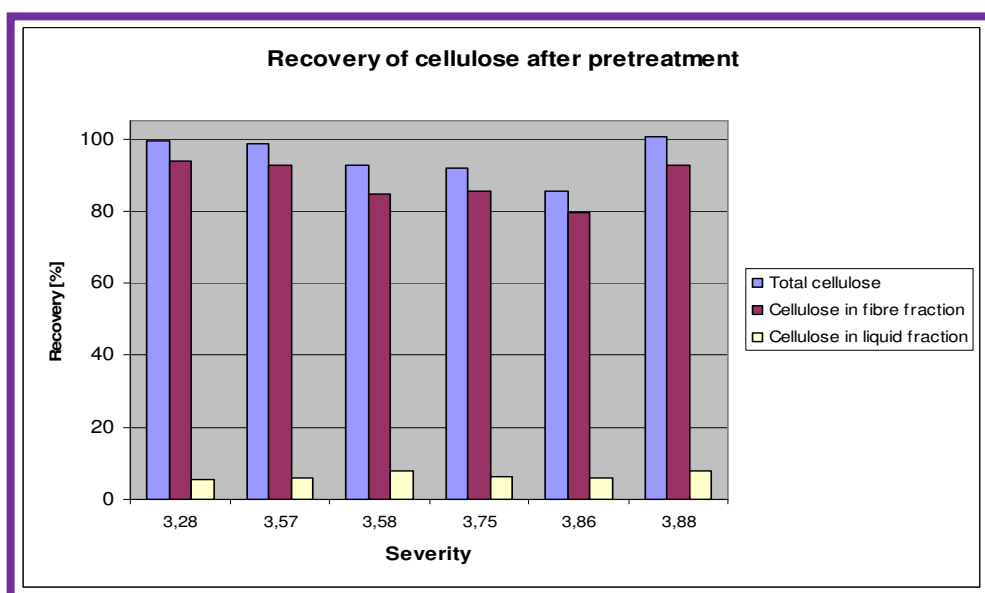
$$\log(R_0) = \log\left(t \cdot \exp\left(\frac{T - T_{ref}}{14,75}\right)\right)$$

Hvor: t: Opholdstid, T: Temperatur, T_{ref} : Reference temperatur (100 °C).

For at bestemme den enzymatiske konverterbarhed af cellulosefibrene efter forbehandlingen blev der lavet SSF forsøg på fiberdelen med *S. cerevisiae* (Bager gær) som beskrevet i (Thomsen et al., 2008).

3.1 Genfinding af cellulose (glukose) efter forbehandling

I alle forsøg er genfindingen af cellulose efter forbehandling over 85 % (figur 1). Fra figuren ses, at mængden af glukose i fiberfraktionen generelt falder, når "severity" stiger, med undtagelse af forsøget med den højeste "severity", hvilket formodentligt skyldes at dette forsøg er kørt ved lavere temperatur men med en længere opholdstid. Den lavere temperatur medfører mindre grad af termisk nedbrydning af sukkeret. Det tab af cellulose, der ses ved høj "severity", vil medføre at der dannes nedbrydnings-produkter (furfural og myresyre), der kan have en inhiberende virkning på gæringen.

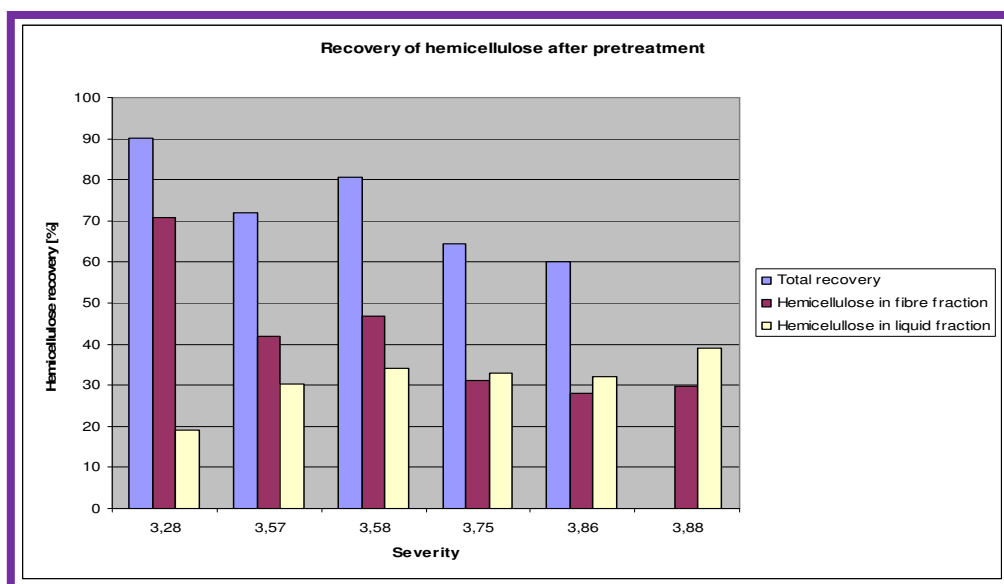


Figur 1: Genfindingen af cellulose efter forbehandling af 50 kg hvedehalm pr. time ved forskellige forsøgsbetingelser. Det totale celluloseindhold i hvedehalmen er 35 % af tørstof.

3.2 Genfinding af hemicellulose (pentose) efter forbehandling

Den totale genfinding af xylose varierer meget mellem de enkelte forsøg – mellem 57 og 93 % (ikke vist), mens genfindingen for total hemicellulose ligger mellem 60 og 90 % (figur 2). I hvedehalm er der generelt ikke er ret stor forskel på, om der ses på genfinding af total hemicellulose eller xylose, da arabinose udgør en meget lille del af hemicellulose polymeren.

Det ses helt tydeligt, at hemicellulose genfindingen er meget afhængig af forbehandlingens "severity". I de fleste forsøg genfindes ca. 30 % af hemicellulosen i væskefraktionen, mens indholdet i fiberfraktionen varierer med "severity" af forbehandling (fra over 70 % ved lav "severity" til under 30 % ved høj "severity"). Det tab af hemicellulose, der ses ved høj "severity", vil medføre, at der dannes nedbrydnings-produkter (hydroxymethyl-furfural, eddikesyre og myresyre), der kan have en inhiberende virkning på gæringen.



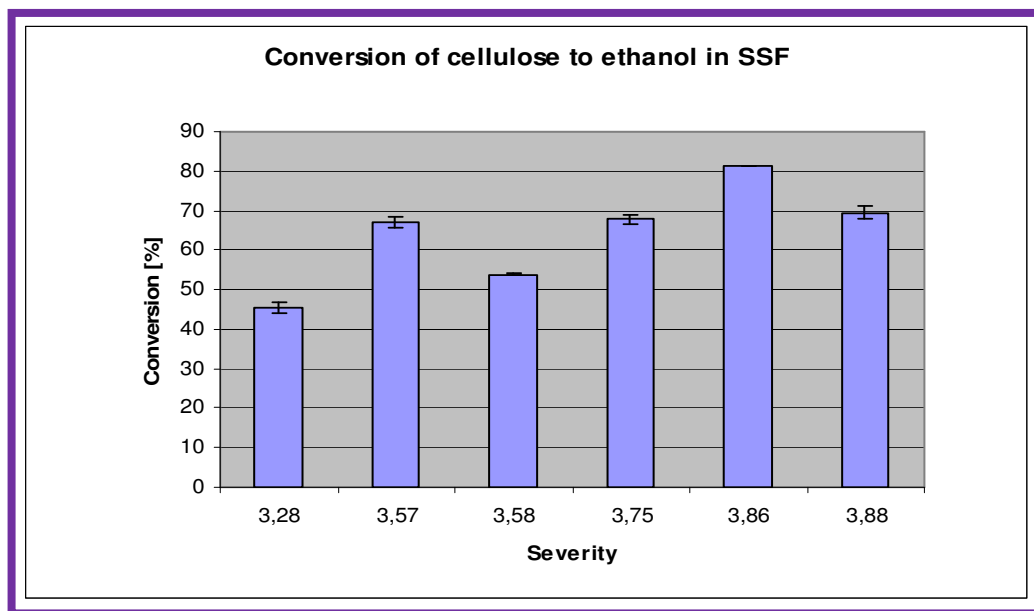
Figur 2: Genfindingen af hemicellulose efter forbehandling af 50 kg hvedehalm pr. time ved forskellige forsøgsbetingelser. Det totale hemicellulose i hvedehalmen er 22,3 % af tørstof.

3.3 Genfinding af lignin efter forbehandling

Genfindingen af lignin ligger i de fleste forsøg over 90 %. Generelt er der høj genfinding af lignin i alle forsøg, og det kan konkluderes, at lignin ikke påvirkes nævneværdigt ved forbehandling. Det tab af lignin, der ses ved høj "severity", vil dog sandsynligvis medføre at der dannes nedbrydnings-produkter (frie phenoler), der kan have en inhiberende virkning på gæringen.

3.4 Enzymatisk konverterbarhed af fiber-fractionen ved SSF

Den enzymatiske konverterbarhed af fibre er undersøgt ved at lave SSF på fibre i pH justeret vand. Derved undgås produktinhibering af enzymerne, da gæren sideløbende med hydrolysen omsætter den producerede glukose til ethanol. Konverterbarheden på fiberprøverne kørt i denne optimeringsrække viser stor variation afhængig af procesparametrene fra ca. 45 % ved lav "severity" til mere end 80 % ved høj "severity" (Figur 3).



Figur 3: Enzymatisk konverterbarhed af fiber-fractionen i pH justeret vand bestemt ved SSF forsøg med *S. cerevisiae* (13 % tørstof – 2 x 15 FPU/g tørstof).

Selv om der er stor variation mellem de enkelte forbehandlingsforsøg, er der meget lille standardafvigelse på gentagelserne af SSF forsøgene (dobbeltsforsøg), hvilket betyder at resultaterne er troværdige. Den højeste konverterbarhed er fundet ved "severity" på 3,86.

3.5 Diskussion af optimeringsforsøgene

Ved forbehandling af lignocellulose materialer er det altid et kompromis mellem at opnå høj konverterbarhed af fiberfraktionen samtidig med at termisk nedbrydning af sukkerpolymerene undgås. I disse forsøg er den højeste konverterbarhed (80 %) fundet ved "severity" på 3,86 men det er også i dette forsøg, at der er fundet den laveste genfinding af cellulose og hemicellulose (ca. 85 % og 60 % respektivt).

Tre forsøg har konverterbarheder på ca. 70 % (serverity: 3,57; 3,75; 3,88), og af disse forsøg er forsøgene ved "serverity" 3,57 og 3,88 de bedste, da sukker genfindingen er højest i disse forsøg (ca. 100 % for cellulose og ca. 70 % for hemicellulose). Disse to forsøg er kørt ved samme temperatur, men med forskellige opholdtider, hvilket viser os, at temperaturen er den vigtigste parameter at optimere på. I disse forsøg er der også en meget høj genfinding af lignin, hvilket er en vigtig parameter i IBUS-processen, hvor lignin-resten (efter SSF) bruges til afbrænding i kraft-varme-værket, og bidrager til energiøkonomien i processen.

3.6 Identifikation af inhibitorer fra den hydrotermiske forbehandling

I nogle af de forsøg der tidligere var blevet kørt på IBUS anlægget (i EU-projektet: ENK6-CT-2002-00650) var der observeret problemer med at køre SSF direkte på det forbehandlede materiale. Der var derfor et ønske om at få identificeret de dannede fermenteringsinhibitorer som kommer fra nedbrydning af sukker og lignin under forbehandlingen.

Væske samt hydrolysat fra 12 forskellige forsøg (kørt ved forskellige proces parametre) blev analyseret:

To-trins forsøg

- 190° C, 195° C, 200° C - 6 min
- 190° C, 195° C, 200° C - 6 min - H₂O₂
- 195° C, 200° C, 205° C - 3 min

Tre-trins forsøg:

- 195° C, 3 min + 180° C, 15 min
- 195° C, 3 min + 180° C, 7.5 min
- 195° C, 3 min + 170° C, 7.5 min

Der blev analyseret for følgende komponenter: eddike syre, myre syre, furan (furfural, 5-HMF, 2-furic acid), samt frie fenoler. Niveauet af inhibitorer blev desuden fulgt under SSF (prøver blev udtaget efter 24, 75 og 145 timer).

I disse forsøg viser gæren stor evne til at "afgifte" hydrolysaterne under SSF ved at omsætte flere af de toksiske forbindelser (der dannes ved forbehandling af halm) f.eks. furfural, 5-HMF, vanillin, syringaldehyde, and hydroxybenaldehyde til de korresponderende alkoholer, som er mindre giftige for gæren (Thomsen et al., 2008).

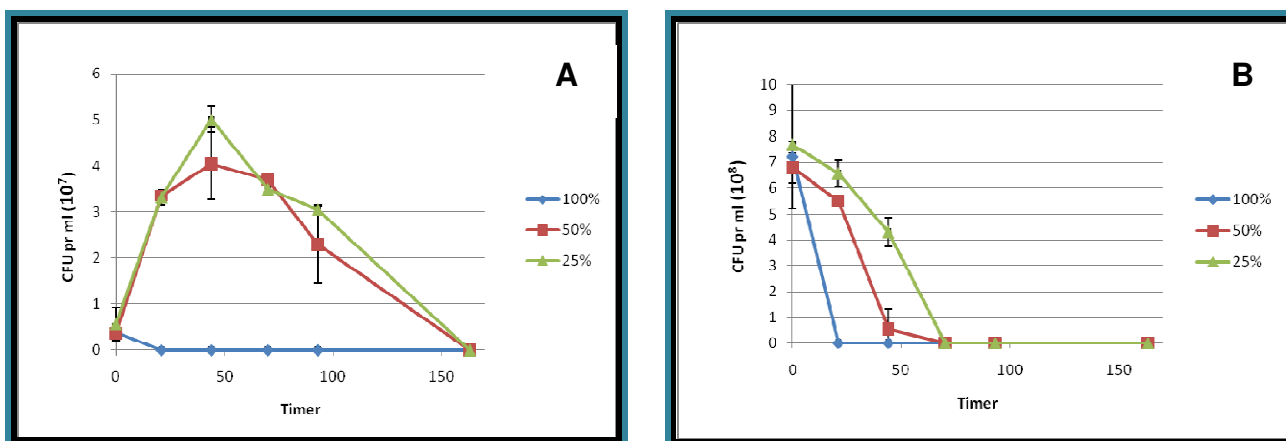
Men resultaterne viser også at flere vigtige fermenteringsinhibitorer f.eks. acetic acid, formic acid, vanillic acid, ferulic acid, and acetovanillone øges under SSF – nogle til koncentrationer der overskrider, hvad gæren kan tåle. Dette kan være forklaringen på, at 45-30% af tilgængelig sukker i hydrolysatet ikke omsættes ved SSF (Thomsen et al., 2008).

3.7 Inhibitor analyse i fermenteringsforsøg

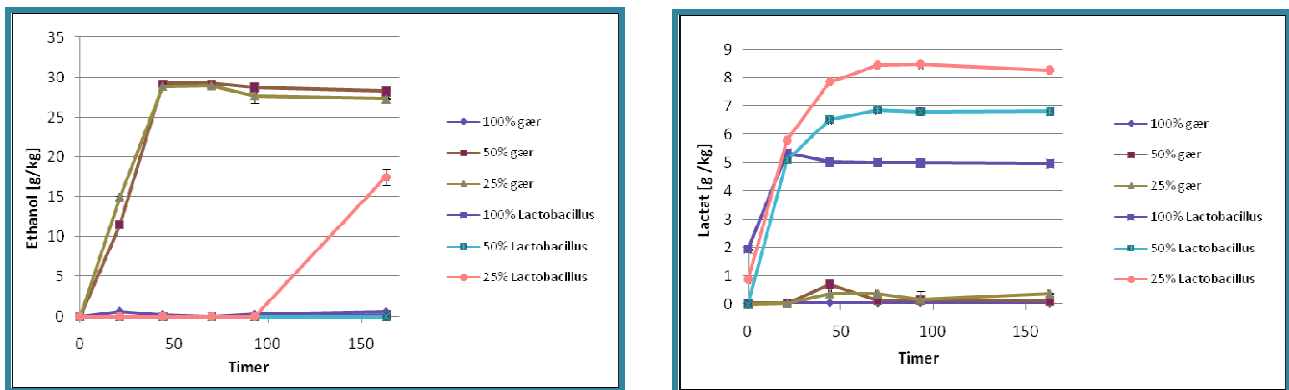
I dette forsøg ønskede vi at undersøge hvilken virkning forskellige koncentrationer af inhibitorer har på vækst af gær og *Lactobacillus* under anaerobe forhold. I væskefraktionen fra IBUS forbehandlingen finder vi den største koncentration af inhibitorer, hvorfor forskellige koncentrationer (100, 50 og 25 %) af væskefraktionen tilsat glukose blev brugt for at undersøge effekten af kombinationen af inhibitorer der er kendetegnende for IBUS forbehandlingen. Der blev udført en lang række inhibitoranalyser på prøver udtaget på forskellige trin i fermenteringsprocessen (jf. 4. halvårsrapport juni 2008). CFU af gær og *Lactobacillus* ses af figur 4 (A og B), mens produktionen af hhv. ethanol og mælkesyre ses af figur 5 (A og B).

I ufortyndet inhibitorvæske dør gæren, og danner ikke ethanol, mens den omsætter glukosen med ens hastighed, ved hhv. 25 og 50 % inhibitorniveau (figur 4A og 5A). Ved disse inhibitor niveauer vokser gæren med en faktor 8-10 over de første 2 døgn, hvorefter CFU falder støt til et lavt niveau dag 7. Gæren formår ikke at fjerne inhibitorer i den ufortyndede væske, mens vigtige inhibitorer så som HMF, furfural og vanilin omsættes delvis i 50 % fortyndingen og fuldstændigt i 25 % fortyndingen.

Lactobacillus CFU forsvinder efter ca. 1 døgn, 2 og 3 ved hhv. 100 %, 50 % og 25 % fortynding af inhibitorvæsken (figur 4B). Dog når *Lactobacillus* at producere mælkesyre i alle 3 behandlinger (figur 5B). Det ser ud til at også *Lactobacillus* kan fjerne en del af HMF og furfural i væske, dog ikke i samme grad som gæren. Som forventet viste forsøget at gær er mere robust overfor inhibitorerne end *Lactobacillus*.



Figur 4 (A) CFU Thermosacch. 100 % er ufortyndet C5 væske, 50 % er fortyndet 1:1, og 25 % er fortyndet 1:4,
(B) CFU *Lactobacillus*. 100 % er ufortyndet C5 væske, 50 % er fortyndet 1:1, og 25 % er fortyndet 1:4.



Figur 5 (A) Ethanol produceret over tid. 100 % er uforyndet C5 væske, 50 % er fortyndet 1:1, og 25 % er fortyndet 1:4. Teoretisk muligt udbytte er ca. 30 g/kg, (B) Lactat produceret over tid. 100 % er uforyndet C5 væske, 50 % er fortyndet 1:1, og 25 % er fortyndet 1:4. Teoretisk muligt udbytte er ca. 60 g/kg.

3.8 Inhibitors toksicitet og indvirkning på gær i fermenteringsforsøg

I dette forsøg laves et syntetisk substrat med en koncentration af de kendte inhibitorer fundet i IBUS-væsken svarende til den koncentration hvor gæren netop kan vokse og producere ethanol. Effekten af de enkelte komponenter på gærens vækst undersøges ved at øge koncentrationen af en enkelt komponent ad gangen til først det dobbelte (forsøg 1-22) og dernæst 10 gange (forsøg 26-46) og følge gærens vækst og ethanolproduktion i substratet. Desuden er der lavet tre forsøg (23, 24 og 25) hvor mængden af alle fenol-komponenter er øget med henholdsvis 2, 10 og 20 gange.

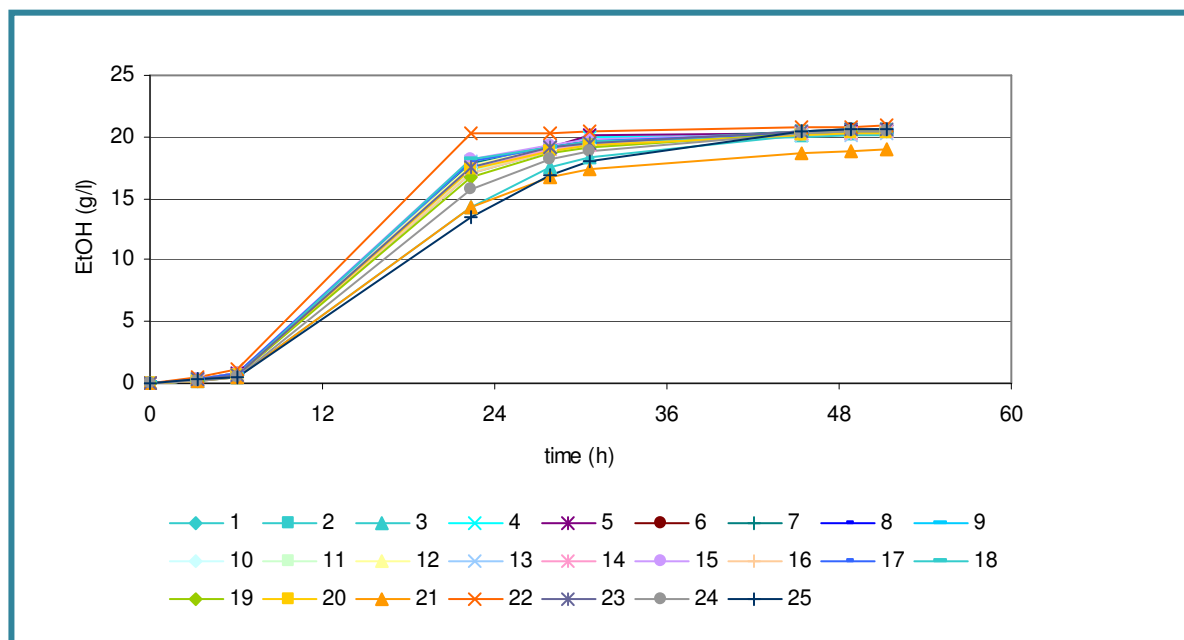
Formålet med dette forsøg var at undersøge toksiciteten af de mange kendte inhibitorer (nedbrydningsprodukter) der i tidligere forsøg er identificeret i liquid fraction. Hvilke af de identificerede inhibitorer der mest toksiske for gæren, synergieffekter mellem grupper af inhibitorer, samt eventuelle inhiberende komponenter i væsken, der endnu ikke er identificeret.

Ved at lave et syntetisk medium undlades effekten af eventuelle ukendte faktorer i substratet. Forsøgene blev udført i 250 ml rysteflasker med gær-rør, hvor der blev tilsat 150 ml medium. pH i medierne blev indstillet til 5,0, flasken blev inkuberet med 1 vol % af forkultur af *Thermosaccharomyces* og headspace blev gemmeskyllet med nitrogen. Flaskerne blev inkuberet på rystebord ved 35°C og 100 rpm.

Første forsøgsrække - fordobling af koncentrationen af inhiberende komponenter:

Figur 6 viser ethanol produktionen i de forskellige substrater beregnet ud fra vægttabet som følge af CO₂ afgang. Det ses, at der er en kort lagfase i ethanolproduktionen i alle flasker, også i flaske 1 som er grundsubstratet.

Dette viser, at koncentrationen af inhibitorer i udgangssubstratet er høj nok til at gæren først må tilvænne sig mediet (evt. omsætte visse komponenter) inden der kan produceres ethanol. Der er en tydelig forskel i produktiviteten af gæren de første 22 timer af fermenteringen.



Figur 6: Ethanol produktion i fermentering med *Thermosacch.* i syntetisk substrat (Tabel 1) med øget koncentration (fordoblet) af inhiberende komponenter.

(1=grundsubstrat, 2=HMF, 3=furfural, 4=2-furoic acid, 5=phenol, 6=guaiacol, 7=syringol, 8=vanillin, 9= syringaldehyd, 10=4-OH benzylalcohol, 11=4-OH acetophenone, 12=acetosyringone, 13=4-OH benzoic acid, 14= vanillic acid, 15= homovanillic acid, 16= syringic acid, 17= coumaric acid, 18= ferulic acid, 19=acetic acid, 20=formic acid, 21=succinic acid, 22=glycolic acid, 23=Alle fenoler x 2, 24=Alle fenoler x 10, 25=Alle fenoler x 20).

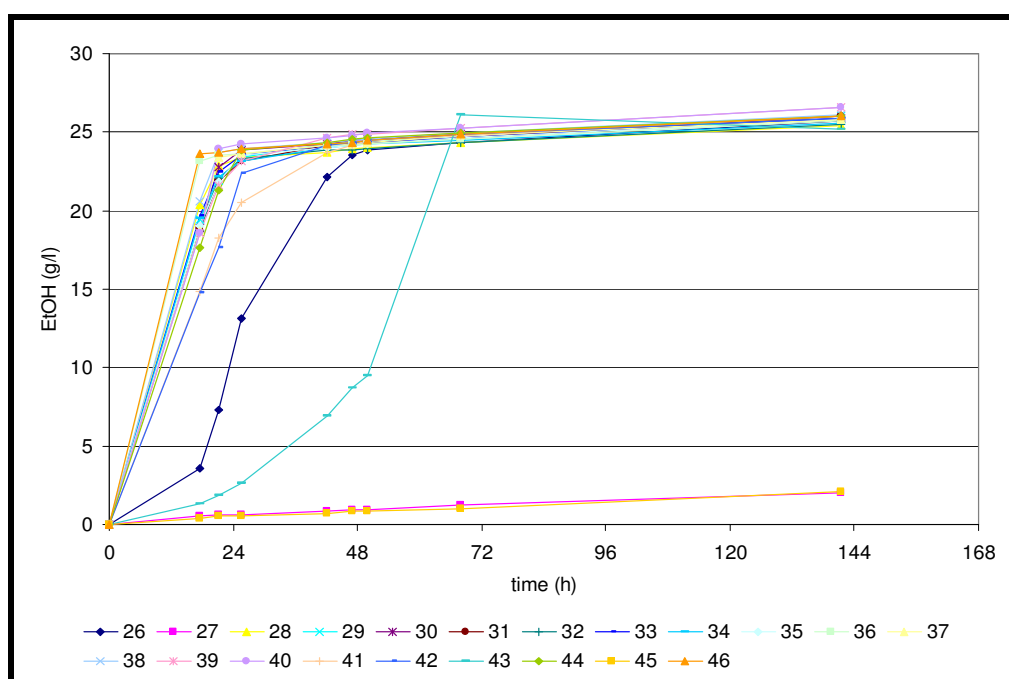
Ethanol koncentrationen svinger mellem ca. 13,5 g/l produceret i forsøget hvor alle fenol komponenter er øget 20 gange i forhold til grundsubstratet til ca. 20,2 g/l i forsøget hvor koncentrationen af glycolsyre er fordoblet. I grundsubstratet er der produceret ca. 17,5 g/l, og de fleste af substraterne ligger tæt på denne værdi, hvilket betyder at de fleste komponenter ikke er mere inhiberende for gæren i den dobbelte koncentration. De substrater der ligger under 17 g/l ethanol produceret efter 22 timer er substraterne hvor; eddikesyre, ravsyre og furfural er fordoblet samt forsøgene hvor alle phenoler er øget 5 og 10 gange. Det er dog kun produktions hastigheden, der er påvirket af den øgede koncentration af komponenterne, da alle forsøg med en enkelt undtagelse (ravsyre) ender på ca. 20-22 g ethanol per liter efter 50 timers fermentering.

Dette skyldes sandsynligvis bl.a. at ravsyre er den komponent, der er fundet i højeste koncentration i IBUS væsken/hydrolysatet (4 g/l) og derfor når helt op på en koncentration på 8 g/l når den fordobles i det syntetiske substrat.

Anden forsøgsrække – koncentrationen af inhiberende komponenter øget 10 gange:

Figur 7 viser ethanol produktionen i de forskellige substrater beregnet ud fra væggtabet som følge af CO₂ afgang i forsøgene, hvor koncentrationen af de enkelte inhibitorer er øget 10 gange i forhold til grundsubstratet. Det ses af figuren, at flere af forsøgene er stærkere inhiberet end der blev observeret ved en fordobling af koncentration. Forsøgene, hvor furfural og ravsyre er 10-doblet forløber stort set ikke, og der produceres kun meget lidt ethanol i disse forsøg (ca. 2 g/l). Gæren er normalt i stand til at detoxificere substrater for furfural, men altså ikke i et kompleks substrat som dette ved en furfural koncentration på 3 g/l.

Forsøgene hvor eddikesyre og HMF er 10-doblet er også stærkt inhiberet, og der ses længere lagfase og en noget lavere produktivitet i disse forsøg, men gæren er dog stadig i stand til at overkomme den høje koncentration (detoxificere) og opnå en god slutethanol koncentration.



Figur 7: Ethanol produktion i fermentering med *Thermosacch.* i syntetisk substrat (Tabel 2) med øget koncentration (10 gange koncentrationen i grundsubstratet) af inhiberende komponenter. (26=HMF, 27=furfural, 28=2-furoic acid, 29=phenol, 30=guaiacol, 31=syringol, 32=vanillin, 33=syringaldehyd, 34=4-OH benzylalcohol, 35=4-OH acetophenone, 36=acetosyringone, 37=4-OH benzoic acid, 38= vanillic acid, 39= homovanillic acid, 40= syringic acid, 41= coumaric acid, 42= ferulic acid, 43=acetic acid, 44=formic acid, 45=succinic acid, 46=glycolic acid).

Der er stor forskel på, hvor meget ethanol der er produceret i de forskellige substrater. Foruden ravsyre, furfural, eddikesyre og HMF er også coumaric acid og ferulic acid inhibitorer når koncentrationen øges 10 gange, og det er da også de to phenol-komponenter, der findes i den højeste koncentration i grundmediet, og som når en koncentration på over 200 ppm når de 10-dobles. Ligesom med eddikesyre og HMF er gæren i stand til at overkomme den høje koncentration af disse komponenter og der opnås god slut-ethanol produktion. Der ses i begge forsøgsrækker en positiv effekt af glycol syre på produktiviteten, og også forsøget med acetosyringone viser god ethanol produktivitet.

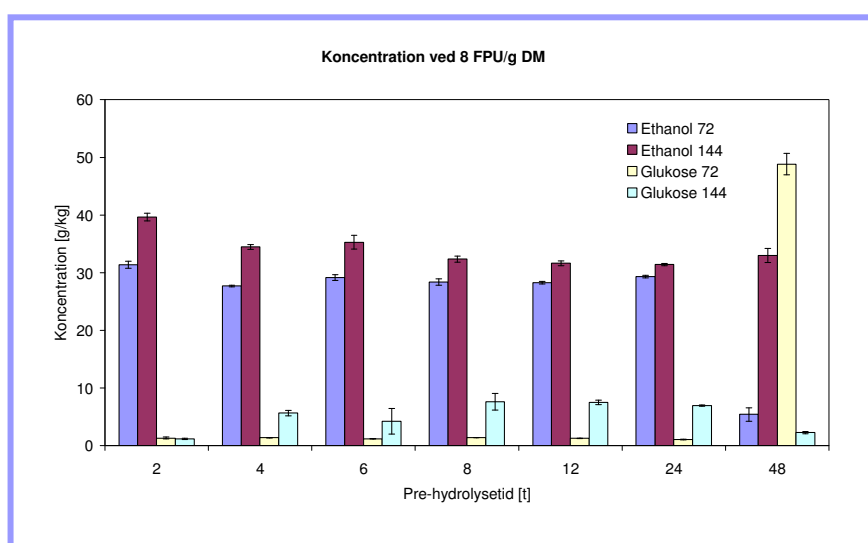
4 Enzymatisk hydrolyse ved høje tørstof koncentrationer

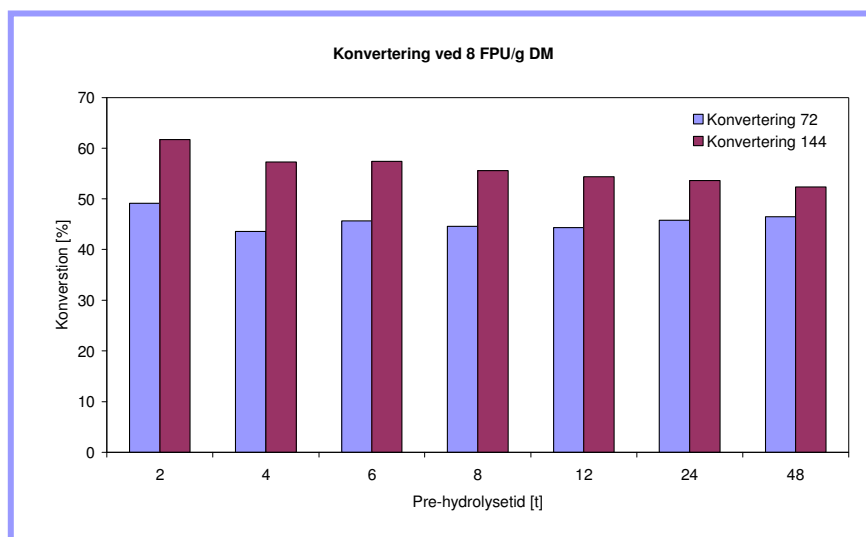
Formålet med forhydrolysen er at få en hurtig forflydning og til dels også en forsykning af den hydrotermiske forbehandlede biomasse. Det afgørende er, at forhydrolysen udføres ved 50°C, hvilket er den optimale temperatur for enzymerne men for høj til at tillade tilsætning af gæren. Inden tilsætning af gæren sænkes temperaturen til 32°C, som er optimum for gæren men suboptimal for enzymerne. Ved længere tids forhydrolyse sker en ophobning af produkt (glukose), som virker inhibitorisk på enzymerne, hvorved effektiviteten reduceres. Det er derfor afgørende, at undersøge, hvilken kombination af forhydrolyse og SSF, der giver det bedste samlede udbytte.

4.1 Forhydrolysen

Optimeringen blev udført i lille laboratorieskala (100 ml skala) ved 20% tørstof og med anvendelse af to forskellige enzymdoser (4 og 8 FPU/g DM eller ca. 7 og 14 FPU/g cellulose).

A



B

Figur 8: Koncentrationen af ethanol og glukose (A) og konvertering (B) efter 72 og 144 timer ved en enzymloading på 8 FPU/g DM. Tiden er regnet fra starten af forsøget og inkluderer derfor forhydrolyse og fermentering (SSF). Konverteringen er beregnet på basis af mængden af glukose og ethanol i væsten efter 72/144 timer og under antagelse af et fermenteringsudbytte på 0.51 g/g. Værdierne er gennemsnit og standardafvigelse på triplikater.

Forsøget viste, at det sluttelige ethanoludbytte efter 144 timer var lavere ved anvendelse af en lang forhydrolyse (Fig. 8A), og at det højeste udbytte blev opnået med en forhydrolysetid på kun 2 timer. Det kunne observeres, at ved længere forhydrolysetid sås akkumulering af glukose i slutningen af fermenteringen. Dette tab af fermenteringskapacitet af gæren kan skyldes det øgede stress ved inokulering ved høje koncentrationer af glukose. Den samlede konvertering beregnet ud fra mængden af dannet ethanol og glukose faldt også som funktion af længden af forhydrolysen (Fig. 8B). Dette tyder på, at enzymerne også mister effektivitet jo længere forhydrolysen har varet, hvilket igen kan kobles til stabiliteten af enzymerne ved høj temperatur.

Konklusionen er derfor, at i en SSF proces skal længden af forhydrolysen holdes så kort som mulig, idet fordelen ved højere temperatur under hydrolysen modsvares i tab af enzymaktivitet og levedygtighed af gæren. Endvidere er der muligvis en lille gevinst at hente ved besparelsen i energi som følge af en lavere temperatur i processen. I produktionskala vil det afgørende være, at forhydrolysen sikrer en tilstrækkelig forflydning til at massen kan pumpes til en fermenter og fermenteringen startes. Den endelige længde af forhydrolysen er derfor afhængig af, hvor hurtigt materialet opnår en passende viskositet (pumpbarhed), men det vil formodentlig være i omegnen af 4-8 timer.

4.2 Effekt af næringsstoffer på fermenteringen

Der er blevet lavet en grundig evaluering af effekten af en række næringsstoffer, salt og vitaminer på hastigheden og udbyttet i fermentering under SHF betingelser. Forsøget

blev udført som et faktorforsøg, hvor 6 forskellige brugte næringskomponenter blev testet alene eller i kombination. Gærekstrakt var det næringsstof, som alene gav den bedste effekt – i SHF var lagfasen kortere og fermenteringen hurtigere. Det endelige ethanoludbytte var dog ikke væsentligt forskellige fra, hvad der også kunne opnås med andre næringsstoffer, men blev opnået på kortere tid.

Det blev fundet, at simple nitrogenkilder som urea eller ammoniumsulfat ikke havde nogen nævneværdig effekt på fermenteringskapaciteten af gæren. Forsøg med at tilsætte vitaminer sammen med de simple nitrogenkilder viste også, at dette ikke heller ikke var nok for at opnå samme gode effekt som gærekstrakt. Komplekse nitrogen- og næringskilder som gærekstrakt, corn steep liquor og peptone er derfor de bedste til at understøtte gæren ved fermentering af medie med højt tørstofindhold.

Optimeringsforsøget blev udført med anvendelse af to forskellige cellulaseblandinger (Celluclast blandet med Novozym 188 og NS50073). Ved anvendelse af NS50073, som er 4 gange mere koncentreret end Celluclast-Novozym 188, var effekten af tilsætning af næringsstoffer mere udtalt end ved Celluclast-Novozym 188. Celluclast og Novozym 188 er ikke oprensede enzymblandinger og indeholder derfor næringskomponenter fra gæringen af disse. Samtidig er de ikke særlig koncentrerede og der anvendes relativt store mængder i hydrolysen. Vigtige næringsstoffer bliver herved indirekte tilført til fermenteringen. Ved skift til nye og mere koncentrerede enzymblandinger kan kravene til tilsætning af næringsstoffer derfor ændres/forstærkes.

Under de anvendte betingelser ved SHF blev det fundet, at 3,5 g/l af gærekstrakt (0,014 g/kg tørstof) gav en god afvejning mellem doseringen af gærekstrakt (og dermed omkostningerne) og forbedring i fermenteringsperformance. Dette blev yderligere testet i større skala (10 kg skala) i SSF forsøg. Også her blev det bekræftet, at gærekstrakt ved en dosering på 1,4% i forhold til tørstof gav en forbedret fermentering. Specielt blev det i SSF fundet, at i visse tilfælde var lagfasen meget lang efter forhydrolysen eller der skete akkumulering af glukose i slutningen af fermenteringen i de forsøg, hvor der ikke var tilsat næringsstoffer.

Dette indikerer, at gærekstrakt og generelt andre komplekse næringsstoffer har en positiv effekt på gærens evne til at klare sig under stress, fx højt startindhold af glukose, høj ethanolkoncentration og tilstedeværelse af inhibitorer fra forbehandlingen.

4.3 Effekt af PEG og mulighed for recirkulering

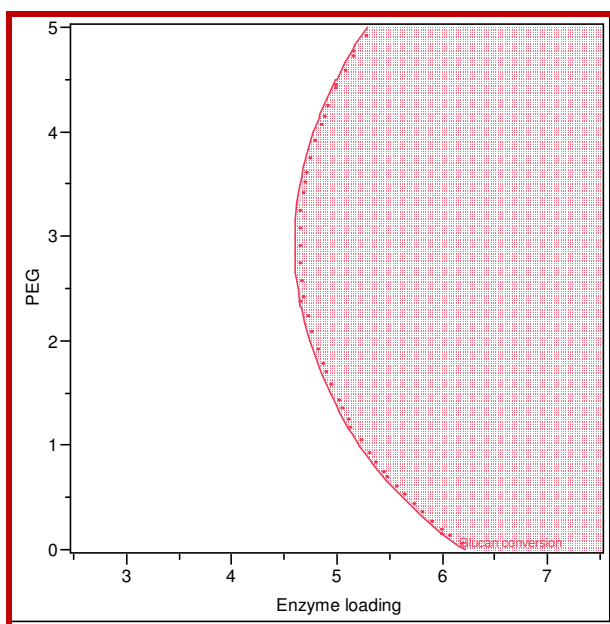
Allerede inden dette projekt havde forsøg på S&L og Inbicon vist, at tilsætning af overfladeaktive stoffer som fx. polyethylenglycol (PEG) 6000 havde en positiv effekt på effektiviteten af enzymerne, specielt cellulaserne (Kristensen et al., 2007). I dette projekt var formålet derfor at afklare optimum for doseringen af PEG 6000 under forskellige forsøgsbetingelser, fx tørstofindhold og enzymdosis.

Indledningsvis blev forsøgene udført som SSF-forsøg i 5-kammerreaktoren (10 kg skala). I disse forsøg blev det ved 25% tørstof fundet, at allerede ved 0,5% PEG 6000 (0,005 g/g tørstof) kunne der opnås 11% højere ethanoludbytte i slutningen af fermenteringen.

ringen. Ved 5% var forbedringen 44%. Det var dog svært at udføre et mere detaljeret studie med variation af en række parametre i 10 kg skala pga. manglende mulighed for at lave gentagelser med kun 5 samtidige forsøg samt et stort forbrug af materiale og enzym. Derfor blev et nedskaleret setup udviklet og valideret med forsøgene fra stor skala.

Ved hjælp af det nedskalerede setup var det muligt at udføre et faktorforsøg for at afdekke effekten af tørstofkoncentration, PEG koncentration og enzymdosis på konverterbarheden i 72 timers hydrolyseforsøg. Forsøget viste, at generelt falder konverteringen ved stigende tørstofkoncentration, hvilket er i overensstemmelse med tidligere forsøg udført i 10 kg skala (Jørgensen et al., 2007). Desuden blev det fundet, at ved lav tørstofkoncentration var den optimale PEG koncentration omkring 5% og at den faldt til omkring 3% ved 25% tørstof. Effektiviteten af PEG synes derfor at stige når tørstofkoncentrationen stiger. Der var ikke nogen umiddelbar forskel i optimum for koncentrationen af PEG ved forskellige enzymloadings.

Typisk kigges på, hvor meget PEG forbedre konverteringen, men omvendt kan man også kigge på, hvor meget mindre enzym, der skal bruges for at opnå en given konvertering. Som det fremgår af figur 2, vil man ved 20% DM kunne opnå 60% konvertering efter 72 timer ved bruge af 6,25 FPU/g DM eller 4,6 FPU/g DM sammen med 3% PEG. Altså en enzymbesparelse på 26%.



Figur 9: Konturplot ved tørstofkoncentration på 20% DM. Det skraverede område angiver konvertering på over 60%.

Et tilsvarende forsøgsdesign blev brugt til at evaluere effekten af PEG i SSF forsøg. Under SSF betingelser blev det fundet, at ved omkring 3,7% PEG 6000 opnås den maksimale konvertering til ethanol.

PEG menes at virke ved at nedsætte uproduktiv adsorption af enzym til lignin, hvorved en større andel af det tilsatte enzym forbliver aktivt i opløsning. Foruden at forbedre hydrolysen vil dette også betyde, at mere enzym vil kunne genfindes i væsken efter endt hydrolyse (og fermentering). Tilsætning af PEG er derfor interessant i forhold til at kunne recirkulere enzym i processen.

En række forsøg blev udført for at afdække muligheden for at kunne recirkulere enzym i IBUS processen. I forsøgene blev hhv. forbehandlet halm eller filterpapir hydrolyseret med/uden tilsætning af PEG og genfindingen af enzym blev efterfølgende målt ved hydrolyse af nyt materiale eller måling af specifikke enzymaktiviteter. Filterpapir blev inddraget i forsøget for at sammenligne med materiale, hvor der ikke findes lignin.

Der blev testet ved to forskellige enzymmængder og med/uden 2% PEG 6000 tilsat. På forbehandlet halm resulterede tilsætning af PEG i 16% højere konvertering af glucan til glukose, hvorimod der kun var en marginal stigning (under 2%) på filterpapir. Tilsætning af PEG har stor betydning for mængden af enzym (hvor meget aktivitet), der kan genfindes i væsken efterfølgende. Det ses også, at tilsætningen af PEG har relativt større effekt ved en lav enzymdosis. På filterpapir har PEG som forventet ikke nogen effekt.

4.4 Alternative anvendelser af C5 sukre

Fra projektets start var hovedformålet med denne workpakage at teste nye termofile produktionsstammer fra DTU, som kan fermentere C5 sukre i biomassehydrolysat under høje sukkerkoncentrationer og med høje yields. Midt i projektperioden opstod der nogle interne problemer på DTU vedrørende disse termofile mikroorganismer, hvorfor fokus i den sidste halvdel af projektet blev ændret til at omhandle C5 sukrenes mulige anvendelse til biofilm og screening af synergieffekter ved at blande kommercielle enzymer.

4.5 Test af den termofile C5 fermenterende mikroorganisme BG1

De første forsøg viste, at BG1 ikke kan fermentere direkte i væske fraktion fra IBUS processen, da inhibitor niveauet heri er for højt.

BG1 blev herefter testet i fibre mash (fiberfraktionen fra IBUS processen enzymatisk hydrolyseret ved høj tørstof koncentration). Fermentering med den termofile mikroorganisme BG1 i IBUS fibre mash blev udført i en fortyndingsrække (se tabel 1). Ved en indfødningsskoncentration på 133 g sukker/l (101 g glucose/l og 32 g xylose/l) blev opnået 48.3 g ethanol/l, hvilket betyder et ethanol udbytte på 0.39 g/g konverteret sukker.

Tabel 1

Total sugars (g/l)	Influent (g/l)			Effluent (g/l)				Sugar conversion (%)			Yield (g/g)		CR (%)
	glu	xyl	ace	glu	xyl	ace	EtOH	glu	xyl	total	ace	*EtOH	
10	9.35	1.5	0.17	0.20	0.17	1.56	3.93	97.9	88.8	96.6	0.13	0.38	0.88
30	26.8	2.82	0.42	0.54	0.27	4.46	11.2	98.1	90.4	98.6	0.14	0.39	0.79
103	78.1	25.2	2.87	24.35	0.56	12.2	29.4	68.9	74.1	70.2	0.13	0.40	0.58
133	101	32.1	3.45	7.67	2.98	12.1	48.3	92.5	90.7	92.0	0.07	0.39	0.39
164	123	40.9	4.54	62.46	18.3	3.8	46.8	49.3	55.3	50.8	?	?	?
14**	12.4	2.46	0.33	0.26	0.92	3.17	4.37	97.9	62.5	92.0	0.21	0.32	1
27**	24.1	4.86	0.9	2.1	1.15	2.4	9.6	86	73	88.7	0.14	?	?

4.6 Isolering og karakterisering af hemicellulose med henblik på produktion af hemicellulose film

Der er arbejdet på at isolere hemicellulose fra væskestrømmen udtaget fra IBUS den 29/5-2007. Forskellige fremgangsmåder er brugt til oprensning af hemicellulosen, hvor hovedparten af lignin er fjernet ved sur fældning og hemicellulosen er dernæst udfældet i neutral eller basisk væske evt. ved brug af et organisk solvent (acetone eller ethanol). Det er lykkedes at oprense hemicellulose ved de nævnte metoder og disse er efterfølgende forsøgt karakteriseret ved forskellige metoder.

HPLC-analyse af de frie sukre samt totalt sukkerindhold i råvæsken viser, at der er polysaccharider (evt. oligosaccharider) til stede. Det er dog mere vanskeligt at karakterisere de oprensede hemicelluloser i tilfredsstillende grad. ¹H-NMR har været forsøgt som analysemetode, men lav opløselighed gør, at resultaterne ikke er entydige.

Sammenligning af IR-spektre for de oprensede hemicelluloser med data for to kommercielle xylaner fra hvede og birk har vist, at det med overvejende sandsynlighed er xylaner, som isoleres fra IBUS væskestrømmen. Det endelige substitutionsmønster for de fundne biopolymerer er dog ikke fastslået, da dette afviger fra det observerede for de kommercielle produkter. I parallelle forsøg er hvedehalm vådoxideret i laboratorieskala (195 °C i 10 min, med og uden tilført ilt) for at opnå produkter som antageligvis er mindre komplekse end dem opnået i IBUS. Det vil især hjælpe med analysen af de oprensede hemicelluloser, hvis der er så få mulige biprodukter som muligt. Hemicelluloserne oprenset fra vådoxidationerne ser ud til at være strukturelt lig produkterne oprenset fra IBUS (såvel som de kommercielle xylaner).

Størrelseskromatografi (GPC) er delvist lykkedes ved brug af stærk base som eluent (NaOH, pH = 12) til at analysere både de kommercielle og egne produkter. Resultaterne er entydige for de kommercielle produkter, mens signalerne for de oprensede hemicelluloser forstyrres af tilstedeværelsen af rest-lignin. Molekylvægten er af afgørende betydning for en polymers evne til at danne film og foreløbige resultater tyder på, at den tilbageværende hemicellulose er langt mindre i molekylvægt end de kommercielle. Dette kunne betyde, at filmformningsegenskaberne er stærkt begrænsede og at man i stedet burde koncentrere sig om at nedbryde hemicellulose til mindre komponenter.

4.7 Optimering af enzym synergi for en effektiv og billig cellulose hydrolyse

Formålet med dette projekt var at reducere enzymomkostningerne ved hydrolyse af celluloseholdig biomasse for derved at forøge chancerne for kommercialisering af ethanol fremstillet deraf. Fokus for dette projekt var at forøge den enzymatiske effektivitet ved at 1) finde synergier mellem forskellige cellulosenedbrydende enzymer og 2) øge enzymernes tilgængelighed til cellulose.

Vi indledte med at gennemføre en litteratur-undersøgelse over de seneste undersøgelser af mikrobiel produktion af enzymer, synergier mellem forskellige enzymer og udvikling af teknologier til hydrolyse af cellulose.

Synergier

Vi udvalgte 10 cellulases eller lignende enzympræparater fremstillet af forskellige virksomheder i 5 lande: Celluclast 1.5L, Novozym 188, PulpzymeR HC, Cellu softRL, AccelleraceTM1000, Cellulase13P-C013P, EcostoneHPL1800, Spezy meCP, RapidaseTF og CellulaseEBT. Vi lavede blandinger under hensyn til deres forskellige aktiviteter på forskellige celluloseholdigt substrater såsom filterpapir, CMC og cellobiose i form af FPase (FPU/ml), CMCCase (IU/ml) og Cellubiase (IU/ml).

Disse blandinger blev brugt til at hydrolysere filterpapir ved 50 °C over 72 timer. Individuelle enzympræparater blev anvendt som kontrol. Bortset fra det velkendte faktum, at tilsætning af Novozym 188 øger produktionen af glukose, opdagede vi, at blandingen af Cellulase 13P-C013P og Accellerace 1000 (1:1) gav en FPase af 143 FPU / ml, hvilket var 12 % højere end gennemsnittet af de to individuelle enzympræparater. Blandinger af andre enzympræparater gav tvetydige resultater, i intervallet -2 % -8 % og med store variationer (STD > 5%).

Tilgængelighed

Enzymblandingen Cellulase 13P-C013P/Acellerace 1000 (1:1) blev brugt til at hydrolysere hvedehalm, forbehandlet med 0,25% NaOH ved 121°C i 1 time. Forbehandlingen fjernede 19 % af den organiske fraktion (lignin og hemicellulose) og 23 % af de uorganiske salte. For yderligere at øge tilgængeligheden blev fiber størrelsen af den forbehandlede halm reduceret ved hjælp af "wet-milling". Den ikke-forbehandlede halm blev brugt som kontrol. Resultaterne viser, at

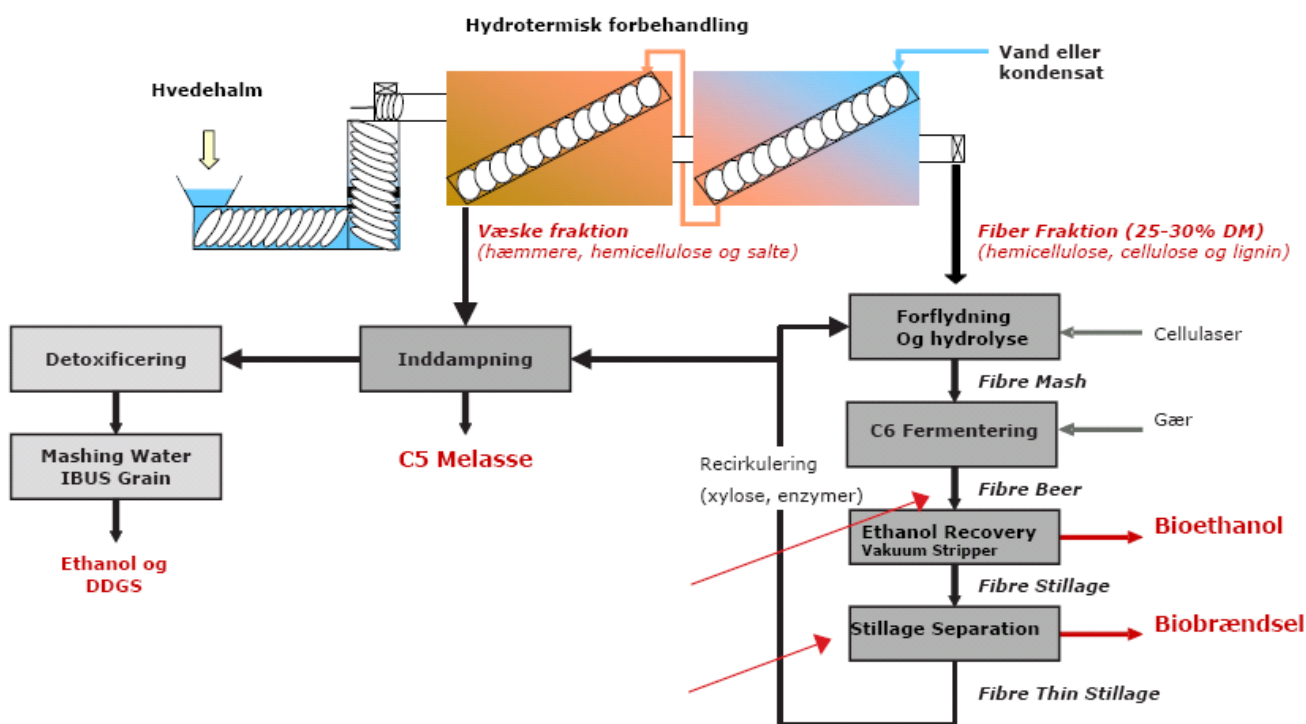
sukker produktionen (glucose og xylose) forøges med 49 % ved behandling med NaOH og med 89 % ved yderligere at anvende "wet-milling".

4.8 Separation og anvendelse af alkali- og klorfrit biobrændsel i produktion af brændelsespiller

Efter hydrotermisk forbehandling, enzymatisk behandling og fermentering adskilles ethanol fra restfraktionen, som hovedsageligt består af lignin. Lignin er den komponent i halm, som har den største brændværdi, hvorfor ligninrestfraktion vil blive opkoncentreret og anvendt som fast biobrændsel.

Separationsforsøg med ligninrest

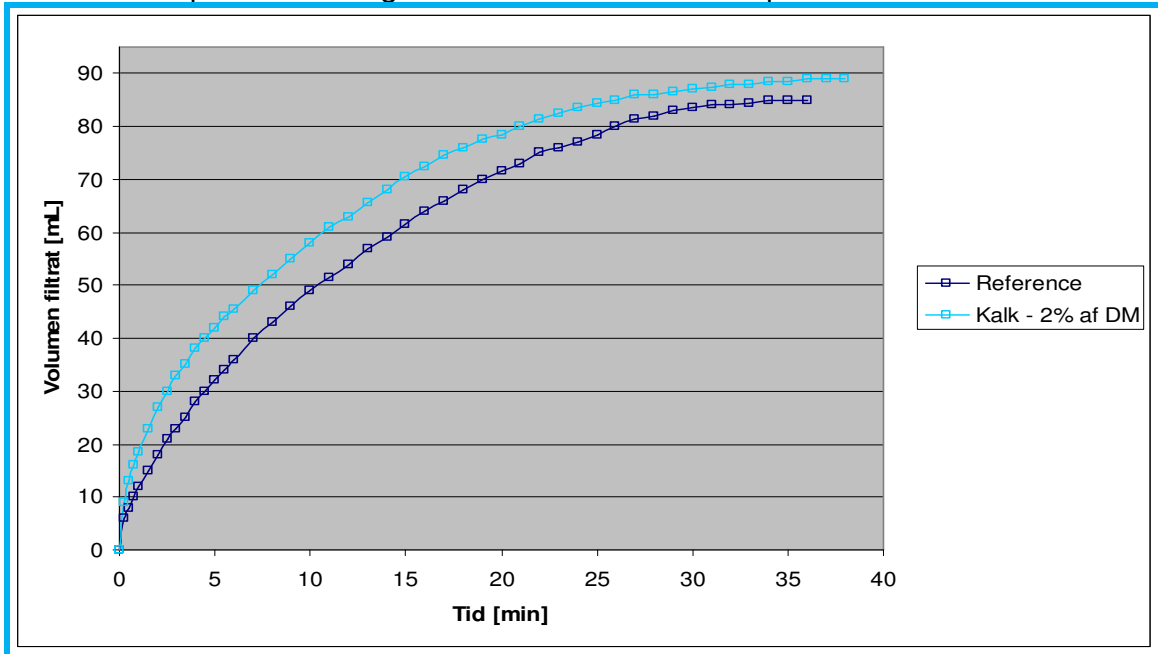
De indledende separationsforsøg blev udført på fiber beer direkte fra C6 fermenteringen (se figur 10), da det ikke var muligt at udtage fiber stillage på forsøgstidspunktet. Det skal her bemærkes, at tilstedeværelsen af ethanol i koncentrationer op til 10 vol-%, kan have en effekt på separationen.



Figur 10: Oversigt over IBUS-processen med angivelse af: 1. fraktionen brugt til forsøgene og 2. i IBUS-processen skal separationen foregå efter destillationen.

De indledende forsøg med filterpresning af fiber beer er udført på en Labox filterpresse (en laboratorieskala filterpressen fra Larox), der kan filtrere ca. 150 mL pr. batch.

Forsøgene viser, at der dannes en meget kompakt filterkage, som gør filtreringen meget langsommelig. Filtreringshastigheden kan forøges en smule ved tilsætning af kalk (figur 11), men der skal i fremtiden arbejdes på, at finde andre typer filterhjælp, hvis en filterpresse skal bruges i dette procestrin. Filtrering med filterpresse giver en filterkage med et tørstofindhold på 45-50 % og et tørstofindhold i filtratet på ca. 4 %.



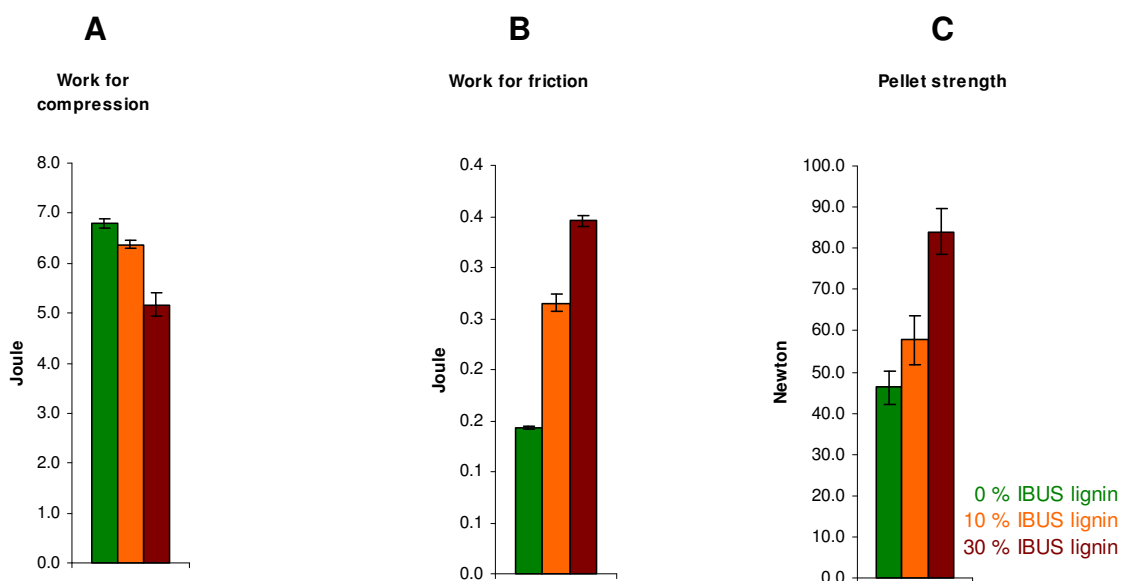
Figur 11: Volumen af filtrat som funktion af tiden for referenceforsøg og ved tilsætning af kalk som filterhjælp.

Som alternativ til filterpressen er der også udført indledende forsøg med en dekantercentrifuge, som viser, at der med denne teknik kan opnås et tørstofindhold i filterkagen på ca. 40-45 %. Separationen med dekantercentrifuge er mulig uden tilsætning af hjælpestoffer, hvis temperaturen af fibre beer er ca. 60 °C, hvilket svarer til temperaturen i processen efter vakuum destillationen.

I demonstrationsanlægget i Kalundborg vil blive anvendt dekantercentrifuger til at opkoncentrere ligninresten.

Anvendelse af IBUS materiale til pelletering

Restmassen efter hydrolyse og fermentering er rig på lignin og dermed velegnet som et brændsel i fx. kraftværker. En anden mulighed der har været undersøgt er at bruge restmassen som et bindemiddel i produktionen af træpiller, som fx også anvendes til opvarmning i alm. husholdninger. Herved kan restmassen potentielt afsættes som et dyrere produkt og muligvis have positive egenskaber i forbindelse med pilleproduktionen.



Figur 12: Energi, der skal bruges for at presse materialet sammen til en densitet på ca. 1.4 g/cm³ (A), energien, der skal bruges til udpresningen fra pressekanalen (B) samt styrken af de producerede piller (C) ved blanding af savsmuld med hhv. 0, 10 og 30% IBUS lignin.

Et forsøg med iblanding af tørret restmateriale efter hydrolyse og fermentering (IBUS lignin) ved presning af træpiller blev testet i laboratorieskala. Forsøget viste, at tilsætning af tørret IBUS lignin til træpilleråvaren kan øge pillernes styrke og mindske den mængde energi, der skal bruges til sammenpresning af pillen. Tilsætning gør også, at friktionen i pressekanalen øges. Det kan tyde på at tilsætning af lignin til råvaren vil kræve en ændring af pillepressens opsætning, idet man kan forvente at pressekanalerne i pillepressens matrice skal være kortere. Kortere pressekanaler giver mindre friktion og derved mindre modtryk til sammenpresning.

Med lignintilsætning skal der derfor bruges mindre kraft til sammenpresning, og samtidigt giver ligninen en øget friktion. Isoleret set for processerne i matricen kan resultatet blive, at pressernes kapacitet og pillernes kvalitet øges, idet der samlet set skal bruges mindre energi til at producere en pillekvalitet på linje med den, der opnås med rent savsmuld. Der synes derfor at være potentiale for brugen af restmaterialet i pelletering af træ- og halmpiller.

5 Ensretning af analysemetoder på danske laboratorier

Formålet med denne opgave var klarlægning af residual på op til 20 % ved analyse for kemisk sammensætning af halm.

Den kemiske sammensætning af såvel råhalm som fiberprøver bestemmes ved en stærk syrehydrolyse hvor alle sukkerarter i biomassen hydrolyseres vha. 72 % H₂SO₄ til frie opløselige sukkermonomerer. Efter hydrolysen filtreres prøven og de opløste sukke bestemmes vha. HPLC. Filterkagen tørres og foraskes, og prøvens indhold af lignin bestemmes som den tørre rest fratrukket aske.

Ved beregning af massebalance efter analyse af råvare prøver, var der ofte ca. 20 % af biomassen der ikke kunne findes som sukker, lignin eller aske. For at prøve at klarlægge noget af denne residual, samt sikre at der ikke "gemmer" sig sukker i residualen, blev følgende analyser udført:

- Bestemmelse af ethanol ekstraktiver – Soxhlet ekstraktion (Fjerner ikke-strukturelle komponenter (voks, fedt, tannin, stivelse, farvestoffer ect.))
- Dobbelt stærk syrehydrolyse (Der laves stærk syrehydrolyse på lignin fraktionen (filterkagen) fra 1. syre hydrolyse)

5.1 Soxhlet ekstraktion og dobbelt syrehydrolyse

Ved Soxhlet ekstraktion af prøverne blev det bestemt, at ca. 8 % af prøverne består af ikke-strukturelle komponenter. Derved bringes residualen ned på omkring 10 % (Figur 13A). Efter 2. syrehydrolyse, på lignin fraktionen fra syrehydrolyse af råhalmen, var der ingen (eller meget lidt) sukker ved kørsel af væsken på HPLC, dvs. der "gemmes" ikke sukker i lignin-resten (Figure 13B).

De sidste 10 % af tørstoffet i prøverne, der ikke kan gøres rede for ved ovenstående analyser, er ikke forsøgt klarlagt - men består formodentligt af nedrydningsprodukter af sukker (furaner og organiske syrer) og lignin (frie fenoler), der nedbrydes af den stærke svovlsyre. Disse komponenter opløses i væskefasen – men måles i dette studie ikke ved kørsel på HPLC. Desuden er der andre komponenter i halmen der ikke analyseres for f.eks. protein.

A

Composition		
Sample	Rå-051027	Rå-051103
component	g/100gTS	g/100gTS
glucan	34,9	36,1
xylan	20,4	21,1
arabinan	²³ 2,4	2,4
Klason	17,5	17,4
Ash	5,9	6,1
Extractives	8,3	8,2
residual	10,7	8,6
SUM	100,0	100

B

Sample	Rå-051027	Rå-051103
component	g/100gTS	g/100gTS
glucan	0,4	0,7
xylan	0,2	0,2
arabinan	0,4	0,4
Klason	75,9	78,7
Ash		
Extractives		
residual		
SUM		

Figure 13: (A) Sammensætning af råhalm efter soxhlet ekstraktion, stærk syrehydrolyse samt bestemmelse af klasonlignin og aske. (B) Sammensætning af lignin fraktionen (filterkagen) fra analyse af rå halm efter en 2. syrehydrolyse.

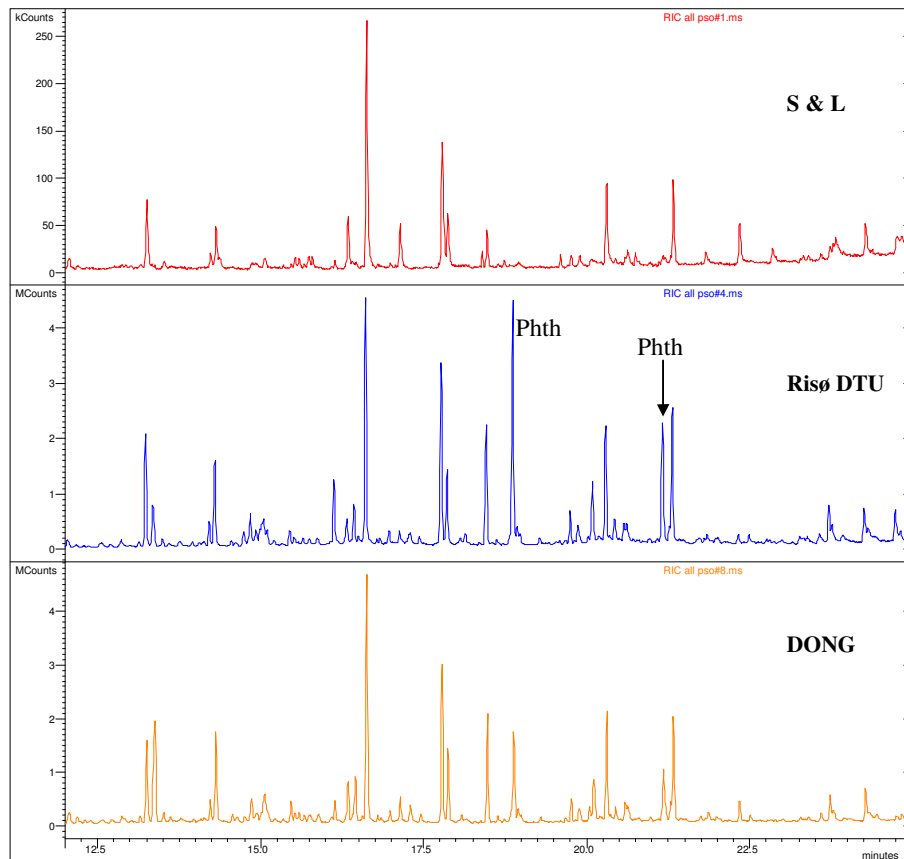
5.2 Flashpyrolyse og GC-MS på lignin-resten

Tre forskellige lignin-residualer efter stærk syrehydrolyse blev samlet fra alle tre laboratorier (KU-life, Risø og Inbicon). Prøverne var fra stærk syrehydrolyse af en råhalmsprøve samt to forbehandlede prøver (185°C, 12 min. og 195°C, 12 min.). Prøverne blev analyseret ved flashpyrolyse og GC-MS. Figur 2 viser pyro-kromatogrammerne af råhalmsprøven.

Kromatogrammerne blev sammenlignet med kromatogrammet for pyrolyse af cellulose og viste klart indhold af glukane – særligt for råhalmsprøven. Kromatogrammerne af prøverne fra de tre laboratorier var meget ens og viste samme type lignin og sammenlignelig lignin/glukan forhold i prøverne. Metoden er ikke fuldstændigt kalibreret, men indikerer at glukane i prøverne var få procenter.

Chromatogram Plots

Plot 1: c:\satur\data\pso\pso#1.ms RIC all
Plot 2: c:\satur\data\pso\pso#4.ms RIC all
Plot 3: c:\satur\data\pso\pso#8.ms RIC all



Figur 14: Pyro-kromatogrammer for lignin-residual fra stærk syrehydrolyse af råhalm udført af KU-life (S&L), Risø-DTU og Inbicon (DONG).

6 Konklusioner

PSO 6412 har medført at de samlede danske forskningskræfter inden for biomasse og bioenergi gennem et fælles program relateret til Inbicons IBUS pilot anlæg har optimeret IBUS processen i en sådan grad, at man nu tager IBUS teknologien til det næste niveau på lærekurven, nemlig demonstrationsskala.

For hvedehalm er temperatur og opholdstid i den hydrotermiske forbehandling optimeret på pilotanlægget. I disse forsøg er sukkergefindning og cellulose konverterbarhed klarlagt ved forskellig proces hårdheder.

Undervejs i projektet blev det bestemt ikke at arbejde med detoxificering, da det er energi og kemikalie krævende proces. I stedet er der fokuseret meget på karakterisering af liquid fraction - især med henblik på de forskellige inhibitors indvirkning under fermenteringsprocessen. Disse forsøg har givet en bedre viden om hvilke komponenter

der dannes afhængig af forbehandlingen samt om gærens tolerance og evne til at håndtere de forskellige komponenter.

Inden for hydrolyse og fermentering har procesoptimeringen været rettet mod tre hovedområder: 1) Effekten af næringsstoffer på fermenteringen med gær ved højt tørstof, 2) Betydning af forhydrolyse på fermenteringsudbytte, 3) Muligheden for at reducere adsorption af enzymer til lignin og dermed muligheden for at recirkulere enzymer. Forsøg med optimering af forhydrolysen imellem 2 og 48 timer viste, at ethanoludbyttet til slut ikke blev positivt påvirket af at forlænge længden af forhydrolysen. Ved udførelse med højt tørstofniveau bliver den positive effekt af at operere ved 50°C ophævet af den produktinhibering, som hurtigt opstår. Det er derfor bedre at starte SSF så hurtigt som muligt. Høje niveauer af sukker ved inokulering kan muligvis have negativ effekt på gæren. I forlængelse heraf viste forsøg med optimering af næringsstoffer til at understøtte gæren, at tilsætning af gærekstrakt gav den bedste effekt i SHF forsøg. Tilsætning af gærekstrakt gav hurtigere fermentering (kortere lagfase) samt højere udbytte af ethanol og mindre glycerol. Tilsætning af simple nitrogenkilder som urea og ammoniumsulfat alene eller sammen med vitaminer kunne ikke give samme positive effekt som gærekstrakt. I SSF forsøg i 10 kg skala blev det tilsvarende eftervist, at gærekstrakt havde en positiv effekt på fermenteringen ved en dosering omkring 1 %. Forsøg med tilsætning af PEG har været undersøgt både ved hydrolyseforsøg i laboratorieskala samt i SSF forsøg i større skala (10 kg skala). Tilsætning af PEG 6000 synes at have optimum i området 1-4 % i forhold til tørstof afhængig af procesbetingelserne. Effekten af PEG er størst ved lave enzymdoseringer. Ved tilsætning af omkring 3 % PEG 6000 kan hydrolyse- eller fermenteringsudbyttet øges med over 20 %. Tilsætning af PEG 6000 reducerer adsorptionen af enzym til lignin, hvormed genfindingen af enzym kan øges med op til 130 %, hvilket forbedrer muligheden for recirkulering af enzym i processen.

Den faste restfraktion efter fermentering, som hovedsagelig indeholder lignin, synes attraktiv som additiv i træpilleproduktion. Ved iblanding med savsmuld (10 og 30 %) kan opnås betydelig stærkere træpiller, lavere energiforbrug til kompression og øget friktion i pressekanalen. Samlet ses vurderes dette at kunne betyde et lavere energiforbrug, øget kapacitet af pelleteringsmaskinen og højere kvalitet af træpillerne. Ligninresten synes derfor at være attraktiv som additiv i træpilleproduktionen.

Den termofile mikroorganisme BG1 er i stand til at konvertere fortyndede hydrolysater af forbehandlet hvedehalm. Både glucose og xylose omsættes med et ethanoludbytte på 0.39 g ethanol/(g C5+C6).

Karakterisering af hemicellulosen med henblik på produktion af bio-polymerfilm viser at molekylvægten på IBUS-hemicellulosen er for lav til at kunne anvendes til dette formål.

Arbejdet med klarlægning af residual på op til 20 % ved analyse for kemisk sammensætning af halm har givet resultat. Ved Soxhlet ekstraktion af prøverne blev det bestemt, at ca. 8 % af prøverne består af ikke-strukturelle komponenter, hvorved residualen bringes ned på omkring 10 %. Der er ved hjælp af flash-pyrolyse og GC-MS fundet små mængder af glucan i residualen fra alle tre laboratorier. 10 % residual er acceptabelt.

De milepæle, som blev fastsat ved projektstart, blevet opnået. På visse områder som fx enzymadsorption og recirkulering af enzym er det dog nødvendigt med yderligere forskning for at afklare mekanismerne nærmere og for at kunne implementere processen i IBUS processen.



Præsentationer og publikationer i perioden

Videnskabelige artikler:

Larsen J, Petersen MØ, Thirup L, Li HW, Iversen FK (2008) The IBUS process - Ligno-cellulosic Bioethanol Close to a Commercial Reality. Chem. Eng. Technol. 31, No. 5, 765-772

Thomsen MH, Thygesen A, Thomsen AB (2009) Identification and characterization of fermentation inhibitors formed during hydrothermal treatment and following SSF of wheat straw. Applied Microbiology and Biotechnology: Volume 83, Issue 3, p. 447.

Jørgensen, H. (2009). Effect of nutrients on fermentation of pretreated wheat straw at very high dry matter content by *Saccharomyces cerevisia*. Applied Biochemistry and Biotechnology 153:44-57.

Petersen MØ, Larsen J, Thomsen MH (2009) Optimization of hydrothermal pretreatment of whet straw for production of bioethanol at low water consumption without addition of chemicals. Biomass and bioenergy 33, p. 834-840.

Konference proceedings:

Hansen NML, Plackett D, Thomsen MH, Thomsen AB, Nielsen L, Ndon S. Characterization and potential use of residual hemicellulose from bioethanol production. Modification, Degradation and Stabilisation of Polymers (MoDeSt2008), 7-11/9 2008, Liège, Belgium.

Hansen NML, Plackett D, Thomsen MH, Thomsen AB, Nielsen L, Ndon S. Characterization and potential use of residual hemicellulose from bioethanol production. Nordic Polymer Days 2008, 11-13/6 2008, Stockholm, Sweden.

Poster:

Thomsen MH, Kádár Z, Thygesen A, Thomsen AB. Inhibitors study on pretreated wheat straw from IBUS pilot scale pretreatment plant. The Second Annual Workshop of COST FP0602 4-5/12 2008, Biel, Switzerland.

Thomsen MH, Christensen T, Plackett DV, Thomsen AB. Characterization of hemicellulose polymers extracted from biomass by wet oxidation. Production and Functionalization of Hemicelluloses for Sustainable Advanced Products, 19-20/3 2007, Hamburg, Germany.

Henning Jørgensen, Mai Østergaard Petersen , Jan Larsen (2007). Optimisation of medium for fermentation of wheat straw at very high dry matter content. 29th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, Denver, USA.

Jørgensen, H., Kristensen, J.B. (2008). Effect of pretreatment temperature in combination with hemicellulases on cellulose conversion. First European workshop on biotechnology for lignocellulose biorefineries, København, Danmark.

Jørgensen, H., Larsen, J. (2008). Optimisation of medium composition for fermentation of wheat straw in SHF and SSF mode at very high dry matter content. 30th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, New Orleans, Louisiana, USA.

Reference liste

Jørgensen, H., Vibe-Pedersen, J., Larsen, J., and Felby, C. 2007. Liquefaction of Lignocellulose at High-Solids Concentrations. *Biotechnol. Bioeng.* 96, 862-870.

Kristensen, J.B., Börjesson, J., Bruun, M.H., Tjerneld, F., and Jørgensen, H. 2007. Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 888-895.