

Mikrober och enzymer för framställning av biodrivmedel

Text: Forskare vid MicroDrivE, SLU, Uppsala

Vid Sveriges lantbruksuniversitet (SLU) pågår jakten på framtidens biodrivmedel. Satsningen som kallas MicroDrivE (Mikrobiellt producerade biodrivmedel) avser att optimera uthållig produktion av etanol och biogas från växtbiomassa. Forskningsprogrammet leds av professor Johan Schnürer och involverar ett 20-tal forskare och doktorander. I artikeln beskriver forskare vid MicroDrivE de olika delarna som ingår i projektet. Idag vet vi att "peak oil" är nära förestående eller att vi kanske till och med redan har passerat toppen för vår möjlighet att utvinna olja. Samtidigt som oljan är den största bidragande faktorn till vår välfärd är vi medvetna om de problem användningen av olja innebär, inte minst i form av emissioner av växthusgaser. Gemensamt för etanol och biogas är att de med hjälp av mikroorganismer och enzymer kan framställas ur växtbiomassa och därför är förnyelsebara energikällor. I programmet MicroDrivE pågår forskning som berör hela produktionskedjan av biobränsle, från produktion och lagring av växtbiomassa till återförsl av växtnäring till jordbruksmark (se bild ovan).

Lagring – energisparande spannmålslagring

Växtbiomassa som ska användas för biodrivmedelsproduktion måste oftast lagras i väntan på vidare processbehandling. Det är då viktigt att förhindra angrepp av oönskade mikroorganismer, som både konsumerar energirika ämnen och som också kan ställa till med hälsoproblem vid hanteringen av biomassen.

Spannmål torkas ofta för att bli lagringsstabil men torkningsprocessen kräver mycket energi. För att minimera energiförbrukningen kan man i stället lagra spannmålen fuktiga. Detta kräver dock en helt syrefri lagringsmiljö för att undvika tillväxt av störande mikroorganismer, något som kan vara svårt att upprätthålla då luft lätt kommer in i systemet, inte minst vid uttag av spannmål.

Genom att tillsätta mikroorganismer, så kallad biokontroll, är det möjligt att minimera problemet säger, Matilda Olstorpe, forskare vid Institutionen för mikrobiologi. Vi använder en jästtyp som när den växer på spannmålen, hindrar tillväxten av skadliga mikroorganismer. Metoden kan användas både vid lagring av



Minisilos" för studier av lagringstabilitet hos spannmål i syrefri miljö. Foto: Mikael Pell

spannmål som ska användas i biobränsleprocessen men även inför användning som djurfoder. Lagringsmetoden ger nämligen ett ökat näringsvärde för djuren då jästens aktivitet ger en ökad proteinmängd och en förbättrad biotillgänglighet av olika mineraler (se bild minisilos ovan).

Förbehandling – med ånga och enzymer

Växter består till ungefär hälften av cellulosa och till en fjärdedel av andra polysackarider, så kallad hemicellulosa. Båda kan brytas ned med enzymer från svampar och bakterier till lösliga sockerarter för produktion av etanol och biogas eller andra kemikalier. Nedbrytningen går långsamt eftersom cellulosan och hemicellulosan är tätt sammanflätade i växternas cellväggar och oftast inbäddade i lignin, berättar Jerry Ståhlberg och Mats Sandgren, forskare vid Institutionen för molekylärbioologi.

Vi studerar enzymernas tredimensionella struktur för att förstå funktionen, förbättra dem och hitta nya effektivare enzymer (se bild på enzymstruktur till höger). Inom gruppen karakteriserar vi bland annat enzymer som kommer från svampen *Trichoderma reesei* som beskrivs i laborationen som följer efter artikeln.

Nedbrytningen påskyndas också genom att lignocellulosa först luckras upp med så kallad termokemisk förbehandling, ofta med hjälp av syra eller alkali. En lovande metod är ångexplosion, där materialet hettas upp med ånga till runt 200 grader under högt tryck. En ventil öppnas och det plötsliga tryckfallet spränger sönder celler och

cellväggar. Högre temperatur, längre tid och mer kemikalier ger snabbare nedbrytning men kostar mer, förstör en del av sockret och ger toxiska ämnen som hindrar enzymer och mikroorganismer i senare steg.

Inom MicroDrivE testar vi olika växtmaterial som förbehandlats på olika sätt, bland annat halm av vete och havre, samt sågspån av asp, gran och tall.

Etanol – jäsnings med nya jästsorter

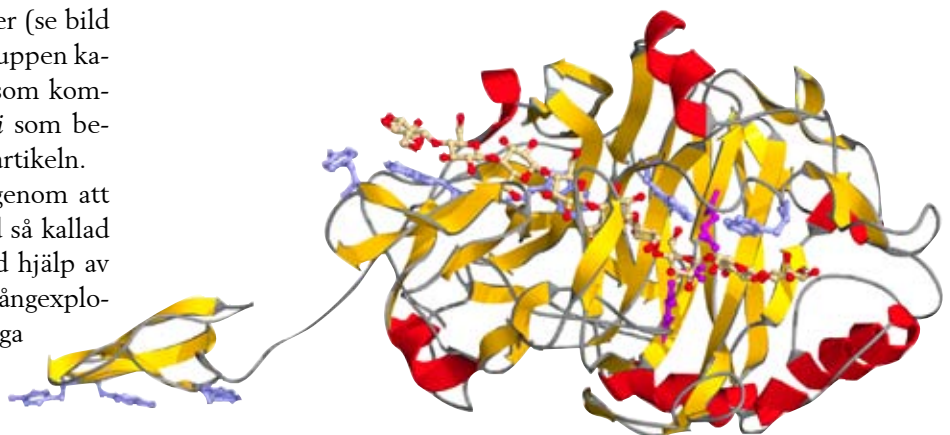
Etanol produceras främst av jäst i en process som vi vanligen kallar för alkoholjäsnings. Ett problem är att traditionella råvaror såsom spannmål, sockerrör och sockerbetor också kan användas som livsmedel vilket gör det önskvärt att hitta "nya" icke livsmedelsrelaterade råmaterial.

Lignocellulosabaserade (vedbaserade) råvaror måste förbehandlas för att frigöra jäsningsbara sockerarter. Vanligtvis betraktas *Saccharomyces cerevisiae*, den vanliga bageri- och bryggerijästen, som den mest lämpliga jästen för etanolproduktion. Vi har undersökt en industriell jäsningsprocess där man återcirkulerade jästen till jäsningsstanken. När vi identifierade processens organismer blev vi överraskade, säger Volkmar Passoth, forskare vid Institutionen för mikrobiologi: Vi fann enbart *Dekkera bruxellensis* (se bild höger), det vill säga en helt annan art än den bagerijäst som man hade ympat med när processen startade. Ändå gick processen bra och stabilt.

Vi undersöker fysiologin hos *D. bruxellensis* för att se hur etanolproduktionen påverkas när man använder en icke-konventionell jäst. Vi undersöker också jästen *Scheffersomyces stipitis* som kan producera etanol från hemicellulosans sockerarter. Vi försöker nu att identifiera reglerande steg vid jäsningsen och vår förhoppning är att finna komponenter som kan modifieras för att erhålla mer effektiva jäststammar.

Dekkera bruxellensis är en ny jäst som utvärderas för industriell framställning av etanol.

Foto: Johanna Blomqvist



Cellulas (Cel7D) från svampen *Phanerochaete chrysosporium*. Den lilla modulen binder till cellulosaafibers yta och underlättar för den större katalytiska modulen att binda in en cellulosa kedja i sin tunnel och klyva bort två sockermolekyler i taget. Illustration: Jerry Ståhlberg

Bioraffinering – nyttiga restprodukter

Vid produktionen av bioetanol bildas drank, en biprodukt som blir över när spannmålets innehåll av stärkelse jästs till etanol. Kvar finns då, protein, fett, mineraler och fiber, viktiga komponenter i djurfoder. Drink används idag som foder i både blöta och torra (pellets) fraktioner, se bild till vänster.

Att torka ner dranken till pellets kostar mycket energi men att använda dranken som en blöt fraktion är också kostsamt. Stora mängder vatten måste transporteras och dessutom är ris-

ken stor att olika mikroorganismer, från den omgivande miljön, börjar tillväxa.

Sådana spontana processer resulterar i stora variationer i både den hygieniska och näringsmässiga kvaliteten hos fodret, något som kan leda till produktionsbortfall och stora ekonomiska konsekvenser för jordbrukaren, säger Matilda Olstorpe, forskare vid Institutionen för mikrobiologi.

För att kontrollera den mikrobiologiska variationen undersöker vi effekten av starterkulturer det vill säga tillsats av en cocktail med specifika mikroorganismer som ska hjälpa till att hålla den mikrobiologiska floran stabil. Detta ska resultera i ett näringsmässigt och hygiensikt bättre men även smakligare foder för djuren.

Biogas – processoptimering

Biogas bildas då olika mikroorganismer bryter ner organiskt material i en syrefri miljö. Processen sker i naturliga miljöer men utnyttjas idag också i konstruerade reaktorer. Metan, den huvudskaliga komponenten i biogas, är en förnyelsebar energikälla som kan användas både som fordonsbränsle eller för att göra el och värme. Idag används bland annat matavfall och slam från vattenreningsverk för biogasproduktion men för att få fram mer gas i framtiden är det viktigt att också kunna använda andra material, som växtbiomassa och drank.

För att få biogasprocessen att fungera är det viktigt att mikroorganismerna får all näring de behöver, säger Anna Schnürer, forskare vid Institutionen för mikrobiologi. För att maximera produktionen måste därför olika material blandas på rätt sätt och ibland måste olika förbehandlings utföras för att säkerställa att mikroorganismerna kommer åt näringen. Vi gör studier i småskaliga biogasreaktorer (se bild nedan) för att utvärdera olika material och behandlingar och också analysera hur mikroorganismerna mår. Resultaten kan sedan användas till att förbättra biogasproduktionen i industriell skala.



Restprodukten från etanoljäsning kan förädlas och pelleteras till ett bra djurfoder. Foto: Niclas Olstorpe



Biogasreaktorer i labskala. Foto: Anna Schnürer

Rötrest – ett bra gödselmedel

I jordbruket används mineralgödsel där kvävet har bundits med hjälp av olja, och fosfor hämtas från ändligena fyndigheter. När vi sedan gödslar läcker en stor del av växtnäringen från våra åkrar eller hamnar i reningsverkets slam. Detta linjära användande av växtnäring är inte hållbart.

I MicroDrivE jämför vi gödslingseffekten av rötrest från biogasprocessen med mineralgödsel och gödsel från grisar och kor. Man brukar oftast anta att rötresterna och djurgödseln är jämförbara med avseende på gödslingseffekter och effekter på det mikrobiella marksystemet. Vi tror inte att det är så enkelt säger, Mikael Pell, forskare vid Institutionen för mikrobiologi.

I växtodlingskammare har vi sett att biogasrötrest ger jämförbara eller till och med högre skördar av vete än då mineralgödsel används, men att det kan variera mycket mellan olika rötrest (se bild till höger). Svinflytgödsel ger en högre skörd. Vi ser att rötrest stimulerar markbakteriernas aktivitet. Mineralgödsel leder till lägre och svinflytgödsel till högre mikrobiell aktivitet jämfört med de rötrest vi har testat. När det gäller produktion av lustgas, en potent växthusgas, så tycks det vara så att både marktyp och rötrestens kvalitet påverkar emissionen.

Systemanalys – produktion av biodrivmedel
För att framtidens samhälle ska bli miljövänligt och hållbart krävs att vi övergår till att använda förnyelsebara material och energikällor och sluter kretsloppen så att näringsämnen återförs till marken.

Hela produktionssystemet inbegripet transporter, energieffektivitet och återvinning undersöks därför med så kallad systemanalys där ekonomi, miljöpåverkan och produktutbyte räknas ut beroende på tillverkningsprocess, råvaror och samverkan med infrastruktur och samhälle.

Inom MicroDrivE sammanför vi därför resultaten från vår forskning och undersöker vilka kombinationer av biobränsleprocesser som är optimala och hur de ska integreras med till exempel kraftvärmeverk och jord och skogsbruk, säger forskare Stefan Trobro och professor Per-Anders Hansson vid Institutionen för energi och teknik. Vi använder experimentella data för att räkna ut mass- och energibalanser och resultaten visar till exempel att etanoljäsning följt av biogasrötning av havrehalm kan ge ett högt biobränsleutbyte och en snabb och effektiv process. Systemanalys kräver stora mängder data och därför bygger vi upp databaser som underlättar processutveckling och planeringen av framtida experiment.



Odlingsförsök med vete. Från vänster: ingen gödsel, mineralgödsel (NP), rötrest och svinflytgödsel. Foto: Mikael Pell

Laboration kring biobränslen: Enzymaktivitet hos svamp

Går det att göra försök i skolan som efterliknar det som forskarna gör? I det följande beskrivs ett modellförsök med svampen *Trichoderma reesei*. Enzym från denna svamp studeras inom projektet MicroDrivE med avsikt att förbättra egenskaperna och därmed bidra till en effektivare biobränsleproduktion.

Enzymerna som studeras i försöken nedan hör till gruppen cellulaser. De produceras huvudsakligen av svampar, bakterier och protozoer. Enzymerna bryter ned cellulosa till lösliga sockerarter som i sin tur kan användas vid exempelvis produktion av etanol och biogas (se sid 11 i artikeln om biodrivmedel). Till cellulaser hör cellobias, som bryter ner cellobios (disackarid) till glukos (monosackarid).

Trichoderma reesei

– en växtnedbrytande svamp i naturen

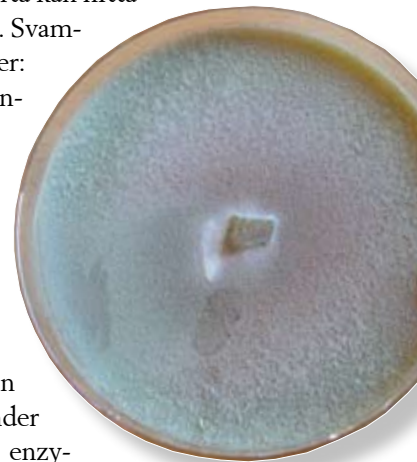
Trichoderma reesei är en vanligt förekommande filamentbildande svamp som man ofta kan hitta där döda växter bryts ned i naturen. Svampen producerar tre typer av cellulaser:

1. Endocellulaser hydrolyserar de interna bindningarna i cellulosa.
2. Exocellulaser hydrolyserar från änden av cellulosamolekyler och bildar disackariden cellobios ($C_{12}H_{22}O_{11}$).
3. Cellobiaser bryter ner cellobios till glukos.

Studenter som läser "Methods in protein chemistry" på SLU, gör under kursen en laboration för att testa enzymaktiviteten hos svampen *Trichoderma reesei*. På Bioresurs håller vi som bäst på att odla upp *Trichoderma reesei*, som vi fått från MicroDrivE, för att anpassa laborationen för skolbruk. Tanken är att vi ska kunna förse lärare, som är intresserade av att göra laborationen, med svampsporer från *Trichoderma reesei*. Vi återkommer senare med mer information om laborationen. Laborationen beskrivs endast översiktligt nedan.

BioFuel Enzyme Kit

Under Bioresursdagarna hösten 2010 fick kursdeltagarna möjlighet att använda samma testmetod för att detektera cellobiasaktivitet, som forskarna använder i MicroDrivE-projektet. Vi använde ett färdigt kit från företaget BioRad, BioFuel Enzyme Kit, som är avsett för skolan (se www.biorad.com). Kittet innehåller modellförsök för att pröva ut optimala förhållanden för cellobias och enzymaktiviteten prövades under



Trichoderma reesei odlad på maltagarplatta.

olika förhållanden; exempelvis varierades pH, temperatur, enzym- och substratkoncentration. Kittet kopplas till biobränsleproduktion.

Som en del i försöken testades även om olika svampar, som man kan köpa i livsmedelsaffärer, har cellobiasaktivitet och vi kunde konstatera att matsvampar, som exempelvis champinjon, portabello och shiitake hade enzymaktivitet.

BioFuel Enzyme Kit kan även användas för att detektera enzymaktivitet vid försök med svampen *Trichoderma reesei* enligt nedan eftersom denna svamp tillsammans med andra enzymer även bildar cellobiaser.

Testa enzymaktivitet hos svampen *T. reesei*



Hela vetekorn mals i mortel för att blandas i odlingsmediet.

Odlingsmedium

Det första steget är att bereda ett odlingsmedium av vatten, malda vetekorn (inköps i mataffär), kaliumdivätefosfat och ammoniumsulfat.

Starta förkultur med *T. reesei*

Till odlingsmediet tillsätts mjölkpulver. Om svampen odlas med laktos som kolkälla sker inget uttryck av cellulaser. Efter det att mediet autoklaverats och svalnat tillsätts sporsuspension innehållande *T. reesei*. Svampen får sedan växa till i mediet.

Starta cellulastuttrycks-kulturerna

I två E-kolvar med odlingsmedium enligt ovan tillsätts papper (t.ex. hushållspapper) respektive jeanstyg, som fungerar som kolkällor. (Se bild ovan till höger.) Kolvarna värms därefter upp. Efter avsvälning ställs pH till 4,5. Därefter autoklaverar man för att avdöda mjölksyrabakterier.

Inokulering med *T. reesei*

En liten mängd av *T. reesei*-förkultur sätts till E-kolvarna, som innehåller hushållspapper respektive jeanstyg. Ett nollprov tas ut. E-kolvarna förseglas med aluminiumfolie och får stå på skakplatta i rumstemperatur i cirka två veckor.



I E-kolvarna finns odlingsmedium, svampkultur och jeanstyg respektive hushållspapper.

Provtagning

Varje dag tas prover ut från de båda odlingarna. Proverna centrifugeras och supernatanten tas till vara. Redan efter några dagar bör man kunna se hur nedbrytningen av hushållspapper respektive jeanstyg har påbörjats.

Proverna fryses in och enzymaktiviteten testas med hjälp av BioFuel Enzyme Kit när försöket avslutats.

Med kittet testas man cellobias förmåga att bryta ner sockerarten *p*-nitrophenyl glukopyranosid till glukos och *p*-nitrophenol. *P*-nitrophenyl glukopyranosid används här som substrat i stället för det naturliga substratet, cellobios, eftersom *p*-nitrophenol ger gul färg i basisk lösning. Den gula färgen kan antingen detekteras visuellt eller med spektrofotometer. På detta sätt kan man indirekt fastställa mängden enzym som har uttryckts i svampkulturen. ■

För mer information om, MicroDrive, kontakta: Mats Sandgren, Institutionen för molekylärbiologi, SLU. Tel: 018-4714592, E-post: mats.sandgren@slu.se, MicroDrive: <http://microdrive.phosdev.se/>



Koppling till styrdokumentet

Artikeln och laborationen om biobränslen anknuter på olika sätt till styrdokumentet för gymnasium och grundskola. Det centrala innehållet i Biologi 1 innehåller bland annat "Energiflöden och kretslopp av materia samt ekosystemtjänster", samt "ekologiskt hållbar utveckling". I grundskolans kursplan för biologi ingår "Människans påverkan på naturen lokalt och globalt. Möjligheter att som konsument och samhällsmedborgare bidra till en hållbar utveckling". Se www.skolverket.se