

**Tillförsel av jäst till SSF i industriell skala
(Supply of yeast for SSF on industrial scale)**



**Examensarbete
Januari – Juni 2010
Kurskod 3D1001
Kungliga Tekniska Högskolan**

Utfört på SEKAB E-Technology AB
Örnsköldsvik, Sverige

Författare: Karin Boström
Handledare: Annika Lambert, SEKAB E-technology AB
Examinator: Gunnar Henriksson, KTH

Sammanfattning

Användning av etanol som drivmedel och en efterfråga på gröna kemikalier driver utvecklingen av bioetanol framåt. Etanolpiloten, SEKAB, i Örnsköldsvik är en av få anläggningar i världen med kompetens och kunskap att producera bioetanol baserat på lignocellulosa. På senare tid har det dock uppstått problem vid etanolframställningen på grund av att en del jästodlingar blivit kontaminerade av bakterier vilket lett till ett sämre utbyte av biomassa och etanol. Det huvudsakliga syftet med detta examensarbete var att ta reda på orsaken till dessa misslyckade jästodlingar.

Examensarbetet delades upp i två huvudsakliga problemområden. Förutom orsaken till de kontaminerade odlingarna studerades även funktionen hos en ny jäststam, *Saccharomyces cerevisiae* torrjäst, i syfte att undersöka om det finns bättre alternativ till den jäststam som används i etanolpiloten i nuläget.

En specialstudie av rengöringen av odlingstankar och ledningar i etanolpiloten utfördes i syfte att kartlägga var i utrustningen som infektionsrisken är som störst. Försöken påvisade att det huvudsakliga problemet kan lokaliseras till den största jästodlingstanken. Där befinner sig jästen under en längre tid i en miljö som är gynnsam för tillväxt av både jäst och bakterier. En annan orsak till de infekterade odlingarna är att rengöringen av utrustningen inte har skett på rätt sätt, samt att temperaturen hos tvättkemikalierna har varit för låg. En viktig slutsats är därför att bättre rutiner vid hanteringen av jästodlingsutrustningen samt att större noggrannhet i samband med rengöringen bör eftersträvas.

En bidragande orsak till de infekterade odlingarna kan också härröra från uppodlingsprocessen av ympjäst som i dagens läge sker på laboratorium. Genom att använda en stam av *S. cerevisiae* som köps in i frystorkad form kan flera steg i jästodlingsprocessen elimineras. Det både förkortar odlingsprocessen och minskar infektionsrisken. *S. cerevisiae* torrjäst undersöktes både i laboratorium och i etanolpiloten. Tre olika odlingsskalor användes, skakflaskor (250 ml), labfermentorer (3 l) och pilotskala (10m³). Försöken påvisar höga utbyten av både biomassa och etanol. För att kunna hålla nere produktionskostnaderna för etanolframställningen är det viktigt att jästen som används går att odla på det hydrolysat som produceras vid förbehandlingen av råvaran. Försök i pilotskala visar på lovande resultat vid uppodling av *S. cerevisiae* torrjäst när hela 70 % av sockerkällan kommer från hydrolysat. Ytterligare utvärdering och optimering av odlingsprocessen samt en ekonomisk jämförelse mellan de tillgängliga jäststammarna krävs dock innan *S. cerevisiae* torrjäst eventuellt kan användas kontinuerligt i pilotskala.

Abstract

The development of bio-ethanol production is driven by the increased use of ethanol as a fuel and the demand for green chemicals. The research facility SEKAB, situated in Örnsköldsvik, is one of a few facilities in the world with the knowledge and equipment to produce lignocellulose based bio-ethanol. Recently, however, there has been some problems in the production of the bio-ethanol due to the fact that some of the yeast cultures needed in the process have become contaminated by bacteria, this leading to a reduction in the yield of biomass and ethanol. The main purpose of this study was to determine the cause of these failed yeast cultivations.

The thesis was divided into two main tasks. The first objective was to study the contaminated yeast cultivations, and the second objective was to analyze the function of a new yeast strain - *Saccaromyces cerevisiae* dry yeast, in order to examine whether there are better alternatives available compared to the yeast strain currently in use at the facility.

A special study of the cleaning phase, where pipelines and cultivation tanks at the facility are getting cleaned between different runs, was conducted in order to identify where in the equipment the risk of infection is highest and most likely to occur. The study showed that the main problem is located in the largest yeast cultivation tank. This is due to the fact that the yeast stays here for a long time in an environment highly favourable for growth of not only yeast, but also bacteria. Another cause of the infected cultivations has to do with the cleaning of the equipment, which often has not been performed properly. Also, the chemicals used during the cleaning phase have not been used at the temperature where they have the greatest effect. The study concludes that it is of great importance that the management of the cultivation equipment is being carried out to the acquired standard, and also that the cleaning phase needs to be completed correctly.

A contributing factor to the infected cultivations may also result from the process in which the yeast inoculum culture is being cultivated. Currently this process is performed at the facility's laboratory. A study of another yeast strain, *S. cerevisiae* dry yeast, was conducted in order to evaluate its suitability as a substitute to the yeast strain currently in use. *S. cerevisiae* dry yeast is purchased in freeze dried form which means that several steps in the cultivation process are eliminated. This both shortens the reproductive process and reduces the risk of infection. The suitability of *S. cerevisiae* dry yeast was analyzed in laboratory as well as the facility's large scale equipment. Three different scales of cultivation were used; shake flask (250 ml), lab-fermentors (3l) and large scale (10m³). The experiments demonstrate high yields of both biomass and ethanol. In order to keep production costs low, it is important that the yeast used in the process can be grown out of the hydrolysate produced in the pre-treatment of the raw material. Large scale experiments shows promising cultivation results of *S. cerevisiae* dry yeast, where as much as 70% of the sugar source is derived out of hydrolysate. Further evaluation and optimization of the cultivation process, as well as an economic comparison of available yeast strains, is still required before *S. cerevisiae* dry yeast can be used continuously in the facility's large scale production.

Tack

till SEKAB E-technology för möjligheten att få utföra mitt examensarbete hos er.

Speciellt stort tack till min handledare Annika Lambert.

Jag vill även tacka Carl-Axel Lalander och Tomas Brandberg, för er hjälp och era bra tips och idéer.

Sist men inte minst vill jag också passa på att tacka hela gänget operatörer i etanolpiloten, för er betydelsefulla insats i detta examensarbete.

Tack också till alla ni andra som har bidragit till min härliga vår i Örnsköldsvik.

Karin Boström

Innehåll

Sammanfattning	3
Abstract	4
Innehåll	7
Inledning	9
Bakgrund	9
Odling av jäst i etanolpiloten	9
Disposition	9
Etanolpiloten, SEKAB E-technology AB, Örnsköldsvik	11
Jäststammar	12
Teori	13
Metabolism	13
Odlingsmetoder	13
Batch	13
Fedbatch	14
Lignocellulosa	14
Kolhydrater och lignin	14
Pentosjäsning	15
Hydrolys	15
Inhibitorer	16
Cleaning-in-place	16
Metod	17
DEL 1	19
Material och metoder	19
Mätning och analys	19
Försök del 1	20
Resultat del 1	23
DEL 2	28
Försök del 2	28
Resultat del 2	29
Provvätska	30
Slutsats och diskussion	31
Källor	33
Bilaga 1	37
Bilaga 2	38
Bilaga 3	39
Bilaga 4	41

Inledning

I takt med en ökad efterfråga på förnyelsebar energi och gröna kemikalier drivs utvecklingen av etanolframställningen framåt. Idag produceras etanol främst på jordbruksgrödor som till exempel sockerrör och majs. Genom att istället utnyttja skogsråvaror och restprodukter från jordbruket för ändamålet, undviks en konkurrenssituation med matproducenterna om jordbruksmarken. Processen att framställa etanol baserad på lignocellulosa är dock betydligt mer komplicerad än på första generationens grödor. Etanolpiloten, SEKAB, i Örnsköldsvik är en av få anläggningar i världen med kunskap och kompetens för framställningen av andra generationens etanol.

Bakgrund

Upprepade gånger har en hög bakteriehalt uppmätts i jästodlingen i etanolpiloten. Denna halt har kvantitativt mätts och undersökts i mikroskop. Analys med hjälp av HPLC (high-pressure liquid chromatography) har även påvisat en hög mjölksyraproduktion. Genom att mjölksyraproducerande bakterier tar upp glukos minskar utbytet av biomassa (jäst) och etanol. Jästodlingssteget i etanolframställningsprocessen är ett av de mest kostnadskrävande stegen samt att en hel del koldioxid släpps ut av jästen som biprodukt. Med en effektiv jästodlingsprocess med högt biomassa-utbyte finns stora summor att spara.

I kommersiell jästproduktion odlas jästen främst på ett melassbaserat odlingsmedium, men inom tillverkning av celluloasetanol är det önskvärt att ha en fungerande jästodling på hydrolysat från förbehandlingen för att kunna hålla en låg produktionskostnad.

Odling av jäst i etanolpiloten

I dagens läge används en stam av *Saccharomyces cerevisiae* (CCUG 55310) från Domsjö Fabriker, Örnsköldsvik. Denna odlas upp i skakflaska på laboratorium och överförs sedan till en ymptank i pilotanläggningen. Processen är både tidskrävande och löper stor risk för att bli kontaminerad eftersom flera av dessa delsteg kräver mänsklig inblandning. En möjlighet till renare process och snabbare uppodling är att använda torrjäst eftersom denna kan tillsättas direkt i ymptanken. Genom att hoppa över de första odlingsstegen förkortas både odlingsperioden och risken för infektioner minskar. Vinsten med detta blir en snabbare, renare och enklare process samt ett högre jästutbyte. Man undviker även risken med misslyckad skakflaskodling.

Vid en misslyckad jästodling tvingas man vid etanolpiloten att köpa in kommersiellt odlad jäst från Jästbolaget till fermenteringen. Detta har en viss leveranstid och kort hållbarhet. I en industriellanläggning i full skala är detta inte ett rimligt förfarande. Det är ytterst viktigt och nödvändigt att etanolpiloten har en egen och väl fungerande jästproduktion. Både med avseende på produktionskostnad och för odling av icke kommersiella jäststammar.

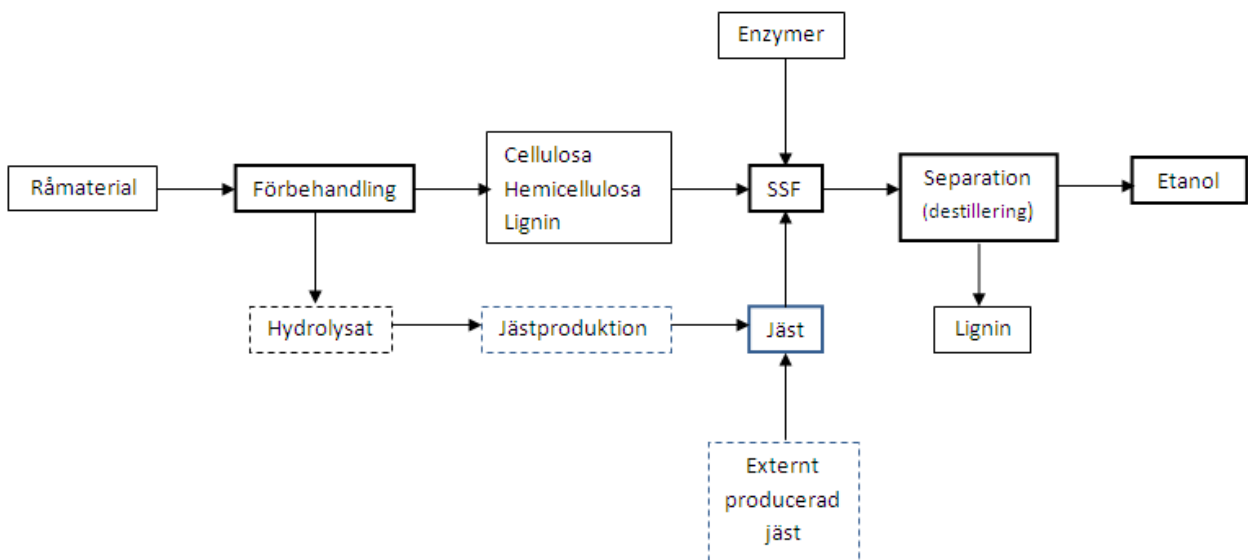
Disposition

Examensarbetet är uppdelat i två delar där del 1 syftar till att undersöka en ny jäststam, *S. cerevisiae* torrjäst, och fastställa om det är ett alternativ för etanolpiloten. En jämförelse av denna jäst mot *S. cerevisiae* CCUG 55310 och Jästbolagets KronJäst med avseende på bland annat biomassa-utbyte och jäsningskapacitet har genomförts. En lyckad odlingsprocess beror även till mycket stor del av en ren utrustning. Del 2 i examensarbetet gick därför ut på att undersöka den befintliga jästodlingsutrustningen i etanolpiloten. Genom att noga analysera och följa upp varje jästodling och rengöringen av odlingsutrustningen kunna spåra vad infektionerna kan uppstå ifrån. Examensarbetet är uppbyggt genom att från två håll arbeta med att nå det gemensamma målet med att förbättra odlingsprocessen i etanolpiloten.

De två delarna är sammanställda separat för att sedan avslutas med gemensam slutsats och diskussion. Aktuell teori presenteras först, därefter följer de två delarna med försöksupplägg och resultat.

Etanolpiloten, SEKAB E-technology AB, Örnsköldsvik

Etanolpiloten Örnsköldsvik är en av få anläggningar i världen i sin skala (Banerjee et al., 2009) och invigdes 2004. Kapaciteten i etanolpiloten är 300-400l etanol/dygn och drivs kontinuerligt av skiftgående operatörer. Uppskalningsfaktorn till en fullskalig anläggning är ca 800 gånger (baserat på träråvara och producerad volym etanol) för en ekonomisk hållbar process (SEKAB, 2010). Projektet med etanolpiloten syftar till att kommersialisera tekniken för produktion av lignocellulosaetanol med målet att ”utveckla en industriell struktur för att leverera kunskap och utrustning gällande framställning av cellulosaetanol.” (SEKAB, 2010). Barrved och sockerrörsbagass är exempel på väl beprövade råmaterial. Svårigheten med dessa material kontra första generationens råvaror som till exempel majs och sockerrör är den komplexa cellväggsstrukturen. Cellulosan och hemicellulosan hålls ihop med hjälp av lignin. Ligninet fungerar som trädets klistor och ger hållbarhet och styrka men det bidrar också till att göra nedbrytningsprocessen av materialet problematiskt. Lignin fungerar som en mycket bra energikälla efter att den har separerats från kolhydraterna under förbehandlingen. Genom att både kolhydrater och lignin kan utnyttjas i processen ges ett mycket bra energiutbyte (Yuan et al., 2008).



Figur 1 Etanolprocessen. Förbehandlingen syftar till att lösa ut cellulosan och hemicellulosa med hjälp av bland annat svagsyrahydrolys. Slurryn som bildas jäses sedan till etanol, vilket kan ske genom så kallad SSF (simultaneous saccharification and fermentation) där enzymerna lösgör socker som jästen samtidigt omsätter till etanol. Etanolen separeras sedan ut i en destillationsanläggning. Samtidigt får man också ut det fasta materialet som till största delen består av lignin som till exempel kan förbrännas i värmekraftverk för att producera energi. Figur (Olofsson K et al., 2008)

Jäststammar

***S. cerevisiae* CCUG 55310**

Har sitt ursprung från Domsjö Fabriker, Örnsköldsvik. Stammen används ofta som fermenterande organism i etanlpiloten.

KronJäst

Kommersiell bagerijäst producerad av Jästbolaget, Rotebro. Stam av *S. cerevisiae*. Jästen används i laboratoriet både som levande jästkultur och som torrjäst, beroende på försök. Den kan även användas i etanlpiloten.

***S. cerevisiae* torrjäst**

S. cerevisiae torrjäst är en stam av *S. cerevisiae*. Den är externt producerad och speciellt framtagen för industriell produktion av bränsleetanol. Den har en hög etanoltolerans och är framställd främst för fermentering av jordbruksgrödor. Anledningen till att denna stam är intressant att bruka i etanlpiloten är bland annat att den levereras i frystorkad form. Det gör att jästen har en lång hållbarhet och alltid finns tillgänglig. Att använda torrjäst medför också en enklare odlingsprocess och minskad risk för kontamination då flera delsteg kan strykas.

Teori

Metabolism

Jäst är en kemoorganotrofisk organism vilket betyder att den får sin energi genom nedbrytning, katabolism, av organiska molekyler som till exempel kolhydraten glukos. Energin den tillgodogör sig krävs för att upprätthålla livsviktiga funktioner samt för tillväxt och förökning, så kallade anabola funktioner. De katabola och anabola processerna sker samtidigt och är beroende av att vissa co-faktorer, till exempel NAD^+/NADH , ständigt finns närvarande. Jäst är en fakultativ anaerob vilket innebär att den kan växa både med och utan syre tillgängligt. Det medför också att jästen har många av sina anaeroba enzymssystem aktiva även under aeroba förhållanden (Enfors och Häggström, 2000).

Första stegen för nedbrytning av glukos sker i glykolysen där det omvandlas i flera delsteg till pyruvat. Den här nedbrytningen kräver bland annat den reducerande molekylen NAD^+ för att kunna genomföras. Vid tillgång till syre fortgår sedan nedbrytningen av pyruvat till energi, koldioxid och vatten via citronsyrcykeln och vidare elektrontransportkedjan. NADH bildas i citronsyrcykeln för att sedan reoxideras till NAD^+ i elektrontransportkedjan. Ett annat sätt för jästen att reoxidera NAD^+ är att fermentera etanol vilket huvudsakligen sker under anaeroba förhållanden (Nelson D L et al., 2005). Jästen kan även producera etanol under aeroba förhållanden då det finns kolkälla i överflöd, så kallad överflödesmetabolism. Ett tredje sätt för jästen att åter skapa NAD^+ är att producera glycerol. Substratet som jästen tar upp går till tre huvudsakliga funktioner; anabolism, energi för underhåll och energi för tillväxt (Enfors och Häggström, 2000).

Jäst kräver ett relativt brett spektra av näringsämnen och ett komplext definierat medium krävs ofta vid uppodling (Enfors och Häggström, 2000). Huvudsakliga näringsämnen är socker, kväve, fosfat, och magnesium. Sedan krävs en hel del spårämnen och vitaminer. Många av de näringsämnen som jästen kräver tillförs med melass som innehåller flera olika sorters socker och ett stort antal aminosyror (Enfors och Häggström, 2000).

Odlingsmetoder

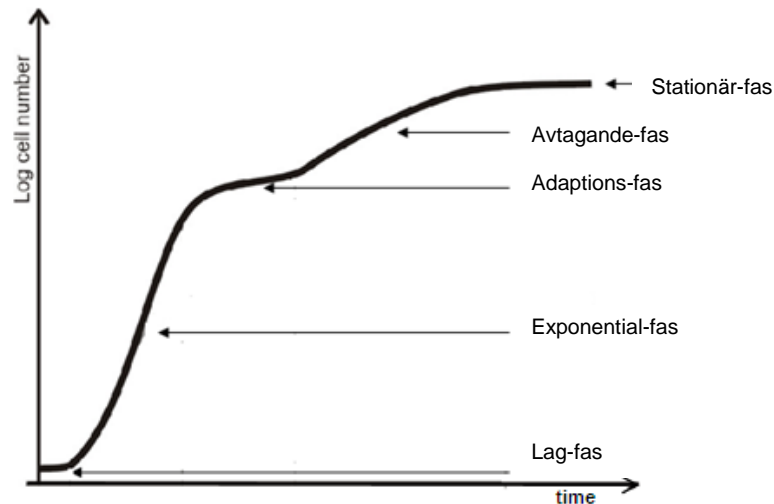
Det finns i huvudsak tre olika metoder för odling av jäst, dessa är batch, fedbatch och kontinuerlig odling (Enfors och Häggström, 2000). I piloten tillämpas batch och fedbatchodling. Anledningen till detta är att man på så sätt kan uppnå det högsta utbytet av biomassa.

Batch

I en batchodling låter man jästen växa med obegränsad tillgång på socker och näringsämnen. När omgivande sockerkoncentration är för hög, hinner inte allt pyruvat omsättas i citronsyrcykeln trots god syretillgång, utan överskottet metaboliseras till etanol istället. Det här är en möjlighet för fakultativa organismer att reoxidera NAD^+ eftersom de har delar av sina anaeroba enzymer aktiverade även under aeroba förhållanden (Enfors och Häggström, 2000). När sockerkällan har tagit slut i odlingsmediet avstannar tillväxten en kort period då jästen adapterar sig till att kunna ta upp etanol som kolkälla. Under adaptations-fasen aktiveras enzymerna som ingår i glukoneogenesen (Enfors och Häggström, 2000), processen som återbildar glukos från etanol (Nelson D L et al., 2005). Det gör att odlingskurvan vid en batchodling har två tillväxtfaser, så kallad ”diauxic growth”.

I början på en batchodling befinner sig jästen i en lag-fas, se figur 2. Där sker knappt någon tillväxt utan jästen jobbar med att anpassa sig till den nya omgivningen. Lag-fasen övergår sedan till exponential-fasen där cellerna växer vid maximala tillväxthastigheten (μ_{max}) och cellmängden ökar exponentiellt till dess att sockret är slut eller något näringsämne blir begränsat. Jästen övergår då i

adaption-fasen. Därefter följer en avtagande-fas där etanolen tas upp. Tillväxthastigheten är lägre och jästkulturen övergår sedan i stationär-fasen. Under stationär-fasen avstannar tillväxten antingen som en konsekvens av att substratet är slut eller ackumulation av någon form av inhibitor (Enfors och Häggström, 2000).



Figur 2 Tillväxtkurva under batchodling av *S. cerevisiae* (Swinnen et al., 2006)

Fedbatch

Fedbatch är den odlingsmetod som ger högst biomassautbyte. Man börjar ofta en fedbatchodling med en batchfas. Efter att batchfasen har gått klart börjar inmatningen av odlingsmedium eller endast ett tillväxtbegränsande näringsämne (Enfors och Häggström, 2000). Sockerkoncentrationen i odlingsmediet anpassas efter den cellkoncentration som önskas uppnås i slutet av odlingen (Thi Bich Pham H, 1999). Inmatningen anpassas sedan efter jästens tillväxthastighet för att så mycket socker som möjligt ska gå till biomassa. Under fedbatch är det viktigt att jästens kritiska upptagningshastighet av substrat inte nås för att undvika överflödesmetabolism (Pettersson och Lidén, 2006). Om för mycket socker tillsätts producerar jästen etanol som biprodukt, precis som i batchfasen och biomassautbytet minskar. Genom att etanolhalten i odlingstanken mäts momentant, kontrolleras att inmatningen av medium sker i rätt hastighet och att så mycket som möjligt av sockret går till biomassa (Pettersson och Lidén, 2006). Genom noggrann mätning av etanolhalten i odlingstanken kan alltså jästodlingen optimeras. I slutet av odlingen avtar ofta tillväxten, vilket bland annat kan bero på begränsad syretillförsel (Pettersson och Lidén, 2006).

Lignocellulosa

Kolhydrater och lignin

Cellulosa är en linjär polymer bestående av sammanlänkade β -D-glukosenheter med hjälp av glykosidbindningar. Vätebindningar och van der Waals bindningar hjälper sedan till att stabilisera och sammanlänka de olika delarna och bidra till cellulosans kristallina struktur (Henriksson G och Lennholm H, 2009). Tuff förbehandling krävs därför för att bryta ner den mycket stabila strukturen (Olsson L och Hahn-Hägerdal B, 1996).

Hemicellulosa är en grenad polymer bestående av flera olika sorters monomerer, både hexoser och pentoser. Huvudsakliga monomerer är glukos, mannos, galaktos, xylos och arabinos (Teleman A,

2009). Sammansättningen av dessa varierar mellan olika lignocellulosamaterial. På grund av den varierande sammansättningen och grenade strukturen är hemicellulosan inte kristallin som cellulosa, utan är lättare att bryta ner vid förbehandlingen.

Lignin är en hydrofob polymer som bidrar med att ge trädets dess mekaniska styrka. Lignin har en mycket komplex struktur med både aromatiska och alifatiska enheter. Den består huvudsakligen av tre olika monolignoler, *p*-coumaryl alkohol, coniferyl alkohol och sinapylalkohol (Henriksson G, 2009). Under förbehandlingen av lignocellulosa skadas även ligninet och ger upphov till flertalet aromatiska och polyaromatiska föreningar som påverkar den fermenterande mikroorganismen (Olsson L och Hahn-Hägerdal B, 1996). Lignin utgör också den huvudsakliga biprodukten vid etanoltillverkning och är en viktig värme- och energikälla (Galbe M och Zacchi G, 2002).

Pentosjäsnig

S. cerevisiae används flitigt som fermenteringsorganism vid produktion av etanol. Nackdelen med denna mikroorganism är att den saknar förmågan att omsätta pentoser, 5-kolssocker (Doran-Peterson et al., 2008). *S. cerevisiae* nyttjar i stort sett endast hexoser, sexkols-socker, vilket gör att ett maximalt utnyttjande av kolhydraterna inte erhålls. Med hjälp av genmodifiering kan gener för pentosjäsnig införas i *S. cerevisiae* och andra fermenterande mikroorganismer. Flera genmodifierade stammar finns tillgängliga på marknaden (Doran-Peterson et al., 2008). Granflishydrolysat som främst används i etanolpiloten innehåller pentoser till endast ca 7% av torrvikten (Olofsson K et al., 2008) och vanlig icke modifierad jäst ger därför fullt tillräckligt utbyte i produktionen. Nyttjande och försök med andra skogsråvaror eller jordbruksavfall kräver dock möjlighet till jäsnig av pentoser då innehållet i dessa material är >15 % av torrvikten (Olofsson K et al., 2008; Doran-Peterson et al., 2008).

Hydrolys

Förbehandlingen i etanolprocessen syftar till att separera de huvudsakliga beståndsdelarna i råvaran från varandra och göra materialet mer poröst samt att frigöra cellulosa och minska dess kristallinitet (Jørgensen et al., 2007). Efter denna behandling kan enzymerna sedan lättare komma åt cellulosakedjorna och frigöra sockermolekylerna. I etanolpiloten används bland annat så kallad svagsyrahydrolysteknik i förbehandlingen. En låg koncentration syra i kombination med en hög temperatur omvandlar cellulosa effektivt (Galbe M och Zacchi G, 2002). Den tuffa förbehandlingen bidrar dock till att den lättnedbrytbara hemicellulosa och lignin sönderdelas och frigör ämnen och föreningar (Jones J L och Semrau K T., 1984). De flesta av dessa ämnen är toxiska för den fermenterande mikroorganismen samt att bildningen av dem minskar det totala utbytet (Almeida et al. 2007). Flertalet studier har visat att *S. cerevisiae* är en av de organismer som har visat sig mest tålig mot dessa inhibitorer (Olsson L och Hahn-Hägerdal B, 1993; Olsson L, Hahn-Hägerdal B, 1996; Dien et al., 2003).

För att frigöra de enskilda monomererna i cellulosa och hemicellulosa finns flera tekniker att tillgå. I etanolpiloten används bland annat enzymatisk hydrolys i samband med fermenteringen, så kallad SSF, simultaneous saccharification and fermentation. Fördelen med denna metod mot SHF, separate hydrolysis and fermentation, är att jästen omsätter de fria sockermolekylerna i samma takt som de frigörs. På så sätt undviks det att enzymerna hämmas av en för hög sockerkoncentration som kan vara ett problem i och med SHF-tekniken (Wingren A et al., 2003). Fördelen med SHF är däremot att processen kan genomföras under, för de olika delarna, optimala temperaturer (Tomás-Pejó E et al., 2008). Enzymerna jobbar bäst i en temperatur kring 50°C medan *S. cerevisiae* föredrar en temperatur kring 30°C för optimal fermentering. I SSF sker en kompromiss och processen körs vid 35°C. (Galbe M och Zacchi G, 2002) Med SHF-tekniken är även en recirkulering av jästen en möjlighet. Detta fungerar inte med SSF eftersom det bland annat innehåller för mycket fibrer. En annan orsak är att både lignin och jäst är blandade i processen och det är svårt att separera dessa från varandra (Pettersson och Lidén, 2006).

Inhibitorer

Vid dehydrering av pentoser och hexoser bildas ett flertal olika ämnen som kan verka inhiberande på mikroorganismer (Mills et al., 2009). Furanerna furfural (2-furaldehyd) och HMF (5-hydroxymetyl-2-furaldehyd) hämmar jästens tillväxt och minskar utbytet av etanol genom att de direkt inhiberar flertalet enzymer som är involverade i syntesen av acetyl-CoA och etanolfermentering (Modig et al., 2002; Nelson D L et al., 2005). Ökad glycerolproduktion är även en effekt av aerob odling av jäst i hydrolysat innehållande furfural. Under aeroba tillväxtförhållanden oxideras furfural till furoic acid, en process som kräver NAD⁺ (Horvath et al., 2003). För att reoxidera NADH svarar jästen med att producera glycerol på grund av otillräcklig kapacitet för extra NAD⁺-regenerering i andningskedjan. Ökad glycerolproduktion ger ett minskat utbyte av biomassa och det föreslås därför att effekten av bland annat dessa inhibitorer kan vara större under odling än fermentering (Pettersson och Lidén, 2006). Enligt (Larsson S et al., 1999b) har furfural även förmågan att förlänga lag-fasen då jästen möter ett hydrolysatbaserat odlingsmedium innehållandes inhibitorer under en SSF. Detta tros bero på att jästen under dessa förhållanden måste reducera furfural till furfuryl alkohol vilket tros påverka lag-fasens längd. HMF kan vidare brytas ner till svaga syror så som levulinsyra och myrsyra (Larsson S et al., 1999). Deacetylering av hemicellulosa bildar ättiksyra. Dessa syror kan diffundera genom cellmembranet och påverka det intracellulära pH:t. En minskning av pH påverkar i sin tur jästens ATP förbrukning så att mindre energi finns tillgänglig för att producera biomassa. Under anaeroba förhållanden tros dock en liten mängd av svaga syror trigga jästens ATP produktion vilket bidrar till ett högre etanolutbyte (Larsson S et al., 1999).

Fenoler bildas i och med nedbrytning av lignin under förbehandlingen. Komplexiteten hos molekylerna och typ av råvara bidrar till bildning av ett flertal fenoliska föreningar. Kunskapen om dessa föreningar är i dagsläget knapp, men det finns viss forskning som tyder på att placeringen av molekylens substituent har en betydelse för dess inhiberande effekt (Almeida et al. 2007; Larsson et al, 2000). Etanolutbytet minskar vid förekomst av inhibitorer och genom att detoxifiera hydrolysatet kan antalet inhibitorer reduceras (Palmqvist och Hahn-Hägerdal, 2000b). Tre huvudsakliga metoder finns att tillgå; kemisk, biologisk och fysisk. Metodernas effekt varierar med hydrolysatets sammansättning och det är därför svårt att förutse resultatet av detoxifieringen (Palmqvist och Hahn-Hägerdal, 2000a).

Cleaning-in-place

Cleaning-in-place (CIP) är ett rengöringssystem som kombinerar mekanisk med kemisk rening. Det används inom industrin där det ställs höga krav på renhet i tillverkningsprocessen eller på produkten. Ett väl anpassat CIP-system minskar risken för kontamination och bakterietillväxt bland annat genom att systemet förenklar och förbättrar rengöringen av tankar och slutna system med hjälp av att rengöringssekvensen till stor del sker automatiserat.

En smutsig utrustning är en av de vanligaste orsakerna till en misslyckad process. En renare process ger ett högre utbyte eftersom mer socker kan omsättas av jästen och inte av andra oönskade mikroorganismer. Både inom livsmedelsbranschen som inom bioteknikindustrin kan en förorenad produkt bli väldigt kostsam. En misslyckad jästodling vid etanolpiloten påverkar hela tillverkningsprocessen genom att en ny jästodling snabbt måste startas upp eller extern jäst köpas in. Det är ytterst viktigt att förbehandlingen och jästodlingen sker hand i hand för att kunna ha en kontinuerlig drift i anläggningen.

Den största risken för en misslyckad produktion är någon form av nedsmutsning under processens gång (Chisti Y, 1992). Nedsmutsningen kan bero av flera orsaker, mikroorganismer kan komma in via råmaterialet, infekterad ymp eller genom otillräcklig sterilisering av utrustningen (Junker B et al., 2006). Den mänskliga faktorn är även en bidragande orsak till kontaminering. Felaktig information, bristande rutiner, slarv och otillräcklig dränering av ledningar och rörslut kan vara nog så stora orsaker

till en misslyckad produktion (Junker B et al., 2006). Andra bidragande orsaker kan vara processreaktorernas och tankarnas utformning med onödigt många döda zoner, tätningar och ventiler.

Fördelen med ett automatiserat rengöringssystem är att det är enkelt att genomföra av operatörerna och att det är tidseffektivt eftersom det kan ske under processens gång. Helt automatiserad kan en rengöringsprocedur dock aldrig bli. Det är ytterst viktigt att operatörerna i den befintliga anläggningen hela tiden kontrollerar att rörstumpar och ledningar är tömda och fria från smuts och processmedium (Junker B et al., 2006).

Metod

CIP-vätskan fördelas vanligtvis i tanken med hjälp av en sprejboll, en så kallad CIP-kula, eller CIP-munstycket. Det är viktigt att ett tillräckligt högt flöde uppnås eftersom den mekaniska kraften utnyttjas för att eliminera lös och grov smuts samt för att försäkra att rengöringskemikalierna ger önskvärd effekt på samtliga områden i tanken (Chisti Y och Moo-Young M., 1994). Ofta sprayas bara ca en tredjedel av tanken och resten rengörs av rinnande vätska längs insidan. Det är även viktigt att området ovanför CIP-kulan nås av rengöringsvätskan och att rengöringsproceduren sker tätt efter att tanken har används för att förhindra att smutsen klumpar ihop och fastnar i tankar och ledningar. Det är också viktigt att CIP-systemet kommer åt att rengöra kring propellrar och skumbrytare. I områden kring dessa är det annars stor risk för att biofilm och gynnsamma mikroklimat för bakterier kan uppstå (Chisti Y och Moo-Young M., 1994).

Vid rekommendationer för CIP-sekvens och utrustning är det inte tankstorleken som är den avgörande faktorn utan produkten som tillverkas. En minuts sköljning kan i vissa fall räcka för att ta bort den grova smutsen, medan en fem minuter lång sköljning i ett annat fall är otillräcklig (Chisti Y och Moo-Young M., 1994).

För att försäkra att den kraftigaste nedsmutsningen försvinner och inte sedimenterar i tankar och ledningar, krävs en flödes hastighet på minst 1,5 m/s (Ecolab 2008; Chisti Y och Moo-Young M., 1994). Andra krav som ställs på rörledningar och system är att de är anpassade för att CIP-vätskan ska kunna passera igenom med turbulent flöde. För att garantera rengöring av ledningarna bör Reynolds nummer vara minst 10^4 (Chisti Y och Moo-Young M., 1994). Turbulens krävs bland annat för att värmeöverföringen och transporten av tvättvätska och kemikalier ska ske i tillräcklig hastighet och för att försäkra god rengöring (Chisti Y och Moo-Young M., 1994). Det är även stor risk att det finns kvar sporer i rör och ledningar efter rengöringen om inte flödet är tillräckligt högt.

Vid konstruktionen av en bioprocessanläggning är det även viktigt att försöka undgå döda zoner och små utrymmen. I dessa blindtarmar har CIP-vätskan mycket svårt att komma åt att rengöra och det kan ansamlas smuts och processrester, vilket utgör en mkt bra grogrund för bakterier (Ecolab, 2008). För att minimera risken för kontamination är det därför ytterst viktigt att utrustningen innehåller så få döda zoner som möjligt. Rörstumpar från ledningar och tankar bör inte vara längre än två gånger rörets diameter för att rengöringskemikalierna ska komma åt och göra rent (Chisti Y och Moo-Young M., 1994).

Rengöringseffekten i ett CIP-system beror av fyra huvudsakliga faktorer: Tid, temperatur, koncentration och mekanisk kraft (ICD, 2010). En för kort sekvens lämnar kvar processrester i tanken och ger otillräcklig renhet. En högre temperatur ger i de flesta fall en effektivare rengöring, det är även viktigt att ett tillräckligt högt flöde, gärna inom det turbulenta området, uppnås eftersom den mekaniska kraften utnyttjas för att eliminera lös och grov smuts samt för att försäkra att rengöringskemikalierna ger önskvärd effekt på samtliga områden i tanken (Sansebastiano et al., 2007).

CIP-sekvensen kan se olika ut vid olika anläggningar. Längden på rengöringsstegen kan varieras, olika sekvenser kan köras och flödesvolymen varieras. Systemet är på så sätt otroligt flexibelt och kan anpassas helt efter önskemål och rengöringsgrad. Ett standardschema är utarbetat och varieras därefter

beroende på produktionsprocess. Sekvensen startar med en försköljning med det huvudsakliga syftet att skölja bort grov smuts och processrester. Vid försköljningen är det viktigt att tanken töms ordentligt så att ingen smuts finns kvar på botten. I steg två tillförs en alkalisk lösning, ofta natriumhydroxid, med uppgift att sönderdela och eliminera den kvarvarande smutsen efter försköljningen (Sansebastiano et al., 2007). Koncentrationen på lösningen bör vara ca 1% (w/v) och hålla en temperatur mellan 70-80°C (Chisti Y och Moo-Young M., 1994). Inom mejeriindustrin är det vanligt att luten recirkuleras i CIP-systemet (Norrmejerier, 2010). Inom andra bioprocesser är den metoden inte lika effektiv eftersom risken för kontaminering med smuts och sporer är alldeles för stor. Utspädning av CIP-vätskan skulle också leda till sämre rengöring vid nästa CIP-sekvens (Chisti Y och Moo-Young M., 1994). En ordentlig tvättning efter lutssteget krävs sedan för att få bort kvarvarande kemikalier och neutralisera pH. I vissa fall adderas även ett syrasteg efter lut-tvätten. Det används främst för att ta bort salter som har fällts ut på väggarna.

Som ett sista steg i CIP-sekvensen kan tanken rengöras med varmvatten eller ånga. Ångan fungerar som ett desinfektionssteg och reducerar mängden mikroorganismer. Vanligtvis kan metoden inte eliminera bakteriella sporer. Detta steg garanterar också att vattnet som blir kvar i tanken innan nästa omgång har hög standard (ICD, 2010).

Trots en ordentlig rengöring kan det finnas rester kvar i systemet. Biofilm och avlagringar kan bildas i små utrymmen som blindrör och sprickor där CIP-vätskan inte kan komma åt. Bakteriella sporer är mycket resistenta och har förmågan att överleva i de flesta miljöer och behandlingar (Le Gentil et al., 2010). Test har visat att biofilm skyddar sporer från att nås av rengöringsvätskan (Wirtanen G och Salo S, 2003). Utan ett tillräckligt flöde genom rör och ledningar är det även stor risk för att sporer överlever CIP-behandlingen (Lelièvre et al., 2002). Även mikromiljön som kan bildas i och med saltutfällningar och avlagringar kan erbjuda en gynnsam miljö för sporer att överleva (Sansebastiano et al., 2007). Även celler kan skyddas i biofilmen och överleva under rengöringsproceduren och sedan kontaminera produkten (Wirtanen G och Salo S, 2003).

Det är viktigt att notera är att en CIP-sekvens inte skapar en steril miljö, utan en ren. En helt steril miljö uppnås inte, utan en viss grad av smuts/processrester måste accepteras. Var gränsen går varierar inom olika tillämpningsområden. Rent definitionsmässigt så är det den nivån som inte påverkar säkerheten, styrkan eller kvalitén (Chisti Y och Moo-Young M., 1994). För etanolpiloten är det önskvärt att uppnå den reningsgrad där utrustningen bör vara synligt ren och att det inte lossnar smuts från ytor om tanken fylls med ny vätska.

DEL 1

Material och metoder

Försök utfördes både i laboratorium och i etanolpiloten. Försöken följer i kronologisk ordning och odlingsmetoden som har tillämpas framgår av respektive försök.

Odlingsmediet i försöken autoklaverades innan användning. I laboratorium skedde detta i autoklav (Systec V-75), 121°C under 15 min. I etanolpiloten skedde steriliseringen antingen direkt i odlingstanken eller i mediumtanken. Glukos och kvävekälla autoklaverades separat för att undvika en så kallad Maillardreaktion, där kolhydrater reagerar med aminosyror och leder till bland annat färgomslag och lukt (Wikipedia, 2010).

I en standardodling i etanolpiloten tillämpas både batch och fedbatchodling. Lilla odlingstanken (D-7208) förbereds med melass, MgSO₄, skumdämpare och sterilvatten. Tanken steriliseras under 30 min 120 °C varefter NH₃ och H₃PO₄ tillsätts. Inoculumkultur med *S.cerevisiae* CCUG 55310, biotin och VitaHop (bakteriehämmande) tillförs via septum ner i tanken när temperaturen sjunkit till 30 °C, pH 5,0. Batchfasen fortgår 24-30 timmar innan inmatning från mediumtanken startar. Inmatningsfasen pågår under ca 48 timmar.

Odlingsmediet i mediumtanken (F-7211) tillreds efter vilken typ av odling som skall genomföras och varierar under examensarbetets gång. Standard är att melass, hydrolysat, sterilvatten och magnesiumfosfat steriliseras i tanken under 30 min , 120°C. Både D-7208 och D-7207 (stora odlingstanken) tillförs medium från F-7211. Odlingsmedium, sterilvatten samt skumdämpare tillförs D-7207 och steriliseras i tanken innan NH₃, H₃PO₄, biotin, VitaHop och odlingen från D-7208 tillförs. Batchfasen i D-7207 pågår även den under 24-30 timmar, därefter startar inmatningen från F-7211.

Mätning och analys

Torrviksmätning skedde i glasrör. Dubbelprov med 10 ml i respektive glasrör centrifugerades i 5 min 4000 rpm. Därefter tvättades provet med 10 ml vatten och centrifugeringen upprepades. Torkning skedde under 24 timmar i torkugn, 105 °C. Online-mätning av torrvikten med till exempel OD-mätning var inte en aktuell mätmetod eftersom *S.cerevisiae* CCUG 55310 lätt flocculerar. Även melassens och hydrolysatets mörka färg kan försvåra analysen.

Glukos och etanol analyserades med hjälp av enzymkit. För både glukos- och etanolanalys användes Boehringer Mannheim/R-biopharm, Enzymatic BioAnalysis.

Kolhydrater och inhibitorer analyserades med hjälp av HPLC (high pressure liquid chromatography). 1 ml prov späddes till 25 ml med milliQ-vatten. Ca 1,5 ml överfördes sedan till vialer för analys. Analyserna genomfördes av personal från MoRe Research, Örnsköldsvik.

Försök del 1

Odling och SSF med *S. cerevisiae* torrjäst i labfermentor, försök 1.

Som tidigare nämnt innehåller hydrolysaten som produceras i etanolkolonen en hel del inhibitorer som kan hämma jästen och leda till ett lägre utbyte. Det gäller att *S. cerevisiae* torrjäststammen är tillräckligt motståndskraftig mot dessa ämnen för att den ska vara ett alternativ i etanolkolonen. För att ta reda på detta sattes en odling och SSF-försök på laboratorium ihop och analyserades på hur bra *S. cerevisiae* torrjäst kunde ta upp glukos och producera etanol.

Första steget med *S. cerevisiae* torrjäst var att ta reda på om den klarade av att omsätta glukos och näringsämnen i ett hydrolysatmedium. Uppodling och SSF genomfördes i labfermentor med en arbetsvolym av 3 l. Odlingmedium tillreddes med sukros (glukos+fruktos) (50 g/l), jästextrakt och pepton. Batchodling pågick under 48 timmar tills en jästmängd på 10g uppnåddes. pH 5 och temperatur 30°C, omrörningen var 500 rpm. Därefter startades en SSF med granflishydrolysat, pH 5,5 och temp 35°C. Hydrolysat tillsattes två gånger per dag under två dygn. Omrörningshastigheten sänktes till 400 rpm på grund av mycket skum trots tillsats av skumdämpare. Prov för glukosmätning och HPLC-analys tog strax före varje ny tillsats av hydrolysat.

Stamjämförelse, odling i skakflaska på laboratorium

Syftet med försöket var att jämföra *S. cerevisiae* torrjäst kapacitet för upptag av socker med *S. cerevisiae* CCUG 55310 och Jästbolagets KronJäst. 250 ml skakflaskor förbereddes och autoklaverades med en glukoskoncentration av 50 g/l. Därefter tillsattes autoklaverat jästextrakt och jäst från en odlingskoloni på agarplatta. Uppslamning och odling skedde i skakbad, 230 skak/min, under 24 timmar därefter tillsattes 40 ml filtrerat granflishydrolysat. Torrviktsprov (10 ml) togs vid start och slutpunkt. Mätning av glukoshalten skedde med hjälp av glukostestkit varje eller varannan timme under 21 timmar och slutprov 30 timmar efter tillsats. Två identiska försök genomfördes.

Torrjästjämförelse, odling i skakflaska på laboratorium

Försöksupplägget var detsamma som för stamjämförelsen med jäst från odlingskoloni på agarplatta. I detta försök användes istället torrjäst av *S. cerevisiae* torrjäst och KronJäst för att få en mer exakt startkoncentration av de båda. Startkoncentrationen bestämdes till 4 g/l. Dubbelprov genomfördes för att kunna säkerställa resultaten av försöket.

Odling och SSF med *S. cerevisiae* torrjäst i labfermentor, försök 2.

Försök två i labfermentor syftade till att jämföra resultatet av en SSF med *S. cerevisiae* torrjäst mot en med KronJäst. Odlingmedium sammansattes enligt tabell 1. Melass och näringsämnen autoklaverades var för sig och blandades i fermentorn i vilken torrjäst (1 g/l) därefter tillsattes. Batch och fedbatchodling (24 + 24 timmar, pH 5, 30 °C, 500 rpm) genomfördes. Därefter följde en 48 timmar lång viloperiod för att efterlikna förhållanden i etanolkolonen (15 °C, 500 rpm) innan start av SSF (pH 5,5; 35 °C; 400 rpm). Fyra omgångar av granflishydrolysat tillsattes under en period av 48 timmar (totalt 4*583 g hydrolysat). Samma försöksupställning för SSF med KronJäst (startkoncentration 5 g/l) genomfördes parallellt av Nicholas Gay, SEKAB.

Tabell 1 Mediumsammansättning för försök i labfermentor. Batchmediet innehöll samtliga näringsämnen för både batch och fedbatch. Inmatningsmediet bestod endast av autoklaverad melass och vatten

Näringsämne	Batch (g/l)	Fedbatch (g/l)
Melass	50	150
(NH ₄) ₂ SO ₄	7,5	7,5
KH ₂ PO ₄	3,5	3,5
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,75	0,75
Biotin	0,01	
VitaHop	0,5 ml	

Odling av *S. cerevisiae* torrjäst i etanolpiloten, försök 1.

Försöken på laboratorium gav en god indikation på att *S. cerevisiae* torrjäst bör testas att odlas i större skala i etanolpiloten. Samma försöksupställning som för en standardodling av *S. cerevisiae* CCUG 55310 (se del 1, material och metoder) användes. D-7208 var dock inte tillgänglig och 5kg torrjäst tillsattes direkt i stora odlingstanken tillsammans med biotin och VitaHop. Mediumsammansättningen i F-7211 bestod av 90 % melass och 10 % hydrolysat, beräknat utifrån C6-socker (hexoser) innehåll. Batchodling pågick under 24 timmar därefter fedbatch under 48 timmar.

Odling av *S. cerevisiae* torrjäst i etanolpiloten, försök 2

I kommersiell jästproduktion odlas jästen främst på ett melassbaserat odlingmedium, inom tillverkning av celluloetaetanol i bland annat Sverige är det dock önskvärt att ha en fungerande jästodling på egenproducerat hydrolysat för att kunna hålla en låg produktionskostnad. Att importera melass är inte ekonomiskt hållbart för en fullskalig anläggning där produktionskostnaderna måste hållas låga och försäljningspriset på etanol vara konkurrenskraftigt.

I fallet med etanolpiloten handlar det om att kunna odla jästen på hydrolysat från förbehandlingen. Mediumsammansättningen till odling två av *S. cerevisiae* torrjäst i etanolpiloten bestod därför av ett hydrolysatbaserat sockernehåll. Endast 10 % melass blandades i feedmediet. Enligt ett tidigare utför examensarbete (Häggström C, 2008) ska denna sammansättning vara fullt möjlig. Batchmediet baserades dock precis som innan på 90 % melass. Utförandet var detsamma som i ”Odling av *S. cerevisiae* torrjäst i etanolpiloten, försök 1.”

Odling och SSF i labfermentor med detoxifierat hydrolysat

Det tredje försöket i labfermentor baserades på de två föregående odlingarna i etanolpiloten. Försökets syfte var att ta reda på om detoxifierat granflishydrolysat ger ett högre biomassautbyte än odetoxifierat och om det är inhibitorerna i hydrolysatet som påverkar *S. cerevisiae* torrjäst aktivitet eller om hydrolysatet endast är för näringsfattigt och vi därför får ett dåligt utbyte.

Två parallella försök genomfördes. Samma upplägg för odling av *S. cerevisiae* torrjäst som i ”Odling och SSF med *S. cerevisiae* torrjäst i labfermentor, försök 2”. Pressat granflishydrolysat från etanolpiloten användes som feedmedium varav i den ena en detoxifierande kemikalie tillsattes.

Undersökning av hydrolysatåtlighet, odling i skakflaska på laboratorium

För att ta reda på om hydrolysatet är för näringsfattigt för *S. cerevisiae* torrjäst gjordes en försöksupställning med varierad mängd melass respektive filtrerat granflishydrolysat i odlingsmediet, se tabell 2. Syftet med försöket var att ta reda på var gränsen går för hur mycket hydrolysat som kan användas i odlingsmediet utan att det ska bli för inhiberande eller näringsfattigt samt för att utbytet av biomassa ska bli så högt som möjligt. En uppodling av *S. cerevisiae* torrjäst till koncentrationen 1,1 g/l genomfördes med enbart näringsämnen och melass som odlingsmedium. 250 ml skakflaskor och

provburkar förbereddes med 40 ml respektive 150 ml odlingsmedium enligt tabell 4 nedan. Därefter tillsattes 10 ml av jästodlingen i respektive 250 ml skakolv. Semifedbatch pågick under tio timmar (30°C, 230 skak/min) där 15 ml odlingsmedium av respektive sammansättning portionerades ut i respektive skakflaska varannan timme. Analys av biomassa skedde med hjälp av torrviktsmätning.

Tabell 2 Sammansättning av odlingsmediet i försök ”Undersökning av hydrolysattålighet, odling i skakflaska på laboratorium”

Skakflaska	1	2	3	4	5	6
Hydrolysat (% hexoser)	100	80	60	40	20	0
Melass (% hexoser)	0	20	40	60	80	100

Undersökning av hydrolysattålighet med detox, odling i skakflaska på laboratorium

Försöksupplägget var detsamma som i ”Undersökning av hydrolysattålighet, odling i skakflaska på laboratorium”. Dels för att se om samma tendenser visades igen, samt med detoxkemikalie i dubbelprovet för att ta bort den eventuellt inhiberande effekten från hydrolysatet.

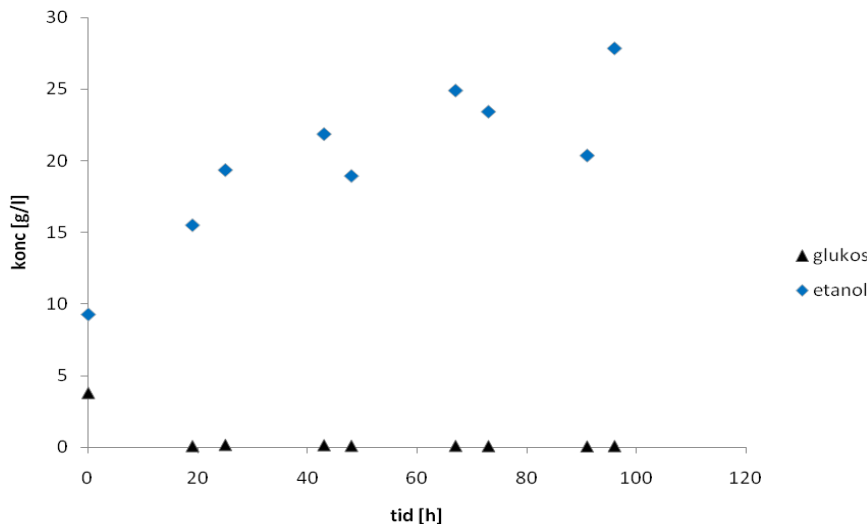
Odling av *S. cerevisiae* torrjäst i etanolpiloten, försök 3.

Genomförda försök i laboratoriet påvisade att *S. cerevisiae* torrjäst borde klara av att växa i ett medium bestående av 60-80 % hydrolysat. Baserat på detta odlades den tredje pilotodlingen på ett medium med 70 % hydrolysat. Odlingen startades i D-7208 och följde samma upplägg som vid en standardodling av *S. cerevisiae* CCUG 55310. 100g torrjäst tillsattes i D-7208. Efter klar fedbatchodling överfördes odlingskulturen till D-7207 för start av ny batchodling. Färdigblandat medium från F-7211 användes både som batch- och inmatningsmedium i D-7207.

Resultat del 1

Odling och SSF med *S. cerevisiae* torrjäst i labfermentor, försök 1

Upptag av C6-socker samt produktion av etanol undersöktes. Som vi tydligt kan se i figur 3 så klarar *S. cerevisiae* torrjäst både att ta upp socker och producera etanol (27,8 g/l etanol i slutprovet). För att jämföra *S. cerevisiae* torrjäst mot andra jäststammar som används i etanolpiloten planerades ett antal nya laboratorieförsök i skakflaska in.



Figur 3 Resultat av SSF med *S. cerevisiae* torrjäst. Jästen har en förmåga att ta upp glukos och producera etanol i hydrolysaten som produceras i etanolpiloten.

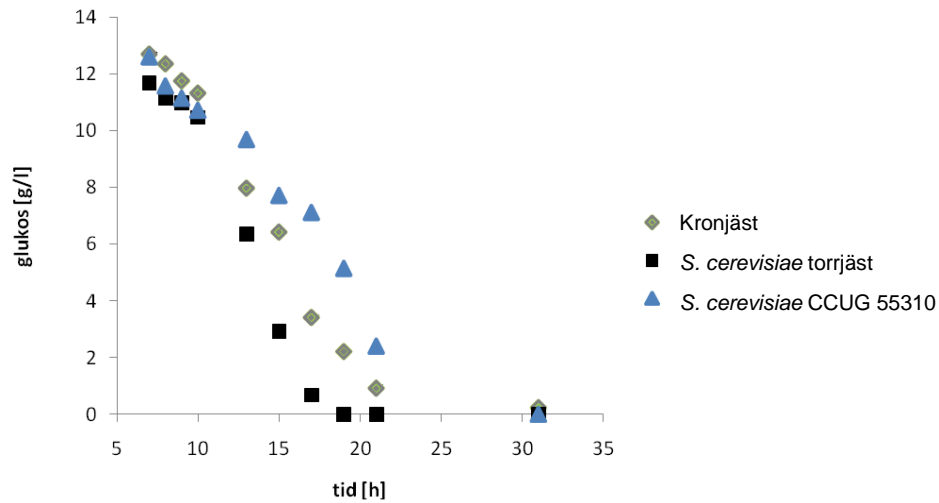
Stamjämförelse, odling i skakflaska på laboratorium

Det är inte möjligt att dra några adekvata slutsatser från skakflaskförsöken eftersom startvolymerna hade för stor spridning. Samtliga stammar hade lika stor mängd socker att växa på, men beroende på de olika ympstorlekarna från plattodlingen hann jästen växa olika mycket. Under stamjämförelse försök 1 ökade *S. cerevisiae* torrjäst mest i biomassa under uppodlingen och hade en startkoncentration av 8,2 g/l medan både *S. cerevisiae* CCUG 55310 och KronJäst hade en startkoncentration på 7,1 g/l. Målet var en startkoncentration på 5 g/l för att efterlikna förhållanden i etanolpiloten. *S. cerevisiae* torrjäst tog upp sockret snabbast av dessa tre, efter ca 17 timmar var sockret slut. Efter cirka 21 timmar hade KronJäst omsatt all glukos, medan det tog över 21 timmar för *S. cerevisiae* CCUG 55310, se figur 4. Enligt torrviktsberäkningar ökade inte biomassan för någon av jäststammarna. Endast för KronJäst var mängden jäst oförändrad medan den minskade för de andra två, se figur 5. Detta beror antagligen på mätfel. Totala volymen som användes för glukosanalys var 70 ml och kan påverka torrviktsresultatet till viss del, men borde inte vara den huvudsakliga anledningen till minskad biomassa.

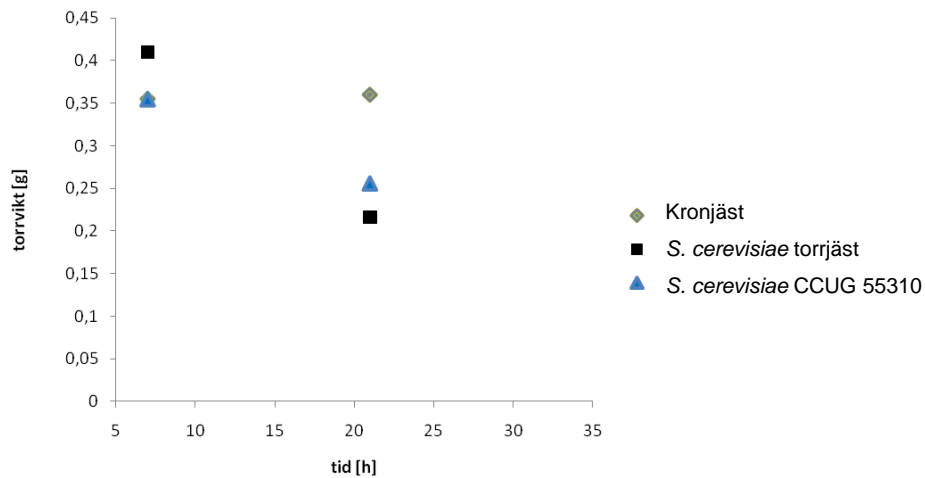
Under stamjämförelse försök 2, ändrades planeringen för att kunna följa slutdelen av glukosupptaget som under förra försöket inträffade under natten. *S. cerevisiae* torrjäst ökade mest i biomassa under uppodlingen och hade en startkoncentration av 6,3 g/l medan både *S. cerevisiae* CCUG 55310 och KronJäst hade lägre; 5,8 g/l respektive 3,7 g/l. *S. cerevisiae* torrjäst tog upp sockret snabbast av dessa tre, inom 10 timmar var glukosen slut. Både *S. cerevisiae* CCUG 55310 och KronJäst hade sämre kapacitet att omsätta sockret. Det går inte riktigt att jämföra *S. cerevisiae* torrjäst med *S. cerevisiae* CCUG 55310 eftersom det skiljer alltför mycket i cellmängd mellan dessa två.

Resultaten från de båda försöken skiljde sig åt och det är svårt att dra några rimliga slutsatser. Svårigheten med försöket låg i att få likvärdiga startvolymmer för samtliga stammar. Försöket bör ha

varit utformat på annat sätt för att uppnå detta. Längden på lag-fasen var också mycket osäker då den skiljde sig i de båda försöken. Inga infektionstester togs under försöken och inte heller etanolhalten mättes.



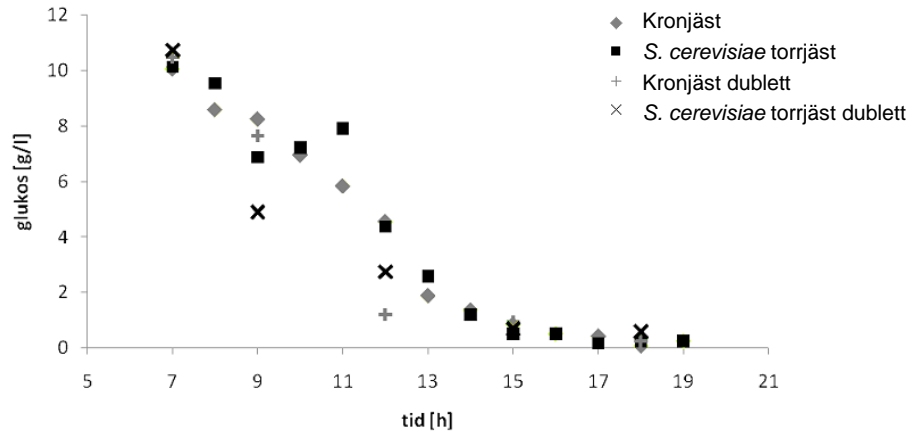
Figur 4. Upptag av glukos, jämförelse mellan *S. cerevisiae* torrjäst, *S. cerevisiae* CCUG 55310, KronJäst, i "Stamjämförelse, odling i skakflaska på laboratorium" försök 1



Figur 5. Förändring av biomassa under försök "Stamjämförelse, odling i skakflaska på laboratorium" försök 1

Torrjästjämförelse, odling i skakflaska på laboratorium

Resultatet från detta försök skiljde sig från odlingsförsöken. Startkoncentrationen för *S. cerevisiae* torrjäst och KronJäst var 4 g/l respektive 3,9 g/l. I detta försök visade det sig att *S. cerevisiae* torrjäst och KronJäst hade lika bra omsättning av glukos, se figur 6. Ökningen i biomassa var även den i stort sett lika, 122 % för *S. cerevisiae* torrjäst och 104 % för kronjäst. Dubbelprov påvisade samma tendenser, se figur 6, vilket ger viss säkerhet till resultatet.



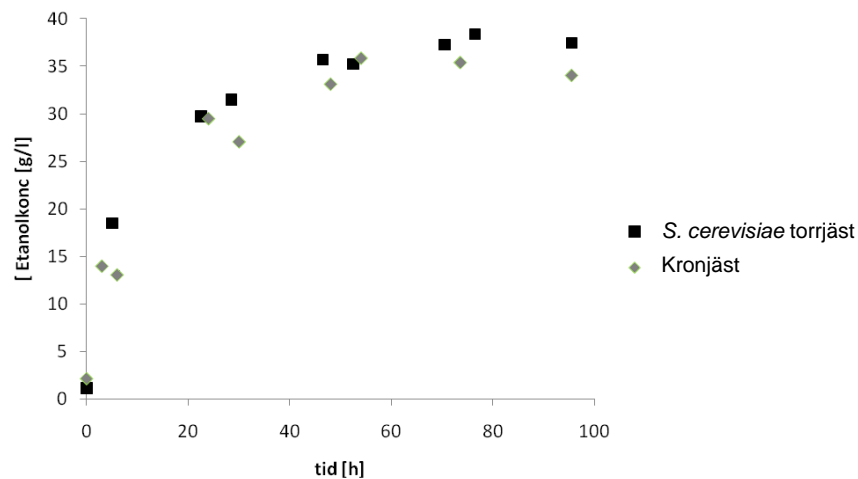
Figur 6 Upptag av glukos, jämförelse mellan *S. cerevisiae* torrjäst och KronJäst, i "Torrjästjämförelse, odling i skakflaska på laboratorium"

De genomförda stamjämförelserna ger varierande resultat. Inga av försöken stärker varandra. Detta tyder på att skakflaskförsök inte är speciellt pålitliga och att de endast ger indikationer på jästens beteende snarare än att några slutsatser kan dras. Det enda vi med säkerhet kan säga från dessa försök är att *S. cerevisiae* torrjäst klarar av att överleva och växa i granflishydrolysat.

Odling och SSF med *S. cerevisiae* torrjäst i labfermentor, försök 2

Odlingen gav en jästkonzentration på 4 g/l. Kronjäst användes i 5 g/l. HPLC-analys påvisade att *S. cerevisiae* torrjäst och KronJäst har liknande fermenterande kapacitet under SSF-försöket, se figur 7, trots att *S. cerevisiae* torrjäst hade en lägre koncentration.

I samband med det här SSF-försöket satte vi också en *S. cerevisiae* torrjästodling i piloten, för att mäta dess kapacitet i pilotskala.



Figur 7. Resultat av SSF. Jämförelse av etanolproduktion mellan *S. cerevisiae* torrjäst (4 g/l) och KronJäst (5 g/l)

Odling av *S. cerevisiae* torrjäst i etanolkiloten, försök 1

Odlingen skedde på 90 % melass och lyckades väl. Under batch fick vi ett utbyte på 14 % och under fedbatch på 34 %. Ett högre utbyte är dock möjligt och önskvärt. För diagram över biomassautbyte och etanolproduktion se bilaga 3.

Odling av *S. cerevisiae* torrjäst i etanolpiloten, försök 2

Batchodlingen blev även här lyckad med ett utbyte på 28 %. Under fedbatchfasen, då mediumet baserades till 90 % på hydrolysat, blev utbytet endast 8 %. Jästen reagerade istället med att producera etanol, hela 28 % av sockret gick till detta ändamål. Koncentrationen av hydrolysat visade sig vara för hög för vad *S. cerevisiae* torrjäst klarade av. Det återstår att avgöra om mediet var för näringsfattigt då hydrolysat innehåller betydligt färre komponenter som jästen behöver än vad melass gör, eller om det var koncentrationen av inhibitorer som var för hög. Det är viktigt att näringstillseterna som eventuellt krävs i och med odling på hydrolysat hålls så låga som möjligt med främsta anledningen att hålla nere produktionskostnaderna.

För att ta reda på om det var hydrolysatet som var för inhiberande för jästen eller om det innehöll för lite näring, utfördes ett par försök på laboratorium.

Odling och SSF i labfermentor med detoxifierat hydrolysat

Detoxifierat hydrolysat visade sig inte ha någon effekt på vare sig biomassaproduktionen eller etanolutbytet. Detta beror antagligen på en för låg inmatningshastighet av hydrolysatet.

Detoxkemikalien ger endast effekt då koncentrationen av hydrolysat är för hög för att jästen själv ska klara av mängden inhibitorer. Nu var koncentrationen av inhibitorer antagligen för låg för att jästen skulle påverkas negativt. Vid ett repeterat försök bör hydrolysatet koncentreras eller matas in i en högre hastighet eller jästkonzentrationen minskas för att vi ska kunna se någon effekt. Ett upprepat försök ligger dock utanför tidsramen för detta examensarbete.

Undersökning av hydrolysatåtlighet, odling i skakflaska på laboratorium samt Undersökning av hydrolysatåtlighet med detox, odling i skakflaska på laboratorium

Studie av biomassa mellan de olika mediumsammansättningarna ger vissa indikationer på hur mycket hydrolysat som jästen klarar av. Vid 100 % hydrolysat blev utbytet av biomassa lägst, vilket också var hypotesen. En viss mängd hydrolysat, 20 %, visade sig dock ge ett bra utbyte (6,6 % i försök 1 och 4,7 % i försök 2). Mängden biomassa i de olika försöken skiljer sig en del vid de låga hydrolysatkoncentrationerna medan utbytet vid högre koncentration är i stort sett de samma. Den stora variationen vad gäller 80 % och 100 % melass ger osäkerhet till resultaten. Det är önskvärt att ha så mycket hydrolysat som möjligt i odlingsmediet eftersom det sänker produktionskostnaderna vid en anläggning som inte är egenproducerande på melass. Genom att tillsätta en kemikalie som detoxifierar hydrolysatet borde biomassautbytet öka eftersom mängden inhibitorer minskar. I detta försök, precis som i "Odling i labfermentor med detoxifierat hydrolysat" kan inte hydrolysatet ha varit i tillräckligt hög koncentration för att detoxifieringen skulle ha någon effekt eftersom skillnaden mellan försök 1 och försök 2 inte är speciellt anmärkningsbar.

Tabell 3 Biomassautbyte vid odling i skakflaska

Hydrolysat/Melass	Försök 1 (%)	Försök 2 (%)	Försök 2 detox (%)
100/0	3,1	3,3	3,8
80/20	4,3	3,8	4,3
60/40	4,7	4,8	4,8
40/60	5,0		4,8
20/80	6,6		4,7
0/100	5,9		3,0

De tre sammansättningarna med 80 %, 60 % och 40 % hydrolysat ger ungefär samma utbyten, 80 % något lägre än de båda andra. Genom att studera kolhydratomsättningen, inhibitorhalt och etanolproduktion med hjälp av HPLC-analysen från försök 1, fås en klarare bild av jästens beteende i de olika hydrolysatkoncentrationerna, se bilaga 4. Vid 100 % hydrolysat tyder samtliga analyser på att jästen är hämmad av den höga koncentrationen inhibitorer, ättiksyrakoncentrationen är upp mot 3 g/l. Mängden ättiksyra minskar sedan successivt med minskande mängd hydrolysat. Vad gäller levulinsyran så varierar mängden i de olika proverna vid odlingens slut (från 0,5 g/l till 1,9 g/l) och det är svårt att dra någon slutsats om jästen inhiberas av dessa koncentrationer eller inte. Mängden mjölksyra ökar med stigande melasshalter. Främsta anledningen till detta borde vara hydrolysatets hämmande effekt av mjölksyraproducerande bakterier. 20 % hydrolysat ger bäst biomassautbyte men etanol och glycerolhalten är hög. Att använda 80 % melass i odlingen är dock inte önskvärt ur ett ekonomiskt perspektiv. 80 %, 60 % och 40 % hydrolysat visar alla på liknande resultat efter HPLC-analysen; relativt hög etanolproduktion och ättiksyrakoncentration men låg glycerol och levulinsyrahalt.

Dessa resultat påvisar att *S. cerevisiae* torrjäst borde klara av att växa i ett medium bestående av 60-80 % hydrolysat. Baserat på detta valde vi att odla den tredje pilotodlingen på ett medium med 70 % hydrolysat.

Odling av *S. cerevisiae* torrjäst i etanolfiloten, försök 3

Vi fick bra resultat från odlingen i D-7208, ett utbyte på 28 % respektive 33 %. Men efter att jästen hade överförts till D-7207 avstannade tillväxten helt. Det kan bero på minst två saker, dels så tappade vi temperaturen under batchfasen som gick ner till 20°C vilket gör att jästaktiviteten går ner betydligt, den optimala odlingstemperaturen ligger runt 30°C (Walker Graeme M., 1998) och *S. cerevisiae* torrjäst är mest aktiv vid 30-40°C. Den andra anledningen kan vara att hydrolysatet trots allt var för inhiberande för jästen. Att ha huvudsakligen hydrolysat i en batchfas är antagligen för tufft miljö för jästen. Enligt (Larsson S et al., 1999) har inhibitorn furfural förmågan att förlänga lag-fasen under ett fermenteringsförlopp. Detta borde också kunna inträffa under en odling vid start av ny batchfas om syretillgången är begränsad. Om detta nu är möjligt kan det vara en orsak till jästens avstannande tillväxt då den överfördes till D-7207. Innan jästcellerna väl hade adapterat sig till omgivningen, sjönk temperaturen i tanken till ca 20°C under ett par timmar, vilket kan ha förlängt fasen ytterligare. Även andra inhibitorer närvarande kan ha påverkat jästen ytterligare och fortfarande 62 timmar efter batchodlingen startades i D-7207 kunde ingen märkbar jästaktivitet noteras. Odlingen avbröts därför med misstanken att jästen kollapsat bland annat till följd av en hög inhibitorkoncentration.

DEL 2

Försök del 2

Vid etanolpiloten har CIP-sekvensen rutinmässigt genomförts efter varje odling. Vid lång tids odlingsuppehåll har rengöring även skett före en odling. Vid saknad av någon tvättvätska har antalet delsteg i CIP-sekvensen reducerats vilket medfört att rengöringen av tanken eventuellt inte blivit tillräcklig. Principiellt sett så sker rengöring efter varje odling och det är dessa tillfällen som har följts upp under examensarbetet.

Endast en CIP-omgång genomfördes enligt standard. I resterande rengöringssekvenser saknades tillgång till sulfaminsyra och fokus riktades endast till variation av lutsteget. Parametrar som varierades under försöken var tid och temperatur. Sex stycken provuttag på jästodlingsutrustningen valdes ut. Två av dessa fanns på mediumtanken (F-7211), ett på ymptanken (D-7208), två på odlingstanken (D-7207) och ytterligare ett på jästslurrytanken (F-7208), se bilaga 1. Provvätskan samlades in i autoklaverade och desinficerade burkar. Vätskan ströks ut både på YPD- och MRS-plattor. MRS-medium användes för att kunna frångilja egenodlad jäst från vildjäst, svamphyfer och bakterier. Plattorna inkuberades i 30°C under 48 timmar i värmeskåp. Därefter räknades antalet kolonier varav en del även undersöktes i mikroskåp. Provvätskorna och dess variation mellan CIP-omgångarna dokumenterades och analyserades med avseende på färg och lukt parallellt med plattstryken. Då det är önskvärt med turbulent flöde i samtliga rör och ledningar för att garantera tillräcklig rengöring, beräknades flödes hastigheten i ett par av odlingsutrustningens rör och ledningar.

Tabell 4 Provvuttag på jästodlingsutrustningen

Provpunkt	Tank		Uttag
1	D-7208	ymp	direkt från tank
2	F-7211	medium	lågpunkt
3	F-7211	medium	efter pump
4	D-7207	odling	lågpunkt
5	D-7207	odling	direkt från tank
6	F-7208	jästslurry	lågpunkt

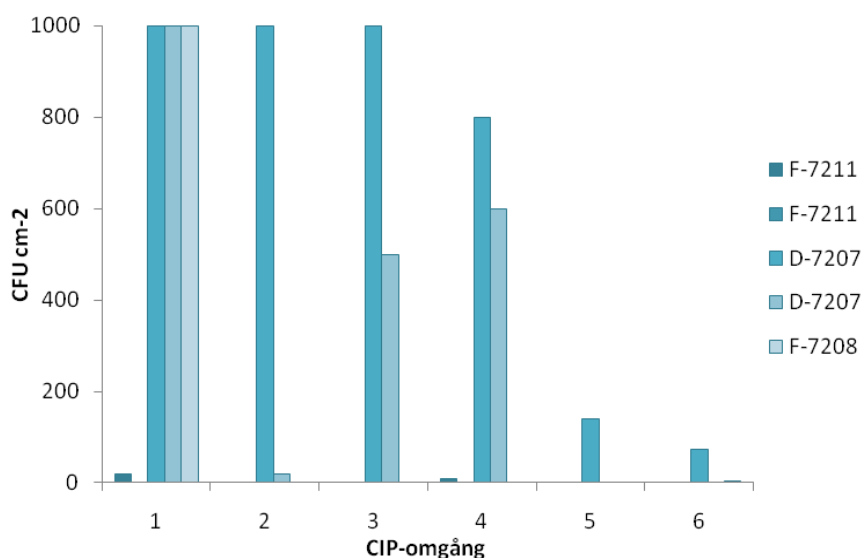
Tabell 5 De olika tvättsekvenserna vid CIP

CIP-omgång	Tillfälle	CIP-sekvens		
		NaOH	H ₃ NO ₃ S	Ånga
1	efter CCUG 55310-odling	x		x
2	efter <i>S. cerevisiae</i> torrjästodling	x	x	x
3	efter <i>S. cerevisiae</i> torrjästodling	x		x
4	nedsmutsning mha kasserad jäst	80°		x
5	nedsmutsning mha kasserad jäst	80° + tid*		x
6	efter <i>S. cerevisiae</i> torrjästodling	80° + tid*		x

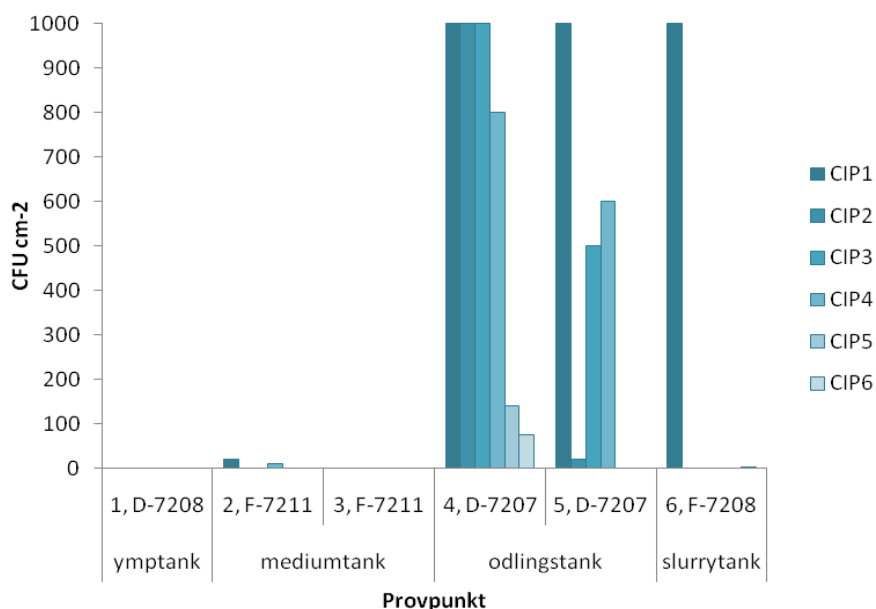
* ökad vätskevolym 0,4m³ till 0,6m³

Resultat del 2

Resultatet från plattodlingen är sammanställt i figur 8 och 9. Där syns tydligt att problemet med bakteriekontamination huvudsakligen finns i tank D-7207 eller i de rörsystem som angränsar till tanken. Som diagrammen tydligt visar minskar antalet bakterier med hårdare parametrar i CIP-sekvensen. Antalet bakterier presenteras som CFU (colony forming units) per cm².



Figur 8 Antal bakterier per CIP-omgång och provpunkt



Figur 9 Antal bakterier per provpunkt och CIP-omgång

Störst skillnad kan ses då temperaturen höjs från rumstemperatur till 80°C. Utifrån detta och med litteraturen som bakgrund kan vi konstatera att en uppvärmning av tvättkemikalierna är nödvändigt.

Mellan CIP-omgång 5 och 6 rengjordes D-7207 och ytlagret eliminerades (se mer under provväska nedan), vilket genast gav utslag på mängden bakterier i den samma, vilka minskade ytterligare. Då fokus inte har legat på sulfaminsyrasteget i sekvensen, är det svårt att säga något angående detta. Att enbart hetta upp luten och sedan använda ånga kan vara tillräckligt. Utan vidare utvärdering av sulfaminsyra delsteget är det svårt att göra några konstateranden. Det undersökningen visar på är att en temperaturhöjning av tvättkemikalierna är en nödvändighet. Vidare utredning om vad som är ekonomiskt hållbart i en pilotanläggning eller fullskalig anläggning krävs. Kravet på renhet måste ställas mot uppvärmningskostnad och kemikalieanvändning, detta område sträcker sig dock utanför examensarbetets ramar.

YPD- och MRS-plattor undersöktes i mikroskåp för att fastställa vad för typ av mikroorganismer som förekom i tankarna. Vildjäst, svamphyfer och bakterier med och utan sporer var rikligt förekommande. Flertalet bilder presenteras i bilaga 2. Dessa oönskade mikroorganismer minskar utbytet av biomassa och det är av stor vikt att dessa elimineras från odlingstankarna i så hög grad som möjligt.

Vid beräkning av flödes hastigheten i ett par av ledningarna till och från jästodlingstankarna, visade det sig att hastigheten >1,5 m/s endast uppnåddes i två ledningar av fyra. Utan en flödes hastighet på 1,5 m/s och utan turbulens blir inte ledningarna tillräckligt rena och smuts och odlingsmedium får en chans att sedimentera och utgöra en bra grogrund för bakterier att växa och föröka sig. Utan rätt hastighet i ledningarna är dessa en stor källa till att odlingarna blir infekterade trots rena tankar.

Tabell 6 Beräknade flödes hastigheter i ledningarna till och från jästodlingstankarna.

Flödes hastighet i rör och ledningar			
	flödes hastighet (m/s)	ledning	flödes hastighet (m/s)
Teori	> 1,5		
Pilot	0,07 - 3,4	F-7211 till D-7208	0,07
		F-7211 till D-7207	2,27
		D-7208 till D-7207	3,40
		D-7207 till F-7208	1,06

Provväska

Som en delanalys till plattutstryken dokumenterades även provvätskan. Vätskan visade mycket tydligt på när rengöringen var tillräcklig eller inte. Efter lutsköljningen var vätskan grumlig i olika bruna nyanser. I en del fall innehöll provuttagen rent odlingsmedium, vilket är ett tydligt tecken på att rör och ledningar inte har blivit tillräckligt tömda. När tömningen skett ordentligt, kunde en skillnad på vätskans färg och lukt konstateras. Då den hårdaste CIP-behandlingen kördes, 80°C NaOH och förlängd tid, var vätskan från D-7207 mycket grumlig. Vid vidare undersökning visade det sig att det var ett ytlager av smuts i D-7207 som inte eliminerades trots rengöring. Ytlagret definierades inte mer än att det antagligen bestod av gammal skumdämpare och jäst. Vid mikrobiologisk undersökning visade det sig dock att det innehöll levande bakterier och sporformande bakterier (se bilaga 2), vilket kan vara en av anledningarna till de återkommande infektionerna i D-7207. Antagligen har ytlagret bildats under en längre tid, då dessa produktionsrester inte har eliminerats i och med rengöring av tanken. Den grumliga vätskan i provuttaget konstaterades innehålla gamla fiberrester från hydrolysatet.

Slutsats och diskussion

Det övervägande syftet med examensarbetet var att ta reda på vad de misslyckade jästodlingarna i etanolpiloten beror på med målet att minska antalet misslyckade jästodlingar.

Som ett steg i ledet undersöktes en ny jäststam som levereras i frystorkad form. Genom att jobba med denna typ av jäst är förhoppningen att antalet infektioner ska minska eftersom inblandningen av den mänskliga faktorn minskar i och med att färre delsteg i odlingsprocessen krävs. En förutsättning är dock att denna jäststam är minst lika bra som den befintliga stammen av *S. cerevisiae* (CCUG 55310) som i dagens läge används i anläggningen. De genomförda undersökningarna och experimenten i examensarbetet tyder på att stammen är lika tålig som *S. cerevisiae* CCUG 55310. En del av dessa undersökningar tyder även på att en lägre jästkonzentration av *S. cerevisiae* torrjäst uppnår lika bra resultat som föregående stam. Odlingsförfarandet och odlingstiden förkortades när *S. cerevisiae* torrjäst användes och det underlättade utförandet av odlingen. Frytorkad jäst har även en betydligt längre hållbarhet än färskjäst vilket medför att frystorkad jäst alltid bör kunna vara tillgänglig och inköp av färdigproducerad jäst kan undvikas.

Försök genomförda i skakflaska på laboratorium påvisar mycket varierande resultat. Variationer i liten skala får ett stort genomslag på resultatet. Skakflaskförsök är bra så till vida att de ger en god indikation på hur jästen beter sig i olika situationer. Slutsatser enbart utifrån småskaliga försök som sedan direkt tillämpas i pilotskala är osäkra. Under examensarbetets gång har det därför varit mycket givande att genomföra försök i tre olika skalor.

Försök med hög koncentration hydrolysat tyder på att jästen påverkas av inhibitorerna i den samma. Det är en noga balansgång över hur mycket hydrolysat man kan tillsätta odlingsmediet. Genom att detoxifiera hydrolysatet borde upp mot 100 % av sockrets ursprung kunna komma från hydrolysat, under förutsättning att nödvändiga näringsämnen tillsätts utöver. En undersökning om kostnaden för näringsämnen kontra melass bör genomföras om detta fall är aktuellt.

Vid undersökning av nya odlingsmetoder eller jäststammar är det viktigt att odlingsförfarandet flyter på utan problem. Ett exempel är vid odlingen av *S. cerevisiae* torrjäst i piloten odling 3, där temperaturen sjönk ner till 20 °C. Anledningar till den misslyckade odlingen måste sökas på betydligt fler ställen än om processen hade flutit på normalt. Hänsyn måste bland annat tas till jästens påverkan av låg temperatur och den lägre motståndskraften till inhibitorer.

Egenproducerad jäst med start från inoculum i laboratorium kan alltså medföra en ökad risk för att jästodlingarna ska bli kontaminerade och förstörda. Undersökningen av odlingsutrustningen avslöjar dock att en otillräcklig rengöring av denna lika väl kan vara anledningen till att odlingarna blir kontaminerade som en infekterad ymp. Både den mänskliga faktorn och fel i utformningen av anläggningen är möjliga orsaker till att processrester och smuts från tidigare odlingar kan finnas kvar i tankar och ledningar. Utifrån de genomförda undersökningarna kan det konstateras att en stor anledning till de kontaminerade odlingarna härstammar från stora odlingstanken. Otillräcklig tömning av tanken på grund av bland annat missvisning i nivåmätare har lett till att processrester funnits kvar i tanken och utgjort grogrund för bakterier. För låg temperatur på tvättkemikalierna för att spara på uppvärmningskostnaden eller en tro att rumtempererade kemikalier har haft likvärdig effekt som upphettade kan vara ytterligare en anledning till misslyckad rengöring. Slarv och gening i CIP-sekvensen där lut eller syrasteg har hoppats över för att någon av dessa kemikalier har saknats inom anläggningen. Provtagningsstudsar och bottenventiler har inte heller blivit tömda ordentligt. Detta förfarande har lett till att processrester finns kvar i tankarna trots en ordentlig rengöringssekvens. Ett otillräckligt turbulent flöde i rör och ledningar kan också göra att smutsen i ledningarna får möjlighet att sedimentera och utgöra grogrund för bakterier. För att få en ren process är det ytterst viktigt att driftorder och instruktioner framförs ordentligt och att antalet missförstånd minimeras. Upphettning av tvättkemikalierna är en nödvändighet för att celler och bakterier ska elimineras. För bra resultat bör

även bottenventiler och studsar tömmas mellan varje delsekvens för att garantera att processrester elimineras från utrustningen. Vad beträffar vilka kemikalier som krävs för en ren tank kan inga direkta uppgifter ges eftersom examensarbetet endast koncentrerades till att undersöka rengöringseffekten av lut och inte syra. Eventuellt är det så att även syra krävs för att eliminera de sista processresterna. Ytterligare undersökningar krävs för att fastställa detta. Ett beslut över vilken renhetsgrad som skall uppnås och till vilken kostnad är den avgörande faktorn för hur rengöringen av tanken ska utformas och genomföras. Undersökningarna i examensarbetet ger endast en överblick över situationen och hur rengöringen påverkas genom variation av två av de viktigaste effektparametrarna, tid och temperatur. I verkligheten är situationen mer komplex och ytterligare undersökningar rekommenderas för att fastställa den verkliga effekten och påverkan.

Oavsett vilka undersökningar och experiment som genomförs eller vilka resultat som framförs är det i slutändan ändå kostnaden som avgör vilka åtgärder som kan eller ska vidtas. En avvägning krävs över vad en lyckad odling är värd. Självklart har man inte råd att avstå fermenteringar till följd av att det saknas tillgång till jäst. En produktionsprocess kräver att samtliga bitar kan genomföras. Om jästodlingen hela tiden är den svaga länken kan det önskvärda utbytet av etanol inte uppnås, hur bra förbehandlingen än är. Det är ytterst viktigt att både jästodling och förbehandling går hand i hand för att få en lyckad tillverkning av slutprodukten etanol.

Källor

- Almeida RM et al.**, *Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by Saccharomyces cerevisiae*, Mini-Review, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2007, Volume 82, pages 340-349
- Banerjee S et al.**, *Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies*, Review, Biofuels, bioproducts and biorefining, 2009, pages 77-93
- Chisti Yusuf**, *Assure bioreactor sterility*, Chemical engineering progress, 1992, volume 88, pages 80-85
- Chisti Y, Moo-Young M**, *Clean-in-place systems for industrial bioreactors: design validation and operation*, Journal of Industrial Microbiology, 1994, volume 13, pages 201-207
- Dien B S, Cotta M A, Jeffries T W**, *Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status*, Appl Microbiol Biotechnol, 2003, pages 258-266
- Doran-Peterson J, Cook D M, Brandon S K**, *Microbial conversion of sugars from plant biomass to lactic acid or ethanol*, The plant journal, 2008, volume 54, pages 582-592
- Ecolab**, *mötereferat*, 2008-05-08
- Enfors S-O, Häggström L**, *Bioprocess technology, Fundamentals and Applications*, Royal institute of Technology, 2000
- Galbe M, Zacchi G**, *A review of the production of ethanol from softwood*, mini-review, Appl Microbiology Biotechnology, 2002, volume 59, pages 618-628
- Henriksson G**, *Pulp and Paper Chemistry and Technology V2*, Chapter 6 Lignin, 2009, Eds M Ek, G Gellerstedt and G Henriksson, De Gruyter, Berlin Germany, ISBN 978-3-11-021341-6
- Henriksson G, Lennholm H**, *Pulp and Paper Chemistry and Technology V2*, Chapter 4 Cellulose and carbohydrate chemistry, 2009, Eds M Ek, G Gellerstedt and G Henriksson, De Gruyter, Berlin Germany, ISBN 978-3-11-021341-6
- Horvath I S et al.**, *Effects of furfural on the respiratory metabolism of Saccharomyces cerevisiae in glucose-limited chemostats*, Appl and Environ Microbiol, 2003, volume 69, pages 4076-4086
- Häggström, Caroline**, *Media requirements for aerobic cultivation of a yeast strain related to Saccharomyces cerevisiae TMB3400 on softwood hydrolysate*, Luleå tekniska universitet, examensarbete, 2008
- Industry council for development, ICD**,
<http://www.icd-online.org/an/courspdf/HACCP%20Course/M2L5.pdf>, tillgänglig 20-08-10
- Jones J L, Semrau K T**, *Wood hydrolysis for ethanol production – previous experience and the economics of selected processes*, Biomass, 1984, volume 5, pages 109-135
- Junker B et al.**, *Sustainable reduction of bioreactor contamination in an industrial fermentation pilot plant*, Journal of Bioscience and Bioengineering, 2006, volume 102, pages 251-268

- Jørgensen H, Kristensen J B, Felby C**, *Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities*, Biofuels, bioproducts and biorefining, 2007, volume 1, pages 119-134
- Larsson S et al.**, *Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by Saccharomyces cerevisiae*. Appl Biochem Biotechnol, 2000, volume 84-86, pages 617-632
- Larsson S et al.**, *The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood*, Enzyme and Microbial Technology, 1999a, volume 24, pages 151-159
- Larsson S et al.**, *The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood: anion accumulation versus uncoupling*, Enzyme and microbiology Technology, 1999b, volume 24, pages 151-159
- Le Gentil C, Sylla Y, Faille C**, *Bacterial re-contamination of surfaces of food processing lines during cleaning in place procedures*, Journal of Food Engineering, 2010, volume 96, pages 37-42
- Lelièvre C et al**, *Cleaning-in-place: effect of local wall shear stress variation on bacterial removal from stainless steel equipment*, Chemical engineering science, 2002, volume 57, pages 1287-1297
- Lesaffre group**, *S. cerevisiae torrjäst*, http://www.S.cerevisiae.torrjast.com/FO/90-Ethanol/90-20_why_use.asp, http://www.S.cerevisiae.torrjast.com/FO/90-Ethanol/90-30_product_range.asp, tillgänglig 20/8-2010
- Mills T Y, Sandoval N R, Gill T R**, *Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in Escherichia coli*, Review, Biotechnology for Biofuels, 2009
- Modig T, Lidén G, Taherzadeh M J**, *Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase*, Biochemical Journal, 2002, pages 769-776
- Nelson D L, Cox M M**, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th edition, 2005, ISBN: 0-7167-4339-6
- Norrmejerier**, *Muntlig källa, Studiebesök våren 2010*
- Olofsson K, Bertilsson M, Lidén G**, *A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks*, Review, Biotechnology for Biofuels, 2008
- Olsson L, Hahn-Hägerdal B**, *Fermentative performance of bacteria and yeasts in lignocellulose hydrolysates*, Process Biochemistry, 1993, volume 28, pages 249-257
- Olsson L, Hahn-Hägerdal B**, *Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production*, Enzyme and microbial technology, 1996, volume 18, pages 312-331
- Palmqvist Eva and Hahn-Hägerdal Bärbel**, *Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification*, Review paper, Bioresource Technology, Volume 74, Issue 1, 2000(a), pages 17-24
- Palmqvist Eva and Hahn-Hägerdal Bärbel**, *Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition*, Review paper, Bioresource Technology, Volume 74, 2000(b), pages 25-33
- Petersson Anneli och Lidén Gunnar**, *Fed-batch cultivation of Saccharomyces cerevisiae on lignocellulosic hydrolyzate*, Biotechnology Letters, 2006, volume 29, pages 219-225

Pham H.T B, Larsson G, Enfors S-O, *Precultivation technique for studies of microorganisms exhibiting overflow metabolism*, Biotechnology Techniques, 1999, volume 13, pages 75-80

Sansebastiano G, Zoni R, Bigliardi L, *Cleaning and disinfection procedures in the food industry General aspects and practical applications*, Food safety, 2007, pages 253-280

SEKAB, www.sekab.com/default.asp?id=1481&refid=1435, tillgänglig 20-08-10

Swinnen et al., *Rim15 and the crossroads of nutrient signalling pathways in Saccharomyces cerevisiae*, Review, Cell Division, 2006

Teleman A, *Pulp and Paper Chemistry and Technology V2*, Chapter 5 Hemicelluloses and Pectins, 2009, Eds M Ek, G Gellerstedt and G Henriksson, De Gruyter, Berlin Germany, ISBN 978-3-11-021341-6

Tomás-Pejó E et al., *Comparison of SHF and SSF Processes From Steam-Exploded Wheat Straw for Ethanol Production by Xylose-Fermenting and Robust Glucose-Fermenting Saccharomyces cerevisiae Strains*, Biotechnology and Bioengineering, 2008, volume 100, pages 1122-1131

Walker Graeme M., *Yeast physiology and biotechnology*, John Wiley & sons, 1998, ISBN 0-471-96447-6

Wikipedia, Maillardreaktion, http://en.wikipedia.org/wiki/Maillard_reaction, tillgänglig 20/8-2010

Wingren A, Galbe M, Zacchi G, *Techno-Economic Evaluation of producing Ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks*, Biotechnol Prog, 2003, volume 19, pages 1109-1117

Wirtanen G, Salo S, *Disinfection in food processing – efficacy testing of disinfectants*, Environmental Science and Bio/Technology, 2003, volyme 2, pages 293-306

Yuan J S et al., *Plants to power: bioenergy to fuel the future*, Cellpress, 2008, pages 421-429

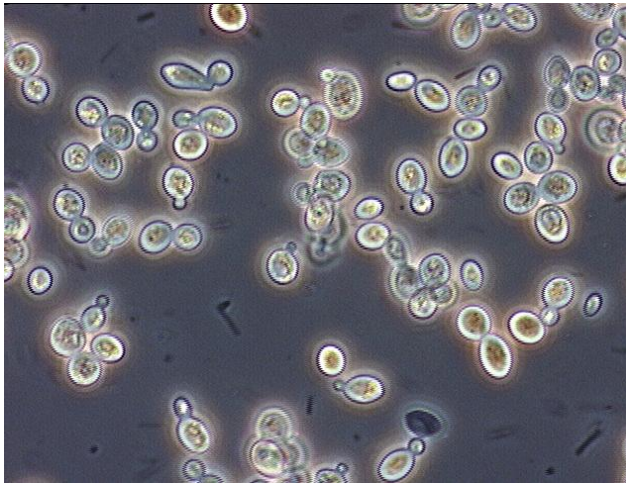
Bilaga 1

Provuttag som användes vid undersökning av rengöringsprocessen av jästodlingsutrustningen.

Ej för publikation.

Bilaga 2

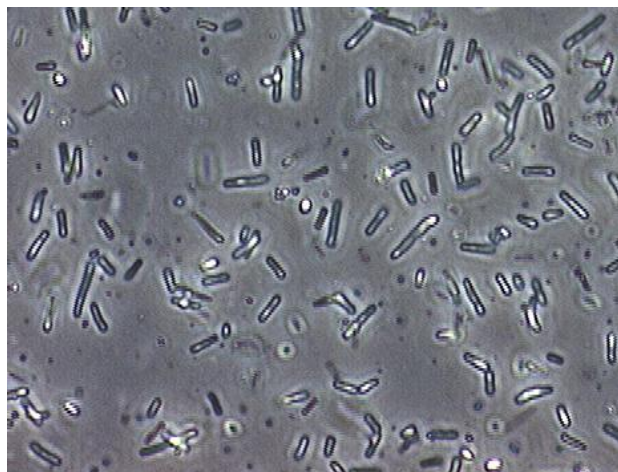
Fotografier från elektronmikroskåp. Foto: Birgitta Lundgren, MoRe research



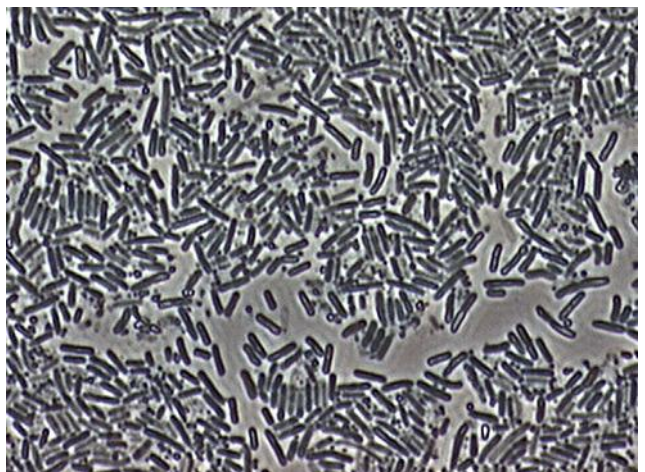
Prov från jästodlingen i D-7207. *S. cerevisiae* torrjäst



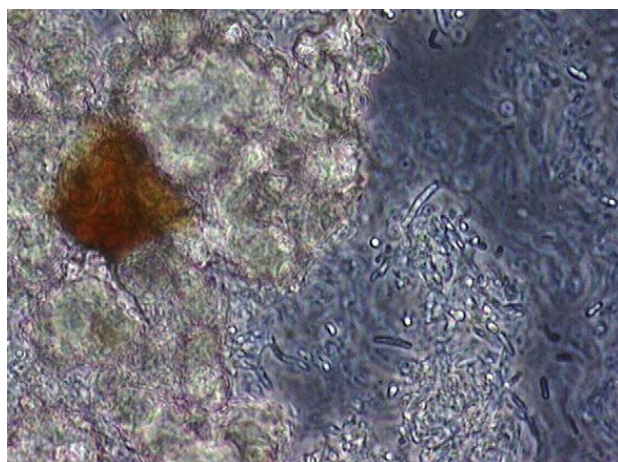
Prov från plattutstryk efter lutsteget i CIP-sekvensen omgång 4. Vildjäst och svamphyfer.



Prov från plattutstryk efter lutsteget i CIP-sekvensen omgång 4. Bakterier med sporer.



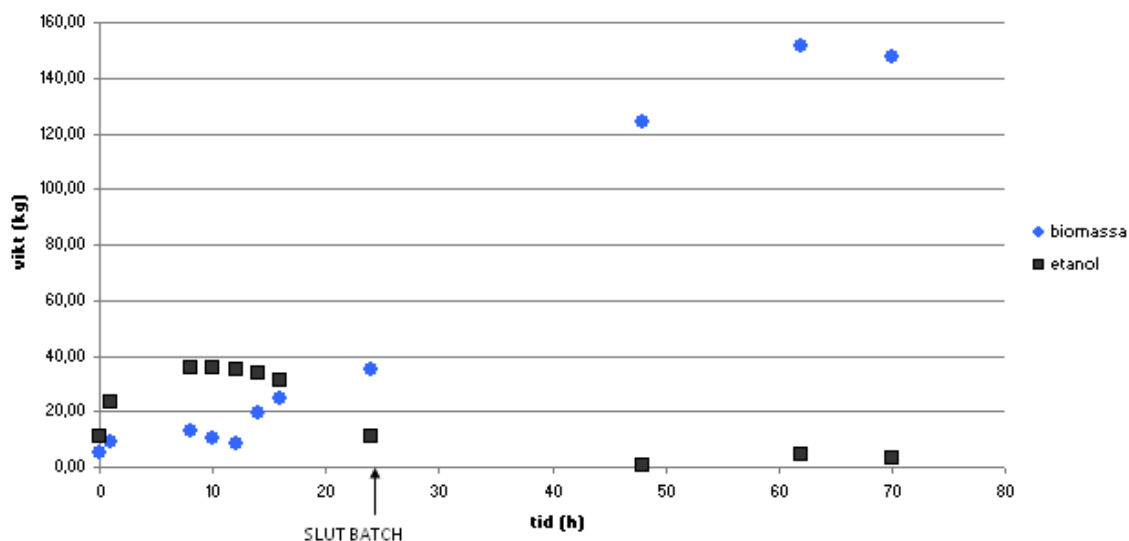
Prov från plattutstryk efter lutsteget i CIP-sekvensen omgång 4. Bakterier.



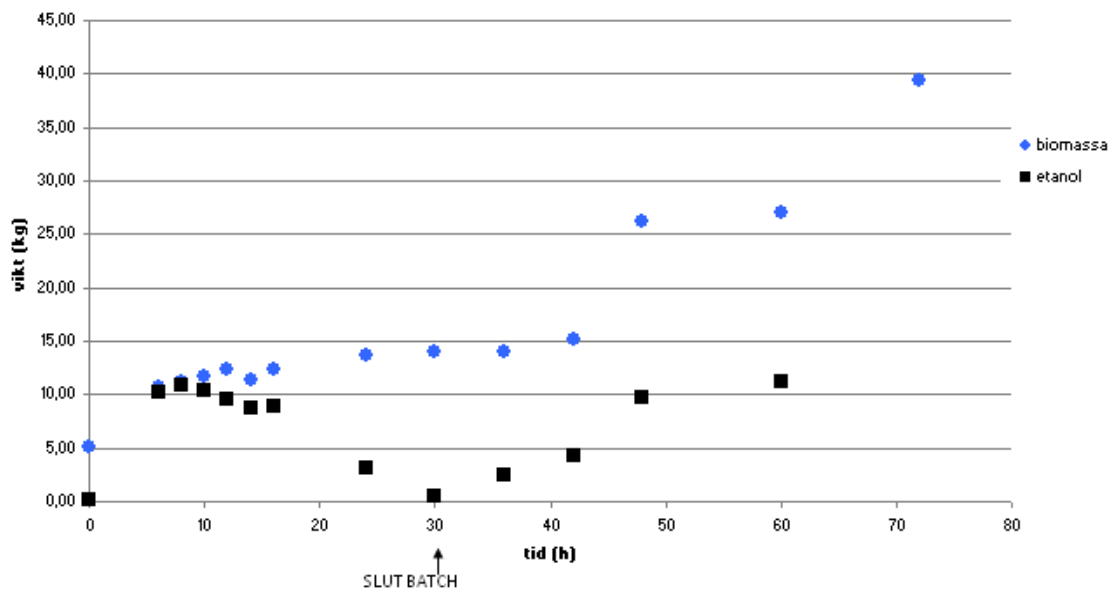
Prov från ytlagret i D-7207, se sid 28. Bakterieklyster och frisimmande bakterier.

Bilaga 3

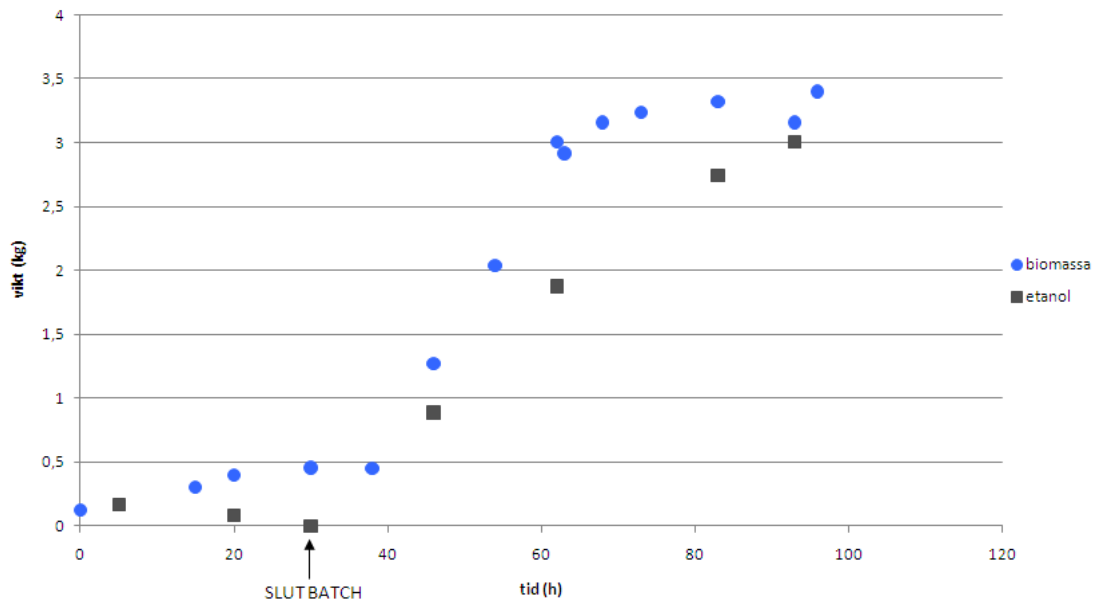
Jästodlingsdiagram från pilotodlingar av *S. cerevisiae* torrjäst



Figur 10 Jästodling av *S. cerevisiae* torrjäst i etanolpiloten försök 1, stora odlingstanken (D-7207).
Batchmedium: 100 % melass
Inmatningsmedium: 10 % hydrolysat och 90 % melass
Startmängd: 5 kg torrjäst. Slutmängd ca 150 kg



Figur 11 Jästodling av *S. cerevisiae* torrjäst i etanolpiloten försök 2, stora odlingstanken (D-7207).
Batchmedium: 100 % melass
Inmatningsmedium: 90 % hydrolysat och 10 % melass
Startmängd: 5 kg torrjäst. Slutmängd ca 40 kg



Figur 12 Jästodling av *S. cerevisiae* torrjäst i etanolpiloten försök 3, ympjästtanken (D-7208).
 Batchmedium: 100 % melass
 Inmatningsmedium: 70 % hydrolysat och 30 % melass
 Startmängd: 100 g torrjäst. Slutmängd ca 3,5 kg

Bilaga 4

Resultat av HPLC-analys från ”Undersökning av hydrolysattålighet, odling i skakflaska på laboratorium”, försök 1

hydrolysat/melass [%]	provpunkt	glukos [g/l]	arabinos [g/l]	mjölksyra [g/l]	glycerol [g/l]	acetic acid [g/l]	levulinsyra [g/l]	etanol [g/l]	biomassa utbyte [%]
100/0	startprov	15,6	2,3	0,8	0,3	2,9	1,4	5,1	3,1
	slutprov	7,9	2,3	0,9	0,3	2,4	1,4	8	
80/20	startprov	12,6	1,7	0,8	0,4	2,2	1,1	6,4	4,3
	slutprov	2,7	0,9	0,3	0,5	1,4	0,7	13,2	
60/40	startprov	12,8	1,7	1,6	0,5	1,9	0,9	7,8	4,7
	slutprov	2,1	0,7	1,5	0,5	1,1	0,5	13,9	
40/60	startprov	11,2	0,8	2,4	0,7	1,4	0,5	8,6	5,0
	slutprov	4,4	1,9	0,7	0,4	2,1	1,1	11,7	
20/80	startprov	9,9	0,2	2,6	0,6	0,9	0,2	8,9	6,6
	slutprov	1,6	0,3	2,7	1,1	0,7	1,6	18,4	
0/100	startprov	9,9	1,3	3,5	1,1	0,6	2,1	10,5	5,9
	slutprov	2,6	1,1	3,7	1,7	0,5	1,9	17,6	