

Linkadresserne fungerer pr. 25.4.2016. Forlaget tager forbehold for evt. ændringer i adresserne.

Fremstilling af bioethanol

Nedenstående fermenteringsforsøg kan laves enkeltvis eller samlet som et undervisningsforløb om bioethanol, hvor der fokuseres på sammenhængen mellem substrattype, forbehandling og udbytte. Ethanol-fremstillingsforsøgene kan laves som en udvidelse af forsøg e) 'Gærcellernes udnyttelse af forskellige carbohydrater' fra Bioteknologi 2, tema 3. Teorien bag fremstilling af første- og andengenerations bioethanol fremgår af Bioteknologi 3, side 80-87.

Enzymer til forsøgene kan bestilles på: <http://www.easj.dk/enzymer/>

A Førstegenerations bioethanol af mono- og disaccharider

Til dette forsøg anvendes forskellige mono- og disaccharider, fx fructose, glucose, galactose, lactose, saccharose og maltose som udgangspunkt for fermenteringen. Teori – se Bioteknologi 3, s. 80-83.

Materialer

- Mono- og disaccharider
- Bagegær
- Postevand
- 1000 mL koniske kolber
- Glasspatel
- Gummipropper med gærlås med (kalk)vand
- Præcisionsvægt

Fremgangsmåde

Dag 1

1. De rengjorte opstillinger klargøres.
2. Markér kolberne med jeres navn og carbohydrattype.
3. Til hver kolbe tilsættes 25 g gær og 200 mL lunkent postevand.
4. Der omrøres til gæren er helt opløst.
5. Beregn hvor meget carbohydrat der skal tilsættes hver kolbe. Koncentrationen skal være 10 vægt%, og kolberne fyldes op til 400 mL. Der skal tilsættes samme mængde til alle kolber.
6. Til hver kolbe tilsættes carbohydrat, og kolberne efterfyldes med postevand til 400 mL.
7. Propper med gærlås monteres.
8. Gærlåsene fyldes halvt op med (kalk)vand.
9. Vej hele opstillingen og notér vægten for dag 1.
10. Tæl antallet af bobler i et minut til tiden 10, 20, 30, 40, 50, 60 og 70 minutter.
11. Lad opstillingen stå ved stuetemperatur 3-7 dage.

Dag 2 (slutdag)

1. Vej hele opstillingen og notér vægten for dag 2.
2. Beregn og notér vægttabet.



Figur 1. Fremstilling af førstegenerations bioethanol.

3. Beregn bioethanoludbyttet således:

$$m_{\text{ethanol}} = m_{\text{CO}_2} \cdot \frac{m_{\text{ethanol}}}{m_{\text{CO}_2}} = m_{\text{CO}_2} \cdot \frac{46,0688 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{44,01 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = m_{\text{CO}_2} \cdot 1,045$$

Ved et vægttab på fx 20,0 g for en kolbe, er det tilsvarende bioethanoludbytte på 20,9 g.

4. Følg vejledningen for destillation.

Resultater

	Carbohydrat 1	Carbohydrat 2	Carbohydrat 3	Carbohydrat 4	Carbohydrat 5	Carbohydrat 6	Kommentarer
Vægt af opstilling dag 1 [g]							
Bobler/min. T10							
Bobler/min. T20							
Bobler/min. T30							
Bobler/min. T40							
Bobler/min. T50							
Bobler/min. T60							
Bobler/min. T70							
Vægt af opstilling dag 2							
Vægttab [g]							
Beregnet bioethanoludbytte [g]							

Resultatbearbejdning

1. Afbild resultaterne fra de forskellige kolber i et diagram med tiden som x-akse og antal CO₂-bobler/ minut som y-akse.
2. Forklar kurvernes forløb. Hvorfor er de ikke ens?
3. Er der en sammenhæng mellem kurveforløbet fra dag 1 og vægttabet på dag 2?
4. Hvad er der sket fra dag 1 til dag 2?
5. Kommentér det beregnede bioethanoludbytte fra de forskellige opstillinger.
6. Kan gærcellerne udnytte de forskellige carbohydrater lige godt? – Begrund svaret.
7. Gør rede for mulige fejlkilder i forsøget.
8. Hvordan kan dette forsøg varieres?
9. Hvordan kan viden fra dette forsøg udnyttes til planlægning af produktion via fermentering?

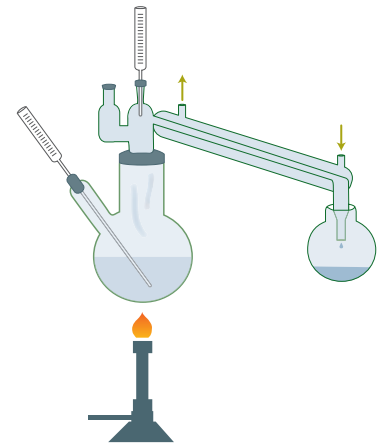
I. Destillation

Materialer

- Kolber med færdiggæret opløsning
- 500 mL måleglas
- Tragt
- Rundfilter/kaffefilter
- Destillationsudstyr: 1000 mL rundkolbe, varmekappe eller bunsenbrænder, termometer, kondenseringsrør med slanger og vandkobling, 25 mL måleglas, kogesten, antiskummiddel

Fremgangsmåde

1. Hæld den færdiggærede væske i et måleglas og notér volumen.
2. Filtrer eventuelt væsken gennem et filter i en tragt.
3. Hæld væsken i en rundkolbe, tilsæt 1 tsk. kogesten og 1 dråbe antiskummiddel.
4. Vej og notér den præcise vægt for opsamlingsglas 1 og 2.
5. Tilkobl glasrør, termometer, slanger, vandkøling og måleglas.
6. Skru op på max varme i varmekappen og hold øje med temperaturen i termometret.
7. Når opløsningen begynder at koge, skrues ned for varmen så det småkoger.
8. Destillationen og opsamlingen af ethanol i måleglasset fortsætter så længe damptemperaturen ligger på 78-80 °C.
9. Når damptemperaturen stiger over 80 °C, skiftes opsamlingsmåleglasset (= destillat 1) til et andet (= destillat 2), og destillationen fortsætter til temperaturen når 98 °C hvorpå opsamlingsmåleglasset fjernes, og destillationen afbrydes.
10. Aflæs det præcise volumen for destillat 1 og 2.
11. Bestem den præcise vægt for destillat 1 og 2.



Figur 2. Destillationsapparat. Pilene angiver kølevandets retning.

Alternativ metode

Ovenstående destillationsmetode er den bedste, men den tager meget lang tid. I stedet kan man lave en forsigtig destillation med et antiskummiddel.

Resultater

	Carbohydrat 1	Carbohydrat 2	Carbohydrat 3	Carbohydrat 4	Carbohydrat 5	Carbohydrat 6
Beregnet bioethanoludbytte fra forsøg A [g]						
Præcist volumen af destillat 1 [mL]						
Præcist volumen af destillat 2 [mL]						
Præcis vægt af destillat 1 [g]						
Præcis vægt af destillat 2 [g]						
Alkoholprocent i destillat 1 (volumenprocent)						
Alkoholprocent i destillat 2 (volumenprocent)						
Alkoholprocent i destillat 1 (vægtprocent)						
Alkoholprocent i destillat 2 (vægtprocent)						

Resultatbearbejdning

1. Hvad kan grunden være til at der laves et 1. og 2. destillat fra hver opstilling?
2. Beregn alkoholkoncentrationen i den færdiggærede væske – se vejledning.
3. Hvor 'stærk' en alkoholisk væske fik du fremstillet i din oprindelige fermenteringskolbe, med andre ord hvad var alkoholprocenten?
4. Hvorfor er det ikke muligt at opnå en alkoholprocent over 14 selv om der tilsættes mere substrat til gærceller?
5. Er der overensstemmelse mellem det beregnede bioethanoludbytte og den bestemte alkoholprocent for destillaterne – hvordan kan afvigelser forklares?
6. Beregn hvor meget substrat der skal til for at danne 1 liter 96 % ethanol.
7. Hvorfor er der forskel på ethanoludbyttet alt efter hvilket substrat der fermenteres?
8. Hvordan kan destillationsforsøget varieres?
9. Hvordan kan viden fra dette forsøg udnyttes til bioethanolproduktion?

II. Bestemmelse af alkoholkoncentration

Alkoholindholdet i en blanding kan angives på to måder, nemlig som volumenprocent og som vægtprocent, dvs. massebestemmelse. På alkoholiske drikke er alkoholindholdet typisk angivet som volumenprocent, fx 4,6 % for en almindelig pilsner.

Vægtprocent af alkohol i en blanding er et udtryk for den relative masse af alkohol i blandingen – fx i jeres destillater.

Vægtprocent og volumenprocent i en blanding beregnes således:

$$\text{vægtprocent} = \frac{\text{masse af stoffet}}{\text{masse af blandingen}} \cdot 100 \%$$

$$\text{volumenprocent} = \frac{\text{volumen af stoffet}}{\text{volumen af blandingen}} \cdot 100 \%$$

idet ethanol har en massefylde på 0,789 g/mL.

Alkoholkoncentration angivet som volumenprocent giver en højere værdi end angivet som vægtprocent.

B Førstegenerations bioethanol af polysaccharider med og uden enzym

Til dette forsøg anvendes forskellige polysaccharider fx amylose i form af majsstivelse, kartoffelstivelse og hvedestivelse, som udgangspunkt for fermenteringen. Fermenteringen udføres med og uden stivelsesspaltende enzymer, amylase og amyloglucosidase. Teori – se Bioteknologi 3, s. 80-83.

Materialer

- Majsstivelse, kartoffelstivelse eller hvedestivelse
- Bagegær
- α -amylase, Termamyl 120
- Amyloglucosidase, AMG 300
- Ionbyttet vand
- 1000 mL koniske kolber
- 1M HCl
- Måleglas
- Glasspatel
- Gummipropper med gærlås med (kalk)vand
- Præcisionsvægt

Fremgangsmåde

Dag 1

1. De rengjorte opstillinger klargøres.
2. Markér kolberne med jeres navn, carbohydrattype og +E eller -E for henholdsvis kolber med enzym og uden enzym.
3. Tilsæt 40,0 g carbohydrat til hver kolbe og 300 mL ionbyttet vand.
4. Tilsæt 2 mL Termamyl 120 (α -amylase) og 4 mL AMG 300 (amyloglucosidase) til +E kolberne.
5. Til hver kolbe tilsættes 25 g gær og der omrøres til gæren er helt opløst.
6. Kolberne efterfyldes med ionbyttet vand til 400 mL.
7. pH justeres til 6.0 ved tildrypning af HCl.
8. Propper med gærlås monteres.
9. Gærlåsene fyldes halvt op med (kalk)vand.
10. Hver opstilling placeres på en præcisionsvægt der er koblet til en datalogger. Dataloggeren skal være indstillet til at opsamle opstillingens vægt hver 30. minut over to døgn.



Figur 3. Fremstilling af førstegenerations bioethanol på vægt.

Dag 2 (slutdag)

Forsøget afsluttes og vejledning for destillation følges.

Resultater

	Carbohydrat 1 + Enzym	Carbohydrat 1 - Enzym	Carbohydrat 2 + Enzym	Carbohydrat 2 - Enzym	Carbohydrat 3 + Enzym	Carbohydrat 3 - Enzym
Startvægt [g]						
Slutvægt [g]						
Vægttab [g]						
Beregnet bioethanol-udbytte [g]						

Resultatbearbejdning

1. Lav et diagram over vægtudviklingen over to døgn i de forskellige opstillinger, idet x-aksen angiver tiden og y-aksen angiver vægten.
2. Forklar kurveforløbene – hvorfor sker vægttabet ikke lige hurtigt og hvordan kan forskelle i vægttab forklares?
3. Beregn de forskellige værdier for vægttab og bioethanoludbytte vha. formlen i forsøg A.
4. Gør rede for mulige fejlkilder i forsøget.
5. Hvordan kan dette forsøg varieres og med hvilke resultater?
6. Hvilke konklusioner kan du drage af forsøget?

C Andengenerations bioethanol af planteaffald med og uden enzym

Til dette forsøg anvendes forskellige slags planteaffald fx kartoffelskræller, æbleskræller og græsafklip som udgangspunkt for fermenteringen. Fermenteringen udføres med og uden enzymerne cellulase og amyloglucosidase. Teori – se Bioteknologi 3, s. 84-87.

Materialer

- Planteaffald
- Bagegær
- Ionbyttet vand
- 1000 mL koniske kolber
- Celluclast 1,5 L FG (cellulaseenzymkompleks)
- AMG 300 (amyloglucosidase)
- 1M HCl
- Gummipropper med gærlås med (kalk)vand
- Præcisionsvægt
- Diverse glasvarer og pipetter

Fremgangsmåde

Dag 1

1. De rengjorte opstillinger klargøres.
2. Markér kolberne med jeres navn, carbohydrattype og +E eller -E for henholdsvis kolber med enzym og uden.
3. Tilsæt 40,0 g carbohydrat til hver kolbe og 300 mL ionbyttet vand.
4. Tilsæt 2 mL Celluclast og 4 mL AMG 300 til +E kolberne.
5. Til hver kolbe tilsættes 25 g gær og der omrøres til gæren er helt opløst.
6. Kolberne efterfyldes med ionbyttet vand til 400 mL.
7. pH justeres til 6.0 ved tildrypning af HCl.
8. Propper med gærlås monteres.
9. Gærlåsene fyldes halvt op med (kalk)vand.
10. Hver opstilling placeres på en præcisionsvægt der er koblet til en datalogger. Placer opstillingerne så lunt som muligt. Dataloggeren skal være indstillet til at opsamle opstillingens vægt hver 30. minut over to døgn.



Figur 4. Planteaffald i form af kartoffelskræller.

Dag 2

Afslut forsøget og følg vejledning for destillation.

Resultater

	Carbohydrat 1 + Enzym	Carbohydrat 1 - Enzym	Carbohydrat 2 + Enzym	Carbohydrat 2 - Enzym	Carbohydrat 3 + Enzym	Carbohydrat 3 - Enzym
Startvægt						
Slutvægt						
Vægttab [g]						
Beregnet bioethanol-udbytte [g]						

Resultatbearbejdning

1. Lav et diagram over vægtudviklingen over to døgn i de forskellige opstillinger, idet x-aksen angiver tiden og y-aksen angiver vægten.
2. Forklar kurveforløbene – hvorfor sker vægttabet ikke lige hurtigt, og hvordan kan forskelle i vægttab forklares?
3. Beregn de forskellige værdier for vægttab og bioethanoludbytte vha. formelen i forsøg A.
4. Gør rede for mulige fejlkilder i forsøget.
5. Hvordan kan dette forsøg varieres og med hvilke resultater?
6. Hvilke konklusioner kan du drage af forsøget?

D Andengenerations bioethanol af halm med og uden autoklaving

Til dette forsøg anvendes halm som udgangspunkt for fermenteringen. Fermenteringen udføres med og uden autoklaving og med enzymer til spaltning af celluloseforbindelserne. Teori – se Bioteknologi 3, s. 84-87.

Det er mest hensigtsmæssigt at autoklavere kolber (+A, se nedenfor) inden forsøgsgangen da det tager tid at starte en autoklaving.

Materialer

- Halm
- 1000 mL koniske kolber
- Tætssluttende propper
- Propper med gærlås med (kalk)vand
- Ionbyttet vand
- Koncentreret svovlsyre, 98 % H_2SO_4
- 2M NaOH
- 2M HCl
- 0,1 M citratpuffer lavet af 10 g citronsyre opløst i 1 L demineraliseret vand, pH = 5
- Novozym 188
- Celluclast 1,5 L FG
- Bagegær
- Varmeskab
- Saks
- Blender
- Diverse glasvarer og pipetter

Fremgangsmåde

Dag 1 (dobbelmodul)

1. De rengjorte opstillinger klargøres.
2. Markér kolberne med jeres navn, +A eller -A for henholdsvis kolber med og uden autoklaving.
3. Halm klippes fint med en saks og blendes endnu finere i en blender.
4. Afvej 25 g halm-smulder pr. kolbe.
5. Tilsæt 300 mL ionbyttet vand pr. kolbe.
6. I stinkskab og ved brug af sikkerhedsbriller og handsker tilsættes 3 mL koncentreret H_2SO_4 pr. kolbe.
7. Omrør grundigt med glasspatel og luk kolber med tætssluttende propper.
8. -A kolber placeres i 50 °C varmeskab i en time.
9. Kolberne afkøles til 30-40 grader.
10. I stinkskab og ved brug af sikkerhedsbriller og handsker justeres pH til 4,8 med 2M NaOH, idet der omrøres grundigt undervejs.
11. Halmmassen hældes i en stor tragt med filterpapir og skylles to gange med 500 mL ionbyttet vand.
12. Den skyllede halm masse hældes tilbage i den rengjorte koniske kolbe.



Figur 5. a. Ikke autoklaveret halm.
b. Autoklaveret halm.

13. Tilsæt 500 mL citratpuffer til hver kolbe.
14. I stinkskab og ved brug af sikkerhedsbriller og handsker justeres pH til 5 enten ved tildrypning af HCl, hvis pH skal sænkes, eller ved tildrypning af NaOH, hvis pH skal hæves. Grundig omrøring undervejs.
15. Hver kolbe tilsættes 2 mL Novozym 188 og 6 mL Celluclast 1,5 L FG, der omrøres og lukkes med tætsluttende propper.
16. Kolberne placeres i 50 °C varmeskab i en uge. Omrystning i løbet af ugen er en fordel.

Dag 2

1. Tag kolberne ud af varmeskab og lad dem afkøle til 30 °C.
2. Tilsæt 15 g bagegær til hver kolbe og monter gærlåse med (kalk)vand.
3. Vej hver opstilling på en præcisionsvægt og notér vægten.
4. Placer opstillingerne i 30 °C varmeskab i to uger.

Dag 3 (dobbelmodul)

1. Tag kolberne ud af varmeskab og vej hver opstilling på en præcisionsvægt, notér vægten.
2. Overfør kolbens indhold til en stor rundkolbe således at rundkolben er ca. halvt fyldt op.
3. Følg vejledningen for destillation.

Resultater

	Halm + Autoklaving	Halm - Autoklaving
Startvægt		
Slutvægt		
Vægttab [g]		
Beregnet bioethanoludbytte [g]		

Resultatbearbejdning

1. Forklar udførligt hvad der sker med halmen under de enkelte trin i fremgangsmåden, nemlig findeling, svovlsur hydrolyse, opvarmning, enzymatisk reaktion, fermentering.
2. Beregn vægttab og bioethanoludbytte via forsøg A.
3. Er der overensstemmelse mellem det beregnede ethanoludbytte og det opnåede ethanoludbytte ved destillation? Begrund svaret.
4. Gør rede for mulige fejlkilder i forsøget.
5. Hvordan kan dette forsøg varieres og med hvilke resultater?
6. Hvorledes adskiller fremstilling af 2. generations bioethanol sig fra fremstilling af 1. generations bioethanol?
7. Hvilke konklusioner kan du drage af forsøget?
8. Hvordan kan viden fra dette forsøg udnyttes til planlægning af produktion via fermentering?