

Nationellt Samverkansprojekt Biogas i Fordon



Ekologisk lunga för biogasuppgradering 610401

ISSN 1651-5501

Projektet delfinansieras av Energimyndigheten

EKOLOGISK LUNGA FÖR BIOGASUPPGRADERING

Slutrapport från projekt 21777-1.

Lund 30.3.2005.

Bo Mattiasson

Avdelningen för Bioteknik
Lunds universitet

Innehåll:

Sammanfattning

Bakgrund

Teori

Kloning och expression av enzymet

Rening av enzym

Immobilisering

Bärare som utnyttjats

Resultat:

Inledande försök med köpt enzym

Produktion av enzym

Försök med hela celler

Immobilisering

Reaktorförsök för uppgradering av biogas

Försök i liten skala att rena biogas med hjälp av fritt enzym

Reaktorexperiment med karboanhydras immobiliserat till Sepharose

Användande av klonat enzym

Diskussion

Fortsatta studier

Referenser

Sammanfattning:

Projektet EKOLOGISK LUNGA baseras på utnyttjandet av enzymet karboanhydras för att effektivt avlägsna koldioxid från biogas och därigenom uppgradera gasen till fordonskvalitet.

För att detta skall vara möjligt måste enzymet kunna återanvändas och dessutom måste en kontinuerlig process skapas.

Karboanhydras producerades efter att genen för enzymet införts i bakterien *Escherichia coli*. Enzymet som producerades hade förutom den sekvens som det har i naturligt tillstånd även en liten svans i form av 6 histidiner. Dessa histidiner utnyttjas i ett affinitetssteg genom att histiderna binder till metallkelat. På en fast bärare har immobiliserats metallkelat och vid exposition av denna bärare för ett homogent från *E. coli* odlingen bindes det protein till bäraren som har histidiner exponerade. Enzymet kan frigöras från bäraren och därefter immobiliseras på en bärare vilken därefter utnyttjas i processen för rening av biogas. Alternativt kan det affinitetsinbundna enzymet utnyttjas direkt för katalytisk rening av biogas.

Projektet har genomförts i mindre skala än som initialt var planerat. En bidragande orsak till detta var den tidsåtgång som skedde innan vi fick tillgång till stora mängder av klonat enzym. Den biogas som renats med hjälp av immobiliserat enzym har visats innehålla upp till 99 % metan, dvs. en gas som mer än väl fyller kriterierna för fordonsgas.

Den teknologi som utvecklats synes vara mycket lämplig för småskalig rening av biogas. Den bör även kunna utnyttjas i storskaliga processer. Projektet har således lett fram till ny kunskap kring rening av biogas för att man skall erhålla fordonskvalitet på gasen.

Bakgrund:

Ett problem om man vill utnyttja biogas som fordonsbränsle är att gasen innehåller nästan lika stora volymer koldioxid och metan. Om man driver rötningsprocessen effektivt kan man reducera den relativa andelen koldioxid i utgående gas, men man kommer alltid att ha koldioxid närvarande. Att rena bort denna är tekniskt möjligt och det görs också. De anläggningar som finns för rening av biogas är relativt kostsamma och är därför anpassade till stora rötanläggningar. För mindre anläggningar finns inga bra metoder idag.

Problemet att bli av med koldioxiden är i princip detsamma som vi, var och en av oss, har att hantera i kroppen då koldioxid från metabolismen skall utsöndras och nytt syre beredas plats. I kroppen finns ett enzymesystem som reglerar koldioxidens löslighet i kroppsvätskorna. Detta enzym, karboanhydras, har isolerats och det är väl studerat. Dessutom har man immobiliserat karboanhydras så att det är lättare att arbeta med i teknisk skala. En intressant egenskap hos enzymet är att det är mycket snabbt, dvs det omsätter många koldioxidmolekyler per tidsenhet.

Teori:

Enzymet karboanhydras katalyserar jämvikten: koldioxid + vatten = vätekarbonat + hydroniumjon. Denna jämvikt är beroende av pH i mediet. Enzymet medverkar till att koldioxid löses mer effektivt i vattenfasen än vad som annars skulle vara fallet. Om man sedan avlägsnar vattenfasen från enzymet och kontakten med den koldioxidinnehållande gasfasen kan man få koldioxid att frisättas. Detta leder till en nettotransport av koldioxid från en koldioxid-haltig atmosfär till en som har lägre halt, dvs. koldioxid nettotransporteras från den gas som skall renas.

Enzymet karboanhydras har ett lågt K_m för koldioxid, dvs. det binder koldioxiden effektivt. Detta skulle kunna leda till att man kan eliminera koldioxid effektivt och uppnå hög reningsgrad på den utgående biogasen.

Enzymet är normalt fritt i lösning, men för att man skall kunna återanvända det måste det kopplas upp på en fast bärare. Detta gör det möjligt att genomföra kontinuerliga

processer varvid enzymet arbetar kontinuerligt. Viss denaturering kommer att ske och det är härvid viktigt att fastställa randvillkoren för enzymets stabilitet.

Karboanhydras har påvisats från en mängd organismer (djur, växter, alger, mikroorganismer). Det förväntas att man skall kunna utnyttja olika karboanhydraser för att lösa respektive för att frisätta koldioxid. Det skulle innebära att två enzymsteg, båda med karboanhydras men från olika organismer, skulle utnyttjas för att uppgradera biogasen.

Enzymet karboanhydras finns att köpa från olika kemikalieleverantörer. Priset för rent enzym är avskräckande högt och det är därför nödvändigt att finna andra metoder att få fram enzym. Initialt under studien köptes dock enzym så att försök kunde inledas med småreaktorer samtidigt som arbetet pågick att få fram stora mängder enzym till mer realistiska priser.

Kloning och expression av enzym

En recombinant plasmid transformerades till *E.coli* NovaBlue elektrokompetenta celler genom användning av Biorad gene Pulser II. Sålunda elektroporerade *E. coli* celler odlades vid 37°C på LB agar plattor innehållande kanamycin (30 µg/ml). Plasmider från en enstaka koloni extraherades och transformerades till en expressionscell linje av *E. coli* (BL21(DE3)). De elektroporerade *E.coli* BL21 cellerna odlades på samma sätt som NovaBlue cellerna på kanamycin- LB-agar-plattor.

Expression

En enstaka koloni av *E.coli* BL21 (DE3) celler med den recombinanta vektorn odlades över natten i 50 ml LB medium innehållande kanamycin (30µg/ml). Denna kultur utnyttjades sedan för att inokulera 300 ml LB medium i ett 2 liters odlingskärl. Kulturen odlades vid 37 °C på ett skakbord med en skakfrekvens av 200 rpm. När den optiska densiteten vid 600 nm var ca 0.7, tillsattes IPTG till en slutkoncentration av ca 1 mM. Denna inducerade produktion av enzym och odlingen avbröts efter ca 8 timmar efter induktionen.

Rening

Cellerna skördades genom centrifugering och cellerna tvättades därefter genom att slammas upp i 30 ml 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5. Efter ytterligare en centrifugering, suspenderades cellerna i samma buffert och 50 µl av Lysozyme (stamlösning 50 mg/ml) tillsattes för att lysa cellerna. Efter inkubation i två timmar i rumstemperatur utsattes lysatet för frysning/töning och sonikering för att reducera viskositeten. Cell debris och annat partikulärt material avlägsnades genom centrifugering.

Rening av enzym

Genom att utnyttja tekniken med affinitetssvansar, i detta fall en hexa-histidin, kopplad till enzymmolekylen underlättas uppreningen dramatiskt. Histidiner är kända för att interagera med immobiliserade metallkelater, i detta fall iminodiättiksyra med komplexbunden tvåvärd metalljon (koppar eller zink).

Vanligtvis måste man efter att cellerna skördats från odlingsmediet spräcka cellerna för att frisätta cellinnehållet. Därefter vidtager en komplicerad sorteringsprocedur då det protein som man avser rena skall skiljas från alla övriga. Först börjar man med att avskilja partikulärt material varefter olika kromatografiska separationsmetoder tillämpas. Vi valde i detta projekt att utnyttja en ny teknologi som innebär att man arbetar med supermakroporösa geler på vilka metallkelater sitter immobiliserade. Genom att man har stora porer kan det separata centrifugeringssteg som måste utnyttjas för att avskilja partikulärt material elimineras och hela homogenatet efter cellsönderdelningen kan direkt appliceras på den kromatografiska kolonnen. Under det efterföljande tvättsteget avlägsnas det partikulära materialet tillsammans med alla de proteiner som inte binder till metallkelatet. Därefter förändras betingelserna så att de proteiner som selektivt band till metallkelat frisättes.

Det rekombinanta karboanhydraset innehåller en histidin-svans för att göra reningsprocessen enklare. Man utnyttjar immobiliserad metal-kelat affinitetskromatografi. Två olika processer användes: konventionell teknik och supermakroporös gel. Beskrivningen nedan är för det konventionella förfarandet. Det klara cell lysatet laddades på en Cu^{2+} - iminodiättiksyra gel kolonn som ekvilibrerats med

inbindingsbuffert (20 mM Tris-HCl, pH 7.5 med 20 mM imidazole och 0.5 M NaCl). Därefter tvättades kolonnen för att avlägsna alla icke bundna eller svagt retarderade proteiner. Det bundna proteinet eluerades med 250 mM imidazole innehållande 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) samt 0.5 M NaCl. De eluerade fraktionerna samlas varefter salt och imidazol avlägsnades genom dialys.

Immobilisering av enzymet:

Ett flertal olika metoder har studerats. Det är viktigt att dels få en preparation med hög bibehållen aktivitet, dels en preparation med hög stabilitet. Dessutom måste bäraren vara av sådan beskaffenhet att den fungerar processtekniskt.

Bärare som utnyttjats:

Sepharose: Sepharose är en bärare som utnyttjats mycket och som finns väl representerad i litteraturen. Därför genomfördes initiala försök med denna bärare, även om vi redan då var medvetna om att prisbilden för denna bärare är sådan att man måste söka efter alternativ när en storskalig process skall sättas upp.

Cryogel som monolit:

Monolit baserad på akrylamid: Gelen exponeras för förhöjd temperatur (ca 90 °C) vid högt pH under ca 4 timmar, varefter den tvättas med vatten till pH blir neutralt. Därefter tillsättes glutardialdehyd i överskott. Denna tillåtes reagera under några timmar vid rumstemperatur och därefter sker noggrann tvätt med vatten. Gelen har med denna behandling fått aldehydgrupper vilka kan koppla till aminogrunder på enzymet. I samband med enzymkopplingen bildas Schiffska baser och gelen färgas (från gul till rödbrun beroende på derivatiseringsgraden). De Schiffska baserna reduceras med natrium borhydrid och en stabil enzympreparation har erhållits.

Epoxi-innehållande monolit: Gelen exponeras för etylendiamin id pH 10. Därvid kommer epoxigruppen att reagera med en aminogrupp och gelen får ett lager av uppkopplade etylendiamin-molekyler. Den terminala aminogruppen förblir fri och kan sedan utnyttjas för koppling av aktiverad dextran. Denna kompositstruktur utnyttjas sedan för koppling av enzymet karboanhydras.

Monolit med metallkelat: I samband med enzymreningen (se nedan) bindes enzymet till gelen via interaktioner mellan histidin-svansen som satts på enzymet och metallkelatgrupperna på gelen. Efter tvätt för att avlägsna ovidkommande proteiner och partikulärt material kan preparationen utnyttjas i gasreningsprocessen.

Cryogel i kulform: Förutom monoliter har även geler i kul-form utnyttjats (diameter 0.1 – 2 mm). Gelkolor av såväl akrylamid som poly(vinylacetat) har utnyttjats.

Resultat:

Projektet inleddes med småskaliga försök i laboratoriet för att utröna optimala betingelser för att genomföra gasreningsprocessen. I ett första skede utvärderades immobiliseringstekniker för att skapa enzympreparationer med hög bibehållen aktivitet samt med hög operationell stabilitet.

Inledande försök med köpt enzym: Initialt studerades effekten av enzymnärvaro då en buffertlösning kom i kontakt med biogas. Det framgår tydligt att enzymet katalyserar att koldioxid löses i bufferten varvid dels biogasens metanhalt ökar, dels pH i bufferten påverkas.

Ett antal olika immobiliseringsmetoder prövades och det befanns att epoxi-medierad koppling var den för projektet lämpligaste. Detta tar sig uttryck i form av högre bibehållen aktivitet vid immobiliseringen samt även en god operationell stabilitet.

Produktion av enzym: Att producera karboanhydras efter det att genen klonats in i *E. coli* visade sig vara en utmärkt metod för att framställa stora mängder enzym. Processen är inte fullt optimerad ännu, men på detta stadium räcker produktiviteten väl till. Genom att enzymet försetts med en affinitetssvans (His₆) underlättades reningen avsevärt (Arvidsson et al 2003, Kumar et al 2003). Homogenatet applicerades på en kolonn med supermakroporös gel och enzymet band in på metallkelat-ligander som fanns på gelen (Lozinsky et al 2003). Efter tvätt, eluerades enzymet ut med ett utbyte på över 90 %.

Försök med hela celler:

En suspension av celler utnyttjades i buffert pH 9 och biogas bubblades igenom. Det visar sig vara en effektiv metod att skilja av koldioxid. Man måste dock innan denna teknik kan utnyttjas säkerställa att cellerna inte följer med gasen ut. Detta kommer att göras genom att cellerna immobiliseras.

Det är uppenbart från försök med suspenderade celler att några mätbara diffusionsbegränsningar inte kunde påvisas. När immobilisering av celler sker kommer dock massöverföringen att försvåras. Det finns ett antal alternativa metoder för att immobilisera hela celler. Eftersom det rör sig om genetiskt modifierade celler

kan inte gärna adsorption eller adhesiv påväxt utnyttjas utan i stället skall inneslutning (entrapment) användas. (Mattiasson 1983)

Immobilisering:

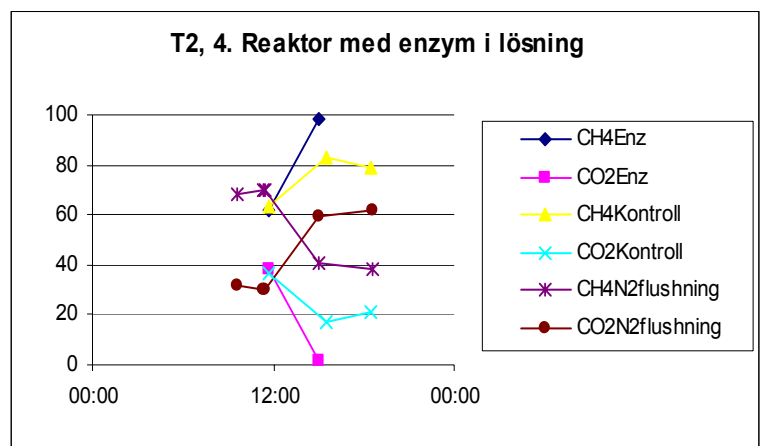
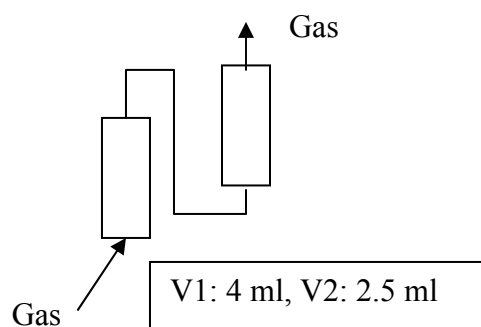
Ett antal olika metoder för att immobilisera enzymet har studerats (Mosbach 1976, Griffin 1993). Det visar sig att vid kovalent koppling av enzymet till den fasta bäraren så är epoximedierad koppling att föredra. Det ger en stabil koppling med hög bibehållen aktivitet.

Samtidigt kan dock konstateras att när man har tillgång till ett enzym med en affinitetssvans så är immobilisering genom utnyttjandet av affinitetssvansen både billigare och snabbare. När enzympreparationen tappas aktivitet kan den lätt avlägsnas och ersättas med nytt enzym. Detta är intressant eftersom man i ekonomisk analys av storskaliga processer funnit att enzymet visserligen är värdefullt, men att den största kostnaden ligger i bärmaterialet som utnyttjas.

Reaktorförsök för uppgradering av biogas:

Försök i liten skala att rena biogas med hjälp av fritt enzym.

Satsvis test: Gas bubblades genom två reaktorer sekventiella fyllda med löst enzym i fosfat-buffert, pH 9.

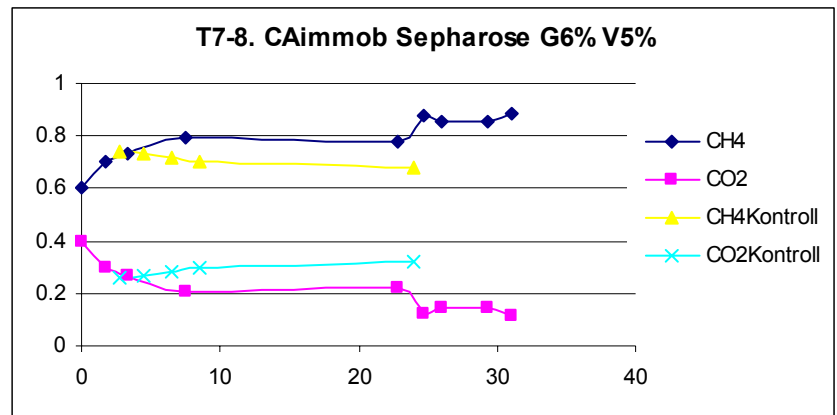
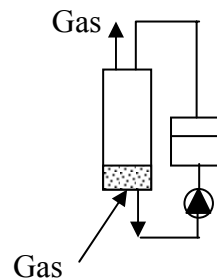


Resultat: Metaninnehållet ökade från 60% till 98% i reaktorsystemet. Efter viss tid skedde mättning med koldioxid av bufferten (pH 6.7). När biogas-flödet ersattes med kvävgas för att frisätta löst koldioxid ökade innehållet koldioxid i utgående gas till 60 % (purple line) vilket visar att det var möjligt att driva av koldioxiden. I kontrollförsök påvisades en ökning av metaninnehållet till 82 % i utgående gas (jfr med 98 i reaktorsystemet).

Detta visar således att konceptet fungerar. Att det ej är realistiskt att utnyttja löst enzym är uppenbart, men för att bevisa konceptets hållbarhet fungerade det.

Reaktorexperiment med karboanhydras immobiliseat till Sepharose.

Fosfatbuffert (0.01 M pH 9.4) användes för recirculation genom reaktorn. Buffert tanken hade en volym 5 ggr den av gelen. Gas flöde och vätskeflöde varierades.



Resultat: CO₂ absorberade i kontrollreaktorn så att metanhalten blev 75 %. Under 24 timmars experiment sjönk pH till 6.44 genom att CO₂ absorberades och orsakade pH-sänkningen.

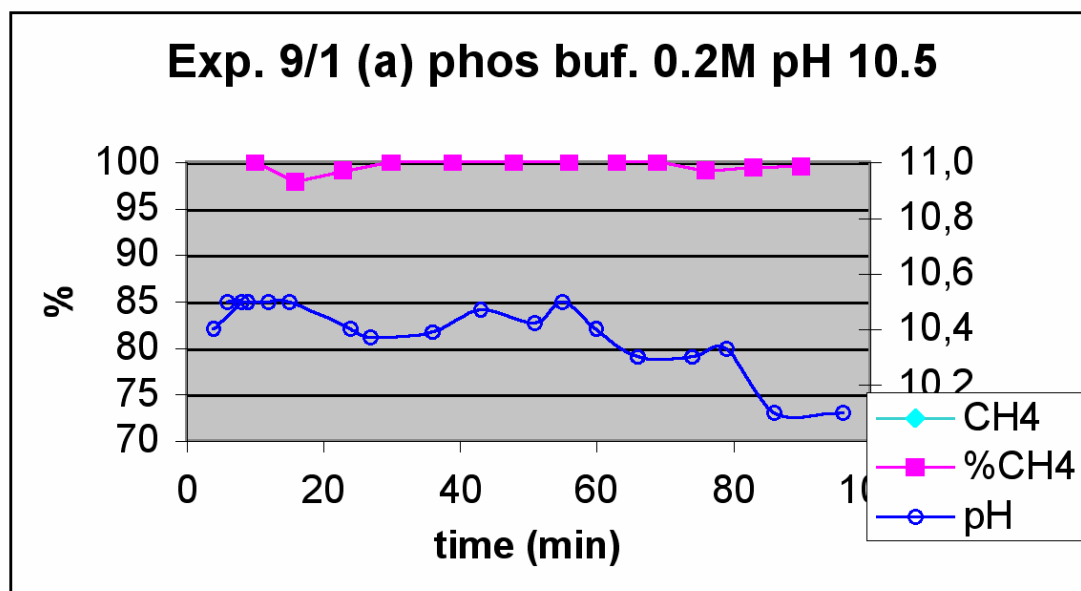
Enzymreaktorn med immobiliserat enzym kördes först under 3.5 timmar med en buffert som var 0.01 M med sedan ökades koncentrationen till 0.1 M. Under denna tid var metanhalten ungefär 80 %, och när färsk buffert började utnyttjas steg metanhalten till 86- 89 %.

Användande av klonat enzym.

Vid utnyttjande poly(vinylalkol) (PVA)gel med Cu-iminodiättiksyra samt klonat enzym som immobiliserar via interaktioner mellan histidin och metallkelat. Gelkolor av packades i en kolonn och då biogas tilläts passera över kolonnen löstes koldioxiden ut. Redan efter tre minuter var metanhalten i utgående gas 89 %, detta kunde i senare försök förbättras ytterligare. Det har framgått att pH i vätskefasen är av stor betydelse för effektiviteten i processen. Om man arbetar med buffert så ser man en klar korrelation mellan buffertstyrka och effektivitet i reningsprocessen. Alternativt kan högre pH utnyttjas.

Vi har studerat dels monolitiska kolonner, dels kolonner fyllda med gelkulor. Det förväntades att monolitiska kolonner skulle vara effektiva, men här förelåg massöverföringsproblem, varför gelkulor visade sig mer lättarbetade. Samma typ av supermakroporös gel som utnyttjats för monoliterna har även använts vid tillverkning av gelkulor.

Vid utnyttjande av gentekniskt producerat enzym har reaktorer på 1 liter etablerats. Resultaten från dess körningar är likartade som för de småskaliga, dvs. gasreningen fungerar bra. Genom att justera flödet av gas respektive vätska kan metanhalten i utgående gas justeras.



Resultat från reaktor försök med rekombinant enzym.

Diskussion: Resultaten av genomförda försök visar att konceptet med den ekologiska lungan håller. Det är möjligt att med relativt enkla medel skapa en gas med upp till 99 % metan, dvs. klart mer än vad som behövs för fordonskvalitet.

Den begränsande faktorn som tillgång på enzym utgjorde i initialskedet av projektet har lösts genom att enzymet klonats och nu kan produceras i stor mängd.

Processtekniskt finns några punkter som behöver studeras ytterligare. Hur man på bästa sätt skapar god kontakt mellan immobiliserat enzym och biogasen har studerats i

ett antal olika processkonfigurationer, men vi har i dag ingen absolut klar bild av vilken den optimala processkonfigurationen är. En omrörd tank i vilken enzympartiklarna är suspenderade och genom vilken biogasen tillåtes strömma har visat sig effektiv i liten skala. Ett mer attraktivt utförande vore att genomföra processen i en kolonn med gas strömmande i en riktning och vätska i en andra riktning. Detta har studerats i laboratoriereaktorer, men för att klart kunna utvärdera denna teknik behövs att man arbetar i större skala. Detta har inte varit möjligt inom den tidsram som funnits till förfogande, utan detta återstår att göra nu när enzymtillgången och bärarproblematiken är lösta.

Avdrivning av den lösta koldioxiden har studerats och visats fungera väl i laboratorieskala. Detta steg behöver studeras mer i detalj när processen skalas upp.

Fortsatta studier: Det är av klart intresse att fortsätta de påbörjade studierna, dels genom att utvärdera fler enzymer från ett spektrum av organismer, dels genomföra storskaliga försök. I ett litet längre perspektiv kommer även stabilitetsfrågor kring enzymet att bli av intresse. För närvarande räcker stabiliteten väl till, men i ett produktionsskede kommer man att vilja ha enzympreparationer med lång livslängd och då kommer stabilitetsaspekter att bli alltmer framträdande.

Personal som varit involverade:

Tekn. Dr. Marika Murto, Civ.ing Beatrice Teurneau, MSc Gashaw Mamo samt projektledaren Bo Mattiasson. Dessutom har medverkan erhållits av Dr. Fatima Plieva då det gäller produktion av supermakroporösa geler.

Referenser:

Pär Arvidsson, Fatima M. Plieva, Vladimir I. Lozinsky, Igor Yu. Galaev and Bo Mattiasson: (2003) Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent. **J. Chromatography** 986, 275-290

M. Griffin, E. J. Hammonds and C. K. Leach (1993) Enzyme immobilization, in Technological applications of biocatalysts. Pp 75- 117. Butterworth-Heinemann, Oxford UK.

Ashok Kumar, Ashraf A. M. Khalil, Igor Yu. Galaev and Bo Mattiasson (2003) Metal chelate affinity precipitation: purification of (His)₆-tagged lactate dehydrogenase using poly(vinylimidazole-co-N-isopropylacrylamide) copolymers. **Enzyme Microb. Technol.** 33, 113-117.

Vladimir I. Lozinsky, Igor Yu. Galaev, Fatima M. Plieva, Irina N. Savina, Hans Jungvid and Bo Mattiasson (2003) Polymeric Cryogels as Promising Materials of Biotechnological Interest. **Trends Biotechnol.** 21, 445-451.

B. Mattiasson (ed.) (1983) "Immobilized cells and organelles" CRC-Press. Vol. I + II., Boca raton, FL, USA.

Klaus Mosbach (ed). (1976) Methods in Enzymolgy vol 44, Academic Press, New York.