

FOOD OR FUEL?



productie van tweede generatie bio-ethanol

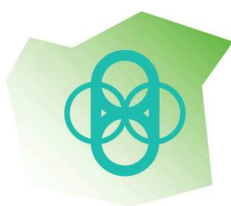


Gecertificeerde NLT module voor het VWO



WAGENINGEN UNIVERSITY
WAGENINGENUR

Colofon



De module Food or Fuel is bestemd voor de lessen Natuur, Leven en Technologie (NLT). De module is op 10 december 2009 gecertificeerd door de Stuurgroep NLT voor gebruik op het vwo in domein F (biomedische technologie en biotechnologie). Het certificeringsnummer van de module is X225-050-VF.

De originele gecertificeerde module is in pdf-formaat downloadbaar via ► <http://www.betavak-nlt.nl>

Disclaimer

Deze gecertificeerde module is niet ontwikkeld in opdracht van het Landelijk Ontwikkelpunt NLT of Stuurgroep NLT. Stuurgroep NLT en Landelijk Ontwikkelpunt NLT aanvaarden geen enkele aansprakelijkheid voor onjuistheden en/of onvolledigheden in de module, dan wel voor enige schade, voortkomend uit (het gebruik van) deze module. Aangepaste versies van deze module mogen alleen verspreid worden, indien in de module vermeld wordt dat het een aangepaste versie betreft, onder vermelding van de naam van de auteur van de wijzigingen.

Materialen en websites die leerlingen nodig hebben bij deze module zijn beschikbaar via het vaklokaal NLT: ► <http://vaklokaal-nlt.nl>

© 2010. Versie 1.0

Voor deze module geldt een Creative Commons Naamsvermelding-Niet-commercieel-Gelijk delen 3.0 Nederland Licentie ► <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/nl>

Het auteursrecht op de module berust bij B-Basic. B-Basic is derhalve de rechthebbende zoals bedoeld in de hierboven vermelde creative commons licentie.



Deze module is gemaakt in opdracht van B-Basic, en ontwikkeld door

Auteurs

Marcel Koeneman - docent Scheikunde

Guido Linssen - docent Natuurkunde

Hans Tramper - hoogleraar Bioprocestechnologie

Hoofdredacteur

Janneke van Seters - medewerker B-Basic

Wetenschappelijk experts

Ton van Maris - Technische Universiteit Delft

Sonja Isken- Wageningen University

Met medewerking van

Jeroen Sijbers

Anne-Lotte Masson

Misha Denis

Bram van Ravenstein

Greetje Bosma

Jaap Hillebrand

Joke Zwarteveen

Mia Drummen

Inhoudsopgave

1. Inleiding	6
2. Biobrandstoffen	9
2.1 CO ₂ -neutraal of niet.....	10
2.2 Bio-ethanol en biodiesel	10
2.3 Food or fuel?	11
2.4 Tweede generatie bio-ethanol productie	15
2.5 Fotosynthese voor transport.....	16
3. Grondstoffen	18
3.1 Lignocellulose	20
3.2 Productieproces van bio-ethanol	24
4. Voorbewerking	28
4.1 De eerste stappen	28
4.2 Enzymatische hydrolyse	30
5. Vergisting	47
5.1 Klassieke biotechnologie	47
5.2 De gistcel	49
5.3 Biochemie.....	51
5.4 Vergistingsreactie	54
5.5 Nieuwe ontwikkelingen.....	56
5.6 De bioreactor.....	57
5.7 Celgroei	58
6. Opwerking	62
6.1 Filtratie	62
6.2 Destillatie.....	63
7. Practicum	73
7.1 De hydrolyse.....	74
7.2 De vergisting	75
7.3 De destillatie	76
8. URL lijst.....	78

1. Inleiding

Deze module gaat over bio-ethanol. Ethanol is de officiële naam voor de vloeistof die we thuis meestal ‘alcohol’ noemen. Ethanol wordt veel toegepast als oplosmiddel (bijvoorbeeld in schoonmaakmiddelen), als smaakstof (in wijn en andere alcoholische dranken) en als brandstof. Ethanol kennen we als brandstof vooral van spiritusbrandertjes, maar tegenwoordig kunnen we hem steeds vaker in autobrandstof aantreffen.

Bio-ethanol is niet een andere stof dan ethanol. De naam geeft alleen maar aan dat bio-ethanol gemaakt wordt uit biomassa, meestal planten.

Het theoretisch deel van de module omvat de hoofdstukken 2 tot en met 6. Hoofdstuk 7 is een uitgebreid practicum waarin je zelf bio-ethanol gaat maken uit een onverwachte grondstof: plantaardig afval. Daarnaast is er de mogelijkheid om je voor te bereiden op de verschillende hoofdstukken door middel van een **digitale voorkennis module** (►URL 1). Door deze module te doorlopen wordt je goed voorbereid op de verschillende hoofdstukken.

Hoofdstuk 2. Biobrandstoffen

Dit hoofdstuk vertelt over het grootschalige gebruik van fossiele brandstoffen, zoals olie en aardgas, en over de relatie met het broeikaseffect. Het legt ook uit dat biobrandstoffen een kans bieden om het broeikaseffect tegen te gaan.

In dit hoofdstuk kun je lezen hoe de bestaande productie van biobrandstof concurreert met de voedselproductie. Nieuwe productiewijzen moeten de tweede generatie biobrandstoffen mogelijk maken, maar de technologie hiervoor is er nog niet. Deze technologie wordt op dit moment ontwikkeld. Zo zou het binnenkort mogelijk kunnen zijn om op grote schaal biobrandstoffen te maken uit gewassen die groeien op zogenaamde marginale gronden, dat zijn landbouwgronden die niet geschikt zijn om voedselgewassen op te verbouwen. Een andere mogelijkheid is om biobrandstof te produceren uit plantaardig afval; dat ga je zelf onderzoeken in deze module.

In dit hoofdstuk leer je:

- de verschillende vormen van biobrandstof kennen;

- het spanningsveld tussen voedsel en brandstof kennen en hoe de komst van zogenaamde tweede generatie biobrandstoffen dit dilemma kan helpen oplossen;
- berekeningen maken over de energieopbrengst van biobrandstof per hectare landbouwgrond;
- berekenen hoeveel grond er nodig is voor een bepaalde transportbehoefte.

Hoofdstuk 3. Grondstoffen

Dit hoofdstuk vertelt iets over hoe ethanol wordt gewonnen uit planten.

In dit hoofdstuk leer je:

- rekenen aan de verbrandingsreactie van glucose;
- de opbouw van suiker, zetmeel en lignocellulose;
- de samenstelling van lignocellulose;
- de vier basisbewerkingen van ethanolproductie.

Hoofdstuk 4. Voorbewerking

Dit hoofdstuk gaat dieper in op de vraag waarom ethanolproductie uit de niet-eetbare delen van de plant zo moeilijk is. Verder behandelt dit hoofdstuk de theorie van de enzymkinetiek.

In dit hoofdstuk leer je:

- waarom productie van ethanol uit lignocellulose zo moeilijk is;
- wat het onderscheid is tussen zuurgekatalyseerde en enzymatische hydrolyse;
- de theorie van de enzymkinetiek;
- berekeningen maken m.b.v. de theorie van de enzymkinetiek.

Hoofdstuk 5. Vergisting

Dit hoofdstuk gaat in op de vergisting. Het begint met de behandeling van de geschiedenis van de vergisting. Vervolgens wordt ingegaan op de bouw van de gistcel. Er wordt uitgelegd hoe ethanolproductie samenhangt met de stofwisseling van de gistcel. Tenslotte wordt ingegaan op vergistingsprocessen en op de wiskundige modellen die men gebruikt om de vergisting nauwkeurig te sturen.

In dit hoofdstuk leer je:

- waaraan je een vergisting kunt herkennen;
- de bouw van de gistcel en de structuur van enkele biomoleculen;
- wat de glycolyse inhoudt en wat de betekenis is van de glycolyse voor de ethanolproductie;

- waarom genetische modificatie van de gistcel van belang is;
- twee typen bioreactoren;
- rekenen aan wiskundige modellen van onbegrensde groei en logistische groei.

Hoofdstuk 6

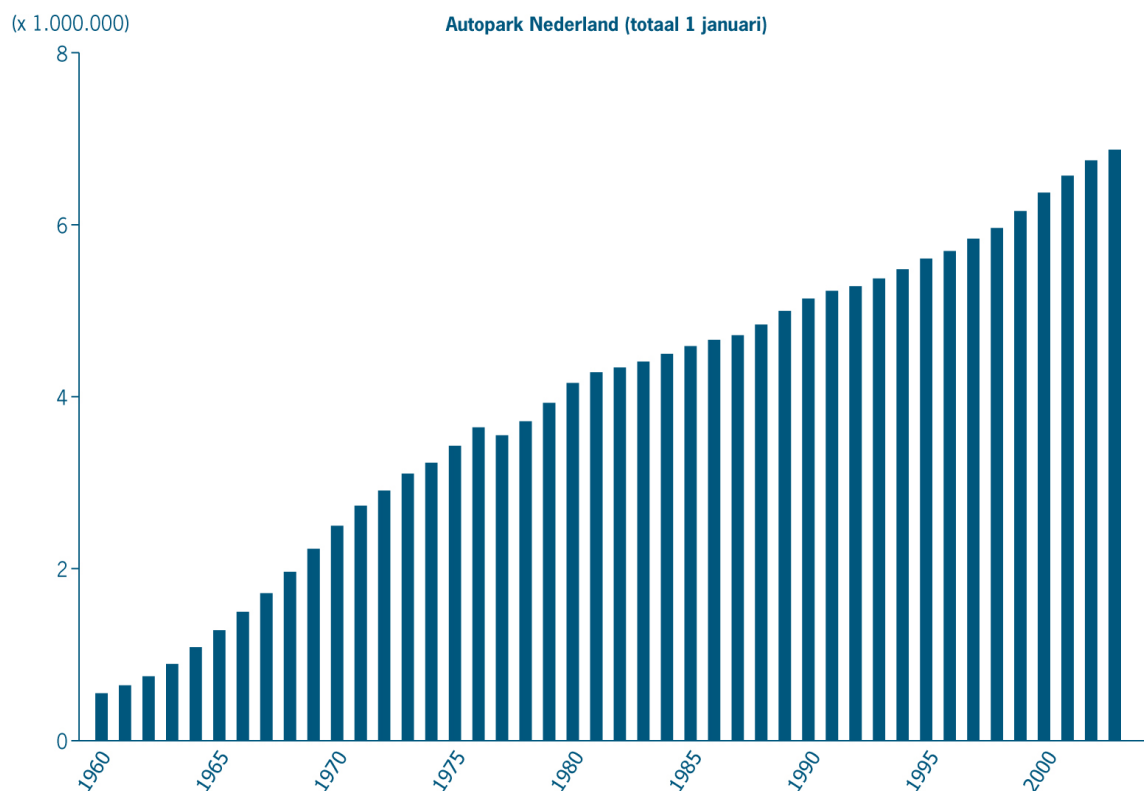
Dit hoofdstuk gaat dieper in op de technieken om zuivere ethanol te krijgen: filtratie en destillatie.

In dit hoofdstuk leer je:

- hoe je met destillatie ethanol en water kunt scheiden;
- hoe dampdruk ontstaat en wat koken is;
- de theorie van de destillatie;
- hoe herhaalde destillatie leidt tot steeds hogere concentraties ethanol;
- waarom je via destillatie toch geen zuivere ethanol kunt krijgen.

2. Biobrandstoffen

Biobrandstoffen gaan aardolie voor meer en meer toepassingen vervangen. Aardolie wordt schaars en duur. De vraag naar vloeibare brandstof stijgt wereldwijd. Onderstaande grafiek laat zien waarom. Steeds meer mensen willen de beschikking over een auto hebben. Alleen al in Nederland blijft het autopark maar groeien (Figuur 1). Maar ook in Azië rukt de auto op. In landen als India en China moet de stijging zoals Nederland die in de tweede helft van de vorige eeuw heeft laten zien, nog beginnen.



Figuur 1 De groei van het Nederlandse autopark van 1960-2004

Behalve economische oorzaken zijn er nog andere redenen die een overgang naar duurzame oplossingen zoals biobrandstoffen waarschijnlijk maken. Steeds meer mensen gaan zich zorgen maken over de CO₂-uitstoot. Veel onderzoekers nemen aan dat deze uitstoot leidt tot klimaatverandering. Vervanging van fossiele brandstoffen door biobrandstoffen kan een middel zijn om deze CO₂-uitstoot te reduceren.

In een richtlijn van 2003 heeft de EU besloten dat in 2010 bijna 6% van de energie-inhoud van de brandstof bij de benzinepomp van biobrandstof afkomstig moet zijn. Behalve economische druk ontstaat er nu ook een politieke druk om het aanbod van biobrandstoffen te vergroten. Doe nu eerst de voorkennismodule behorende bij hoofdstuk 2 (► URL 1).

2.1 CO₂-neutraal of niet.

Eigenlijk is de term biobrandstof verwarrend, want de grote voorraden fossiele brandstoffen olie, steenkool en aardgas hebben ook een plantaardige of dierlijke oorsprong. Maar er is een belangrijk verschil tussen biobrandstoffen en fossiele brandstoffen. Dat verschil blijkt wanneer je kijkt naar de tijd die nodig is voor de vorming ervan en de snelheid waarmee ze gebruikt worden. Planten leggen energie van de zon vast. Bij fossiele energie is dat miljoenen jaren geleden gebeurd, bij biobrandstoffen “gisteren”.

Wie in de open haard de biobrandstof hout verstoekt, gebruikt energie die hooguit enkele decennia eerder is vastgelegd. De CO₂-emissie die plaats vindt bij het stoken in de kachel, is precies even groot als de CO₂-opname die nodig was voor de vorming van het hout. De CO₂ die korte tijd geleden aan de atmosfeer is onttrokken, wordt er nu aan teruggegeven. Verbranding van biobrandstof is CO₂-neutraal.

Gebruik van de fossiele brandstof benzine tijdens een autorit maakt CO₂ vrij die miljoenen jaren geleden uit de lucht is gehaald. De uitstoot die nu plaatsvindt, doet het CO₂-gehalte toenemen. Verbranding van fossiele brandstof is niet CO₂-neutraal.

2.2 Bio-ethanol en biodiesel

Biobrandstoffen zijn er in allerlei soorten. In vaste vorm (zoals hout), in gasvorm (zoals methaangas dat vrijkomt bij rottingsprocessen) en in vloeibare vorm. De meest bekende vloeibare biobrandstoffen zijn biodiesel en bio-ethanol. Om deze laatste gaat het bij transport. Dat heeft te maken met de historie. In de geïndustrialiseerde wereld is er voor gekozen om de explosiemotoren van Otto (benzinemotor) en van Diesel (dieselmotor) tot ontwikkeling te brengen. Motoren die na ruim een eeuw sleutelen een geweldige reputatie hebben opgebouwd. Deze motoren hebben in tegenstelling tot bijvoorbeeld de warmtemotor van Stirling vloeibare brandstof nodig. Biodiesel kan rechtstreeks in de tank van een diesel-auto worden gedaan. Bioethanol is bestemd voor een benzine-

auto. Om een auto volledig op bio-ethanol te laten rijden, is een (kleine) aanpassing van de motor nodig. Bijmengen van benzine is echter geen probleem.

Bio-ethanol is gewoon ethanol. Van oudsher wordt dat gemaakt met behulp van een biologisch proces: fermentatie (vergisting) waarbij de omzetting plaats vindt m.b.v. micro-organismen.

Biodiesel wordt geproduceerd m.b.v. een chemisch proces. Plantaardig vet, brandbaar maar te stroperig voor een automotor, wordt bewerkt met behulp van methanol waardoor biodiesel ontstaat die veel vloeibaarder is. Het maken van biodiesel is, vergeleken met bioethanol, een vrij eenvoudig proces.

Opdracht 1

Zoek op internet de structuurformules voor ethanol en voor biodiesel. Welk molecuul is het grootst? Uit hoeveel atomen bestaat molecuul ethanol? En een molecuul biodiesel?

Opdracht 2

Bij het proces waarbij biobrandstof wordt gevormd hoort een reactievergelijking.

- a. Zoek m.b.v. Google wat de reactievergelijking is die hoort bij de vorming van bio-ethanol. Raadpleeg tenminste twee sites en noteer dan de vergelijking.
- b. Doe dit ook voor biodiesel.

2.3 Food or fuel?

De overgang naar vloeibare biobrandstof verloopt niet zonder problemen. De huidige technologieën gebruiken voedingsgewassen om de ethanol te produceren. Stijgende olieprijs kunnen dan ook leiden tot stijgende voedselprijzen.

Opdracht 3

Leg uit waarom de prijs van brood zou kunnen stijgen door een sterk stijgende vraag naar biobrandstoffen.

Doordat biobrandstof nu nog geproduceerd wordt met gewassen als maïs en graan, zullen energiemarkt en voedselmarkt gekoppeld raken als de aardolieprijs een bepaald niveau bereikt. Voor menigeen is dat een nachtmerrie.

Grootschalige inzet van traditionele voedingsgewassen om te voorzien in de brandstofbehoefte voor transport heeft onvermijdelijk verregaande consequenties. De Amerikaanse milieudenker Lester Brown rekende voor dat om de tank van een SUV te vullen een hoeveelheid graan nodig is die een mens in een jaar consumeert.

Beter dan dit soort vergelijkingen is het om te kijken naar de energieopbrengst per hectare. Dit is te zien in Tabel 1.

Tabel 1 De energieopbrengst per hectare van verschillende gewassen.

Gewas	Opbrengst per hectare in GJ
Suikerriet	104
Suikerbieten	90
Maïs	54
Tarwe	45
Gerst	20
zonnebloemen	16
Koolzaad	20
Palmolie	81
<i>Bron: Louise Fresco, Duisenberg lezing (2006): Biomass for food or fuel: is there a dilemma?</i>	

Ter vergelijking: met 100 GJ kan de gemiddelde autorijder ongeveer 3 jaar rijden. Het gebruik van voedingsgewassen voor de productie van ethanol of biodiesel vanwege transportdoeleinden zal dus een groot beslag leggen op de beschikbare landbouwgrond.

Efficiëntie

Er is nog een reden dat veel mensen sceptisch zijn over de inzet van maïs en graan voor de productie van bio-ethanol. Het is namelijk zo dat je voor het produceren van energie ook altijd energie moet investeren. Voordat je een fossiele brandstof als benzine kunt gaan gebruiken, is er veel energie verloren gegaan aan de oliewinning, het transport en de processen in de olieraffinaderijen. Bij biobrandstoffen is dat niet veel anders.

Om te beginnen moet het gewas worden verbouwd en geoogst. Met name voor de kunstmest en het transport zijn grote hoeveelheden energie nodig. Daarna moet het gewas nog worden omgezet in ethanol of biodiesel. Ook hier is een grote energie-input nodig.

David Pimentel, ecologisch en agrarisch deskundige, is zelfs van mening dat het totale rendement van een gewas als maïs uiteindelijk negatief is. Dat wil zeggen dat er meer energie ingaat dan er uitkomt.

Deskundigen die uitgaan van de meest recente toestand van de techniek, komen voor maïs op een rendement van 20-30%, voor suikerriet op een rendement van 80-90% (er wordt nog veel met de hand gedaan in Brazilië, de grootste producent van ethanol uit suikerriet), en voor biodiesel uit koolzaad 50-60%.

Opdracht 4

Ga naar de site (► URL 2) en lees het interview met Pimentel. Pimentel kreeg van zijn critici te horen dat zijn berekeningen betrekking hadden op gegevens uit 1970 en daarom verouderd waren.

Leg uit dat gebruik van meer recente gegevens leidt tot betere rendementen.

Op het eerste oog lijkt biodiesel niet te concurreren met de voedselvoorziening. In Duitsland wordt vooral koolzaad verbouwd dat alleen maar bruikbaar is voor de productie van biodiesel. Voor de teelt is echter landbouwgebied nodig dat ook voor de voedselvoorziening geschikt is. De productie van biodiesel stuit overigens op veel meer bezwaren. Een van de meest productieve oliebevattende planten is de oliepalm. Met name in Zuidoost-Azië worden grote stukken regenwoud vernietigd om plaats te maken voor de teelt van oliepalmen. Deze vernietiging laat de CO₂-balans zwaar doorslaan naar de verkeerde kant. Dat komt omdat de regenwouden enorme reservoirs zijn van opgeslagen CO₂.

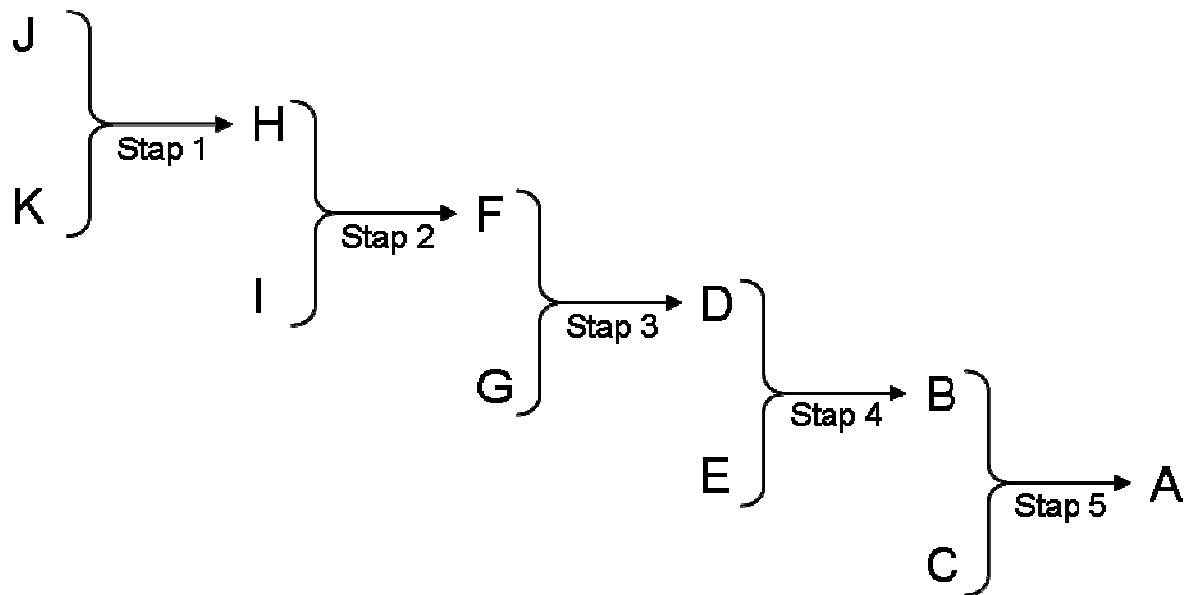
De vernietiging van regenwouden heeft dus een onmiddellijke enorme CO₂-uitstoot tot gevolg.

Bio-energie in Nederland

Zou Nederland veel bio-energie kunnen produceren? In Nederland wordt doorgaans gewerkt met suikerbieten. Per hectare wordt jaarlijks 55 ton suikerbieten geproduceerd. Daarvan kan 17% worden omgezet in suiker. Deze suiker kan worden omgezet in ethanol. Centrale vraag is op hoeveel hectaren suikerbieten verbouwd zouden moeten worden om de ethanol te produceren waarop alle auto's in Nederland zouden kunnen rijden.

Opdracht 5

In deze opdracht moet je uiteindelijk tot een gefundeerde schatting komen van de hoeveelheid grond die nodig is om met behulp van suiker uit suikerbieten zoveel ethanol te produceren dat het autoverkeer in Nederland hierop kan rijden, in plaats van - zoals nu - op fossiele brandstoffen.



Figuur 2 Rekenschema voor berekening van een grootheid.

De berekening verloopt in een aantal stappen. Deze stappen zijn aangegeven in het schema van Figuur 2. De grootheden die een rol spelen, zijn vermeld met een letter.

Hieronder staat een lijst van de betrokken grootheden. De bijbehorende eenheid staat er tussen haakjes achter. Maar er is niet aangegeven (behalve bij A) welke letter bij welke grootte hoort. Grootheden die gegeven zijn, zijn vet gedrukt.

- Het benodigde landbouwareaal : A (ha)
- **Opbrengst gewas per ha** (50 ton/ha)
- **De verbrandingswaarde van ethanol** (22MJ/liter)
- **De verbrandingswaarde van benzine** (32MJ/liter)
- De totale Nederlandse behoefte aan energie t.b.v. het autoverkeer(MJ)
- **Het gemiddeld benzineverbruik van auto's** (12 km/liter)
- **Het aantal autokilometers dat jaarlijks wordt afgelegd** (100 mld km)
- **Ethanolopbrengst per ton gewas** (108 liter/ton)
- De totale Nederlandse behoefte aan ethanol t.b.v. autoverkeer (liter)
- Energiegebruik per km (MJ/km)

- a) Koppel elke grootte met een letter in het rekenschema.
- b) Bereken het benodigde landbouwareaal.

2.4 Tweede generatie bio-ethanol productie

Gelukkig is de koppeling tussen energiemarkt en voedselmarkt niet zo dwingend als in het voorgaande is geschetst. De oorzaak is dat bijvoorbeeld een maïsplant niet alleen bestaat uit een maïskolf. Het grootste gedeelte van de plant bestaat uit niet-eetbare stoffen. Maar die stoffen zijn wel geschikt voor de productie van biobrandstof. De technologieën om uit de niet-eetbare delen van de plant biobrandstof te maken zijn in ontwikkeling. In dat verband wordt ook wel gesproken van de tweede generatie biobrandstoffen.

De eerste generatie biobrandstoffen concentreert zich op drie grondstoffen:

- Suiker (afkomstig van suikerriet en suikerbiet; relatief eenvoudig om te zetten in bio-ethanol)
- Zetmeel (afkomstig van graan, maïs, gerst, aardappel etc.; iets lastiger om te zetten in ethanol maar er zijn inmiddels beproefde technieken.
- Olie(afkomstig uit koolzaad, zonnebloemen, olijven, oliepalm etc; eenvoudig om te zetten in biodiesel)

De rest van de plant bevat onder andere veel cellulose. Ook de cellulose is energierijk maar ongeschikt voor menselijke consumptie. Cellulose en aanverwante stoffen kunnen worden omgezet in ethanol. De bijbehorende technologie is echter nog in ontwikkeling. Hoofdstuk 3 gaat hier dieper op in.

Vloeibare biobrandstoffen die afkomstig zijn van cellulose en aanverwante stoffen worden tweede generatie biobrandstoffen genoemd.

Tweede generatie biobrandstoffen bieden grote mogelijkheden omdat ze niet rechtstreeks concurreren met de voedselvoorziening maar daar zelfs een aanvulling op kunnen zijn.

Afvalverwerking

De extractie uit voedingsgewassen van de drie genoemde grondstoffen - suiker, zetmeel en olie - leidt tot grote afvalstromen in de landbouw; er blijft van graan bijvoorbeeld heel veel stro over. Voor een deel is daar een bestemming voor, zoals compostering. Het gevolg is dat doorgaans slechts een beperkt gedeelte van de energie van de plant wordt benut.

Denkbaar is een toekomst waarbij de graanboer zijn graan aan de voedselmarkt levert, een deel van de planten laat liggen als grondverbetering en het restant aflevert bij de ethanolfabriek.

Verbouw energiegewassen op marginale gronden

Marginale gronden zijn gronden die niet geschikt zijn voor gewone landbouw. De gronden zijn geërodeerd, verzilt of te rotsachtig. Wereldwijd gaat het om 17 miljoen km² ofwel 13 % van de beschikbare grond.

De beste mogelijkheden om tweede generatie biobrandstoffen te produceren, bieden hier meerjarige gewassen, die groeien makkelijker op bodems van lage kwaliteit.

Meerjarige gewassen nemen in vergelijking met eenjarige (landbouw)gewassen meer kooldioxide op, ze hebben minder meststoffen en landbouwchemicaliën nodig (die kosten veel energie!) en de bodem raakt niet snel uitgeput. De energieproductie is efficiënter en goedkoper.

Op termijn kan ingebruikname van deze bodems ten behoeve van bio-energie zelfs leiden tot verbetering van deze gronden zodat ze geschikt worden als landbouwgrond.

Hoeveel bio-energie kan een hectare eigenlijk leveren als we kijken naar de hele plant? Hoeveel energie legt een plant eigenlijk vast? Om die vraag te beantwoorden is het nodig bij het begin te beginnen, de fotosynthese.

2.5 Fotosynthese voor transport

Bieden biobrandstoffen een oplossing voor het energievraagstuk? Hoe komt de plant eigenlijk aan zijn energie? Misschien wel de belangrijkste reactie van de biosfeer is de fotosynthese. Hierover gaat de volgende opdracht.

Opdracht 6

Planten groeien door middel van de fotosynthese. Zoek op wat de reactie is van de fotosynthese. Het juiste reactieschema voor deze reactie is:

- a. $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} + \text{O}_2 + \text{energie}$
- b. $\text{CO}_2 + \text{O}_2 + \text{energie} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$.
- c. $6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O} + \text{energie} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2$
- d. $6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2 + \text{energie}$.

Hoewel gewassen erg kunnen verschillen, blijkt de fotosynthese vrijwel altijd hetzelfde op te leveren. In berekeningen kan men er vanuit gaan dat 1 m² gewas via fotosynthese ongeveer 50 g CO₂ per dag vastlegt en dat een groeiseizoen 100 dagen omvat.

Opdracht 7

Aangezien de opgenomen CO_2 wordt omgezet in glucose, kan worden uitgerekend hoeveel glucose wordt geproduceerd. Van glucose is de energie-inhoud bekend (Binas).

Dus kan worden uitgerekend hoeveel zonne-energie door de fotosynthese wordt omgezet in chemische energie.

- a) Bereken hoeveel CO_2 per jaar en per hectare wordt vastgelegd.
- b) Bereken hoeveel glucose per jaar per hectare wordt gemaakt.
- c) Bereken hoeveel energie per hectare en per jaar wordt vastgelegd.

De zon levert gemiddeld over dag en nacht ongeveer 100 W/m^2 .

- d) Bereken het rendement van de fotosynthese.

Opdracht 8

Maak de quiz die via de volgende website ► URL 3 te vinden is.

3. Grondstoffen

Bioethanol wordt geproduceerd door micro-organismen. In deze module staat *Saccharomyces cerevisiae* centraal, beter bekend als bakkersgist omdat het meest bekende gebruik van het organisme betrekking heeft op het rijzen van brooddeeg. Hoofdstuk 5 en meer in het bijzonder paragraaf 5.2 gaat dieper in op de eigenschappen van gist. Gist gebruikt glucose als energiebron. Als er voldoende zuurstof is heeft de gistcel de mogelijkheid veel energie uit de glucose te halen en zullen de cellen zich snel vermenigvuldigen. Maar als er te weinig zuurstof is, kan slechts een gedeelte van de energie worden vrijgemaakt. Ethanol bevat dus de energie die de gistcel niet kon gebruiken.

Opdracht 9

Deze verschillende metabole processen kunnen als volgt worden weergegeven:

Aerobe dissimilatie:

Glucose+.....→.....+.....+energie

Anaerobe dissimilatie:

Glucose→.....+.....+energie

- Vul de stoffen in op de ontbrekende plaatsen.
- Leg uit bij welke van de bovenstaande reacties de vrijkomende energie het grootst is.
- Beide reacties zijn zogenaamde netto-reactieschema's: leg uit wat daarmee wordt bedoeld.

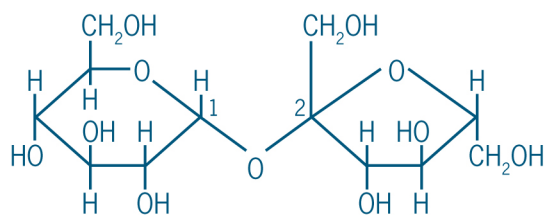
Zoek, voor je aan de volgende vragen begint de formule van glucose en ethanol op in bv binas. Gebruik bij de berekening reactievergelijkingen.

- Als er 1 mol glucose wordt omgezet bij aerobe verbranding, hoeveel mol CO₂ ontstaat er dan? Leg uit.
- Als er 1 mol glucose wordt omgezet bij anaerobe vergisting, hoeveel mol alcohol ontstaat er dan? Leg uit.
- Als er 1 kg glucose wordt omgezet bij anaerobe vergisting, hoeveel gram alcohol wordt er dan geproduceerd? Leg uit.

Gistcellen produceren dus alcohol onder anaerobe omstandigheden en hebben daarvoor glucose nodig. Maar glucose komt in de natuur niet zoveel in vrije vorm voor. Glucose is vaak een bouwsteen voor andere, meer complexe moleculen. De belangrijkste zijn: suiker, zetmeel en cellulose. Deze stoffen die door planten op grote schaal worden geproduceerd fungeren dan ook als grondstof voor de productie van alcohol.

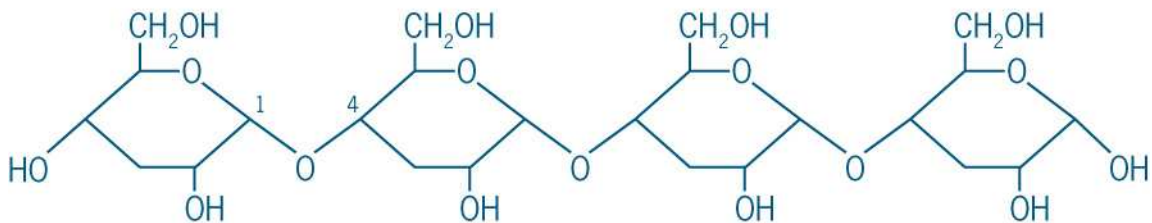
In Figuur 3, 4 en Figuur 5 is te zien hoe de stoffen sucrose (sacharose, oftewel gewone suiker), zetmeel en cellulose zijn opgebouwd uit glucose.

Sucrose



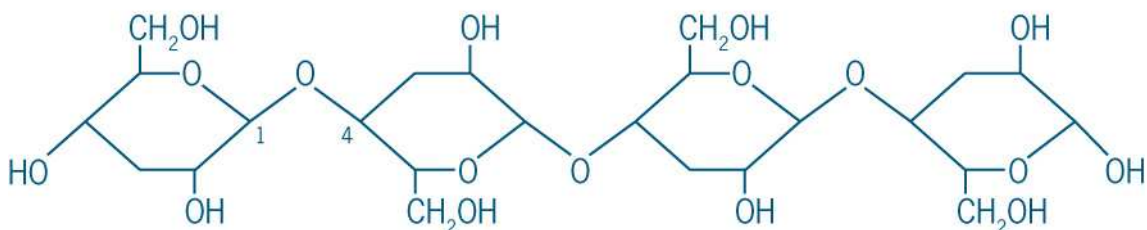
Figuur 3 Sucrose bestaat uit twee componenten: glucose en fructose

Zetmeel



Figuur 4 Zetmeel is een polymeer van glucose-moleculen.

Cellulose



Figuur 5 Cellulose is een polymeer van glucose-moleculen. De glucose-moleculen zitten, in vergelijking met zetmeel, met een andere binding aan elkaar vast.

Om met behulp van gistcellen alcohol te produceren moet een grondstof eerst worden afgebroken tot glucose. Dit proces verloopt bij alledrie de stoffen, sucrose, zetmeel en cellulose, op vergelijkbare wijze. De verbindingen tussen de glucosecomponenten worden

verbroken bij het zuurstofatoom dat de componenten verbindt. Water speelt hierbij een essentiële rol (zie ook paragraaf 3.2). Dit proces wordt hydrolyse ($\acute{\upsilon}\delta\rho\omicron\varsigma$ = water, $\lambda\acute{\upsilon}\epsilon\iota\nu$ = losmaken) genoemd. Doe nu eerst de voorkennismodule bij hoofdstuk 3 ►URL 1.

Opdracht 10

Teken een glucose- α en een glucose- β naast elkaar en laat goed zien waarin het verschil zit. Raadpleeg eventueel internet.

Opdracht 11

Glucose speelt een sleutelrol in de stofwisseling van cellen. Zowel in bacteriën als in dierlijke cellen functioneert glucose als energiebron. Hoe het komt dat glucose deze rol speelt en niet fructose of een andere enkelvoudige suiker is een vraag waarop de moleculaire evolutiebiologie nog steeds een antwoord zoekt.

Leg uit dat glucose in de natuur niet in grote hoeveelheden in vrije vorm is te vinden.

Opdracht 12

Suiker, zetmeel en cellulose zijn grondstoffen voor de productie van ethanol.

- Noem bij elk van de stoffen suiker, zetmeel en cellulose drie planten die de betrokken stoffen voortbrengen.
- Welk van deze drie stoffen wordt gebruikt bij de productie van wijn?
- Welk van deze drie stoffen wordt gebruikt bij de productie van bier?

3.1 Lignocellulose

Plantencellen hebben een celwand die voor het grootste deel bestaat uit cellulose, onmiddellijk gevolgd door hemicellulose en lignine. Van cellulose is glucose de enige bouwsteen en van hemicellulose is het een belangrijke bouwsteen.

Ongeveer de helft van alle plantaardige materiaal op aarde bestaat uit cellulose. Daarmee is cellulose de meest voorkomende organische stof op aarde.

De combinatie van cellulose, hemicellulose en lignine wordt lignocellulose genoemd.

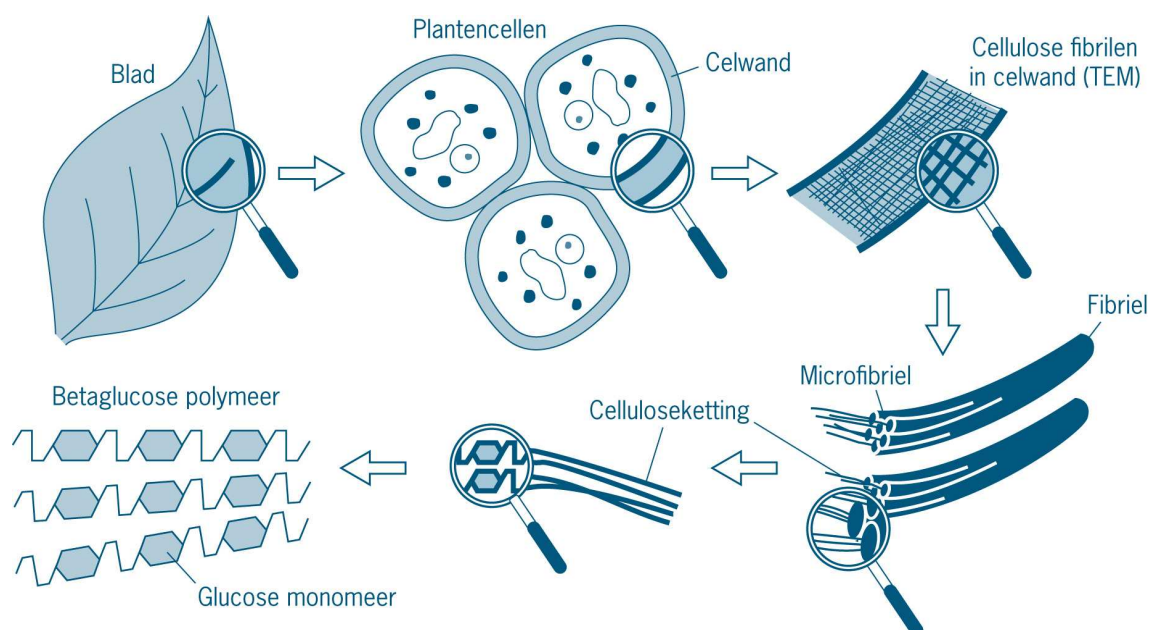
Hieronder is in Tabel 2 voor een aantal grondstoffen het percentage cellulose, hemicellulose en lignine in de droge stof opgegeven:

Tabel 2 Percentage cellulose, hemicellulose en lignine van verschillende grondstoffen

Soort lignine	Cellulose %	Hemicellulose %	Lignine %
Bagasse	41	24	18
Stro	35	35	6
Hardhout	40-55	24-40	18-25
Bladeren	15-20	80-85	0
Katoen	80-95	5-20	0
Krantenpapier	40-55	25-40	18-30
Gras	25-40	35-50	10-30

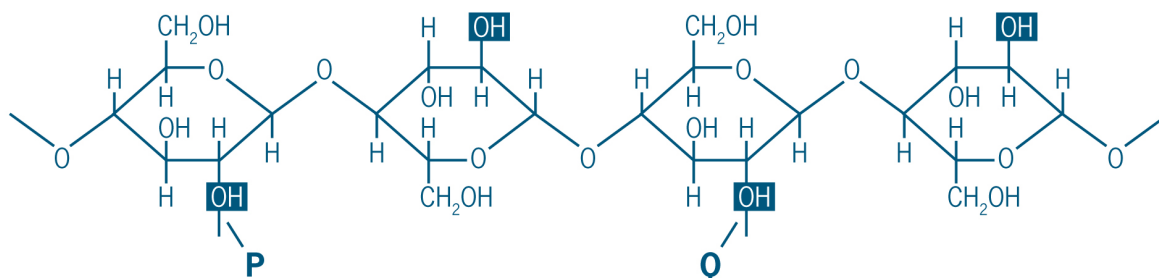
Cellulose

Planten cellen hebben een kenmerkende structuur met een starre celwand. Die startheid komt mede tot stand door cellulose. De opbouw is hieronder getekend (Figuur 6).



Figuur 6 De structuur van plantencellen. De starre celwand bestaat uit vezels die zijn opgebouwd uit microfibrillen. Deze bestaan uit zo'n 100 celluloseketens.

Cellulose bestaat uit lange polymeren (ketens) van β -D-glucose-moleculen (Figuur 7). Er is sprake van slechts één soort verbinding tussen steeds dezelfde koolstofatomen van de glucose-monomeren, nl de C1- C4 binding (zo genoemd naar de C-atomen die de binding aangaan)



Figuur 7 Celluloseketens kunnen onderling bindingen aangaan met waterstofbruggen. Dat kan gebeuren bij de plaatsen P en Q.

Tussen de ketens kunnen waterstofbruggen ontstaan (zie Figuur 7) Zo ontstaan microfibrillen die elk uit zo'n 100 polymeren bestaan.

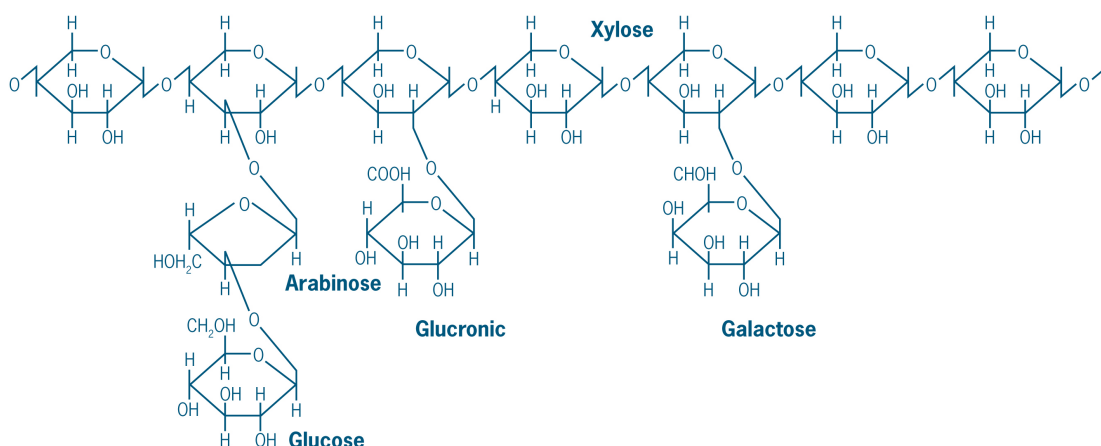
De opbouw van cellulose is zo geordend dat het doet denken aan een kristal. De kristallijne structuur maakt dat cellulose moeilijk afbreekbaar is. Hout blijft dan ook jaren goed als het droog wordt bewaard.

Hemicellulose

Microfibrillen van cellulose zitten niet stijf op elkaar gepakt maar zijn ingebed in een massa met minder structuur: een amorfe tussenstof gevormd door hemicellulose en lignine.

Hemicellulose verschilt in een aantal belangrijke opzichten van cellulose:

- Het is een polymeer dat niet alleen uit hexosen (dwz C_6 suikers zoals glucose, galactose en mannose) bestaat maar ook pentosen (C_5 suikers, voornamelijk xylose en arabinose).
- De polymeren hebben een dominante keten bestaande uit een soort suikers, vaak xylosen.
- Doordat er meerdere bindingsmogelijkheden worden gebruikt, ontstaan er zijtakken aan het polymeer.
- Soms komen er zijtakken met andere componenten voor zoals suikerzuur (glucronic acid)



Figuur 8 Hemicellulose bestaat uit een polymeer met zijketens. Hier bestaat de ruggengraat uit xylose

Met behulp van waterstofbruggen hecht het hemicellulose aan de microfibrillen.

Door de vertakkingen kan het hemicellulose niet de kristallijne structuren opbouwen die kenmerkend zijn voor cellulose. Er is meer ruimte voor enzymen die de verbindingen verbreken. Hemicellulose is dan ook gevoeliger voor vocht en aantasting door micro-organismen. Als hout begint te rotten desintegreert eerst het hemicellulose. Door de zuren die daarbij ontstaan raakt uiteindelijk ook de cellulose aangetast. Het totaal aan winbare suikers in lignocellulose varieert sterk per plant. Tabel 3 laat de samenstelling zien van het lignocellulose van enkele agrarische restmaterialen. In de tabel komt duidelijk naar voren dat behalve glucose ook de monosaccharide xylose vaak voorkomt. Dit is van belang voor de ethanolproductie omdat de gewone gistcel xylose niet kan fermenteren. Een technologische doorbraak in Delft heeft hierin echter verandering gebracht. Zie ook H5, Nieuwe ontwikkelingen.

Tabel 3 Massapercentage suikers in lignocellulose van enkele agrarische restmaterialen (Naar Grohmann en Bothast (1994))

Suiker	Maïs-stengel	Graanstro	Bagasse	Katoen-rest	Suikerbieten-pulp	Vingergras
Glucose	34,6	32,6	39,0	37,1	24,1	31,0
Mannose	0,4	0,3	0,4	1,1	4,6	0,2
Galactose	1,0	0,8	0,5	2,4	0,9	0,9
Xylose	19,3	19,2	22,1	9,4	18,2	0,4
Arabinose	2,5	2,4	2,1	2,3	1,5	2,8

Opdracht 13

In Tabel 2 worden verschillende vormen van biomassa genoemd. Leg uit waarom stro in de natuur veel minder snel composteert dan bladeren.

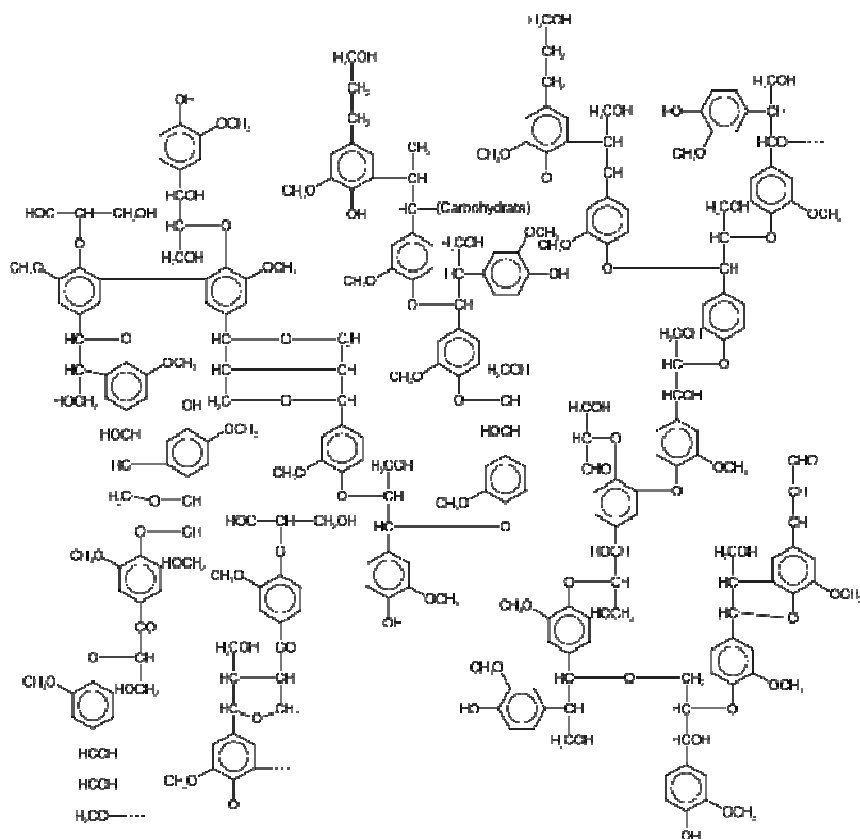
Opdracht 14

Leg aan de hand van Tabel 3 uit voor welke grondstof de vinding van Delft de grootste bijdrage zou kunnen leveren: bij vingergras of bij maisstro.

Lignine

Lignine is een groot macromolecuul met veel aromatische ringen (Figuur 9). Het molecuul heeft geen lineaire structuur maar vormt samen met de hemicellulose een netwerk waarin de microfibrillen liggen ingebed. Hierdoor ontstaat de starre structuur van de plantencel. Het lignine ontstaat vaak langzamer en vervangt dan pectine als tussenstof. Gras dat sterk verouderd is bevat veel lignine en wordt houtachtig genoemd. Graskuilen met een overmaat van dit gras zijn gevaarlijk voor de koeien. Lignine (ook wel houtstof genoemd) is voor koeien en andere herkauwers niet verteerbaar omdat er

maar weinig micro-organismen zijn die het molecuul kunnen opbreken.



Figuur 9 Lignine is een groot macromolecuul zonder vaste structuur en met veel ringen en zijketens.

3.2 Productieproces van bio-ethanol

Om ethanol te produceren uit planten zijn vier basisbewerkingen nodig:

- Voorbewerking
- Hydrolyse
- Vergisting
- Opwerking

Voorbewerking van de grondstof

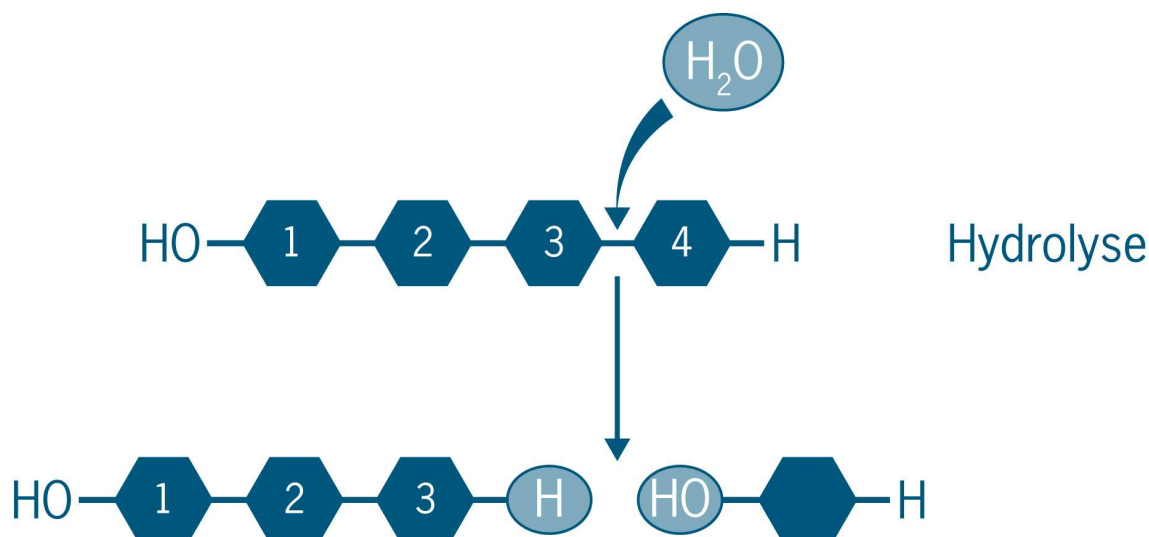
De plant of vrucht zal bewerkt moeten worden. Meestal zit de suiker in de sappen van de plant of de vrucht. Het kost meestal niet veel energie om die sappen vrij te maken. Bij zetmeel kost de voorbewerking al weer meer energie. Zetmeel zit doorgaans in zaden.

Deze moeten stevig zijn om hun functie goed te kunnen vervullen. Is de zaadschil gebroken dan is het zetmeel toegankelijk.

Cellulose is de minst schaarse maar wel de meest lastige grondstof. Cellulose heeft als functie de plant stevigheid te geven. Een boom bestaat voor een groot gedeelte uit cellulose. Maar om de cellulosemoleculen af te kunnen breken tot losse glucose-moleculen (hydrolyse) moet de boom verpulverd worden en een hele reeks van bewerkingen ondergaan.

Hydrolyse

Bij de hydrolyse moeten de bindingen tussen de glucosecomponenten dus worden verbroken. Voor hydrolyse is water nodig. De binding tussen de C van een glucosering en de verbindende O wordt verbroken, aan de C wordt een OH-groep gekoppeld en aan de O een H (samen dus H_2O) waardoor weer volledige glucosemoleculen ontstaan. De hydrolyse kan verlopen als een zuiver scheikundig proces. Dit proces is weergegeven in Figuur 10.



Figuur 10 Hydrolyse van een polymeer. De binding tussen glucose-moleculen 3 en 4 wordt verbroken. Vervolgens worden met behulp van een watermolecuul weer twee nieuwe moleculen gevormd.

Hydrolyse vindt niet spontaan plaats, maar bijvoorbeeld wel door de toevoeging van een zuur. De vrije waterstofionen maken de binding tussen de glucosecomponenten zwakker. Na afloop van de hydrolyse is er een watermolecuul verbruikt. De waterstofionen van het zuur hebben alleen gediend als katalysator.

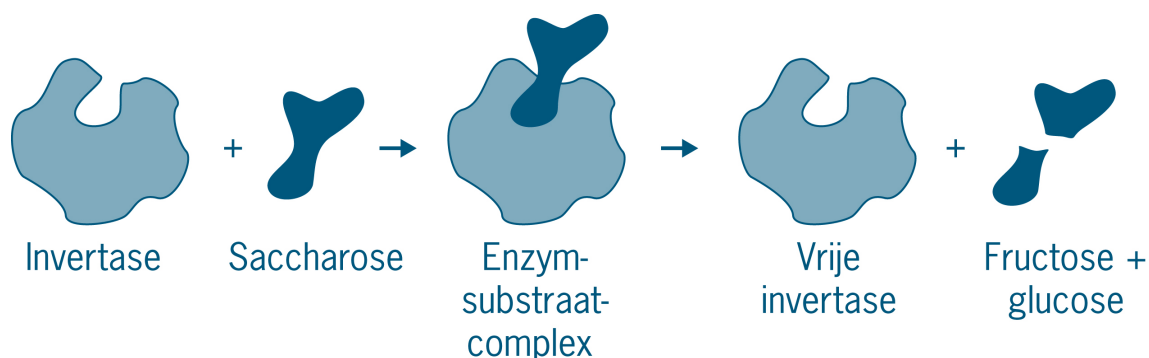
Opdracht 15

Leg uit wat een katalysator is.

Enzymatische hydrolyse.

Behalve een zuur kunnen ook bepaalde eiwitten als katalysator dienen. Bij sucrose (gewone tafelsuiker) functioneert invertase als katalysator. Invertase is een

eiwit. Eiwitten die als katalysator dienen worden enzymen genoemd. In eiwitten die als katalysator optreden wordt gesproken van enzymatische hydrolyse. In Figuur 11 is te zien hoe het enzym invertase een suikermolecuul hydrolyseert. Daarna kan het eiwit een nieuw molecuul aanpakken.



Figuur 11 Een invertase-molecuul, een enzym, bindt een sucrose aan zich, verbreekt de binding, waarna de producten vrij.

Opdracht 16

Zoek met behulp van Google naar animaties van de hydrolyse. Treftermen: animation- hydrolysis.

Opdracht 17

Waarom verloopt de hydrolyse met behulp van een enzym steeds langzamer?

Wat kun je doen om de reactie te versnellen?

Vergisting.

Tijdens de vergisting of fermentatie zetten gistcellen de glucose om in alcohol. Dit gebeurt in ieder geval als er geen zuurstof aanwezig is. Vergisting kan plaats vinden op kleine schaal maar ook op industriële schaal. Op de foto hieronder (Figuur 12) zijn enkele enorme vergistingsvaten te zien.

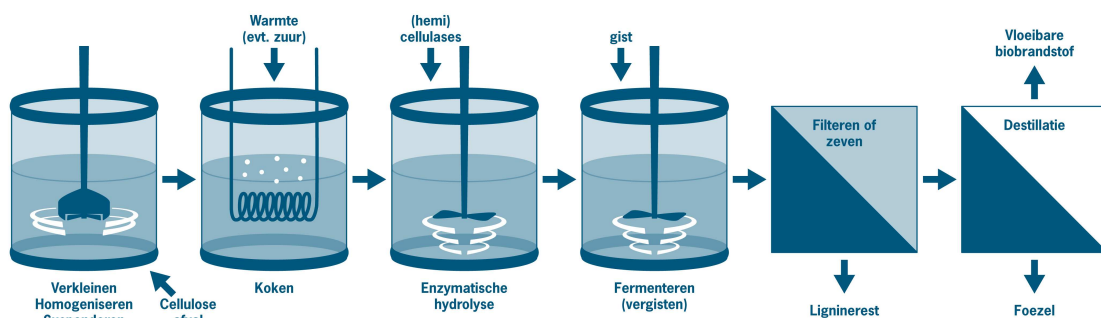


Figuur 12 Vaten voor vergisting.

Filtratie en destillatie.

Als de gistcellen hun werk hebben gedaan, resteert een mengsel van alcohol, water, gist en evt. overgebleven suikers. Om zuivere alcohol te krijgen moet het mengsel gescheiden worden. Door het mengsel door een filter te sturen, blijven alle vaste bestanddelen achter. Hier zit ook de gist bij. De vloeistof bevat dan alcohol, water en opgeloste suikers. Deze vloeistof wordt vervolgens gedestilleerd.

Wordt het totale proces in kaart gebracht dan ontstaat het volgende beeld (Figuur 13).



Figuur 13 Processchema van de productie van bio-ethanol.

In de volgende hoofdstukken wordt dieper ingegaan op de verschillende productiestappen.

4. Voorbewerking

In hoofdstuk 2 is uiteengezet dat ethanolproductie uit lignocellulose de voorkeur verdient boven de productie uit suiker- of zetmeelbevattende planten

Er zijn echter een aantal problemen:

Alcohol produceren uit suikerhoudende planten of uit maïs is bestaande technologie. Alcohol produceren uit cellulose is moeilijker.

Bij cellulose wordt de voorbewerking veel belangrijker.

Meestal is er niet alleen een mechanische bewerking nodig om de cellulose te ontsluiten maar moet er ook verhit worden en moet er zuur worden toegevoegd.

De kristallijne structuur van de cellulose maakt dat het beschikbare oppervlak waarop hydrolyse kan inwerken klein is. De hydrolyse is nodig om fermenteerbare suikers te krijgen. Verder vormen cellulose, lignine en hemicellulose samen een matrix die het beschikbare oppervlak nog verder verkleint. Lignine draagt helemaal niet bij aan de ethanolproductie en moet worden afgescheiden. Doe nu eerst de voorkennismodule behorende bij hoofdstuk 4 ►URL 1.

4.1 De eerste stappen

Mechanische bewerking

Het materiaal moet klein gemaakt worden. Dat kan gebeuren door het te versnipperen via snijden/hakselen waarbij brokjes ontstaan van enkele cm of door het te malen of fijn te stampen waarbij deeltjes ontstaan van 0,2-2 mm.

De mechanische bewerking maakt de cellulose veel toegankelijker omdat het effectieve oppervlak waarop de enzymen voor de hydrolyse kunnen aangrijpen veel groter wordt.

Het nadeel van de mechanische bewerking wordt gevormd door de hoge energiekosten. Ongeveer één derde van de totale energiekosten van de productie van ethanol uit plantaardig materiaal is nodig voor de mechanische bewerking. Er zijn ook geen technische ontwikkelingen in zicht waarmee deze energiekosten in de toekomst substantieel terug te dringen zouden zijn. Tabel 4 toont de energiekosten van enkele bewerkingen:

Tabel 4 Energiekosten van voorbereiding (Cadoche en Lopez (1989))

Materiaal	Korrelgrootte (mm)	Energie-input MJ/ton Snijmolen	Energie-input MJ/ton Hamermolen
hardhout	1.6	468	468
	2.5	288	432
	3.2	180	414
	6.4	90	342
stro	1.6	27	151
	2.5	23	104
maïsplantenresten	1.6	-	50
	3.2	72	35

Opdracht 18

Lignocellulosemateriaal moet eerst een voorbehandeling ondergaan voordat enzymatische hydrolyse mogelijk is.

a) Leg uit wat enzymatische voorbehandeling is en of er andere vormen van hydrolyse bestaan.

b) Leg uit waarom er sprake is van weinig ethanolproductie als de lignocellulose niet wordt voorbehandeld.

Een vorm van voorbereiding is het hakken en malen van de cellulose.

c) Leg uit waarom dit bijdraagt tot een grotere opbrengst van ethanol.

De volgende site geeft een overzicht van zeer veel voorbehandelingsmethoden.

d) Ga naar de site ► URL 4. Zoek het overzicht van verschillende vormen van voorbehandeling en de toelichting die daarop volgt (pag. 1627 e.v.). Vul m.b.v. de beschrijving de onderstaande tabel aan.

Proces	Categorie (nat-schei-biol)	Beschrijving (wat gebeurt er bij dit proces?)	Nadelen
malen	natuurkundig	De grondstof wordt verdeeld in kleine stukjes. Het beschikbare oppervlak waarop enzymen kunnen aangrijpen wordt sterk vergroot.	Kost veel energie om hout te verpulveren.
stoomexplosie			
Afex			
Ozone (Ozonolyse)			

Zuurgekatalyseerde hydrolyse

Geconcentreerde zuren zoals H_2SO_4 of HCl worden ook wel gebruikt om lignocellulose te behandelen, bijvoorbeeld voorafgaand aan enzymatische hydrolyse. In principe kunnen sterke zuren de cellulose zelfs meteen hydrolyseren zodat voorbehandeling en hydrolyse in één stap kunnen worden gerealiseerd. In de bestaande fabrieken waar hout werd omgezet in ethanol gebeurde dat ook op deze wijze. En ook tegenwoordig wordt zuur-hydrolyse toegepast.

Er zitten verschillende nadelen aan de zuurbehandeling:

- Het zuur tast de reactor aan (tenzij je duur en sterk staal gebruikt).
- De biomassa moet weer worden geneutraliseerd t.b.v. de eventuele latere enzymatische hydrolyse en de fermentatie. Dit kost geld en levert extra afval op.
- Het zuur levert giftige residuen op die schadelijk zijn voor de latere fermentatie. Deze moeten worden verwijderd.
- Er ontstaat een grote afvalstroom met zout.

4.2 Enzymatische hydrolyse

De zuur-hydrolyse vergt veel energie.

Procestemperaturen van honderden graden Celsius maken het erg moeilijk warmteverliezen tegen te gaan. Het is dan ook maar de vraag of de uiteindelijk geproduceerde alcohol meer energie zal opleveren dan nodig was om het te produceren.

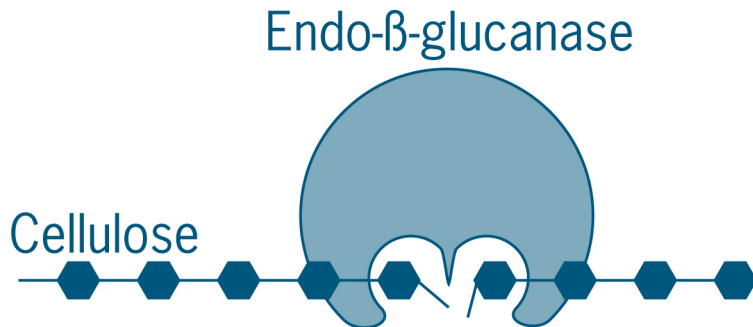
Een geheel andere methode om de hydrolyse te krijgen is die waarbij gebruik gemaakt wordt van enzymen.

Enzymen die cellulose afbreken worden cellulases genoemd. Er zijn veel micro-organismen die deze enzymen produceren. Dit zijn dezelfde heterotrofe micro-organismen die het hout in de natuur afbreken om zo aan hun voeding te komen. Sommige bacteriën en schimmels kunnen cellulases produceren.

Cellulase komt in meerdere varianten voor, elk met een eigen functie. Doorgaans wordt een drietal soorten enzymen onderscheiden:

Endo- β -glucanasen

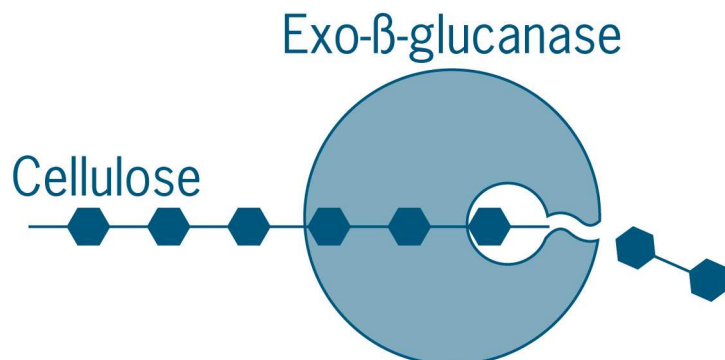
Deze enzymen breken de lange polymeren open op willekeurige plaatsen door de 1-4 binding tussen twee glucose moleculen te hydrolyseren (Figuur 14).



Figuur 14 Het enzym endo- β -glucanase knipt een cellulosepolymeer in twee stukken. Zo ontstaan er meer uiteinden waar andere enzymen op kunnen aangrijpen

Exo- β -glucanasen:

Exo- β -glucanasen zetten zich vast op de beschikbare uiteinden van de polymeerketens en knippen korte stukjes (disacchariden en oligosacchariden) af van de losse uiteinden (Figuur 15). De disacchariden worden cellobiosen genoemd. Deze combinatie van twee glucose moleculen met een β -1-4-verbinding moet goed onderscheiden worden van maltose, gevormd door een α -verbinding van twee glucose moleculen. Maltose is goed verteerbaar voor ons en ook gemakkelijk fermenteerbaar. Cellobiose is onverteerbaar voor ons en het is niet fermenteerbaar door *S. cerevisiae*.



Figuur 15 Exo- β -glucanase knipt aan de uiteinde van een celluloseketen disacchariden.

Glucosidasen

Deze enzymen knippen losse glucosecomponenten van oligosacchariden en klieven de cellobiosen (Figuur 16).

β -glucosidase

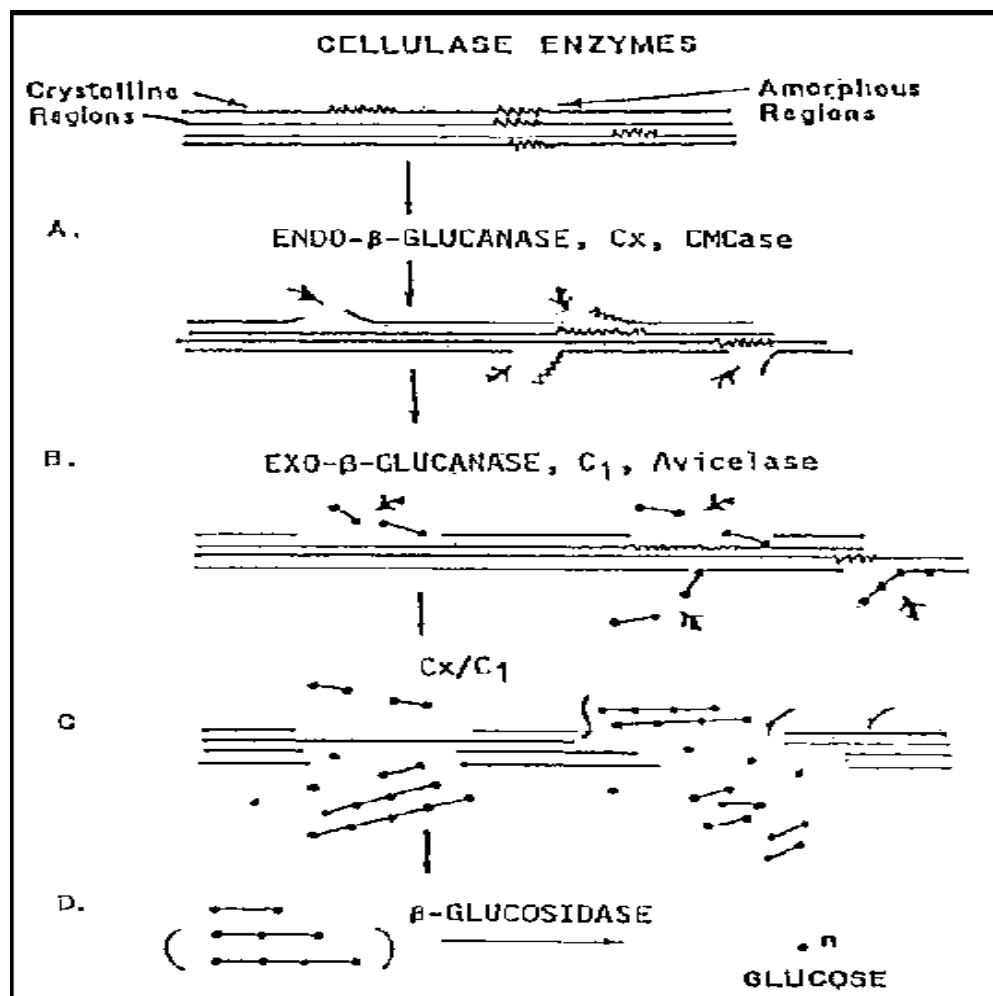


Figuur 16 Het enzym β -glucosidase knipt de disacchariden door.

De glucanases zijn grote eiwitten die bestaan uit twee functionele eenheden. Met het ene deel vindt de katalyse plaats, in dit geval dus de hydrolyse. Met het andere deel bindt het eiwit zich aan de koolwaterstofketen. Dit gedeelte wordt aangeduid als CBM (van het Engelse Carbohydrate-Binding Module)

Het is duidelijk dat de exoglucanases sneller hun werk kunnen doen als er door de endoglucanases meer losse uiteinden zijn gecreëerd.

Één en ander is zichtbaar gemaakt in Figuur 17.



Figuur 17 De werking van enzymen bij de afbraak van cellulose tot glucose.

Ook voor hemicellulose bestaan vergelijkbare enzymcomplexen. De zaak ligt hier ingewikkelder want er is nu sprake van meerdere suikers die op verschillende manieren aan elkaar verbonden zijn.

Enzymatische hydrolyse vindt vaak op industriële schaal plaats maar nog nergens voor productie van bioethanol.

Wel ontstaan er in hoog tempo allerlei proefinstallaties en wordt volop onderzoek verricht.

Een aantal problemen doen zich voor bij de enzymatische hydrolyse:

- Lignine en hemicellulose omringen de cellulose zodat het beschikbare oppervlak voor de glucanasen om zich te binden gering is.
- Enzymremmende werking van de producten glucose en cellobiose: Teveel glucose remt de werking van de β -glucosidasen. Daardoor stagneert de omzetting van de cellobiosen. Dit belemmert weer de exo- β -glucanasen. Een oplossing moet worden gezocht in een vroege onttrekking van de glucose moleculen aan de oplossing.
- De exo- β -glucanasen moeten zich binden aan de celluloseketen om de uiteinden er af te kunnen breken. Soms binden deze eiwitten zich op de verkeerde plaats. Ze zijn dan improductief maar hinderen ook de endoglucanasen.
- De enzymen kunnen zich ook hechten aan lignine-deeltjes en worden daardoor improductief.
- Enzymen kunnen gemakkelijk beschadigd raken door thermische of chemische activiteit.

Ondanks de gesignaleerde problemen wordt er veel verwacht van deze vorm van hydrolyse. Onderzoek over een breed terrein vindt plaats om efficiënte vormen van enzymatische hydrolyse te ontwikkelen.

De belangrijkste pogingen richten zich op:

- Het ontwikkelen van bioraffinaderijen voor EFC (Ethanol-from Cellulose) waarbij enzymen on-site worden geproduceerd.
- Het zoeken naar micro-organismen middels genetische modificatie die enzymen voor zowel de cellulose als de hemicellulose produceren;.
- Het ontwikkelen van genetische gemodificeerde micro-organismen die zowel de hydrolyse-enzymen produceren als het fermentatieproces verzorgen. In dat geval wordt meteen het probleem opgelost van de hydrolyse-remmende werking van de glucose moleculen.

Opdracht 19

Voor de hydrolyse van cellulose zijn verschillende enzymen nodig.

a) Welke enzymen zijn dit?

Het volgende gedachtenexperiment wordt uitgevoerd:
Drie bioreactoren met cellulosesubstraat worden

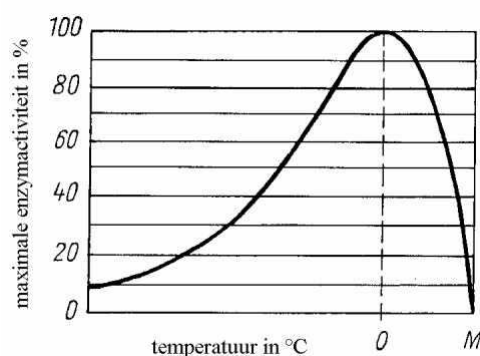
achtereenvolgens aan drie enzymen blootgesteld. De overige omstandigheden worden constant gehouden (waarom?). Na elke bewerking wordt het substraat weer enzymvrij opgeleverd. De volgorde waarin de enzymen worden toegevoerd wordt daarbij gevarieerd. Hieronder staat in Tabel 5 de volgorde:

Tabel 5 De volgorde van toevoegen van de enzymen		
Bioreactor 1	Bioreactor 2	Bioreactor 3
Exo- β -glucanase	Endo- β -glucanase	glucosidase
Endo- β -glucanase	Exo- β -glucanase	Endo- β -glucanase
glucosidase	glucosidase	Exo- β -glucanase

- b) In een reactor zal vrijwel geen glucose worden geproduceerd. Welke reactor is dat?
- c) In welke reactor zal de meeste glucose worden gevormd? Leg uit waarom.

De werkzaamheid van een enzym hangt af van de temperatuur.

Hieronder is dat in Figuur 18 weergegeven:



Figuur 18 De enzymactiviteit als functie van de temperatuur.

- d) Leg uit waarom de enzymactiviteit aanvankelijk toeneemt als de temperatuur oploopt.
- e) Leg uit dat vanaf zekere temperatuur de enzymactiviteit afneemt.

Hieronder staat in Tabel 6 voor een aantal enzymen een aantal kenmerkende parameters.

Tabel 6 Overzicht van enzymen met hun kenmerken.

Enzymen	Optimale temperatuur [°C]	Optimale pH	Inactiverings-temperatuur [°C]	Gemiddelde temperatuur [°C]
Cellobiase	< 20	4.5-5.0	> 20	37-38
Maltase	35-40	5.3	> 70	
Laminaribiase	37	5.0	> 55	
Lipase	35-40	6.8	> 50	
Exo-beta-glucanase	< 40	4.5	> 40	
Arabinosidase	40	4.5-4.7	> 60	
R-enzym	40	5.3	> 70	
Endo-β-glucanase	40-45	4.5-4.8	> 55	45
Aminopeptidase	40-45	7.2	> 50	
Exo-xylanase	45	5.0	> 50	
Endo-xylanase	45	5.0	> 50	
Dipeptidase	40-45	7.8-8.2	> 50	
Saccharase	50	5.5	55	52
Fosfatase	52	4.5-5.0	70	
Endopeptidase	50-60	5.0-5.2	> 80	
Carboxypeptidase	50-60	5.2	> 70	
β-grensdextrinase	55-60	5.1	> 65	62
β-amylase	60-65	5.4-5.6	70	
α-amylase	70-75	5.6-5.8	80	72

- f) Leg uit waarom toevoeging van een mengsel van de benodigde enzymen aan een cellulosesubstraat met de kenmerken die in Tabel 6 worden genoemd niet tot een maximaal resultaat leidt.
- g) Leg uit wat jij de producent zou adviseren om de productie van glucose op te voeren.

Enzymactiviteit

Enzymactiviteit hangt af van de temperatuur. Als de temperatuur te hoog wordt denatureren de proteïnen. Door de thermische beweging van de moleculen in het substraat raken er altijd wel een paar proteïnen beschadigd. Dit wil zeggen dat de zwakke krachten die de proteïne zijn specifieke vorm geven niet langer stand houden. Als de temperatuur stijgt, versnelt dit proces. Hieronder onderzoeken we dit proces mbv een dynamisch model.

Noemen we het aantal enzymmoleculen N dan gaan er in een periode Δt een aantal moleculen verloren door dit proces van denaturatie. We noemen deze afname: ΔN . ΔN is dus negatief.

Voor berekeningen is het lastig dat N verandert in de periode Δt . Daarom wordt de periode zo klein genomen dat N (en ook de andere grootheden die invloed hebben op de afname) niet merkbaar veranderen. In dat geval spreken we van een afname dN in een periode dt .

Er geldt:

$dN \sim dt$ (Hoe meer tijd, hoe meer moleculen in die periode zullen bezwijken)
 $dN \sim N$ (2x zoveel moleculen dan ook 2x zoveel afname)

dus $dN = -k * N * dt$ (1)

Hierin is de evenredigheidsfactor k een constante die iets zegt over de afnamesnelheid. Deze factor hangt af van temperatuur en andere omgevingsfactoren zoals de pH etc, etc.. Maar niet van N .

Om een idee te krijgen van de grootte van k kun je bijvoorbeeld de vraag stellen: Na hoeveel tijd zou de populatie met 10% zijn afgenomen? En in hoeveel tijd is de hoeveelheid enzymen gehalveerd? We spreken dan van de halfwaardetijd van de enzymen.

Neem eens aan dat voor een bepaalde cellulase bij een bepaalde temperatuur de halfwaardetijd 2 uur is. Hoe groot is dan de karakteristieke grootte k ?

Om hier achter te komen kunnen we gebruik maken van Excel.

Daarbij hanteren we een dynamisch model.

We beginnen met een willekeurige waarde voor de constante k . Bijvoorbeeld $k = 0,001 \text{ s}^{-1}$. Dit houdt in dat geldt:

$$dN = -k * N * dt = -0,001 (\text{s}^{-1}) * N * 1 (\text{s})$$

en dat zou betekenen dat na een seconde 1 promille van de enzymen verdwenen is. Wat zou de halfwaardetijd van dit enzym zijn bij deze temperatuur?

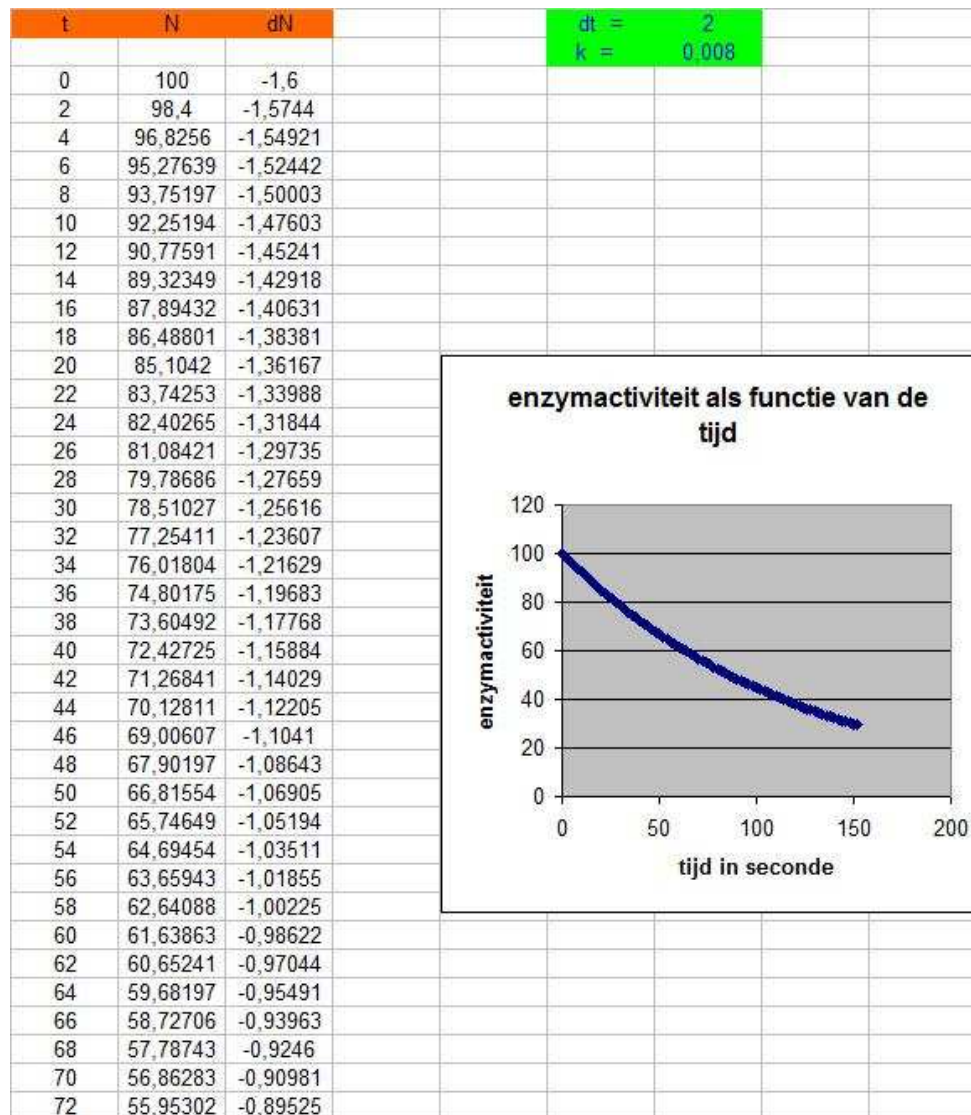
We starten met een beginhoeveelheid 100 en gaan kijken hoelang het duurt voordat de waarde is afgenomen tot 50. Het rekenproces ziet er als volgt uit:

Kies een startwaarde van t , meestal:	t wordt 0 of $t := 0$
Kies een startwaarde van N :	bijvoorbeeld $N := 100$
Kies een tijdstap:	bijvoorbeeld $dt := 2 \text{ s}$
Kies een factor k :	stel $k := 0,008$

Nu start het berekenen

Stap 1:	Bereken nu dN	$dN := -0,008 * 100 * 2 = 1,6$
Stap 2	Bereken de nieuwe waarde van N	$N := N + dN = 100 - 1,6 = 98,4$
Stap 3	Bereken de nieuwe waarde van t	$t := t + dt = 0 + 2 = 2 \text{ s}$
Stap 4	Ga weer naar stap 1	
Etc.		

Met Excel is dit eenvoudig te doen. Vervolgens kan men de grafiek tekenen van N tegen t. Hieronder is een plaatje van een Excelbestand weergegeven. De getoonde waarden zijn berekend op de wijze zoals boven geschetst.



Figuur 19 In Excel kan de inhoud van een cel worden berekend met de inhoud van een andere cel. Bij stap 1 in de figuur hieronder is de inhoud van cel C2 berekend met: $C2 = F52*B2*F51$. Door de cel C2 te kopiëren naar C3 ontstaat daar $C3 = F52*B3*F51$. De dollartekens voorkomen dat bij kopiëren ook hier naar een andere cel wordt verwezen.

Het voordeel van het werken met dit soort modellen is dat je door middel van “trial and error” de waarde van k kunt vinden die past bij een halveringstijd van bijvoorbeeld 2 uur. Hier vinden we een halveringstijd van minder dan 100 s. De temperatuur is blijkbaar erg hoog.

Opdracht 20

Zoek mbv Excel uit welke waarde k moet hebben voor een halveringstijd van 2 uur.

Varieer ook de tijdstap. Hoe kleiner die is hoe nauwkeuriger de resultaten maar er is ook een nadeel aan verbonden.

Opdracht 21

Herhaal de vorige opdracht maar gebruik nu het programma Coach. Als je daar nog niet mee hebt gewerkt moet je eerst de inleidende opdracht van Coach doen.

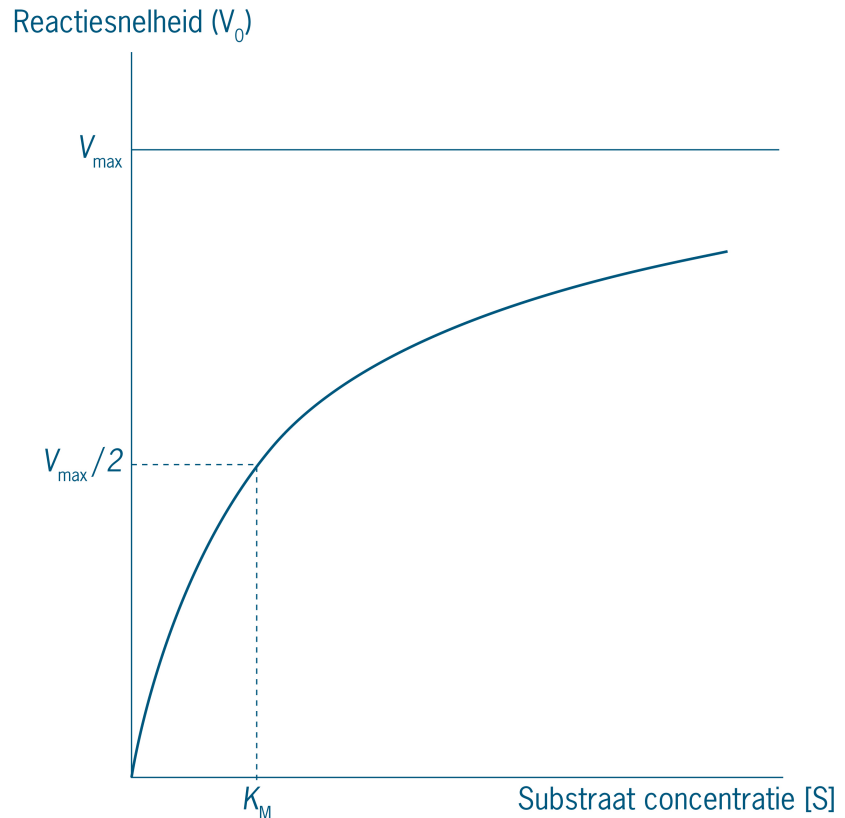
Enzymkinetiek

In iedere levende cel vinden vele reacties plaats die er voor zorgen dat de cel in leven blijft en zichzelf kan vermeerderen. In de cel heersen relatief milde omstandigheden, te weten een neutraal waterig milieu en een temperatuur en druk die niet veel afwijken van die van de omgeving. Het zijn in ieder geval omstandigheden waarbij de meeste van deze reacties in de cel nauwelijks plaatsvinden. Toch verlopen ze in het algemeen heel snel, omdat ze vrijwel allemaal gekatalyseerd worden door een reactiespecifiek enzym. Enzymen zijn eiwitten en worden wel de katalysatoren van het leven genoemd, oftewel biokatalysatoren. Zonder deze enzymen zouden de meeste van deze reacties nauwelijks plaatsvinden in de cel.

Enzymen kunnen ook buiten de cel hun werk verrichten. Sommige enzymen die door de cel gemaakt worden, zijn daarvoor juist bedoeld en worden door de cel uitgescheiden, bijvoorbeeld om voedingsstoffen uit natuurlijke polymeren vrij te maken. Zo scheiden sommige schimmels cellulasen uit die cellulose in rottend hout afbreken tot glucose dat door de cellen opgenomen en verteerd (gemetaboliseerd) kan worden. Enzymen kunnen buiten de cel ook de vorming katalyseren van een groot aantal commercieel interessante stoffen die op andere manieren lastig te maken zijn. Er bestaat daarom grote belangstelling voor enzymen als industriële katalysator. Dit is te meer omdat door de recombinant-DNA technologie de beschikbaarheid van enzymen enorm is toegenomen. Als het gen dat codeert voor een gewenst enzym nog niet beschikbaar is, kan het gemaakt of geïsoleerd worden en vervolgens in een productieorganisme, bijvoorbeeld *E.coli* (een bacterie die ook onze darmflora zit) of een gist, gekloneerd worden. Met het genetisch gemodificeerde organisme kan dan op conventionele wijze het betreffende enzym op grote schaal in de gewenste zuiverheid geproduceerd worden. Zo worden al tientallen jaren enzymen geproduceerd voor gebruik in wasmiddelen, als

bakkerijgrondstof, bij de productie van frisdranken, wijn, antibiotica, enz.

Voor efficiënt gebruik als industriële biokatalysator is het gewenst dat het betreffende enzym goed gekarakteriseerd is, dat wil zeggen dat men goed moet weten hoe het enzym werkt, dus ook hoe snel het enzym katalyseert, met andere woorden wat de enzymactiviteit is (Oefening "Omrekenen"). De enzymactiviteit is de snelheid (V) waarmee het enzym de uitgangsstof(fen), bij enzymreacties noemt men dat substraat (S), omzet in product (P) of producten. Al meer dan eeuw wordt onderzoek verricht aan enzymkinetiek, dat is de beschrijving van chemische reactiesnelheden onder invloed van enzymen. Alle chemische reacties zijn evenwichtsreacties, waarbij de omstandigheden bepalen of het evenwicht meer aan de kant van de reactant(en) of (het) product(en) ligt. Enzymen zijn gewone chemische verbindingen - weliswaar macromoleculen - en dat betekent dat zij zich ook zo gedragen, ook als katalysator. Enzymen, zoals alle andere katalysatoren, veranderen dus niets aan de evenwichtsligging, ze verhogen alleen de snelheid waarmee het evenwicht wordt ingesteld. Toch vertoont enzymkinetiek een eigen karakter omdat het mechanisme van de katalyse anders en complexer is dan van de meeste gewone chemische katalysatoren. Enzymkatalyse wordt gekenmerkt door het verschijnsel substraatverzadiging. Wanneer we de enzymgekatalyseerde reactiesnelheid V uitzet als een functie van de substraatconcentratie $[S]$ dan krijgen we in het eenvoudigste geval onderstaande Figuur 20, de zogenaamde Michaelis-Menten curve.



Figuur 20 . Enzymkinetiek volgens Michaelis en Menten.

We zien dat V bij relatief hoge $[S]$ nauwelijks nog toeneemt en dat asymptotisch een maximale reactiesnelheid benaderd wordt, de substraatverzadigingswaarde $V_{\max}$. V is dan nagenoeg nulde orde met betrekking tot $[S]$, dat wil zeggen onafhankelijk van $[S]$:

$$V - \text{constant} = V_{\max} \quad (2)$$

Dat betekent dus wanneer je in een kolfje een oplossing hebt met een relatief hoge substraatconcentratie en je voegt enzym toe, dat het enzym in het begin nagenoeg met de snelheid $V_{\max}$ werkt. Hoe meer substraat echter is omgezet, hoe kleiner V wordt. In Figuur 20 lopen we de asymptotische curve van rechts naar links af (ga dit bij jezelf na).

Bij relatief lage $[S]$ neemt V bijna rechtevenredig toe met $[S]$, d.w.z. V is nagenoeg eerste orde met betrekking tot $[S]$:

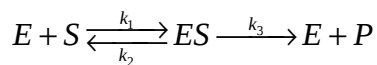
$$V = \text{constante} \cdot [S] \quad (3)$$

In het tussenliggende gebied vlakt de snelheidstoename steeds verder af en is er sprake van een reactieorde tussen nul en één. De hele curve kan beschreven worden met de volgende vergelijking:

$$V = \frac{V_{\max} * [S]}{K_M + [S]} \quad (4)$$

Dit wordt de Michealis-Menten vergelijking genoemd en K_M de Michaelis-Menten constante, omdat twee onderzoekers, Leonor Michaelis en Maud Menten, deze vergelijking theoretisch afgeleid hebben. Uitgaande van het kenmerkende verschijnsel van substraatverzadiging hebben ze in 1913 een theorie opgesteld die nog altijd het uitgangspunt vormt voor kwantitatieve analyse van vele aspecten van enzymkinetiek, ook voor meer complexe vormen van enzymkinetiek.

Volgens hun theorie is in het eenvoudigste geval de eerste stap bij enzymkatalyse binding van substraat S aan vrij enzym E onder vorming van een enzymsubstraatcomplex ES, gevolgd door uiteenvallen van dit complex in vrij enzym en product P. Beide stappen zijn evenwichtsreacties, maar in veel gevallen ligt het evenwicht van de tweede stap ver naar rechts, waardoor de reactievergelijking vereenvoudigt tot:



De k 's zijn de specifieke reactiesnelheidsconstanten en zijn de maat voor de katalytische kracht van een enzym. Met behulp van de gebruikelijke principes uit de chemische reactiekinetiek kan hieruit de Michaelis-Menten vergelijking (4) afgeleid worden waarbij

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (5)$$

en

$$V_{\max} = k_3 * [E_T] \quad (6)$$

met $[E_T]$ de totale enzymconcentratie, oftewel de som van de vrije en complexgebonden enzymconcentratie:

$$[E_T] = [E] + [ES] \quad (7)$$

Bij nadere inspectie van de MM-vergelijking zien we dat K_M eenheden moet hebben gelijk aan die van substraatconcentratie $[S]$, dus kg m^{-3} of mol m^{-3} , als we de aanbevolen SI-eenheden gebruiken. Als de substraatconcentratie $[S]$ gelijk is aan K_M en dit in

vergelijking (4) substitueren dan rolt eruit dat $V = \frac{1}{2} V_{\max}$! Dat wil dus zeggen dat K_M de numerieke waarde heeft die gelijk is aan de substraatconcentratie waarbij de omzettingssnelheid gelijk is aan $\frac{1}{2} V_{\max}$ (zie Figuur 20).

Opdracht 22

De officiële SI-eenheid voor enzymactiviteit is de katal. Eén katal is de hoeveelheid enzym die de omzetting katalyseert van 1 mol substraat per seconde. De specifieke activiteit van een enzym kan dus uitgedrukt worden in katal per kg (enzym)eiwit, maar deze eenheid wordt niet vaak gebruikt. In biochemisch onderzoek wordt enzymactiviteit meestal uitgedrukt in eenheden (units). Eén eenheid (1 U) enzymactiviteit is de hoeveelheid enzym die nodig is om 1 μmol substraat per minuut om te zetten. De specifieke activiteit van een enzym wordt meestal gegeven in $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ en de enzymconcentratie in mg ml^{-1} . Bioprocestechnologen rekenen het liefst met kg, m, s, enz. Bereken $V_{\max}$ in deze eenheden als gegeven is dat de totale enzymconcentratie in een bioreactor 10 mg ml^{-1} is en $k_3 = 1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$.

Wanneer $[S] \gg K_M$ (vuistregel: $[S] > 5 K_M$) dan kunnen we K_M onder de deelstreep in de MM-vergelijking verwaarlozen ten opzichte van $[S]$ en kan vergelijking (4) tot vergelijking (2) vereenvoudigd worden, d.w.z. $V \approx V_{\max}$. Dit gegeven wordt vaak gebruikt om een snelle eerste schatting van reactiesnelheden te maken.

Opdracht 23

In het novemberdecembernummer, jaargang 2007, van het tijdschrift *Biocatalysis and Biotransformation* (25(6): 419-429) beschrijven Drissen c.s. een model voor de glucoseproductie uit verschillende cellulosesubstraten (filterpapier en tarwestro) met behulp van een commercieel cellulasecomplex, dat meerdere enzymen bevat. Samengevat nemen ze het volgende vereenvoudigde reactiemechanisme aan:

cellulose $\rightarrow$ cellobiose
cellobiose $\rightarrow$ glucose
cellulose $\rightarrow$ glucose

Cellulose wordt dus direct of via cellobiose tot glucose omgezet door het cellulasecomplex. We hebben al gezien dat cellobiose bestaat uit twee aan elkaar gekoppelde glucosemoleculen. Het enzym β -glucosidase, ook wel cellobiase genoemd, katalyseert de hydrolyse van cellobiose tot glucose. Drissen c.s. hebben gemeten dat de maximale cellobiaseactiviteit van het complex 204 U

ml^{-1} is waarbij 1 U per minuut 1 μmol glucose uit 0.5 μmol cellobiose vrijmaakt.

De vraag is nu hoe lang het duurt voordat 90% van de cellobiose is omgezet in een oplossing waarin 34.2 kg cellobiose per m^3 zit. In 1 m^3 zit 1 liter van het enzymcomplex en we veronderstellen dat de concentratie substraat ook na 90% omzetting nog altijd minimaal 5 keer K_M is.

Als $[S] \ll K_M$ dan kunnen we de MM-vergelijking vereenvoudigen tot vergelijking (3) waarbij

$$C = \frac{V_{\max}}{K_M} \quad (8)$$

Met C een constante. Het rekenwerk wordt daardoor eenvoudiger en in de praktijk maken we hier gebruik van als $[S] < 0.2 K_M$ en we weer een snelle, minder nauwkeurige eerste schatting willen maken. De Oefening “Melk: de witte motor!” is hier een voorbeeld van.

In veel gevallen beschrijft de Michaelis-Menten vergelijking enzymatische reactiesnelheden voldoende nauwkeurig om er mee te mogen rekenen bij het ontwerpen van bioreactoren. In de industrie worden de meeste reacties, ook enzymgekatalyseerde, uitgevoerd in batchreactoren. Een enzymbatchreactor is een vat waarin substraat in een waterig medium is opgelost en waaraan op tijdstip nul enzym wordt toegevoegd om de reactie te starten. Het vat wordt meestal geroerd om substraat en enzym goed te kunnen mengen en in verband met pH- en temperatuurcontrole. De verandering in substraatconcentratie in het vat als functie van de tijd na toevoegen van enzym kan wiskundig beschreven worden als:

$$\frac{d[S]}{dt} = r_s = -v \quad (9)$$

De linker term staat voor de verandering van de substraatconcentratie in de tijd en is per definitie gelijk aan r_s , gedefinieerd als de volumetrische productiesnelheid van substraat in kg of mol per volume-eenheid (m^3) per tijdseenheid (s^{-1}). Deze is hier gelijk aan $-V$ omdat substraat niet geproduceerd maar omgezet wordt (negatieve productie). Het eenvoudigste geval krijgen we bij substraatverzadiging (nulde orde kinetiek) waarbij $V = V_{\max}$ (in de cellobiose hydrolyse oefening wordt dit gebruikt). Als we dit in vergelijking (9)

substitueren, de variabelen scheiden ($dS = V_{\max} \cdot dt$) en integreren van 0 naar t , dan krijgen we:

$$\int_{[S(0)]}^{[S(t)]} d[S] = -V_{\max} \int_0^t dt \quad (10)$$

oftewel

$$[S(0)] - [S(t)] = V_{\max} \cdot t \quad (11)$$

Voor het geval dat de substraatconcentratie $[S]$ de hele tijd kleiner is dan $0.2 K_M$ kunnen we in vergelijking (9) $V = \{V_{\max} \cdot [S] / K_M\}$ substitueren. Scheiding van variabelen en integreren van 0 naar t levert nu:

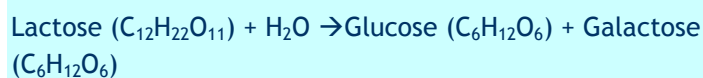
$$\int_{[S(0)]}^{[S(t)]} \frac{d[S]}{[S]} = -\frac{V_{\max}}{K_M} \int_0^t dt \quad (12)$$

oftewel

$$\ln[S(0)] - \ln[S(t)] = \frac{V_{\max}}{K_M} t \quad (13)$$

Opdracht 24

Joris Driepinter rijdt de hele dag op drie glazen melk en dat moeten we zo houden. De prijs van melk stijgt sterk, onder meer doordat gewassen die tot nu toe vooral gebruikt werden in de levensmiddelen- en veevoerindustrie, nu ook gebruikt gaan worden voor productie van biobrandstoffen, zoals we al zagen. In derdewereldlanden vormt niet alleen de prijs een probleem voor het drinken van melk. Veel mensen in Afrika en Azië zijn lactose-intolerant. Ze worden ziek als ze melk drinken. Dat komt omdat ze lactose, melksuiker, niet kunnen verdragen. Evenals cellobiose is lactose een disaccharide, alleen zijn het in dit geval niet 2 glucosemoleculen die aan elkaar gekoppeld zijn, maar een glucose- en een galactosemolecuul. Het enzym β -galactosidase, ook wel lactase genoemd, katalyseert de hydrolyse van lactose:



Stel dat melk 25 gram lactose per liter bevat en dat we net voordat in de melkfabriek de literpakken dichtgaan 1

mg lactase toevoegen. Na 1 dag koopt een lactose-intolerante persoon zo'n pak en drinkt direct een glas ervan. We weten dat er maximaal 1 gram per liter in mag zitten, dat de maximale omzettingssnelheid van lactase 15 mol lactose per kg enzym per seconde is (bij koelkasttemperatuur) en dat $K_M = 0.4 \text{ M}$. Krijgt de persoon last?

In veel gevallen zullen we toch te maken hebben met substraatconcentraties van om en de nabij K_M en kunnen we niet om de MM-vergelijking heen. Substitutie van vergelijking (4) in vergelijking (9), scheiding van variabelen en integratie van 0 naar t levert nu:

$$\int_{[S(0)]}^{[S(t)]} \frac{(K_M + [S])d[S]}{[S]} = -V_{\max} \int_0^t dt \quad (14)$$

oftewel

$$\ln(S(0)) - \ln[S(t)] + \frac{[S(0)] - [S(t)]}{K_M} = \frac{V_{\max}}{K_M} t \quad (15)$$

Als we hier goed naar kijken en vergelijken met vergelijkingen (11) en (13) dan zien we dat het eigenlijk een optelsom is van nulde en eerste orde reacties.

Opdracht 25

Sucrose is wat we in de volksmond gewoon suiker noemen en is afkomstig uit bieten of rietsuikerplanten. Sucrose bestaat uit een glucosemolecuul gekoppeld aan een fructosemolecuul en is dus net als cellobiose en lactose een disacharide. De hydrolyse van sucrose

$\{[\alpha]_D^{20} = +66.5^\circ\}$ tot D-glucose $\{[\alpha]_D^{20} = +52.5^\circ\}$ en D-fructose $\{[\alpha]_D^{20} = -92^\circ\}$ wordt vaak inversie genoemd

omdat het vergezeld gaat van een netto verandering in optische draaiing van dextro (rechtsdraaiend) naar levo (linksdraaiend) doordat glucose en fructose in equimolaire hoeveelheden gevormd worden. Het gevormde mengsel wordt daarom ook vaak invertsuiker genoemd. De hydrolyse van sucrose kan gekatalyseerd worden door zuur of door het enzym invertase en deze omzetting kan dus in een polarimeter, een apparaat dat de optische draaiing meet, gevolgd worden. Fructose (vruchtensuiker) is zoeter dan glucose en sucrose, en invertsuiker is dus ook zoeter, zij het uiteraard minder

dan fructose. Het wordt in de industrie onder meer gebruikt om wijn te verbeteren en bij de champagne- en likeurbereiding. Ook wordt invertsuiker gebruikt als honingvervanger omdat honing grotendeels dezelfde suikerverhouding bevat.

We kopen een commercieel invertasepoeder en voegen 1 gram aan 0.1 m^3 suikeroplossing (100 kg suiker per m^3) toe. De K_M van invertase is 0.1 M . De concentratie van suiker is na precies een dag 10 kg m^{-3} . Bereken de maximale specifieke enzymactiviteit in kg substraat per kg enzym per seconde.

5. Vergisting

Al sinds het begin van zijn geschiedenis gebruikt de mens vergistingsprocessen bij de bereiding van voedsel en drank. Het zou kunnen dat je dit al hebt geleerd binnen het vak biologie. Kijk of je kennis up-to-date is via de voorkennis module (► URL 1).

5.1 Klassieke biotechnologie

Het gebruik van vergisting is een typisch voorbeeld van de klassieke biotechnologie. Het bestaan van gistcellen is pas bekend geworden door het werk van onderzoekers in de 19e eeuw. Louis Pasteur is de meest bekende onderzoeker die studie heeft gemaakt van micro-organismen. Tegenwoordig zijn er complete industrieën die gistcellen kweken m.b.v. biotechnologie. Dagelijks worden er vele tonnen gist geproduceerd ten behoeve van bakkers en brouwerijen.

Opdracht 26

- Zoek op wat verstaan wordt onder biotechnologie.
- Noem drie voorbeelden van klassieke biotechnologie.
- Geef aan waarin de moderne biotechnologie verschilt van de klassieke biotechnologie en geef hiervan een voorbeeld.
- Zoek via internet een Nederlands bedrijf op dat gist produceert.
- Zoek via internet op welke bedrijven, behalve bakkerijen en brouwerijen, voor hun productie gist nodig hebben.

Opdracht 27 experiment

Hoeveel gistcellen zitten er in een kg droge bakkersgist? Aangezien een gistcel verschrikkelijk klein is, zullen het er wel veel zijn.

Voor het tellen is een microscoop nodig.

Meng 1 gram gist met 100 ml water. Neem van dit mengsel een druppel en bekijk dit onder de microscoop. Maak een tekening van wat je ziet.

Bedenk een methode om tot een schatting te komen van het aantal gistcellen in een gram gist.

Beschrijf de methode in een aantal stappen en leg bij elke stap uit welke berekeningen nodig zijn.

Voer je methode uit.

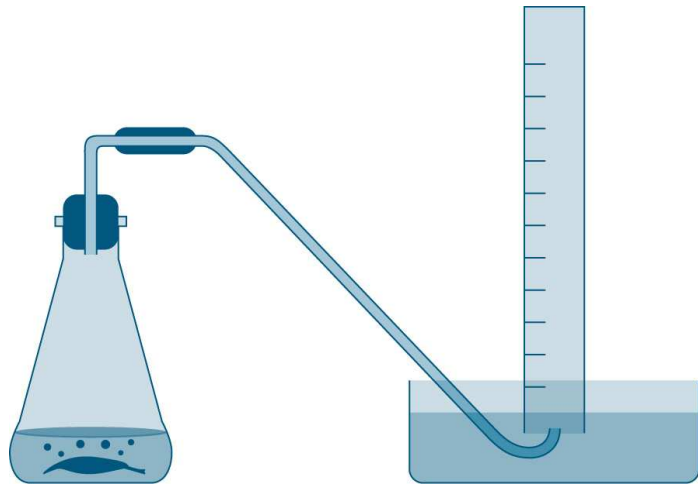
(Voor je berekeningen mag je gebruik maken van het gegeven dat er 20 druppels in 1 ml gaan.)

Het eerste gebruik van gistcellen

Het maken van wijn is waarschijnlijk de oudste vorm van biotechnologie. Wijn is gemakkelijk te maken omdat in vruchtensap vaak al spontaan alcohol ontstaat. Gistcellen komen overal voor en er zitten er altijd wel een paar op een ongewassen vrucht. Misschien ontdekte men bij toeval dat de drank die bij de vergisting ontstond, langer houdbaar was dan vruchtensap. Voor jager-verzamelaars moet dat een geweldige ontdekking zijn geweest. Tegenwoordig is de wijnindustrie een wetenschappelijk geavanceerde bedrijfstak waar niet wordt vertrouwd op wilde gistcellen. Er wordt veel research gepleegd.

Opdracht 28 Experiment:

Om na te gaan of wilde gistcellen ook in de natuur voorkomen, kan het volgende experiment worden uitgevoerd.



Figuur 21 Opstelling voor experiment 28.

Er worden twee van deze opstellingen gemaakt. In de ene erlenmeyer wordt druivensap uit een pak gedaan. In een tweede gaat ook druivensap maar je doet er ook een ongewassen vruchtje, een spruitje of wat blaadjes in. De opstelling blijft een paar dagen staan. Eén van de volgende drie mogelijkheden zal zich nu voordoen.

- In beide vaten treedt geen vergisting op.
- In beide vaten treedt vergisting op.
- In één vat treedt vergisting op.

Je kunt voordat je aan het experiment begint al nagaan welke conclusies je aan elk van de uitkomsten zou moeten verbinden.

- a) Leg uit hoe m.b.v. dit experiment kan worden nagegaan of er sprake is van vergisting.
- b) Leg bij elke mogelijkheid uit welke conclusies er aan moeten worden verbonden.

c) Leg uit waarom er wel met schone spullen moet worden gewerkt.

Voer het experiment uit en noteer de waarnemingen. Bekijk een druppel uit beide erlenmeyers en teken wat je ziet.

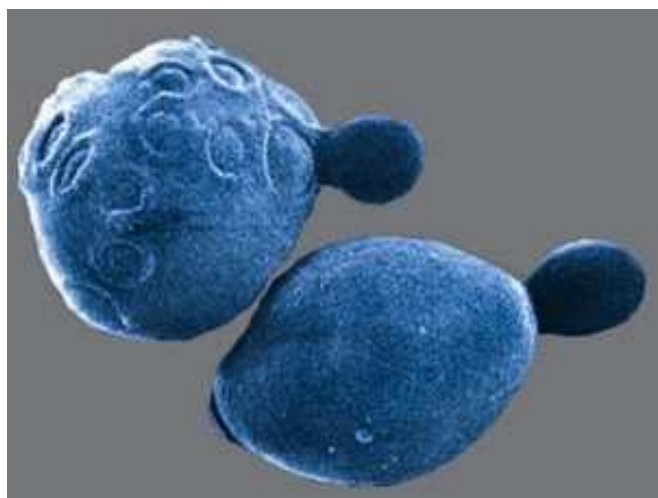
5.2 De gistcel

Het bekendste micro-organisme dat in staat is glucose om te zetten in ethanol, is verkrijgbaar in de supermarkt. Het is waarschijnlijk het enige levende wezen dat in een doodgewone verpakking te koop wordt aangeboden en tussen de suiker en de bloem staat. De officiële naam luidt *Saccharomyces cerevisiae* maar deze eencellige staat beter bekend als bakkersgist. Het is een van de meest onderzochte levende wezens en het wordt op industriële schaal geproduceerd.

De gistcel is een heterotroof organisme. Dit houdt in dat de cel voor zijn bestaan afhankelijk is van andere levende wezens. Dit in tegenstelling tot autotrofe organismen. Die zijn in staat om uit niet-organische stoffen de complexe moleculen van het leven te maken. Planten zijn autotroof. Uit water, CO₂ en mineralen vormen planten met behulp van zonlicht organische stoffen. Één van de stoffen die daarbij worden geproduceerd, is glucose waaruit vervolgens andere stoffen worden opgebouwd. De gistcel heeft glucose nodig als voeding.

Cellen

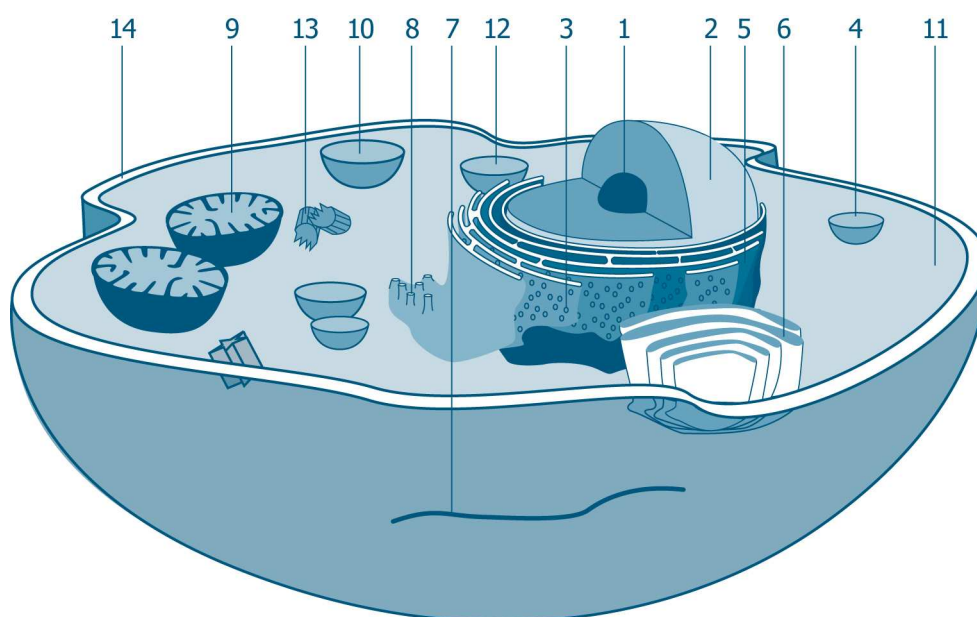
Leven op aarde is altijd georganiseerd in cellen. Cellen vertonen allemaal globaal dezelfde opbouw. Gistcellen zijn afgebeeld in Figuur 22.



Figuur 22 *Saccharomyces cerevisiae*

Na de ontdekking van de cel door Robert Hooke in 1665 groeide langzaam het inzicht dat alle leven, in ieder Food or Fuel?

geval op aarde, georganiseerd is in cellen. Afgesloten van de omgeving door een celmembraan dat bescherming biedt tegen chemische activiteiten in de buitenwereld, spelen zich bijzondere scheikundige processen af. De overeenkomsten op celniveau zijn verbijsterend. Paarden hebben meer gemeen met een paardenbloem dan doorgaans wordt aangenomen. Dat geldt voor de opbouw van de cellen en het geldt voor de chemische processen binnen de cel. En voor gistcellen is dat niet anders. Gistcellen zijn goed te beschrijven m.b.v. Figuur 23.



Figuur 23 De opbouw van een cel.

De kern bevat het DNA dat de genetische code bevat waarmee de gistcel eigenschappen doorgeeft aan dochtercellen.

De cel wordt omgeven door een celwand, die de ingewikkelde scheikundige processen die zich binnen de cel afspelen, beschermt tegen chemisch actieve stoffen buiten de cel.

Het cytosol is de vloeistof waarmee de cel gevuld is. Hierin spelen zich ook belangrijke processen af. De belangrijkste is ongetwijfeld de glycolyse: het proces waarbij glucose wordt omgezet in alcohol. In het cytosol zweven meerdere organellen, celonderdelen.

Opdracht 29

Als een cel wordt vergeleken met een fabriek, dan zijn de organellen de onderdelen van de fabriek ieder met een specifieke functie:

- Er is het hoofdkantoor waar de belangrijkste beslissingen worden genomen;

- Er zijn de productieplaatsen waar de eiwitten worden geproduceerd: dit zijn de stoffen die nodig zijn voor alle belangrijke functies van de cel;
 - Er zijn energiecentrales die de cel van energie moeten voorzien.
 - Er is een noodaggregaat voor het geval dat de energiecentrale niet werkt.
 - Er is een import/exportafdeling die zorg draagt voor de aflevering van de goederen;
 - Er is een vuilverwerkingafdeling die afval verwerkt.
 - Er is een transportsysteem dat afval naar buiten transporteert.
- a) Zoek de werking van een cel op.
 - b) Geef aan welke rol de verschillende organellen vervullen
 - c) Vergelijk de functies van de organellen met bovenstaande indeling.

5.3 Biochemie

De celchemie is de chemie van in water opgeloste stoffen met het koolstofatoom (C) als belangrijkste bouwcomponent. Het koolstofatoom speelt zo'n belangrijke rol omdat het maximaal vier enkelvoudige, dubbele en zelfs drievoudige bindingen kan aangaan met andere atomen. Daarbij kunnen moleculaire structuren ontstaan met een koolstofskelet van ketens, ringen en combinaties daarvan. Er zijn - buiten levende wezens - zelfs cilindervormige en bolvormige structuren bekend (nanobuisjes en buckeyballs).

De koolstofchemie maakt de complexiteit mogelijk die het leven kenmerkt.

Ondanks de vrijwel onbegrensde mogelijkheden die de koolstofchemie biedt, maakt de celchemie slechts gebruik van een beperkt aantal moleculaire bouwstenen en structuren. Een zestal stoffen of families van stoffen speelt een hoofdrol in de chemie van het leven, de biochemie:

Lipiden

Lipiden zijn moleculen met lange ketens. Er zijn twee belangrijke deelgroepen te onderscheiden. De ene groep wordt gevormd door vetten, die als belangrijkste functie hebben om de energieopslag voor de cel te verzorgen. De andere groep zijn de fosfolipiden. Deze ontleen hun betekenis aan het feit dat ze spontaan membranen vormen die het mogelijk maken dat celactiviteiten onderling en van de buitenwereld worden afgescheiden.

Koolhydraten

Cellulose, zetmeel en glycogeen zijn biopolymeren die zijn opgebouwd uit glucose-moleculen. De koolhydraten zijn opgebouwd uit slechts één soort bouwstenen en hebben dan ook maar weinig specificiteitverlenende kenmerken. Deze stoffen hebben vaak maar één functie. Suikers en zetmeel dienen als brandstof. Cellulose komt voor in planten en geeft de plant stevigheid.

Eiwitten

Ook eiwitten of proteïnen zijn polymeren. Eiwitten zijn ketens van aminozuren. Eiwitten zijn als het ware de werkpaarden in de cel en verrichten tal van taken. Er zijn eiwitten die een functie vervullen als bouw materiaal, zoals keratine, dat de belangrijkste stof is voor nagels, er zijn eiwitten die transportfuncties hebben, zoals hemoglobine, dat voor het vervoer van zuurstof in het bloed zorgt en er zijn eiwitten die fungeren als chemische katalysator waarmee chemische reacties mogelijk of onmogelijk worden gemaakt.

Nucleïnezuren (DNA en RNA)

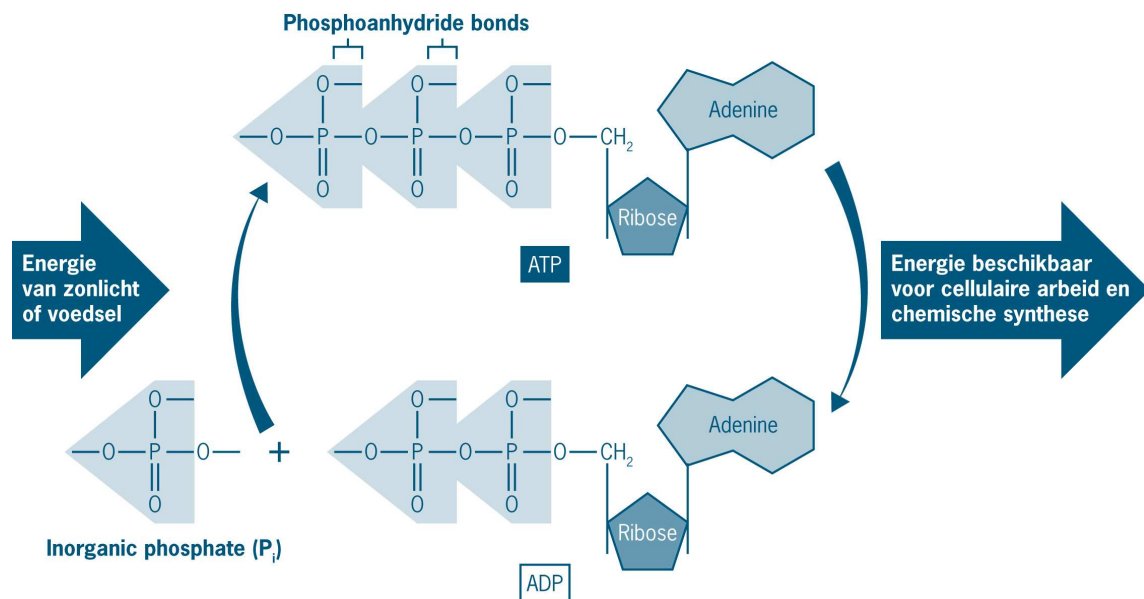
DNA is de drager van de erfelijke code. Met behulp van deze code worden de eiwitten samengesteld. Het is het enige molecuul dat met hulp van eiwitten zichzelf kan splitsen en zichzelf kan kopiëren. RNA speelt een rol bij het coderingsproces van de eiwitten.

Adenosinefosfaten (AMP-ADP-ATP)

Deze moleculen fungeren als pasmunt waarmee chemische reacties energetisch worden gefinancierd. Suikers en vetten zijn de brandstoffen voor de cellulaire activiteit. Rechtstreekse afbraak van deze brandstoffen zou echter twee problemen opwerpen. Ten eerste is de hoeveelheid vrijkomende energie veel te groot. De cel zou oververhit raken. Ten tweede moet de energie veel sneller beschikbaar zijn dan mogelijk is via de afbraak van suikers of vetten.

Daarom is in de natuur een energetische pasmunt aanwezig in de vorm van ATP (Adenosine-trifosfaat). Het ATP-molecuul kan worden afgebroken tot een ADP-molecuul. Daarbij wordt een fosfaatgroep afgesplitst; onder normale omstandigheden komt daar 50 KJ/mol bij vrij.

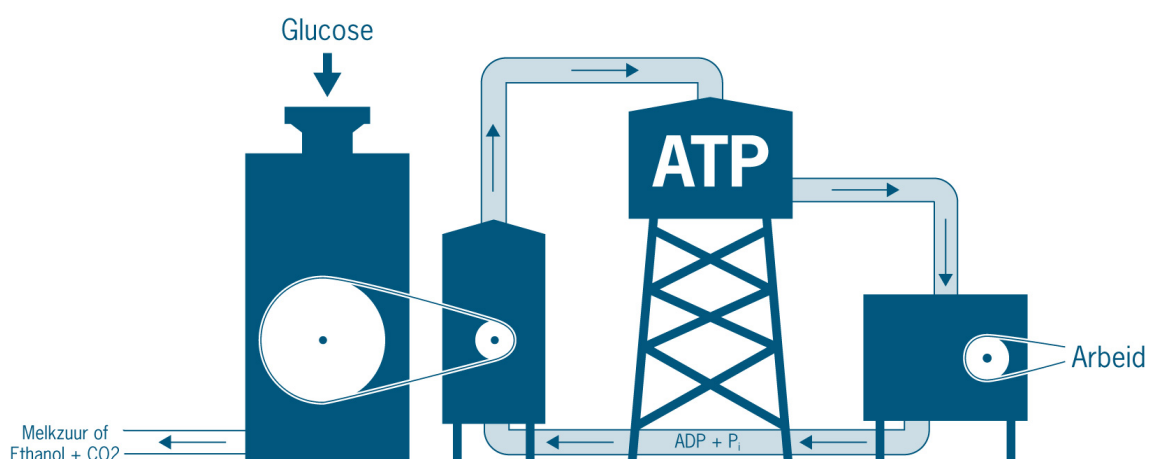
Dit proces is afgebeeld in Figuur 24.



Figuur 24 ADP kan door opname van energie overgaan in ATP. ATP functioneert vervolgens als energiedrager. Als de energie wordt gebruikt gaat ATP weer over naar ADP.

Metabolisme

Het metabolisme bestaat uit al die chemische activiteiten die het levende wezens mogelijk moeten maken informatie te creëren en complexe structuren op te bouwen met behulp van stoffen en energie van buitenaf. Het metabolisme kent daarbij anabole wegen waarbij stoffen als eiwitten worden gesynthetiseerd. Daarnaast zijn er ook katabole wegen, die de energie leveren die nodig is voor de synthese door bijvoorbeeld de afbraak van glucose.



Figuur 25 Door verbranding van glucose komt energie vrij waarmee ADP wordt opgewaardeerd tot ATP. Als er energie nodig is, voor arbeid bijvoorbeeld, kan ATP zijn energie vrijgeven door in ADP te veranderen.

Opdracht 30

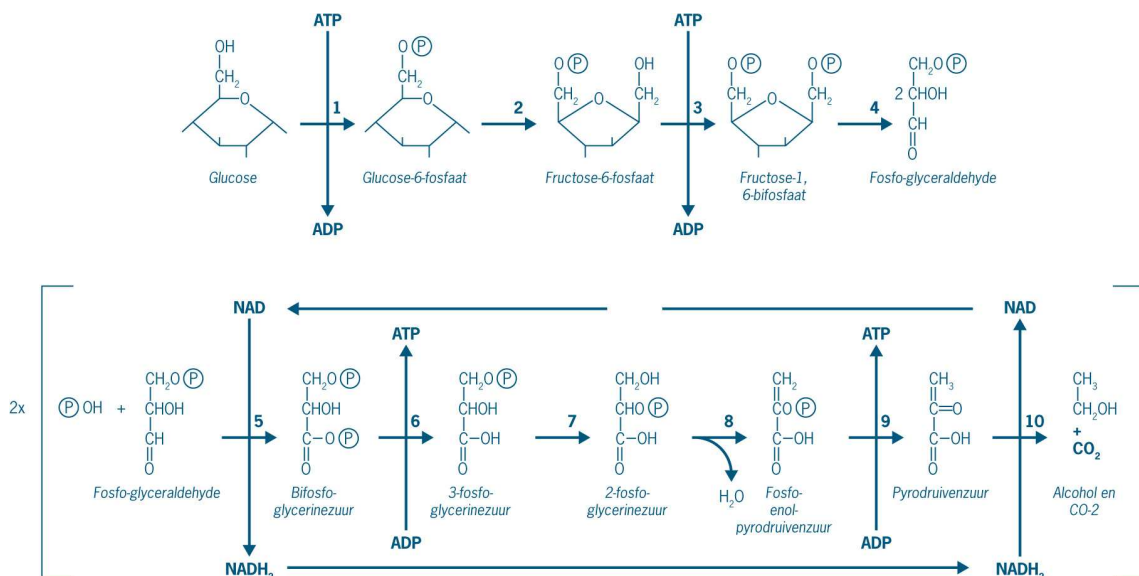
Leg bij de volgende reacties uit of het anabole of katabole reacties zijn:

- a) de verbranding van glucose.
- b) De hydrolyse
- c) De vorming van eiwitten uit aminozuren.
- d) de fotosynthese
- e) de alcoholgisting

5.4 Vergistingsreactie

De alcoholgisting

Verbranding van glucose vormt het katabole mechanisme waarmee de gistcel energie genereert voor zijn levensprocessen. De gistcel beschikt over mitochondriën die kunnen zorgen voor verbranding van de glucose als er zuurstof aanwezig is. Tijdens de afbraak van 1 glucosemolecuul worden er in gist dan ongeveer 16 ATP-moleculen gevormd. Maar onder bijna alle condities gebruikt de gistcel bij voorkeur de alcoholgisting. Netto levert deze maar 2 ATP op. Hiermee zal de gistcel het onder de meeste omstandigheden moeten doen. De overige energie die in het glucosemolecuul lag opgeslagen, zit nu ten dele in het ethanolmolecuul. Als de alcoholconcentratie te hoog wordt, gaan de gistcellen dood. Dat gebeurt al bij ongeveer 14 procent; sommige giststammen kunnen wat hogere concentraties aan. In Figuur 26 is de alcoholgisting afgebeeld.



Figuur 26 De glycolyse bij de gistcel. In 10 stappen wordt glucose omgezet in CO₂ en ethanol

De eerste negen stappen van de glycolyse zijn bij alle cellen hetzelfde. Bij de tiende stap is er een keuzemogelijkheid. Bij veel andere micro-organismen

(maar ook in menselijke spiercellen bijvoorbeeld) wordt er in plaats van alcohol en CO_2 melkzuur geproduceerd. In 1856 vormde dat de oorzaak van een persoonlijke tragedie van Louis Dominique Bigo, een distillateur uit Lille die zich plotseling aan de rand van een faillissement geplaatst wist, toen bleek dat al zijn gistvaten met suikerbietensap verzuurd bleken. Ten einde raad riep hij de hulp in van een jonge chemicus die in dienst was van de universiteit van Lille en die naar men zei briljant werk had verricht. De man bleek bereid Bigo te helpen en redde zijn handel. Maar zijn ontdekking die daarvoor nodig was zou de wereld veranderen. Hij ontdekte dat vergisting het werk was van micro-organismen. Zijn naam was Louis Pasteur.

Opdracht 31

- a) Leg uit wat er met de gistvaten van Bigo gebeurd kan zijn.
- b) Leg ook uit hoe Bigo in de toekomst vermoedelijk wist te voorkomen dat hij opnieuw door dezelfde rampspoed zou worden getroffen.

Opdracht 32

Bekijk via ► URL 5 de animatie over de glycolyse.

Beantwoord de volgende vragen:

- a. Wordt er bij dit proces melkzuur of ethanol geproduceerd?
- b. Komt er CO_2 vrij?
- c. Met meel en water kan een zuurdesem worden gemaakt. Het zuur is afkomstig van melkzuur dat geproduceerd wordt door bacteriën. Kan het deeg rijzen alleen ten gevolge van de activiteit van melkzuurbacteriën?
- d. Levert de glycolyse energie op of kost deze energie en, uitgedrukt in eenheden ATP, hoeveel?

Opdracht 33

- a. Zoek de formule voor melkzuur op
- b. Ga na dat de productie van melkzuur in stap 10 van de glycolyse ook mogelijk is.

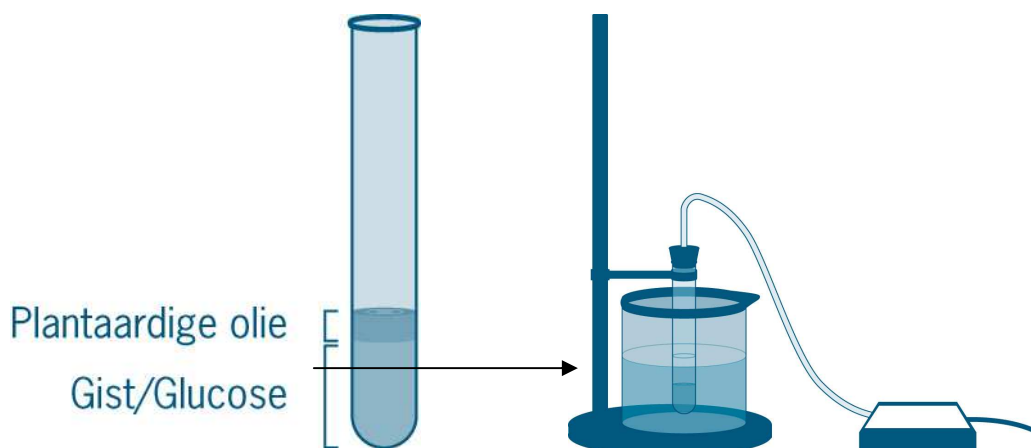
Opdracht 25a, Demonstratie-experiment

Vergistingsnelheid is een belangrijke grootheid voor een producent van alcohol.

Geef aan wat de eenheid is waarin je de vergistingsnelheid zou kunnen uitdrukken.

- a. Leg uit waarom de vergistingsnelheid van belang is voor de producent.
- b. Noem enkele factoren die van belang zijn voor de vergistingsnelheid.

Met de opstelling van hoofdstuk 5, opdracht 20 kan onderzoek gedaan worden naar de vergistingsnelheid. Ook is het mogelijk hiervoor een sensor te gebruiken. Een reageerbuis wordt gevuld met een suiker-gist-oplossing, afgedekt met een dun olielaagje. De reageerbuis wordt vervolgens afgesloten met een druksensor. Zie Figuur 27.



Figuur 27 Een opstelling om vergistingsnelheid te meten. Met een druksensor wordt de CO_2 -spanning gemeten.

- c. Hoe kun je met de gedemonstreerde opstelling de invloed van de verschillende factoren onderzoeken?

5.5 Nieuwe ontwikkelingen

Wereldwijd worden pogingen ondernomen *Saccharomyces cerevisiae* in te zetten voor de productie van ethanol uit plantenmateriaal. De gistcel is gespecialiseerd in de omzetting van glucose. Zoals in hoofdstuk 2 is uiteengezet, vindt er een overgang plaats van het gebruik van plantendelen met suiker en zetmeel naar de lignocellulose. Maar lignocellulose bestaat niet alleen maar uit de makkelijk te vergisten C_6 -suikers zoals glucose. Met name hemicellulose bevat ook veel zogenaamde C_5 -suikers zoals xylose. Bij sommige planten kan de hoeveelheid xylose erg oplopen (Zie Hoofdstuk 3, Tabel 3). De gistcel kan echter weinig met een suiker als xylose. Bakkersgist mist een essentieel enzym voor de vergisting van xylose. Daarmee blijft het rendement van de ethanolproductie dus laag. Zou xylose ook kunnen worden gebruikt, dan kan de ethanolproductie met wel 20% stijgen.

Olifantenpoep

Een ontdekking van een groep Nijmeegse microbiologen biedt nu nieuwe mogelijkheden. Zij troffen in olifantenpoep de schimmel *Piromyces* aan. Deze

schimmel kan dankzij het enzym xylose-isomerase xylose wél omzetten. Deze vondst bracht microbioloog Marko Kuyper van de Technische Universiteit Delft, één van de partners in het Kluyver Centre for Genomics of Industrial Fermentation, op het idee om het gen uit deze schimmel coderend voor het enzym in het genoom van bakkersgist in te bouwen zodat het alsnog xylose kan omzetten. De gemodificeerde bakkersgist bleek maar langzaam te groeien in een zuurstofloze omgeving. Voor alcoholproductie is een zuurstofloze omgeving noodzakelijk. Kuyper slaagde er uiteindelijk in een gist te maken die sneller kon groeien. Deze gist kan de biobrandstof dan ook veel sneller maken.

5.6 De bioreactor

Een opstelling waarbij in een vat micro-organismen worden gehouden ten behoeve van productiedoeleinden, wordt een bioreactor genoemd.

Een goed voorbeeld van een ondernemer die gebruik maakt van bioreactoren is de gistproducent. Deze is geïnteresseerd in een zo snel mogelijk toename van zijn gistcellen. Een gistproducent zal dan ook altijd de beschikking moeten hebben over een researchafdeling. Daar wordt altijd gebruik gemaakt van wiskundige modellen van het leven in de bioreactor.

Er zijn verschillende soorten bioreactoren die gebruik maken van verschillende processen:

- **Batchproces:**
Bij het batchproces worden een hoeveelheid gistcellen samen met voeding in een bioreactor gedaan. De hoeveelheid gistcellen in de reactor neemt toe en na verloop van tijd wordt er geoogst waarna de reactor opnieuw gevuld wordt.
- **Continu proces:**
Bij een continu proces is er sprake van een continue instroom van voedingsstoffen en vindt er ook continu uitstroom plaats van product. Het proces binnen de reactor verloopt stationair, d.w.z. de hoeveelheid gistcellen en de hoeveelheid voeding binnen de reactor zijn constant.

Opdracht 34

- Als we gistcellen willen produceren in een batchproces, is er dan sprake van een aeroob of een anaeroob proces?
- Leg uit of bij een batchproces stoffen moeten worden toegevoerd.
- Leg uit of bij een batchproces stoffen moeten worden afgevoerd.

Aangenomen mag worden dat de hoeveelheid gistcellen in het vat bij een batchproces op zeker moment maximaal is.

- d. Leg uit of dit moment optreedt als de voeding op is of dat dat eerder het geval is.
- e. Schets hoe in de loop van de tijd de hoeveelheid gistcellen in het reactorvat zal veranderen bij een batchproces.

Bij een batchproces moet het tijdstip worden gekozen waarop de gist moet worden geoogst. Mogelijk zou zijn te wachten totdat het aantal gistcellen niet verder meer toeneemt. Hieraan is een voordeel en een nadeel verbonden.

- f. Noem het voordeel en het nadeel.
- g. Leg uit waarom de bioreactor na elk gebruik goed gereinigd moet worden.

In een continu-reactor is sprake van een stationair proces.

- h. Leg uit wat dit voor consequentie heeft voor de toevoer- en afvoerstromen.
- i. In de reactor wordt koolstof, C, ingevoerd en uitgevoerd: in welke vorm?

5.7 Celgroei

Voor de productie van bio-ethanol is de concentratie gistcellen van groot belang. Maar het aantal gistcellen kan veranderen. Er komen cellen bij en er gaan cellen dood. Om voorspellingen te doen zijn wiskundige modellen nodig.

De groei van gistcellen in een afgesloten vat laat zich wiskundig beschrijven. Afhankelijk van de omstandigheden zijn verschillende groeimodellen denkbaar.

Exponentiële groei

Bij aanvang van het groeiproces is voor de aanwezige gistcellen voldoende voeding aanwezig. De omstandigheden zijn optimaal. De groei van de gistcellen wordt volledig bepaald door de snelheid waarmee gistcellen zich kunnen vermenigvuldigen.

In een kleine periode dt waarin de omstandigheden niet merkbaar veranderen zal het aantal gistcellen N toenemen met een kleine hoeveelheid dN

Food or Fuel?

Er zal gelden dat dN evenredig is met N want hoe meer gistcellen er zijn, hoe meer nakomelingen. Bovendien zal gelden dat dN evenredig is met de duur van de periode dt . Hoe langer deze periode duurt hoe meer nakomelingen.

Dus

$$dN = \text{constante} * N * dt$$

Een proces waarvoor dit geldt, wordt exponentiële groei genoemd. Als het volume van het vat V is kan ook naar de concentratie c van de gistcellen worden gekeken. Delen we linker- en rechterlid door het volume van het vat dan geldt:

$$dc = \mu c * dt$$

of ook wel

$$dc/dt = \mu c$$

Opdracht 35

Bovenstaande vergelijking vertelt dat een hoeveelheid c per tijdseenheid steeds met dezelfde factor groeit. Neem aan dat deze factor (μ) 0,04 bedraagt.

Nemen we als startwaarde voor N de waarde 100 en we kiezen voor tijdstappen $dt = 1$

a. Vul nu de volgende tabel aan:

t	dN	N
0	0	100
1	$0,04 * 100 = 4$	104
2	$0,04 * 104 = 4,16$	108,16
3		
4		
5		
6		

- Ga na hoeveel delingen nodig zijn om N te laten verdubbelen. We noemen dit de verdubbelingstijd.
- Leg uit dat bij een groei van 4% per tijdseenheid er minder dan 25 tijdseenheden nodig zijn voor verdubbeling.
- Voor gistcellen geldt een verdubbelingstijd van 1,5 uur. Ga door berekening na wat de groeifactor, μ , per uur dan moet zijn.

Dynamische modellen

Dynamische modellen zijn modellen waarbij de ontwikkeling van grootheden in de tijd zijn te berekenen. Er zijn computerprogramma's waarmee je heel snel modellen kunt doorrekenen. Vaak wordt gewerkt met een

grafische modelomgeving. Ook bij de bestudering van de groei van gistcellen kan een modelomgeving goede diensten bewijzen.

We zijn geïnteresseerd in een toestandsgrootte: bijvoorbeeld, de concentratie gistcellen c in g/liter. Hoe verandert c tijdens een groeiproces in een afgesloten bioreactor? De informatie die bekend is, heeft betrekking op de stroomgrootte dN/dt .

De berekening door het model gaat nu als volgt:

Er wordt een tijdstap dt gekozen die zo klein is dat de omstandigheden (hoeveelheid voedsel, zuurstof, etc.) in die periode niet merkbaar veranderen. En er wordt een startwaarde voor N gekozen. Voor de tijd t wordt de startwaarde 0 gekozen.

Vervolgens worden de volgende stappen berekend:

$$dN = k \cdot dt \quad (k = \text{een constante})$$

$$N = N + dN \quad (N \text{ wordt de oude waarde van } N, \text{ opgehoogd met } dN)$$

$$t = t + dt \quad (t \text{ wordt } t+dt)$$

Dit wordt vervolgens een groot aantal keren herhaald totdat een bepaalde stopconditie is vervuld die van tevoren is opgegeven, bijvoorbeeld $t = 100$ eenheden.

Opdracht 36

- Maak een model met exponentiële groei. Kies de tijdstap $dt = 1$ en kies de groeifactor $= 0,04$. Controleer de uitkomsten van de vorige opdracht.
- Bepaal met je model de verdubbelingstijd.
- Varieer de tijdstap en kijk wat de invloed is op de verdubbelingstijd.

Voor gistcellen geldt onder optimale omstandigheden dat ze zich gemiddeld een keer in de 90 minuten vermenigvuldigen.

- Kies een tijdstap van 1 seconde en ga m.b.v. je model na, hoe groot de specifieke groeisnelheid μ moet zijn.

Logistische groei

Het vorige model heeft betrekking op onbegrensde groei. In werkelijkheid zijn er natuurlijk altijd grenzen.

Naarmate deze grenzen in zicht komen, wordt de groei beperkt. Een beperkende factor is bijvoorbeeld de beschikbare hoeveelheid zuurstof. Deze wordt weliswaar permanent toegevoerd in het reactorvat, maar als er meer gistcellen zijn, neemt het verbruik toe. Bij constante zuurstoftoevoer neemt dan de beschikbare toevoer per gistcel af.

Opdracht 37

Bij een experiment wordt op zeker moment de zuurstoftoevoer naar de bioreactor gestopt. Geef aan wat de consequenties zijn voor

- a. het aantal gistcellen N
- b. de groeisnelheid dN/dt

Op zeker moment is ook de voeding op. Geef aan wat de consequenties zijn voor

- c. het aantal gistcellen N
- d. de groeisnelheid dN/dt

Wiskundig zou je dit als volgt kunnen aangeven:

Als de concentratie van de gistcellen groeit, ontstaan er voor de gistcellen problemen A, B, etc. (zuurstoftekort, etc). Een aantal van deze factoren remmen alleen maar de groei. Andere zijn lethaal.

$$dc/dt = \mu c - k_A - m_B - \dots$$

De factoren A, B etc nemen toe bij stijgende c . Er bestaat dan een concentratie c waarbij de problemen A, B etc zo groot zijn dat de groei 0 wordt. De concentratie heeft dan zijn maximale waarde bereikt. Noemen we de maximale concentratie E , dan zal gelden

$$dc/dt = \mu c (1 - c/E)$$

Als de concentratie c veel kleiner is dan E , dan is de tweede term tussen de haakjes vrijwel nul en geldt er ongeremde groei. Als $c = E$ dan wordt de groei nul.

Opdracht 38

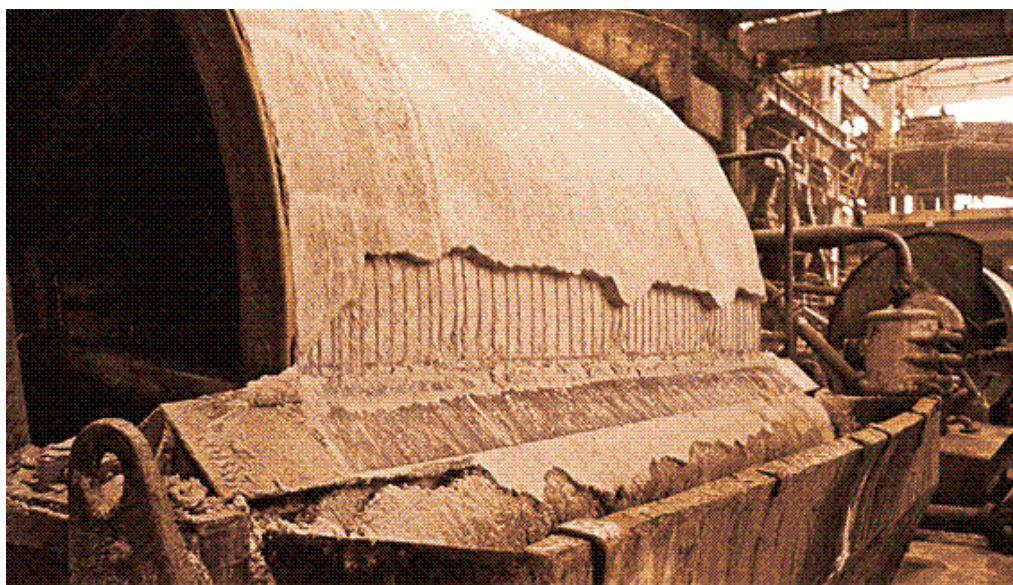
Breid je model uit. Voeg aan de definitie van de stroomgrootte dc/dt een term toe. Kies zelf je startwaarden. Kijk welke invloed deze term heeft op het verloop van c .

6. Opwerking

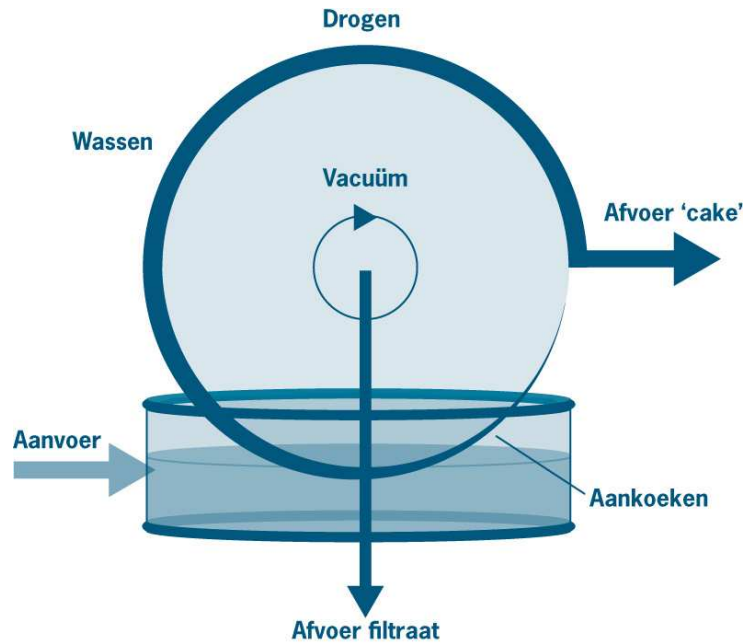
Zodra de gistcellen voldoende substraat hebben omgezet, wordt het tijd om de ethanol te gaan winnen. Om ethanol als brandstof te gebruiken, moet hij (vrijwel) zuiver zijn of gemengd met andere brandstoffen. Er mogen uiteraard geen water of vaste bestanddelen in zitten. Maar de microbiologische herkomst van de bio-ethanol zorgt ervoor dat deze brandstof juist ontstaat in een ingewikkeld mengsel van water, opgeloste vaste stoffen (suikers, afvalstoffen van de gistcellen, restanten van het substraat), andere opgeloste stoffen (ethanol, koolstofdioxide) en onopgeloste vaste stoffen (vooral dode en levende gistcellen). Doe nu eerst de voorkennismodule ►URL 1. Na deze module is je kennis over opwerking en scheidingsmethoden opgefrist.

6.1 Filtratie

Het makkelijkste is het nog om de vaste bestanddelen uit het mengsel te halen. Scheidingsmethoden als bezinken en filtreren liggen voor de hand. Het is wel moeilijk om het efficiënt en goedkoop te doen. En als je ethanol maakt in een *continuproces*, is het wel handig om ook de filtratiestap continu te kunnen laten plaatsvinden. Een mogelijkheid is de continue filtratie zoals in Figuur 28 en Figuur 29.



Figuur 28 Continue filtratie met vacuüm drum filter



Figuur 29 continue filtratie met vacuüm drum filter - schematisch

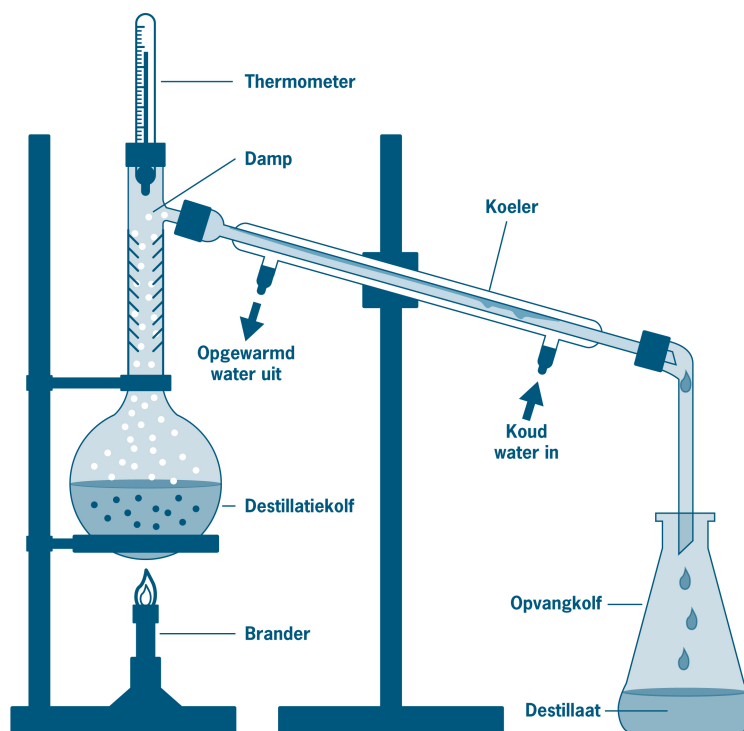
Opdracht 39

Leg in eigen woorden uit hoe een continue filtratie met 'vacuüm drum filter' werkt. Zorg ervoor dat in elk geval de volgende zaken ter sprake komen:

- vacuüm,
- de Nederlandse term voor 'drum',
- continu,
- de bouw van het filter,
- de weg waarlangs het filtraat afgevoerd zou kunnen worden.

6.2 Destillatie

Nadat de vaste bestanddelen uit het mengsel verwijderd zijn, is destillatie vrijwel de enige mogelijkheid om de ethanol uit het restant te winnen. Je hebt destillatie leren kennen als één van de belangrijkste scheidingsmethoden (Figuur 30). Het principe waarop deze methode berust, is een verschil in kookpunt van de verschillende componenten, waarvan water en ethanol hier de belangrijkste zijn. Water heeft een kookpunt van 100 °C, ethanol van ongeveer 78,5 °C.



Figuur 30 Een eenvoudig destillatieapparaat

Hiermee konden we in de derde klas verklaren hoe destillatie werkt: ethanol heeft het laagste kookpunt en verdampt als eerste. De ethanoldamp condenseert in de koeler en wordt aan het einde daarvan opgevangen. Het water blijft uiteindelijk achter.

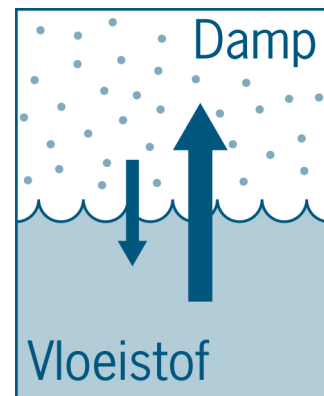
Dit klopt ook mooi met iets dat je ook al in de derde klas hebt geleerd, namelijk dat een mengsel van ethanol en water geen kookpunt heeft, maar een **kooktraject**. Als een mengsel een kooktraject heeft, loopt de temperatuur van het mengsel tijdens het koken op. Dit betekent dat de samenstelling van het mengsel tijdens het koken verandert: De component met het laagste kookpunt verdwijnt er het eerste uit, totdat uiteindelijk die met het hoogste kookpunt overblijft. De verhouding tussen de bestanddelen in de vloeistof verandert dus voortdurend. Tot zover de derde klas-scheikunde. Maar in werkelijkheid ligt het allemaal wat ingewikkelder.

We kijken nog eens nauwkeuriger naar de verschijnselen die hier een rol spelen. Koken is op zichzelf een bijzonder verdampingsproces. Wat gebeurt er precies bij koken? Daarvoor moet je eerst iets weten over dampdruk.

Dampdruk

Beschouw een afgesloten ruimte met een vloeistof, bijvoorbeeld water.

Boven het vloeistofoppervlak bevindt zich waterdamp. Voortdurend ontsnappen er moleculen aan de vloeistof. Dit noemen we de uitgaande stroom. Tegelijkertijd keren moleculen terug in de vloeistof. Dit is de ingaande stroom. Op zeker moment zal er een dynamisch evenwicht ontstaan waarbij ingaande stroom en uitgaande stroom aan elkaar gelijk zijn. De damp is dan verzadigd. Er heerst boven de vloeistof een bepaalde dampdruk. Als de temperatuur stijgt, stijgt ook de dampdruk (Figuur 31).



Figuur 31 Een afgesloten ruimte met damp en vloeistof. De uitgaande stroom hangt af van temperatuur en is hier groter dan de ingaande stroom, dus de dampdichtheid neemt toe. Dampevenwicht ontstaat doordat de ingaande stroom bij toenemende dampdichtheid groter wordt.

Opdracht 40

De volgende factoren zullen van invloed zijn op dit proces van in- en uitstroom: temperatuur, dampdruk, grootte van het vloeistofoppervlak, soort vloeistof.

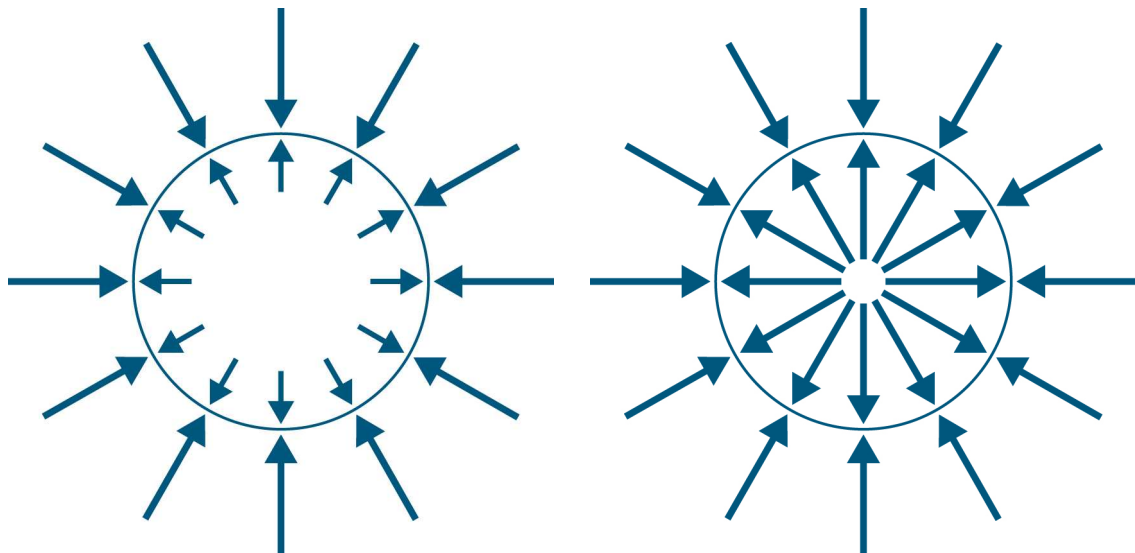
- Van welke factoren hangt de uitgaande stroom af?
- Van welke factoren hangt de ingaande stroom af?
- Als de temperatuur stijgt, neemt een van beide stromen toe: welke is dat?
- Waarom moet de andere stroom zich uiteindelijk aanpassen?
- Waarom geldt dat na een temperatuurstijging er een nieuw evenwicht ontstaat bij een hogere dampdruk?
- Leg uit dat de verzadigingsdruk - of kortweg de dampdruk - niet afhangt van de afmetingen van het vloeistofoppervlak maar wel van het soort vloeistof en de temperatuur.
- Leg uit dat de dampdruk meer dan evenredig stijgt met de temperatuur.
- Zoek in Binas op bij welke temperatuur water een dampspanning heeft van 1,0 bar
- Doe hetzelfde voor ethanol.
- Zoek in Binas op wat de dampdruk van water is bij 300°C.

- k. Waarom is het gevaarlijk om vloeistof in een afgesloten vat te verhitten?
- l. Waarom is het gevaarlijk een druppel water in hete olie te laten vallen?

Koken

Bij koken ontstaan dampbellen in de vloeistof. Waar komen deze bellen vandaan? Waarom heeft kokend water een temperatuur van $100\text{ }^{\circ}\text{C}$?

Dampbelletjes ontstaan regelmatig in water. Ze verdwijnen echter weer omdat de dampdruk kleiner is dan de buitendruk. Bekijk onderstaande tekening (Figuur 32). Bij toenemende temperatuur stijgt de dampdruk. Als de dampdruk is opgewassen tegen de buitendruk of zelfs groter is zwelt de dampbel op. De bellen stijgen vervolgens naar het vloeistofoppervlak.



Figuur 32 Als de dampdruk niet groot genoeg is, zal een dampbel weer verdwijnen. Als de dampbel wel groot genoeg is, ontstaat er een kookbel.

Opdracht 41

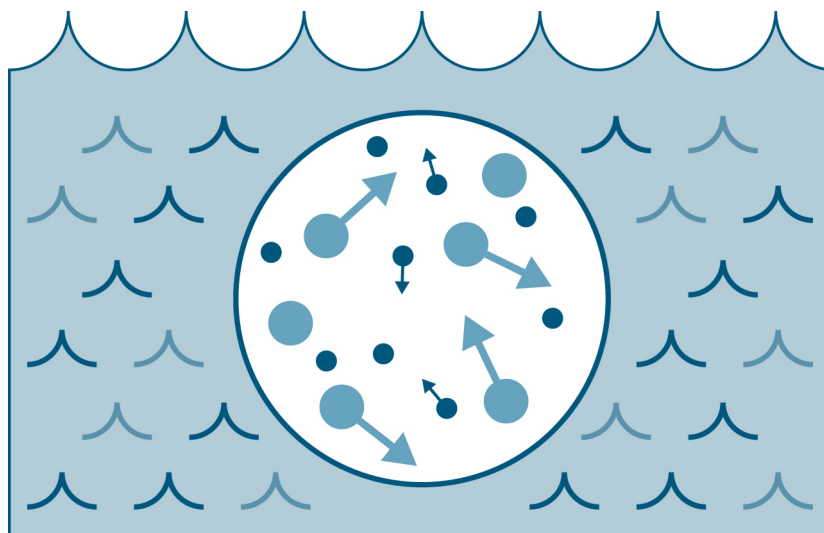
De dampdruk van vloeistoffen hangt af van de temperatuur.

- a. Waarom kookt water bij 100°C ?
- b. Waarom kookt water in de bergen bij een lagere temperatuur?

Destillatie

Bij destillatie wordt een *mengsel* van water en ethanol aan de kook gebracht.

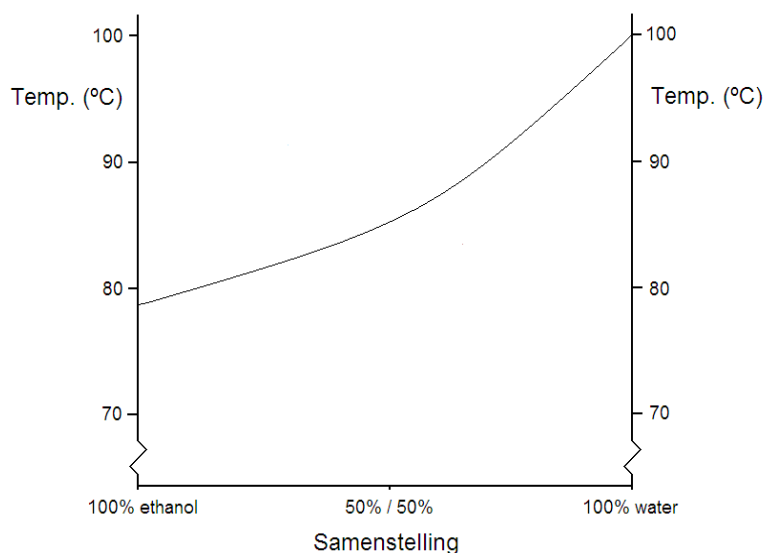
In de kokende vloeistof ontstaan weer dampbellen omdat de dampdruk weer gelijk is aan de buitendruk. Ditmaal hebben we echter niet te maken met één vloeistof maar met twee.



Figuur 33 Een dampbel met ethanol en watermoleculen.

Binnen de dampbel zullen er zowel ethanol- als watermoleculen zijn (Figuur 30). Het totale aantal moleculen N in de bel bestaat voor een deel uit watermoleculen N_w en een deel ethanolmoleculen N_a . Beide soorten moleculen leveren een bijdrage aan de totale dampdruk in de bel. Deze is weer gelijk aan de buitendruk, d.w.z. 1 atmosfeer.

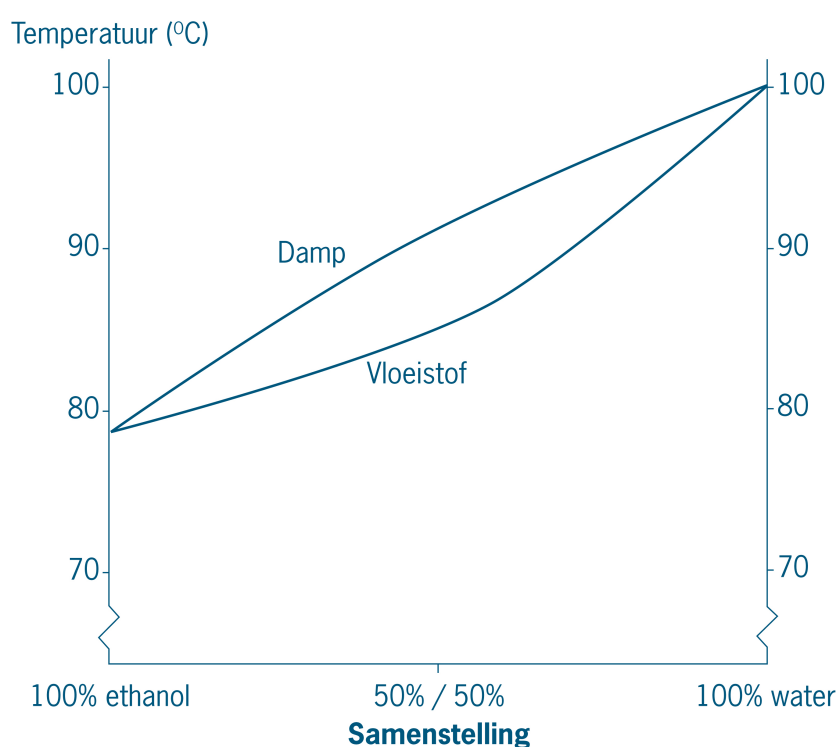
Het kookpunt van water ligt bij 100 °C. Het kookpunt van ethanol ligt bij 78,5 °C. Van een mengsel kan het kookpunt worden berekend met de wet van Raoult.



Figuur 34 Het kookpunt van een mengsel hangt af van zijn samenstelling (theoretische waarden).

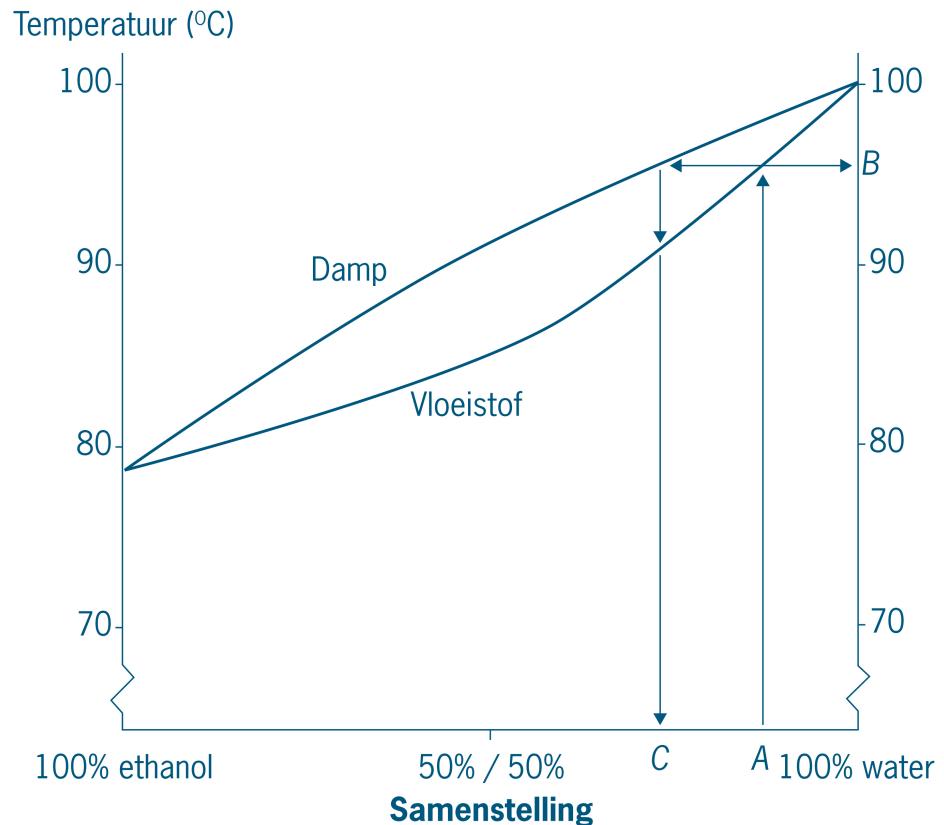
In Figuur 34 hierboven zie je hoe het kookpunt van een water/ethanolmengsel (theoretisch) afhangt van de samenstelling. Dit is de achtergrond van het kooktraject van het mengsel.

Als we nu de samenstelling van de damp gaan onderzoeken, blijkt dat die anders is dan die van de vloeistof. Hadden we dat verwacht? Jazeker, want we verwachtten dat juist de ethanol zou verdampen. Dat is ook zo, maar er is **ook water** verdampt. De damp bevat procentueel gezien wel minder water dan de vloeistof. Bij elke kooktemperatuur blijkt een bepaalde ethanol/waterverhouding voor de damp te bestaan. Die gegevens kun je overzichtelijk weergeven in een zogenaamd T,x diagram. In Figuur 35 staat zo'n diagram. Je herkent de vloeistoflijn van Figuur 31. De T slaat op de temperatuur; de x op de x-as waarop de samenstelling van het mengsel staat weergegeven. (Ook hier zijn de waarden weer theoretisch.)



Figuur 35 Een T,x-diagram van een water/ethanolmengsel.

Hoe moet je zo'n diagram lezen? Je kiest een bepaalde verhouding water/ethanol, bijvoorbeeld zoals die in wijn, waarin ongeveer 12 volumeprocent ethanol zit. Dat wordt punt A in Figuur 36. Dan kun je het kookpunt aflezen bij punt B. Punt C geeft de verhouding van de componenten in de dampfase bij evenwicht.



Figuur 36 Een T,x-diagram van een water/ethanolmengsel.

En kijk, hier zien we hoe destillatie werkt. De damp heeft een andere samenstelling dan de oorspronkelijke vloeistof. We zitten volgens het diagram nu op ongeveer 30% ethanol. Als je deze damp laat condenseren, krijg je een nieuw vloeibaar mengsel dat je een tweede keer kunt destilleren. Dan krijg je een nog hoger ethanolgehalte. Na enkele herhaalde destillaties zou je dan in de buurt van 100% ethanol komen.

Kadertekst Filtratie en destillatie

In het gedachte-experiment wachtten we, tot er een evenwicht ontstaan was tussen de vloeistof en de damp. Dat kan in de praktijk lang duren, vandaar dat er in een destillatieapparaat meestal voorzieningen zijn aangebracht om het contact tussen de vloeistof en de damp extra intensief te maken.

In een glazen destillatieopstelling zoals op school brengt men vaak een zogenaamde *vigreux* (spijkeropzet) aan. Die heeft een groot inwendig oppervlak, waarlangs de gecondenseerde vloeistof naar beneden kan lopen, tegen de opstijgende damp in.

In een grote industriële destillatietoren, meestal *rectificatiekolom* genoemd, zitten op bepaalde afstanden horizontale stalen platen, waar het contact tussen damp en vloeistof tot stand komt via een systeem van buisjes en ‘borrelkapjes’. In het ideale geval bereik je ter hoogte van elk plateau een vloeistof/dampevenwicht. En omdat een rectificatiekolom een hele serie platen bevat, met naar boven toe een steeds lagere temperatuur, vindt er naar boven steeds meer zuivering plaats van de component met het laagste kookpunt. Zo kun je met één apparaat toch een hoge zuiverheid bereiken, omdat hij als het ware meerdere destillatiestappen achter elkaar uitvoert.

Opdracht 42

Zoek op het internet duidelijke afbeeldingen van een vigreux en van een plaat in een rectificatiekolom met borrelkapjes. Zorg in beide gevallen zo mogelijk voor zowel een foto als van een schematische tekening.

Opdracht 43

Wat gebeurt er precies met eventueel aanwezige koolstofdioxide tijdens de destillatie?

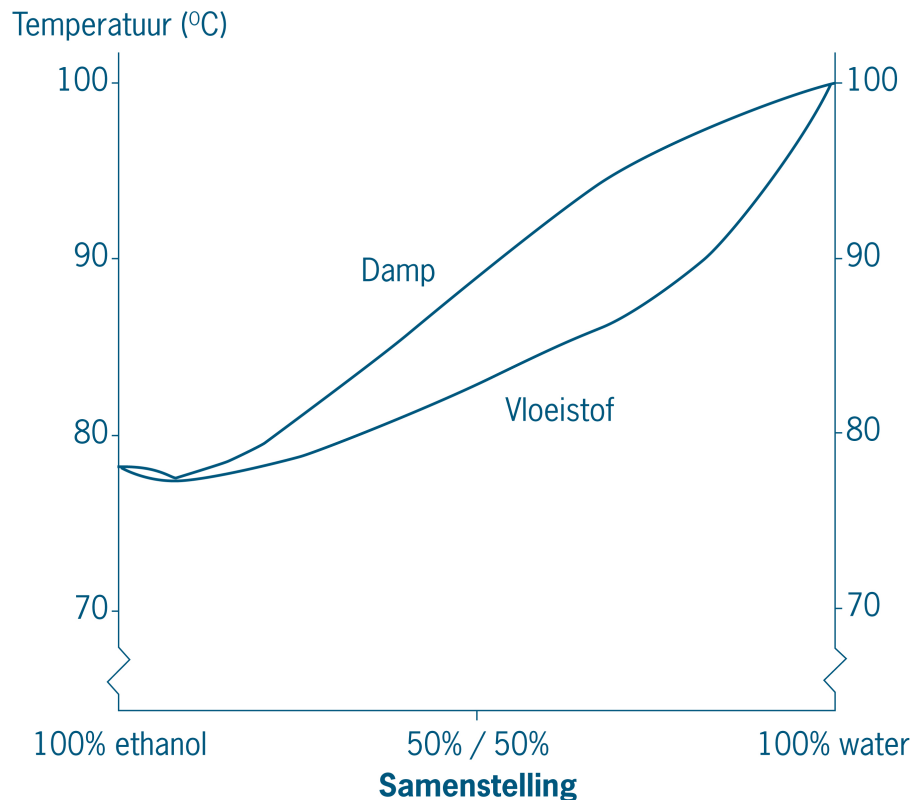
Opdracht 44

- a Teken met potlood in Figuur 33 in wat er gebeurt bij een tweede en derde destillatie.
- b Schat hoeveel destillatiestappen je nodig hebt om - volgens dit diagram - een ethanolgehalte van 90% te behalen.

In het bijschrift bij de Figuren 31 en 32 staat de opmerking ‘theoretische waarden’.

Dat heeft ermee te maken dat er iets aan de hand is met het water/ethanolmengsel waardoor het zich niet helemaal aan de theorie houdt. De moleculen van deze twee stoffen vertonen zoveel interactie dat de damp samenstelling anders is dan de diagrammen hierboven voor het ‘ideale geval’ aangeven.

Het echte T,x diagram van water/ethanol ziet er zo uit als in Figuur 37.



Figuur 37 Het werkelijke T,x diagram voor een water/ethanolmengsel.

Het valt meteen op dat de linkeruiteinden van de curven niet meer het minimum vormen. Er bevindt zich een nieuw dieptepunt bij ongeveer 78 °C en 96 (volume)procent ethanol. Op dat dieptepunt raken de curven elkaar ook. Als je met dit diagram weer een serie destillaties simuleert, dan merk je dat je vastloopt in dat dieptepunt. Je kunt met destilleren niet verder komen dan 96% ethanol.

Je kunt het ook zo bekijken: Doe eens een destillatie met een ethanol/watermengsel waarin 96% ethanol zit. Het diagram laat de samenstelling van de damp zien. Die is **hetzelfde** als van de vloeistof waar je mee bezig bent. Wanneer je die damp weer laat condenseren in de koeler, krijg je gewoon je oorspronkelijke vloeistof weer terug. Het destilleren heeft het ethanolgehalte dus niet meer verhoogd. Wanneer men dat laatste restje water er uit wil krijgen om 100% zuiverheid te verkrijgen ('absolute alcohol'), dan moet er een andere methode gezocht worden.

Een vloeistof waarvan de damp dezelfde samenstelling heeft, noemt men een **azeotroop**. Het woord komt, zoals zoveel wetenschappelijke termen, uit het Grieks. A-zeo-troop betekent zoveel als 'zonder-kook-verandering'.

Opdracht 45

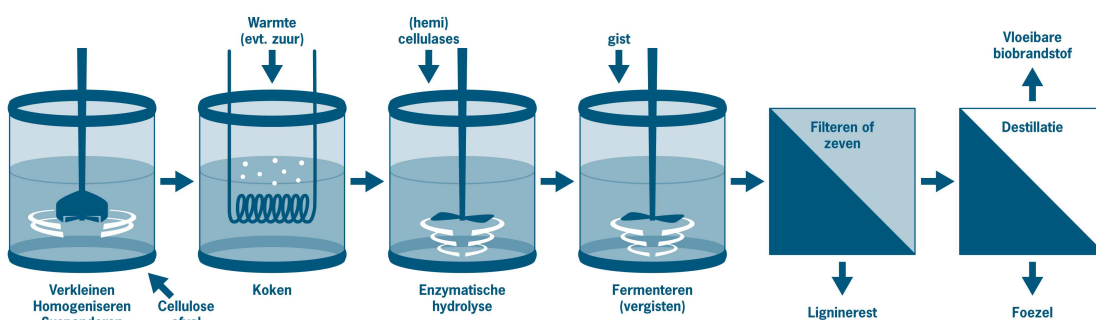
Wat voor interactie vertonen de moleculen van water en ethanol onderling?

Opdracht 46

Teken met potlood in Figuur 37 in wat er gebeurt bij een serie van 10 destillaties, weer te beginnen met een mengsel met 12 procent ethanol.

7. Practicum

In het theoriegedeelte is er meer verteld over de productie van bio-ethanol. Bio-ethanol is op redelijk eenvoudige wijze te produceren en het mooiste zou zijn als deze brandstof geproduceerd kon worden uit materiaal dat toch niet meer gebruikt wordt, uit afval dus. Van ons huishoudelijk afval bestaat zo'n 70 % uit materiaal dat cellulose bevat, zoals hout en papierresten. Zo ook tissue: het afvalproduct dat in dit practicum bekeken wordt. Normaal wordt dit als afval verbrand, maar er kan iets veel nuttiger mee gedaan worden: biobrandstof produceren. Dat is dan ook het doel van dit practicum. In verschillende stappen gaat de cellulose uit de tissues omgezet worden in ethanol. In Figuur 38 is te zien hoe dat in de industrie gebeurt.



Figuur 38: Het globale proces voor de productie van bio-ethanol, zoals die ook in de industrie al toegepast wordt om bio-ethanol te produceren.

Tijdens dit practicum is het echter voldoende om gebruik te maken van drie stappen uit dit schema, namelijk: Stap A hydrolyse → Stap B vergisting → Stap C destillatie.

Zoek nu eerst op wat de reacties zijn die in de stappen A en B uitgevoerd worden. Begin daarna pas aan het practicum.

7.1 De hydrolyse

Benodigdheden:

0.1 M acetaat buffer pH 4,5 (gemaakt door docent of TOA)

Enzymoplossing (gemaakt door docent)

Tissues

Afsluitbaar bakje

Oven of waterbad op 50°C

Glucose strips

Weegschaal

Maatcilinder (250 mL)

- Weeg ongeveer 30 gram tissues af en doe deze in het bakje.
- Meet met een maatcilinder 200 mL buffer af en voeg daar 5 mL enzymoplossing aan toe.
- Giet de buffer met enzymoplossing over de tissues heen, zodat ze goed doordrenkt zijn.
- Sluit het bakje goed af en leg deze in de stoof of het waterbad van 50°C

Het glucosegehalte bepalen

Om het glucosegehalte te bepalen, gebruiken we een indicator. Deze worden bij de dokter gebruikt om te achterhalen of er suiker in iemands urine zit. Maar helaas zijn de strips niet erg nauwkeurig voor hoge suikerconcentraties, daarom zal het monster verdund moeten worden voor de tijdstippen 24, 48 en 72 uur. De kleuromslag van geel naar groen is het meest betrouwbaar, dus gaan we in een verdunningsreeks die kleuromslag zoeken.

De verdunningsreeks

Laat het bakje even afkoelen en haal daaruit een monster van 5 mL met behulp van een pipet. Maak van deze 5 mL vier potjes met verschillende verdunningen:

1:10 1:50 1:100 1:150

Dus 1:10 wil zeggen 1 deel monster (bijv. 1 mL) en 9 delen water. Om een 1:100 verdunning te maken, kun je dan 1 mL van je 1:10 verdunning nemen en daar weer 9 mL water aan toevoegen.

De glucosestrip gebruiken

Doe bij ieder potje een glucosestrip. Houd hem 2 seconden in de vloeistof en haal hem er weer uit. Lees na 15 seconden de kleur af en maak een schatting van de hoeveelheid suiker met behulp van de verpakking van de glucosestrips. Schrijf deze waarde meteen op.

Bereken voor elk potje de suikerconcentratie. Deze zou eigenlijk vier keer dezelfde moeten zijn. Welke van de vier metingen ga je gebruiken en waarom?

- Meet na 1 uur het glucosegehalte met de glucosestrips (zie 'glucosegehalte bepalen') en herhaal dit na ongeveer 24 uur, 48 uur en 72 uur.

Wat is de concentratie glucose die je hebt gemeten?

Tijd	glucosegehalte
1 uur	
24 uur	
48 uur	
72 uur	

7.2 De vergisting

Benodigdheden:

De oplossing uit onderdeel A

Reactievat van 500 mL

Waterslot met daarbij een rubberen cap, om op het reactievat aan te brengen

Gist (10 gram)

Magneetroerder

Roervlo

Waterbad of oven op 33°C

Weegschaal

- Breng de suspensie uit onderdeel A, inclusief de overgebleven tissues, over in het reactievat en voeg 10 gram gist toe en een roervlo.
- Sluit het reactievat af met het waterslot.
- Zet het vat in een oven of waterbad van 33 graden, zodanig dat de roervlo door de magneetroerder in beweging kan worden gezet.
- Zet de roerder op 500 toeren/min en noteer de tijd.
- Kijk het komende half uur regelmatig naar het waterslot.

Noteer je waarneming en geef een verklaring.

- Laat de vergistingopstelling ongeveer een dag staan. Langer kan geen kwaad.
- Bepaal het glucosegehalte opnieuw met een glucosestrip en noteer de concentratie glucose
- Ruik aan de oplossing.

Verklaar je waarnemingen.

7.3 De destillatie

Benodigdheden

Oplossing uit onderdeel B

Opstelling voor destillatie met vigreux-kolom met een 250 mL kolf (opgezet door docent)

Verschillende maatcilinders van 10 mL om het destillaat in op te vangen.

Verwarmingsbron (bij voorkeur een verwarmingsmantel)

Kooksteentjes

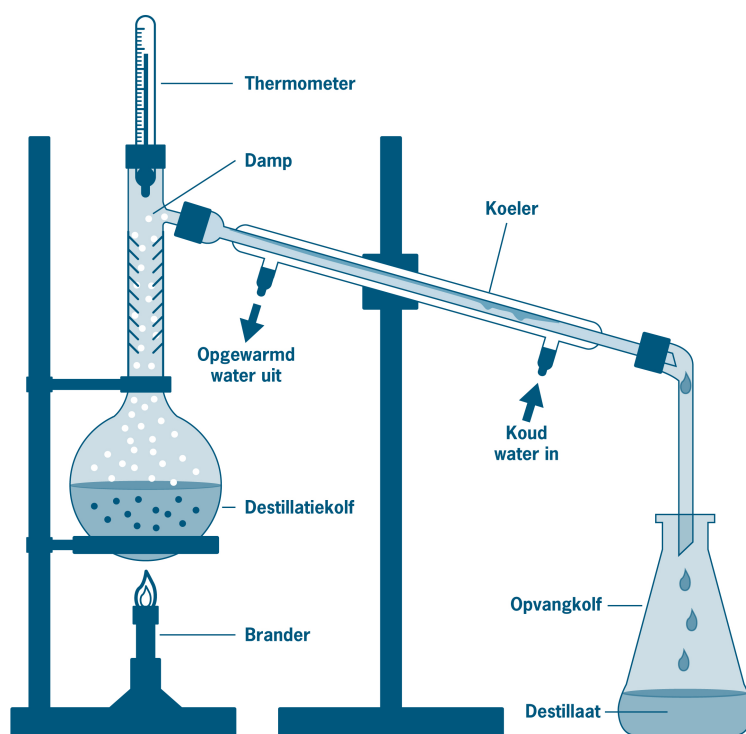
Schoteltje

Lucifers

Veiligheidsbril

Lepel

- Hieronder zie je een tekening van een destillatieopstelling.



- De opstelling voor de destillatie wordt klaargezet door de docent.
- Zorg ervoor dat de kolf schoon en droog is
- Zorg ervoor dat het reservoir van de thermometer zich op dezelfde hoogte bevindt als het punt waar de damp de koeler ingaat.
- Meet met de maatcilinder hoeveel oplossing uit onderdeel B je overhebt en doe dit in de destillatie kolf. Voeg een paar kooksteentjes toe.

- Zet je veiligheidsbril op en begin met verwarmen. Je verwarmt op vol vermogen, totdat de vloeistof gaat koken. Zet het verwarmingselement dan op half vermogen en houd de thermometer goed in de gaten. Je ziet de temperatuur ineens heel snel stijgen. Op 80 graden blijft de temperatuur even stabiel. Je ziet de eerste druppels in de opvangkolf druppelen. Verwissel de opvangkolf op het moment dat de temperatuur 93 graden is. Je hebt dan ongeveer 5 mL vloeistof opgevangen. Destilleer nog even door en vang steeds fracties van 5 mL vloeistof op. Stop als je in totaal vier fracties hebt (inclusief de eerste fractie).
- Je hebt nu vier fracties met verschillende ethanolpercentages.

Welke fractie heeft volgens jou het hoogste ethanolpercentage?

- We gaan nu de brandbaarheid van de fracties bepalen. Houd je veiligheidsbril op! Doe de helft van fractie 1 op een schoteltje. Probeer de vloeistof met een lucifer te laten ontbranden.

Brandt deze fractie?

Je ziet dat niet alle vloeistof op het schoteltje verbrandt. Hoe komt dit?

- Herhaal de vorige stap voor de andere fracties
- Niet alle fracties zullen branden. Gebruik de laatste fractie die niet brandt in de volgende stap:
- *Waarschuwing: doe deze stap niet met een fractie die wel goed brandt!*
Giet wat vloeistof op een lepel, houd deze voorzichtig enkele seconden boven een gasbrander en probeer hem dan nog eens aan te steken. Let goed op: de vlam van ethanol is niet altijd even goed zichtbaar. Test of de vloeistof op de lepel al brandt door een nieuwe lucifer boven de lepel te houden. De lucifer zal gaan ontbranden wanneer de ethanol brandt.

Als je er vanuit gaat dat ethanol brandt vanaf een gehalte van 40 %, welke fracties bevatten dan meer dan veertig procent ethanol?

Wat vind je van de efficiëntie van deze proef?

8. URL lijst

URL1 Digitale voorkennismodule: Maak een account aan en klik op *B-basic*.

<http://pkedu.fbt.wur.nl/moodle/>

URL2 Cornell ecologist's study finds that producing ethanol and biodiesel from corn and other crops is not worth the energy

<http://www.news.cornell.edu/stories/july05/ethanol.too.costly.ssl.html>

URL3 Bio-energie quiz ANW-actief

<http://www.vijfvannijgh.nl/anwactief/jun2007/vraag1.php>

URL4 Pretreatment of Lignocellulosic Wastes

<http://www.mdpi.com/1422-0067/9/9/1621/pdf>

URL5 Glycolyse:

<http://instruct1.cit.cornell.edu/Courses/biomi290/MOVIES/GLYCOLYSIS.HTML>