

Energimyndighetens titel på projektet – svenska Zygomycet-baserat bioraffinaderi med etanolproduktion	
Energimyndighetens titel på projektet – engelska Zygomycetes-based biorefinery with ethanol production	
Ev. Energimyndighetens program Etanolprocesser	Tidplan 2011-11-01 till 2015-10-30
Total projektkostnad 5 617 000 kr	Energimyndighetens andel av kostnaden i %/kr 86 % / 4 832 000 kr
Ev. rapporttitel hos stödmottagaren -	Ev. rapportnr hos stödmottagaren -
Universitet/högskola/företag Högskolan i Borås	Avdelning/institution Resursåtervinning och samhällsbyggnad (f.d. Ingenjörshögskolan)
Adress 501 90 BORÅS	Organisationsnummer 202100-3138
Namn och e-post - projektledare Mohammad Taherzadeh, mohammad.taherzadeh@hb.se	
Namn och e-post – Huvudförfattare/ medförfattare/projektdeltagare/doktorander Patrik Lennartsson (tekn. dr), patrik.lennartsson@hb.se Jorge Ferreira (doktorand), jorge.ferreira@hb.se Karthik Rajendran (doktorand) karthik.rajendran@hb.se Andreas Gundberg (Lantmännen Agroetanol) andreas.gundberg@lantmannen.com Robin Karlsson (Lantmännen Agroetanol) robin.x.karlsson@lantmannen.com Irina Svensson (Lantmännen Agroetanol) irina.svensson@lantmannen.com Per Erlandsson (Lantmännen Energi) Per.Erlandsson@lantmannen.com Nahid Kandori (Sahlgrenska Universitetssjukhuset) nahid.kondori@microbio.gu.se	
Nyckelord: 5-7 st Etanol, cellulosa, tunndrank, svamp, <i>Neurospora intermedia</i>,	

Sammanfattning

Att använda ätbara filamentösa svampar i ett bioraffinaderikoncept med etanol som en huvudprodukt har stora potentiella fördelar. Främst innebär det att flera substrat kan utnyttjas och till större andel, samtidigt som ytterligare en värdefull produkt i form av proteinrik svampmassa produceras.

Inom projektet har ”ätbara” filamentösa svampar klassificerade som zygomyceter och ascomyceter använts för att utveckla etanolprocesser med svampmassa som en värdefull foderprodukt från lignocellulosa med fokus på jordbruksavfall och interna processflöden hos Lantmännen Agroetanol. Totalt har 32 zygomycetstammar associerade med produktion av indonesiskt tempoh och 5 ätbara ascomycetstammar undersökts. Bland de två bästa zygomycetstammarna kunde etanolutbyten på 0,46-0,47 g/g erhållas med inhibitortolerans lika god som en industriell stam av flockulerande *Saccharomyces cerevisiae* från etanolproduktion av restprodukter från pappersmassaproduktion. Från mer komplexa/svårnedbrytbara substrat var ascomycetstammarna bättre lämpade, och *Neurospora intermedia* var bäst för ur ett etanolperspektiv. *N. intermedia* uppvisade förmåga att bryta ner både hemicellulosa (xylan) och cellulosa (Avicel) i syntetiskt medium.

Det substrat som visade sig vara mest intressant för industriell tillämpning var och är det interna processflödet tunndrank hos Lantmännen Agroetanol. Fri tillgång till substratet, som bland annat innehåller lignocellulosarester från klifractionen i Agroetanols råvara, och enkel separation av den producerade etanolen då vätskan går tillbaka till Agroetanols process är två viktiga anledningar. Över 5 g/L etanol, (motsvarande 5000 m³ ren etanol/år på fullskala), har erhållits med den ätbara filamentösa svampen *N. intermedia*. Försöken har skalats upp på Högskolan i Borås från labbskala till 26 samt 1.300 L bioreaktorer, i satsvis och kontinuerlig odling med utspädningshastigheter upp till 0,2 h⁻¹. Hos Lantmännen Agroetanol har processen skalats upp ytterligare till 2,5 samt 80 m³ stora bioreaktorer med flera framgångsrika försök, även om kontaminering av ättiksyraproducerande bakterier varit problematisk.

Processimulering av en av Lantmännen Agroetanols produktionslinjer visade på en betydande positiv effekt för ett svampodlingssteg; 4 % mer etanol, en förbättring med 11 % av DDGS och en minskning av energianvändningen med 2,5 %. Att integrera vetekli i processen visade på en positiv ekonomisk effekt, även om det gav en betydande ökning av energianvändningen. En LCA (livscykelanalys) utförd av Lantmännen visade dessutom på en totalt sett positiv ändring av miljöpåverkan vid användning av *N. intermedia* för etanol- och svampmassa-produktion från tunndrank.

Summary

To use edible filamentous fungi in a biorefinery concept with ethanol as a main product has large potential advantages. Mainly it means that different substrates can be used and to a larger degree, while simultaneously a new valuable product in the form of protein-rich fungal biomass is produced.

Within this project, “edible” filamentous fungi classified as zygomycetes and ascomycetes have been used to develop the ethanol process with fungal biomass as a valuable product. Lignocelluloses with focus on agricultural waste and internal process flows at Lantmännen Agroetanol have been used. In total 32 zygomycetes strains associated with production of Indonesian tempeh and 4 edible ascomycetes strains have been used. Amongst the two best zygomycetes ethanol yields of 0.46-0.47 g/g could be achieved. The strains also had a tolerance towards inhibitors as good as a strain of flocculating *Saccharomyces cerevisiae* isolated from an ethanol production process based on rest-products from paper pulp production. From more complex/recalcitrant substrates, the ascomycetes were better suited, and *Neurospora intermedia* was the best from an ethanol production perspective. *N. intermedia* exhibited capability to degrade both hemicellulose (xylan) and cellulose (Avicel) in a synthetic medium.

The substrate that turned out to be the most interesting for industrial application was, and is, the internal process flow “thin stillage” at Lantmännen Agroetanol. Free access to the substrate, which amongst other things contain lignocellulosic residues from the bran fraction and ease of separation of the produced ethanol since the liquid is returned to Agroetanols process are two important reasons. Over 5 g/L ethanol, (corresponding to 5000 m³ pure ethanol per year in full scale process) have been achieved by the filamentous fungi *N. intermedia*. The trials have been scaled up at the University of Borås from lab scale to 26 and 1300 L bioreactors with both batch and continuous cultivation. At Lantmännen Agroetanol, the process has been further scaled up to 2,5 and 80 m³ bioreactors with several successful trials, although contamination with acetic acid producing bacteria have been problematic.

Process simulation of one of Lantmännen Agroetanols production lines showed a considerable positive effect for a fungal cultivation step: 4 % more ethanol, an improvement of 11 % for animal feed product, and a reduction in energy usage by 2.5 %. To integrate wheat bran into the process also showed a positive economic effect, although it caused a considerable increase in energy usage. A life cycle analysis (LCA) carried out by Lantmännen also showed a net positive effect on the environment for application of *N. intermedia* for production of ethanol and fungal cellmass from thin stillage.

Inledning

Forskargruppen i detta projekt har arbetat med filamentösa svampar (zygomyceter och ascomyceter) för etanolframställning sedan 1999 och är troligen den ledande gruppen i världen när det gäller utveckling av applikationer av dessa svampar. Vi har utvecklat olika aspekter av ett svamp-baserat bioraffinaderi och det nuvarande projektet är en naturlig fortsättning av detta. Flera ätbara etanolproducerande stammar bland zygomyceter och ascomyceter har redan identifierats. Deras tillväxt på en mängd olika cellulosebaserade material, jordbruks- och verksamhetsavfall har undersökts, deras morfologi har undersökts och deras tolerans mot inhibitorer i lignocellulosebaserade hydrolysater har studerats. Parallellt med detta utvärderades bl a en biologisk superabsorbent och fiskfoder baserat på cellmassa från zygomyceter. Gruppen har idag tillgång till flera stammar av ätbara svampar av zygomyceter som isolerats ur det indonesiska livsmedlet ”tempe” och dess förmåga att växa på drank har undersökts. Tunndranken går idag till industrier för att avdunsta vatten för recirkulering till processen, och en koncentrerad sirap som blandas med centrifugkakan efter destillationen. Blandningen torkas och säljs som djurfoder under beteckningen DDGS (Dried Distillers Grains with Solubles).

Mikroskopiska svampar kan påträffas naturligt över hela jordklotet och fullgör flera viktiga funktioner i naturen. De har även visat sig utföra flera viktiga uppgifter åt människan genom deras medverkan i produktionen av fermenterade maträtter som tofu, tempeh, och oncom som är populära i Sydostasien, och varit det i flera århundraden. Rätt arter kan därmed betraktas som GRAS (allmänt betraktas som säkra). De har generellt en snabb tillväxt och på grund av deras saprofytiska natur är de vana vid att assimilera flera olika sockerarter från stärkelse, cellulosa och hemicellulosa som t.ex. glukos, mannos, galaktos, xylos, arabinos och cellobios, samt andra råvaror som t.ex. glycerol som är en biprodukt vid framställning av biodiesel. Zygomyceter och ascomyceter kan producera ett brett spektrum av metaboliter och enzymer som bl.a. etanol, cellulasa och β -glukosidas. Detta innebär en ekonomisk fördel för processer där man använder dessa mikroskopiska svampar, eftersom de kan odlas direkt på lignocellulosa och restprodukter utan, eller med begränsad, tillförsel av enzymer. Vidare kan svampbiomassan användas som en viktig biprodukt från etanolproduktion, vilket ökar det ekonomiska värdet på hela processen. Exempelvis pågick ett projekt vid Iowa State University (USA) i syfte att förbättra kvaliteten på djurfodret som produceras från främst torrmalningsbaserade etanolprocesser. Mikroorganismen som används är zygomyceten *Rhizopus oligosporus*.

Projektets mål var att bidra till ökad kunskap inom etanolproduktion från lignocellulosa och ge möjligheter för ett ökat utnyttjande av råmaterialet genom att introducera filamentösa svampar till en process som tidigare endast använt jäst som tidigare visat sig fungera, men som inte utvecklats till fullo. Övergripande förväntas speciellt utnyttjandet av pentoser i halm och andra restprodukter samt den producerade svampbiomassan i processen ha stor potential för storskalig användning i jämförelse med vanlig etanolproduktion baserad på stärkelse från säd. I förlängningen kan användning av den i processen producerade

svampbiomassan få stor betydelse för kostnads-effektiviteten. Projektet är relevant för ett flertal olika industrier:

1. Svenska etanolproducenter baserade på säd, lignocellulosa, och olika avfall som kan tjäna på resultaten genom:
 - a. Fermentering med filamentösa svampar för etanolproduktion
 - b. Fermentering och assimilering av kvarvarande (pentos- och hexos-) socker i dranken eller andra processvatten.
 - c. Försäljning av den producerade svamp-biomassan
2. Jordbruks-, djurfoder och fiskfoder-industrier genom användandet av svamp-biomassan som foder, antingen som enda proteinkälla eller i blandning med andra material.
3. Hygien- och läkemedels-industrier genom integrering av biologiskt nedbrytbara superabsorbenter som kan produceras från cellväggsmaterialet, som ett substitut till nuvarande oljebaserade superabsorbenter.

Projektet utfördes i samarbete med Lantmännen Energi och Lantmännen Agroetanol. Projektet var tydligt förankrat i den egna organisationen då det var väl inom ett av Högskolan i Borås profilområden ”Resursåtervinning”. Samtidigt var det en tydlig fortsättning av tidigare forskning. Projektet anses främst ha kopplingar till följande miljömål; (1) Begränsad klimatpåverkan (genom produktion av bioetanol), och (10) Hav i balans samt levande kust och skärgård (genom användandet av svampbiomassan som t.ex. fiskfoder i stället för fiskmjöl).

Huvudresultat

Ätbara filamentösa svampar klassificerade som zygomyceter och ascomyceter har använts för att utveckla etanolprocesser med svampmassa som en värdefull foderprodukt från lignocellulosa med fokus på jordbruksavfall och interna processflöden hos Agroetanol. Totalt har 32 zygomycetstammar associerade med produktion av indonesiskt tempoh och 4 ätbara ascomycetstammar undersökts. Bland de två bästa zygomycetstammarna kunde etanolutbyten på 0,46-0,47 g/g erhållas med inhibitortolerans lika god som en industriell stam av flockulerande *Sacharomyces cerevisiae* från etanolproduktion av restprodukter från pappersmassaproduktion. Från mer komplexa/svårnedbrytbara substrat var ascomycetstammarna bättre lämpade, och *N. intermedia* var bäst ur ett etanolperspektiv. *N. intermedia* uppvisade förmåga att bryta ner både hemicellulosa (xylan) och cellulosa (Avicel) i syntetiskt medium.

Det substrat som visade sig vara mest intressant för industriell tillämpning var och är det interna processflödet tunndrank hos Lantmännen Agroetanol. Fri tillgång till substratet, som bland annat innehåller lignocellulosarester från klifractionen i Agroetanols råvara, och enkel separation av den producerade etanolen då vätskan går tillbaka till Agroetanols process är två viktiga anledningar. Över 5 g/L etanol, motsvarande 5000 m³ ren etanol/år, har erhållits med den ätbara filamentösa svampen *N. intermedia*. Försöken har skalats upp på Högskolan i Borås från labbskala till 26 samt 1,300 L bioreaktorer, i satsvis och kontinuerlig odling med utspädningshastigheter upp till 0,2 h⁻¹. Hos Lantmännen Agroetanol har processen skalats upp ytterligare till 80 m³ stor bioreaktor med flera framgångsrika försök, även om kontaminering av ättiksyraproducerande bakterier varit problematisk.

Processimulering av en av Lantmännen Agroetanols produktionslinjer visade på en betydande positiv effekt; 4 % mer etanol, en förbättring med 11 % av DDGS och en minskning av energianvändningen med 2,5 %. Att integrera vetekli i processen visade på en positiv ekonomisk effekt, även om det gav en betydande ökning av energianvändningen. En LCA (livscykelanalys) utförd av Lantmännen visade dessutom på en totalt sett positiv ändring av miljöpåverkan vid användning av *N. intermedia* för etanol- och svampmassa-produktion från tunndrank.

Måluppfyllelse

a) Hitta minst en ätbar zygomycet som kan producera etanol som huvudprodukt och kan vara jämförbar med bagerijäst

Totalt har 32 zygomycetstammar isolerats från blad som används vid produktion av indonesisk tempeh. I en första screening gav de olika stammarna etanolutbyten mellan 0,26 och 0,41 g/g glukos. De två mest lovande isolaten, RM3 och RM4 valdes sedan för ytterligare försök (Tabell 1).

Tabell 1: Metabolitutbyten för zygomycet-isolaten RM3 och RM4

Carbon source	Aeration condition	Ethanol (g/L)	Glycerol (g/L)	Xylitol (g/L)	Y_m ethanol (g/g glucose)	$Y_{ethanol}$ (g/g glucose)
RM3 ^a						
Glucose	Aerobic	20,32 ± 0,02	1,97 ± 0,00	0 ± 0	0,39 ± 0,01	0,38 ± 0,01
Glucose	Micro-aerobic	23,58 ± 0,44	1,88 ± 0,05	0 ± 0	0,47 ± 0,01	0,46 ± 0,00
Xylose	Aerobic	6,37 ± 0,28	3,31 ± 0,09	3,28 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,22 ± 0,00
Xylose	Micro-aerobic ^c	0 ± 0	0,12 ± 0,02	0,82 ± 0,14	0 ± 0	0 ± 0
Mixed sugars ^d	Aerobic	4,14 ± 0,01	0,15 ± 0,00	0 ± 0	0,28 ± 0,00	0,31 ± 0,06
Mixed sugars ^d	Micro-aerobic	4,61 ± 0,02	0,43 ± 0,00	0,13 ± 0,02	0,31 ± 0,00	0,38 ± 0,00
RM4 ^b						
Glucose	Aerobic	18,42 ± 0,01	1,83 ± 0,04	0 ± 0	0,37 ± 0,00	0,38 ± 0,02
Glucose	Micro-aerobic	22,85 ± 0,17	1,81 ± 0,21	0 ± 0	0,46 ± 0,00	0,47 ± 0,02
Xylose	Aerobic	5,62 ± 0,55	2,64 ± 0,91	3,64 ± 0,55	0,11 ± 0,01	0,19 ± 0,02
Xylose	Micro-aerobic ^c	0 ± 0	0 ± 0	0,24 ± 0,02	0 ± 0	0 ± 0
Mixed sugars ^d	Aerobic	4,02 ± 0,00	0,21 ± 0,00	0 ± 0	0,27 ± 0,02	0,31 ± 0,07
Mixed sugars ^d	Micro-aerobic	4,25 ± 0,02	0,33 ± 0,02	0 ± 0	0,28 ± 0,03	0,37 ± 0,03

Y_m metaboliskt etanolutbyte (baserat på konsumerade socker)

Y etanolutbyte baserat på initial sockerkoncentration

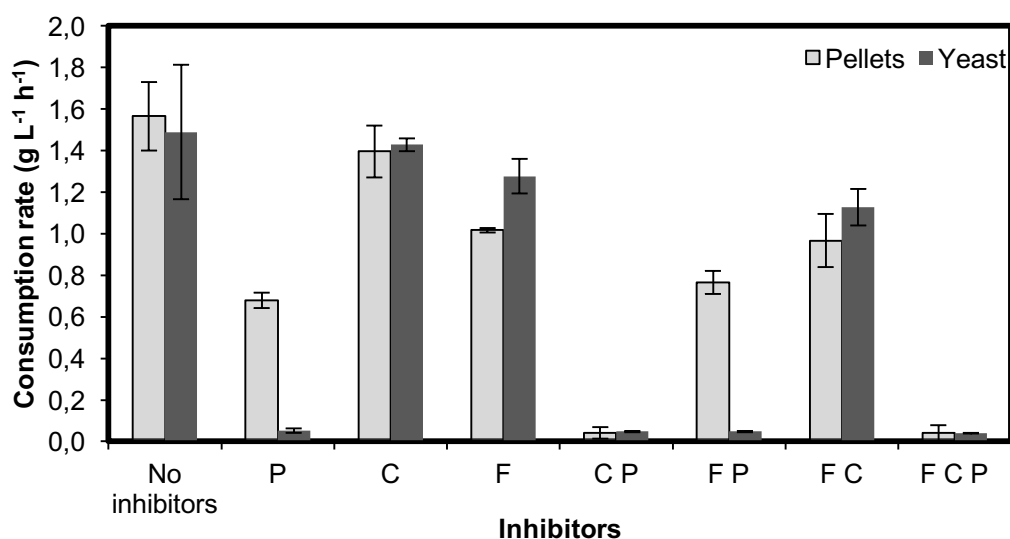
^a CCUG 61146

^b CCUG 61147

^c Mindre än 3 g/L xylos konsumerades

^d "Mixed sugars" innehåller (g/L) 2 cellobios, 4 glukos, 2 xylos, 1 arabinos, 1 galaktos, och 5 mannos

Toleransen mot inhibitorer för RM4 i pelletform jämfördes med flockulerande bagerijäst (*S. cerevisiae*). De tre huvudsakliga grupperna av lignocellulosarelaterade inhibitorer valdes: furaner, karboxylsyror och fenoliska föreningar. Zygomyceten visade sig ha bättre eller likvärdig motståndskraft mot de olika inhibitorerna (Fig 1). Även dess förmåga att omvandla vissa av inhibitorerna visades vara bättre än hos den flockulerande jästen (Tabell 2).



Figur 1: Glukosupptagshastighet för zygomycet i pelletform och flockulerande bagerijäst i närvaro av fenoliska föreningar (P), karboxylsyror (C), och furaner (F) och kombinationer av dessa.

Tabell 2: Omvandling av HMF (hydroxymetylfurfural) för zygomycet i pelletform (P) och flockulerande *S. cerevisiae* (Y) vid olika inhibitor-kombinationer.

Inhibitors		HMF conversion (%)		
		10 h	24 h	48 h
Furans	P	97.0 ± 4.2	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
	Y	71.9 ± 28.1	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
Furans, Phenolic compounds	P	91.1 ± 5.5	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
	Y	15.9 ± 8.1	38.1 ± 38.4	47.3 ± 37.1
Furans, Carboxylic acids	P	23.7 ± 26.2	94.1 ± 8.4	100.0 ± 0.0
	Y	43.6 ± 36.2	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
Furans, Carboxylic acids, Phenolic compounds	P	9.3 ± 13.2	19.6 ± 25.2	42.2 ± 62.7
	Y	1.7 ± 3.3	6.1 ± 8.7	10.5 ± 14.1

För att artbestämning de olika zygomycetstammarna användes ITS-PCR av ribosomalt DNA, med sekvensering av produkterna för jämförelse med NCBI/GenBank. Av stammarna identifierades 18 som *Rhizopus microsporus*, 5 som *Rhizopus oryzae* alternativt *Rhizopus delemar*, medan övriga inte gav någon PCR produkt och därmed inte kunde artbestämmas. Av stammarna identifierade som *R. microsporus* kunde hälften (9 st) växa vid 42 °C. Samtliga stammar kunde växa vid 37 °C.

b) Hitta minst en ätbar svamp som kan växa på cellulosa

Bland de undersökta zygomycet-isolaten kunde ingen tillväxt på cellulosa bevisas. Däremot uppvisade ascomyceten *N. intermedia* en förmåga att bryta ner samtliga av de detekterade sockerpolymererna hittade i den fasta fasen i restprodukten tunndrank utan någon extern tillsatts av enzym (Tabell 3).

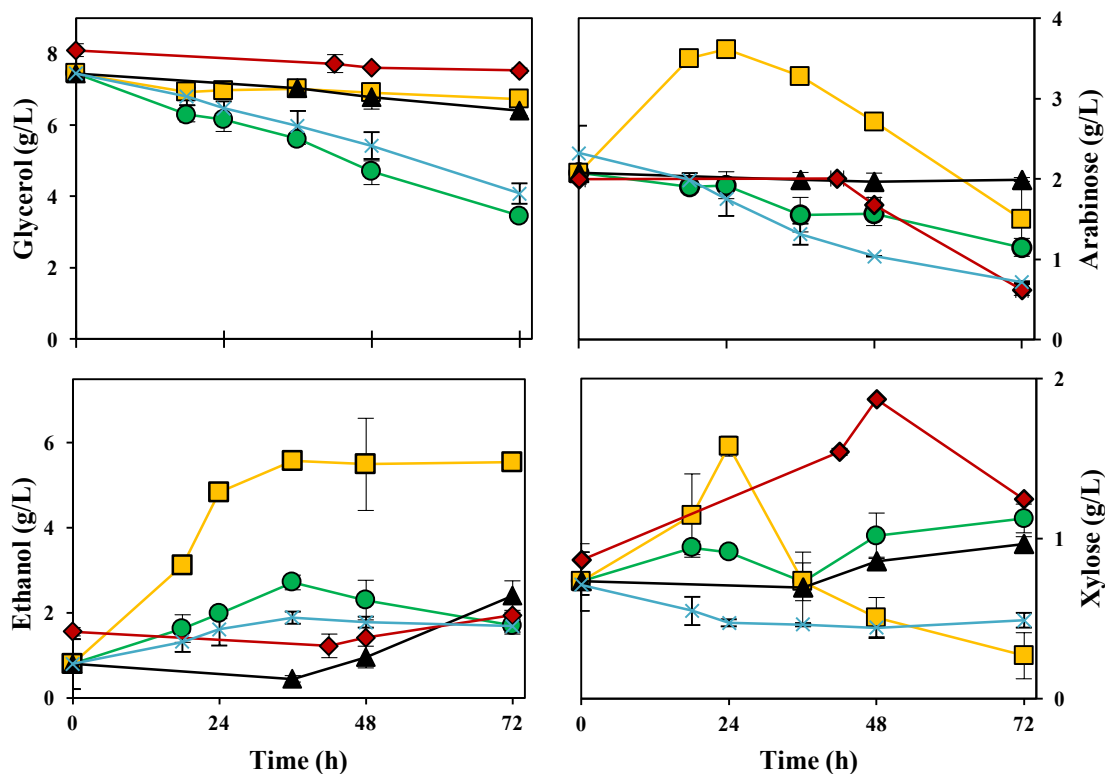
Tabell 3: Koncentration (g/L) av sockerpolymerer i den fasta fraktionen av tunndrank före odling och efter 48 h odling med *N. intermedia*.

	Före	Efter
Arabinan	0,104 ± 0,044	0,018 ± 0,00
Galaktan	0,178 ± 0,026	0,054 ± 0,00
Glukan	2,641 ± 0,681	1,149 ± 0,38
Mannan	0,391 ± 0,109	0,097 ± 0,02
Xylan	0,560 ± 0,020	0,049 ± 0,01

Vid försök på rena substrat med *N. intermedia* kunde denna förmåga bekräftas. Både cellobios och xylos kunde utnyttjas som enda kolkällor i syntetiskt medium. Likaså kunde xylan användas av svampen som enda kolkälla med visuellt fullständig hydrolys och viss etanolproduktion med maxima efter 72 h. Även cellulosa som enda kolkälla, i form av Avicel, hydrolyserades i viss utsträckning med etanolproduktion detekterad efter 96 h. En mycket god förmåga att hydrolysera stärkelse identifierades också hos *N. intermedia*.

c) Producera etanol av ätbara svampar och optimera förhållandet i labbskala

Substratet med störst potential för användning i industriell skala var tunndrank, vilket därmed fick störst fokus. Zygomyceten *Rhizopus* sp. och ascomyceterna *N. intermedia*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium venenatum*, och *Monascus purpureus* jämfördes. Bäst lämpad för etanolproduktion var *N. intermedia* (Fig 2) som i labbskala producerade nästan 5 g/L etanol från tunndranken. *A. oryzae* producerade dock mer svampbiomassa, vilket ungefär motsvarade skillnaden i etanolproduktion arterna emellan. En sammanfattning av resultaten står att finna i Tabell 4. De angivna biomassavärdena innefattar även fasta partiklar associerade med filamenten, vilket gjorde värdena något överskattade.



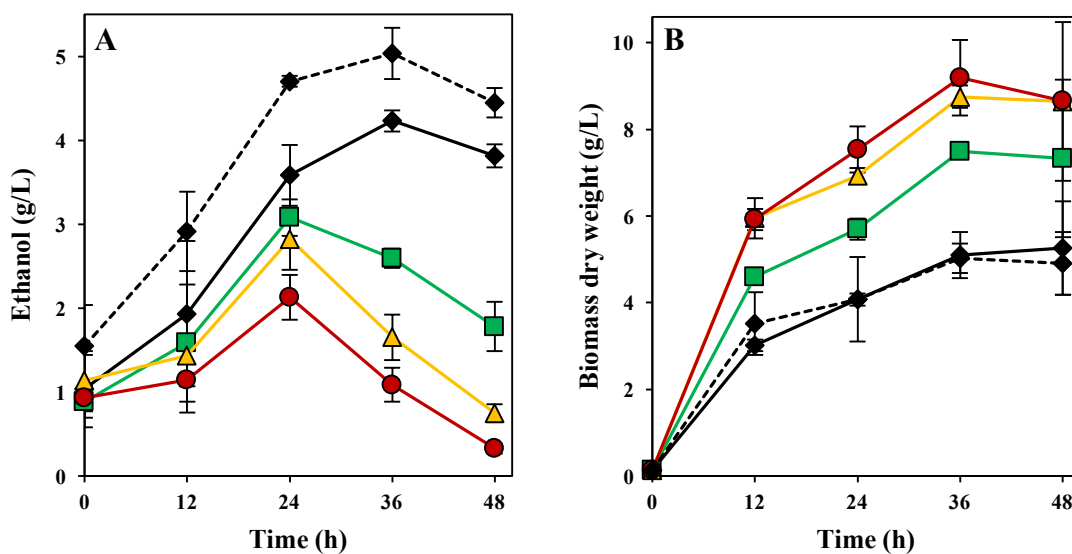
Figur 2: Koncentration av glycerol, etanol, arabinos och xylos vid odling av ascomyceterna *A. oryzae* (●), *N. intermedia* (■), *F. venenatum* (▲), *M. purpureus* (◆) och zygomyceten *Rhizopus sp.* (×) på tunndrank.

Tabell 4: Svampbiomassa (och viss mängd fasta partiklar) samt egenskaper hos tunndrank efter 96 h odling med zygomyceter eller 72 h odling med ascomyceter.

Fungal group	<i>Zygomycetes</i>		<i>Ascomycetes</i>		
Fungal Strain	<i>Rhizopus sp.</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>F. venenatum</i>	<i>M. purpureus</i>	<i>N. intermedia</i>
Fungal biomass					
Biomass dry weight (g/L)	15 ± 3	19 ± 1	14 ± 1	12 ± 2	16 ± 2
% Crude protein (g/g)	55 ± 1	48 ± 0	56 ± 0	44 ± 2	56 ± 3
AIM (mg/g)	145 ± 26	ND ^a	ND	ND	ND
GlcN (mg/g)	229 ± 94	ND	ND	ND	ND
GlcNAc (mg/g)	207 ± 59	ND	ND	ND	ND
Spent thin stillage					
pH	5.7 ± 0.4	6.0 ± 0.0	5.4 ± 0.1	5.5 ± 0.1	6.0 ± 0.1
Lactic acid reduction (%)	70 ± 4	0	0	0	0
Glycerol reduction (%)	68 ± 8	54 ± 0	14 ± 2	7 ± 1	10 ± 3
Ethanol (g/L)	2.0 ± 0.4	1.7 ± 0.2	2.4 ± 0.3	1.9 ± 0.1	5.5 ± 0.1
Xylose (g/L)	0.3 ± 0.0	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.0	1.2 ± 0.0	0.3 ± 0.1
Arabinose (g/L)	0.8 ± 0.1	1.2 ± 0.1	2.0 ± 0.0	0.6 ± 0.1	1.5 ± 0.4
TS reduction (%) ^b	20 ± 6	32 ± 1	21 ± 3	16 ± 5	34 ± 9
SS reduction (%) ^c	37 ± 15	55 ± 6	40 ± 1	58 ± 4	69 ± 20

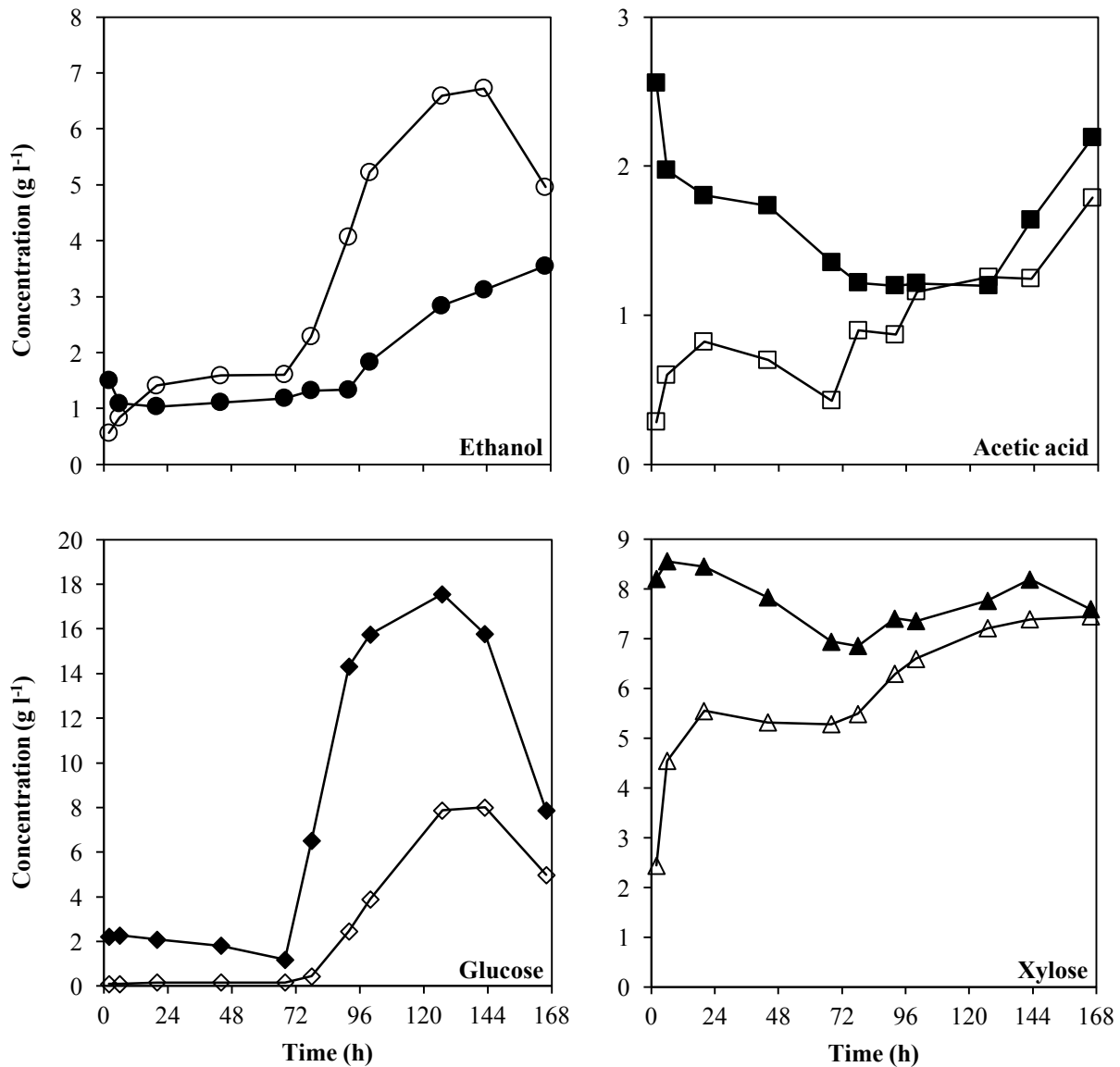
^aND – not determined; ^bTS – Total solids; ^cSS – Suspended solids

Då *N. intermedia* uppvisade bäst egenskaper för etanolproduktion valdes den för vidare försök. Då processen kräver viss mängd tillförsel av syre för att gå bra undersöktes processen ytterligare i en 26 L airlift/bubbel-kolonn med varierad luftning (Fig 3). En viktig slutsats från försöken var att ingen markant skillnad uppmättes mellan airlift och bubbelkollon, vilket innebär att en enklare reaktordesign kan användas vid uppskalning. En annan viktig upptäckt var att vid luftning av ≥ 1 vvm började etanolkoncentrationen att minska efter 24 h, vilket kan ha varit en kombination av avdunstning och etanolkonsumtion av den filamentösa svampen.



Figur 3: Etanol- (A) och svampbiomassa-koncentrationer (B) under odling i 48 h med *N. intermedia* i en airlift (heldragen linje) och en bubbel-kolonn (streckad linje) med 0,5 (♦), 1 (■), 1,5 (▲) och 2 (●) vvm (volym per volym per minut) luftning.

En process som utnyttjade både filamentösa svampar och SSFF (Simultan Sackarifiering Filtrering och Fermentering) där hydrolys och fermentering sker samtidigt i två olika men kommunicerande kärl har även utvecklats under projektet gång. Beroende på processförhållandena har etanolutbyten på 0,40 g/g och biomassautbyten på 0,34 g/g konsumerade monosackarider och ättiksyra uppnåtts. Som substrat användes vetehalm förbehandlad vid SEKAB. Inga problem med fouling av membranet som användes för att separera partiklarna från vätskan mellan de båda reaktorerna detekterades under försök som kunde pågå upp till 168 h.

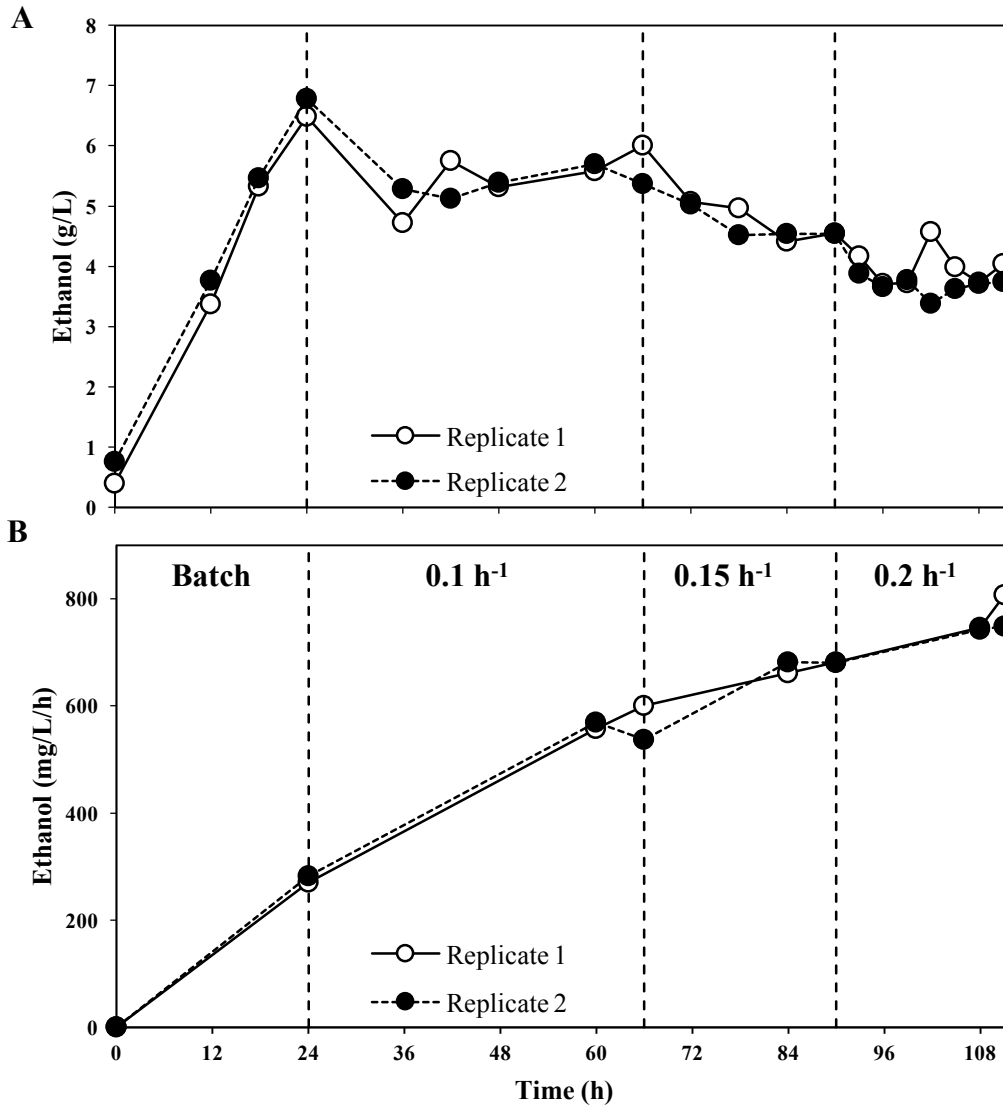


Figur 4: SSFF med zygomyceten *Rhizopus* sp. med förbehandlad vete-halm som substrat. Svarta markörer representerar flödet från hydrolysreaktorn och vita markörer representerar flödet från fermentationsreaktorn. Försöket påbörjades aerobt utan cellulas. Efter 72 h tillsattes cellulas och luftningen stängdes av.

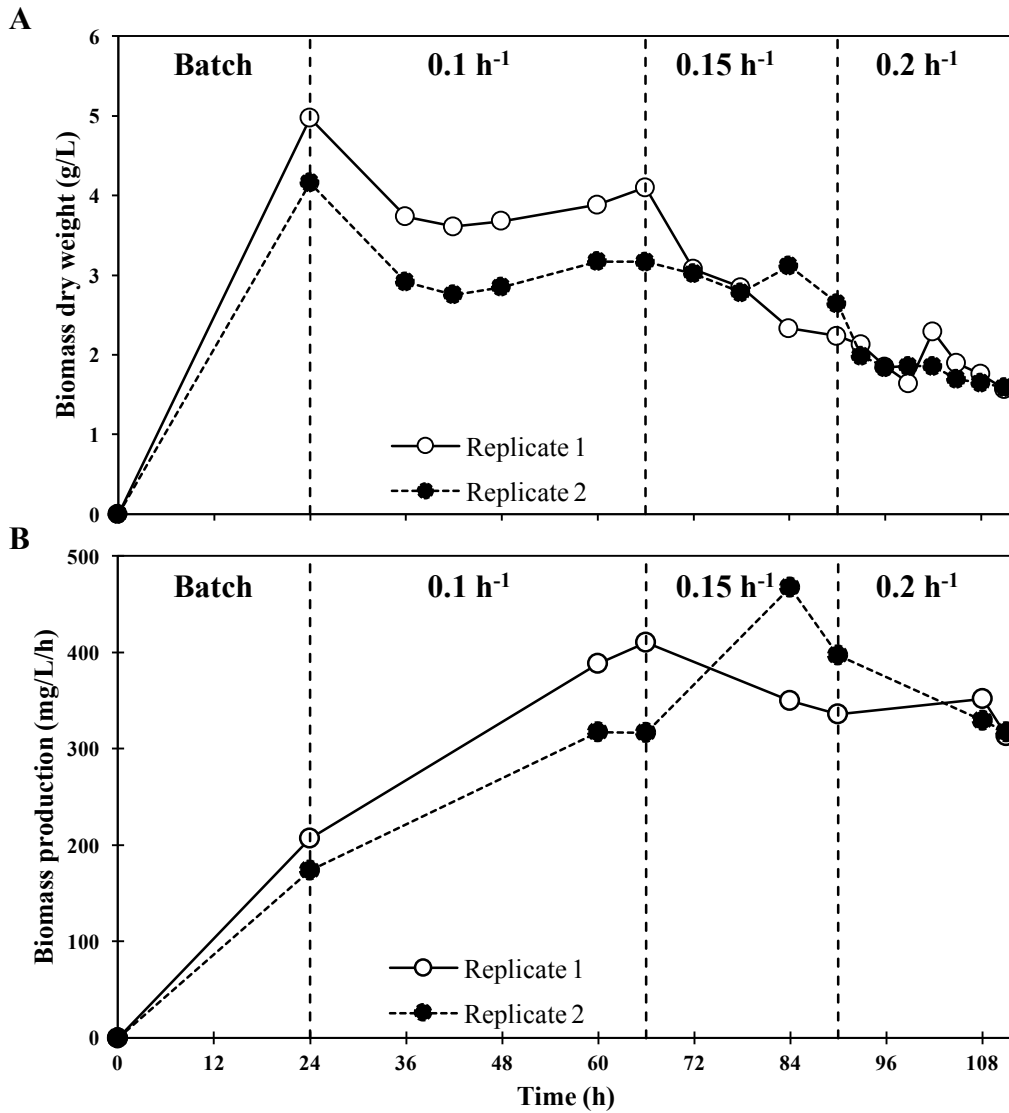
d) Producera etanol och svamp-massa av svenska jordbruksavfall och processströmmar från etanolprocesser hos Lantmännen Agroetanol

Process-strömmen med tunndrank hade fortfarande en mycket god potential för industriell applicering efter optimering och undersöktes därmed ytterligare för produktion av etanol och svamp-massa. Detta gjordes under kontinuerlig odling med *N. intermedia* i en 26 L bioreaktor i bubbelkolonnkonfiguration med 0,5 vvm luftning. Processen kunde utföras med utspädningshastigheter upp till 0,2 h⁻¹ utan att den ätbara svampen tvättades ur bioreaktorn. Den högsta etanolhalten (5,1 g/L)

erhölls vid den lägsta utspädningshastigheten, $0,1 \text{ h}^{-1}$, medan den högsta produktionshastigheten av etanol ($778 \pm 59 \text{ mg/L/h}$) erhöills vid den högsta utspädningshastigheten på $0,2 \text{ h}^{-1}$ (Fig 4). Biomassaprodukten följde samma trender, där den högsta koncentrationen på $3,6 \text{ g/L}$ erhöills vid utspädningshastigheten $0,1$ (Fig 5) och hade ett råproteininnehåll på 50% . Ytterligare information om svampmassan återfinns i Tabell 5.



Figur 4: Etanolkoncentration (A) och etanolproduktion (B) under kontinuerlig odling med *N. intermedia* i tunndrank med utspädningshastigheter på $0,10$, $0,15$ och $0,20 \text{ h}^{-1}$. Under de första 24 h kördes odlingen som batch.



Figur 5: Svampbiomassakoncentration (A) och svampbiomassaproduktion (B) under kontinuerlig odling med *N. intermedia* i tunndrank med utspädningshastigheter på 0,10, 0,15 och 0,20 h⁻¹. Under de första 24 h kördes odlingen som batch.

Tabell 5: Protein- och lipid-sammansättning för *N. intermedia* efter 48 h odling i bubbelkolonn och DDGS (distillers dried grains with solubles, från Lantmännen Agroetanol)

Component (mg/g)	DDGS ^{a)}	<i>N. intermedia</i>	Component (mg/g)	DDGS	<i>N. intermedia</i>
Protein content and amino acid profile			Lipid content and fatty acid profile		
Crude protein	514 ± 13	529 ± 65	Lipid	77 ± 2	116 ± 11
Alanine	20.2 ± 0.5	32 ± 4	C 14:0	ND ^{b)}	< 1
Ammonia	17.2 ± 0.4	13 ± 3	C 15:0	ND	< 1
Arginine	23.1 ± 0.6	29 ± 8	C 16:0	ND	24 ± 5
Aspartic	28.6 ± 0.7	39 ± 9	C 16:1 n-7	ND	< 1
Cysteine	11.1 ± 0.3	6 ± 1	C 17:0	ND	< 1
Glutamic acid	143.2 ± 3.6	52 ± 10	C 17:1 n-7	ND	< 1
Glycine	19.3 ± 0.5	22 ± 6	C 18:0	ND	4 ± 0
Histidine ^{c)}	11.2 ± 0.3	12 ± 3	C 18:1 n-9	ND	18 ± 1
Isoleucine ^{c)}	21.8 ± 0.6	21 ± 7	C 18:2 n-6	ND	55 ± 4
Leucine ^{c)}	37.7 ± 1.0	32 ± 10	C 18:3 n-3	ND	5 ± 0
Lysine ^{c)}	15.7 ± 0.4	33 ± 9	C 20:0	ND	< 1
Methionine ^{c)}	8.4 ± 0.2	8 ± 3	C 20:1 n-9	ND	< 1
Ornithine	0.3 ± 0.0	6 ± 1	C 20:2 n-6	ND	< 1
Proline	46.0 ± 1.2	19 ± 3	C 22:0	ND	< 1
Phenylalaline ^{c)}	25.2 ± 0.6	18 ± 6	C 24:0	ND	< 1
Serine	26.2 ± 0.7	21 ± 5	C 24:1 n-9	ND	< 1
Threonine ^{c)}	16.8 ± 0.4	21 ± 5			
Tryptophan ^{c)}	5.7 ± 0.1	7 ± 2			
Tyrosine	18.1 ± 0.5	15 ± 4			
Valine ^{c)}	26.1 ± 0.7	27 ± 9			

e) Vidareutveckla samjäsning mellan svampar och bagerijäst

Zygomyceter och bagerijäst har tidigare visats kunna samjäsa, vilket öppnat för möjligheten att utnyttja fördelarna med båda typerna av organismer samtidigt. Ett första steg var att få svampen att växa som pellets. Ett flertal olika faktorer undersöktes, vilket resulterade i följande sannolikhetsmodell för *Rhizopus* sp. att producera pellets:

$$P(\text{pellet}) = \frac{1}{1 + e^{-x'\beta}}$$

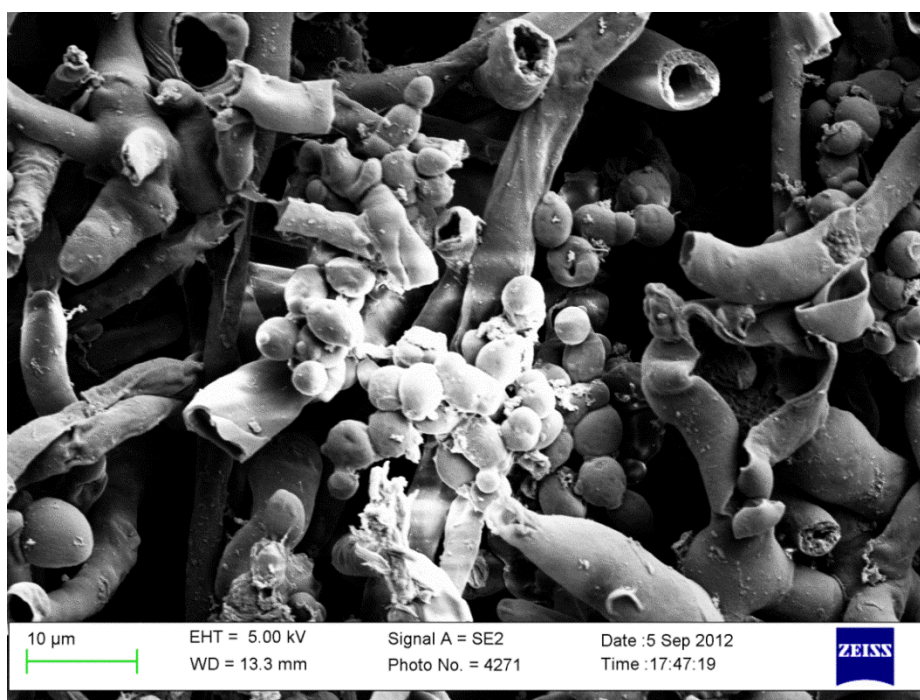
$$x'\beta = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_4x_4 + \beta_6x_6^2$$

Konstanterna är redovisade i Tabell 6.

Tabell 6: Logistiska regressionsvärden. Coef är koefficienten som används för sannolikhetsfunktionen, SE Coef är dess standardfel, Z är koefficientens standardiserade värde, och p är sannolikhetsvärdet. Koefficienten ansågs vara signifikant om dess p-värde var mindre än 0,05.

Predictor	Coef	SE Coef	Z	p	Low level (-1)	Center level (0)	high level (+1)
Constant	3,304	1,046	3,16	0,002			
Temp	1,512	0,474	3,19	0,001	25 °C	30 °C	35 °C
Agitation	-1,26	0,448	-2,81	0,005	120 rpm	155 rpm	190 rpm
Calcium	1,26	0,448	2,81	0,005	3,4 mg/l	2,5 g/l	5,0 g/l
Particles	-0,984	0,42	-2,35	0,019	0 g/l	1,0 g/l	2,0 g/l
pH	0	0,379	0	1	4,0	5,0	6,0
pH*pH	-5,189	1,201	-4,32	0	4,0	5,0	6,0

Flockulerande bagerijäst (*S. cerevisiae*) kunde sedan immobiliseras i pellets av *Rhizopus* sp. (en så kallad biokapsel) genom att först använda en kolkälla som endast var tillgänglig för den filamentösa svampen och sedan använda en kolkälla tillgänglig för båda arterna. Bagerijästen var sedan omöjlig att tvätta ur biokapseln, vilket kan förklaras med att jästen verkade fäst sig på den filamentösa svampen (Fig 6).



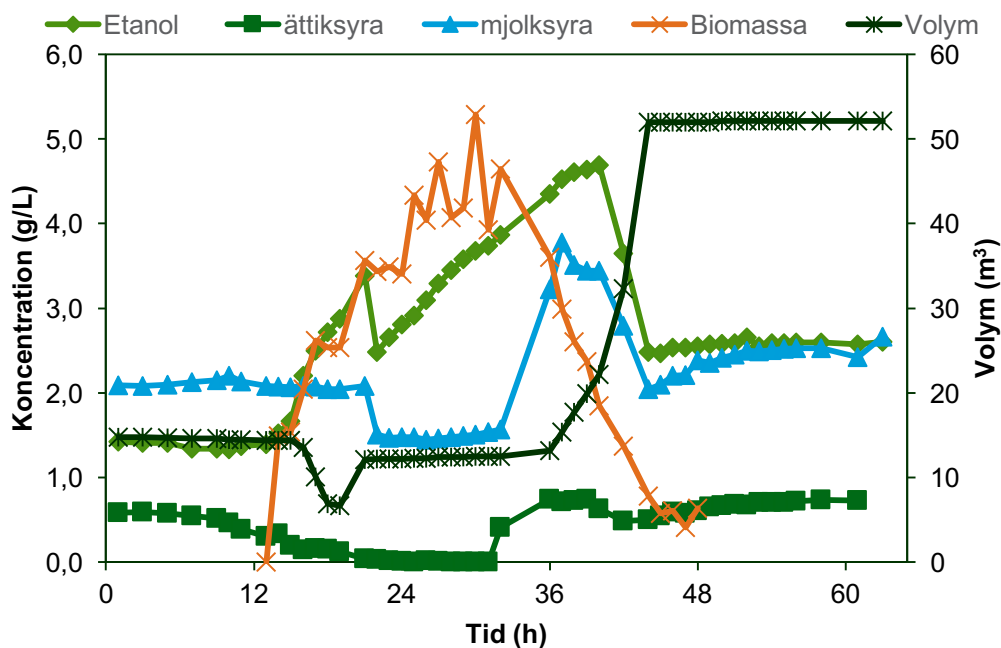
Figur 6: Elektronmikroskopbild av ett tvärsnitt av en biokapsel bestående av den filamentösa svampen *Rhizopus* sp. och flockulerande *S. cerevisiae*.

Samjäsning i form av biokapslar bestående av *Rhizopus* sp. och *S. cerevisiae* undersöktes även både i semi-syntetiskt medium och lignocellulosa-hydrolysat. Inga direkta fördelar jämfört med monokulturer upptäcktes dock.

f) Producera etanol av valda råvaror med bästa svampen i pilotskala hos HB, PDU i Lund eller Lantmännen Agroetanol

Försöken med *N. intermedia* med tunndrank som substrat utfördes först i 2,5 m³ och sedan i en bioreaktor på 80 m³ vid Agroetanols fabrik i Norrköping. Totalt har 23 stycken odlingar genomförts i pilotskala. Resultat från odlingar visade på etanolkoncentrationer över 5 g/L (upp till 9 g/L har uppnåtts) och mängd tvättad biomassa på något lägre nivåer vid lyckad odling.

Vid uppskalning till pilotskala har de största problemen varit att hålla kontroll på de ättiksyraproducerande bakterierna. Då processen är aerob är förloppet väldigt snabbt om tillväxt av dessa bakterier påbörjas vilket yttrars genom produktion av ättiksyra. En tillväxt av dessa bakterier påverkar såväl produktionen av etanol som biomassa (Fig 7).

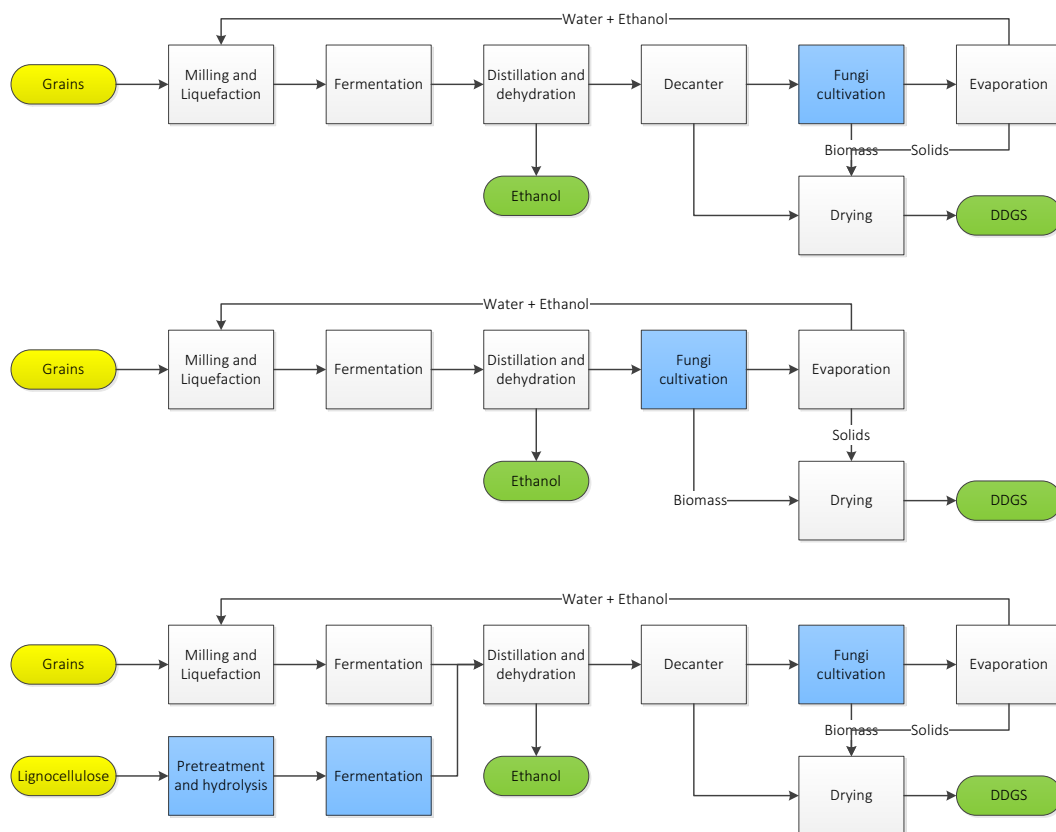


Figur 7: Odling av *N. intermedia* på tunndrank i en 80 m³ bioreaktor.

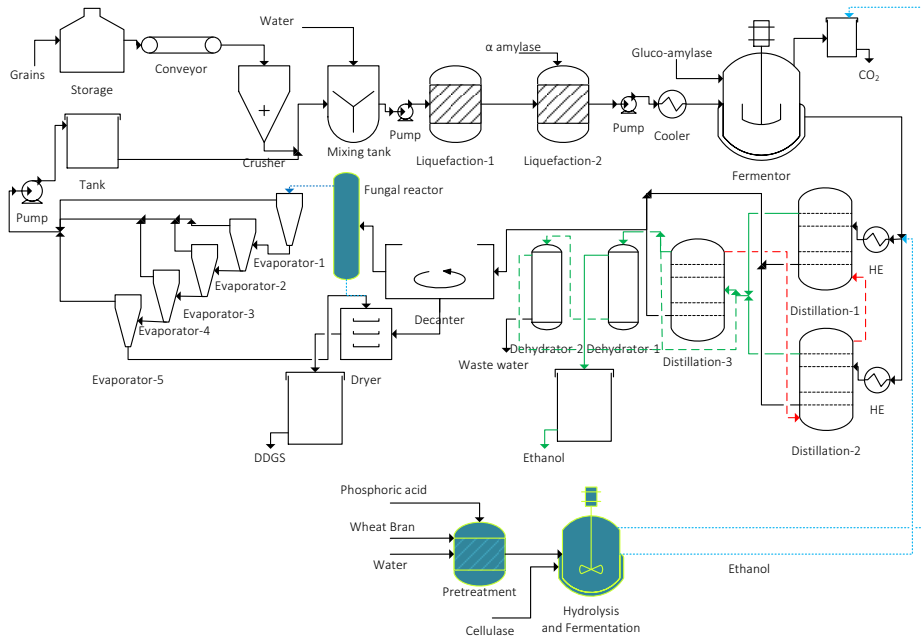
N. intermedia har också odlats i en 1300 L bioreaktor på Högskolan i Borås med förbehandlad vetekli som substrat. Vid en substratkoncentration på 5 % och 4 FPU cellulas/g SS (suspended solids) kunde 8,5 g/L etanol produceras och infektion av bakterier kontrolleras. I förlängningen ger detta möjligheten till att även inkludera vetekli i processen.

g) Genomföra en ekonomisk beräkning för integrering av svampar i etanolprocesser

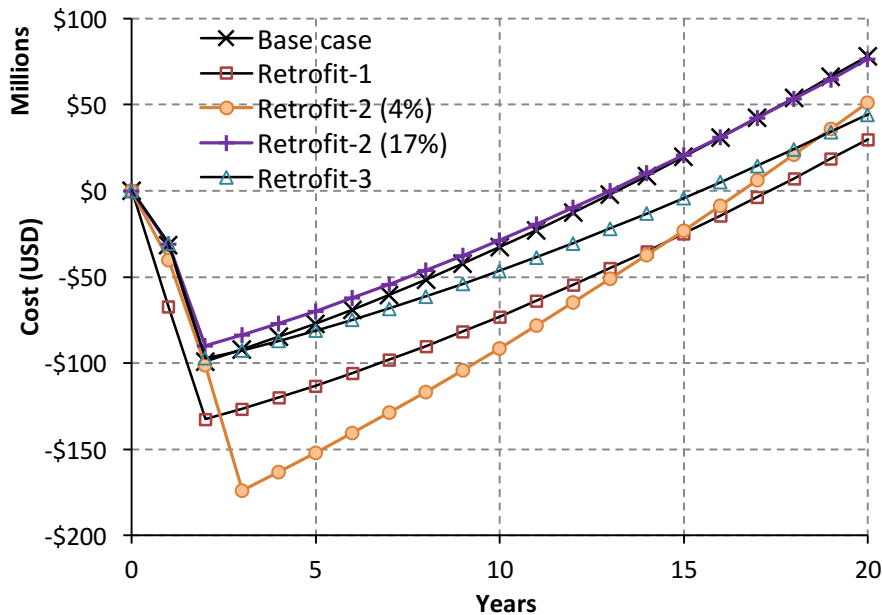
Som ett första steg simulerades den nuvarande etanolprocessen i Aspen Plus (baserat på Lantmännen Agroetanol linje A10), och olika processmodifikationer undersöktes (Fig 8 och 9). Mest uppenbart var vikten som DDGS spelar för processekonomin. Om koncentration av etanol i fermentorn minskar så ökar all utrustning kraftigt i storlek vilket leder till höga initiala investeringsbehov. Detta leder dock också till mer DDGS, vilket ger ett högre ackumulerade nettovinst "net present value" (NVP) än att minska etanolkoncentrationen till 93 % från 99,5 % och därmed inte behöva dehydrera destillatet, eller att omvandla dranken till biogas. Att konvertera dranken till biogas är energieffektivt, men NVP påverkas negativt då mängden DDGS tillgänglig för försäljning minskar. Att öka etanolhalten till 17 % i fermenteringen kan leda till mer etanol, men leder också till en minskad mängd DDGS och en totalt sett ingen signifikant skillnad i processekonomin. Samtliga ändringar av processen visade att den nuvarande processen troligen är det bästa alternativet (Fig 10).



Figur 8. Blockflödesschema över de föreslagna ändringarna i den första generationens etanolproduktion.

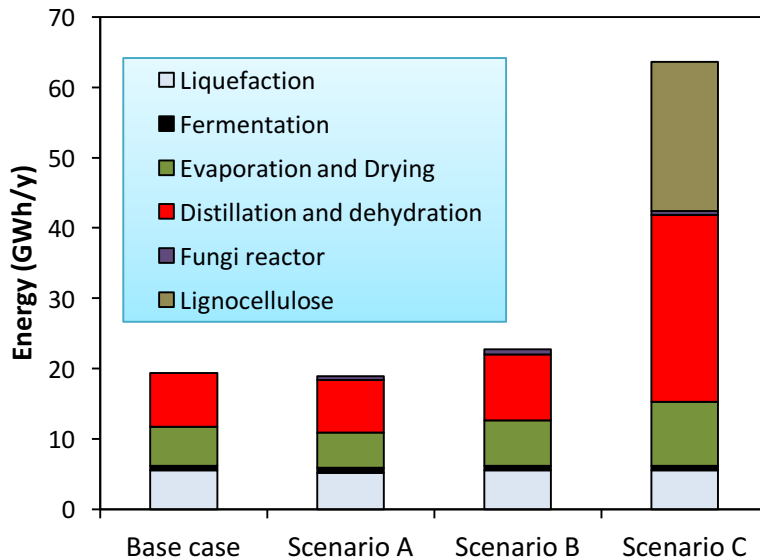


Figur 9. Processflödesschema över den integrerade lignocellulosa till tunndranken modifierade första etanolproduktion. De modifierade enhetsoperationer från basfallet är markerade i färg.



Figur 10: Penningflöde för olika processändringar i den nuvarande bioetanolprocessen. De olika alternativen inkluderar att exkludera dehydringssteget och sälja till billigare pris (retrofit 1), att minska etanoltoleransen till 4 % (retrofit 2, 4 %), att öka etanoltoleransen till 17 % (retrofit 2, 17 %) och att producera biogas från dranken (retrofit 3). Ursprungsläget (base case) baserat på Lantmännen Agroetanol's process.

Att inkludera filamentös svamp i processen visade att energianvändningen kunde minskas medan processekonomin förbättras då delar av tunndranken omvandlas till etanol och svampmassa. Att använda den ätbara filamentösa svampen resulterade i 4 % mer etanol och en förbättring med 11 % för DDGS. Detta resulterade också i att den totala energianvändningen kunde minskas med 2,5 %. Att integrera vetekli i processen visade på en positiv processekonomisk ändring. Dock var energibehovet betydande (Fig 11).



Figur 11: Energianvändning för bioetanolprocessen vid olika konfigurationer: svampodling på tunndrank (A), svampodling på heldrank (B), och integrering med produktion från lignocellulosa (C)

h) Genomföra en livscykelanalys för integrering av zygomyceter i etanolprocesser

En LCA från råvara till färdig produkt för konsumtion har genomförts för processkonceptet (Tabell 7). Beräkning är genomförd enligt de lagkrav som finns i RED-direktivitet (Renewable Energy Directive). Växthusgasbelastningen innehåller påverkan från odling, transporter och tillverkning. Anledningen till att växthusgasutsläppen ökar på etanolprodukten trots att en större mängd produceras av lika stor mängd råvara är att regelverket säger att växthusgasutsläppen måste allokeras proportionellt mot mängden av de produkter som används. Med en effektivare process och ökat utbyte måste därigenom större växthusgasutsläpp från odling, transport och tillverkning allokeras till etanolprodukten. Sett till både etanol och foderprodukt så ger processen upphov till en förbättring då belastningen på djurfodret sjunker mer än vad den ökar på etanolen.

Tabell 7: Resultat från LCA för användning av *N. intermedia* för etanol och svampbiomassa-produktion från tunndrank jämfört med den nuvarande processen hos Lantmännen Agroetanol.

Energi	NU-läge	Ascomycet- produktion
Klimatprestanda, etanol	1,3	1,7 g CO ₂ eq/MJ
Klimatprestanda, DDGS	15,8	14,3 g CO ₂ eq/MJ
Klimatprestanda, Fungi		14,3 g CO ₂ eq/MJ
Klimatprestanda, DDGS	252,4	229,2 g CO ₂ eq/kg foder
Klimatprestanda, Fungi		229,2 g CO ₂ eq/kg foder
Klimatprestanda, DDGS	876,4	795,8 g CO ₂ eq/kg protein
Klimatprestanda, Fungi		795,8 g CO ₂ eq/kg protein
Växthusgasförbättring, etanol	98,5%	Jämfört med bensin (83,8 g CO ₂ eq/MJ EtOH)
Växthusgasförbättring, DDGS och Fungi	84,2%	Jämfört med sojamjöl som proteinråvara (2500 g CO ₂ eq/kg sojamjöl)

I det rapporterade fallet har faktiska siffror för växthusgasutsläpp på produkter från Lantmännen Agroetanol använts. Vid applicering i produktionsprocess med en högre klimatbelastning blir utseendet motsvarande fast med ännu större ökning på etanol och minskning på foder.

Målgrupp och deltagande

Huvudsaklig målgrupp för projektet är svensk etanolindustri. Som representant för denna, och största aktör inom landet, har Lantmännen Agroetanol (och Lantmännen Energi) varit med i projektets ledningsgrupp som haft möten i genomsnitt varannan månad under projektets gång. Även andra intressenter som foderindustrin (Lantmännen lantbruk) och Biorefinery Demo Plant har deltagit. I övrigt har informationen från projektet spridits via publikationer i internationella vetenskapliga tidsskrifter, där projektet även kommer resultera i några publikationer till som i skrivandets stund inte hunnit gå igenom peer-review och publicering.

Effekter i samhället

Projektet har visat sig synnerligen intressant för vidareutveckling av processen hos Lantmännen Agroetanol. Pilotförsök, med tunndrank som substrat, har

påbörjats i slutet av 2014 i en 80 m³ bioreaktor hos Agroetanol, betalda och utförda av företaget. Försöken har fortsatt under 2015 med det uttalade målet att nå en reaktorvolym på 1000 m³ under året. Med en fullt integrerad process förväntas Lantmännen Agroetanols produktion öka med ca 3-5 %, motsvarande 5 000-8 000 m³ ren etanol om året, samtidigt som en ny högkvalitativ foderprodukt skulle produceras.

I övrigt har färdigställda resultat publicerats i internationella tidsskrifter och konferenser.

Genomförande

Projektet har delats upp i 5 olika delmoment baserat på de olika projektuppgifterna som utförts enligt arbetsplanen. I korthet har försök påbörjats i bänkskala vid Högskolan i Borås för att skala upp den bästa processen till en pilotreaktor på 80 m³ hos Lantmännen Agroetanol.

Möten inom styrgruppen har skett i genomsnitt varannan månad under projektets gång.

Isolering av ätliga etanolproducerande svampar

Användning av filamentösa svampar innebär stora möjligheter för att utveckla etanolprocesser. Det innebär även vissa risker, då många olika filamentösa svampar kan producera giftiga substanser, mykotoxiner. Då nuvarande etanolprocess även producerar djurfoder måste detta naturligtvis undvikas till varje pris. För att uppfylla detta har endast filamentösa svampar som är bekräftat ofarliga, då de använts för produktion av maträtter, använts.

I det första steget togs 32 isolat av filamentösa svampar fram från blad (laru och usar) som används för produktion av maträtten tempeh i Indonesien. Dessa utvärderades sedan i skakflaskor för produktion av etanol, mjölksyra, glycerol, biomassa, protein och kitosan, samt förmåga att bryta ner mer komplexa substrat som cellulosa. De två bäst lämpade isolaten undersöktes sedan ytterligare med bl.a. olika blandningar av socker och vid olika process-förhållanden. Även motståndskraft mot de tre huvudsakliga grupperna av inhibitorer från lignocellulosa; fenoliska ämnen, organiska syror, och furaner; samt kombinationer användes för utvärderingen av ett av isolaten.

För att artbestämning de olika zygomycetstammarna användes ITS-PCR av ribosomalt DNA, med sekvensering av produkterna för jämförelse med NCBI/GenBank. Även mer klassisk klassificering som temperaturtolerans användes för att artbestämma isolaten.

Även 4 matrelaterade ascomycetararter valdes ut från artkollektioner: *M. purpureus*, *A. oryzae*, *N. intermedia*, och *F. venenatum*.

Odling av ätliga svampar på cellulosa och biprodukter

Samtliga ascomyceter och den mest lovande zygomyceten undersöktes med den interna process-strömmen tunndrank från Lantmännen Agroetanols process i skakflaskor. Tunndrank innehåller både cellulosa- och fermentationsrester. Både den producerade svampmassan och den flytande fraktionen efter svampodlingen utvärderades. Svampen med sammanlagt bäst egenskaper (*N. intermedia*) undersöktes sedan för dess förmåga att använda hemicellulosa (xylan), cellulosa (avicel), stärkelse, och olika sockerarter som enda kolkälla i skakflaskor.

Då försöken med *N. intermedia* och tunndrank var ytterst intressanta för Lantmännen Agroetanol fortsattes undersökningen. Försöken skalades upp till en airlift-reaktor på 26 L och inverkan av olika luftning utvärderades. Bioreaktorn

omkonfigurerades även till en bubbelkolonn och jämfördes med airlift-konfigurationen. Bubbelkolonnen användes sedan för kontinuerlig odling av tunndranken med *N. intermedia* med retentionstider ner till 5 h.

Även heldrank, med en större mängd cellulosa-rester än tunndrank, undersöktes. Olika fraktioner utvärderades, och möjligheten att förbättra etanolproduktionen genom tillsatts av mindre mängder cellulas-cocktail (ner till 1 FPU/g Suspended Solids) undersöktes i skakflaskor. Även en tvåstegsprocess utvecklades i bioreaktorer i bänkskala, där etanol först produceras av *N. intermedia* och resterna omvandlas till ytterligare svampmassa av *A. oryzae*.

Ätbara filamentösa svampar användes också vid undersökning av mejerirester för produktion av bioetanol och svampmassa i skakflaskor och bioreaktorer i bänkskala.

Samjäsning av hydrolysat med zygomyceter och bagerijäst

Som ett första steg för samjäsning med zygomyceter och bagerijäst undersöktes vilka faktorer som påverkar svampen att bilda pellets i skakflaskor. Effekten av temperatur, omrörning, CaCl₂, Tween 80, sporkoncentration, närvaro av fasta partiklar, pH, volym, och deras interaktion togs hänsyn till. Processen vidareutvecklades för att skapa ”biokapslar”, där bagerijäst lever inuti pellets av filamentös svamp. Dessa användes sedan för att jäsa lignocellulosahydrolysat.

Ett system med SSFF (simultan sackarifiering, filtrering och fermentering) sattes också upp med två bioreaktorer i bänkskala för jäsning med ätbara filamentösa svampar av hydrolysat från vetehalm. Då biokapslarna (svamp och jäst) inte gav någon bättre jäsningsförmåga än renkulturer utvärderades även en process där jästen tillsattes till hydrolysreaktorn och svampen till det dedikerade jäsningskärlet.

Jäsning på storskala i airlift och/eller CSTR bioreaktorer

Totalt har över 20 odlingar genomförts på pilotskala hos Lantmännen Agroetanol. I optimeringssyfte har ett antal parametrar varierats såsom; pH, mängd ymp, lufttillsats, bakteriehämmande tillsats (ej antibiotikum), och tillsats av nytt substrat (fed-batch).

Försöken har utförts framförallt i en 80 m³ reaktor. Efter hygienisering av samtliga system har tunndrank tillsatts till tanken och pH justerats till 4,5-5,5. Vid rätt temperatur har sedan ymp tillsatts med en volym av 40-120 L. Produktionen av ymp har genomförts vid Högskolan i Borås för att sedan transporteras till Norrköping. Störst problem har visat sig vara kontaminering av ättiksyraproducerande bakterieter.

Efter och under genomfört försök har även den tillverkade svampmassan skördats med hjälp av en så kallad centrisil.

Försök med *N. intermedia* har även utförts i en airlift på 1300 L med förbehandlat vetekli som substrat för etanolproduktion. Möjligheten att bekämpa infektion under pågående odling undersöktes också.

Processimulering och ekonomiska beräkningar

Som ett första steg för processimulering byggdes ett "base case" med nuvarande process upp i Aspen Plus. Även påverkan av olika processförändringar utvärderades och inkluderade: ändring av etanolkoncentrationen i destillatet, ändring av de fermenterande mikroorganismernas etanoltolerans och att konvertera dranken till biogas för att täcka den interna energianvändningen. Etanolkoncentrationen minskades från 99,5 % till 93 % för att ta bort dehydringsbehovet. Etanolhalten för mikroorganismerna utvärderades vid 10 %, 4 % och 17 %. Genom att ändra dessa förhållanden kunde även vikten av produkten DDGS utvärderas och hur den påverkar hela processekonomin.

I ett andra steg användes resultaten från laboratorieförsöken. Ett svampodlingssteg lades till för tunndrank och heldrank, som resulterade i att dranken delvis omvandlades till etanol och svampbiomassa. Vidare lades ett processteg till där etanolproduktion från vetekli integrerades med den nuvarande processen. Både mass- och energi-balanser simulerades och effekten de olika ändringarna har på processekonomin beräknades.

En livscykelanalys baserad på de erhållna resultaten utfördes av Lantmännen enligt *ISCC 205 GHG Emissions calculation methodology and GHG audit v 2.3-EU* av ISCC.

Publiceringar

Följande peer-reviewed artiklar har publicerats inom projektet:

1. Wikandari, R., Millati, R., Lennartsson, P.R., Harayani, E. and Taherzadeh, M.J., *Isolation and characterisation of zygomycetes fungi from tempe for ethanol production and biomass applications*. **Appl Biochem Biotechnol**, 2012. 167(6): p 1501-1512.
2. Ferreira, J.A., Lennartsson, P.R., Edebo, L., Taherzadeh, M.J., *Zygomycetes-based biorefinery: present status and future prospects*, **Bioresour Technol**, 2013. 135(0): p 523-532
3. Nyman, J., Lacintra, M.G., Westman, J.O., Berglin, M., Lundin, M., Lennartsson, P.R., Taherzadeh, M.J., *Pellet formation of zygomycetes and immobilization of yeast*, **New Biotechnol.**, 2013. 30(5): p 516-522
4. Ferreira, J.A., Lennartsson, P.R., Taherzadeh, M.J., *Production of ethanol and biomass from thin stillage using food-grade Zygomycetes and Ascomycetes filamentous fungi*, **Energies**, 2014. 7(6): p 3872-3885
5. Ranejndran, K., Rajoli, S., Teichert, O., Taherzadeh, M.J., *Impacts of retrofitting analysis on first generation ethanol production: process design and techno-economics*, **Bioprocess Biosyst Eng**, 2015. 38(2): p 389-397

6. Ferreira, J.A., Lennartsson, P.R., Taherzadeh, M.J. *Production of ethanol and biomass from thin stillage by Neurospora intermedia: A pilot study for process deversification*, **Eng Life Sci**, 2015. DOI:10.1002/elsc.201400213
7. Bátori, V., Ferreira, J.A., Taherzadeh, M.J., Lennartsson, P.R., *Ethanol and protein from ethanol plant by-products using edible fungi Neurospora intermedia and Aspergillus oryzae*, **BioMed Res. Int.**, Article ID: 176371 *in press*

Projektet har även resulterat i följande ej ännu publicerade manuskript:

1. Rajendran, K., Rajoli, S., Taherzadeh, M.J., *Techno-economic analysis of integrating first and second generation ethanol production using filamentous fungi*, **submitted**
2. FazeliNejad, S., Ferreira, J.A., Brandberg, T., Lennartsson, P.R., Taherzadeh, M.J., *Fungal protein and ethanol from lignocelluloses by Rhizopus pellets under simultaneous saccharification, filtration and fermentation (SSFF)*, **manuscript**

Projektet har även resulterat i 2 doktorsavhandlingar som kommer försvaras:

1. Rajendran, K., *Industrial Bioprocess Developments for Biogas and Ethanol Production*, **Högskolan i Borås**, 2015-11-06
2. Ferreira, J.A., *Integration of filamentous fungi in ethanol dry-mill biorefinery*, **Högskolan i Borås**, 2015-11-13

Projektet har presenterats vid följande konferenser:

1. Ferreira, J., Lennartsson, P. R., Taherzadeh, M. J., *Partial or complete inclusion of Zygomycetes fungi in biorefineries*. **Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals 2013**, Portland, poster
2. Lennartsson, P. R., Taherzadeh M.J., *Zygomycetes fungi: A core of biorefineries*. **PYFF 2013**, Montpellier, poster
3. Ferreira, J. A., Lennartsson P. R., Taherzadeh, M. J., *Zygomycetes-based biorefineries*. **PYFF 2013**, Montpellier, poster
4. Ferreira, J.A., Lennartsson P.R., Taherzadeh, M.J., *Thin stillage utilization by edible Ascomycetes and Zygomycetes for an improved ethanol process*. **The sixth annual conference on the Challenges in Environmental Science and Engineering**, Daegu, 2013, muntlig presentation
5. Ferreira, J.A., Lennartsson, P.R., Taherzadeh, M.J., *Production of ethanol and biomass from thin stillage using edible Neurospora intermedia*, **16th European Congress on Biotechnology**, 2014

Även ett antal examensarbeten har producerats:

1. Jarneving, L., BSc: *Screening of exoenzymes from edible strains of zygomycetes*, **Högskolan i Borås** 2012

2. Lacintra, M., Nyman, J., MSc: *Co-cultures of yeasts and zygomycetes in the form of pellets*, **Högskolan i Borås** 2012
3. Jampana, V.S.N.R., Akula, S.B., MSc: *Edible fungi and bioethanol from lignocelluloses*, **Högskolan i Borås** 2012
4. FazeliNejad, S., MSc: *The effects of inhibitors on Zygomycetes and the application of SSFF*, **Högskolan i Borås** 2013
5. Mahboubi, A., MSc: *Dairy waste valorisation by means of edible filamentous fungi*, **Högskolan i Borås** 2015