



University of Applied Sciences

Optimierung von Hefestämmen zur Ethanol- Produktion der 2. Generation

Heike Kahr, Sara Helmberger und Alexander Jäger
Arbeitsgruppe Bioethanolics



Biokraftstoffe der 2. Generation

Rohstoffe Zellulose-Anteile von Pflanzen, z.B.
Stroh, Gräsern und Holz



University of Applied Sciences

Einsatz von Stroh in Österreich:

Einstreu

Rückdüngung am Feld

Strohverbrennung

Dämmstoff

Strohmulch

Verfügbares restliches Stroh:

Ca. 1 Millionen Tonnen





Chancen

- Intakte Landwirtschaft
- Genügend Niederschläge
- Österreich könnte unabhängiger von Erdöl werden
- Keine ethische Diskussion: „Lebensmittel für Treibstoff“
- Kauf der FFVs ist möglich und ist mit SuperEthanol E85 oder Superbenzin tankbar
- Tankstellennetz ist in Österreich im Aufbau



Geschichte:

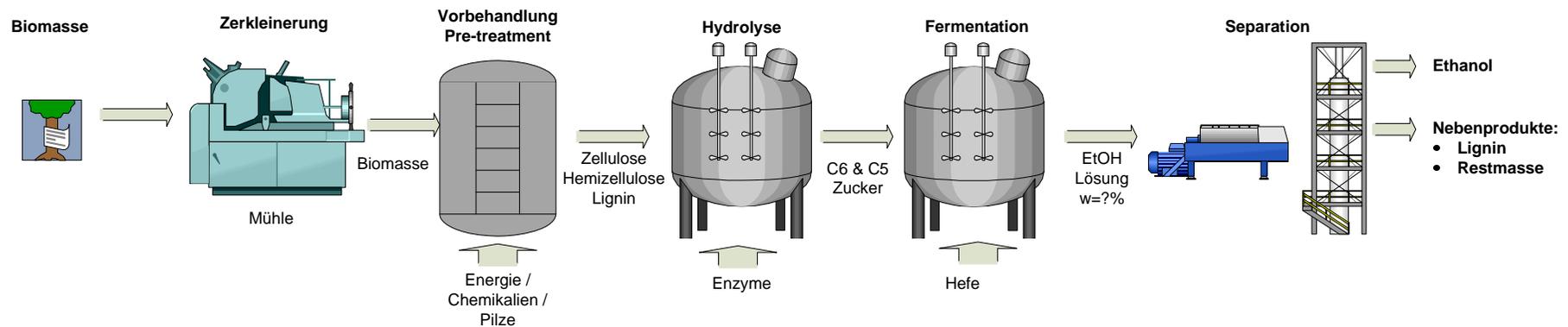
Bereits 1988 wurde eine Pilotanlage zur Gewinnung von Bioethanol aus Stroh im Technikum der VOEST Linz errichtet.

Leider wurde das Projekt wieder eingestellt.





Bioethanol Prozess



F&E Schwerpunkte:

Aufschluss:

1. Simultane C₅ & C₆ Fermentation
2. Erhöhung der EtOH Konzentration

Strategien für Nebenprodukte

Verfahrensvarianten:

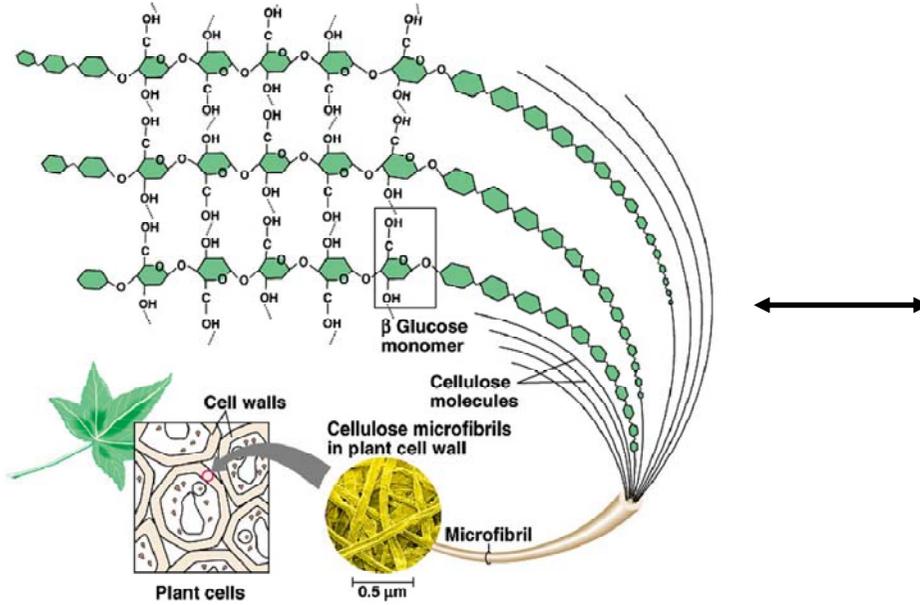
SHF – Separate Hydrolyse und Fermentation

SSF – Simultane Verzuckerung und Fermentation vom C₆

SSCF – Simultane Verzuckerung und Cofermentation von C₆ & C₅



Aufbau Cellulosefibrillen



Steam Explosion

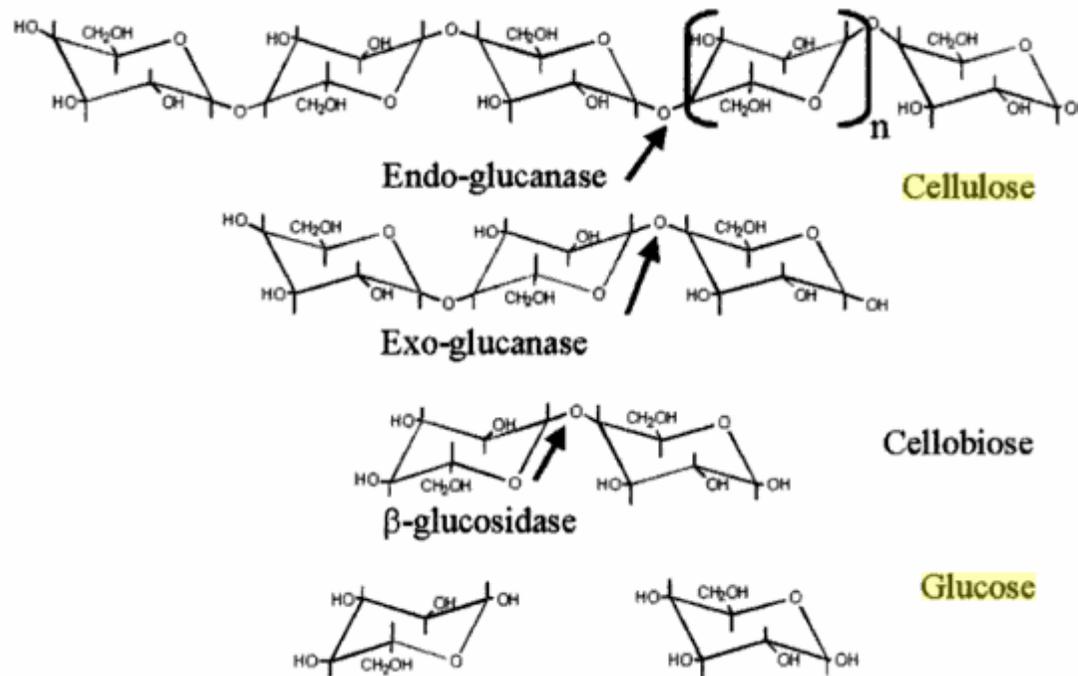


University of Applied Sciences





Hydrolyse mit dem Enzymkomplex Cellulase

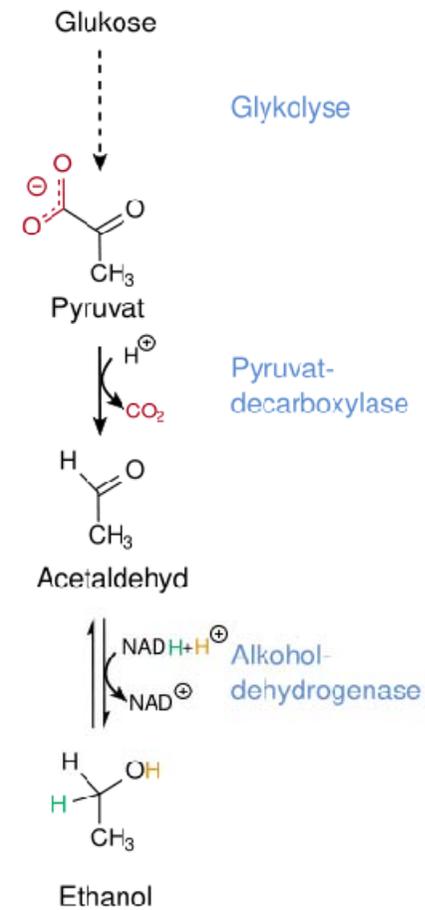
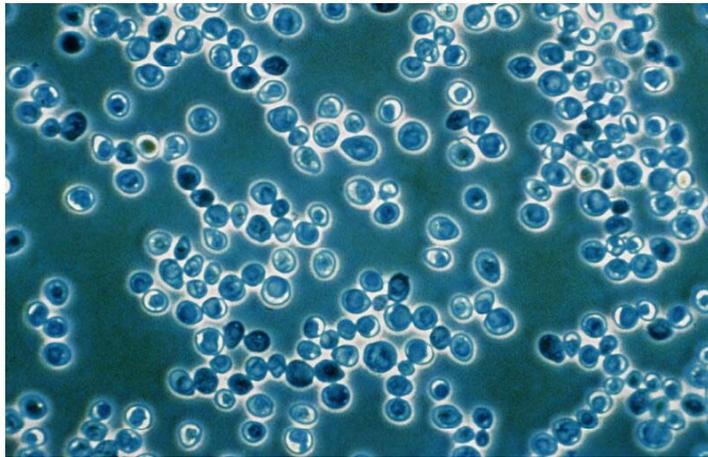




Fermentation mit Hefe



University of Applied Sciences





Membrantechnologie zur Aufreinigung und Konzentration von Bioethanol



University of Applied Sciences





University of Applied Sciences

Ausbeute

September 2008: 2% Ethanol

Dezember 2009: 6-7% Ethanol

Ziel: mindest. 8% Ethanol



Problematik

Im Moment ist unser/andere Prozesse noch nicht ausgereift bzw. brauchen mehr Energie-Input als Energie-Output. Zeitintensiv und kostenintensiv.

Fehlen einer Nachhaltigkeitsstudie

Hydrolyse (3.Schritt):
?Einfluss von Inhibitoren?

Fermentation (4.Schritt):
?Einfluss von Inhibitoren?

Inhibitoren: Polyphenole, organische Säuren; Furfural, HMF



Ausgewählte Hefestämme:

industrielle Bäckerhefe (S.C.BUT2)

Saccharomyces cerevisiae, Kluyveromyces marxianus (DSM 5418), Pichia stipitis, Kluyveromyces marxianus (DSM 5420), Kluyveromyces thermotolerans, Pachysolen tannophilus, Turbo-8, Portwein, Candida utilis, Sherry, Rhodotorula, Kluyveromyces lactis, osmophile Hefe

Strohhydrolysat:

Fermentation bei allen Hefestämme ~ gleich



Idealerweise wäre die Entwicklung eines Hefestammes mit folgenden Eigenschaften:

- Thermotoleranz
- Toleranz gegen Inhibitoren
 - Ethanoltoleranz
 - Zuckertoleranz
- Simultane Fermentation von C5 und C6 Zuckern
 - Stabilität im industriellen Einsatz



Thermotoleranz

Grund: Differenz der Temperatur - Hydrolyse (50°C) versus Fermentation (30°C) in Fall einer simultanen Hydrolyse - Fermentation

Sehr gutes Wachstum auf Agarplatten: 30°C, 35°C, 38°C, 40°C
Ausnahme *Saccharomyces cerevisiae* – wächst nur bei 30°C

42°C

Portwein	Sherry	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Candida utilis</i>	Turbo-8	Osmophile Hefe
+++	+++	+++	+++	+++	++

+++ sehr gutes Wachstum, ++ gutes Wachstum

Kluyveromyces marxianus: bis zu 45°C



Fermentationskompetenz der Hefestämme bei erhöhter Temperatur (30°C und 40°C)

30°C

<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Portwein</i>	<i>Turbo-8</i>	<i>Sherry</i>	<i>S.C.BUT2</i>
5,5%	5,4%	5,3%	5,2%	7,2%

40°C

<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Portwein</i>	<i>Turbo-8</i>	<i>Sherry</i>	<i>S.C.BUT2</i>
5,3%	2,3%	4,7%	3,1%	4,7%

EtOH-Gehalt nach der Fermentation (Glukoselösung: 140 g/l)



Fermentationskompetenz der Hefestämme bei erhöhter Temperatur (30°C und 40°C)

Bei 40°C Fermentationstemperatur ist ein deutlicher Einbruch der Fermentationskompetenz der Hefestämmen *Portwein*, *Sherry* und *industrieller Bäckerhefe (S.C.BUT2)* sichtbar. Bei dieser Temperatur sind nach der Fermentation ~90% der Hefen tot.



Fermentationskompetenz - Kluyveromyces marxianus

42°C	45°C
5%	3,2%

EtOH-Gehalt nach der Fermentation (Glukoselösung: 140 g/l)



Verbesserung der Thermotoleranz

- **Mutagenese mittels UV-Bestrahlung oder EMS-Behandlung**
- **Thermische Adaptation**



Toleranz gegen Inhibitoren (organische Säuren, Polyphenole, Furfural, HMF)

- Adaptation:

Sechs ausgewählte Hefestämme wurden in einem Medium mit steigendem Strohhydrolysat-Konzentrat (10% bis 100% Strohhydrolysat) gezüchtet. Im Moment werden diese Hefen getestet.

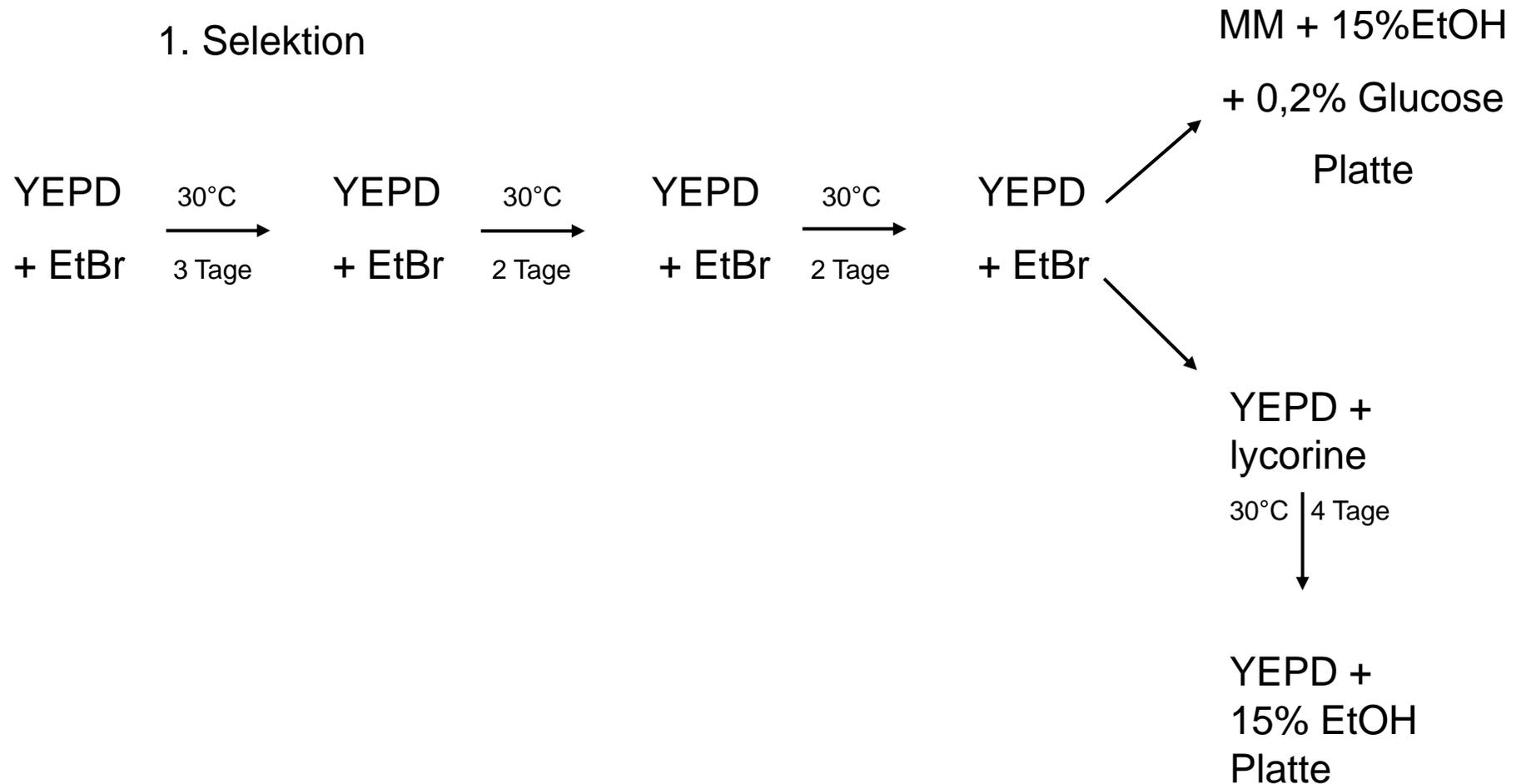


Ethanoltoleranz - Mutagenese



University of Applied Sciences

1. Selektion





Vorläufiges Ergebnis:

Sechs ausgewählte Hefestämme wurden laut diesen Protokoll mutiert.

Selektion 1a:

Fünf Hefestämme haben dieses Verfahren überlebt und werden im Moment ausgetestet.

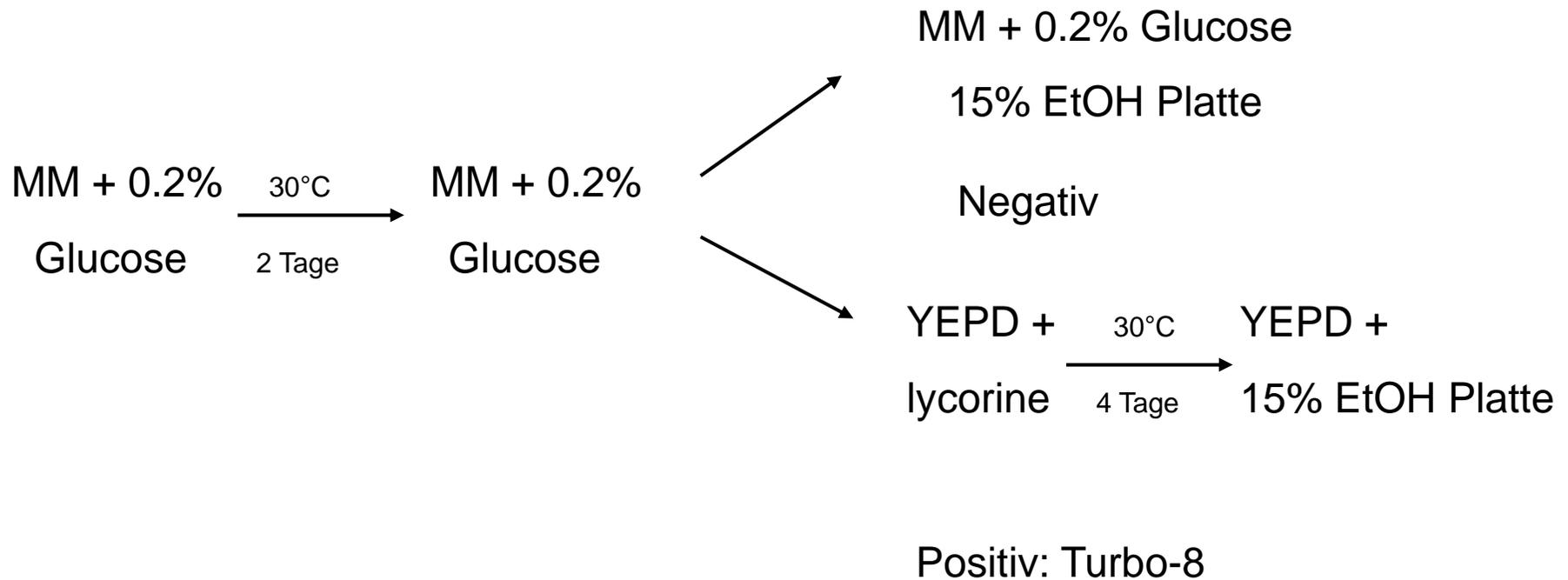
Negativ: *Kluyveromyces marxianus*

Selektion 1b:

Drei Hefestämme haben dieses Verfahren überlebt und werden im Moment ausgetestet: Turbo-8, Sherry, osmophile Hefe, *industrielle Bäckerhefe (S.C.BUT2)*



2. Selektion





Zuckertoleranz

	Kluyveromyces marxianus	industrielle Bäckerhefe (S.C.BUT2)	Sherry	Turbo-8	Osmophile Hefe	Portwein
140 g/l Glukose	6,6%	6,9%	6,6%	7%	6,7%	7,2%
200 g/l Glukose	8,47%	8%	7,8%	8,2%	7,9%	8,5%
300 g/l Glukose	3.87%	11,5%	10%	12%	11,4%	10,8%

EtOH-Gehalt nach der Fermentation bei 30°C



Simultane Fermentation von C5 und C6 Zucker



University of Applied Sciences

	nach Hydrolyse	nach der Fermentation
Glukosegehalt	30 g/l	~ 0 g/l
Xylosegehalt	15 g/l	15 g/L

HPLC-Analysen zeigten, dass Xylose etwa 1/3 des Gesamtzuckers ausmacht. Glucose- und Xyloseausbeute nach der Hydrolyse und nach der Fermentation im Vergleich.



Fermentationskompetenz der C5 und C6 Zucker



University of Applied Sciences

Glukose	Xylose
<i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>industrielle Bäckerhefe</i> <i>(S.C.BUT2)</i>	<i>Pichia stipitis</i>

Alle Hefestämme können Glukose gut fermentieren, nur *Pichia stipitis* kann Xylose zumindest partiell fermentieren.



Cofermentation



University of Applied Sciences

	<i>Pichia stipitis</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Kluyveromyces marxianus/Pichia stipitis</i>
Glukose	7,5%	7,5%	7,4%
Mischung – Glukose - Xylose	3,8%	4%	4,1%

Ethanolausbeuten bei Co-Fermentationsansätzen mit *Pichia stipitis* und *Kluyveromyces marxianus*



Verbesserungen der Fermentationskompetenz



University of Applied Sciences

Gezielte Adaptation/Selektion:

Hefestämme wurden über 50 Generationen auf Xylose-hältigen Vollmedium gezüchtet. Eine Anzüchtung in Xylose-hältigen Flüssigkulturen ist bereits positiv erfolgt.

Vor 10 Generationen wurden die Hefestämme auf Xylose-hältigen Minimalmedium umgestellt.



Zusammenfassung:

- Thermotolerant: *Kluyveromyces marxianus*
- Zuckertolerant: industrielle Bäckerhefe (S.C.BUT2), Sherry, Turbo-8, Osmophile Hefe, Portwein
- Simultane Fermentation von C5 und C6 Zucker im Moment noch nicht effizient
- Entwicklung von ethanoltoleranter Hefe und resistent gegen Inhibitoren

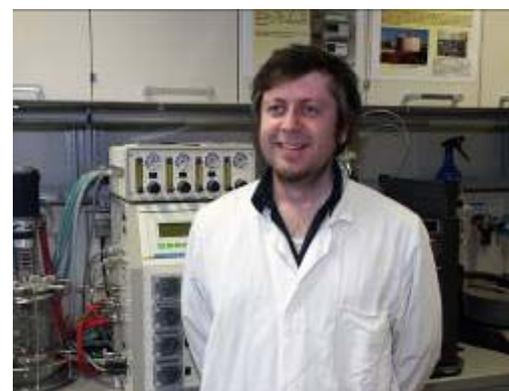
- **Verknüpfung der einzelnen Adaptationen und Mutagenesen zu einem idealen Hefestamm**



Vielen Dank an unsere Arbeitsgruppe



University of Applied Sciences



Danke für Ihre Aufmerksamkeit !