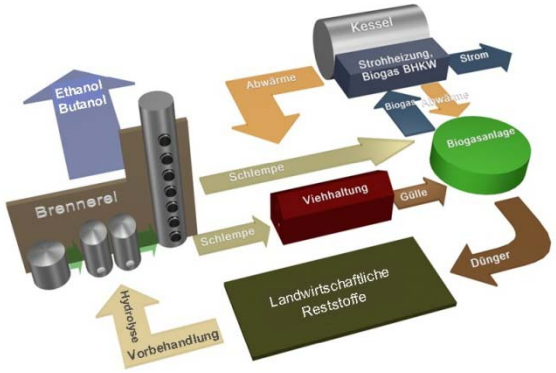
Etablierung neuer Hefen zur vollständigen Vergärung von Biomassehydrolysaten.

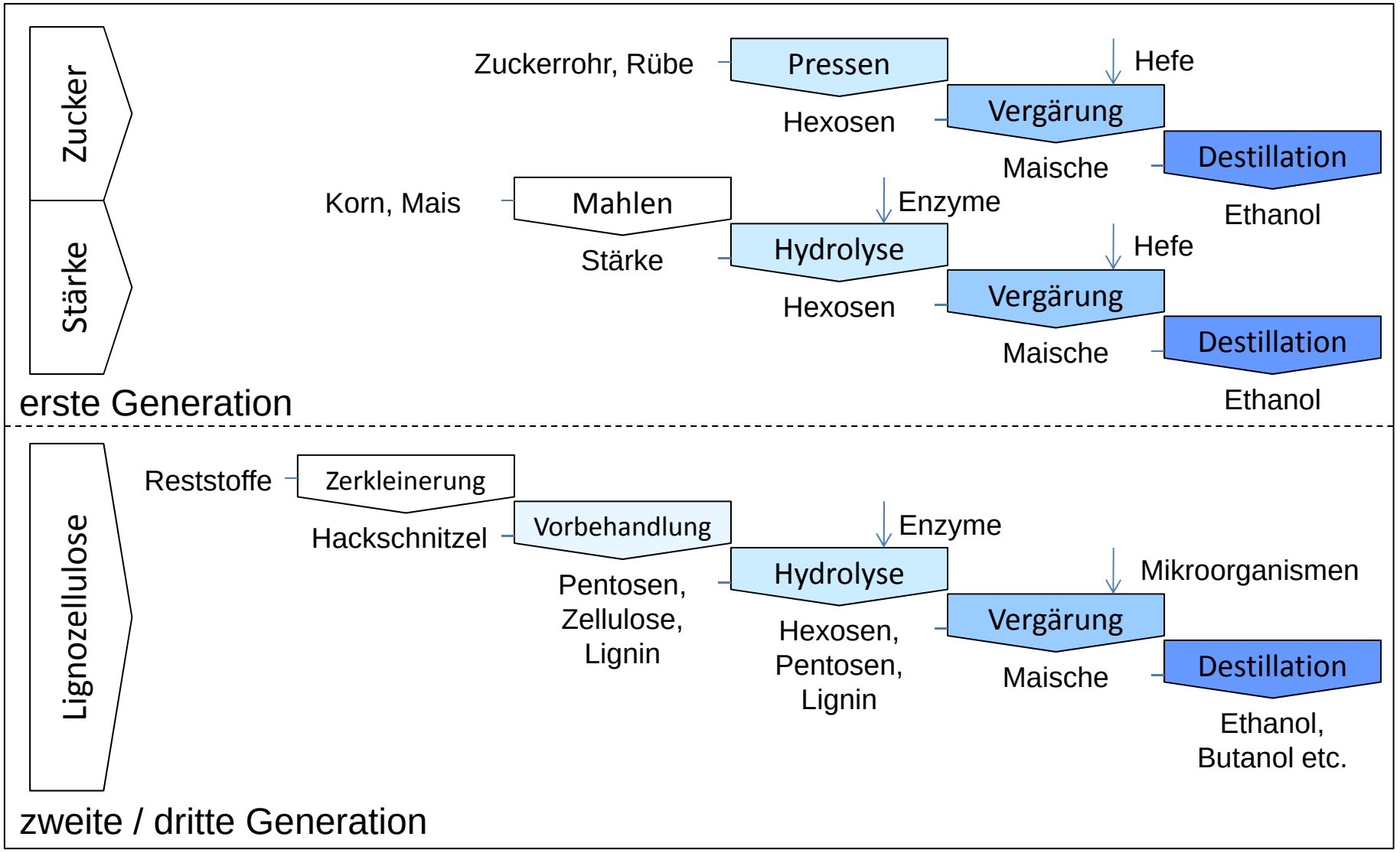
Heiko Dietz – Arbeitsgruppe Prof. Dr. Boles

Institut für Molekulare Biowissenschaften
Goethe-Universität Frankfurt

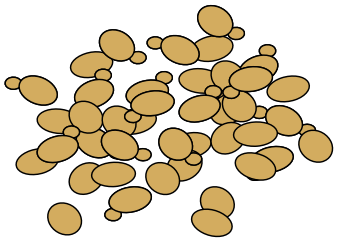


05. Februar 2013
Hohenheim - Deutschland
Fachtagung - Regionale Bioalkoholherstellung aus biogenen Reststoffen

Übersicht über die Produktion von Alkoholen als Biokraftstoff



Vorteile der Nutzung von Hefe in der Kraftstoffproduktion



Industrielle Hefestämme…

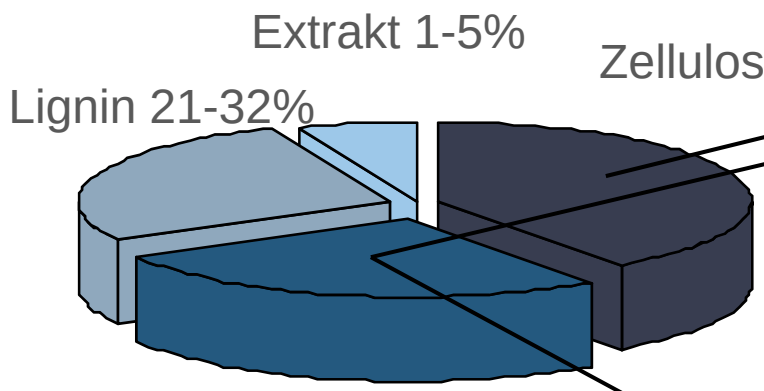
- sind etabliert und akzeptiert in der Ethanolproduktion
- sind robust
  - hohe Resistenz gegenüber giftigen Inhibitoren und Fermentationsprodukten
  - Tolerant gegenüber mechanischen Kräften im Fermenter
  - Stress tolerant z.B. gegenüber Temperaturschwankungen
- fermentieren Zucker bei niedrigen pH-Werten → verringertes Kontaminationsrisiko
- haben hohe Fermentationsraten

Hefe allgemein…

- hat den Gras Status (Generally Recognized as Safe)
- gehört zu den am besten untersuchten Mikroorganismen
- sind einfach genetisch zu Verändern

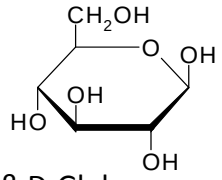
  (gilt nur bedingt für Industrielle Hefestämme)

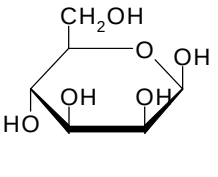
Zusammensetzung von lignozellulose-haltiger Biomasse

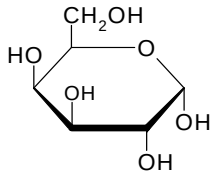


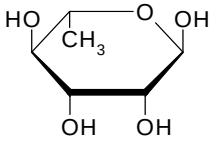
Geänderte Abbildung nach Hahn-Hägerdal *et al*. *Adv Biochem Eng/Biotechnol* , 2001, 73:53, p.84

HEXOSEN

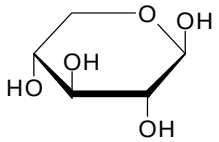

ß-D-Glukose

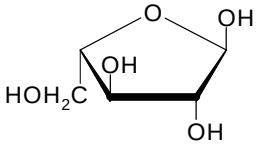

ß-D-Mannose


ß-D-Galaktose

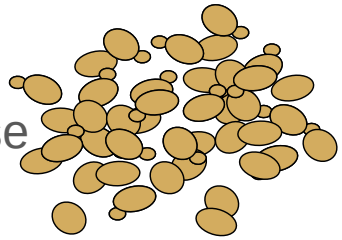

α-L-Rhamnose

PENTOSEN


ß-D-Xylose


α-L-Arabinose

S.cerevisiae vergärt effektive Hexosen, ist aber natürlicherweise nicht in der Lage Pentosen umzusetzen.



Vielfalt von lignozellulose-haltigen Hydrolysaten

Maissilagehydrolysat (Dampfvorbehandlung)
-Universität Hohenheim

Inhibierende Substanzen:

~ 50 g/l organische Säuren
(Essigsäure, Milchsäure)

Fichtenhydrolysat
(Dampf- und verdünnte Schwefelsäurevorbehandlung)
– SEKAB E-Technology

Inhibierende Substanzen:

~ 20 g/l organische Säuren
(Essigsäure, Levulinsäure, Ameisensäure)
~ 10 g/l Aldehyde
(Furfural, HMF)
phenolische Komponenten

Weizenstrohhydrolysat (konzentrierte Salzsäurevorbehandlung)
– Green Sugar GmbH

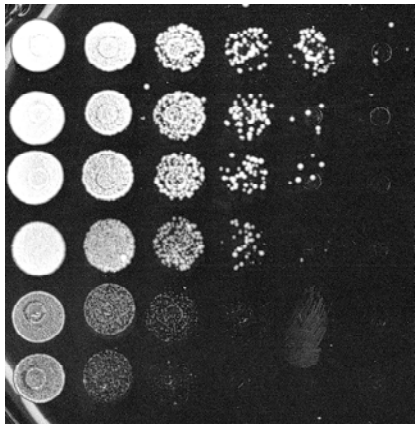
Inhibierende Substanzen:

phenolische Komponenten
hohe Salzkonzentration

Vergärung von lignozellulose-haltigen Hydrolysaten

GOETHE UNIVERSITÄT FRANKFURT AM MAIN

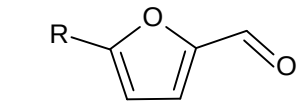
Screening der Toleranz gegenüber verschiedenen Hydrolysaten



Industriehefestamm

Laborhefestamm

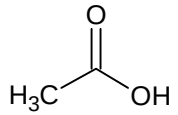
Screening der Toleranz gegenüber einzelnen Inhibitoren



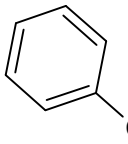
H—R - Furfural

R - Hydroxymethylfurfural

HO



Essigsäure



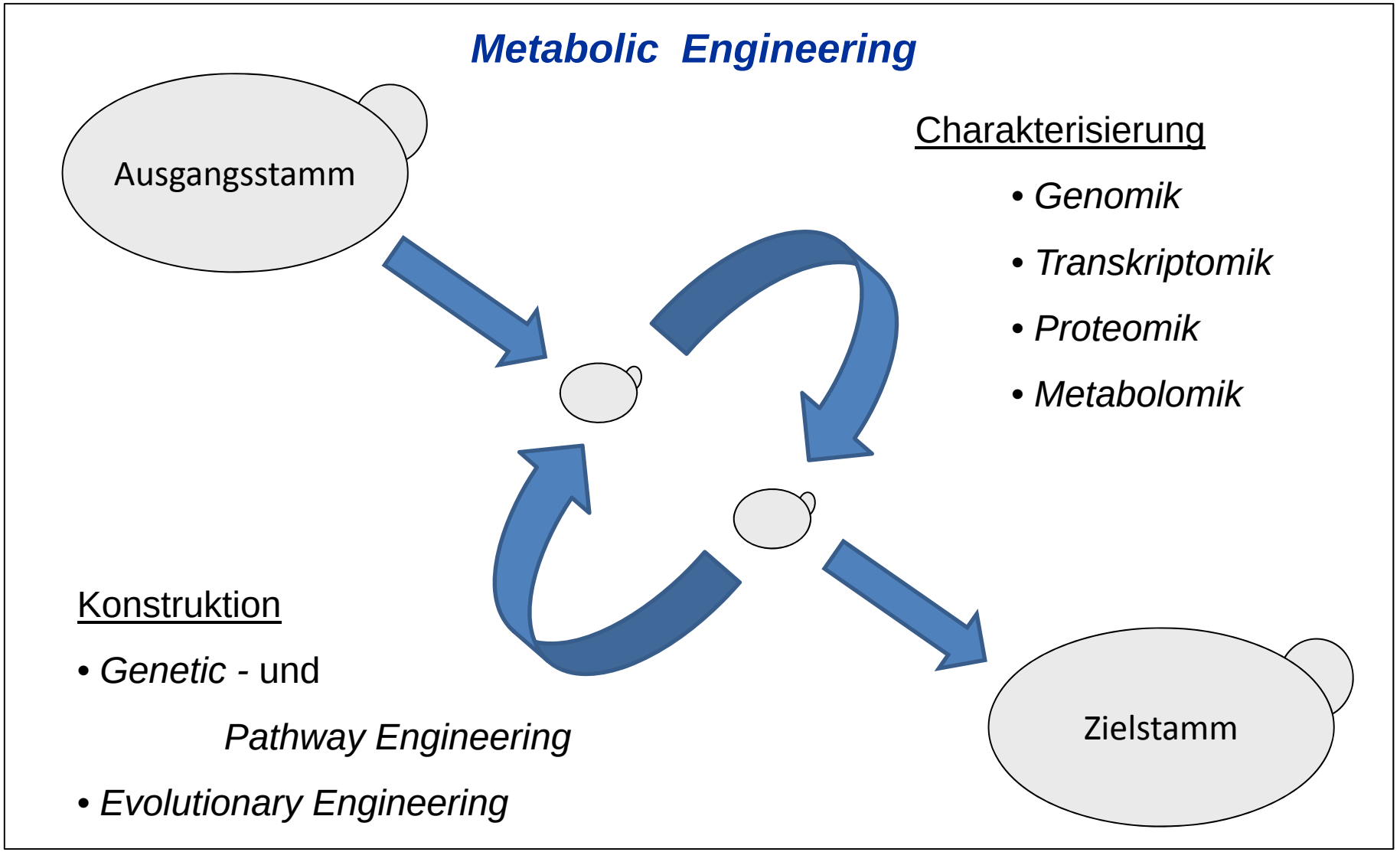
Phenolderivate (Phenol gezeigt)

Selektion des besten Stammes für die Etablierung der Pentosevergärung

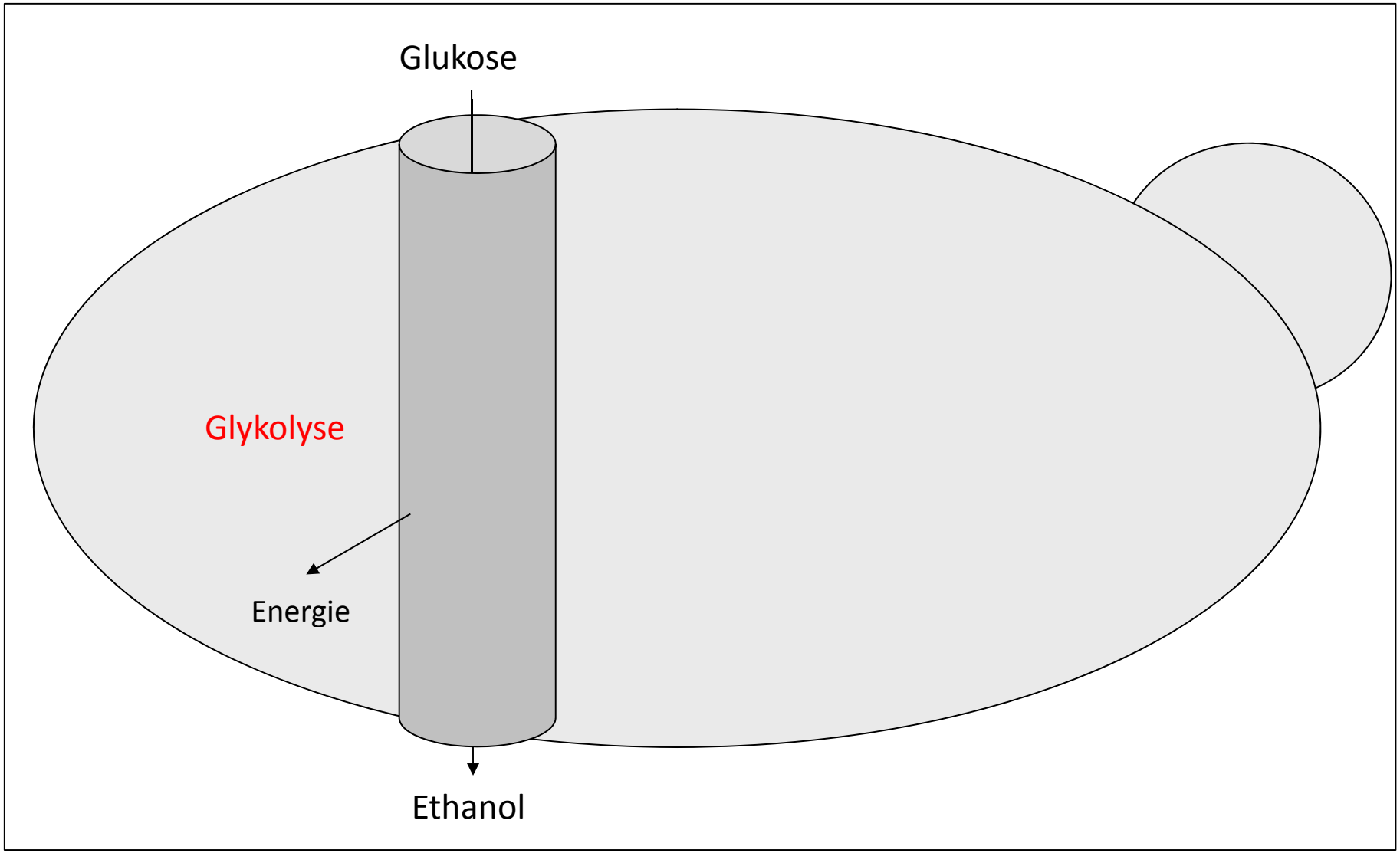
Ethanol Red (Lesaffres / Fermentis, Frankreich)

Etablierung und Optimierung neuer Stofwechselwege

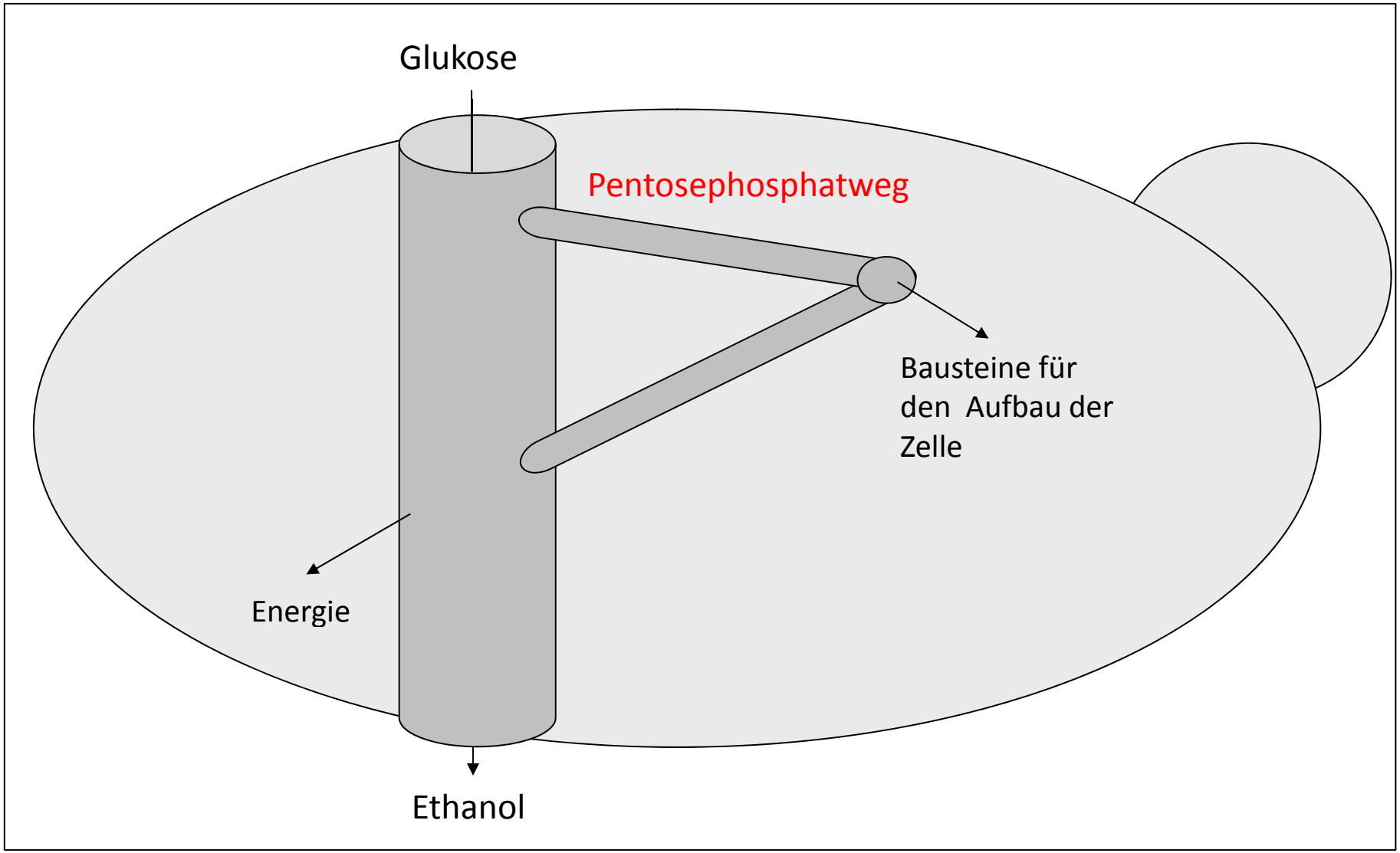
GOETHE UNIVERSITÄT FRANKFURT AM MAIN



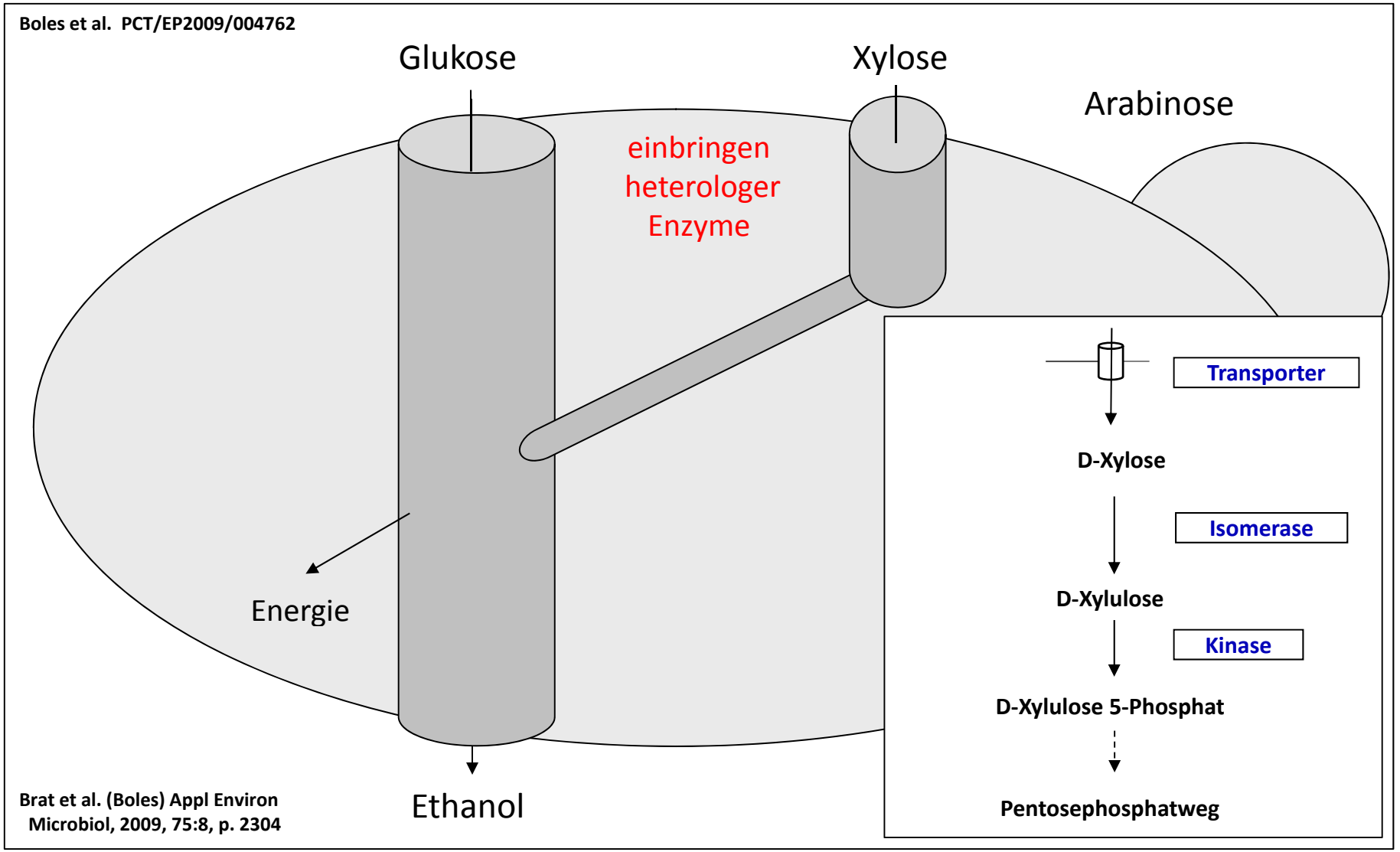
Stoffwechsel der Hefe
- Glykolyse -



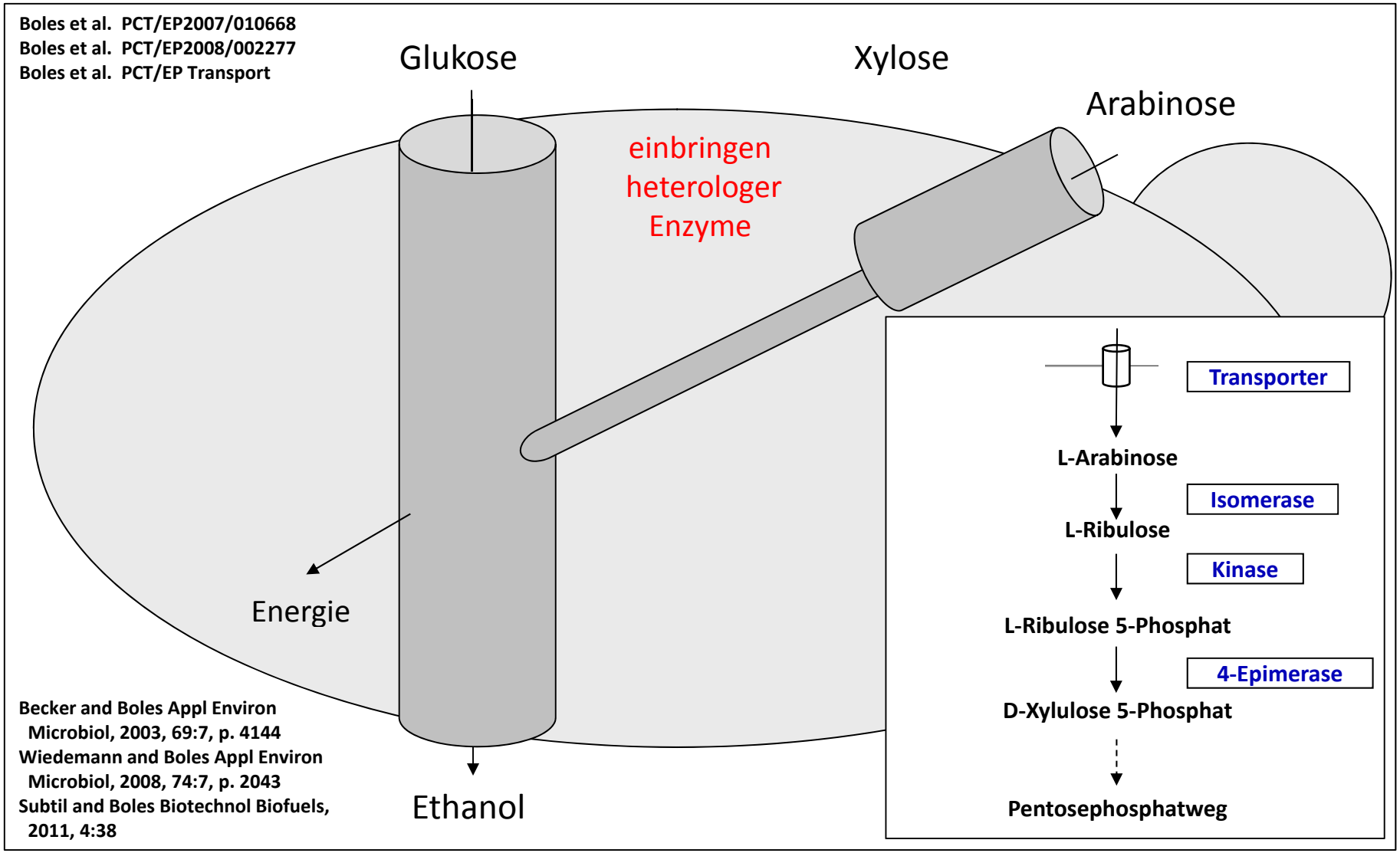
Stoffwechsel der Hefe
- Pentosephosphatweg -



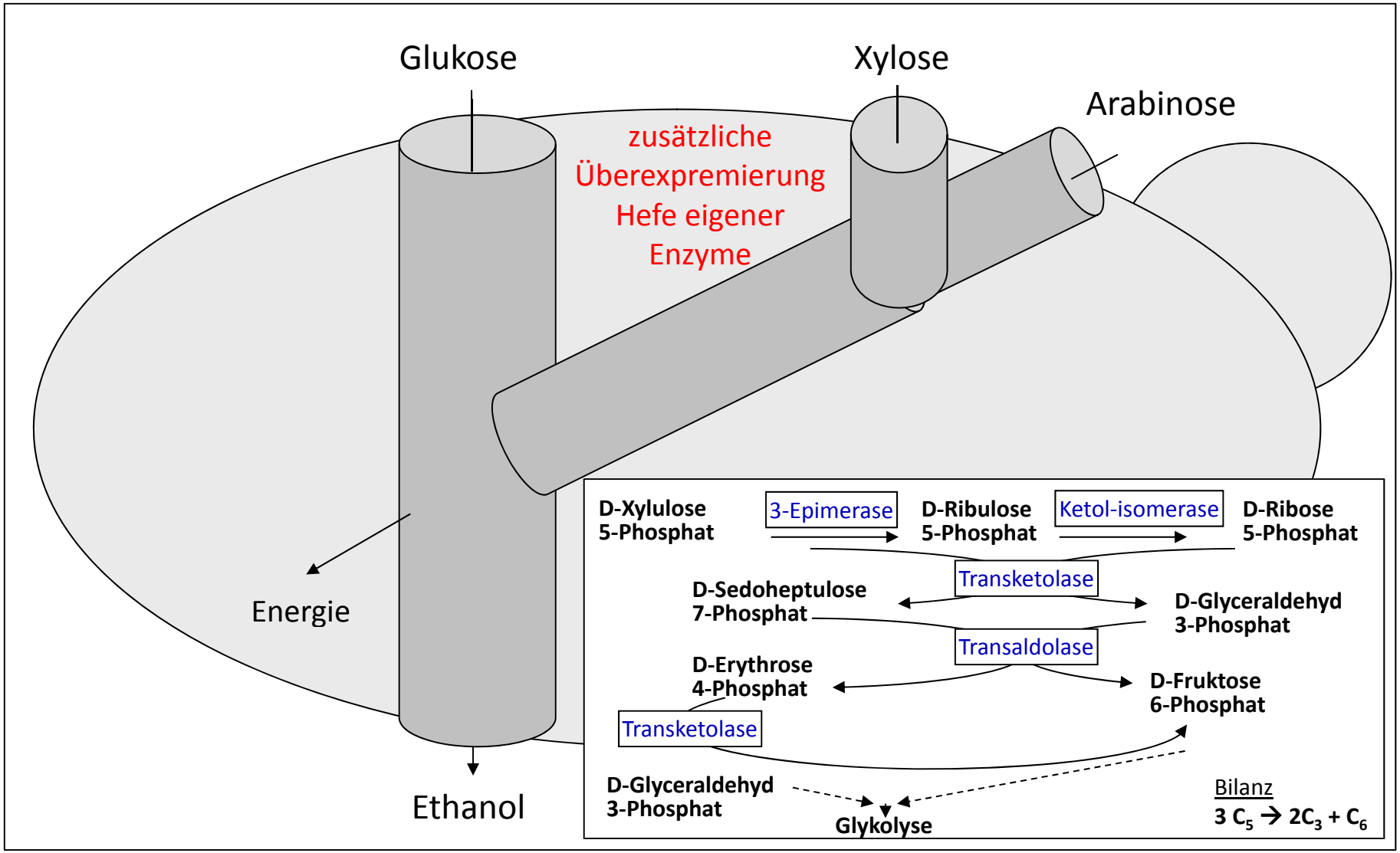
Konstruktion eines Pentose vergärenden Industriehefestammes



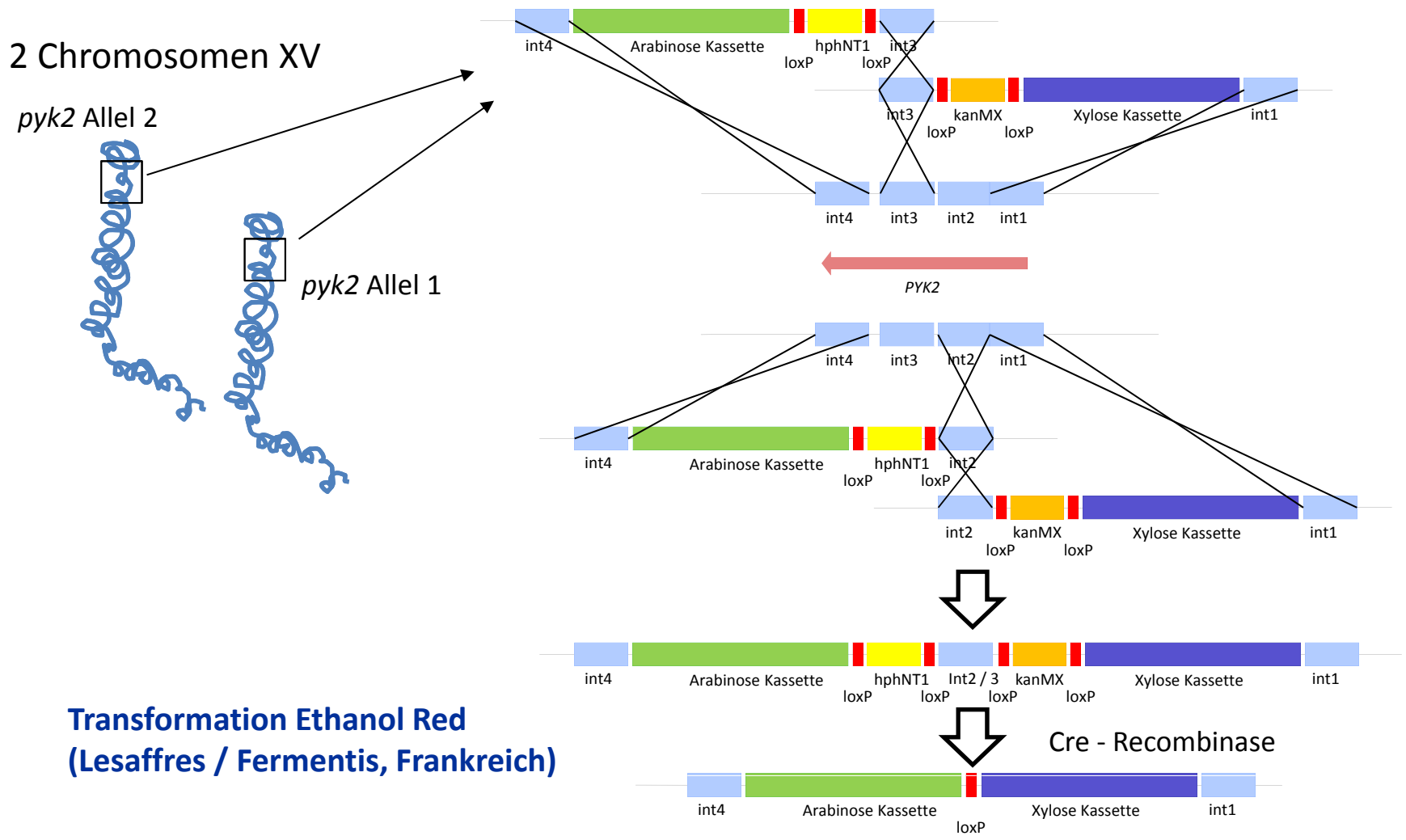
Konstruktion eines Pentose vergärenden Industriehefestammes



Konstruktion eines Pentose vergärenden Industriehefestammes

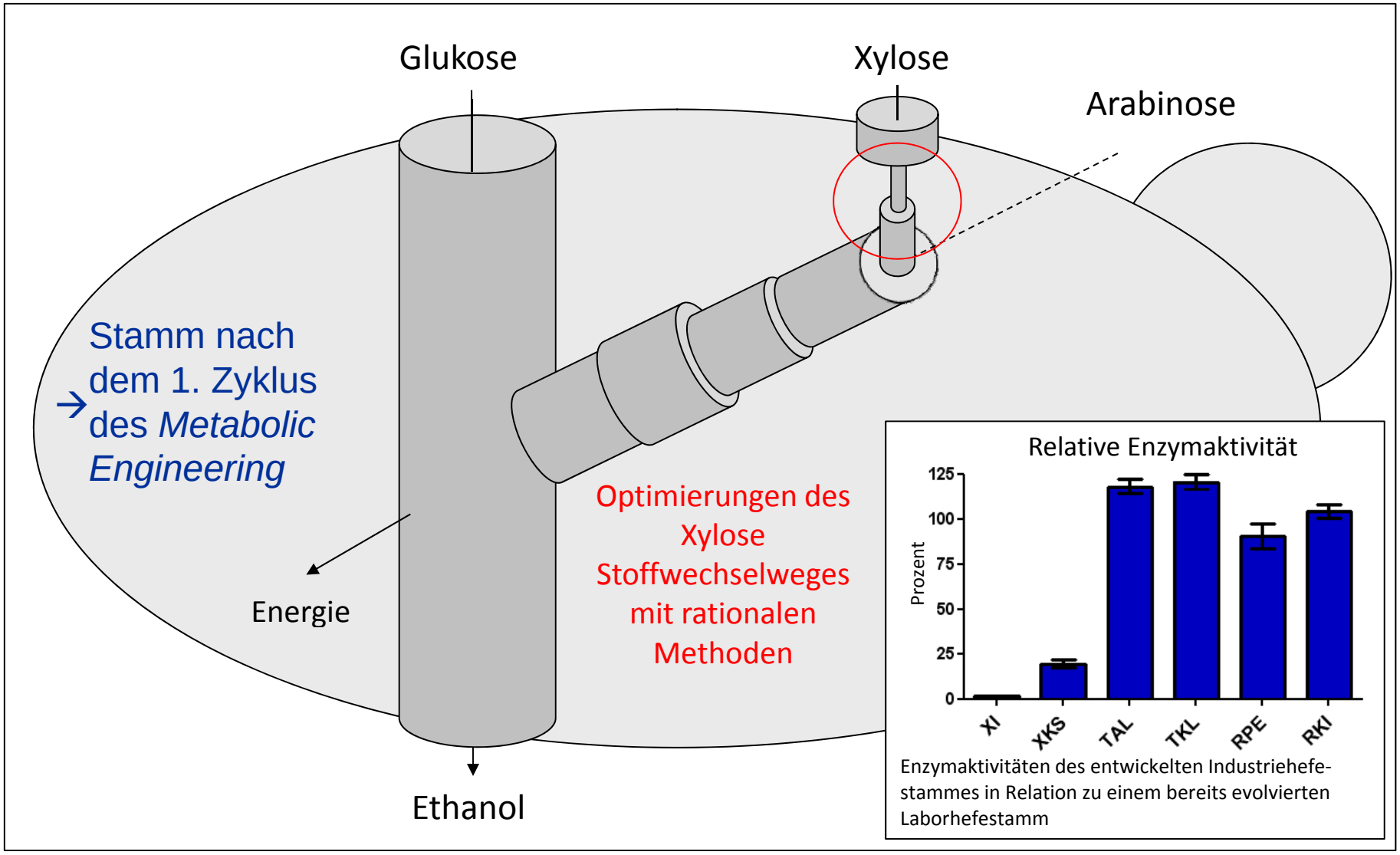


Konstruktion eines Pentose vergärenden Industriehefestammes



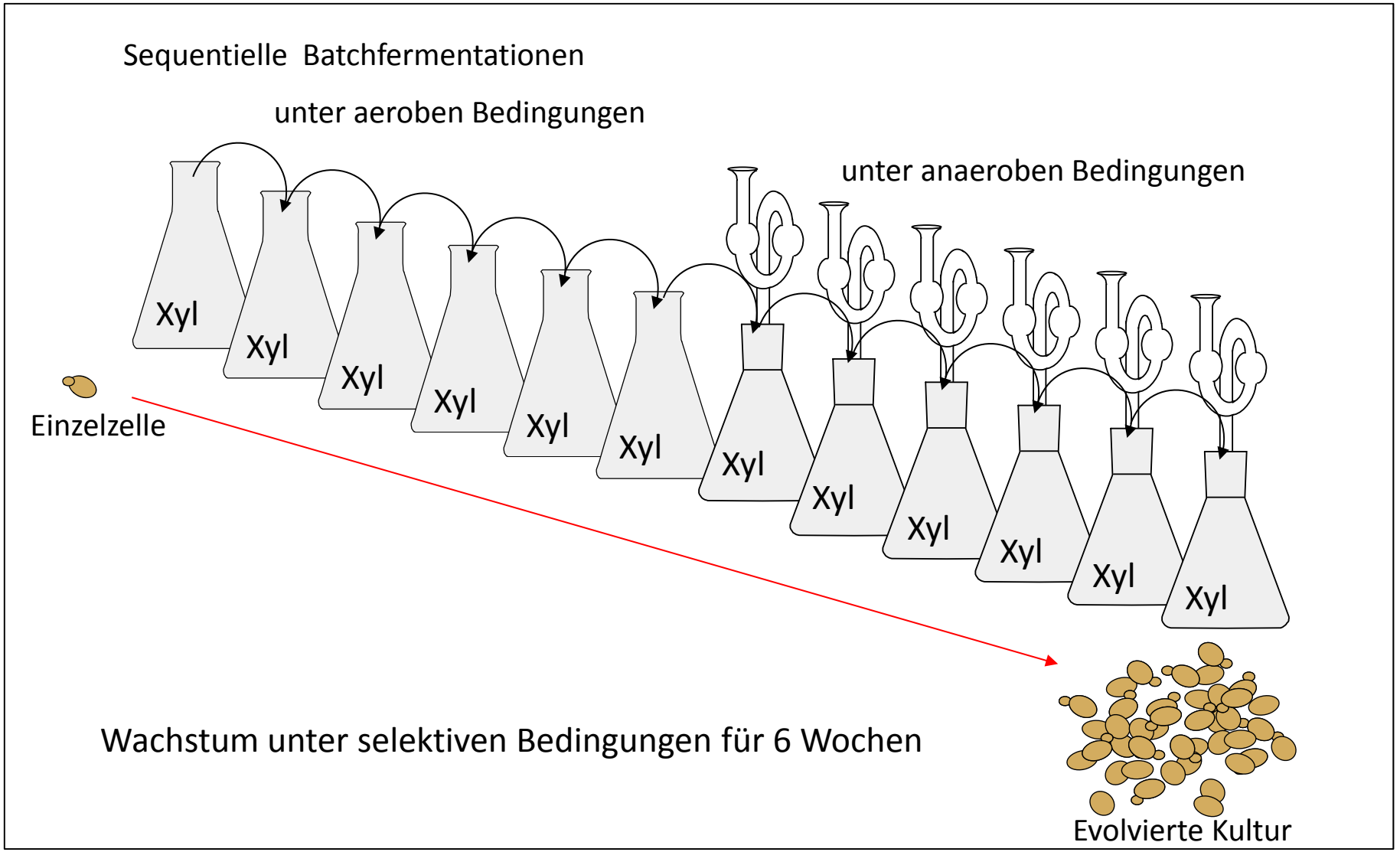
Transformation Ethanol Red
(Lesaffres / Fermentis, Frankreich)

Charakterisierung des entwickelten Industriehefestammes



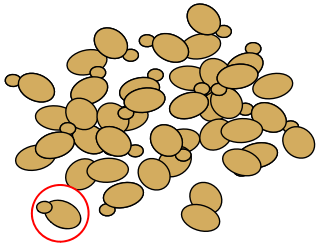
Enzymaktivitäten des entwickelten Industriehefe-stammes in Relation zu einem bereits evolvierten Laborhefestamm

Evolvierung auf Xylose als einzige Kohlenstoffquelle

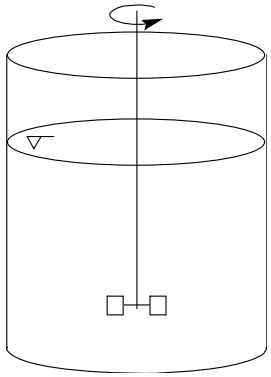


Charakterisierung des evolvierten Industriehefestammes

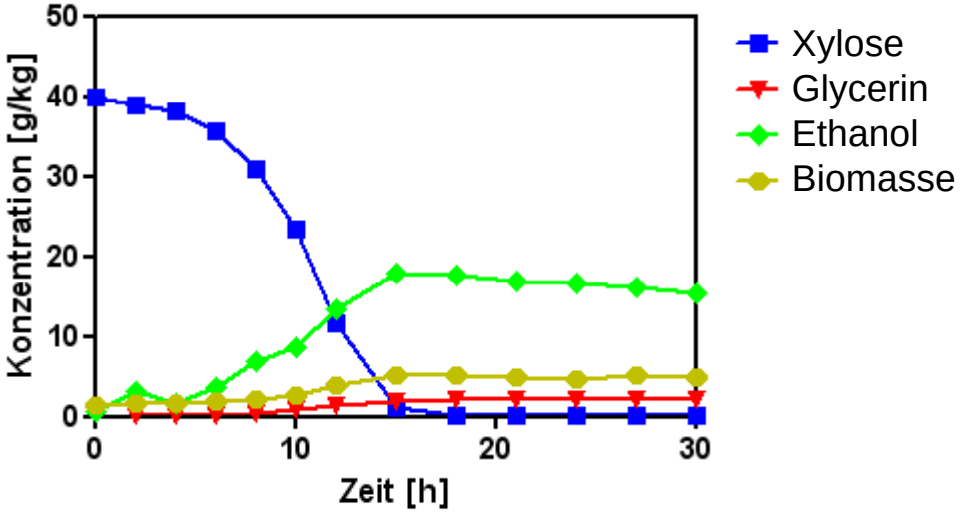
Fermentation von synthetischen Medium



Auswahl einer Hefezelle mit guter Fermentationsleistung auf D-Xylose



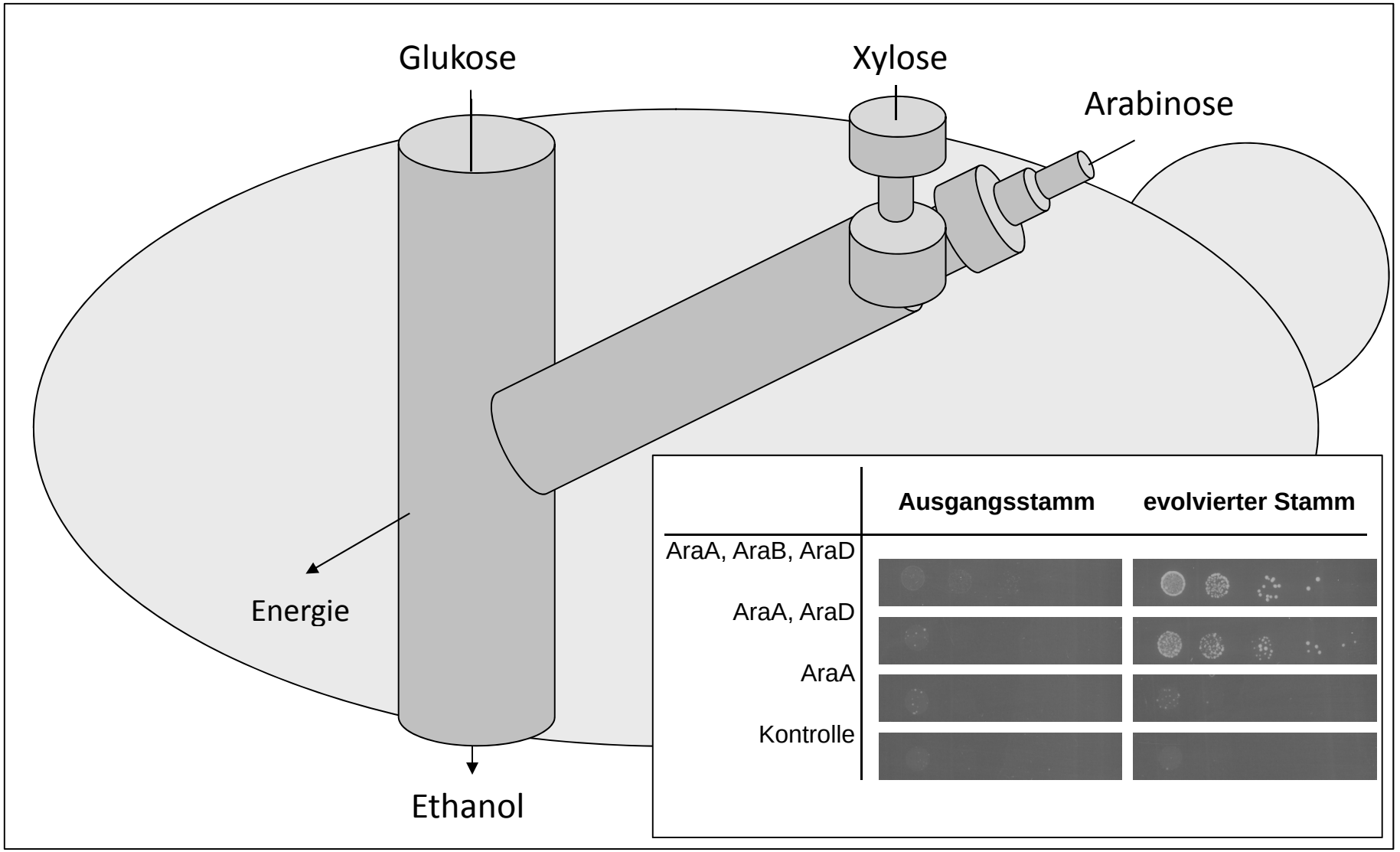
evolvierter Stamm



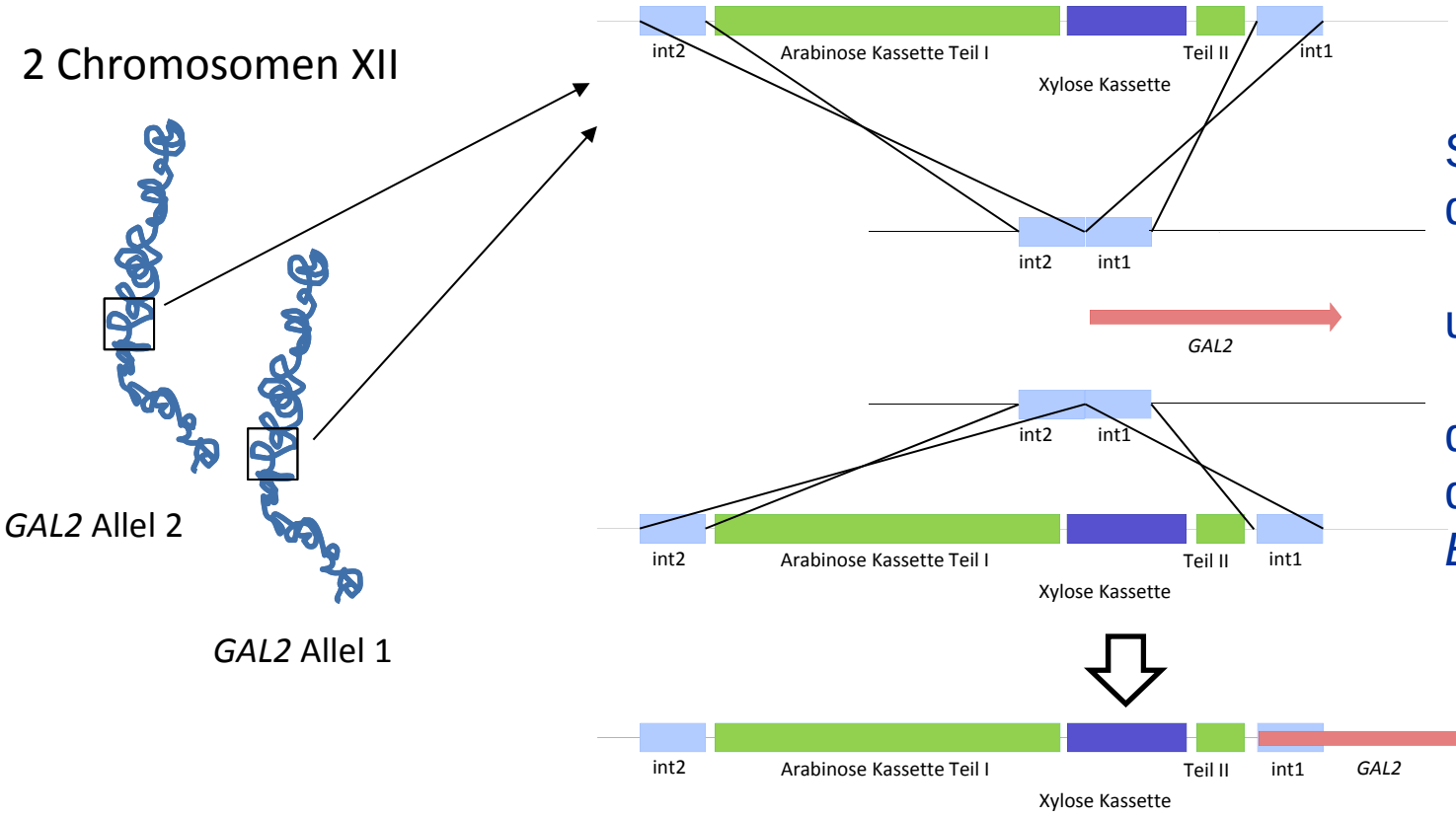
Ethanolausbeute [g/g]	Ethanolproduktionsrate [g/g*h]
0,433	0,841

→Stamm nach dem 2. Zyklus des *Metabolic Engineering*

Charakterisierung des evolvierten Industriehefestammes



Konstruktion eines Pentose vergärenden Industriehefestammes



Stamm nach dem 3. Zyklus

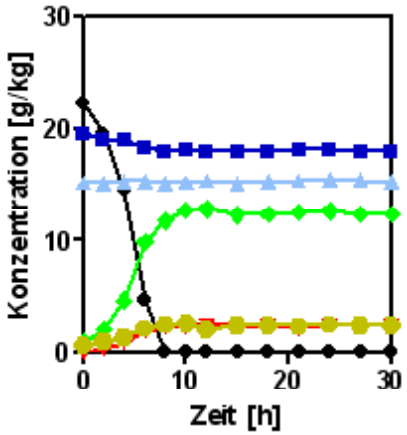
und

dem 4. Zyklus des *Metabolic Engineering*

Verlauf der Stammentwicklung

Fermentation von synthetischen Medium

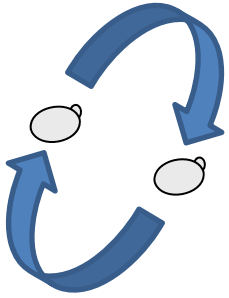
Ethanol Red



Glukose
Xylose
Arabinose
Glycerin
Ethanol
Biomasse

Stamm	Ethanolausbeute [g/g]	Ethanolproduktionsrate [g/g*h]
Ethanol Red	0,20	1,45
1.Zyklus *ME*	0,21	1,63
2.Zyklus *ME*	0,26	1,88
3.Zyklus *ME*	0,39	1,45
4.Zyklus *ME*	0,41	1,70

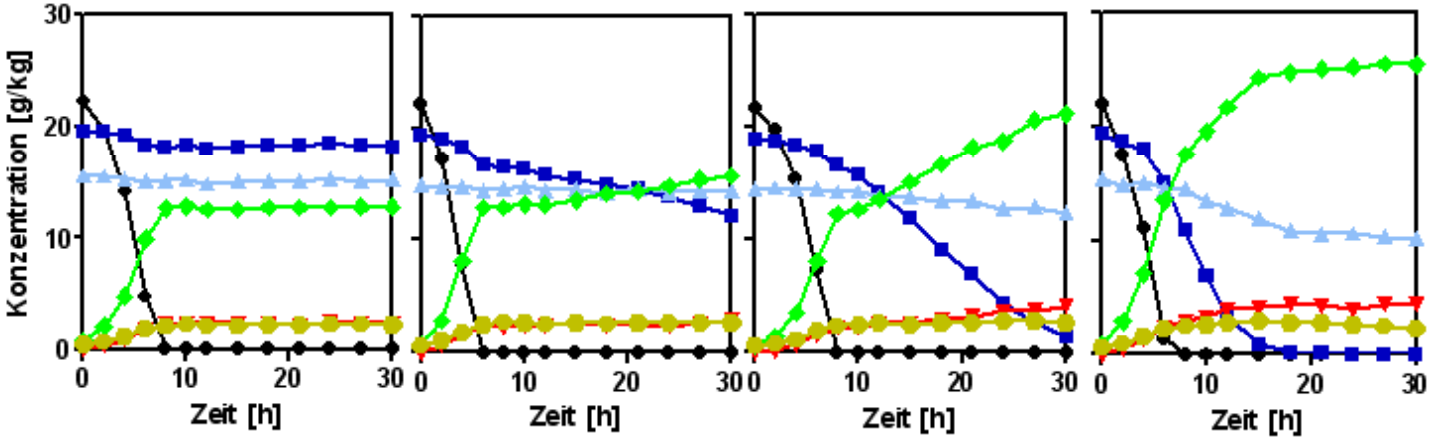
Charakterisierung



Konstruktion

Metabolic Engineering (ME)

1. Zyklus *ME* | 2. Zyklus *ME* | 3. Zyklus *ME* | 4. Zyklus *ME*

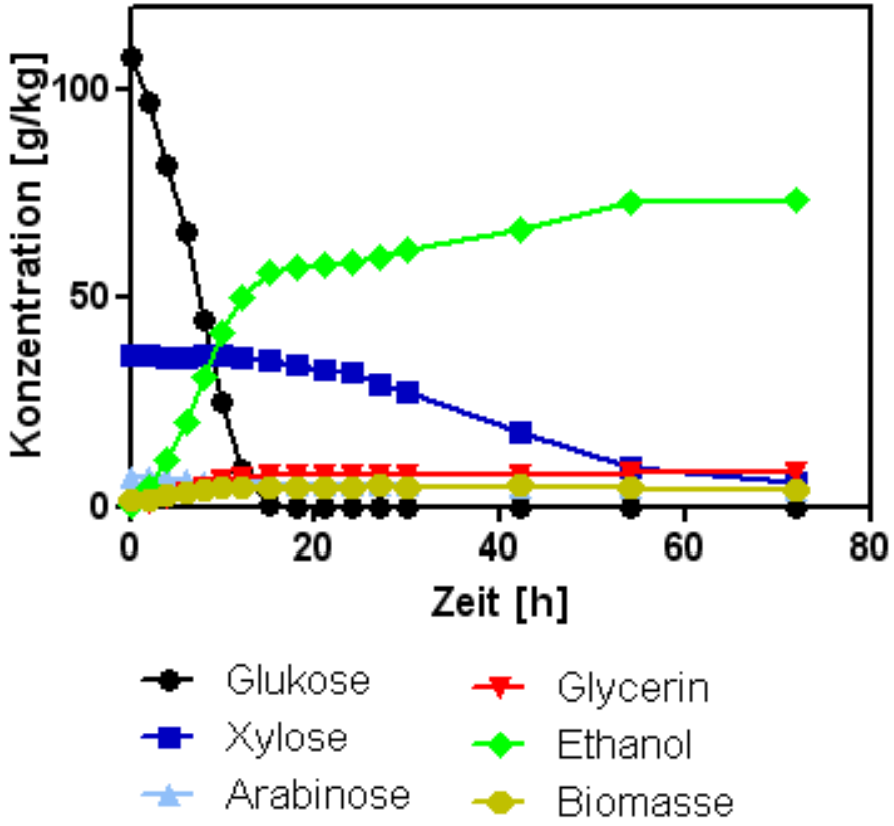


Vergärung von lignozellulose-haltigen Hydrolysat

GOETHE UNIVERSITÄT FRANKFURT AM MAIN

Fermentation von Weizenstrohhydrolysat (Green Sugar)

Stamm	Ethanolausbeute [g/g]	Ethanolproduktionsrate [g/g*h]
4.Zyklus *ME*	0,47	1,58



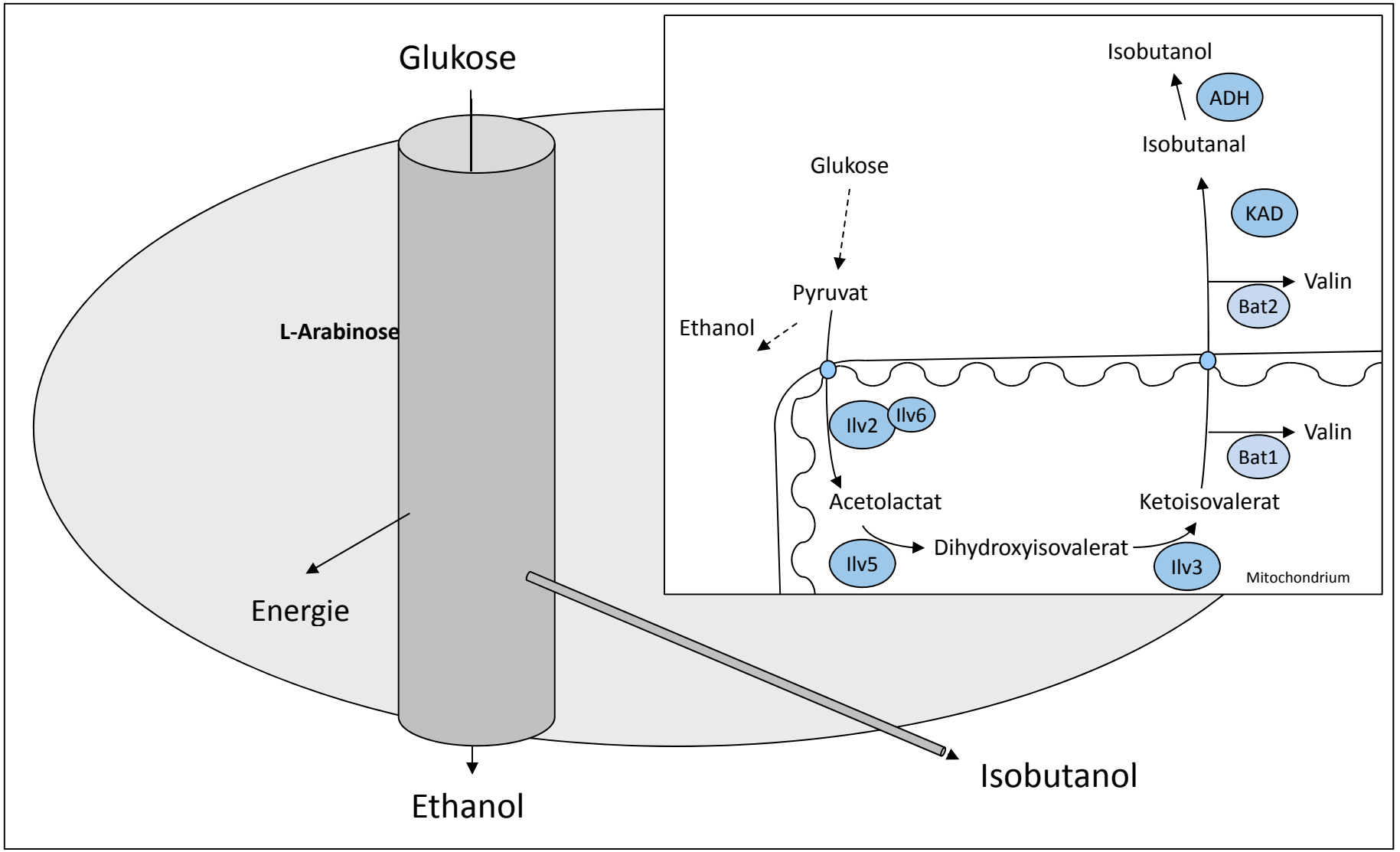
85% Xylose verbraucht

40% Arabinose verbraucht

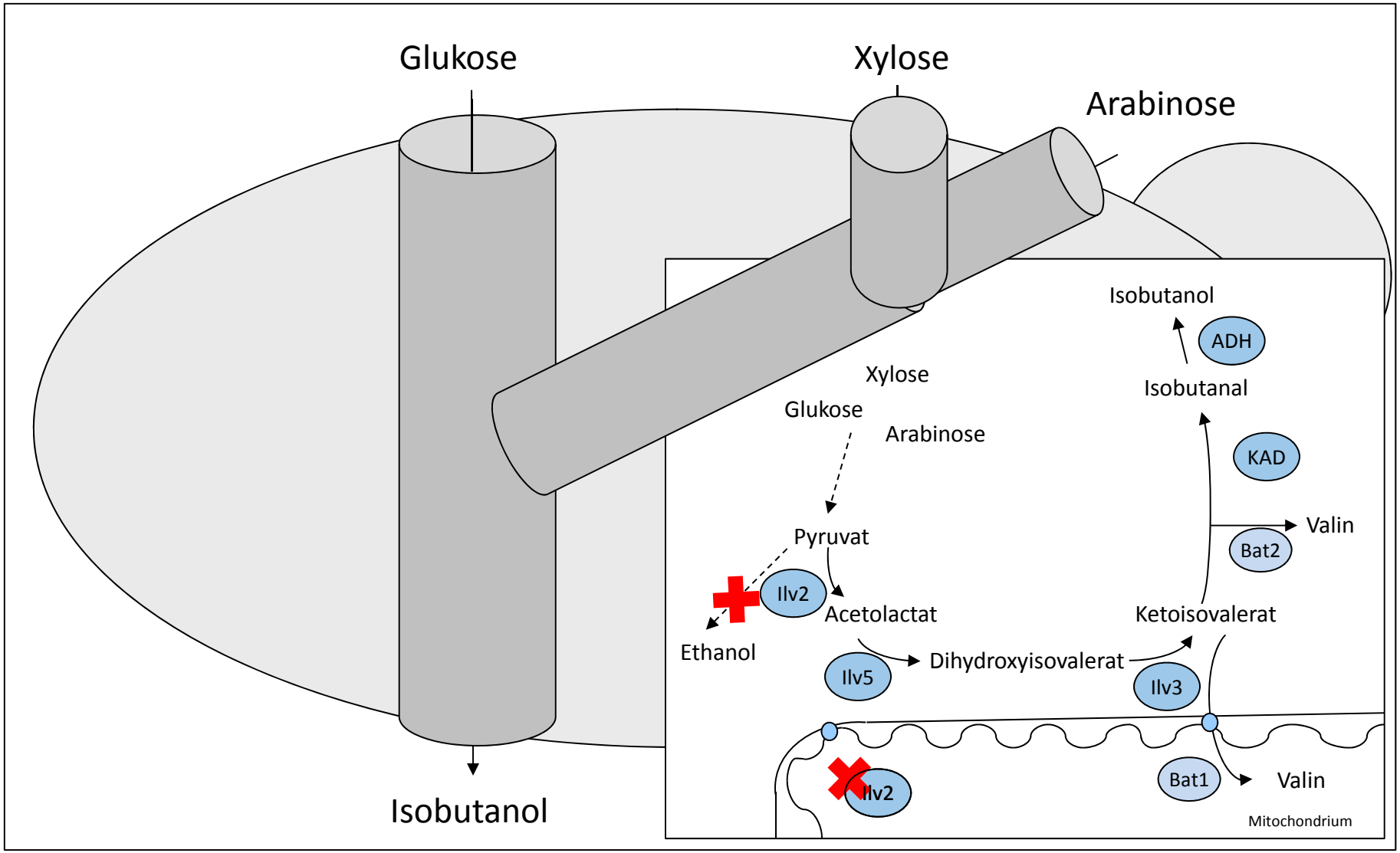
über 20% höhere Ethanolausbeute

über 70 g/kg Ethanoltiter

Stoffwechsel der Hefe
- Isobutanol -

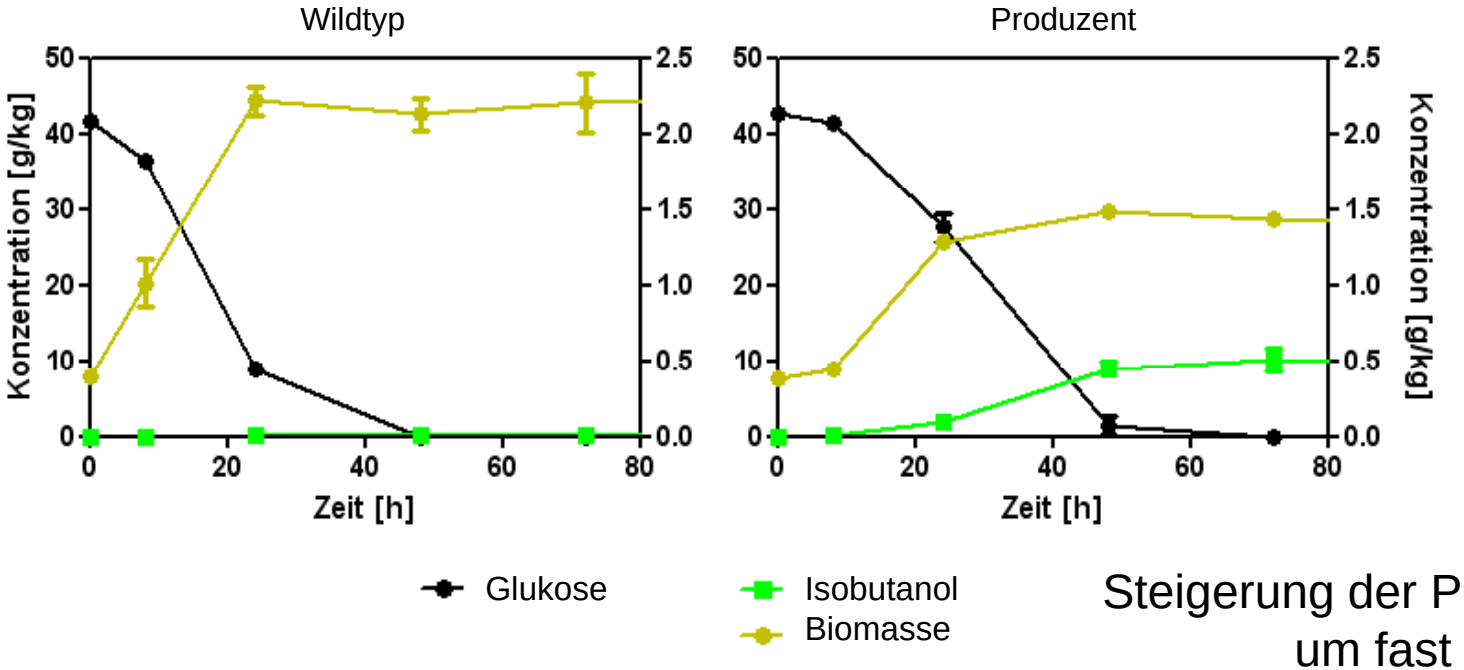


Konstruktion eines Isobutanol produzierenden Hefestammes



Konstruktion eines Isobutanol produzierenden Hefestammes

Stamm	Isobutanolausbeute [mg/g]	Isobutanolproduktionrate [mg/g*h]
Wildtyp	0,20	0,23
Produzent	11,8	10,7



Steigerung der Produktion um fast das 50-fache

Steigerung der Ausbeute um fast das 60-fache

"Proof of concept" in einem Laborhefestamm

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!

GOETHE UNIVERSITÄT FRANKFURT AM MAIN

GROUP LEADER
Prof. Dr. Eckhard Boles

POSTDOCS
Mislav Oreb (Enzyme complexes)

PHD STUDENTS
Dawid Brat (Butanol)
Feline Benisch (Butanol)
Thorsten Subtil (Pentose uptake)
Alexander Farwick (Pentose uptake)
Heiko Dietz (Fermentation)
Sarah Zimmet (Biochemicals)
Christine Brückner (Biochemicals)
Stefan Bruder (Biochemicals)
Thomas Thomik (Enzyme complexes)
Cora Mignat (Enzyme complexes)

MASTER STUDENTS
Berhard Valldorf
Charlotte Hannig
Virginia Schadeweg

BACHELOR STUDENTS
Martin Brinek

TECHNICAL ASSISTANTS
Christine Essl
Charlotte Hiesl

Industrial cooperation:

butalco bio-based innovations

BASF The Chemical Company

Involved projects:

NEMO for bioethanol

BIO RAFFINERIE 2021 Bioraffinerie der Zukunft

RE-ALKO

ECO-FERM

Founded by : *EU* *BMBF* *BMU* *FNR*