

Energimyndighetens titel på projektet – svenska Utveckling av effektiva xylosjäsande och syratoleranta jäststammar: ett avgörande steg mot kommersiell cellulosabaserad drivmedelstillverkning!	
Energimyndighetens titel på projektet – engelska Development of efficient xylose fermenting and acid-tolerant yeast strains - a crucial step towards commercial (scale) cellulose-based fuel production!	
Ev. Energimyndighetens program Etanolprocesser	Tidplan 2012-01-01...2014-12-31
Total projektkostnad 7 519 053 kr	Energimyndighetens andel av kostnaden i %/kr 80% / 6 015 243 kr
Ev. rapporttitel hos stödmottagaren	Ev. rapportnr hos stödmottagaren
Universitet/högskola/företag Chalmers Tekniska Högskolan	Avdelning/institution Industriell Bioteknik- Kemi och Bioteknik
Adress Chalmersplatsen 1, 41296, Göteborg	Organisationsnummer 556479-5598
Namn och e-post - projektledare Lisbeth Olsson, lisbeth.olsson@chalmers.se	
Namn och e-post – Huvudförfattare/ medförfattare/projektdeltagare/doktorander Lisbeth Olsson, lisbeth.olsson@chalmers.se Maurizio Bettiga, maurizio.bettiga@chalmers.se Cecilia Geijer, cecilia.geijer@chalmers.se David Moreno, davidmo@chalmers.se Lina Lindahl, lina.lindahl@chalmers.se Nicklas Bonander, nicklas.bonander@chalmers.se	
Nyckelord: 5-7 st Second generation bioethanol, inhibitor tolerance, industrial yeast strains, evolutionary engineering, metabolic engineering, propagation	

Sammanfattning

Projektets mål har varit att utveckla jäststammar och processteknik som är lämpade för andra generationens etanolproduktion. I den första delen har vi kombinerat metabolic engineering och genome shuffling med evolutionary engineering och utvecklat en jäst som producerar 6.8 % (v/v) etanol på 36 timmar och utan större biproduktbildning. Denna jäst kommersialiseras av Taurus under namnet Xyloferm 13. I den andra delen utvärderade vi en stamutvecklingsstrategi som kombinerad mutagenes och evolutionary engineering, vilket ledde fram till en stam som producerar 7% (v/v) etanol på 48 timmar. Vi har också upptäckt en ny pentosjäsande jäst med intressanta egenskaper. I den tredje delen av projektet har vi arbetat mot utveckling av en ättiksyra tolerant jäststam och kunskapsuppbyggnad av de molekylära mekanismerna som inbegriper ättiksyratolerans. Slutligen har vi utvecklat propageringsstrategier som positivt påverkar fermenteringen och vi har konfirmerat våra resultat i demoskal försök (4 m³).

Summary

The aim of the project was to develop yeast strains and process technology for second generation ethanol production. In our first track we combined metabolic engineering and genome shuffling with evolutionary engineering to develop a strain that produces 6.8 % (v/v) ethanol in 36 hours, with high ethanol production rate and almost no by-product formation. The strain is launched by Taurus as Xyloferm 13. In our second track we have evaluated a combined mutagenesis and engineering strategy that allowed isolating a strain producing 7% (v/v) ethanol in 48 hours. Thanks to this set up, also a novel C5-pentose-fermenting yeast with highly interesting properties was discovered. Within the third track, we have taken a step towards acetic acid tolerant strains and a big step towards understanding acetic acid tolerance. We developed yeast propagation strategies which positively impact the fermentation performance and our results were confirmed in a 4 m³ scale trial in Örensköldsvik.

Inledning

Arbete mot en hållbar framtid är del av de stora samhällsutmaningarna. Genom att arbeta mot en etablering av en biobaserad samhällsekonomi kan vi bidra att möta dessa utmaningarna samtidigt som vi kan exploatera den svenska skogsråvaran. Utvecklingen av andra generationens processer där lignocellulosa utnyttjas är en nödvändighet för att möta framtidens behov av bränslen, kemikalier och material. En lyckad etablering av andra generationens bioetanol har möjlighet att bana väg för produktion av en stor variation av biobaserade produkter. Stora framsteg har gjorts mot en effektiv andra generationens etanolförställning, men trots detta återstår många utmaningar vad det gäller tekniska lösningar och den ekonomiska konkurrenskraften av teknologin. Drivkraften i det här projektet har varit att utveckla jäststammar och processteknik för industriell etanolproduktion. Förbättrade egenskaper för industriella jäststammar är ökad xylosomvandlingskapacitet och större syratolerans, för att erhålla en snabbare och mer fullständig sockerkonsumtion och därigenom erhålla en ökad etanolproduktion.

Målet i det här projektet var att utveckla stammar och processteknik, så att minst 90% xylos förjäses och minst 6% v/v etanol produceras inom 48h i råvaruströmmar med total syrehalt på minst 5 g/L.

Huvudresultat

Detta projekt har genererat två *S. cerevisiae* stammar, med hög prestanda i andra generationens råvaruströmmar; (i) XyloFerm®T13, har bekräftad hög etanolproduktionskapacitet i råmaterial såsom vetehalm och vid jäsning av vetehalmshydrolysat erhöles 6.8% (v/v) etanol efter 36 timmar fermentering och fullständig konsumtion av glukos och xylos och (ii) C37 har vid fermentering av vetehalmshydrolysat uppnått 7% (v/v) etanol efter 40 timmars jäsning och då konsumerat mer än 90% av den initiala mängden glukos och xylos.

Trenden inom andra generationens bioetanolproduktion går mot högre och högre substratkoncentrationer och därmed krav på högre syratolerans. Vi har jobbat med ett unikt sätt att uppnå ättiksyratolerans genom att genetiskt förändra cellens membran för att minska genomsläppligheten för ättiksyra och har konkluderat följande att ökad andel sphingolipider i membranet minskar permeabiliteten, vilket vi också har visat genom *in silico* membransimuleringar och genom karaktärisering av den ättiksyra toleranta jästen *Zygosaccharomyces bailii*.

Som ett alternativ till *S. cerevisiae* så har en jäststam med naturlig förmåga att konsumera xylos identifierats. Stammens art är bestämd men kommer av sekretess skäl att beskrivas som C5-jäst. C5-jästen presterar lovande i xylosrika material utan behov av genmodifiering som är en nödvändighet för att *S. cerevisiae* ska kunna fermentera xylos.

Vi har i en detaljerad studie beskrivit vikten av rätt propagering för optimal fermentering. I projektets slutskede genomfördes en studie i demonstrationsskala hos SEKAB, där vi kunde validera effektiv propagering och jäsning.

Måloppfyllelse

Projektets mål har med marginal uppfyllts genom konstruktionen av *Saccharomyces cerevisiae* XyloFerm®T13 som genom fullständigt konsumtion av både xylos och glukos genererar 6.8% v/v etanol på 36h från vetealmshydrolysat som innehåller 5.5 g/L ättiksyra. Även *Saccharomyces cerevisiae* C37 uppfyller målet genom att förjäsa 90% av sockret under 48h och producera 7% v/v etanol. Delmålet att utveckla minst en jäststam med 50 % ökad xylosjäsningshastighet har uppfyllts genom XyloFerm®T13 som har en specifik xyloskonsumtionshastighet på 0.42 g/h*g CDW vilket är 381% av ursprungsstammens xylosekonsumtionshastighet.

Delmålet att demonstrera nya strategier att designa jäststammar med ökad kapacitet att förjäsa syrarika strömmar, har inte uppfyllts till fullo. Vi har fokuserat på att förändra cellens yttre membran för att uppnå syratålighet och har genererat grundläggande kunskap nödvändig för att bygga stamförbättringsstrategier, arbete pågår att ta fram en syratålig stam. Dock har vi uppnått vårt mål att konstruera en industriell stam med kombinerad kapacitet att jäsa xylos effektivt i en syrarik råvaruström, genom utvecklingen av XyloFerm®T13 och C37 som erhöll syratålighet genom riktad evolution.

Effekter i samhället

XyloFerm®T13 har utvärderats hos en rad kunder till Taurus Energi AB och har stor potential att vara med och bidra till etableringen av framgångsrika processer baserade på lignocellulosa som råvarumaterial. Även den identifierade C5-jästen har stor potential att fungera som ett alternativ till *S. cerevisiae* vid anläggningar där genmodifierade organismer ej är önskvärda.

Kunskap gällande syra tolerans och propagering genererat i projektet kommer att komma till stor nytta för forskningsfältet. Arbetet har generell betydelse för nyttjande av biotekniska omvandlingsprocesser inom biobaserat samhällsekonomi.

Genomförande

Projektet har genomförts i samarbete mellan Taurus Energy AB och i samverkan med delprojekt utförda av SEKAB E-Technology och LTH. Förbehandlade material, från olika råvaror, har producerats i PDU-anläggningen vid LTH och i demoanläggning i Örnsköldsvik. Regelbundna projektmöten har hållits mellan de samverkande partners, vilket har bidragit till god utveckling av projekten.

En rad olika jäststammar har tagits fram och karakteriserats. Vi har dels arbetat med industriella jäststammar med komplex genetisk bakgrund och mera välkarakteriserade laboriestammar. Med hjälp av olika kombinationer av riktade genetiska ändringar, s.k genom shuffling, evolutionary engineering har vi uppnått de resultat som redogörs för ovan. I arbetet med stamutvecklingen har vi också arbetet i nära samarbete med Taurus Energy AB och därigenom haft målbilder som har kommersiell betydelse.

Vidare har detaljerade fysiologiska studier genomförts för att generera kunskap som ligger till grund för vidare stamutveckling. Vi har använt detaljerade fermenteringsförsök kopplade till systembiologiska analysmetoder. De fysiologiska studierna har bland annat haft till avsikt att skapa insikter i sambandet mellan ett cellmembrans sammansättning och deras genomsläpplighet av syror, i synnerhet ättiksyra. Vi har också använt fysiologiska studier till att studera den isolerade C5-jästen och värdera dens potential att växa på olika kolkällor och under olika förhållanden som är relevanta för andra generationens bioethanolproduktion. Under projektets gång har vi utvecklat vår förståelse för hur jästen reglerar då den utsätts för den tuffa miljö som lignocellulosa-hydrolysat innebär. De fysiologiska studier har också lett fram till propageringsstrategier som tar till vara hela potentialen hos de framtagna stammarna.

De framtagna jäststammarna har karaktäriserats i labbskala med olika råvaruströmmar och med jäsningstekniker såsom separat jäsning av hydrolysat och i kombinerad SSF. Jäststammarna har sedan karaktäriserats ytterligare från ett processperspektiv i delprojektet som drivs av LTH. Slutligen, har vi utvärderat uppskaleringspotentialen av vår teknologi genom att genomföra propagerings och jäsningsförsök i 4 m³ skala med *Salix* som råvara i samarbete med SEKAB.