

C5-Zucker vergärende Hefen zur Produktion von Lignocellulose-Ethanol

Verzuckert

Prof. Dr. Eckhard Boles,
Institut für Molekulare Biowissenschaften, Goethe-Universität Ffm.

Intensive Forschungs- und Entwicklungsarbeit haben in den letzten Jahren dazu geführt, dass ein industrieller Prozess zur Produktion von Kraftstoffethanol aus pflanzlicher Biomasse greifbar nahe ist. Methoden zur Vorbehandlung des Pflanzenmaterials sind vorhanden, Enzyme zur Verzuckerung der Cellulose können bereits deutlich preiswerter produziert werden und man kann nun Hefen züchten, die auch den in Pflanzenmaterial enthaltenen C5-Zucker zu Ethanol vergären. Nun müssen nur noch die verschiedenen Teilprozesse zusammengeführt werden, um den Prozess effektiver und kostengünstiger und damit letztendlich kommerzialisierbar zu machen.



Bioethanol als erneuerbarer Biokraftstoff

Eine der größten Herausforderungen des 21sten Jahrhunderts wird es sein, den wachsenden weltweiten Hunger nach Energie zu stillen. Für den Transportsektor bieten sich hierbei insbesondere erneuerbare, flüssige Biokraftstoffe wie Bioethanol an. Bioethanol ist ein Kraftstoff, der durch Vergärung von pflanzlichen Rohstoffen gewonnen werden kann. Sein großer logistischer Vorteil ist, dass alle vorhandenen Autos mit Ottomotoren „ethanol-fähig“ sind und einen Zusatz von bis zu 10% Ethanol zum Benzin ohne Änderung des Motors verwenden können. Durch nur geringfügige Umrüstung oder in den so genannten Flexible Fuel Vehicles (FFVs) können sogar Mischungen bis zu 85% Ethanol/15% Benzin (= E85) verwendet werden. Bioethanol kann ohne große Anpassungen über die vorhandene Tankstelleninfrastruktur vertrieben werden. Ethanol wurde bereits in großem Maßstab in Brasilien, den USA und einigen europäischen Ländern eingeführt und es wird erwartet, dass es in den nächsten 20 Jahren einer der dominierenden erneuerbaren Biokraftstoffe im Transportsektor werden wird.

Klassischer Produktionsprozess von Bioethanol

Bioethanol ist Alkohol, der durch Fermentation aus Zuckern mit Hilfe von Mikroorganismen gewonnen wird. Im Allgemeinen wird dazu die Hefe mit dem wissenschaftlichen Namen *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt. Die Zucker stammen aus Pflanzen, die durch den Prozess der Photosynthese die Energie des Sonnenlichtes ausnutzen, um aus Kohlendioxid (CO₂) ihre organischen Bestandteile aufzubauen. Die Zucker können in Form von Stärke (z.B. Getreidekorn, Kartoffel) oder Saccharose (z.B. Zuckerrübe, Zuckerrohr) gespeichert werden oder sie werden in Strukturbestandteile (z.B. Cellulose) umgewandelt, die der Pflanze ihre Form und Stabilität verleihen. Heutzutage wird Bioethanol vornehmlich aus Saccharose (brasilianisches Zuckerrohr) oder aus Stärke (Mais, Getreide) gewonnen. Dabei ist vor allen Dingen das brasilianische Ethanol deshalb so preiswert, weil die Hefen die Saccharose direkt zu Ethanol vergären können, während die Stärke zunächst in einem vorgeschalteten Prozess in Zucker aufgespalten („hydrolysiert“) werden muss. Das geschieht mittels speziellen Enzymen. Nach Destillation und Trocknung kann Ethanol dann als Autokraftstoff eingesetzt werden.

Ethanol aus lignocellulosischer Biomasse

Bioethanol aus Getreide kann nur eine Übergangslösung darstellen. Zum einen ergibt sich dabei eine Konkurrenz zum Lebensmittelmarkt. Zum anderen stehen die nur begrenzten Anbauflächen und die ökologischen Probleme bei der not-

Innovationspreis

Auszeichnung für innovative Kraft-Wärme-Kältekopplung (KWKK)

Im Rahmen einer kleinen Feierstunde am 06.03.07 im Alten Schloss der Stadt Gießen, konnte Prof. Dr.-Ing. Fritz Richarts von der FH Gießen-Friedberg ein Preisgeld von 4000,- € in Empfang nehmen. Er gilt als Ideenschmied des Projektes „Kraft-Wärme-Kältekopplung im Canon Werk Gießen“ die für Ihr Projekt den Innovationspreis der deutschen Gaswirtschaft 2006 in der Kategorie „Preis für Planung, Forschung und Entwicklung“ erhielten. Durch die Realisierung des Projektes, welches in Zusammenarbeit mit den Stadtwerken Gießen AG sowie der Firma Köhler & Ziegler Anlagentechnik GmbH aus Lollar durchgeführt wurde, konnte der CO₂-Ausstoß des Werkes der CANON GIESSEN GmbH um rund 50% gesenkt werden. Darüber hinaus wurden 300.000 kWh Strom sowie 220.000 kWh Wärme eingespart.

Oberbürgermeister Haumann hob in seiner Laudatio die perfekte Zusammenarbeit zwischen der FH Gießen den Stadtwerken einerseits und der CANON GIESSEN GmbH hervor. Insbesondere dankte er Prof. F. Richarts, für sein besonderes Engagement. Herr Toru Nishicawa (President CANON) und Frau Harue Zipse-Utsunomiya (General Manager CANON) hoben den Modellcharakter des Projektes für den CANON Konzern hervor und wünschen sich weitere so fruchtbare Kooperationsprojekte.



v.l.n.r. Toru Nishicawa, Prof. Dr. Richarts, OB Heinz-Peter Haumann, Vizepräsident Prof. Dr. Schumann-Luck

IN MEMORIAM

Am Sonntag, dem 11.03.2007, ist

Prof. Dr.-Ing. habil. Joachim Zschernig

nach langem und geduldig ertragenem Leiden verstorben.



Geboren am 15.10.1943 in Aken, studierte er von 1963–1969 an der TU-Dresden, wo er 1973 promovierte und sich 1991 habilitierte. Nach langen Jahren in der energietechnischen Praxis wurde Joachim Zschernig 1993 als Professor für Energiewirtschaft berufen. Er war ein leidenschaftlicher Lehrer und Forscher mit vielen originellen Denkanätzen, mit denen er seine Mitarbeiter, Doktoranden und Diplomanden anregte. Mit seinen immensen ingenieurtheoretischen und -praktischen Kenntnissen war Joachim Zschernig ein gefragter Partner der Industrie, vor allem auf den Gebieten der Energiewirtschaft, der Fernwärmeversorgung und Kraft-Wärme-Kopplung sowie der Nutzung regenerativer Energiequellen und Wärmepumpen. Joachim Zschernig hat die Verbindung von Theorie und Praxis aktiv gelebt und ist der „geistige“ Vater des nunmehr entstehenden Zentrums für Energietechnik.

Prof. Dr. Fritz Richarts, Dipl.-Ing. Reinhold Altensen, FH Gießen-Friedberg

wendigen Intensivierung der Landwirtschaft einer großflächigen Produktion von auf Stärke basierendem Ethanol entgegen. Der einzige Ausweg aus diesem Dilemma ergibt sich durch die Nutzung von pflanzlichen Reststoffen, wie Stroh, Holzresten oder Landschaftspflegegut, die zudem noch äußerst billig zu haben sind oder aus dem Anbau von Energiepflanzen wie Switchgras oder Miscanthus, die keiner intensiven landwirtschaftlichen Bewirtschaftung bedürfen und auch auf minderwertigen Böden wachsen (Tabelle) [1].

Pflanzenreste oder Energiepflanzen besitzen nur wenig Stärke oder Saccharose, sondern enthalten Zucker in Form von Lignocellulosen in ihren Zellwänden eingelagert. Lignocellulosen bestehen aus Cellulose, Hemicellulosen und dem nicht fermentierbaren Lignin („Holzstoff“). Cellulose ist wie die Stärke ein Polymer aus Zuckermolekülen mit sechs Kohlenstoffatomen, der Glucose, die zu langen Ketten miteinander verknüpft sind. Beide unterscheiden sich nur in der Art der Verknüpfungen. Hemicellulosen bestehen zum größten Teil aus Zuckern mit fünf Kohlenstoffatomen, Xylose und Arabinose, die in verzweigten Ketten aneinandergelagert werden. Um aus Lignocellulose Bioethanol herstellen zu können, müssen zunächst die Cellulose und die Hemicellulosen in die einzelnen Zucker gespalten werden. Das geschieht mit Säuren und speziellen Enzymen. Danach müssen die Hefen das Gemisch aus Glucose, Xylose und Arabinose zu Ethanol fermentieren. Die Fermentation, Destillation und Trocknung geschieht analog zum klassischen Bioethanol-Prozess.

Trotz der großen Ähnlichkeiten in der Stärke- und Lignocellulose-Fermentation galt es, bei der letzteren zunächst einige Probleme in den Griff zu bekommen (Abb. 1). Zunächst muss die Lignocellulose verflüssigt und verzuckert werden. Dieses ist deutlich schwieriger als bei der Stärke, da die Zuckerketten nur schwer zugänglich sind. Das Pflanzenmaterial muss deshalb zunächst chemisch oder thermisch vorbehandelt werden. Erst dann kann die Verzuckerung mit Hilfe von speziellen Enzymen (Cellulasen, Xylanasen, Glucosidasen) geschehen, die analog den Amylasen bei der Stärke die Celluloseketten in Glucose spalten. Diese Enzyme werden aus Pilzen gewonnen, die in der Natur an der Verrottung von Pflanzenresten beteiligt sind. Da wesentlich mehr Enzyme als bei der Stärkeverzuckerung benötigt werden, führt dies zu erhöhten Kosten. Forschungsanstrengungen haben hier in den letzten Jahren jedoch zu einer deutlichen Kostenreduzierung geführt [2].

Der zweite wesentliche Unterschied liegt darin, dass in der Lignocellulose nicht wie in der Stärke nur Glucose als Zuckerbaustein vorhanden ist, sondern auch andere Zucker wie Xylose und Arabinose. Diese können jedoch von den zur Ethanolproduktion verwendeten Hefen nicht genutzt werden. Es müssen also speziell gezüchtete Hefen eingesetzt werden, die neben der Glukose auch die anderen Zucker zu Ethanol

vergären können. Dies wird unten noch im Detail beschrieben. Ein dritter Unterschied sind toxische Stoffe, die bei der chemischen Vorbehandlung des Pflanzenmaterials entstehen (z.B. Furfurale). Diese Inhibitoren schädigen die bei der Fermentation eingesetzten Mikroorganismen und müssen theoretisch vorher entfernt werden. Dies verursacht zusätzliche Kosten. Ein Ausweg ist es, Inhibitor-tolerante Hefen einzusetzen [3].

Ein vierter wesentlicher Unterschied ist das niedrigere Raumgewicht von Pflanzenabfällen, d.h. die niedrigere Energiedichte gegenüber Getreide- oder Maiskörnern. Dieses bedeutet erhöhte Transportkosten und einen erhöhten Lager-raumbedarf. Dieses Problem könnte jedoch durch effizientere Presstechniken, den Transport von bereits zerkleinertem Material und kleineren, dezentralen Produktionsanlagen gelöst werden.

Vergärung der C5-Zucker Xylose und Arabinose

Wie bereits oben angeführt, besteht die pflanzliche Biomasse zu einem Großteil aus Zuckern mit sechs und solchen mit fünf Kohlenstoffatomen (C6- und C5-Zucker). In der Natur gibt es nun jedoch keine geeigneten Organismen, die alle diese Zucker vollständig zu Ethanol vergären könnten. Aus diesem Grunde bedurfte es einiger Anstrengungen, um einen Mikroorganismus zu züchten, der alle Zucker mit hoher Ausbeute zu Ethanol vergären kann.

Wie wichtig die Umsetzung aller Zucker für eine wirtschaftliche Vergärung von pflanzlicher Biomasse ist, sei hier gezeigt. Pflanzenabfälle wie z.B. Stroh enthalten etwa 32% Glucose, 19% Xylose und 2,4% Arabinose [1]. In 1t Abfall sind also

Zusammensetzung von landwirtschaftlichen lignocellulosischen Rohstoffen

	Maisstroh	Weizenstroh	Bagase	Switchgras
Kohlenhydrate (%)				
Glucose	34,6	32,6	39,0	31,0
Mannose	0,4	0,3	0,4	0,2
Galactose	1,0	0,8	0,5	0,9
Xylose	19,3	19,2	22,1	0,4
Arabinose	2,5	2,4	2,1	2,8
Uronsäuren	3,2	2,2	2,2	1,2
Nicht-Kohlenhydrate (%)				
Lignin	17,7	16,9	23,1	17,6
Andere Rückstände	18,1	23,2	7,5	22,8

320kg Glucose enthalten. Bei einer vollständigen Vergärung entstehen daraus etwa 160kg Ethanol, was einem Volumen von 200l entspricht. Die vollständige Vergärung des Pentosezuckers Xylose ergibt entsprechend zusätzliche 124l Ethanol pro Tonne Abfall. In der Praxis kann man in Deutschland von einem Netto-Strohertrag von 2,8 t Trockenmasse pro Hektar ausgehen. Insgesamt werden in Deutschland z.Z. etwa 12 Mio. Hektar Land als Ackerfläche genutzt. Würde nun etwa die Hälfte des vorhandenen Abfalls in Ethanol vergoren, so könnten pro Jahr aus der gebundenen Glucose etwa 3 Mrd. Liter Ethanol gewonnen werden. Die Vergärung der in den Pflanzenabfällen vorhandenen Xylose ergäbe zusätzliche 2 Mrd. Liter Ethanol. Selbst die prozentual gesehen recht kleine Menge an Arabinose liefert immerhin noch 250 Mio. Liter Ethanol. Da die Margen in einem Markt wie den Biokraftstoffen recht eng sind, ist es für einen wirtschaftlich sinnvollen Prozess essentiell, möglichst alle vorhandenen Zuckerarten in Ethanol umzuwandeln.

In der traditionellen Ethanolproduktion werden ausschließlich Hefen vom Typ *Saccharomyces* eingesetzt. Das sind die gleichen Hefen, die auch zur Herstellung von Brot, Bier und Wein dienen. Hefen haben gegenüber Bakterien den Vorteil, dass ihre Handhabung in industriellen Prozessen schon seit Jahrhunderten etabliert ist. Darüber hinaus sind sie auch wesentlich widerstandsfähiger und robuster. Aus diesem Grunde bieten sie sich hervorragend für die Produktion von Ethanol aus Lignocellulose an. Ihr großer Nachteil ist jedoch, dass sie nur die C6-Zucker aber nicht die C5-Zucker vergären können.

Verschiedene Forschergruppen aus Europa und den USA, unter anderem auch meine Arbeitsgruppe von der Goethe-

Universität Frankfurt, haben in den letzten Jahren Hefestämme züchten können, die auch C5-Zucker zu Ethanol vergären. Aus dem Erbmateriale der Hefe lässt sich ablesen, dass diese früher einmal in der Lage war, C5-Zucker zu verwerten [4, 5]. Sie hat diese Eigenschaft allerdings im Laufe ihrer Evolution wieder verloren. Mit Hilfe moderner biologischer Verfahren gelang es nun jedoch, den Hefezellen diese Eigenschaft wieder zu verleihen bzw. sie sogar deutlich zu verbessern. Dazu wurde ihnen gezielt das entsprechende Erbmateriale aus anderen Hefen, Pilzen und Bakterien angeboten. Solch ein sogenannter horizontaler Gentransfer ist in der Natur ein normaler Prozess und hat über die Jahrmillionen zu der Vielfalt an Organismen geführt, die wir heute kennen. Auch die Hefezellen besitzen von Natur aus Erbmateriale, das sie im Laufe ihrer Entwicklung von anderen Organismen erworben haben. Im Falle der C5-Zucker vergärenden Hefen konnte dieser Prozess nun in einer deutlich verkürzten Zeit nachgestellt werden. Dabei sind Hefezellen entstanden, die sowohl C6- als auch C5-Zucker vergären können.

Im Falle des C5-Zuckers Xylose wurden dazu zwei verschiedene Strategien angewandt (Abb. 2, rechts). Wissenschaftler der Universität Lund in Schweden nutzten einen 2-Schritt-Mechanismus (Xylose-Reductase/Xylitol-Dehydrogenase aus *Pichia stipitis*) aus, um Xylose in den Stoffwechsel der Hefe einzuschleusen [6]. Dieselben Wissenschaftler und solche der Technischen Universität Delft aus den Niederlanden konnten kürzlich aber auch erfolgreich Hefen züchten, die Xylose direkt in einem Schritt mithilfe des Enzyms Xylose-Isomerase in ihren Stoffwechsel integrieren und zu Ethanol vergären können [1, 6].

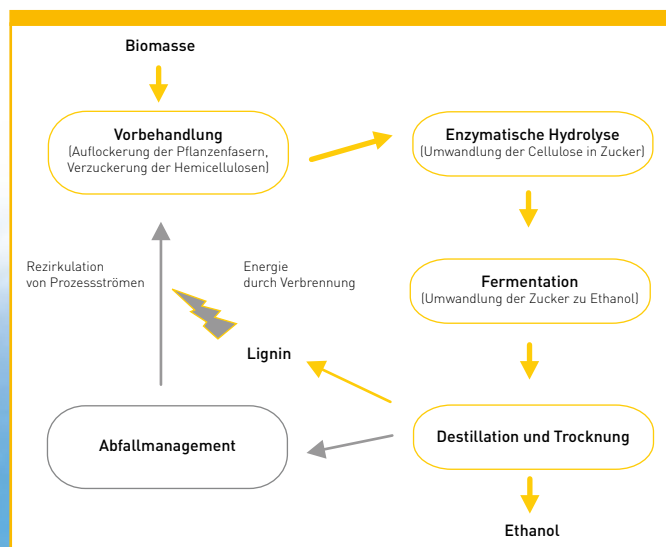


Abb. 1: Schematische Darstellung der Umwandlung von Biomasse zu Bioethanol

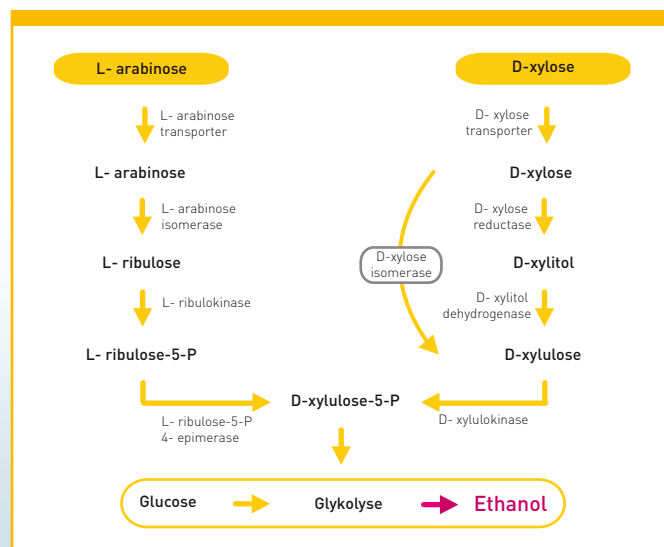


Abb. 2: Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde mit zahlreichen neuen Enzymen ausgestattet, um außer der Glucose auch die in Pflanzen vorhandenen C5-Zucker Arabinose und Xylose zu Ethanol zu vergären.

Im Falle des C5-Zuckers Arabinose stellte sich der häufig in Pilzen zu findende 5-stufige Abbauweg in den *Saccharomyces*-Hefen als wenig geeignet heraus. Dagegen konnte meine eigene Arbeitsgruppe erfolgreich einen 3-stufigen Stoffwechselweg etablieren, der sonst nur in Bakterien zu finden ist [7] (Abb. 2, links). Integrierte man diesen Stoffwechselweg in die Hefen und zwang sie dann mehrere Monate lang, Arabinose als einzige Energiequelle zu nutzen, dann entwickelten sich tatsächlich Hefestämme, die neben der Glucose auch Arabinose vergären konnten. Zusammen mit den Forschern der Universität Lund waren wir dann sogar in der Lage eine Hefe zu züchten, die alle Zucker, also Glucose, Xylose und Arabinose zu Ethanol vergären kann [8].

Als nächsten Schritt gilt es nun, die im Labor erzielten Erfolge für den industriellen Einsatz weiterzuentwickeln. Die im Laboralltag benutzten Hefestämme sind zwar sehr gut geeignet, die verschiedenen Vergärungsstrategien zu erforschen, sie sind jedoch meist für industrielle Anwendungen weniger brauchbar. Zum einen sind die Laborhefen nicht stabil genug und verlieren ihre erworbenen Fähigkeiten sehr schnell wieder, zum anderen sind sie zu empfindlich gegenüber toxischen Substanzen (Furfuralen), die bei der chemischen Vorbehandlung des Pflanzenmaterials entstehen. Die Weiterentwicklung in den industriellen Maßstab geht jedoch an den Aufgaben der Universitäten und Forschungseinrichtungen vorbei. Hier bedarf es privatwirtschaftlicher Anstrengungen. Diese Lücke versuchen wir gerade durch die Gründung des Unternehmens Pentalco (www.pentalco.com) zu schließen.

Ausblick

Insgesamt bleibt also festzuhalten, dass alle wesentlichen Voraussetzungen für einen Lignocellulose-Ethanol Prozess vorhanden sind. Nun gilt es nur noch, diesen in die Wirklichkeit zu überführen. Die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (FNR) hat in einer Studie die Kosten für Lignocellulose-Ethanol aus Abfallstroh auf etwa 60 Cent pro Liter geschätzt [9]. Das ist nur wenig mehr als die Kosten für Stärke-Ethanol. Außerdem sind es nur Schätzungen, da es noch keine industrielle Produktion gibt. Ebenso sind darin keine steuerlichen Vergünstigungen, Fördermittel und sonstigen Subventionen

berücksichtigt. Die wahren Kosten wird erst die erste kommerziell betriebene Anlage zeigen. Die größten Kosten sind immer noch die Enzymkosten zur Celluloseverzuckerung. Enzymhersteller verweisen jedoch darauf, dass es bereits kostengünstige Prozesse für effektivere Enzyme gibt, es aber nicht lohnt, sie zu produzieren, weil keine Nachfrage da ist. Erst wenn die ersten kommerziellen Anlagen laufen, wird die Nachfrage steigen und die Enzyme werden billiger werden. Erst dann wird man auch sehen, wie sich die neu gezüchteten Hefen unter diesen Bedingungen verhalten. Auch wenn vielleicht die C5-Zuckervergärung zunächst noch nicht optimal verläuft, so können alle Hefen die C6-Zucker bereits vollständig vergären. Und sobald verbesserte, kostengünstige Enzyme und Hefen da sind, lassen sich diese in jeder Anlage jederzeit problemlos austauschen. Die Frage scheint also nicht länger zu sein ob, sondern wann die erste im kommerziellen Maßstab betriebene Lignocellulose-Ethanolanlage in Betrieb gehen wird.

Literatur

- [1] van Maris AJ, Abbott DA, Bellissimi E, van den Brink J, Kuyper M, Luttik MA, Wisselink HW, Scheffers WA, van Dijken JP, Pronk JT (2006) Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie Van Leeuwenhoek* 90:391-418.
- [2] Zeman N (2007) The discoverer's game. *Ethanol Producer Magazine*, January 2007
- [3] Petersson A, Almeida JR, Modig T, Karhumaa K, Hahn-Hagerdal B, Gorwa-Grauslund MF, Liden G. (2006) A 5-hydroxymethyl furfural reducing enzyme encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* ADH6 gene conveys HMF tolerance. *Yeast*. 23:455-64.
- [4] Toivari MH, Salusjarvi L, Ruohonen L, Penttila M. (2004) Endogenous xylose pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*. 70:3681-6.
- [5] Attfield PV, Bell PJ. (2006) Use of population genetics to derive nonrecombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains that grow using xylose as a sole carbon source. *FEMS Yeast Res*. 6:862-8.
- [6] Hahn-Hagerdal B, Galbe M, Gorwa-Grauslund MF, Liden G, Zacchi G. (2006) Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol*. 24:549-56.
- [7] Becker J, Boles E. (2003) A modified *Saccharomyces cerevisiae* strain that consumes L-arabinose and produces ethanol. *Appl Environ Microbiol*. 69:4144-50.
- [8] Karhumaa K, Wiedemann B, Hahn-Hagerdal B, Boles E, Gorwa-Grauslund MF. (2006) Co-utilization of L-arabinose and D-xylose by laboratory and industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Microb Cell Fact*. 5:18.
- [9] Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (2006) Biokraftstoffe – eine vergleichende Analyse.

● e.boles@bio.uni-frankfurt.de