



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Unraveling substrate dynamics and identifying inhibitors in hydrolysates of lignocellulosic biomass by exometabolomics

Zha, Y.

Citation

Zha, Y. (2013, November 27). *Unraveling substrate dynamics and identifying inhibitors in hydrolysates of lignocellulosic biomass by exometabolomics*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/22379>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/22379>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/22379> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Zha, Ying

Title: Unraveling substrate dynamics and identifying inhibitors in hydrolysates of lignocellulosic biomass by exometabolomics

Issue Date: 2013-11-27

SAMENVATTING

Lignocellulolytische biomassa is dé 2e generatie feedstock voor bio-ethanol productie met behulp van fermentatie processen. Biomassa-bronnen worden met name gevonden onder de afvalproducten van landbouw en/of industrie. Deze zijn goedkoop, milieu-vriendelijk en niet concurrerend met het gebruik als menselijk of dierlijk voedsel. De structuur van lignocellulose is zeer rigide en bestaat uit de componenten cellulose, hemicellulose en lignine. Om de starre structuur open te breken, zodat de cellulose en hemicellulose toegankelijk worden voor hydrolyse, is het nodig een voorbehandelingsmethode toe te passen. Hier bestaan diverse varianten van die verschillend zijn qua openbrekend vermogen en qua efficiëntie. Een milde voorbehandelingsmethode resulteert in het niet volledig toegankelijk worden van cellulose, terwijl een agressieve methode kan leiden tot het ontstaan van ongewenste componenten door omzetting van suikers en lignine in giftige afbraakproducten. Deze giftige componenten remmen de groei van het micro-organisme dat het fermentatieproces uitvoert, wat resulteert in een verlaagde productiviteit.

Om de fermenteerbaarheid te verbeteren van het lignocellulose hydrolyseproduct (met andere woorden het biomassa hydrolysaat), is het belangrijk om te identificeren welke componenten remmend zijn. **Hoofdstuk 1** van dit proefschrift beschrijft de in deze studie gebruikte aanpak en introduceert een breed-toepasbare methodiek waarmee systematisch remmende componenten in biomassa hydrolysaten geïdentificeerd kunnen worden: de 'exometabolomics aanpak'. Deze exometabolomics aanpak bestaat uit vier stappen, te weten: (i) definiëren van de onderzoeksvraag, (ii) ontwerpen van de experimentele opzet, (iii) selectie en analyse van monsters, en (iv) data analyse en interpretatie.

Er is een brede verscheidenheid aan biomassa hydrolysaten nodig om met behulp van de exometabolomics aanpak de remmende componenten in die hydrolysaten te kunnen identificeren. Vier verschillende voorbehandelingsmethoden werden uitgevoerd en toegepast op zes verschillende soorten biomassa. De fermenteerbaarheid van de resulterende vierentwintig verschillende biomassa hydrolysaten werd getest met de ethanol-producerende gist *Saccharomyces cerevisiae*. In **Hoofdstuk 2** worden de gedetailleerde protocollen van de vier voorbehandelingsmethoden beschreven en ook de verschillen in fermenteerbaarheid van de met deze methoden geproduceerde biomassa hydrolysaten.

Het onderwerp van discussie in **Hoofdstuk 3** is de hydrolyse efficiëntie van de voorbehandelde biomassa. Om het hydrolyseproces breder te bestuderen dan alleen maar

Samenvatting

te kijken naar het vrijmaken van monosacchariden, en ook om begrip te krijgen van welke oligosacchariden voorkomen in biomassa hydrolysaten, is een specifieke meetmethode toegepast genaamd high-performance anion-exchange chromatography + mass spectrometry (HPAEC-MS). Deze methode is in staat vele oligosacchariden binnen één meting te scheiden en individueel te detecteren. Bovendien kan door het schatten van de response factor per oligosaccharide een overzicht gemaakt worden van de relatieve hoeveelheden van de gedetecteerde oligosacchariden. Het resultaat van deze analyse was dat naast monomeren de resterende suikers in hoofdzaak als disacchariden aanwezig waren in alle biomassa hydrolysaten zoals gemaakt met behulp van de voorbehandelingsmethoden beschreven in Hoofdstuk 2.

Hoofdstuk 4 tot en met 6 zijn gericht op het identificeren van remmende componenten in lignocellulolytische biomassa hydrolysaten en het bestuderen van hun effecten op de ethanol-producerende gist gedurende het fermentatieproces. Dit soort remmende componenten worden vrijgemaakt of gevormd gedurende het biomassa voorbehandelingsproces en zijn voornamelijk onder te verdelen in de groepen zwakke zuren, furanen en fenolische stoffen (voorbeelden respectievelijk azijnzuur, furfural en vaniline). De aanwezigheid en concentratie van de remmende componenten worden bepaald door het type biomassa en door de toegepaste voorbehandelingsmethode. Het remmingseffect van deze componenten kan zich uiten in onder andere een langere lag-fase, een lagere groeisnelheid en een gereduceerde productiviteit.

Hoofdstuk 4 beschrijft onderzoek naar de aanwezigheid en dynamiek van een geselecteerde groep remmers in een aantal verschillende biomassa hydrolysaten. De fermenteerbaarheid van de hydrolysaten werd getest door batch-fermentaties met bakkersgist uit te voeren en gedurende dit hele proces tijdsmonsters te nemen waarvan vervolgens de samenstelling werd bepaald (met uitsluiting van suikerverbindingen). Van een geselecteerde groep remmers werden de daadwerkelijke concentraties bepaald. De gevonden waarden zijn daarna gebruikt voor het opzetten van een giftigheidstest van mogelijk remmende componenten.

Hoofdstuk 5 beschrijft de gedetailleerde experimentele procedure en resultaten van de exometabolomics aanpak zoals geïntroduceerd in Hoofdstuk 1. De onderzoeksvraag, in dit geval de identificatie van remmers in biomassa hydrolysaten, werd beantwoord door met behulp van biostatistische methoden correlaties te identificeren tussen de fermenteerbaarheid van 16 verschillende biomassa hydrolysaten en hun chemische samenstelling. Om een zo breed mogelijk spectrum van componenten te kunnen detecteren

werd de samenstelling bepaald met behulp van twee verschillende GC-MS methoden. Analyse van de meetresultaten werd uitgevoerd door deze in statistische modellen te beschrijven. Het eindresultaat was een lijst van componenten met remmende eigenschappen in biomassa hydrolysaten, waaronder ook niet eerder hiervoor beschreven componenten. Dit resultaat geeft aan dat metabolomics een relevante aanpak kan zijn bij het vinden van specifieke componenten in complexe systemen zoals lignocellulolytische biomassa hydrolysaten

Ter afsluiting, in **Hoofdstuk 6** wordt beschreven hoe we uit verschillende milieus micro-organismen hebben geïsoleerd die restitutie vertonen tegen de remmende effecten van biomassa hydrolysaat componenten. Een micro-organisme met unieke kwaliteiten op dit gebied werd geïdentificeerd als *Pichia anomala*. Deze specifieke gist stam vertoonde in de geteste hydrolysaten een hoge resistentie tegen groeiremming in vergelijking met andere *P. anomala* stammen, en was ook in staat xylose als koolstofbron en nitraat als stikstofbron te gebruiken. Als deze stam, door verder onderzoek en genetische modificatie, nog verder geoptimaliseerd kan worden in deze eigenschappen, dan is deze stam in potentie een goede kandidaat voor commerciële vergisting van lignocellulolytische biomassa hydrolysaten.

