ABSTRACT

A major challenge during bioethanol production is the generation of inhibitory compounds during pretreatment of lignocellulosic biomass, which decreases overall ethanol yield and productivity by affecting growth of the fermenting microorganism when using unwashed biomass. Therefore, the major aim of this study was to develop robust bioethanol-producing yeast having superior tolerance to multiple inhibitors. After screening 150 indigenous yeasts, a new robust thermotolerant ethanol fermenting yeast *Kluyveromyces marxianus* JKH5 was selected. It was improved further via adaptive laboratory evolution (ALE) to increase its tolerance to higher concentrations of inhibitory compounds. The developed yeast *K. marxianus* JKH5 C60 had a 3.3-fold higher specific growth rate and 56% reduced lag phase in comparison to the parent strain in presence of inhibitor cocktail containing acetic acid 6 g/L, furfural 3.2 g/L and vanillin 3 g/L. The fermentation efficiency in presence of inhibitors with glucose (100 g/L) was enhanced by 80%, with an ethanol titer of 24.8±1.0 g/L. Further, sequential dilute acid-alkali pretreatment of sugarcane bagasse (SCB) was optimized to reduce its recalcitrance by using Box-Behnken and D-optimal designs. Optimised pretreatment conditions were: H_2SO_4 and NaOH concentrations of 3% (v/v) and 5% (w/v), SCB solid loadings (SLs) of 18 and 15% (w/w), pretreatment time and temperature of 30 min and 121 °C, respectively. The effectiveness of sequential pretreatment was supported by increased cellulose content (83%), drop in hemicellulose (92%), 97.2% removal of lignin, as well as favourable ultrastructural changes in pretreated SCB as confirmed by FT-IR, SEM, EDX, TGA, XRD and SANS analyses. Enzymatic hydrolysis of pretreated bagasse at SL of 15% (w/w) by commercial cellulase (enzyme dose of 20 FPU/gds) resulted in maximum reducing sugar production of 124.8±0.9 g/L. Further, separate hydrolysis and fermentation of sugars by *K. marxianus* JKH5 C60 resulted in ethanol production of 54.9± 1.2 g/L. The detoxified and neutralized pentose-rich (23 g/L) dilute acid hydrolysate was fermented to ethanol (6.8±0.07 g/L) using *Pichia stiptis* NCIM 3499. Batch and fed-batch strategies for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of pretreated bagasse were also optimized at shake flasks and successfully scaled up to 3L lab-scale fermenter. Fed-batch SSF with intermittent feeding of SCB biomass and enzyme emerged as a superior strategy for enhanced bioethanol production at 42 °C, with comparable ethanol production in the presence and absence of inhibitors. Under optimized lab-scale fed-batch SSF at a high solid loading of SCB (dry SL = 20%), the ethanol titer and productivities by the developed yeast (in presence of inhibitors), were 73.4±1.2 g/L and 3.0 g/L, respectively. Mass balance analysis of the whole process of conversion of SCB to bioethanol, using the adapted yeast strain, indicated overall ethanol production of 260.1 kg per tonne of native sugarcane bagasse. Thus, the yeast developed in this study can make bioethanol production process more cost-effective by producing high ethanol titer within a shorter duration, and by decreasing wastewater generation by eliminating the need to wash the pretreated biomass prior to fermentation.

Keywords: Lignocellulose; Sugarcane bagasse; Sequential pretreatment; Small-angle neutron scattering (SANS); Enzymatic saccharification; Bioethanol

सार

बायोएथेनॉल उत्पादन के दौरान एक बड़ी चुनौती लिग्नोसेल्यूलोसिक बायोमास के प्रीट्रीटमेंट के दौरान निरोधात्मक यौगिकों का निर्माण है, जो बिना धुले बायोमास का उपयोग करते समय किण्वित सूक्ष्मजीव के विकास को प्रभावित करके समग्र इथेनॉल उपज और उत्पादकता को कम करता है। इसलिए, इस अध्ययन का प्रमुख उद्देश्य एक मजबूत बायोएथेनॉल-उत्पादक yeast विकसित करना था जिसमें कई अवरोधकों के लिए बेहतर सहनशीलता हो। 150 स्वदेशी यीस्ट की जांच के बाद, एक नया थर्मोटोलरेंट इथेनॉल किण्वन yeast *K. marxianus* JKH5 का चयन किया गया। निरोधात्मक यौगिकों की उच्च सांद्रता के प्रति इसकी सहनशीलता बढ़ाने के लिए अनुकूली प्रयोगशाला विकास (एएलई) के माध्यम से इसे और बेहतर बनाया गया था। विकसित यीस्ट *K. marxianus* JKH5 C60 में एसिटिक एसिड 6 g/L, फुरफुरल 3.2 g/L और वैनिलिन 3 g/L युक्त इनहिबिटर कॉकटेल की उपस्थिति में पैरेंट स्ट्रेन की तुलना में 3.3 गुना अधिक विशिष्ट विकास दर और 56% कम अंतराल चरण था। ग्लूकोज (100 g/L) के साथ अवरोधकों की उपस्थिति में किण्वन दक्षता को 24.8±1.0 g/L के इथेनॉल टिटर के साथ 80% तक बढ़ाया गया था। इसके अलावा, गन्ना खोई (एससीबी) के अनुक्रमिक तनु अम्ल-क्षार प्रीट्रीटमेंट को Box-Behnken and D-optimal डिजाइनों का उपयोग करके इसकी पुनर्गणना को कम करने के लिए अनुकूलित किया गया था। अनुकूलित प्रीट्रीटमेंट स्थितियां थीं: H_2SO_4 और NaOH सांद्रता 3% (v/v) और 5% (w/v), SCB सॉलिड लोडिंग (SL) 18 और 15% (w/w), प्रीट्रीटमेंट समय और 30 मिनट का तापमान और 121°C, क्रमशः। अनुक्रमिक प्रीट्रीटमेंट की प्रभावशीलता बढ़ी हुई सेल्यूलोज सामग्री (83%), हेमिसेल्यूलोज में गिरावट (92%), लिग्निन को 97.2 % हटाने, साथ ही एफटी-आईआर, एसईएम द्वारा पुष्टि के रूप में प्रीट्रीटेड एससीबी में अनुकूल अवसंरचनात्मक परिवर्तनों द्वारा समर्थित थी। EDX, TGA, XRD और SANS विश्लेषण करते हैं। वाणिज्यिक सेल्युलेस (20 FPU/gds की एंजाइम खुराक) द्वारा 15% (w/w) के SL पर प्रीट्रीटेड बैगैस के एंजाइमैटिक हाइड्रोलिसिस के परिणामस्वरूप अधिकतम चीनी उत्पादन 124.8 ± 0.9 g/L कम हो गया। इसके अलावा, *K. marxianus* JKH5 C60 द्वारा अलग हाइड्रोलिसिस और शर्करा के किण्वन के परिणामस्वरूप 54.9± 1.2 g/L का इथेनॉल उत्पादन हुआ। डिटॉक्सिफाइड और न्यूट्रलाइज्ड पेंटोस-रिच (23 g/L) डाइल्यूट एसिड हाइड्रोलाइजेट को *Pichia stipitis* NCIM 3499 का उपयोग करके इथेनॉल (6.8±0.07 g/L) में किण्वित किया गया था। प्रीट्रीटेड खोई के एक साथ सैक्रिफिकेशन और किण्वन (SSF) के लिए बैच और फेड-बैच रणनीतियों को भी शेक फ्लास्क में अनुकूलित किया गया था और सफलतापूर्वक 3L लैब-स्केल किण्वक तक बढ़ाया गया था। एससीबी बायोमास और एंजाइम की आंतरायिक फीडिंग के साथ फेड-बैच एसएसएफ 42 °C पर बायोएथेनॉल उत्पादन को बढ़ाने के लिए एक बेहतर रणनीति के रूप में उभरा, जिसमें अवरोधकों की उपस्थिति और अनुपस्थिति में समान / तुलनीय इथेनॉल उत्पादन होता है। एससीबी (dry SL = 20%) के उच्च ठोस लोडिंग पर अनुकूलित लैब-स्केल फेड-बैच एसएसएफ के तहत, विकसित yeast (अवरोधकों की उपस्थिति में) द्वारा इथेनॉल टिटर और उत्पादकता 73.4±1.2 g/L g/L और 3.0 g/L/h), क्रमशः। अनुकूलित यीस्ट स्ट्रेन का उपयोग करते हुए एससीबी को बायोएथेनॉल में बदलने की पूरी प्रक्रिया का सामूहिक संतुलन विश्लेषण, 260.1 kg per tonne देशी गन्ना खोई के समग्र इथेनॉल उत्पादन को दर्शाता है। इस प्रकार, इस अध्ययन में विकसित yeast बायोएथेनॉल उत्पादन प्रक्रिया को कम अवधि के भीतर उच्च इथेनॉल टिटर का उत्पादन करके और किण्वन से पहले प्रीट्रीटेड बायोमास को धोने की आवश्यकता को समाप्त करके अपशिष्ट जल उत्पादन को कम करके अधिक लागत प्रभावी बना सकता है।

कीवर्ड: *लिग्नोसेल्यूलोज; गन्ने की खोई; अनुक्रमिक दिखावा; स्मॉल-एंगल न्यूट्रॉन स्कैटरिंग (SANS); एंजाइमेटिक सैक्रिफिकेशन; बायोएथेनॉल*