

Abschlussbericht:

Zuwendungsempfänger: Prof. Dr. Ch. Wilhelm, Universität Leipzig, Institut für Biologie I - Abteilung Pflanzenphysiologie Johannisallee 21-23 D-04103 Leipzig Tel.: 0341-9736874 / 70, Fax: 0341-9736899	Verbundnummer: W3ALG101
Vorhabenbezeichnung: „Prozessintensivierung für die Algenbioverfahrenstechnik: ein neuer Ansatz“	
Laufzeit des Vorhabens: 01.07.2006-31.12.2009	

Der Bericht stellt neben den wissenschaftlich-technischen Ergebnissen, die vom Zuwendungsempfänger erzielt wurden, auch die Daten der Unterauftragnehmer zusammen. Die beteiligten Kooperationspartner waren:

Prof. Dr. Clemens Posten,
KIT - Campus Süd
Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik,
Bereich Bioverfahrenstechnik
Fritz-Haber-Weg 2
76131 Karlsruhe
Tel: 0721 608 – 5200, Fax: 0721 608 - 5202
Email: Clemens.Posten@kit.edu
Web: <http://bvt.blk.kit.edu/>

Sächsisches Institut für Angewandte
Biotechnologie (SIAB)
Permoserstr. 15
04318 Leipzig
Tel: 0341 235 278, Fax 0341 235 283
Email: siab@rz.uni-leipzig.de

Prof. Dr. Norbert Rübiger
Institut für Umweltverfahrenstechnik
Universität Bremen
Leobener Str.
28359 Bremen
Tel: 0421-218-63330, Fax:+49- 421-218 4947
Web: <http://www.iuv.uni-bremen.de>

Inhaltsverzeichnis

I. Kurze Darstellung des Projektes	4
I.1. Aufgabenstellung	4
I.2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	4
I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens	4
I.4. Wissenschaftlich und technischer Stand, an dem angeknüpft wurde	5
II. Eingehende Darstellung	6
II.1. Erzielte Ergebnisse im Einzelnen	6
II.1.1. Bestimmung und Steuerung der Glykolatausscheidung	6
II.1.1.1. Glykolatausscheidung bei verschiedener Gaszusammensetzung	6
II.1.1.2. Optimierung der Glykolatausscheidung	10
II.1.1.3. Untersuchungen der Glykolatausscheidung an immobilisierten Algen	13
II.1.1.4. Glykolatnachweis mittels HPLC-Methode	15
II.1.2. Vergärung von Glykolat zu Methan	16
II.1.2.1. Etablierung einer Glykolat-verwertenden Mikroorganismenkultur	17
II.1.2.2. Bilanzierung des Methanertrags aus Glykolsäure	19
II.1.2.3. Isolierung der Mikroorganismen aus dem Biogasreaktor	20
II.1.3. Photobioreaktordesign für einen Algenvliesreaktor	21
II.1.3.1. Methoden der Immobilisierung	22
II.1.3.2. Untersuchungen verschiedener Materialien auf ihre Tauglichkeit als Träger bzw. zur Immobilisierung	23
II.1.3.3. Abschließende Bewertung der Ergebnisse	27
II.1.4. Trennung des aeroben Photosynthese- vom anaeroben Fermentationskompartiment	29
II.1.4.1. Ergebnisse zur Biofilmbildung auf prinzipiell geeigneten, semipermeablen Oberflächen	30
II.1.4.2. Ergebnisse für die Materialauswahl zur Ausfertigung des Trennmoduls	35
II.1.4.3. Abschließende Bewertung der Ergebnisse	42
II.1.5. Zusammenfassung	43
II.2. Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises	45
II.3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	45

II.4. Voraussichtlicher Nutzen	46
II.5. Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordene Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens	46
II.6. Die erfolgten und geplanten Veröffentlichungen der Ergebnisse	46
II.6.1. Vorträge und Poster auf nationalen und internationalen Tagungen	46
II.6.2. Veröffentlichungen und in Vorbereitung befindliche Veröffentlichungen	46
II.7. Literatur	46
III. Erfolgskontrollbericht	48
1. Beitrag der Ergebnisse zu den förderpolitischen Zielen	48
2. Wissenschaftliche Ergebnisse des Vorhabens, die erreichten Nebenergebnisse und die gesammelten wesentlichen Erfahrungen	48
3. Fortschreibung des Verwertungsplans	49
4. Arbeiten, die noch zu keiner Lösung geführt haben	49
5. Präsentationsmöglichkeiten	49
6. Einhaltung der Ausgaben und der Zeitplanung	49

I. Kurze Darstellung des Projektes

I.1. Aufgabenstellung

Ziel des Vorhabens ist eine erste Machbarkeitsstudie mit Hilfe eines neuen Ansatzes photosynthetisch aktive aerobe Algenbiofilme in Kombination mit einem anaeroben Fermentationskompartiment eine direkte Synthese von Methan aus Wasser und CO₂ zu realisieren. Dazu wurde im ersten Teilprojekt die photosynthetische Ausscheidung von Glykolat, in einem zweiten Teilvorhaben die anaerobe Fermentation von Glykolat in Methan, in einem dritten Teilvorhaben die Biofilmbildung auf geeigneten Trägern untersucht. Schließlich wurde im vierten Teilprojekt nach Möglichkeiten gesucht, einen aeroben Algenbiofilm mit einem anaeroben Bakterienreaktor zu koppeln. Es sollte gezeigt werden, daß die Teilvorgänge bei der Glykolatherstellung und Verwertung gemäß Projektidee möglich sind und dann dokumentiert werden, daß technisch die Möglichkeit besteht, die Vorgänge von photosynthetischer Glykolatbildung und anaerober Methanogenese in einem Reaktorkonzept zu koppeln.

I.2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Der neue Ansatz verlangt die Zusammenführung von vier verschiedenen Expertisen: der Algenphysiologie, der anaeroben Fermentertechnologie, der Mikrosystemtechnik und des Photobioreaktordesigns. Die algenphysiologische Seite wurde von der Universität Leipzig vertreten, die Vorgänge bei der glykolatbasierten Methanogenese vom SIAB, die Mikrosystemtechnik von der Universität Bremen und schließlich die Untersuchungen zum Reaktordesign von der Universität Karlsruhe beigetragen. In dem Vorhaben wurde dieses Konsortium neu gegründet und eine operative Zusammenarbeit aufgebaut. Der Bericht belegt, daß das Konsortium trotz der kurzen Laufzeit des Vorhabens eine erfolgreiche Zusammenarbeit wissenschaftlich und administrativ aufbauen konnte.

I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Vorhaben mußte kostenneutral verlängert werden, da nach Erhalt des Zuwendungsbescheides nicht sofort das notwendige Personal eingestellt werden konnte. Dadurch kam es zu einem verzögerten Mittelablauf. Durch die verwaltungstechnisch bedingte verspätete Personaleinstellung konnten die Ziele des Vorhabens nur durch eine entsprechende Laufzeitverlängerung erreicht werden. Ansonsten wurde das Vorhaben gemäß dem Arbeitsplan abgearbeitet.

I.4. Wissenschaftlich und technischer Stand, an dem angeknüpft wurde

Bei der Herstellung von Biokraftstoffen, wie Biodiesel oder Methan, aus Algenbiomasse sind die heutigen technischen Ansätze weit davon entfernt, einen signifikanten Beitrag zur Bedarfsdeckung zu leisten. Die heute verfolgten Ansätze beruhen auf dem Prinzip, daß in einem ersten Schritt Biomasse hergestellt wird, die dann in einem zweiten Schritt geerntet, gereinigt und in den eigentlichen Kraftstoff umgewandelt wird. Die maximale Energiekonversionseffizienz bei der Biomasseherstellung beträgt 14% bezogen auf den Energieinhalt der genutzten Photonen pro zellulär gebundenem Kohlenstoff. Dieser Wert wird drastisch kleiner, wenn die Algen unter natürlichen Lichtbedingungen kultiviert werden und Energie für die Temperaturkontrolle und das Durchmischen der Kultur aufgewendet werden muß. Zudem wird der biologische Wirkungsgrad kleiner, wenn der Kohlenstoff in Lipide und Proteine eingebaut wird. Bezieht man die energetischen Kosten für Ernte und Refinement mit ein, ist nicht mehr sicher, ob überhaupt ein Nettoenergiegewinn zu verzeichnen ist. Berücksichtigt man außerdem den Energieaufwand für die Hardware bei der Algenproduktion (Edelstahlgerüste, Kunststoffe der Produktionsbehälter etc.) ist der Vorteil gegenüber herkömmlichen Energiepflanzen gering oder sogar negativ. Kritiker halten daher Algenmassenproduktion in gemäßigten Breiten in aufwändigen Photokollektoren für ineffizient und treten daher für einfache Open-Pond Technologien ein. Eine Gesamtökobilanz liegt noch nicht vor. Der wichtigste Vorteil in der Algenmassentechnologie liegt in dem geringen Wasserbedarf, der potentiellen Nutzung von Abwasser oder Meerwasser und in der Erzeugung besonders hochwertiger Produkte. Während technische Fortschritte in der Reaktortechnologie oder in der Anreicherung von hochpreisigen Wertstoffen sichtbar sind, sind bei den Problemen der Ernte und des Refinement kaum Lösungen in Sicht.

Daher wurde in dieser Machbarkeitsstudie erstmalig ein alternatives Konzept entwickelt und die Umsetzungsmöglichkeiten untersucht. Die Grundlagen des neuartigen Verfahrens stellen sich wie folgt dar:

Algen, z.B. *Chlorella fusca* oder auch *Chlamydomonas reinhardtii*, scheiden bei hohen Temperaturen (über 25 °C), hohem Sauerstoffpartialdruck und geringem CO₂-Angebot Glykolat aus. Dieses Glykolat ist ein Produkt des natürlichen Prozesses der Photorespiration, die man durch das Verhältnis CO₂/O₂ technisch leicht steuern kann. Bisher wurde versucht, die Glykolatbildung zu vermeiden (und alle Studien hatten das Ziel, diese unerwünschte Nebenreaktion zu unterdrücken), weil die Glykolatausscheidung mit einem Kohlenstoffverlust verbunden ist und das Wachstum hemmt. In unserem Konzept wird Glykolat von den Zellen ausgeschieden und dann durch eine Bakterienassoziation, die von Friedrich et al. (1991) beschrieben wurde zu Methan und CO₂ umgesetzt. Die Rückleitung des CO₂ in den Algenteil des Reaktors ermöglicht eine photosynthetische Refixierung. Somit durchläuft etwa ein Drittel des Kohlenstoffs den Kreislauf zwei Mal. Das Produkt ist dann aber reines Methan. Kontaminationen mit Ammonium und Schwefelwasserstoff sind nur in

geringstem Maß zu erwarten. Stoffwechselphysiologisch werden sowohl die Stärkesynthese, der Stärkeabbau und die umfangreiche Synthese von Lipiden und Proteinen auf das Minimum des Erhaltungsstoffwechsels beschränkt. Damit ist eine physiologische Prozessintensivierung für die Glykolatausscheidung und damit für die Methangewinnung zu erwarten. Voraussetzung ist, dass es gelingt, ein aerobes Milieu auf Diffusionsabstand mit einem anaeroben Milieu zu koppeln. Im lichtexponierten Teil des Sandwichs, in dem sich die Algen befinden, herrschen hohe Sauerstoffpartialdrücke, während die Bakterien, die das Glykolat zu CO₂ und Methan disproportionieren, strikt anaerobe Lebensbedingungen erfordern.

Um die Stofftransportwege so kurz als möglich zu gestalten ist eine flächige, als „Sandwich“ gestaltete Anordnung der verschiedenen Milieus, über eine Biofilmbildung, der bisher üblichen Suspensionstechnologie vorzuziehen. Die Algen wären daher auf einer Oberfläche zu immobilisieren. Durch dieses Substrat wird die Nährlösung gedrückt und das ausgeschiedene Glykolat wird in einem anaeroben Kompartiment von den Mikroorganismen zu Methan umwandelt. Es entstehen dadurch zwei Gasströme: der erste sauerstoffhaltige Gasstrom, der die Algen mit CO₂ versorgt und der zweite Gasstrom, der das Methan aus dem Kompartiment mit den anaeroben Mikroorganismen abführt. In der Nettobilanz wird aus CO₂ und Wasser Methan gebildet. Die beiden Hauptreaktionsräume, das aerobe Algen-Kompartiment und das anaerobe Bakterien-Kompartiment, werden über eine selektive Membran getrennt, hier kommen nur Membranen in Frage, welche in Hinblick auf den Stofftransport von Glykolat und die Rückhaltung von Mikroorganismen, Gasen u. a. Stoffen möglichst selektiv arbeiten. Das Interface zwischen diesen beiden Kompartimenten stellt das technische Herzstück der Neuentwicklung dar. Hier muss auf kurzem Diffusionsabstand ein hoher Stofftransport realisiert werden, wobei dieser über eine starke Sauerstoffbarriere hinweg erfolgen muss. Diese Aufgabe soll mit Hilfe der Mikrosystemtechnik gelöst werden.

II. Eingehende Darstellung

II.1. Erzielte Ergebnisse im Einzelnen

II.1.1 Bestimmung und Steuerung der Glykolatausscheidung

II.1.1.1. Glykolatausscheidung bei verschiedener Gaszusammensetzung

Forschungsziel: Bestimmung der Glykolatausscheidung bei den beiden Mikroalgen *Chlorella vulgaris* und *Chlamydomonas reinhardtii* in Abhängigkeit vom CO₂-Gehalt der Luft und vom Sauerstoffpartialdruck im Induktionsexperiment.

Die Kulturen wurden zunächst optimal mit CO₂ versorgt, um Wachstum zu erreichen. Dann wurde auf Glykolatproduktion umgestellt. In einem parallelen Experiment wurde der Hemmstoff Isoniazid eingesetzt, der die weitere Umsetzung des aus dem Glykolat gebildeten Glyoxylats hemmt und auf

diese Weise zu einer verstärkten Ausscheidung von Glykolat aus den Zellen führen sollte. Es wurden verschiedene Gaszusammensetzungen gewählt.

- 31% O₂ bei 0,03 % CO₂
- 47% O₂ bei 0,023 % CO₂
- 70% O₂ bei 0,013 % CO₂

Die Versuche wurden mit der Grünalge *Chlorella vulgaris* durchgeführt. Parallel wurden die Kulturen mit Isoniazid (NIA) behandelt. Die Glykolatmenge im Medium wurde mit Hilfe eines modifizierten optischen Tests nach Calkins (1943) bestimmt. Das Ergebnis der durchgeführten Untersuchungen ist in Abbildung 1 dargestellt.

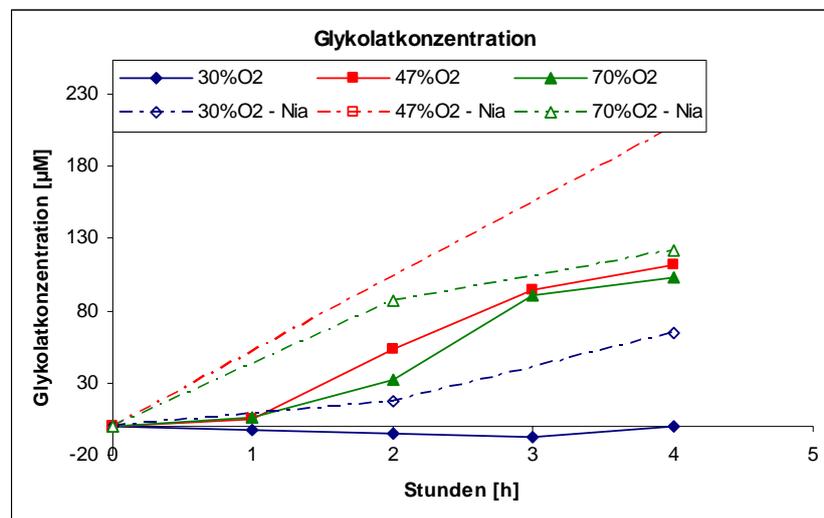


Abbildung 1: Versuchsergebnisse ohne / mit Isoniazid

Man erkennt, dass nach 2 Stunden in den Kontrollkulturen (blaue, durchgezogene Linie) praktisch kein Glykolat nachweisbar ist, während in den Kulturen mit erhöhtem Sauerstoffgehalt das Glykolat ausgeschieden wird. Eine Steigerung des Sauerstoffpartialdrucks über 47% steigert die Glykolatausscheidung nicht mehr. Auch erhöhte CO₂-Gaben bei hohem Sauerstoffgehalt fördern nicht die Glykolatausscheidung (Daten nicht gezeigt). Isoniazid führt im Kurzzeitexperiment zu einer Steigerung der Glykolatexkretion. Dieser Effekt wird noch verstärkt, wenn man den Versuch über einige Tage fortsetzt (Abbildung 2).

Hierbei zeigte sich, dass die Hemmung der zellinternen Umsetzung des Glykolats die Exkretionsraten drastisch erhöhen kann. Auf der Grundlage dieser Daten ist es möglich, die Glykolatbildungsraten pro Chlorophyll und Zeit zu berechnen. Die zweite Untersuchungsalge, *Chlamydomonas reinhardtii*, verhält sich grundsätzlich ähnlich. Auch hier zeigte sich, dass die Algen ohne die Zugabe eines Hemmstoffes nur über kurze Zeit Glykolat ausscheiden. In Anwesenheit von Isoniazid wurde die

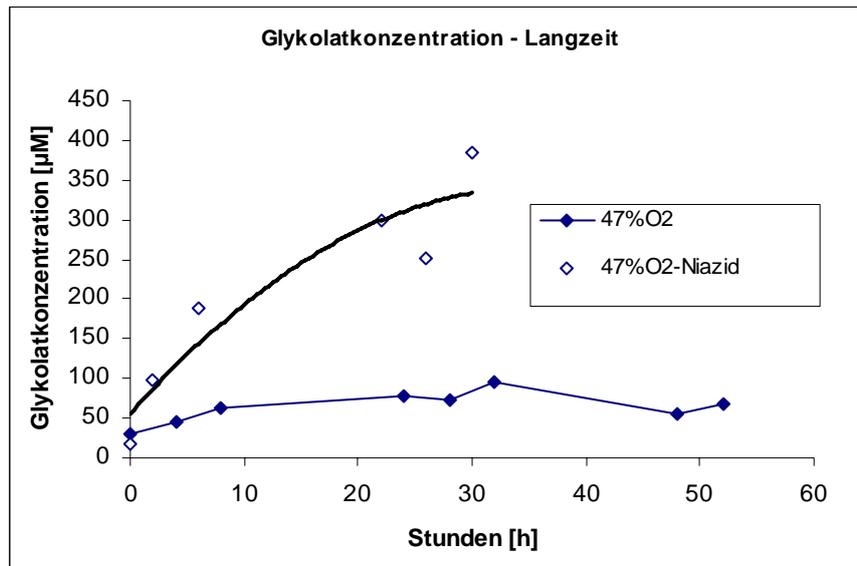


Abbildung 2 : Langzeitversuche mit Isoniazid

Glykolatexkretionsrate im Vergleich zur Kontrolle deutlich gesteigert und blieb im Kurzzeitversuch über mehrere Stunden konstant hoch.

Eine deutliche Steigerung der Glykolatexkretion konnte im Gegensatz dazu jedoch durch die Veränderung der Anzuchtbedingungen der Stammkultur erzielt werden. Durch die Erhöhung der CO₂ Konzentration und eine Verringerung des Chlorophyll a Gehaltes der Stammkultur konnte die Glykolatexkretion (pro mg Chl a) um den Faktor 3 gesteigert werden. Tabelle 1 fasst die mittleren Glykolatexkretionsraten in µmol Glykolat/mg Chlorophyll und Stunde aus den beschriebenen Versuchen zusammen. Da sich die zweite Untersuchungsalge *Chlamydomonas reinhardtii* grundsätzlich ähnlich verhielt, werden in Tabelle 1 die mittleren Glykolatbildungsrate in µmol Glykolat/mg Chlorophyll und Stunde dargestellt.

Tabelle 1: Erzielte Glykolatbildungsrate (NIA – Hemmstoff Isoniazid)

Algenspezies	% O ₂ /% CO ₂	Bildungsrate o. NIA	Bildungsrate mit NIA
<i>Chlorella vulgaris</i>	30/0,03	< 0,2	1,05
<i>Chlorella vulgaris</i>	47/0,023	1,7	3,3
<i>Chlorella vulgaris</i>	70/0,013	1,8	2,1

Stammkultur mit 1% CO₂ und 12 mg Chla /l

<i>Chlamydomonas</i>	47/0,023	1,2 (in den ersten 3h)	3,3
<i>Chlamydomonas</i>	70/0,013	1,1 (in den ersten 3h)	3,1

Stammkultur mit 2% CO₂ und 5 mg Chla /l

<i>Chlamydomonas</i>	47/0,023	3 (in den ersten 3h)	12
<i>Chlamydomonas</i>	70/0,013	3,8 (in den ersten 3h)	12,3

Grundsätzlich sterben die Kulturen in Anwesenheit von NIA ab, da sich unter diesen Bedingungen in den Zellen nicht nur Glykolat, sondern auch Glyoxylat anhäuft, das als Zellgift wirkt. Zudem greift NIA zentral in den Aminosäurestoffwechsel ein. Es wurde hier nur eingesetzt, um das Exkretionspotential abzuschätzen. In einer bio-technischen Applikation könnte man NIA ersetzen, indem man gentechnisch die Glykolatoxidation reduziert (siehe unten, Abschnitt 2). Da Glykolat selbst die Photosynthese hemmen kann und hohe externe Glykolatkonzentrationen, die sich im Laufe der Kultur ergeben, den Ausstrom blockieren können, wurde untersucht, ab welchen externen Konzentrationen die Photosynthese gehemmt wird (Abbildung 3).

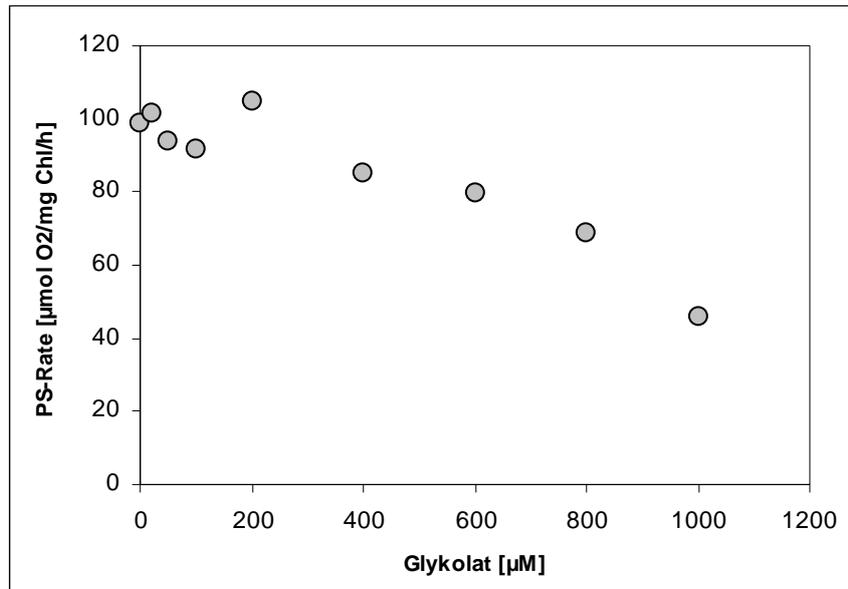


Abbildung 3: Photosyntheserate bei zunehmender Produkthemmung

Das Ergebnis zeigt, dass bei Glykolatkonzentrationen oberhalb von 400 μM die Photosynthese eine zunächst leichte und bei 1000 μM eine ca. 50% ige Hemmung erfährt. Wenn man also dauerhaft hohe Exkretionsraten aufrecht erhalten will, sollte die Glykolatkonzentration in der Umgebung der Zellen möglichst nicht über 200 μM liegen.

Zur Bestimmung der Energiebilanzen vom eingestrahlt Licht bis in die Menge des produzierten Glykolats wurden bei *Chlorella vulgaris* zunächst die Quantenausbeute in Bezug auf den Sauerstoff ermittelt und aus dem Verhältnis Sauerstoff/Glykolat die Quantenausbeute für das Glykolat berechnet. Bei den verschiedenen Begasungs- und Hemmstoffbedingungen ergaben sich die Werte, die in Abbildung 4 dargestellt sind.

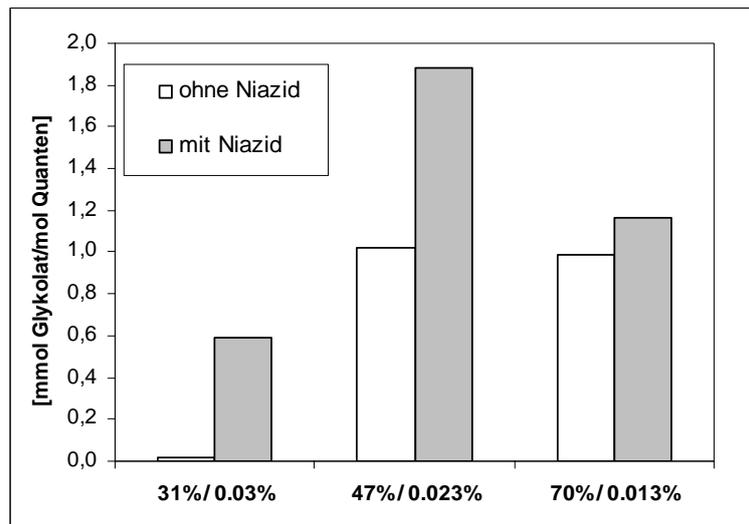


Abbildung 4: Quantenausbeute für die Glykolatproduktion

Zusammen mit den Daten aus der Gärausbeute lässt sich damit eine potentielle Methanproduktion pro Fläche und Jahr errechnen.

II.1.1.2. Optimierung der Glykolatausscheidung

Die im ersten Projektteil verwendeten Versuchsbedingungen wurden hinsichtlich der Lichtquantität und – qualität weiter variiert. Es sollte untersucht werden, ob in den bisherigen Versuchen bereits die maximale Glykolatausscheidungsrate erzielt wurde oder ob Änderungen der Versuchsbedingungen eine weitere Steigerung der Glykolatausscheidung bewirken können. Kritische Bedingungen sind die verwendete Lichtintensität sowie der Effekt der Belichtung mit unterschiedlichen Lichtspektren. Aus der Literatur ist bekannt, daß vor allem Rotlicht die Glykolatexkretion positiv beeinflusst, während Blaulicht sie eher unterdrückt (Becker et al., 1968). Zur Beantwortung dieser Fragestellungen wurde die Glykolatexkretion bei Belichtung mit zwei unterschiedlichen Lichtintensitäten (150 und $300 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) sowie unter Rotlicht, Blaulicht und Rot/Blaulicht kombiniert bestimmt.

Aus Abb. 5 ist ersichtlich, daß eine Verdopplung der Lichtintensität von 150 auf $300 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ keine weitere Steigerung der Glykolatausscheidung bewirkte. Daher muss davon ausgegangen werden, daß die maximale Enzymkapazität des glykolatbildenden Enzyms RubisCo bereits bei der niedrigeren Lichtintensität erreicht ist. Unklar ist jedoch noch, wie sich unterschiedliche Lichtintensitäten in Langzeitversuchen auswirken würden. Es sei auch angemerkt, daß diese Ergebnisse nur für den Wildtyp von *C. reinhardtii* gelten. Bei gentechnisch veränderten Zellen (z.B. mit verkleinerter Antenne bzw. erhöhtem RubisCo-gehalt mit evtl. veränderter Substratspezifität) ist zu erwarten, daß sich die maximale Enzymkapazität der RubisCo zu höheren Lichtintensitäten verschiebt. Damit bilden die Versuche am Wildtyp von *C. reinhardtii* die Grundlage zur Überprüfung des Erfolges zukünftiger gentechnischer Veränderungen an dieser Alge.

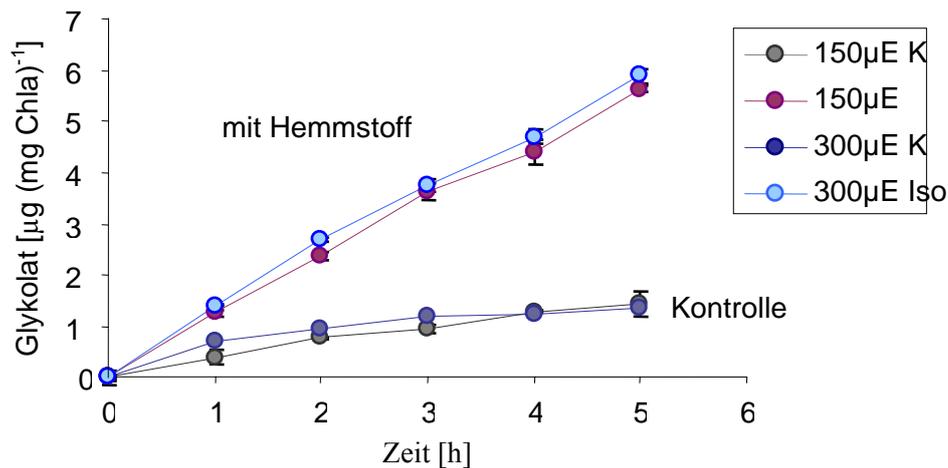


Abbildung 5: Glykolatkonzentration im Medium bei Belichtung von *Chlamydomonas reinhardtii* mit 150 bzw. 300 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Die Versuche wurden ohne (Kontrolle) und mit dem Hemmstoff Isoniazid durchgeführt. Isoniazid hemmt die zellinterne Metabolisierung des Glykolats und führt zu erhöhten Glykolatexkretionsraten.

Abb. 6 dokumentiert, daß die Glykolatauscheidung in *C. reinhardtii* unabhängig vom Spektrum der Lichtquelle ist. Die Auswirkungen der unterschiedlichen Lichtqualitäten wurden zunächst nur während der Phase mit photorespiratorischen Bedingungen untersucht. Ausstehend ist noch die Anzucht der Algenkultur mit unterschiedlichen Lichtqualitäten und anschließender photorespiratorischer Phase. Für die praktische Umsetzung des Gesamtvorhabens dürfte die Frage der Lichtqualität jedoch von untergeordneter Priorität sein. Zum einen hat natürliches Sonnenlicht generell einen erhöhten Rotlichtanteil. Zum anderen ist in mehrlagigen Zellschichten zu erwarten, daß sich der Rotlichtanteil in den tieferen Schichten noch weiter erhöht aufgrund der erhöhten spezifischen Absorption blauen Lichtes durch die Algenzellen in den oberen Zellschichten. Somit sollten die bisherigen Versuche unter Rotlicht bereits eine hinreichend gute Grundlage zur Bewertung zukünftiger experimenteller Ansätze sein.

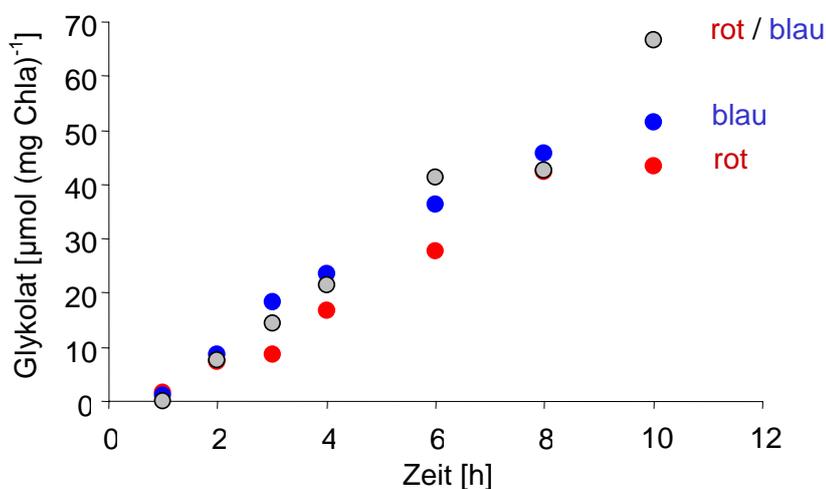


Abbildung 6: Glykolatkonzentration im Medium bei Belichtung von *Chlamydomonas reinhardtii* mit blauem, rotem bzw. einer Kombination aus rotem und blauem Licht. Die Versuche wurden mit dem Hemmstoff Isoniazid durchgeführt.

Den größten Einfluss auf die Glykolatexkretionsraten hatte in den bisherigen Versuchen die CO₂-Konzentration während der Anzucht der Algenkultur. Abb. 7 zeigt, daß eine Verdopplung des CO₂-Angebotes bei gleichzeitiger Verringerung der Zelldichte eine Steigerung der Glykolatexkretion um den Faktor drei bewirkte.

C. reinhardtii bildet sehr effiziente CO₂-Konzentrationsmechanismen (CCMs) aus, die für ein hohes zellinternes CO₂-Angebot sorgen und somit die Photorespiration unterdrücken können. Die Ausbildung der CCMs ist abhängig von der CO₂-Konzentration im umgebenden Medium, wie auch die Daten in Abb. 7 bestätigen. D.h., hohe CO₂-Konzentrationen unterdrücken CCMs, während niedrige CO₂-Konzentrationen die Ausbildung der CCMs induzieren. Vor allem die Induktion der

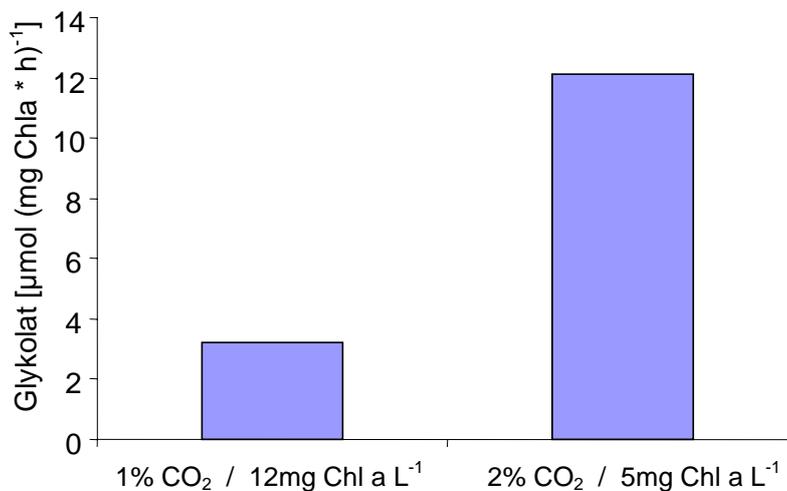


Abbildung. 7: Glykolatexkretionsraten von *Chlamydomonas reinhardtii* unter photorespiratorischen Bedingungen nach Anzucht mit verschiedenen CO₂-Konzentrationen im Medium.

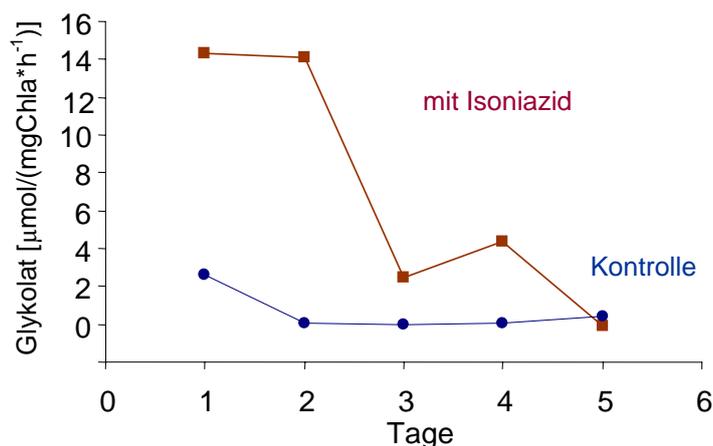


Abbildung. 8: Langzeitversuch zur Glykolatexkretion in *Chlamydomonas reinhardtii* in Suspensionskultur unter photorespiratorischen Bedingungen (47% O₂, 0,02% CO₂).

CCMs kann sehr schnell, innerhalb 0,5 bis 2h erfolgen (Ramazanov et al., 1995). Das hat direkte Auswirkungen auf die Langzeitversuche unter photorespiratorischen Bedingungen. So konnte in Kontrollansätzen ohne Hemmstoff Isoniazid nur während der ersten Lichtphase eine

Glykolatausscheidung festgestellt werden (Abb. 8). Es kann vermutet werden, daß die Photorespiration und Glykolatexkretion im weiteren Verlauf durch eine aktive CO₂-Aufnahme unterdrückt wurde. Auch mit dem Hemmstoff Isoniazid war eine starke Hemmung der Glykolatausscheidung nach spätestens 48 h zu beobachten. In diesen Versuchen wurde außerdem beobachtet, daß Isoniazid längerfristig zu einem Absterben der Algenkultur führt. Neben der Induktion der CCMs könnte ein weiteres Problem in der Akkumulation von Glykolat in den Zellen liegen. Die damit einhergehende Anreicherung von P-Glykolat, dem Fixierungsprodukt der RubisCo, könnte eine Hemmung des Calvin-Zyklus bewirken (Hall et al., 1987). Im ersten Teil des Projektes konnte bereits gezeigt werden, daß eine externe Glykolatzugabe die Photosyntheseraten ab einer Konzentration von etwa 400 µM Glykolat deutlich inhibiert (siehe Abb. 3). In allen bisher durchgeführten Langzeitversuchen wurden auch keine höheren Glykolatkonzentrationen als 600 µM im Medium festgestellt, was für eine Inhibition der Rubisco-Aktivität bei diesen Glykolatkonzentrationen spricht. Dieses Problem sollte sich umgehen lassen, wenn die Versuche mit immobilisierten Algen durchgeführt werden. Unter der Voraussetzung, daß die Algenzellen gut am Trägermaterial anhaften oder darin eingeschlossen sind, ist es dann möglich, das Medium regelmäßig auszutauschen und das ausgeschiedene Glykolat zu entfernen.

II.1.1.3. Untersuchung der Glykolatausscheidung an immobilisierten Algen

Die erste Versuche zur Klärung dieser Fragestellung wurden mit *C. reinhardtii* durchgeführt. Dazu wurden die Algenzellen als Biofilm auf einem Papiervlies aufgebracht, sowie in Alginatkügelchen bzw. in einem Agarfilm immobilisiert.

Das Papiervlies erwies sich in Kombination mit *C. reinhardtii* als ungünstig, da die Zellen nicht sehr fest haften blieben. Es konnte zwar eine Glykolatexkretion unter photorespiratorischen Bedingungen gemessen werden (Abb. 9), allerdings war es durch ein partielles Ablösen der Algen beim Mediumwechsel nicht möglich, Chl-normierte Raten der Glykolatexkretion zu bestimmen.

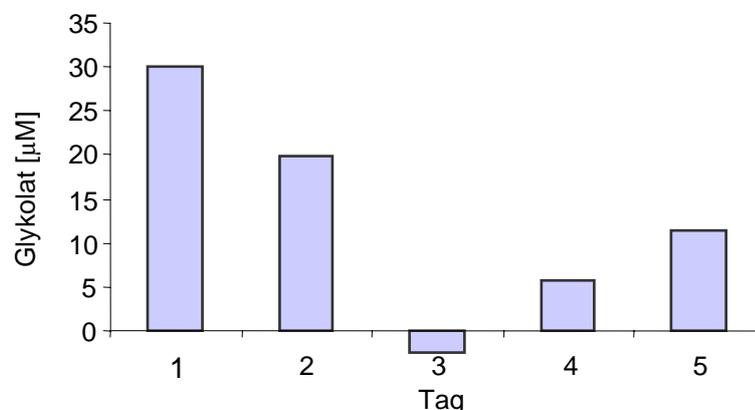


Abbildung. 9: Langzeitversuch zur Glykolatexkretion in *Chlamydomonas reinhardtii* auf einem Papiervlies unter photorespiratorischen Bedingungen (47% O₂, 0,02% CO₂).

Eine weitere Möglichkeit der Immobilisierung der Algenzellen ist die Herstellung von Alginatkügelchen. Ein Ablösen/Auswaschen der Algenzellen beim Mediumwechsel konnte mit dieser Methode sehr effektiv unterbunden werden. Diese Alginatkulturen wurden über mehrere Tage auf ihre Glykolatexkretion untersucht (Abb. 10).

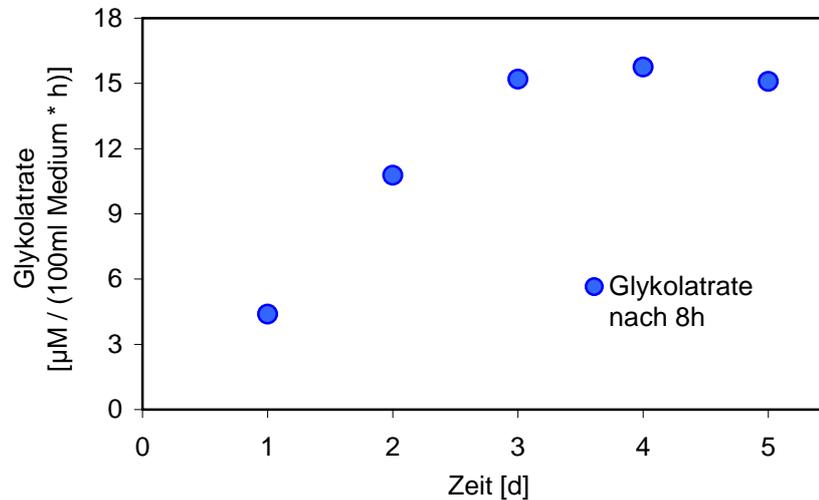


Abbildung 10: Langzeitversuch zur Glykolatexkretion in einer Alginatkultur von *Chlamydomonas reinhardtii* unter photorespiratorischen Bedingungen (8 h mit 47% O₂, 0,02% CO₂; ohne Hemmstoff Isoniazid).

Aus Abb. 10 wird ersichtlich, daß sich ein regelmäßiges Entfernen des glykolathaltigen Mediums positiv auf die Glykolatexkretion auswirkt. Die Glykolatexkretion erreichte in diesem Ansatz am dritten Tag die maximale Rate, die auch noch am vierten und fünften Versuchstag nachweisbar war. Das späte Erreichen der maximalen Glykolatexkretion entspricht nicht den bisherigen Beobachtungen in Suspensionskulturen. Dies liegt sehr wahrscheinlich daran, daß es zu einer Retention der Abgabe des Glykolats aus dem Alginat in das Medium kommt. Belegt wurde dieser Sachverhalt aus der Tatsache, daß auch in der anschließenden Dunkelphase nach Beendigung der achtstündigen Phase unter photorespiratorischen Bedingungen eine Glykolatexkretion zu beobachten war (Daten nicht gezeigt).

Nach drei Tagen wird aber offensichtlich ein steady state-Zustand erreicht und die Glykolatausscheidung der Zellen im weiteren Versuchsverlauf, z.B. durch eine Akkumulation von Glykolat in der Zellumgebung, nicht negativ beeinflusst. Für eine Chlorophyll-normierte Quantifizierung der Glykolatraten erwies sich als hinderlich, daß die Zellzahl innerhalb der Alginatkügelchen sehr unterschiedlich war. Im Gegensatz zur Immobilisierung auf dem Papiervlies blieb die Zelldichte im Reaktor aber relativ konstant, so daß die Glykolatraten der einzelnen Versuchstage gut miteinander verglichen werden können.

Ein weiterer Ansatz ist die Immobilisierung der Algenzellen in einem Agarfilm. Dazu wurden die Algen mit verflüssigtem Agar vermischt und in einer Elektrophoresekammer zu einem dünnen Agarfilm gegossen. Dieser wurde in einen Bioreaktor überführt und mit Medium überschichtet. Ein

kritischer Aspekt bei diesem Ansatz ist die relativ hohe Temperatur des Agars beim Vermischen mit den Algen. Diese Prozedur haben die Algenzellen jedoch gut überstanden. Gegenüber der Alginatkultur hätte diese Methode den Vorteil einer sehr homogenen Verteilung der Zellen. Die Chlorophyllkonzentration kann dann z.B. über Chl-Fluoreszenz bestimmt und über einen längeren Zeitraum dokumentiert werden. Mittels variabler Chlorophyllfluoreszenz kann gleichzeitig auch noch eine Aussage über den physiologischen Zustand der Zellen getroffen werden, was für den Vergleich verschiedener Versuchsbedingungen wichtig ist. In diesem Ansatz wurden noch keine Messungen zur Glykolatexkretion durchgeführt. Es gibt objektiv jedoch keine Gründe, warum in diesem Ansatz nicht gleichen Raten der Glykolatausscheidung erreicht werden sollten, wie in Suspensionskultur oder in der Alginatkultur.

II.1.1.4. Glykolatnachweis mittels HPLC-Methode

Neben der Bestimmung des Glykolatgehaltes ist es auch wichtig zu überprüfen, ob Glykolat das einzige Exkretionsprodukt der Algen ist. Vor allem bei neuen Versuchsbedingungen bzw. zukünftig bei Verwendung anderer Algenarten oder gentechnisch veränderter Algen kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Algen alternative metabolische Wege zur Glykolatverwertung ausbilden und damit evtl. auch andere organische Produkte ausscheiden. Da die bisher verwendete photometrische Methode der Glykolatbestimmung nicht spezifisch für Glykolat ist, wurde eine HPLC-Methode zur Bestimmung organischer Säuren etabliert. Dafür wurde eine Organic Acid Resin-Säule verwendet. Die Detektion bei 210 nm erfolgte nach isokratischer Trennung mit 0,025 M H₂SO₄. Die Säule wurde mit Standards verschiedener organischer Säuren (wie Glyoxalat, Malat, Citrat, Succinat, α -Ketoglutarat) kalibriert. Dabei zeigte sich eine gute Detektierbarkeit des Glykolats im Vgl. zu den anderen getesteten Standards. In Mediumproben, die einer Kultur von *C. reinhardtii* unter photorepiratorischen Bedingungen entnommen wurden, war der Glykolatpeak deutlich bei einer Retentionszeit zwischen Minute 13-14 erkennbar (Abb. 11).

Es wurde auch festgestellt, daß in den bisher untersuchten Proben fast ausschließlich Glykolat von den Algenzellen ausgeschieden wurde. Der quantitative Vergleich der Glykolatkonzentrationen, die mittels photometrischer Methode und mittels HPLC bestimmt wurden, zeigte eine gute Korrelation (Abb. 12). Es muss allerdings angemerkt werden, daß die untere Detektionsgrenze der photometrischen Glykolatbestimmung deutlich niedriger liegt als bei der HPLC-Methode. Somit ist die HPLC-Methode geeignet und wichtig für die Überprüfung der Zusammensetzung der exkretierten organischen Substanz, aber nicht unbedingt geeignet für die routinemäßige Quantifizierung der Glykolatratzen.

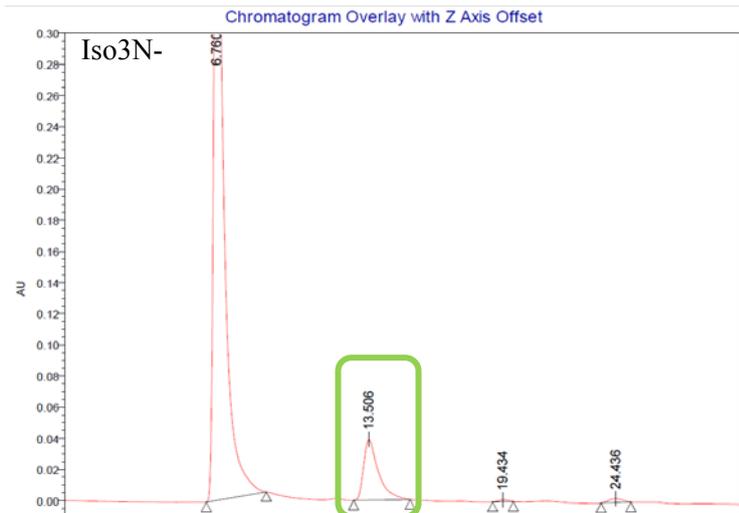


Abbildung 11: Chromatogramm der Glykolatbestimmung mittels HPLC. Säule: Organic Acid Resin; isokratische Trennung mit 0,025 M H₂SO₄; Detektion bei 210 nm

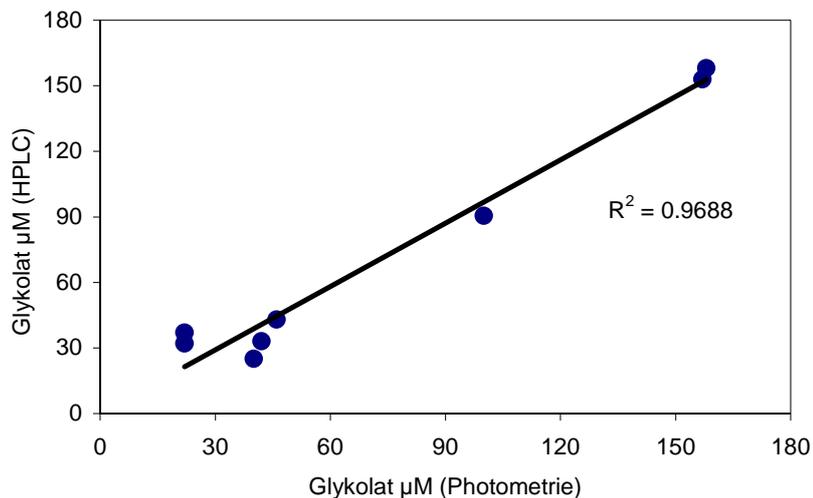


Abbildung 12: Vergleich der photometrischen und der HPLC-Methode zur Bestimmung der Glykolatkonzentration.

II.1.2. Vergärung von Glykolat zu Methan

An das Sächsische Institut für Angewandte Biotechnologie (**SIAB Leipzig**) wurde der Auftrag vergeben, folgende Fragen zu untersuchen:

- Untersuchungen zur grundlegenden Verwertbarkeit und Umwandlung von Algenmetaboliten, insbesondere von Glykolat, zu Biogas bzw. Methan durch methanbildende Mikroorganismen in diskontinuierlichen Gärtests.
- Ermittlung biogasspezifischer Kennwerte der Glykolatvergärung; Vorversuche zur Bewertung der grundsätzlichen Glykolatverwertung im Biogasprozess durch diskontinuierliche Gärtests (batch-Ansatz) unter Variation der Substrat- und/oder Impfschlammkonzentration; Bereitstellung der Impfkultur aus Biogasanlage; ggf. Bereitstellung der Impfkultur vom Projektpartner. Hierbei

ergab sich, dass die Kulturen von Friedrich et al. extrem geringes Wachstum zeigten und keine ausreichende Biomasse für Gärversuche erreicht werden konnte. Es wurde daher aus einer konventionellen Biogasanlage Gärrest eingesetzt.

II.1.2.1 Etablierung einer Glykolat-verwertenden Mikroorganismenkultur

Ziel der praktischen Arbeit bestand in der Bereitstellung einer Glykolsäure-verwertenden Kultur, die unter konstanten Reaktionsbedingungen eine stabile Biogasmenge produziert, um die substratbezogene Methan- und Kohlendioxidausbeute zu ermitteln. Dazu wurde aktive Biomasse einer konventionellen Biogasanlage unter anaeroben Bedingungen bei 37°C in einem Laborreaktor (3,5L Arbeitsvolumen; Abb. 13) schrittweise an Glykolsäure in reiner Form adaptiert.



Abbildung 13: Ansicht vom Laborbioreaktor

Ursprünglich erfolgte die Versorgung der Mischpopulation manuell mit Glycolat-angereichertem Gärrest. Nach 150 d Laufzeit wurde die Rückführung durch eine automatisierte Zugabe einer Glycolat-haltigen Nährlösung ersetzt und der Volumenausgleich im System durch regelmäßigen Gärrestaustausch gewährleistet. Der Verlauf der Biogasproduktion in Abhängigkeit der täglich dosierten Glykolsäuremenge ist in Abb. 14 über einen Versuchszeitraum von 1,5 Jahren abgebildet. Mit steigender Substratmenge war ein Zuwachs der gebildeten Gasmenge bis zu 290 ml d⁻¹ bei Nachführung von 8,24 mmol Glycolat d⁻¹ zu verzeichnen.

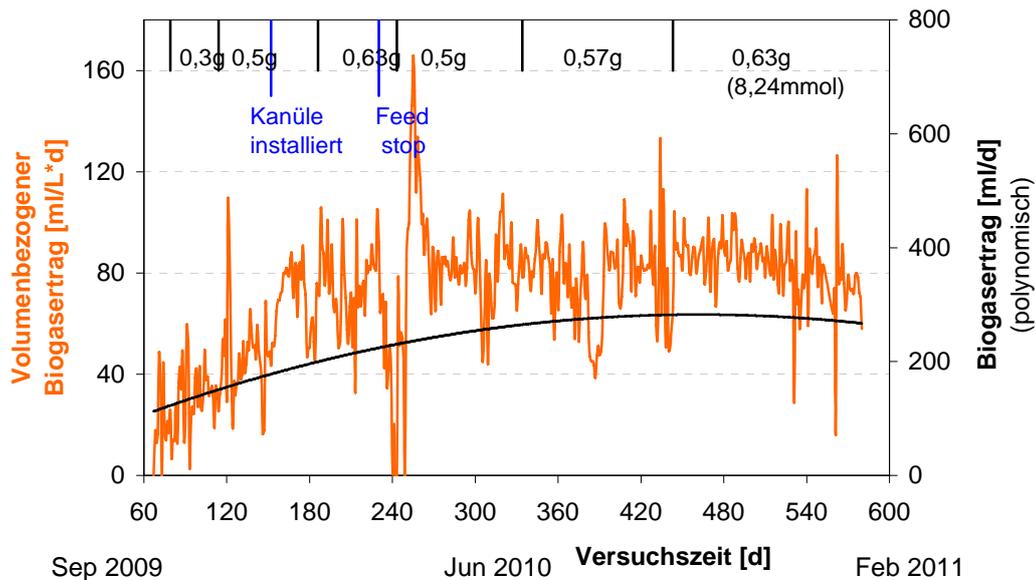


Abbildung 14: Biogasbildungsraten im gesamten Versuchszeitraum. ‚Feed stop‘ kennzeichnet den Beginn einer kurzzeitigen Unterbrechung der Glykolatzugabe.

Neben der erzielten Biogasmenge wurde auch deren Zusammensetzung über den Versuchszeitraum verfolgt. Die Bestimmung erfolgte durch gaschromatographische Analyse und ist beispielhaft an Abb. 15 veranschaulicht. Die bisher untersuchten Gasproben wiesen keinen Wasserstoff (Retentionszeit bei ca. 2min) auf.

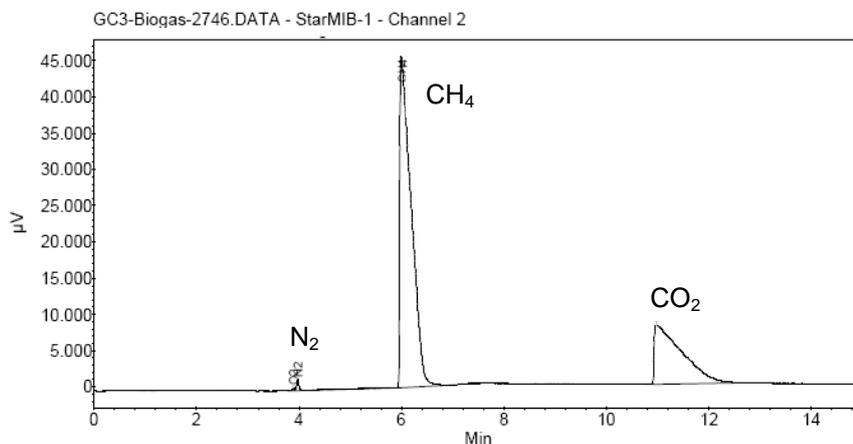


Abbildung 15: Chromatogramm der Biogasanalyse vom 07.02.2011

Abb. 16 dokumentiert die anfänglich ausgeprägten Schwankungen im Methan- und Kohlendioxidverlauf, die vorrangig einer variierenden Versorgungsweise mit Glycolsäure und Änderungen am Aufbau des Bioreaktors geschuldet waren. Mit fortschreitender Versuchsdauer haben sich die entsprechenden Werte zunehmend stabilisiert.

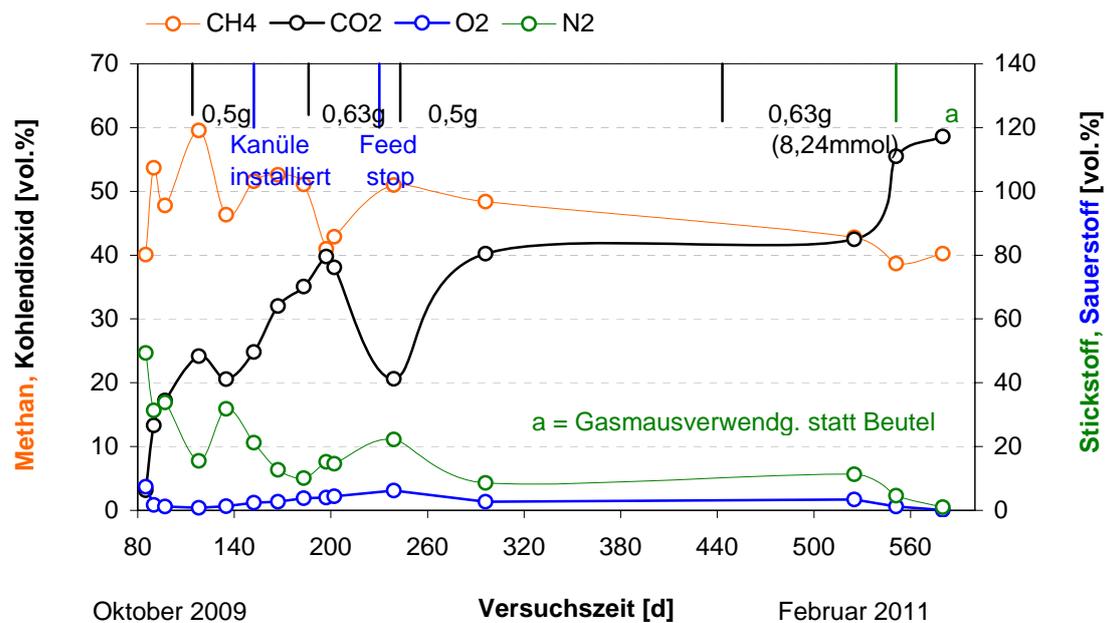


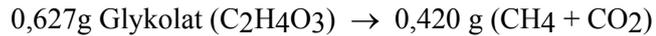
Abbildung 16: Biogaszusammensetzung über den gesamten Versuchszeitraum. ‚Feed stop‘ kennzeichnet den Beginn einer kurzzeitigen Unterbrechung der Glykolatzugabe.

Für Stickstoff und Sauerstoff waren bis etwa 530d Laufzeit deutlich höhere Konzentrationen ($N_2 = 10-20 \text{ Vol\%}$ und $O_2 \sim 5 \text{ Vol\%}$) im Vergleich zu den üblichen Literaturwerten mit $< 2 \text{ Vol\%}$ für beide Gase zu verzeichnen. Aufgrund der Tatsache, dass beide Werte fortwährend im gleichen relativen Verhältnis wie dem von Luft zueinander standen, waren Abweichungen in der Stoffwechselaktivität der Methanbildner als Ursache unwahrscheinlich. Mit der Optimierung der Gasprobenentnahme (Verwendung einer Gasmaus anstelle eines ursprünglich genutzten Biogasauffangbeutels) stellten sich die erwarteten niedrigen Stickstoff- und Sauerstoffwerte im Biogas bei den jüngsten Messungen ein. Der Methan- und Kohlendioxidgehalt bewegt sich seit konstanter Glykolatdosierung von 630mg um 40 bzw. 50 Vol%. Während kein Ammoniak detektiert wurde, war bei der letzten Gasprobe im Februar 2011 ein geringer Schwefelwasserstoffgehalt von 200ppm nachweisbar.

II.1.2.2 Bilanzierung des Methanertrages aus Glykolsäure

Für die Ermittlung des Biogasertrages pro vergorener Glykolatmenge war ein weitestgehend stationärer Stoffwechselzustand der aktiven Kultur unter konstanter Substratversorgung voraussetzend. Die Ertragsbestimmung bezieht sich damit auf die ermittelten Durchschnittswerte des Zeitraumes von Oktober 2010 bis Februar 2011 (450 – 580d Laufzeit) und liegt den jüngsten Werten der Biogaszusammensetzung zu Grunde:

- konstante Substratzuführung = 630 mg (8,24 mmol) Glykolsäure / d
- mittlere Tagesgasproduktion = 290 ml Biogas (40,3% CH_4 + 58,6% CO_2)
- mittlere CH_4 -Menge / d = 116,9 ml (5,22 mM = 0,086 g)
- mittlere CO_2 -Menge / d = 169,9 ml (7,59 mM = 0,334 g)



Aus 630 mg Glykolat werden somit unter den gegenwärtigen Versuchsbedingungen 86 mg Methan und 334 mg Kohlendioxid gebildet. Das entspricht einer Biogasausbeute von ca. 0,46 ml Biogas pro mg Glykolat und schätzungsweise 90 % der theoretischen Gausbeute aus Glykolat (Abb. 17). Im Vergleich zu Rindergülle, als typisch konventionell eingesetztes Substrat in Biogasanlagen, bewegt sich diese Ausbeute im Normalbereich: Rindergülle = 200 – 500 m³ Biogasertrag / t oTS; entspricht 0,2 – 0,5 ml Biogas / mg oTS; Methangehalt mit 60% (nach Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V., Handreichung Biogasgewinnung und -nutzung, 3. Auflage 2006). Die relativ hohen Biogasausbeuten am Beginn der Versuchsreihe sind wahrscheinlich auf die Vergärung von Restsubstraten aus dem verwendeten Gärrest zurückzuführen. Die volumenbezogene, tägliche Biogasproduktion des Laborbioreaktors liegt mit 80 ml pro l Reaktorvolumen deutlich unter den Werten konventioneller Biogasanlagen (ca. 600 ml l⁻¹ d⁻¹; Ergebnisse des Biogas-Messprogramms, Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V., 2005). Allerdings ist hierbei die um den gleichen Faktor geringere Raumbelastung im Laborbioreaktor zu beachten, so daß mit steigender Glykolatezugabe auch noch höhere Biogasproduktionsraten zu erwarten sind.

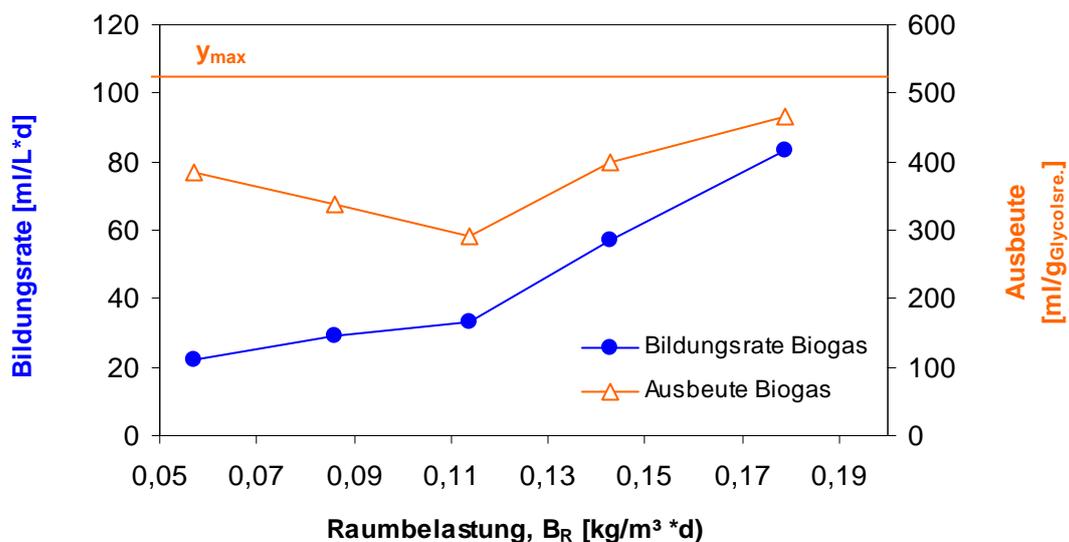


Abbildung 17: Biogasausbeute (ml pro g Glykolat) und Biogasbildungsrate (ml pro l Reaktorvolumen) in Abhängigkeit der Raumbelastung. Die Angabe y_{max} bezieht sich auf die theoretisch erreichbare Biogasausbeute pro zugegebener Glykolatemenge von 0,63 g.

II.1.2.3 Isolierung der Mikroorganismen aus dem Biogasreaktor

Die Ausgangskultur des laufenden Biogasreaktors entstammt einer konventionellen Biogasanlage. In dem Gärrest dieses Reaktors sind nicht hydrolysierte Feststoffe wie lignocellulose Fasern enthalten, die fast ausschließlich den Gesamtanteil der enthaltenen Feststoffe ausmachen. Zur Isolierung der an eine Glykolsäureverwertung angepassten Mikroorganismengemeinschaft wurde der Gärrestaustzug

durch 2-malige Zentrifugation gereinigt und filtriert (Glasfaserfilter: MN 85/90). Das Filtrat wurde anschließend in Anaerobier-Nährmedium bei 37°C weiterkultiviert.

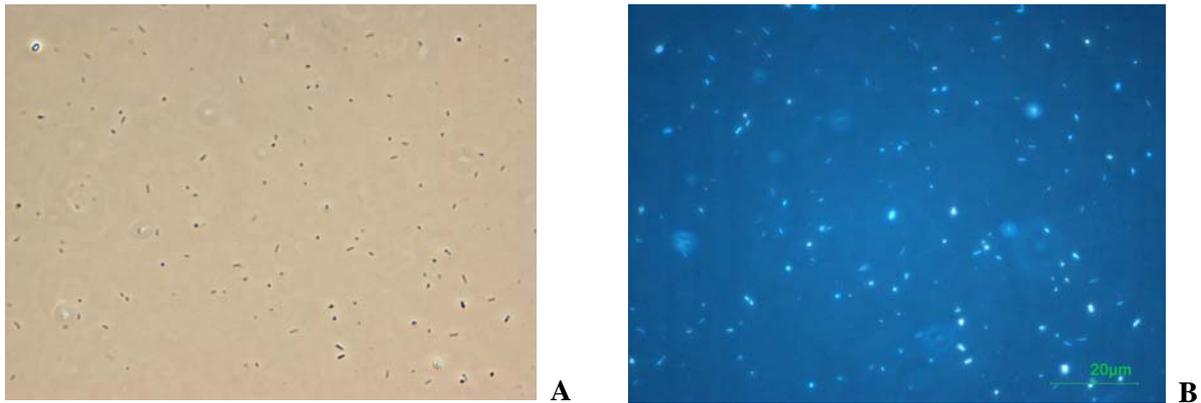


Abbildung 18: Mikroskopische Aufnahmen der Mikroflora des Biogasreaktors bei 100-facher Vergrößerung, Maßstab: 20 µm. A – Phasenkontrastaufnahme; B – DAPI-Färbung desselben Ausschnittes

Eine Anreicherung der Originalprobe erfolgte durch einen weiteren Zentrifugationsschritt. Nach Einengung der isolierten Mikroorganismen um den Faktor 1000 konnten pro Sichtfeld wie in Abb. 18 zu sehen, ca. 150 Organismen sichtbar gemacht werden.

II.1.3. Photobioreaktordesign für einen Algenvliesreaktor

Im Rahmen des BMBF-Projektes W3ALG101 hatte das KIT (ehemals Universität Karlsruhe, Bereich Bioverfahrenstechnik) die Aufgabe, in Kooperation mit den Projektpartnern das grundlegende Reaktordesign zu entwickeln. Ein wichtiger Anspruch war dabei die Kultivierung der Algen in möglichst geringen Volumina des Mediums durchzuführen, um die energieaufwändige Durchmischung und Abtrennung der Biomasse zu vermeiden. Hier bietet sich die **Immobilisierung** der Zellen bzw. die Bildung von Biofilmen, anstelle von Suspensionskulturen, an. Da die Art der Immobilisierung, wie auch die Trenneinheit, großen Einfluss auf die optimale Geometrie des Reaktors haben, wurden in der Bioverfahrenstechnik, in Abstimmung mit den Partnern, intensiv verschiedene Möglichkeiten der Algenimmobilisierung untersucht. **Die ideale Matrix hat dabei folgende Eigenschaften:**

- preiswert
- nicht toxisch für die Zellen
- lichtdurchlässig (Photosynthese der Algen)
- (hydrophil und) stabil während der Kultivierungen
- dauerhafte Rückhaltung der Zellen
- möglichst großes Oberfläche / Volumen - Verhältnis und möglichst geringe Dichte

II 1.3.1 Methoden der Immobilisierung

1) **Kovalente Bindung** (ungeeignet): z.B. mit Glutaraldehyd

Die Zellen werden irreversibel chemisch gebunden und dadurch geschädigt, der Träger kann nicht regeneriert werden.

2) Adsorption (sehr häufig eingesetzt): poröse Gläser, Silicagel, Keramik, Aluminiumoxid, Pheolharze, Aktivkohle, Polyurethan-Schaum etc.; Vorbehandlung: Ladung, Beschichtung mit Kollagen, Polylysin, Silanisierung etc.

Aufgrund der schwachen Anziehung werden die Zellen nicht geschädigt und es ist eine leichte Desorption und Regenerierung des Trägers möglich. Glatte Oberflächen bieten dabei einen guten Stoffaustausch und eine leichte Desorption, neigen aber aufgrund der schwachen Anziehung zum Zellverlust und verfügen über kein großes Oberfläche/Volumen-Verhältnis. Makroporöse Matrizen besitzen die entgegengesetzten Eigenschaften.

3) **Emulsionen** (selten eingesetzt)

4) Rückhaltung mittels semipermeabler Membran: z.B. Hohlfasern, Membran-Biofilmreaktoren (von wachsender Bedeutung) Die Zellen werden dauerhaft von der Membran zurück gehalten und sind vom Medium getrennt. Dadurch ist das System stabil und lange einsetzbar. Der Stoffaustausch ist jedoch limitiert, da die Nährstoffe durch die Membran diffundieren müssen.

Dabei können die Algen z.B. auf einer mikroporösen Membran aufwachsen (Nitrocellulose, Cellulose-Ester, Polycarbonat), die sie gleichzeitig zurück hält, während eine makroporöse Membran oder ein Hohlraum als Mediumspeicher dient (Glasfaservlies).

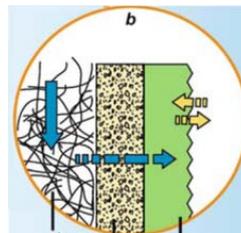


Abbildung 19:
Links: makroporöse Membran mit Medium,
Mitte: mikroporöse Membran,
Rechts: aufwachsende Algenschicht

5) **Einschluss in Gele, Polymere** (häufigste Art der Algen-Immobilisierung im Labormaßstab):

Der Nährstoff diffundiert durch Poren des Gels in die Mikroräume mit den Zellen. Hier sind zu Beginn 100% der Zellen immobilisiert und eine hohe Zelldichte ist möglich. Allerdings findet mit der Zeit ein Zellverlust statt, u.a. da die Zellen aus den Mikroräumen wachsen. Synthetische Polymere wie Polyacrylamid, Polyurethan, Polysulfon und Silicagel sind günstig, jedoch nicht biologisch abbaubar. Die Vorpolymere sind toxisch und das Wachstum reduziert. Natürliche Polymere wie Alginat, κ -Carrageenan, Agar und Chitosan sind atoxisch und transparent, doch über längere Zeit instabil, somit nur für kurze Prozesse geeignet. Meist finden Algen-Immobilisierungen mit Alginat und einem Kugeldurchmesser von 3mm statt.

6) **Zellaggregate / Flockenbildung:** z.B. mit Chitosan (geringe Stabilität)

7) Co-Immobilisierung mit anderen Organismen: Bakterien oder Biofilm-bildende Mikroalgen. Dies ist problematisch, da die co-immobilisierten Organismen das produzierte Glykolat aufbrauchen könnten oder eine zusätzliche Kohlenstoffquelle benötigen.

Je nach Immobilisierung eignen sich bestimmte Reaktortypen:

Der **Wirbelschicht-/Fließbettreaktor** (Abb. 20, links) eignet sich z.B. für Polymer-Kugeln oder Schaumstoff-Würfel. Die Bewegung führt zu einem guten Stoffaustausch, übt aber auch Scherkräfte auf die Zellen aus, ist meist inhomogen und hat einen hohen Energiebedarf.

Am meisten untersucht ist der **Festbettreaktor** (Abb. 20, rechts), für z.B. Polymer-Kugeln, Schaumstoff-Würfel, Silicagel. Sie bieten eine hohe Raum- Zeitausbeute, führen jedoch zur Kanalbildung und haben eine geringe Lichteindringtiefe.

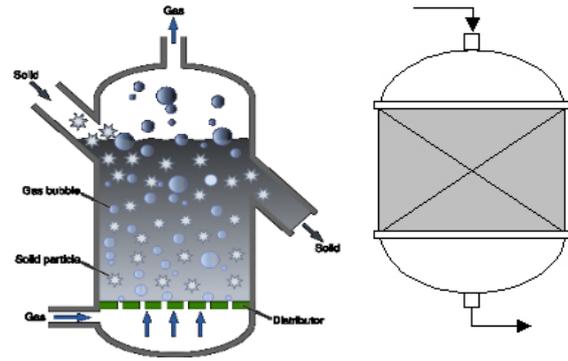


Abbildung 20:
links: Wirbelschichtreaktor mit festen Partikeln, begast von unten;
rechts: Festbettreaktor, durchströmt von oben nach unten

Membran-Reaktoren, z.B. Hohlfaserreaktoren (Polysulfon- oder Cellulose-Hohlfasern in transparentem Rohr) können nach einer Reinigung wieder verwendet werden, allerdings darf der Aufwuchs nicht zu stark sein, sonst wird das System geschädigt.

Weitere Varianten sind der **Air-Lift-** bzw. **Schlaufenreaktor**.

II 1.3.2 Untersuchung verschiedener Materialien auf ihre Tauglichkeit als Träger bzw. zur Immobilisierung

Organismen: Mikroalgen *Chlamydomonas reinhardtii* und *Chlorella vulgaris*

Kultivierungsbedingungen: TAP-Medium (Tris-Acetat-Phosphat), 22 °C, künstliche Beleuchtung

Das Wachstum auf den getesteten Stoffen wurde optisch beurteilt und mittels Fotografien an verschiedenen Tagen verglichen. Die Versuchsdauer betrug teilweise bis zu 1½ Monate.

A1

Materialien:

M1) Glaswolle Fa. Roth, Watte, Schaumstoffe, Bewässerungsvlies (Baumarkt)

M2) Kunststoff-Kugeln: 3mm

M3) Glaskugeln: 0.75-1mm Kalk-Soda-Glas (glatt) Fa. Roth;
1.5mm (rau) SiLiBeads Dragonit25 Fa. Sigmund Lindner; 4mm (glatt)

M4) Filter:
4 aus Glasfaser: 691 (1.6 µm) Fa. VWR, GF31, GF31.10, GF50;
2 aus Cellulose: AP60.1 (12-15 µm), AP68.1 (8-12 µm);
1 aus Celluloseacetat (0.2 µm)

Die Materialien wurden entweder trocken oder mit Medium autoklaviert. Zur Immobilisierung wurden diese entweder mit Zellsuspension in Schüttelkolben kultiviert (auf dem Schüttler oder ruhend), die Zellen aufpipettiert oder auffiltriert (Filter Pos. 4). Die Kultivierung fand bei den letzten beiden Varianten in 90mm-Petrischalen mit ca. 15-25ml Medium statt.

Zu M1 bis M3) Diese Stoffe bieten eine größere Wachstumsfläche als z.B. Oberflächenfilter, nehmen teilweise aber auch selbst einen großen Teil des Arbeitsvolumens ein.

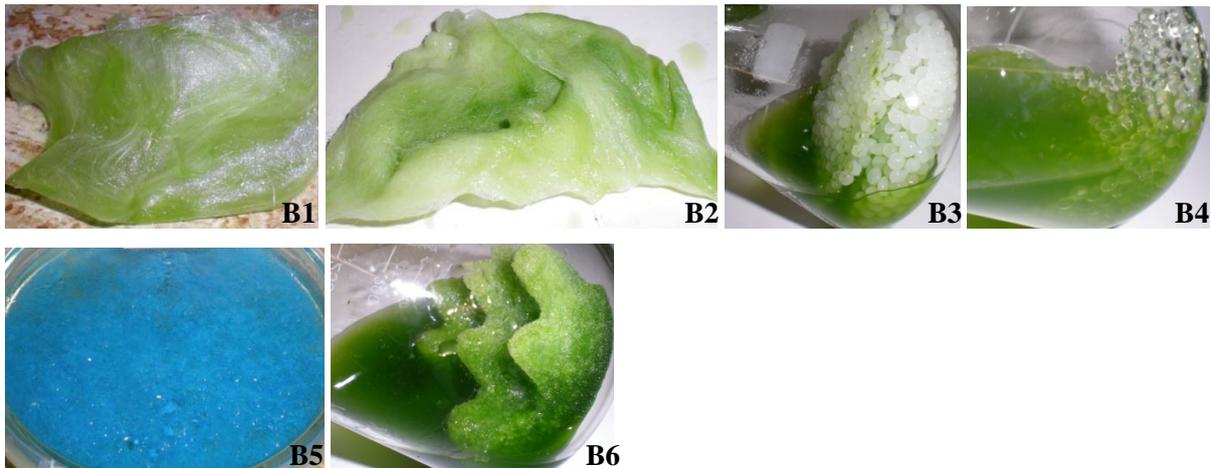


Abbildung 21: Verschiedene Materialien, kultiviert mit Mikroalgen in Schüttelkolben bzw. Petrischalen (B5) B1) Glaswolle, B2) Watte, B3) Kunststoff-Kugeln, B4) klare Glaskugeln 4mm, B5 und B6) Schaumstoffe

Die Algen hefteten sich nicht an diese Materialien und setzten sich auch nicht auf diesen ab (Bild B1-B6). Sie blieben suspendiert im Medium (keine Adsorption (2) oder kovalente Bindung (1)).

Zu M4) Für die Filter erwiesen sich folgende Methoden am besten:

- aufbringen der Zellen mittels Aufpipettieren
- Kultivierungen in Petrischalen: unten Glaskugeln/Glasfritte mit Medium als Mediumquelle, darauf Filter mit Algenschicht (Abb. 22)

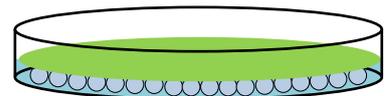


Abbildung 22:
Petrischale:
unten: Glaskugeln mit Medium,
oben: Filter mit Algenschicht

So lagen die Filter mit der Algenschicht nicht direkt im Medium, wie es zu Beginn der Versuche durchgeführt wurde, und es befanden sich deutlich weniger Zellen im Medium.

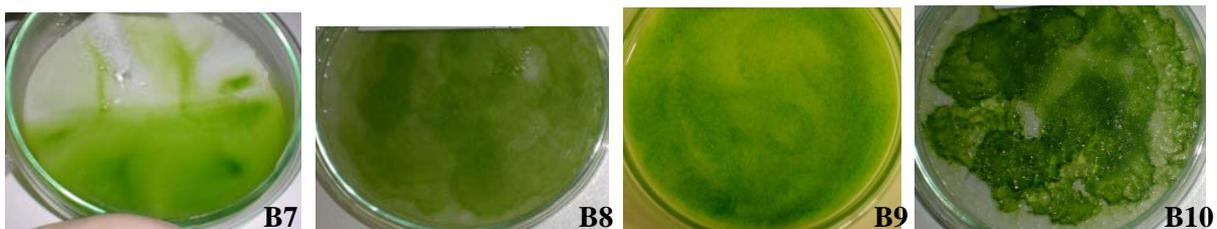


Abbildung 23: Verschiedene Filter mit Mikroalgen in Glas-Petrischalen, nach 7 und 9 Tagen Kultivierung
Celluloseacetat (9Tage) Cellulose AP60.1 (7Tage) Glasfaser 691 (7Tage) Glasfaser GF31 (7Tage)

Die Zellen hafteten nicht auf dem glatten Celluloseacetat-Filter (Bild B7). Auf den Cellulose-Filtern (Bild B8) wuchsen die Algen zwar, das beste Ergebnis erreicht man aber mit den Glasfaser-Filtern. Besonders gut war der Aufwuchs auf den rauen Filtern GF31 (Bild B10) und GF31.10, aber auch auf dem Filter 691 (Bild B9).

Mit diesen Filtern kann keine ausreichende Immobilisierung nur mittels Adsorption stattfinden, da diese zu gering ist. Es ist eine Trennung der Algen vom Medium nötig und die Filter dienen als semipermeable Membran (4), wodurch das Wachstum verzögert wird. Weiterhin sind v.a. die

Glasfaser-Filter nicht sehr stabil aufgrund der ständigen Berührung mit Wasser. Sie weichen auf und reißen leicht.

A2

Materialien:

- M5) beschichtetes, raues und unbehandeltes Glas, Duran-Glas, Fa. Sigmund Lindner, Ø 4mm
- M6) Adhäsionsobjektträger der Firma ThermoFisher Scientific
- M7) Einschluss in das natürliche Polymer Alginat
- M8) Einschluss in das natürliche Polymer Agar
- M9) Spinnvlies aus Polyactid (erhalten vom SIAB): Ausgangsstoff PLA Polymer 6202D Fa. Nature Works, weiterverarbeitet im STFI (Sächsisches Textilforschungsinstitut)

Zu M5) Da die Adsorption an unbehandeltem Glas zu gering ist, wurden beschichtetes und raues Glas untersucht, sowie unbehandeltes Glas zum Vergleich. Die Algen hafteten jedoch an keinem der Gläser an.

Zu M6) Zudem wurden verschiedene Adhäsionsobjektträger getestet. Das Glas ist entsprechend vorbehandelt und wird eigentlich für die Mikroskopie eingesetzt, um z.B. Gewebeschnitte und Zellen besser zu binden.

- SuperFrost Plus: permanent positive Ladung, elektrostatische Anziehung
- SuperFrost Ultra Plus: permanent positive Ladung, elektrostatische Anziehung
- Polysine: permanenter Haftstoff, elektrostatische und chemische Anziehung

Da die Algen Wasser benötigen, wurden die Objektträger in Petrischalen mit etwas Medium bedeckt. So fand allerdings nur eine schwache Anhaftung einer sehr dünnen Zellschicht statt, da durch die schwache Anziehung des Glases nicht mehrere Zellschichten gebunden werden können.

Zu M7) Da es sich bei dem Einschluss der Zellen (i5) in dem natürlichen Polymer Alginat um die häufigste Mikroalgen-Immobilisierung handelt, wurde dies ebenfalls untersucht. Die Versuchsdurchführung wurde der Literatur entnommen. Die Alginat-Konzentrationen und Zelldichte zu Beginn wurde variiert, sowie die Form des Gels und die Kultivierungsbedingungen:

Alginat-Konzentration im Gel [Gewichtsprozent]: 2% und 3%

Zelldichte im Gel zu Beginn [mg/L]: Kugeln mit 2% Alginat: 28, 117, 323, 470, 43 (auch mit 3% Alginat) Film je mit 2% und 3% Alginat: 13, 43

Form: Kugeln: Durchmesser ca. 3mm

Film: Durchmesser ca. 80mm, Höhe ca. 4-5mm

Kultivierungsbedingungen:

für Kugeln: Kolben mit Medium, geschüttelt oder Petrischale mit Medium, ruhend

für Film: Petrischale, ruhend: unten: Glaskugeln mit Medium, Mitte: Filter oder Papier als

Trennschicht und zum Stützen des Films (s. Abb. 23), oben: Film

Herstellung: Für die Kugeln wurden die Alginat-Lösung und die Zellsuspension 1:1 gemischt und durch eine Kanüle (\varnothing 1,2mm) in eine 0,2 molare Calciumchlorid-Lösung (CaCl_2) gepumpt.

Für den Film wurden die Petrischalen wie zur Kultivierung vorbereitet (Aufbau s. Abb. 23), jedoch das Medium durch Calciumchlorid ersetzt. Das Alginat-Zellgemisch wurde auf das Filterpapier gegeben und zusätzlich mit Calciumchlorid besprüht. Bei der Berührung mit Calciumchlorid geliert das Gemisch direkt, wird ca. 2 Stunden darin ausgehärtet und anschließend mit dest. Wasser gewaschen.

Zur quantitativen Bestimmung der Zelldichte in dem Gel wurde das Gel in Natrium-Citrat wieder gelöst und die Zelldichte bestimmt.

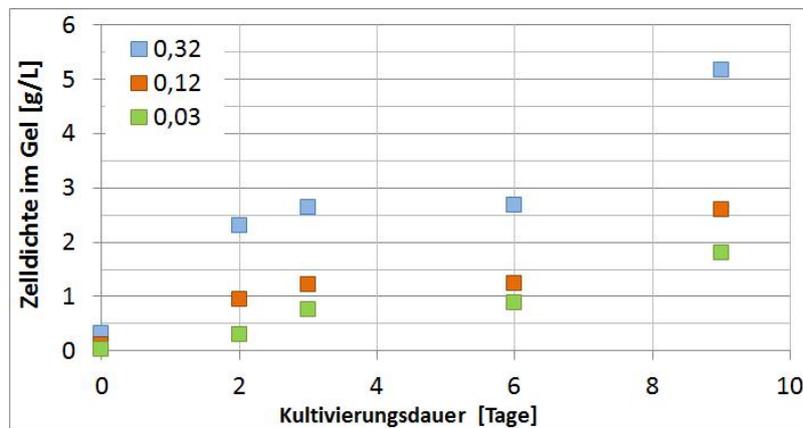


Abbildung 24: Zelldichte der Mikroalgen (angegeben als Biotrockenmasse) in Alginat-Kugeln während der Kultivierung

Wie in Abb. 24 zu sehen ist, nimmt die Biotrockenmasse (BTM) in den Alginat-Kugeln (2% Alginat) bereits innerhalb 6 Tage deutlich zu (eventuell falsche Messung am 9.Tag): von 0,32 auf 2,68 g/L (blau), von 0,12 auf 1,24 g/L (orange) und von 0,03 auf 0,88 g/L (grün). Umso höher die Start-Zelldichte, desto höher die erreichbare Dichte in den Kugeln. Da die Mikroräume in dem Gel das Wachstum der Zellen darin begrenzt, kann nicht die gleiche Endkonzentration erreicht werden. Nach etwa 4-5 Tagen befinden sich auch freie Zellen im Medium (Abb. 25, B11-B14). Dies wurde durch die ruhende Kultivierung reduziert (Abb. 25, B15-B17). Es konnte kein Unterschied bei den getesteten Alginat-Konzentrationen von 2% und 3% festgestellt werden. Die Start-BTM von 470 mg/L war bereits zu hoch. Insgesamt ist eine relative hohe Zelldichte im Gel erreichbar.



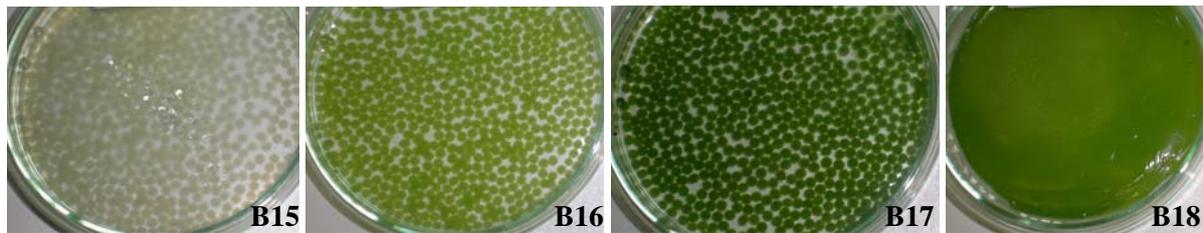


Abbildung 25: *Chlorella vulgaris* immobilisiert in Alginat, kultiviert in Medium

B11-B14) Kugeln, auf Schüttler nach 1, 3, 7 und 16 Tagen, verschiedene Start-Zelldichten

B15-B17) Kugeln, in Petrischale, ruhend, nach 1, 3 und 7 Tagen; B18) Film, in Petrischale nach 7 Tagen

Die Alginat-Filme waren durch Papier oder Filter vom Medium getrennt, daher befanden sich keine freien Zellen im Medium (zusätzliche Zell-Rückhaltung durch semipermeable Membran). Die Zellen wuchsen auch darin sehr gut.

Zu M8) Für den Gel-Einschluss in dem natürlichen Polymer Agar muss die Zellsuspension mit der mind. 41°C heißen Agar-Lösung gemischt werden, da das Agar unterhalb 41°C geliert. Dies ist für lebende Zellen eher ungeeignet. Das Gemisch wurde in Eis-gekühltes Wasser bzw. auf eine kalte Fläche gegeben zum Gelieren und anschließend mit Medium kultiviert. Es konnte kein Wachstum beobachtet werden, da die Algen sehr wahrscheinlich bei der Temperatur abgetötet wurden.

Zu M9) Auf dem Spinnvlies konnte keine Algen-Adsorption beobachtet werden. Wie bei den Filtern (M4) könnten jedoch die Algen auffiltrierte werden und das Vlies zur Trennung der Algen vom Medium dienen (Abb. 22). Dies wurde im Rahmen des Projektes nicht mehr durchgeführt. Das Vlies müsste vorher gut befeuchtet werden, da es sonst eher wasserabweisend ist. Ein Vorteil dieses Vlies ist, dass es nur unter industriellen Kompostbedingungen zersetzt wird.

II 1.3.3 Abschließende Bewertung der Ergebnisse

In den Versuchen erwiesen sich das Alginat (M7) in Kombination mit einem Filter oder Trennpapier und die Glasfaser-Filter (M4), eventuell auch das Vlies (M9), als die geeignetsten Materialien. Die beste Zell-Rückhaltung erreicht man in beiden Fällen, wenn der Filter bzw. das Papier als semipermeable Membran zwischen den Algen und dem Medium sitzt. Auf diese Weise werden die Zellen nicht von dem Filter gelöst und das Alginat gibt keine Zellen in das Medium ab. Der Mediumspeicher kann immer wieder aufgefüllt werden und Nährstoffe durch die Filter nachdiffundieren. Statt dem Alginat mit den eingeschlossenen Zellen, könnte man auch eine Agar-Schicht ohne Zellen herstellen und die Algen darauf austreichen. Diese Schicht könnte man wie den Alginatfilm durch einen Filter vom Medium trennen und kultivieren.

Im Vergleich ist das Aufpipettieren oder auch das Auffiltrieren der Algen auf einen Filter deutlich schneller und einfacher als die Herstellung des Alginats. Hingegen ist der Preis pro Fläche (€/m²) eines 5mm hohen Alginat-Films deutlich geringer als der Preis für z.B. den Glasfaserfilter 691 (Tabelle 1). Ein besser geeigneter Filter könnte auch deutlich teurer sein als der getestete Filter, wie z.B. die verstärkte Nitrocellulose-Membran mit guten Bindungseigenschaften (OPTITRAN BA-S 85,

Poren 0,45 µm) der Firma Whatman. Hingegen wäre z.B. der getestete Cellulose-Filter insgesamt am günstigsten pro Fläche (Tabelle 1). Es könnten weitere Filter untersucht werden und die Preise von Filtern für den technischen Maßstab bei entsprechender Abnahmemenge werden von den genannten Preisen deutlich abweichen. Ein weiterer Vorteil des Alginats ist dessen biologische Abbaubarkeit.

Tabelle 1: Preise einiger getesteter Materialien zur Mikroalgen-Immobilisierung

Material		Preis [€]		Preis [€/m ²]
Alginat	2% im Gel	53 /kg Pulver	1,06 /L Gel	* 5,30
Agar	1,5% im Gel	92 /kg Pulver	1,38 /L Gel	* 6,90
Cellulose Filter Typ 111A (P. 12-15µm)		0,03 /dm ² (bei Ø 240mm)		3,14
Glasfaser-Filter 691 (Poren 1,6µm)		0,51 /dm ² (bei Ø 110mm)		51,00
OPTITRAN BA-S 85 (Poren 0,45µm)		4,19 /dm ² (bei 30cmx3m)		419,00

*Gel-Schicht, Höhe 5mm → 5L/m²

Um mehr Algen pro Reaktorfläche zu immobilisieren, könnten die Filter oder Membranen gefaltet werden oder wellenförmig verlaufen. Die Stützschiene mit dem gleichen Oberflächenverlauf, die zugleich als Medium-Speicher dient, würde nicht aus Glaskugeln bestehen, sondern sollte eine poröse Struktur wie die eingesetzten Glasfritten haben. Für diese Immobilisierungs-Methode bieten sich flache Plattenreaktoren an, wie sie bereits am Institut untersucht wurden mit Algensuspension (Abb. 26). Neben der Immobilisierung bestimmen aber auch die Trenneinheit und die Effizienz der Vergärung von Methan das Konzept des Gesamt-Reaktors. Da dies in der Kürze der Zeit nicht festgelegt werden konnte, war die Erstellung eines Gesamtkonzepts des Reaktors bisher nicht möglich.



Abbildung 26: *Chlamydomonas reinhardtii* kultiviert in Mini-Plattenreaktoren, links mit Glaseinbauten ohne Zellanhaftungen

Die Kultivierung von *Chlamydomonas reinhardtii* in den Platten-Reaktoren (Abb. 26) erfolgt in 200ml TAP-Medium bei 25°C und einer Begasungsrate von 47,5 ml/min Luft und 5 ml/min CO₂ (9,5% CO₂). Begasung von unten durch eine PTFE-Membran mit einer Porengröße von 1 µm und einer Dicke von 1,6 mm. Antischaumzugabe aufgrund der Schaumbildung durch die Begasung. Der pH-Wert wird nicht kontrolliert und liegt zu Beginn bei ca. 8,8. Die inneren Maße der Reaktoren betragen 10x14x2cm. Die Lichtintensität der LED-Beleuchtung kann variabel eingestellt werden.

II.1.4. Trennung des aeroben Photosynthese- vom anaeroben Fermentationskompartiment

Innerhalb der Kooperation ist es lt. Antrag die Aufgabe des **IUV (Universität Bremen)**, Machbarkeitsstudien für die Auswahl von Reaktorvarianten der zu entwickelnden und getrennten aerob-anaeroben Produktion von Methan aus Algen via Umsetzung von Glykolat durch Bakterien durchzuführen. Gemäß der Zielsetzung, optional für die Zukunft minimierte Reaktorvarianten (Mikro-Skala) und/oder kompakte Reaktionsräume zu realisieren, werden zwei Verfahrenswege als Konstruktionsvarianten verfolgt:

- Die Kompaktbauweise, mit integrierter aerob- und anaerob-Zone („Membranschlauchreaktor“)
- Die Membrantrennung, welche eine Separation von aerob- und anaerob-Zone im Mini- oder Mikroskalenbereich ermöglichen soll („Kammersystem“).

Innerhalb des ersten Teils der Studie wurden diese zwei Konzepte in Hinblick auf die Machbarkeit verfolgt und die Schwachpunkte bzw. Kernfragen zu deren Umsetzung diskutiert. So wurde klar, dass das Materialscreening für die Membran (Trennungsmodul) einen wesentlicher Untersuchungsgegenstand darstellen muss sowie die von den Eigenschaften dieser Membran abhängige, mögliche bzw. effizienteste Reaktorvariante. Aus der Konzeption von möglichen Reaktorvarianten auf der Grundlage der gewonnen Erkenntnisse gingen **zwei grundsätzliche Schwerpunkte** („Bottlenecks“) für die Umsetzung der Verfahrensidee hervor, wodurch sich folgende **Untersuchungsfelder** für den zweiten Teil der Studie ergaben:

- **Biofilm** (Algen / Bakterien) auf Membran (-schlauch)
- Trennmoduls und **Membranmaterial** (2- oder 3-Stufen-Verfahren)

Es sollten zwei konkrete Konzeptentwürfe bezüglich der **Machbarkeit** untersucht und anschließend ggf. miteinander verknüpft werden:

- **Membranschlauch /Membranrohr** mit Biofilmen (Aerob/Algen und Anaerob/Bakterien)
- Mikrostrukturreakorttechnologie im (idealen) 2-Stufenverfahren (Aeraob/Anaerob) als **flache „Sandwich-Variante“**

An dem Hierfür innerhalb des ersten Teils der Studie eigens errichteten Membranteststand wurden nun im zweiten Teil Untersuchungen von prinzipiell am Markt verfügbaren, den Anforderungen weitgehend entsprechenden Materialien durchgeführt, wobei dem Glykolatdurchtritt das Hauptaugenmerk galt.

Das gezielte Etablieren von Reinkultur-Algenbiofilmen auf Oberflächen (wie. z.B. Membranen) stellt auch heute noch in der Wissenschaft ein elementares Problem der Reproduzierbarkeit dar. Die prinzipielle Machbarkeit hierzu muss für die Zielsetzung der Studie nachweisbar sein, weshalb dies

ebenfalls für verschiedene, in Frage kommende Materialien im Rahmen des zweiten Teils des Projektes erprobt wurde.

II.1.4.1. Ergebnisse zur Biofilmbildung auf prinzipiell geeigneten, semi-permeablen Oberflächen

Vor dem Hintergrund möglichst kurzer Stofftransportwege, optimaler Photonennutzung sowie Versorgung mit weiteren Spurenstoffen und „Luft“ (CO₂, O₂) bietet sich eine Kultivierung der beteiligten Organismen (phototroph, heterotroph) als Biofilme optimal an. Als ideales Szenario würden so die verschiedenen Spezies und die damit verbundenen Milieubedingungen (aerob/anaerob) allein durch eine semipermeable, dünne Schicht (Membran) getrennt und der Stofffluss selektiv auf die organischen Produkt-/ Substratverbindungen (Glykolat) begrenzt. Dies gezielte Biofilmbildung homogener Spezieskulturen stellt gleichwohl eine Herausforderung dar, insbesondere wenn es sich um Organismen handelt, welche in der Natur in eher selten in Biofilmen anzutreffen sind (begeißelte Einzeller, z.B. *Chlamydomonas r.*). Die innerhalb des Vorhabens gewählten, verschiedenen verfolgten Strategien zur Biofilmbildung orientieren sich dabei an folgenden Möglichkeiten:

- Oberflächenstruktur für Spezies unter haftungsspezifischen Gesichtspunkten optimiert auswählen;
- Milieubedingungen (z. B. Nährstoffe, CO₂) an Oberflächen „attraktiv“ gestalten und gegenüber der Umgebung limitieren;
- Fixierung der Spezies an Oberflächen durch Hilfsmittel (Gelmatrix aus organischen Polymeren).

Die hierzu unternommenen Parametervariationen sind in Tab. 1 aufgeführt. Dabei wurde die Biofilmbildung auf Flachmembranen zunächst nicht in den Vordergrund gestellt, da sich diese durch ihre Vielzahl, wie z.B. spezifischen Oberflächeneigenschaften/ Einbauvarianten (hydrophob, hydrophil, „glatt“ (Polymermembranen), „rau“ (Fasermembranen) usw.) stark unterscheiden können und daher eine gezielte Untersuchung den gegebenen Rahmen einer Studie sprengen würde. Darüber hinaus ergibt sich grundsätzlich die Möglichkeit, die Algen in Gelmatritzen auf der Fläche zu fixieren, was auf ebenen Flächen machbar erscheint und auch grundsätzlich durch die Ergebnisse des Projektpartners IBLT bestätigt wird.

Aus anderen Untersuchungen mit Spezies *Vibrio fischeri* in bereits bearbeiteten Projekten des IUV konnte für diese im Bewegungs- und Milieuverhalten recht analoge Spezies selektiert werden, dass raue Oberflächenstrukturen für eine Biofilmbildung besser geeignet sind, als glatte.

Für die milieugesteuerte Biofilmbildung durch Nährstoff – oder „Luft“-Limitierung wurden daher, vor dem Hintergrund der Schlauch – bzw. Rohrmodul-Reaktorvariante zwei potentiell geeignete, am Markt erhältliche Membranmaterialien untersucht. Diese unterschieden sich im Wesentlichen in der Oberflächenrauigkeit. Die Idee für die Anwendung ist in Abb. 27 schematisch dargestellt.

Tabelle 2: Parametervariation für die Algenbiofilmbildung auf verschiedenen Oberflächen

Nr.	Membran	Methode der Immobilisierung		Stickstoff-Zugabe	Reaktor-variante
		Luftlimitierung	Nährstofflimitierung		
1	Membranschlauch	x		x	Schlaufenreaktor
2	Membranschlauch	x			Schott-Flaschen-Reaktor
3	Membranschlauch		x	x	Schott-Flaschen-Reaktor
4	Membranschlauch		x		Schott-Flaschen-Reaktor
5	Membranschlauch		x plus anschließender Trocknungsphase		Schott-Flaschen-Reaktor
6	Keramikmembran	x			Schott-Flaschen-Reaktor
7	Keramikmembran		x		Schott-Flaschen-Reaktor
8	Keramikmembran		x plus Wechsel in anderes Milieu		Schott-Flaschen-Reaktor

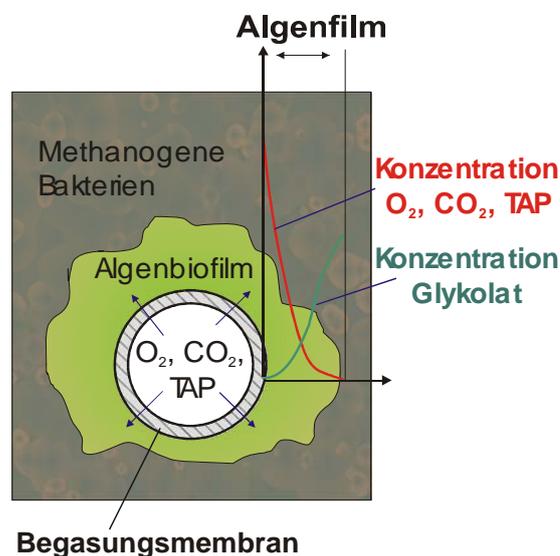


Abbildung 27: Schema einer möglichen Biofilmanordnung in Suspensionreaktoren mit erwarteten Transportgradienten

Es wird angestrebt, durch die Luft – oder Nährstofflimitierung eine Biofilmbildung zu initiieren, und nach ausreichender Etablierung eines Filmes diesen dann unter den für die Glykolatbildung zu limitierenden Bedingungen zu versorgen. In einer „Suspensions-Schlaufenreaktorvariante“ würde der Algenbiofilm mit einer Bakteriensuspension umgeben, welche das direkt an der Schlauchoberfläche

gebildete Glykolat zu Methan veratmet. Allerdings würde dies eine detaillierte Untersuchung zu konstruktiven Umsetzung hinsichtlich der Lichtversorgung erfordern. Bei genauerer Kenntnis der Möglichkeiten könnten sich jedoch die methanogenen Bakterien auch innerhalb des Schlauches / Rohrmoduls kultivieren lassen, wenn zuvor ein stabiler Biofilm auf der Oberfläche etabliert wurde. Die derzeitigen Versuche sind hier im Sinne der Studie zunächst vor dem Hintergrund einer gezielten Biofilmbildung auf verschiedenen Materialien zu bewerten. Die einzelnen Versuchsergebnisse sind in Tab. 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Versuchsergebnisse der Algenbiofilmbildung

Membran	Methode der Immobilisierung	Erfolg		Schlussfolgerung	Bild
		Ja	nein		
I. Membran- Schlauch	Luftlimitierung + Stickstoff		x	Reaktor ist nicht optimal, durch viele Toträume nicht auto-klavierbar. Versuch müsste in autoklavierbarem Reaktor (Edelstahl) durchgeführt werden.	
II. Membran- Schlauch	Luftlimitierung	x		Die Algen haben sich an im Strömungsschatten (Rühr-Fisch) auf den Schlauch. Es gab keinen vollständigen Film.	
III. Membran- Schlauch	Luftlimitierung + Stickstoff		x	Es haben sich keine Algen auf dem Schlauch angesiedelt.	-
IV: Membran- Schlauch	Nährstofflimitierung	x		Die Algen haben sich an im Strömungsschatten (Rühr-Fisch) auf den Schlauch. Es gab keinen voll-ständigen Film.	

V. Membran- Schlauch	Nährstofflimitierung , Benetzen des Schlauchs mit anschließendem Antrocknen		x	Silikonschlauch hat eine zu glatte Oberfläche. Algen setzen sich auf den Boden ab.	-
VI. Keramik- Membran	Luftlimitierung		x	Die Membran ist zu großporig, daher kam es zu großen Schergradienten durch die Drucklufteingabe	-
VII. Keramik- Membran	Nährstofflimitier- ung		x	Es hat sich ein dünner Algenfilm, besonders im Strömungsschatten ausgebildet.	
VIII. Keramik- Membran	Nährstofflimitier- ung mit Wechsel des Milieus		x	Algenfilm spült sich zunächst leicht ab, anschließend wuchs er aber flächenhaft auf der Membran weiter.	
IX. Agar			x	Algen lassen sich leicht und großflächig auf Agar immobilisieren.	

Bewertung der Methoden der Immobilisierung:

Die Methode der lokalen Luftlimitierung führt zu guten Ergebnissen (Vgl. Versuch II. aus Tab. 3). Die Methode der lokalen Nährstofflimitierung ist vielversprechender als die Methode der Luftlimitierung (vgl. Versuch IV. und VII. aus Tab. 3). Diese Methode wäre auch bei flächiger Oberflächenausführung (Flachmembran) im Mikrostrukturreaktor und generell bei der Problemstellung, unabhängig von der Reaktorbauweise, leichter realisierbar.

Bewertung des Trägermaterials:

Der Membranschlauch lässt TAP-Lösung permeieren, welches in einem separaten Kurzversuch mittels Leitfähigkeitstest bestimmt wurde. Dieser ist zum Immobilisieren der Mikroalgen allerdings nur

bedingt geeignet, da seine Oberfläche aus Silikon besteht. Silikon hat eine sehr glatte Oberfläche und erschwert aus diesem Grund das Ansiedeln der Algen. Dies wurde besonders im Versuch V. Tab. 2 sichtbar. Dort ist die Suspension vom Schlauch direkt abgeperlt, wodurch sich keine Algen auf dem Schlauch absetzen. Auch ein händisches Aufrauen der Silikonoberfläche brachte hier keinen Erfolg. Gegebenenfalls war der Grad der Unebenheit der Oberfläche nicht ausreichend genug.

Das Keramikmembranmodul ermöglichte ein flächenhaftes Aufwachsen der Algen. Die poröse Oberfläche bietet eine gute Möglichkeit für die Algen sich auf die Membran anzusiedeln. Die Poren der hier verwendeten Keramikmembran waren allerdings zu groß, so dass TAP Lösung direkt ins Medium getreten ist wodurch keine langsame Diffusion erfolgte und die lokale Limitierung der Nährstoffe nicht hundertprozentig gewährleistet war. Dennoch hat sich auf der Membran ein leichter Film, besonders im Strömungsschatten gebildet. Der Film auf dem Modul konnte zunächst leicht abgespült werden, was zeigt, dass die Algen zu Beginn der Wachstumsphase nicht fest auf der Membran haften. In einem weiteren Versuch zeigte sich, dass nach dem Beginn der Wachstumsphase die Algen fest auf dem Trägermaterial aufwachsen und ein Abspülen nicht mehr möglich war. Hierfür wurde zunächst ein Keramikmodul in eine beimpfte Schottflasche mit Leitungswasser eingehängt und mit Nährlösung gefüllt. Der Versuchsaufbau wurde für 5 Tage mit Hilfe eines Magnetrührers betrieben, bis ein leichter Algenfilm auf der Membran sichtbar wurde. Das Modul wurde aus der Flasche entnommen und in eine zweite Schottflasche, gefüllt mit Leitungswasser und ohne Rührmechanismus, eingetaucht. Innerhalb des ersten Tages löste sich die oberste Algenschicht von der Keramikmembran. Nach ca. 10 Tage bildete sich die feine Algenschicht wieder aus und umlegte die Membran. Nach Beendigung des Versuchs wurde der Algenfilm unter dem Mikroskop untersucht und als gesund bewertet. Diese Methode ermöglicht eine gleichmäßige Ausbildung des Algenfilms und wird daher als sehr positiv bewertet, auch wenn die längere Vorlaufzeit nachteilig ist.

Die Variante der lokalen Luftlimitierung hatte hier strömungstechnische Hürden aufzuweisen: Der Durchfluss der Luft durch die Membran in das Medium und die damit verursachten Scherkräfte wirken dem Streben der Algen entgegen. Die Algen können diese Kräfte nicht überwinden und erreichen die ideale Umgebung am Schlauch nicht. Folglich findet keine Festsetzung der Algen statt. Dieses technische Problem könnte zukünftig jedoch über Materialentwicklung behoben werden.

Ein ideales Trägermaterial zur Immobilisierung von Mikroorganismen bietet Agar-Nährboden, produziert mit TAP-Lösung (vgl. Versuch IX). Dies korrespondiert mit Untersuchungen des KIT. Auf Agar wachsen die Algen schnell und großflächig auf. Hierbei ist kritisch zu betrachten, dass die Immobilisierung von Algen auf Agar zusätzlich eine semipermeable Schicht (Agar) für den Stofftransport von Glykolat darstellt. Hierzu werden jedoch im folgenden Untersuchungen vorgestellt. Generell erscheinen im Sinne der Zielstellung poröse Membran oder Flächen, beschichtet mit Agar, am erfolversprechendsten für die Biofilmbildung. Wie in der Versuchsreihe festgestellt, vernetzt Agar sich mit der porösen Oberfläche zu einer stabilen Membranstruktur. Eine gezielte, homogene Biofilmbildung in Reinkultur kann daher positiv als „machbar“ eingestuft werden.

II.1.4.2 Ergebnisse für die Materialauswahl zur Ausfertigung des Trennmoduls (Membranmaterial)

Im Sinne der Zielstellung ist zu untersuchen, in wie weit eine technische Umsetzung der Trennung des aeroben von dem anaeroben Milieus bei gleichzeitiger Sicherstellung des Stofftransportes von Glykolat durch die Trennschicht / das Trennmodul möglich erscheint. Wie bereits in dem ersten Teil des Projektes definiert, muss hier dem Zielkonflikt eines möglichst hohen, ungehinderten Stofftransportes eines – relativ- vergleichsweise großen Moleküls (Glykolat) bei gleichzeitiger Rückhaltung eines vergleichsweise kleinen Moleküls (Sauerstoff) und geringem Wasserflux Rechnung getragen werden. Diese Anforderungen werden auch durch die Konzeption des IBLT an das Trennmodul gestellt, welches das Kernstück eines zukünftigen „Sandwichreaktors“ darstellt. Dieser Zielkonflikt lässt sich nicht vollkommen mit derzeitig verfügbaren Materialien lösen; Eine Aussage hierzu ist nur auf der Grundlage von Untersuchungen derzeit am Markt erhältlicher Membranen möglich, um „die am wenigsten schlechte Lösung“ einschätzen zu können, auf deren Grundlage eine Bewertung hinsichtlich prinzipieller Machbarkeit erfolgen kann.

An der im ersten Teil des Vorhabens errichteten Versuchsanordnung (vgl. Abb. 28) wurden systematische Untersuchungen verschiedener Membranmaterialien vorgenommen. Die Analyse hinsichtlich erfolgten Stofftransport wurde mittels CSB-Messungen vorgenommen (vgl. Kalibrierkurve in Abb. 29).



Abbildung 28: Membranteststand

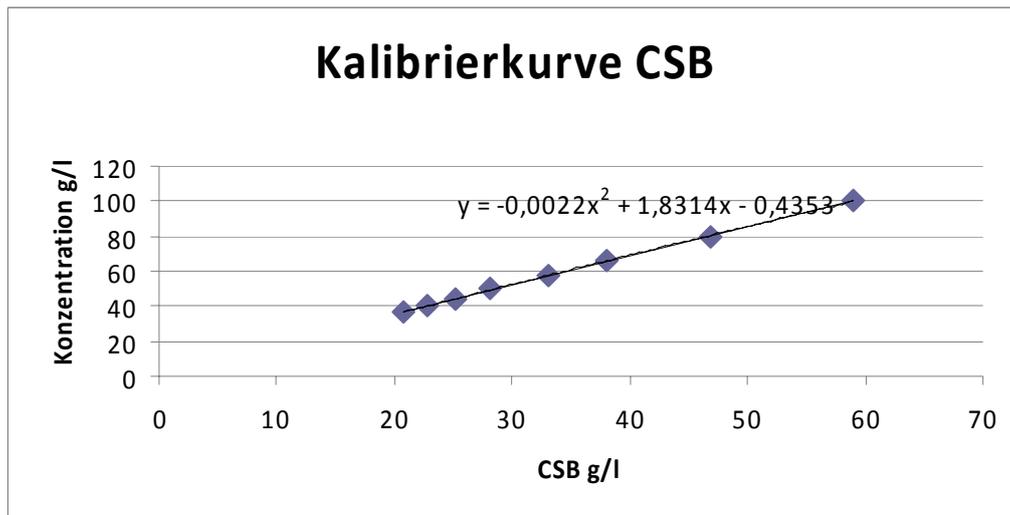


Abbildung 29: Kalibrierung für Glykolatkonzentration mittels CSB-Messung

Die Ergebnisse der einzelnen Versuche sind in folgender Tabelle 4 zu sehen und geben Auskunft über die Eignung der jeweiligen Testmembran im Bezug auf den Einsatz in dem Sandwichreaktor. Dabei wurden auch Membranen, welche zunächst nicht den Anforderungen entsprechen als „Grenzkriterium“ mit aufgenommen, wenn diese als hersteller-abhängige Variante eine Restmöglichkeit auf Eignung aufwiesen (UO-Membran). Wurden die Membranen erfolgreich getestet, erfolgte im Anschluss eine Untersuchung in einem Langzeitversuch. Die untersuchten Membranen wurden anhand von verschiedenen Kenngrößen, wie

- Permeieren von Glykolat,
- Transportkoeffizienten / Dauer bis zum Ausgleich der Stoffkonzentration,
- Rückhaltevermögen von Wasser und
- Langzeituntersuchungen / Transportkoeffizient nach höherer Betriebsdauer.

bewertet, um anschließend eine begründete Auswahl treffen zu können. Dabei wurden, vor dem Hintergrund der unterschiedlichen Transporteigenschaften und -richtungen die Membranen gemäß Hersteller-Angaben getestet (aktive Schicht zur Ausgangs-Glykolatlösung) sowie „umgekehrt“, wodurch z.B. der Wasserflux verringert werden kann, da die hydrophobe Schicht eine entsprechende Orientierung aufweist.

Wie durch die Ergebnisse zur Biofilmbildung deutlich wurde, stellt die eventuelle Beschichtung von Membranen mit Gelmatrix (Agar, Alginat o.ä.) möglicherweise einen zusätzlichen Widerstand für den Stofftransport von Glykolat dar. Daher werden die Versuchsergebnisse der Membranen mit Agar-Beschichtung gesondert analysiert.

Tabelle 4: Übersicht der Ergebnisse der einzelnen Membran-Versuche

Nr.	Membran	Einsetzweise	mit Agar beschichtet		Erfolgreich	Schlussfolgerung
		aktive Trennschicht nach...	Ja	Nein	Ja/nein	
1	Umkehr-osmose	-		x	Nein	Glykolat kann nicht durch eine UO-Membran diffundieren.
2	Nadir UC 100	Oben		x	nein zu hohe Wasserpermeabilität	Die Nadir UC 100 ist nicht geeignet.
3	Nadir UC 100	Unten		X	nein zu hohe Wasserpermeabilität	Auch umgekehrt eingesetzt ist die Nadir UC 100 nicht geeignet.
4	Nadir UC 010	Oben		x	Ja	Die Nadir UC 10 kann als Trenneinheit in den Reaktor eingesetzt werden.
5	Nadir UC 010	Unten		x	Ja	Auch umgekehrt diffundiert das Glykolat durch die Membran UC 10
6	Nadir UC 010	Unten	X		Ja	Die Nadir UC 010 mit Agar beschichtet ist als Trenneinheit geeignet.
7	Keramikmembran	Oben		x	nein zu hohe Wasserpermeabilität	Die unbeschichtete Keramikmembran ist nicht für den Sandwichreaktor geeignet.
8	Keramikmembran	Unten	X		Ja	Durch die Beschichtung verändert sich die Wasserdurchlässigkeit der Membran und sie ist als Trenneinheit geeignet.

Der Transportkoeffizient wurde für jeden einzelnen Versuch bestimmt und ermöglichte somit den Vergleich der unterschiedlichen Membrantypen (z.B. vgl. Abb. 30).

Die einzelnen Ergebnisse liefern die Erkenntnis, dass der Transportkoeffizient über die Zeit abnimmt. Dieses Verhalten kann durch die Abnahme des Konzentrationsgradienten und damit der Triebkraft für die Permeation von Glykolat durch die Membran, hervorgerufen durch den stattfindenden Konzentrationsausgleich, begründet werden. Das gewählte Beispiel (Abb. 30) zeigt den direkten Vergleich der Membran Nadir UC10 mit der aktiven Trennschicht Richtung Glykolatlösung und „umgekehrt“ eingebaut. Die Membran UC10 umgekehrt ermöglicht einen Konzentrationsausgleich nach 9 Tagen, die UC 010 richtig herum eingesetzt bereits nach 8 Tagen. Somit empfiehlt sich im direkten Vergleich die Variante mit der aktiven Trennschicht gerichtet zur Glykolatlösung eingebaut.

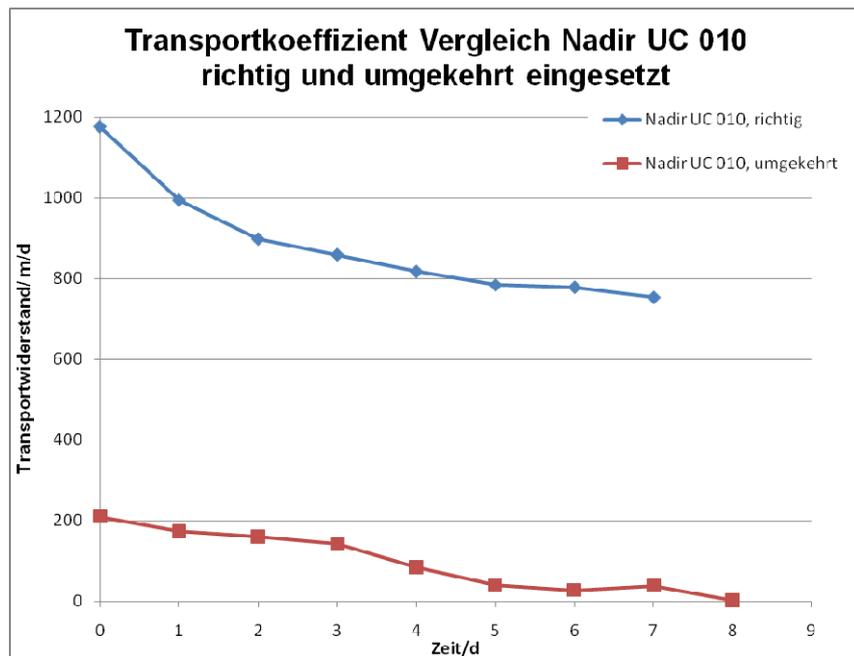


Abbildung 30: Vergleich der Transportkoeffizienten Nadir UC 010 richtig und umgekehrt eingesetzt

Rückhaltevermögen von Wasser:

Entscheidend für den Einsatz der Membran ist das Bewertungskriterium Rückhaltevermögen von Wasser. Bei einem zu hohen Durchfluss des Wassers werden einerseits die Messergebnisse verfälscht, andererseits ist dies für den Rückhalt von Sauerstoff, Methan oder Nährsalzen für diese Anwendung wichtig, einen geringen Wasserfluss auch zur Unterstützung der Biofilmetablierung sicherzustellen. Während der Versuchsreihen wurde täglich die Füllstandsänderung des Glasrohrs gemessen, um eine Vergleichsgrundlage aufzubauen. Beispielhaft für ein ungenügendes Ergebnis kann hier die Keramikmembran genannt werden Wie in Abb. 31 zu erkennen ist, konnte diese Membran den Anforderungen dieser Kenngröße nicht genügen und wurde aus diesem Grund aus den weiteren Versuchsreihen in dieser Form ausgeschlossen.

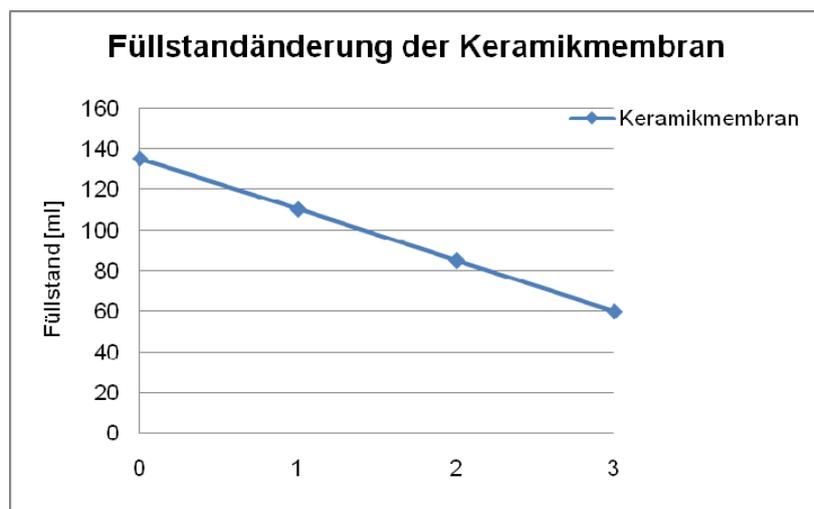


Abbildung 31: Füllstandsänderung Keramikmembran im Zeitverlauf

Veränderung des Transportkoeffizienten im Laufe der Betriebszeit:

Eine weitere Kennzahl, die einen Einfluss auf die Auswahl der geeigneten Membran hat, ist die Veränderung des Transportkoeffizienten im Laufe der Betriebszeit der Membran. Um eine Aussage über dieses Verhalten zu treffen, wurden die für geeignet befundenen Membranen in einem Langzeitversuch (jeweils drei Durchgänge) beobachtet und die Transportkoeffizienten miteinander verglichen. Beispielhaft kann der Vergleich des Transportkoeffizienten zwischen der Nadir UC 10 im ersten Durchgang und im Langzeitversuch genannt werden (vgl. Abb. 32).

Bei den Langzeitversuchen hat sich gezeigt, dass der Transportkoeffizient des dritten Durchgangs am Referenztag t nach Versuchsbeginn höher ist, als der der ersten Durchgänge. Dies zeigt, dass sich die Membraneigenschaften über die Zeit positiv für den Transport von Glykolat entwickeln.

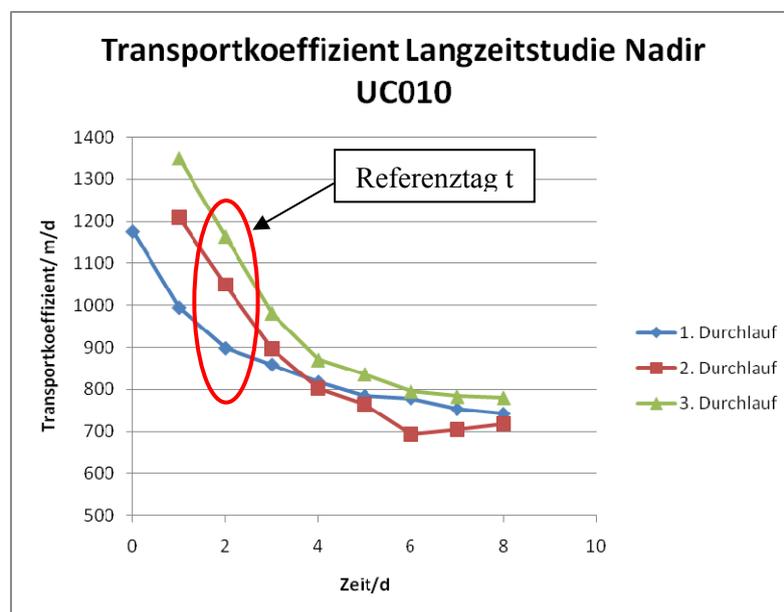


Abbildung 32: Veränderung des Transportkoeffizienten je Durchgang

Agar-Agar als Membranbeschichtung:

Die zuvor vorgestellte Variante, Agar-Agar als Membranbeschichtung zu verwenden, wurde während der einzelnen Versuchsreihen ebenfalls getestet und erzielte ein positives Gesamtergebnis. Aus den Versuchsreihen wird die Erkenntnis gewonnen, dass Glykolat durch eine 10%ige Agar-Beschichtung hindurch permeieren kann. Dies stellt sich als sehr positiv auch in Hinblick auf die Ergebnisse der Projektpartner in Leipzig und Karlsruhe dar, da dort ebenfalls sehr deutlich wurde, dass eine Agar-Beschichtung günstig für die Biofilmbildung der Algen ist und diese und dies kein Hindernis in der Glykolatexkretion darstellt. Für die bessere Beständigkeit der Agarschicht eignet sich besonders gut eine poröse Stützschrift, wie die Ergebnisse der Nadir UC 010 Versuchsreihe mit Agar zeigen. Ein weiterer positiver Effekt, den eine Agar-Beschichtung auf die Membranversuche hat, ist, dass das Permeieren des Wassers durch die Membran herabgesetzt wird. Diese Erkenntnis kann besonders

deutlich bei der Versuchsreihe „Keramikmembran ohne Agar“ und „Keramikmembran mit Agar“ gesehen werden und der Abb. 33 entnommen werden.

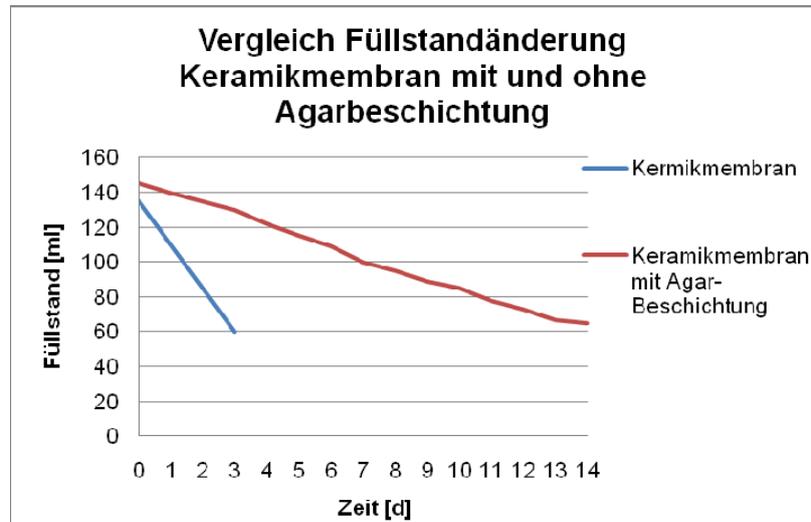


Abbildung 33: Vergleich der Füllstandsänderung zweier Membranen

Die Füllstandsänderung ist um ein fünffaches geringer, wird eine Agar-Beschichtung verwendet. Allerdings hat die Agar-Beschichtung auch eine Auswirkung auf die Dauer bis zum Konzentrationsausgleich. Bei gleichen Rahmenbedingungen verlängert sich der Zeitabschnitt um 467% (11. Tag) (vgl. Abb. 31), allerdings beruht der Konzentrationsausgleich fast ausschließlich auf reiner Konvektion im Fall der Keramikmembran. Ist eine Füllstandsänderung zu vermeiden, sprechen die positiven Versuchsergebnisse für die Verwendung einer agarbeschichteten Membran in dem anvisierten Verfahren.

Membranempfehlung:

Die Bewertung der Membranen erfolgte nach den oben genannten Kriterien. Jede Membran wurde jeweils in ihrer Einbauweise und bei Langzeitversuchen in den einzelnen Durchgängen separat betrachtet. Das erste Kriterium, das Permeieren von Glykolat erfüllten, bis auf die Umkehrosmosemembran, alle verschiedenen Varianten. In der weiteren Bewertung werden die Membranen sortiert nach

1. Dauer des Konzentrationsausgleichs: jeweils nach der Anzahl der benötigten Tage, wobei die Membran mit den wenigsten Tagen an erster Stelle steht,
2. Füllstandsänderung: jeweils nach der Menge der Änderung pro Tag, wobei die Membran mit den geringsten Mengen Platz eins belegt

und jeweils mit Punkten versehen. Eine hohe Punktzahl entspricht einer hohen Eignung. In Tabelle 5 und 6 sind die ersten fünf Plätze der tauglichsten untersuchten Membranen dargestellt. Zu beachten ist, dass in dem Sandwichreaktor die Membranen die Glykolatdiffusion in beide Richtungen erlauben muss. Aus diesem Grund werden zwar in den „Ranglisten“ die Einbauweise je Membran separat

betrachtet, für das Gesamtergebnis stehen die umgekehrt eingesetzte Membran und die mit der aktiven Trennschicht gerichtet zur Glykolatlösung eingesetzte Membran nicht in Konkurrenz zueinander- ihre Punkte addieren sich.

Tab. 5: Reihenfolge der Membranen mit dem Kriterium Dauer des Konzentrationsausgleichs

Membran	Leitungs- H ₂ O	Durch- gang	Dauer des Konzentrations- ausgleiches [Tag]	Füllstands- änderung total [ml]	Mittlere Dichte- differenz [kg/m ³]	Punkte
Nadir UC 010 (u*)	x	3	7	50	58,37	5
Keramikmem- bran mit Agar	x	2	8	33	69,47	4
Nadir UC 010 (u*)	x	1	8	101	64,25	3
Nadir UC 010 (u*)	x	2	8	104	64,35	3
Nadir UC 010 mit Agar	x	2	9	17	65,41	3

u*=umgekehrt eingesetzt

Die Membran Nadir UC 010 in umgekehrter Weise eingesetzt und im dritten Durchgang des Langzeitversuchs ermöglicht den Konzentrationsausgleich innerhalb von sieben Tagen. Die Keramikmembran, beschichtet mit Agar und die Nadir UC 010 umgekehrt eingesetzt in dem ersten und zweiten Durchgang des Langzeitversuchs benötigen für den Ausgleich jeweils acht Tage. Die Nadir UC 010 beschichtet mit Agar neun Tage. Bei der Betrachtung der Füllstandsänderung überzeugt ebenfalls die Nadir UC 010 mit und ohne Agar-Beschichtung in den einzelnen Durchgängen.

Tabelle 6: Rangreihenfolge der Membranen mit dem Kriterium der Füllstandsänderung

Membran	Leitungs- H ₂ O	Durch- gang	Dauer des Konzentrations- ausgleiches [Tag]	Füllstands- änderung total [ml]	Mittlere Dichte- differenz [kg/m ³]	Punkte
Nadir UC 010	x	2	9	17	65,40	5
Nadir UC 010 mit Agar	x	2	9	17	65,41	5
Nadir UC 010 mit Agar	x	1	9	20	63,57	3
Nadir UC 010	x	1	9	25	63,57	2
Nadir UC 010	x	1	9	25	63,57	2

Auf der Basis der hier durchgeführten Untersuchungen wird die Membran Nadir UC 010 als Trenneinheit für das Verfahren, vor allem in der Mikrostruktureaktorvariante, empfohlen.

II.1.4.3 Abschließende Bewertung der Ergebnisse

Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigen deutlich, dass prinzipiell die Hürden einer technischen Umsetzung des Verfahrens zur Produktion von Methan aus Algen überwindbar erscheinen. Gleichwohl wurde klar, dass sich durch Ausschöpfung des Entwicklungspotenzials auch auf der Materialseite noch erhebliches Optimierungspotenzial für das Verfahren ergeben kann. Die umfangreichen, unumgänglichen Untersuchungen zu am Markt erhältlichen Materialien und deren Eignung für die Überwindung der im ersten Teil der Studie spezifizierten Bottlenecks zeigen, dass die technische Konstruktion nicht limitierend allein auf eine Variante fokussieren muss, sondern bereits auf der Basis der jetzigen Erkenntnisse deutlich eine Machbarkeit sowohl als Mikrosystemvariante als auch als Makro-Variante in flächiger als auch kompakter Bauweise zulässt. Die Wirtschaftlichkeit in Bezug auf Material und Betriebskosten wird letztlich über die Bauart entscheiden. Das Verfahren als solches ist als „machbar“ einzustufen.

II.1.5. Zusammenfassung

- a) Die Exkretion von Glykolat konnte sowohl in Suspensions- als auch in Biofilmen gezeigt werden. Die Exkretion wird wesentlich gesteigert, wenn bei hohem Sauerstoffpartialdruck (47%) die CO₂-Konzentrationen hoch gehalten werden. Das ist technisch eher günstig.
- b) Die die Erhöhung der Lichtintensität als auch die spektrale Zusammensetzung des Lichts keinen Einfluss auf die Rate der Glykolatausscheidung hatten. Der Einfluss der Lichtintensität dürfte sich jedoch verändern, wenn in zukünftigen Versuchen Zelllinien mit reduzierter Antennengröße bzw. veränderten Eigenschaften der RubisCo eingesetzt werden.
- c) Es konnte gezeigt werden, daß immobilisierte Algen die gleichen Glykolatraten aufweisen, wie Suspensionskulturen. Damit eröffnet sich die Möglichkeit, ähnliche Versuchsbedingungen zu schaffen, wie sie später auch im Bioreaktor zu erwarten sind und diese auch im Langzeitversuch zu überprüfen.
- d) Die Nachhaltigkeit der hohen Exkretion ist noch nicht realisiert. Die Daten zeigen, dass die Exkretion hoch ist, wenn die Verstoffwechslung des Glykolats verhindert wird. Dies kann zur Zeit nur mit Hilfe eines toxischen Hemmstoffs realisiert werden. Dieses Problem dürfte über „metabolic engineering“ zu lösen sein.
- e) Die Etablierung einer HPLC-Methode zur Trennung und Detektion organischer Säuren ermöglicht eine schnelle und günstige Untersuchung der Zusammensetzung der exkretierten Substanzen im Zellmedium. Das ist wichtig, da keine Bedingungen oder Algenarten selektiert werden sollen, bei denen größere Mengen anderer organischer Substanzen als Glykolat ausgeschieden werden. Die bisherigen Daten zeigen, dass außer Glykolat keine anderen organischen Säuren von den Zellen ausgeschieden wurden.
- f) Die Lichteffizienz der Glykolatbildung ist noch nicht optimal. Es wurden Werte von 150-500 Photonen pro Glykolatmolekül berechnet. Diese Raten sind durch metabolic engineering noch drastisch zu steigern.
- g) Die Gärversuche haben ergeben, dass Glykolat sehr effizient in Biogas umgewandelt werden kann. Das gebildete Biogas besteht praktisch nur aus Methan und Kohlendioxid. Die Fermentation ist nicht extrem sauerstoff-empfindlich. Selbst in Anwesenheit von 4% Sauerstoff sind die Gärausbeuten noch sehr hoch.
- h) Aus den Glykolatbildungsraten und den Gärausbeuten lassen sich potentielle Methanbildungsraten pro Fläche und Jahr im Freiland berechnen. Ausgehend von einer maximalen Chlorophylldichte von 300 mg/m² kann die zu erwartende Glykolatexkretionsrate bzw. Methanbildungsrate pro Fläche berechnet werden. Unter der Voraussetzung, dass 1 kg Methan äquivalent sind zu 1,4 L Biodiesel ergeben sich schon auf der Grundlage des nicht-optimierten Algenstoffwechsels und einer „Vegetationsperiode“ von April bis September Ausbeuten von ca. 325 L Biodiesel/ha Jahr (ohne Hemmung der zellinternen Glykolatweiterverwertung). Die Versuche mit dem Hemmstoff Isoniazid haben gezeigt, dass

diese Ausbeute durch die Hemmung der zellinternen Glykolatmetabolisierung Glykolatausscheidungsraten auf ca. 1300 L Biodiesel/ha Jahr gesteigert werden kann. Das maximale Potential kann erst abgeschätzt werden, wenn Algenzellen mittel Transformation auf die Glykolatexkretion optimiert worden sind.

- i) Innerhalb des Vorhabens konnte gezeigt werden, dass die Membran- und Biofilmträger Materialien, welche am Markt verbreitet sind, deutlich eine positive Bewertung hinsichtlich der Machbarkeit dieses Verfahrens erlauben. Für einzelne Versuchsbedingungen konnten die Hürden partiell mit einigen der vorhandenen Materialien überwunden werden. Dennoch muss für die Überwindung der Gesamtheit des technischen Zielkonfliktes weiterhin Forschungsarbeit investiert werden, da sich noch keine endgültige, für alle Anforderungen geeignete Material-Lösung absehen lässt.
- j) Das Gleiche gilt für die Kompartimenttrennung. Durch die Verzögerung des Vorhabenbeginns sowie durch den Umfang der spezifizierten „Schwachstellen“ bzw. notwendigen durchzuführenden Forschungsarbeiten („Bottlenecks“) konnten noch keine Resultate gewonnen werden, die man als endgültige Lösung bezeichnen könnte. Hier gilt jedoch ebenfalls, dass das Problem eindeutig als lösbar angesehen werden kann.
- k) Eine detailliertere Planung des Reaktors war bisher noch nicht möglich, da dies ganz entscheidend von der letztlich verwendeten Methode der Algenimmobilisierung, der verwendeten Trennmembran und der Effizienz der Glykolatvergärung abhängt.

II.2. Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Personalkosten:

812: 75.033,00 EURO

882: Beschäftigungsentgelte (studentische Hilfskräfte) 6000,00 Euro

Sächliche Verwaltungsausgaben/Geräteinvestitionen

850:

CLF Plant Climatics GmbH – Lichtanlage = 8520,40 EURO

Photosystems Instruments Ltd. - Photobioreactor = 1297,10 EURO

ISL-Industriehandel&Service GmbH - Filterplatte = 332,40 EURO

Firma ERJAWETZ – Schlauchpumpe = 2844,10 EURO

Sonstige allgemeine Verwaltungsausgaben:

843: = 24100,00 EURO

Aufträge an Kooperationspartner:

SIAB: = 35000,00 EURO

Universität Bremen: = 17850,00 EURO

Universität Karlsruhe: = 15000,00 EURO

II.3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Es handelte sich bei dem Vorhaben um eine typische Machbarkeitsstudie. Es mußte untersucht werden, ob die Glykolatausscheidung tatsächlich so verändert werden kann, daß sie als Grundlage für den Gesamtprozess dienen kann. Es mußte zweitens gesichert werden, daß Glykolat von methanogenen Mikroorganismen als einzige C-Quelle verwertet werden kann und ob das entstehende Produkt auch technisch verwertbar ist. Schließlich wurde mit der Algenkultur auf Biofilmen völliges Neuland betreten. Hier mußten entsprechende Trägermaterialien und Immobilisierungstechniken erstmals getestet werden, um Daten an die Hand zu bekommen, ob das Verfahren weiter entwicklungsfähig ist. Die Kopplung eines aeroben Photosynthesemoduls mit einem anaeroben Methanogenesemodul ist in der Wissenschaft ebenfalls erstmalig untersucht worden. Daher wurden auch hier zunächst nur mögliche Trennprinzipien getestet, um das zukünftige Entwicklungspotential abschätzen zu können.

II.4. Voraussichtlicher Nutzen

Die Ergebnisse zeigen, dass der hier verfolgte Ansatz aussichtsreich erscheint, weiter entwickelt zu werden. Im Erfolgsfall ist das Nutzungspotential außerordentlich hoch, da eine enorme Effizienzsteigerung bei der Herstellung von Bioenergie zu erwarten ist. Der zweite potentielle Nutzen besteht hauptsächlich darin, daß bei der Algenbiofilmtechnologie durch den verringerten Aufwand in der Hardware gegenüber traditionellen Photobioreaktoren Flächen potentiell nutzbar werden, die zur Zeit nicht für die Bioenergieerzeugung bereit gestellt werden können (wie z.B. Verkehrsflächen).

II.5. Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordene Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens.

Nach unserer Kenntnis konzentriert sich die Forschung zur Herstellung von Biofuels mittels Algenbiotechnologie entweder auf die Generierung von Wasserstoff oder auf Technologien, die über Biomasse und anschließende Ernte und Refinement entweder zu Biogas oder zu Pflanzenölen gelangen. Ergebnisse aus Vorhaben, die auf andere Weise unter Umgehung der Biomassebildung Kraftstoffe herzustellen versuchen, sind uns nicht bekannt.

II.6. Die erfolgten und geplanten Veröffentlichungen der Ergebnisse

Um die Patentanmeldung nicht zu gefährden, wurden bisher die Ergebnisse noch nicht veröffentlicht. Da zum jetzigen Zeitpunkt die Urheberrechte schon gesichert sind, ist eine Publikation in Vorbereitung. In dieser Veröffentlichung wird auf die Förderung durch das BMBF hingewiesen.

II.6.1 Vorträge und Poster auf nationalen und internationalen Tagungen

Auf Vorträgen wurde aus den oben genannten Gründen auf die Veröffentlichung der Ergebnisse dieses Vorhabens verzichtet.

II.6.3 Veröffentlichte und in Vorbereitung befindliche Publikationen

Eine Veröffentlichung in Nature Biotechnology ist nun in Vorbereitung.

II.7. Literatur

Becker J, Dohler G, Egle K (1968). The effect of monochromatic light on the extracellular excretion of glycolate during photosynthesis of *Chlorella*, Z. Pflanzenphysiol. 58: 212-221.

Calkins V (1943) Microdetermination of glycollic and oxalic acids. Ind. Eng. Chem. 15:762-763.

Friedrich M, Laderer U, Schink B (1991). Fermentative degradation of glycolic acid by defined syntrophic cocultures. Arch. Microbiol. 156: 398-404.

Hall NP, Kendall AC, Lea PJ, Turner JC, Wallsgrove RM (1987). Characteristics of a photorespiratory mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.) deficient in phosphoglycollate phosphatase. *Photosynth. Res.* 11:89-96.

Vílchez C, Galván F, Vega JM (1991) Glycolate photoproduction by free and alginate-entrapped cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35:716-719.

III. Erfolgskontrollbericht

1. Beitrag der Ergebnisse zu den förderpolitischen Zielen

Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, die Prinzipien der Prozessintensivierung auf die Algenbiotechnologie anzuwenden. Es wurde untersucht, ob es möglich ist, in einem neuartigen Ansatz Mikroalgen auf einem Biofilm so zu kultivieren, dass das photosynthetisch gebildete Glykolat ausgeschieden wird und von Mikroorganismen in einem anaeroben Kompartiment direkt zu Methan umgesetzt wird. Damit kann die Anzahl der Prozessschritte vom Licht bis in das verwendungsfähige Methan drastisch vermindert und die Effizienz potentiell um mindestens eine Zehnerpotenz gesteigert werden.

2. Wissenschaftliche Ergebnisse des Vorhabens, die erreichten Nebenergebnisse und die gesammelten wesentlichen Erfahrungen

Die Exkretion von Glykolat konnte sowohl in Suspensions- als auch in Biofilmen gezeigt werden. Die Exkretion wird wesentlich gesteigert, wenn bei hohem Sauerstoffpartialdruck (47%) die CO₂-Konzentrationen hoch gehalten werden. Es konnte gezeigt werden, daß immobilisierte Algen die gleichen Glykolatraten aufweisen, wie Suspensionskulturen. Damit eröffnet sich die Möglichkeit, ähnliche Versuchsbedingungen zu schaffen, wie sie später auch im Bioreaktor zu erwarten sind und diese auch im Langzeitversuch zu überprüfen. Die Etablierung einer HPLC-Methode zur Trennung und Detektion organischer Säuren ermöglicht eine schnelle und günstige Untersuchung der Zusammensetzung der exkretierten Substanzen im Zellmedium. Das ist wichtig, da keine Bedingungen oder Algenarten selektiert werden sollen, bei denen größere Mengen anderer organischer Substanzen als Glykolat ausgeschieden werden. Die Lichteffizienz der Glykolatbildung beträgt 150-500 Photonen pro Glykolatmolekül. Diese Raten sind noch niedrig und können durch geeignetere Organismen und/oder durch metabolic engineering sicherlich drastisch gesteigert werden. Die Gärversuche haben ergeben, dass Glykolat sehr effizient in Biogas umgewandelt werden kann. Das gebildete Biogas besteht praktisch nur aus Methan und Kohlendioxid. Die Fermentation ist nicht extrem sauerstoff-empfindlich, da selbst in Anwesenheit von 4% Sauerstoff die Gärausbeuten noch sehr hoch sind. Aus den Glykolatbildungsraten und den Gärausbeuten lassen sich potentielle Methanbildungsraten pro Fläche und Jahr im Freiland berechnen. Ausgehend von einer maximalen Chlorophylldichte von 300 mg/m² kann die zu erwartende Glykolatexkretionsrate bzw. Methanbildungsrate pro Fläche berechnet werden. Unter der Voraussetzung, dass 1 kg Methan äquivalent sind zu 1,4 L Biodiesel ergeben sich schon auf der Grundlage des nicht-optimierten Algenstoffwechsels und einer „Vegetationsperiode“ von April bis September Ausbeuten von ca. 325 L Biodiesel/ha Jahr (ohne Hemmung der zellinternen Glykolatweiterverwertung). Die Versuche mit dem Hemmstoff Isoniazid haben gezeigt, dass diese Ausbeute durch die Hemmung der zellinternen

Glykolatmetabolisierung Glykolatausscheidungsraten auf ca. 1300 L Biodiesel/ha Jahr gesteigert werden kann. Das maximale Potential kann erst abgeschätzt werden, wenn Algenzellen mittel Transformation auf die Glykolatexkretion optimiert worden sind. Im Vorhabens konnte gezeigt werden, dass die Membran- und Biofilmträger Materialien, welche am Markt verbreitet sind, eine positive Bewertung hinsichtlich der Machbarkeit dieses Verfahrens erlauben. Für einzelne Versuchsbedingungen konnten die Hürden partiell mit einigen der vorhandenen Materialien überwunden werden.

3. Fortschreibung des Verwertungsplans

Aus dem Vorhaben ist eine Patentanmeldung hervorgegangen. Es wird damit gerechnet, dass das Patent „Verfahren und Vorrichtung zur Herstellung von Methan in einem Photobioreaktor“ (Amtliches Aktenzeichen: 102010040440.3) im Sommer 2011 erteilt wird. Es werden jetzt Forschungen durchgeführt, die Umsetzung des Prinzips in einem Modellreaktor zu realisieren. Dazu wurde im Rahmen des VIP Programmes des BMBF ein Förderantrag (Nr VIP 0001, Aktenzeichen 16V0001-0003.) gestellt.

4. Arbeiten, die noch nicht zu einer Lösung geführt haben

Eine nachhaltig hohe Glykolatexkretion konnte noch nicht realisiert werden. Die Daten zeigen, dass die Exkretion hoch ist, wenn die Verstoffwechslung des Glykolats verhindert wird. Dies konnte in dem Vorhaben nur mit Hilfe eines toxischen Hemmstoffs realisiert werden. Dieses Problem dürfte über „metabolic engineering“ zu lösen sein. Bei der Kompartimenttrennung konnten noch keine Resultate gewonnen werden, die man als endgültige Lösung bezeichnen könnte. Allerdings zeigen die Ergebnisse eindeutig, dass das Problem als lösbar angesehen werden kann. Eine detailliertere Planung des Reaktors war bisher noch nicht möglich, da dies ganz entscheidend von der letztlich verwendeten Methode der Algenimmobilisierung, der verwendeten Trennmembran und der Effizienz der Glykolatvergärung abhängt.

5. Präsentationsmöglichkeiten

Da das Patent noch nicht erteilt ist, wurden bisher keine Daten veröffentlicht und keine öffentlichen Vorträge gehalten, um die Patenterteilung nicht zu gefährden.

6. Einhaltung der Ausgaben und Zeitplanung

Der Kosten- und Zeitplan wurde weitgehend eingehalten. Aufgrund anfänglichen Verzögerungen wurde eine kostenneutrale Verlängerung nötig, in der alle wesentlichen im Antrag geplanten Arbeiten ausgeführt werden konnten.