

# Abschlussbericht

MBFSt-Kennziffer: 2878

Berichtszeitraum: 1. Juli 2010 - 30. Juni 2012

## Biogasgewinnung als Endstufe von Bioraffineriekonzepten

Betreuer: Prof. Dr. Erwin Flaschel  
Stipendiat: Dipl.-Biol. Philipp Grimm  
Lehrstuhl für Fermentationstechnik  
Technische Fakultät  
Universität Bielefeld



Um die Wirtschaftlichkeit eines solchen Prozesses zu gewährleisten, ist eine stetige Versorgung mit Biomasse vonnöten. Während *E. gracilis* bei heterotrophen Kultivierungsbedingungen vergleichsweise hohe Zelldichten erreicht, ist die Biotrockenmassebildung unter photoautotrophen Bedingungen eher gering. Die  $\alpha$ -Tocopherolbildung ist zwar auch unter heterotrophen Bedingungen gegeben, jedoch weit geringer als unter photoautotrophen Bedingungen (Ogbonna *et al.*, 1998). Zur stetigen Generierung von Biomasse kann *E. gracilis* kontinuierlich in einem Photobioreaktor kultiviert werden. Als Nachteilig ist neben der bereits erwähnten geringen Zelldichte die energieaufwendige Ernte der Biomasse anzusehen. Ein alternativer Weg, um hohe Biotrockenmassekonzentrationen und hohe  $\alpha$ -Tocopherolkonzentrationen zu erreichen, ist der photoheterotrophe Kultivierungsmodus dieses Einzellers. Eine weitere Möglichkeit stellt die sequenzielle heterotrophe und photoheterotrophe Kultivierung dar (Ogbonna *et al.*, 1999). Der Vorteil der Zellanzucht mit externen Kohlenstoffquellen ist durch ein schnelleres Wachstum zu hohen Zelldichten begründet. Mittels nachträglicher Illumination dieser Biomasse lässt sich die Produktausbeute deutlich erhöhen.

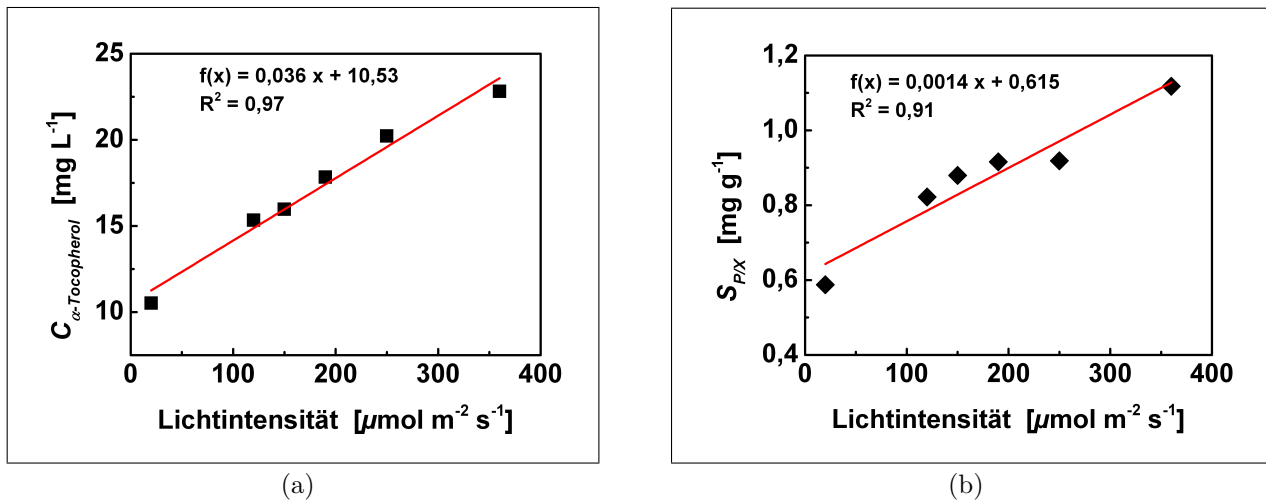
Ein weiterer Vorteil der nachträglich illuminierten, heterotroph gewonnenen Biomasse für das Bioraffineriekonzept ist die Tatsache, dass die Biomasse in Bezug auf das Volumen nicht nur eine höhere Konzentration, sondern zudem einen höheren Paramylonanteil aufweist als photoautotroph gewonnene. Zum einen zeigt die photoheterotroph gewonnene Biomasse eine rasche, vollständige Sedimentation, was eine energiearme Ernte ermöglicht. Zum anderen ist aufgrund des höheren Paramylonanteils somit auch das C/N-Verhältnis der Biomasse für die Biomethangewinnung vorteilhafter. Das für die anaerobe Gärung unvorteilhafte C/N-Verhältnis von Algenbiomasse ist in der Literatur beschrieben (Yen und Brune, 2007). Nachteilig ist, dass in diesem Fall kein vollständig geschlossener Stoffkreislauf gegeben ist und Kohlenstoffquellen z.B. in Form von Glucose dem Kreislauf hinzugefügt werden müssen.

## Ergebnisse

Die kontinuierliche, photoautotrophe Kultivierung von *E. gracilis* wurde in einem Flachplattenbioreaktor mit einem Arbeitsvolumen von 5 L, welcher in der Arbeitsgruppe Fermentationstechnik konzipiert und gebaut wurde, über einen Zeitraum von vier Monaten erfolgreich durchgeführt worden. Dieser Versuch galt primär der Untersuchung der Eignung von *E. gracilis*, den Organismus über längere Prozesszeiten in einem künstlichen System zu kultivieren. Neben der Erprobung verschiedener Volumenströme wurde eine kontinuierliche und satzweise Sedimentation dem Photobioreaktor nachgeschaltet, um das Sedimentationsverhalten hinsichtlich wichtiger Parameter, wie Temperatur oder Taxis photoautotropher *E. gracilis*-Zellen genauer charakterisieren zu können.

Zur Erhöhung der  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration in Bezug auf das Fermentervolumen wurde die Methode der sequentiellen heterotrophen und photoheterotrophen Kultivierung im 20 mL-Maßstab angewandt. Nach einer fünftägigen, heterotrophen Kultivierungsphase in einem Minimalmedium mit 25 g L<sup>-1</sup> D-(-)-Fructose konnte eine Biotrockenmassekonzentration von 15 g L<sup>-1</sup> generiert werden. Die anschließende fünftägige Illumination erfolgte bei unterschiedlichen Beleuchtungsintensitäten, wobei schließlich Biotrockenmassekonzentrationen zwischen 17,5 g L<sup>-1</sup> für die niedrigste und 22 g L<sup>-1</sup> für die höchste Beleuchtungsintensität erreicht werden konnten. In Bezug auf die Produktkonzentration und die Selektivität konnte gezeigt werden, dass eine

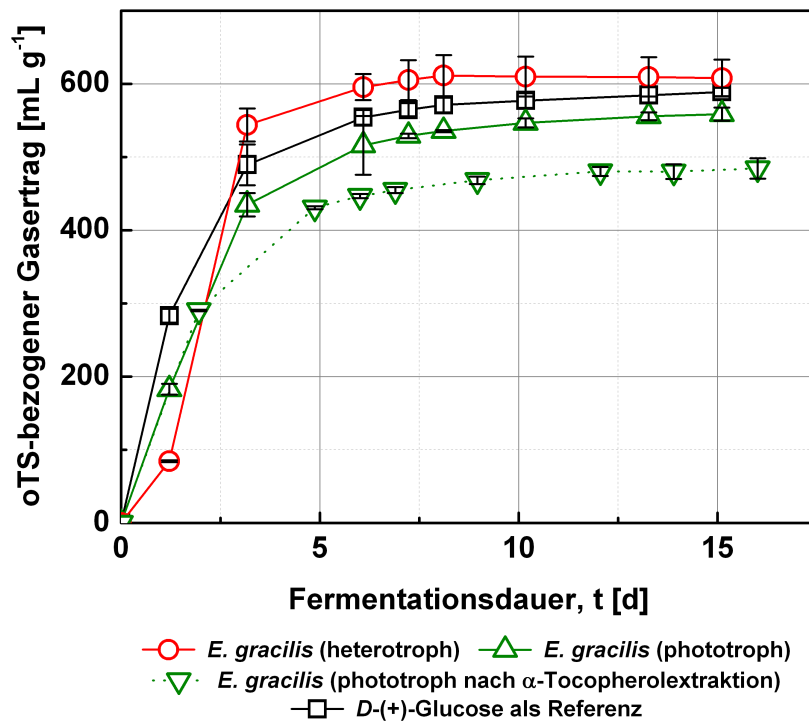
starke Korrelation zwischen Beleuchtungsintensität und  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration vorliegt, wie in Abbildung 2 gezeigt ist.



**Abbildung 2:** Korrelation zwischen Lichtintensität und  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration (a) bzw. Selektivität (b).

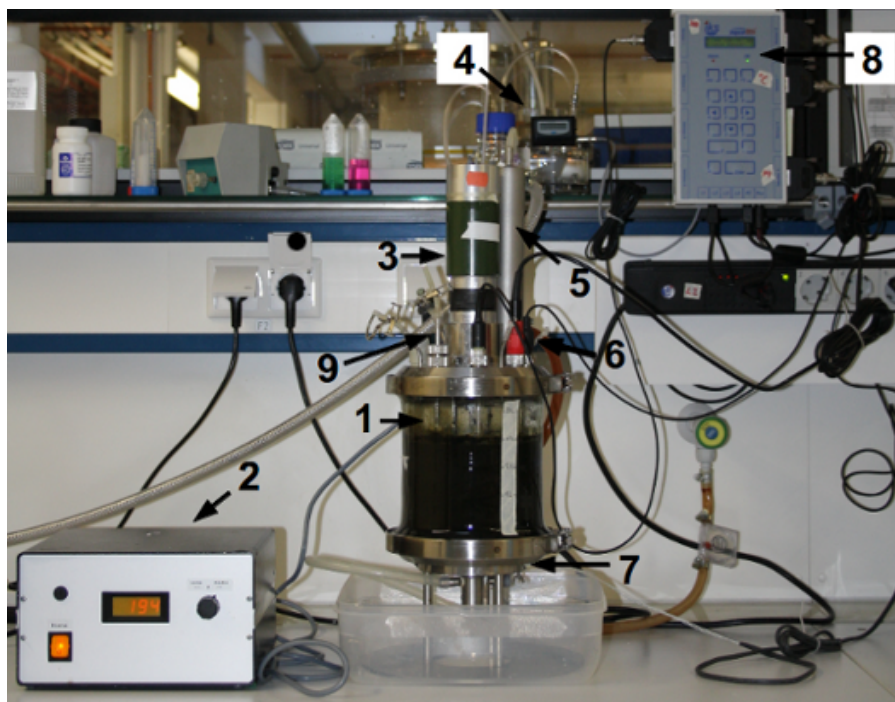
Der Zusammenhang zwischen Lichtintensität und Produktkonzentration (Abb. 2(a)) führte zu einem fast linearen Korrelationskoeffizienten von 0,97. Die Steigung der Regressionsgeraden beträgt  $0,036 \left[ \frac{\text{mg}}{\text{L}} \cdot \frac{\text{m}^2 \cdot \text{s}}{\mu\text{mol}} \right]$  und stellt den Korrelationsfaktor für die Produkterhöhung bei gegebener Beleuchtung dar. In Abbildung 2(b) ist die Korrelation von Lichtintensität und der Selektivität dargestellt. Dieser ist zu entnehmen, dass auch die Selektivität mit der Lichtintensität korreliert. Die Steigung der Regressionsgeraden beträgt  $0,0014 \left[ \frac{\text{mg}}{\text{g}} \cdot \frac{\text{m}^2 \cdot \text{s}}{\mu\text{mol}} \right]$  bei einem Korrelationskoeffizienten von 0,91. Die maximale Beleuchtungsintensität von  $360 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  konnte aus technischen Gründen bisher nicht erhöht werden. Wie die erzielten Ergebnisse vermuten lassen, ließe sich die Produktausbeute durch eine höhere Beleuchtungsintensität wohl noch weiter steigern. Zusätzlich lässt sich die Synthese von  $\alpha$ -Tocopherol in *E. gracilis* durch die Zugabe von Glutamat und Ethanol (Rodrigues-Zavala *et al.*, 2010) oder z.B. 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff (Fujita *et al.*, 2009) weiter erhöhen.

Um die Abbaubarkeit und Produktivität verschiedener Substrate zu untersuchen, eignet sich der Biogassatzreaktortest nach *DIN EN ISO 11734* (VDI 4630, 2004). Abbildung 3 zeigt die Gaserträge von heterotroph gewonnener Biomasse sowie die der phototroph gewonnenen Biomasse vor und nach  $\alpha$ -Tocopherolextraktion. Da der zu erwartende Gasertrag von Glucose, welcher  $600 \text{ mL g}^{-1}$  beträgt, bekannt ist, wurde diese Substanz als Kontrolle für den Prozess eingesetzt. Nach einer Fermentationsdauer von 15 Tagen konnten Gaserträge von  $610 \text{ mL g}^{-1}$  für die heterotroph gewonnene und  $550 \text{ mL g}^{-1}$  für die phototroph gewonnene Biomasse erzielt werden. Nach der Extraktion von  $\alpha$ -Tocopherol mit Methanol durchgeführt wurde, konnte ein Gasertrag von  $480 \text{ mL g}^{-1}$  verzeichnet werden. Die Selektivität der photoautotroph gewonnenen Biomasse, welche bei diesem Ansatz eingesetzt wurde, betrug etwa  $1,2 \text{ mg g}^{-1}$   $\alpha$ -Tocopherol aus Biomasse.



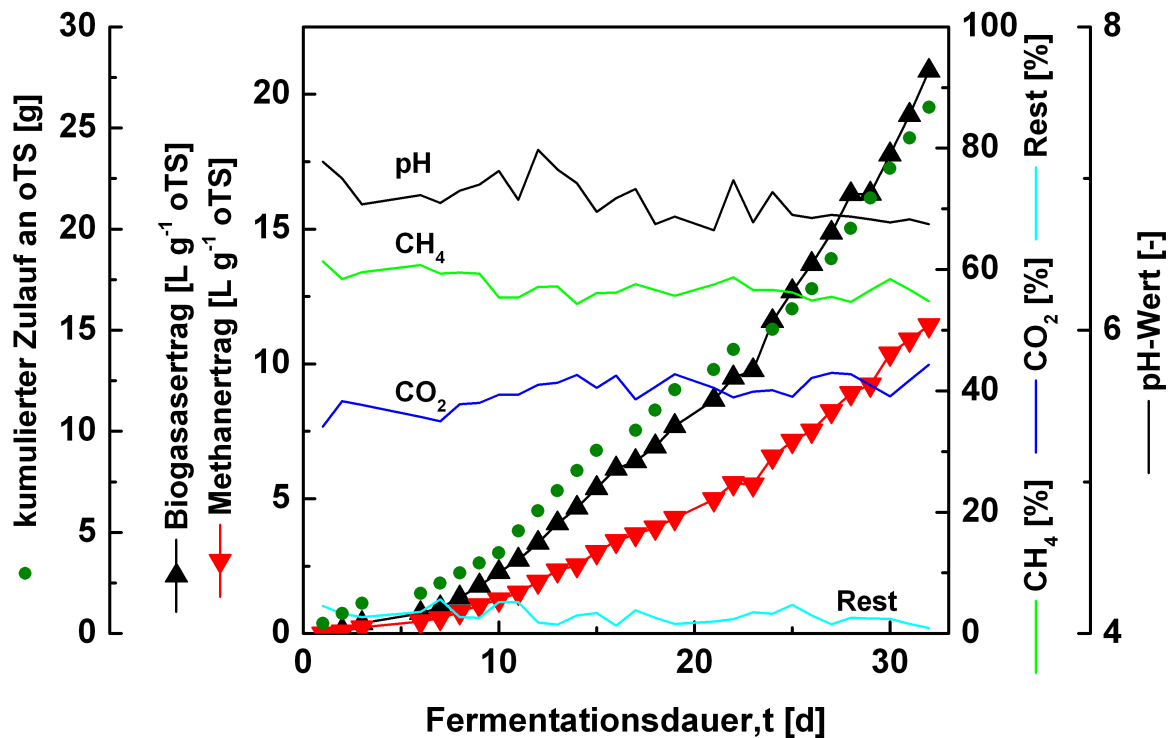
**Abbildung 3:** Entwicklung des Gasertrages mit der Gasvolumenmessung mittels Gasdruckmessgerät nach *DIN EN ISO 11734*. Die eingesetzte Menge an Substrat betrug 500 mg im Bezug auf die Biotrockenmasse zu 60 mL Impfschlamm in 250 mL Satzreaktoren. Die Reaktionstemperatur betrug 39 °C +/- 0,5 °C. oTS = organische Trockensubstanz.

Zur Überprüfung der Vergärbarkeit der *E. gracilis*-Biomasse im kontinuierlichen Betrieb ist eine Biogasanlage mit einem Arbeitsvolumen von 2 L entwickelt worden. Diese Biogasanlage besteht aus zwei baugleichen Rührkesselreaktoren, welche auch separat eingesetzt werden können. Abbildung 4 zeigt eine fotografische Aufnahme eines Reaktors. Jeder Rührkesselreaktor, dessen Korpus aus Glas und die Deckel- sowie die Bodenplatte aus Edelstahl besteht, verfügt über ein Rührwerk, dessen Welle über eine Magnetkupplung mit einem Rührwerksmotor verbunden ist. Über einen Frequenzregler kann die Drehfrequenz eingestellt werden. Als Rührorgan dient ein Propellerrührer, welcher mit einer Frequenz von 200 min<sup>-1</sup> für eine Durchmischung des Reaktorinhaltes sorgt. Das entstandene Biogas wird nahezu drucklos durch einen Rückflusskühler befördert und passiert als trockenes Gas einen Milligascounter<sup>®</sup>, welcher die entstandene Gasmenge aufzeichnet. Jeder Reaktor ist durch Verschraubungen in der Deckelplatte mit Elektroden für den pH-Wert und für das Redox-Potential sowie mit einem Temperaturfühler ausgestattet. Die Beheizung erfolgt über einen 50 W-Heizstab, welcher in der Bodenplatte eingelassen ist. Die Aufnahme der Daten der Elektroden sowie die Steuerung der Heizung erfolgt über ein Dateninterface (*iks aquastar*). Die Daten werden mit dem Programm *DASYLab* visualisiert und aufgezeichnet. Die Probenahme sowie die Zufütterung erfolgt über Stutzen in der Deckelplatte. Die Aufnahme der Daten eines FOS/TAC-Titrators (*FOS/TAC 2000 PRONOVA*) sowie die der Gas- und Schlammzusammensetzung mittels Gaschromatographie (*GC2010 Shimadzu*) erfolgt diskontinuierlich.



**Abbildung 4:** Rührkesselreaktor zur Biomethanherzeugung mit einem Arbeitsvolumen von 2 L. 1. Reaktor, 2. Frequenzregler f. Rührwerk, 3. Rührwerksmotor, 4. Gaszähler (Milligascounter®), 5. Gasleitung mit Rückflusskühler, 6. Elektroden (pH- und Redox) und Temperaturfühler, 7. Heizung, 8. Dateninterface, 9. Stützen für Zufütterung und Probenahme. Nicht abgebildet: FOS/TAC-Titrator, Gaschromatograph.

Abbildung 5 zeigt die Biogasbildung unter Verwendung von heterotroph gewonnener *E. gracilis*-Biomasse mit kontinuierlicher Substratzugabe über einen Zeitraum von 33 Tagen. Die tägliche volumenbezogene Zufütterung an Biotrockenmasse betrug in den ersten 10 Tagen  $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ,  $1 \text{ g L}^{-1}$  für die darauffolgenden 16 Tage und  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  für den weiteren Verlauf des Experiments. Der Versuch war zum Zeitpunkt dieses Berichtes noch nicht abgeschlossen und die Zufütterung soll auf etwa  $4 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  weiter gesteigert werden. Nach 33 Tagen Fermentationsdauer konnte eine Gesamtbio gasmenge von  $20,9 \text{ L L}^{-1}$  Fermentervolumen, bzw.  $11,4 \text{ L L}^{-1}$  Methanbildung verzeichnet werden. Durchschnittlich konnte pro Gramm Biotrockenmasse ein Biogasvolumen von  $616 \text{ mL}$ , bzw.  $352 \text{ mL}$  Methan erzeugt werden. Dies entspricht in etwa der Menge, welche auch im Satzreaktor (s. Abbildung 3) gemessen wurde. Der pH-Wert lag in einem Bereich von  $7,1$  und  $6,6$  und wurde als Indikator für eine Überfütterung der Anlage verwendet. Der durchschnittliche  $\text{CH}_4$ -Anteil des Biogases lag bei  $57,1\%$  mit einem durchschnittlichen  $\text{CO}_2$ -Anteil von  $39,9\%$ . Als Restliche Gase wurde vor allem  $\text{N}_2$  gemessen. Der Anteil an  $\text{H}_2\text{S}$  und  $\text{H}_2$  lag im ppm-Bereich und war unterhalb der Detektionsgrenze.



**Abbildung 5:** Kontinuierliche Biogasproduktion mit heterotroph gewonnener *E. gracilis*-Biomasse bei steigender Zufütterung über einen Zeitraum von 33 d im 2 L Rührkesselreaktor. Die Reaktionstemperatur betrug 37 °C +/- 1 °C. oTS = organische Trockensubstanz.

Um die im Klärschlamm vorhandenen Salze und Spurenelemente als Medienbestandteile nutzbar machen zu können, wurde der Überstand des Klärschlammes, welcher nur mit Thiamin (Vitamin B<sub>1</sub>) und Cyanocobalamin (Vitamin B<sub>12</sub>) supplementiert wurde, als Medium für die photoautotrophe Kultivierung von *E. gracilis* eingesetzt. Während unverdünnter Überstand zu einer Inhibition des Wachstums geführt hat, konnten mit verschiedenen Verdünnungsstufen des Überstands als Medienbestandteil bis zu 3 g L<sup>-1</sup> Biotrockenmasse erreicht werden. Dies entspricht etwa 70% der Biotrockenmasse, welche unter Verwendung eines Minimalmediums bei gleichen Kultivierungsbedingungen zu erwarten ist.

Ein weiteres Produkt, welches mit *E. gracilis* generiert werden kann, ist Paramylon. Dieses  $\beta$ -1,3-Glucan zeigt immunstimulierende Eigenschaften (Brown und Gordon, 2003) und findet in Nahrungsergänzungsmitteln und Kosmetika Verwendung. Ein weiteres mögliches Einsatzgebiet ist die Verwendung von Paramylon als Ausgangsstoff für die Herstellung von biobasierten Kunststoffen (Bäumer, 1998). Je nach Kultivierungsbedingungen variiert der Anteil an Paramylon gewaltig. Während dieses Speicherpolysaccharid bei photoautotropher Kultivierung 5 bis 20% der Biotrockenmasse ausmacht, kann der Gehalt bei heterotropher Kultivierung mit 20 g L<sup>-1</sup> supplementierter Glucose mehr als 70% der Biotrockenmasse betragen. Soll Paramylon als einziges Produkt generiert werden, kann die fermentative Gewinnung strikt heterotroph in einem Minimalmedium erfolgen (Šantek *et al.*, 2009; Šantek *et al.*, 2010; Šantek *et al.*, 2012). Nach Aufreinigung des Produktes steht jedoch nur eine unzureichende Menge an Restbiomasse, welche zudem stark verdünnt ist und ein nachteiliges C/N-Verhältnis aufweist, für die Biomethan-

gewinnung zur Verfügung. Daher eignet sich diese Biomasse eher als Cosubstrat für eine Biogasanlage, welche mit nachwachsenden Rohstoffen wie z.B. Maissilage betrieben wird. Eine weitere Möglichkeit der Nutzung der restlichen Biomasse ist die Verwendung dieser als Medienbestandteil für eine erneute Kultivierung von *E. gracilis*.

## Literatur

- BÄUMER D. (1998): Isolierung und partielle Charakterisierung der Paramylonsynthese aus *Euglena gracilis* (Euglenozoa). Dissertation Universität Bielefeld
- BROWN G.D. UND GORDON S. (2003): Fungal  $\beta$ -glucans and mammalian immunity. In: *Immunity* **19**: 311–315
- CHAE S.R., HWANG E.J. UND SHIN H.S. (2006): Single cell production of *Euglena gracilis* and carbon dioxide fixation in an innovative photo-bioreactor. In: *Bioresource Technology* **97**: 322–329
- FUJITA T., OGBONNA J.C., TANAKA, H. UND AOYAGI H. (2009): Effects of reactive oxygen species on  $\alpha$ -tocopherol production in mitochondria and chloroplasts of *Euglena gracilis*. In: *Journal of Applied Phycology* **21**: 185–191
- GOLUEKE C.G., OSWALD W.J. UND GOTAAS H.B. (1957): Anaerobic Digestion of Algae. In: *Applied Microbiology* **5** (1): 47–55
- GOLUEKE C.G. UND OSWALD W.J. (1959): Biological Conversion of Light Energy to the Chemical Energy of Methane. In: *Applied Microbiology* **7** (4): 219–227
- OGBONNA J.C, TOMIYAMA S. UND TANAKA H. (1999): Heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* Z for efficient production of  $\alpha$ -tocopherol. In: *Journal of Applied Phycology* **10**: 67–74
- OGBONNA J.C., TOMIYAMA S. UND TANAKA H. (1999): Production of  $\alpha$ -tocopherol by sequential heterotrophic–photoautotrophic cultivation of *Euglena gracilis*. In: *Journal of Biotechnology* **70**,: 213–221
- RODRIGUEZ-ZAVALA, J.S., ORTIZ-CRUZ, M.A., MENDOZA-HERNÁNDEZ, G. UND MORENO-SÁNCHEZ, R. (2010): Increased Synthesis of tocopherol, paramylon and tyrosine by *Euglena gracilis* under conditions of high biomass production. In: *Journal of Applied Microbiology* **109**: 2160–2172
- ŠANTEK B., FELSKI M, FRIEHS K., LOTZ M. UND FLASCHEL E (2009): Production of paramylon, a  $\beta$ -1,3-glucan, by heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* on a synthetic medium. In: *Engineering in Life Sciences* **9** (1): 23–28
- ŠANTEK B., FELSKI M, FRIEHS K., LOTZ M. UND FLASCHEL E (2010): Production of paramylon, a  $\beta$ -1,3-glucan, by heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* on potato liquor. In: *Engineering in Life Sciences* **10** (2): 165–170
- ŠANTEK B., FRIEHS K., LOTZ M. UND FLASCHEL E (2012): Production of paramylon, a  $\beta$ -1,3-glucan, by heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* on potato liquor in fed-batch and repeated-batch mode of cultivation. In: *Engineering in Life Sciences* **12** (1): 89–94
- Richtlinie 4630 des VDI (VEREIN DEUTSCHER INGENIEURE, 2004), Vergärung organischer Stoffe, *Beuth Verlag GmbH*
- YEN H.-W. UND BRUNE D.E. (2007): Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. In: *Bioresource Technology* **98** (1): 130–134