

**Vorhabensbezeichnung:**

***New Green Chemistry“ (NGC): Ein neuer Ansatz zur Herstellung von industriellen Rohstoffen als Grundlage für eine nachhaltige Bioökonomie auf der Grundlage neuer umweltgerechter Verfahren***

Förderkennzeichen: **AZ 31579/O1**

Laufzeit des Vorhabens: 1.10.2014 bis 30.09.2016

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren

Institut für Biologie  
Abteilung Pflanzenphysiologie  
Johannisallee 23  
D-04103 Leipzig

Prof. Dr. Christian Wilhelm, Dr. T. Jakob, Dipl. Biol. Anja Günther und M. Sc. Theresa Quaas, BSc  
Deborah Bozzato

## 1. Zielstellung des Vorhabens

In dem Projekt soll mit Hilfe gezielten metabolischen Engineerings der Stoffwechsel in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* so umgestellt werden, dass er für die Glykolatproduktion als biotechnologische Plattform genutzt werden kann. Im Erfolgsfall kann eine neue Technologie entwickelt werden, die mit einer deutlich verbesserten Energiebilanz industrielle Rohstoffe in großem Umfang produziert. Für dieses Ziel ist die Herstellung phototropher Hochleistungsstämme der Mikroalge *Chlamydomonas reinhardtii* zur effizienten Herstellung von Glykolat auf photosynthetischem Wege unverzichtbar. Gegenstand der Förderung ist es daher Stämme herzustellen und die Reaktorbedingungen zu definieren, bei denen eine möglichst hohe Glykolatsyntheseleistung auch unter den Bedingungen des natürlichen Sonnenlichts im Freiland stattfindet. Das im Antrag vorgesehene Lösungskonzept beruht auf dem in der Biotechnologie verbreiteten Prinzip des „metabolic engineering“. Hierbei war es das Ziel zunächst den Glykolatstoffwechsel so zu verändern, dass bei möglichst hoher Photosyntheseleistung der Zellen der assimilierte Kohlenstoff so kontrolliert ausgeschieden wird, dass es nicht mehr zu Biomassebildung kommt und die Zellen nicht mehr wachsen. In einem zweiten Ansatz sollte die CO<sub>2</sub> Assimilationsleistung gesteigert werden, indem das die Photosyntheseleistung begrenzende Enzym, die Ribulose-1,5-bis-Phosphat Carboxylase (RubisCO) durch eine bakterielle Variante ersetzt wird, die eine höhere Carboxilierungsgeschwindigkeit aufweist.

## 2. Darstellung der erzielten wissenschaftlichen Ergebnisse im Vorhaben

Ursprünglich war geplant, sich zunächst auf das metabolic engineering des C-Weges zu konzentrieren und eine Doppelmutante herzustellen, bei der sowohl das Enzym Glykolatdehydrogenase (GYD) als auch der Kohlenstoffkonzentrierungsmechanismus (CCM) ausgeschaltet ist. Die Inaktivierung der GYD ist notwendig um die zellinterne Metabolisierung des Glykolats (C<sub>2</sub>-Weg) zu hemmen. Die Hemmung des CCM ist von zentraler Bedeutung, da die Glykolatbildung nur dann stattfindet, wenn an dem Enzym RubisCO das Verhältnis von CO<sub>2</sub> zu O<sub>2</sub> so eingestellt ist, dass statistisch pro enzymatischem Zyklus zweimal carboxiliert und nur einmal oxigeniert wird. Diese Stöchiometrie kann man aber durch externe Gassteuerung nur einstellen, wenn die Zellen nicht aktiv CO<sub>2</sub> in die Zellen transportieren und in der Umgebung der RubisCO anreichern. Das metabolische Engineering ist notwendig, da man zwar wie in Abb. 1. Dargestellt, die Glykolatexkretion durch einen bekannten Hemmstoff des C<sub>2</sub>-Wegs, Isoniazid, sehr stark befördern kann, allerdings sterben die Zellen unter diesem Hemmstoff ab, wie im unteren Teil der Abbildung zu sehen ist.

Hinzu kommt, dass unter Isoniazid der Kohlenstoff des exkretierten Glykolats offenbar nicht aus der Photosynthese stammt, sondern aus den C-Vorräten der Zelle gespeist wird, da die Zellen innerhalb von wenigen Stunden über 50% ihres Zellgewichts verlieren (siehe Abb 2). Daher war es unabdingbar Mutanten zu erzeugen, die auch ohne Hemmstoff Glykolat exkretieren. In einem Vorprojekt wurden verschiedene Mutanten generiert. In einem Ansatz wurde die GYD mittels RNAi inaktiviert während in einem zweiten Ansatz der CCM dadurch

gehemmt wurde, dass die plastidäre Carboanhydraseaktivität ausgeschaltet wurde. Das Ergebnis ist in Abb. 3 dargestellt.

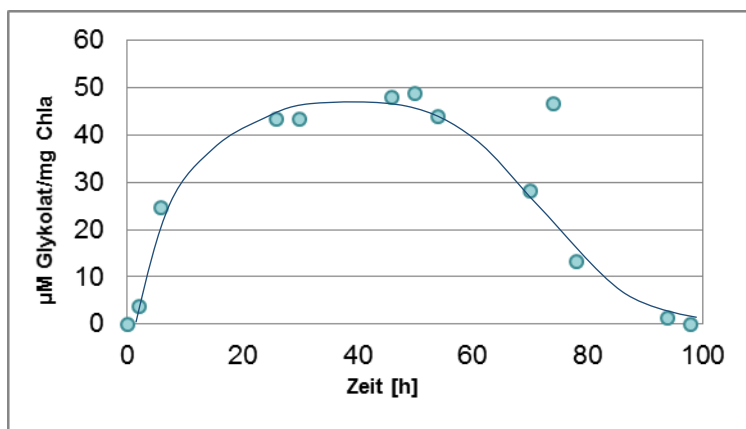
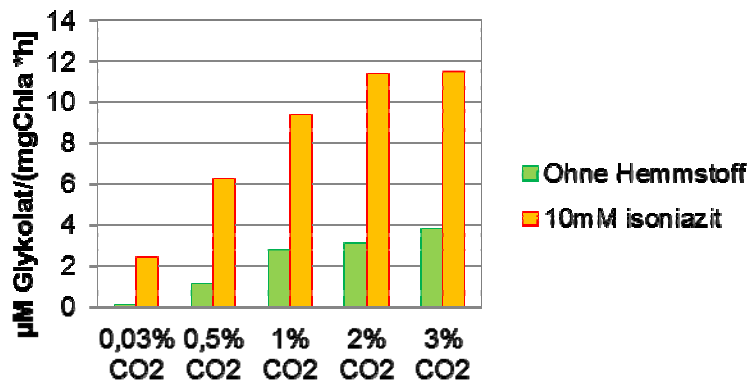


Abb. 1: Steigerung der Glykolatexkretion bei 40% Sauerstoff in der Zuluft bei unterschiedlichen CO<sub>2</sub>-Beimischungen. Man erkennt, dass bei einem O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> Verhältnis von 4:1 etwa 2-3 µmol Glykolat pro mg Chl und Stunde gebildet werden, die mittels Isoniazid auf 10-12 µmol Glykolat/mg Chl h gesteigert werden können. Im unteren Teil der Abbildung ist die Glykolatakkumulation bei 40% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> dargestellt.

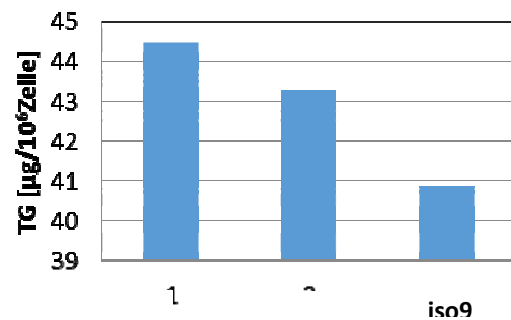
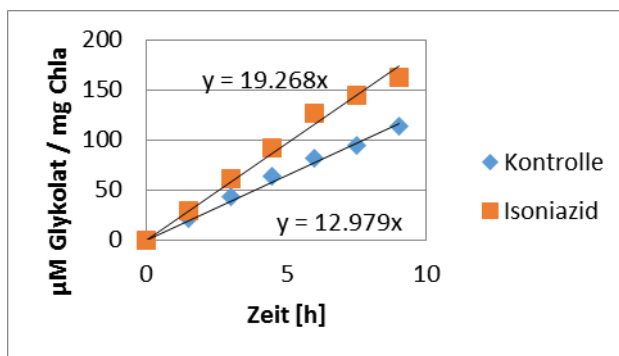
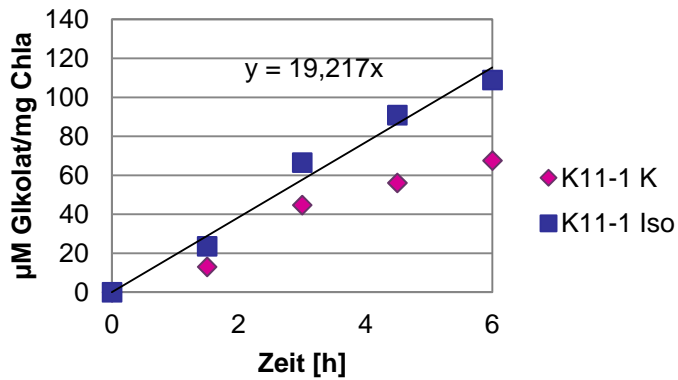


Abb.2: Glykolatbildung einer GYD Mutante unter Isoniazid (links) und Veränderung des Zelltrockengewichts nach 9 Stunden.



A

Abb.3: Glykolatbildung einer GYD Mutante unter Isoniazid-freien Bedingungen und unter dem Einfluss des Hemmstoffs.

Man erkennt, dass die Mutante K11-1K zu Beginn die gleiche Glykolatrate (Anstieg der Geraden) zeigt, wie die Isoniazid behandelte Kultur, nach 3 Stunden die Exkretion aber geringer wird, da der CCM aktiviert wird. Dies wird bei einer CCM Mutanten nicht beobachtet. Hier bleibt der Anstieg konstant, aber es werden nicht die Raten erreicht, wie unter Isoniazid.

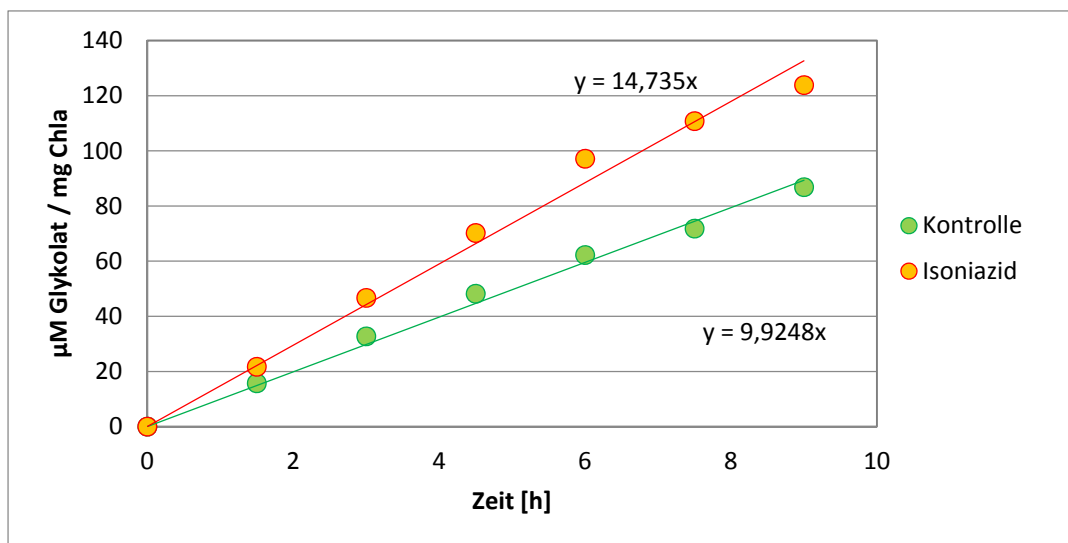


Abb.4 Glykolatbildung einer CCM Mutante unter Isoniazid-freien Bedingungen und unter dem Einfluss des Hemmstoffs.

Die generierten Mutanten zeigten aber überraschenderweise unter optimalen Bedingungen eine gegenüber dem Wildtyp von *Chlamydomonas* verminderte Photosyntheseleistung. Aus der Steigung der Geraden konnten immer nur Glykolatexkretionsraten von 10-15 µmol /mg Chl und h erreicht werden. Diese Werte sind für eine neue technologische Plattform viel zu klein, wie nachfolgende Berechnung zeigt.

Physiologisch voll aktive Chlamydomonaszellen bilden bei Lichtsättigung etwa 250-300 µmol Sauerstoff/ mg Chl\* h. Das entspricht etwa 1000-1200 µmol Elektronen mg Chl\* h. Für die Assimilation eines CO<sub>2</sub> Moleküls werden 4 Elektronen verbraucht. Da für die Neubildung von Glykolat zwei CO<sub>2</sub>-Moleküle notwendig sind, kann man theoretisch 150µmol Glykolat/mg

Chl\* h erzeugen. Offenbar nutzen die Mutanten nur ca. 10% des Assimilationspotentials aus. Es war daher nicht sinnvoll auf der Grundlage dieser Mutanten, Doppelmutanten herzustellen.

In dieser Situation haben wir zunächst nach weiteren Hemmstoffen gesucht, die so spezifisch wirken, dass wir den Ursachen der geringen Glykolatexkretion auf den Grund gehen können. Wir setzen dazu folgende Hemmstoffe ein:

- EZA: Ethoxyolamin als Inhibitor aller Carboanhydrasen
- AOA: Sminooxyacetat als Inhibitor der Glyoxylat-Serin-Aminotransferase (C2 Weg)
- SHAM: Salicylhydroxymic Acid als Hemmstoff der GDH

Dabei machten wir folgende Entdeckung: Die Hemmstoffe des C2 Weges verbessern die Glykolatexkretion signifikant, aber vergleichsweise nur geringfügig im Vergleich zur vollständigen Inaktivierung des CCM mittels EZA. (Ethoxyolamid). Die Wirkung ist in Abb. 5 dargestellt.

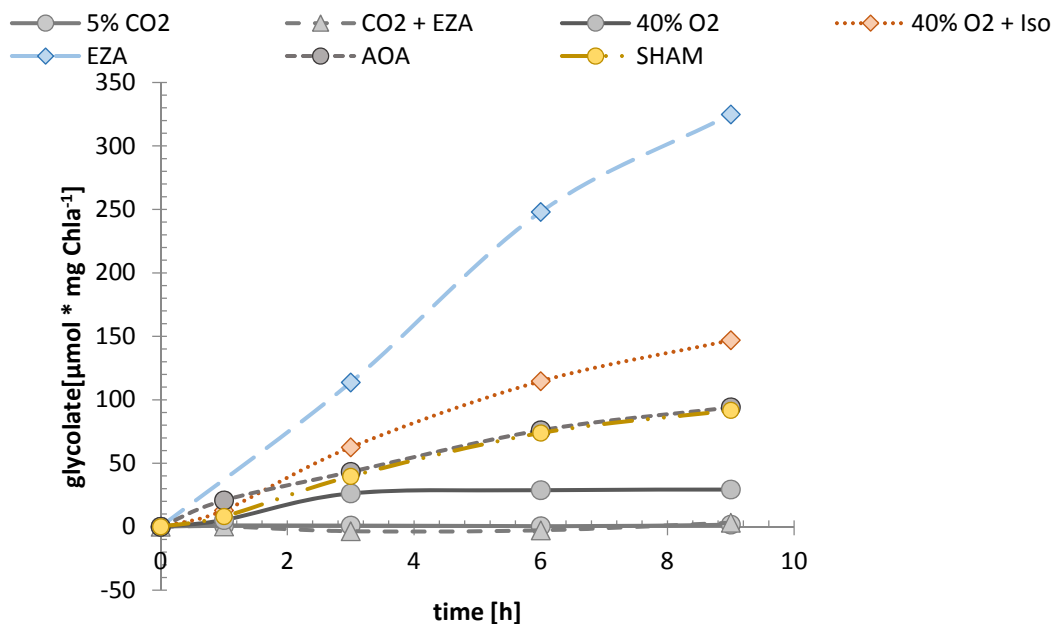


Abb. 5: Glykolatbildung des Wildtyps von *Chlamydomonas reinhardtii* unter Einsatz verschiedener Hemmstoffe. EZA: Ethoxyolamin als Inhibitor aller Carboanhydrasen, AOA: Sminooxyacetat als Inhibitor der Glyoxylat-Serin-Aminotransferase (C2 Weg), SHAM: Salicylhydroxymic Acid als Hemmstoff der GDH

Vergleicht man die Glykolatbildungsraten unter den verschiedenen Bedingungen ist klar zu erkennen, dass in der Wildform unter EZA die höchsten Werte erreicht werden und kaum noch Biomasseneubildung erfolgt. Es wird unter EZA nur noch ca. 10% der photosynthetischen Elektronen für die Biomassensynthese genutzt.

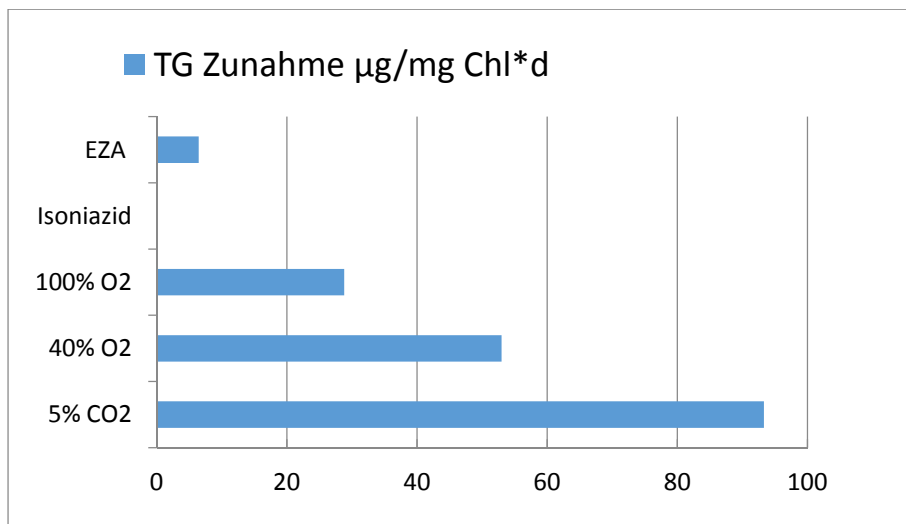
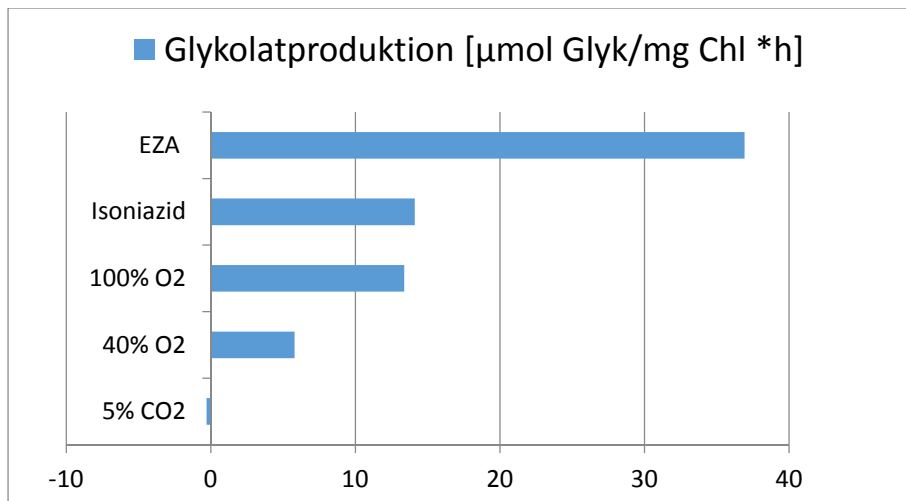


Abb.6: Glykolatbildungsrate des Wildtyps von *Chlamydomonas reinhardtii* unter Einsatz der Hemmstoffe Isoniazid, EZA: Ethoxyolamin und verschiedenen Begasungsbedingungen.

Besonders erfreulich an diesem Ergebnis ist, dass unter EZA die Glykokolatexkretion über längere Zeit anhält und nicht die Photosynthese hemmt. Daher beobachtet man ein inverses Verhältnis von Biomassebildung und Glykolatbildungsrate (Abb 6).

Daraufhin haben wir untersucht, ob durch den Hemmstoff EZA in den Mutanten die Glykolatbildung weiter gesteigert werden kann, und ob sich eine Temperaturerhöhung positiv auf die Glykolatsynthese auswirkt. Das Ergebnis ist in Abb. 7 dargestellt. Zu unserer Überraschung liefern die Mutanten bei Anwesenheit von EZA nicht mehr Glykolat als die Wildform, während die Temperaturerhöhung drastisch die Glykolatbildungsrate steigert. Bei 30 °C erreicht die Wildform Glykolatbildungsraten von ca. 90  $\mu\text{mol Glykolat/mg Chl} \cdot \text{h}$  und erreicht damit ca 60% des theoretischen Maximums. Berücksichtigt man, dass dabei die Zellen auch noch etwas Biomasse bilden, kann man feststellen, dass die Wildform unter EZA und 30 °C bei einer Gaszusammensetzung von 40% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> und nahezu drei Viertel des fixierten Kohlenstoffs ausscheidet. Eine weitere Optimierung auf dem Weg des genetic Engineering war daher nicht angezeigt. Stattdessen ist im Laufe des Vorhabens geplant, die Glykokolatexkretion im Wildstamm unter EZA unter freilandähnlichen Bedingungen zu

testen, in dem man einen natürlichen Tagesgang hinsichtlich Licht- und Temperaturverteilung im Reaktor realisiert und dann die Tagesproduktion pro Fläche und Tag unter freilandähnlichen Bedingungen abschätzen kann. Dabei wird auch zu untersuchen sein, ob und wie lange EZA eingesetzt werden kann.

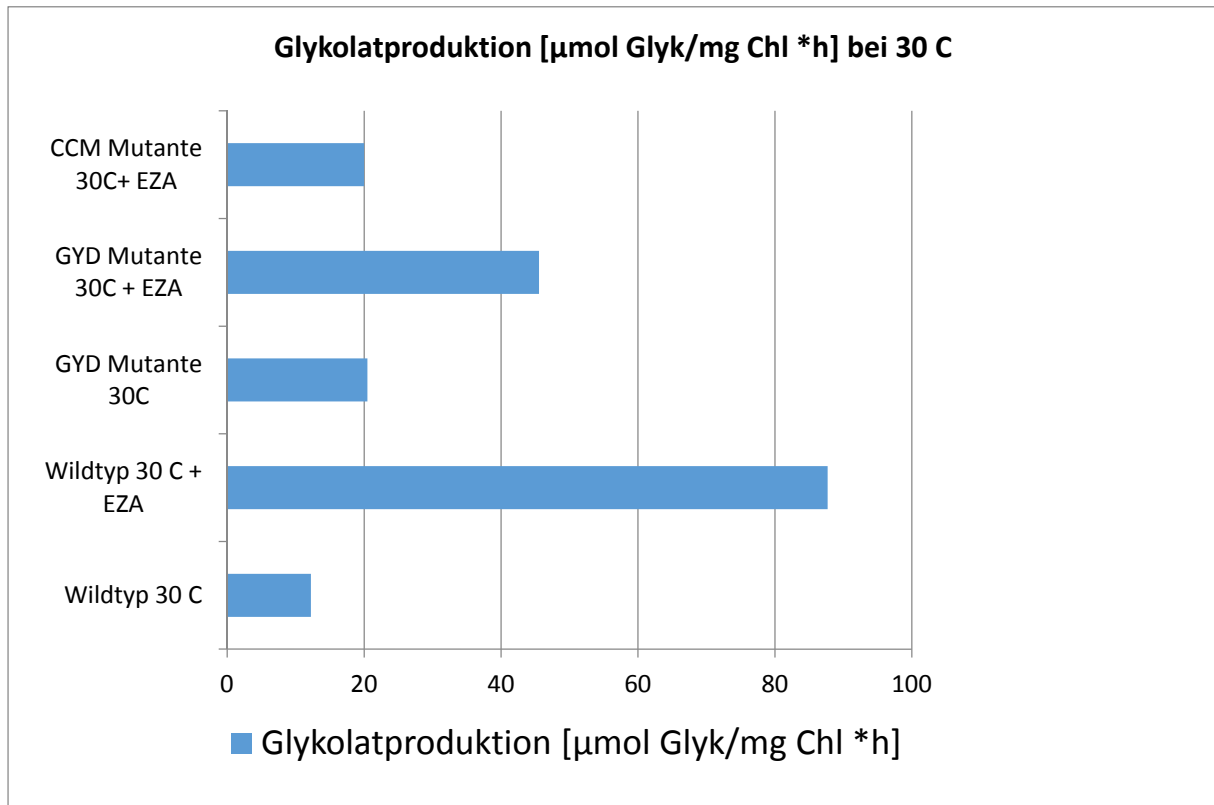


Abb.7: Glykolatbildungsrate des Wildtyps und zweier Mutanten von *Chlamydomonas reinhardtii* unter Einsatz des Hemmstoffes EZA ( Ethoxyolamin) bei 30 °C.

### 3. Maximierung der Photosynthesekapazität mittels RubisCO Typ II (siehe Punkt 3 im Antrag)

#### 3.1 Vorgehen

Wir sind dabei so vorgegangen wie es im Antrag beschrieben wurde. Da das neu zu exprimierende Gen RubisCO Typ II nur physiologisch aktiv sein kann, wenn das Protein auch in den Chloroplasten transferiert wird, haben wir zunächst auf ein Testsystem für den erfolgreichen Import des Zielgens in den Chloroplasten mit dem Fluoreszenzprotein Kusabira Orange zurückgegriffen. Der verwendete Transformationsvektor ist in Abb. 8 dargestellt.



Abb. 8: Der Transformationsvektor pAG\_Ble\_rbcS2\_mKO zum Einbringen des Fluoreszenzproteins Kusabira-Orange in *C. reinhardtii*.

Die erfolgreiche Transformation der Zellen kann auf mehreren Ebenen nachgewiesen werden. Erstens überleben nur transformierte Zellen den Selektionsagar mit Zeosin. Danach werden grüne Spots gepickt und in Suspensionskultur angezogen, um sie dann fluoreszenzspektroskopisch zu untersuchen.

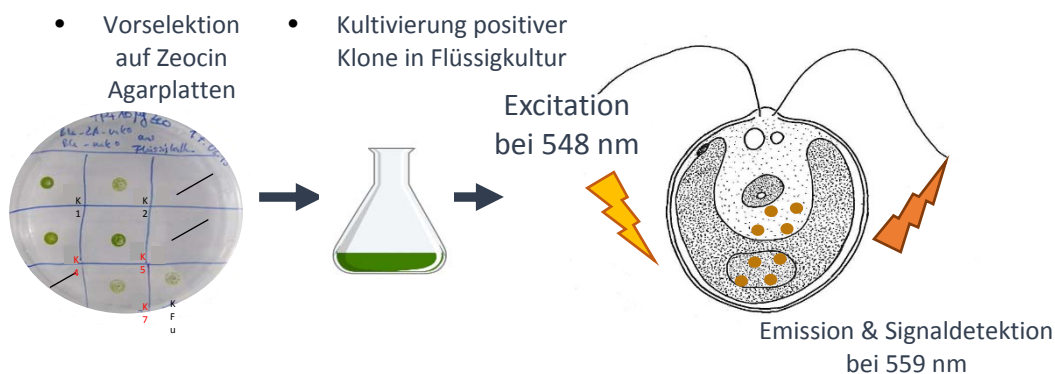


Abb. 9: Der Transformationsnachweis des Vektors pAG\_Ble\_rbcS2\_mKO zum Einbringen des Fluoreszenzproteins Kusabira-Orange in *C. reinhardtii*.

Der Vorteil von Kusabira-Orange ist dabei, dass sowohl die Anregung als auch die Emissionswellenlänge in der Grünlichte der Zellabsorption liegt, also bei Wellenlängen, bei denen die Photosynthesepigmente (Chlorophylle und Carotinoide) nur minimal absorbieren und so die Messung wenig stören.

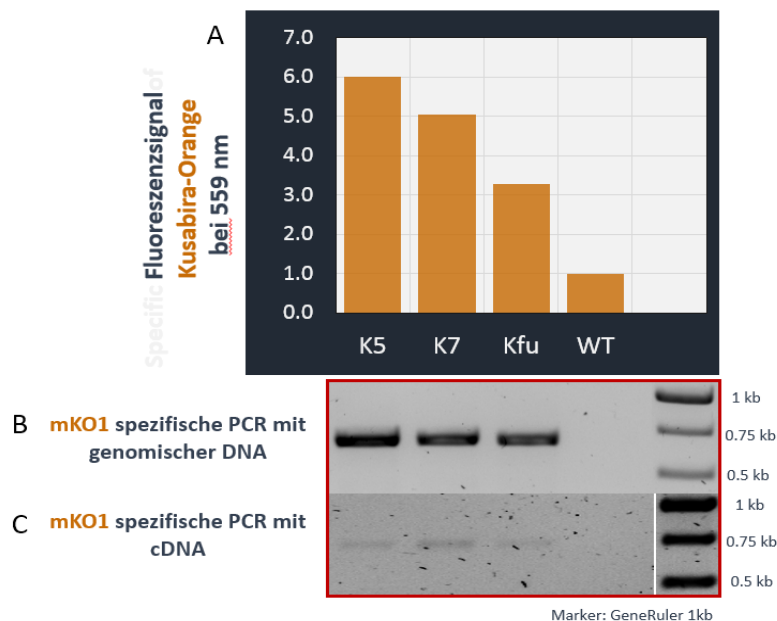


Abb. 10: Nachweis der Expression des Fluoreszenzproteins Kusabira Orange in *C. reinhardtii* Stamm auf funktioneller Ebene über fluoreszenzbasierte Spektroskopie (A) und auf genomischer und translatorischer Ebene (B, C).



Abbildung 10 zeigt das Ergebnis der Transformation auf der DNA-Ebene (B) auf der mRNA Ebene (C) und auf der Proteinebene über den Nachweis der Proteinfluoreszenz von Kusabira-Orange (A)

Im nächsten Schritt erfolgt mittels Überlagerung der Autofluoreszenz aus dem Chloroplasten mit der Fluoreszenz von Kusabira-Orange der Nachweis, dass das Protein im Chloroplasten lokalisiert wurde. Man erkennt in Abb. 10, dass bei der K7 Mutante, die Kusabira Fluoreszenz eindeutig mit der roten Autofluoreszenz, die aus dem Chlorophyll stammt, überlagert ist, während diese Überlagerung im Wildtyp nicht zu sehen ist. Hier erkennt man nur die rote Autofluoreszenz.

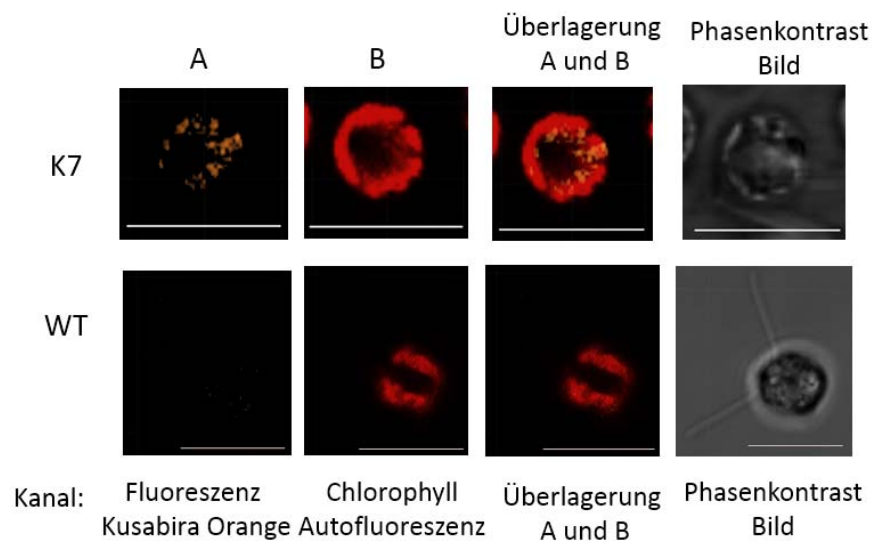


Abb. 10: Nachweis des Chloroplastenimports von Kusabira Orange mittels Fluoreszenzspektroskopie der Mutante K7 im Vergleich zum Wildtypen.

Damit war nachgewiesen, dass die gewählte Transformationsstrategie auch für das Einbringen der bakteriellen RubisCO Typ II geeignet ist.

### 3.2. Einbringung der bakteriellen RubisCO Typ II in *C. reinhardtii*.

Der verwendete *C. reinhardtii* Grundstamm für die RubisCO Typ II Expression ist der Stamm CC-2653 (18-7G) und wurde von der Algensammlung Chlamydomonas Resource Centre bezogen und besitzt keine native RubisCO Typ I. Dieser Stamm wurde ausgewählt, weil hier das Screening der transgenen Zellen auf funktioneller Ebene besonders einfach ist. Die Zellen besitzen keine funktionelle RubisCO und können daher keine CO<sub>2</sub>-Assimilation betreiben. Sie können nur im Dunkeln heterotroph auf Acetatbasis kultiviert werden. Im Licht bleichen die Zellen aus, da sie die aus den Lichtreaktionen stammenden Reduktions- und Energieäquivalente nicht verbrauchen können. Die Zellen kommen daher im Licht in einen Zustand extremer Photoinhibition, bei der dann reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden, die dann die Zellen ausbleichen und schließlich zum Absterben bringen. Ein erfolgreicher

Einbau einer funktionellen RubiCO wird daran erkennbar, dass die Zellen auch im Licht überleben.

Zur Herstellung der transgenen Linie wurde der in Abb. 11 dargestellte Vektor konstruiert und für die Transformation eingesetzt.



Abb. 11: Finaler Transformationsvektor für die Expression der RubisCO Typ II in *C. reinhardtii*.

Nach der Selektion konnten mehrere grüne Zellen identifiziert und molekular charakterisiert werden. Dies erfolgte zunächst auf der DNA Ebene, um zu zeigen, dass ein Gen einer entsprechenden Größe mittels PCR nachgewiesen werden kann (Abb 12A). In den ersten fünf Bahnen sind transgene Klone nach der Transformation dargestellt. Sie alle zeigen, dass sich mittels PCR RubisCO Typ II spezifische Banden der erwarteten Größe nachweisen lassen. Diese Bande fehlt sowohl in der Wildform als auch in der nicht-transformierten Mutante. Im unteren Teil der Abbildung ist der Nachweis auf mRNA Ebene geführt und bestätigt, dass die inserierte Fremd-DNA auch in mRNA umgesetzt wird.

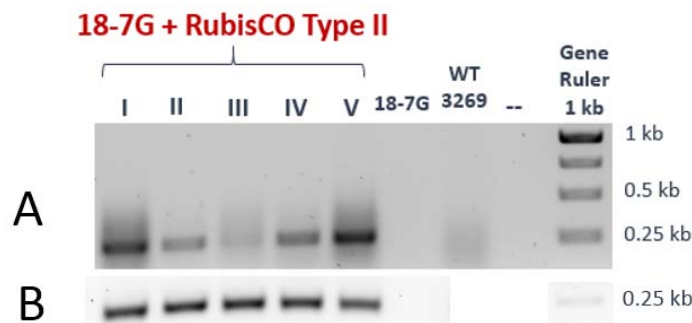


Abb. 12: Nachweis der Insertion des Gens der RubisCO Typ II (*rbcM*) im Genom von *C. reinhardtii* mittels spezifischer PCR (A) und Nachweis der Expression auf mRNA Ebene (B).

Im nächsten Schritt wurde nachgewiesen, dass die mRNA auch in Protein übersetzt wird (Abb 13). Dazu war es notwendig einen spezifischen Antikörper gegen eine Untereinheit der RubisCO Typ II und einen anderen spezifischen Antikörper gegen eine Untereinheit der RubisCO Typ I zur Verfügung zu haben. In Abb. 13 ist im oberen Abschnitt die Antikörperreaktion des Proteinextraktes gegen RubisCO Typ II (A) und im unteren Teil gegen RubisCO Typ I gezeigt. Auf der rechten Seite sieht man, dass die Wildform nur Typ I enthält, während der Mutante 18-7G beide Proteine fehlen. Dagegen zeigen die transgenen Klone nur die Expression des Typ II Proteins und nicht des Typ I Proteins. Damit ist der Nachweis erbracht, dass es gelungen ist, in der Mutante die RubisCO Typ II zu exprimieren.

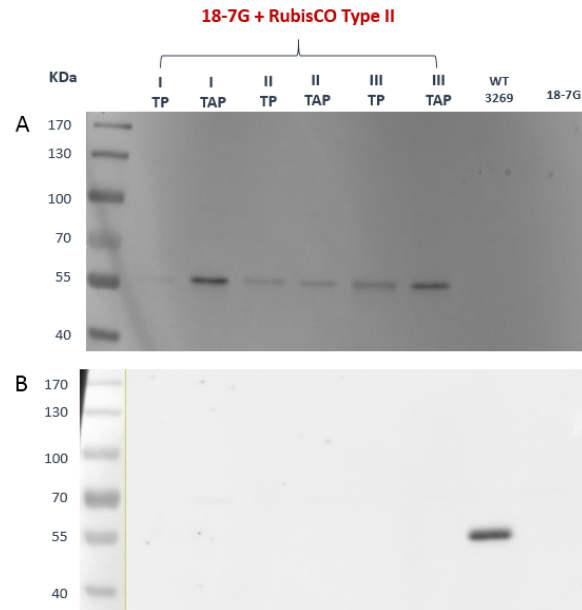


Abb. 13: Nachweis der erfolgreichen Expression der RubisCO Typ II in *C. reinhardtii* ohne native RubisCO Typ I (18-7G) für die Mutanten I bis III mit einem spezifischen Antikörper gegen die große Untereinheit der RubisCO Typ II (ca. 57 kDa) (A). Und der Nachweis, dass in den Mutanten keine RubisCO Typ I exprimiert wird mit einem spezifischen Antikörper gegen die große Untereinheit der RubisCO Typ I (ca. 57 kDa) (B).

#### 4. Physiologische Charakterisierung der Mutanten

Im letzten Schritt wurde dann in einem physiologischen Leistungstest untersucht, ob das neu exprimierte RubisCO Typ II Protein auch tatsächlich die Assimilationsleistung steigert. Dafür muss sichergestellt sein, dass die Geninsertion keine unspezifischen Nebeneffekte induziert hat, die die Leistungsfähigkeit der Zellen beeinträchtigen. Der für die Mutagenese verwendete *C. reinhardtii* Grundstamm CC-2653 (18-7G) zeigte in seiner Grundform (ohne native RubisCO Typ I) ein sehr schlechtes Wachstum unter hohen Lichtbedingungen auf und auch die erzeugten RubisCO Typ II Mutanten die aus diesem Stamm hervorgehen, wiesen ein schlechtes Wachstumsverhalten auf. Zur Kontrolle wurde die Transformation auch mit dem zugrunde liegenden Wildtypen Stamm CC-3269 durchgeführt. Diese Transformation war ebenfalls auf Insertions-, Expressions- und Proteinebene erfolgreich und die Mutanten in ihrem Wachstumsverhalten stabiler, weshalb sie für die physiologische Charakterisierung genutzt wurden. Allerdings muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass diese Mutanten zusätzlich zu der neu exprimierten RubisCO Typ II auch noch die native RubisCO Typ I besitzen. Dennoch sollte sich die Expression zweier unterschiedlicher RubisCO's mit variierenden  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  Affinitäten positiv auf eine zu steigende Glykolatexkretion auswirken. Die im Folgenden gezeigten Daten beziehen sich auf diese RubisCO Doppelmutanten. Um mit den erzeugten RubisCO Mutanten in einem Reaktor unter natürlichen Lichtbedingungen tatsächlich mehr Glykolat bilden zu können, müssen drei Voraussetzungen erfüllt sein.

##### 4.1 Vergleich Lichtsammlung Mutanten versus Wildtyp

Mutanten müssen ähnlich effizient wie die Wildtypzellen das Licht sammeln können. Nur dann kann man mit gleicher Algenbiomasse auf einem Biofilm auch die gleiche Lichtmenge

absorbieren. Als Maß für die Lichtabsorption wird oft nur der Chlorophyllgehalt benutzt. Für die Produktionsbedingungen in einem Photobioreaktor ist jedoch die absolute Menge an absorbierten Photonen pro Zelle und Zeit ( $Q_{phar}$ ) entscheidend. Wir haben daher das  $Q_{phar}$  unter realistischen Lichtbedingungen von Mutanten und vom Wildtyp verglichen.

In Abb. 13 ist die Lichtaufnahme der Mutanten und des Wildtyps in Abhängigkeit von der eingestrahlten Lichtintensität dargestellt. Die Steigung der resultierenden Geraden ist ein absolutes Maß für die Effizienz der Lichtabsorption. Man erkennt, dass die Mutanten nicht in ihrer Lichtabsorption verändert sind. Das bedeutet, dass die Lichtbedingungen im Reaktor problemlos vom Wildtyp auf die Mutanten übertragen werden können. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen wurden ca. 50% des eingestrahlten Lichts aufgenommen. Durch eine Erhöhung der Biomasse im Reaktor kann die absorbierte Lichtmenge leicht auf Totalabsorption erhöht werden.

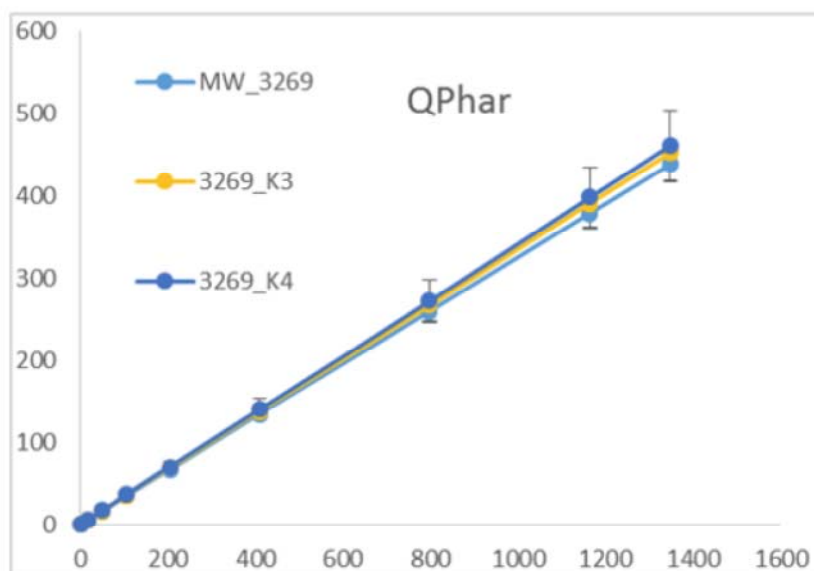


Abb. 14: Abhängigkeit von  $Q_{phar}$  ( $\mu\text{mol photons/m}^2 \text{ sec}$ ) gegen die eingestrahlte Lichtintensität ( $\mu\text{mol photons/m}^2 \text{ sec}$ ) bei einer Schichtdicke von 2 cm und einem Chlorophyllgehalt von 5mg Chl/L.

#### 4.2 Vergleich Photosyntheseleistung Mutanten versus Wildtyp

Der Austausch des Carboxilierungsenzyms RubisCO Typ I gegen Typ II sollte im optimalen Fall die ursprünglich defekten Mutanten wieder „reparieren“. Wie oben bereits beschrieben, war das Wachstum der Stämme die nur RubisCO Typ II exprimieren so gering, dass die ersten Experimente mit den RubisCO Doppelmutanten durchgeführt wurden, die ein gutes Wachstum zeigten. Unter Bedingungen, bei denen die RubisCO nicht die limitierende Stelle im Photosyntheseapparat darstellt, sollte die Photosyntheseleistung der Doppelmutanten dem Wildtyp entsprechen. Die höhere Leistung sollte sich erst dann zeigen, wenn das Carboxilierungsenzym limitierend wirkt, also z.B. unter photorespiratorischen Bedingungen der Glykolatproduktion. Zweitens sollen die Zellen mit RubisCO Typ II zusätzlich zu RubisCO Typ I gegenüber dem Wildtyp empfindlicher gegenüber photorespiratorischen Bedingungen reagieren.

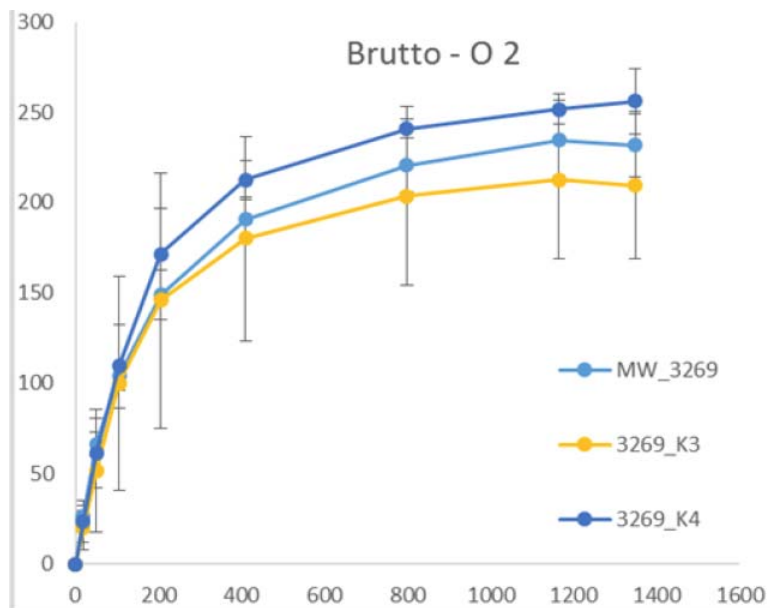


Abb. 15: Lichtsättigungskurve aufgetragen als Sauerstoffentwicklung (O<sub>2</sub>/mg Chl h) gegen die Lichtintensität (μmol photonen/m<sup>2</sup> sec).

Man erkennt, dass der lineare Anstieg bei allen drei Zellvarianten gleich ist. Im Bereich der Lichtsättigung liegt die Mutante 3269\_K4 leicht über dem Wildtyp, während die zweite Mutante 3269\_K3 eine leicht geringere gesättigte Photosyntheserate zeigt. Die Ergebnisse bestätigen die Erwartungen und zeigen, dass der experimentelle Ansatz erfolgreich war.

#### 4.3 Vergleich Glykolatexkretion der Mutanten versus Wildtyp in Abwesenheit von EZA

Die Glykolatexkretion sollte bei den Mutanten ohne den Hemmstoff EZA stark gesteigert sein, weil die RubisCO Typ II deutlich empfindlicher auf photorespiratorische Bedingungen reagiert. Dies kann tatsächlich beobachtet werden. Dies ist exemplarisch an der Mutante 3269\_K2 in Abb. 16 gezeigt.

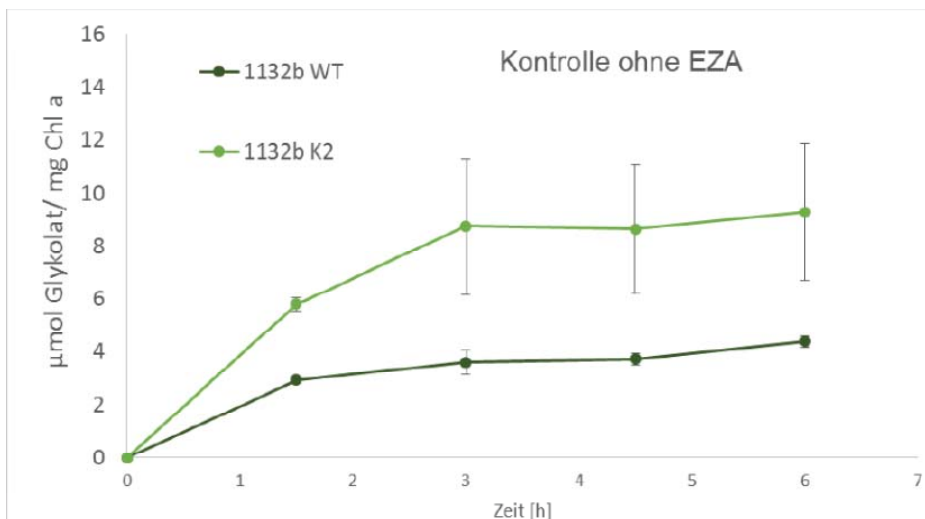


Abb. 16: Glykolatexkretion nach Überführung unter photorespiratorische Bedingungen bei Wildtyp und 1132b\_K2 Mutante.

In Abb. 17. sind die Unterschiede in der Glykolatbildung zwischen Wildtyp und Mutanten im Vergleich ohne EZA dargestellt. Man erkennt, dass in der Mutante 3269 K3 gegenüber dem Wildtyp die Glykolatbildung nach 6 Stunden photorespiratorischer Beleuchtung um das Siebenfache gesteigert wurde. Bei der Mutante 3269 K4 beträgt die Erhöhung nur das 2,5 Fache. Die gleiche Steigerung konnte in der Mutante des Wildtyps 1132b erreicht werden. Diese Daten belegen klar, dass das Konzept, durch Austausch des RubisCO-Enzyms die Glykolatproduktion zu steigern, erfolgreich war und weiter optimiert werden kann. Im Vorhaben konnte aus Zeitgründen nicht untersucht werden, ob das für die Glykolatexkretion bei dem Wildtyp optimierte O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-Verhältnis auch für die RubisCO Typ II Mutanten optimal ist. Da die RubisCO Typ II eine geringere Affinität zu CO<sub>2</sub> und eine höhere zu O<sub>2</sub> hat, sollte sich die Glykolatbildung durch Verminderung des O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-Verhältnis steigern lassen. Auch die weitere Charakterisierung und das finden optimaler Anzuchtbedingungen der RubisCO Typ II Mutanten im Stamm CC-2653 (18-7G) konnte aus Zeitgründen nicht abgeschlossen werden.

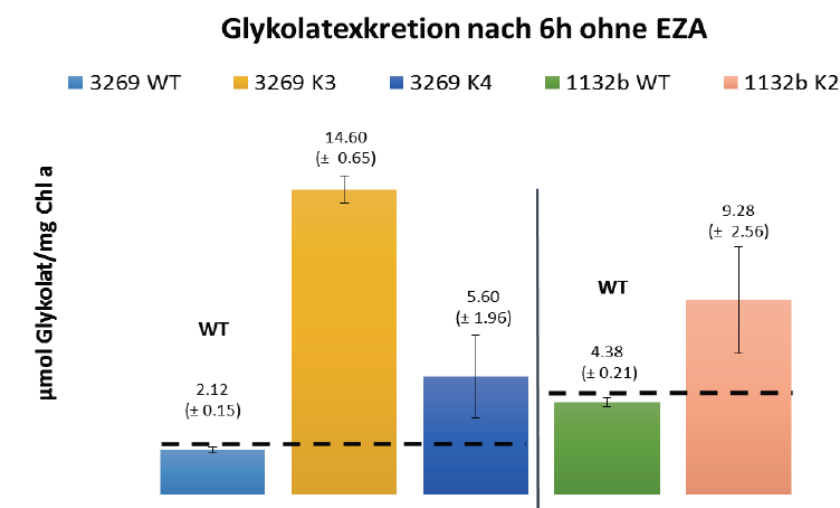


Abb. 17: Glykolatexkretion nach 6 h photorespiratorischer Belichtung bei den beiden im Vorhaben verwendeten Wildtypen und den erzeugten Mutanten.

#### 4.4 Vergleich Glykolatexkretion der Mutanten versus Wildtyp in Anwesenheit von EZA

Unter EZA erreicht man die maximale Glykolatexkretion, weil sowohl die Glykolatmetabolisierung als auch die interne CO<sub>2</sub>-Anreicherung, die die Glykolatbildung hemmt, unterdrückt sind. Man erkennt in Abb. 18, dass die Mutanten eine leicht höhere Glykolatbildung vorweisen können. Der geringe Unterschied begründet sich aus den Kulturbedingungen. Die Zellen mussten zunächst unter Bedingungen kultiviert werden, unter denen Biomasse aufgebaut wird, um überhaupt messbares Material zur Verfügung zu haben. Hohe Glykolatexkretion ergibt sich aber erst, wenn die Zellen einige Tage unter photorespiratorischen Bedingungen gehalten werden. Die Steigerung der Glykolatexkretion durch den Zusatz der RubisCO Typ II zu Typ I ist signifikant und beträgt ca. 20% im Kurzzeitexperiment nach 6 Stunden.

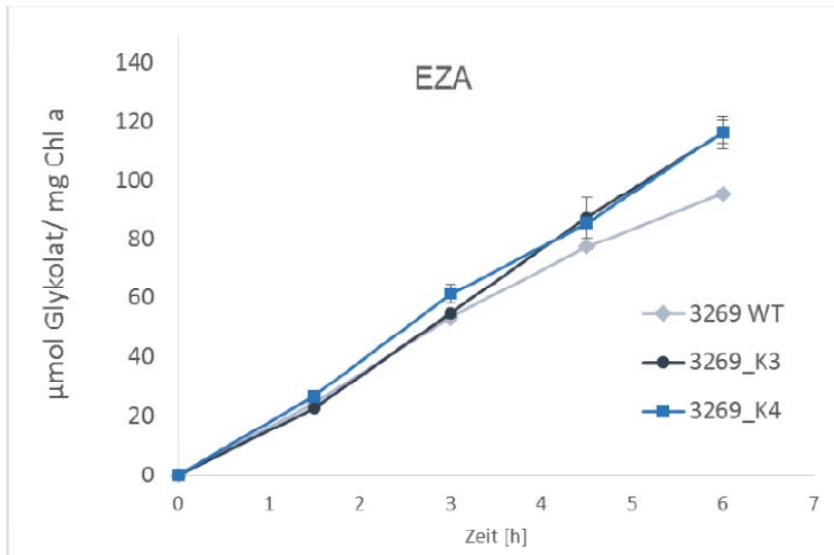


Abb. 18: Verlauf der Glykolatexkretion während einer 6-stündigen photorespiratorischer Belichtung bei dem Wildtyp 3269 und den beiden erzeugten RubisCO-Mutanten

Erwartungsgemäß sind die Exkretionsraten unter EZA etwa um den Faktor 10 erhöht im Vergleich zum EZA-freien Betrieb. Die Steigerung der Glykolatproduktion durch die RubisCO-Mutation ist zwar signifikant aber deutlich kleiner und liegt bei etwa 20%. Damit ist aber ein Steigerungspotential erkennbar, wenn die Zellen an den permanenten C-Verlust angepasst sind und sowohl die Temperatur als auch die Gaszusammensetzung optimiert ist.

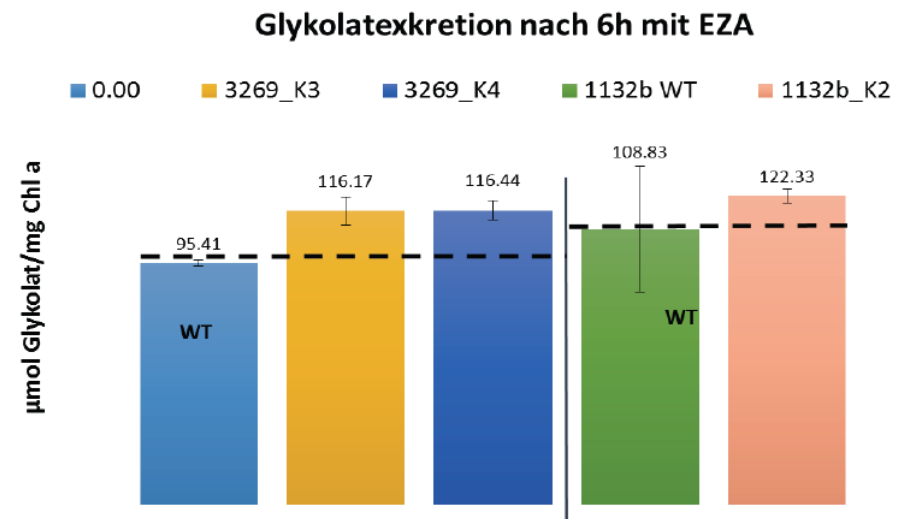


Abb. 19: Verlauf der Glykolatexkretion während einer 6-stündigen photorespiratorischer Belichtung bei dem Wildtyp 3269 und den beiden erzeugten RubisCO-Mutanten

#### 4.5 Leistungsverbesserung durch RubisCO Typ II Mutanten

Die Ergebnisse zeigen klar, dass das angestrebte Ergebnis eine verbesserte Glykolatexkretion durch Enzymengineering möglich ist. Wie hoch die Leistungsverbesserung sein wird, wenn die Algen unter

Freilandbedingungen kultiviert werden lässt sich zur Zeit noch nicht durch experimentell belegte Zahlen validieren. Dazu reichte die Zeit im Förderzeitraum nicht aus. Wir haben aber aus Experimenten mit EZA-behandelten Wildtypzellen zeigen können, dass

- Natürliche Umweltbedingungen wie Licht-Dunkel-Wechsel und eine Erhöhung der Temperatur am Tag und eine Absenkung in der Nacht zu Akklimatisierungserscheinungen der Zelle führt, die zu einer drastischen Steigerung der Glykolatexkretion führt.
- Dabei die Biomasse im Reaktor konstant bleibt und die Zellen nicht wachsen
- Damit die Glykolatexkretion der C-assimilationsrate entspricht.

Mit diesen Angaben lässt sich nun mit verschiedenen Annahmen die C-Assimilation pro Fläche und Zeit modellieren und so mit der Assimilation von Mais oder Biomasse produzierenden Algen vergleichen. Wir haben dabei folgenden Annahmen gemacht:

- Es sind 400 mg Chlorophyll pro  $m^2$  notwendig, um 90% des Sonnenlichts zu absorbieren.
- Das Licht wird in der Algenschicht so verteilt, dass es der Aktivität der Lichtsättigungskurve entspricht.
- Die Algen verhalten sich im Biofilm physiologisch ähnlich wie in Suspension.

Die erste und die dritte Bedingung wurde am Wildtyp verifiziert. Die zweite Bedingung konnte nicht getestet werden, weil es solcher Biofilm noch in Entwicklung ist. Wir haben daher in der Modellrechnung eine Suspensionskultur angenommen, bei der alle drei Bedingungen erfüllt sind. Für die Mutanten haben wir angenommen, dass:

- die Steigerung der Glykolatproduktion unter oszillierendem Licht und Temperatur prozentual die gleichen Effekte wie im Wildtyp hat (konnte aus Zeitgründen nicht verifiziert werden).
- die kinetische Verbesserung der RubisCO II, die wir im EZA freien Experiment gesehen haben, sich auch im akklimatisierten Zustand bestätigt (konnte aus Zeitgründen nicht verifiziert werden).

Unter diesen Annahmen kommt man zu folgendem Modellergebnis, das in Abb .20 dargestellt ist.

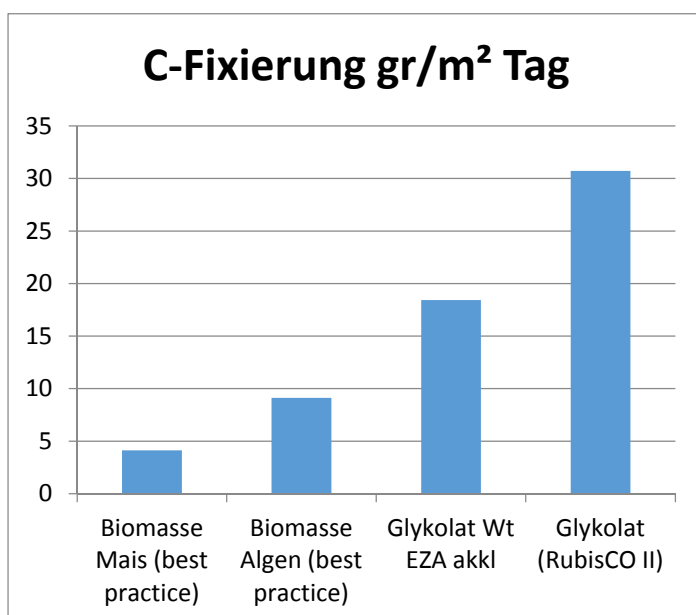




Abb. 20: Vergleich der CO<sub>2</sub>-Fixierung pro Fläche und Tag von Mais, Algen in der Biomasseproduktion und den beiden Glykolatvarianten (Erklärung siehe Text)

Zunächst sieht man den bekannten Effekt, dass Mikroalgen eine ca. 2,5 fach höhere Flächenleistung haben als Mais, wenn man einen Tag im das Jahresintegral vergleicht. Dies ist in Übereinstimmung mit der Literatur, die sich nicht auf Potentiale, sondern auf in der Realität erzielte Werte bezieht (Wilhelm et al. 2014). Bei der mit Hilfe von EZA ermittelten CO<sub>2</sub>-Fixierungsrate erkennt man eine Verdoppelung, allerdings sind die Glykolatwerte nur im Labor modelliert, während der Wert für die Algenbiomasse aus der (besten) Praxis ermittelt wurde. Entscheidend für diese Studie ist allerdings die erwartete Steigerung durch die RubisCO Typ II Mutation. Die gleichen Ergebnisse erhält man, wenn man die Assimilationsunterschiede auf die im Labor gemessenen Photosyntheseraten bezieht.

Dies ist in Abb. 21 dargestellt. Man kann am Vergleich der beiden Abbildung klar ersehen, dass die Unterschiede reproduzieren, unabhängig auf welche Mess- bzw. Modellierungsgröße die Leistungsfähigkeit bezogen wird. Die hier im Labor auf der Grundlage von der Glykolatexkretion bestimmten Werte sind die höchsten Assimilationsraten, die jemals bei der Mikroalge Chlamydomonas gemessen wurden. Dieser Befund belegt klar, dass die Assimilationsleistung nicht durch die Photosynthese, sondern durch die C-Nutzung und durch das Zellwachstum begrenzt wird und daher nur der Weg der C-Ausscheidung entscheidend die C-Bindungseffizienz der Zellen verbessern kann. Eine Publikation hierzu ist in Vorbereitung.

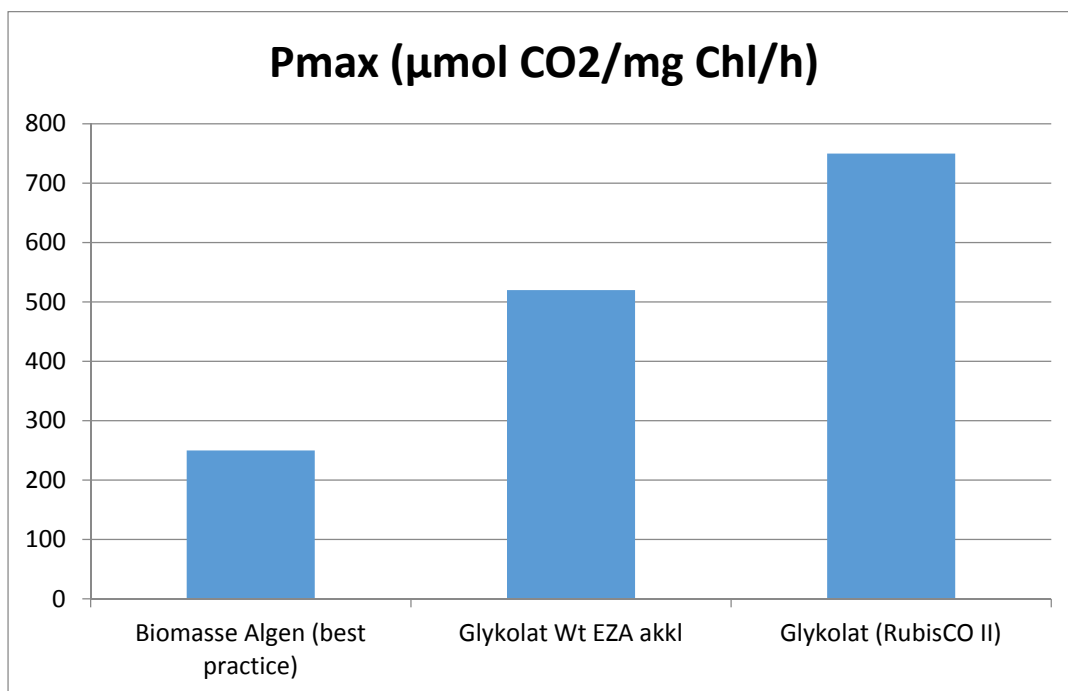


Abb. 21: Vergleich der maximalen Photosyntheserate von Algen in der Biomasseproduktion und den beiden Glykolatvarianten (Erklärung siehe Text)

## 5. Wirtschaftlichkeitsberechnung

Es war der Wunsch der DBU am Ende des Vorhabens eine Wirtschaftlichkeitsberechnung durchzuführen. Die Wirtschaftlichkeit eines Verfahrens ergibt sich aus den Aufwendungen für die Herstellung eines Produkts (Investitionskosten, Betriebskosten) und aus dem auf dem

Markt erzielbaren Preis des Produkts. Seit der Antragsstellung haben sich hinsichtlich des Produkts allerdings entscheidende Veränderungen ergeben. Im Antrag war als Produkt Methan genannt worden. Aus einem vom BMBF geförderten Projekt, das während der DBU Förderung zu Ende geführt wurde, haben wir feststellen müssen, dass für eine solche Rechnung die wissenschaftlichen Grundlagen nicht ausreichen.

1. Für die technische Umsetzung ist ein Trennmodul erforderlich, das das aerobe, phototrophe Reaktorkompartiments von einem anaeroben, methanogenen Reaktorteil trennt. Wir konnten zwar zeigen, dass dies technisch möglich ist, aber inwieweit diese Lösung großtechnisch skalierbar ist, blieb offen.
2. Die technischen Aufwendungen und damit die Kosten für das Trennmodul werden ganz wesentlich von den Volumenströmen bestimmt. Die wirtschaftlichen und die energetischen Kosten unterscheiden sich um mindestens eine Zehnerpotenz, wenn der Algenreaktor als Biofilm und nicht als Suspensionsreaktor geführt wird. Der Biofilm befindet sich noch in der Entwicklung und es lassen sich noch keine wirklich belastbaren Zahlen angeben, die es erlauben würden den Volumenstrom und damit die Wirtschaftlichkeitskosten zu berechnen.
3. Eine vergleichende Wirtschaftlichkeitsberechnung mit der Biogasherstellung auf der Grundlage der Fermentation von Mikroalgen erschien uns auch deshalb nicht sinnvoll, da eine auf Algenbiomasse basierende Methanherstellung kein vernünftiger und optimierbarer Bezugspunkt sein können, wie nachfolgende Überschlagsberechnung zeigt.

#### 3.1.1. Wirtschaftlichkeit der Methanherstellung aus Algenbiomasse mittels konventioneller Technik.

Die Herstellungskosten von Mikroalgenbiomasse beträgt auf der Grundlage heutiger Technologien ca. 20 € pro kg (Posten und Wilhelm, 2016)<sup>1</sup>. Pro kg Biomasse lassen sich theoretisch bis zu 0,650 m<sup>3</sup> Methan herstellen. Die realen Ausbeuten liegen bei 0,2 m<sup>3</sup>. Nimmt man einen Energiegehalt von 9,97 kWh pro m<sup>3</sup> an, kann man aus einem kg Algenbiomasse ca. 1,9 kWh herstellen. Der Handelspreis für Erdgas liegt bei ca 7 ct/kWh. Die Herstellungskosten für 1 kWh Erdgas über Algenbiomasse liegen damit bei ca. 10 €. Meyer und Weiss (2014)<sup>2</sup> berechneten einen algenbasierten Preis unter optimierten Bedingungen für eine kWh Biogas mit 3,6 €. Das entspricht etwa einem Euro pro MJ Energie im Methan. Es ist also offensichtlich, dass es wenig sinnvoll ist bei dieser Diskrepanz von einem Faktor 500 zwischen Herstellungskosten und Marktwert eine wirtschaftliche Analyse durchzuführen.

Dabei zeigt die Rechnung zeigt klar, dass der Euro Herstellungskosten pro MJ im Betrieb nach Fertigstellung zu ca. 8% auf die Hardware entfällt (8ct/MJ), während die restlichen 92 % (92 ct/MJ) sich auf Personal- und Betriebskosten verteilen. Die Personalkosten sind praktisch vollständig durch die Biomasseherstellung und die Ernte gebunden. Es ist mit dieser Rechnung offensichtlich, dass selbst die drastische Steigerung der C-Fixierung um

---

<sup>1</sup> Kaltschmitt, M., Hartmann, H., Hofbauer, H., Energie aus Biomasse, (3. Auflage) Springer-Verlag 2016

<sup>2</sup> Meyer M & Weiss, A. Life cycle costs for the optimized production of hydrogen and biogas from microalgae. Energy 78 (2014) 84e93

das Dreifache, was bislang noch nirgends gelungen ist, keine Lösung darstellt. Der wirkliche wirtschaftliche Durchbruch kann nur gelingen, wenn die Volumenströme durch Ablösung der Suspensionstechnologie durch einen katalytischen Biofilm reduziert wird. Da wir für dieses Design noch keine wirtschaftlich belastbaren Zahlen haben, können wir auch keine Wirtschaftlichkeitsrechnung für Methan vorlegen. Die Chance, dass im Biofilmreaktor die Betriebskosten (Nährstoffe, Mischen, Ernten) sind um eine Zehnerpotenz reduzieren lassen wird, weil der Volumenstrom nur noch 2-5% des Suspensionsreaktors beträgt, sind sehr hoch. Nimmt man an, dass die Investitionskosten gleich bleiben, was eher pessimistisch gerechnet ist, weil der Materialaufwand um ein Vielfaches geringer wird (dünne Glasschwammschichten im Vergleich zu tonnenschweren Turbularreaktoren) und dass die Betriebskosten um den Faktor 10 gesenkt werden können (9 ct/MJ) betragen die Herstellungskosten nur noch 17 ct/MJ. Rechnet man dann die Verdreifachung der C-Assimilation pro Fläche hinzu erreicht man eine Wirtschaftlichkeitsschwelle bei 3 ct/MJ. Berücksichtigt man dann, dass die Herstellung tatsächlich CO<sub>2</sub>-arm erfolgt und kann dafür die CO<sub>2</sub>-Abgabe einsparen, wäre auch Methan über NGC konkurrenzfähig.

### 3.1.2. Wirtschaftlichkeit der Glykolattechnik für andere Produkte

Es wurde im vorhergehenden Kapitel gezeigt, dass es die Biofilmtechnik ist, die wesentlich zur Kostenreduzierung beitragen wird. Aufgrund der nicht erzielbaren Wirtschaftlichkeit von Biofuels mittels Algenbiomasse verlagert sich die Forschung verstärkt auf die Herstellung von Wertstoffen. Dieser Weg scheint zunächst über die Glykolatexkretion verstellt. Dies ist aber nicht der Fall, im Gegenteil. In höheren Pflanzen wurde gezeigt, dass das Glykolat über bakterielle Enzyme ohne CO<sub>2</sub>-Freisetzung wieder in den Stoffwechsel der Glykolyse eingeführt werden kann (Peterhänsel and Maurino, 2011)<sup>3</sup>. Dies führte zu der Idee, *E. coli* als Substratverwerter für Glykolat zu verwenden. Dies erfolgt zurzeit in einem BMBF Vorhaben „Glykolat“ in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. A. Schmid am Umweltforschungszentrum. Grundidee ist es, *E. coli* unter aeroben Bedingungen als Fermentierungsplattform zu benutzen und anstelle von Glucose Glykolat einzusetzen. Damit muss man nicht über höhere Pflanzen Stärke produzieren und diese dann enzymatisch in Glucose für die *E.coli* Biotechnologie bereit zu stellen. Damit wird es möglich, den Stärkemarkt zu entlasten und alle glucose-basierten Biotechnologieverfahren zukünftig auf Glykolat umzustellen. Die nachfolgende Rechnung belegt die extrem viel höhere Flächeneffizienz und die Entlastung von Ackerflächen für die weisse Biotechnologie. Als Produkt zielen wir hierbei Limonen an, das sowohl hochpreisig für pharmazeutisch/kosmetische Zwecke eingesetzt werden kann, aber auch direkt energetisch z.B. als Kerosinbeimischung Verwendung finden kann. Der Markt dafür ist bei entsprechendem Preis nahezu unbegrenzt. Wir vergleichen die Limonenherstellung auf der Grundlage von Kartoffeln mit der von Glykolat mittels der von uns erzeugte Mutante K4.

---

<sup>3</sup> Peterhänsel C, Maurino VG. 2011. Photorespiration redesigned. *Plant Physiology* 155, 49–55.

### Annahmen für die Vergleichsrechnung

Kartoffelertrag pro ha Jahr: 40.000 kg <sup>4</sup>

Stärkegehalt pro Kg Kartoffel: ca. 20% Trockensubstanz davon ca. 70% Stärke<sup>5</sup>

gr Glukose pro kg Kartoffel: 140

Umwandlungseffizienz Glucose in Limonen angenommen 50% der theoretischen Effizienz

(gr Limonen pro gr Glucose): 0,22

Potentieller Limonenertrag pro ha und Jahr auf der Grundlage von Kartoffelstärke: 1.232 kg

Glykolatertrag pro ha und Jahr: 15.960 kg

Umwandlungseffizienz Glykolat in Limonen angenommen mit 50% der theoretischen Effizienz

(gr Limonen pro gr Glykolat): 0,16

Potentieller Limonenertrag pro ha und Jahr auf der Grundlage von Glykolat: 2.512 kg

Man erhält also die doppelte Menge an Limonen pro ha Fläche, wobei hier der Einsatz von Stickstoff, Phosphor und Kalium nicht berücksichtigt ist. Weiterhin unberücksichtigt ist, dass dieser sehr hohe Ertrag auch bei Extremwetterlagen und unabhängig von der Bodenqualität erwirtschaftet werden kann. An diesem Beispiel wird auch deutlich, wie stark die umweltverträgliche Herstellung einer kraftstofffähigen Grundchemikalie für die Industrie in dem biomassefreien Ansatz gesteigert werden kann, wenn die CO<sub>2</sub> Assimilation mittels Enzymengineering verbessert wird. Bemerkenswert ist auch, dass die Produktionssteigerung nicht mit einem erhöhten Einsatz von Ressourcen (Nährstoffe, Durchmischung, Ernte, Hardware jedweder Form) verbunden ist. Diese Schlussüberlegung zeigt klar den Vorteil des hier vorgestellten neuen Ansatzes zur nachhaltigen Bio-Ökonomie.

Leipzig, den 8.11.2016

---

<sup>4</sup> <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/28985/umfrage/hektarertrag-fuer-kartoffeln-in-ausgewaehlten-laendern-der-eu/>

<sup>5</sup> S. Wölfel, Abschlussbericht, Einflussnahme auf die Entwicklung des Stärkegehaltes von Speisekartoffeln unter Thüringer Bedingungen, Themenblatt-Nr.: 41.09.420, Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, 2002