

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung

**Zuwendungsempfänger:  
Technische Hochschule Mittelhessen**

**Titel der Förderung: Mikrobielle Biofabriken:  
Methanogene als Plattform-Organismen zur  
Energie-Speicherung, Gen-Expression und zur  
Produktion von Chemikalien höherer  
Wertschöpfung (Teilvorhaben D)**

**Verantwortlicher Autor:  
Prof. Dr.-Ing. Dirk Holtmann  
Förderkennzeichen: 031B0851D**

„Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 031B0851D gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.“

## **Kurzbericht**

Forschungsvorhaben: 031B0851D  
Thema: Mikrobielle Biofabriken: Methanogene als Plattform-Organismen zur Energie-Speicherung, Gen-Expression und zur Produktion von Chemikalien höherer Wertschöpfung (Teilvorhaben D)  
Laufzeit: 01.02.20-31.12.23  
Ausführende Stelle: Technische Hochschule Mittelhessen - Institut für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie (IBPT), Wiesenstr. 14, 35390 Gießen  
Projektleitung: Prof. Dr.-Ing. Dirk Holtmann

### **A. Aufgabenstellung sowie wissenschaftlicher und technischer Stand zu Beginn des Projektes**

Das Gesamtziel des Verbundprojektes MethanoPEP war es, den Einsatz von Methanogenen als Plattformorganismen in der Biotechnologie deutlich auszuweiten. Dies sollte durch die Entwicklung und Optimierung von Verfahren und Technologien erreicht werden, die einen breiteren Einsatz von Methanogenen in industriellen Prozessen ermöglichen. Physiologische Fähigkeiten, die über die Methanproduktion hinausgehen, sollen charakterisiert und nutzbar gemacht sowie Technologien entwickelt werden, die generell für Methanbildner in industriellen Anwendungen geeignet sind. Die vom MethanoPEP-Konsortium zu Beginn des Projektes angestrebten Innovationen bestanden in der Erweiterung bestehender - auf die Methanproduktion ausgerichteter - Technologien um höherwertige Verbindungen im Produktportfolio sowie in der Übertragung optimierter Kultivierungs- und Prozesssteuerungsmethoden auf verschiedene Produktionsstämme, wodurch der wirtschaftliche Wert des Gesamtprozesses gesteigert werden sollte.

### **B. Ablauf des Vorhabens**

Das MethanoPEP-Forschungskonsortium bestand aus drei universitären Arbeitsgruppen (AG M. Rother, Technische Universität Dresden (TUD), AG R. Schmitz-Streit, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (CAU), AG B. Molitor, Eberhard-Karls-Universität Tübingen (EKU), AG Holtmann, Technische Hochschule Mittelhessen (THM) und KMU Electrochaea GmbH (EC). Das Projekt MethanoPEP gliederte sich in die drei Teilprojekte (TPs) Kultivierung (TP1), Genetik (TP2) und Produkte (TP3), die wiederum in sechs Arbeitspakete (WPs) unterteilt waren. Diese wurden jeweils von einem/einer Projektpartner\*in koordiniert; WP1: Bioelektrosynthese mit Methanogenen (THM), WP2: Optimierung der Power-to-Gas-Energiespeicherung (EC), WP3: Syngas-abhängige Zweistufenfermentation (EKU), WP4: Induzierbare Genexpressionssysteme für Methanogene (CAU), WP5: Genetische Werkzeuge für Methanothermobacter thermotrophicus (EKU) und AP6: Produktion von Isoprenoiden in Methanogenen (TUD). Die Arbeiten an der THM konzentrieren sich auf die mikrobielle Elektrosynthese (MES). Bei MES nehmen elektroaktive Mikroorganismen Elektronen von einer Kathode einer Kathode auf und reduzieren so CO<sub>2</sub> zu verschiedenen chemischen Produkten, wie z.B. Methan. Methan durch die Stoffwechselaktivität von Methanogenen. MES zeichnen sich dabei vor allem durch ihre hohe Elektronenausbeute (> 80%) gegenüber anderen Verfahren aus. Als Elektronenquelle kann elektrischer Strom aus erneuerbaren Energien oder auch Überschussstrom genutzt werden.

### **C. Wesentliche Ergebnisse sowie Zusammenarbeit mit anderen Forschungsstellen**

Im Folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse der Teilprojekte der THM beschrieben.

**WP 1.1 - Physiologie der Bioelektromethanogenese:** Die Kultivierung verschiedener methanogener Organismen unter variablen Kultivierungsbedingungen bildete den Schwerpunkt

des WP. (i) Kultivierung in Septenflaschen: Wachstumsparameter sowie Produktbildung und Substratverbrauch wurden unter Verwendung der Substrate Formiat und  $H_2/CO_2$  bestimmt. Folgende Methanogene wurden hierbei charakterisiert: *Methanobacterium formicicum* JF-1, *Methanobacterium palustre* F, *Methanothermobacter defluvii* ADZ, *Methanothermococcus okinawensis* IH1, *Methanococcus voltae* PS, *Methanoculleus taiwanensis* CYW4, *Methanobrevibacter boviskoreani* JH1, *Methanocorpusculum aggregans* XII, *Methanomicrobium antiquum* MobH. (ii) Kultivierungen in H-Zellen (bioelektrochemischer Reaktor): Produktbildungsraten im bioelektrochemischen System der oben genannten Methanogenen (außer *M. acetivorans*) wurden ermittelt. (iii) Bioelektromethanogenese mittels Mediatoren: Die Mediatoren Anthrachinon-2-sulfonsäure (AQS), Neutralrot und Safranin O wurden elektrochemisch und spektroskopisch charakterisiert. Spektroskopische Analysen der Mediatoren, nach Zugabe zu Methanogenenkulturen, deuteten auf eine Reduktion der Mediatoren durch die Methanogenen hin. Versuche im bioelektrochemischen System zeigten keinen Einfluss der Mediatoren auf Wachstumsparameter und Produktbildung.

**WP 1.2 - Bioelektromethanogenese-abhängige Transkriptom-/Proteomanalyse:** Die Analyse der Stoffwechselvorgänge auf Proteomebene wurde auf der Grundlage der in WP 1.1 angewandten Kultivierungsmethoden durchgeführt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass alle notwendigen Methoden an der THM etabliert wurden, der Elektronentransfer jedoch nicht aufgeklärt werden konnte.

**WP 1.3 - 2-Phasen-System zur Separation von Isopren/-oiden:** In diesem AP wurden als Extraktionsmittel Dodekan, Tetradekan, Pentadekan, Hexadekan, Methylbutyrat, Cyclodextrin, PEG 20000 sowie die Deep Eutectic Solvents Menthol/Dodekan und Menthol/Dodekansäure getestet und charakterisiert. Dabei wurden die höheren Alkane (Dodekan, Tetradekan, Pentadekan, Hexadekan) als geeignete Extraktionsmittel identifiziert. Bewertungskriterien waren die Extraktion der Isoprenoide, Umweltaspekte, Kosten, Arbeitssicherheit, Stabilität in elektrochemischen Reaktoren und Wechselwirkungen mit methanogenen Produktionsorganismen.

**WP 1.4 - Formiat-abhängige Bioelektromethanogenese:** Für die Versuche zur Formiatsynthese mit einer GDE wurde ein Plattenreaktor verwendet. Der Reaktor wurde zur Untersuchung des Einflusses der Elektrolytzusammensetzung und zur Herstellung von e-Formiat (elektrochemisch erzeugtes Formiat) verwendet. Die Formiatsynthese im oben beschriebenen Plattenreaktor wurde unter verschiedenen Bedingungen (Temperaturen, Stromdichten, Drücke, Elektrodenzusammensetzung, Elektrodenvorbehandlung) charakterisiert. Betriebsbedingungen für hohe Produktivität und Stromausbeute wurden identifiziert. Das hergestellte Formiat wurde in der Versuchsreihe in AP 1 eingesetzt und mit handelsüblichem Formiat verglichen. Es konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

**WP 1.5 - Formiat-abhängige Isopren/-oid-Produktion mittels MES:** In diesem AP wurden alle vorhergehenden Schritte gekoppelt und für die Methanbildung aus Formiat der Substratverbrauch, die Produktbildungsrate und das Substrat-Produkt-Verhältnis für verschiedene formiatverwertende Methanbildner (*M. maripaludis*, *M. thermotrophicus*, *M. defluvii*, *M. okinawensis*, *M. formicicum*, *M. palustre*, *M. voltae*) bestimmt. Für das Upscaling wurde ein Konzept entwickelt, das auf einer zwischengeschalteten Elektrodialyse basiert. Dadurch kann der direkte Kontakt zwischen Methanbildnern und Elektroden vermieden werden. Die Anoden- und Kathodenräume sowie die Membranen können dann entsprechend skaliert werden.

Die geplanten Kooperationen wurden trotz einiger Verzögerungen durch die SARS-CoV-2-Pandemie und Lieferverzögerungen weitestgehend wie geplant durchgeführt.

## Eingehende Ergebnisdarstellung

Forschungsvorhaben:	031B0851D
Thema:	Mikrobielle Biofabriken: Methanogene als Plattform-Organismen zur Energie-Speicherung, Gen-Expression und zur Produktion von Chemikalien höherer Wertschöpfung (Teilvorhaben D)
Laufzeit:	01.02.20-31.12.23
Ausführende Stelle:	Technische Hochschule Mittelhessen - Institut für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie (IBPT), Wiesenstr. 14, 35390 Gießen
Projektleitung:	Prof. Dr.-Ing. Dirk Holtmann

## **Ergebnisdarstellung und Vergleich der Ergebnisse zur Vorhabenbeschreibung**

Die Darstellung der Ergebnisse orientiert sich an den geplanten Arbeitspaketen gemäß Vorhabensbeschreibung.

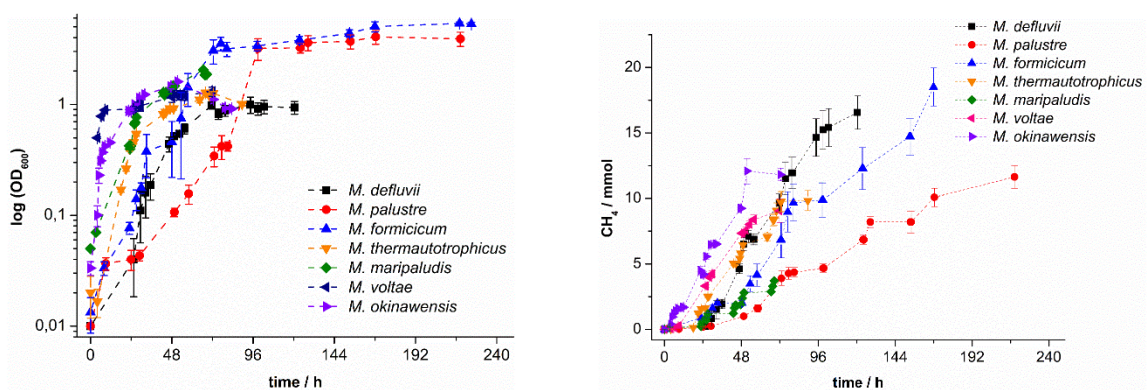
### AP 1.1 Physiologie der Bioelektromethanogenese

Die Kultivierung verschiedener methanogener Organismen unter variablen Kultivierungsbedingungen bildete den Schwerpunkt des WP. Für den extrazellulären Elektronentransfer (EET) von der Biokathode zum Organismus unterscheidet man drei verschiedene Transferwege, den direkten Elektronentransfer (DET), den indirekten Elektronentransfer (IET) und den mediatorvermittelten Elektronentransfer (MET). Beim DET gibt es zwei Möglichkeiten, wie der Organismus Elektronen durch direkten Kontakt mit der Biokathode aufnehmen kann. Zum einen bilden viele Organismen an der äußeren Membran Cytochrome, die über eine Häm-Gruppe Elektronen aufnehmen können. Zum anderen bilden manche Organismen Pili oder Nanowires, eine Aneinanderreihung „leitfähiger“ Proteine, die es ermöglichen, Elektronen auch in größerer Entfernung von der Biokathode aufzunehmen. Bei einem negativeren Potential als 0,414 V gegenüber SHE bildet sich an der Kathode bzw. der Biokathode Wasserstoff, der als Elektronendonator genutzt werden kann. Beim MET werden die Elektronen ebenfalls auf kleine Moleküle, sogenannte Elektronen-Shuttles, übertragen. Der große Unterschied zur IET ist die reversible Redoxreaktion der Mediatoren. Während der MES werden die Mediatoren an der Biokathode reduziert und durch den Organismus oxidiert und stellen somit über die gesamte Versuchsdauer Elektronen zur Verfügung. Im Folgenden werden die entsprechenden Ergebnisse dargestellt.

#### (i) Kultivierung in Septenflaschen

In diesem Arbeitspaket wurden verschiedene Methanbildner hinsichtlich ihres Wachstums auf  $H_2/CO_2$  und Formiat untersucht und verglichen. Diese Ergebnisse dienen als Grundlage für die nachfolgenden Untersuchungen. Abbildung 1 links zeigt die Wachstumskinetik von Methanbildnern, die auf  $H_2/CO_2$  kultiviert wurden. *M. maripaludis* KA1 zeigte eine Verzögerungsphase von etwa 10 Stunden, gefolgt von einem exponentiellen Anstieg des Wachstums innerhalb der nächsten 24 Stunden bis zu einer maximalen optischen Dichte von  $2,05 \pm 0,08$ . Die Kultivierung wurde nach 69 Stunden mit einer maximalen Wachstumsrate von  $(0,19 \pm 0,00) h^{-1}$  beendet. *M. thermautotrophicus* zeigte eine Verzögerungsphase von etwa 10 Stunden, gefolgt von einem exponentiellen Wachstum mit einer maximalen Wachstumsrate von  $(0,16 \pm 0,02) h^{-1}$  und einer maximalen optischen Dichte von  $1,27 \pm 0,06$  nach 68 Stunden Kultivierung. *M. defluvii* erreichte nach einer Lag-Phase von fast 25 Stunden eine maximale optische Dichte von  $0,98 \pm 0,07$  mit einer maximalen Wachstumsrate von  $(0,21 \pm 0,07) h^{-1}$  nach 72 Stunden

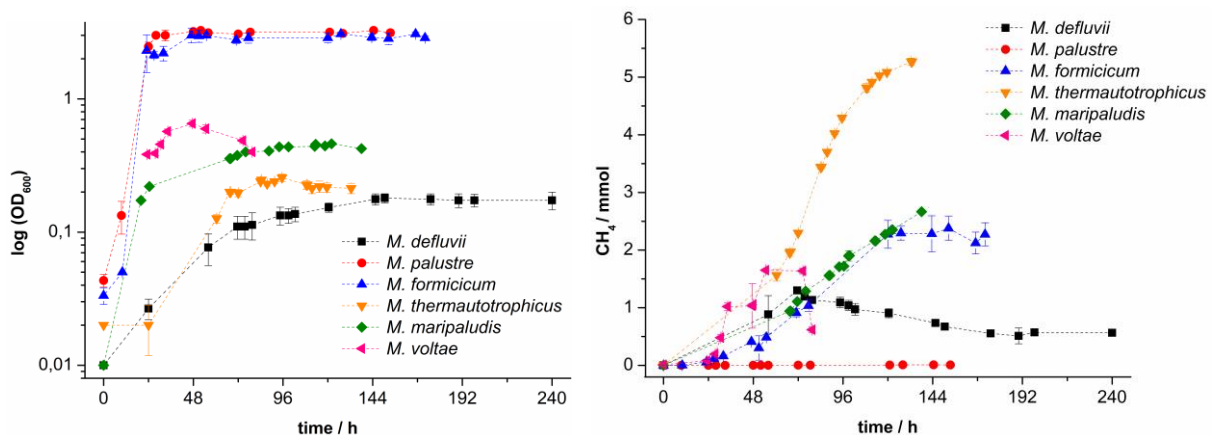
Kultivierung. *M. okinawensis* zeigte die höchste Wachstumsrate der charakterisierten Stämme mit einer Lag-Phase von weniger als 4 Stunden und einer fast zehnfachen Zunahme der optischen Dichte nach 24 Stunden, die nach 52 Stunden Kultivierung ein Maximum von  $1,61 \pm 0,02$  erreichte. Die maximale Wachstumsrate betrug  $(0,43 \pm 0,07) \text{ h}^{-1}$ . Das Wachstum von *M. formicicum* und *M. palustre* wurde ebenfalls gemessen, aber die Kulturbrühe trübte sich während der Kultivierung ein, was die photometrischen Messungen störte. Die Werte für diese Stämme sind daher mit Vorsicht zu interpretieren. Die Lag-Phase von *M. formicicum* dauerte etwa 40 Stunden, das exponentielle Wachstum begann nach 50 Stunden und erreichte nach 218 Stunden Kultivierung eine maximale optische Dichte von  $5,37 \pm 0,19$ . Die maximale Wachstumsrate dieses Stammes betrug  $(0,15 \pm 0,04) \text{ h}^{-1}$ . *M. palustre* zeigte im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Stämmen eine geringere Wachstumsrate mit einer Verzögerungsphase von fast 50 Stunden. Die maximale optische Dichte von  $4,07 \pm 0,57$  wurde nach 167 Kultivierungsstunden erreicht. Die für diesen Stamm berechnete maximale Wachstumsrate betrug  $(0,05 \pm 0,00) \text{ h}^{-1}$ . Abbildung 1 rechts zeigt die entsprechende Bildung an Methan. *M. okinawensis* begann innerhalb von 4 Stunden nach der Kultivierung mit der Methanproduktion und produzierte innerhalb von 52 Stunden  $(11,8 \pm 0,5) \text{ mmol}$  Methan. Die Methanproduktion ging mit einer Abnahme der optischen Dichte nach 52 Stunden einher. Bei den anderen Stämmen begann die Methanproduktion nach etwa 20 Stunden Kultivierung. *M. palustre* produzierte eine ähnliche Menge Methan, brauchte aber dreimal so lange wie *M. okinawensis*, um die gleiche Menge zu erreichen. Die höchste Methanproduktion wurde bei *M. formicicum* mit insgesamt  $18,5 \pm 1,4 \text{ mmol}$  beobachtet, was auf einen kontinuierlichen Anstieg auch während der stationären Phase hinweist. Ein ähnlicher Trend zeigte sich auch bei *M. defluvii* und *M. palustre*. *M. defluvii* erreichte mit  $(16,6 \pm 1,3) \text{ mmol}$  nach 121 h Kultivierung die zweithöchste Methanproduktion, während *M. thermotrophicus* eine moderate Produktion von  $(6,41 \pm 0,3) \text{ mmol}$  aufwies. *M. maripaludis* hatte mit  $(3,5 \pm 0,1) \text{ mmol}$  die geringste Methanproduktion.



**Abbildung 1: Wachstumsverlauf (links) und Methanbildung (rechts) verschiedener Spezies an Methanogenen auf  $\text{H}_2$  und  $\text{CO}_2$ . Die Versuche wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt**

Abbildung 2 links zeigt die Wachstumskinetik der Organismen zum Vergleich auf Formiat. Die Kultivierung von *M. maripaludis* auf Formiat zeigte eine Lag-Phase von weniger als 20 Stunden und einen Peak der optischen Dichte von 0,46 nach 114 Stunden, nachdem die stationäre Phase erreicht wurde. Die Wachstumsrate auf Formiat ( $0,13 \text{ h}^{-1}$ ) war geringer als die Wachstumsrate auf  $\text{H}_2/\text{CO}_2$ . *M. thermotrophicus* zeigte eine längere Verzögerungszeit von 55 Stunden und eine niedrigere Wachstumsrate von  $0,07 \text{ h}^{-1}$  mit einer maximalen optischen Dichte von 0,31 bei 113 Stunden. *M. defluvii* hatte die niedrigste Wachstumsrate ( $0,04 \text{ h}^{-1}$ ) und die höchste optische Dichte (0,18 bei 151 Stunden). Die Kultivierung von *M. formicicum* und *M. palustre* wurde ebenfalls durchgeführt, aber die Farbveränderung (zu schwarz) während der Kultivierung von Formiat beeinträchtigte die photometrischen Messungen. Trotz möglicher Ungenauigkeiten durch die Verfärbung wurden Wachstumsmessungen durchgeführt. *M.*

*formicum* zeigte eine Verzögerungszeit von 23 Stunden, eine maximale optische Dichte von 3,07 nach 127 Stunden und eine maximale Wachstumsrate von  $0,29 \text{ h}^{-1}$ . *M. palustre* hatte eine Verzögerungsphase von 9 Stunden, eine maximale optische Dichte von 3,27 nach 52 Stunden und eine maximale Wachstumsrate von  $0,18 \text{ h}^{-1}$ . Bei *M. okinawensis* wurde kein Wachstum auf Formiat beobachtet. *M. voltae* hatte eine Verzögerungszeit von weniger als 20 Stunden, erreichte eine maximale optische Dichte von 0,65 nach 48 Stunden und eine maximale Wachstumsrate von  $0,06 \text{ h}^{-1}$ . Abbildung 2 rechts zeigt die entsprechende  $\text{CH}_4$ -Produktion. *M. voltae* begann innerhalb von 24 Stunden nach der Kultivierung mit der  $\text{CH}_4$ -Produktion und erreichte nach 75 Stunden ( $1,65 \pm 0,04$ ) mmol  $\text{CH}_4$ . Danach wurde eine Abnahme der  $\text{CH}_4$ -Produktion beobachtet, die mit der Wachstumskurve korrelierte und sich in einer Abnahme der optischen Dichte nach 48 Stunden widerspiegelte. Bei *M. formicum* begann die  $\text{CH}_4$ -Produktion etwa 24 Stunden nach Kultivierungsbeginn. Bemerkenswerterweise zeigte dieser Methanbildner einen kontinuierlichen Anstieg der  $\text{CH}_4$ -Konzentration, auch wenn die Kultur die stationäre Phase zu erreichen schien. Nach 153 Stunden erreichte *M. formicum* eine maximale  $\text{CH}_4$ -Produktion von ( $2,38 \pm 0,21$ ) mmol und damit die dritthöchste aller in dieser Studie untersuchten Methanbildner auf Formiat. *M. maripaludis* zeigte eine höhere  $\text{CH}_4$ -Produktion mit insgesamt ( $2,64 \pm 0,1$ ) mmol nach 138 Stunden Kultivierung, wobei die  $\text{CH}_4$ -Menge, wie in der Grafik dargestellt, weiter anstieg. *M. thermotrophicus* zeigte die höchste  $\text{CH}_4$ -Produktion mit ( $2,82 \pm 0,1$ ) mmol  $\text{CH}_4$  nach 167 Stunden Kultivierungszeit. Umgekehrt wurde die geringste  $\text{CH}_4$ -Produktion bei *M. defluvii* beobachtet, der nach 72 Stunden Kultivierung ( $1,3 \pm 0,02$ ) mmol  $\text{CH}_4$  anreicherte. Bemerkenswert ist, dass die  $\text{CH}_4$ -Produktion von *M. defluvii* trotz eines Anstiegs der optischen Dichte nach Erreichen des Maximums abfiel und danach nicht mehr anstieg. Im Gegensatz dazu zeigten alle anderen Stämme eine steigende  $\text{CH}_4$ -Produktion, auch nach dem Eintritt in die stationäre Phase. Bemerkenswert ist, dass *M. palustre* keine nachweisbare  $\text{CH}_4$ -Produktion zeigte. Stattdessen produzierte dieser Methanbildner Wasserstoff ( $\text{H}_2$ ), wobei nach 20 Stunden Kultivierung 2,7 mmol  $\text{H}_2$  registriert wurden. Während der verbleibenden Kultivierungszeit wurde das produzierte  $\text{H}_2$  sowie das  $\text{CO}_2$  aus der Luft teilweise verbraucht.



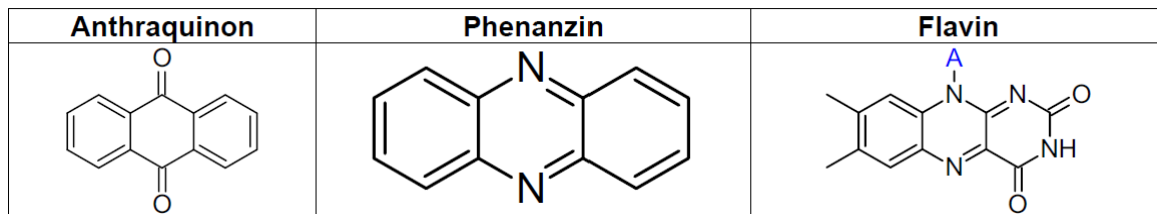
**Abbildung 2: Wachstumsverlauf (links) und Methanbildung (rechts) verschiedener Spezies an Methanogenen auf Formiat. Die Versuche wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt**

- (ii) Kultivierungen in H-Zellen (bioelektrochemischer Reaktor)
- (iii) Bioelektromethanogenese mittels Mediatoren

Vorbemerkung: Die Ergebnisse von (ii) und (iii) werden gemeinsam dargestellt, da (ii) als Referenz für (iii) verwendet wurde.

Im Allgemeinen werden Mediatoren von vielen Organismen als Elektronenüberträger produziert und genutzt. Dementsprechend gibt es eine Vielzahl verschiedener Mediatoren, die sich

in bestimmten Eigenschaften wie Redoxpotential, Löslichkeit, Lichtbrechung oder Kosten unterscheiden. Abbildung 3 zeigt die Grundgerüste häufig vorkommender Mediatoren. Beispiele für Anthraquinone sind die Mediatoren Anthraquinon-2-sulfonsäure (AQS), 9,10-Anthraquinon-2-carbonsäure (AQC) und 9,10-Anthraquinon-2,6-disulfonsäure (AQDS). Phenazine sind kleine, lipophile Moleküle, die durch Substitution an den Seitenketten, z. B. zu Neutralrot, vielseitig als Mediatoren eingesetzt werden können. Flavine kommen in der Natur häufig vor, z. B. wird Riboflavin u. a. als natürlicher Mediator in einer *Geobacter*-Art segregiert.



**Abbildung 3: Grundgerüste von verschiedenen Mediatoren (1) Anthraquinon-Grundgerüst, (2) Phenazin-Grundgerüst und (3) Flavin-Grundgerüst**

Im Rahmen dieser Forschungen wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Methanbildner verwendet. Der *M. maripaludis*-Stamm stammt aus der Arbeitsgruppe von Andrea Koerdt an der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung in Berlin, die anderen Methanbildner aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ).

**Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Methanogene mit Stammbezeichnung, DSMZ-Nummer und zugehörigen Kultivierungsmedium und -temperatur**

Organismus (Stammbezeichnung)	DSMZ	Medium	Temperatur
<i>Methanothermobacter defluvii</i> (ADZ)	7466	Modifiziertes 141	60°C
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> (FTF)	3012	1523	60°C
<i>Methanococcus maripaludis</i> (KA1)	n. A.	141	37°C
<i>Methanobacterium formicum</i> (JF-1)	2639	1523	37°C
<i>Methanobacterium palustre</i> (F)	3108	1523	37°C

Im folgenden Abschnitt werden beispielhaft die Ergebnisse der mikrobiellen Elektrosynthesversuche mit *M. voltae* dargestellt. Zunächst wurde *M. voltae* im bioelektrischen System (BES) ohne Mediator getestet. Darauf aufbauend wurde *M. voltae* mit den Mediatoren AQS, Neutralrot und AQC in weiteren BES-Versuchen getestet.

Abbildung 4 zeigt den Verlauf der Stromstärke, die Methanproduktion und die H<sub>2</sub>-Bildung von *M. voltae* während der MES ohne die Zugabe eines Mediators. Eine Methan-Produktion (0,34 mmol/d) und H<sub>2</sub>-Bildung (0,55 mmol/d) ist schon während der Polarisation, 2h nach Versuchsbeginn, zu erkennen. Zwischen 17 h und 43 h steigt die Methanproduktion mit Ausnahme des Messpunktes bei 23 h linear an und hat eine maximale Methanproduktionsrate von 4,71

mmol/d nach 43 h. Der nächste Messpunkt nach 46 h zeigt aber einen starken Rückgang der Methanproduktion auf 0,39 mmol/d. Nach 51 h wird kein Methan mehr produziert.

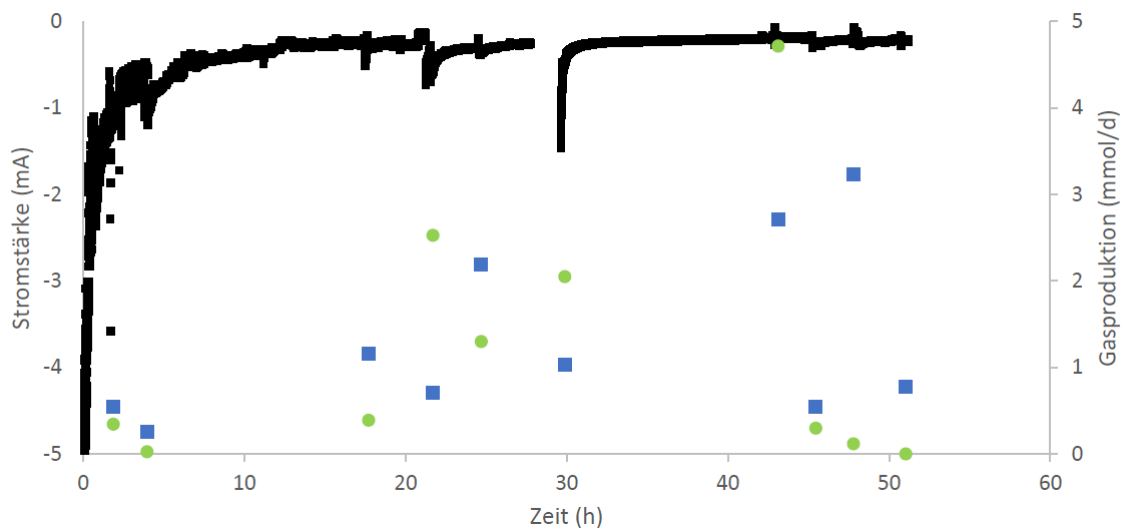


Abbildung 4: Darstellung der Stromstärke (—), der Methanproduktionsrate (●) und der Wasserstoffproduktionsrate (■) von *M. voltae* im BES ohne Mediator (n=1) bei einem Potential von -900 mV vs. Ag/AgCl (KCl sat.)

Im Folgenden sind die Versuche mit *M. voltae* und 500  $\mu$ M AQS (Abbildung 5), *M. voltae* und 50  $\mu$ M Neutralrot (Abbildung 6) und *M. voltae* und 100  $\mu$ M AQC (Abbildung 7) gezeigt. Die Tabelle 2 zeigt eine Gegenüberstellung der Prozessparameter der MES mit *M. voltae* mit und ohne Mediatorzusatz.

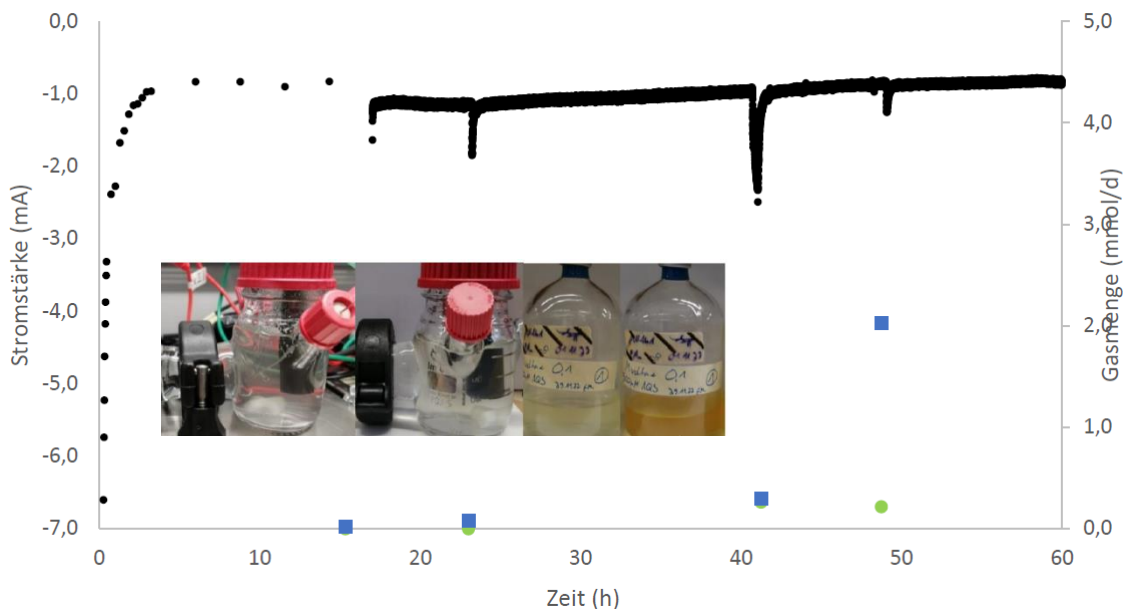


Abbildung 5: Darstellung der Stromstärke (—), der Methanproduktionsrate (●) und der Wasserstoffproduktionsrate (■) von *M. voltae* im BES mit 500  $\mu$ M AQS (n=1), das Insert zeigt H-Zellen mit *M. voltae* und 500  $\mu$ M AQS kurz nach dem Versuchsbeginn (1 v. links) und nach Versuchsende (2 v. links). Im Vergleich dazu, ist *M. voltae* in Septenflaschen ohne Mediator 2 v. rechts und mit 500  $\mu$ M AQS (1 v. rechts) dargestellt

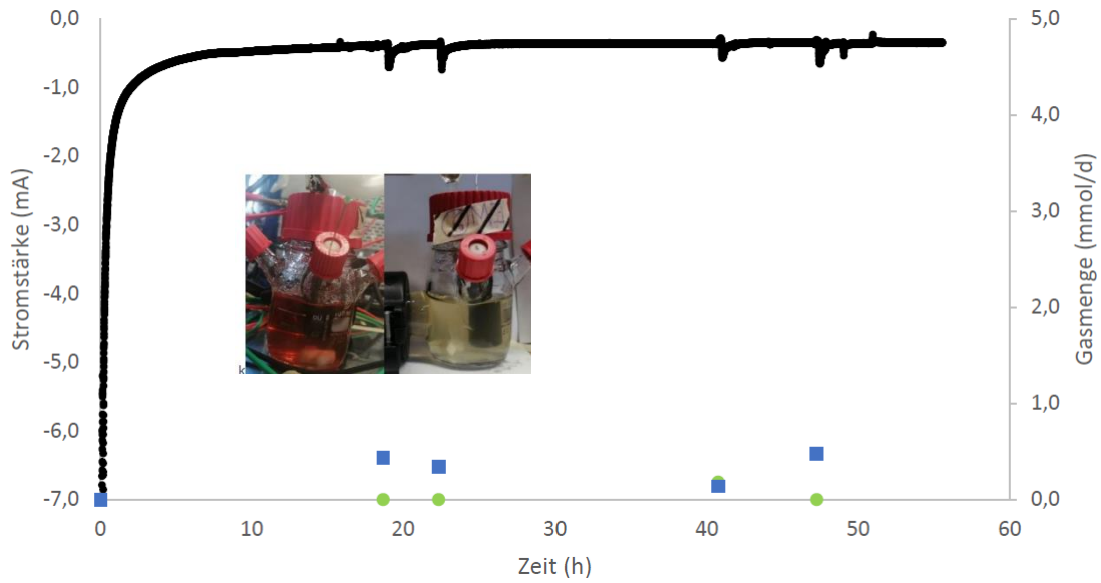


Abbildung 6: Darstellung der Stromstärke (—), der Methanproduktionsrate (●) und der Wasserstoffproduktionsrate (■) von *M. voltae* im BES mit 50 µM Neutralrot (n=1), das Insert zeigt die Färbung des MM141-Mediums während der MES mit *M. voltae* und 50 µM zu Versuchsbeginn (Bild links) und am Versuchsende (Bild rechts)

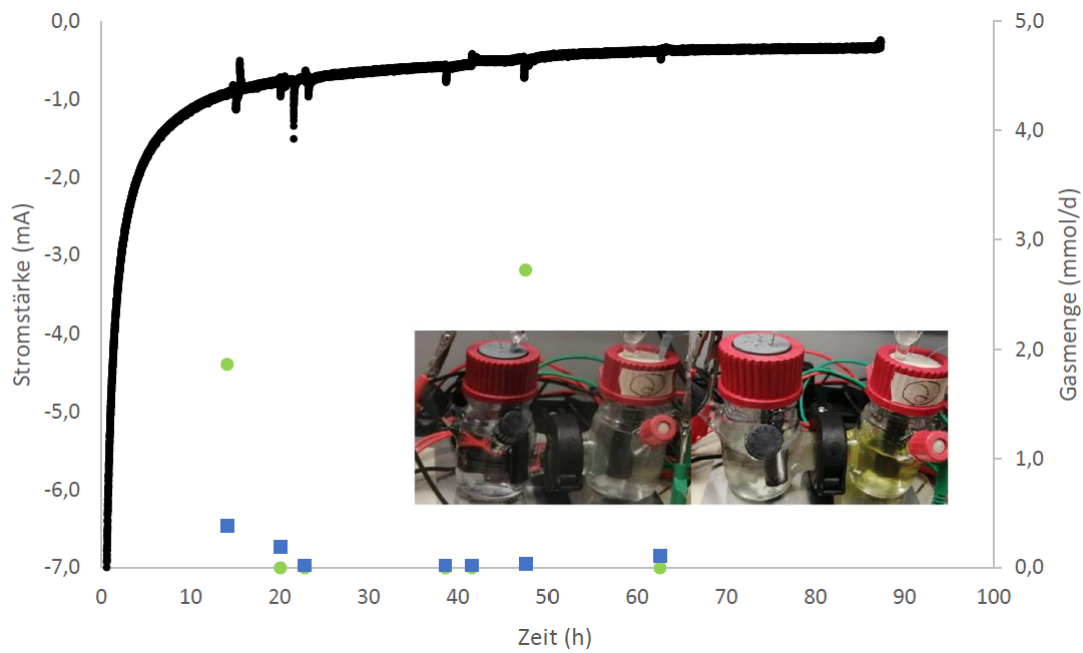


Abbildung 7: Darstellung der Stromstärke (—), der Methanproduktionsrate (●) und der Wasserstoffproduktionsrate (■) von *M. voltae* im BES mit 100 µM AQC (n=1), das Insert zeigt die farblichen Veränderungen des Kultivierungsmedium in der kathodischen Halbzelle (jeweils rechte Kammer der H-Zelle) über den gesamten Versuchszeitraum. Bild links: H-Zelle kurz nach Versuchsbeginn. Bild rechts: H-Zelle nach 87 h.

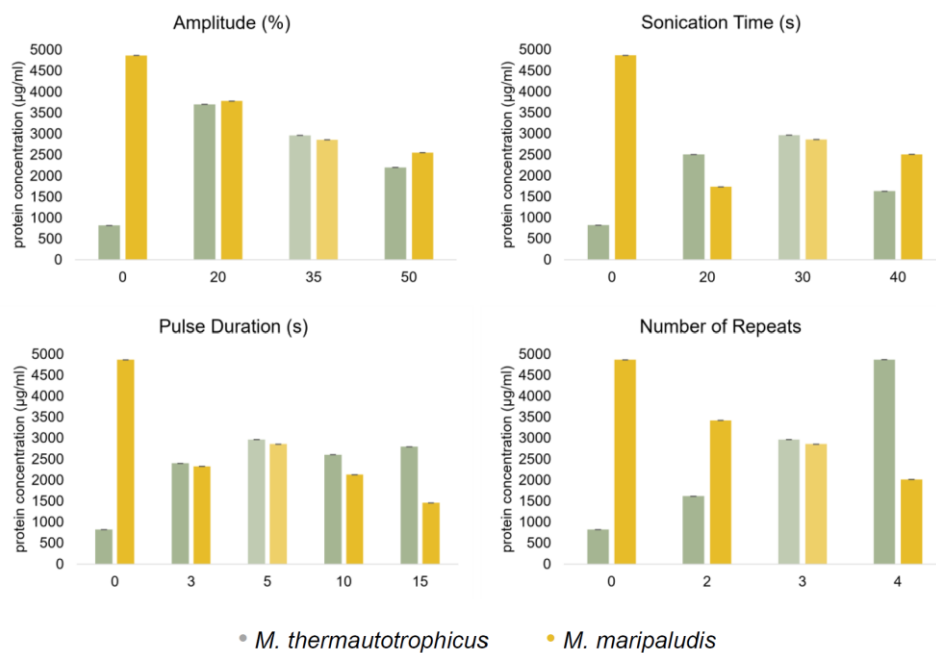
Tabelle 2: Darstellung der Prozessparameter der MES mit *M. voltae* mit und ohne Mediatorzusatz

Mediator	Max. OD600	Max. CH <sub>4</sub> - Produktion (mmol/d)	Max. H <sub>2</sub> Bildung (mmol/d)	Ø Stromstärke (mA)
Ohne	0,14	4,71	3,23	-0,29 ± 0,06 -0,22 ± 0,02
AQS	0,10	0,29	2,03	-1,00 ± 0,15
Neutralrot	0,23	0,18	0,48	-0,39 ± 0,05
AQC	0,12	2,72	0,39	-0,47 ± 0,11

Die obige Tabelle zeigt einen Vergleich der gemessenen Parameter der MES mit und ohne Mediator. Der Vergleich der maximalen OD600 zeigt keine großen Unterschiede, mit Ausnahme der MES mit Neutralrot, bei der das Neutralrot im oxidierten Zustand die OD600-Messung beeinflusst. Die höchste maximale OD600 wurde bei der MES ohne Mediator gemessen (0,14), bei der auch die höchste CH<sub>4</sub>-Produktion gemessen wurde (4,7150 mmol/d). Die maximalen Methanproduktionsraten der MES mit den Mediatoren waren deutlich geringer. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Methanproduktion, der Wasserstoffproduktion und der mittleren Stromstärke ist nicht erkennbar. Einerseits ist die Wasserstoffbildungsrate und die Methanbildungsrate der MES ohne Mediator am höchsten, die mittlere Stromstärke jedoch am niedrigsten. Andererseits ist die Wasserstoffbildungsrate der MES mit 500 µM AQS im Vergleich sehr hoch, die Methanbildungsrate jedoch deutlich niedriger als ohne Mediator. Generell ist die mittlere Stromstärke mit Mediatorzusatz höher als in der Kontrolle ohne Mediator.

#### AP 1.2 Bioelektromethanogenese-abhängige Transkriptom-/Proteomanalyse

Die Analyse von Stoffwechselfvorgängen auf der Ebene des Proteoms erfordert eine Reihe von Teilschritten, deren Ergebnisse im Folgenden dargestellt werden. Für die zytosolische Proteomanalyse ist der erste Schritt die Zellyse. Um die Lyse von mesophilen und thermophilen methanogenen Zellen durch Ultraschall zu optimieren, wurden verschiedene Einstellungen der Ultraschallanwendung hinsichtlich Amplitudenhöhe, Beschallungszeit, Pulsdauer und Anzahl der Wiederholungen getestet. Die Ergebnisse der Messungen, die in dreifacher Ausführung durchgeführt wurden, sind in Abbildung 8 dargestellt.



**Abbildung 8: Ergebnisse der Optimierung der Zellyse von mesophilen und thermophilen methanogenen Zellen. Die Messungen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt.**

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die folgenden Einstellungen am besten für die Zellyse von mesophilen und thermophilen Methanogenen geeignet waren.

**Tabelle 3: Übersicht über die am besten geeigneten Ultraschalleinstellungen für die Lyse von mesophilen und thermophilen Methanbildnern**

Setting	<i>M. thermautotrophicus</i>	<i>M. maripaludis</i>
<b>Amplitude</b>	20 %	20 %
<b>Beschallungszeit</b>	30 s	30 s
<b>Pulsdauer</b>	5 s	5 s
<b>Anzahl an Wiederholungen</b>	2	4

Das Proteom formotropher Methanbildner wurde mittels 2D-PAGE analysiert.



Abbildung 9 zeigt die Bilder des Polyacrylamidgels nach der Silberfärbung unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen für den Stamm *M. thermautotrophicus*. Hier wurden die Proteine vor der 2D-PAGE nicht markiert. Das linke Bild zeigt *M. thermautotrophicus*, der mit  $H_2/CO_2$  kultiviert wurde, während die Kulturen im rechten Bild Formiat als einzige Energiequelle verwendeten.



**Abbildung 9: Zweidimensionale Gelanalyse des Proteoms von *M. thermautotrophicus*, kultiviert auf  $H_2/CO_2$  (links) und Formiat (rechts). 200  $\mu g$  jeder Proteinprobe wurden zunächst durch IEF aufgetrennt und anschließend auf einem 12 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zur Visualisierung der Proteinspots wurde Silberfärbung verwendet.**

Die Zellyse war erfolgreich, da die Proteinspots auf dem Gel sichtbar waren. Außerdem konnten die Proteine in beiden Dimensionen aufgetrennt werden. Ein Vergleich der beiden Bedingungen war jedoch aufgrund der unklaren Spots nicht möglich. Auf dem rechten Gel (Ameisensäurekultivierung) waren deutlich weniger Spots zu sehen, obwohl die gleiche Proteinmenge auf das Gel aufgetragen wurde. Die folgende Abbildung zeigt die Darstellung der Polyacrylamid-Gele als Ergebnis der DIGE. Hier wurden die Proteine der einzelnen Stämme vor der 2D-PAGE angefärbt.



Abbildung 10: 2D DIGE G-Dye 200 (links) und G-Dye 300 (rechts) Bilder von *M. thermotrophicus*, gewachsen auf  $H_2/CO_2$  und Formiat

Auf beiden Abbildungen sind keine deutlichen Spots zu erkennen. Bei genauer Analyse, können Sie die Markerspots und einige Proteinspots erkennen. Dies zeigt an, dass die Gelelektrophorese erfolgreich war und die Probe Proteine enthielt, die aufgetrennt werden konnten. Die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Proteine konnten nicht sichtbar gemacht werden. Entweder gab es ein Problem mit der Markierung der Proteine oder die Ursache lag in einem der Zwischenschritte. Eine Möglichkeit ist, dass der zur Solubilisierung der Proteinproben verwendete Probenpuffer leicht von dem vom Hersteller empfohlenen Puffer abweicht. Der Grund für die Verwendung des Rehydratationspuffers als Probenpuffer war die Kompatibilität dieses Puffers mit dem nachfolgenden IEF-Schritt. Außerdem wurden die Gele nach der Gelelektrophorese und vor der Bildgebung mit Coomassie-Blau gefärbt. Die Färbung könnte jedoch die Fluoreszenzleistung beeinträchtigt haben, und es waren keine Spots sichtbar. Es wurde erwartet, dass Unterschiede in der Proteinexpression zwischen der Kultivierung auf  $H_2/CO_2$  und der Kultivierung auf Formiat in Form unterschiedlicher Spots oder unterschiedlicher Spotintensitäten sichtbar werden. Beispielsweise wurde erwartet, dass FDH (Formiatdehydrogenasen) in Kulturen, die auf Formiat kultiviert wurden, stärker reguliert wird als in Kulturen, die auf  $H_2/CO_2$  kultiviert wurden. Es wurde erwartet, dass dies als zusätzlicher Spot zu den mit G-Dye200 gefärbten Proteinen in der mit Formiat kultivierten Kultur sichtbar sein würde.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass alle notwendigen Methoden an der THM etabliert wurden, der Elektronentransfer jedoch nicht aufgeklärt werden konnte. Aus diesem Grund wurden im Rahmen einer zuwendungsneutralen Verlängerung der Förderung des Gesamtprojektes an der Universität Kiel (AG Schmitz-Streit) umfangreiche RNAseq-Datenanalysen durchgeführt (siehe entsprechender Teilbericht).

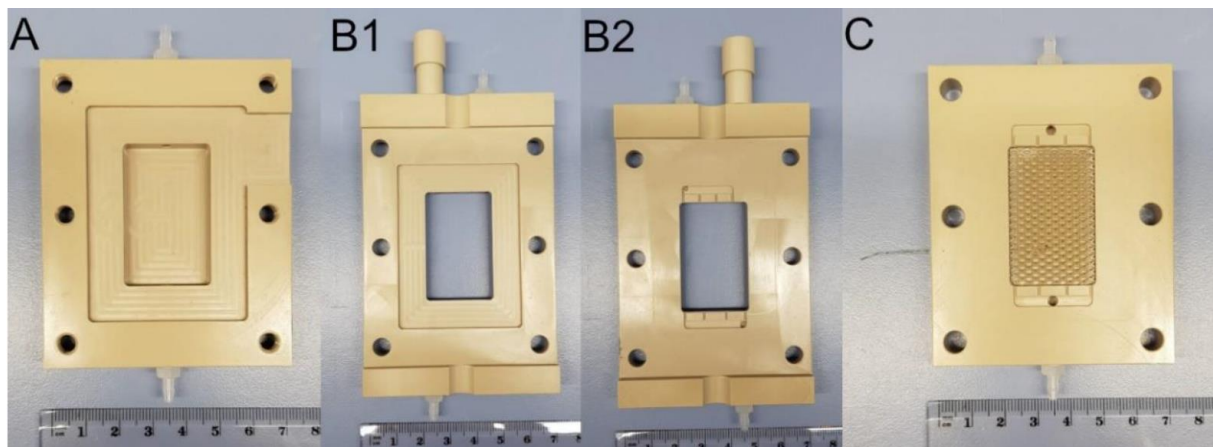
#### AP 1.3: 2-Phasen-System zur Separation von Isopren/-oiden

In diesem AP wurden als Extraktionsmittel Dodekan, Tetradekan, Pentadekan, Hexadekan, Methylbutyrat, Cyclodextrin, PEG 20000 sowie die Deep Eutectic Solvents Menthol/Dodekan und Menthol/Dodekansäure getestet und charakterisiert. Dabei wurden die höheren Alkane (Dodekan, Tetradekan, Pentadekan, Hexadekan) als geeignete Extraktionsmittel identifiziert. Bewertungskriterien waren die Extraktion der Isoprenoide, Umweltaspekte, Kosten, Arbeitssicherheit, Stabilität in elektrochemischen Reaktoren und Wechselwirkungen mit methanogenen

Produktionsorganismen. Diese Ergebnisse wurden an die TU Dresden übermittelt und dort mit entsprechenden Stämmen vertieft untersucht (siehe Bericht der TU Dresden).

#### AP 1.4: Formiat-abhängige Bioelektromethanogenese

Für Formiatsyntheseversuche mit einer GDE wurde ein Plattenreaktor eingesetzt. Der Reaktor wurde verwendet, um den Einfluss der Elektrolytzusammensetzung zu untersuchen und um e-Formiat (elektrochemisch erzeugtes Formiat) bereitzustellen. Der verwendete Plattenreaktor besteht aus Polyetheretherketon (PEEK), indem das Gas mit einem leichten Überdruck an der GDE entlangströmt. Der Druck wird durch ein Nadelventil auf der Gasaustrittsseite eingestellt. Der Elektrolytbereich wird durch eine Protonenaustauschmembran in eine Katholyt- und eine Anolytkammer geteilt. Die Nafionmembran verhindert dabei, dass in der Katholytkammer gebildetes Formiat, in die Anolytkammer gelangen kann, wo es sonst oxidiert werden würde. Durch diese Membran kann sich das Produkt auf der Kathodenseite anreichern und der Transport von Kationen von der Anodenseite zur Katholytkammer bleibt bestehen. Der Plattenreaktor besteht aus drei Hauptkomponenten, die in Abbildung 11 dargestellt sind. Jede dieser Komponenten ist mit jeweils zwei Gewinden für die Aufnahme von Einschraubtüllen ausgestattet, an die Schlauchleitungen angeschlossen werden können.



**Abbildung 11: Komponenten des Plattenreaktors**

In Abbildung 12 ist der Aufbau der Versuchsanlage dargestellt. Der Plattenreaktor befand sich zusammen mit den Elektrolytvorratsgefäßen in einer Inkubatorhaube. Eine Peristaltikpumpe befand sich außerhalb des Inkubators und förderte die Elektrolyte mit einem definierten Volumenstrom. Die Förderrichtung des Elektrolyten wurde von unten nach oben festgelegt, damit entstehendes Gas aus Nebenreaktionen besser aus dem Reaktor heraustransportiert werden konnte. Die CO<sub>2</sub>-Leitungen wurden so angeschlossen, dass Gas von oben nach unten durch den Plattenreaktor fließt. Auf diese Weise kann Elektrolyt, das durch die Gasdiffusionselektrode durchtritt mithilfe der Schwerkraft aus der CO<sub>2</sub>-Kammer gefördert wird. Auf der Gasaustrittsseite des Reaktors wurde eine Schlauchleitung mit einem Drucksensor und einem Nadelventil verbunden. Mit Hilfe des Druckmessgerätes und dem Nadelventil wurde der Betriebsdruck auf 40 mbar eingestellt. Als Potentiostat wurde ein Interface 1010B verwendet. Die GDE wurde als Arbeitselektrode geschaltet.

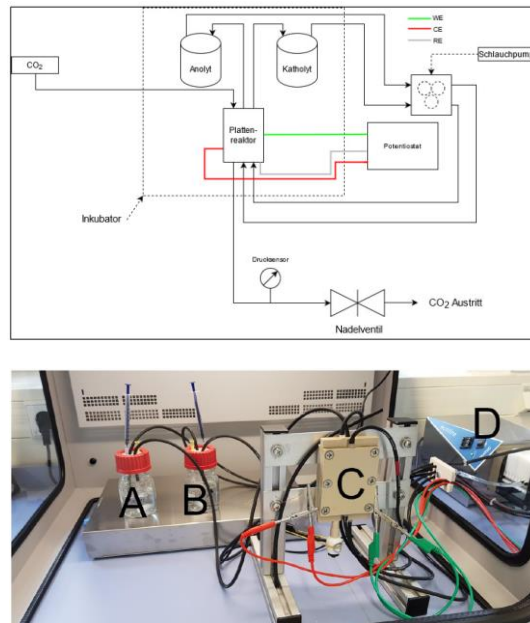


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Versuchsanlage, WE = Arbeitselektrode, CE = Gegenelektrode, RE = Referenzelektrode (rechts), Versuchsaufbau innerhalb des Inkubators. A = Anolytvorratsgefäß, B = Katholytvorratsgefäß, C = Plattenreaktor, D = Peristaltikpumpe (links)

Die Formiatsynthese im oben beschriebenen Plattenreaktor wurde unter verschiedenen Bedingungen charakterisiert. Beispielhaft sind hier Synthesen bei verschiedenen Temperaturen dargestellt. Abbildung 13 zeigt die erzielten Konzentrationen an Formiat die entsprechenden Faraday-Effizienzen nach 240 Minuten Syntheszeit. Ab 60 °C ist die Endkonzentration und Effizienz leicht abgefallen.

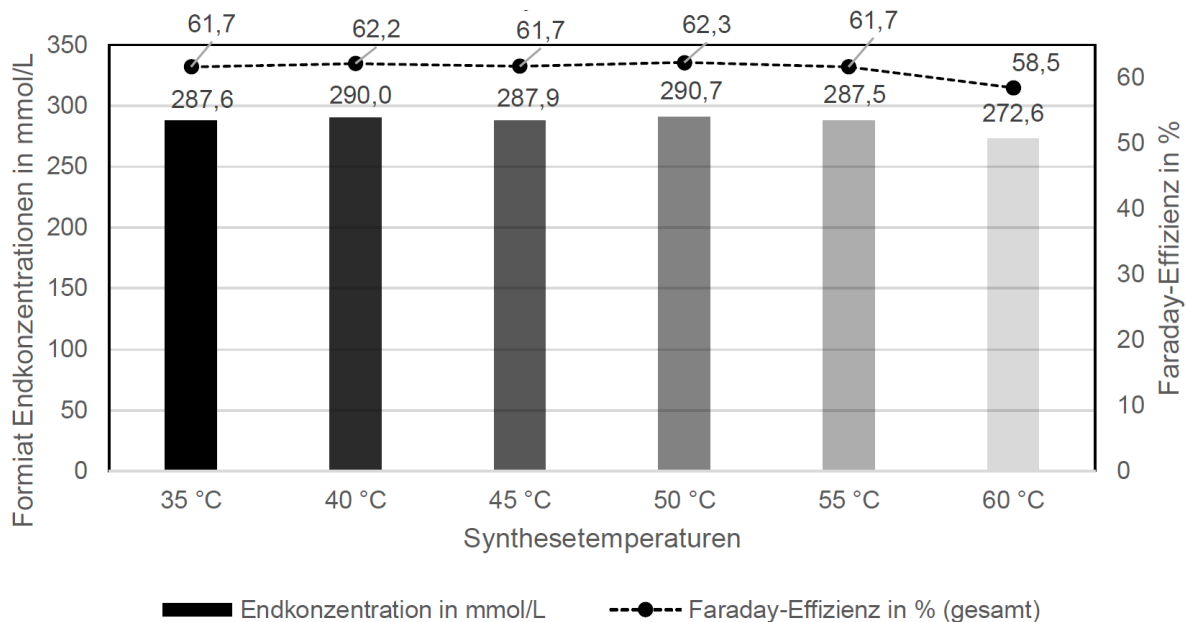
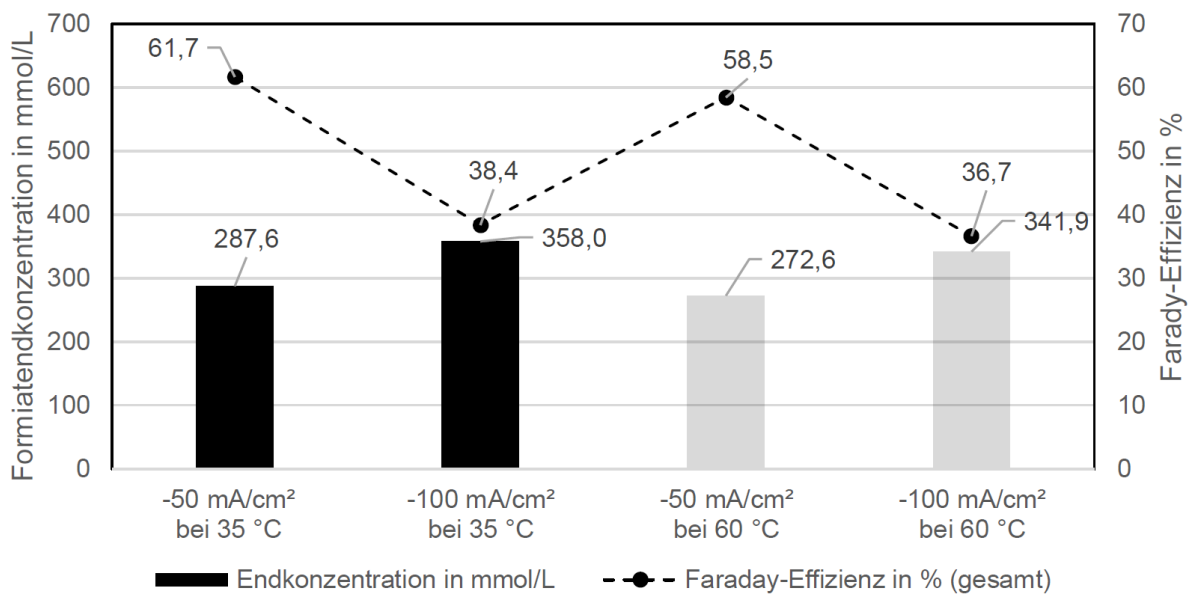


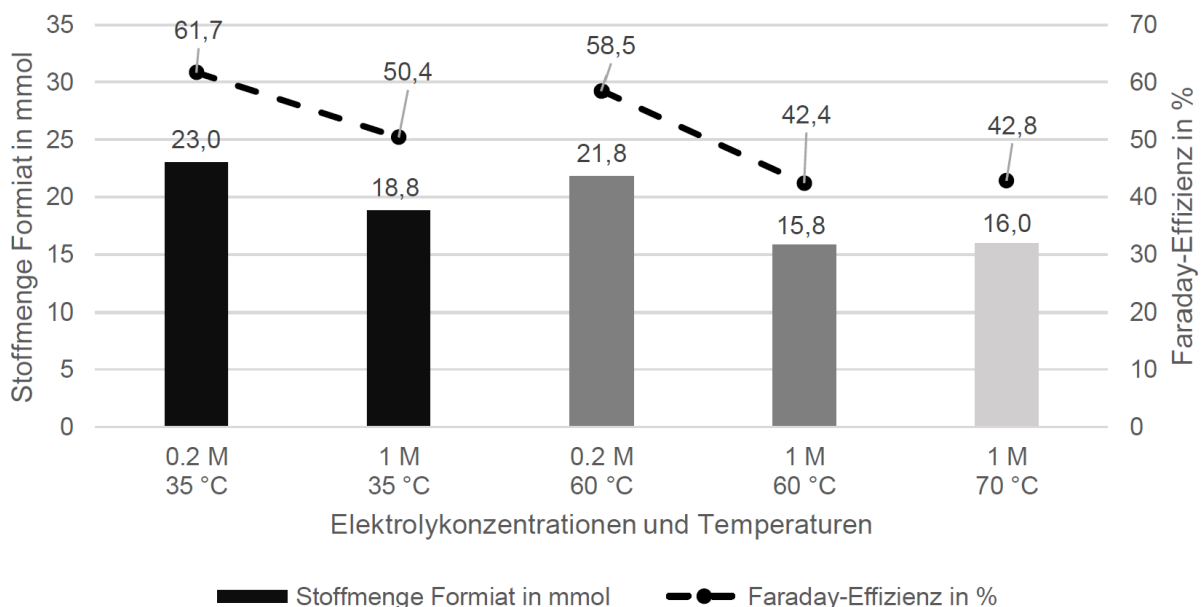
Abbildung 13: Formiat-Konzentrationen und Faraday-Effizienzen nach 4 h Syntheszeit

Im nächsten Schritt wurden bei verschiedenen Temperaturen unterschiedliche Stromdichten untersucht (Abbildung 14). Bei einer Stromdichte von  $-100 \text{ mA/cm}^2$  konnte mehr Formiat synthetisiert werden als bei  $-50 \text{ mA/cm}^2$ . Dies ging jedoch mit einer deutlichen Verschlechterung der Faraday-Effizienz einher. Der Temperatursprung von 35 auf 60 °C führte bei beiden Stromdichten zu einer Verschlechterung der Faraday-Effizienz.



**Abbildung 14: Der Einfluss der Stromdichten und Temperaturen auf die Formiatkonzentrationen und Faraday-Wirkungsgrade nach 4 h Syntheszeit verglichen**

In Abbildung 15 sind die erzeugten Formiatmengen und die erzielten Faraday-Wirkungsgrade in Abhängigkeit von der Elektrolytkonzentration und der Synthesetemperatur dargestellt. Zum besseren Vergleich ist anstelle der Konzentration die Formiat-Stoffmenge dargestellt, da im Versuch mit der höheren Elektrolytkonzentration das Volumen von 80 auf 100 ml geändert wurde. Mit der Erhöhung der Elektrolytkonzentration von 0,2 M auf 1 M nahm sowohl die produzierte Formiatmenge als auch die Faraday-Effizienz ab. Die Erhöhung der Temperatur von 35 auf 60 °C führte zu einer Verringerung der Formiatmenge und der Faraday-Effizienz. Die höheren Elektrolytkonzentrationen scheinen die Synthese stärker negativ beeinflusst zu haben als die Temperaturerhöhung. Eine weitere Erhöhung der Synthesetemperatur auf 70 °C führte bei 1 M Elektrolyt zu keiner weiteren Veränderung der Synthese.



**Abbildung 15: Der Einfluss der Elektrolytkonzentration und der Temperatur auf die Formiatbildung und die Faraday-Effizienz werden im Vergleich dargestellt.**

Das hier hergestellte Formiat wurde in der Versuchsreihe in AP 1 eingesetzt und mit handelsüblichem Formiat verglichen. Es konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

#### AP 1.5: Formiat-abhängige Isopren/-oid-Produktion mittels MES

In diesen Arbeiten sollten die vorherigen Arbeitsschritte in dem Reaktor zusammengeführt und die Synthese von Isopren/-oiden auf elektrochemisch erzeugtem Formiat untersucht und optimiert. Dabei sollten insbesondere die Ertragskoeffizienten Biomasse pro Substrat und Produkt pro Substrat adressiert. Weiterhin wird die Raum-Zeit-Ausbeute untersucht. Am Ende des Arbeitsschrittes soll ein Konzept für das *upscaling* des Reaktionssystems entwickelt werden. Die Arbeiten wurden plangemäß durchgeführt und alle Vorarbeiten für die elektrobiotechnologische Zweistufensynthese von Isoprenen geleistet. Die Umsetzung von CO<sub>2</sub> zu Formiat wurde Formiat wurde an der THM vollständig charakterisiert und etabliert - nach Bereitstellung des entsprechenden Stammes durch die AG Rother hätte das AP abgeschlossen werden können. Da trotz intensiver Bemühungen (siehe Bericht der AG Rother) kein entsprechender Stamm bereitgestellt werden konnte, wurden die Betrachtungen auf die Methanbildung beschränkt.

Tabelle 4 zeigt die entsprechende Verbrauchs- und Produktionsraten sowie die Ausbeutekoeffizienten.

**Tabelle 4: Darstellung des Substratverbrauchs, der Produktbildungsrate und des Substrat-Produkt-Verhältnisses für verschiedene formiatverwertende Methanbildner.**

Organismus	$r_{HCOO^-}$	$r_{CH_4}$	H <sub>2</sub> : CH <sub>4</sub>	CO <sub>2</sub> : CH <sub>4</sub>
<i>M. maripaludis</i>	-0.225 ± 0.012	0.043 ± 0.000	6.5 ± 0.5	2.6 ± 0.2
<i>M. thermautotrophicus</i>	-0.188 ± 0.057	0.039 ± 0.017	5.5 ± 0.2	0.8 ± 0.1
<i>M. defluvii</i>	-0.078 ± 0.001	0.018 ± 0.000	4.3 ± 0.1	0.8 ± 0.0
<i>M. okinawensis</i>	-	-	-	-
<i>M. formicicum</i>	-0.062 ± 0.016	0.011 ± 0.006	6.0 ± 0.3	0.9 ± 0.0
<i>M. palustre</i>	-0.152 ± 0.002	-	-	-
<i>M. voltae</i>	-0.483 ± 0.029	0.059 ± 0.006	11.4 ± 2.1	2.2 ± 0.8

Das Upscalingkonzept (Abbildung 16) sieht eine zwischengeschaltete Elektrodialyse vor, um den direkten Kontakt zwischen Methanbildnern und Elektroden zu vermeiden. Die Anoden- und Kathodenräume sowie die Membranen können dann entsprechend angepasst werden. Das Konzept wurde in ersten Vorversuchen evaluiert und wird nach Projektende weiter optimiert.

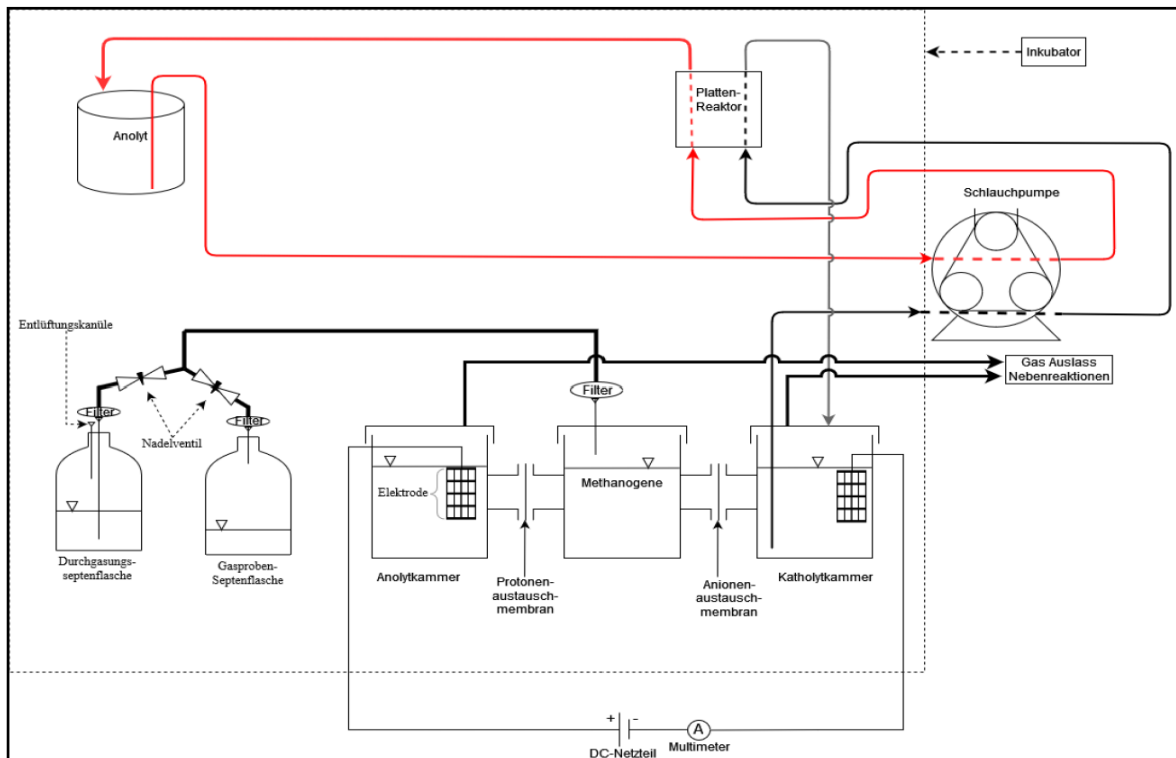


Abbildung 16: Schematische Darstellung eines Scale-up-Konzeptes für eine Elektro-Methanogenese mit-Elektrodialyse

## Zusammenfassung/Abgleich

Die folgende Tabelle zeigt den Endstatus der geplanten und in der Projektbeschreibung dargestellten Meilensteine (dargestellt sind nur die Meilensteine, für die die THM verantwortlich war). Es wurden alle geplanten Meilensteine erreicht.

**Tabelle 5: Endstatus der Meilensteine (MS)**

<b>Meilenstein</b>	<b>Endstatus</b>
Meilenstein 1.1: Bioelektromethanogenese in <i>M. acetivorans</i> , <i>M. mazei</i> und <i>M. thermautotrophicus</i> ist charakterisiert.	Erreicht
Meilenstein 1.2: Transkriptom- und/oder Proteomanalysen von methanogenen Stämmen in MES sind durchgeführt und ausgewertet.	Erreicht (*)
Meilenstein 1.3: Ein 2-Phasen-System für die Abtrennung des Isopren/-oids aus mikrobiellen Elektrosynthesen ist etabliert	Erreicht
Meilenstein 1.4: Elektrochemische Erzeugung von Formiat und seine mikrobielle Umsetzung ist charakterisiert.	Erreicht
Meilenstein 1.5: Synthese von Isopren/-oiden aus Formiat ist charakterisiert.	Teilweise erreicht (**)

(\*) Der in der Projektbeschreibung beschriebene Meilenstein wurde vollständig erreicht, jedoch konnten keine neuen Erkenntnisse über die zugrundeliegenden Mechanismen des Elektronentransfers gewonnen werden.

(\*\*) Trotz intensiver Forschungsarbeiten an der TU Dresden (siehe entsprechender Bericht) konnte der THM kein Stamm für die Synthese von Isopren/Oliven zur Verfügung gestellt werden. Durch ergänzende Arbeiten konnte jedoch die Zusammenführung der Arbeiten der THM am Beispiel der Methanbildung aufgezeigt und hier die Ertragskoeffizienten Biomasse pro Substrat und Produkt pro Substrat sowie die Raum-Zeit-Ausbeute untersucht werden.

## **Verwendung der Zuwendung**

Die folgende Tabelle zeigt die wichtigsten Positionen gemäß dem zahlenmäßigen Nachweis.

**Tabelle 6: Ausgaben gemäß dem zahlenmäßigen Nachweis**

<b>Position</b>	<b>Kurzbeschreibung</b>	<b>Planungszahlen in €</b>	<b>Summe in €</b>
0812	Wissenschaftliches Personal	205.714,00	212.124,16
0835	Aufträgen an Dritte	4.000,00	4.015,65
0843	Sachmittel	28.800,00	25.582,69
0846	Reisekosten	5.355,00	2.595,12
0850	Geräte	37.329,00	37.328,68
<b>Summe</b>		<b>281.198,00</b>	<b>281.646,30</b>

Im Weiteren werden der Personaleinsatz und weiteren Positionen kurz erläutert:

Die Personalkosten unter Position 0812 wurden für die Finanzierung des wissenschaftlichen Mitarbeiters verwendet, der die wissenschaftlichen Arbeiten unter Anleitung des Projektleiters durchführte.

Gegenstand von Aufträgen an Dritte war die Herstellung von Reaktoren für elektrobiotechnologische Untersuchungen.

Im Rahmen des Projektes wurden insbesondere die folgenden Sachmittel (Position 0843) angeschafft: spezielle Feinwerkzeuge für die Herstellung der Elektroden, Glasgeräte, Halbzeuge und Reaktormaterial (z.B. Plexiglas, PEEK oder Edelstahl), Elektrodenmaterialien (z.B. Graphit, Platin), Verbrauchsmaterialien (z.B. Kanülen, Spritzen, Filter, Reaktionsgefäße), Kultivierungssysteme (z.B. Erlenmeyer-Kolben), Mikrotiterplatten, Gase für Kultivierung und Analytik, Referenzelektroden, Verbrauchsmaterialien für Analytik, Chemikalien und Medien-Komponenten, Enzyme, Kits für die Molekularbiologie und Transkriptom-/Proteomanalyse.

Die Reisekosten (0846) dienen dem wissenschaftlichen Austausch und der Präsentation der Ergebnisse auf nationalen und internationalen Tagungen.

Drei Potentiostaten, zwei Inkubatoren und ein Mehrstellen-Magnetrührer wurden wie geplant unter Position 0850 angeschafft. Die Potentiostaten wurden permanent für die Durchführung von elektrochemischen Experimenten (IET, DET und MET) verwendet. Die Inkubationshaube und der Mehrstellen-Magnetrührer wurde für die Durchführung von Experimenten unter kontrollierten mikrobiologischen und elektrochemischen Bedingungen beschafft. Nach Absprache mit dem PTJ wurde zusätzlich ein RI-Detektor zuwendungsneutral beschafft und zur Analyse von Substraten und Produkten eingesetzt.

### **Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten**

Die im Projekt durchgeführten Forschungsarbeiten und die dafür eingesetzten Ressourcen waren notwendig und angemessen, da sie der im Projektantrag formulierten Planung entsprechen und alle im Arbeitsplan formulierten Aufgabenschwerpunkte erfolgreich bearbeitet wurden.

Die THM wendet erhebliche Mittel für die Infrastruktur und die Modernisierung der Grundausstattung der wissenschaftlichen Arbeitsgruppen auf. Sie übernahm die Arbeitsplatzkosten sowie die Kosten für Wasser und Strom. Die Mess- und Analysegeräte der THM wurden für das Projekt genutzt.

Eine Finanzierung der für das beantragte Projekt erforderlichen Personalstellen, Geräteinvestitionen, Sachmittel und Reisekosten durch die THM ist nicht möglich.

### **Fortgeschriebener Verwertungsplans**

Aus dem vorliegenden Teilprojekt an der THM ergibt sich eine Vielzahl von Vorteilen für Unternehmen unterschiedlicher Branchen und für eine nachhaltige Wirtschaft in Deutschland:

1. Die Speicherung von Überschussstrom als chemischer Energiespeicher Methan leistet einen Beitrag zur Sicherung der Energieversorgung in Deutschland einen Beitrag zur Sicherung der Energieversorgung in Deutschland.

2. Die MES ermöglicht mildere Reaktionsbedingungen (Druck, Temperatur) als der etablierte Sabatier-Prozess, daher wird eine höhere Akzeptanz in der Industrie erwartet.
3. Eine Reduzierung des Energiebedarfs für die CO<sub>2</sub>-Reduktion zu Methan bei mikrobiellen Elektrosynthesen um bis zu 80 % gegenüber der elektrochemischen Katalyse führt zu einer höheren Akzeptanz in der Industrie.
4. Extrem hohe Energieausbeute - mehr als 80 % der eingesetzten Elektronen werden in der MES auf das CO<sub>2</sub> übertragen, um Methan zu erzeugen.
5. Reduzierung der CO<sub>2</sub>-Emissionen und damit leichteres Erreichen der Ziele des Kyoto-Protokolls.
6. Durch die Integration der Mikrobiellen Elektrosynthese in bestehende Biogasanlagen ergeben sich Möglichkeiten der Prozessintegration, z.B. Wärmenutzung, und damit einen geringeren Investitionsaufwand.

Im Rahmen des Projektes wurden die Punkte 1. bis 5. untermauert, der Punkt 6. muss im Folgenden weiter untersucht werden.

Die folgenden Tabellen zeigen sowohl die wirtschaftlichen als auch die wissenschaftlichen Erfolgsaussichten aus Sicht der THM. Es werden jeweils die ursprünglichen Planungen, die bisher durchgeführten Maßnahmen sowie die geplanten weiteren Maßnahmen dargestellt.

**Tabelle 7: Tabellarische Übersicht der projektspezifischen wirtschaftlichen Erfolgsaussichten mit Zeithorizont**

Gegenstand/Instrument	Ursprüngliche Planung	Erfolgte Umsetzung	Weitere Planung
Etablierung eines neuen ressourceneffizienten Elektronentransfers für Methanogene	Ggf. schon während der Projektlaufzeit	Die Prinzipien wurden erfolgreich untersucht und die Leistungsdaten verglichen. Einer Umsetzung stehen derzeit hohe und unsichere Strompreise sowie fehlende Skalierungskonzepte entgegen.	Zur Untersuchung der Skaleneffekte wird derzeit ein Antrag im Rahmen der Ausschreibung "Vermeidung klimarelevanter Prozessemissionen in der Industrie (KlimPro-Industrie II)" mit Industriepartnern vorbereitet.
Schutzrechte und Vergabe von Lizenzen auf den ressourceneffizienten Elektronentransfer für Methanogene	Ab Projektende, 0-5 Jahre nach Projektende	Noch offen.	Die Schutzrechtssituation wird kontinuierlich mit dem Industriepartner erörtert.
Die THM unterstützt ausdrücklich die Gründung von Spin-off-Unternehmen, die	Ab Projektende, 0-5 Jahre nach Projektende	Noch offen.	Die Markteintrittsbarrieren werden durch das o.g. Folgeprojekt

Gegenstand/Instrument	Ursprüngliche Planung	Erfolgte Umsetzung	Weitere Planung
gegebenenfalls (Teil)-Ergebnisse des Projektes nutzen.			gesenkt. Durch den Wechsel des Projektleiters D. Holtmann werden diese Aspekte nun am KIT weiterverfolgt.

**Tabelle 8: Zusammenstellung der wissenschaftlichen und/oder technischen Erfolgsaussichten**

Gegenstand/Instrument	Ursprüngliche Planung	Erfolgte Umsetzung	Weitere Planung
Erstellung von Publikation mit (Teil)-Ergebnissen in nationalen und internationalen Fachtagungen	Während der Laufzeit, 0-2 Jahre nach Abschluss der Arbeiten	Es wurden bisher drei Publikationen im Themengebiet des Antrages und unter Beteiligung des Doktoranden M. Pfitzer publiziert (siehe * unten).	Eine weitere Publikation ist vorbereitet.
Wissenschaftliche Vorträge auf nationalen und internationalen Veranstaltungen	Während der Laufzeit, 0-2 Jahre nach Abschluss der Arbeiten	Es wurden bisher zwei Vorträge und Posterbeiträge auf internationalen Tagungen gehalten.	Nach Ankündigung durch Veranstalter.
Ausbildung von Bachelor- und Master-Student*innen	Während der Laufzeit	Eine Bachelor- und drei Masterarbeiten sowie ein Forschungspraktikum an der THM wurden zu diesem Thema durchgeführt.	
Übernahme der Ergebnisse in die Lehre der Hochschule	0-5 Jahre nach Abschluss der Arbeiten	Die Ergebnisse des Projektes wurden und werden in die Lehre von Dirk Holtmann am KIT integriert (Bachelorvorlesung „Intensivierung von Bioprozessen“ (ab SS 25) und Mastervorlesung „Elektrobiotechnologie“ (seit WS 23/24)).	
Qualifizierung von Fach- und Führungskräften	0-10 Jahre nach Abschluss der Arbeiten	Es wird gerade eine Promotion von Marc Pfitzer finalisiert.	
(Teil)-Ergebnisse werden in öffentlich geförderte Folge-Projekte Eingang finden.	Während der Laufzeit, 0-2 Jahre nach Abschluss der Arbeiten	Es wird aktuell ein Folgeprojekt initiiert und Teilaspekte werden	Teilaspekte des Projektes sollen Eingang in weitere Drittmittelanträge finden.

Gegenstand/Instrument	Ursprüngliche Planung	Erfolgte Umsetzung	Weitere Planung
		bereits in dem Projekt „GAMES - Gasdiffusions-elektroden für gekoppelte mikrobielle-elektrochemische Synthesen aus CO <sub>2</sub> “ weitergeführt.	


\*)

- Enzmann, F., Stöckl, M., Pfitzer, M., Holtmann, D. (2021). Empower C1: Combination of Electrochemistry and Biology to Convert C1 Compounds. In: Zeng, AP., Claassens, N.J. (eds) One-Carbon Feedstocks for Sustainable Bioproduction. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 180. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/10\\_2021\\_171](https://doi.org/10.1007/10_2021_171)
- Contreras, J. Thomsen, M. Pfitzer, D. Hafenbradl, D. Kostner, D. Holtmann, R.A. Schmitz, M. Rother, B. Molitor (2022) New perspectives for biotechnological applications of methanogens, Current Research in Biotechnology,4, <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2022.10.001>.
- Pfitzer, M., Mayer, F., Mangold, K.-M., Holtmann, D., Stöckl, M. (2022) Straightforward synthesis of magnetized activated carbon particles, Nano-Structures & Nano-Objects, 30, <https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2022.100875>

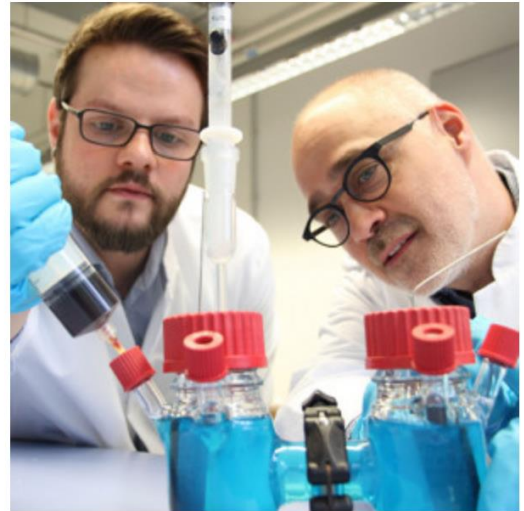
Es wurden weiterhin ergänzende Maßnahmen zum Ergebnistransfer durchgeführt:

- Es wurde im Internet der THM über das Projekt berichtet: <https://www.thm.de/site/hochschule/campus/aktuelles/aus-lehre-und-forschung/biooekonomie-als-ressourcenschonende-zukunftstechnologie.html> (diese Nachricht wurde auch als Pressemitteilung verteilt und u.a. in der regionalen Presse veröffentlicht)

# Bioökonomie als ressourcenschonende Zukunftstechnologie

 Erstellt: 25. Februar 2020

Mit dem Einsatz methanbildender Mikroorganismen in der industriellen Bioökonomie befasst sich ein Forschungsprojekt, an dem die Technische Hochschule Mittelhessen beteiligt ist. Prof. Dr. Dirk Holtmann vom Gießener Fachbereich Life Science Engineering arbeitet dabei mit dem Institut für Mikrobiologie der TU Dresden zusammen. Weitere Kooperationspartner sind die Universitäten in Kiel und Tübingen sowie die Electrochea GmbH. Das Münchner Start-up hat ein neuartiges Verfahren zur Umwandlung des Klimagases CO<sub>2</sub> und elektrischer Energie in Erdgas entwickelt. Diese „Power-to-Gas-Technologie“ dient zur Speicherung von Strom aus regenerativen Quellen. Das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) fördert das Teilprojekt der THM mit 340.000 Euro.



**Abbildung 17: Auszug aus der Pressemeldung der THM.**

- Die Pressemitteilung war Basis für einen Bericht in DUZ transfer 02/20, herausgegeben von der Hochschulallianz für den Mittelstand (<https://hochschulallianz.de/publikationen/ausgabe-2-20-juli/>)
- Es wurden für die Serien Hessen schafft Wissen (<https://www.hessen-schafft-wissen.de/artikel/podcast-dirk-holtmann>) eine Podcast-Folge mit deutlichem Bezug zu dem Projekt MethanoPEP aufgenommen.

## **Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordenen Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen**

Die kontinuierliche Recherche (wissenschaftliche Literatur und Patente) während der Projektlaufzeit ergab keine Ergebnisse, die der Zielerreichung entgegenstehen. Es ist jedoch eine verstärkte Publikationstätigkeit anderer Gruppen im Bereich der Elektro-Methanogenese festzustellen. Dies unterstreicht die Relevanz des Forschungsthemas.

## **Erfolgte und geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses**

Die Veröffentlichungen wurden im Rahmen des vorgeführten Verwertungsplans erläutert.