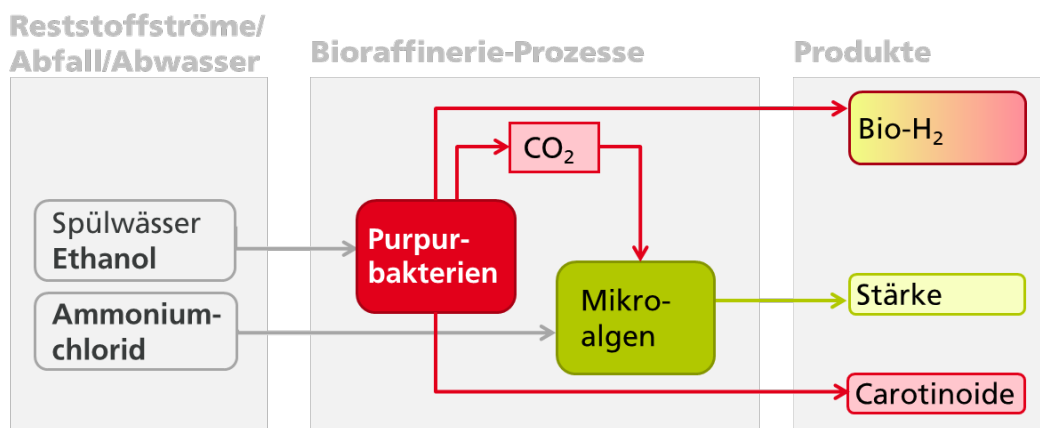


Gemeinsamer Abschlussbericht zum  
Verbundprojekt SmartBioH<sub>2</sub>-BW  
im Rahmen des  
EFRE-Programms Baden-Württembergs:  
Bio-Ab-Cycling – Bioraffinerien zur Gewinnung von Roh-  
stoffen aus Abfall und Abwasser: „Bio-Ab-Cycling“ für  
den Zeitraum 10/2021 - 10/2024

## Die Wasserstoffbioraffinerie



**SmartBioH<sub>2</sub>-BW – Biowasserstoff aus industriellen Abwässern und Reststoffströmen als Plattform für vielseitige Biosynthesewege**



Gefördert durch  
Baden-Württemberg  
Ministerium für Umwelt, Klima  
und Energiewirtschaft

Kofinanziert von der  
Europäischen Union

## Autoren und Verantwortliche der einzelnen Arbeitspaketen:

TP-Nr.	Zielsetzung	Leiter	Aktivitäten
0	Projektkoordination und -management	Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB  Stellvertretend: Fraunhofer-Institut für Produktionstechnik und Automatisierung IPA	0.1 Berichte 0.2 Projekttreffen 0.3 Pressemitteilungen/ Fachartikel in Abhängigkeit vom Projektfortschritt
1	Screening potenzieller Substrate (Rest- und Abwasserströme)	Institut für Biomaterialien und biomolekulare Systeme (IBBS) – Universität Stuttgart  Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB (IM1)	1.1 Analyse der Rest- und Abwasserströme am Standort Rheinfelden 1.2 Optimierung verschiedener Nährsubstratkombinationen zur Kultivierung von <i>R. rubrum</i>
2	Entwicklung einer spezifische Bewertungssystematik unter Berücksichtigung ökonomischer und ökologischer Kriterien	Fraunhofer-Institut für Produktionstechnik und Automatisierung IPA  Institut für Energieeffizienz in der Produktion (EEP) – Universität Stuttgart	2.1 Technische Abstraktion der Teilprozesse und Übertrag in modulares und kombinierbares Verfahrens-Grundmodell 2.2 Definition des Untersuchungsrahmens und Auswahl der Bewertungskriterien 2.3 Priorisierung der Bewertungskennzahlen für Bioraffinerie-Konzepte und Überführung in eine Systematik
3	Simulationsmodell zur techno-ökologischen und ökonomischen Bewertung	Institut für Energieeffizienz in der Produktion (EEP) – Universität Stuttgart  Fraunhofer-Institut für Produktionstechnik und Automatisierung IPA	3.1 Aspen Plus Modellierung der Stoff- und Energieflüsse 3.2 Umberto Modell zur Ökobilanzierung und Verknüpfung mit Stoff- und Energieflussmodell 3.3 Integration der Bewertungssystematik in das verknüpfte Bewertungsmodell und Entwicklung einer Benutzeroberfläche
4	Simulation für die Bewertung der Ökologie und Ökonomie unterschiedlicher Prozessoptionen	Fraunhofer-Institut für Produktionstechnik und Automatisierung IPA  Institut für Energieeffizienz in der Produktion (EEP) – Universität Stuttgart	4.1 Simulationen zur vergleichenden Bewertung verschiedener Prozesskombinationen 4.2 Simulation zur detaillierten techno-ökologischen und ökonomischen Bewertung und Validierung 4.3 Simulationen zur Identifikation von vielversprechenden technischen Entwicklungsansätzen
5	Verfahrenstechnische und mikrobiologische Entwicklungen für den Aufbau einer Pilotanlage	Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB (IM1+IM3) – mit alle	5.1 Verfahrensoptimierung für gezielte semi-aerobe H <sub>2</sub> -Produktion mit <i>R. rubrum</i> 5.2 Genom-Screening von <i>R. rubrum</i> , für weitere H <sub>2</sub> -Überproduzenten, die auf Reststoffströmen von Evonik wachsen können

TP-Nr.	Zielsetzung	Leiter	Aktivitäten
		Institut für Biomaterialien und biomolekulare Systeme (IBBS) – Universität Stuttgart	5.3 Optimierung Verfahrenskonzepte (Batch, FedBatch, Produktionsphase) für hohe Raum-Zeitausbeute im Laborreaktor 5.4 Optimierung der Belüftung zur H <sub>2</sub> - und CO <sub>2</sub> -Produktion; Scale-up; technischer Aufbau zur Kopplung des <i>R. rubrum</i> Prozesses mit der Kultivierung von Algen 5.5 Aufbau und Inbetriebnahme eines 5x25L Photobioreaktor-Moduls zur Algenkultivierung; Integration CO <sub>2</sub> -Verwertung und interne Abgasrückführung; Prozessoptimierung hinsichtlich Licht, CO <sub>2</sub> und Nährstoffgehalt 5.6 Entwicklung 2-stufiger Prozess zur H <sub>2</sub> -Produktion mit <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; Optimierung Stärkegehalt und Lichtintensität unter anaeroben Bedingungen
6	Technische Machbarkeit des Konzeptes anhand eines Demonstrators	Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB (IM1+IM3)  Assoziierter Partner Evonik	6.1 Planung und Aufbau der Pilotanlagen unter Beachtung der Passfähigkeit der Schnittstellen

## Inhaltsverzeichnis

1	Kurzzusammenfassung: Beschreibung des Vorhabens und der modularen Bioraffinerie	1
2	Motivation des Vorhabens und eigene Erwartungen - Beitrag des Vorhabens zur Umsetzung der Landesstrategie Nachhaltige Bioökonomie	2
3	Beschreibung des Themas und Stand der Technik	3
	3.1 Problemstellung	3
	3.2 Stand der Forschung und Ansatz des Vorhabens	3
	3.2.1 Biotechnologische Wasserstoffherstellung	3
	3.2.2 CO <sub>2</sub> -Fixierung durch Mikroalgen	5
	3.2.3 Nachhaltigkeitsbewertung	5
	3.2.4 Öffentlichkeitsarbeit und Kommunikation	6
4	Durchführung des Projekts	6
	4.1 Aktualisierte Darstellung des zeitlichen und inhaltlichen Projektablaufs – Ziele und Meilensteine	6
5	Aufzählung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse und deren Bewertung	9
	5.1 Darstellung der wichtigsten Ergebnisse und Meilensteine	9
	5.2 Ergebnisdarstellung gegliedert nach Themen	9
	5.2.1 Screening potenzieller Substrate (Rest- und Abwasserströme)	10
	5.2.2 Entwicklung einer spezifischen Bewertungssystematik unter Berücksichtigung ökonomischer und ökologischer Kriterien	14
	5.2.3 Simulationsmodell zur techno-ökologischen und ökonomischen Bewertung	20
	5.2.4 Simulation für die Bewertung der Ökologie und Ökonomie unterschiedlicher Prozessoptionen	23
	5.2.5 Verfahrenstechnische und mikrobiologische Entwicklungen für den Aufbau einer Pilotanlage	30
	5.2.6 Technische Machbarkeit des Konzeptes anhand eines Demonstrators	41
6	Praktische Anwendbarkeit und Roll-out	46
	6.1 Übertragbarkeit der getesteten Technologien in die Praxis	46
	6.2 Wirtschaftliche Aussichten der Verwertungswege	47
	6.3 Was wird benötigt um die Technologie in die Anwendung zu bringen?	49
7	Ausblick und Entwicklungsperspektive	50
8	Literaturverzeichnis	50

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht der Substrat- und Produktströme innerhalb des Bioraffineriekonzepts des Projekts SmartBioH2.....	1
Abbildung 2: Einfluss der Alkoholkonzentrationen von Ethanol, Toluol und Methanol auf das Wachstum von <i>R. rubrum</i> . Die Wachstumsrate ist normiert auf einen Kontrollversuch ohne Alkohol. ....	10
Abbildung 3: Photosynthetisches (ps, anaerob) und semi-aerobes (saer, dunkel) Wachstum von <i>R. rubrum</i> Wild-Typ S1 mit verschiedenen Ethanol (EtOH)-Substrat-Kombinationen. Als Inokulum wurden gewaschene Zellen aus semi-aeroben M2S-Kulturen verwendet. Die Absorptionswerte bei 660 nm (Zelldichte) sind als Balken, das Verhältnis A882/A660 (Membranen/Zelle) als rote Punkte gezeigt (Mittelwerte aus jeweils 3 Messungen mit Standardabweichungen als Fehlerbalken). ....	11
Abbildung 4: Semi-aerobe Kultivierung mit EtOH als einzigem Substrat.....	11
Abbildung 5: Wachstumskurven von <i>R. rubrum</i> -Kulturen, die an höhere EtOH-Konzentrationen angepasst wurden. Schon nach der zweiten Passage ist eine signifikante Verkürzung der lag-Phase bei Wachstum mit 2% Ethanol sichtbar. ....	12
Abbildung 6: Wachstum des im Projekt entwickelten EtOH-angepassten Stamms S1E mit EtOH als einziger C-Quelle. ....	12
Abbildung 7: Mit EtOH gezüchtete <i>R. rubrum</i> Zellen zeigen eine Überproduktion an PHB. ....	13
Abbildung 8: Prozessabstraktion, Systemgrenzen und Massenströme des untersuchten Bioraffineriekonzepts mit Input (I), Emissionen (E), Produkten (P) und Abfälle (W). Die H <sub>2</sub> und CO <sub>2</sub> Ströme zwischen den Prozessschritten und zwischen den verschiedenen Teilsystemen sind in grau dargestellt. DP= „Downstream Processing“ . ....	15
Abbildung 9: Systemgrenzen des untersuchten Bioraffinerie-Konzepts.....	16
Abbildung 10: Überblick der angewendeten Bewertungssystematik.....	17
Abbildung 11: Bildschirmausschnitt von Aspen Plus® Modell für „Dunkel-Photosynthese“. ....	20
Abbildung 12: „Global Warming Potential“ Auswirkungen für einen Zyklus der Algenkultivierung in einem 125 L „Airlift“ Reaktor (ein Zyklus = 4 Tage, 24 h/Tag) (DP = „Dunkel-Photosynthese“). ....	24
Abbildung 13: Prozentualer Beitrag für ausgewählte LCA Wirkungskategorien für das gesamte Bioraffinerie Konzepts. (GWP = „Global Warming Potential“; FE = „Freshwater Eutrophication Potential“; ME = „Marine Eutrophication Potential“; FTA = „Freshwater and Terrestrial acidification Potential“; FD = „Fossil Depletion“). ....	26
Abbildung 14: Umweltauswirkungen für unterschiedliche Prozessoptionen. ....	29
Abbildung 15: Veränderung des Redoxpotentials (links) während der Kultivierung von <i>R. rubrum</i> mit und ohne Ethanol im 1 L Bioreaktor. Wasserstoffbildungsraten ohne Ethanol, mit Ethanol und mit einer zusätzlichen Stickstoffbegasung zur Einstellung der Redoxpotentiale (rechts). Der semiaerobe Bereich wird definiert zwischen -150 und -400 mV. ....	30
Abbildung 16: (A) Differenzspektroskopie der wasserlöslichen Fraktionen aus aufgeschlossenen Zellen, die in verschiedenen Kulturmedien gezüchtet wurden, zeigt, dass in S1E nach Wachstum in 2% Ethanol Cytochrom c´ als Haupt-Cytochrom vorliegt, während im Wild-Typ normalerweise nur Cytochrom c2 in größeren Mengen nachgewiesen werden kann. (B) zeigt die Referenzspektren von gereinigten Cytochromen. ....	31
Abbildung 17: (A) SDS-PAGE von ausgewählten Fraktionen der wasserlöslichen Proteine von S1E. (B) Proteomics Analyse der Banden 17 bzw. 18 bestätigen einen überdurchschnittlich hohen Anteil an Cytochrom c´.....	32
Abbildung 18: Etablierung eines Zulaufverfahrens für höhere Zelldichten durch eine pO <sub>2</sub> -abhängige Zufütterung im 1 L Maßstab.....	33
Abbildung 19: Ermittlung des optimalen Beleuchtungsszenarios für <i>C. sorokiniana</i> in Photobioreaktoren, die beidseitig beleuchtet wurden. Für das Beleuchtungsszenario wurde die Lichtintensität auf der Reaktoroberfläche je nach Biomassekonzentration im Reaktorvolumen eingestellt ( $\mu\text{mol Photonen} / \text{g TS} \cdot \text{s}$ ). Die Anpassung der Lichtintensität an die Biomassekonzentration erfolgte täglich. [A] Wachstum, [B] Biomasseproduktivität [ $\text{g TS L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ] und Lichtausbeute ( $\text{g TS mol Photonen}^{-1}$ ) bei einer spezifischen Lichtverfügbarkeit von 5 und 10 $\mu\text{mol Photonen g TS}^{-1} \text{s}^{-1}$ . [C] Strombedarf um ein kg Biomasse zu produzieren ( $\text{kWh/kg TS}$ ) und Biomasseproduktivität ( $\text{g TS L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) mit steigender Photonenfluxdichte PFD in $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; [D] mit zunehmender Biomassekonzentration im Reaktor nimmt je Beleuchtungsszenario die Biomasseproduktivität [ $\text{g TS L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ] zu, der Strombedarf pro kg erzeugter Biomasse bleibt nahezu konstant. ....	35
Abbildung 20: Stärkebildung durch <i>C. sorokiniana</i> nach N-Limitierung. [A] Biomassezunahme, Stärke-,	

Chlorophyll- und Luteingehalt der Biomasse über die Zeit. [B] Verlauf der spezifischen Lichtverfügbarkeit (in $\mu\text{mol Photonen gTS}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) und der daraus resultierenden Biomasseproduktivität ( $\text{g TS l}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) und Lichtausbeute ( $\text{g TS mol Photonen}^{-1}$ ). .....	36
Abbildung 21: Sensorsignal für die Messung von gelöstem $\text{CO}_2$ und $\text{O}_2$ im Kulturmedium. In [A] wird durch Fütterung von Ammonium eine pH-Wert-Änderung und damit $\text{CO}_2$ -Bedarf ausgelöst. Erfolgt keine $\text{NH}_4$ -Fütterung mehr, fällt der $\text{CO}_2$ -Bedarf auf einen nahezu konstanten Wert ab. Das $\text{CO}_2$ : $\text{O}_2$ -Verhältnis bleibt mit 4-5 weit über dem Sollwert. ....	37
Abbildung 22: Kompakter modularer Photobioreaktor. ....	38
Abbildung 23: a) Immobilisierung von Mikroalgen durch Einlegen eines mit Chitosan beschichteten Kunststoffträgers in Algensuspension. b) und c) Betrachtung der Algenschicht unter dem Lichtmikroskop direkt nach der Immobilisierung. d) Abgestorbene (ausgebleichte) Algenzellen nach einem Tag. ....	38
Abbildung 24:a) Aufbau des Laborversuchs. b) Nahaufnahme von Reaktor und Gasanschlüssen. c) Licht-leiter mit montierten und beschichteten Kunststoffträger.....	39
Abbildung 25: Links: Messung der Wasserstoffkonzentration mit dem Massenspektrometer. Über drei Stunden wurde ein linearer Anstieg beobachtet. Es wurden nur die Messwerte verwendet, bei welchen ein Druck von $2\text{E-}6$ mbar im Massenspektrometer vorherrschte (dort wo Lücken sind, gab es Druckschwankungen). Die Absenkung der Kurve nach dem Ausschalten des Lichts könnte auf eine Wiederaufnahme von Wasserstoff durch die Algen hindeuten. Rechts: Messung der Sauerstoffkonzentration mit dem Massenspektrometer. Der Sauerstoff ist ebenfalls linear über die Versuchszeit angestiegen. Die gepunktete Linie wurde anhand der Messpunkte der ersten 10 Minuten extrapoliert und stellt die Sauerstoffleckage von außen in den Reaktor dar. Die Differenz der beiden Geraden beschreibt den von den Algen produzierten Sauerstoff. ....	40
Abbildung 26: Wachstumsverlauf während der bakteriellen Fermentation im Demonstratormaßstab (links). Zufütterungen sind durch Pfeile markiert. Gebildete Gasmenge von $\text{H}_2$ und $\text{CO}_2$ pro Minute (rechts) während der Fermentation. In grün hinterlegt ist die aerobe Phase, in rot die semiaerobe Phase mit $\text{H}_2$ -Produktion.....	41
Abbildung 27: Technische Zeichnung der Integration von mikrobieller Wasserstoffherstellung mit Kopplung an den Algenreaktor zur $\text{CO}_2$ -Fixierung. ....	43
Abbildung 28: Installation des in TP5.1 aufgebauten Photobioreaktoranlage bestehend aus fünf miteinander gekoppelten 25L FPA-Reaktoren. ....	44
Abbildung 29: Online-Daten der Kopplung der <i>R. rubrum</i> -Fermentation mit dem Demonstrator Algenreaktor mit <i>C. sorokiniana</i> 09-2024 am Standort der Evonik. A: Mit Beginn der Wasserstoffproduktionsphase nach 150h (6 Tagen) schwankte der $\text{CO}_2$ -Volumenstrom (L/h) stark aufgrund der Fütterungszyklen mit Fructose im Fermenter. B: Online-Daten der Kultivierung im Photobioreaktor-Demonstrator: Bis Tag 6 wurde ein konstanter $\text{CO}_2$ -Volumenstrom eingestellt. $\text{CO}_2$ -Volumenstrom der <i>R. rubrum</i> -Fermentation. Nach 6 Tagen wurde die $\text{CO}_2$ -Begasung auf Fermentationsabgas umgestellt. ....	45

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Schwerpunkte der Landesstrategie nachhaltige Bioökonomie und wie das Projekt SmartBioH2 hierzu beitragen kann. ....	2
Tabelle 2: Übersicht der Meilensteine, Inhalte und des Erfüllungszeitraums.....	8
Tabelle 3: Übersicht der Arbeitspakete und der zentralen Ergebnisse.....	9
Tabelle 4: Beschreibung der ausgewählten Wirkungskategorien.....	18
Tabelle 5: Weitere Umweltindikatoren .....	19
Tabelle 6: Wichtige Parameter für die Modellierung der Algenkultivierung. ....	22
Tabelle 7: Materialausbeute für die „Dunkel-Photosynthese“. ....	23
Tabelle 8: Gesamtausbeute der Algenkultivierung für einen Zyklus (Ein Zyklus = 4 Tage, 24 h/Tag Betrieb; Gesamtvolumen des Reaktors = 125 L). ....	24
Tabelle 9: Berechnete Umweltauswirkungen für 1 kg Wasserstoff unter Verwendung der Masse-Allokation. GWP = „Global Warming Potential,“ Klimawandelpotenzial. ....	25
Tabelle 10: Nicht-LCA-Bewertungskriterien für das Gesamtbioraffineriekonzept.....	26
Tabelle 11: Absolute Werte und Prozentsatz der verschiedenen CapEX Komponenten.....	27
Tabelle 12: Absolute Jahreswerte und Prozentsatz der verschiedenen OpEX-Komponenten .....	28

# 1 Kurzzusammenfassung: Beschreibung des Vorhabens und der modularen Bioraffinerie

Das Projektvorhaben SmartBioH2-BW zielt auf die Integration einer Bioraffinerie in eine bestehende Industrieumgebung der Evonik Operations GmbH in Rheinfelden unter Nutzung von dort anfallenden industriellen Abwasser- und Reststoffströmen ab. Die in diesem Projekt aufgebaute Bioraffinerie basiert auf zwei Verfahren der biotechnologischen Wasserstoffherzeugung, die miteinander verknüpft wurden: der sogenannten Dunkel-Photosynthese, die unter Verwendung von Purpurbakterien in einem geschlossenen Bioreaktor stattfand, und einer Mikroalgenanlage, die in einem belichteten Photobioreaktor umgesetzt wurde. Da bei der Dunkelfermentation neben Wasserstoff ( $H_2$ ) und weiteren Produktoptionen, wie beispielsweise Carotinoiden, auch Kohlenstoffdioxid ( $CO_2$ ) als Nebenprodukt entsteht, sollte dieses der Algenproduktion zugeführt werden. Dort wurde es in der Algenbiomasse gebunden unter Freisetzung von weiterem Wasserstoff oder sonstigen Produkten, wie Proteinen oder Lutein. Der Aufbau der Algenbiomasse diente also zur Bindung des  $CO_2$ , der Steigerung der  $H_2$ - Ausbeute und zur Erweiterung der Produktpalette der Bioraffinerie.

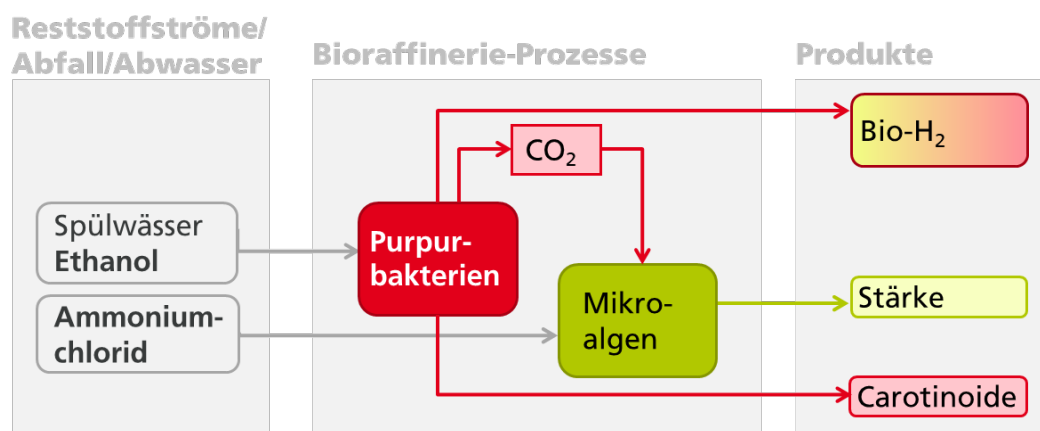


Abbildung 1: Übersicht der Substrat- und Produktströme innerhalb des Bioraffineriekonzepts des Projekts SmartBioH2.

Die aufgebaute Bioraffinerie wurde über den gesamten Planungs- und Entwicklungsprozess hinweg nach ökologischen und, ökonomischen Kriterien analysiert und optimiert. Dazu wurde eine auf weitere „Biofabriken“ übertragbare, ganzheitliche Bewertungssystematik entwickelt, mit der die relevanten Umweltauswirkungen und ökonomische Zusammenhänge erfasst werden können. Eine in diesem Zusammenhang entwickelte software-basierte Energie- und Materialflussmodellierung sowie damit verknüpfte Ökobilanzierungen dienten als Simulationsplattform für die Berechnung und Visualisierung dieser Auswirkungen und Analyse der komplexen Wirkzusammenhänge. Mittels Simulationen verschiedener Nutzungsszenarien wurde darüber hinaus der Entwicklungs- und Innovationsprozess der aufgebauten und weiterer Bioraffinerien unterstützt. Über gezielte Variationen von Prozessparametern und einer systematischen Auswertung der jeweiligen Bewertungsergebnisse konnten vielversprechende Entwicklungsansätze für die Bioraffinerie abgeleitet und in Form einer Innovation Roadmap erarbeitet werden.

Mit dem kombinierten Bioraffinerie-Konzept sollte eine möglichst emissionsarme und effiziente Nutzung der Abwasser- und Reststoffströme am Evonik Standort Rheinfelden ermöglicht werden, die neben dem Zukunftenergieträger Wasserstoff unterschiedliche weitere Produktoptionen und damit ein flexibles Wertschöpfungsangebot ermöglicht.

## 2 Motivation des Vorhabens und eigene Erwartungen - Beitrag des Vorhabens zur Umsetzung der Landesstrategie Nachhaltige Bioökonomie

Unser Vorhaben „SmartBioH2-BW“ leistete einen wesentlichen Beitrag zur Erreichung einiger globaler Ziele für eine nachhaltige Entwicklung, wie einem respektvollen Umgang mit der Umwelt, dem Management natürlicher Ressourcen (SDG Ziel 15) und einer nachhaltigen Produktion und dem Konsum (SDG Ziel 12). Die nachfolgende Tabelle stellt inhaltliche Schwerpunkte der „Landesstrategie Nachhaltige Bioökonomie“ des Landes Baden-Württemberg, der Bekanntmachung „Bio-Ab-Cycling“ und Zielen des Projekts „SmartBioH2“ gegenüber, die in Bezug zu den inhaltlichen Themen stehen.

**Tabelle 1: Übersicht der Schwerpunkte der Landesstrategie nachhaltige Bioökonomie und wie das Projekt SmartBioH2 hierzu beitragen kann.**

Schwerpunkte der Bekanntmachung	Ziele der SmartBioH2-Bioraffinerie
Verwendung von Abfällen	Nutzung von ethanolhaltigen Abwässern und Nebenstoffströmen der Evonik
Aufbau von Bioraffinerien	Erstmaliger Aufbau einer Bioraffinerie mit der Verwertung von ethanolhaltigen Abwässern, der Herstellung von Biowasserstoff, der Fixierung des dabei entstehenden CO <sub>2</sub> und der Gewinnung von Nebenprodukten (Stärke, PHA, Carotenoide)
Mindestens zwei verschiedene Technologien kombinieren und mindestens zwei Produkte/Sekundärrohstoffe gewinnen	In dem Projekt wurde die biotechnologische Wasserstoffherstellung aus Alkoholen mit Purpurbakterien innerhalb des Verfahrens der mikroaeroben Dunkelfermentation im Bioreaktor gekoppelt mit einer Anlage zur photosynthetischen Kultivierung von Algen, bei der das bei der Wasserstoffherstellung als Nebenprodukt produzierte CO <sub>2</sub> in Form von Biomasse gebunden werden kann.
Nachhaltigkeitsziele, Ziel 1 der Landesstrategie BW	Wir führen organische Reststoffe & Abfälle einer neuen Wertschöpfungskette zu um höherwertige Produkte herzustellen
Klimaschutz, Ziel 2 der Landesstrategie des Landes Baden-Württemberg	Wir leisten einen Beitrag Verfahren zu entwickeln, in denen fossile Ressourcen geschont werden und Wasserstoff nachhaltig und klimaneutral hergestellt werden kann
Transformation zu einer nachhaltigen Wirtschaftsform und Stärkung der ländlichen Räume durch innovative bioökonomische Lösungsansätze (Ziel 3 und 4 der Landesstrategie	Die hier aufgebaute Anlage ist einer der ersten im industriellen Umfeld, welche direkt aus Abwässern der Chemieindustrie lokal in Deutschland Biowasserstoff herstellt

## **3 Beschreibung des Themas und Stand der Technik**

### **3.1 Problemstellung**

Um ein zukunftsfähiges Wirtschaftssystem zu entwickeln, ist es entscheidend, die Abhängigkeit von fossilen Rohstoffen sowohl in der Energieerzeugung als auch in der stofflichen Wertschöpfung zu verringern. Dies erfordert nicht nur den Ausbau erneuerbarer Energien im Stromsektor, sondern auch die Schaffung nachhaltiger Kreisläufe für chemische Energieträger und Grundstoffe. Im Energiebereich sollten diese Kreisläufe insbesondere in Anwendungsbe-  
reichen etabliert werden, die schwer zu elektrifizieren sind, wie etwa im Schiffs- und Schwerlastverkehr oder bei der Bereitstellung von Wärme für Hochtemperaturprozesse in der Industrie. Biosynthetisch erzeugte Energieträger, wie Biowasserstoff, bieten skalierbare und flexibel einsetzbare Lösungen zur Schließung bioökonomischer Stoffkreisläufe. Wasserstoff kann sowohl direkt als emissionsfreier Energieträger als auch indirekt als Reduktionsmittel zur Herstellung einer breiten Produktpalette genutzt werden, um bioökonomische Stoffkreisläufe auf Kohlenstoffbasis zu etablieren. Solche Kreisläufe sollten in Sektoren implementiert werden, die bislang von fossilen Rohstoffen geprägt sind, wie der Kunststoff- und Chemieindustrie. Hier kann Wasserstoff als Ausgangsstoff für die Produktion von stickstoffhaltigem Dünger, Salzsäure, Methanol, Anilin, Olefinen und anderen Produkten dienen und/oder durch die Reduktion von CO<sub>2</sub> kohlenwasserstoffbasierte Kreisläufe schließen.

Da biogene Abfallstoffe überwiegend dezentral anfallen, sollten auch die darauf basierenden Bioraffineriekonzepte dezentral umgesetzt werden. Industrieumgebungen bieten oft ideale Bedingungen, da dort Reststoffströme konstant und in großen Mengen an einem Ort anfallen können. Für die Realisierung solcher dezentralen Prozesse mithilfe biotechnologischer Methoden sind hochflexible Bioreaktoren erforderlich, die als Smart Bioenergy Devices (SBED) bezeichnet werden. Diese sollten durch robuste und effiziente Mess-, Steuerungs- und Regelungskonzepte gestaltet und in bestehende Prozessketten und -kreisläufe integriert werden. Die Mikrobiologie trägt zur Bereitstellung alternativer Synthesewege bei, indem sie enzymatisch katalysierte Stoffumwandlungen ermöglicht, die eine höhere Energieeffizienz bieten, da sie hohe Drücke oder Temperaturen vermeiden. Mit solchen bioökonomischen Lösungen können aus organischen Rest- und Abfallstoffen nicht nur energetische Verwertungen, sondern auch stoffliche Nutzungen durch SBED realisiert werden.

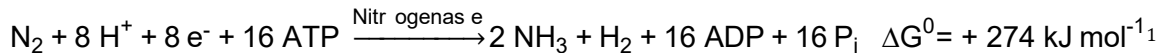
Dieses Projekt wurde bei der Evonik Operations GmbH durchgeführt, wo Wasserstoff (H<sub>2</sub>) ein wichtiger Rohstoff für die Produktion ist und in verschiedenen Bereichen eingesetzt wird. Hier dient H<sub>2</sub> nahezu ausschließlich als Rohstoff und nicht als Brennstoff. Ein möglicher Anwendungsbereich ist die Herstellung von Wasserstoffperoxid, das als Bleichmittel in der Zellstoff- und Papierproduktion sowie als Desinfektionsmittel in der Lebensmittelindustrie, der Elektronikindustrie und der Medizintechnik verwendet wird. Darüber hinaus arbeitet Evonik auch mit CO<sub>2</sub> als Rohstoff. Evonik brachte seine Expertise im Bereich der Gasfermentation in das Projekt ein, sodass das anfallende CO<sub>2</sub> in höherwertige Produkte umgewandelt werden könnte. Die aus der CO<sub>2</sub>-Umwandlung resultierenden Folgeprodukte könnten direkt am Standort als Rohstoffe für eine Vielzahl von Produktionsprozessen genutzt werden, beispielsweise zur Herstellung von SiO<sub>2</sub>, Silanen oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ein weiteres Folgeprodukt aus CO<sub>2</sub> ist Algenbiomasse, die sowohl Lutein/Pigmente als auch Proteine enthält. Diese Komponenten könnten in Futtermitteln verwendet werden, während die Proteine nach Hydrolyse auch in Fermentationen eingesetzt werden können, um komplexe Medienbestandteile wie Hefeextrakt zu ersetzen.

### **3.2 Stand der Forschung und Ansatz des Vorhabens**

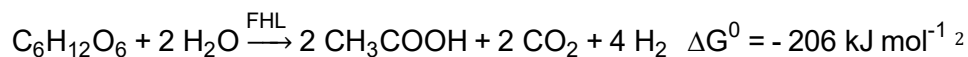
#### **3.2.1 *Biotechnologische Wasserstoffherstellung***

Die Wasserstoffherstellung mittels Biotechnologie lässt sich in zwei Bereiche unterteilen, welche ihrerseits weitere Unterteilungen haben: Die photosynthetische Herstellung von Wasserstoff durch Algen, sowie die fermentative durch Bakterien. Die Photosynthese lässt sich in direkte und indirekte Photolyse unterteilen, die Fermentation in Photofermentation und Dunkelfermentation. Bei der anaeroben Photofemention, wird Licht von den Bakterien ähnlich wie

bei der Photosynthese absorbiert. Die Lichtenergie wird von den Bakterien genutzt, um Stickstoff aus der Luft zu binden, wobei Wasserstoff als Nebenprodukt entsteht. Die Photofermentation lässt sich anhand folgender Formel darstellen:



Die für die Reaktion benötigte Energie kann das Bakterium normalerweise nur durch Licht als Energiequelle bereitstellen, woraus ein hoher Energiebedarf, so wie eine große Reaktoroberfläche notwendig wird. Als Schlüsselenzym fungiert die Nitrogenase, ein sauerstofflabiles Enzym, welches nur bei einem hohen Energiezustand der Zelle, sowie Stickstoffmangel aktiv ist. Bei der anaeroben Dunkelfermentation werden Zucker metabolisiert und überschüssige Reduktionsäquivalente in Form von Wasserstoff freigesetzt. Dabei entsteht innerhalb des Pyruvat-Formiat-Lyase Stoffwechselwegs Essigsäure als Nebenprodukt, die Reaktionsgleichung ist dabei nachfolgend dargestellt:



Die Reaktion dient dabei dem Bakterium als Weg um Elektronen abzugeben und Reduktionsäquivalente zu regenerieren. Dies ist notwendig um die Verstoffwechslung von Zuckern, die Glykolyse, aufrecht zu erhalten. Schlüsselenzym ist die ebenfalls sauerstofflabile Formiathydrogenlyase, welche Ameisensäure, die zuvor aus Pyruvat gewonnen wurde, zu Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid umsetzt.

Beide Prozesse wurden bereits seit Jahrzehnten erforscht und optimiert, dennoch befindet sich das Verfahren der biotechnologischen Wasserstoffherstellung weiterhin in einem technologischen Reifegrad, in dem die Forschung in einem Labormaßstab weiterhin dominiert. Eine Umsetzung in einem industriellen Umfeld ist bisher noch kaum bis gar nicht erfolgt, Grund ist nach wie vor eine mangelnde Effizienz des Verfahrens und einen zu hohen Produktpreis. Aus diesem Grund wurde in diesem Projekt ein neues Verfahren untersucht, was eine neue Perspektive mit Potenzial zu den bisher untersuchten Verfahren darstellen sollte und erstmals in einen industriellen Prozess integriert und skaliert werden sollte, die mikroaerobe Dunkelphotosynthese. Dieses neue Konzept wurde erstmal für das purpurfarbene Nicht-Schwefel-Bakterien (PNSB) *Rhodospirillum rubrum* entdeckt und in letzter Zeit vermehrt untersucht, eine Kombination aus beiden Stoffwechselwegen unter mikroaeroben Bedingungen zur biotechnologischen Wasserstoffherstellung war der Zielprozess innerhalb dieses Projekts. Der mikroaerobe Zustand wird als Zwischenzustand zwischen aerober Atmung und anaerober Fermentation bei niedrigen Konzentrationen an gelöstem Sauerstoff definiert, in dem eine Kombination aus oxidativen und reduktiven Stoffwechselwegen auftritt. Unter diesen Bedingungen kann die Bildung von photosynthetischen Membranen aufgrund eines außergewöhnlichen reduzierten Zustands beobachtet werden, die sonst nur unter photofermentativen Bedingungen auftreten. Unter mikroaeroben, dunklen Bedingungen kann Wasserstoff nicht nur durch die Fermentation von Zuckern durch Überreduktion von Bakterien, sondern auch durch die Enzyme der Photofermentation erzeugt werden.<sup>3</sup> Der Prozess profitiert von einer höheren theoretischen Ausbeute, der Verwendung einer Vielzahl von Substraten und der Fermentation in einfachen Bioreaktoren. Der Prozess zeichnet sich durch die Vermeidung hoher Drücke und Temperaturen sowie eine hohe Energieeffizienz aus.<sup>4</sup> Die Vorversuche zur "Dunkel-Photosynthese", die vom Projektpartner IBBS im 500 mL Labormaßstab durchgeführt wurden, ergaben hochgerechnet eine Wasserstoffausbeute von 0,8 mol H<sub>2</sub> pro 100 Liter Kultur. Durch die Verwendung eines modifizierten Mediums kann die Aktivität der Nitrogenase so gesteigert werden, dass eine vierfache Ausbeute möglich ist. Zudem ermöglichte das High-Cell-Density Fed-Batch Verfahren eine deutliche Steigerung der Zelldichte, was zu einer zusätzlichen Steigerung der Ausbeute führte. Die

<sup>1</sup> Alloul A, Blansaer N, Segura PC, Wattiez R, Vlaeminck SE, Leroy B. Dehazing redox homeostasis to foster purple bacteria biotechnology. *Trends Biotechnol.* 2023;41(1):106-19.

<sup>2</sup> Castelló E, Ferraz-Junior ADN, Andreani C, Anzola-Rojas MD, Borzacconi L, Buitrón G, et al. Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: Possible causes and solutions. *Renew Sust Energy Rev.* 2020;119.

<sup>3</sup> Selao TT, Edgren T, Wang H, Norén A, Nordlund S. Effect of pyruvate on the metabolic regulation of nitrogenase activity in *Rhodospirillum rubrum* in darkness. *Microbiol-Sgm.* 2011;157:1834-40.

<sup>4</sup> Nirmala N, Praveen G, AmitKumar S, SundarRajan P, Baskaran A, Priyadharsini P, et al. A review on biological biohydrogen production: Outlook on genetic strain enhancements, reactor model and techno-economics analysis. *Sci Total Environ.* 2023;896.

Lichtunabhängigkeit erlaubte eine Skalierung auf nahezu beliebige Anlagengrößen. Des Weiteren zeigten die Labortests des IBBS, dass der *R. rubrum* in der Lage ist, bis zu 10% (w/v) Ethanol, einen der Hauptbestandteile der bei Evonik anfallenden Abwässer, in Anwesenheit geeigneter Stickstoffquellen (in den Vorversuchen: Ammonium) zu verwerten. Dies bildete die Grundlage für das Projekt SmartBioH<sub>2</sub>-BW. Dabei wurde ein Prozess entwickelt, bei dem *R. rubrum* an das neue Substrat, ethanolhaltige Spül- und Waschwässer, adaptiert und auf sein Dunkelphotosyntheseverhalten untersucht wurde. Im Anschluss wurde ein Hochzell-Dichteverfahren inklusive Wasserstoffproduktion etabliert und der gesamte Prozess skaliert. Abschließend wurde ein Demonstrator in Industrieumgebung aufgebaut und betrieben, bei dem Abwässer der Evonik Industries eingesetzt wurden.

### **3.2.2 CO<sub>2</sub>-Fixierung durch Mikroalgen**

Bei der Dunkelfermentation mit *R. rubrum* entstehen neben Wasserstoff (H<sub>2</sub>) auch stöchiometrische Mengen an Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>). So wurden beispielsweise aus 1 kg (5,6 mol) Fructose 60 L (2,7 mol) H<sub>2</sub> und 370 L (16,7 mol) CO<sub>2</sub> (Verhältnis 1:6) erzeugt. Um die CO<sub>2</sub>-Emissionen zu reduzieren, sollte die Produktion von Mikroalgen mit der Wasserstoffproduktion gekoppelt werden. Mikroalgen sind in der Lage, durch Photosynthese CO<sub>2</sub>, Licht und anorganische Nährstoffe wie Ammonium und Phosphat in Biomasse umzuwandeln. Im Rahmen des Projekts wurde daher Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle für die Algenproduktion genutzt werden.

Das IGB verfügt über mehr als 20 Jahre Erfahrung in der Kultivierung von Mikroalgen in Flachplatten-Airlift-Reaktoren (FPA-Reaktoren) und hat das Ziel, Prozesse zu entwickeln, die vielfältige Einsatzmöglichkeiten für Algenbiomasse bieten. Durch die Anpassung der Wachstumsbedingungen in den Photobioreaktoren wurde die Produktion und die Akkumulation von Zielinhaltsstoffen optimiert. Die Intensivierung der Prozesse durch den Einsatz von LED-Beleuchtung in den Algenkulturen führte zu einer erhöhten Produktivität und zu höheren Produktgehalten.

Einige Mikroalgen sind zusätzlich zum photoautotrophen Stoffwechselweg (Licht und CO<sub>2</sub>) in der Lage, organische Kohlenstoffquellen zu metabolisieren, was als mixotropher Stoffwechsel bezeichnet wird. Für mixotroph wachsende Mikroalgen können durch den Zusatz von organischen Kohlenstoffquellen die Wachstumsraten erhöht werden. Im Rahmen dieses Vorhabens wurde Ethanol als Kohlenstoffquelle getestet, wobei der Algenstamm *C. reinhardtii* geeignet ist, da er verschiedene niedermolekulare Kohlenstoffquellen wie Acetat nutzen kann. Zudem können Mikroalgen auch Wasserstoff produzieren. Die photobiologische H<sub>2</sub>-Produktion wird in direkte und indirekte Biophotolyse unterteilt. Bei der direkten Biophotolyse erzeugen photosynthetische Mikroorganismen (Grünalgen oder Cyanobakterien) H<sub>2</sub> aus Wasser, indem sie Sonnenlicht unter anaeroben Bedingungen nutzen. Bei der indirekten Biophotolyse wird die H<sub>2</sub>-Produktion von der hemmenden O<sub>2</sub>-Produktion der Photosynthese getrennt, wobei Stärke als Zwischenspeicher für die Elektronen dient.

Wie bereits erwähnt, war die Wasserstoffausbeute bei dieser Methode geringer als bei der Verwendung von *R. rubrum*. Das CO<sub>2</sub>, das bei der Fermentation mit *R. rubrum* anfällt, konnte jedoch zur Produktion von stärkereicher Algenbiomasse verwendet werden. Am Fraunhofer IGB wurde ein photoautotropher Prozess (CO<sub>2</sub> und Licht) zur Stärkeproduktion im FPA-Reaktor mit *C. reinhardtii* entwickelt. Ein Teil der Algenkultur konnte somit für die Wasserstoffproduktion eingesetzt werden. Die Algenbiomasse, die sowohl aus der CO<sub>2</sub>-Verwertung resultiert, enthält etwa 0,5 % Lutein und ca. 40 % Proteine, die zur zusätzlichen Wertschöpfung beitragen.

### **3.2.3 Nachhaltigkeitsbewertung**

Der Fokus des Projekts lag auf der bioökonomischen Nutzung von Abfallströmen, die am Standort Rheinfelden anfallen und bislang ungenutzt blieben. Besonders hervorzuheben ist die große Menge an Ethanol, die aus Waschwässern gewonnen werden kann. Dieses Ethanol wurde von *R. rubrum* verwendet, um Biomasse aufzubauen und Wasserstoff (H<sub>2</sub>) sowie weitere Produkte zu erzeugen. Das dabei entstehende Nebenprodukt CO<sub>2</sub> wurde durch Mikroalgen gebunden und konnte anschließend zur Erzeugung von zusätzlichem H<sub>2</sub> und weiteren Produkten aus der Algenbiomasse genutzt werden. Die Entwicklung dieser mikrobiellen Prozesse

fördern somit die Nachhaltigkeit, indem sie Stoffkreisläufe schließen und Emissionen reduzieren. Aus energetischer Perspektive sind diese Prozesse sehr effizient, da sie bei niedrigen Drücken und Temperaturen ablaufen. Das Temperaturoptimum von *R. rubrum* liegt beispielsweise bei 30°C, und für das semi-aerobe Wachstum ist nur eine geringe Rührgeschwindigkeit erforderlich, was den Prozess insgesamt energieeffizient gestaltete. Zusätzlich zu den Prozessabwässern können auch andere fructosehaltige Rest- und Abfallstoffe als Substrate genutzt werden, die beispielsweise von benachbarten Weinbaubetrieben bezogen werden könnten.

### **3.2.4 Öffentlichkeitsarbeit und Kommunikation**

Die frühzeitige Einbindung und Information sowohl der breiten Öffentlichkeit als auch der interessierten Fachgemeinschaft wurde erfolgreich umgesetzt und hat sich als entscheidend für die Förderung der Bioökonomie und ihrer Lösungsansätze erwiesen. Durch die frühzeitige Einbindung dieser Gruppen während des gesamten Projektverlaufs konnten wir eine breite Akzeptanz sowohl in der Öffentlichkeit als auch bei potenziellen Anwendern erreichen. Wir haben Fachartikel und Pressemitteilungen erstellt und veröffentlicht, die den Fortschritt des Projekts dokumentierten. Zudem haben wir Veranstaltungen organisiert und durchgeführt, darunter Workshops, Tagungen und Besichtigungen in einem teils partizipativen Format. Diese Maßnahmen haben erheblich dazu beigetragen, das Wissen und Verständnis der Öffentlichkeit sowie des Fachpublikums für diesen innovativen Lösungsansatz zu erweitern. Dadurch haben wir eine wesentliche Voraussetzung für einen erfolgreichen Technologietransfer der Ergebnisse in die praktische Umsetzung nach Abschluss des Projekts geschaffen.

## **4 Durchführung des Projekts**

### **4.1 Aktualisierte Darstellung des zeitlichen und inhaltlichen Projektablaufs – Ziele und Meilensteine**

Unsere technisch-wissenschaftlichen Ziele dieses Projekts wurden in den verschiedenen Bereichen wie folgt definiert:

#### Bewertung der organischen Reststoffe und Abwässer

- Screening potenzieller Substrate (Rest- und Abwasserströme) zur Biowasserstoffproduktion wurden durchgeführt, insbesondere am Standort Rheinfelden.
- Die Eignung der Substrate wurde experimentell geprüft, wobei zusätzliche Co-Substrate (z.B. Fructose) eingesetzt werden, um die Wasserstoffausbeute zu optimieren.
- Nutzung verfügbarer Rest- und Abfallströme (vor allem Ethanol) am Standort Rheinfelden der Evonik Operations GmbH und weiteren regionalen Stoffströmen.

#### Entwicklung einer spezifischen Bewertungssystematik

- Entwicklung einer Bewertungssystematik für Verfahrenskombinationen am Standort Rheinfelden unter Berücksichtigung ökonomischer und ökologischer Kriterien.
- Definition von Systemgrenzen, Identifizierung relevanter Stoff- und Energieströme sowie Erstellung von Input-/Output-Modellen für Ausgangsstoffe und Prozessketten.
- Analyse der ökologischen und ökonomischen Auswirkungen der Prozessmodule zur Ableitung eines Kriterienkatalogs.
- Erstellung einer Systematik zur Bewertung und Auswahl von Syntheserouten, unterstützt durch simulationsgestützte Bewertungen und Durchführung eines „Critical Review“ Verfahrens zur Sicherstellung der Konsistenz mit internationalen Normen.

#### Erstellung eines Simulationsmodells zur techno-ökologischen und ökonomischen Bewertung

- Überführung der Bewertungssystematik in ein Simulationsmodell zur techno-ökologischen und ökonomischen Bewertung von Prozessrouten und Geschäftsmodellen.
- Abbildung von Teilprozessen sowie Stoff- und Energieströmen in einem modularen Prozessmodell, um Energie- und Materialströme zu simulieren.
- Prozesssimulation mit der Software Aspen Plus, um eine systematische Prozessanalyse und Vergleich von Technologievarianten durchzuführen.
- Abbildung von Verfahrenskonzepten und die Entwicklung einer SmartBio-Toolbox, um wirtschaftliche und ökologische Kennzahlen benutzerfreundlich zu visualisieren und die

Nutzung von Rest- und Abfallströmen in der Wasserstoffherzeugung zu fördern.

#### Simulation für die Bewertung der Ökologie und Ökonomie

- Durchführung von Simulationen zur ökologischen und ökonomischen Bewertung verschiedener Prozessoptionen für das Bioraffinerie-Konzept am Standort Rheinfelden, Identifikation von vielversprechenden Nutzungsszenarien.
- Externe Experten und das Projektteam führen Konsistenz- und Vollständigkeitsprüfungen der Ergebnisse durch, um vielversprechende Nutzungsszenarien auszuwählen, die im Projektverlauf weiterverfolgt werden sollen.
- Ziel ist die Identifikation von Optimierungspotenzialen zur Steigerung der Nachhaltigkeit durch Sensitivitäts- und Szenarioanalysen, gefolgt von der Entwicklung einer Innovation Roadmap zur gezielten Prozessentwicklung.

#### Übertragung der Wasserstoffherstellung

- Genomscreening von *R. rubrum* auf Eignung für Wachstum auf Reststoffströmen
- Übertragung der bakteriellen Wasserstoffherstellung auf Abwässern im Labormaßstab
- Etablierung eines Prozesses mit Zufütterung zur Steigerung der Zelldichten
- Entwicklung einer Regelung des mikroaeroben Zustands zur Wasserstoffproduktion
- Untersuchung des Reststoffstroms Ammoniumchlorid der Evonik auf Eignung zur Kultivierung der Mikroalge *C. reinhardtii*
- Übertragung der Algenkultivierung in den Stack-Photobioreaktor

#### Aufbau der Demonstratoranlage in Rheinfelden bei Evonik

- Planung, Aufbau und Betrieb des Demonstrators in Rheinfelden bei der Evonik
- Nutzung von Abwässern zur Wasserstoffproduktion und CO<sub>2</sub>-Fixierung
- Kopplung der Anlagenteile bakterielle Wasserstoffproduktion und Algenreaktor

#### Öffentlichkeitsarbeit und Kommunikation

Veröffentlichung von Pressemitteilungen und Fachartikeln zum Projektfortschritt

Unsere Meilensteine, bezogen auf die Arbeitspakete in Kapitel 5.1, sind wie folgt definiert: Die Meilensteintabelle (siehe Tabelle 2) wurde auf eine Laufzeit von 36 Monaten angepasst.

**Tabelle 2: Übersicht der Meilensteine, Inhalte und des Erfüllungszeitraums.**

<b>Meilenstein</b>	<b>Titel</b>	<b>Monat</b>
M1	Geeignete Reststoffströme wurden identifiziert	24
M2	Bewertungssystematik wurde entwickelt und durch Critical Review Board geprüft	32
M3	Simulationsmodell zur Analyse und Bewertung des Bioraffinerie-Konzepts wurde erstellt	10
M4	Technologie-Roadmap wurde finalisiert und Simulationsmodell validiert	36
M5	Erfolgreiche Nutzung von Reststoffen und Waschwässern am Standort Rheinfelden zur Kultivierung von <i>R. rubrum</i>	20
M6	<i>R. rubrum</i> Stämme für optimierte H <sub>2</sub> - und CO <sub>2</sub> - Produktion, die an das für den Standort Rheinfelden entwickelte Nährmedium angepasst sind, sind vorhanden	32
M7	Erfolgreiche Kopplung des <i>R. rubrum</i> Wachstums mit photobiotechnologischer Algenproduktion erfolgte	36
M8	Design-Konzept für Up-Scaling wurde erarbeitet	36

## 5 Aufzählung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse und deren Bewertung

### 5.1 Darstellung der wichtigsten Ergebnisse und Meilensteine

In Tabelle 3 sind die wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse je Arbeitspaket für das Projekt aufgeführt und der Erfüllungsstatus der Meilensteine kommentiert.

Tabelle 3: Übersicht der Arbeitspakete und der zentralen Ergebnisse.

Arbeitspakete (AP)	Bearbeitungsstand
TP1 – Screening potenzieller Substrate (Rest- und Abwasserströme)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meilenstein 1: Geeignete Reststoffströme sind identifiziert (IGB)               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Zusammensetzung von Spülwasser der Evonik wurde bestimmt</li> <li>○ Toxizität und Eignung der Spülwässer zur Fermentation mit <i>R. rubrum</i> wurde bewertet</li> <li>○ Fructosehaltige Fermentationsüberstände der biotechnologischen Biotensidproduktion wurden als mögliche, zusätzliche Kohlenstoffquelle identifiziert</li> <li>○ Durch eine Optimierung eines bestehenden Fermentationsmediums konnte der Ethanolverbrauch und die Wachstumsrate gesteigert werden</li> </ul> </li> </ul>
TP2 – Entwicklung einer spezifischen Bewertungssystematik unter Berücksichtigung ökonomischer und ökologischer Kriterien	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meilenstein 2: Entwicklung Bewertungssystematik und Prüfung durch Critical Review Board (IPA)               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Der Meilenstein wurde abgeschlossen. Eine Bewertungsmethodik wurde erfolgreich entwickelt und in zwei Besprechungen mit einem externen CRB überprüft.</li> </ul> </li> </ul>
TP3 – Simulationsmodell zur techno-ökologischen und ökonomischen Bewertung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meilenstein 3: Erstellung Simulationsmodell für die Bioraffinerie (EEP)               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Dieser Meilenstein wurde erreicht. Mit Hilfe der Prozesssimulationssoftware Aspen Plus wurde ein Prozessmodell entwickelt, das die wichtigsten identifizierten Energie- und Stoffströme darstellt.</li> </ul> </li> </ul>
TP4 – Simulation für die Bewertung der Ökologie und Ökonomie unterschiedlicher Prozessoptionen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meilenstein 4: Finalisierung Technologie-Roadmap und Validierung des Simulationsmodells (IPA)               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Dieser Meilenstein wurde abgeschlossen. Eine ökologische und ökonomische Bewertung der Bioraffinerie wurde anhand des entwickelten Prozessmodells durchgeführt. Es wurden verschiedene Prozessoptionen modelliert und bewertet. Die Ergebnisse wurden mit einem externen CRB überprüft.</li> </ul> </li> </ul>
TP5 – Verfahrenstechnische und mikrobiologische Entwicklungen für den Aufbau einer Pilotanlage	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meilenstein 5: Erfolgreiche Nutzung von Reststoffen und Waschwässern am Standort Rheinfelden zur Kultivierung von <i>R. rubrum</i> (IGB)               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Nachweis von H<sub>2</sub>-Bildung wurde durch Regelung des Redoxpotentials auch mit Ethanol nachgewiesen</li> <li>○ Kennzahlen für aerobes und mikroaerobes Wachstum wurden bestimmt</li> <li>○ Verschiedene Zufütterungsverfahren zur Erreichung höherer Zelldichten wurden durchgeführt und bewertet. Mit einer pO<sub>2</sub>-abhängigen Zufütterung wurde eine Zelldichte von 33,4 g L<sup>-1</sup> TS erreicht</li> </ul> </li> <li>• Meilenstein 6: <i>R. rubrum</i> Stämme für optimierte H<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>- Produktion, die an das für den Standort Rheinfelden entwickelte Nährmedium angepasst sind (IBBS)               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Ein ethanoltoleranter Stamme S1E wurde entwickelt</li> </ul> </li> </ul>
TP6 – Technische Machbarkeit des Konzeptes anhand eines Demonstrators	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meilenstein 7 und 8: Erfolgreiche Kopplung des <i>R. rubrum</i> Wachstums mit photobiotechnologischer Algenproduktion (IGB), Design-Konzept für Scale-up wurde erarbeitet               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Erarbeitung eines Anlagen- und Sicherheitskonzepts, Genehmigung der Anlage durch das Regierungspräsidium Freiburg als wissenschaftlicher Betrieb</li> <li>○ Demonstrator Bioraffinerie wurde in Rheinfelden bei der Evonik in Betrieb genommen, Kopplung beider Anlagen wurde umgesetzt</li> <li>○ H<sub>2</sub>-Herstellung wurde im 50 L Maßstab mit Spülwasser erfolgreich erreicht</li> </ul> </li> </ul>

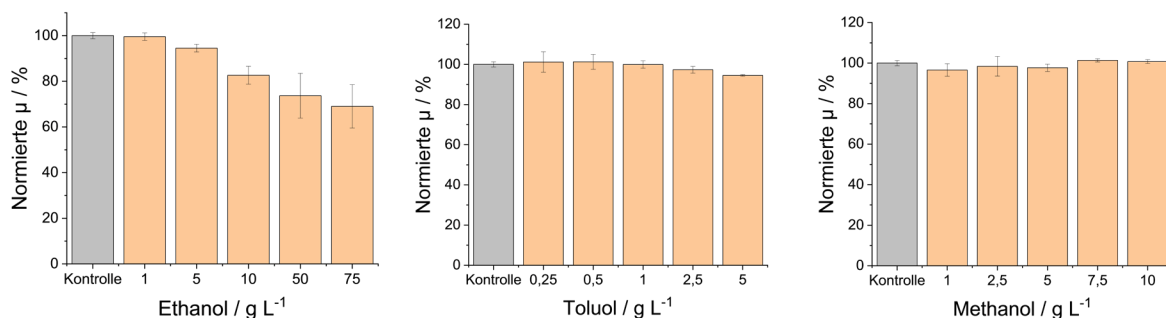
### 5.2 Ergebnisdarstellung gegliedert nach Themen

In den nachfolgenden Abschnitten erfolgt eine detaillierte Ergebnisdarstellung für die einzelnen Themengebiete.

## 5.2.1 Screening potenzieller Substrate (Rest- und Abwasserströme)

### 5.2.1.1 Analyse der Rest- und Abwasserströme in Abhängigkeit vom Projektfortschritt (IGB)

Vor Projektbeginn war bekannt, dass Ethanol und Ammonium als Hauptbestandteile in den Rest- und Abwasserströmen am Evonik Standort Rheinfelden vorlagen. Genaue chemische Analysen der weiteren Bestandteile und Toxizitätstests wurden im Projektzeitraum am Fraunhofer IGB durchgeführt. Im IBBS wurde das Haupt-Augenmerk auf die Anpassung von *R. rubrum* an höhere Ethanol-Konzentrationen gelegt. *R. rubrum* kann Ammonium als Stickstoffquelle nutzen, allerdings hemmt Ammonium die Nitrogenase, das Hauptenzym für Wasserstoffproduktion. Von daher wurden die Ammonium-haltigen Abfälle im Projekt nur bei der Algenkultivierung eingesetzt. Am Fraunhofer IGB wurde innerhalb des Projekts verschiedene Quellen auf ihre mögliche Eignung für die Fermentation bewertet und ein Spülwasser der Evonik identifiziert, welches aufgrund eines hohen Ethanolgehalts und einer geringen Menge an toxischen Alkoholen wie Toluol oder Methanol als geeignet eingestuft wurde. Um die Chargenvariation bewerten zu können wurden aus drei Chargen je sechs Proben genommen. Dabei wurde in den Chargen ein Ethanolgehalt von 406 - 720 g L<sup>-1</sup> festgestellt. Toluol konnte ebenfalls in allen Proben nachgewiesen werden, mit einer maximalen Konzentration von 0,5 g L<sup>-1</sup>, sowie in einer der Proben Methanol (0,2 g L<sup>-1</sup>). Ein Ethanolgehalt von bis zu 720 g L<sup>-1</sup> stellte eine geeignete Konzentration dar um in Zufütterungsverfahren Substrat zugeben zu können ohne zu große Verdünnungseffekte zu verursachen. Eine Quantifizierung weiterer Substanzen zeigte, dass diese unter der Bestimmungsgrenze lagen. Toluol ist gesundheitsschädlich, daher wurde als Sicherheitsmaßnahme die Arbeit unter Abzügen bzw. mit Schnüffelleitung festgelegt. Eine Quantifizierung anderer Substanzen war aufgrund der geringen Konzentration nicht möglich. Daraufhin wurde am Fraunhofer IGB in 48 Experimenten im Mikrofermentersystem mikrobiologisch untersucht, wie die drei Bestandteile des Spülwassers (Ethanol, Toluol und Methanol) sich auf das Wachstumsverhalten von *R. rubrum* auswirken. Hierfür wurden die Substanzen, entsprechend der Konzentration im Spülwasser, zu den Kulturen zugegeben und die Wachstumsrate bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 dargestellt:



**Abbildung 2: Einfluss der Alkoholkonzentrationen von Ethanol, Toluol und Methanol auf das Wachstum von *R. rubrum*. Die Wachstumsrate ist normiert auf einen Kontrollversuch ohne Alkohol.**

Dabei wurde beobachtet, dass bei Ethanol ab etwa 10 g L<sup>-1</sup> das Wachstum der Bakterien gehemmt wurde, in denen für Methanol und Toluol gewählten Konzentrationen wurde keine Inhibition des Wachstums beobachtet. Vermutlich da der Abbau von Ethanol über Acetat in den Tricarbonsäurezyklus energetisch weniger effektiv abläuft, als die direkte Einspeisung in den Zyklus wie sie bei Succinat auftritt. Dieser Effekt konnte bei Toluol und Methanol nicht beobachtet werden, diese Substanzen können von *R. rubrum* jedoch aufgrund von fehlenden Enzymen auch nicht verstoffwechselt werden. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass mit Wahl der geeigneten Konzentrationen ein Wachstum auf dem Spülwasser als Substrat möglich ist.

### 5.2.1.2 Optimierung verschiedener Nährsubstratkombinationen zur Kultivierung von *R. rubrum* (IBBS und IGB)

Auch der *R. rubrum* Wild-Typ kann kleine Mengen Ethanol (ca. 1% (v/v)) verwerten, was als Startpunkt zur Testung verschiedener Substratkombinationen diente. In Abbildung 3 ist sichtbar, dass 1% (v/v) Ethanol nicht nur toleriert wurde sondern, in Kombination mit verschiedenen Substraten wie Succinat, Fructose und Pyruvat zu einer Wachstumssteigerung führten. Auch Zugabe von Bicarbonat führte zu höheren Zelldichten. Allerdings waren die Kulturen, die mit Ethanol gezüchtet wurden, viel blasser gefärbt, was sich auch in einem niedrigen Verhältnis der Absorption  $A_{880}$  zu  $A_{660}$  (entspricht der Menge photosynthetischer Membranen/Zelle) niederschlug (Abbildung 4). Höhere Ethanol-Konzentrationen als 1% führten in den hier gezeigten Experimenten zu einer Wachstumshemmung und konnten nur von dem an Ethanol angepassten Stamm S1E erfolgreich verwertet werden.

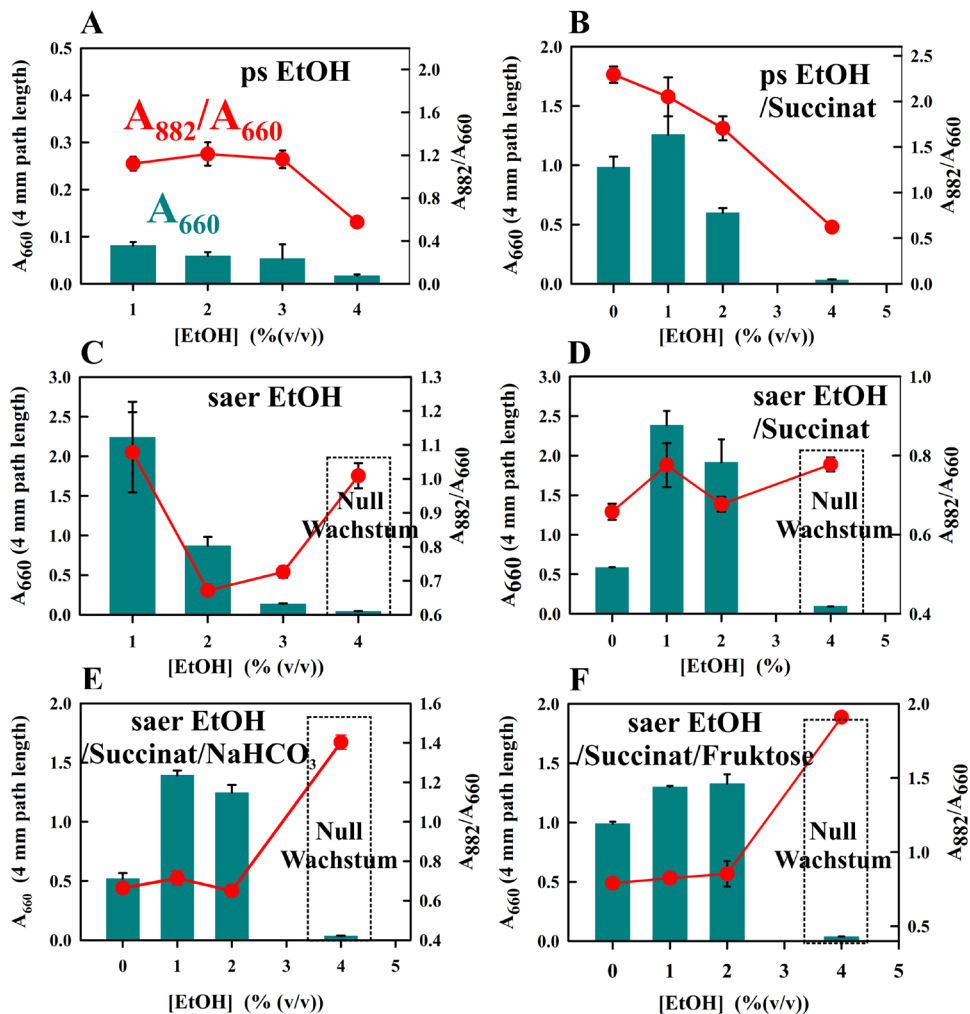


Abbildung 3: Photosynthetisches (ps, anaerob) und semi-aerobes (saer, dunkel) Wachstum von *R. rubrum* Wild-Typ S1 mit verschiedenen Ethanol (EtOH)-Substrat-Kombinationen. Als Inokulum wurden gewachsene Zellen aus semi-aeroben M2S-Kulturen verwendet. Die Absorptionswerte bei 660 nm (Zelldichte) sind als Balken, das Verhältnis  $A_{882}/A_{660}$  (Membranen/Zelle) als rote Punkte gezeigt (Mittelwerte aus jeweils 3 Messungen mit Standardabweichungen als Fehlerbalken).



Abbildung 4: Semi-aerobe Kultivierung mit EtOH als einzigem Substrat.

Durch schrittweise Anpassung an höhere Ethanol-Konzentrationen wurde der Stamm S1E entwickelt (Abbildung 5), der mit Ethanol als einziger C-Quelle wachsen kann (Abbildung 6):

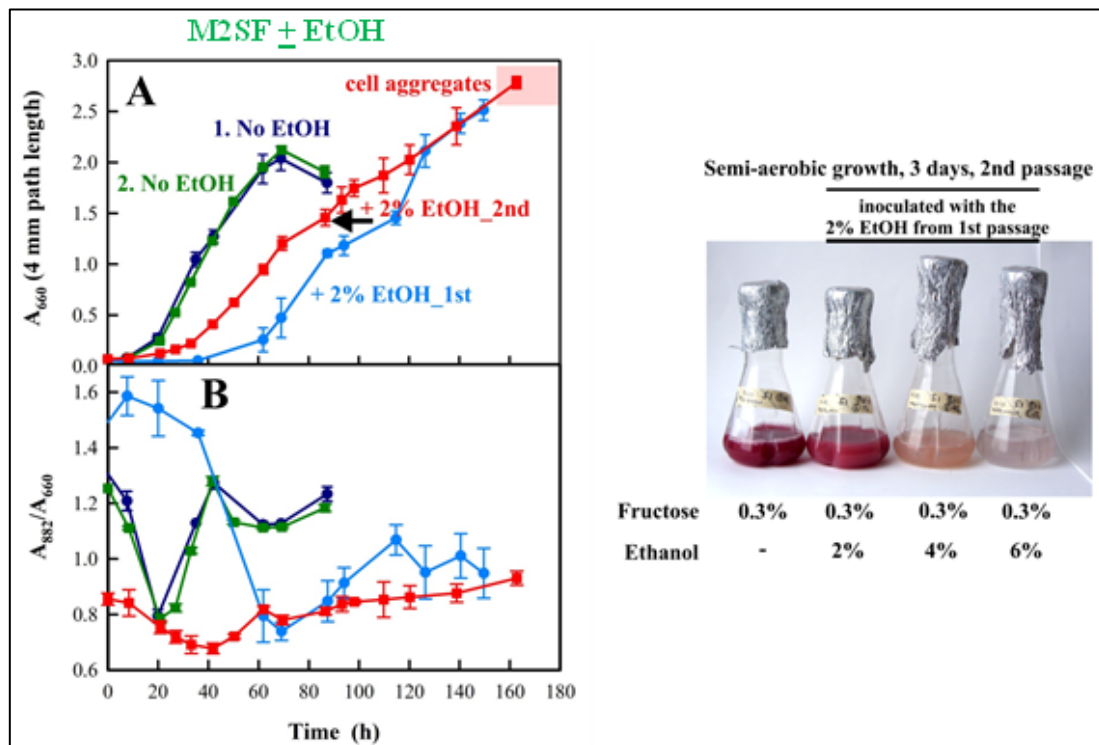


Abbildung 5: Wachstumskurven von *R. rubrum*-Kulturen, die an höhere EtOH-Konzentrationen angepasst wurden. Schon nach der zweiten Passage ist eine signifikante Verkürzung der lag-Phase bei Wachstum mit 2% Ethanol sichtbar.

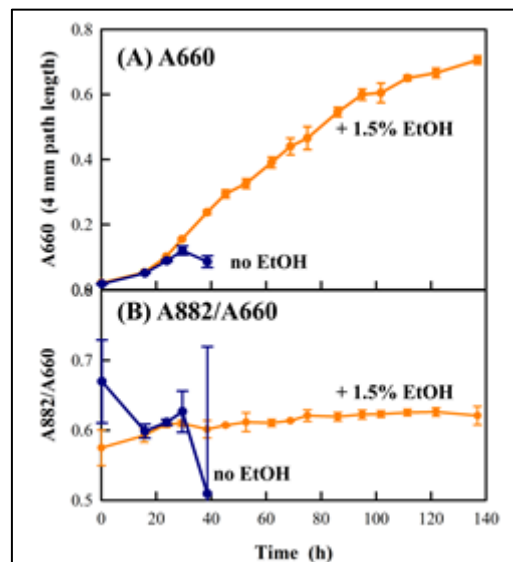
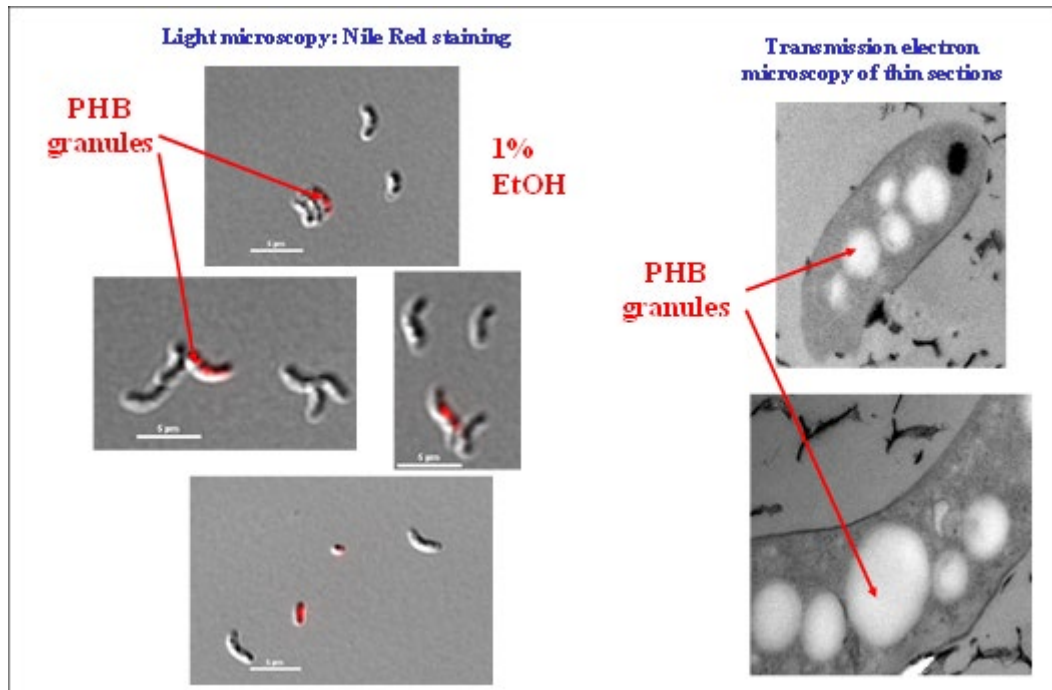


Abbildung 6: Wachstum des im Projekt entwickelten EtOH-angepassten Stamms S1E mit EtOH als einziger C-Quelle.

Die mit den verschiedenen Substratkombinationen gewachsenen Kulturen wurden auch, mit Hilfe eines im Projekt entwickelten Schnell-Screening-Verfahrens zur Wasserstoffmessung (mittels eines herkömmlichen Wasserstoff-Alarmsensors) auf ihre Wasserstoff-Produktionskapazität hin untersucht. Hier zeigte sich jedoch, dass, unter semi-aeroben Bedingungen, mit Ethanol als einzigem Substrat keine Wasserstoffproduktion erfolgte. Allerdings wurden große Mengen an PHB produziert (Abbildung 7). Signifikante Wasserstoffproduktion konnte nur mit Fructose oder Extrakten aus Frucht-Trester erreicht werden. Als Strategie für die Zukunft

könnte mit *R. rubrum* somit Zellmasse, CO<sub>2</sub> und PHB mit Hilfe von Ethanol-haltigen Wasch-wässern von Evonik produziert werden, Wasserstoff und CO<sub>2</sub> aber aus biogenen Abfällen aus der Region.



**Abbildung 7: Mit EtOH gezüchtete *R. rubrum* Zellen zeigen eine Überproduktion an PHB.**

Auf Basis dieser Ergebnisse galt es am Fraunhofer IGB zu bewerten, in welcher Form das Spülwasser optimal eingesetzt werden kann, ob das im Medium vorhandene Succinat vollständig durch Ethanol ersetzt werden kann, wie es sich auf die Bildung von Photosynthesemembranen auswirkt und wie hemmende Wachstumseffekte durch eine Medienoptimierung minimiert werden könnten.

Hierfür wurde im Schüttelkolbenmaßstab untersucht, welche Änderungen im Kultivierungsverhalten von *R. rubrum* auftraten, wenn Ethanol zum Fructose-Succinat Medium (Grundmedium) lediglich zugegeben oder Succinat durch Ethanol substituiert wurde. Dabei konnten zwei Effekte beobachtet werden. Erstens wird das Wachstum gehemmt, unabhängig davon ob Ethanol addiert oder substituiert wurde und zweitens beeinträchtigte Ethanol ebenfalls in beiden Fällen die Photosynthesemembranbildung. Dabei wurde aber nur eine Verzögerung beobachtet, die auf eine geringere Überreduktion der Bakterien aufgrund der Substrathemmung zurückzuführen sein könnte. Im Verlauf der Kultivierung wurde dann aber ein Niveau entsprechend des Fructose-Succinat Mediums erzielt. Für zukünftige Versuche wurde entschieden, dass Succinat durch Ethanol ersetzt wird, um Kosten für eine zusätzliche Kohlenstoffquelle zu vermeiden.

In weiteren Versuchen stellte sich die Kombination von Fructose und Ethanol als eine Notwendigkeit heraus, da es ohne zusätzliche Reduktionsäquivalente aus der Glykolyse der Fructose nicht zu einer Überreduktion der Bakterien kam, was die Membranbildung beeinträchtigte und die Wasserstoffausbeute erheblich senkte. Als eine Möglichkeit auch Fructose aus Reststoffströmen zu nutzen wurde die Nutzung von fructosehaltigen Fermentationsüberständen aus der am Fraunhofer IGB entwickelten Biotensidproduktion mit Saccharose getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass der sterilfiltrierte Überstand direkt von *R. rubrum* verwertet werden kann und ein identisches Kultivierungsverhalten wie mit reiner Fructose erreicht wird.

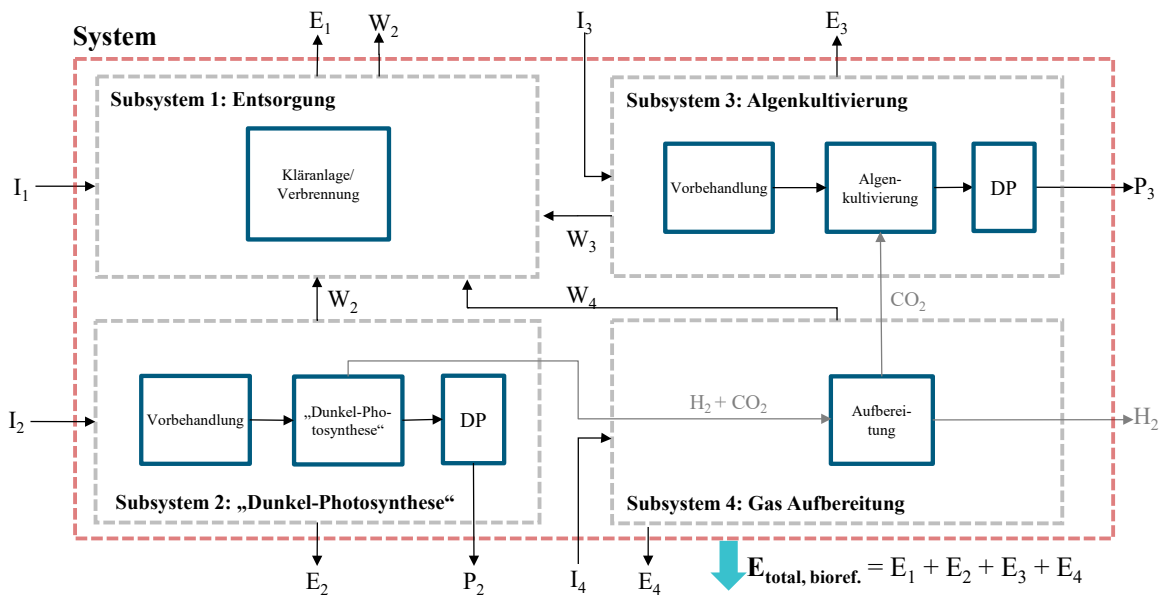
Für einen effizienten Prozess galt es im Anschluss die Hemmwirkung von Ethanol auf das Bakterienwachstum zu minimieren um Prozesszeiten zu verkürzen. Hierfür wurde in einer statistischen Versuchsplanung zunächst verschiedene Fructose-Ethanol Verhältnisse (0-15 g L<sup>-1</sup>) zusammen mit der Konzentration dreier Stickstoffquellen (0-10 g L<sup>-1</sup>) variiert. Als Optimie-

rungsparameter wurde einerseits eine größtmögliche Wachstumsrate, sowie eine größtmögliche Ethanolkonzentration gewählt, um eine möglichst große Mengen der anfallenden Spülwasser der Evonik nutzen zu können. Hierbei zeigte sich, dass höhere Ethanolkonzentrationen grundsätzlich möglich sind, wenn in gleichem Maße Fructose zugegeben wurde, ein Optimum wurde dabei bei 11,25 g/L identifiziert. Während Ammoniumchlorid und Harnstoff bereits in höheren Konzentrationen toxisch wirkten, lag bei Glutamat eine höhere Toleranz und auch eine höhere Wachstumsrate vor. Da Glutamat aber vergleichsweise ein sehr teures Substrat ist und bei der Evonik auch Ammoniumchlorid als Nebenstoffstrom anfiel wurde sich für Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle entschieden. Neben der Zusammensetzung der Kohlenstoff- und Stickstoffquelle wurde das Medium auch dahingehend optimiert, dass die Konzentration an Phosphat, Vitaminen und Spurenelementen variiert wurde. Während eine Steigerung der Anteile von Phosphat und Vitaminen das Wachstum förderten, wirkten Spurenelemente in der Ausgangskonzentration bereits hemmend. Durch die Anpassung dieser Faktoren konnte die Wachstumsrate von *R. rubrum* noch einmal um ca. 30 % gesteigert werden. Somit wurde ein neue Mediumzusammensetzung identifiziert, welche trotz des Einsatz von höheren Ethanolkonzentrationen eine gesteigerte Wachstumsrate aufwies, welche 64 % der Wachstumsrate ohne Ethanol entsprach.

## **5.2.2 Entwicklung einer spezifischen Bewertungssystematik unter Berücksichtigung ökonomischer und ökologischer Kriterien**

### **5.2.2.1 Technische Abstraktion der Teilprozesse und Übertrag in modulares und kombinierbares Verfahrensgrundmodell**

Eine Prozessabstraktion des Bioraffineriekonzepts ist unten zusammen mit den Systemgrenzen dargestellt. Das entwickelte Bioraffineriekonzept wurde in vier Teilsysteme unterteilt, die den Hauptprozessschritten entsprechen. Diese sind 1) ein Abfallmanagement-Subsystem, bestehend aus einer Abwasserbehandlung und einer Verbrennungsstufe, 2) die bakterielle Konversionsstufe, einschließlich Substratvorbehandlung und Downstream Processing (DP), 3) die Algenkultivierungsstufe zur Bindung von CO<sub>2</sub> aus der bakteriellen Konversionsstufe, ebenfalls einschließlich der entsprechenden Vorbehandlungs- und Downstream Processing-Schritte, und 4) eine Reinigungsstufe, bestehend aus einer Druckwechseladsorptionsanlage. Die Stoff- und Energieströme, die in jedes Teilsystem eintreten und es verlassen, wurden als Emissionen (E), Inputs (I), Abfälle (W) oder Produkte (P) kategorisiert. Dies sind allgemeine Kategorien, die mehrere Ströme umfassen. Alle Ströme wurden einer dieser Kategorien zugewiesen. Diese Prozessabstraktion kann auf monetäre Flüsse ausgedehnt werden, um Wirtschafts- und Umweltindikatoren zu ermitteln.



**Abbildung 8: Prozessabstraktion, Systemgrenzen und Massenströme des untersuchten Biorefineriekonzepts mit Input (I), Emissionen (E), Produkten (P) und Abfällen (W). Die  $H_2$  und  $CO_2$  Ströme zwischen den Prozessschritten und zwischen den verschiedenen Teilsystemen sind in grau dargestellt. DP= „Downstream Processing“.**

Die Gesamtemissionen des Biorefineriekonzepts ( $E_{total, bioref.}$ ) ergaben sich aus der Summe der Emissionen der einzelnen Teilsysteme. Diese Emissionen umfassen alle Output-Stoffströme, die in die Umwelt freigesetzt werden und eine entsprechende Wirkung haben. Auswirkungen, die mit der Produktion von Einsatzstoffen und Energie sowie mit der Erschöpfung endlicher Ressourcen verbunden sind, wurden ebenfalls berücksichtigt (nicht dargestellt). Alle Stoff- und Energieströme sind über Input/Output-Modelle für jede Prozesseinheit zu ermitteln, wobei eine Kombination aus verfügbaren Daten, Prozessparametern und Prozesssimulationen verwendet wurde. Diese Modelle dienen als Sachbilanz, das dann zur Durchführung der Ökobilanz mit spezieller Ökobilanzsoftware verwendet wurde.

### 5.2.2.2 Definition des Untersuchungsrahmens und Auswahl der Bewertungskriterien

Der Rahmen für die durchgeführte Bewertung wird in den einzelnen Komponenten unten erläutert.

#### Ziel

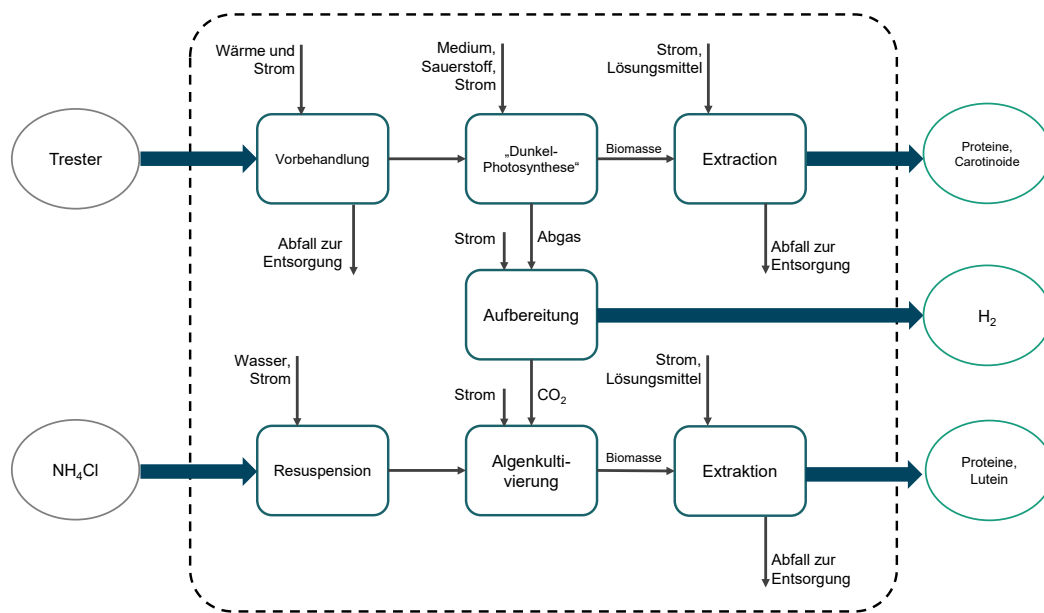
Ziel der Studie war es, die Umweltauswirkungen des geplanten Biorefineriekonzepts anhand ausgewählter Indikatoren im Rahmen eines Life Cycle Assessment (LCA) zu bewerten. Diese Analyse wurde in Anlehnung an die Standards für Ökobilanzen nach den Normen ISO 14040 und ISO 14044 durchgeführt.

#### Auswahl der funktionellen Einheit

Um die Umweltauswirkungen des geplanten Biorefineriekonzepts abschätzen zu können, musste eine funktionelle Einheit definiert werden. Diese funktionelle Einheit diente als Referenz, auf die sich alle berechneten Auswirkungen beziehen, um eine Vergleichbarkeit über verschiedene Systeme hinweg zu ermöglichen. Als funktionelle Einheit wurde für diese Studie 1 kg Wasserstoffgas ( $H_2$ ) mit einer Reinheit von  $> 99\%$  gewählt, das am Standort der Evonik Operations GmbH in Rheinfeldern den weiteren Konversionsprozessen zugeführt werden kann.

#### Systemgrenzen

Die definierten Systemgrenzen für die Umweltanalyse des Biorefineriekonzepts sind in Abbildung 9 dargestellt. Entsprechend dieser Abgrenzung ist die Analyse eine Gate-to-Gate-Studie.



**Abbildung 9: Systemgrenzen des untersuchten Bioaffinerie-Konzepts**

Wie in Abbildung 9 dargestellt, wurden die Auswirkungen im Zusammenhang mit der Erzeugung der Abfallströme Ammoniumchlorid und Ethanol in dieser Analyse nicht berücksichtigt. Da diese Ströme vor Ort erzeugt werden, wurden die mit ihrem Transport verbundenen Auswirkungen als vernachlässigbar angesehen und daher in dieser Studie nicht berücksichtigt. Was die zusätzliche Kohlenstoffquelle betraf, so wurden die Auswirkungen, die sich aus der Ernte und der Verarbeitung der ursprünglichen Kulturpflanze (z. B. Karotten oder rote Beete) ergaben, ebenfalls nicht in die Studie einbezogen, da diese Auswirkungen unabhängig von der Umsetzung des Bioaffineriekonzepts auftreten. Der Transport der Abfallfraktion dieses Materials, die als zusätzliche Kohlenstoffquelle für die Stufe *R. rubrum* verwendet werden sollte, vom Ort der Erzeugung zum Standort der Evonik in Rheinfelden wurde hingegen in die Systemgrenze einbezogen. Dies ist gerechtfertigt, da diese Emissionen sonst nicht aufgetreten wären. Beide biologischen Prozesse sind in dieser Studie enthalten, einschließlich aller notwendigen Vorbehandlungsschritte für alle drei Hauptrohstoffe (Ammoniumchlorid, Ethanol und die zusätzliche Kohlenstoffquelle). Die Nebenprodukte der biologischen Prozesse wurden ebenfalls in die Analyse einbezogen, und zwar bis sie für den Abtransport aus der Anlage bereit sind. Auswirkungen aus ihrer Nutzungsphase wurden daher nicht berücksichtigt.

### Zeitliche und geografische Abgrenzung

Der gewählte Zeitbezug für diese Studie war das Jahr 2024.

Der geografische Geltungsbereich war die Stadt Rheinfelden, Baden-Württemberg, Deutschland. Der Energieverbrauch berücksichtigte den deutschen Strommix. Chemikalien und andere Materialien wurden aus dem deutschen Markt bezogen.

### Allokation

Die Energiebedarfe, eingesetzten Ressourcen und Emissionen der Biowasserstoffproduktion wurden mittels Allokation aufgeteilt und den Produkten Biowasserstoff, Carotinoide, Proteine sowie biogene Reststoffe und Abwasser zugeordnet. Trotz dieser Vielzahl an Produkten war die Multifunktionalität dieses Systems bedingt gegeben. Zwar entstanden zusätzlich zu Biowasserstoff Nebenprodukte, diese erfüllen jedoch nicht die Hauptfunktion des Systems, Biowasserstoff zu produzieren. Eine Allokation im klassischen Sinne war hier kaum möglich, da die Kausalitäten des Systems nicht eindeutig hervorgingen. Insbesondere auf stofflicher Ebene konnte keine Allokation stattfinden. Es wurde deshalb eine Systemerweiterung vorgenommen. Die CO<sub>2</sub>-Emission der „Dunkel-Photosynthese“ wurde aufgrund dieser Systemerweiterung zum Zwischenproduktfluss und wurde von dem darauffolgenden Prozess, der Algenkultivierung, vollständig aufgenommen. Die Umweltwirkung dieses CO<sub>2</sub> wurde deshalb nicht berücksichtigt.

## Abschneidekriterien

Die Verwendung von Abschneidekriterien ermöglichte eine Vereinfachung des Produktsystems, indem Inputs bzw. Prozessschritte mit einem geringen Beitrag auf die Gesamtbilanz abgeschnitten werden können. Inputs, die beispielsweise einen geringen Anteil an Masse, Energie oder Umweltbelastung haben, können dadurch unberücksichtigt bleiben. Die Festlegung eines Schwellenwerts wurde selbst getroffen und war abhängig von dem jeweiligen Ziel der Untersuchung.

Bei dem untersuchten System zur Biowasserstoffherstellung wurden folgende Entscheidungskriterien definiert:

- Die ausgepressten Bioapfeltrester wurden nach dem Vorbehandlungsschritt bei der weiteren Produktion nicht mehr benötigt und fallen als biogene Reststoffe an. Sie wurden in diesem Prozess bereits als Abfallprodukt der Fruchtsaftindustrie weiterverarbeitet, die Tresterreste können jedoch auf unterschiedliche Weisen weiterverwendet werden. Ihre weitere Nutzung wurde für verschiedene Szenarien geprüft, die in Abschnitt 5.2.4 beschrieben werden.
- Bei der Herstellung des M2SF-ähnlichen Kulturmediums wurden alle Substanzen abgeschnitten, die eine Konzentration von unter 0,3 g/L ausmachen. Es ist davon auszugehen, dass mit dem geringen Massenanteil eine ebenso geringe Umweltauswirkung einhergeht.
- Die Herstellung der Bakterienvorkultur wurde abgeschnitten. In dem Bioreaktor mit 60 L Arbeitsvolumen ist eine reine Bakterienkultur von ca. 21 mL enthalten. Der Anteil betrug also <0,04 %.
- Die benötigte Energie zur Steuerung und Regelung der Anlagen wurde abgeschnitten. Es wurde von einem geringen Energieaufwand ausgegangen.

### 5.2.2.3 Priorisierung der Bewertungskennzahlen für Bioraffinerie-Konzepte und Überführung in eine Systematik

Die entwickelte Bewertungssystematik zur technoökonomischen und ökologischen Bewertung des Bioraffineriekonzepts lässt sich in acht grundlegende Schritte unterteilen, die in Abbildung 10 dargestellt sind. Die Bewertungskennzahlen werden im Folgenden beschrieben.

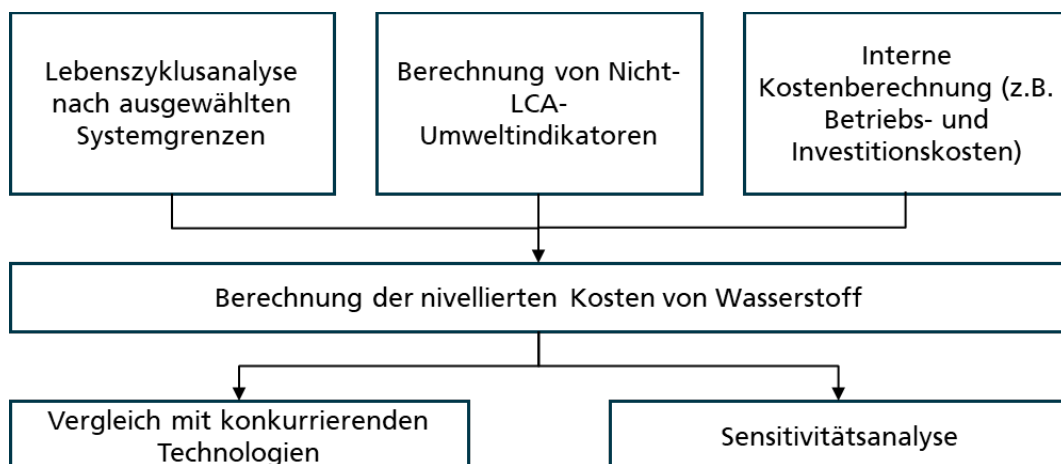


Abbildung 10: Überblick der angewendeten Bewertungssystematik.

## LCA-Wirkungskategorien und Indikatoren

Der Klimawandel stellte aufgrund seiner hohen sozialen, politischen und ökologischen Relevanz eine geeignete Wirkungskategorie für die Bewertung von Technologien, Verfahren und Produkten dar. Der für diese Wirkungskategorie verwendete Indikator war der Strahlungs-

antrieb als globales Erwärmungspotenzial für einen 100-Jahres-Zeitraum (GWP100), gemessen in kg CO<sub>2</sub> eq.

Das Versauerungspotenzial und das Eutrophierungspotenzial sind relevante Wirkungskategorien für die Bewertung von Bioraffinerien, da bei biologischen Prozessen relativ große Mengen an Abwasser anfallen. Dieses Abwasser kann verschiedene chemische Stoffe enthalten, die zur Versauerung und Eutrophierung von Gewässern beitragen. Der Indikator für das Versauerungspotenzial ist die kumulierte Überschreitung, gemessen in mol H<sup>+</sup> eq.

Zur Abschätzung des Eutrophierungspotenzials sollte das entsprechende Kompartiment (Süßwasser, Meer oder Land) je nach Prozessspezifikationen wie Standort, Entsorgungswege sowie Art und Effizienz der Abfallbehandlungstechnologien ausgewählt werden. Geeignete Indikatoren könnten die akkumulierte Überschreitung, gemessen in mol N eq, oder der Anteil der in die Gewässer gelangenden Nährstoffe, gemessen in kg P eq oder kg N eq, sein.

Die Kategorie „Wassernutzung“ beschreibt die relative Menge des verbrauchten Wassers, basierend auf regionalisierten Wasserknappheitsfaktoren und gemessen in kg Weltäquivalent des entzogenen Wassers. Sie kann daher für die Bewertung von Bioraffinerien in von Wasserknappheit bedrohten Gebieten relevant sein.

Die Wirkungskategorie Ressourcennutzung (Energieträger) könnte besonders relevant für die Bewertung von Bioraffineriekonzepten sein, die Energieträger auf der Grundlage fossiler Ressourcen produzieren. Der in MJ angegebene Indikator „Abiotischer Ressourcenverbrauch - Fossile Brennstoffe“ kann verwendet werden, um die durch das bewertete Bioraffineriekonzept erzielten Einsparungen bei den fossilen Ressourcen abzuschätzen.

**Tabelle 4: Beschreibung der ausgewählten Wirkungskategorien**

<b>Wirkungskategorie</b>	<b>Indikator</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Einheit</b>
<b>Klimawandel</b>	Strahlungsantrieb als Globales Erwärmungspotenzial (GWP100)	Indikator für die potenzielle globale Erwärmung durch die Emission von Treibhausgasen in die Luft. Beinhaltet die Kohlenstoffrückwirkungen für verschiedene Stoffe. Unterteilt in 3 Unterkategorien auf der Grundlage der Emissionsquelle: (1) fossile Ressourcen, (2) biobasierte Ressourcen und (3) Landnutzungsänderungen.	kg CO <sub>2</sub> eq
<b>Versauerungspotenzial</b>	Kumulierte Überschreitung (engl. „Accumulated Exceedance“ (AE))	Indikator für die potenzielle Versauerung von Böden und Wasser aufgrund der Freisetzung von Gasen wie NH <sub>3</sub> , NO <sub>2</sub> und SO <sub>x</sub> .	mol H <sup>+</sup> eq
<b>Eutrophierung</b>	Kumulierte Überschreitung (engl. „Accumulated Exceedance“ (AE))	Indikator für die Anreicherung des terrestrischen Ökosystems mit Nahrungselementen. Nur die Stickstoff-Konzentration ist der begrenzende und daher wichtige Faktor. Die ursprünglichen Datensätze enthalten Charakterisierungsfaktoren (CF) für NH <sub>3</sub> und NO <sub>2</sub> , die in die Luft abgegeben werden. Der CF für NO wurde anhand der Stöchiometrie abgeleitet, die auf dem Molekulargewicht der betrachteten Verbindungen basiert. Ebenso wurden die NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> - und NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -Ionen charakterisiert.	mol N eq

Wirkungskategorie	Indikator	Beschreibung	Einheit
Wassernutzung	Deprivationspotenzial (deprivationsgewichteter Wasserverbrauch)	Indikator für die relative Menge an verbrauchtem Wasser, basierend auf regionalisierten Wasserknappheitsfaktoren. Bei der EF-Methode wird das Modell A-WARE eingesetzt, das die Auswirkungen in Bezug auf die Menge des entzogenen Wassers bewertet.	kg world eq. Deprived
Ressourcennutzung, Energieträger	Abiotische Ressourcenerschöpfung - fossile Brennstoffe (ADP-fossil)	Indikator für die Erschöpfung der natürlichen Ressourcen an fossilen Brennstoffen.	MJ

### Andere Umweltindikatoren

Andere Bewertungskriterien, die die LCA-Indikatoren ergänzen, sind in Tabelle 5 unten aufgeführt. Die Kennzahlen Energie- und Rohstoffintensität, Abfall-Faktor und Rohstoffintensität konnten durch die Berechnung aller Material- und Energieflüsse innerhalb des Bioraffineriekonzepts geschätzt werden (in dieser Studie wurde dies mithilfe des in Aspen Plus<sup>®</sup> entwickelten Prozessmodells erreicht). Der Einsatz von gefährlichen Chemikalien ist ein qualitativer Indikator, der sich auf die Verwendung von Stoffen bezieht, die gemäß der EU-REACH-Gesetzgebung (Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe) als gefährlich eingestuft werden. Er wurde daher durch die Bewertung der Gefährlichkeit aller im Prozess verwendeten Materialien ermittelt.

Tabelle 5: Weitere Umweltindikatoren

Kennzahl	Beschreibung	Einheit
Abfall-Faktor	Abfallmenge für alle Produkte und Nebenerzeugnisse	kg Abfall / kg Produkte
Rohstoffintensität	Masse der für die Herstellung aller Produkte und Nebenprodukte benötigten Rohstoffe	kg Rohstoff / kg Produkte
Energieintensität	Energiebedarf für die Herstellung aller Produkte und Nebenprodukte	kWh / kg Produkte
Einsatz gefährlicher Chemikalien	Qualitativer Indikator für die Verwendung gefährlicher Chemikalien im Produktionsprozess	Gut / Schlecht

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Indikatoren, Rahmenbedingungen und die Methodik wurden mit einem externen Expertengremium im Sinne eines Critical Review Board diskutiert. Insgesamt wurden zwei Termine durchgeführt. Das Feedback dieses Gremiums wurde in die Bewertungsmethode eingearbeitet.

## 5.2.3 Simulationsmodell zur techno-ökologischen und ökonomischen Bewertung

### 5.2.3.1 Aspen Plus Modellierung der Stoff- und Energieflüsse

Die Input- und Output-Informationen wurden zur Erstellung eines Prozessmodells in Aspen Plus® verwendet, das wiederum zur Erstellung von Massen- und Energiebilanzen diente. Diese wurden dann verwendet, um die Sachbilanz für das Gesamtkonzept der Bioraffinerie zu erstellen (Abbildung 11). Die Inventardaten wurden in die LCA-Software Umberto® der iPoint Systems GmbH integriert und zur Berechnung der LCA-spezifischen Wirkungskategorien mit Hilfe der Ecoinvent 3.9-Datenbank verwendet, während die aus dem Aspen Plus®-Modell gewonnenen Stoff- und Energiebilanzen zur Abschätzung der Nicht-LCA-Indikatoren verwendet wurden.

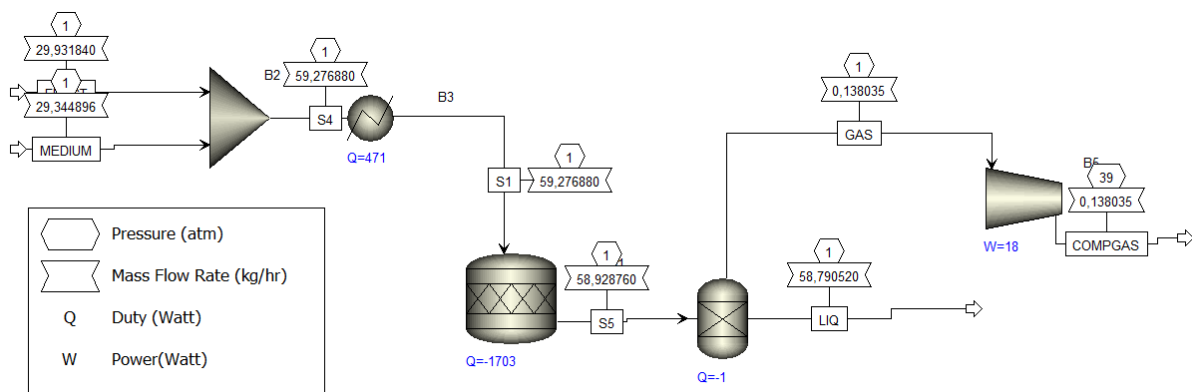


Abbildung 11: Bildschirmausschnitt von Aspen Plus® Modell für „Dunkel-Photosynthese“.

Das Prozessmodell wurde in zwei Abschnitte unterteilt, die den Schritten der „Dunkel-Photosynthese“ und der Algenkultivierung entsprechen. Diese wurden getrennt modelliert, da sie im realen Prozess voneinander entkoppelt und nur durch die Abtrennung und Speicherung von Wasserstoff und CO<sub>2</sub> verbunden sind. Der Abschnitt „Dunkel-Photosynthese“ wurde als Batch-Prozess mit einem 65-Stunden-Zyklus modelliert (Abbildung 11). Die Algenkultivierung wurde als kontinuierlicher Prozess mit CO<sub>2</sub> und NH<sub>4</sub>Cl als primären Inputs modelliert. Für beide Prozesse wurden die Komponenten mit Hilfe der Aspen Plus®-Datenbank (sofern verfügbar) definiert und benutzerdefinierte („nicht konventionelle“) Komponenten für die Biomassefraktionen erstellt. Das thermodynamische Paket NRTL (engl. „non-random two-liquid“) wurde zur Modellierung beider Schritte verwendet, da beide unter Umgebungsdruck durchgeführt werden. Für die Modellierung der Gastrennung wurde ein generischer Abscheiderblock aus der in Aspen Plus® verfügbaren Palette verwendet.

Ein separates Modell wurde für die Vorbehandlung von Apfeltrester als Hauptkohlenstoffquelle erstellt. Die modellierten Prozessschritte umfassten eine Zerkleinerung und einen Extraktionsschritt mit heißem Wasser bei 142 °C (Autohydrolyse) gemäß Hijosa-Valsero et al.<sup>5</sup> Für die Zerkleinerung wurde das generische Modell der Aspen Plus® Modellpalette mit einem Endpartikeldurchmesser von 5 mm verwendet (eigene Annahme). Die Kinetik der Fructoseextraktion und die Ausbeute wurden aus der Literatur entnommen und in einem RYield-Reaktor zur Modellierung des Extraktionsschritts verwendet. Der resultierende Strom wurde mit einem M2SF-Mediumstrom kombiniert und dem Reaktor für „Dunkel-Photosynthese“ mit einem Volumen von 60 L zugeführt.

In Laborversuchen wurde die Menge an Fructose, die effektiv aus Apfeltrester extrahiert werden kann, mit 50 Gramm pro Kilogramm Trester gemessen. Die Extraktion wurde als Zerkleinerung, Resuspension in Wasser und Filtration modelliert, wobei von ähnlichen Flüssigkeitseigenschaften wie bei Tomatensaft ausgegangen wurde und generische Blöcke aus der Aspen

<sup>5</sup> Hijosa-Valsero, M., Paniagua-García, A.I. & Díez-Antolínez, R. Biobutanol production from apple pomace: the importance of pretreatment methods on the fermentability of lignocellulosic agro-food wastes. *Appl Microbiol Biotechnol* 101, 8041–8052 (2017).

Plus® Modellpalette verwendet wurden. Der Stromverbrauch wurde auf der Grundlage ähnlicher Studien angenommen. Der Apfeltresterextrakt wurde dann einem Hygienisierungsschritt unterzogen, der aus einer einstündigen Erhitzung bei 70 °C bestand. Der Energiebedarf wurde anhand der von Aspen Plus® berechneten Wärmeabgaben ermittelt.

Die „Dunkel-Photosynthese“ wurde als Batch-Reaktion mit einer Kapazität von 100 Litern (60 Liter Arbeitsraum + 40 Liter Overhead) unter Verwendung eines der vordefinierten Reaktormodelle in Aspen Plus® (RYield) modelliert. Die Temperatur des Reaktors wurde auf 30 °C bei atmosphärischem Druck eingestellt.

In Laborversuchen wurde eine Wasserstoffausbeute von 0,25 mol H<sub>2</sub>/mol Fructose pro Batch gemessen. Der in diesen Versuchen gemessene Biomassertrag von *R. rubrum* auf dem M2SF-Medium betrug 0,33 Gramm Biomasse pro Gramm Fructose. Dieser Wert lag etwa 40 % unter dem maximalen Biomassertrag von *R. rubrum* auf M2SF-Medium, der von Zeiger et al.<sup>6</sup> berechnet wurde. Deren Studie konzentrierte sich jedoch nicht auf die Wasserstoffproduktion und verwendete ein Fed-Batch-Verfahren, um Kulturen mit hoher Zelldichte zu erreichen. Daher ist ihre Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen dieser Arbeit eingeschränkt.

Die bakterielle Biomasse wurde als nicht-konventionelle (d. h. benutzerdefinierte) Verbindung modelliert, wobei die von Favier-Teodorescu et al.<sup>7</sup> berichtete durchschnittliche Zellzusammensetzung für *R. rubrum* verwendet wurde. Die Ausbeuten und Stoffströme aus den Carotinoid- und Proteinextraktionsprozessen wurden anhand von Literaturdaten über gängige Lösungsmittel-/Lösungsmittelextraktionsmethoden unter Verwendung von Hexan und Methanol als Lösungsmittel (siehe z. B. die von Bóna-Lovász et al.<sup>8</sup> beschriebene Methode) zusammen mit den aus den Prozesssimulationen erhaltenen Biomasseausbeuten geschätzt. Diese Schritte wurden als einfache Extraktionskolonne in Aspen Plus® modelliert.

Die wichtigsten Inputs für die Algenzucht waren der CO<sub>2</sub>-Strom aus der „Dunkel-Photosynthese“ und festes Ammoniumchlorid (NH<sub>4</sub>Cl). Die einzige Vorbehandlung, die für diesen Strom in Betracht gezogen wurde, war das Mischen mit Wasser auf eine Konzentration von 0,033 %. Es wurde davon ausgegangen, dass die Verfütterung von unsterilem NH<sub>4</sub>Cl das Wachstum der Algenarten in der Kultur nicht wesentlich beeinträchtigt, was durch Labortests bestätigt wurde. Der Nährstoffbedarf wurde aus den Versuchsergebnissen abgeleitet und zur Festlegung der Durchflussmenge beider Ströme verwendet.

Die kontinuierliche Algenkultivierung mit *C. sorokiniana* wurde mit einem Ertrag-Reaktor aus der Reaktorpalette in Aspen Plus® (RYield) simuliert. Diese Einheit stellte die fünf flachen Air-lift-Photobioreaktoren von je 25 L dar, in denen die Algen kultiviert werden. Es wurde ein Gewinn an Algenbiomasse von 5 gCDW/L pro Zyklus zugrunde gelegt (Zyklusdauer = 4 Tage mit einer Betriebszeit von 24 h pro Tag). Außerdem wurde ein durchschnittlicher Kohlenstoffgehalt von 49 % für *C. sorokiniana* verwendet, um die pro Zyklus gebundene CO<sub>2</sub>-Menge zu schätzen. Mit diesen Werten wurden die Umwandlungsanteile und der Gesamtmassenertragsanteil für einen Zyklus geschätzt.

---

<sup>6</sup> Zeiger, L.; Grammel, H. Model-based high cell density cultivation of *Rhodospirillum rubrum* under respiratory dark conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 2010, *105*, 729–739. <https://doi.org/10.1002/bit.22589>.

<sup>7</sup> Favier-Teodorescu, L.; Cornet, J.F.; Dussap, C.G. Modelling continuous culture of *Rhodospirillum rubrum* in photobioreactor under light limited conditions. *Biotechnol. Lett.* 2003, *25*, 359–364.

<sup>8</sup> Bóna-Lovász, J.; Bóna, A.; Ederer, M.; Sawodny, O.; Ghosh, R. A rapid method for the extraction and analysis of carotenoids and other hydrophobic substances suitable for systems biology studies with photosynthetic bacteria. *Metabolites* 2013, *3*, 912–930. <https://doi.org/10.3390/metabo3040912>.

Die wichtigsten Parameter, die für das Aspen Plus®-Modell des Algenkultivierungsschritts verwendet wurden, sind in Tabelle 6 aufgeführt.

**Tabelle 6: Wichtige Parameter für die Modellierung der Algenkultivierung.**

<b>Parameter</b>	<b>Wert</b>	<b>Einheit</b>
NH <sub>4</sub> Cl Zufuhrtrate	3.11	g/h
NH <sub>4</sub> Cl Umwandlungsfraction	0.756	-
CO <sub>2</sub> Zufuhrtrate	47.04	g/h
CO <sub>2</sub> Umwandlungsfraction	0.249	-
Algenbiomasse Massenertragsanteil	0.13	-
NH <sub>4</sub> Cl Massenausbeuteanteil	0.015	-
CO <sub>2</sub> Massenausbeuteanteil	0.704	-

### **5.2.3.2 Umberto Modell zur Ökobilanzierung und Verknüpfung mit dem Stoff- und Energieflussmodell**

Das in Aspen Plus entwickelte Prozessmodell wurde zur Generierung der Inventardaten für ein Ökobilanzmodell verwendet, das mit der Software Umberto der iPoint systems GmbH erstellt wurde. Die für die Bewertung des Bioraffineriekonzepts gewählte Methode war der „Environmental Footprint“ (3.1). Für die Auswirkungskategorie Klimawandel wurden biogene, Landnutzung und Landnutzungsänderung sowie fossile Kohlenstoffemissionen separat geschätzt. Die Eingangs- und Ausgangsflüsse wurden dabei in dem Modell hinterlegt. Für einen Teil der Flüsse wurden bereits existierende Datensätze aus der Ecoinvent (v. 3.9)-Datenbank verwendet. Für In- und Outputs, die erwartbare Umweltauswirkungen besitzen, jedoch nicht in der Datenbank sind, wurden Proxys bestimmt. Nach Trenkler und Stahlecker sind Proxys Ersatzvariablen, die für Variablen des Systems eingesetzt werden können, falls diese selbst bzw. zugehörige Datensätze nicht vorhanden sind. Proxys können dabei nie die genauen Wirkungen/Ergebnisse abbilden, aber je nach Qualität, ähnliche (Trenkler & Stahlecker 1996, S.65). In diesem Modell waren die verwendeten Proxys den In- bzw. Outputs stofflich ähnliche Substanzen, von denen auszugehen ist, dass die Umweltauswirkungen annähernd gleich groß waren, aufgrund der ähnlichen chemischen Zusammensetzung/Klassifikation oder eines ähnlichen Herstellungsprozesses.

### **5.2.3.3 Integration der Bewertungssystematik in das verknüpfte Bewertungsmodell und Entwicklung einer Benutzeroberfläche**

Die entwickelte Bewertungssystematik wurde in eine in Microsoft Excel entwickelte Benutzeroberfläche integriert. Es können verschiedene Prozessrouten basierend auf den wichtigsten Technologien zur Biowasserstoffproduktion (anaerobe Vergärung mit Methanreformierung, Dunkelfermentation und Vergasung) ausgewählt werden. Der Benutzer wird aufgefordert, geeignete Prozessschritte einzugeben, um das gewünschte Produkt (u. a. Wasserstoff, Düngemittel, Carotinoide und Biopolymere) zu erzeugen, einschließlich der Optionen für die Vorbehandlung und nachgeschaltete Verarbeitung. Wenn ein geeigneter Prozessweg ausgewählt wird, werden die wirtschaftlichen und ökologischen Auswirkungen für dieses Produkt und diesen Produktionsweg mit verschiedenen Visualisierungsoptionen angezeigt. Andernfalls wird eine Fehlermeldung angezeigt. Das Excel-Tool ist diesem Bericht als separate Datei beigelegt.

Für die Erstellung des Tools wurden Wirtschafts- und Umweltdatenbanken unter Verwendung von Literaturdaten für jeden Prozessweg erstellt. Diese Daten wurden in separaten Datenblättern zusammengestellt und, soweit möglich, an das angewandte Bewertungssystem angepasst. Die entsprechenden Metriken wurden dann auf der Grundlage von Expertenwissen und eigenen Annahmen berechnet.

Mehrere Prozessrouten und -kombinationen wurden nicht in das Tool aufgenommen, da keine

geeigneten Daten vorlagen oder diese nicht mit der verwendeten Bewertungsmethode kompatibel waren. So wurden in einigen Fällen die Auswirkungen in der Literatur mit einer anderen funktionellen Einheit angegeben, die nicht in die im Tool verwendete funktionelle Einheit umgerechnet werden konnte, so dass eine Umrechnung nicht möglich war. Außerdem war die Datengrundlage für die verschiedenen dargestellten Routen sehr unterschiedlich, da die einbezogenen Technologien unterschiedliche Reifegrade aufwiesen. Dies spiegelt sich auch in der Verfügbarkeit von Prozessdaten für die einzelnen Routen wieder. Infolgedessen könnten die Ergebnisse für neuartige Prozesse mit relativ wenigen unterstützenden Studien beeinträchtigt sein oder sich auf kleinmaßstäbliche Ergebnisse stützen, die nicht die Realität eines großtechnischen Prozesses widerspiegeln. Das entwickelte Tool wird weiterentwickelt, um mehr Prozessrouten einzubeziehen und die bereits modellierten Prozessrouten zu verfeinern.

## **5.2.4 Simulation für die Bewertung der Ökologie und Ökonomie unterschiedlicher Prozessoptionen**

### **5.2.4.1 Simulationen zur vergleichenden Bewertung verschiedener Prozesskombinationen**

Die in Aspen Plus® durchgeführten Massen- und Energiebilanzen zeigten, dass das Bioraffineriekonzept pro Kilogramm erzeugtem Wasserstoff 0,74 kg Lutein, 0,23 kg  $\beta$ -Carotin und 130 kg Futtermittel erzeugt. Hierfür werden 4,9 Tonnen unverarbeiteter Apfeltrester benötigt. In diesem Fall ist jedoch der Energieverbrauch in Form von Strom angesichts der geringen Wasserstoffausbeute pro Batch und des hohen Energiebedarfs des Abscheidesystems, wie modelliert, besonders hoch (über 10 MWh).

Tabelle 7 zeigt die primären Stoffströme für den Schritt der „Dunkel-Photosynthese“. Der Protein- und  $\beta$ -Carotin-Gehalt wurde in Laborversuchen unter den gleichen Kultivierungsbedingungen wie im Prozessmodell bestimmt ( $\beta$ -Carotin- und Proteingehalt von 2 % bzw. 54 %).

**Tabelle 7: Materialausbeute für die „Dunkel-Photosynthese“.**

<b>Komponente</b>	<b>Wert</b>	<b>Einheit</b>
H <sub>2</sub>	0.25	mol/mol Fructose
	2.80E-03	g/g Fructose
Biomasse	0.33	g/g Fructose
Protein als Futtermittel	0.18	g/g Fructose
$\beta$ -Carotin	6.64E-3	g/g Fructose

Tabelle 8 unten zeigt die berechneten Materialausbeuten für den Algenkultivierungsschritt. Die Hauptprodukte dieser Phase sind Lutein und Protein für Futtermittel. Diese wurden unter der Annahme einer Konzentration in der Algenbiomasse von 0,5 % bzw. 40 % nach Gewicht berechnet. Das Gesamtprodukt bezieht sich auf die Summe des gesamten produzierten Luteins und Proteine.

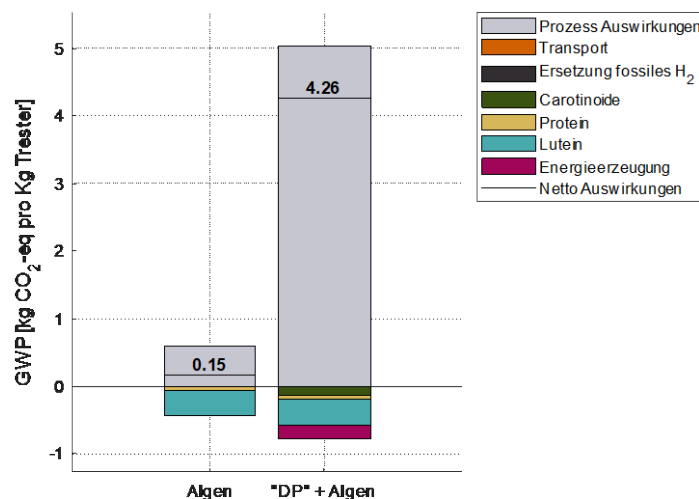
**Tabelle 8: Gesamtausbeute der Algenkultivierung für einen Zyklus (Ein Zyklus = 4 Tage, 24 h/Tag Betrieb; Gesamtvolumen des Reaktors = 125 L).**

Komponente	Wert	Einheit
CO <sub>2</sub> fixiert	1.13	kg
NH <sub>4</sub> Cl verbraucht	85.1	g
Algenbiomasse	737	g
Lutein	3.69	g
Protein als Futtermittel	295	g

Um mögliche Entwicklungsoptionen für die untersuchten Technologien zu identifizieren, wurden Prozesssimulationen mit Variationen der oben genannten Parameter durchgeführt. Es wurde festgestellt, dass negative CO<sub>2</sub>-Emissionen erreicht werden können, wenn eine vollständige Verwertung der im Apfeltrester vorhandenen Hexosen, d.h. der Glukose- und Fructosefraktionen, gegeben ist und die Wasserstoffausbeute auf mindestens 4 mol H<sub>2</sub> pro mol Hexose erhöht wird. Darüber hinaus bestehen große Emissionsminderungspotenziale, wenn die Wasserstoffproduktion aus dem Algenanbau betrachtet wird.

Die Ökobilanz der Algenkultivierung weist das Potenzial auf, negative Kohlenstoffemissionen zu erreichen, wenn biogener Kohlenstoff verwendet wird. So konnten bis zu -1,18 kg CO<sub>2</sub>eq pro Zyklus in einer 125-Liter-Kultur erzielt werden. In diesem Fall werden „Credits“ für die Produktion von Proteinen für Tierfutter und Lutein vergeben (Systemerweiterung). Der größte Teil der (positiven) Auswirkungen stammt aus der Produktion von letzterem.

Die GWP-Auswirkungen für die kombinierten Prozesse der Algenkultivierung und der „Dunkel-Photosynthese“ sind in Abbildung 12 dargestellt. Diese basieren auf einem Kilogramm Apfeltrester, da die Algenkultivierung nicht zur Wasserstoffproduktion führt. Die hohen Prozessemissionen aus der „Dunkel-Photosynthese“ werden durch die Nutzung des gereinigten CO<sub>2</sub>-Stroms nicht kompensiert. Dies zeigt, dass weitere Verfahrensentwicklungen erforderlich sind, insbesondere im Hinblick auf die Verbesserung der Wasserstoffausbeute.



**Abbildung 12: „Global Warming Potential“ Auswirkungen für einen Zyklus der Algenkultivierung in einem 125 L „Airlift“ Reaktor (ein Zyklus = 4 Tage, 24 h/Tag) (DP = „Dunkel-Photosynthese“).**

#### 5.2.4.2 Simulation zur detaillierten techno-ökologischen und ökonomischen Bewertung und Validierung

Die Ergebnisse der Umweltverträglichkeitsprüfung des Bioraffineriekonzepts wurden mit einem externen Expertengremium (Critical Review Board) besprochen. Diese Ergebnisse wurden auch in einer „Open Access“-Zeitschrift veröffentlicht und somit einem Peer Review unterzogen (siehe Abschnitt „Öffentlichkeitsarbeit“).

## Ökologische Bewertung

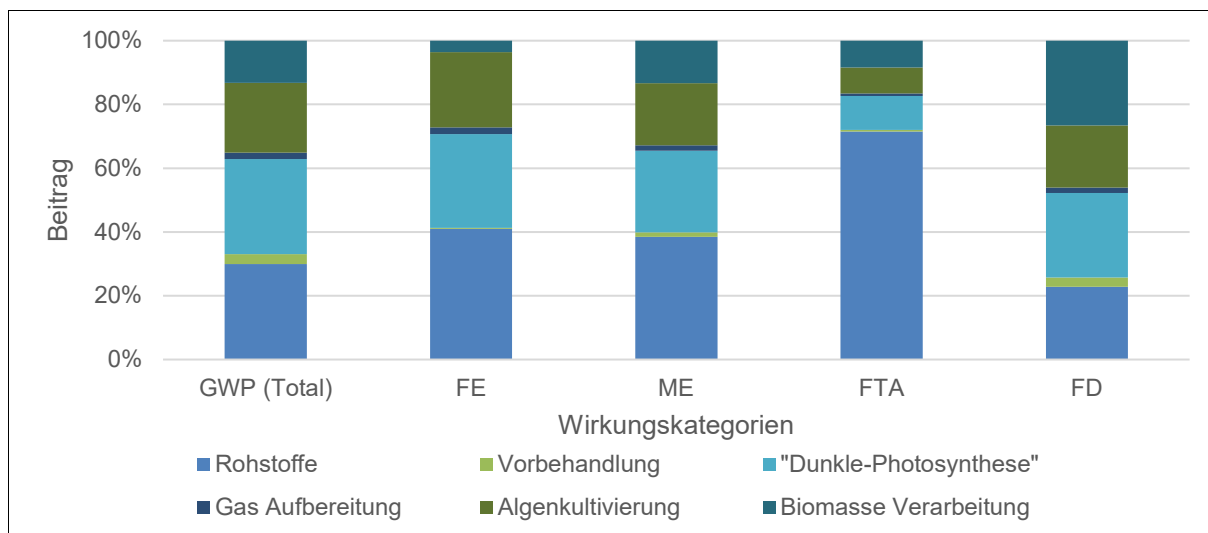
Tabelle 9 zeigt die berechneten Auswirkungen für die bewerteten Wirkungskategorien zur Herstellung von 1 kg Wasserstoffgas. Es wurde ein Zeithorizont von 100 Jahren angenommen. Zur Berücksichtigung der verschiedenen Produkte, die in der Bioraffinerie erzeugt werden, wurde eine Massenzuordnung über den gesamten Prozess vorgenommen. Dabei wurden den erzeugten Nebenprodukten (Lutein,  $\beta$ -Carotin, Tierfutterprotein) keine Gutschriften zugewiesen.

**Tabelle 9: Berechnete Umweltauswirkungen für 1 kg Wasserstoff unter Verwendung der Masse-Allokation. GWP = „Global Warming Potential,“ Klimawandelpotenzial.**

Wirkungskategorie	Wert	Einheit
GWP (fossil)	24.4	kg CO <sub>2</sub> -eq
Süßwasser-Eutrophierung	0.036	kg P-eq
Marine Eutrophierung	0.020	kg N-eq
Versauerung von Süßwasser und Böden	0.180	mol H <sup>+</sup> -eq
Erschöpfung fossiler Ressourcen	351.2	MJ
Kumulierter Energiebedarf	419.4	MJ

Die Bewertung dieser Auswirkungen ist nach den wichtigsten Prozessschritten unterteilt: (1) Rohstoffe, (2) Vorbehandlung, (3) „Dunkel-Photosynthese“, (4) Algenkultivierung, (5) Gasreinigung und (6) Verarbeitung der Biomasse. Eine Übersicht über den Beitrag der einzelnen Prozessschritte zur jeweiligen Wirkungskategorie ist in Abbildung 13 dargestellt. Die meisten Auswirkungen entstehen in den ersten drei Prozessschritten (Rohstoffe, Vorbehandlung und "Dunkel-Photosynthese"). Für die Wirkungsindikatoren Treibhauspotenzial (GWP) und marine Eutrophierung (ME) werden etwa 80 % der Umweltauswirkungen in den Umwandlungsschritten verursacht. Weitere 10-15 % ergeben sich aus der Auswahl der Rohstoffe und 8-10 % aus den Vorbehandlungsschritten (siehe Abbildung 13). Der Schritt der „Dunkel-Photosynthese“ ist in fast allen Kategorien hauptsächlich für die Umweltauswirkungen verantwortlich. Dies ist auf den Strom- und Wärmebedarf zurückzuführen, z. B. für Pumpen und die Kulturtemperierung. Lediglich in der Wirkungskategorie Versauerungspotenzial ist der Beitrag der Rohmaterialien etwas höher. Diese Auswirkungen sind hauptsächlich auf die Produktion von Nährstoffen für das M2SF-Nährmedium zurückzuführen. Die Vorbehandlung von Rohstoffen hat trotz des relativ hohen Strom- und Wärmebedarfs für die Hygienisierung der eingesetzten Rohstoffe nur geringe Auswirkungen auf die ausgewählten Wirkungskategorien.

Die in dieser Studie durchgeführte Auswertung ergab, dass das Bioraffineriekonzept 24,4 kg CO<sub>2</sub>-Äquivalente pro Kilogramm erzeugtem Wasserstoff erzeugt, wovon 0,172 kg CO<sub>2</sub>-Äquivalente auf biogenen Kohlenstoff entfallen. Dies ist fast doppelt so hoch wie die von Patel et al. berechneten Emissionen von konventionellem Wasserstoff auf Siliziumbasis, der durch Dampfreformierung von Erdgas hergestellt wird (12,3 kg CO<sub>2</sub>-Äq. pro Kilogramm Wasserstoff). Der Gesamtenergiebedarf des Bioraffineriekonzepts beträgt 419 MJ pro Kilogramm Wasserstoff, mehr als das Dreifache des unteren Heizwertes von Wasserstoff (120 MJ/kg). Dies deutet darauf hin, dass das Bioraffineriesystem, so wie es modelliert wurde, nicht umweltfreundlicher ist als die auf fossilen Rohstoffen basierende Alternative (grauer Wasserstoff).



**Abbildung 13: Prozentualer Beitrag für ausgewählte LCA Wirkungskategorien für das gesamte Bioaffinerie Konzepts. (GWP = „Global Warming Potential“; FE = „Freshwater Eutrophication Potential“; ME = „Marine Eutrophication Potential“; FTA = „Freshwater and Terrestrial acidification Potential“; FD = „Fossil Depletion“).**

Die Algenkultivierung dient zur Aufnahme des CO<sub>2</sub> aus dem „Dunkel-Photosynthese“. Es konnte festgestellt werden, dass die Umweltwirkung zur Herstellung von 1 kg Biowasserstoff deutlich höher ist, wenn das CO<sub>2</sub> in die Umwelt ausgestoßen, als wenn es im Rahmen der Algenkultivierung in Algenbiomasse umgewandelt wird.

Eine Sensitivitätsanalyse wurde durchgeführt, um die Robustheit der Ökobilanz zu bewerten und den Einfluss von Prozessparametern auf die GWP-Auswirkungskategorie zu bestimmen. Diese Wirkungskategorie wurde aufgrund ihrer aktuellen Relevanz vorgezogen. Bei den variierten Prozessparametern handelte es sich um die Ausbeute an H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> sowie um den Wärme- und Strombedarf des Schritts der „Dunkel-Photosynthese“. Die Ausbeute wurde ausgewählt, weil sie das Ziel laufender Optimierungsbemühungen ist, die sich auf die Erhöhung der H<sub>2</sub>-Ausbeute durch genetische Veränderung von *R. rubrum*-Stämmen und verfahrenstechnische Ansätze konzentrieren. Ebenso kann der Wärme- und Energiebedarf durch verschiedene Strategien wie Energierückgewinnung, Prozessintegration und Optimierung der Energienutzung reduziert werden. Beim „Upscaling“ des Prozesses kann der Energie- und Wärmebedarf jedoch nichtlinear ansteigen, so dass eine Erhöhung des GWP-Indikators möglich ist.

Tabelle 10 unten zeigt die berechneten Nicht-LCA-Kriterien für die Schritte „Dunkel-Photosynthese“ und Algenkultivierung separat. Die Indikatoren werden anhand des Gesamtgewichts der in jedem Schritt erzeugten Produkte und nicht anhand einer einzelnen funktionellen Einheit berechnet. Die Rohstoffeffizienz wird berechnet, indem das Gewicht aller Inputmaterialien für jeden Umwandlungsschritt addiert und durch das Gesamtgewicht der Produkte geteilt wird.

**Tabelle 10: Nicht-LCA-Bewertungskriterien für das Gesamtbioaffineriekonzept.**

Kennzahl	Wert	Einheit
Abfall-Faktor	2.13	kg Abfall / kg Produkte
Rohstoffintensität	36.9	kg Rohstoff / kg Produkte
Energieintensität	176.0	kWh / kg Produkte
Einsatz gefährlicher Chemikalien	Potenziell schlecht, abhängig von Extraktionsmethode <sup>1</sup>	

<sup>1</sup> Laut dem Einstufungs- und Kennzeichnungsverzeichnis der Europäischen Chemikalienagentur steht n-Hexan im Verdacht, fortpflanzungsgefährdend zu sein. Die Extraktion mit n-Hexan ist ersetzbar durch Methoden wie die überkritische CO<sub>2</sub>-Extraktion.

Im Allgemeinen waren die geschätzten Auswirkungen für die „Dunkel-Photosynthese“ höher als für die Algenkultivierung. Dies ist zum Teil auf den Batch-Betriebsmodus zurückzuführen, der bei der Modellierung der „Dunkel-Photosynthese“ im Vergleich zum halbkontinuierlichen Modus des Algenkultivierungssystems verwendet wird. Dies führte zu einer höheren Rohstoff-

und Energieintensität und zu größeren Abfallmengen pro erzeugter Produktmasse. Dies ist typisch für Batch-Prozesse, bei denen die Produktivität pro Zeiteinheit deutlich geringer ist als bei kontinuierlichen Prozessen. Es ist anzumerken, dass der größte Teil des anfallenden Abfalls aus Kulturmedium und Restbiomasse besteht, die beide in Bezug auf die Umweltauswirkungen relativ unbedenklich sind. Darüber hinaus könnte ein Teil des anfallenden Abwassers recycelt werden, was die Umweltauswirkungen verringern könnte.

### Ökonomische Bewertung

Unter der Annahme, dass mit dem Prozess der „Dunkel-Photosynthese“ negative Emissionen erreicht werden, wurde ein hypothetisches Szenario entwickelt, das eine großtechnische Anlage beschreibt, in der organische Abfälle als Input für die Produktion von Wasserstoff und CO<sub>2</sub> verwendet werden. Die Brutto- und Nettoarbeitsvolumen des Bioreaktors wurden mit 7200 m<sup>3</sup> bzw. 6000 m<sup>3</sup> angenommen. Es wurde ferner angenommen, dass die Brutto-Biowasserstoffausbeute aufgrund von Verlusten im Gasaufbereitungssystem um 8 % verringert wird. Das Produktgas erreicht einen Reinheitsgrad von 99 % Wasserstoff und wird auf 700 bar verdichtet. Weitere Verluste oder Leckagen für Wasserstoff wurden nicht berücksichtigt. Auf der Grundlage des Reaktorvolumens, der Anlagenverfügbarkeit und der Dichte der Einsatzstoffe wurde davon ausgegangen, dass jährlich 186,7 Tonnen Abfall oder Reststoffe verarbeitet werden. Der Strombedarf der Anlage wurde mit 7,25 % der gesamten erzeugten Strommenge angesetzt, basierend auf typischen Werten für Biogasanlagen. Damit wurde der Strombedarf einschließlich der Substratvorbehandlung (Zerkleinerung, Pumpen, Mess- und Regeltechnik) und der Produktgasaufbereitung gedeckt. Der Strom wird aus dem deutschen Netz zu einem durchschnittlichen Preis von 0,176 EUR/kWh<sub>el</sub> bezogen. Wärme wird für die Hygienisierung der Substrate benötigt. Der Bedarf wird auf der Grundlage der Substrat- und Prozesswassermenge geschätzt. Die Heizkosten werden mit 0,09 EUR/kWh<sub>th</sub> angenommen. Die Wärmerückgewinnung aus dem Obstverarbeitungsbetrieb senkt den jährlichen Wärmeverbrauch, wenn man davon ausgeht, dass das Substrat mit Abwärme auf 50 °C vorgewärmt werden kann.

Für die Berechnung der Investitionskosten (CapEx) wurde die faktorielle Kostenschätzung Investitionsausgaben (CapEx). Die Betriebskosten (OpEx) werden auf Basis von Anlagendimensionen, Versuchsdaten Erfahrungswerten aus Biogasanlagen in Deutschland und Zuschlagsfaktoren. Die Gesamtanlagenkosten enthalten die Gesamtanlagenkosten, einschließlich Substratmanagement, Bakterienmanagement, Bioreaktorsystem, Sterildruckluftsystem, Gärrest- und Gasaufbereitung. Diese Kosten sind in der nachstehenden Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Absolute Werte und Prozentsatz der verschiedenen CapEX Komponenten.

Elementbeschreibung	Kosten (EUR)	Prozentsatz der Investitionskosten
Substratmanagement	1.175.200	12%
Bioreaktorsystem	706.300	7%
Gärrestverarbeitung	506.500	5%
Bakterienmanagement	145.450	1%
Sterilluft-Kompressionssystem	140.850	1%
Gasaufbereitungssystem	89.150	1%
Gesamtkosten der Anlage	2.763.450	28%
Direkte und indirekte Kosten	2.686.050	27%
CapEx Kohlenstoffspeicherung	4.422.000	45%
<b>Gesamtkosten (CapEX)</b>	<b>9.871.500</b>	<b>100%</b>

Die variablen Kosten, die auf 1.412.800 EUR pro Jahr geschätzt wurden, beinhalten Ausgaben für Strom, Wärme, Prozesswasser, Aktivkohle sowie Transport, Lagerung und Überwachung

des biogenen CO<sub>2</sub>. Die fixen Produktionskosten umfassen die Ausgaben für Steuern und Versicherungen, Instandhaltung und Personalkosten und sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

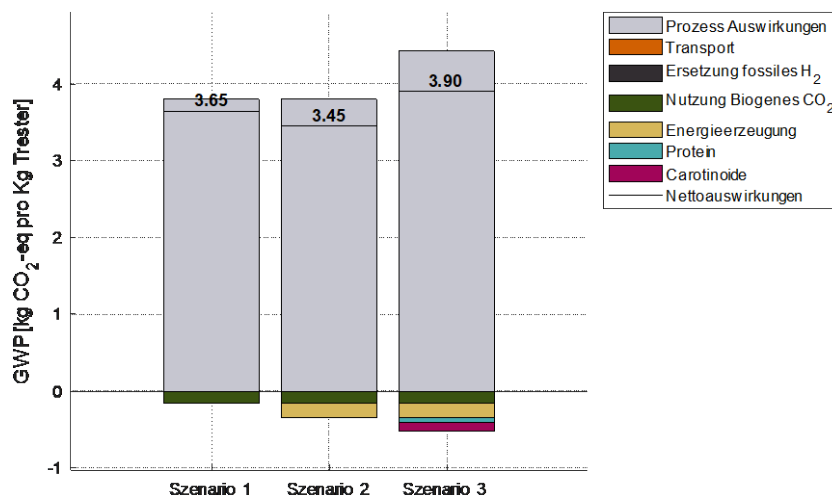
Tabelle 12: Absolute Jahreswerte und Prozentsatz der verschiedenen OpEX-Komponenten

Elementbeschreibung	Kosten (EUR/a)	Prozentsatz der Betriebskosten
Strom	101.700	5%
Wärme	696.100	32%
Prozesswasser	307.000	14%
Aktivkohle	46.100	2%
Kohlenstoff Speicherungssystem	261.900	12%
<b>Summe variable Kosten</b>	<b>1.412.800</b>	<b>65%</b>
Steuern und Versicherungen	98.700	5%
Wartung	197.400	9%
Personalaufwand	480.100	22%
<b>Summe fixe Kosten</b>	<b>776.200</b>	<b>35%</b>
<b>Summe OpEx</b>	<b>2.189.000</b>	<b>100%</b>

Die internen nivellierten Energiekosten des Biowasserstoffs aus dem Beispielprojekt wurden auf 0,12 EUR/kWh H<sub>2</sub> bzw. 4,00 EUR/kg H<sub>2</sub> geschätzt. Sie sind damit niedriger als die von grünem Wasserstoff aus Elektrolyse unter Verwendung erneuerbarer elektrischer Energie (0,17 EUR/kWh H<sub>2</sub> bzw. 5,67 EUR/kg H<sub>2</sub>). Dies deutet darauf hin, dass das Beispielprojekt unter den getroffenen Annahmen bereits mit der Erzeugung von grünem Wasserstoff durch Elektrolyse wettbewerbsfähig sein könnte. Für das Beispielprojekt betragen die nivellierten Kosten von kohlenstoffnegativem Wasserstoff (d.h. einschließlich der Internalisierung der Kosten für die CO<sub>2</sub>-Entfernung) 0,013 EUR/kWhH<sub>2</sub> (0,43 EUR/kg H<sub>2</sub>). Der Vergleich dieser Stromgestehungskosten mit denen alternativer Technologien verdeutlicht den hohen ökologischen Nutzen von kohlenstoffnegativem Wasserstoff. Werden alle positiven und negativen Effekte in die Berechnungen einbezogen, verliert die fossile Alternative grauer Wasserstoff aus Erdgas (0,12 EUR/kWh H<sub>2</sub> bzw. 4,00 EUR/kg H<sub>2</sub>) an Wettbewerbsfähigkeit. Ein direkter Vergleich mit dem konventionellen fossilen Energieträger Erdgas führt zum gleichen Ergebnis: Die internen Stromgestehungskosten von 0,02 EUR/kWh würden bei Einbeziehung der externen Kosten der THG-Emissionen auf 0,06 EUR/kWh steigen. Im Vergleich zu Wasserstoff aus Elektrolyse unter Verwendung von erneuerbarem Strom stellt die positive Wirkung der negativen Emissionen ebenfalls einen erheblichen Vorteil für das Beispielprojekt dar.

#### 5.2.4.3 Simulation zur Identifikation von technischen Entwicklungsansätzen

Für die Identifizierung vielversprechender Entwicklungsoptionen für die evaluierte Bioraffinerie wurde eine andere funktionelle Einheit gewählt, nämlich die eingesetzte Trestermenge. Die definierte funktionelle Einheit für diese Simulationen war also 1 kg Apfeltrester. Dies ermöglichte den Vergleich verschiedener Prozessoptionen, die nicht unbedingt zur Erzeugung von Wasserstoff führten. Zunächst wurde die „Dunkel- Photosynthese“ separat modelliert, was zur Produktion von Wasserstoff und CO<sub>2</sub> als Produkte beiträgt. Es wurden „Credits“ für die Substitution von fossilem Wasserstoff („grauer Wasserstoff“) und für die Nutzung von biogenem CO<sub>2</sub> vergeben. In diesem Fall wurde angenommen, dass CO<sub>2</sub> abgeschieden und als Produkt weiterverwendet wird. Es wurden drei Szenarien definiert: 1) Feststoffe aus der Zuckerextraktion des Apfeltresters werden deponiert, nur CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> als Produkte; 2) Feststoffe werden zur Stromerzeugung in einem BHKW mit entsprechendem Transport (50 km Entfernung mit LKW) plus CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> als einzige Produkte aus der „Dunkel-Photosynthese“ verwendet; und 3) Szenario 2 plus die Weiterverarbeitung von *R. rubrum*-Biomasse zur Herstellung von Proteinen für Tierfutter und Carotinoide.



**Abbildung 14: Umweltauswirkungen für unterschiedliche Prozessoptionen.**

Da sich die Szenarien 1 und 2 in Bezug auf den Kernprozess nicht unterscheiden, sind ihre Beiträge gleich groß. Bei Szenario 3 kommt ein zusätzlicher Prozessschritt hinzu (nachgeschaltete Verarbeitung der bakteriellen Biomasse), so dass ein weiterer Prozessschritt hinzukommt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Produktion des M2SF-Mediums einen großen Teil der Umweltauswirkungen für die „Dunkel-Photosynthese“ ausmacht.

Weitere Ansätze wurden untersucht, um die Umweltauswirkungen des Bioaffineriekonzepts zu verringern. Die Änderung des Strombezugs vom deutschen Strommix hin zu Windenergie hat unterschiedlich hohe Auswirkungen auf die jeweiligen Wirkungskategorien. Die höchste Reduktion der Umweltwirkungen wird in den Kategorien Meeres- und Süßwassereutrophierung (66 % und 57 %) sowie Klimawandel (55 %) realisiert. Das terrestrische Versauerungspotenzial wird um ca. 20 % verringert. Es ist weiter festzustellen, dass die Veränderung des Strombezugs auf Windenergie zu einer ca. 30-prozentigen Verringerung des Gesamtenergiebedarfs führt. Der Energiebedarf aus nicht erneuerbaren Energiequellen halbiert sich auf ca. 31 MJ, wohingegen sich die Umweltwirkung des erneuerbaren Energiebedarfs fast verdoppelt.

In einer anderen Simulation wurde die Hydrolyse der Apfeltresterfraktion untersucht, um mehr Zucker zu lösen. Da *R. rubrum* jedoch nur Fructose verstoffwechseln kann und die Hemizellulose- und Zellulosefraktion des Apfeltresters hauptsächlich zu Glukose hydrolysiert wird, wurde der zusätzliche Energiebedarf für die Hydrolyse nicht durch den zusätzlichen Zucker ausgeglichen. Dies bedeutet, dass die Umweltauswirkungen und die Kosten höher sind, so dass die Hydrolyse nicht als wirtschaftliche Option in Betracht gezogen wurde. Weitere Entwicklungspotenziale für die untersuchten Technologien sind in der Technologie-Roadmap beschrieben, die zusammen mit diesem Bericht vorgelegt wird.

Im Projekt konnten Herausforderungen und mögliche Lösungswege zur Verbesserung der Effizienz der Technologien aufgezeigt werden. Hierzu zählen u.a. die Entwicklung robuster mikrobieller Stämme zur Verarbeitung verschiedener Substrate, die Reduktion der hohen Kosten und Umweltauswirkungen des Kulturmediums und die Entwicklung effektiver Verfahren zur Hygienisierung der verwendeten Substrate. Ein Ansatz hierfür besteht darin, eine vollständige Verwertung von Reststoffen und stabile Prozessbedingungen in dezentralen Umgebungen zu forcieren. Auf technischer Ebene müssen zudem Aspekte wie die Reaktorkonstruktion, insbesondere die Belüftung, optimiert werden und kostengünstigere Technologien zur Aufreinigung der Produkte entwickelt werden. Die Integration der „Dunkel-Photosynthese“ in kontinuierliche Prozesse sowie die Berücksichtigung rechtlicher Rahmenbedingungen sind ebenfalls wichtig.

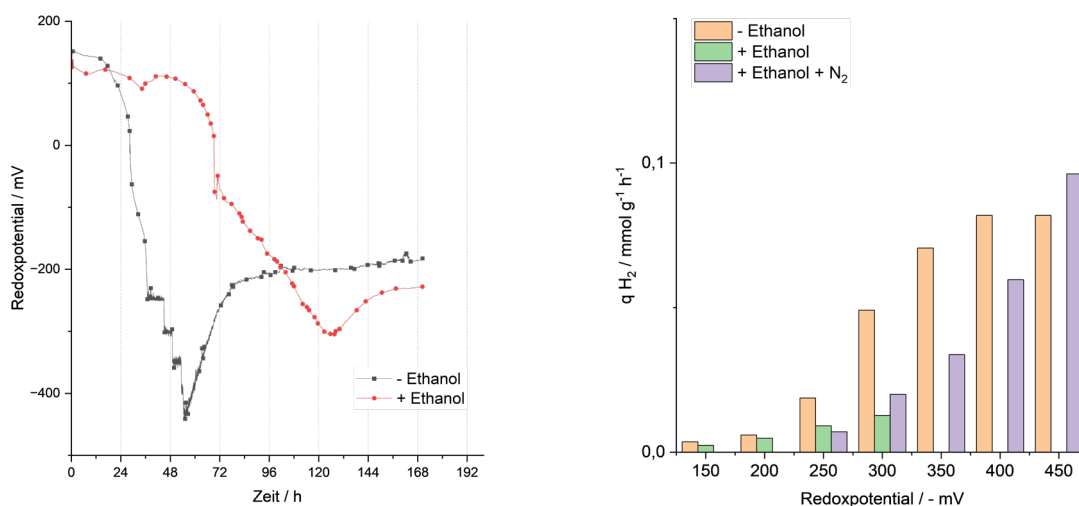
## 5.2.5 Verfahrenstechnische und mikrobiologische Entwicklungen für den Aufbau einer Pilotanlage

### 5.2.5.1 Verfahrensoptimierung für gezielte semi-aerobe H<sub>2</sub>-Produktion mit *R. rubrum* (IBBS und IGB)

Mit Hilfe eines kommerziellen Wasserstoff-Alarmsensors wurde eine Screening-Methode entwickelt, mit der 50 mL-Kulturen und auch kleinere (2 mL) Mengen in ELISA-Platten mit schnellem Durchsatz gemessen werden konnten. Die Wasserstoff- und CO<sub>2</sub>-Produktion von S1E wurde auch im 500 mL-Maßstab mit einem bereits von uns (IBBS) im Rahmen einer anderen Förderung entwickelten gasdichten und EX-geschützten Setup gemessen.<sup>9</sup>

Zur Verfahrensoptimierung der Wasserstoffproduktion auf Ethanol mit *R. rubrum* wurde am Fraunhofer IGB zunächst ein 1 L Bioreaktorsetup angepasst. Zur Analyse der Produktkonzentrationen wurden zwei verschiedene Online Messungen integriert. Eine Wärmeleitfähigkeitsmessung des produzierten H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> durch BlueSens BlueVary Sensoren, sowie zum Vergleich eine Vollquantifizierung aller Gasbestandteile mittels Massenspektrometrie (Variolytics). In einem ersten Versuch zum Nachweis der Eignung des Setups wurde eine Fermentation mit *R. rubrum* auf Fructose-Succinat Medium durchgeführt. Dabei konnte der semiaerobe Zustand erstmals im Bioreaktor erfolgreich eingestellt werden und die Produktion von Wasserstoff (0,8 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) nachgewiesen werden.

Beim erstmaligen Einsatz eines Fructose-Ethanolgemischs zur Produktion von H<sub>2</sub> konnte keine Produktbildung nachgewiesen werden. Der Vergleich ist in Abbildung 15 dargestellt.



**Abbildung 15:** Veränderung des Redoxpotentials (links) während der Kultivierung von *R. rubrum* mit und ohne Ethanol im 1 L Bioreaktor. Wasserstoffbildungsraten ohne Ethanol, mit Ethanol und mit einer zusätzlichen Stickstoffbegasung zur Einstellung der Redoxpotentiale (rechts). Der semiaerobe Bereich wird definiert zwischen -150 und -400 mV.

Wie bereits zu erwarten war, zeigte sich bei der Kultivierung mit Ethanol eine geringere Wachstumsrate und ein Erreichen der maximalen Zelldichte erst drei Tage nach der Fermentation auf Fructose-Succinat Medium. Bei Betrachtung des Redoxpotentials (das Redoxpotential gibt Auskunft über die Menge an oxidierten und reduzierten Substanzen in einem Fermentationsmedium, ein geringer Wert bedeutet ein zunehmend anaerober Zustand) war auffällig, dass bei Ethanol als Substrat ein deutlich höheres Redoxpotential als in der Kontrolle festgestellt wurde. Da die H<sub>2</sub>-Bildung abhängig ist von dem Reduzierungszustand, könnte hier eine Ursache für die ausbleibende H<sub>2</sub>-Bildung liegen. Erklärungen für das erhöhte Redoxpotential könnte einerseits sein, dass Ethanol ein bereits reduziertes Substrat ist, dass im Stoffwechsel dann oxidiert wird. Dadurch nahm die Menge an reduzierten Substanzen (Ethanol) im Medium ab und oxidierte Metaboliten (wie Acetat) zu, wodurch das Redoxpotential stieg. Eine weitere

<sup>9</sup> Autenrieth, C., Shaw, S., and Ghosh, R. (2021) *Metabolites* 11: 667. New approach for the construction and calibration of gas-tight setups for biohydrogen production at the small laboratory scale.

Erklärung könnte eine geringere Sauerstoffverbrauchsrate gewesen sein, aufgrund einer Inhibition des Stoffwechsels durch Ethanol. Um diese These zu überprüfen wurde eine Regelung des Redoxpotentials anhand einer zusätzlichen Begasung mit Stickstoff und einer abhängigen Einstellung der Rührerdrehzahl realisiert. Eine Reihe an Redoxpotentialen wurden dann eingestellt und die Auswirkungen auf die H<sub>2</sub>-Bildung überprüft (siehe Abbildung 15). Dabei konnte gezeigt werden, dass eine H<sub>2</sub>-Bildung mit Ethanol als Substrat erzielt werden kann. Zu beobachten war eine Verschiebung der H<sub>2</sub>-Bildung hin zu geringeren Redoxpotentialen, wobei dann annähernd gleiche Produktionsraten erreicht wurden. Wichtig ist anzumerken, dass ein Redoxpotential von -400 mV bereits anaeroben Bedingungen entspricht und kein Ethanol zur Herstellung von H<sub>2</sub> mehr verstoffwechselt wurde. Daher wurde als Prozessparameter ein Redoxpotential von -300 mV bis -350 mV ausgewählt, sofern eine Reaktorsteuerung technisch möglich war.

Auf Basis dieser Ergebnisse wurde sowohl aerob als auch semiaerob in vier Fermentationsversuchen im 1 L Bioreaktor fermentiert um kinetische Kennzahlen zur Beschreibung und Modellierung des Prozesses zu gewinnen. Bei der Limitierung von Sauerstoff konnte ein bereits beobachteter Effekt erkannt werden: Durch eine verringerte, oxidative Aktivität der Mikroorganismen sank die Wachstumsrate unter semiaeroben Bedingungen (Carius et al. 2008). Des Weiteren wurde ebenfalls ein geringerer Biomasseausbeutekoeffizient  $Y_{X/S}$  beobachtet. Erklärbar ist dieser Effekt anhand der Bildung von extrazellulären Metaboliten, eine Bildung von Acetat, Bernsteinsäure und Ameisensäure konnte unter semiaeroben Bedingungen nachgewiesen werden. Durch die Regelung des Redoxpotentials auf -300 bis -350 mV konnte eine Konversion nicht nur von Fructose sondern auch von Ethanol in H<sub>2</sub> nachgewiesen werden. Somit konnte der Prozess in Vorbereitung auf die Etablierung eines mehrstufigen Verfahrens mit Zufütterung grundlegend charakterisiert werden.

### 5.2.5.2 Genom-Screening von *R. rubrum* für weitere H<sub>2</sub>-Überproduzenten, die auf Reststoffströme von Evonik wachsen (IBBS)

Im Laufe des Projekts hatte sich herausgestellt, dass mit Ethanol als einzigem Substrat keine Wasserstoffproduktion möglich war, dass allerdings andere hochwertige Stoffe, wie z.B. PHB überproduziert wurden. Somit war es dennoch interessant, die Ursachen der Ethanol-Anpassung auf molekularer Ebene genauer zu untersuchen. Zwar findet man im Genom von *R. rubrum* mehrere Annotationen, die auf Alkohol-Dehydrogenasen hinweisen, eine Ethanol-abhängige Enzymaktivität konnte aber bislang nicht nachgewiesen werden (auch nicht von uns).

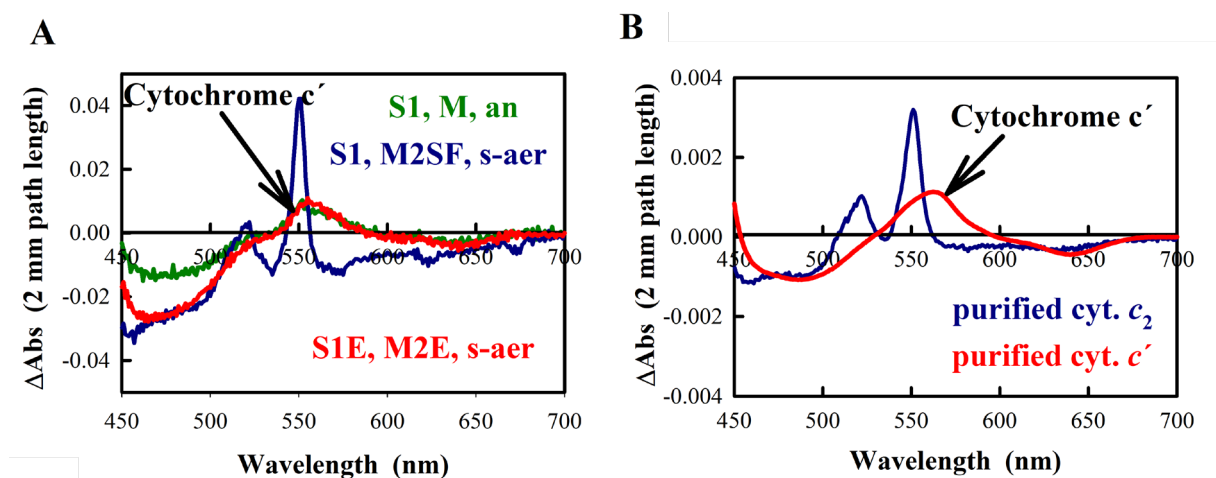


Abbildung 16: (A) Differenzspektroskopie der wasserlöslichen Fraktionen aus aufgeschlossenen Zellen, die in verschiedenen Kulturmedien gezüchtet wurden, zeigt, dass in S1E nach Wachstum in 2% Ethanol Cytochrom c' als Haupt-Cytochrom vorliegt, während im Wild-Typ normalerweise nur Cytochrom c<sub>2</sub> in größeren Mengen nachgewiesen werden kann. (B) zeigt die Referenzspektren von gereinigten Cytochromen.

Mit Hilfe von Spektroskopie (Abbildung 16) und Proteomics-Untersuchungen (Abbildung 17) konnten wir aber wertvolle Hinweise auf den möglichen Mechanismus der Ethanol-Verwertung in *R. rubrum* finden: auffallend war, dass im Ethanol-angepassten Stamm der Redox-carrier Cytochrom c' in viel größeren Mengen als üblich vorlag. Normalerweise ist Cytochrom c2 das vorherrschende wasserlösliche Cytochrom, und Cytochrom c' liegt nur in kleinen Mengen vor. Da Cytochrom c' aber isopotential mit dem Ethanol/Acetaldehyd-Redoxpaar ist, liegt die Vermutung nahe, dass wir den Elektronenakzeptor für die Ethanol-Oxidationsreaktion der (weiterhin noch unbekannt) Alkohol-Dehydrogenase entdeckt haben. Untersuchungen zur weiteren Charakterisierung der Cytochrom c' abhängigen Ethanol-Verwertung laufen noch, und ein Manuskript über diese Ergebnisse ist in Bearbeitung.

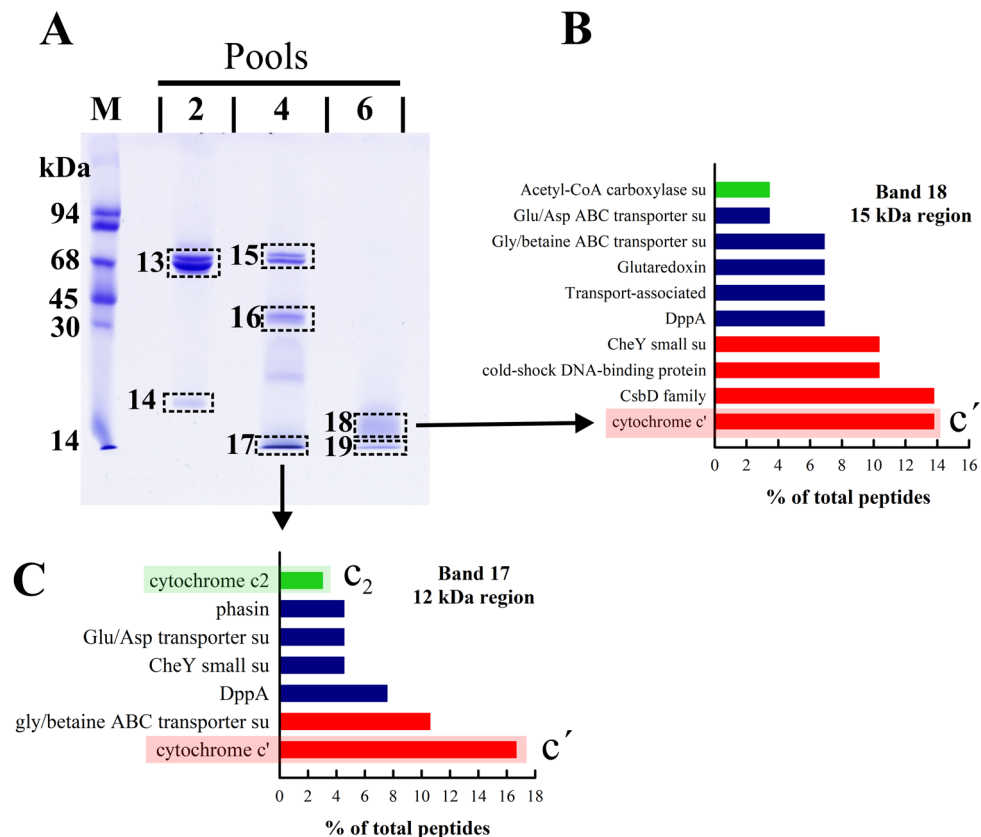
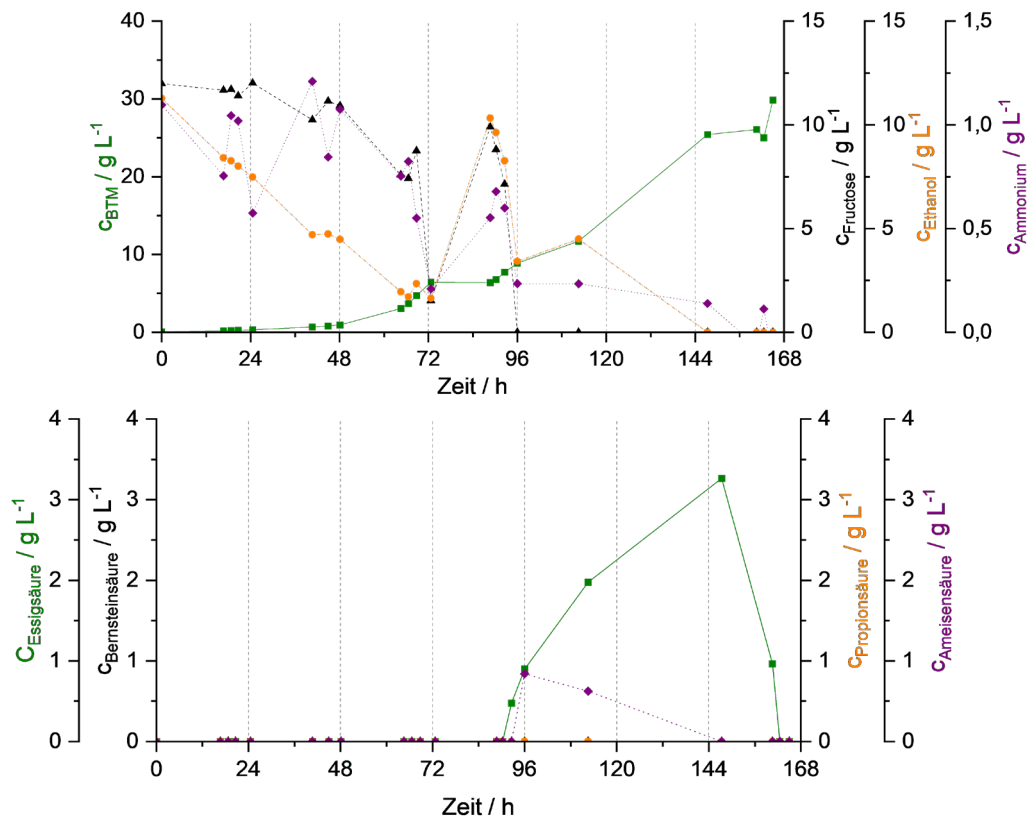


Abbildung 17: (A) SDS-PAGE von ausgewählten Fraktionen der wasserlöslichen Proteine von S1E. (B) Proteomics Analyse der Banden 17 bzw. 18 bestätigen einen überdurchschnittlich hohen Anteil an Cytochrom c'.

### 5.2.5.3 Optimierung Verfahrenskonzepte für hohe Raum-Zeitausbeuten im Laborreaktor (IGB)

Ziel dieses Arbeitspakets am Fraunhofer IGB war die Etablierung eines 2-stufigen Prozesses. Hierbei sollte in einer ersten Phase ein Hochzelldichteverfahren unter aeroben Bedingungen etabliert und in einer zweiten Phase durch eine Umstellung der Fermentation zu semiaeroben Bedingungen die H<sub>2</sub>-Bildung initiiert werden. Zur Etablierung eines Hochzelldichteverfahrens wurde im Verlauf der Kultivierung die bakterielle Biomasse durch eine zusätzliche Zufütterung von Substratlösungen gesteigert. Innerhalb des Projekts wurden hierfür zwei verschiedene Verfahrenskonzepte zur Zufütterung in Dreifachbestimmung getestet. Eine pO<sub>2</sub>-abhängige Zufütterung, hierbei sank zunächst die Gelöstsauerstoffkonzentration (pO<sub>2</sub>) im Fermentationsmedium durch die Stoffwechselaktivität der Bakterien. War das Substrat vollständig durch die Bakterien aufgebraucht sank diese Aktivität wieder und ein Anstieg des pO<sub>2</sub>-Signals aufgrund der Begasung und Rührung des Bioreaktors trat auf, der sogenannte „hunger peak“. Durch eine Regelung wurde als Reaktion auf dieses Signal die Substratlösung als Puls in den Reaktor zugegeben, wodurch wieder Substrat für den Aufbau von Biomasse vorlag. Als zweites

Verfahren zur Steigerung der Biomassekonzentration wurde ein Zulaufverfahren mit zunehmender Fütterung getestet. Dabei wurde entsprechend der vorliegenden Biomassekonzentration, der Wachstumsrate und des Biomasseausbeutekoeffizient eine Zufütterung so eingestellt, dass die Menge an zugegebenem Substrat der Menge an Verbrauch entsprach. Theoretisch sollte dieses Verfahren in höheren Zelldichten resultieren. Die Ergebnisse der im Anschluss favorisierten  $pO_2$ -abhängigen Zufütterung sind in Abbildung 18 dargestellt.



**Abbildung 18:** Etablierung eines Zulaufverfahrens für höhere Zelldichten durch eine  $pO_2$ -abhängige Zufütterung im 1 L Maßstab.

Während bei der  $pO_2$ -abhängigen Zufütterung eine maximale Biotrockenmassekonzentration von  $33,4 \text{ g L}^{-1}$  erreicht werden konnte, wurde bei der zunehmenden Fütterung lediglich eine maximale Konzentration von  $13,8 \text{ g L}^{-1}$  erzielt. Die Diskrepanz in den Resultaten lässt sich anhand des Verlaufs der Substrat- und Metabolitenkonzentration erklären. In der Auswertung der zunehmenden Fütterung wurde festgestellt, dass im Verlauf der Kultivierung eine Akkumulation von bis zu  $25 \text{ g L}^{-1}$  Ethanol auftrat, in dessen Folge der Bakteriengehalt aufgrund der Toxizität von Ethanol abnahm. Diese Unstimmigkeit in der Konzentration der zugegebenen Substrate resultierte aus der Akkumulation von organischen Säuren, insbesondere von Essigsäure, Bernsteinsäure und Ameisensäure. In 48 Parallelkultivierungen im Mikrofermentersystem konnte eine deutliche Inhibierung des Wachstums bereits bei geringeren Konzentrationen von Essigsäure, Ameisensäure oder Propionsäure festgestellt werden (beginnend ab  $1\text{--}4 \text{ g L}^{-1}$ ). Somit lag keine Übereinstimmung zwischen der für die Zufütterung definierten und der tatsächlichen Wachstumsrate mehr vor, die Zufütterungsrate war zu hoch und Ethanol wurde bis zum Zelltod zugegeben. Da zum einen mit der  $pO_2$ -abhängigen Zufütterung im Labormaßstab eine höhere Zelldichte erreicht wurde und durch die Art des Verfahrens vermieden werden kann, dass es zu einer Akkumulation von Ethanol im Reaktor kommen kann, wurde sich aufgrund der Robustheit dieser Zufütterungsmethode für das Verfahren für den Demonstrator Maßstab entschieden.

Da die Bildung von Säuren während der aeroben Wachstumsphase den Prozess aufgrund einer Hemmung der Wachstumsrate verlangsamt, aber auch verhindern, dass die Substrate

vollständig vom Bakterium in Form von Biomasse umgewandelt werden, wurden weitere Untersuchungen zur Säurebildung durchgeführt. Hierfür wurde bei der Fermentation durch Steuerung der Begasung und der Rührung verschiedene Redoxpotentiale eingestellt und die Säurebildung bestimmt. Dabei konnte beobachtet werden, dass erst ab einem Redoxpotential von -80 mV eine Bildung von Säuren als Metaboliten gemessen werden konnte. Zwischen -80 mV und -200 mV trat noch eine gemäßigte Säurebildung auf, ab -250 mV wurde in größerem Maßstab die Bildung von Bernsteinsäure, Essigsäure und Ameisensäure beobachtet. Dieses Verhalten wird unter dem Begriff Acidogenese zusammengefasst und ist ein für *R. rubrum*, und andere fakultative Anaerobier, bereits beobachtetes Verhalten. Für die Steuerung der Phase zum Biomasseaufbau in der Fermentation wurde daher der Schluss gezogen, dass durch Begasung und Rührung des Fermentationsmediums verhindert werden soll, dass es zur Säurebildung kommt. Hierfür wurde für zukünftige Versuche der  $pO_2$ -Regelwert von 5 % auf 10 % angehoben, um sicherzustellen, dass die Regelung eine Säurebildung während der aeroben Fermentation unterbindet.

#### **5.2.5.4 Aufbau und Inbetriebnahme eines 5x25 L Photobioreaktor-Moduls zur Algenkultivierung; Integration der $CO_2$ -Verwertung und interne Abgasrückführung**

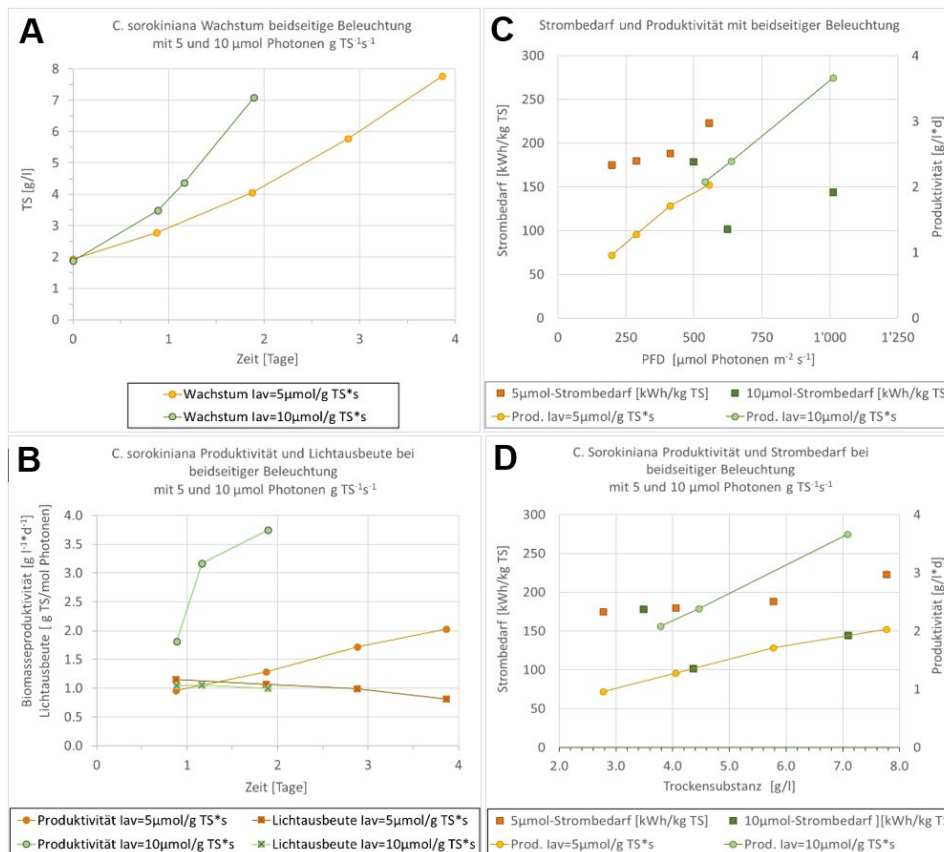
##### **5.2.5.4.1 Ergebnisse Labormaßstab**

#### **Prozessoptimierung hinsichtlich beidseitiger Beleuchtung, $CO_2$ und Nährstoffe**

Die Herausforderung bei der Algenkultivierung war die Prozessintensivierung als Spagat zwischen Nachhaltigkeit und Rentabilität. Einer der wichtigsten Aspekte dieses Ansatzes war die optimierte Lichtnutzung. Photobioreaktoren ermöglichen eine präzise Steuerung des Lichtregimes, was die Produktivität und die Effizienz der Lichtumwandlung erheblich steigert. Indem sie die Algen mit der optimalen Lichtmenge versorgen, maximieren diese Systeme nicht nur die photosynthetische Aktivität und damit die Biomasseproduktivität. Über die Reaktorgeometrie und die Durchmischung wird maßgeblich die Effizienz der Lichtkonversion in Biomasse beeinflusst.

Die Optimierung erfolgte unter besonderem Fokus des Energiebedarfes mit dem für die on-site Demonstration ausgewählten Algenstamm *Chlorella sorokiniana*. Die Übertragung des bisherigen Prozess-Knowhows mit diesem Stamm auf das neue Beleuchtungskonzept mit beidseitiger LED-Beleuchtung erfolgte im 6L-Maßstab in FPA-Reaktoren, die beidseitig mit LEDs (Lumitronix 3000 K warmweiß) beleuchtet wurden. Der Fokus lag hierbei auf der Lichtausbeute, d.h. die Konversion von Licht in Biomasseproduktivität. Die Lichtausbeute ist abhängig vom verfügbaren Licht pro Einzelzelle im Reaktorvolumen, der Biomassekonzentration und der Durchmischung im Reaktorvolumen.

Ausgehend von den Ergebnissen bei einseitiger Beleuchtung der Reaktoroberfläche wurde die Lichtmenge pro g Biomasse im Reaktorvolumen variiert und die entsprechende Biomasseproduktivität ( $g\ TS\ L^{-1}\ d^{-1}$ ), sowie die Lichtausbeute ( $g\ Biomasse/mol\ Photonen$ ) bestimmt. In Abbildung 19 sind die Versuchsergebnisse für die verschiedenen Beleuchtungsszenarios aufgeführt.



**Abbildung 19: Ermittlung des optimalen Beleuchtungsszenarios für *C. sorokiniana* in Photobioreaktoren, die beidseitig beleuchtet wurden.** Für das Beleuchtungsszenario wurde die Lichtintensität auf der Reaktoroberfläche je nach Biomassekonzentration im Reaktorvolumen eingestellt ( $\mu\text{mol Photonen} / \text{g TS}^*\text{s}$ ). Die Anpassung der Lichtintensität an die Biomassekonzentration erfolgte täglich. [A] Wachstum, [B] Biomasseproduktivität [ $\text{g TS L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ] und Lichtausbeute ( $\text{g TS mol Photonen}^{-1}$ ) bei einer spezifischen Lichtverfügbarkeit von 5 und 10  $\mu\text{mol Photonen g TS}^{-1} \text{s}^{-1}$ . [C] Strombedarf um ein kg Biomasse zu produzieren ( $\text{kWh/kg TS}$ ) und Biomasseproduktivität ( $\text{g TS L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) mit steigender Photonendichte PFD in  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; [D] mit zunehmender Biomassekonzentration im Reaktor nimmt je Beleuchtungsszenario die Biomasseproduktivität [ $\text{g TS L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ] zu, der Strombedarf pro kg erzeugter Biomasse bleibt nahezu konstant.

## Ergebnisse

- Wachstum und Biomasseproduktivität waren abhängig von der Lichtverfügbarkeit ( $\mu\text{mol Photonen/g TS}^*\text{s}$ ). Durch eine hohe Lichtverfügbarkeit konnte mit *C. sorokiniana* die bisher höchsten Biomasseproduktivitäten erzielt werden (siehe Abbildung 19 [A] und [B]).
- *C. sorokiniana* setzte auch hohe Lichtintensitäten (siehe Abbildung 19 [C]) in Wachstum und Produktivität um.
- Der Strombedarf für die Produktion von 1 kg Algenbiomasse blieb gleich über einen weiten TS-Bereich (siehe Abbildung 19 [D]) und bei beiden Beleuchtungsszenarios. Dies war auf die gute Lichtverteilung im FPA-Reaktor als Kombination aus beidseitiger Beleuchtung zur Reduktion der gegenseitigen Beschattung und der Durchmischung im Airlift-Betrieb mit statischen Mischern, zurückzuführen. Der Strombedarf lag aber mit 170 kWh/kg TS noch sehr hoch im Labor-Setup.
- Eine Reduktion des Strombedarfes könnte durch neue effiziente LEDs mit höherer Lichtausbeute (mol Photonen/Watt) erreicht werden. Bei den eingesetzten LEDs lag die Lichtausbeute nur bei ca. 1,5  $\mu\text{mol Photonen pro Watt}$ . Neue effizientere LEDs haben eine doppelt so hohe Lichtausbeute. Damit könnte der Strombedarf pro kg Algenbiomasse auf unter 100 kWh pro kg TS reduziert werden.
- Die Ergebnisse zeigten auch ein mögliches Prozessfenster an, bei dem sowohl eine hohe Biomasseproduktivität als auch eine Lichtausbeute  $> 1 \text{ g BTM/mol Photonen}$  erzielt werden kann. Biomassekonzentrationen bis zu 8 g TS/L könnten mit einer spezifischen Beleuchtung von 10  $\mu\text{mol Photonen g TS}^{-1} \text{s}^{-1}$  noch mit einer hohen Lichtausbeute erzeugt werden.

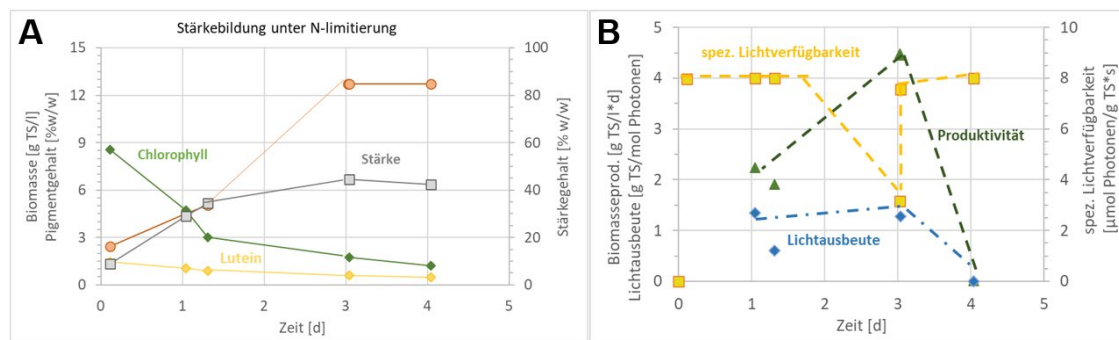
- Die CO<sub>2</sub>-Verwertung war direkt mit der Biomasseproduktivität gekoppelt. Ca. 1,8 kg CO<sub>2</sub> wurden für die Produktion von 1 kg Algenbiomasse umgesetzt.

Diese Ergebnisse wurden in AP5.5 hochskaliert und auf den Demonstrator übertragen.

**Fazit:** Für den ausgewählten Algenstamm *C. sorokiniana* wurde im Labmaßstab das Prozessfenster bestimmt für die maximale Verwertung von CO<sub>2</sub>.

### Produktion von Co-Produkten (Stärke, Lutein) mit Mikroalgen aus CO<sub>2</sub>

Mit der Erzeugung von Co-Produkten wie Stärke und Lutein durch *C. sorokiniana* kann die Wertschöpfung aus Chlorella-Biomasse erhöht werden. *C. sorokiniana* zeichnet sich durch einen hohen Luteingehalt in der Wachstumsphase aus. Unter Stickstofflimitierung bildet *C. sorokiniana* Stärke.



**Abbildung 20: Stärkebildung durch *C. sorokiniana* nach N-Limitierung. [A] Biomassezunahme, Stärke-, Chlorophyll- und Luteingehalt der Biomasse über die Zeit. [B] Verlauf der spezifischen Lichtverfügbarkeit (in µmol Photonen g TS<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>) und der daraus resultierenden Biomasseproduktivität (g TS l<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) und Lichtausbeute (g TS mol Photonen<sup>-1</sup>).**

### Ergebnisse

- Die Kultivierung erfolgte in zweiseitig beleuchteten Laborreaktoren und einer spezifischen Lichtverfügbarkeit von 8 µmol Photonen g TS<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>. Durch Verbrauch der Stickstoffquelle setzte die Akkumulation von Stärke als Speicherstoff der Photosynthese ein. Innerhalb von 3 Tagen wurden 45% Stärke intrazellulär akkumuliert (siehe Abbildung 20 [A]).
- Die maximale Biomasseproduktivität betrug 4,5 g TS L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> (siehe Abbildung 20 [B]).
- Die Lichtausbeute an Tag 3 war immer noch sehr hoch mit ca. 1 g TS/mol Photonen. Dies könnte auf die fehlende Anpassung der spezifischen Lichtverfügbarkeit an Tag 2 und die hohe Biomassekonzentration von 12 g TS l<sup>-1</sup> zurückzuführen sein.
- Allerdings nahm während der N-Limitierung der Lutein-Gehalt von 1,5% auf 0,5 % (w/w) ab (siehe Abbildung 20 [A]).

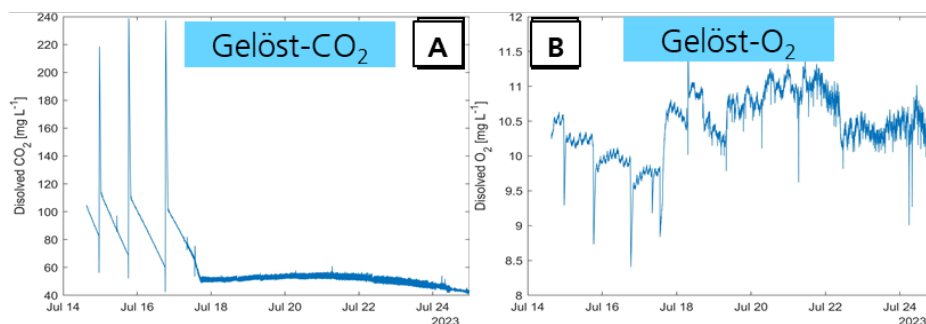
**Fazit:** *C. sorokiniana* konnte unter Stickstofflimitierung effizient CO<sub>2</sub> zu Stärke konvertieren und intrazellulär Stärke bis zu 45% des Zellgewichtes akkumulieren. Der Luteingehalt von *C. sorokiniana* war mit 1,5% vergleichsweise hoch und könnte für die Erhöhung der Wertschöpfung aus der produzierten Algenbiomasse beitragen.

#### 5.2.5.4.2 Ergebnisse Technikum/Pilotierung

### Integration CO<sub>2</sub>-Verwertung und interne Abgasrückführung

Für die Kopplung der Algenproduktion mit der Wasserstoffproduktion durch *R. rubrum* sollte der CO<sub>2</sub>-haltige Abgasstrom aus dem Fermenter zur Produktion des Mikroalgenstammes *C. sorokiniana* genutzt werden. Um den CO<sub>2</sub>-Volumenstrom aus der Wasserstoffproduktion mit *R. rubrum* effizient zu verwerten wurde eine Abgasrückführung etabliert um nur tatsächlich fixiertes CO<sub>2</sub> im Abgasstrom zu ersetzen, dabei war auf ein ausreichendes CO<sub>2</sub> : O<sub>2</sub>-Verhältnis an gelöstem CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> im Medium von minimal 0,4 zu achten. Im Stack-Reaktor wurde der Abgasstrom über eine Membranpumpe erneut verdichtet und über die Begasungseinheit am

Boden der FPA-Reaktoren den Reaktoren wieder zugeführt. Über die pH-Regelung wurde nötiges bzw. verbrauchtes CO<sub>2</sub> in den Luft-CO<sub>2</sub>-Strom zudosiert. Für die Kontrolle wurden Sensoren zur Messung des Gelöst-O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub>-Gehaltes im Medium installiert und in die Steuerung integriert (siehe Abbildung 21).



**Abbildung 21: Sensorsignal für die Messung von gelöstem CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> im Kulturmedium. In [A] wird durch Fütterung von Ammonium eine pH-Wert-Änderung und damit CO<sub>2</sub>-Bedarf ausgelöst. Erfolgt keine NH<sub>4</sub>-Fütterung mehr, fällt der CO<sub>2</sub>-Bedarf auf einen nahezu konstanten Wert ab. Das CO<sub>2</sub>:O<sub>2</sub>-Verhältnis bleibt mit 4-5 weit über dem Sollwert.**

## Ergebnisse

- Die Abgas-Rezirkulation reduzierte den CO<sub>2</sub>-Bedarf auf 0,2 bis 0,3 % (v/v) je nach Biomassekonzentration und Nährstoffgehalt (Ammonium und Phosphat).
- Das CO<sub>2</sub>:O<sub>2</sub>-Verhältnis war ausreichend, so dass keine Sauerstoffhemmung eintrat, die die Photosyntheserate reduziert.
- Eingespeistes CO<sub>2</sub> wurde fast vollständig umgesetzt
- Insgesamt konnte der CO<sub>2</sub>-Bedarf um >90 % reduziert werden.

**Fazit:** Der CO<sub>2</sub>-Bedarf konnte um >90% reduziert werden, und es trat keine Sauerstoffhemmung ein.

## Aufbau und Inbetriebnahme eines 5x25L Photobioreaktormoduls zur Algenkultivierung

Für die Demonstration der Kopplung eines Algenreaktors mit der fermentativen H<sub>2</sub>-Produktion mit *R. rubrum* wurde ein kompakter modularer Stackreaktor bestehend aus 5 x 25L FPA-Reaktoren, die miteinander zu einem Reaktormodul verbunden waren, aufgebaut (siehe Abbildung 29). Der Stack-Reaktor hatte folgende zusätzliche Ausstattung, die teilweise in diesem Projekt entwickelt wurden:

- Abgasrückführung um den CO<sub>2</sub>-Bedarf zu reduzieren (siehe Abbildung 22 [C]) und gleichzeitig sollten keine Hemmung im Prozess durch Sauerstoffakkumulation im Abgasstrom erfolgen. Dazu wurden Sonden zur Messung des Gelöst-O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub>-Gehaltes im Medium installiert und in die Steuerung integriert. Der CO<sub>2</sub>-Bedarf konnte um >90% reduziert werden, und es trat keine Sauerstoffhemmung ein.
- Integration einer OD-Sonde zur Messung der Biomassekonzentration in das Steuerungskonzept. Die Kalibrierung der Sonde erfolgte nach einer neuen Modellgleichung (Dissertation Yen-Cheng Yeh, IGB), deren Genauigkeit die Anpassung der Lichtintensität an steigende Biomassekonzentrationen im Reaktor auch bei hohen Biomassekonzentrationen erlaubt. Zusätzlich können über diese Sonde Fütterungs- und Erntezyklen ausgelöst werden (siehe Abbildung 22 [F] und [G]).
- Das Steuerungskonzept wurde um die oben genannten Funktionen erweitert und getestet. Dies erlaubt auch eine Remote Control worüber nicht nur der aktuelle Zustand der Kultur abgefragt werden kann, sondern auch Fütterungs- und Erntezyklen ausgelöst werden können.
- Neues Beleuchtungskonzept mit energieeffizienten LEDs von Lientec: warmweiße LEDs (3000K) mit zuschaltbaren blauen und roten LEDs.
- Der Energiebedarf für den Anlagenbetrieb wurde kontinuierlich erfasst, wobei der Hauptenergiebedarf die LED-Beleuchtung ist (siehe Abbildung 22 [C]).



- Komponenten des 5x25L Stack-FPA-Reaktors:**
- [A] Flachplatten-Airliftreaktor Einzelpaneele
  - [B] Die FPA-Reaktoren werden je Reaktoroberfläche mit einem LED-Panel beleuchtet
  - [C] Eine Membranpumpe rezirkuliert den Abgasstrom (Luft + CO<sub>2</sub>) zwischen Abluft und Zuluft
  - [D] Die Kühlung erfolgt durch Eintauchen der Reaktoren in ein temperiertes Wasserbad
  - [E] Steuerungseinheit mit Touchpanel. Erfassung und Speicherung der Prozessdaten (und der online-Daten der Sensoren [F].)
  - [F] Integrierte online-Sensoren: pH, Temp, Druck (Füllstandsmessung), AU (OD), CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub> gelöst.
  - [G] Automatische Fütterung von Nährstoffen und Stellmittel
  - [H] Sterilisation des Zulaufs (Medium oder Spülwasser) mittels UV
- Nicht gezeigt sind Mediums- und Erntebehälter

**Abbildung 22: Kompakter modularer Photobioreaktor.**

Der Demonstrator wurde mit *C. sorokiniana* in Betrieb genommen und getestet. Die eingesetzten Parameter wurden in den folgenden TP ermittelt bzw. entwickelt und getestet.

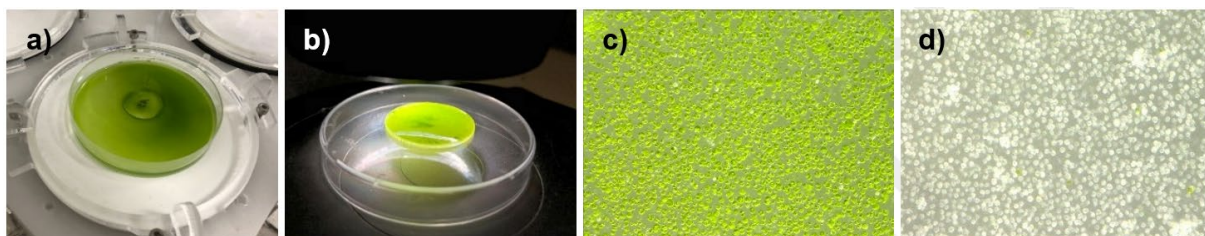
**Fazit:** Ein mobiler Demonstrator bestehend aus 5x25L FPA-Reaktoren wurde aufgebaut und in Betrieb genommen. Damit kann CO<sub>2</sub> aus dem Abgasstrom der *R. rubrum*-Fermentation mit der Algenproduktion gekoppelt werden. Die Versuche sollten vor Ort bei Evonik erfolgen.

#### 5.2.5.5 Entwicklung eines 2-stufigen Prozess zur H<sub>2</sub>-Produktion mit *Chlamydomonas reinhardtii*: Optimierung Stärkegehalt und Lichtintensität unter anaeroben Bedingungen

Für die Immobilisierung der Algen wurden Acrylglasplättchen verwendet, welche in einem ersten Schritt mit Sauerstoffplasma aktiviert wurden um eine hydrophile Oberfläche zu erhalten. Untersucht wurden zwei unterschiedliche Verfahren – die direkte Immobilisierung der Mikroalgen auf Chitosan und die Immobilisierung in einer Alginatschicht. Für beide Verfahren wurden die Plättchen nach der Aktivierung mit Chitosan beschichtet. Es wurde darauf geachtet, dass die Kunststoffträger recycelt werden können, um die Kosten bei einer Skalierung zu senken. Beide Beschichtungsmethoden lassen ein relativ einfaches Recycling zu.

#### Direkte Immobilisierung auf Chitosan

Da Chitosan ein Biopolymer ist, welches Mikroalgen über positiv geladene Aminogruppen elektrostatisch binden kann, wurde versucht eine einzellige Schicht (Monolayer) von Mikroalgen direkt auf den Kunststoffträger zu binden. Obwohl mit diesem Verfahren innerhalb von weniger als einer Stunde eine dichte Algenschicht immobilisiert werden konnte, war das Verfahren nicht anwendbar, da die Algen aus bislang unerklärlichen Gründen nach etwa einem Tag zum größten Teil abgestorben waren.



**Abbildung 23:** a) Immobilisierung von Mikroalgen durch Einlegen eines mit Chitosan beschichteten Kunststoffträgers in Algensuspension. b) und c) Betrachtung der Algenschicht unter dem Lichtmikroskop direkt nach der Immobilisierung. d) Abgestorbene (ausgebleichte) Algenzellen nach einem Tag.

## Immobilisierung in Alginat

Chitosan (ein Polykation) verbindet sich auch mit dem Polyanion Alginat. Daher wurde für eine Beschichtung mit Alginat eine Erstbeschichtung mit Chitosan durchgeführt. Die Algen wurden bei diesem Verfahren in einer Zentrifuge zuerst aufkonzentriert und dann in Alginat gegeben und vermischt. Mit einem Spincoater wurde dann das Alginat-Algen-Gemisch auf die Plättchen gegeben um bei etwa 1400 U/min eine gleichmäßige Schicht auf dem Substrat zu erhalten. Es konnten Schichtdicken von nur 20  $\mu\text{m}$  hergestellt werden, welche somit einem Monolayer nahekommen (ausgewachsene *C. reinhardtii*-Zellen haben einen Durchmesser von 8-10  $\mu\text{m}$ ). Zwar konnte mit diesem Verfahren keine so hohe Dichte wie bei der direkten Immobilisierung erreicht werden, jedoch blieben die Zellen im Alginat gut erhalten. So wurde nach der Immobilisierung ein Wachstum beobachtet, welches auch genutzt werden könnte um über einen Zeitraum von mehreren Tagen die Algendichte in der Alginat-Schicht noch zu erhöhen.

### Fazit

Für die Wasserstoffversuche im Labor als auch für spätere Versuche mit einem vorgesehenen Demonstrator wurde das zweite Verfahren ausgewählt, bei welchem die Mikroalgen in einer Alginat-Schicht immobilisiert wurden.

### Aufbau Laborversuch

Für den Reaktor wurde ein Verteiler aus der Hochvakuumtechnik verwendet, an welchem diverse Leitungen und Sensoren über gasdichte Verbindungen angeschlossen wurden. Die Beleuchtung der Algen erfolgte über einen Lichtleiter welcher seitlich in die Reaktorkammer führte. Aufgrund von Problemen bezüglich der Dichtigkeit (Eindringen von  $\text{O}_2$  aus der Umgebungsluft), mussten diverse Umbauarbeiten und Anpassungen durchgeführt werden. Nach diesen Anpassungen konnte jedoch eine sehr hohe Dichtigkeit erreicht werden, sodass ein Sauerstoffpartialdruck von weniger als 0.01 mbar über mehrere Stunden gehalten werden konnte. Die Gase Sauerstoff und Wasserstoff wurden mit einem Massenspektrometer gemessen. Eine Kühlfalle mit Flüssigstickstoff fror dabei das Wasser aus dem zugeführten Gasstrom aus um eine zuverlässige Wasserstoffmessung zu gewährleisten. Mit einem angeschlossenen Ultraschallvernebler konnte die relative Feuchte im Reaktor bis nahezu 100% aufrechterhalten werden, sodass die Algenschicht nicht austrocknete.

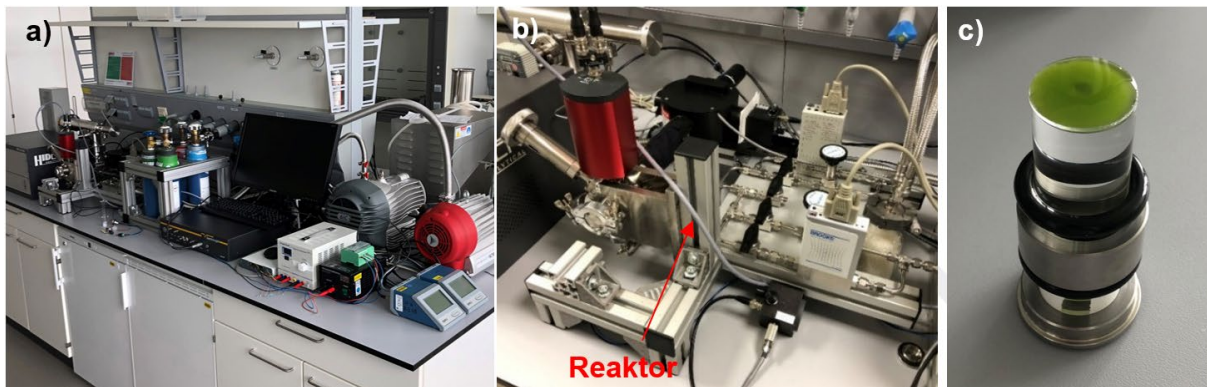


Abbildung 24: a) Aufbau des Laborversuchs. b) Nahaufnahme von Reaktor und Gasanschlüssen. c) Lichtleiter mit montierten und beschichteten Kunststoffträger.

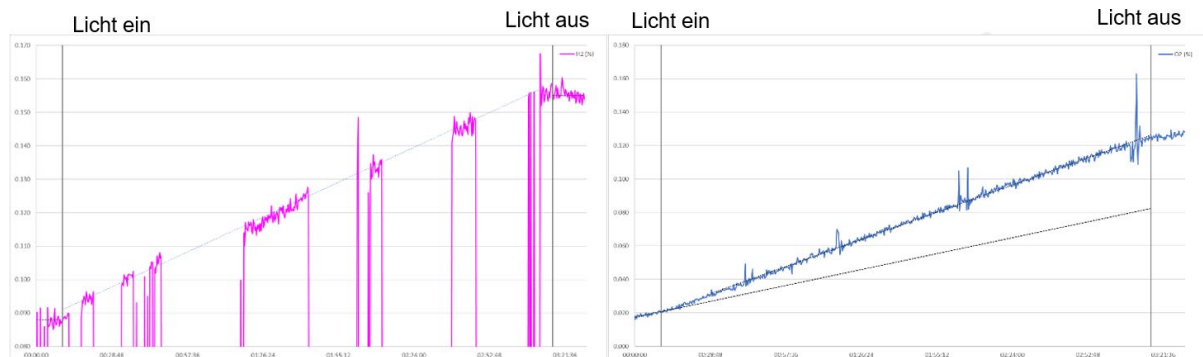
## Wasserstoffproduktion

In Vorversuchen konnte bereits gezeigt werden, dass Algen im Vakuum überleben können. Zwar hatten in der Vergangenheit mehrere Forschungsgruppen das Verhalten der Algen bei niedrigem Druck bereits untersucht (v.a. für Anwendungen im Weltraum), jedoch wurden mit *C. reinhardtii* gemäß aktuellem Wissenstand bisher keine Versuche unterhalb von 700 mbar durchgeführt, bei denen die Vitalität der Algen untersucht wurde. In den Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die Algen nach dem Aussetzen in einem Vakuum von unter 40 mbar über eine Stunde ein unverändertes Wachstum aufwiesen (bei Atmosphärendruck). Die Dekompressionsrate ist jedoch kritisch, da bei zu schneller Druckabsenkung die Zellhüllen der

Algen aufgrund expandierender Gase im Zellinnern Schaden nehmen können. Nach Untersuchung verschiedener Dekompressionsraten, wurde eine Druckabsenkung von 1 bar auf 100 mbar innerhalb von einer Stunde als geeignet festgelegt. Für die Wasserstoffversuche wurde Argon als Trägergas für das Massenspektrometer verwendet. Nach der Druckabsenkung auf 100 mbar wurde der Reaktor daher mit Argon gespült um den Sauerstoff im System zu entfernen. Die Gasphase im Reaktor bestand danach im Wesentlichen aus Argon (Partialdruck ca. 72 mbar) und Wasserdampf (Partialdruck ca. 28 mbar). Der Sauerstoff konnte durch das Durchspülen auf einen Partialdruck von weniger als 0.01 mbar gebracht werden. Aufgrund der nötigen Vorarbeiten für einen Versuch und der Tatsache, dass das Massenspektrometer nicht über Nacht laufen kann, waren die längsten durchgeführten Versuche im Labor ca. 3 Stunden. Da während dieser Zeit die kritische Grenze von Sauerstoff von 0.1 mbar nur knapp überschritten wurde, konnten die Versuche ohne aktive Entfernung von Sauerstoff durchgeführt werden. Es konnte gezeigt werden, dass mixotroph kultivierte Algen jedoch in der gleichen Zeit viel mehr Sauerstoff produzieren. Da bei diesen Kulturen Acetat im Nährmedium ist, wird durch den Stoffwechsel der Algen mehr CO<sub>2</sub> ausgeatmet, welches während der Wasserstoffproduktion von den Algen wiederum für die Photosynthese verwendet werden kann. Im Verlaufe der Versuche wurde daher auf eine autotrophe Kultur umgestellt. Bei dem bislang erfolgreichsten Versuch waren die Algen in einer ca. 45 µm dicken Alginatschicht eingebettet. Die Algendichte war jedoch nicht sehr hoch. Nach der Evakuierung des Reaktors und der Anaerobisierung folgte eine anaerobe Dunkelphase während etwa 2 h (bei < 0.07 mbar Sauerstoffpartialdruck), während der die Algen das wichtige Enzym *Hydrogenase* produzierten.

## Ergebnisse

Es konnte über einen Zeitraum von über 3 Stunden eine kontinuierliche Wasserstoffproduktion gemessen werden. Dabei wurde eine flächenspezifische Wasserstoffproduktionsrate von ca. 6.3 NmL H<sub>2</sub>/m<sup>2</sup> h gemessen. Obwohl der Sauerstoffpartialdruck die kritische Grenze von 0.1 mbar überschritten hat, konnte keine Beeinträchtigung der Wasserstoffproduktion beobachtet werden. Der Versuch musste letztlich aus Zeitgründen abgebrochen werden.



**Abbildung 25:** Links: Messung der Wasserstoffkonzentration mit dem Massenspektrometer. Über drei Stunden wurde ein linearer Anstieg beobachtet. Es wurden nur die Messwerte verwendet, bei welchen ein Druck von 2E-6 mbar im Massenspektrometer vorherrschte (dort wo Lücken sind, gab es Druckschwankungen). Die Absenkung der Kurve nach dem Ausschalten des Lichts könnte auf eine Wiederaufnahme von Wasserstoff durch die Algen hindeuten. Rechts: Messung der Sauerstoffkonzentration mit dem Massenspektrometer. Der Sauerstoff ist ebenfalls linear über die Versuchszeit angestiegen. Die gepunktete Linie wurde anhand der Messpunkte der ersten 10 Minuten extrapoliert und stellt die Sauerstoffleckage von außen in den Reaktor dar. Die Differenz der beiden Geraden beschreibt den von den Algen produzierten Sauerstoff.

## Fazit

Mit dem Versuch konnte ein Proof of Concept für eine kurzzeitige Wasserstoffproduktion erbracht werden. Die Kopplung mit dem Deoxygenator und die Demonstration der aktiven Sauerstoffabscheidung mit diesem während Langzeitversuchen steht noch aus. Aufgrund der geringen Algendichte auf der Oberfläche in dem beschriebenen Wasserstoffversuch wird davon ausgegangen, dass das Potential für die flächenspezifische Wasserstoffproduktionsrate noch um einiges höher liegt.

## Sauerstoffabscheidung über externen Deoxygenator

Der Deoxygenator konzentrierte den Sauerstoff in einem Kondensator auf, in welchem der Wasserdampf aufgrund geringerer Temperatur (ca. 10°C) teilweise auskondensierte. Durch die unterschiedlichen Partialdrücke von Wasserdampf aufgrund der Temperaturdifferenz wurde kontinuierlich Gas aus dem Reaktor abgezogen. Da beim zukünftigen Demonstrator der Wasserdampfdruck im Reaktor über die Verdampfung von reinem Wasser aufrechterhalten wird, kann der mit Sauerstoff angereicherte Wasserdampf kontinuierlich in den Kondensator strömen und dort den Sauerstoff anreichern. Sobald im Kondensator ein Sauerstoffpartialdruck von ca. 10 mbar erreicht wird, soll dieser an die Umgebung abgepumpt werden. Ein ähnliches Prinzip wird teilweise auch bei Wärmepumpen in sog. Restgasabscheidern verwendet. Im Labor wurde ein separater Versuchsaufbau gemacht, wo mit einem einfachen Dimroth-Kondensator gearbeitet wurde, um den Sauerstoff aufzukonzentrieren.

### Ergebnisse

Der Sauerstoffpartialdruck konnte mit dem Versuchsaufbau von 4.3 mbar auf 0.05 mbar innerhalb von 45 min abgesenkt werden. Da somit die kritische Grenze des Sauerstoffpartialdrucks für die Wasserstoffproduktion von 0.1 mbar unterschritten wurde, sollte bei einer Kopplung mit dem Reaktor die Sauerstoffkonzentration ausreichend tief gehalten werden können.

### Fazit

Ein Labormodell eines Deoxygenators konnte erfolgreich getestet werden. Die für die Wasserstoffproduktion kritische Grenze des Sauerstoffpartialdrucks konnte dabei unterschritten werden. Eine Kopplung mit dem Reaktor und entsprechende Langzeitversuche mit aktiver Sauerstoffabscheidung sind beim zukünftigen Demonstrator vorgesehen.

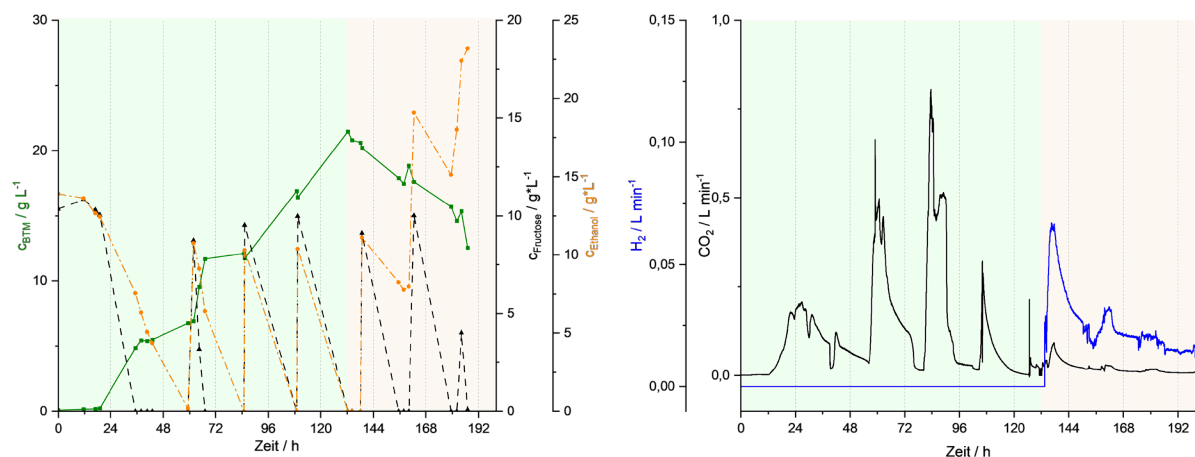
## 5.2.6 Technische Machbarkeit des Konzeptes anhand eines Demonstrators

### 5.2.6.1 Planung und Aufbau der Pilotanlagen unter Beachtung der Passfähigkeit der Schnittstelle (IGB)

Auf Basis der Ergebnisse aus der Entwicklung einer Steuerung des semiaeroben Zustands (siehe 5.2.5) und der Etablierung einer Fütterungsstrategie (siehe 5.2.5.3) wurde ein optimierter Prozess gefunden, welcher anschließend als Demonstrator hochskaliert wurde. Hierfür wurde am 01.08.2024 der Anlagenteil der bakteriellen H<sub>2</sub>-Produktion in Rheinfelden aufgebaut, am 03.08.2024 eingeweiht und schließlich am 05.08.2024 in Betrieb genommen. Der Demonstrator wurde mit einem Arbeitsvolumen von 50 L betrieben. Um zur Inokulation ausreichend Biomasse bereitzustellen wurde ein 7,5 L Reaktor in der Vorkulturführung eingesetzt.

### Inbetriebnahme der semiaeroben Dunkelfermentation im Demonstratormaßstab (IGB)

Insgesamt wurden vier Fermentation durch das Fraunhofer IGB durchgeführt, nachfolgend ist die vielversprechendste dargestellt.



**Abbildung 26: Wachstumsvorgang während der bakteriellen Fermentation im Demonstratormaßstab (links). Zufütterungen sind durch Pfeile markiert. Gebildete Gasmenge von H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> pro Minute (rechts) während der Fermentation. In grün hinterlegt ist die aerobe Phase, in rot die semiaerobe Phase mit H<sub>2</sub>-Produktion.**

Um die Produktion von Biowasserstoff effizient zu gestalten, muss die Produktionsphase verlängert werden, daher wurde in diesem Versuch drei Zufütterungen zur H<sub>2</sub>-Produktion geplant. Der Wachstumsverlauf ist dabei in Abbildung 26 dargestellt. Als maximale Zelldichte wurde eine Biotrockenmasse von 21,5 g L<sup>-1</sup> erreicht, trotz eines deutlichen geringeren Verbrauchs an Korrekturmitteln. Im Gegensatz zu dem hier verwendeten Spülwasser wurden die Laborversuche mit reinem Ethanol durchgeführt. Dies lässt darauf schließen, dass die geringere Zelldichte nicht aufgrund des Verfahrens aufgetreten ist, sondern womöglich eine Akkumulation von inhibierenden Stoffen aus dem Spülwasser stattgefunden hat, welche das Wachstum hemmen.

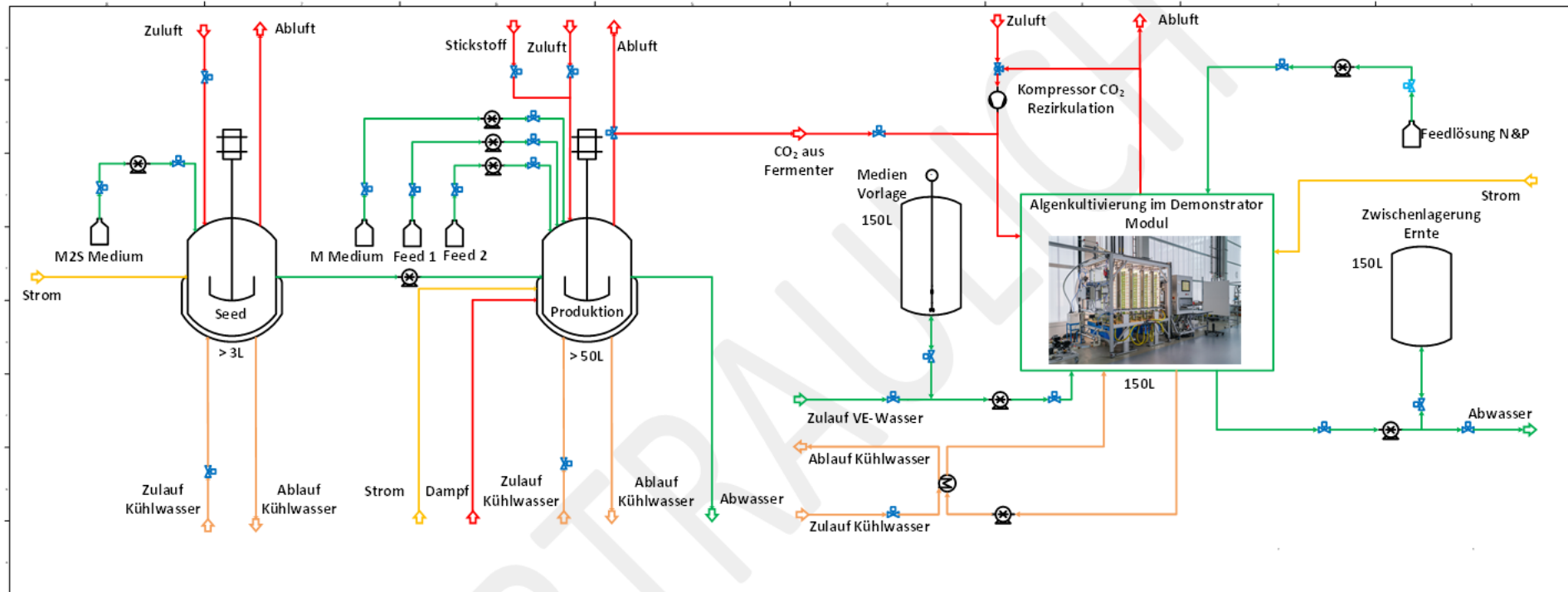
In dieser Fermentation konnte der semiaerobe Zustand so eingestellt werden, dass auch noch Ethanol aus dem Spülwasser verstoffwechselt konnte während der H<sub>2</sub>-Produktion. Wie bereits zuvor beschrieben sank die Aufnahme von Ethanol unter semiaeroben Bedingungen im Gegensatz zu Fructose. Dadurch kam es unter semiaeroben Bedingungen zu einer Akkumulation von Ethanol. In Zukunft wäre eine Abstimmung der Substratkonzentrationen in der Zufütterungslösung in Abhängigkeit vom semiaeroben Zustand sinnvoll, um einer Toxizität von Ethanol entgegen zu wirken. Die Bildung der relevanten Abgase CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> ist in Abbildung 26 dargestellt. In dieser Fermentation konnte die semiaerobe Produktionsphase auf drei Tage verlängert werden. Dabei wurde ein maximaler CO<sub>2</sub>-Gehalt von 3,20 % und ein H<sub>2</sub>-Gehalt von 0,85 % nachgewiesen. Insgesamt wurden 96,0 L H<sub>2</sub> produziert. Bei der Produktausbeute wurde ein Trend erkennbar, wurde für die 4. Zufütterung eine Ausbeute von  $Y_{P/S} = 0,34 \text{ mol mol}^{-1}$  erreicht, betrug dieser in der 5. Zufütterung lediglich  $Y_{P/S} = 0,17 \text{ mol mol}^{-1}$  und in der 6. Zufütterung  $Y_{P/S} = 0,12 \text{ mol mol}^{-1}$ . Die Überreduktion der Bakterien im semiaeroben Zustand stellte einen erheblichen Stress dar (sichtbar auch an einer Abnahme der Biomasse), in Kombination mit der Akkumulation von organischen Säuren wurden die Bakterien gehemmt. Für die weitere Prozessentwicklung bedeutet dies, dass in Zukunft neue Verfahrenskonzepte zur Stabilisierung des semiaeroben Zustands und der Überführung in einen kontinuierlichen Prozess notwendig sind. Denkbar wäre eine intervallweise Fermentationsstrategie, bei der alternierend zwischen aeroben und semiaeroben Zuständen gewechselt wird, um unter aeroben Bedingungen inhibierende Substanzen im Medium zu verstoffwechseln.

### **Skalierung Photobioreaktor für Demonstratoraufbau vor Ort**

In diesem Arbeitspaket sollte erstmals die Kopplung zwischen Wasserstoff-Fermentation mit *R. rubrum* und der Algenproduktion mit *C. sorokiniana* vor Ort bei der Evonik Operations GmbH in Rheinfeldern erfolgen. Insbesondere in der Wasserstoff-Produktionsphase sollte aus Fructose und Ethanol CO<sub>2</sub> entstehen, das mit den Algen zu Biomasse umgesetzt werden sollte.

- In Absprache mit Evonik wurden Räume angemietet, der Versuchsbetrieb der beiden Anlagen beim Regierungspräsidium Freiburg abgeklärt und die Standortbedingungen definiert bezüglich Schnittstellen. Der in 5.2.5.4 beschriebene mobile Demonstrator, bestehend aus 5x25L FPA-Reaktoren, wurde vor Ort bei Evonik in Rheinfeldern aufgebaut und mit dem Fermenter (70 Liter Arbeitsvolumen) zur Wasserstoff-Produktion mit *R. rubrum* gekoppelt (siehe Abbildung 27 und Abbildung 28) und in Betrieb genommen.
- Die anfallende CO<sub>2</sub>-Menge wurde abgeschätzt nach Fermentervolumen und Ethanol- bzw. Fructoseverbrauch in der Wachstums- und Wasserstoffproduktionsphase. In der Wachstumsphase mit Ethanol als C-Quelle entsteht nur wenig CO<sub>2</sub>, da Ethanol auch zu Acetat umgesetzt werden kann. In der Wasserstoffproduktionsphase sollten theoretisch pro kg Fructose bis zu 700 L CO<sub>2</sub> entstehen, das von den Algen genutzt werden sollte. Deshalb wurde entschieden die Kopplung nur in der Wasserstoffproduktionsphase durchzuführen.
- Bei den zu erwartenden niedrigen CO<sub>2</sub>-Volumenströmen wurde auf die Abgasrückführung verzichtet und der Abgasstrom des Fermenters direkt dem Algenreaktor zugeführt.
- Der Demonstrator wurde vor Ort bei Evonik Operations GmbH in Rheinfeldern aufgebaut und im August 2024 in Betrieb genommen. Zu diesem Zeitpunkt war die *R. rubrum*-Fermentation noch nicht betriebsbereit.
- Über eine etablierte Fernwarte zur Übermittlung der Sensordaten zum Fraunhofer IGB sollte die Algenkultivierung überwacht und Fütterungs- und Erntezyklen ausgelöst werden.
- Der Reststoffstrom Ammoniumchlorid würde für das Algenwachstum eingesetzt und entsprechend dem angezeigten Wachstum der OD-Sonde zusammen mit Phosphat gefüttert.

Integriert wurde der Demonstrator während der Fermentation an den Algenreaktor zur CO<sub>2</sub>-Fixierung. Hierfür wurden verschiedene Wege der Kopplung evaluiert und schließlich ein Anlagenkonzept erarbeitet (siehe Abbildung 27).



**Abbildung 27: Technische Zeichnung der Integration von mikrobieller Wasserstoffherstellung mit Kopplung an den Algenreaktor zur CO<sub>2</sub>-Fixierung.**

Die Anlagenplanung zur Kopplung einer semiaeroben Dunkelfermentation mit einer Algenanlage war entscheidend für die effiziente Nutzung von Ressourcen und die Maximierung der CO<sub>2</sub>-Fixierung. In diesem Prozess entstand CO<sub>2</sub>, welches durch die Algen fixiert wird, was eine Synergie zwischen beiden Systemen ermöglicht. Dabei war es wichtig, die Abgasstrommenge und -zusammensetzung genau abzustimmen, um die gekoppelte Algenanlage optimal zu betreiben. Des Weiteren bestand die Herausforderungen einen Prozess im Satzbetrieb (bakterielle Fermentation) mit einem nahezu kontinuierlichen Prozess (Algenreaktor) zu verbinden. Zudem mussten technische Aspekte wie Anschlüsse, Schläuche und die Energieversorgung der Anlagen für einen reibungslosen und effizienten Betrieb angepasst werden. Durch eine sorgfältige Abstimmung dieser Faktoren konnte die Integration der beiden Systeme etabliert und optimiert werden.

**Fazit:** Ein betriebsbereiter Demonstrator für die Kopplung von Wasserstoffproduktion mit der Algenkultivierung stand ab August 2024 bis Projektende 31.10.2024 zur Verfügung.

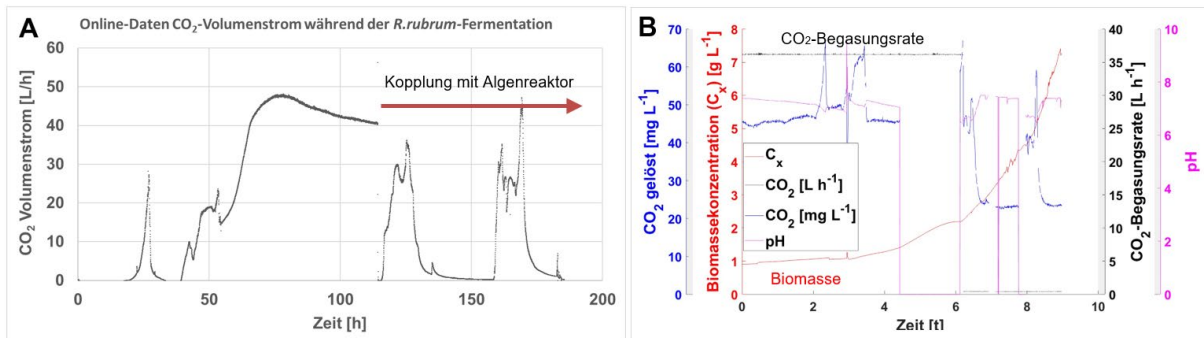


Abbildung 28: Installation des in TP5.1 aufgebauten Photobioreaktoranlage bestehend aus fünf miteinander gekoppelten 25L FPA-Reaktoren.

### 5.2.6.2 Demonstration der Kopplung Algenreaktor an den *R. rubrum*-Prozess zur Verwertung von Abgas-CO<sub>2</sub>

Die Kopplung der CO<sub>2</sub>-Verwertung durch Mikroalgen (*C. sorokiniana*) mit der Wasserstoffproduktion durch *R. rubrum* erfolgte im September 2024 vor Ort bei Evonik und im Januar 2025 nochmals im Fraunhofer IGB.

- Während der Versuchslaufzeit kam es immer wieder zum Ausfall der Sensorsignale, da eine große Nähe des Standorts zu Starkstromleitungen auf dem Betriebsgelände von Evonik bestand. Durch Abschirmung der Sonden konnte dies verbessert werden, aber nicht vollständig behoben werden wie aus Abbildung 29 [B] ab Tag 6 für den pH-Wert und Gelöst-CO<sub>2</sub>-Wert ersichtlich ist.
- In der Wachstumsphase (0-6 Tage) wurde CO<sub>2</sub> aus einer externen Quelle zudosiert (ca. 37 L CO<sub>2</sub>/h, das entspricht 1,54% in der Zuluft. Das Verhältnis CO<sub>2</sub><sub>gelöst</sub> : O<sub>2</sub><sub>gelöst</sub> war ausreichend mit > 4. Die in Abbildung 29 [A] erfassten online-Daten für diese Phase sind ab Tag 2,5 fehlerhaft. Mit Einsatz der Wasserstoffproduktionsphase nimmt jeweils der CO<sub>2</sub>-Volumenstrom nach Fructosefütterung zu bis auf 30 L/h, das entspricht 0 – 1,1 Volumen% CO<sub>2</sub> in der Zuluft des Algenreaktors, und damit nach bisherigen Erfahrungen zu niedrig für gutes Wachstum der Kultur. In der Zeit 130 bis 160 h wurde kein CO<sub>2</sub> gebildet, was bedeutet, dass die Algenkultur zeitweise stark CO<sub>2</sub>-limitiert war.
- Die Zunahme der Biomassekonzentration im Algenreaktor (siehe Abbildung 29 [B]) und damit die Anpassung der Lichtintensität an die steigende Biomassekonzentration war fehlerbehaftet durch Biofilmbildung in der Messstrecke des OD-Sensors.
- Die Bilanzierung der CO<sub>2</sub>-Verwertung zwischen Tag 6 und 9 erbrachte ein Biomassezuwachs von ca. 2,5 g TS/L, das entspricht 300 g Biomasse wurden pro Demonstrator-Reaktor produziert. Das entspricht 15% des zugeführten CO<sub>2</sub> wurden in Biomasse umgesetzt. Diese geringe Ausbeute ist auf die sehr schwankende Bereitstellung von CO<sub>2</sub> zurückzuführen.



**Abbildung 29: Online-Daten der Kopplung der *R. rubrum*-Fermentation mit dem Demonstrator Algenreaktor mit *C. sorokiniana* 09-2024 am Standort der Evonik. A: Mit Beginn der Wasserstoffproduktionsphase nach 150h (6 Tagen) schwankte der CO<sub>2</sub>-Volumenstrom (L/h) stark aufgrund der Fütterungszyklen mit Fructose im Fermenter. B: Online-Daten der Kultivierung im Photobioreaktor-Demonstrator: Bis Tag 6 wurde ein konstanter CO<sub>2</sub>-Volumenstrom eingestellt. CO<sub>2</sub>-Volumenstrom der *R. rubrum*-Fermentation. Nach 6 Tagen wurde die CO<sub>2</sub>-Begasung auf Fermentationsabgas umgestellt.**

Ein erneuter Kopplungsversuch zwischen *R. rubrum*-Fermentation und Algenreaktor erfolgte im Januar 2025 im Fraunhofer IGB.

## Ergebnis

- In der *R. rubrum*-Fermentation wurden beim Wachstum auf Ethanol und der Verdünnung des Abgasstromes weit unter die Explosionsgrenze sehr schwankende und zu geringe CO<sub>2</sub>-Volumenströme erreicht. Eine Kopplung mit dem Algenreaktor unter Zuschaltung der Abgasrückführung war nicht möglich, da der Abgasstrom drucklos angefallen ist und der CO<sub>2</sub>-Volumenstrom nur in kurzen Zeitintervallen ausreichend war. Der CO<sub>2</sub>-Volumenstrom schwankte zwischen 0,1 und 0,6 L CO<sub>2</sub> / min, das entspricht 6 – 36 L/h (siehe Abbildung 26). Für eine Entnahme des CO<sub>2</sub>-Abgasstromes aus einem Zwischenbehälter über die Rezirkulierungspumpe schwankte der CO<sub>2</sub>-Abgasstrom zu stark und wäre nur in 2 Zeitintervallen (ca. 60 – 66 h und 80 – 90h) ausreichend für eine Kopplung über die Rezirkulierungspumpe ausreichend gewesen.
- In der Wasserstoffproduktionsphase ab 130 h wurde fast kein CO<sub>2</sub> mehr produziert. Zugegebene Fructose wurde durch *R. rubrum* für die Akkumulation von PHA verstoffwechselt. Eine Algenproduktion war mit diesen CO<sub>2</sub>-Mengen nicht möglich.

Für eine effektive Kopplung des Algenreaktors an die Wasserstoffproduktion durch *R. rubrum* sollte H<sub>2</sub> aus dem Abgasstrom abgetrennt werden und der resultierende CO<sub>2</sub>-Abgasstrom verdichtet in einem Zwischentank mit mindestens 1 bar Überdruck der Algenkultivierung zur Verfügung stehen. Damit könnte eine pH-Wert-kontrollierte Zugabe von CO<sub>2</sub> erfolgen und die zugeschaltete Abluft-Rezirkulierung würde die CO<sub>2</sub>-Verwertungseffizienz deutlich erhöhen.

## Gesamtfazit mikroaerobe Dunkelfermentation

- ✓ Geeigneter Abwasserstrom der Evonik konnte identifiziert werden.
- ✓ Mittels Toxizitätsbewertung und Optimierung der Medienzusammensetzung konnte eine Substratkonzentration definiert werden, wodurch die Wachstumsrate um 30 % gesteigert werden konnte.
- ✓ Eine Wasserstoffproduktion konnte auch mit Ethanol durch Etablierung einer Redoxpotentialsteuerung durch zusätzliche Stickstoffbegasung realisiert werden.
- ✓ Durch Etablierung einer Zufütterungsstrategie konnte eine Zelldichte von 33,4 g/L im Labormaßstab, bzw. 21,5 g/L im Demonstratormaßstab erreicht werden, was in einer Steigerung der H<sub>2</sub>-Produktionsrate um das 13-fache resultierte.
- ✓ Ein Betrieb der Demonstratoranlage in Rheinfelden konnte technisch realisiert werden.

## Gesamtfazit Algen

- ✓ Durch Kopplung an die Mikroalgenproduktion konnte sowohl der Reststoffstrom Ammoniumchlorid als auch CO<sub>2</sub> aus der bakteriellen Wasserstoffproduktion verwertet werden.
- ✓ Mit beidseitiger Beleuchtung der Algenreaktoren konnten hohe Biomasseproduktivitäten bei gleichzeitig hoher Lichtausbeute erzielt werden.
- ✓ Interessante Co-Produkte bei Einsatz von *C. sorokiniana* waren Stärke als Kohlenstoffspeicher (>40% der TS) und Lutein (bis zu 1,8% der TS).
- ✓ Durch Integration einer internen Abgasrückführung konnte die Effizienz der CO<sub>2</sub>-Verwertung stark erhöht werden.
- ✓ Kopplung zwischen Fermenter-Abgasstrom und Algenreaktor: Für einen stabilen Betrieb CO<sub>2</sub> sollte gleichmäßig anfallen und 30-40 L CO<sub>2</sub>/h erreichen.
- ✓ Für einen stabilen Betrieb des Algenreaktors sollte die Biomassekonzentration an das CO<sub>2</sub>-Aufkommen im Abgasstrom angepasst werden.
- ✓ Der Proof of Concept für eine kurzzeitige Wasserstoffproduktion konnte erbracht werden. Den dafür benötigten Deoxygenator konnte erfolgreich etabliert und getestet werden.

## 6 Praktische Anwendbarkeit und Roll-out

Die Pilotanlagen mit einem Volumen von jeweils etwa 100 Litern wurden erfolgreich im Werksteil Nord errichtet. Dieser Standort erwies sich als ideal, da dort Chemikalien aus fossilem Wasserstoff produziert werden und standortspezifische Rest- und Abfallstoffe anfallen. Der Aufbau der Anlagen erfolgte in enger Abstimmung zwischen den Partnern.

Bei der Auswahl der Verfahrensführung, dem Aufbau der Fermentertechnik und den Regelkonzepten konnten wir die Expertise der Evonik Operations GmbH in Rheinfelden, einem der größten Wasserstoffherzeuger und -verbraucher in Baden-Württemberg, nutzen. Diese brachten umfassende Erfahrung im Umgang mit Wasserstoff mit. Zudem wurde die Expertise sowie die Labor- und Technik-Infrastruktur des Fraunhofer-Instituts für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik (IGB) sowie der Abteilung für Laborautomatisierung und Bioproduktionstechnik des Fraunhofer-Instituts für Produktionstechnik und Automatisierung (IPA) erfolgreich einbezogen. Auf Basis des Betriebs der Pilotprozesse haben wir schließlich eine Validierung des im Teilprojekt 3 erstellten Simulationsmodells durchgeführt.

### 6.1 Übertragbarkeit der getesteten Technologien in die Praxis

Am Standort Rheinfelden werden jährlich 890 Tonnen Prozesswasser und Reststoffe, die potenziell für die im Projekt beschriebenen biotechnologischen Verfahren geeignet sind, ausschließlich entsorgt. Stattdessen leisten wir mit der Implementierung der Pilotanlagen in die bestehende Produktionsinfrastruktur der Evonik Operations GmbH einen bedeutenden Beitrag zur stofflichen und ressourcenorientierten Verwertung von Abwasser und Reststoffen. Der Prozess konnte dabei erfolgreich umgesetzt werden und nach einer weiterführenden Optimierung und positiven Ergebnissen könnte Evonik unmittelbar mit der industriellen Umsetzung beginnen.

Insbesondere kleine und mittlere Unternehmen (KMUs), die einzelne Komponenten des Gesamtprozesses bereitstellen, haben nun die Möglichkeit, einen neuen Markt in der Abwasserbranche sowie in der Ressourcenrückgewinnung und im Recycling zu erschließen. Die Pilotprojekte in diesen Bereichen sind besonders wichtig, um die Machbarkeit und Wirtschaftlichkeit solcher Alternativen in etablierten Entsorgungsbereichen zu demonstrieren.

Das in diesem Projekt umgesetzte Konzept bietet Lösungsansätze für grundlegende Fragestellungen zur Verwertung von Inhaltsstoffen aus Abwasser- und Reststoffströmen. Durch die erfolgreiche Umsetzung ist das Konzept auf Unternehmen aus ähnlichen oder anderen Branchen und Standorten übertragbar. Das Demonstrationsvorhaben lieferte ein anpassbares Modell für die Kreislaufwirtschaft im Rahmen einer nachhaltigen Bioökonomie. Darüber hinaus tragen die Projektergebnisse zur Förderung des Ansatzes der Ultraeffizienz bei, der eine symbiotisch verlustfreie Produktion im urbanen Umfeld ermöglicht.

Das Bewertungs- und Optimierungsmodell kann ebenfalls auf andere Bioraffinerieansätze übertragen werden und soll langfristig den zielgerichteten Innovationsprozess im Bereich der Bioökonomie unterstützen sowie die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Ansätzen fördern.

## 6.2 Wirtschaftliche Aussichten der Verwertungswege

### a) H<sub>2</sub>-Produktion mit *R. rubrum* mittels "Dunkel-Photosynthese":

Die internen nivellierten Energiekosten des Biowasserstoffs aus dem Beispielprojekt beliefen sich auf 0,12 EUR/kWh H<sub>2</sub> bzw. 4,00 EUR/kg H<sub>2</sub>. Diese Kosten sind im Vergleich zu grünem Wasserstoff aus Elektrolyse, der mit 0,17 EUR/kWh H<sub>2</sub> bzw. 5,67 EUR/kg H<sub>2</sub> zu Buche schlägt, wettbewerbsfähig. Diese Erkenntnis deutet darauf hin, dass das Beispielprojekt, unter den getroffenen Annahmen, bereits in der Lage sein könnte, mit der Erzeugung von grünem Wasserstoff durch Elektrolyse in Konkurrenz zu treten.

Darüber hinaus sind die nivellierten Kosten für kohlenstoffnegativen Wasserstoff, der die Kosten für die CO<sub>2</sub>-Entfernung internalisiert, mit nur 0,013 EUR/kWh H<sub>2</sub> (0,43 EUR/kg H<sub>2</sub>) extrem niedrig. Dies verdeutlicht den hohen ökologischen Nutzen dieser Technologie. Im Vergleich dazu verliert grauer Wasserstoff, der aus Erdgas gewonnen wird, mit Kosten von 0,12 EUR/kWh H<sub>2</sub> bzw. 4,00 EUR/kg H<sub>2</sub> an Wettbewerbsfähigkeit, wenn die positiven und negativen Umweltauswirkungen in die Berechnungen einfließen.

Die Studie hat auch ergeben, dass das Bioraffineriekonzept 24,4 kg CO<sub>2</sub>-Äquivalente pro Kilogramm erzeugtem Wasserstoff produziert, wovon 0,172 kg CO<sub>2</sub>-Äquivalente auf biogenen Kohlenstoff entfallen. Diese Emissionen sind nahezu doppelt so hoch wie die von konventionellem Wasserstoff, der mittels Dampfreformierung von Erdgas hergestellt wird (12,3 kg CO<sub>2</sub>-Äq. pro Kilogramm Wasserstoff). Der hohe Gesamtenergiebedarf des Bioraffineriekonzepts von 419 MJ pro Kilogramm Wasserstoff, was mehr als das Dreifache des unteren Heizwertes von Wasserstoff (120 MJ/kg) ist, lässt jedoch darauf schließen, dass das derzeit modellierte Bioraffineriesystem nicht umweltfreundlicher ist als die fossilen Alternativen, dass die Notwendigkeit weiterer Forschung insbesondere innerhalb der Verfahrensoptimierung und der Schnittstelle zwischen H<sub>2</sub> Produktion und CO<sub>2</sub> Fixierung verdeutlicht.

Ein möglicher wirtschaftlicher Verwertungsweg liegt im Bereich der Patente und der Technologien zur Wasserstoffproduktion. Der „Dunkel-Photosynthese“-Ansatz basiert auf dem M2SF-Medium, das bereits 1994 veröffentlicht wurde und somit nicht patentierbar ist. Allerdings könnte eine erfolgreiche großtechnische Regelung des Dunkel-Photosynthese-Prozesses im Fermenter patentierbar sein.

Eine spezielle H<sub>2</sub>-produzierende Mutante (*R. rubrum* H<sub>2</sub>), die in laufenden Projekten verwendet wurde, ist bislang nicht patentiert, da sie aus einem anderen Forschungsbereich stammte und phänotypisch instabil ist, innerhalb dieses Projekts wurde nach weiteren H<sub>2</sub>-Überproduktionsmutanten gesucht, die an die vorhandenen Stoffströme am Standort Rheinfelden angepasst sind. Diese könnten ebenfalls das Potenzial zur Patentierung aufweisen.

Zusätzlich wurden in einer vorläufigen Patentrecherche zwei relevante bestehende Patente identifiziert:

US-Patent US2008311640A: Beschreibt ein Verfahren zur H<sub>2</sub>-Produktion von *R. rubrum* im Bioreaktor unter anaeroben, photosynthetischen Bedingungen.

WO2015068054A1: Bietet technische Lösungen für eine zwei-Schritt Fermentation mit *Clostridium* sp. und Purpurbakterien.

Dies zeigt, dass dieser neue Ansatz bisher noch nicht durch bestehende Patente abgedeckt ist und somit das Potenzial einer wirtschaftlichen Nutzung dieser Technologie möglich ist.

Insgesamt zeigt die Analyse, dass durch eine weitere Optimierung der Produktionsprozesse, insbesondere zur Reduzierung des Kohlenstoffdioxidaustoßes, wirtschaftliche Verwertungswege im Bereich der biotechnologischen Wasserstoffproduktion bestehen.

b) Wasserstoff aus Algen und *R. rubrum* für den internen Prozess zur Herstellung von bisher bereits produzierten Produkten wie Silane, SiO<sub>2</sub> oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und weitere:

Das Marktpotenzial der bislang produzierten Produkte ist bereits vorhanden. Ein Nachteil besteht jedoch darin, dass die Wasserstoffquelle fossilbasiert ist. Der biotechnologisch erzeugte Wasserstoff soll in Zukunft schrittweise oder sogar vollständig den fossilen Wasserstoff ersetzen.

c) Proteine und Lutein aus Algen für die Futtermittelanwendung:

Der Bioraffinerieansatz dieses Projekts zielte auf die Schließung von Stoffkreisläufen zwischen den einzelnen Produktionsmodulen. Auf diese Weise konnte das bei der fermentativen Wasserstoffproduktion anfallende Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) für die photoautotrophe Kultivierung von Mikroalgen verwendet werden. Diese konnten durch die gezielte Modifikation der Kultivierungsbedingungen Stärke anreichern, welche dann erneut für die Wasserstoffproduktion genutzt werden könnte. Für das photoautotrophe Wachstum der Algen werden neben CO<sub>2</sub> anorganische Nährstoffe wie Ammonium benötigt, welche dann vor allem in Proteinen gebunden werden.

Neben der wirtschaftlichen Betrachtung der Wasserstoffproduktion ermöglichte die Produktion von Stärke-reicher Biomasse die gleichzeitige Produktion werthaltiger Inhaltsstoffe, welche von der Stärke separiert und separat kommerziell verwertet werden könnten. Insbesondere die Nutzung der Protein-reichen Biomassefraktionen ist dabei besonders für die Nutzung als Lebens- und Futtermittel geeignet, da die Aminosäurezusammensetzung dieser Fraktion sehr vorteilhaft für die Ernährung angesehen wird. Die Nutzung von Mikroalgenbiomasse als Nahrungs- und Futtermittel würde daher als vielversprechender Ansatzpunkt für die Lösung von globalen Herausforderungen der Nahrungsmittelproduktion dienen. Nicht umsonst werden Mikroalgen seit vielen Jahren im Hinblick auf dieses Anwendungsfeld stark erforscht.

Innerhalb der Europäischen Union unterliegt die Nutzung von neuartigen Biomassen als Lebens- und Futtermittel strengen Auflagen. Neben Hindernissen wie der Novel-Food-Regulation stellen uneindeutige Regelungen für die Nutzung von CO<sub>2</sub>-Abgasströmen eine weitere Herausforderung in der kommerziellen Entwicklung der Mikroalgenbiotechnologie dar. Hintergrund ist, dass keine Abfälle oder Substanzen mit schadhaften Effekten für die Produktion von Lebens- und Futtermitteln eingesetzt werden dürfen. Dies ist einerseits auf die auf die Ammoniumchlorid-haltigen Waschwässer als auch auf unterschiedliche Abgasströme der chemischen Industrie anwendbar. Vor diesem Hintergrund ist eine grundlegende Klärung der regulatorischen Hindernisse in jedem Einzelfall und mit Bezug zum verwendeten Reststoffstrom zu untersuchen.

Im vorliegenden Projekt wurden verschiedene Mikroalgen untersucht. Vorbehaltliche der regulatorischen Klärung zur Nutzung verschiedener Abfallströme wäre es aufgrund von Neuerungen in der Novel-Food-Regulatorik bereits möglich Biomasse der Mikroalgen *Chlorella sorokiniana* als Lebens- und Futtermittel zu verwenden. Diese Alge eignet sich neben der Produktion von Stärke auch zur Bildung von Lutein- und Protein-reichen Biomassefraktionen. Die ebenfalls untersuchte Mikroalge *Chlamydomonas reinhardtii* kann ebenfalls zu diesem Zweck verwendet werden, besitzt jedoch noch keine Novel-Food-Zulassung.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Bioraffinerie-Ansatz zur gekoppelten Produktion von Wasserstoff und werthaltigen Inhaltsstoffen schon heute wirtschaftliche Anschlussfähig ist. Aufgrund regulatorischer Hürden in Bezug auf die im Chemiepark nutzbaren Rohstoffe erscheint die Nutzung der hier produzierten Biomasse zunächst schwierig. Aufgrund der starken Nachfrage nachhaltiger Prozesse und Produkte erscheint die Bewältigung der regulatorischen Unklarheiten neben der ökonomischen Tragfähigkeit im Sinne der aufgewendeten Stromkosten als ein zentraler Baustein für die weitere kommerzielle Entwicklung.

### 6.3 Was wird benötigt um die Technologie in die Anwendung zu bringen?

Um die Verfahren und Technologien dieses Bioraffineriekonzepts innerhalb der Industrie zu implementieren sind mehrere Aspekte zu berücksichtigen:

#### 1. Mikroorganismen:

- Evaluation von gentechnischen Stämmen zur Maximierung der H<sub>2</sub>-Ausbeute entweder durch Einsatz von *hup*-defizienten Stämmen zur Vermeidung der Wiederaufnahme des produzierten Wasserstoffs durch die Bakterien, oder der Inhibition bei der Bildung photosynthetischer Membranen verursacht durch hohe Zelldichten (Quorum Sensing), wodurch die H<sub>2</sub>-Ausbeute unter hohen Zelldichten sinkt.

#### 2. Substrat und Medium:

- Screening von industrie-üblichen, kostengünstigeren Fermentationsmedien zur Senkung der Prozesskosten und der Eutrophierungsauswirkungen.
- Test neuer Verfahrenskonzepte entweder zur Verringerung des Energie- und Kostenaufwands der Substratvorbereitung oder der Etablierung von teilsterilen Fermentationsarten.

#### 3. Prozesskontrolle:

- Entwicklung automatisierter Systeme zur Überwachung und Steuerung der mikroaeroben Kultivierungsbedingungen.

#### 4. Integration in bestehende Systeme:

- Etablierung von kontinuierlichen Verfahren bei der bakteriellen H<sub>2</sub>-Herstellung zur Steigerung von Raum-Zeit-Ausbeuten, einer längeren Produktionsphase und einer simpleren Integration von Bioreaktor und Algenreaktor.
- Integration einer Abgasrückführung innerhalb der bakteriellen Fermentation zur Senkung des Stickstoffverbrauchs, sowie einer technischen Implementierung der CO<sub>2</sub>-Abgasrückführung bei der Kopplung beider Bioraffinerieanlagen zur vollständigen Fixierung des CO<sub>2</sub> aus der Fermentation durch die Algen.
- Bewertung von Technologien unter praxisnahen Bedingungen zur Aufreinigung des hergestellten Wasserstoffs bei der Präsenz von Sauerstoff in der Abluft.

Die Umsetzung der Technologien der bakteriellen Dunkelphotosynthese erfordert ein interdisziplinäres Vorgehen, das biotechnologische, ingenieurtechnische und wirtschaftliche Aspekte umfasst. Durch gezielte Forschung und Entwicklung könnten diese Verfahren effizienter ablaufen und in der Industrie implementiert werden, um nachhaltige Lösungen für die Energiegewinnung und Abfallverwertung zu bieten.

## 7 Ausblick und Entwicklungsperspektive

Die Entwicklungsperspektive einer Bioraffinerie, die eine mikroaerobe Dunkelphotosynthese zur Wasserstoffherstellung mit einer Algenanlage zur CO<sub>2</sub>-Fixierung kombiniert, ist vielversprechend. Diese integrierte Anlage könnte nicht nur zur nachhaltigen Energieproduktion beitragen, sondern auch die CO<sub>2</sub>-Emissionen erheblich reduzieren. Durch die Umwandlung von organischen Abfällen aus der Chemieindustrie in Wasserstoff mittels Dunkelphotosynthese wurde eine wertvolle Energiequelle erschlossen, während die Algenanlage gleichzeitig CO<sub>2</sub> aus den Abgasen aufnahm und in Biomasse umwandelte. Diese Synergie ermöglicht eine im Idealfall geschlossene Kohlenstoffbilanz und fördert die Kreislaufwirtschaft. Zudem könnten zukünftige Entwicklungen im Bereich der Genomforschung und der Prozessoptimierung die Effizienz beider Technologien weiter steigern, wodurch die Bioraffinerie zu einer zunehmend interessanten Perspektive in der nachhaltigen Energieversorgung werden könnte. In diesem Projekt wurden Grundlagen geschaffen und erstmals gezeigt, dass der Betrieb eines solchen Bioraffineriekonzepts auch in Industrieumgebung in einem skalierten Maßstab möglich ist und Abwasserströme aus der Chemieindustrie in nachhaltigen und umweltfreundlichen Wasserstoff umgewandelt werden konnten.

## 8 Literaturverzeichnis

- <sup>1</sup> Alloul A, Blansaer N, Segura PC, Wattiez R, Vlaeminck SE, Leroy B. Dehazing redox homeostasis to foster purple bacteria biotechnology. *Trends Biotechnol.* 2023;41(1):106-19.
- <sup>2</sup> Castelló E, Ferraz-Junior ADN, Andreani C, Anzola-Rojas MD, Borzacconi L, Buitrón G, et al. Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: Possible causes and solutions. *Renew Sust Energ Rev.* 2020;119.
- <sup>3</sup> Selao TT, Edgren T, Wang H, Norén A, Nordlund S. Effect of pyruvate on the metabolic regulation of nitrogenase activity in *Rhodospirillum rubrum* in darkness. *Microbiol-Sgm.* 2011;157:1834-40.
- <sup>4</sup> Nirmala N, Praveen G, AmitKumar S, SundarRajan P, Baskaran A, Priyadharsini P, et al. A review on biological biohydrogen production: Outlook on genetic strain enhancements, reactor model and techno-economics analysis. *Sci Total Environ.* 2023;896.
- <sup>5</sup> Hijosa-Valsero, M., Paniagua-García, A.I. & Díez-Antolínez, R. Biobutanol production from apple pomace: the importance of pretreatment methods on the fermentability of lignocellulosic agro-food wastes. *Appl Microbiol Biotechnol* 101, 8041–8052 (2017).
- <sup>6</sup> Zeiger, L.; Grammel, H. Model-based high cell density cultivation of *Rhodospirillum rubrum* under respiratory dark conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 2010, 105, 729–739. <https://doi.org/10.1002/bit.22589>.
- <sup>7</sup> Favier-Teodorescu, L.; Cornet, J.F.; Dussap, C.G. Modelling continuous culture of *Rhodospirillum rubrum* in photobioreactor under light limited conditions. *Biotechnol. Lett.* 2003, 25, 359–364.
- <sup>8</sup> Bóna-Lovász, J.; Bóna, A.; Ederer, M.; Sawodny, O.; Ghosh, R. A rapid method for the extraction and analysis of carotenoids and other hydrophobic substances suitable for systems biology studies with photosynthetic bacteria. *Metabolites* 2013, 3, 912–930. <https://doi.org/10.3390/metabo3040912>.
- <sup>9</sup> Autenrieth, C., Shaw, S., and Ghosh, R. (2021) *Metabolites* 11: 667. New approach for the construction and calibration of gas-tight setups for biohydrogen production at the small laboratory scale.