

wasserstoff aus wasser – biologisch und ökonomisch?

Designzellen und Biobatterie-Modelle zur Entwicklung solargetriebener Energiemodule

von Matthias Rögner

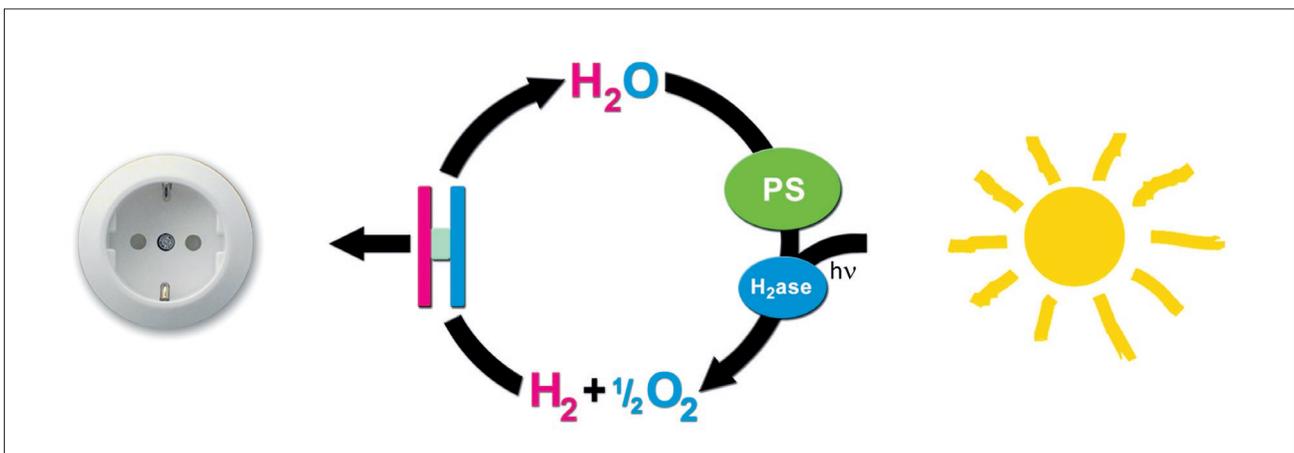
Photosynthese ist Ursprung und Triebkraft (fast) allen Lebens auf der Erde. Allerdings wird ein Großteil dieser umgewandelten Sonnenenergie in den Aufbau von „grüner“ Biomasse oder die Synthese langfristiger Speicherstoffe investiert. Hierbei geht bekanntlich – bezogen auf die ursprünglich absorbierte Solarenergie – mehr als 95% der Energie verloren. Nachhaltige und effiziente Energieernte kann deshalb nur erzielt werden, wenn die energieliefernden Prozesse so direkt wie möglich an die Primärreaktionen der Photosynthese gekoppelt werden, die mit einer (Quanten-)Effizienz von bis zu 99% ablaufen. Wasserstoff wäre ein idealer Energieträger für diese Kopplung, da er CO_2 -neutral ist, eine hohe Energiedichte besitzt und – im Gegensatz zu den in der Photosynthese primär gebildeten energiereichen Intermediaten – langfristig speicherbar ist. Seine Energie kann z. B. in Brennstoffzellen ohne Umwege direkt freigesetzt und verwertet werden. Gelänge es,

die für die Wasserstofferzeugung benötigten Elektronen mit Hilfe der photosynthetischen Wasserspaltung direkt aus Wasser, das an vielen Stellen der Welt im Überfluss vorhanden ist (neben Süßwasser sind auch Meer- bzw. Salzwasser nutzbar), zu beziehen und hierfür die kostenlose Energie der Sonne zu nutzen, hätte man einen äußerst umweltfreundlichen energieerzeugenden Prozess, der im $\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2$ -Zyklus mit der Brennstoffzelle als einziges „Abfallprodukt“ wieder die Ausgangskomponente Wasser erzeugt (Abb. 1).

Die Strategie

Da natürliche photosynthetische Zellen – sofern sie das für die H_2 -Erzeugung notwendige Enzym „Hydrogenase“ (H_2ase) überhaupt besitzen (nur Cyanobakterien und Grünalgen) – in der Regel Wasserstofferzeugung nur als „Notventil“ unter ungünstigen Umweltbedingungen „anschalten“ und entsprechend ineffizient sind, muss der Energiemetabolismus der ganzen photosyntheti-

Abbildung 1:



Energiekreislauf von Wasserstoff und Wasser, in welchem Solarenergie mit Hilfe der natürlichen Katalysatoren Photosystem 2 (PS2) und Hydrogenase (H_2ase) in Wasserstoff umgewandelt wird, dessen Energie dann wieder in einer Brennstoffzelle freigesetzt und verwertet werden kann, wobei als „Abfallprodukt“ wieder Wasser entsteht (Quelle: Matthias Rögner).



Matthias Rögner vor dem Prototyp eines 100 L-Flachbett-Photobioreaktors, welcher zusammen mit der Fa. KSD (Hattingen) entwickelt wurde (Foto: Dieter Wunsch)

schen Zelle umgestellt werden. Nur so kann Wasserstoff in ausreichenden Mengen und unter Bedingungen erzeugt werden, die eine spätere ökonomische Nutzung sinnvoll und aussichtsreich erscheinen lassen. Schätzungen gehen von einer notwendigen Optimierung der H_2 -Erzeugungsrates der besten bisher verfügbaren „natürlichen“ Grünalgenzellen (*Chlamydomonas reinhardtii*) um einen Faktor 100 aus (Abschätzung Prof. H.-J. Wagner, LEE, RUB). Dies kann durch Proteindesign von H_2 asen und Expression in Designerorganismen gelingen, mithilfe dessen die volle Aktivität der H_2 asen unter aeroben (statt anaeroben) Bedingungen zur Verfügung steht. Fast alle H_2 asen sind nämlich extrem sauerstoffempfindlich. Zweiter wichtiger Schritt ist die optimale, d. h. energetisch günstigste Kopplung von Photosynthese und Wasserstoffherzeugung, um die Elektronen auf möglichst direktem Weg von der Wasserspaltung in PS2 auf die H_2 ase zu leiten. Hierbei handelt es sich um einen iterativen Prozess, bei welchem in vielen Einzelschritten Mutanten der zentralen Proteine (s. „Designproteine“ in Abb. 2) erzeugt und charakterisiert werden müssen. Als Ausgangsorganismus für diese „Designzelle“ nutzen wir das Cyanobakterium *Synechocystis* PCC 6803, da es der einfachste, am besten charakterisierte und am schnellsten genetisch modifizierbare Organismus für diesen Zweck ist.

Grundsätzliche Fragestellungen zur Optimierung von Elektronentransfer und Protein-Protein-Interaktion sowie zur energetischen Effizienzabschätzung klären wir parallel hierzu mit einem semiartificialen Modellsystem, welches lediglich die isolierten und aufgereinigten Hauptkomponenten enthält, die auf Goldelektroden immobilisiert werden („Biobatterie“ in Abb. 2). Zu dieser „Machbarkeitsstudie“ gehört auch die Entwicklung und Optimierung spezieller Photobioreaktoren einschließlich der Steuerungssysteme zum kontinuierlichen Betrieb. Diese sind sowohl für die Standardisierung des Verfahrens, die Optimierung des Ertrags als auch als verknüpfbare Module für eine spätere Massenanzucht der photosynthetischen Designzellen unabdingbar. Zusätzlich muß der Preis dieser Photobioreaktoren erheblich reduziert werden, um einen kompetitiven Endpreis für den zukünftigen Biowasserstoff zu erzielen.

Die Realisierung (1): „Biobatterie“

Mithilfe dieses Ansatzes soll die Effizienz der Kopplung der photobiologischen Wasserspaltung am PS2 an die biologische Wasserstoffherzeugung mittels H_2 ase in einem möglichst einfachen Modellsystem als „Proof of Principle“ optimiert werden. Die einfachste Möglichkeit ist die Isolierung der hierzu benötigten Enzyme/Elektronencarrier und deren Zusammenführung in einem semiartificialen „Minimalsystem“. Größtes Hindernis ist die Hydrogenase. Das mit Abstand aktivste Enzym, die Fe-Fe-Hydrogenase aus Grünalgen oder Clostridien, ist extrem sauerstoffempfindlich. Dieses Enzym empfängt in Organismen wie der Grünalge *Chlamydomonas* seine Elektronen über Ferredoxin (Fd) von Photosystem 1 (PS1) – allerdings nur unter anaeroben Bedingungen. Diese sind nur zu realisieren, wenn die O_2 erzeugende Wasserspaltung auf ca. 5% reduziert wird. Um die volle Kapazität von sowohl Wasserspaltung als auch H_2 -Erzeugung unter optimalen Bedingungen simulieren zu können, werden beide Prozesse in der „Biobatterie“ in einen aeroben und einen anaeroben Bereich getrennt (Abb. 3). Im aeroben Bereich wird thermostabiles isoliertes PS2 auf Goldelektroden immobilisiert, im anaeroben Bereich thermostabiles PS1. In beiden Fällen wird der leitende Kontakt zur Elektrodenoberfläche durch ein e-leitendes Osmium-Polymer hergestellt, welches sowohl die Lebenszeit der Photosysteme deutlich verlängert als auch die mit Abstand höchsten bisher gemessenen Photoströme ermöglicht (Badura *et al.* 2011). Wenn jetzt noch die optimale Ankopplung der H_2 ase an PS1 gelingt, haben wir eine perfekte „Biobatterie“ realisiert, welche ähnlich der Elektrolyse aber mit biologischen Katalysatoren Sauerstoff und Wasserstoff erzeugt. Nach Optimierung aller Komponenten ähnlich einem Baukastenprinzip, können mit dieser „Biobatterie“ die maximale Leistungsfähigkeit dieses Systems simuliert und wertvolle Erkenntnisse für die natürliche „Designzelle“ gewonnen werden. Aufgrund der zeitlich beschränkten Lebensdauer insbesondere von PS2, handelt es sich jedoch hier eindeutig um ein Modellsystem zum Testen der einzelnen Komponenten und ihres Potentials.

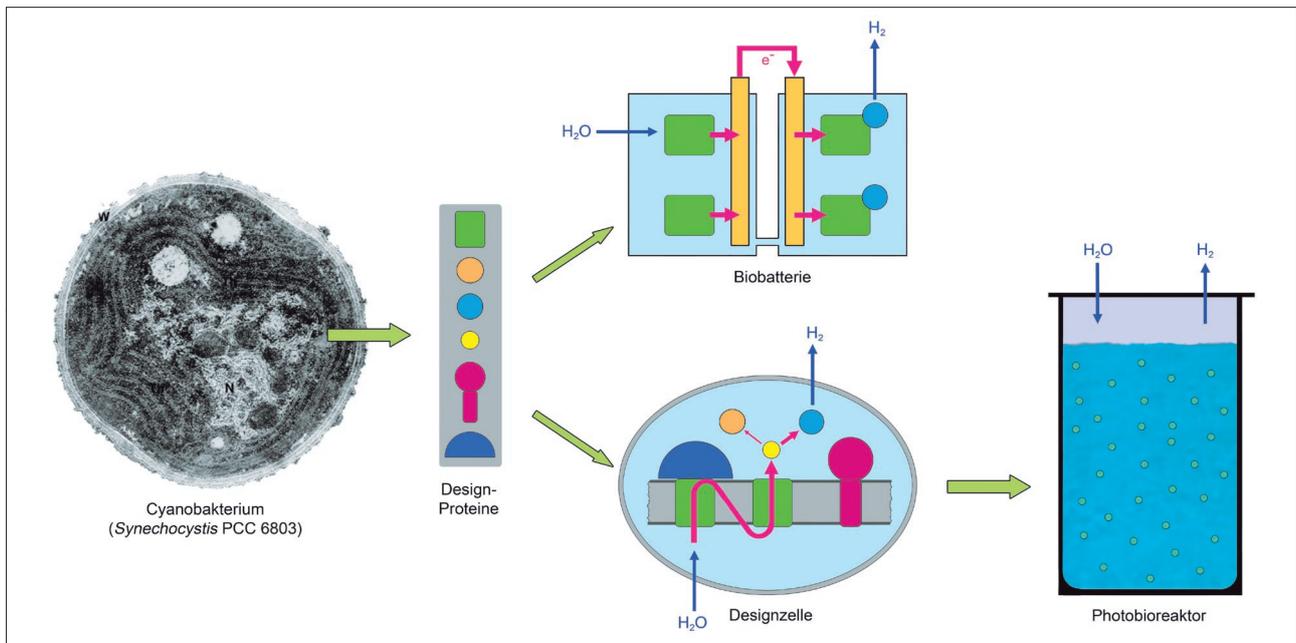


Abbildung 2:

Strategie zur Erzeugung einer wasserstoffproduzierenden „Designzelle“ mit potentieller Anwendung: Zentrale Proteine der Wildtyp-Zelle von *Synechocystis* PCC 6803 werden im Hinblick auf eine optimale Verknüpfung von biologischer Wasserspaltung und Wasserstoffproduktion genetisch verändert und sowohl in einem semiartificialen Minimal-Modellsystem als auch in der schrittweise erzeugten „Designzelle“ getestet und optimiert. Gleichzeitig werden preisgünstige Flachbett-Photobioreaktorsysteme entwickelt, die das Potential für ein Up-scaling zu Großreaktoren haben (Quelle: Matthias Rögner).

Die Realisierung (2): Designzellen & Photobioreaktor

Unser langfristiges Ziel ist die Herstellung einer natürlichen „Designzelle“, die sich selbständig repariert, repliziert und in Massenkultur in geschlossenen Photobioreaktorsystemen gehalten werden kann (Waschewski *et al.* 2010). Abgesehen von Aufwand und Kosten für die „Biobatterie“, ist die Designzelle insbesondere wegen PS2 erforderlich, das eine durchschnittliche Halbwertszeit von nur 30 min hat und ständig „repariert“ werden muss. Dies ist in einem semiartificialen System wie der Biobatterie nicht realisierbar. Das von uns ausgewählte Cyanobakterium *Synechocystis* 6803 muss aus mehreren Gründen für die H_2 -Erzeugung (mittels der O_2 -resistenten Fremdhydrogenase) metabolisch angepasst werden:

- Das System hat zu viele Lichtsammelantennen: Durch Deletion der Cyanobakterien-typischen Phycobilisomen kann eine wesentlich höhere Zelldichte im Photobioreaktor erzielt und das PS2/PS1-Verhältnis sowie der lineare ET um das bis zu 7-fache erhöht werden (Bernat *et al.* 2009).
- Der lineare ET, welcher für die spätere H_2 -Produktion entscheidend ist, kann durch die Verwendung einer ATPase-Mutante mit partieller Entkoppelung verdoppelt werden (Imashimizu *et al.* 2011), ohne dass die Zellen Schaden nehmen.
- Ferredoxin stellt die für die „importierte“ H_2ase benötigten Elektronen zur Verfügung. Durch Erzeugung von FNR-Mutanten mit deutlich geringerer Affinität zu Fd kann ein Großteil der Elektronen – schätzungsweise 75% sind möglich – von Fd auf die H_2ase „umgeleitet“ werden (s. Abb. 4, Fd), was zur Zeit getestet wird.

Diese Beispiele sollen verdeutlichen, dass die zukünftige Designzelle ein großes Potential zur Erhöhung der H_2 -Produktion hat. Einen wesentlichen Anteil hieran (Faktor 10-20) wird die Hydrogenase haben, deren Sauerstofftoleranz z. Zt. über High-Throughput-Screening in Kombination mit „directed evolution“ und anderen genetischen Methoden erhöht wird (AG Photobiotechnologie von Prof. Thomas Happe, s. Abb. 4, H_2ase).

Ein weiterer zentraler Faktor ist das Design und die Herstellung kostengünstiger Photobioreaktoren und deren kontinuierlicher Betrieb unter konstanten Bedingungen. In Zusammenarbeit mit der Fa. KSD (Hattingen) konnten wir einen 5 L-Flachbettreaktor entwickeln, der sich durch optimalen Lichteintrag und geringe Herstellungskosten auszeichnet. Ein hierfür entwickeltes automatisches Steuersystem ermöglichte bereits ein über 9-monatiges kontinuierliches Wachstum einer Kultur unter gleichbleibenden Bedingungen.

Ausblick & Potenzial

Das Potenzial des Flachbett-PBR, verbunden mit dem kontinuierlichen Verfahren, wurde inzwischen auf einen 100 L-Flachbettreaktor übertragen, der sich in der Erprobung befindet. Die iterative Verbesserung von Designzelle, PBR und Prozesssteuerung wird zeigen, ob wir unser ehrgeiziges Ziel erreichen, Biowasserstoff zu einem marktfähigen Preis herzustellen. Parallel hierzu eröffnen unsere Untersuchungen wichtige prinzipielle Einsichten

in die „Systembiologie der biologischen Energieerzeugung“, etwa in die Frage, ob Bakterien als direkte Energielieferanten ohne den energetisch verlustreichen Umweg über die Biomasse dienen können und wie die Stoff- und Energiebilanz phototropher Zellen aussieht, wenn man ihnen durch Dauerbelichtung langfristig die Nachtruhe raubt.

Steckbrief Forschungsprojekt:

Projektname: Design natürlicher Systeme zur lichtgetriebenen H₂-Produktion: Von molekularen zu Massenfermentationssystemen (Akronym: „H₂-Designzellen“).

Koordinator: Matthias Rögner

Referenzen:

Badura, A., Kothe, T., Schuhmann, W. & Rögner, M. (2011) Wiring photosynthetic enzymes to electrodes; *Energy Environ. Sci.* 4, 3263-3274

Bernat, G., Waschewski, N. & Rögner, M. (2009) Towards efficient hydrogen production: the impact of antenna size and external factors on electron transport dynamics in *Synechocystis* PCC 6803;

Photosynth. Res. 99, 205-216

Imashimizu, M., Bernat, G., Isato, K., Broekmans, M., Konno, H., Sunamura, E.-I., Rögner, M., Hisabori, T. (2011) Regulation of F₀F₁-ATPase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 by the γ and ϵ subunits is significant for light/dark adaptation; *J. Biol. Chem.* 286, 26595-26602

Waschewski, N., Bernat, G. & Rögner, M. (2010) Engineering photosynthesis for H₂ production from H₂O: Cyanobacteria as design organisms; in: „Biomass to Biofuels – Strategies for Global Industries“ (Vertes, A., Qureshi, N., Yukawa, H., Blaschek, H.P. eds.) John Wiley & Sons, Chichester, UK, p. 387-401

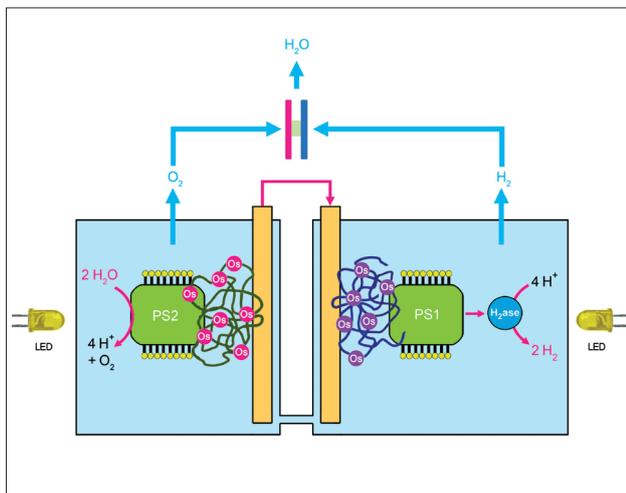
Kontakt:

Prof. Dr. Matthias Rögner

Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen
Fakultät für Biologie & Biotechnologie
Ruhr-Universität Bochum
matthias.roegner@rub.de

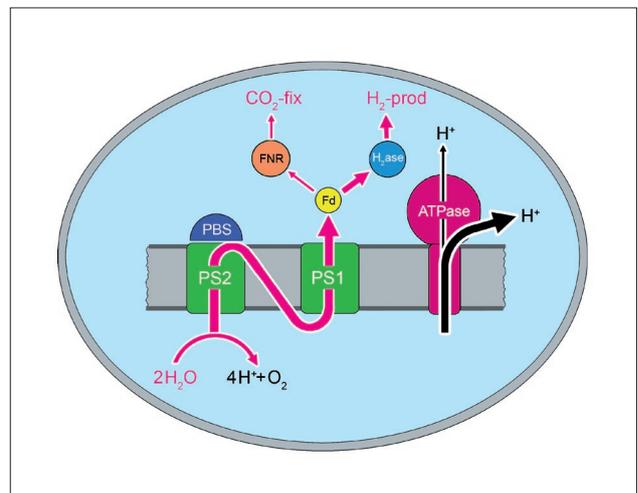
www.bpf.ruhr-uni-bochum.de

Abbildung 3:



„Biobatterie“ als semiatifizielles Minimalsystem zur Optimierung der Elektronentransportprozesse der zukünftigen „Designzelle“: Der wasserspaltende, sauerstoffentwickelnde Bereich mit PS2 (linke Halbzelle, aerobe Bedingungen) ist räumlich getrennt vom wasserstofferzeugenden, sauerstoffempfindlichen Teil mit der Hydrogenase (rechte Halbzelle, anaerober Bereich). Der optimale Kontakt der beiden Photosysteme zur Goldelektrode wird durch leitende Osmiumpolymere in beiden Halbzellen erreicht (Quelle: Matthias Rögner).

Abbildung 4:



Zukünftige „Designzelle“ mit Komponenten, die im Hinblick auf eine erhöhte Biowasserstoffproduktion angepasst werden müssen: Mengenverhältnis der Photosysteme (PS1, PS2), Phycobilisomenantenne (PBS), partielle Entkopplung der ATPase, Elektronenübertragung von Ferredoxin (Fd) auf die Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase (FNR) sowie die Hydrogenase (H₂ase) (Quelle: Matthias Rögner).