(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. März 2012 (15.03.2012)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2012/032109 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
C12M 1/00 (2006.01) *C12P 5/02* (2006.01)
C12M 1/113 (2006.01) *C12N 9/02* (2006.01)
C12M 1/12 (2006.01) *C12R 1/89* (2006.01)
C12M 1/18 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2011/065536

(22) Internationales Anmeldedatum:
8. September 2011 (08.09.2011)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2010 040 440.3
8. September 2010 (08.09.2010) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **UNIVERSITÄT LEIPZIG** [DE/DE]; Ritterstraße 26, 04109 Leipzig (DE). **SÄCHSISCHES INSTITUT FÜR ANGEWANDTE BIOTECHNOLOGIE AN DER UNIVERSITÄT LEIPZIG E.V.** [DE/DE]; Permoserstraße 15, 04318 Leipzig (DE). **KARLSRUHER INSTITUT FÜR TECHNOLOGIE** [DE/DE]; Kaiserstraße 12, 76131 Karlsruhe (DE). **UNIVERSITÄT BREMEN** [DE/DE]; Bibliothekstraße 1, 28359 Bremen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **WILHELM, Christian** [DE/DE]; Brunnenweg 6, 04103 Leipzig (DE). **POSTEN, Clemens** [DE/DE]; Kronenstraße 13, 76131 Karlsruhe (DE). **RÄBIGER, Norbert** [DE/DE]; Am Jantzen Park 14, 28359 Bremen (DE).

(74) Anwälte: **KAILUWEIT, Frank** et al.; Kailuweit & Uhlemann, Bamberger Str. 49, 01187 Dresden (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe g)*

(54) **Title**: METHOD AND FACILITY FOR PRODUCING METHANE IN A PHOTOBIOREACTOR

(54) **Bezeichnung** : VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR HERSTELLUNG VON METHAN IN EINEM PHOTOBIOREAKTOR

(57) **Abstract**: The invention relates to a method for producing methane by culturing algae and methanogenic microorganisms, and to a facility for carrying out the process. The essence of the invention is a photobioreactor which directly generates methane from two zones composed of sunlight and an oxygen-enriched and carbon-dioxide-depleted gas mixture. The reaction is carried out in two sub steps which take place in two different zones. In the first, aerobic part, glycolate is synthesized in algal cells by photosynthesis, and this glycolate is excreted by the cells. The algae form a biofilm on a support material, which biofilm is firstly supplied by nutrients with the aid of a continuous or semicontinuous stream of liquid and secondly transfers the excreted glycolate into the second zone. This compartment is anaerobic due to an oxygen-impermeable membrane and comprises methanogenic bacteria, which directly convert the introduced glycolate into methane.

(57) **Zusammenfassung**: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Methan durch Kultivierung von Algen und methanogenen Mikroorganismen und eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens. Das Wesen der Erfindung besteht in einem Photobioreaktor, der aus zwei Zonen bestehend aus Sonnenlicht und einem sauerstoffangereichertem und kohlendioxid-abgereichertem Gasgemisch direkt Methan erzeugt. Die Reaktion erfolgt in zwei Teilschritten, die in zwei verschiedene Bereiche verlagert sind. Im ersten aeroben Abschnitt erfolgt mit Hilfe der Photosynthese in Algenzellen die Synthese von Glykolat, das von den Zellen ausgeschieden wird. Die Algen bilden auf einem Trägermaterial einen Biofilm, der mit Hilfe eines kontinuierlichen bzw. semi-kontinuierlichen Flüssigkeitsstromes einerseits mit Nährstoffen versorgt wird und andererseits das ausgeschiedene Glykolat in die zweite Zone transferiert. Dieses Kompartiment ist durch eine sauerstoffundurchlässige Membran anaerob und enthält methanogene Bakterien. Diese setzen das eingeschleuste Glykolat direkt zu Methan um.

WO 2012/032109 A2

Verfahren und Vorrichtung zur Herstellung von Methan in einem Photobioreaktor

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Methan durch Kultivierung von Algen und methanogenen Mikroorganismen und eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens.

Die Nachfrage nach nachwachsenden Rohstoffen wird mittelfristig, und vor allem langfristig, steigen. Grund dafür ist neben der nicht langfristig gesicherten Verfügbarkeit fossiler Brennstoffe vor allem die Belastbarkeit der Atmosphäre mit dem Verbrennungsprodukt Kohlendioxid (CO_2). Technologien, die CO_2 entweder einsparen oder aus der Atmosphäre entfernen, bilden die Grundlage für zukunftssichere Wertstoffproduktion. In diesem Zusammenhang hat in den letzten Jahren die Algenbiotechnologie weltweit an Bedeutung gewonnen. Der Grund dafür liegt darin, dass Algen eine wesentlich höhere Produktivität pro Fläche aufweisen als landwirtschaftliche Nutzpflanzen. Dies wird aus der Aufstellung von Dismukes (2008) wie folgt deutlich.

	Mais	Zuckerrohr	Präriegras	Raps-samen	*Tetraselmis suecica* Phytoplankton	*Arthrospira* (Spirulina) Blaualge
Ertragsfähigkeit (t/ha pro Jahr)	7	73-87	3,6-15	2,7	38-69	27-70
Ertragsfähigkeit je Energieeinheit (GJ/ha pro Jahr)	120	1230-1460	61-255	73	700-1 550	550-1 435
Leicht abbaubare Kohlenhydrate (%)	70	30	4,5-11,5		11-47	15-50
Lipide (%)	4,5-6	13	1-1,6	42	15-23	5-13
Protein (%)	6-12				28-68	27-72
Wasserverbrauch (L/kg Trockengew.)	565	89-118	50	3390	310-570	
Wasserverbrauch je Energieeinheit (L/MJ)	33	5-7	3	200	18-34	

Die in Deutschland kultivierbaren Energiepflanzen Mais und Raps zeigen gegenüber Algen deutliche Nachteile: Der Wasserverbrauch pro geernteter Energiemenge ist bei Mais zwar ähnlich wie bei der Mikroalge *Tetraselmis*, aber der Mengenertrag je Fläche beträgt nur

etwa ein Fünftel. Nimmt man den in der Praxis erzielten Flächenertrag der Algengroßproduktionsanlage in Klötze (Sachsen-Anhalt), der bei ca. 50 t (Trockensubstanz) pro ha liegt, und die Spitzenerträge bei Mais mit ca. 8-9 t (Trockensubstanz) pro ha, kann man mit Algen eine ca. 8-fache Ertragssteigerung erzielen. Beim Ölsamenträger Raps ist die Situation noch ungünstiger: Der Wasserbedarf ist ca. 10 mal höher und die Erträge sind bei einem zwischen 2-4 t je ha schwankenden Flächenertrag ca. 15 mal niedriger. Selbst diese landwirtschaftlichen Erträge sind nur auf guten und nach „best-practice" bewirtschafteten Flächen bei guter Witterung zu erzielen. Die Klimaprognosen sagen allerdings voraus, dass sommerliche Trockenperioden und warme schneefreie Winter an Häufigkeit zunehmen und damit das Risiko von Ernteausfällen steigt.

Der Vorteil von Algenkulturen besteht darin, dass die Anlagen auf landwirtschaftlich völlig wertlosen und sogar auf versiegelten Flächen aufgebaut werden können. Auch die Versorgung mit Dünger ist über vorbehandeltes Abwasser möglich und lässt bei intelligenter Prozessführung erwarten, dass der Wasserbedarf nur in sehr geringem Umfang aus Regen- oder Grundwasser gedeckt werden muss.

Allerdings wird die heutige algenbasierte Photoreaktortechnologie durch folgende Beschränkungen limitiert.

a) Hohe Investitionskosten. Alle zur Zeit verfolgten technischen Konzepte beruhen auf Suspensionskulturen. Diese können entweder „offen" als Ponds oder „geschlossen" in Kunststoff- oder Glasbehältern durchgeführt werden. Offene Systeme haben zwar den Vorteil geringerer Investitionskosten, sie sind allerdings deutlich weniger leistungsfähig und können nur mit natürlichen Arten betrieben werden. Außerdem besteht die Gefahr von Kontaminationen, da sich im Aerosol aerophytische Algen befinden. Geschlossene Anlagen erzeugen hohe Investitions- und Betriebskosten, da die Algensuspensionen in flachen Kollektoren bewegt werden müssen. Das erfordert dichte Kunststoff- oder Glasbehälter, die auf Metallgerüsten installiert werden müssen.

b) Aufgrund des Lichtbedarfs und der hohen Eigenabsorption der Zellen kann man pro Einheit Produktionsvolumen den Biomasseanteil nur gering halten. Die maximale Dichte wird mit 40 g Feuchtgewicht pro Liter angegeben. Auf Kohlenstoff bezogen beträgt die Biomassekonzentration pro Volumen ca. 0,4 %, in den meisten Produktionsanlagen ist sie sogar geringer. Eine weitere Erhöhung

ist aus Gründen der Reaktorsteuerung (Entsorgung des Sauerstoffs, Versorgung mit CO_2, Lichtdurchlässigkeit) nicht möglich. Die Algensuspensionen müssen daher beständig umgepumpt, gerührt oder stark begast werden. Berechnet man die CO_2-Emission, die bei der Herstellung des Stroms für den Pumpenbetrieb entstanden ist, werden schon 50 % des von Algen fixierten Kohlendioxids verbraucht.

c) Der Ernteprozess erfolgt über Druckfiltration (z. T. über Zentrifugation, was noch ungünstiger ist). Auch die hierfür notwendige elektrische Energie ist bedeutsam und reduziert die energetische Wirksamkeit um weitere 15-20 %.

d) Es liegen bislang keine überzeugenden Refinementkonzepte vor, wie die Algenbiomasse in energetische oder stoffliche Massenwertstoffe überführt werden kann. Die heute marktfähigen Produkte aus Algen sind hochpreisige Produkte, wie Nahrungsergänzungsstoffe, Vitamine oder Lebensmittelfarbstoffe wie z. B. Carotinoide. Die direkte Überführung der Algen in Biogasanlagen ist zwar technisch möglich, allerdings ist das Biogas durch einen hohen Anteil an Ammoniak und Schwefelwasserstoff giftig und verlangt eine aufwendige Gasreinigung, die nur bei sehr großen Anlagen wirtschaftlich ist. Zur Zeit wird daher keine Biogasanlage ausschließlich mit Algen als Substrat betrieben.

Aus der DE 10 2007 031 688 A1 ist ein Verfahren zur biologischen Erzeugung von Methan bekannt, bei dem in einem ersten Schritt durch Algen unter Lichteinwirkung zunächst Wasserstoff und Sauerstoff aus Kohlendioxid und Wasser erzeugt wird und in einem zweiten Schritt durch Methanogenese-Bakterien Methan aus dem erzeugten Wasserstoff und aus Kohlendioxid gewonnen wird. Das Verfahren hat den Nachteil, dass die Algen im Licht Sauerstoff bilden, der in den Zellen die Wasserstoffsynthese hemmt. Die Zellen bilden im Licht unter aeroben Bedingungen Stärke und diese wird dann im Dunkeln unter anaeroben Bedingungen abgebaut. Die dabei freiwerdenden Elektronen werden in Abwesenheit von Sauerstoff als Wasserstoff freigesetzt. Diesen Vorgang nennt man Photofermentation. Die energetische Gesamteffizienz ist aber sehr gering. Schon bei der Stärkesynthese beträgt unter den natürlichen Lichtbedingungen der Wirkungsgrad nur maximal 12 – 14 %. Die Umwandlung der in der Stärke gespeicherten Energie in Wasserstoff erfolgt bei aktuellem Forschungsstand zu maximal 5 %. Daraus ergibt sich ein Gesamtwirkungsgrad von 0,07 %. Zwar wird an der Verbesserung dieser Reaktion gearbeitet, aber hier sind noch keine Durchbrüche erkennbar. In der in der

DE 10 2007 031 688 A1 beschriebenen Lösung kann man mit einem Wirkungsgrad von bestenfalls 0,04 % rechnen.

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, ein verbessertes Verfahren zur Herstellung von Methan in einem Photobioreaktor und eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens anzugeben. Insbesondere soll der Wirkungsgrad, d. h. die Methanausbeute bezogen auf die Energie des eingestrahlten Lichts, erhöht werden.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe durch das im Anspruch 1 beschriebene Verfahren gelöst. Die im Anspruch 7 beschriebene Vorrichtung und die in Anspruch 12 beschriebenen Mikroorganismen eignen sich besonders gut zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Die Erfindung erlaubt es mittels photosynthetisch aktiven Mikroorganismen, bevorzugt einem Algenbiofilm, und mit Hilfe der Photosynthese einen Metaboliten zu bilden, der ausgeschieden wird und nach Durchtritt durch eine Trennzone unter anaeroben Bedingungen zu Methan umgesetzt wird. Damit wird eine Methanproduktion während der Anwesenheit von Licht ermöglicht. Durch die Ausscheidung des Metaboliten wird erreicht, dass Produktionslimitierungen durch den Algenstoffwechsel weitgehend umgangen werden können.

Der Erfindung liegt die im Folgenden dargestellte wissenschaftliche Erkenntnis zugrunde.

Die Primärreaktionen der Photosynthese (Photolyse des Wassers, Erzeugung von Reduktions- und Energieäquivalenten) haben einen Wirkungsgrad von ca. 80 %. Danach setzen enzymatische Reaktionen der Zuckersynthese und der anschließenden Verstoffwechselung des Zuckers in die Zellbausteine ein. Jede enzymatische Reaktion ist mit einer Entropiezunahme verbunden, die die Energiewandlungseffizienz vom Photon in das technische Produkt mindert (Langner et. al 2009). Je höher die Zahl der stofflichen Umwandlungen in der Zelle ist, desto höher sind die energetischen Verluste, die man als „metabolische Kosten“ zusammenfassen kann. Unter optimalen Bedingungen werden maximal 14 % der absorbierten Energie in der Biomasse gespeichert, während der restliche Energiebetrag während der Photoperiode verloren geht. Damit wird eine kontinuierliche Methanproduktion ermöglicht. Neuere Arbeiten, die bei Algen komplette Energiebilanzen

nach Teilreaktionen aufgeschlüsselt haben, zeigen, dass nicht die Photosynthese in ihren Primärreaktionen, sondern die Effizienz des Stoffwechsels, der zur neuen Biomasse führt, die Gesamteffizienz mindert. Damit kann man aus der Energetik der Stoffwechselwege ableiten, dass eine drastische Steigerung der bioenergetischen Nutzung der mikrobiellen Photosynthese nur möglich ist, wenn man den assimilierten Kohlenstoff möglichst früh den Zellen entzieht und statt der neuen Biomasse die Exkretionsprodukte, die keinem weiteren Stoffwechsel mehr unterliegen, für die Erzeugung von „Biofuels" nutzt. Die Zellen sollten im optimalen Fall nur soviel von ihrem Kohlenstoff zurückhalten, wie für die Aufrechterhaltung des Grundstoffwechsels erforderlich ist. Im Idealfall wachsen die Algen nicht. Substantielle Effizienzfortschritte lassen sich bei der Herstellung von Biokraftstoffen aus Algen also nur dann erreichen, wenn man den mittels Photosynthese hergestellten organischen Kohlenstoff nicht für die Gewinnung von Biomasse benutzt, sondern ein „frühes" Produkt der Photosynthese aus der Zelle entfernt und dieses weiter biologisch zu einem Wertstoff umsetzt. Ideal wäre daher eine biologisch aktive Oberfläche, die nicht wächst, sondern aus CO_2 und Wasser eine reduzierte, optimalerweise gasförmige Substanz wie Methan bildet.

Dieser neue Ansatz zielt nicht auf die Produktion von Biomasse, sondern auf die limitierte Ernährung von Algen als Verbraucher von CO_2 mit gekoppelter Produktion von CH_4 und ermöglicht neben der Erzeugung von Energie eine Verbesserung der Umweltsituation.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Methan sowie ein Photobioreaktor, der aus zwei Zonen (Kompartimenten) besteht. Im Photobioreaktor wird durch die Einwirkung von Sonnenlicht aus einem sauerstoffangereichertem und kohlendioxid-abgereichertem Gasgemisch Methan erzeugt.
Die Reaktion erfolgt in zwei Teilschritten, die in zwei verschiedene Kompartimente verlagert sind. Im ersten Kompartiment (aerobes Kompartiment) erfolgt mit Hilfe der bei der Photosynthese in Algenzellen (oder andere photosynthetisch aktive Mikroorganismen) auftretenden Photorespiration die Synthese von Glykolat (auch Glycolat), das von den Zellen ausgeschieden wird. Die photosynthetisch aktiven Mikroorganismen bilden bevorzugt auf einem Trägermaterial eine Beschichtung. Mit Hilfe eines kontinuierlichen bzw. semi-kontinuierlichen Flüssigkeitsstromes werden die photosynthetisch aktiven Mikroorganismen einerseits mit Nährstoffen versorgt und andererseits das ausgeschiedene Glykolat in das zweite Kompartiment (anaerobes Kompartiment) transferiert. Dieses

anaerobe Kompartiment ist durch ein Trennmodul, bevorzugt eine sauerstoffundurchlässige Membran, von dem aeroben Kompartiment abgetrennt. Das zweite Kompartiment ist anaerob und enthält methanogene Mikroorganismen. Die methanogenen Mikroorganismen setzen das eingeschleuste Glykolat direkt zu Methan um. Das gebildete Biogas besteht ausschließlich aus Methan und Kohlendioxid in einem Verhältnis von 3:5. Durch einen Waschvorgang wird das CO_2 entfernt. Das auf diese Weise erhaltene CO_2 wird bevorzugt zusammen mit dem im ersten Kompartiment gebildeten und dort oder in der Strippingkammer abgeführten Sauerstoff als Nährgas zum Kompartiment 1 zurückgeführt. Das so erhaltene Methan ist direkt ohne weitere Aufarbeitung verwendbar. Vorteilhaft ist, dass der Gehalt an störenden Stickstoffverbindungen (insbesondere Stickoxide, NH_3) und Schwefelverbindungen (insbesondere H_2S) geringer als 1 % ist, bevorzugt unter 0,1 %, ist.

Auch wenn als Ergebnis des erfindungsgemäßen Verfahrens ein Gemisch aus Methan und Kohlendioxid gebildet wird, so wird doch im Gesamtergebnis durch das erfindungsgemäße Verfahren unter CO_2-Verbrauch CH_4 hergestellt.

Die formale Reaktionsgleichung des Gesamtprozesses lautet:

$$1\ CO_2 + 2\ H_20 \longrightarrow CH_4 + 2\ O_2 \qquad \text{(Gleichung 1)}$$

Vorteilhaft handelt es sich bei dem erfindungsgemäßen Verfahren um eine reine Kohlenwasserstofftechnologie. Es werden weder Stickstoff- noch Phosphorverbindungen als Nährstoffe benötigt.

Da im erfindungsgemäßen Verfahren der fixierte Kohlenstoff nur in sehr geringem Umfang über eine Vielzahl von Enzymen im Stoffwechsel der photosynthetisch aktiven Mikroorganismen und methanogenen Mikroorganismen in komplexe Makromoleküle, wie Protein, Stärke und Fette umgewandelt werden muss, sind die Verluste durch den Stoffwechsel gering. Im erfindungsgemäßen Verfahren lässt sich vorteilhaft mit einer mindestens 20 % und bis zu 25 %, bevorzugt 30 %igen photosynthetischen Effizienz der Lichtenergie Glykolat herstellen. Da bei dem Fermentationsprozess ebenfalls der Energieverlust relativ gering ist, weist das erfindungsgemäße Verfahren einen

Gesamtwirkungsgrad von 15 %, bevorzugt 20 % bis 25 % auf. Dies ist gegenüber herkömmlichen Technologien eine Steigerung um eine Zehnerpotenz.

Das Wachstum der photosynthetisch aktiven Mikroorganismen wird im erfindungsgemäßen Verfahren auf ein Minimum reduziert bzw. ganz eingestellt. Daher werden die photosynthetisch aktiven Mikroorganismen im erfindungsgemäßen Verfahren nicht gedüngt, d. h. der Flüssigkeitsstrom, der die photosynthetisch aktiven Mikroorganismen versorgt, enthält bevorzugt keine Stickstoff- und/oder Phosphorquelle.

Bevorzugt wird im erfindungsgemäßen Verfahren der Anteil des ausgeschiedenen Glykolats durch unterschiedlichste Maßnahmen erhöht.
Dies geschieht bevorzugt, in dem die photosynthetisch aktiven Mikroorganismen bei nicht photorespiratorischen Bedingungen kultiviert werden. Dazu wird mit einer Gasmischeinrichtung das Verhältnis CO_2 zu O_2 in der Gaszusammensetzung, mit dem die photosynthetisch aktiven Mikroorganismen versorgt wird („Nährgas“) eingestellt. Der CO_2-Gehalt des Gases beträgt vorzugsweise maximal ein 1/500, weiter bevorzugt maximal 1/1000 des Sauerstoffgehalts bezogen auf die Volumenanteile. Besonders bevorzugt beträgt das Verhältnis CO_2 zu O_2 in der Gaszusammensetzung 1 zu 1500 bis 1 zu 2000 bezogen auf die Volumenanteile.

Durch die Reduktion des CO_2-Gehalts und die Erhöhung des Sauerstoffgehalts des im Nährgas wird vorteilhaft die Oxygenaseaktivität der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase (RUBISCO, EC 4.1.1.39) und damit die Glykolatproduktion gesteigert.

Zusätzlich oder alternativ zu der Einstellung des CO_2/O_2-Verhältnisses wird in der Erfindung bevorzugt die Glykolatproduktion durch weitere Maßnahmen gesteigert, die Glykolatmetabolisierung reduziert und/oder die Glykolatausscheidung erhöht.

Die Reduktion der Glykolatmetabolisierung geschieht entweder durch Einsatz von unspezifischen Inhibitoren (wie z. B. Isoniazid) oder bevorzugt durch gezielte Inhibition der Glykolatdehydrogenase und/oder Glykolatoxidase. Die gezielte zellinterne Inhibition erfolgt beispielsweise durch small hairpin RNA (shRNA) oder small interference RNA (siRNA). Durch die wie oben durchgeführte Inhibition kann vorteilhaft die

Glykolatmetabolisierung der photosynthetisch aktiven Mikroorganismen, insbesondere Algen, weitestgehend unterbunden werden.

Alternativ oder bevorzugt zusätzlich erfolgt in den photosynthetisch aktiven Mikroorganismen eine Überexpression der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase (RUBISCO, EC 4.1.1.39) und/oder der Glykolatphosphat-Phosphatase (EC 3,1,3,18), wodurch die Glykolatproduktion gesteigert wird. Besonders bevorzugt erfolgt eine Überexpression der RUBISCO vom Typ II. Diese hat vorteilhaft eine höhere Umsatzrate als die natürlicherweise in Algen und Cyanobakterien enthaltene RUBISCO vom Typ I.

Alternativ oder bevorzugt zusätzlich wird die Glykolatausscheidung gesteigert, in dem in die photosynthetisch aktiven Mikroorganismen ein für einen Glykolattransporters codierenden Gens einkloniert wird. Das für den Glykolattransporter codierende Gen enthält Targetsequenzen, welche dafür sorgen, dass der Glykolattransporter in die Zytoplasmamembran und/oder die Membran der Chloroplasten getarget wird.

Alternativ oder bevorzugt zusätzlich wird in den photosynthetisch aktiven Mikroorganismen der Kohlenstoffkonzentrierungsmechanismus (engl. „carbon concentrating mechanism“ abgekürzt CCM) inaktiviert. Der Kohlenstoffkonzentrierungsmechanismus unterstützt die Fixierung von anorganischem Kohlenstoff (CO_2 oder HCO_3^-) und variiert von Organismus zu Organismus. Häufig schließt der CCM eine externe oder intrazelluläre Carboanhydrase und einen Kohlenstofftransporter für anorganischen Kohlenstoff ein. Der CCM erhöht die CO_2-Konzentration in Pyrenoiden (Algen) bzw. Carboxysomen (Cyanobakterien) um die RUBISCO und schließt meist eine Carboanhydrase ein, die HCO_3^- produziert. Durch den Kohlenstofftransporter wird der anorganische Kohlenstoff (meist Hydrogencarbonat) dann in die Carboxysomen bzw. Pyrenoiden gepumpt. CCM in Algen sind bekannt u. a. in Giordano M et al. 2005 beschrieben, welches hier ausdrücklich als Referenz einbezogen wird. Der CCM wird bevorzugt durch genetische Inaktivierung der Carboanhydrase und/oder den Kohlenstofftransporter inaktiviert. Ebenso sind Algen bekannt, den ein CCM fehlt. Hier sei beispielhaft auf Raven JA et al. 2005 verwiesen, welches hier ebenfalls ausdrücklich als Referenz einbezogen wird.

Vorteilhaft können die wie oben beschriebenen transgenen photosynthetisch aktiven Mikroorganismen auch bei einem CO_2/O_2-Verhältnisses, welches der normalen Luft entspricht oder sogar mehr CO_2 enthält, kultiviert werden. Bei Überexpression der RUBISCO vom Typ II ist das Verhältnis CO_2 zu O_2 in der Gaszusammensetzung bevorzugt höher als in der normalen Luft.

Gegenstand der Erfindung sind auch wie oben beschrieben genetisch veränderte photosynthetisch aktive Mikroorganismen, insbesondere Algen.

Die photosynthetisch aktiven Mikroorganismen sind vorzugsweise biofilmbildende Algen, bevorzugt der Gattungen Chlamydomonas, Chlorella, Apathococcus, Chlorokybus, Stichococcus, Nannochloris, Trebouxia, Keratococcus, Pseudococcomyxa.

Bevorzugt werden im erfindungsgemäßen Verfahren photosynthetisch aktive Mikroorganismen, bevorzugt Algen der oben genannten Gattungen, mit verminderter Aktivität der Glykolatdehydrogenase und/oder Glykolatoxidase eingesetzt. Dazu werden photosynthetisch aktive Mikroorganismen selektiert, die eine verminderte Aktivität der Glykolatdehydrogenase und/oder Glykolatoxidase aufweisen oder es erfolgt eine Inhibition der Glykolatdehydrogenase und/oder Glykolatoxidase wie oben beschrieben.

Die Methanproduktion erfolgt unter anaeroben Bedingungen durch methanogene Mikroorganismen, die Glykolat als Substrat in CO_2 und CH_4 umsetzen. Dabei wird ein molares Verhältnis CO_2 zu CH_4 von 5:3 erzielt. Besonders bevorzugt werden Mikroorganismen der Gattung Synthrophospora oder mittels Glykolatselektion (bevorzugt Glykolat als einzigem Substrat) erzeugte Mischpopulationen aus konventionellen Gärsümpfen oder Biogasanlagen für die Methanogenese genutzt.

Im erfindungsgemäßen Verfahren fließen zwei Gasströme:

1. der erste sauerstoff- und kohlendioxidhaltige Gasstrom, der im aeroben Kompartiment an O_2 angereichert und CO_2 abgereichert wird und
2. im anaeroben Kompartiment der zweite Gasstrom (Methan und CO_2), der das Methan aus dem Kompartiment mit den methanogenen Mikroorganismen abführt.

In der Nettobilanz wird im erfindungsgemäßen Verfahren aus CO_2 und Wasser Methan und Sauerstoff gebildet.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung (Photobioreaktor) besteht aus drei Bauteilen (Modulen):

1. Ein Photosynthesemodul mit dem erstem, aeroben Kompartiment,
2. Ein Trennmodul mit einer sauerstoffundurchlässigen Membran,
3. Ein Methanogenesemodul mit dem zweiten, anaeroben Kompartiment.

Vorteilhaft kann der erfindungsgemäße Photobioreaktor in einer in der Form eines Plattenreaktor ausgestaltet werden und wie herkömmliche Solarmodule z. B. auf Hausdächern oder auch Hausaußenwänden montiert werden. Einzelne Photobioreaktoren können bezüglich der Flüsigkeits- und Gasversorgung parallel oder auch in Reihe geschaltet werden. Bevorzugt ist eine flächige Ausfertigung der Vorrichtung - alternativ wird die Vorrichtung in zylindrischen oder halbzylindrischen Geometrien ausgestaltet. Die einzelnen Zonen (Kompartimente) sind bevorzugt als Dünnschichtkammern ausgestaltet.

Beide Zonen bzw. Kammern verfügen je über Anschlüsse zur Versorgung, d. h. Nährstoffzufuhr und Flüssigkeit (Algen und Mikroorganismen), CO_2 O_2, zum Abtransport von Beiprodukten (Überschussschlamm, Flüssigkeit) und zur Entgasung und Produktgewinn, (CO_2, O_2, CH_4,) gemäß Abschnitt 6. Das Material zur Ausfertigung dieser technischen Einrichtung muss sich an den hier gestellten Ansprüchen orientieren und kann daher als solide Ausfertigung (Glas, Metall, Kunststoff) oder auch mittels Folien ausgeführt werden.

Die Gasabfuhr vom anaeroben Kompartiment ist bevorzugt mit einer Gaswascheinrichtung verbunden, welche die Abtrennung des CO_2 aus dem gebildeten Biogas erlaubt.

Bevorzugt ist die Gaszufuhr zum aeroben Kompartiment mit einer Gasmischeinrichtung verbunden, welche die Einstellung des gewünschten CO_2/O_2-Verhältnisses erlaubt. Die Gasmischeinrichtung wird einerseits bevorzugt durch Luftsauerstoff und/oder aus dem aeroben Kompartiment abgeführten Sauerstoff, sowie aus dem anaeroben Kompartiment

abgeführten CO_2 gespeist. Bevorzugt ist dazu die Gasmischeinrichtung mit der Gasabfuhr des aeroben Kompartiment sowie mit der Gaswascheinrichtung verbunden.

Aufbau und Funktionsweise des Photobioreaktors sowie der Verfahrensablauf werden anhand dieser Module und den Abbildungen 1 bis 6 näher erläutert:

1. Der Photosynthesemodul

Photosynthetisch aktive Mikroorganismen, bevorzugt Mikroalgen, wie z. B. *Chlorella fusca* oder auch *Chlamydomonas reinhardtii*, können sowohl in Suspension als auch als Biofilme wachsen. Biofilmbildende Algen zeichnen sich durch hohe Resistenz gegenüber Licht-, Temperatur- und Trockenheitsstress aus. Zur Beschichtung des Trägermaterials werden daher bevorzugt Biofilmbildende Algen eingesetzt. Alternativ werden die photosynthetisch aktiven Mikroorganismen, bevorzugt Algen, in einer Matrix (z. B. Biopolymere wie Alginat, Chitosan, Agar) immobilisiert. Insbesondere im Falle der biofilmbildenden Algen dient die zur Abtrennung der beiden Kompartimente verwendete Membran (oder genauer deren zum aeroben Kompartiment zugewandte Seite - Retentatseite) als Trägermaterial für die Algen bzw. den Algenbiofilm. Alternativ liegt auf der Membran (oder genauer deren zum aeroben Kompartiment zugewandte Seite) ein Trägermaterial, bevorzugt ein Faser-Vlies oder eine Matrix (z. B. aus den oben genannten Biopolymeren) auf, in dem oder auf dem die Algen immobilisiert sind.
Die der Licht zugewandte Seite des aeroben Kompartiments ist aus lichtdurchlässigem Material. Der aerobe Kompartiment ist bevorzugt als Kammer ausgestaltet, die neben einer Vertiefung für die Aufnahme von Nährmedium eine Gaszufuhr und Gasabfuhr enthält, die so angebracht sind, dass das Gas über das Trägermaterial strömt. Die Gaszufuhr erfolgt bevorzugt kontinuierlich. Die Flüssigkeitszufuhr erfolgt entweder über die Gasabfuhr oder -zufuhrstutzen – alternativ enthält das Kompartiment dafür einen gesonderten Stutzen oder einen abnehmbaren Deckel. Die Flüssigkeitszufuhr erfolgt bevorzugt ebenfalls kontinuierlich.

Die Biomasse an photosynthetisch aktiven Mikroorganismen wird bevorzugt in einer Menge aufgebracht, die je nach Zelltyp aus so vielen Lagen besteht, dass etwa 90 % der photosynthetisch aktiven Strahlung absorbiert werden. Bevorzugt hat die Biomasseschicht eine Dicke unter 5 mm. Diese Biomasse kann entweder durch Aufwuchs oder durch

Beschichtung aus vorkultivierten photosynthetisch aktiven Mikroorganismen, insbesondere Algen, erfolgen.

Vorbereitung:
Das Trägermaterial (ggf. die Membran) wird vor der Inbetriebnahme bzw. ggf. vor Montage der Verfahrensapparatur mit photosynthetisch aktiven Mikroorganismen (bevorzugt Algen gemäß der oben aufgeführten Spezies beschichtet), so dass diese bevorzugt einen Biofilm oder Beschichtung in geeigneter Matrix/ Trägermaterial bilden.

Die Biofilmbildung oder Beschichtung sollte vor Beginn der Produktion von Glykolat als Energieträger abgeschlossen sein.

Ergebnisse der Erfinder zeigen, dass sich durch die Erniedrigung der CO_2-Konzentration und des Sauerstoffkonzentration (gegenüber Luft) die Glykolatausscheidung steuern lässt (Abb. 2).

Wird die Weiterverwertung des Glykolats verhindert, z. B. durch einen Hemmstoff (wie Isoniazid) oder durch die Hemmung des Enzyms Glykolatdehydrogenase, steigen die Exkretionsraten signifikant an (Abb. 3).

Die Photonenbilanz kann deutlich verbessert werden, indem folgendes metabolische Design der Glykolat-exkretierenden Zellen realisiert bzw. mindestens eine der folgenden genetischen Veränderungen in den photosynthetisch aktiven Mikroorganismen, bevorzugt Algen, durchführt:

a) Zur Erhöhung der Carboxylierungskapazität wird die RUBISCO überexprimiert, während die anderen Enyzme des CALVIN Zyklus inkl. ihrer Regulation unverändert bleiben. Damit ist sicher gestellt, dass der CALVIN Zyklus ausreichende Mengen des Akzeptormoleküls 1,5-Ribulose-bis-Phosphat zur Verfügung stellen kann. Eine Verdoppelung der RUBSICO Menge resultiert in einer Erhöhung der Glykolatexkretion, da die Rubisco die kapazitätsbestimmende Komponente der Kohlenstofffixierung darstellt.

b) Zur Verbesserung der Glykolatausscheidung wird die Glykolatphosphat Phosphatase (EC 3.1.3.18) überexprimiert.

c) Zur Verbesserung der Glykolatausscheidung wird der Glykolattransporter überexprimiert werden. Dieses Enzym ist sowohl bei Bakterien (Nunez et al. 2001) als auch als Glykolatimporter in pflanzlichen Peroxisomen (Reumann et al. 1995) schon beschrieben und kann in das Genom der Alge integriert werden.

d) Da der Glykolattransporter ein membranintegrales Protein ist, wird er bevorzugt doppelt targetiert: einmal in die Chloroplastenmembran und gleichzeitig in die Zytoplasmamembran, um sicher zu stellen, dass das aus dem Chloroplasten in das Zytosol exkretierte Glykolat die Zelle verlassen kann. D. h. es werden bevorzugt zwei Gene, die für den Glykolattransporter mit unterschiedlichen Targetsequenzen kodieren, in die photosynthetisch aktiven Mikroorganismen transferiert – einmal mit einer Targetsequenz, welche für die Integration in die Chloroplastenmembran sorgt, und – einmal mit einer Targetsequenz, welche für die Integration in die Zytoplasmamembran sorgt.

e) Der Kohlenstoffkonzentrierungsmechnismus (CCM) wie oben beschrieben inaktiviert wird.

Die photosynthetisch aktiven Mikroorganismen, insbesondere Algen, liegen im Photosynthesemodul bevorzugt nicht als Suspensionskultur, sondern als Biofilm vor. Das ausgeschiedene Glykolat wird durch einen Flüssigkeitsstrom, der den Biofilm mit Nährstoffen und mit einem konstanten Reaktionsmilieu versorgt, abgeführt. Damit wird verhindert, dass Glykolat Konzentrationen erreicht, die die Photosynthese hemmen könnten.

Das ausgeschiedene Glykolat wird in einem mikrosystemanalytischen Ansatz in eine anaerobe Zone (siehe 3. Methanogenesemodul) überführt, in dem methanogene Mikroorganismen das Glykolat in Methan und CO_2 umwandeln.

2. Das Trennmodul

In Hinblick auf eine mögliche Separation der aeroben und anaeroben Zone unter Berücksichtigung einer horizontal möglichst kleinskaligen, dünnschichtigen (Mikrosystemtechnik) Ausfertigung der Zonen (Kompartimente), wird das Verfahren in nachfolgender Abbildung dargestellt. Die Abb. 4 zeigt das Schema des Zonensystems.

Die sich ergebenden limitierenden Faktoren sind bei diesem Verfahrensschema:

- die Membran (ggf. auch Biofilmträger) (Cut-Off, Sauerstoff- und Biomasserückhaltung) und
- Erhaltung eines möglichst streng anaeroben Milieus auf der Seite der methanogenen Mikroorganismen, d. h. nur geringster Sauerstoffübergang ist zulässig.

Als Barriere zwischen der anaeroben und aeroben Zone (Kompartiment) werden Materialien eingesetzt werden, welche Sauerstoff und Biomasse zurückhalten und Glykolat passieren lassen. Das Trennmodul grenzt das aerobe Kompartiment in Richtung anerobes Kompartiment, d. h. bevorzugt zu der Sonne abgewandten Seite, ab.

Je nach Form der Vorrichtung (bevorzugt flach oder zylindrisch) kommen Flachmembranen, Rohrmembranen oder Membranschläuche zum Einsatz.
Es werden drei bevorzugte Varianten als potentielle Barriere für die Trennung der Aerob- von der Anaerobzone spezifiziert, welche sowohl die Rückhaltung von Biomasse als auch einen möglichst hohen Rückhalt von Sauerstoff gewährleisten sollen, gleichzeitig aber auch als Biofilmträger fungieren können:

a) Flüssigmembran

Flüssigmembranen können durch die Auswahl des Liquids evtl. eine hohe Selektivität hinsichtlich des Glykolats erreichen. So kann durch spezifische Stoffauswahl nach dem Prinzip „Gleiches- löst- Gleiches“ eine hohe Affinität des Glykolats erreicht werden, bei verhältnismäßig geringem Lösungsvermögen für freies O_2. Eine detaillierte Stoffauswahl kann auf dieser Basis vorgenommen werden. Die Flüssigmembran benötigt i. A. einen Trägerstoff aus porösem Material.

b) einfache Membran

Prinzipiell eignen sich alle handelsüblichen Membranen für die Abtrennung von aeroben und anaeroben Kompartiment. Im einfachsten Fall besteht das Trennmodul aus einer einzelnen Membran. Die Membran trägt bevorzugt kationische Gruppen und ist ausgewählt aus Polymer-, Keramik- oder auch Acetatmembran. Bevorzugt sind Ultrafiltration- oder Umkehrosmose-Materialien. Die Membran kann aus handelsüblichen

Membranmaterialien bestehen und auch in Kombination mit einem Faser-Vlies, welches als Biomasseträger eingesetzt werden kann, die Barrierefunktion erfüllen.

c) Stripping-Kammer
Um den unerwünschten Transport von Sauerstoff in die anaerobe Kultur der methanogenen Mikroorganismen zu unterbinden und gleichwohl das Glykolat zu transportieren kann die Barriere

Bevorzugt wird das Trennmodul als eine dritte, minimalistische Kammer ausgestaltet, welche zum aeroben wie anaeroben Bereich durch eine Membran abgetrennt wird. In diese Stripping-Kammer wird zum Austrag des Sauerstoffs (Entgasung) ein Gas, z. B. CO_2 oder N_2, bevorzugt Prozessgas der Anaerobstufe, in die wässrige, Glykolat-haltige Lösung eingebracht (sog. Strippen). Das Membranmaterial richtet sich dabei nach den oben genannten Spezifikationen.

Die Strippingkammer enthält Eingangsstutzen und Ausgangsstutzen für die Entgasung, sie kann lichtundurchlässig ausgestaltet sein.

3. Das Methanogenesemodul
Das anerobe Kompartiment ist wie oben beschrieben durch das Trennmodul (Membran bzw. Strippingkammer) vom aeroben Kompartiment abgetrennt. Das Glykolat wird hier durch methanogene Mikroorganismen zu CO_2 und CH_4 umgesetzt. Das anerobe Kompartiment enthält mindestens eine Gasabfuhr. Die Flüssigkeitszufuhr erfolgt entweder über diese – alternativ enthält das Kompartiment für die einen gesonderten gasdichtverschließbaren Stutzen. Das anaerobe Kompartiment ist bevorzugt aus lichtundurchlässigem Material gefertigt.

Die anaerob arbeitenden methanogenen Mikroorganismen liegen bevorzugt immobilisiert oder in Suspension vor.

Kurz und LaRue (1973) sowie Edenborn und Lichtfield (1985) konnten zeigen, dass bestimmte strikt anaerobe Mikroorganismen ausschließlich auf Glykolat als einzigem Substrat leben können. Friedrich et al. (1991) klärten dann den Reaktionsweg auf und fanden folgende Reaktionsgleichung des anaeroben Glykolatabbaus:

4 Glykolsäure (Glykolat) $\longrightarrow$ 3 CH_4 + 5 CO_2 + 2 H_20 (Gleichung 2)

Die bevorzugten Isolate *FlGly1* und *FlGlyM* (sensu Friedrich et al. 1991) gehören innerhalb der Clostridien zu den Synthrophospora.

Die Erfinder haben gezeigt, dass auch Mikroorganismenpopulationen aus konventionellen Biogasanlagen in der Lage sind, sich an das Substrat Glykolat anzupassen und den Abbau von Glykolat in CO_2 und Methan in Übereinstimmung mit der Gleichung 2 zu vollziehen (Abb. 5).

Die Erfindung wird anhand folgender Ausführungsbeispiele und den Abbildungen 1 bis 6 näher erläutert:

Abb. 1 zeigt die durch die RUBISCO katalysierte Reaktionen.

Bei hohen Temperaturen und/oder bei einem hohem Sauerstoffpartialdruck bei gleichzeitig geringem CO_2-Angebot wirkt das CO_2-assimilierende Enzym (RUBISCO) nicht nur als Carboxylase, sondern auch als Oxygenase. Es entstehen an Stelle von zwei Molekülen nur ein Molekül Phosphoglycerinsäure sowie ein Molekül Phosphoglycolsäure, wie in Abb. 1 dargestellt ist.

Die Phosphoglykolsäure wird zu Glykolat dephosphoryliert und wird über einen Transporter zunächst in das Zytoplasma und von dort in das Medium ausgeschieden (Glykolat ist ein Produkt des natürlichen Prozesses der Photorespiration. Dieser Prozess erfolgt in Chloroplasten der Zelle. Da die Photorespiration von dem Verhältnis CO_2/O_2 abhängt, kann man das Verhältnis Carboxylierung zu Oxygenierung durch das Verhältnis CO_2/O_2 steuern.

Abb. 2 zeigt, wie sich die Glykolatausscheidung durch die Gaszusammensetzung steuern lässt, mit der die Algen belüftet werden (Gaszusammensetzung in Vol.-%). Ein Luftgemisch, indem das O_2/CO_2 Mischungsverhältnis von bevorzugt 47:0,02 Volumenprozent besteht, erlaubt erfindungsgemäß eine besonders hohe Glykolatexkretion. Dazu wurden *Chlamydomonas reinhardtii* auf Zellulosefilter immobilisiert. Für die Methanognese wurden aus einem Biogasanlagesumpf isolierte Mikroorganismen verwendet.
[µg (mg Chla)-1] = µg Glykolat pro mg Chlorophyll a.

Die durchgeführten Experimente zeigen, dass schon mit dem genetisch unveränderten Algen ohne Zusatz von Inhibitoren (hier Wildtyp von *Chlamydomonas reinhardtii)* Glykolatexkretionen von 30 % der photosynthetischen Gesamtleistung erzielt werden können. Das zelluläre Ausscheidungsprodukt ist ausschließlich Glykolat, Glyoxylat wird nur in Spuren gefunden. Auch andere organische Säuren werden nicht in Mengen gefunden, die Einfluss auf die Kohlenstoffbilanz des Gesamtprozesses haben.

Abb. 3 zeigt, dass durch Zusatz des Hemmstoff Isoniazid (10 mmol/l) die Exkretionsraten signifikant ansteigen. Der Versuch wurde abgesehen von der Isoniazidzugabe wie unter Abb. 2 beschrieben bei 47 Vol-% O2 und 0,02 Vol-% CO_2 durchgeführt.

Der Einsatz des Hemmstoffs Isoniazid zeigt, dass die Exkretionsraten höher werden, wenn die zellinterne Glykolatnutzung unterbunden wird. Es ist bekannt, dass in der Zelle das gebildete Glykolat mit Hilfe der Glykolatdehydrogenase weiter zu Glyoxylat verstoffwechselt wird. In einem komplexen Reaktionsverlauf werden zwei Moleküle Glykolat letztlich zu CO_2 und einem C3-Körper umgesetzt, der in die Chloroplasten zurückgeführt wird. Um die Glykolatexkretion dauerhaft hochzuhalten und die toxische Wirkung des Isoniazid zu umgehen, wird alternativ die Glykolatdehydrogenase genetisch inaktiviert.
Wenn man die Photonenbilanz für die Glykolatexkretion berechnet, erhält man folgende Photonenausbeute pro Glykolatmolekül:

Bedingung % O_2/% CO_2	Glykolatmetabolismus ungehemmt mol Photonen/ mol Glykolat im Medium	Glykolatmetabolismus gehemmt mol Photonen/ mol Glykolat im Medium
31/0,03	< 5000	1600
47/0,023	1010	520
70/0,013	1050	1180

Die **Abb. 4** zeigt das Schema einer erfindungemäßen Vorrichtung mit dem aeroben und dem anaeroben Kompartiment (aerobe und anaerobe Zone) sowie der Membran zur Separation. Die methanogenen Mikroorganismen sind als „Bakterien“ bezeichnet.

Abb. 5 zeigt dass Mikroorganismenpopulationen aus konventionellen Biogasanlagen in der Lage sind, sich an das Substrat Glykolat anzupassen und Glykolat in CO_2 und Methan umzusetzen.
Dazu wurden Mikroorganismenpopulationen aus konventionellen Biogasanlagen isoliert und einer Glykolatselektion unterworfen. Mikroorganismenproben aus einem Gärsumpf einer Biogasanlage wurden dazu 4 Wochen ausschließlich mit Glykolat als einziger Kohlenstoffquelle kultiviert.

Die in Abb. 5 dargestellten Versuchsergebnisse zeigen, wie aus dem Gärsubstrat langsam der Stickstoff, der mit dem Gärsubstrat eingebracht wurde, entweicht und bei ausschließlicher Glykolatzugabe, das resultierende Biogas nur aus Methan und CO_2 in einem Volumenverhältnis von 59:41 besteht. Andere Gase werden nur in Spuren beobachtet. Der Fermentationsprozess ist auch bei geringen Spuren von Restsauerstoff , (bis 4 %) stabil. Die Gasausbeute liegt mit (57 %) bzw. 0,24 ml CH_4 / mg Glykolsäure sehr hoch. Auf der Grundlage dieser Gärausbeute und der in Tabelle 1 ermittelten Glykolat-exkretionsraten gelangt man zu folgender Gesamteffizienz:

Tabelle 1

	Variante 1	Variante 2
Quantenbedarf pro Glykolat [µmol Quanten/µmol Glykolat]	520	1010
Jährliche Strahlungsmenge [mol quanten/m²/a]	4.500	4500
Davon absorbierte Quanten[mol quanten/m²/a]	4.050	4050
Produzierte Glykolatmenge [g Glykolat/m²/a]	610	277
Methanproduktion in L		
(bei einer Gärausbeute von 0,24 ml CH_4/mg Glykolat)	145	66
Bio-Dieseläquivalent (L Biodieselersatz/ha/a)	1.417	645

Variante 1: mit Hemmstoff Isoniazid (10 mmol/l)
Variante 2: ohne Hemmstoff

Damit entspricht die Leistungsfähigkeit des Systems pro Fläche dem Flächenertrag des Biodiesels, der auf der Grundlage des Rapsanbaus erreicht wird. Im Unterschied zu dieser Technologie werden weder landwirtschaftliche Nutzflächen in Anspruch genommen, noch ist ein energieaufwändiger Düngebedarf erforderlich. Der Massenstrom ist nahezu stickstofffrei.

In der **Abb. 6** ist eine Ansicht der erfindungsgemäßen Vorrichtung mit einem Vlies als Trägermaterial, welches auf einer semipermeablen Membran aufliegt, gezeigt.

In der Patentanmeldung wird folgende Nichtpatentliteratur zitiert:

Dismukes G.C. et al. Aquatic Phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for fuels. Current Opinion in Biotechnology 19, 235-240, 2008

Edenborn H.M. et al. Glycolate metabolism by Pseudomonas sp. strain S227, isolated from a coastal marine sediment. Mar. Biol. 88, 199-205, 1985

Friedrich, M. et al. Fermentative degradation of glycolic acid by defined syntropic cocultures. Arch. Microbiol. 156, 398- 404, 1991

Giordano M. et al. CO_2 concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution. Annu Rev Plant Biol. 2005; 56:99-131, 2005.

Kurz, W.G.W. and LaRue T.A.G. Metabolism of glycolic acid by Azotobacter chroococcum PRL H62. Can. J. Microbiol. 19, 321-324, 1973

Langner, U. et al. A complete energy balance for *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlamydomonas acidophila* under neutral and extremely acidic growth conditions. Plant Cell Environm 32: 250-258, 2009

Raven, J. A. et al. Algae lacking carbon-concentrating mechanisms. Canadian Journal of Botany, 2005, 83:(7) 879-890, 10.1139/b05-074

Vilchez C., et al. Glycolate photoproduction by free and alginate-entrapped cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. Appl. Microbiol. Biotechn. 35, 716-719, 1991

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Methan in einem Photobioreaktor, in dem photosynthetisch aktive Mikroorganismen, insbesondere Algen oder Bakterien, mit CO_2 und O_2 versorgt werden, wobei die photosynthetisch aktiven Mikroorganismen Glykolat ausscheiden, welches durch eine Membran abgetrennt wird und unter anaeroben Bedingungen als Substrat für methanogene Mikroorganismen dient, die es in CO_2 und CH_4 umwandeln.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Verhältnis CO_2 zu O_2 in der Gaszusammensetzung maximal 1 zu 500, bevorzugt 1 zu 1500 bis 1 zu 2000 beträgt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass
   a. die Glykolatmetabolisierung der photosynthetisch aktiven Mikroorganismen, bevorzugt durch zellinterne Inaktivierung der Glykolatdehydrogenase und/oder Glykolatoxidase, reduziert wird, und/oder
   b. die Glykolatproduktion, bevorzugt durch die Überexpression der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase (RUBISCO) und/oder der Glykolatphosphat-Phosphatase, gesteigert wird, und/oder
   c. die Glykolatausscheidung, bevorzugt durch die Einklonierung eines für einen Glykolattransporters codierenden Gens und Targeting des Glykolattransporters in die Zytoplasmamembran und/oder die Membran der Chloroplasten, gesteigert wird, und/oder
   d. Kohlenstoffkonzentrierungsmechanismus (engl. „carbon concentrating mechanism“ abgekürzt CCM) inaktiviert ist.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass als photosynthetisch aktive Mikroorganismen biofilmbildende Algen, bevorzugt der Gattungen Chlamydomonas, Chlorella, Apathococcus, Chlorokybus, Stichococcus, Nannochloris, Trebouxia, Keratococcus, Pseudococcomyxa, eingesetzt werden.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass photosynthetisch aktiven Mikroorganismen, bevorzugt Algen der in Anspruch 4 genannten Gattungen, mit verminderter Aktivität der Glykolatdehydrogenase und/oder Glykolatoxidase eingesetzt werden.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Mikroorganismen der Gattung Synthrophospora oder mittels Glykolatselektion gewonnenen Mischpopulationen aus konventionellen Gärsümpfen oder Biogasanlagen für die Methanogenese genutzt werden.

7. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach den Ansprüchen 1 bis 6, die folgende Bestandteile aufweist:
   - ein aerobes Kompartiment, welches ein Trägermaterial zur Kultivierung von photosynthetisch aktiven Mikroorganismen sowie eine Gaszufuhr und Gasabfuhr enthält, die so angebracht sind, dass das Gas über das Trägermaterial strömt,
   - ein anaerobes Kompartiment mit einer Gasabfuhr,

   wobei das anaerobe Kompartiment durch eine Membran von dem aeroben abgetrennt ist.

8. Vorrichtung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Membran gleichzeitig das Trägermaterial ist.

9. Vorrichtung nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Gaszufuhr zum aeroben Kompartiment mit einer Gasmischeinrichtung verbunden ist und/oder dass die Gaszufuhr aus dem anaeroben Kompartiment mit einer Gaswascheinrichtung verbunden ist.

10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine zusätzliche Kammer zwischen aerobem und anaerobem Kompartiment enthält, die mit mindestens einem Eingangsstutzen und Ausgangsstutzen für die Entgasung versehen ist und zu dem aerobem und anaerobem Kompartiment durch eine Membran abgetrennt sind.

11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Membran jeweils kationische Gruppen trägt und bevorzugt ausgewählt ist aus Polymer-, Keramik- und Acetatmembranen.

12. Photosynthetisch aktive Mikroorganismen,

    a. in denen die Glykolatdehydrogenase partiell inaktiviert ist, und/oder

    b. in denen die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase (RUBISCO) und/oder die Glykolatphosphat-Phosphatase überexprimiert ist und/oder

    c. die einen Glykolattransporters exprimieren, der in die Zytoplasmamembran und/oder die Membran der Chloroplasten getarget wird.

13. Photosynthetisch aktive Mikroorganismen nach Anspruch 12, in denen zusätzlich der Kohlenstoffkonzentrierungsmechanismus inaktiviert ist.

14. Verwendung einer Vorrichtung wie in einem der Ansprüche 7 bis 11 definiert zur Herstellung von Methan.

15. Verwendung von von photosynthetisch aktiven Mikroorganismen, bevorzugt Algen,

    a. in denen die Glykolatdehydrogenase partiell inaktiviert ist, und/oder

    b. in denen die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase (RUBISCO) und/oder die Glykolatphosphat-Phosphatase überexprimiert ist und/oder

    c. die einen Glykolattransporters exprimieren, der in die Zytoplasmamembran und/oder die Membran der Chloroplasten getarget wird, und/oder

    d. in denen der Kohlenstoffkonzentrierungsmechanismus inaktiviert ist

zur Herstellung von Methan.

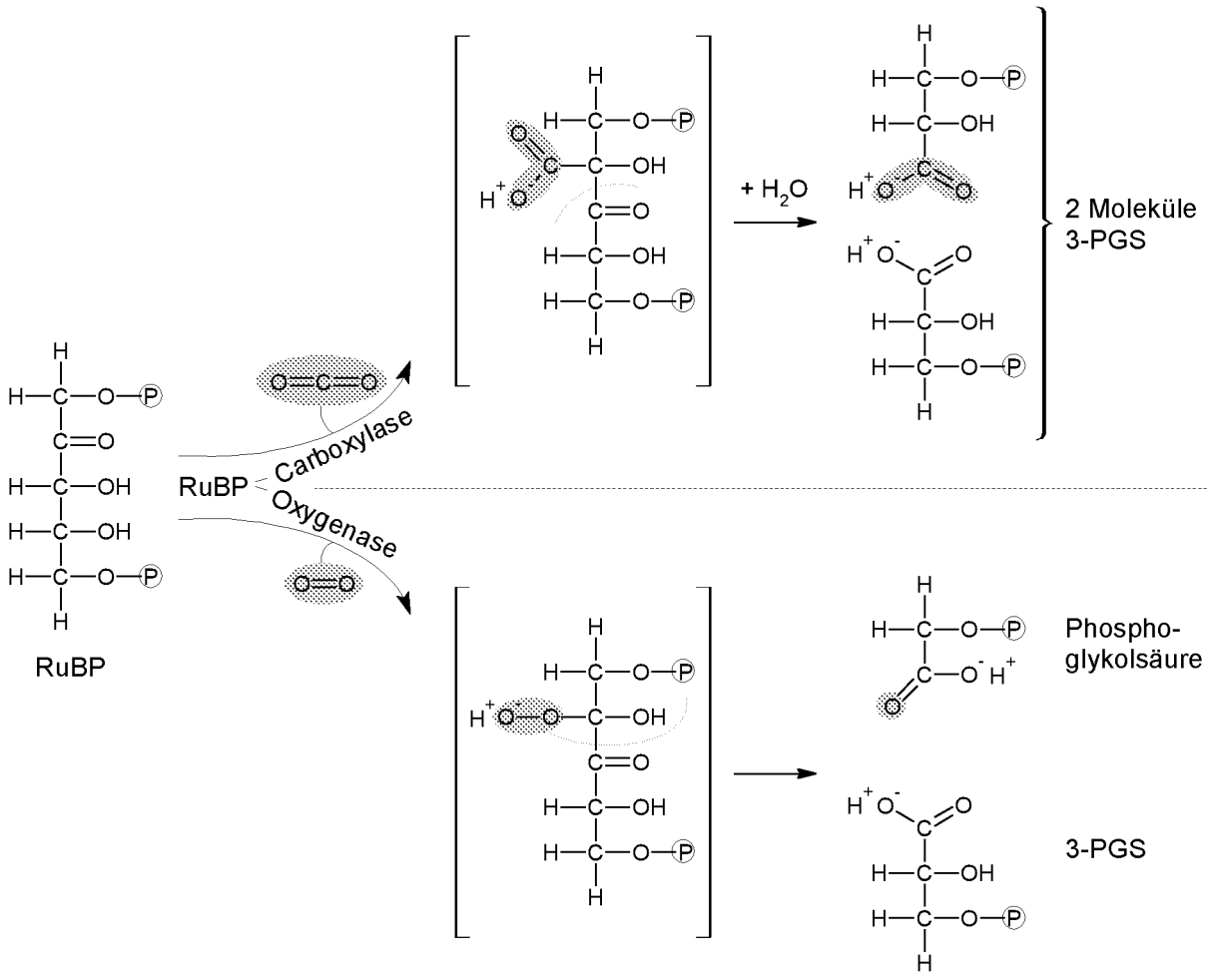
RuBP
Carboxylase
Oxygenase
RuBP
+ H2O
2 Moleküle
3-PGS
Phospho-
glykolsäure
3-PGS
instabil

Abb. 1

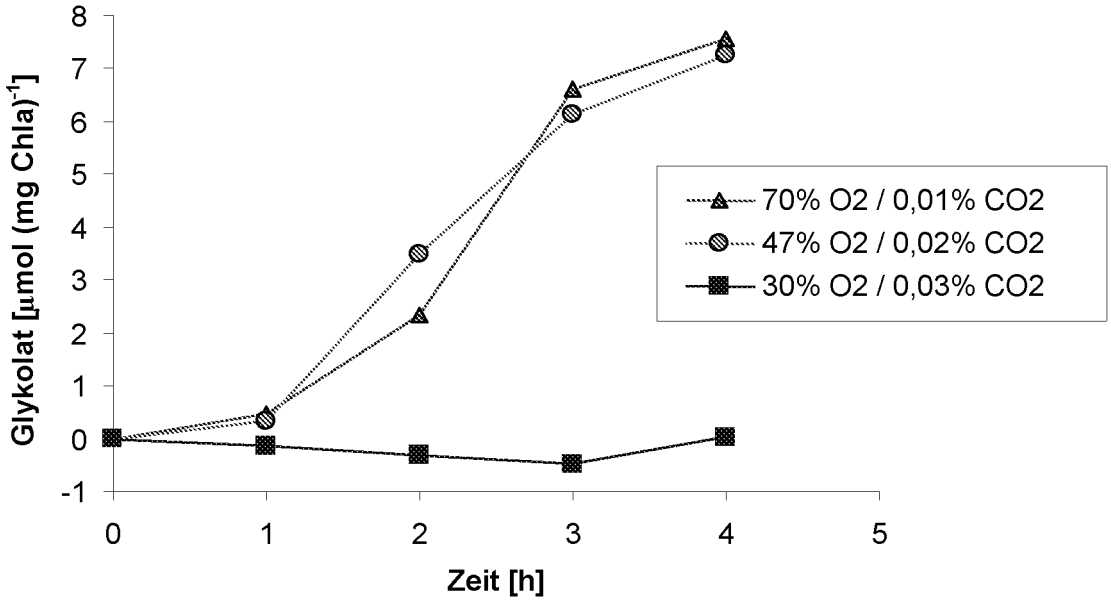
Glykolat [µmol (mg Chla)-1]
Zeit [h]
70% O2 / 0,01% CO2
47% O2 / 0,02% CO2
30% O2 / 0,03% CO2

Abb. 2

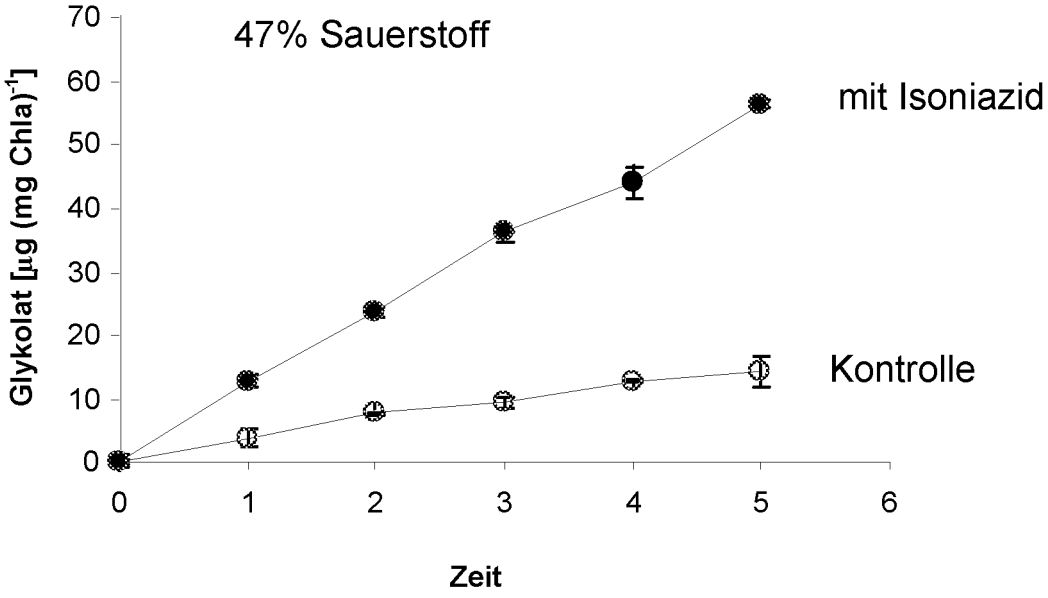
47% Sauerstoff
mit Isoniazid
Kontrolle
Glykolat [µg (mg Chla)-1]
Zeit

Abb. 3

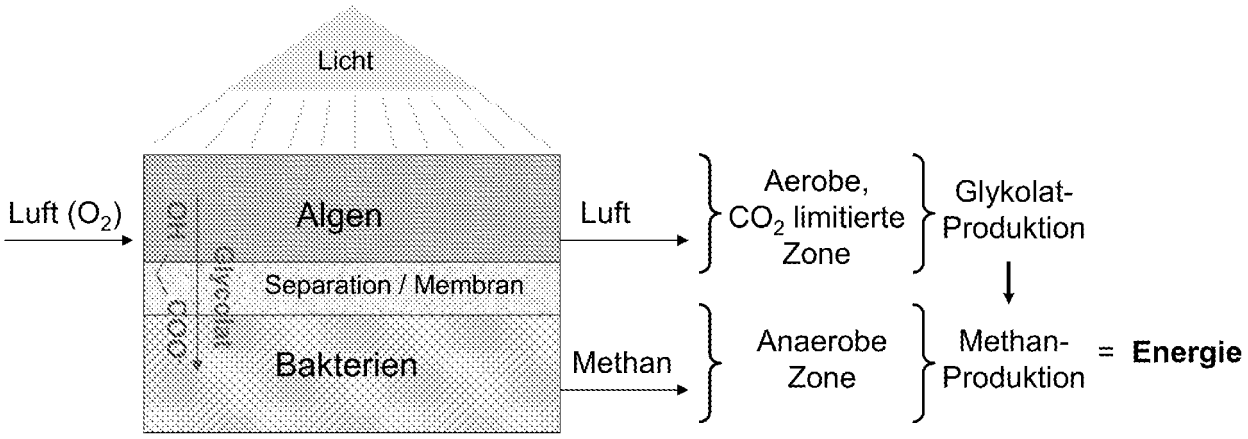
Licht
Luft (O_2)
Algen
Separation / Membran
Bakterien
CO_2
Glycolat
Luft
Methan
Aerobe, CO_2 limitierte Zone
Glykolat-Produktion
Anaerobe Zone
Methan-Produktion
= Energie

Abb. 4

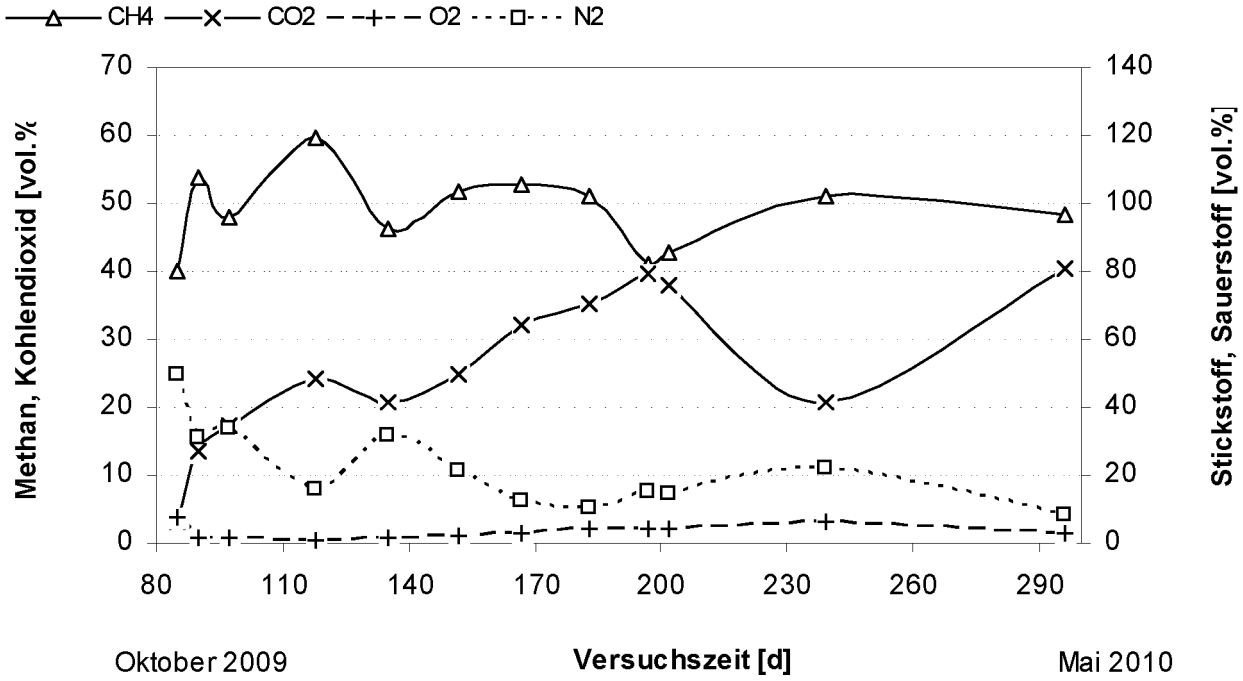
CH4
CO2
O2
N2
Methan, Kohlendioxid [vol.%
Stickstoff, Sauerstoff [vol.%]
70
60
50
40
30
20
10
0
140
120
100
80
60
40
20
0
80
110
140
170
200
230
260
290
Oktober 2009
Versuchszeit [d]
Mai 2010

Abb. 5

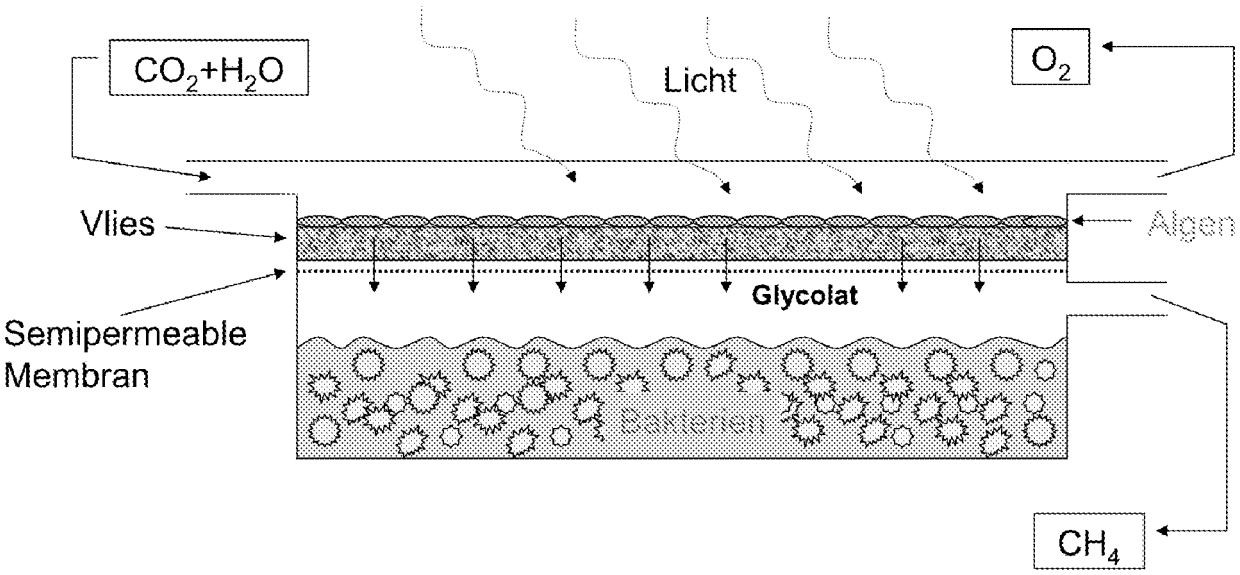
CO_2+H_2O
Licht
O_2
Vlies
Algen
Glycolat
Semipermeable Membran
Bakterien
CH_4

Abb. 6