(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
17. Dezember 2009 (17.12.2009)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2009/149794 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
C12N 1/12 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2009/003231

(22) Internationales Anmeldedatum:
6. Mai 2009 (06.05.2009)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2008 027 889.0 11. Juni 2008 (11.06.2008) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **ALGMAX GMBH** [CH/CH]; Schürmattstrasse 1, CH-6331 Hünenberg/Zug (CH).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **MAACK, Andreas** [DE/DE]; Schipperkamp 29, 31717 Nordsehl (DE).

(74) Anwalt: **SIECKMANN, Ralf**; Schumannstrasse 97-99, 40237 Düsseldorf (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, CN, CO, CR, CU, CZ, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (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, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— *mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)*

— *vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)*

(54) **Title**: METHOD FOR PRODUCING ALGAL BIOMASS AND USE THEREOF

(54) **Bezeichnung**: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON ALGENBIOMASSE UND DEREN VERWENDUNG

(57) **Abstract**: The invention relates to a method for producing algal biomass by means of algae without using light in a closed reactor. An algae and nutrient solution suspension is created by inoculation by non-sterile algae and use of a non-sterile nutrient solution, and the algal biomass is then obtained from said suspension by cell growth and cell multiplication. The invention also relates to the use of algal biomass produced in this way.

(57) **Zusammenfassung**: Offenbart wird ein Verfahren zur Herstellung von Algenbiomasse mittels Algen ohne Verwendung von Licht in einem geschlossenen Reaktor, wobei durch Beimpfen mittels nicht steriler Algen und Verwendung einer nicht sterilen Nährlösung zunächst eine Algen-Nährlösungs-Suspension entsteht, aus welcher dann die Algenbiomasse durch Zellwachstum und Zellvermehrung gewonnen wird sowie die Verwendung der so erzeugten Algenbiomasse.

WO 2009/149794 A1

Verfahren zur Herstellung von Algenbiomasse und deren Verwendung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein neuartiges Verfahren zur Gewinnung von Algenbiomasse in Gegenwart einer Lichtmenge von bis zu 40.000 Lux unter Einsatz nicht gentechnisch veränderter Algen sowie die Verwendung des Verfahrenserzeugnisses, wie im Nachfolgenden erörtert.

Stand der Technik

Die bekannten Verfahren zur Gewinnung von Algenbiomasse, welche bekannt und zahlreich in der Patentliteratur beschrieben sind, nutzten entweder so genannte Photobioreaktoren (PBR) oder Verfahren im offenen Systemen.

So beschreibt EP1040182 B1 ein Verfahren zur Herstellung von Biomasse mittels Photosynthese, bei welchem ein Photobioreaktor beschrieben wird. Eine Übersicht zu offenen Systemen und anderen Verfahren zur Algenbiomassegewinnung findet sich bei Borowitzka, M.A. in Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters; in Journal of Biotechnology, Volume 70, Issues 1-3, 30 April 1999, 313-321.

In den Beschreibungen sind immer Licht, geeignete Nährstoffe, sowie Kohlenstoffdioxid (CO_2) für die Gewinnung der Algenbiomasse notwendig. Die verwendeten Algenarten werden zunächst unter sterilen Bedingungen angezüchtet und vermehrt, danach wird das so genannte Inokulat zusammen mit dem Nährmedium in jeweiligen oben genannten Systemen zur optimalen Vermehrung und Gewinnung der Algenbiomasse eingebracht.

Andererseits können aber auch geschlossene Systeme verwendet werden, die ohne die Verwendung von Licht auskommen. Allerdings ist es bei diesem Verfahren notwendig, die Algen gentechnisch zu manipulieren, wie es z. B. in EP1780283 A1 - Trophische Umwandlung von obligat phototropischen Algen durch metabolische Manipulation- beschrieben wird. Chen F. et al. beschreiben ebenfalls die gentechnische Manipulation in Growing phototrophic cells without light, in Biotechnology Letters 2006 May; 28(9):607-616.

Erst durch die gentechnische Manipulation ist es dann den Algen möglich, ohne Verwendung von Licht, andere Energiequellen wie z.B. Zucker als Kohlenstoffquelle zum Aufbau der Algenbiomasse zu verwenden.

Auch beim Verfahren im Dunkeln werden die gentechnisch manipulierten Algen unter sterilen Bedingungen gezüchtet, das Inokulat dann zusammen mit dem Nährmedium unter sterilen Bedingungen in Bioreaktoren oder anderen geeigneten Behältnissen (Fermentern) weiter vermehrt.

Nachteile des Standes der Technik

Sowohl bei den offenen Systemen, als auch bei geschlossenen Systemen (PBR) wird die Algenbiomasse durch geeignete Vorrichtungen (Schaufelräder, Pumpen, Luftströme im Reaktor, Reaktordesign) bewegt, um ein Absetzen der Algen zu verhindern. Das Absetzen der Algenbiomasse ist unerwünscht und nachteilig, da bei Absetzung die optimale Lichtausbeute herabgesetzt und die Bildung neuer Algenbiomasse verringert und somit der Wirkungsgrad herabgesetzt wird.

Bei der Anwendung der gentechnischen Manipulation der Algen ist der hohe apparative Aufwand von Nachteil. Weiterhin ist auch das Einhalten der sterilen Bedingungen von Nachteil, da diese aufwendig und kostenintensiv sind.

Aufgabe der Erfindung

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Gewinnung von Algenbiomasse bereitzustellen, welches unter Vermeidung der Nachteile bisher bekannter Verfahren auskommt.

Lösung der Aufgabe

Die Aufgabe wird dadurch gelöst, dass Algen unter nicht sterilen Bedingungen in Gegenwart einer Lichtmenge von bis zu 40.000 Lux für eine gewisse Zeit am Tag bzw. ohne Licht und ohne gentechnische Manipulation unter Verwendung mindestens einer anderen kohlenstoffhaltigen Komponente im Nährmedium in geeigneten Behältern gezüchtet und vermehrt werden.

Die vorliegende Erfindung betriff somit ein Verfahren zur Herstellung von Algenbiomasse mittels Algen in einem geschlossenen Reaktor, wobei durch Beimpfen mittels nicht steriler Algen und Verwendung einer nicht sterilen Nährlösung zunächst eine Algen-Nährlösungs-Suspension entsteht, aus welcher dann die Algenbiomasse durch Zellwachstum und Zellvermehrung gewonnen wird, wobei nicht gentechnisch veränderte Algen eingesetzt werden und die Herstellung der Algenbiomasse in Gegenwart einer Lichtmenge von bis zu 40.000 Lux für die Dauer von 30 min bis 360 min pro Tag, über eine Dauer von bis zu 30 Tagen erfolgt..

Vorteile der Erfindung

Durch das erfindungsgemäße Verfahren lässt sich die Algenbiomasse optimal vermehren und Algenbiomasse kostengünstig herstellen, da auf sterile Bedingungen verzichtet werden kann. Weiterhin wird erfindungsgemäß auf eine Genmanipulation der Algen verzichtet.

Durch den weitergehenden Verzicht auf Licht zum Aufbau der Algenbiomasse erhöht sich die Ausbeute der Algenbiomasse, da der bei den vorstehend genannten Verfahren

zum Stand der Technik limitierende Faktor Licht zum Aufbau der Algenbiomasse nicht mehr notwendig ist.

Mit der vorliegenden Erfindung liegt nun ein Verfahren vor, welches gegenüber den bislang bekannten Verfahren folgende Vorteile bietet:

- Verzicht der sterilen Bedingungen,
- Verzicht der Genmanipulation ,
- Verzicht auf die sonst notwendigen Sicherheitsstandards für genmanipulierte Organismen
- geringerer Platzbedarf, da das Volumen anstatt der Fläche genutzt wird.

Nach einer bevorzugen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung erfolgt die Herstellung der Algenbiomasse in Gegenwart einer Lichtmenge von 3.000 Lux bis 40.000 Lux, für die Dauer von 60 min bis 360 min pro Tag, vorzugsweise 60 min bis 240 min pro Tag, über eine Dauer von 1 Tag bis 14 Tagen, bevorzugt 2 Tagen bis 10 Tagen.

Nach einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung erfolgt die Herstellung der Algenbiomasse in Abwesenheit von Licht. Hier erfolgt die Bildung der Algenbiomasse innerhalb von bis zu 14 Tagen, bevorzugt innerhalb von 1 bis 7 Tagen.

Bevorzugt wird bei dem erfindungsgemäßen Verfahren der Algen/Nährlösungs-Suspension und / oder der Nährlösung ein Gas, welches CO_2 enthält, welches solange zugegeben wird, bis sich in der Algen/Nährlösungs-Suspension und/oder Nährlösung einen pH-Wert bereich zwischen 4,5 und 7,0 eingestellt hat.

Nach einem bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden, neben Kohlenstoffdioxid, während der Phase des Zellwachstums der Alge als weitere Kohlenstoff-Quellen dem Nährmedium mindestens eine weitere organische Kohlenstoff-Quelle hinzugefügt.

Weiter bevorzugt ist es bei dem erfindungsgemäßen Verfahren, die Algen/Nährlösungs-Suspension im Reaktor zu durchmischen, insbesondere mittels Rührern. Hierdurch wird

durch Variation der Durchmischung ein optimaler Ertrag an Algenbiomasse durch Verstoffwechselung des eingebrachten Kohlenstoffdioxides und der zusätzlichen organischen Kohlenstoffquelle erzielt.

Nach einer weiteren bevorzugten Aufführungsform der Erfindung werden als Algen Grünalgen (Chlorophyta), insbesondere aus der Familie der Chlorococcales, ganz bevorzugt Mikroalgen der Gattung Chlorella eingesetzt. Beispielhaft seien Chlorella vulgaris, Chlorella protothecoides genannt.

Weiter bevorzugt ist es, im erfindungsgemäßen Verfahren als CO_2 enthaltendes Gas ein Abgas aus Feuerungsanlagen, vorzugsweise Blockheizkraftwerken, aus Verbrennungsprozessen, aus Verbrennungsmotoren oder aus Fermentationsanlagen einzusetzen, wobei das Abgas bevorzugt vor Einleitung in die Nährlösung abgekühlt wird. So wird neben dem in der Luft enthaltenen Kohlenstoffdioxid (CO_2) auch CO_2 aus Rauchgas und/ oder aus Abgasen von Blockheizkraftwerken und/oder aus Verbrennungsmotoren, als Kohlenstoff-Quelle für den Aufbau der Algenbiomasse verwendet.

Weiter bevorzugt im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es, eine Nährlösung aus nährstoffreichen Abwässern, insbesondere einer Kläranlage und / oder einer Biogasanlage, einzusetzen.

Weiter bevorzugt ist es, im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens der Nährlösung als weitere organische Kohlenstoffquelle mindestens ein Einfach- und / oder Mehrfachzucker zuzugeben, bevorzugt Glucose in einer Konzentration von 0,1 g/l bis 10 g/l Nährlösung.

Erfindungsgemäß eignen sich auch Hydrolysate von Polysacchariden, sowie Lignocellulosen einschließlich Lignin und Salze von Carbonsäuren (z.B. Acetate). Beispiele für die Polysaccharidhydrolysate sind die aus Stärke und Stärkeprodukten, aus Galaktomannanen, Carrageenanen, Pektinstoffen, Exsudat-Gummi, Cellulose, Alginaten, Agar, Dextran, Xanthan, Lignocellulosen, Lignin entstehen. Weiter sind nährstoffhaltige Abwässer aus Kläranlagen als weitere Kohlenstoff-Quellen zum Aufbau der Algenbiomasse geeignet.

Nach einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die Nährlösung Wasser, Stickstoffverbindungen, Phosphate, Kalium-, Calcium-, Magnesiumverbindungen und Spurenelemente, die ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Bor, Kupfer, Eisen, Mangan, Molybdän und / oder Zink.

Es wurde überraschenderweise gefunden, dass erfindungsgemäß gerade diese Kombination erhöhter CO_2-Zufuhr mit mindestens einer weiteren Kohlenstoff-Quelle, (z.B. auch Lignocellulosen einschließlich Lignin) bevorzugt Glucose, unter nicht sterilen Bedingungen die Algenbiomassebildung optimiert.

Nach einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Abtrennung der Biomasse in an sich bekannter Weise und die Nährlösung wird in den Reaktor kontinuierlich oder diskontinuierlich zurückgeführt.

Der vorliegenden Erfindung liegt weiter die Aufgabe zugrunde, Verwendungen für das Verfahrenserzeugnis Algenbiomasse bereitzustellen.

Dies ist einmal die Verwendung der Algenbiomasse, erhältlich nach den vorbeschriebenen Verfahrenschritten, als Ausgangsstoff für die Herstellung von Biodiesel oder Ethanol.

Dies ist weiterhin die Verwendung der Algenbiomasse, erhältlich nach den vorbeschriebenen Verfahrensschritten, als Bestandteil von Futtermittel oder als Futtermittel für Wirbeltiere, insbesondere für Nutz- und Haustiere.

Dies ist weiterhin die Verwendung der Algenbiomasse, erhältlich nach den vorbeschriebenen Verfahrenschritten, als Ausgangsstoff für die Herstellung von Biogas.

Dies ist schließlich die Verwendung der Algenbiomasse, erhältlich nach den vorbeschriebenen Verfahrenschritten, als Ausgangsstoff für die Herstellung von Bioschäumen.

Nachfolgend soll die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

Es zeigen.

Fig. 1 einen Reaktor zur Herstellung der Biomasse

Fig. 2 den zeitlichen Verlauf der Biomasseerzeugung und Abnahme von Glukose

Fig. 1 zeigt: eine beispielhafte Ausführungsform des Reaktors sowie den schematischen Ablauf des Verfahrens.

Das Algeninokulat 01 im Tank 02 wird mittels einer Pumpe 03 in den Reaktor 04, welcher mit Nährmedium 05 aus dem Vorratstank 06 gefüllt ist, gepumpt.

Über im Reaktor befindliche Messsensoren 07 , welche den pH-Wert, die Temperatur, den CO_2-Gehalt und die optischen Dichte der Suspension messen, wird über eine zentrale, computergesteuerte Mess- und Regeleinheit 08 der Eintrag von CO_2-haltigem Gas 09 über eine Gas-Pumpe 10 gesteuert.

Die Regeleinheit steuert auch eine im Reaktor befindliche Heizung (in der Zeichnung nicht dargestellt) welche die Temperatur zur Einhaltung der optimalen Zuchtbedingungen sicherstellt und die Rührmotoren 11.

Die so eingestellte Algen-Nährlösungs-Suspension zirkuliert dann im Reaktor 04 mittels Rührmotoren 11, welche eine kontinuierliche Durchmischung der Suspension garantieren.

Im Reaktor erfolgt das Algenbiomassewachstum durch Verstoffwechselung des eingebrachten und gelösten CO_2, sowie der in dem Nährmedium befindlichen anorganischen Nährstoffen und der in dem Nährmedium befindlichen zusätzlichen Kohlenstoff-Quelle ohne Licht.

Die Trockenmassekonzentration der verwendeten Mikroalgensorte Chlorella vulgaris nach Einstellung von Inokulat 01 und Nährmedium 05 im Reaktor beträgt zwischen 0,5 bis 1,0 g Trockensubstanz/l.

Bei Erreichen einer Trockenmassekonzentration von mehr als 2,0 g/l im Reaktor wird die nun erntefähige Algen- Nährmedium-Suspension über die Pumpe 03 in eine dem Fachmann bekannte Trenneinrichtung (z.B. Separator, Zentrifuge, Absetzbecken) zugeführt (nicht in der Zeichnung dargestellt), der Abtrennung zugeführt, um eine Trennung in Algenbiomasse und überschüssiger Nährlösung 05 zu ermöglichen.

Die von der Algenbiomasse befreite Lösung kann über eine Pumpe 03 dem Reaktor 04 und / oder aber dem Nährmediumvorratstank 06 wieder zugeführt werden (in der Zeichnung nicht dargestellt) Dies kann kontinuierlich, aber auch diskontinuierlich, in Abhängigkeit von dem Wachstum der Algenbiomasse erfolgen.

Die so abgetrennte Algenbiomasse kann je nach Verwendungszweck und Zusammensetzung der Algentrockenmasse durch dem Fachmann bekannte Techniken und wie in der gängigen Literatur beschrieben z.B. als Rohstoff für die Biodieselgewinnung, der Ethanolgewinnung, als Futtermittel oder anderen Verwendungszwecken dienen.

Der nach oben offene Reaktor 04 ist mittels einer lichtdichten Folie 12 abgedeckt, welche eine Öffnung 13 besitzt, aus dem gasförmige Stoffwechselprodukte und überschüssige Gase entweichen können.

Fig. 2 zeigt den Verlauf der Biomassebildung [g / l TM] und der Glukosekonzen-tration mit 1 % Glukose und 1-stündiger Lichtphase pro Tag (wenig Licht), wie nachstehend in Herstellbeispiel 1 beschrieben. Der Biomasseertrag stieg kontinuierlich an und betrug nach 10 Tagen Versuchsdauer 2,5 g/l Trockenmasse.

Die optische Dichte wurde quantitativ bestimmt mittels Spektralphotometrie bei 660 nm (z.B. UV-2102 PC Spektrometer, Shimadzu Deutschland GmbH)

Die HPLC-Analyse von Glucose wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:
- HPLC 1100 Series, Agilent
- Brechungsindexdetektor (RI) 1100 Series, Agilent
- Säule: Rezex ROA - Organic Acid H+ (8%), Phenomenex
- Ofentemperatur: 70 °C
- mobile Phase: 5 mM H2SO4, isokratisch

Herstellbeispiel 1: wenig Licht

Leere, tarierte Erlenmeyerkolben mit Schraubverschluss und 500 ml Volumen werden mit CO2 geflutet und mit je 160 ml Algenkultur (Algenart: Chlorella vulgaris (z.B. aus natürlichen Quellen wie Fließgewässern, Teichen gewonnen oder auch bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig erhältlich)(c= 0,41 g/L TM (Gramm pro Liter Trockenmasse) befüllt. Anschließend werden je 3 Ansätze mit 1 % Glukose (1,6 g je Kolben) versetzt. Nach Lösen der Glukose werden die Kolben erneut gewogen. Anschließend wird CO2 (z.B. Kohlendioxid GA 370, Linde AG) in die Suspension geleitet, bis sich ein konstanter pH-Wert bei pH 5,7 einstellt. Das Gas wird hierbei über eine feinporige Metallfritte (Bestandteil eines Fermenterbegasungssystems) zugeführt, womit eine sehr feinperlige Blasenbildung erzielt werden kann. Die Begasung erfolgt manuell und pH-gesteuert. Bevor die Kolben im Schüttelwasserbad inkubiert werden, erfolgt die erste Probennahme. Nach 1-stündiger Inkubation im Schüttelbad erfolgt eine weitere Probennahme zur pH-Kontrolle.

Die Inkubation erfolgt im unbeheizten Schüttelwasserbad ohne Lichtzufuhr bei einer Schüttelfrequenz von 100 rpm. Die Temperatur im Wasserbad beträgt zwischen 20 °C – 25 °C. Die Ansätze werden täglich für 1 h dem Tageslicht ausgesetzt. Die Bestimmung der Beleuchtungsstärke erfolgt mittels Luxmeter (z.B. Voltcraft LUXMETER LX-1108, Conrad Elektronic Versand). Hierbei kann die Lichtmenge je nach Jahreszeit zwischen 3.000 und 40.000 Lux (Winter- bzw. Sommertag) variieren. Die Probennahme der erzeugten Biomasse erfolgt jeweils nach der Lichtbehandlung. Die Bestimmung der Algenbiomasse erfolgt durch Filtration von

5 ml -10 ml Probe durch vorgetrocknete und gewogenen Membranfilter (0,45 µm, z.B. Whatman Schleicher & Schuell) und anschließender Trocknung bei 105 °C.

Nach einer erneuten Begasung mit CO2 werden die Ansätze wieder im abgedunkelten Wasserbad inkubiert.

Herstellbeispiel 2: kein Licht

Leere, tarierte Erlenmeyerkolben mit Schraubverschluss und 500 ml Volumen werden mit CO2 geflutet und mit je 200 ml Algenkultur (Algenart: Chlorella vulgaris (z.B. aus natürlichen Quellen wie Fließgewässern, Teichen gewonnen oder auch bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig erhältlich)(c= 1,0 g/L TM (Gramm pro Liter Trockenmasse) befüllt. Anschließend werden je 2 Ansätze mit 5 % Glukose (10,0 g je Kolben) versetzt. Nach Lösen der Glukose werden die Kolben erneut gewogen. Anschließend wird CO2 in die Suspension geleitet, bis sich ein konstanter pH-Wert bei pH 6,0 einstellt. Die Begasung erfolgt manuell und pH-gesteuert.

Bevor die Kolben im Schüttelwasserbad inkubiert werden, erfolgt die erste Probennahme. Nach 1-stündiger Inkubation im Schüttelbad erfolgt eine weitere Probennahme zur pH-Kontrolle. Die Inkubation erfolgt im beheizten Schüttelwasserbad (Temperatur zwischen 25 – 28 °C) hne Lichtzufuhr bei einer Schüttelfrequenz von 100 rpm. Die Bestimmung der Algenbiomasse erfolgt durch Filtration von 5 ml -10 ml Probe durch vorgetrocknete und gewogene Membranfilter (0,45 µm) und anschließender Trocknung bei 105 °C. Nach 3 Tagen findet kein Biomassezuwachs mehr statt. Tabelle 1 gibt die Biomassebildung im Dunklen nach 3 Tagen wieder.

Tabelle 1:

Ansatz	Biomassekonzentration [g/L]	Biomassekonzentration nach 72 h [g/L]
1	1,0	2,35
2	1,0	2,40

Bezugszeichenliste:

01:Algeninkulat
02:Tank
03: Pumpe
04: Reaktor, offen
05: Nährmedium
06: Vorratstank
07: Messsensoren
08: Regeleinheit
09: CO_2haltiges Gas
10: Gaspumpe
11: Rührmotoren
12: Folie
13: Öffnung

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Algenbiomasse mittels Algen in einem geschlossenen Reaktor, wobei durch Beimpfen mittels nicht steriler Algen und Verwendung einer nicht sterilen Nährlösung zunächst eine Algen-Nährlösungs-Suspension entsteht, aus welcher dann die Algenbiomasse durch Zellwachstum und Zellvermehrung gewonnen wird, **dadurch gekennzeichnet, dass** nicht gentechnisch veränderte Algen eingesetzt werden und die Herstellung der Algenbiomasse in Gegenwart einer Lichtmenge von bis zu 40.000 Lux für die Dauer von 30 min bis 360 min pro Tag, über eine Dauer von bis zu 30 Tagen erfolgt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Herstellung der Algenbiomasse in Gegenwart einer Lichtmenge von 3.000 Lux bis 40.000 Lux, für die Dauer von 60 min bis 360 min pro Tag, vorzugsweise 60 min bis 240 min pro Tag, über eine Dauer von 1 Tag bis 14 Tagen, bevorzugt 2 Tagen bis 10 Tagen erfolgt.

3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Herstellung der Algenbiomasse in Abwesenheit von Licht erfolgt.

4. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Algen/Nährlösungs-Suspension und / oder der Nährlösung solange ein Gas, welches CO_2 enthält, zugegeben wird, bis sich in der Algen/Nährlösungs-Suspension und/oder Nährlösung ein pH-Wertbereich zwischen 4,5 und 7,0 eingestellt hat.

5. Verfahren nach Anspruch 1 oder 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Algen/Nährlösungs-Suspension während der Phase des Zellwachstums der

Algenbiomasse zusätzlich mindestens eine weitere organische Kohlenstoff-Quelle zugeführt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 1 oder 5, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Algen/Nährlösungs-Suspension im Reaktor durchmischt wird, insbesondere mittels eines Rührers.

7. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** als Algen Grünalgen, insbesondere aus der Familie der Chlorococcales, ganz bevorzugt Mikroalgen der Gattung Chlorella eingesetzt werden

8. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** als CO_2 enthaltendes Gas ein Abgas aus Feuerungsanlagen, vorzugsweise Blockheizkraftwerken, aus Verbrennungsprozessen, aus Verbrennungsmotoren oder aus Fermentationsanlagen eingesetzt wird, wobei das Abgas bevorzugt vor Einleitung in die Nährlösung abgekühlt wird.

9. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1, 4 oder 5, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Nährlösung aus nährstoffreichen Abwässern, insbesondere einer Kläranlage und / oder einer Biogasanlage besteht.

10. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 oder 9, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Nährlösung als weitere organische Kohlenstoffquelle mindestens ein Einfach- und/oder Mehrfachzucker zugegeben wird, bevorzugt Glucose in einer Konzentration von 0,1 g/l bis 10 g/l Nährlösung.

11. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1, 9 oder 10, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Nährlösung Wasser, Stickstoffverbindungen, Phosphate, Kalium-, Calcium-, Magnesiumverbindungen und Spurenelemente enthält, die ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Bor, Kupfer, Eisen, Mangan, Molybdän und / oder Zink.

12. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 oder 9 bis 11, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Abtrennung der Biomasse in an sich bekannter Weise erfolgt und die Nährlösung in den Reaktor kontinuierlich oder diskontinuierlich zurückgeführt wird.

13. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1, oder 9 bis 12, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Nährlösung auch Hydrolysate von Polysacchariden, sowie Lignocellulosen einschließlich Lignin und / oder Salze von Carbonsäuren wie Acetate zugesetzt sind.

14. Verwendung der Algenbiomasse, erhältlich nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 13, als Ausgangsstoff für die Herstellung von Biodiesel oder Ethanol.

15. Verwendung der Algenbiomasse, erhältlich nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 13, als Bestandteil von Futtermittel oder als Futtermittel für Wirbeltiere, insbesondere Nutz- und Haustiere.

16. Verwendung der Algenbiomasse, erhältlich nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 13, als Ausgangsstoff für die Herstellung von Biogas.

17. Verwendung der Algenbiomasse, erhältlich nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 13, als Ausgangsstoff für die Herstellung von Bioschäumen.

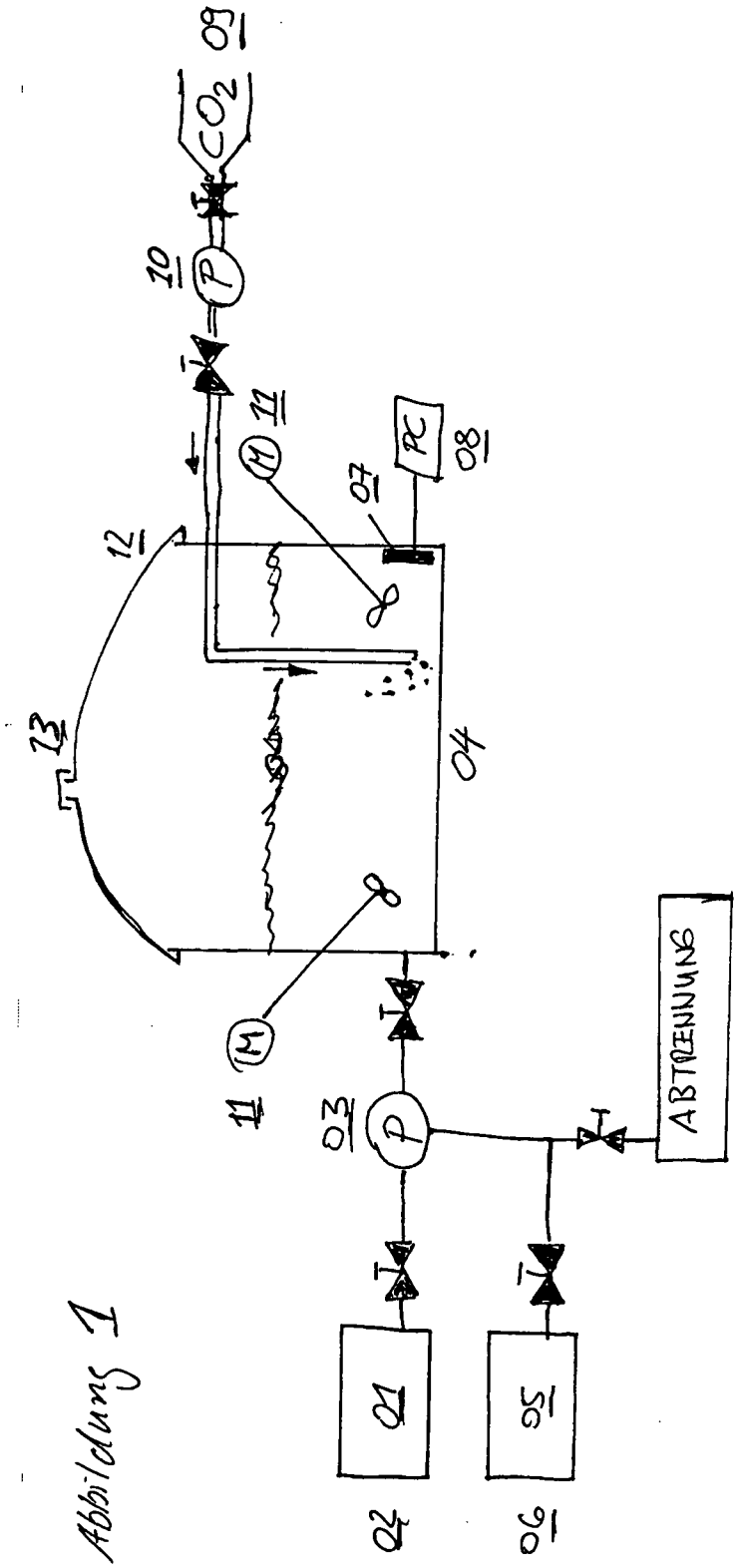


Abbildung 1

Fig. 1

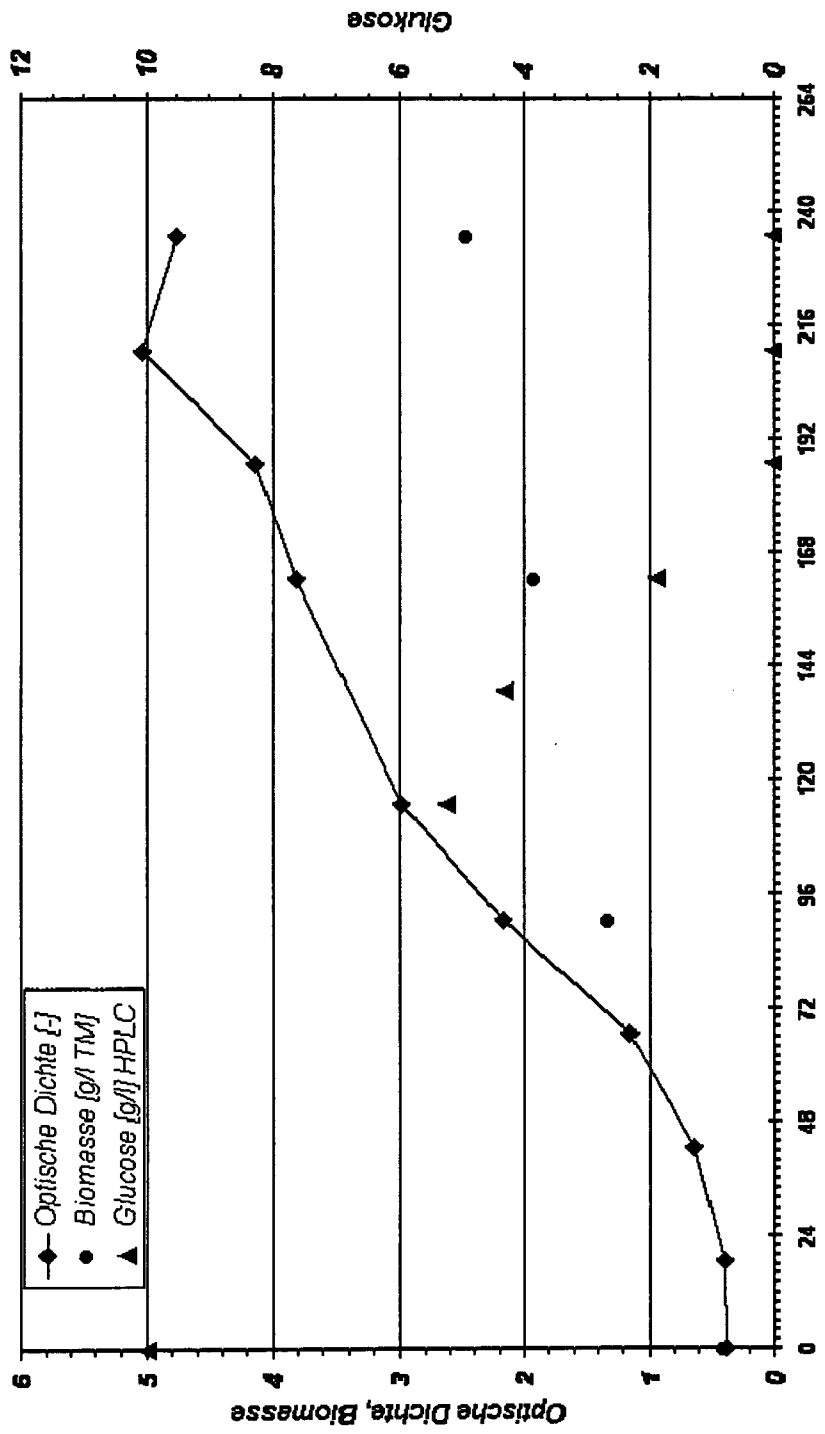

Glukose
Optische Dichte, Biomasse
Zeit[h]
Optische Dichte [-]
Biomasse [g/l TM]
Glucose [g/l] HPLC
0
2
4
6
8
10
12
0
1
2
3
4
5
6
0
24
48
72
96
120
144
168
192
216
240
264

Fig. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/003231

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N1/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12M C12N A01G

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 3 444 647 A (TAKAHASHI MASAHITO) 20 May 1969 (1969-05-20) column 1, line 15 - line 25 column 2, line 23 - line 26 claims 1,2 examples I,V,VI	1-17
A	US 4 043 903 A (DOR INKA) 23 August 1977 (1977-08-23) claims 1,2; example 1	1-17
A	DE 14 42 113 A1 (YAKULT HONSHA KK) 9 October 1969 (1969-10-09) the whole document	1-17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
27 Oktober 2009	05/11/2009

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Fax: (+31–70) 340–3016	Cubas Alcaraz, Jose

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2009/003231

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 3444647 A	20-05-1969	NONE	
US 4043903 A	23-08-1977	IL 46022 A	30-06-1977
		JP 51082784 A	20-07-1976
DE 1442113 A1	09-10-1969	GB 1109658 A	10-04-1968
		US 3316674 A	02-05-1967

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2009/003231

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. C12N1/12

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C12M C12N A01G

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 3 444 647 A (TAKAHASHI MASAHITO) 20. Mai 1969 (1969-05-20) Spalte 1, Zeile 15 - Zeile 25 Spalte 2, Zeile 23 - Zeile 26 Ansprüche 1,2 Beispiele I,V,VI	1-17
A	US 4 043 903 A (DOR INKA) 23. August 1977 (1977-08-23) Ansprüche 1,2; Beispiel 1	1-17
A	DE 14 42 113 A1 (YAKULT HONSHA KK) 9. Oktober 1969 (1969-10-09) das ganze Dokument	1-17

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
27. Oktober 2009	05/11/2009

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Cubas Alcaraz, Jose

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2009/003231

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 3444647 A	20-05-1969	KEINE	
US 4043903 A	23-08-1977	IL 46022 A	30-06-1977
		JP 51082784 A	20-07-1976
DE 1442113 A1	09-10-1969	GB 1109658 A	10-04-1968
		US 3316674 A	02-05-1967