



Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen

Academiejaar 2012-2013

Een nieuwe route voor de productie van 1,3-propaandiol vanuit glycerol in BES

Tom Callewaert

Promotor: Prof. Dr. ir. Korneel Rabaey

Tutor: M.Sc. Jan Arends

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van
Master in de bio-ingenieurswetenschappen: Cel- en genbiotechnologie



Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen

Academiejaar 2012-2013

Een nieuwe route voor de productie van 1,3-propaandiol vanuit glycerol in BES

Tom Callewaert

Promotor: Prof. Dr. ir. Korneel Rabaey

Tutor: M.Sc. Jan Arends

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van
Master in de bio-ingenieurswetenschappen: Cel- en genbiotechnologie

Auteursrecht

“De auteur en de promotor geven de toelating deze scriptie voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting de bron te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit deze scriptie.”

“The author and the promoter give the permission to use this thesis for consultation and to copy parts of it for personal use. Every other use is subject to the copyright laws, more specifically the source must be extensively specified when using results from this thesis.”

Gent, juni 2013

De promotor
Prof. Dr. Ir. Korneel Rabaey

De tutor
M. Sc. Jan Arends

De auteur
Tom Callewaert

Voorwoord

Los van de theoretische basis die je tijdens uw opleiding in handen krijgt, leer je pas echt hoe alles in elkaar zit eenmaal je van de praktijk kan proeven. En hoe mooi theorie ook kan zijn, in het echte leven loopt alles vaak minder van een leien dakje, zo ook mijn voorbije jaar. Labowerk gaat gepaard met veel problematiek, die je stap voor stap ontdekt. Gelukkig kon ik rekenen op steun vanuit diverse hoek zowel binnen LabMET, InBio als bij mijn collega's van de Chiro, jeugdtraad, jeugdhuis en vrienden en familie.

Als eerste wil ik graag mijn promotor Prof. Rabaey bedanken voor de vele goede raad, het bijsturen indien nodig en de kans om dit onderzoek uit te voeren. Daarnaast wens ik Prof. Rabaey eveneens te bedanken voor de gelegenheid om mijn eerste conferentie te kunnen bijwonen, de EU-ISMET meeting van begin september 2012.

Verder wens ik mijn tutor Jan te bedanken, in eerste instantie voor zijn vele geduld en begrip. Het was een bewogen jaar, waar enkele grote activiteiten in mijn verenigingsleven een grote hap van mijn tijd in beslag namen. Dankzij de nodige planning, werd het voor mij mogelijk om alles te combineren. Naast staalnames in het weekend was Jan er steeds voor de nodige opvolging, discussie en ondersteuning. Een perfectionist, maar een droom van een begeleider. Jan, ik wens u het beste met het schrijven van uw doctoraat en uw verdere carrière.

Tijdens het voorbije jaar was het een heen-en-weer geloop tussen twee labo's. Graag wil ik Marieke Vandenheede bedanken voor haar hulp bij het opstarten van mijn thesis en het jaar rond voor de begeleiding met de HPLC en al het werk dat bij InBio plaatsvond.

Ook een dankwoord voor Rosemarie De Weirdt, voor het opstarten van de *Lactobacillus* experimenten, de analyse met de HPLC en lezen en corrigeren van deze thesis.

Verder nog een woord van dank voor Jo De Vrieze die de vele problemen met gaskolommen wist te verhelpen.

Los van de georganiseerde discussiemomenten zijn er de vele vragen die terloops in het labo of in de gangen een antwoord kregen. De wetenschappelijke en andere gesprekken met medestudenten, PhD's en postdocs, ATP en secretariaat waren een aangename afwisseling en bijdrage gedurende het jaar. Ook bij InBio wens ik de vele mensen te bedanken die me hielpen met allerlei zaken tussen hun eigen werk in.

Naast het labowerk moet er ook iets op papier komen, een werkzaamheid die niet altijd vlotte zoals gepland. Dank aan mijn vriendin An die tot vervelens toe mijn frustraties moest aanhoren, me bleef steunen en dit eindwerk ook hielp corrigeren. De boog mag echter niet altijd gespannen staan en daar hebben een hele hoop familie en vrienden voor helpen zorgen. Dank aan mijn collega's uit het verenigingsleven voor een memorabel afgelopen jaar.. Ook een woord van dank voor mijn vader die meerdere figuren in deze thesis uitgetekend heeft. Dank aan allen die het voorbije jaar zo mooi maakten.

Samenvatting

Met als doel de competitiviteit en duurzaamheid van de biodiesel industrie te vergroten, wordt veel onderzoek verricht naar mogelijke toepassingen en valorisatie van zijproducten zoals bijvoorbeeld glycerol. In dit onderzoek wordt de conversie van glycerol (0,5 euro/kg (Kerr *et al.*, 2007)) naar 1,3-propaandiol (1,3-PDO, 1,36 euro/kg (Kraus, 2008)), een interessante grondstof voor onder andere de polymeerindustrie, onder de loep genomen.

Naast batchtesten met glucose en H₂ werd de mogelijkheid van elektrische stroom onderzocht als cosubstraat. Elektrische stroom is een goedkoper alternatief en kan het proces eventueel beter sturen. Diverse pure culturen - zowel natuurlijke (*Citrobacter werkmanii* DSM17579 en *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 6475) als gemodificeerde stammen (*Citrobacter werkmanii* DSM17579 Δ dhaD Δ ldhA Δ adhE::ChlFRT) - worden getest in een bio-elektrochemisch systeem (BES) en dit bij verschillende stroomsterktes (-10 en -100 mA).

Behalve de productie op zich werd in dit onderzoek eveneens het effect van de opgelegde stroomsterkte onderzocht en enkele mogelijke mechanismen van het elektronentransport van naderbij bekeken. Door het werken met testen op stikstofrijke en stikstofarme media kan de relatie tussen groei en 1,3-PDO productie verder uitgediept worden. Voor de testen met de natuurlijke en gemodificeerde *C. werkmanii* stam wordt eveneens het effect van het al dan niet toedienen van antibiotica onderzocht.

Een maximale efficiëntie van 0,43 mol 1,3-PDO gevormd per mol glycerol verwijderd, werd bereikt door de gemodificeerde triple knock-out van *C. werkmanii*. Een theoretisch maximale efficiëntie werd behaald in het oorspronkelijk onderzoek op een glycerol-glucose substraat (Maevoet, 2012), doch in BES ligt de titer hoger (12,04 g/L in vergelijking met 8,16 g/L).

C. werkmanii wild type bereikt in dit onderzoek een efficiëntie van 0,42 mol/mol met een maximale concentratie van 11,20 g/L. Bij een opgelegde stroom van -10 mA worden coulombische efficiënties bereikt van 100% of hoger.

Productie in BES door *L. reuteri* levert een titer toename die 140 maal hoger ligt in vergelijking met de batch testen. De efficiëntie (0,25 mol/mol) en titer (7,01 g/L) liggen lager dan de *Citrobacter* stammen.

Algemeen werden hogere efficiënties en titers bereikt in BES. Dit opent deuren voor verder onderzoek.

Deze studie werd beëindigd met enkele batch testen met een gemengde cultuur en een vooronderzoek betreffende een eenvoudiger medium. De maximale titer in batch (7,21 g/L) bereikt in dit onderzoek werd geproduceerd door de mengcultuur op een glycerol substraat. Opbrengefficiënties in batch van 0,39 mol/mol zonder cosubstraat en 0,24 mol/mol met glucose bij deze gemengde culturen zijn veelbelovend voor testen in BES.

Vooronderzoek op een minder complex medium, M9, levert bij alle pure culturen 1,3-PDO productie op. Een lagere opbrengst door de *Citrobacter* stammen stelt het toekomstig gebruik

van M9 in twijfel. Productie door *L. reuteri* neemt wel toe op dit eenvoudige medium.

Tot slot werd een economische vergelijking gemaakt tussen 1,3-PDO productie door de gemodificeerde *C. werkmanii* in batch fermentatie of in BES gebaseerd op de resultaten uit dit onderzoek. Hieruit blijkt dat productie op basis van elektrische stroom bijna dubbel zo winstgevend kan zijn.

Abstract

The need for more sustainable industrial production of bulk chemicals and energy encourages the industrial production of biodiesel. In order to become a competitive player on the market, a lot of research is focussing on the valorisation of sidestreams from this biorefineries. Glycerol is such a sidestream and can biologically be converted into 1,3-propanediol (1,3-PDO), an interesting chemical compound for creating polymers.

This research focuses on the use of electrical current as an alternative cosubstrate, replacing other more expensive cosubstrates as hydrogen gas and glucose. By testing pure cultures of natural 1,3-PDO producing strains (*Citrobacter werkmanii* DSM17579 en *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 6475) and a modified strain (*Citrobacter werkmanii* DSM17579 Δ dhaD Δ ldhA Δ adhE::ChlFRT) in a bio-electrochemical system (BES) and in batch, the production of 1,3-PDO has been compared.

Next to production of 1,3-PDO in BES this research examines the influence of applied current and tries to define the mechanism of electrontransport. Furthermore the correlation between growth and 1,3-PDO production is being tested by cultivation on nitrogenlacking media. For the *Citrobacter* strains the usage of antibiotics is being explored.

The modified strain of *C. werkmanii* generates a maximum efficiency of 0,43 mol 1,3-PDO produced per mol glycerol consumed. Higher values of 1,00 mol/mol have been obtained earlier (Maervoet, 2012), but in BES a higher concentration is reached (12,04 g/L compared to 8,16 g/L).

The wild type strain of *Citrobacter* reaches an equally high efficiency of 0,42 mol/mol with a maximum concentration of 11,20 g/L. Coulombic efficiencies of 100% or higher are reached on a fixed current of -10 mA.

Production by *L. reuteri* in BES reaches an increase of 140 times the concentration reached in the batch tests. However efficiency (0,25 mol/mol) and maximum concentration (7,01 g/L) is lower compared to *Citrobacter*.

In general BES generates a higher efficiency and higher concentrations of 1,3-PDO. Some hypotheses concerning electrontransport are being postulated here, but more research is needed before making strong conclusions.

Furthermore some batch tests have been performed using a mixed culture of glycerol fermenters and the possibility of using a less complex media has been investigated. The maximum batch concentration of 1,3-PDO reached in this research was produced by the mixed culture with glycerol as sole carbon source. The high efficiencies in batch - 0,39 mol/mol on glycerol and 0,24 mol/mol with glucose as cosubstrate - are most promising for further research in BES. Production of 1,3-PDO on M9, a less complex medium in comparison with the used Boenigk minimal medium, is accomplished. However efficiencies are a lot lower with the *C. werkmanii* strains. Production by *L. reuteri* increases.

Finally an economical comparison for the production of 1,3-PDO by the modified *C. werkmanii* strain between batch fermentation and BES has been made based on the results of this research. Production based on electrical current could generate almost double the profit.

Inhoudsopgave

Auteursrecht	i
Voorwoord	iii
Samenvatting	v
Abstract	vii
Lijst van gebruikte afkortingen	xiii
Lijst van figuren	xv
Lijst van tabellen	xvii
1 Literatuurstudie	1
1.1 Inleiding	1
1.2 Industriële productie van 1,3-PDO	2
1.2.1 Introductie	2
1.2.2 Chemische synthese	2
1.2.3 Bacteriële synthese	3
1.3 Optimalisatie van de bacteriële 1,3-PDO productie	7
1.3.1 Genetische modificatie	7
1.3.2 Cosubstraat	8
1.3.3 Immobilisatie	8
1.3.4 Microbiële elektrolyse (MES)	9
1.4 Bio-elektrochemische systemen (BES)	9
1.4.1 Introductie	9
1.4.2 Microbiële brandstofcellen	10
1.4.3 Microbiële elektrolyse cellen	10
1.4.4 Materialen	11
1.4.5 Elektronentransport	12
2 Hypothese en Doelstellingen	15
3 Materiaal en methoden	17
3.1 Cultuurmedia	17
3.2 Micro-organismen	17
3.2.1 Préculturen	19
3.3 Experimentele opstelling	19
3.3.1 Batch testen in serumfleses	19

3.3.2	Uitplatingen	20
3.3.3	BES experimenten	20
3.4	Analytische methoden	23
3.4.1	Fysicochemische parameters	23
3.4.2	Gasbepalingen	26
3.5	Berekeningen	26
3.5.1	Standaarddeviatie	26
3.5.2	Partieeldruk en opgeloste H ₂ concentratie	26
3.5.3	Elektronequivalenten	27
3.5.4	Stroom	28
3.5.5	Vermogen en energie	28
3.5.6	Opbrengstefficiëntie	29
3.5.7	Coulombische efficiëntie	29
4	Resultaten	31
4.1	Batch testen in serumflessen	31
4.1.1	<i>Citrobacter werkmanii</i> wild type	32
4.1.2	<i>Citrobacter werkmanii</i> triple knock-out	33
4.1.3	<i>Lactobacillus reuteri</i>	34
4.1.4	Mengculturen	35
4.2	Bio-elektrochemische systemen	36
4.2.1	<i>Citrobacter werkmanii</i> wild type	36
4.2.2	<i>Citrobacter werkmanii</i> triple knock-out	41
4.2.3	<i>Lactobacillus reuteri</i>	45
4.3	Overzicht	49
4.3.1	1,3-propaandiol productie	49
4.3.2	BES parameters	53
4.4	Medium testen	54
5	Discussie	55
5.1	1,3-PDO productie in BES	55
5.1.1	<i>C. werkmanii</i> wild type	56
5.1.2	<i>C. werkmanii</i> triple knock-out	56
5.1.3	<i>Lactobacillus reuteri</i>	57
5.1.4	1,3-PDO productie bij verschillende stammen	58
5.1.5	Gemengde culturen	58
5.2	Elektrische stroom als cosubstraat & Elektronentransport	59
5.3	Effect van stroomsterkte	60
5.4	Katalytisch vermogen	60
5.4.1	<i>Citrobacter werkmanii</i> wild type	61
5.4.2	<i>Citrobacter werkmanii</i> triple knock-out	61
5.4.3	<i>Lactobacillus reuteri</i>	62
5.5	Effect van antibiotica	62
5.6	M9 als minimaal medium	63
5.7	Economische haalbaarheid	63
6	Conclusie	65
7	Toekomstperspectieven	67

Bibliografie	69
Appendices	75
A Colony PCR	75
A.1 Materiaal en Methoden	75
A.1.1 Polymerase chain reaction	75
A.1.2 Gelelektroforese	76
A.2 Resultaten	76
B Serumtesten: Groei en pH-curves	77
B.1 <i>Citrobacter werkmanii</i> wild type	77
B.2 <i>Citrobacter werkmanii</i> triple knock-out	77
B.3 <i>Lactobacillus reuteri</i>	78
B.4 Mengculturen	79
C Bio-elektrochemische systemen	81
C.1 Cyclische voltammetrie	81
C.1.1 <i>Citrobacter werkmanii</i> wild type	81
C.1.2 <i>Citrobacter werkmanii</i> triple knock-out	84
C.1.3 <i>Lactobacillus reuteri</i>	86
D Medium testen	87

Lijst van gebruikte afkortingen

1,3-PDO	1,3-Propaandiol
3-HPA	3-Hydroxypropanal
BES	Bio-elektrochemisch systeem
Boenigk MM	Boenigk minimaal medium
$\varepsilon_{Cb}(1,3\text{-PDO})$	Coulombische efficiëntie van glycerolconversie naar 1,3-PDO
$\varepsilon_{Cb}(\text{H}_2)$	Coulombische efficiëntie van H_2 -productie
HRT	Hydraulische retentietijd
InBio	Laboratorium 'Industrial Biotechnology and Biocatalysis'
LabMET	Laboratory of Microbial Ecology and Technology
LB	Luria Broth
MEC	Microbiële elektrolysecel
MES	Microbiële elektrosynthese
MFC	Microbiële brandstofcel
NAD(P)H	Nicotinamide adeninedinucleotide (fosfaat)
P_{CO_2}	Partieeldruk van CO_2
P_{H_2}	Partieeldruk van H_2
RI	Refractie index
SHE	Standaard waterstof elektrode

Lijst van figuren

Literatuurstudie	1
1.1 Wereldwijde productie van biodiesel en glycerol	1
1.2 Chemische synthese 1,3-PDO	3
1.3 Pathway van glycerolconversie	4
1.4 Opbouw en toepassingen BES	10
Materiaal en methoden	17
3.1 Experimentele opstelling BES	20
3.2 Opbouw BES reactor	21
3.3 HPLC grafiek standaardmix	24
3.4 HPLC standaardcurve (Mix)	25
3.5 HPLC standaardcurve (Gly & 1,3-PDO)	25
Resultaten	31
Batch testen	31
4.1 Profiel van de glyceroldegradatie	31
4.2 Substraatconversie serumtest <i>C. werkmanii</i> WT	32
4.3 P_{H_2} en P_{CO_2} serumtest <i>C. werkmanii</i> WT	33
4.4 Substraatconversie serumtest <i>C. werkmanii</i> 3KO	33
4.5 P_{H_2} en P_{CO_2} serumtest <i>C. werkmanii</i> 3KO	34
4.6 Substraatconversie serumtest <i>L. reuteri</i>	34
4.7 P_{H_2} en P_{CO_2} serumtest <i>L. reuteri</i>	35
4.8 Substraatconversie serumtest mengcultuur	35
4.9 P_{H_2} en P_{CO_2} serumtest mengcultuur	36
BES testen	36
4.10 Groei- en pH-curve BES <i>C. werkmanii</i> WT	37
4.11 Substraatconversie BES <i>C. werkmanii</i> WT	38
4.12 Gasproductie BES <i>C. werkmanii</i> WT	39
4.13 Kathodepotentiaal BES <i>C. werkmanii</i> WT	39
4.14 Groei- en pH-curve BES <i>C. werkmanii</i> 3KO	41
4.15 Substraatconversie BES <i>C. werkmanii</i> 3KO	42

4.16	Gasproductie BES <i>C. werkmanii</i> 3KO	43
4.17	Kathodepotentiaal BES <i>C. werkmanii</i> 3KO	44
4.18	Groei en pH-curve BES <i>L. reuteri</i>	46
4.19	Substraatconversie BES <i>L. reuteri</i>	47
4.20	Gasproductie BES <i>L. reuteri</i>	47
4.21	Kathodepotentiaal BES <i>L. reuteri</i>	48
Overzicht		49
4.22	Overzicht 1,3-PDO productie	50
4.23	Overzicht kathode- en celpotentiaal BES	53
4.24	Overzicht vermogen BES	53
Medium testen		53
4.25	Substraatconversie mediumtesten	54
Discussie		55
5.1	1,3-PDO productie <i>C. werkmanii</i> WT (N)	56
5.2	1,3-PDO productie <i>C. werkmanii</i> 3KO (N)	57
5.3	1,3-PDO productie <i>L. reuteri</i> (N)	57
5.4	1,3-PDO productie gemengde cultuur (N)	58
5.5	1,3-PDO productie <i>C. werkmanii</i> WT	61
5.6	1,3-PDO productie <i>C. werkmanii</i> 3KO	61
5.7	1,3-PDO productie <i>L. reuteri</i>	62
5.8	Effect van antibiotica	62
5.9	Opbrengstefficiënties op verschillende media	63
Appendix		75
A.1	cPCR <i>C. werkmanii</i> WT	76
B.1	Groei- en pH-curve serumtest <i>C. werkmanii</i> WT	77
B.2	Groei- en pH-curve serumtest <i>C. werkmanii</i> 3KO	78
B.3	Groei- en pH-curve serumtest <i>L. reuteri</i> (anaëroob)	78
B.4	Groei- en pH-curve serumtest mengcultuur	79
C.1	Cyclische voltammetrie (1 mV/s) BES <i>C. werkmanii</i> WT	82
C.2	Cyclische voltammetrie (50 mV/s) BES <i>C. werkmanii</i> WT	83
C.3	Cyclische voltammetrie (1 mV/s) BES <i>C. werkmanii</i> 3KO	84
C.4	Cyclische voltammetrie (50 mV/s) BES <i>C. werkmanii</i> 3KO	85
C.5	Cyclische voltammetrie BES <i>L. reuteri</i>	86
D.1	Groei-curve op verschillende media	87
D.2	pH-curve op verschillende media	87

Lijst van tabellen

Literatuurstudie	1
1.1 Gemodificeerde 1,3-PDO producenten	6
Materiaal en methoden	17
3.1 Boenigk MM	17
3.2 <i>C. werkmanii</i> DSM17579 mutanten	18
3.3 HPLC RI retentietijden	23
Resultaten	31
4.1 Antibioticatest BES <i>C. werkmanii</i> WT (N-rijk)	36
4.2 Coulombische efficiëntie BES <i>C. werkmanii</i> WT	40
4.3 Coulombische efficiëntie BES <i>C. werkmanii</i> 3KO	45
4.4 Coulombische efficiëntie BES <i>L. reuteri</i>	49
4.5 Titers 1,3-PDO productie	51
4.6 Productiviteit 1,3-PDO productie	52
4.7 Overzicht Coulombische efficiënties BES	52
Discussie	55
5.1 Gemodificeerde 1,3-PDO producenten (beknopt)	56
Appendix	75
A.1 Mastermix cPCR	75

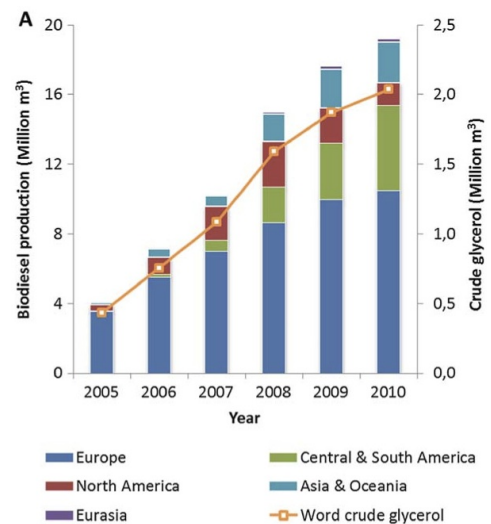
Hoofdstuk 1

Literatuurstudie

1.1 Inleiding

Jaarlijks stijgt wereldwijd de energievraag met 1,8% en het gebruik van fossiele brandstoffen is gelimiteerd aan de bestaande reserves (Emonts *et al.*, 2012). Bovendien is hun gebruik verantwoordelijk voor zo'n 57% van de uitstoot van broeikasgassen, die aan de oorzaak liggen van de opwarming van de aarde (IPCC, 2007). In 2007 was 76,3% van de emissies afkomstig van de verbranding van fossiele brandstoffen en cementproductie (Boden *et al.*, 2010). De bestaande reserves van aardolie, aardgas en steenkool kunnen nog tot 2112 als energiebron dienen, waarbij steenkool als enige beschikbaar blijft na 2042 (Shafiee & Topal, 2009). Deze nakende tekorten en milieuproblematiek liggen aan de basis om op zoek te gaan naar hernieuwbare energiebronnen (Anand & Saxena, 2012).

In de zoektocht naar hernieuwbare energie speelt biotechnologie een voorname rol met biodiesel als koploper. De wereldwijde synthese van biodiesel wordt geschat een jaarlijkse productie van ongeveer 140 miljard liter te bereiken tegen 2016 (Anand & Saxena, 2012). Een gekend probleem van bio-energie is nog steeds de productiekost. Deze kosten kunnen echter verlaagd worden indien afvalstromen kunnen worden omgezet in zij- of nevenstromen met een hoge toegevoegde waarde (Almeida *et al.*, 2012). Eén van die zijstromen is glycerol afkomstig van de biodieselproductie (10% (m/m)) (Yang *et al.*, 2012)(Figuur 1.1). Doorgerekend betekent dit een jaarlijkse productiestroom van ongeveer 15 miljard liter glycerol tegen 2016. De wereldprijs van pure glycerol is door de verhoogde productie gedaald naar 0,50 euro per kilogram en ook de prijs voor ruwe glycerol ligt gevoelig laag (€0,09 /kg)(Kerr *et al.*, 2007).



Figuur 1.1: Wereldwijde productie van biodiesel en glycerol (Almeida *et al.*, 2012)

De laatste jaren is veel onderzoek gedaan naar mogelijke toepassingen van ruwe glycerol om zo de winstmarge en competitiviteit van de biodiesel industrie te vergroten. In de veevoederindu-

strie is al meerdere decennia een vermoeden dat glyceroladditie een ketose¹ remmende werking heeft. De relatief hoge glycerolkost en onvoldoende bewijs van deze remmende werking weerhield de industrie om glycerol te supplementeren (Fisher *et al.*, 1973; Gröhn *et al.*, 1999). Naast de veevoederindustrie wordt glycerol voornamelijk gebruikt in de farmaceutische, cosmetische en voedingsindustrie als solvent, zoetstof en bindmiddel (Maervoet *et al.*, 2011).

Daarnaast wordt het potentieel van glycerol als grondstof van chemische producten onderzocht. Glycerol wordt gebruikt voor de conversie tot tal van economisch hoogwaardigere stoffen, bijvoorbeeld conversie tot acroleïne, een molecule met toepassingen in de polymeer en detergent productie (Maervoet *et al.*, 2011). Naast klassieke katalytische conversie worden tevens de mogelijkheden van biologische conversie nader bekeken. Eén van de meest bestudeerde routes is de conversie tot 1,3-propaandiol (1,3-PDO) (Almeida *et al.*, 2012; Maervoet, 2012; Yang *et al.*, 2012).

1.2 Industriële productie van 1,3-PDO

1.2.1 Introductie

1,3-Propaandiol (1,3-PDO) (in het verleden trimethyleenglycol genoemd) is een fermentatieproduct dat in 1881 ontdekt werd door August Freund. Door de aanwezigheid van twee hydroxylgroepen vindt het zijn toepassing in de polymeerproductie (polyester en polyurethaan). Sinds de ontdekking van het nieuwe polymeer polytrimethyleen terephthalaat (PTT) door de Shell company is de vraag naar 1,3-PDO enorm toegenomen. Naast de polymeerindustrie (polyester, thermoplastisch polyurethaan elastomeren (TPU), polytrimethyleen terephthalaat (PTT)) wordt 1,3-PDO gebruikt in vele industriële toepassingen (Saxena *et al.*, 2009), zoals:

- Cosmetica en detergenten
- Adhesieven, glijmiddelen en solventen
- Biocides: PCT-3015, 2-bromo-2-nitro-1,3-propaandiol
- Voeding en medicijnen
- Antivriess

Het is een kleurloos, lichtzoete en visceuze vloeistof, mengbaar met water en ethanol en bovendien biodegradeerbaar (Kaur *et al.*, 2012; Maervoet *et al.*, 2011). 1,3-PDO is niet corrosief en kan getransporteerd worden in vaten van roestvrij staal, aluminium of bekleed staal (Sullivan, 2000). De wereldprijs is door de betere technologie gedaald tot ongeveer 1,36 euro per kilogram (Kraus, 2008) en de wereldwijde markt werd geschat op 120 miljoen euro in 2012. Bovendien wordt door de prijsdaling een groei voorspeld zodat de wereldmarkt zo'n 430 miljoen euro wordt in 2019 (Markets and Markets, 2012). 1,3-PDO kan op diverse manieren geproduceerd worden, zowel chemisch als biologisch.

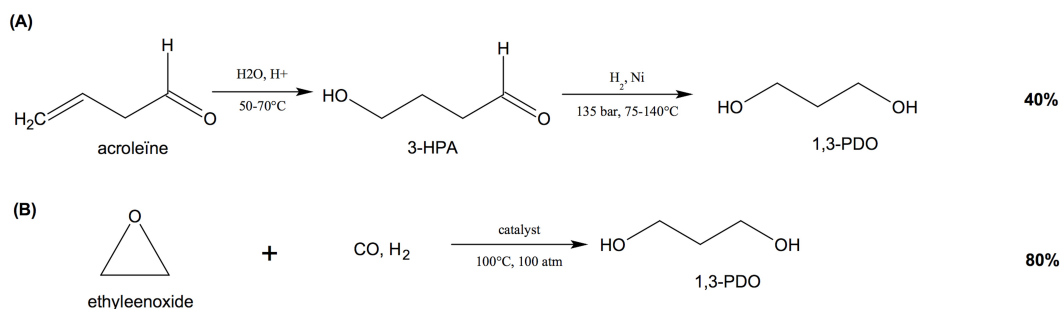
1.2.2 Chemische synthese

Voor de chemische synthese van 1,3-PDO bestaan meerdere processen, maar industrieel zijn er slechts twee van toepassing (Maervoet *et al.*, 2011).

Een eerste industrieel proces is dit van Degussa/DuPont waar gestart wordt van acroleïne en

¹Ketose is de verhoogde concentratie van ketonen in het bloed met een negatieve invloed op de melkproductie.

via hydratatie en katalytische hydrogenatie 1,3-PDO wordt verkregen met een opbrengst van ongeveer 40% (Figuur 1.2A). Een tweede proces is dit gebruikt door Shell dat door carbonylatie van ethyleenoxide en vervolgens hydrogenatie 1,3-PDO bekomt (Figuur 1.2B). Dit proces kan een opbrengst van 80% behalen (Saxena *et al.*, 2009).



Figuur 1.2: Chemische synthese van 1,3-PDO (Saxena *et al.*, 2009)

A. Degussa/Dupont methode startende van acroleïne (40% efficiëntie)

B. Shell methode uitgaande van ethyleenoxide (80% efficiëntie)

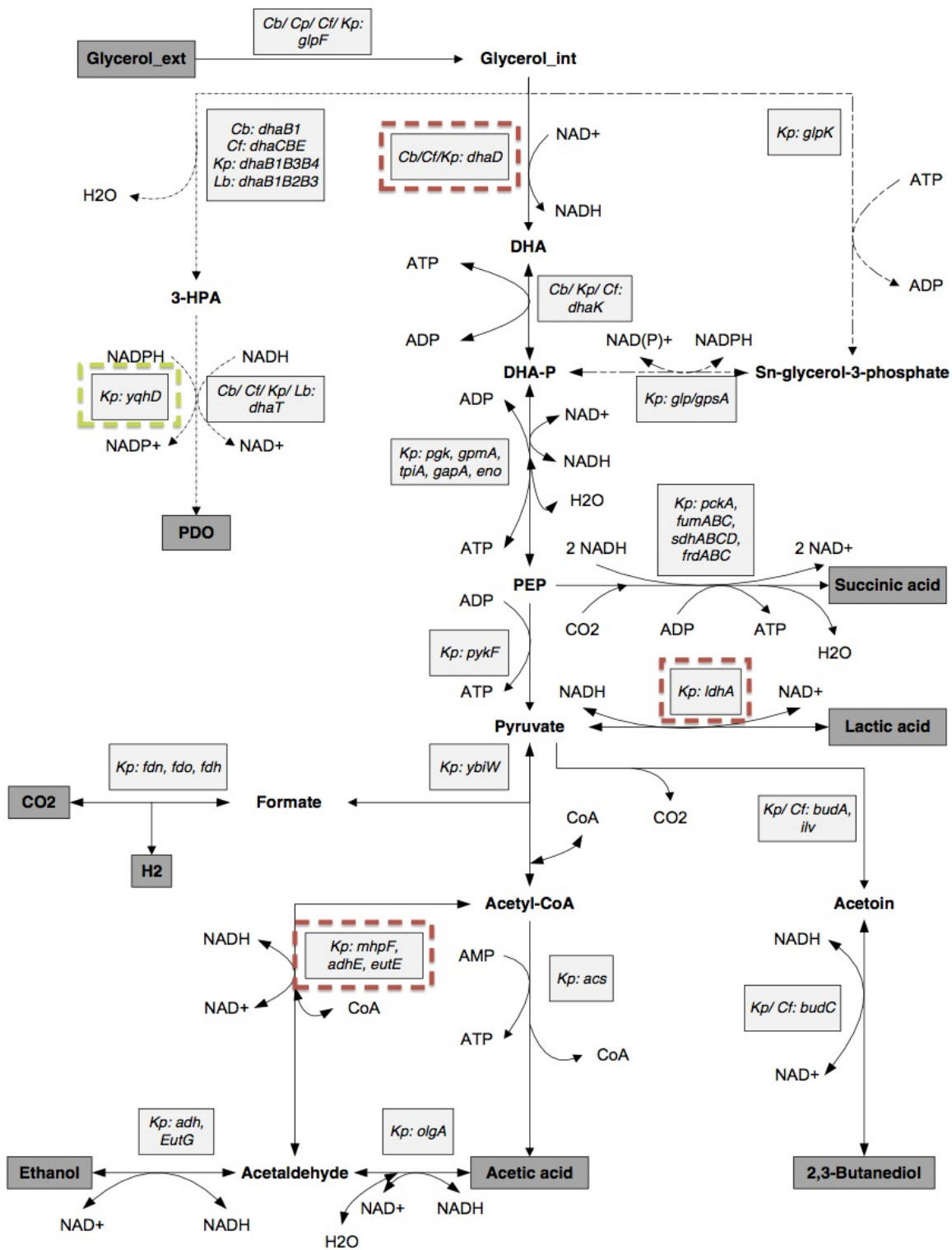
Het grote nadeel van deze chemische conversieprocessen is de noodzaak aan hoge druk en temperaturen. Verder zijn dure katalysatoren nodig (bijvoorbeeld Raney nikkel (Lawrence & Sullivan, 1972)) en worden toxische intermediären gegenereerd. Deze redenen maken de chemische synthese van 1,3-PDO te duur om te kunnen concurreren met de productie van andere alcoholen als 1,2-ethaandiol, 1,2-propaandiol of 1,4 butaandiol die relatief goedkoop en petrochemisch te verkrijgen zijn (Biebl *et al.*, 1999; Sullivan, 2000). Hierdoor wordt veel aandacht besteed aan de bacteriële synthese (Maervoet *et al.*, 2011; Saxena *et al.*, 2009).

1.2.3 Bacteriële synthese

Gedreven door uitputting van fossiele brandstoffen, milieu overwegingen en de vraag naar meer duurzaamheid, wordt steeds meer onderzoek gedaan naar microbiële productie van bulkchemicaliën (Saxena *et al.*, 2009). Er zijn vele bacteria gekend die suikers kunnen metaboliseren tot glycerol, maar dit niet verder kunnen converteren naar 1,3-PDO. Andere organismen zijn in staat glycerol (al dan niet in combinatie met suikers) om te zetten in 1,3-PDO, doch tot op heden is geen organisme gevonden dat suikers rechtstreeks kan omzetten tot 1,3-PDO (Saxena *et al.*, 2009).

Meerdere bacteriële genera bezitten de capaciteit om glycerol te converteren in 1,3-PDO. Genera als *Klebsiella* (Forage & Foster, 1982), *Citrobacter* (Homann *et al.*, 1990), *Enterobacter* (Barbirato *et al.*, 1995), *Lactobacilli* (Schütz & Radler, 1984) en zelfs enkele niet-pathogene *Clostridia* species (Abbad-Andaloussi *et al.*, 1995) zijn hiervoor gekend. Aangezien de meeste genera opportunistische pathogenen omvatten, is enige voorzichtigheid zeker geboden (Saxena *et al.*, 2009). De meeste species zijn anaëroob of facultatief anaëroob.

Maervoet (2012) optimaliseerde de 1,3-PDO productie bij *Citrobacter* species. Daarnaast zijn mengculturen van glycerolfermenteerders en snelgroeiende species als *Lactobacillus* natuurlijke producenten van 1,3-PDO.



Figuur 1.3: Pathway van glycerolconversie
 Samengestelde pathway van natuurlijke glycerol metaboliserende organismen (Maervoet, 2012)

Glycerol kan via twee verschillende reacties - oxidatief of reductief - in het metabolisme worden opgenomen (Figuur 1.3).

- **Oxidatieve pathway** Enerzijds is er de oxidatieve pathway waar glycerol geconverteerd wordt tot een intermediair van de glycolyse. Eerst wordt glycerol geoxideerd door een glycerol dehydrogenase (gecodeerd door *dhaD*-gen) tot dihydroxyaceton (DHA). Dihydroxyaceton wordt vervolgens omgezet tot dihydroxyacetonfosfaat met behulp van de energiedrager adenosinetrifosfaat (ATP) en kan zo in de glycolyse worden opgenomen. Energie aangedragen door nicotinamide adeninedinucleotide (NADH) wordt gebruikt voor de vorming van producten zoals lactaat uit pyruvaat, acetaldehyde uit acetylcoenzymA (onder andere gecodeerd door respectievelijk het *ldhA*- en *adhE*-gen) en ethanol uit acetaldehyde.
- **Reductieve pathway** Anderzijds kan glycerol gemetaboliseerd worden via een reducerende pathway, waar eerst 3-hydroxypropanal (3-HPA) wordt gevormd. Dit intermediair aldehyde heeft een bacteriostatische werking die de groei en glycerolconversie inhibeert. Met de energie aangeleverd door NADH wordt 3-HPA omgezet tot 1,3-PDO door 1,3-PDO dehydrogenase (*dhaT*-gen)(Barbirato *et al.*, 1996; Maervoet, 2012; Saxena *et al.*, 2009).

Microbiële productie van 1,3-PDO door mengculturen

Bij onderzoek naar het potentieel van waterstofgas productie, wordt anaërobe fermentatie door mengculturen vanuit economisch perspectief verkozen boven methodes als elektrolyse of thermochemische productie (Li & Fang, 2007). Selembo *et al.* (2009) onderzocht het effect van een thermische voorbehandeling van het inoculum op deze mengculturen en het effect op glucose of glycerolfermentatie. Glycerolfermentatie biedt het voordeel boven glucose door de productie van 1,3-PDO als regeneratie pathway voor NADH. Naast de vergelijkende studie tussen glucose en glycerol, bekeek Selembo *et al.* (2009) het verschil tussen ruwe en zuivere glycerol. 1,3-PDO bleek als voornaamste fermentatieproduct geproduceerd te worden, gevolgd door acetaat en ethanol. Uit elektronenbalansen werd afgeleid dat voor pure glycerol zo'n 77% van de elektronen gerecupereerd werd in 1,3-PDO, voor ruwe glycerol was dit 65%. Deze waarde voor ruwe glycerol is vermoedelijk lager vanwege inhibitorische componenten in de glycerol. Het effect van diverse voorbehandelingen bleek miniem te zijn.

Dennis *et al.* (2013) bracht een mengcultuur van glycerol fermenters in een stroomgevoed bio-elektrochemisch systeem (BES) (zie 1.4) en bekeek de evolutie van de microbiële populatie en productie over de tijd. De eerste week waren *Citrobacter* species de dominante populatie (95-99%) met een voorname productie van 1,3-PDO en ethanol. Naarmate de tijd vordert, namen *Pectinatus* populaties de cultuur over om op hun beurt vervangen te worden door *Clostridium* species.

Microbiële productie van 1,3-PDO door monoculturen

In de literatuur zijn meerdere species te vinden die natuurlijke producenten zijn van 1,3-PDO (*Lactobacillus brevis* (Schütz & Radler, 1984), *Klebsiella* en *Citrobacter* stammen (Homann *et al.*, 1990), *Clostridia* en *Enterobacteriaceae* (Biebl *et al.*, 1999)). De meeste micro-organismen behoren tot de genera *Enterobacter*, *Lactobacillus* en *Clostridium*. Daarnaast zijn reeds meerdere studies gebeurt waar via genetische modificatie de opbrengstefficiëntie wordt verhoogd (Tabel 1.1).

Tabel 1.1: Beknopt overzicht van enkele gemodificeerde 1,3-PDO producenten (Almeida *et al.*, 2012).
^a percentage van theoretisch maximum.

Organisme	Type Fermentatie	Aërobie	Opbrengst (product/glycerol)	Productiviteit	Titer	Ref.
<i>K. pneumoniae</i> DSM 2026	Fed-batch	Micro-aëroob	0,52 mol/mol	1,57 g/L.h	59,50 g/L	Chen <i>et al.</i> (2003)
<i>K. pneumoniae</i> LDH 526	Fed-batch	Aëroob	0,52 mol/mol	2,13 g/L.h	102,1 g/L	Xu <i>et al.</i> (2009)
<i>C. butyricum</i> F2b	Batch	Anaëroob	0,53 g/g	1,05 g/L.h	47,1 g/L	Papanikolaou <i>et al.</i> (2008)
<i>E. coli</i> K12	Fed-batch	Anaëroob	90,2 % ^a	2,61 g/L.h	104,4 g/L	Tang <i>et al.</i> (2009)
<i>K. pneumoniae</i>	Fed-batch 1 m ³	Anaëroob	61 % ^a	2,2 g/L.h	75 g/L	Liu <i>et al.</i> (2007)
<i>C. werkmanii</i> DSM17579	Batch	Anaëroob	1,00 mol/mol	-	107,2 mM	Maervoet (2012)

De hoge opbrengstefficiënties door een gemodificeerde *Citrobacter werkmanii* (Maervoet, 2012) en de natuurlijke conversie ongerelateerd met groei door *Lactobacillus reuteri* maken dit geschikte kandidaten voor verder onderzoek.

- ***Lactobacillus* species** *Lactobacillus reuteri* is een bacterie afkomstig uit het spijsverteringsstelsel van mens en dier. *Lactobacilli* zijn in staat een diversiteit van antimicrobiële agentia te produceren (Axelsson *et al.*, 1989). Daarnaast werden reeds meerdere klinische studies verricht om het probiotisch effect van *L. reuteri* te bewijzen (Rosander *et al.*, 2008; Shornikova *et al.*, 1997a,b; Weizman *et al.*, 2005; Wolf *et al.*, 1995). Talarico *et al.* (1990) beschrijft het effect van glyceroladditie bij glucosefermentatie door *L. reuteri*. Onder andere een stijging van 1,3-PDO productie en een dalende ethanol concentratie werden geconstateerd. Groei door *L. reuteri* op glycerol blijkt echter onmogelijk, *Lactobacilli* hebben enkel de genen van de reductieve pathway (Veiga da Cunha & Foster, 1992).
- ***Citrobacter* species** Het genus *Citrobacter* bevat natuurlijke producenten van 1,3-PDO. De species zijn facultatief anaëroob, niet-sporulerend en hebben een opportunistisch pathogeen karakter². Verder zijn ze in staat om zowel aëroob als anaëroob 1,3-PDO te produceren, zelfs startende vanuit ruwe glycerol (Maervoet, 2012). De productie van 1,3-PDO is groeigerelateerd en gebeurt voornamelijk tijdens de exponentiële groeifase (Xu *et al.*, 2009).

1.3 Optimalisatie van de bacteriële 1,3-PDO productie

De bacteriële productie van 1,3-PDO biedt veel perspectief voor de toekomst, maar heeft tot op heden nog af te rekenen met enkele uitdagingen. Van de natuurlijke producenten van 1,3-PDO die hoge concentraties kunnen synthetiseren, zijn de meesten level 2 micro-organismen³. Bacteriële synthese biedt veel voordelen door het gebruik van hernieuwbare bronnen, maar heeft vaak te kampen met groei-inhibitie door het substraat, een lage opbrengst en synthese van bijproducten. Verder kan een moeilijke opzuivering of de noodzaak om grondstoffen een voorbereidende behandeling te geven de biotechnologische opmars hinderen (Barbirato *et al.*, 1996; Celińska, 2010).

Momenteel gebeurt veel onderzoek naar het belang van cosubstraten bij glycerolfermentatie, microbiële immobilisatie en de genetische modificatie van 1,3-PDO producenten (Celińska, 2010).

1.3.1 Genetische modificatie

Maervoet (2012) optimaliseerde *Citrobacter* species in hun productie van 1,3-PDO door middel van genetische modificatie. Door de expressie van één of meerdere genen te inhiberen, worden de oxidatieve pathway en/of sommige energieconsumerende reacties onmogelijk gemaakt. De studie concentreerde zich voornamelijk op *Citrobacter wermanii* DSM17579.

Maervoet (2012) bracht mutaties aan in het glycerol dehydrogenase (*dhaD*) gen om de conversie van glycerol optimaal te sturen richting 1,3-PDO. Deze mutatie zorgt er voor dat glycerol

²*Citrobacter rodentium* ligt aan de oorzaak van colonhyperplasie bij muizen (Luperchio & Schauer, 2001). Colonhyperplasie is overmatige groei van het colon door een abnormaal hoge celdeling.

³Level 2 micro-organismen liggen aan de oorzaak van milde menselijke ziekten (bijvoorbeeld mazelen of griep), wat hun industriële toepassingen beperkt (Celińska, 2010).

niet langer gemetaboliseerd kan worden via de oxydatieve pathway. Naast het sturen van de glycerolconversie kan tevens de omzetting van 3-HPA naar 1,3-PDO gestimuleerd worden door een stijgende intracellulaire energiec capaciteit in de vorm van NADH. Door het genetisch uitschakelen van één of meerdere niet essentiële NADH verbruikende reacties, ontstaat een energetisch overschot dat geconsumeerd kan worden door de cel voor de conversie van 3-HPA. Voorbeelden van deze knock-outs zijn het lactaat (*ldhA*) en het ethanol dehydrogenase (*adhE*) gen, respectievelijk leidend tot dalende lactaat en acetaldehyde concentraties.

De aldehyde groep van het intermediair 3-HPA interageert met het DNA en veroorzaakt zo schade en synthese inhibitie, met een stop in groei en glycerolconversie tot gevolg. In een poging de toxische invloed van 3-HPA te vermijden, introduceerde Maervoet (2012) een extra plasmide met een nieuw gen afkomstig van *Klebsiella pneumoniae*, tevens een natuurlijk glycerol metaboliserend organisme. Het eiwit 1,3-PDO oxidoreductase (gecodeerd door het *yqhD*-gen) helpt het natuurlijk aanwezige 1,3-PDO dehydrogenase (*dhaT*-gen) met de conversie, gebruikmakend van NADPH als energiebron in tegenstelling tot NADH van het natuurlijk aanwezige eiwit. Maervoet (2012) slaagde er in via deze genetische modificaties de 1,3-PDO productie tot de maximale theoretische opbrengst te krijgen ($1,02 \pm 0,04$ mol 1,3-PDO/mol glycerol) in aanwezigheid van glucose.

1.3.2 Cosubstraat

Het gebruik van cosubstraten die het gedeeltelijk cellulair verbruik van glycerol voor onderhoud en groei moeten vervangen is gedetailleerd onderzocht bij diverse micro-organismen (*Citrobacter* (Maervoet, 2012), *Lactobacillus* (Lüthi-Peng *et al.*, 2002; Talarico *et al.*, 1990), *Klebsiella pneumoniae* (Xiu *et al.*, 2007)...). Deze vorm van *bioprocess engineering* werd bij Maervoet (2012) toegepast volgens een ratio van 0,33 mol glucose/mol glycerol. Deze waarde benaderd 0,32 mol/mol, de optimale waarde voor maximale 1,3-PDO productie onder anaërobe omstandigheden volgens Xiu *et al.* (2007).

Lüthi-Peng *et al.* (2002) onderzocht het effect van glucose additie op glycerolfermentatie door *Lactobacillus reuteri*. De concentratie van gedoseerde glucose bleek te correleren met het geobserveerde glycerolmetabolisme. NADH, afkomstig van het glucose metabolisme, wordt preferentieel gebruikt voor de conversie van 3-HPA naar 1,3-PDO. De 3-HPA concentratie stijgt gedurende de eerste uren van incubatie, maar neemt dan geleidelijk af, terwijl de concentratie van 1,3-PDO toeneemt.

Talarico *et al.* (1990) toonde het effect aan van diverse cosubstraten op glycerolfermentatie door *L. reuteri*. Een positief groeieffect werd gevonden bij fermentatie op galactose, lactose, maltose en melibiose. Groei bij additie van D-xylose, L-arabinose of sucrose bleek niet beïnvloed te worden.

1.3.3 Immobilisatie

Naast het effect van cosubstraat additie, blijkt immobilisatie van de cultuur een invloed te hebben op de opbrengstefficiëntie van 1,3-PDO. Gungormusler *et al.* (2013) onderzocht het effect van de hydraulische retentietijd (HRT) op 1,3-PDO productie bij *Klebsiella pneumoniae* geïmmobiliseerd op diverse materialen. 1,3-PDO productie bij een lagere HRT blijkt hoger bij geïmmobiliseerde cellen in vergelijking met cellen in suspensie. Het gebruik van geïmmobiliseerde cellen in *packed-bed bioreactor* systemen opent mogelijkheden voor de continue productie van 1,3-PDO.

1.3.4 Microbiële elektrosynthese (MES)

Voor de omzetting van 3-HPA naar 1,3-PDO is energie nodig, aangebracht door dragers als NADH en NADPH. Door toevoeging van elektrische stroom aan diverse organismen is het mogelijk om reductie processen te sturen en stimuleren. Dit proces werd voor het eerst aangetoond door Cheng & Logan (2007) met de microbiële productie van waterstofgas.

Bacteriële enzymen of organellen kunnen geïmmobiliseerd worden op elektrode oppervlakken en op die manier specifieke processen katalyseren (Hill & Higgins, 1981). Het gebruik van micro-organismen in dergelijke bioelektrokatalytische systemen biedt naast specificiteit enkele extra voordelen. Micro-organismen kunnen instaan voor de zelfregeneratie en kwantitatieve aanpassing van de katalysator, hebben een flexibel substraatverbruik en een grotere variëteit aan productie of conversiepathways. Een nadeel van het gebruik van bacteriële cellen is de gedeeltelijke substraatconsumptie voor groei, wat dergelijke systemen geen echte katalysatoren maakt (Rabaey & Rozendal, 2010).

Nevin *et al.* (2010) realiseerde de productie van organische stoffen op basis van CO₂ en water door middel van microbiële elektrosynthese. Via deze methode kan opgevangen zonne-energie via fotovoltaïsche cellen geconverteerd worden naar organische componenten, mogelijk zelfs op een efficiëntere manier dan biomassa gebaseerde fotosynthese. De micro-organismen achter dit metabolisme bestaan voornamelijk uit acetogenen (Nevin *et al.*, 2011).

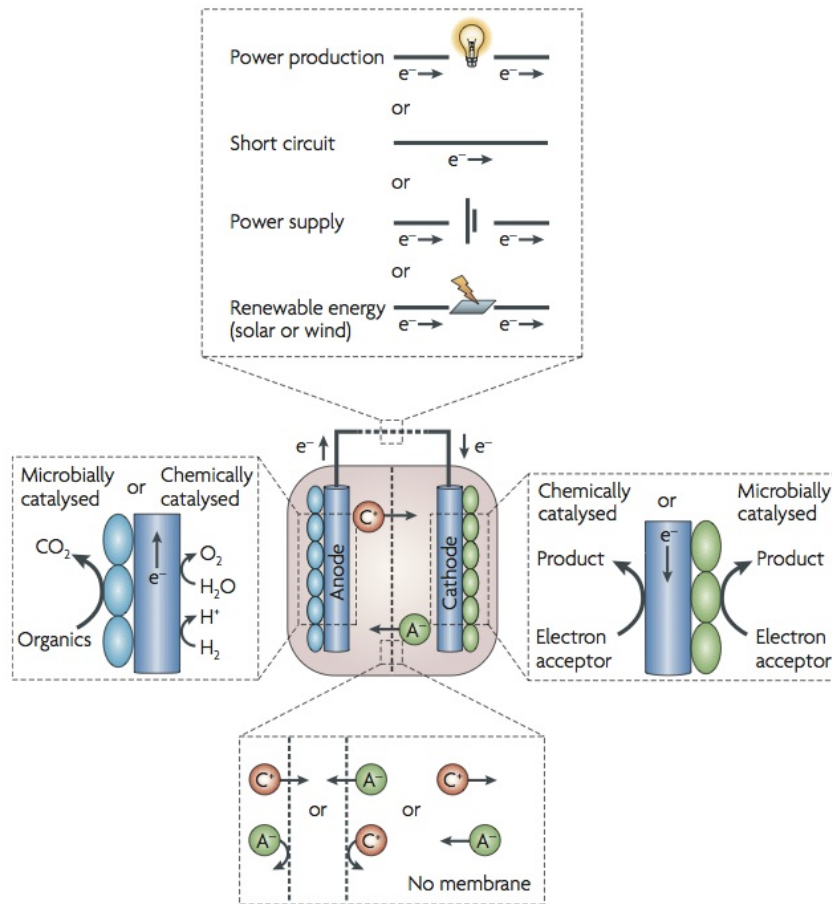
Cosubstraten worden vaak gebruikt als elektrondonor, waarbij hun reductie elektronen vrijstelt voor de gewenste conversie. Microbiële elektrosynthese kan de noodzaak aan cosubstraten wegnemen door de rechtstreekse toevoeging van elektronen aan de hand van elektrische stroom. Voor de additie van stroom wordt gekeken naar het potentieel van bio-elektrochemische systemen (BES).

1.4 Bio-elektrochemische systemen (BES)

1.4.1 Introductie

BES maken gebruik van biologische katalysatoren voor oxidatie en/of reductie reacties aan elektroden. Dergelijke systemen zijn opgebouwd uit een anode en kathode waar respectievelijk oxidatie en reductie plaatsvindt. Beide elektroden zijn onderling verbonden via een elektrisch circuit dat toevoeging of winning van elektrische stroom toelaat (Figuur 1.4). Microbiële brandstofcellen (MFCs) stellen elektrische energie beschikbaar, terwijl bij microbiële elektrolysecellen (MECs) stroom wordt toegediend.

Arends & Verstraete (2012) duiden op drie grote toepassingsvelden voor BES systemen. Een eerste concept is het opwekken van energie bij de verwerking van biodegradeerbare afvalstromen (Rabaey & Verstraete, 2005). Ten tweede bieden BES systemen los van het energetisch aspect eveneens productiemogelijkheden en als derde opent het deuren als duurzame technologie voor pollutieverwijdering en materiaalrecuperatie.



Figuur 1.4: Opbouw en toepassingen BES (Rabaey & Rozendal, 2010)

1.4.2 Microbiële brandstofcellen

Bioanode MFCs gebruiken bacteriën als katalysator voor de oxidatie van anorganische en organische materie en eveneens voor het genereren van stroom. Elektronen vrijgekomen uit de oxidatie van het substraat aan de anode worden via een geleidend materiaal tot de kathode gebracht. Op die manier wordt bacteriële energie geconverteerd naar elektrische stroom. Tenzelfdertijd treedt transport op van ionen door een selectief membraan om het ladingsverschil van beide compartimenten te compenseren.

Het potentieel van MFCs als bron van groene energie is met de huidige stroomdichtheden door de MFC niet realistisch, doch de zoektocht naar diverse toepassingen staat nog maar in z'n kinderschoenen (Arends & Verstraete, 2012; Foley *et al.*, 2010; Rabaey *et al.*, 2004a). Rozendal *et al.* (2008) berekende voor MFC's de investeringskost⁴ (€0,4/kg COD) en de productwinst (elektriciteit, €0,2/kg COD), waarbij de balans voorlopig nog negatief is (-€0,2/kg COD).

1.4.3 Microbiële elektrolyse cellen

Naast het beschikbaar stellen van elektrische stroom is het tevens mogelijk processen te beïnvloeden door het toevoegen van elektriciteit. Door het toevoegen van stroom kan een reactie bij lage potentiaal doorgaan aan de kathode (Foley *et al.*, 2010).

⁴gebaseerd op kosten van voorspelde materialen

Het eerste product, gesynthetiseerd met MEC's, was waterstofgas op basis van acetaat (Liu *et al.*, 2005), doch de mogelijkheden rijken veel verder. MECs kunnen een reduceerbaar vermogen leveren via de kathode, waarmee micro-organismen fermentatie pathways kunnen omzeilen of hun respiratie sturen (Rabaey & Rozendal, 2010).

Net als bij MFCs, berekende Rozendal *et al.* (2008) de investeringskost (€0,4/kg COD) en de productwinst (waterstofgas, €0,6/kg COD), waarbij MECs wel een positieve balans opleveren (€0,2/kg COD).

1.4.4 Materialen

Reactoren Een vaak gebruikte opstelling van BES reactoren is de "two-chamber" BES. De meest eenvoudige opstelling bestaat uit twee bekertjes onderling verbonden door een zoutbrug en een elektrisch circuit. Deze opstelling biedt echter geen bescherming tegen contaminatie, waardoor gelijkaardige systemen werden ontworpen bestaande uit twee flessen onderling verbonden door een glazen tube met een membraan als scheiding tussen beide kamers. Deze zogenaamde H-vorm systemen kunnen gebruikt worden voor beginnend onderzoek naar parameters, maar staan bekend een lager vermogen te genereren (Logan *et al.*, 2006).

Recenter zijn de reactoren bestaande uit twee elektrode compartimenten gescheiden door een membraan. Vanuit dit basisdesign worden diverse parameters (elektrode spatiering, stromingspatronen van het medium, reactorvolume en elektrode oppervlakte) gewijzigd in functie van het onderzoek (Arends *et al.*, 2012). Ook miniaturisatie van de reactoren wordt onder de loep genomen, onder andere vanwege hun eenvoudige opbouw en de mogelijkheid die ze bieden om met grote aantallen onderzoek te voeren (Arends *et al.*, 2012; Ringeisen *et al.*, 2006).

Verscheidene MFC's kunnen in serie of parallel gekoppeld worden om zo het voltage en de stroom op te drijven, de zogenaamde *stacked MFC's*. Gebruik van serieel gekoppelde MFC's leidt tot een verhoging van het voltage, terwijl een gemeenschappelijke stroom door alle cellen stroomt. Parallele systemen werken onder een gemeenschappelijk voltage en leiden tot een verhoging van de totaal geproduceerde stroom (Aelterman *et al.*, 2006).

Membranen De functie van membranen verschilt afhankelijk van het doel van de BES. In waterstofproducerende cellen dient het membraan in eerste instantie voor het transport van protonen van de anode naar de kathode. In MFC's is het voornaamste doel van het membraan om de beide compartimenten fysisch gescheiden te houden en toch uitwisseling van ionen toe te laten. Het verschil in gebruikte membranen is afhankelijk van de gewenste ladingsspecificiteit. Zo bestaan er kation en anion uitwisselingsmembranen, waar respectievelijk enkel positieve of negatieve ionen door het membraan kunnen verplaatst worden. Naast deze twee conventionele membranen is er nog een groot gamma, van protonuitwisselingsmembranen tot bipolaire membranen (Arends *et al.*, 2012; Rozendal *et al.*, 2008).

Elektroden Hoewel de kennis en toepassingen van BES de laatste jaren sterk de kop opsteken, blijven enkele voorname problemen steeds terugkeren. Eén van deze pijnpunten is de lage stroomproductie. De mate van productie varieert afhankelijk van de substraatdegradatie, de snelheid van protonen- en elektrontransport van bacteriën naar de anode en van de kathode naar de bacteriën. Verder is er nog de afhankelijkheid van de weerstand van het elektrisch circuit, de gebruikte elektrode, externe operationele factoren etc. Het gebruikte materiaal heeft een grote invloed op de prestatie van de BES en beïnvloedt bovendien een groot deel van de prijs (Zhou *et al.*, 2011).

De industriële realisatie van BES is onder andere nog gelimiteerd door prijs/kwaliteit eigenschappen van de gebruikte katalysatoren. De zoektocht naar alternatieven focust zich momenteel op materialen met een hoog specifiek oppervlak (bijvoorbeeld grafiet granules), goedkope chemische elektrokatalysatoren of microbiële biokatalysators. Vooral deze laatste worden druk onderzocht vanwege hun voordeel dat ze dure metalen kunnen vervangen door microbiële biofilms op goedkope materialen (Rozendal *et al.*, 2008).

Algemeen is het belangrijk dat elektrodes een hoog specifiek oppervlak hebben, zodat een hoge volumetrische stroomdichtheid kan behaald worden. Verder zijn eigenschappen als een goede elektrische geleiding, lage weerstand, sterke biocompatibiliteit, chemische stabiliteit en een gepaste mechanische sterkte van enorm belang. Vaak gebruikte materiaal zijn koolstof en roestvrij staal (Arends *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2011).

1.4.5 Elektronentransport

Bacteriën streven ernaar om hun energiewinning te maximaliseren. Dit doen ze door het selecteren van de elektronacceptors met de hoogste potentiaal beschikbaar, een proces genaamd extracellulaire elektron transfer (EET) (Rabaey, 2010). Vrijgekomen elektronen uit het oxidatieproces aan de anode dienen uit de suspensie of de biofilm tot aan de elektrode te geraken en omgekeerd opnieuw weg van de kathode. Vaak worden oplosbare elektron acceptors in de bacteriële omgeving geëxcreteerd.

Tot dusver werden een drietal transfermethodes gevonden en plausibel verklaart. Transport kan gebeuren met behulp van elektron mediators/shuttles, directe celmembraan geassocieerde transfer of elektron transport via conductieve pili ('nanowires') geproduceerd door bacteriën (Logan *et al.*, 2006). Voor sommige organismen kan de additie van chemische mediators stroomproductie initiëren, waar dezelfde organismen zonder mediator de elektrode niet kunnen gebruiken (Rabaey *et al.*, 2004a).

Onderzoek rond extracellulair elektronentransport is tot op heden voornamelijk gebaseerd op de species *Pseudomonas aeruginosa* (Rabaey *et al.*, 2004a), *Shewanella oneidensis* en *Geobacter sulfurreducens* (Rabaey, 2010), modelorganismen voor onderzoek betreffende BES's. Grotendeels van het onderzoek tot dusver gebeurde rond bioanodes (Arends *et al.*, 2012). Van de gekende mechanismen aan bioanodes, onderzocht Rosenbaum *et al.* (2011) de plausibiliteit van deze mechanismen bij biokathodes. Er kon geconcludeerd worden dat elektronentransport bij biokathodes eveneens via directe en indirecte processen gebeuren, gelijkaardig aan deze van bioanodes. Daarnaast kan bij biokathodes het geproduceerde waterstofgas door de microorganismen als elektrondonor gebruikt worden (Rabaey & Rozendal, 2010).

Elektron shuttles

Marsili & Zhang (2010) vatten uit meerdere onderzoeken samen dat meerdere bacteriële stammen in staat zijn tot het produceren en vrijstellen van oplosbare redox shuttles wanneer ze blootgesteld worden aan elektrodes op een oxidatieve potentiaal en indien geen elektron acceptoren in de omgeving aanwezig zijn. Opstapeling van deze redox shuttles verhoogt de snelheid van elektron transfer naar de elektrode. Verder zijn deze redox shuttles niet-specifiek en kunnen geëxcreteerde shuttles zowel de producerende bacterie als andere aanwezige species ten goede komen.

Directe membraan geassocieerde elektrontransfer

De voornaamste studies rond celmembraan gebonden elektro-actieve componenten gebeuren op metaalreducerende bacteriën. Redox actieve componenten gelokaliseerd in het buitenste celmembraan, zoals bijvoorbeeld *c*-type cytochromen en ijzer-zwavel proteïnen, kunnen optreden als geleiders van elektronen naar de elektronacceptors (Bretschger *et al.*, 2010).

Nanowires

Reguera *et al.* (2005) toonde aan dat de pili van *Geobacter sulfurreducens* hoog geleidend zijn. De basis van de pili zit in het periplasma en het buitenste membraan van Gram-negatieve bacteriën. Dit creëert de mogelijkheid voor de pili om elektronen te accepteren komende van transferproteïnen gelegen in het periplasma of buitenste membraan. Uit deze geleidbaarheid kan de hypothese verder onderzocht worden dat deze pili dienst doen als bacteriële nanowires die elektronen transporteren tussen de cel en andere oppervlakken.

De kennis rond bacteriële nanowires is tot op heden redelijk beperkt en vele vragen rondom compositie, mechanismen en hun rol steken de kop op. Het weinige onderzoek reeds verricht op de modelorganismen *Shewanella* en *Geobacter*, bracht al enkele antwoorden aan het licht, maar meer onderzoek is noodzakelijk (Bretschger *et al.*, 2010).

Hoofdstuk 2

Hypothese en Doelstellingen

Diverse micro-organismen zijn in staat tot biologische productie van 1,3-propaandiol (1,3-PDO) (Maervoet, 2012; Saxena *et al.*, 2009), voornamelijk tijdens hun exponentiële groeifase (Xu *et al.*, 2009). Tot op heden zijn echter geen organismen bekend die suikers rechtstreeks kunnen omzetten tot 1,3-PDO (Saxena *et al.*, 2009). Vanuit dit standpunt en de lage glycerolprijs vanuit de biodieselraffinaderijen, wordt de directe omzetting van glycerol naar 1,3-PDO onderzocht. In plaats van suikers te gebruiken als cosubstraat wordt de mogelijkheid van andere elektronendonoren zoals waterstofgas en elektrische stroom onderzocht.

Is het mogelijk 1,3-PDO productie te realiseren met pure culturen van wild types of gemodificeerde stammen in een BES?

Het doel van dit onderzoek is het bekomen van 1,3-PDO productie met pure culturen van natuurlijke *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 6475 en gemodificeerde species *Citrobacter werkmanii* DSM17579 in het kathode compartiment van een bio-elektrochemisch systeem (BES). De verschillen in productie tussen de diverse stammen worden onderzocht onder verschillende omstandigheden.

Kan elektrische stroom de rol van cosubstraten overnemen?

Na een batch studie over het gebruik van glucose en waterstofgas (H_2) als elektron donor, wordt onderzocht indien onmiddellijke blootstelling aan elektronen via elektrische stroom hetzelfde effect kan veroorzaken. Door cultivatie van de verschillende culturen onder een constante stroomsterkte wordt de productie vergeleken met de testen in serumflessen.

Hoe verloopt het elektronentransport in een BES bij de verschillende culturen?

Mits productie kan gerealiseerd worden in een BES, kan onderzocht worden welke mogelijke mechanismen achter dit elektronentransport schuilgaan. Met behulp van cyclische voltammetrie, kathodepotentialaal en gasproductie wordt getracht hier een antwoord op te vinden.

Kan een opgelegde stroomsterkte de productie van 1,3-PDO beïnvloeden?

Indien glycerolconversie kan worden verwezenlijkt in de kathode van een BES, is een volgende stap verder onderzoek naar de invloed van de opgelegde stroom op productie van metabolieten. Analyse van geproduceerde metabolieten bij incubatie op een glycerolmedium onder verschillende stroomsterktes wordt onderzocht via HPLC met speciale aandacht voor de vorming van 1,3-PDO.

Is 1,3-PDO productie groeigerelateerd of kan het organisme een zuiver katalytische werking uitoefenen?

Xu *et al.* (2009) onderzocht reeds dit effect en Talarico *et al.* (1990) beschrijft de cosubstraat noodzakelijkheid van *L. reuteri* om te kunnen groeien. Eenmaal 1,3-PDO productie gerealiseerd is in serumflessen en in BES, wordt de relatie groei-productie onderzocht. Bij de verschillende culturen wordt de metaboliëtoproductie onderzocht op een stikstofrijk en een stikstofarm medium om het effect van groei op de 1,3-PDO productie te onderzoeken.

Hoofdstuk 3

Materiaal en methoden

3.1 Cultuurmedia

Media worden bereid in Schott flessen en geautoclaveerd of gefiltersteriliseerd met behulp van *Sartolab BT 500* steriele 0,22 μm filters. Afhankelijk van het experiment wordt antibiotica toegevoegd (zie 3.2) en de stikstofbron vervangen door een gelijkaardig kaliumzout.

Luria Broth medium Als initieel medium voor de opgroei van *Citrobacter* species uit de -80°C werd Luria Broth (LB) medium gebruikt (Trypton 10 g/L, gistextract 5 g/L en NaCl 5 g/L). LB is een algemeen complex medium gebruikt voor het opgroeien van micro-organismen.

MRS broth Als initieel medium voor het opgroeien van *Lactobacillus reuteri* uit de -80°C werd MRS (De Man, Rogosa, Sharpe) medium gebruikt. MRS is een niet selectief medium gebruikt voor het opgroeien van melkzuurbacteriën (Sharpe *et al.*, 1966).

Boenigk minimaal medium Na de initiële groei op een complex medium wordt overgeschakeld naar een minimaal medium (Boenigk MM) om meer controle en inzicht te verkrijgen over de groei (Tabel 3.1). Alles dient toegevoegd te worden in de gegeven volgorde.

M9-medium Een minimaal medium, minder complex qua samenstelling en bereiding dan Boenigk MM is M9 (Rabaey *et al.*, 2004b).

3.2 Micro-organismen

Citrobacter werkmanii DSM17579 en alle mutanten (Tabel 3.2) werden bekomen via de cryostock van Maervoet (2012) bij het laboratorium 'Industrial Biotechnology and Biocatalysis' (InBio). De gebruikte *Citrobacter* species hebben een natuurlijke resistentie voor ampicilline (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). De triple knock-out heeft een resistentiegen voor chlooramphenicol (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Tabel 3.1: Aangepast Boenigk MM: zonder gistextract, op pH 7,5 gebracht met NaOH (Boenigk *et al.*, 1993) Sporenelementenoplossing SL-4 naar DSMZ (2008)

Component	Concentratie g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3,0
KH_2PO_4	6,0
K_2HPO_4	14,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,01
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,05
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0119
Glycerol	15,0
Cysteïne-HCl	0,2
SL-4	1 mL

Tabel 3.2: *C. werkmanii* DSM17579 mutanten: Overzicht van de verschillende mutanten en hun functie (Maervoet, 2012)

Afkorting	Naam	Metabolische karakteristiek
WT	<i>C. werkmanii</i> DSM17579	wild type (WT)
Δ dhaD	<i>C. werkmanii</i> DSM17579 Δ dhaD	single knock-out (Δ dhaD): glycerol dehydrogenase, geen glycerol metabolisme via de oxidatieve pathway
Δ ldhA	<i>C. werkmanii</i> DSM17579 Δ ldhA	single knock-out (Δ ldhA): lactaat dehydrogenase, geen lactaatproductie uit pyruvaat
Δ adhE	<i>C. werkmanii</i> DSM17579 Δ adhE	single knock-out (Δ adhE): ethanol dehydrogenase, geen directe omzetting van Acetyl-CoA naar Acetaldehyde
3KO	<i>C. werkmanii</i> DSM17579 Δ dhaD Δ ldhA Δ adhE::ChlFRT	triple knock-out (3KO): Δ dhaD: glycerol dehydrogenase, geen glycerol metabolisme via de oxidatieve pathway; Δ ldhA: lactaat dehydrogenase, geen lactaatproductie uit pyruvaat en Δ adhE: ethanol dehydrogenase, geen directe omzetting van Acetyl-CoA naar Acetaldehyde; met chloramphenicol resistentiegen
3KO yqhD	<i>C. werkmanii</i> DSM17579 Δ dhaD Δ ldhA Δ adhE::ChlFRT yqhD-Gm	triple knock-out (3KO): Δ dhaD: glycerol dehydrogenase, geen glycerol metabolisme via de oxidatieve pathway; Δ ldhA: lactaat dehydrogenase, geen lactaatproductie uit pyruvaat en Δ adhE: ethanol dehydrogenase, geen directe omzetting van Acetyl-CoA naar Acetaldehyde; met chloramphenicol resistentiegen en extra plasmide met 1,3-PDO oxidoreductase voor de omzetting van 1,3-HPA en een gentamicine resistentiegen

Lactobacillus reuteri ATCC PTA 6475 is een stam oorspronkelijk verkregen via BioGaia, AB, Rayleigh, USA.

De mengcultuur is afkomstig van slib van anaërobe vergisting gemengd met fermentatieafval van een brouwerij en effluent van SHIME experimenten (Molly *et al.*, 1993). Een cryostock van deze mengcultuur werd aangemaakt. Het inoculum werd anaëroob opgegroeid op M9 medium met initieel 1 g/L glycerol en opgebouwd naar 15 g/L. De mengcultuur werd gecultiveerd in flessen met een werkvolume van 800 mL in een temperatuur gecontroleerde kamer bij 37°C en geroerd met behulp van een magnetische roerder. Dagelijks werd de helft van het medium vervangen (hydraulische verblijftijd (HRT) = twee dagen). De korte verblijftijd limiteert groei van methanotrofen. De methaanproductie werd gecontroleerd in het opgevangen gas, dat bij staalname mee werd geanalyseerd.

3.2.1 Préculturen

Steriele 12 mL plastic reageerbuizen (Greiner Bio-one) (LabMET) of glazen buisjes (InBio) met 5 mL medium (MRS (*Lactobacillus reuteri*) of LB (*Citrobacter* species)) worden geënt met micro-organismen afkomstig uit cryovials (door het afschrapen met een entnaald). Préculturen groeien 24u bij 37°C alvorens te worden afgecentrifugeerd (10 minuten bij 1.500g). De pellet na centrifugatie wordt opgelost in medium en opnieuw afgecentrifugeerd onder dezelfde omstandigheden. De pellet wordt een laatste maal opgelost in medium alvorens te inoculeren van de reactor- of serumflessen.

3.3 Experimentele opstelling

3.3.1 Batch testen in serumflessen

Serumtesten

Batch testen worden uitgevoerd in serumflessen ('penicillineflessen') van 120 mL gevuld met 40 mL medium. Inoculatie (2,5% v/v) van de gewassen précultuur in incubatiemedium gebeurt met behulp van steriele tips. Nadien worden de serumflessen afgesloten met een zachte (butyl) stopper (Rubber NV, Nederland) en afgeklemd met een metalen cap. De anaërobe flessen worden vervolgens geflusht zoals vermeld in sectie 3.4.2, in de aërobe flessen gebeurt geen gasuitwisseling en deze ondervinden dus een geleidelijke afname van zuurstof door respiratie van de micro-organismen. Alle testen in serumflessen worden in duplicaat uitgevoerd en steeds met een steriele blanco (behalve de test met de mengculturen).

Staalname

Voor gasanalyse en het bepalen van metaboliëten wordt met behulp van steriele spuiten en 16 mm naalden (diameter 0,5 mm van *BD Microlance™3*) respectievelijk 1mL of 4mL (5mL bij begin en eind) opgezogen. Gasstalen worden enkel genomen bij het begin en het einde van het experiment en worden bewaard met de naald in een rubber stopper alvorens te analyseren met de compact GC. Vloeistofstalen worden opgevangen in steriele 12mL reageerbuizen, waarna optische densiteit (TECAN Sunrise Absorbance Reader, $\lambda = 620\text{nm}$) en pH bepaald wordt. Stalen worden vervolgens bewaard bij -20°C.

Incubatie

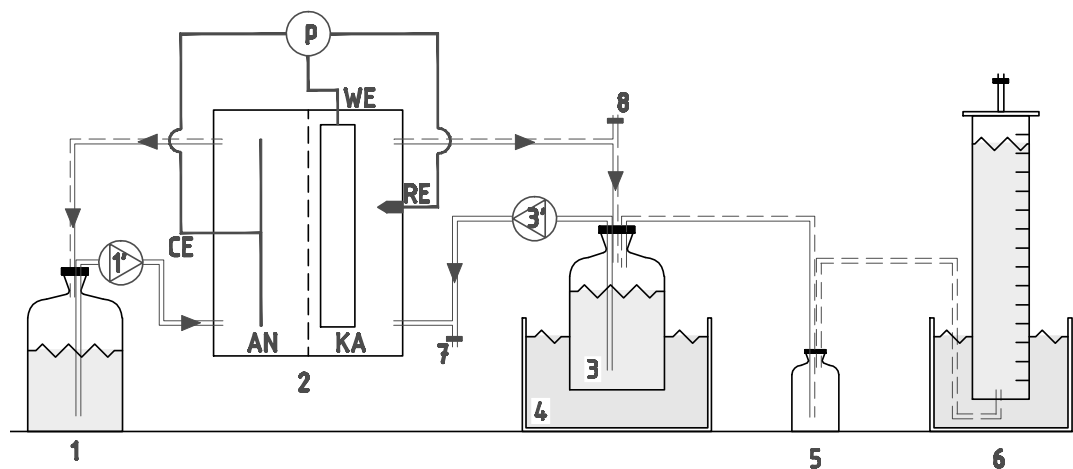
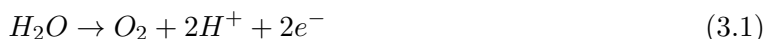
Experimenten worden uitgevoerd bij 37°C in een temperatuur gecontroleerde kamer (InBio) of incubator (Certomat®H Incubation Hood, Sartorius) (LabMET). De serumflessen of glazen buizen worden geplaatst op een Kühner schudder (InBio) bij 200 tpm of een Certomat schudder (LabMET) bij 110 tpm.

3.3.2 Uitplantingen

Culturen werden getest op antibiotica resistentie door met een steriele entnaald te schrapen in cryo en dit te streepenten op een agarplaat. De platen zijn LB agar (LB medium met 12 g/L agar (Difco)) en worden na autoclaveren gegoten in steriele petriplaten (ongeveer 20 mL per plaat, Greiner bio-one), waarna de platen zo'n 20 minuten kunnen opstijven. De antibiotica wordt vlak voor het gieten toegevoegd zodat de warmte geen degradatie kan veroorzaken.

3.3.3 BES experimenten

De experimenten in bio-elektrochemische systemen werden uitgevoerd volgens de opstelling weergegeven in Figuur 3.1. In het anode compartiment ('AN') wordt 5mM Na₂SO₄ (nr. 1) gepompt en elektronen vrijgemaakt volgens reactie 3.1.



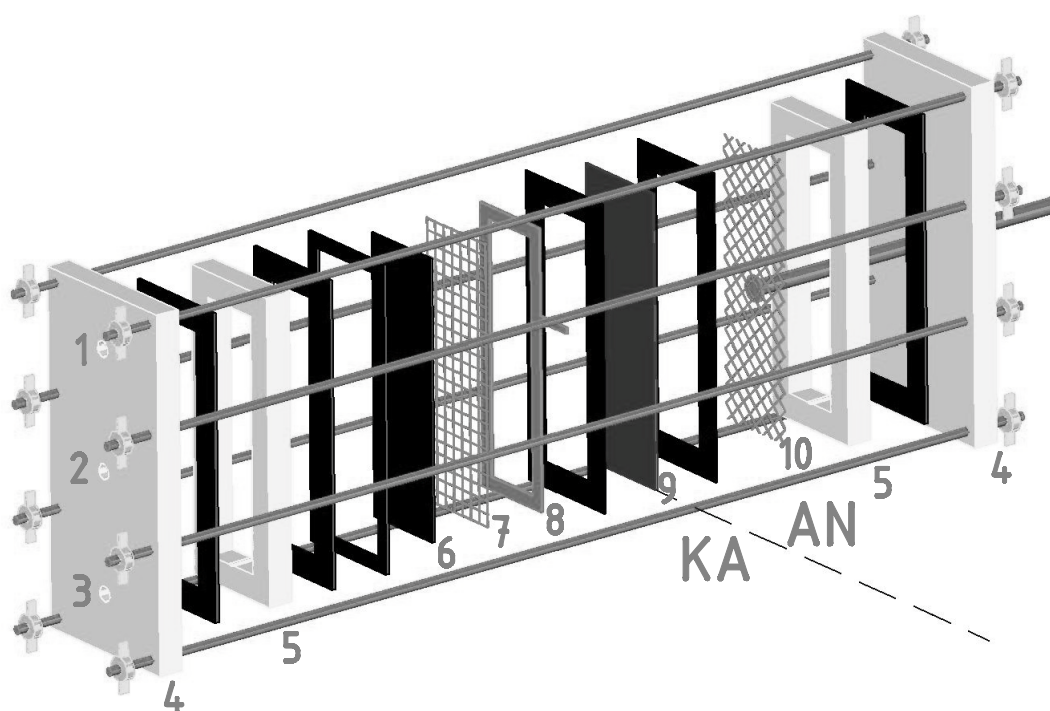
Figuur 3.1: Experimentele opstelling BES: schematische weergave van de opstelling van de BES experimenten met 1) anode voeding met 1' de recirculatiepomp, 2) BES reactor ('CE': *counter elektrode*, 'WE': *working elektrode*, 'RE': referentie elektrode en 'P': potentiostaat), 3) kathode voeding met 3' de recirculatiepomp, 4) warmwaterbad, 5) tussenfles, 6) gaskolom, 7) kraantje voor supplementatie en 8) kraantje voor staalname. Volle dikke lijnen representeren elektrische stroom, dubbele volle lijnen vloeistofstroom, dubbele volle en gestreepte lijnen gas/vloeistofmengsel en dubbele gestreepte lijnen zijn gasstromen.

Flessen met een totaal volume van 600 mL met 500 mL medium (nr. 3), geïnoculeerd met de micro-organismen na een 24 uur groeiende précultuur en na wassen, worden in een warmwaterbad (GFL®, nr. 4) op 37°C gehouden. Via tubing gesteriliseerd met 70% ethanol wordt medium uit de schottfles onderaan de BES reactor in het kathode compartiment ('KA') gepompt, waarna het effluent bovenaan via tubing opnieuw in de mediumfles druppelt. Zowel

influent als effluent kunnen via een kraantje (nr. 7 en 8) afgetapt worden, wat eveneens het overschakelen naar een continu systeem mogelijk maakt. Uit de mediumfles vertrekt een derde aansluiting naar een tweede fles (nr. 5) die dienst doet als tussenfles voor de gaskolom en overloop van vloeistof. Via deze derde route kan gevormd gas doorheen de tussenfles naar de gaskolom (nr. 6) getransporteerd worden.

Opbouw BES reactor

De bioreactor is opgebouwd uit diverse lagen die van elkaar gescheiden zijn door dikke of dunne rubberlagen (respectievelijk 3 en 1 mm dikte) om alles lekdicht af te sluiten (Figuur 3.2). De beide compartimenten van de reactor (kathode en anode) worden samengehouden door twee frames uit plexiglas van 28×13 cm en 2 cm dikte. De compartimenten worden tussen beide frames opgespannen door acht bouten met vleugelmoeren verdeeld over de zijkant van de frames. Centraal in de frames bevinden zich drie openingen voor de aansluiting van de tubing en elektrodes. De compartimenten zelf bestaan tevens uit een frame uit plexiglas van 24×9 cm en 2 cm dikte met een interne uitsparing van 20×5 cm wat een totaal volume van 200 cm^3 opleverd per compartiment. Beide compartimenten worden gescheiden door een kationuitwisselingsmembraan (Ultrax CMI-7000 van Membranes International, USA).



Figuur 3.2: Opbouw BES reactor: schematische weergave van de verschillende onderdelen van een BES reactor met 1) aansluiting effluent tubing, 2) aansluitplaats referentie elektrode, 3) aansluiting influent tubing, 4) frames om reactor op te spannen, 5) frames met reactorcompartiment, 6) koolstofvilt, 7) stroomcollector net, 8) stroomcollector plaat met aftakking, 9) membraan en 10) iridiumoxide elektrode. 'KA' duidt het kathode compartiment aan, 'AN' het anode compartiment. Alle onderdelen worden gescheiden door een laag rubber.

In het anode compartiment wordt een iridiumoxide elektrode (nr. 10) van 20×5 cm (1 mm dikte

en specifiek elektrode oppervlak van $1,0 \text{ m}^2 \text{ m}^{-2}$) bevestigd in het midden van het frame met behulp van een staaf die in de centrale holte (nr. 2) van het buitenste frame (nr. 4) past. Een iridiumoxide elektrode is een titanium elektrode gecoat met een iridiumlaag (Magneto Special Anodes, Nederland). De kathode wordt voorzien van een elektrode gemaakt uit koolstofvilt (Alfa Aesar, dikte van 3,18 mm en zuiverheid 99,0%). Het koolstofvilt (nr. 6) wordt gesneden volgens de afmetingen $22 \times 7 \text{ cm}$ en wordt samen met een stroomcollector net van roestvrij staal (nr. 7) in een dik rubber geïnstalleerd vlak voor het membraan. Op de stroomcollector wordt nog een dunne ($< 0,5 \text{ mm}$) roestvrij stalen plaat (nr. 8) geplaatst met een aftakking tot buiten de frames die dient voor de aansluiting van de potentiostaat. In de centrale uitsparing (nr. 2) van het buitenste frame van het kathode compartiment wordt de referentie elektrode aangebracht.

De volledige BES reactor wordt verzameld in deze volgorde te beginnen bij het kathodecompartiment: buitenste frame, reactorframe, koolstofvilt, stroomcollector, aftakkingplaat, membraan, reactorframe en buitenste frame, telkens gescheiden door lagen rubber.

- **Pompen** De recirculatiepompen zijn verschillend voor anode en kathode, respectievelijk een *Watson Marlow 313S* of *Watson Marlow 323* en *505S*. De hydraulische verblijftijd in een compartiment (200mL) is $5,68 \pm 0,43$ minuten voor de *313S* (100%), $2,62 \pm 0,04$ minuten voor de *323* (90 tpm) en $8,33 \pm 0,09$ minuten voor de *505S* (30 tpm).
- **Tubing, kraantjes en connectoren** Tubing bestaat uit Masterflex Norprene tubing (A60 G) van 1,6 mm dikte, die gasimpermeabel zijn. De tubing wordt onderling verbonden met behulp van nylon verbindingsstukken (Bosta) en kraantjes met drie kanalen voor supplementatie en staalname (Bürkle GmbH).
- **Referentie elektrodes** ('RE') zijn Ag/AgCl-elektrodes (Bio-Logic), gecontroleerd versus een calomel elektrode (QIS, Oosterhout, Nederland) in een 3 molair *KCl* oplossing. De calomel elektrode heeft een stabiel voltage van +244 mV versus een *standard hydrogen electrode* (SHE). Voor de omrekening van de potentiaal versus SHE wordt de gemiddelde waarde gebruikt van de referentie elektrode, voor en na het experiment.
- **Gaskolommen** worden opgesteld in een zuur waterbad (pH 4), om te voorkomen dat CO_2 oplost in het water. Water wordt opgetrokken en volume indicaties zijn aangebracht op de kolom zelf. Gas van de reactoren is met behulp van geplooide pipetten gekoppeld onderaan de kolom en bovenaan is een afvoer voorzien voor staalname en voor het optrekken van het water.

Potentiostaat

Stroom en/of spanning wordt gecontroleerd en gemeten met behulp van een VSP multipotentiostaat (Bio-Logic). De *working electrode* ('WE') wordt geplaatst op de stroomcollector van het kathode compartiment (nr. 8), de *counter electrode* ('CE') op de iridiumoxide elektrode van het anode compartiment (nr. 10) en de referentie elektrode ('RE') is een Ag/AgCl-elektrode geplaatst in het kathode compartiment.

- **Stroomcontrole** van -10 mA en -100 mA wordt opgelegd tijdens de experimenten met registratie van de kathode- (E_{KA}), anode- (E_{AN}) en celpotentiaal (E_{CEL}) en het vermogen (P).
- **Cyclische voltammetrie (CV)** De eerste fase van een cyclische voltammetrie meting is 10,5 minuten op open circuit (zonder opgelegde stroom), waarna de potentiaal gescand

wordt van -0,700 mV tot 0,200 mV (ten opzichte van de referentie elektrode) aan een snelheid van 1 mV per seconde. Na drie dergelijke cycli wordt overgeschakeld naar een snelle CV van 50 mV per seconde en tevens drie cycli. Tijdens de meting worden de waarden van de stroom (I) en het vermogen (P) bewaard. In de figuren worden enkel de eerste twee cycli weergegeven.

3.4 Analytische methoden

3.4.1 Fysicochemische parameters

Optische densiteit

Groei wordt gemeten aan de hand van de optische densiteit. Dit gebeurt bij verschillende golflengtes afhankelijk van het laboratorium (alle data hier gepresenteerd werd gemeten bij 620nm). Het aantal cellen kan bepaald worden via flow cytometrie.

- Jasco V-600_{BIO} Spectrophotometer: Préculturen worden gemeten in cuvettes met een weglengte van 1cm bij een golflengte λ van 600nm. Verdunningen worden gemaakt in fysiologische oplossing (8% *NaCl*), wat tevens als nulmeting dienst doet.
- TECAN Sunrise Absorbance Reader: Culturen worden gemeten in 96well platen bij een golflengte λ van 620nm. 200 μ L worden gepipeteerd in een well, telkens met drie herhalingen alvorens te analyseren. Het gemiddelde van de drie herhalingen wordt gebruikt bij de resultaten met vermelding van de standaardafwijking.

Zuurtegraad (pH)

De pH werd bepaald met behulp van een Consort SP10B pH-elektrode aangesloten op een Consort C532 multimeter analyser (Consort, Turnhout, België). De multimeter werd geregeld gekalibreerd met kalibratieoplossingen met pH-waarden 4 en 7.

High performance liquid chromatography (HPLC) en RI/UV detectie

Glycerol en 1,3-PDO scheiding gebeurt met behulp van high performance liquid chromatography, waarna de aanwezige componenten gedetecteerd worden via refractieve index (RI) en UV-detectie (InBio). Reactorstalen of staalnames van serumtesten worden (na ontdooien) verdund tot een range van 0-1 g/L met milliQ water alvorens te filtreren met behulp van een Millex syringe-driven filter unit van 0,22 μ m.

Het voorbereide staal (koel bewaard tot vlak voor de analyse) wordt vervolgens geanalyseerd met een Prostar HPLC (Varian, Walnut Creek, VSA), uitgerust met een Prostar 220/230 Solvent Delivery Module, een gekoelde (4°C) Prostar 410 autosampler met een 100 μ L loopinjector en een Prostar 510 kolomoven, gekoppeld aan een 325 Dual Wavelength UV-Vis HPLC Detector en een Prostar 350 Refractie Index Detector. Een volume van 20 μ L werd geïnjecteerd en gescheiden over een Aminex 300 mm x 7,8

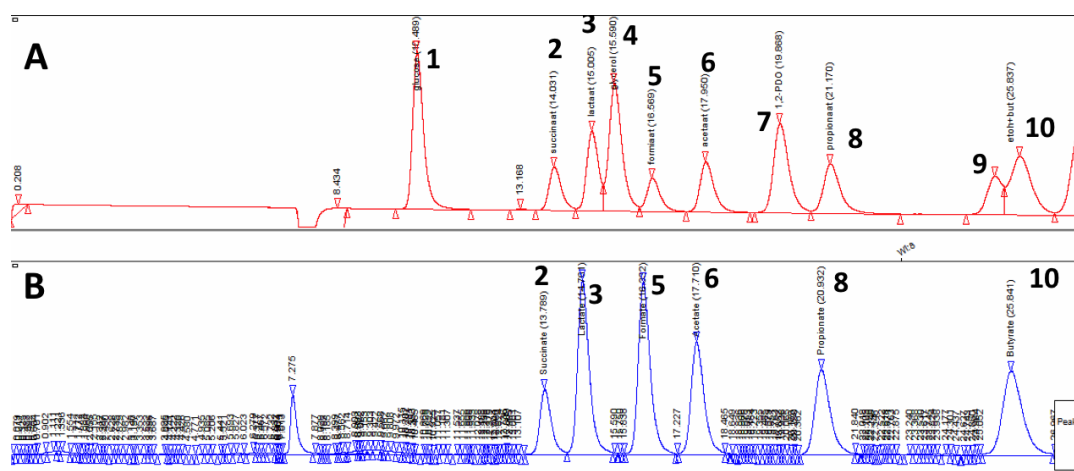
Tabel 3.3: HPLC RI retentietijden van organische zuren, suikers, glycerol en 1,3-PDO

Component	RI
Glucose	10,45
Succinaat	13,9
Lactaat	14,9
Glycerol	15,6
Formiaat	16,4
Acetaat	17,8
1,2-PDO	19,8
1,3-PDO	20,5
Propionaat	20,9
Ethanol	25,4
Butyraat	25,8

mm HPX-87H kolom (Bio-Rad, Hercules, VSA).

De kolomtemperatuur bedraagt 40°C en 10mM H₂SO₄ wordt met een snelheid van 0,5 mL per minuut door de kolom gepompt. UV-detectie gebeurt op 210 en 265 nm en de refractie index (RI) detector staat ingesteld op range 16 (De Weirdt *et al.*, 2010). Een meting duurt 30 minuten en de RI retentietijden van de diverse componenten worden weergegeven in Tabel 3.3. De retentietijden op de UV-detector zijn met een vertraging van ongeveer 0,2 minuten nagenoeg dezelfde.

Bij elke meting wordt telkens een standaardmix meegenomen om nadien de concentraties van de aanwezige componenten te bepalen (Figuur 3.3). De mix wordt telkens gemeten in verschillende concentraties (0,01; 0,25; 0,5; 1; 2,5 en 5 g/L) en eenmaal werden alle componenten apart gemeten om hun retentietijd te bepalen. Uit de verschillende piekoppervlaktes gedetecteerd met de RI detector en de standaardreeks kunnen de concentraties van de verschillende componenten berekend worden (Figuur 3.4). Behalve butyraat worden alle componenten bepaald op basis van de RI data.

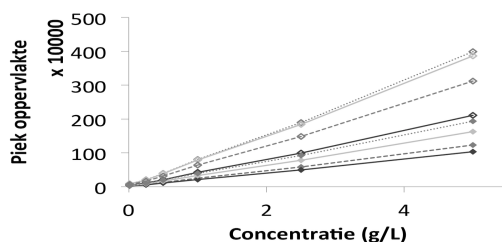


Figuur 3.3: HPLC grafiek van de RI data (A) en UV₂₁₀ (B) van de standaardmix: 1) glucose, 2) succinaat, 3) lactaat, 4) glycerol, 5) formiaat, 6) acetaat, 7) 1,2-PDO, 8) propionaat, 9) ethanol en 10) butyraat

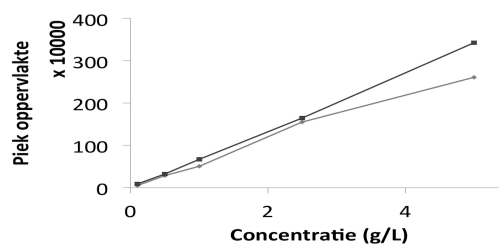
De piek van ethanol en butyraat heeft een overlap en hierbij wordt de data van de UV210 gebruikt. De butyraatconcentratie kan hieruit afgelezen worden. Door de aanwezige concentratie butyraat via de componentenrun om te rekenen naar piekoppervlakte in de RI data en deze waarde van de som (ethanol + butyraat) af te trekken, kan de concentratie aan ethanol berekend worden.

Een extra standaardreeks van glycerol en 1,3-PDO werd apart gemeten op gelijkaardige concentraties (0,1; 0,5; 1; 2,5 en 5 g/L) (Figuur 3.5).

Bij de weergave van de HPLC resultaten wordt niet altijd een som van 100% bekomen, dit is te wijten aan niet gedetecteerde componenten of kleine verschillen door het werken met het gemiddelde van duplicaten.



Figuur 3.4: HPLC curve van de standaardmix: piekoppervlakte van de RI data in functie van de concentratie (g/L) met: glucose (hol, gestippeld), succinaat (vol, gestreept), lactaat (hol, donker), glycerol (hol, licht), formiaat (vol, donker), acetaat (vol, licht), 1,2-PDO (hol, gestreept) en propionaat (vol, gestippeld)



Figuur 3.5: HPLC curve van de glycerol en 1,3-PDO standaardreeks: piekoppervlakte van de RI data in functie van de concentratie (g/L) met glycerol (donker) en 1,3-PDO (licht)

Vluchtige vetzuren (VFA)

Korte keten vluchtige vetzuren (volatile fatty acids, VFA) zijn vetzuren met zes of minder koolstofatomen. Analyse gebeurt door middel van diëthyletherextractie, gevolgd door capillaire gas chromatografie gekoppeld aan een vlam ionisatie detector (Greenberg *et al.*, 1992). Met deze methode kunnen concentraties van acetaat, propionaat, butyraat, isobutyraat, caproaat, isocaproaat, valeriaat and isovaleriaat gemeten worden.

Aan 2 ml staal (na ontdooien) of een verdunde oplossing in milliQ water in een 12 mL reageerbuis met draaistop wordt achtereenvolgens 0,5 mL H₂SO₄ (1:1), 0,4 g NaCl, 0,4 ml interne standaard en 2,0 mL diëthylether toegevoegd. De reageerbuizen worden gedurende twee minuten geïnverteerd, waarna drie minuten gecentrifugeerd wordt bij 3000 tpm (Heraeus Labofuge 400 Function Line). De organische fase wordt dan overgepipeteerd naar een glasvial voor GC-analyse.

De analyse wordt gedaan door het technisch personeel van LabMET, hierbij gebruik makend van een GC-2014 (Shimadzu) met FID detector en split injector. Het injectievolume is 1 µL en het gebruikte temperatuursprofiel gaat van 110°C tot 160°C met een stijging van 6°C per minuut.

De kolom is een capillaire vluchtige vetzuurkolom (EC-1000 Econo-Cap column (Alltech, Laarne, Belgium), 25m x 0,53 mm, filmdikte van 1,2 µm). Het gebruikte gas is N₂ en de temperatuur van de injector en de detector zijn respectievelijk 200°C en 220°C.

De HPLC resultaten werden getoetst aan de VFA analyse en quasi gelijk bevonden. Vanwege de meer eenvoudige staalbereiding werd verder enkel met HPLC gewerkt.

3-hydroxypropanal analyse

De accumulatie van 3-hydroxypropanal (3-HPA) wordt gemeten aan de hand van de optische densiteit na incubatie van het staal met een tryptofaan oplossing en HCl. Het staal wordt (na ontdooien) tienmaal verdund in milliQ water, waarna 50 µL wordt gepipeteerd in een 96-well plaat. Bij het staal wordt 37,5 µL tryptofaan oplossing (0,01 M in 0,05 M HCl, gestabiliseerd met enkele druppels toluen per 250mL) en 150 µL HCl toegevoegd. Na 20 minuten incubatie

bij 37°C wordt de concentratie 3-HPA bepaald aan de hand van de optische densiteit bij 550 nm en een standaardcurve gemaakt met acroleïne (De Weirdt *et al.*, 2012).

Bij een gebrek aan acroleïne en de onmogelijkheid om dit momenteel te verkrijgen, kon de productie en/of accumulatie van 3-HPA niet gecontroleerd worden.

3.4.2 Gasbepalingen

Aërobe en anaërobe experimenten

Aërobe culturen starten initieel met aanwezige lucht in de headspace van de serumfles. Contaminatie wordt vermeden door het afsluiten van de serumflessen met stoppers. Hierdoor kan geen verse lucht in de fles geraken, wat na een periode leidt tot anoxische condities door respiratie van de micro-organismen (gemiddelde afname van 1,4% in vijf dagen bij *L. reuteri* op verschillende substraten).

Testen onder anaërobe omstandigheden worden geflusht bij de start van het experiment (zie hieronder) en de anaërobe condities worden behouden gedurende het experiment.

Gas uitwisseling (flush)

Experimenten in serumflessen onder anaërobe omstandigheden worden meermaals geflusht met N_2 gas, door het creëren van een overdruk (0,5 bar) van N_2 gas, waarna een vacuümpomp het aanwezige gas afzuigt tot een onderdruk van 0,5 bar. Twintig dergelijke cycli worden doorlopen alvorens het flushen bij een aanwezige overdruk te stoppen om staalname te vereenvoudigen. Gassen worden via naalden (indien pure cultuur met een steriele 0,22 μm filter tussen) door de stoppers getransporteerd.

Gas chromatography (GC)

Analyse van gas gebeurt met behulp van een Compact-GC (Global analyser solutions, Interscience, Breda, Nederland). Staalnames van minimum 1 mL worden zo snel mogelijk geanalyseerd na controle van de cGC via een luchtstaal en indien nodig tijdelijk bewaard door middel van een naald die in een stopper werd geprikt zodat geen gas kan ontsnappen of binnendringen.

3.5 Berekeningen

3.5.1 Standaarddeviatie

De standaarddeviatie, σ , wordt berekend volgens Vergelijking 3.2 met \bar{x} het gemiddelde en n het aantal getallen waarvan de standaarddeviatie wordt berekend.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (3.2)$$

Door het werken met duplicaten kan vaak geen statistische standaarddeviatie berekend worden. De trend tussen de duplicaten wordt telkens bekeken.

3.5.2 Partieeldruk en opgeloste H_2 concentratie

Serumtesten

De partieeldruk van H_2 (P_{H_2}) en CO_2 (P_{CO_2}) bij serumtesten wordt berekend volgens Vergelijking 3.3 met X_a de molfractie en P de totale druk van het mengsel. De totale druk wordt 1

bar verondersteld voor de aërobe testen en 1,5 bar voor de anaërobe testen.

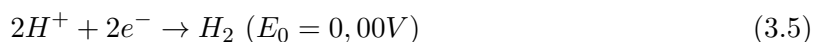
$$P_a = X_a \cdot P \quad (3.3)$$

Via de Wet van Henry (Vergelijking 3.13) kan dan de opgeloste H_2 concentratie berekend worden met X , de concentratie. De echte waarde kan licht afwijken aangezien de gebruikte waarde van de Henry constante k_H (1.282,1 L.atm/mol) geldt bij 25°C en opgelost in water.

$$P_a = k_H \cdot X \quad (3.4)$$

BES

In BES systemen wordt de partiële druk berekend aan de hand van de Nernst vergelijking (Vergelijking 3.6) en de halfreactie van protonreductie naar H_2 of de standaard waterstof elektrode (SHE)(Vergelijking 3.5).



$$E = E_0 - \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \cdot \ln \left(\frac{[red]}{[ox]} \right) \quad (3.6)$$

In deze Nernst vergelijking voor H_2 wordt de temperatuur T 37°C of 310 K verondersteld. Met F de Faraday constante (96485 C/mol), R de universele gasconstante (8,31 J/K.mol) en n het aantal elektronen, kan uit de kathodepotentiaal (E_{KA}) en de pH (Vergelijking 3.7) de molaire concentratie van H_2 berekend worden.

$$\begin{aligned} pH &= -\log[H^+] \\ \Rightarrow [H^+] &= 10^{-pH} \end{aligned} \quad (3.7)$$

$$\begin{aligned} E &= E_0 - \frac{1}{74,9} \cdot \ln \left(\frac{[H_2]}{[H^+]^2} \right) \\ \Rightarrow [H_2] &= e^{-E_{KA} \cdot 74,9} \cdot [H^+]^2 \end{aligned} \quad (3.8)$$

Bij een gebrek aan protonen kan water gereduceerd worden met vrijstelling van protonen (Vergelijking 3.9).



3.5.3 Elektronequivalenten

De cosubstraten gebruikt in de testen in serumflessen werden toegediend gebaseerd op de molaire verhouding 1:3 glucose:glycerol (Vergelijking 3.10), daar dit de ideale verhouding blijkt (Xiu *et al.*, 2007). Er wordt steeds gestart met 15 g/L pure glycerol (AppliChem, 87% zuiver).

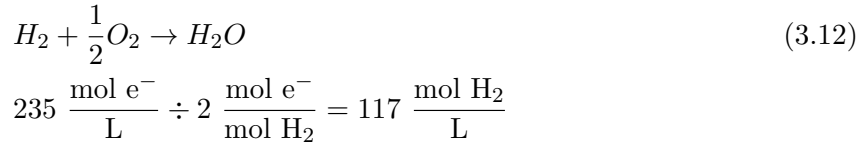
$$15g/L = 0,16 \text{ mol/L (glycerol)}$$

$$\frac{1}{3} \cdot 0,16 \text{ mol/L} = 0,054 \text{ mol/L} \quad (3.10)$$

$$0,054 \text{ mol/L} \cdot 180,16 \text{ g/mol} = 9,79 \text{ g/L (glucose)}$$

De concentratie waterstofgas, eveneens toegediend als cosubstraat, werd berekend volgens elektronequivalenten van glucose (Vergelijking 3.11).

$$\begin{aligned} C_6H_{12}O_6 + 6O_2 &\rightarrow 6CO_2 + 6H_2O \quad (3.11) \\ 0,054 \frac{\text{mol glucose}}{\text{L}} \cdot 6 \frac{\text{mol } O_2}{\text{mol glucose}} \cdot 4 \frac{\text{mol } e^-}{\text{mol } O_2} &= 235 \frac{\text{mol } e^-}{\text{L}} \end{aligned}$$



Via de Wet van Henry kan dit omgerekend worden naar partieeldruk (Vergelijking 3.13).

$$P_a = k_H \cdot c \quad (3.13)$$

$$P_{H_2} = 1.282,1 \frac{\text{L} \cdot \text{atm}}{\text{mol}} \cdot 117 \frac{\text{mol } H_2}{\text{L}}$$

$$= 150.641 \text{ atm} \cdot 1,01325 \frac{\text{bar}}{\text{atm}}$$

$$= 152.637 \text{ bar}$$

Vanwege de te hoge partieeldruk vereist om de gewenste concentratie waterstofgas in het medium te bekomen, werd met een overdruk van 0,5 bar gewerkt. Na driemaal de headspace van de serumfles te injecteren met 50 mL H_2 en opnieuw 50 mL op te zuigen, wordt 40 mL H_2 geïnjecteerd zonder nog gas op te zuigen.

3.5.4 Stroom

Opgelegde stroom wordt uitgedrukt per elektrode oppervlakte (stroomdichtheid J in Ampère per cm^2) of per reactorvolume (A/cm^3) om het vergelijken met andere experimenten mogelijk te maken. Via de Faraday constante (96485 Coulomb per mol elektronen) kan stroom omgerekend worden naar hoeveelheid elektronen (Vergelijking /refeq:Ie).

$$1 \text{ Ampère} = 1 \text{ Coulomb} \cdot \text{seconde}^{-1}$$

$$= 1,036 \cdot 10^{-5} \text{ mol elektronen} \cdot \text{seconde}^{-1} \quad (3.14)$$

Verder kan stroom vergeleken worden met een bron van organische energie en uitgedrukt worden als chemische zuurstofvraag (CZV), rekening houdend dat 1 mol CZV overeenkomt met 4 mol elektronen.

$$1 \text{ Ampère} = 1,036 \cdot 10^{-5} \text{ mol elektronen} \cdot \text{seconde}^{-1}$$

$$= 2,59 \cdot 10^{-6} \text{ mol } O_2 \cdot \text{seconde}^{-1}$$

$$= 8,29 \cdot 10^{-5} \text{ g } O_2 \cdot \text{seconde}^{-1} \quad (3.15)$$

3.5.5 Vermogen en energie

Het vermogen wordt gemeten door de potentiostaat of kan berekend worden als product van de opgelegde stroom (I) en de celpotentiaal (E_{CEL}).

$$P = I \cdot E_{CEL} \quad (3.16)$$

De celpotentiaal wordt eveneens gemeten door de potentiostaat of kan berekend worden uit het verschil van kathode en anode potentiaal.

$$E_{CEL} = E_{KA} - E_{AN} \quad (3.17)$$

Het vermogen wordt vermenigvuldigd met de tijd om de geleverde energie te berekenen in kWh.

$$[P] \cdot [t] = 1W \cdot s = \frac{10^{-3}kW}{3.600s} \cdot uur$$

$$= 2,78 \cdot 10^{-7} \text{ kWh} \quad (3.18)$$

3.5.6 Opbrengstefficiëntie

De opbrengstefficiëntie wordt berekend volgens de molaire verhouding 1,3-PDO geproduceerd versus glycerol verwijderd.

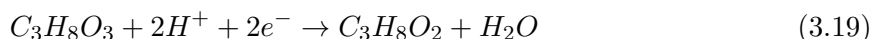
Voor de serumtest wordt de verwijderde hoeveelheid glycerol bepaald door het verschil voor en na. De waarde van 1,3-PDO wordt gehaald op het einde van de test (gemiddeld na 3,5 dagen). Alle beginwaarden werden verrekend op een volume van 40 mL, alle eindwaarden op het nieuwe volume na aftrek van de staalnames.

Voor de testen in BES wordt vanwege de afwijkende HPLC resultaten voor glycerol de afgevoegen hoeveelheid bij mediumbereiding (7,5 g) en bij supplementatie van enkel glycerol (7,5 g) of glycerol in Boenigk MM (7,5 g) genomen als startwaarde. Glycerolverwijdering wordt dan het verschil tussen deze berekende beginwaarde en de eindwaarde van de metingen. De 1,3-PDO waarde gebruikt is deze op het eind van het experiment (na 13 dagen), zelfs al is deze niet de maximale titer. Het volume is afhankelijk van het aantal maal dat gesupplementeerd werd (beginwaarde 0,5 L, na een eerste glycerol-supplementatie 0,525 L en na een eventuele tweede supplementatie 0,575 L, waarvan telkens het volume van staalnames (telkens 5 mL) wordt afgetrokken).

3.5.7 Coulombische efficiëntie

Een aangepaste definitie van Logan *et al.* (2006) stelt de coulombische efficiëntie ε_{Cb} gelijk aan de opgenomen hoeveelheid elektronen ten opzichte van de vrijgegeven elektronen. De efficiëntie duidt op de mate waarin de beschikbaar gestelde elektronen van de kathode gebruikt kunnen worden voor productie.

De coulombische efficiëntie van glycerolconversie naar 1,3-PDO wordt berekend aan de hand van de stoichiometrische vergelijking (Vergelijking 3.19).



In BES wordt de coulombische efficiëntie voor glycerolconversie ($\varepsilon_{Cb}(1,3\text{-PDO})$) berekend aan de hand van de opgelegde stroom en de geproduceerde hoeveelheid 1,3-PDO. Per mol 1,3-PDO gevormd, wordt één mol glycerol en twee elektronen geconsumeerd (Vergelijking 3.19). Door het gevormd aantal mol 1,3-PDO te vermenigvuldigen met twee en te delen door de opgelegde stroomsterkte (als mol e^- per seconde, Vergelijking 3.14) vermenigvuldigd met de tijd, kan ε_{Cb} bepaald worden (Vergelijking 3.20).

$$\varepsilon_{Cb} = \frac{2 \cdot n_{1,3\text{-PDO}}}{I \cdot 1,036 \cdot 10^{-5} \cdot \Delta t} \left(\frac{\frac{\text{mol elektronen}}{\text{mol 1,3-PDO}} \cdot \text{mol 1,3-PDO}}{\text{Ampère} \cdot \frac{\text{mol elektronen}}{\text{seconde Ampère}} \cdot \text{seconde}} \right) \quad (3.20)$$

De niet-opgenomen hoeveelheid elektronen wordt aan de kathode omgezet in waterstofgas. Via Vergelijking 3.21 kan dan de coulombische efficiëntie voor waterstof ($\varepsilon_{Cb}(H_2)$) berekend worden over een bepaalde tijdsperiode.

Het geproduceerd waterstofgas wordt berekend uit de procentuele samenstelling en het volume van het geproduceerde gas (uitgedrukt in mol door te delen door het molair volume 22,4 L per mol). De bekomen waarde wordt vermenigvuldigd met twee vanwege de elektronequivalenten van waterstofgas (Vergelijking 3.5).

$$\varepsilon_{Cb} = \frac{2 \cdot \%H_2 \cdot V_{gas}/22,4}{I \cdot 1,036 \cdot 10^{-5} \cdot \Delta t} \left(\frac{\frac{\text{mol elektronen}}{\text{mol H}_2} \cdot L/\frac{L}{\text{mol H}_2}}{\text{Ampère} \cdot \frac{\text{mol elektronen}}{\text{seconde Ampère}} \cdot \text{seconde}} \right) \quad (3.21)$$

Het verschil tussen 100% en de som van de coulombische efficiëntie van waterstofgasproductie en deze van de glycerolconversie naar 1,3-PDO, zijn elektronen verloren gegaan door bijvoorbeeld conversie van andere componenten. Indien een waarde bekomen wordt hoger dan 100%, is dit door niet stroom gerelateerde 1,3-PDO productie.

Hoofdstuk 4

Resultaten

Vooraleer de verschillende culturen te testen in een bio-elektrochemisch systeem (BES) werden batch testen in serumflessen uitgevoerd om het productievermogen te achterhalen van de stammen. Tevens werd met deze testen gecontroleerd indien de culturen waterstofgas en glucose kunnen opnemen als cosubstraat en welke invloed dit heeft op de metabolietproductie. Vervolgens werden BESs gebouwd en de culturen onder verschillende omstandigheden getest. Uiteindelijk werd nog een mediumtest gedaan om in de toekomst mogelijks met een eenvoudiger medium te werken.

Alle hier besproken serumtesten werden anaëroob uitgevoerd (tenzij anders vermeld) zodat de vergelijking met de BES testen kan gemaakt worden. Bij BES werd niet geflusht, maar er wordt geen gas in het kathode compartiment gepompt.

De *C. werkmanii* stammen werden gecontroleerd aan de hand van colony PCR zoals beschreven in de bijlage (Bijlage A).

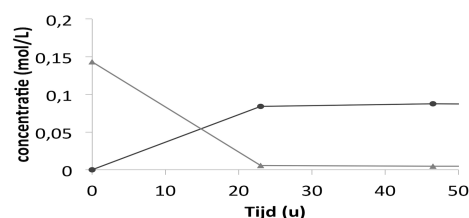
4.1 Batch testen in serumflessen

In de testen in serumflessen ('serumtesten') werd nagegaan indien de verschillende culturen waterstofgas (H_2) kunnen gebruiken als cosubstraat en elektrondonor. In deze sectie worden de verschillende culturen apart beschouwd. De testen worden uitgevoerd op een Boenigk minimaal medium met glycerol als substraat zonder en met H_2 en op een stikstofrijk of -arm medium.

Naast waterstofgas werd ook glucose bekeken als cosubstraat, maar hiervan wordt enkel het eindresultaat weergegeven in Figuur 4.22.

Formiaat ($HCOO^-Na^+$) werd eveneens getest als cosubstraat bij *L. reuteri* en *C. werkmanii* wild type en triple knock-out. Er werd nergens meetbaar glycerol of formiaat verwijderd, noch 1,3-PDO geproduceerd, waardoor formiaat niet verder in dit onderzoek werd opgenomen.

De opvolging van pH en groei (OD_{620}) wordt niet grafisch weergegeven in dit deel, vanwege het ondergeschikt belang in functie van de doelstellingen. De grafieken worden weergegeven in de bijlage



Figuur 4.1: Profiel van de glyceroldegradatie (Δ) en 1,3-PDO productie (\circ): testen bij *C. werkmanii* op stikstofrijk medium in aanwezigheid van antibiotica.

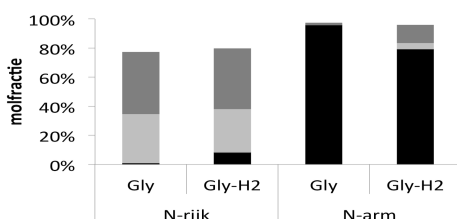
(Bijlage B) voor de volledigheid.

Een analyse nadien deed blijken dat de meeste glycerol al gedegradeerd wordt gedurende de eerste 24u van incubatie (Figuur 4.1). 1,3-PDO productie gebeurde voornamelijk in die periode, waarna de concentratie stagneert. Toekomstige testen kunnen op kortere termijn (48u) onderzocht worden.

4.1.1 *Citrobacter werkmanii* wild type

De batch testen op *C. werkmanii* wild type gebeurden allemaal met antibiotica (ampicilline, 200 µg/mL) en onder anaërobe omstandigheden. De test duurde 95 uur.

Over het verloop van het experiment werd de groei (OD_{620}) en pH opgevolgd (Figuur B.1). De duplicaten volgen een gelijk patroon en ook tussen de testen met en zonder H_2 is weinig verschil te merken. Onder stikstofrijke omstandigheden stabiliseert de OD_{620} na 23 uur op 0,6 en de pH neemt af van 7,5 tot een stabiele 6,25, eveneens na 23 uur. In de afwezigheid van stikstof wordt geen groei gedetecteerd zonder cosubstraat en ook de pH veranderd nauwelijks. Bij de testen met cosubstraat is een minimale groei te zien na 47 uur tot een OD_{620} van ongeveer 0,1 (in vergelijking met 0,06 bij de start van het experiment). De pH daalt minimaal van 7,5 naar 7,3.



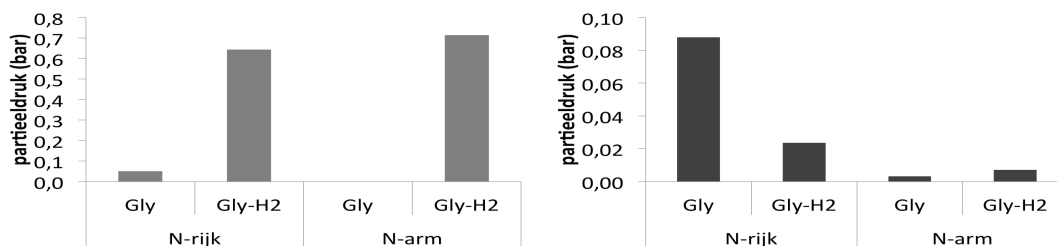
Figuur 4.2: Substraatconversie serumtest *C. werkmanii* wild type: Overzicht van de geproduceerde metabolieten op het einde van de test in molaire fractie versus de initiële molaire glycerolconcentratie. Met glycerol (zwart), 1,3-PDO (lichtgrijs) en organische zuren (grijs).

Op stikstofrijk medium is glycerol nagenoeg volledig verdwenen, waarvan zo'n 35% en 30% (resp. zonder en met cosubstraat) omgezet werd in 1,3-PDO (Figuur 4.2). Voor beide testen werd ongeveer 40% van de glycerol geconverteerd naar organische zuren met als voornaamste zuren acetaat (gemiddeld $37,4 \pm 7,4$ mmol/L) en formiaat (gemiddeld $39,8 \pm 12,3$ mmol/L). Succinaat en lactaat werden eveneens gedetecteerd in kleinere hoeveelheden.

In de afwezigheid van stikstof werd quasi geen glycerol geconsumeerd. Een kleine hoeveelheid succinaat (2,07 mmol/L) werd gedetecteerd bij de test zonder cosubstraat. De test met cosubstraat vertoonde ongeveer 20% glycerolverwijdering, waarvan zo'n 5% omgezet werd in 1,3-PDO en de rest in organische zuren. De gedetecteerde organische zuren waren acetaat, succinaat en lactaat. Er werd geen propionaat en butyraat gedetecteerd.

Op het einde van de testen werd een gasstaal van de headspace geanalyseerd (Figuur 4.3) om te vergelijken met de beginwaarden. Bij de verschillende media was gemiddeld $8,25 \cdot 10^{-3} \pm 0,15 \cdot 10^{-3}$ bar CO_2 bij het begin aanwezig en 0,66 bar H_2 bij de testen met cosubstraat.

In de aanwezigheid van stikstof wordt een minimale hoeveelheid H_2 ($P_{H_2} = 45,6 \cdot 10^{-3}$ bar) geproduceerd bij beide testen. Er wordt geen CO_2 geproduceerd in de afwezigheid van stikstof, maar P_{CO_2} stijgt met $86,7 \cdot 10^{-3}$ bar en $22,7 \cdot 10^{-3}$ bar (resp. zonder en met H_2) op stikstofrijk medium.



Figuur 4.3: Partieeldruk H_2 en CO_2 serumtest *C. werkmanii* wild type: P_{H_2} (lichtgrijs) en P_{CO_2} (donkergrijs) (in bar) in de headspace bij de verschillende testen op het einde van het experiment.

4.1.2 *Citrobacter werkmanii* triple knock-out

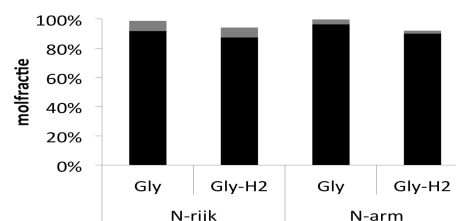
De serumtest met *C. werkmanii* triple knock-out werden uitgevoerd met antibiotica (chloramphenicol, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in het medium aanwezig en onder anaërobe omstandigheden. De test duurde 95 uur.

In de eerste 24 uur trad nagenoeg geen groei op bij de testen zonder cosubstraat (van OD_{620} 0,07 tot 0,08 met stikstof en van 0,05 tot 0,06 zonder stikstofbron). In de aanwezigheid van H_2 is minimale groei zichtbaar de eerste dag (van OD_{620} 0,07 tot 0,11 met stikstof en van 0,05 tot 0,08 zonder stikstof) waarna de OD_{620} stabiel bleef (Figuur B.2). De pH bleef bij alle testen relatief stabiel tussen de 7,5 en 7,6.

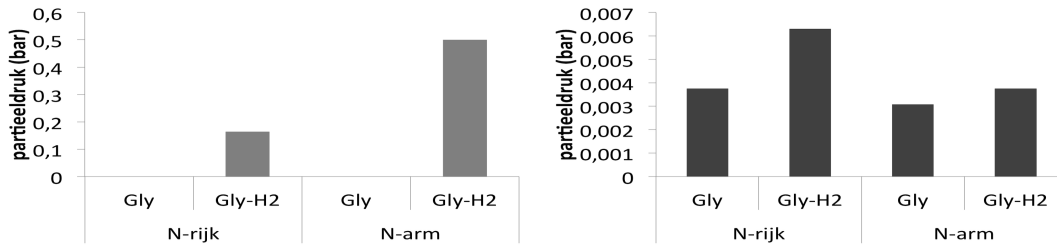
Bij alle testen werd gemiddeld zo'n 10% glycerol gedegradeerd, steeds iets meer bij de testen met H_2 (Figuur 4.4). Het afgebroken glycerol wordt quasi volledig omgezet in organische zuren. De enige zuren die gedetecteerd werden, zijn acetaat en succinaat. Er werd geen 1,3-PDO gedetecteerd.

Bij het begin van de test bevatte de headspace gemiddeld zo'n $1,0 \cdot 10^{-3}$ bar CO_2 en 0,58 bar en 0,87 bar H_2 bij de testen met cosubstraat respectievelijk met en zonder stikstofbron aanwezig. De waarden op het einde van de test worden weergegeven in Figuur 4.5.

Globaal is er bij alle testen een stijging naar gemiddeld $4,0 \cdot 10^{-3}$ bar voor CO_2 in de headspace. Bij de testen met H_2 is er een gemiddelde afname van 0,39 bar bij beide testen.



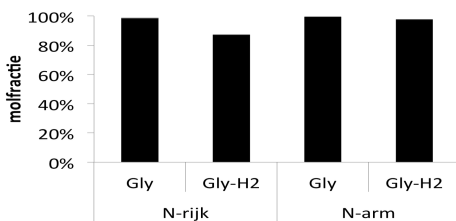
Figuur 4.4: Substraatconversie serumtest *C. werkmanii* triple knock-out: Overzicht van de geproduceerde metabolieten op het einde van de test in molaire fractie versus de initiële molaire glycerolconcentratie. Met glycerol (zwart) en organische zuren (grijs).



Figuur 4.5: Partieeldruk H_2 en CO_2 serumtest *C. werkmanii* triple knock-out: P_{H_2} (lichtgrijs) en P_{CO_2} (donkergrijs) (in bar) in de headspace bij de verschillende testen op het einde van het experiment.

4.1.3 *Lactobacillus reuteri*

Net als *Citrobacter* werd ook *Lactobacillus reuteri* getest op stikstofrijke en -arme media met en zonder waterstofgas als co-substraat (zonder antibiotica aanwezig).



Figuur 4.6: Substraatconversie serumtest *L. reuteri*: Overzicht van de geproduceerde metabolieten op het einde van de test in molaire fractie versus de initiële molaire glycerolconcentratie (met glycerol (zwart)).

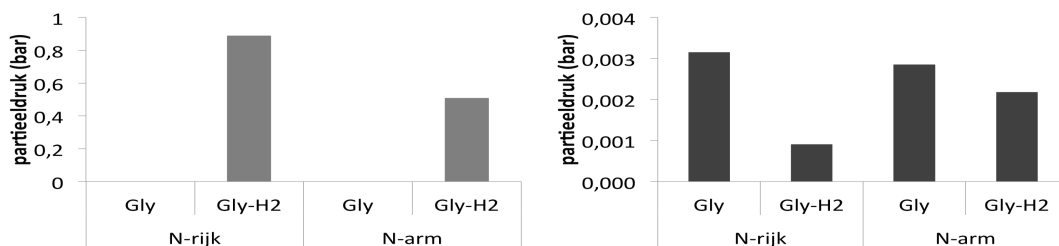
Bij de verschillende testen was er noch qua OD_{620} , noch qua pH een grote verandering waarneembaar (Figuur B.3). Bij de testen in de aanwezigheid van stikstof was zichtbaar groei, maar deze kon niet gedetecteerd worden via OD_{620} meting. Een *wavelength scan* over het volledige UV-VIS spectra van stalen met en zonder zichtbare groei en de blanco leverden geen duidelijke golflengte waarop groei kon gedetecteerd worden.

De pH neemt bij alle testen licht af met maximum 0,1 verschil in vergelijking met de beginwaarde.

Bij alle testen wordt nauwelijks glycerol afgebroken en geproduceerde metabolieten als 1,3-PDO en organische zuren zijn nergens detecteerbaar (Figuur 4.6).

Initieel was gemiddeld $1,8 \cdot 10^{-3}$ bar CO_2 aanwezig (Figuur 4.7). De testen met cosubstraat hadden in het begin een P_{H_2} van 0,68 en 0,99 bar respectievelijk met en zonder stikstofbron aanwezig.

P_{H_2} neemt toe bij de test op stikstofrijk medium met 0,2 bar en daalt bij de testen zonder stikstof naar 0,51 bar. P_{CO_2} blijft quasi onveranderd in afwezigheid van H_2 (stijging van $0,15 \cdot 10^{-3}$ bar bij beide), maar verdubbeld bij de testen met cosubstraat.



Figuur 4.7: Partieeldruk H_2 en CO_2 serumtest *L. reuteri*: P_{H_2} (lichtgrijs) en P_{CO_2} (donkergrijs) (in bar) in de headspace bij de verschillende testen op het einde van het experiment.

4.1.4 Mengculturen

De mengculturen werden getest op medium zonder antibiotica over een verloop van 112 uur. De cultuur heeft onder stikstofrijke omstandigheden een geleidelijke groei tot een OD_{620} van 1,4 en 1,2 voor respectievelijk met en zonder waterstofgas als cosubstraat (Figuur B.4). De pH blijft initieel gelijk rond de 7,7, en daalt tot 6,5 na 43 uur waarna het opnieuw licht stijgt tot 6,8.

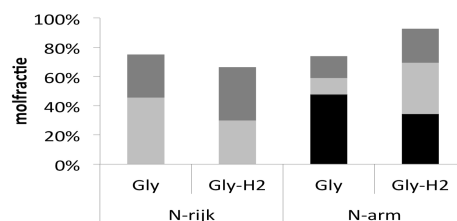
De testen op stikstofarm medium geven een minimale groei ($OD_{620} = 0,2$) en een geleidelijke daling in pH van 7,7 tot 6,7 (met H_2) of 6,9 (zonder H_2). Over het algemeen is er geen groot verschil tussen de testen met en zonder waterstofgas.

Op een stikstofrijk medium werd glycerol volledig afgebroken, onder stikstofarme omstandigheden is dit maar 44% (zonder H_2) en 55% (met H_2) (Figuur 4.8). 1,3-PDO heeft een molfractie van zo'n 50% en 30% bij stikstofrijk en 10% en 35% bij stikstofarm medium respectievelijk zonder en met H_2 als cosubstraat.

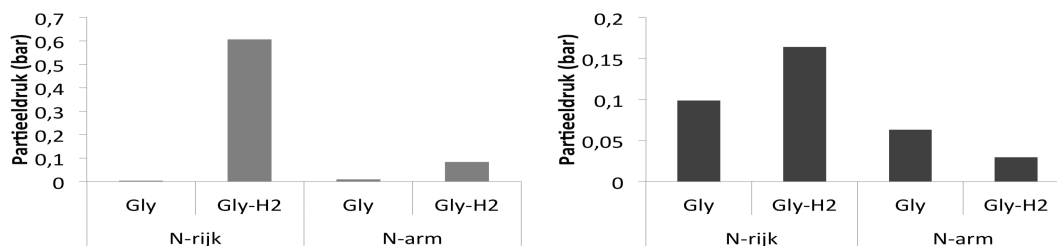
Naast 1,3-PDO wordt voornamelijk acetaat geproduceerd (gemiddeld 59,1 mmol/L (N-rijk) en 22,7 mmol/L (N-arm)). Lactaat wordt enkel geproduceerd onder stikstofarme omstandigheden (gemiddeld 4,2 mmol/L) en formiaat komt enkel voor bij de testen met H_2 (gemiddeld 7,0 mmol/L).

In het begin was er gemiddeld bij alle testen $4,7 \cdot 10^{-3} \pm 0,20 \cdot 10^{-3}$ bar CO_2 in de headspace aanwezig (Figuur 4.9). De testen met H_2 hadden gemiddeld een P_{H_2} van 0,89 bar. Methaan (CH_4) was zowel bij het begin als het einde van de test niet detecteerbaar.

P_{CO_2} neemt bij alle testen gemiddeld toe met $131 \cdot 10^{-3}$ bar in aanwezigheid van stikstof en $45 \cdot 10^{-3}$ bar in de afwezigheid ervan. De testen zonder cosubstraat vertonen H_2 productie en resulteert in P_{H_2} van gemiddeld $5,3 \cdot 10^{-3}$ bar op het einde van de test. P_{H_2} neemt af bij de testen met cosubstraat naar 0,6 bar en 0,08 bar respectievelijk met en zonder stikstofbron.



Figuur 4.8: Substraatconversie serumtest mengcultuur: Overzicht van de geproduceerde metabolieten op het einde van de test in molaire fractie versus de initiële molaire glycerolconcentratie. Met glycerol (zwart), 1,3-PDO (lichtgrijs) en organische zuren (grijs).



Figuur 4.9: Partieeldruk H₂ en CO₂ serumtest mengcultuur: P_{H_2} (lichtgrijs) en P_{CO_2} (donker-grijs) (in bar) in de headspace bij de verschillende testen op het einde van het experiment.

4.2 Bio-elektrochemische systemen

Na de diverse testen in serumflessen, werden de verschillende culturen in een bio-elektrochemisch systeem (BES) gebracht en getest onder constante elektrische stroomtoevoer van -10 mA gedurende een week, gevolgd door een week aan -100 mA. Bij het begin, de wissel tussen de verschillende stroomsterktes en op het eind van de test wordt een cyclische voltammetrie uitgevoerd. De grafieken van de cyclische voltammetrie worden in dit deel niet weergegeven, maar staan allemaal in Bijlage C.1. Behalve de test met *C. werkmanii* wild type met antibiotica werden alle tests uitgevoerd op stikstofrijk en -arm medium.

Alle testen werden bij de wissel tussen de opgelegde stroomsterkte gesupplementeerd met 7,5 gram glycerol in 25mL milliQ water (15 g/L in het BES medium). De testen zonder antibiotica kregen ook nog een extra supplementatie van 7,5 gram glycerol in 50mL Boenigk MM op dag 9 even voor de staalname. Deze tweede supplementatie is meestal niet zichtbaar door te snelle staalname.

De concentraties van glycerol bij het begin van het experiment werden over het algemeen niet goed gedetecteerd, de verwachte waarden zouden rond de 0,16 mol/L (15 g/L) moeten liggen. Bij de berekeningen worden deze waarden dan ook gebruikt (Figuur 4.22).

4.2.1 *Citrobacter werkmanii* wild type

Tabel 4.1: Antibiotica-test BES *C. werkmanii* wild type op stikstofrijk medium. Met LB agar ('LB'), LB agar + ampicilline ('LB-Amp') en LB agar + chlooramphenicol ('LB-Chl'). CFU: colony forming units

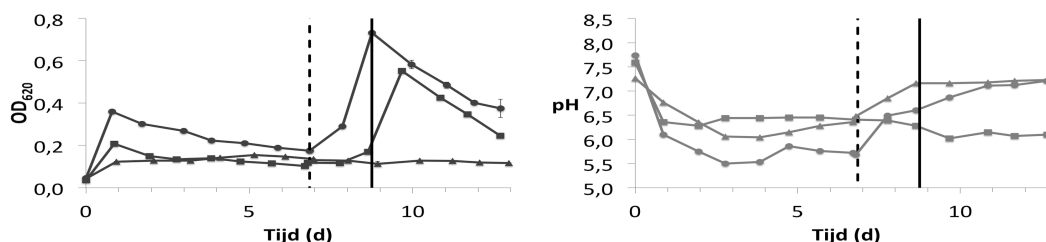
Medium	CFU
LB	+
LB-Amp	-
LB-Chl	3 (klein)

De BES test van *C. werkmanii* wild type werd uitgevoerd zowel met als zonder antibiotica (ampicilline, 200 µg/mL). De test op een stikstofarm medium werd niet uitgevoerd met antibiotica. De gelijkaardige test zonder antibiotica werd uitgeplaat en geïncubeerd gedurende 28 uur bij 37°C (Tabel 4.1).

De resultaten van deze uitplating zijn niet zoals verwacht, maar andere testen vroeger en later uit dezelfde cryovials geven betere resultaten (groei op LB en LB met ampicilline, maar niet in aanwezigheid van chlooramphenicol). Aangezien niets wijst op een contaminatie, wordt verondersteld dat de test zonder antibiotica representatief is voor *C. werkmanii* wild type.

Groei en pH

Na een initiële stijging is een stabiele OD_{620} waarneembaar (licht dalend in stikstofrijk medium zonder antibiotica) tot aan de wissel van opgelegde stroomsterkte. Vanaf de wissel stijgt de OD_{620} sterk in afwezigheid van antibiotica tot er opnieuw glycerol wordt gesupplementeerd, waarna de OD_{620} opnieuw afneemt. In aanwezigheid van antibiotica blijft de OD_{620} na een initiële stijging nagenoeg stabiel (Figuur 4.10).



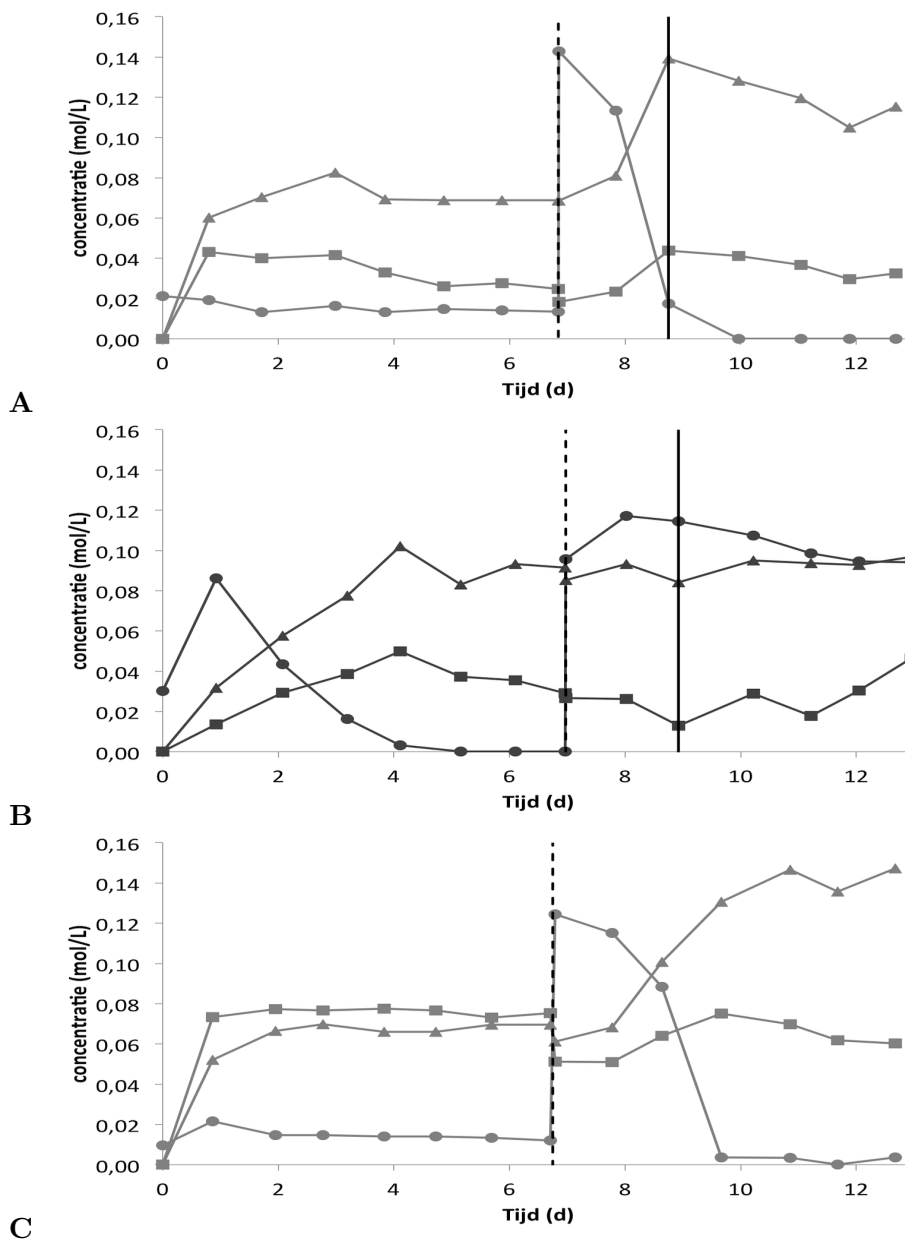
Figuur 4.10: Groei- en pH-curve BES *C. werkmanii* wild type: OD_{620} (donker) en pH (licht) in functie van de tijd (in aantal dagen). Het experiment werd uitgevoerd op medium met (\circ) en zonder (\triangle) stikstofbron en op stikstofrijk medium met antibiotica (\square). De verticaal gestreepte lijn duidt op de overgang tussen -10 mA en -100 mA; de volle lijn duidt op glycerolsupplementatie. De weergegeven foutbalken bij OD_{620} zijn standaarddeviaties van drie metingen.

Het verloop van de pH (Figuur 4.10) kent gelijkaardige keerpunten als de groei. Na een verzuring tijdens het begin van het experiment, stabiliseert de pH tot op het moment waar gewisseld wordt van stroomsterkte. Na de wissel is een kleine stijging van de pH merkbaar tot het moment van supplementatie waarna de pH anders verloopt bij de verschillende testen. Op stikstofrijk medium in afwezigheid van antibiotica neemt de pH geleidelijk toe tot dezelfde waarde van 7,2, waar ook de BES test met stikstof en zonder antibiotica op stabiliseert na supplementatie. De test met antibiotica kent algemeen minder sprongen in de pH en neemt na de wissel geleidelijk af om een dag na supplementatie te satureren op pH 6,1.

Glyceroldegradatie en metaboliëtoproductie

Bij de test op stikstofrijk medium zonder antibiotica zijn relatief stabiele concentraties van glycerol, 1,3-PDO en organische zuren gedetecteerd tot en met de wissel (Figuur 4.11A). Bij -100 mA stijgt de 1,3-PDO concentratie sterk en ook de concentratie aan organische zuren neemt toe met als voornaamste component acetaat. Nadat de laatste glycerol is geconsumeerd stabiliseren alle concentraties. Naast acetaat werd ook succinaat, lactaat, formiaat en butyraat gedetecteerd.

In de afwezigheid van stikstof en antibiotica neemt de glycerolconcentratie sterk af met tegelijkertijd een stijging van 1,3-PDO en organische zuren (voornamelijk acetaat en succinaat) tot op het moment dat alle glycerol is verdwenen (dag 4)(Figuur 4.11B). Na de wissel van opgelegde stroomsterkte en glycerolsupplementatie blijven alle concentraties stabiel, enkel de concentratie organische zuren neemt licht toe. Melkzuur, formiaat en butyraat werden ook gedetecteerd (respectievelijk maximaal 8,2 mmol/L; 0,76 mmol/L en 12,5 mmol/L).

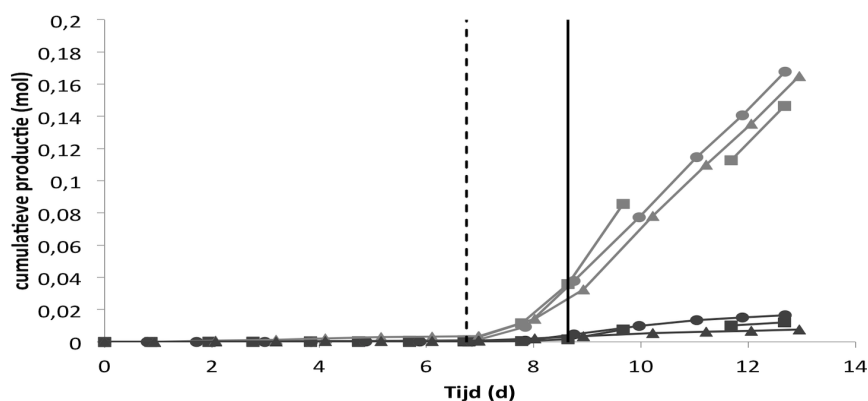


Figuur 4.11: Substraatconversie BES *C. werkmanii* wild type: Evolutie van de molaire concentratie glycerol (○), 1,3-PDO (△) en organische zuren (□) in functie van de tijd (in aantal dagen) met A) stikstofrijk medium zonder antibiotica; B) stikstofarm medium zonder antibiotica en C) stikstofrijk medium met antibiotica. De verticaal gestreepte lijn duidt op de overgang tussen -10 mA en -100 mA; de volle lijn duidt op glycerolsupplementatie.

Bij de testen met antibiotica veranderen alle concentraties na een initiële stijging van 1,3-PDO nagenoeg niet tot en met het moment van de wissel van stroomsterkte, waarna glycerol in drie dagen bijna volledig verwijderd wordt (4.11C). De verwijdering van glycerol gaat gepaard met een stijgende concentratie van 1,3-PDO en een lichte stijging van organische zuren (voornamelijk formiaat en acetaat, respectievelijk maximaal 31,1 mmol/L en 34,1 mmol/L). Andere gedetecteerde zuren zijn succinaat, melkzuur en butyraat.

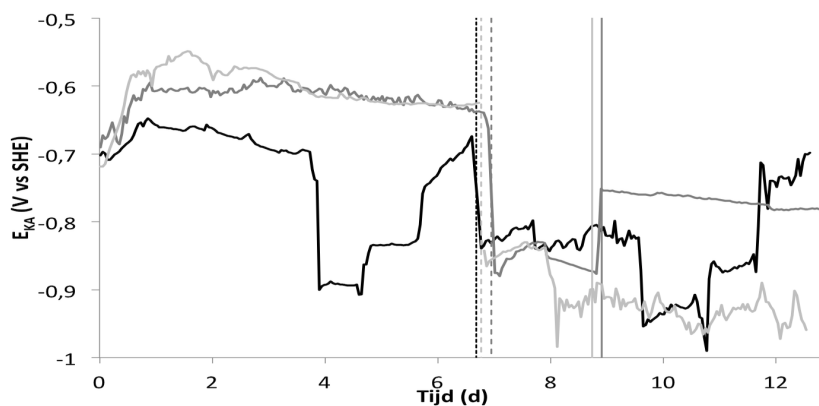
Gasproductie en samenstelling

De cumulatieve productie van waterstofgas (H_2) en koolstofdioxide (CO_2) van de verschillende BES testen wordt weergegeven in Figuur 4.12. Bij -10 mA wordt slechts een minimum aan H_2 geproduceerd. Eenmaal de wissel gemaakt wordt naar -100 mA neemt de H_2 productie sterk toe, quasi gelijk tussen de verschillende testen. Na de wissel begint ook de CO_2 productie gestaag toe te nemen en na de tweede glycerolsupplementatie stijgt dit iets sneller.



Figuur 4.12: Gasproductie BES *C. werkmanii* wild type: cumulatieve productie van H_2 (lichtgrijs) en CO_2 (donkergrijs) in functie van de tijd (in aantal dagen). Met de BES test zonder antibiotica op stikstofrijk (\circ) en stikstofarm (\triangle) medium en de test met antibiotica op stikstofrijk medium (\square). De verticaal gestreepte lijn duidt op de overgang tussen -10 mA en -100 mA; de volle lijn duidt op glycerolsupplementatie.

Kathodepotentiaal



Figuur 4.13: Verloop kathodepotentiaal BES *C. werkmanii* wild type: kathodepotentiaal (V vs SHE) in functie van de tijd (uur) op stikstofrijk (lichtgrijs) en -arm (donkergrijs) medium en met antibiotica op stikstofrijk medium (zwart). De verticaal gestreepte lijn duidt op de overgang van -10 mA naar -100 mA, de volle lijn duidt op Boenigk MM glycerolsupplementatie.

Bij de testen zonder antibiotica blijft de potentiaal relatief stabiel bij -10 mA (gemiddeld $-0,6$ V vs SHE)(Figuur 4.13). Na de wissel naar -100 mA verschilt de potentiaal naargelang de test. De gemiddelde potentiaal is $-0,667 \pm 0,039$ V vs SHE op stikstofrijk en $-0,796 \pm 0,043$ V

vs SHE op stikstofarm medium. Alle sprongen bij -100 mA vallen samen met momenten van staalname.

In de aanwezigheid van antibiotica is de potentiaal minder stabiel, wat onder andere kan verklaard worden door problemen met de recirculatie. Behalve een sprong na vier dagen (het moment waarop vlokvorming gedetecteerd werd in het kathode compartiment) schommelt de potentiaal bij -10 mA rond -0,700 V vs SHE. Na de wissel naar -100 mA daalt de potentiaal. Tussen dag negen en elf was er een probleem met recirculatie en een blokkage in de gasleidingen. Verder werd na bijna iedere staalname de recirculatie hersteld of geoptimaliseerd, de momenten van staalname vallen samen met de grote sprongen.

Cyclische voltammetrie

Bij het begin van het experiment zijn geen pieken detecteerbaar op de cyclische voltammetrie bij 1 mV/s (Figuur C.1). Na zeven dagen bij -10 mA is een irreversibele oxidatieve piek waarneembaar bij -0,1 V vs SHE. De cyclische voltammetrie op het einde van het experiment levert een grotere piek (behalve in aanwezigheid van antibiotica) die verschoven is naar -0,2 V vs SHE. De test met antibiotica levert eveneens een piek op -0,2 V vs SHE, maar in dezelfde grootte-orde (0,2 mA/cm²) als bij de wissel van stroomsterkte.

De meting op het einde van het experiment met antibiotica vertoont eveneens een verhoging van de potentiaal waarbij H₂ gevormd wordt (verschuiving naar -0,4 V vs SHE).

De meting bij 50 mV/s levert nergens reductieve of oxidatieve pieken op, behalve een minimale piek bij -0,2 V vs SHE bij de meting op het eind van het experiment zonder stikstof (Figuur C.2). De stroomdichtheden zijn op het eind van het experiment steeds opvallend hoger, zowel in vergelijking met de meting bij begin en bij de wissel als in vergelijking met de metingen bij 1 mV/s. De verhoogde reductiepotentiaal van H₂ is overal zichtbaar, maar meest uitgesproken bij de test met antibiotica.

Coulombische efficiënties

Op basis van het geproduceerde H₂ en 1,3-PDO wordt een coulombische efficiëntie berekend en eveneens de som van beiden (Tabel 4.2). Bij een opgelegde stroomsterkte van -10 mA liggen alle efficiënties van glycerolconversie boven de 100% wat er op duidt dat niet alle conversie stroomgerelateerd gebeurt. Algemeen is $\varepsilon_{Cb}(1,3\text{-PDO})$ steeds hoger dan $\varepsilon_{Cb}(\text{H}_2)$ bij -10 mA en omgekeerd bij -100 mA. In de afwezigheid van stikstof wordt bij -10 mA meer H₂ geproduceerd en eveneens meer glycerol omgezet naar 1,3-PDO.

Tabel 4.2: Coulombische efficiëntie BES *C. werkmanii* wild type: $\varepsilon_{Cb}(1,3\text{-PDO})$, $\varepsilon_{Cb}(\text{H}_2)$ en de som ($\Sigma \varepsilon_{Cb}$) van de testen op stikstofrijk ('N-rijk') en stikstofarm ('N-arm') medium, met ('Antib') en zonder ('no Antib') antibiotica en met een opgelegde stroomsterkte van -10 mA en -100 mA.

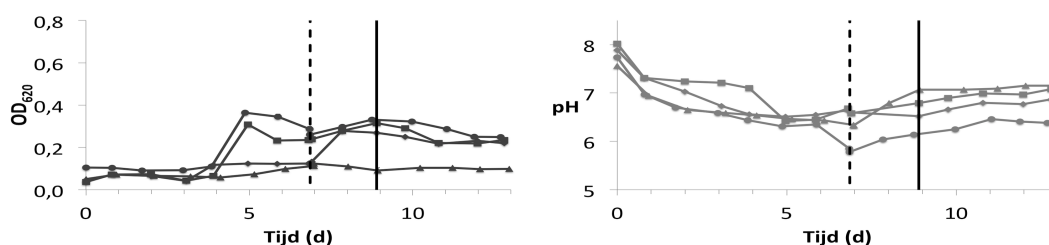
			$\varepsilon_{Cb}(1,3\text{-PDO})$	$\varepsilon_{Cb}(\text{H}_2)$	$\Sigma \varepsilon_{Cb}$
N-rijk	no Antib	-10 mA	104,5 %	0,5 %	105,1 %
		-100 mA	9,1 %	64,2 %	73,2 %
	Antib	-10 mA	107,8 %	3,3 %	111,1 %
		-100 mA	14,8 %	55,2 %	70,1 %
N-arm	no Antib	-10 mA	136,4 %	11,2 %	147,6 %
		-100 mA	2,2 %	60,5 %	62,6 %

4.2.2 *Citrobacter werkmanii* triple knock-out

Na het wild type werd ook de triple knock-out in een BES reactor geanalyseerd. Testen gebeurden eenmaal met en zonder antibiotica (chlooramphenicol, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en telkens op stikstofrijk en stikstofarm medium.

Groei en pH

De groei verloopt over het algemeen volgens een standaard patroon met een lange lag fase (Figuur 4.14). Na vier dagen treedt één dag groei op bij de experimenten met stikstofbron, waarna de OD_{620} stabiliseert. De test zonder stikstof en zonder antibiotica vertoont over het ganse experiment geen groei, maar ook geen afname van OD_{620} . In afwezigheid van stikstof vertoont de test met antibiotica na de wissel één dag groei, waarna de OD_{620} stabiliseert op gelijke waarde als de testen met stikstof (0,24).

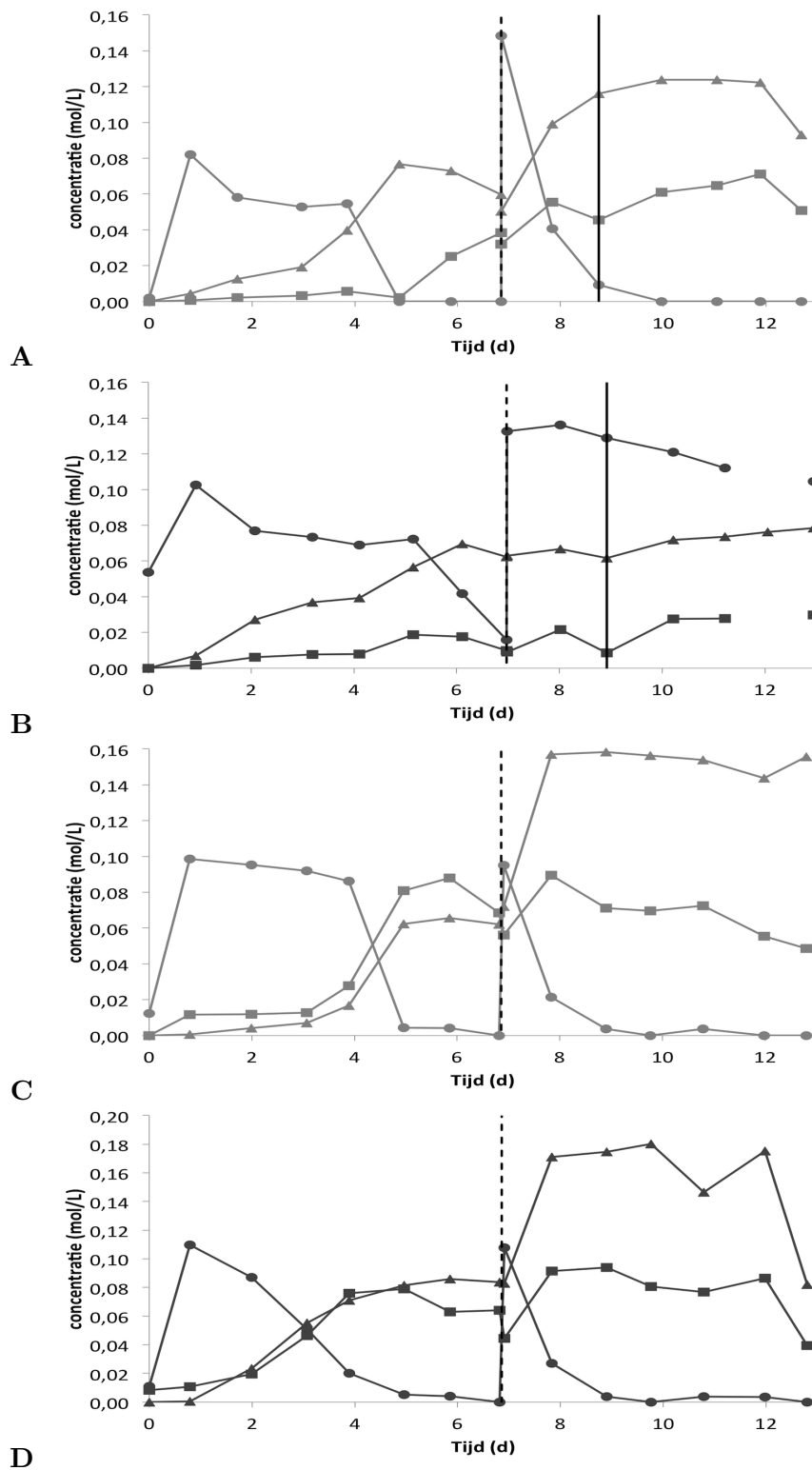


Figuur 4.14: Groei- en pH-curve BES *C. werkmanii* triple knock-out: OD_{620} (donker) en pH (licht) in functie van de tijd (in aantal dagen). Het experiment werd uitgevoerd op medium met (○) en zonder (△) stikstofbron en in aanwezigheid van antibiotica op stikstofrijk (□) en stikstofarm (◇) medium. De verticaal gestreepte lijn duidt op de overgang tussen -10 mA en -100 mA; de volle lijn duidt op glycerolsupplementatie. De weergegeven foutbalken bij OD_{620} zijn standaarddeviaties van drie metingen.

De pH verandert bij alle testen quasi gelijkaardig (Figuur 4.14). Eerst is er een geleidelijke daling van gemiddeld 7,75 tot 6,5 aan het moment van de wissel in stroomsterkte. Na de wissel is er een geleidelijke toename in pH tot eindwaarden van 7,0. Enkel de test met stikstof en zonder antibiotica kent een sterkere daling net voor de wissel en behoudt dit verschil gedurende de rest van het experiment. De trend blijft wel gelijk.

Glyceroldegradatie en metabolietproductie

In aanwezigheid van stikstof en zonder antibiotica neemt glycerol geleidelijk af tot ze verdwenen is na vijf dagen (Figuur 4.15A). Na de supplementatie op de wissel naar -100 mA wordt glycerol in drie dagen volledig geconsumeerd. Zowel de organische zuren (enkel acetaat) als 1,3-PDO nemen geleidelijk toe, waarbij de laatstnoemde het snelst. Eenmaal glycerol verdwenen is uit het medium neemt de concentratie aan organische zuren sterk toe, terwijl 1,3-PDO dan licht afneemt. Na de wissel stijgt 1,3-PDO opnieuw sterk tot glycerol opnieuw volledig is gedegradeerd. De concentratie aan organische zuren stijgt na de wissel geleidelijk met als enige componenten acetaat en butyraat. Formiaat, succinaat, lactaat en propionaat werden nooit gedetecteerd.



Figuur 4.15: Substraatconversie BES *C. werkmanii* triple knock-out: Evolutie van de molaire concentratie glycerol (○), 1,3-PDO (△) en organische zuren (□) in functie van de tijd (in aantal dagen) met A) stikstofrijk medium zonder antibiotica; B) stikstofarm medium zonder antibiotica; C) stikstofrijk medium met antibiotica en D) stikstofarm medium met antibiotica. De verticaal gestreepte lijn duidt op de overgang tussen -10 mA en -100 mA; de volle lijn duidt op glycerolsupplementatie.

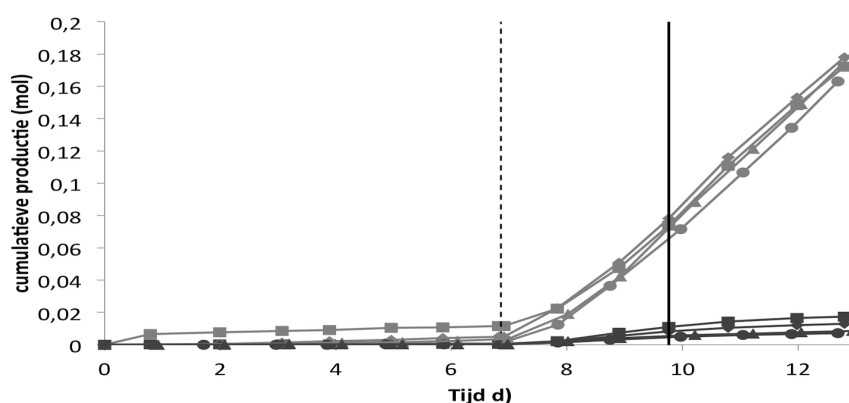
* Op dag 12 zijn de waarden van glycerol en organische zuren in de orde van 0,2 en 0,1 mol/L, een enorm verschil met de dag ervoor en erna, waardoor ze niet in de grafiek zijn opgenomen.

In de afwezigheid van stikstof (en zonder antibiotica) is glycerol bij de wissel van stroomsterkte nog niet volledig verdwenen (Figuur 4.15B). Na supplementatie op de wissel naar -100 mA blijft de glycerol concentratie slechts zeer geleidelijk afnemen. De concentratie aan 1,3-PDO stijgt geleidelijk bij -10 mA, maar kent slechts een minimale toename meer bij -100 mA. De organische zuren nemen geleidelijk toe over het ganse experiment. De voornaamste zuren zijn acetaat en lactaat. Succinaat en butyraat werden eveneens gedetecteerd, maar in lage concentraties (respectievelijk 3,7 mmol/L en 15,7 mmol/L).

De eerste drie dagen neemt glycerol slechts minimaal af in aanwezigheid van antibiotica en zonder stikstofbron, maar na dag vier is een snelle degradatie te zien tot quasi 0 mol/L (Figuur 4.15C). Na supplementatie op de wissel naar -100 mA daalt de glycerolconcentratie onmiddellijk sterk tot glycerol bijna verdwenen is na drie dagen. Bij -10 mA neemt de concentratie van 1,3-PDO en organische zuren (voornamelijk acetaat (22,20 mmol/L op dag 7) en formiaat (541,14 mmol/L op dag 7)) volgens een gelijke trend toe, waarbij de concentratie 1,3-PDO steeds iets hoger ligt. Na de wissel naar -100 mA neemt de concentratie aan organische zuren geleidelijk af, maar de concentratie 1,3-PDO stijgt de eerste dag sterk om dan te stabiliseren op 0,16 mol/L. Naast acetaat en formiaat werden eveneens succinaat (max 7,22mmol/L op dag 5) en lactaat (max 11,39 mmol/L op dag 6) gedetecteerd.

Op medium zonder stikstof en met antibiotica valt de geleidelijke afname van glycerol de eerste vijf dagen gelijktijdig met de toename in 1,3-PDO en organische zuren met als voornaamste component acetaat en formiaat (Figuur 4.15D). Na vijf dagen is glycerol quasi volledig verdwenen en de concentratie 1,3-PDO stabiliseert, terwijl de concentratie organische zuren licht afneemt. Na de wissel naar -100 mA en glycerol-supplementatie wordt glycerol in een drietal dagen volledig gedegradieerd, terwijl de concentraties van 1,3-PDO en organische zuren volgens een gelijke trend stijgen en stabiliseren. De stijging van 1,3-PDO is echter veel groter dan die van de zuren. Na dag twaalf nemen beide concentraties sterk af. Naast acetaat en formiaat werd eveneens succinaat en lactaat gedetecteerd.

Gasproductie en samenstelling



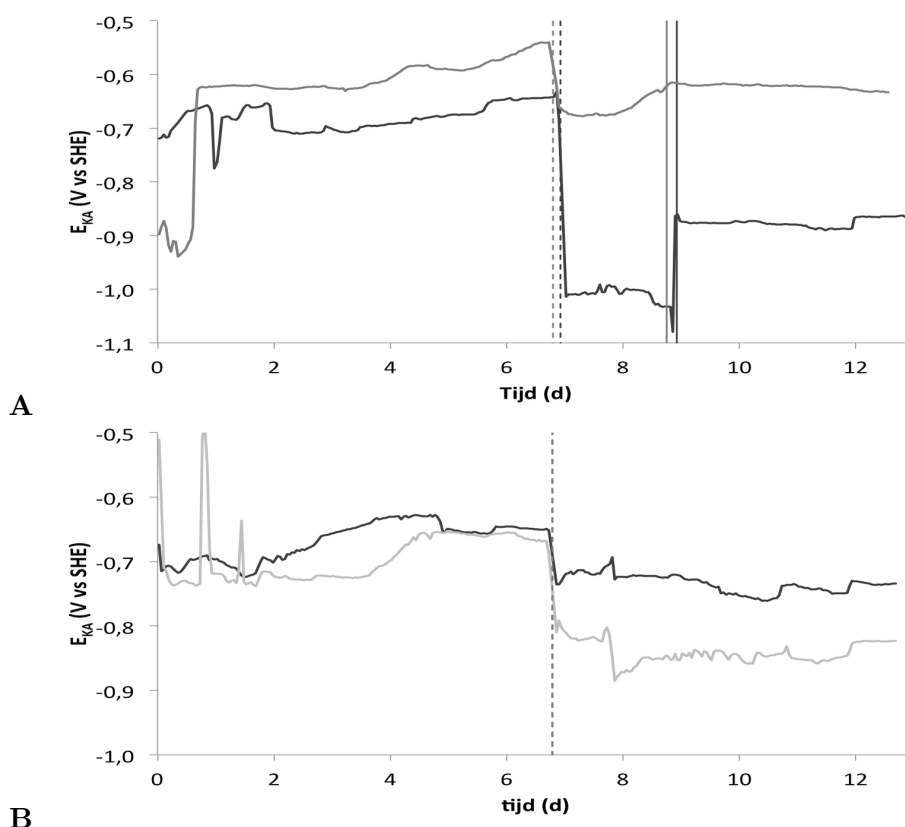
Figuur 4.16: Gasproductie BES *C. werkmanii* triple knock-out: cumulatieve productie van H₂ (lichtgrijs) en CO₂ (donkergrijs) in functie van de tijd (in aantal dagen). Met de BES test zonder antibiotica op stikstofrijk (○) en stikstofarm (△) medium en de test met antibiotica op stikstofrijk (□) en stikstofarm (◇) medium. De verticaal gestreepte lijn duidt op de overgang tussen -10 mA en -100 mA; de volle lijn duidt op glycerol-supplementatie.

Het resultaat van alle testen is gelijkaardig, namelijk een minimale toename van H_2 bij -10 mA en nagenoeg geen stijging van CO_2 (Figuur 4.16). Na de wissel naar -100 mA neemt H_2 sterk toe, terwijl de CO_2 productie slechts minimaal stijgt.

Kathodepotentiaal

Bij -10 mA blijft de potentiaal van beide testen stabiel op -0,63 V vs SHE en -0,68 V vs SHE respectievelijk met en zonder stikstofbron en zonder antibiotica (Figuur 4.17A). Na de wissel naar -100 mA is er bij beide testen een daling te zien, maar veel sterker bij de test op stikstof-arm medium. Na glycerolsupplementatie op dag negen stijgt de potentiaal bij beiden opnieuw. De stijging bij de test in afwezigheid van stikstof is echter veel minder dan de daling na de wissel. De gemiddelde potentiaal bij -100 mA bedraagt $-0,64 \pm 0,02$ V vs SHE voor de test op stikstofrijk en $-0,92 \pm 0,09$ V vs SHE op stikstofarm medium.

In aanwezigheid van antibiotica verlopen beide testen meer gelijkaardig bij een stroomsterkte van -10 mA (Figuur 4.17B). Zowel met (-0,69 V vs SHE) als zonder stikstof (-0,67 V vs SHE) is de potentiaal quasi gelijk. Na omschakeling naar -100 mA dalen beide potentialen, maar sterker bij de test met stikstof. Ook na de wissel blijven de potentialen stabiel op -0,84 V vs SHE met en -0,73 V vs SHE zonder stikstof.



Figuur 4.17: Verloop kathodepotentiaal BES *C. werkmanii* triple knock-out: kathodepotentiaal (V vs SHE) in functie van de tijd (in aantal dagen) op stikstofrijk (lichtgrijs) en -arm (donkergrijs) medium zonder (A) en met (B) antibiotica. De verticaal gestreepte lijn duidt op de overgang van -10 mA naar -100 mA, de volle lijn duidt op Boenigk MM glycerolsupplementatie.

Cyclische voltammetrie

De metingen aan 1 mV/s vertonen allen een verschuiving in de tijd van een irreversibele oxidatieve piek (Figuur C.3). Bij het begin van het experiment is geen piek detecteerbaar, behalve bij de test in afwezigheid van stikstof en met antibiotica, daar is een kleine oxidatieve piek zichtbaar bij 0 V vs SHE. Bij de wissel in stroomsterkte wordt een piek meetbaar op 0,1 v vs SHE met een stroomdichtheid van 0,2 mA/cm², in afwezigheid van stikstof en antibiotica slechts 0,1 mA/cm². De meting op het einde van het experiment wordt gemeten bij een kathodopotential van -0,2 V vs SHE. Enkel in aanwezigheid van stikstof en zonder antibiotica bevindt de piek zich vanaf het begin al bij -0,2 V vs SHE, enkel de stroomdichtheid neemt toe in functie van de tijd. De vorming van H₂ verplaatst zich in de tijd naar lagere potentiala, hoewel dit weinig uitgesproken zichtbaar is.

Cyclische voltammetries bij -50 mV/s vertonen weinig verandering in de tijd (Figuur C.4). Enkel in aanwezigheid van stikstof en zonder antibiotica is een opvallende reductief patroon zichtbaar bij lage stroomdichtheden en dit bij de wissel van stroomsterkte. Op het einde van het experiment is dit patroon nog steeds zichtbaar, doch minder sterk.

Coulombische efficiëntie

Tabel 4.3 heeft de resultaten van $\varepsilon_{Cb}(1,3\text{-PDO})$ en $\varepsilon_{Cb}(\text{H}_2)$ weer, waar we zien dat bij -10 mA de glycerolconversie steeds hoger is dan de H₂-productie en omgekeerd bij -100 mA. Bij -100 mA is de efficiëntie van glycerolconversie minimaal. De waarden boven 100% duiden op conversie ongerelateerd met de stroom, de negatieve waarde voor $\varepsilon_{Cb}(1,3\text{-PDO})$ bij -100 mA op stikstofarm medium met antibiotica is te wijten door een lagere concentratie 1,3-PDO op het einde van het experiment in vergelijking met bij de wissel van stroomsterkte.

Tabel 4.3: Coulombische efficiëntie BES *C. werkmanii* triple knock-out: $\varepsilon_{Cb}(1,3\text{-PDO})$, $\varepsilon_{Cb}(\text{H}_2)$ en de som ($\Sigma \varepsilon_{Cb}$) van de testen op stikstofrijk ('N-rijk') en stikstofarm ('N-arm') medium, met ('Antib') en zonder ('no Antib') antibiotica en met een opgelegde stroomsterkte van -10 mA en -100 mA.

			$\varepsilon_{Cb}(1,3\text{-PDO})$	$\varepsilon_{Cb}(\text{H}_2)$	$\Sigma \varepsilon_{Cb}$
N-rijk	no Antib	-10 mA	90,7 %	2,7 %	93,5 %
		-100 mA	8,3 %	40,5 %	48,8 %
	Antib	-10 mA	94,6 %	37,6 %	132,3 %
		-100 mA	14,4 %	60,9 %	75,3 %
N-arm	no Antib	-10 mA	92,8 %	11,0 %	103,8 %
		-100 mA	2,9 %	66,2 %	69,1 %
	Antib	-10 mA	127,6 %	16,4 %	144,0 %
		-100 mA	-0,2 %	56,1 %	55,9 %

4.2.3 *Lactobacillus reuteri*

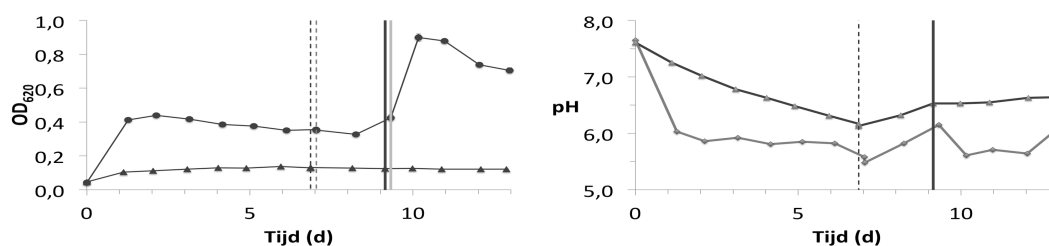
Na de testen met *Citrobacter* species werd ook *L. reuteri* getest in de BES. De testen gebeurden allemaal op stikstofrijk en -arm medium zonder antibiotica.

Groei en pH

In de aanwezigheid van stikstof is er de eerste dag een sterke toename van groei, waarna de OD₆₂₀ stabiel blijft (Figuur 4.18). De pH kent de eerste dag een sterke daling, waarna deze stabiliseert. Na de omschakeling naar -100 mA neemt de OD₆₂₀ pas na twee dagen toe om dan

weer geleidelijk af te nemen. De pH stijgt de eerste twee dagen lichtjes om dan weer te dalen naar zijn stabilisatiewaarde (5,7).

De testen zonder stikstofbron in het medium vertonen over het volledige verloop van het experiment nagenoeg geen groei, maar de pH daalt wel van 7,6 tot 6,2 gedurende de periode van -10 mA. Na de omschakeling naar -100 mA stijgt de pH geleidelijk tot een eindwaarde van 6,6 op dag dertien.



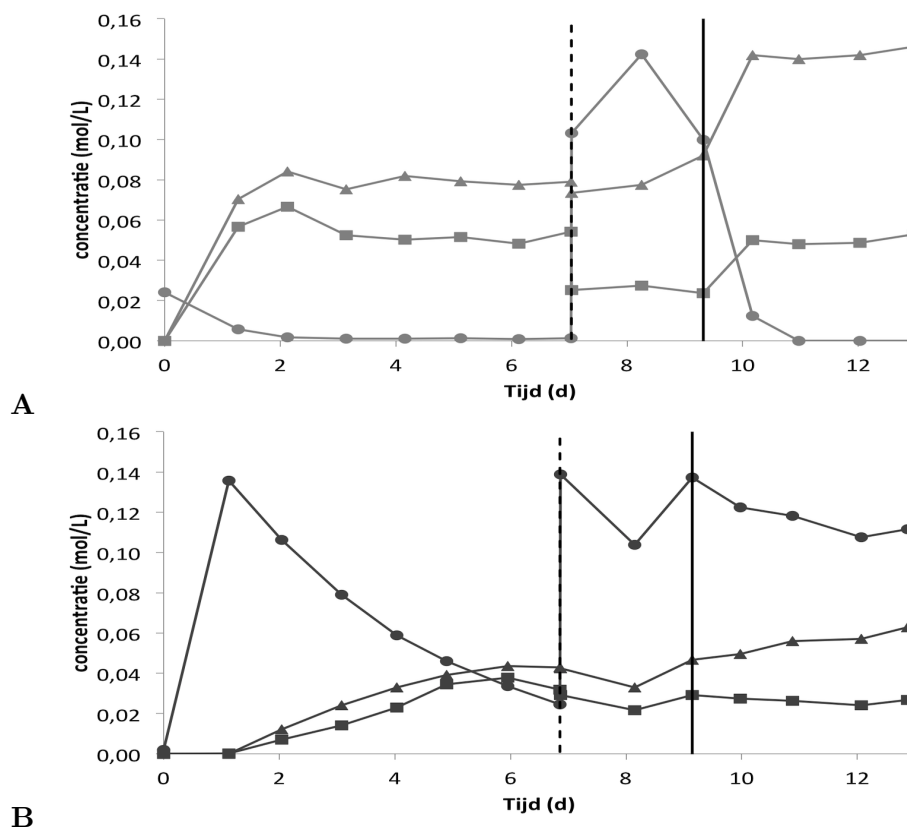
Figuur 4.18: Groei en pH-curve BES *L. reuteri*: OD₆₂₀ (donkergrijs) en pH (lichtgrijs) in functie van de tijd (in aantal dagen). Het experiment werd uitgevoerd op medium met (○) en zonder (△) stikstofbron. Verticaal gestreepte lijnen duiden op de overgang tussen -10 mA en -100 mA bij de verschillende media, volle lijnen duiden op glycerolsupplementatie. De weergegeven foutbalken van OD₆₂₀ zijn standaarddeviaties van drie metingen (niet zichtbaar).

Glyceroldegradatie en metaboliëproductie

De degradatie van glycerol gebeurt bijna volledig in de eerste twee dagen bij de test op stikstofrijk medium (Figuur 4.19A). Na de supplementatie op de wissel van stroomsterkte neemt de concentratie aan glycerol eveneens sterk af. Simultaan met de glyceroldegradatie nemen de concentraties van 1,3-PDO en organische zuren (voornamelijk acetaat) de eerste twee dagen toe, waarna ze stabiliseren. Bij -100 mA kent de productie van 1,3-PDO opnieuw een sterke stijging, terwijl de organische zuren zich op hun stabilisatiewaarde (0,05 mol/L) herstellen na een daling bij de wissel. Eenmaal alle glycerol is verdwenen, stabiliseert ook de concentratie van 1,3-PDO. Bij -10 mA bestonden de organische zuren voornamelijk uit acetaat (28,52 mmol/L op dag 7) en formiaat (15,31 mmol/L op dag 7). Na de wissel naar -100 mA is formiaat niet meer detecteerbaar. Naast deze twee zuren werden ook succinaat (maximum 5,91 mmol/L) en lactaat (maximum 2,92 mmol/L) gedetecteerd, doch in kleine concentraties. Butyraat werd eveneens gedetecteerd (maximum 29,8 mmol/L) na de tweede glycerolsupplementatie wat duidt op een contaminatie.

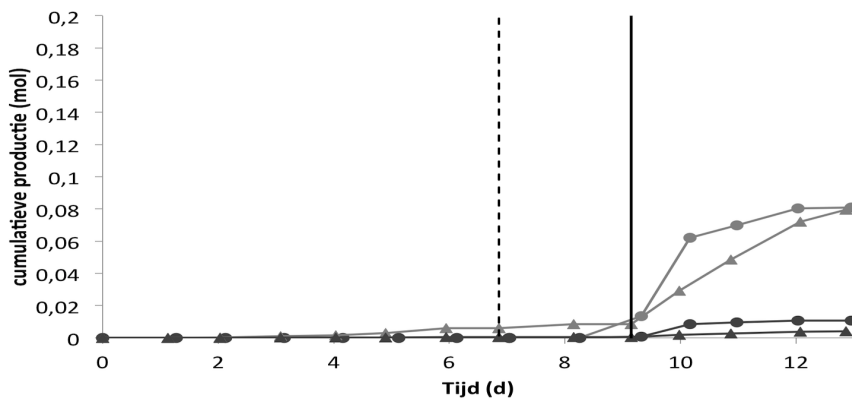
In de afwezigheid van een stikstofbron (Figuur 4.19B) neemt de glycerolconcentratie veel trager af en op het moment van de wissel van stroomsterkte is nog steeds een kleine concentratie aanwezig (24,5 mmol/L). De degradatie bij -100 mA is ook slechts geleidelijk.

De evolutie van concentraties van 1,3-PDO en organische zuren verlopen gedurende het experiment quasi gelijk met steeds een iets hogere concentratie van 1,3-PDO. Eenmaal de glycerol begint te verminderen, nemen de concentraties 1,3-PDO en organische zuren (voornamelijk acetaat (23,68 mmol/L op dag 13) geleidelijk toe. Na omschakeling naar -100 mA stabiliseert de concentratie organische zuren, terwijl 1,3-PDO nog een lichte stijging vertoont. Naast acetaat werd ook succinaat (maximum 11,76 mol/L op dag 5), lactaat (maximum 3,51 mol/L op dag 7) en formiaat (maximum 5,95 mol/L op dag 6) gedetecteerd.



Figuur 4.19: Substraatconversie BES *L. reuteri*: Evolutie van de molaire concentratie glycerol (○), 1,3-PDO (△) en organische zuren (□) in functie van de tijd (in aantal dagen) met A) stikstofrijk medium en B) stikstofarm medium zonder antibiotica. De verticaal gestreepte lijn duidt op de overgang tussen -10 mA en -100 mA; de volle lijn duidt op glycerolsupplementatie.

Gasproductie en samenstelling

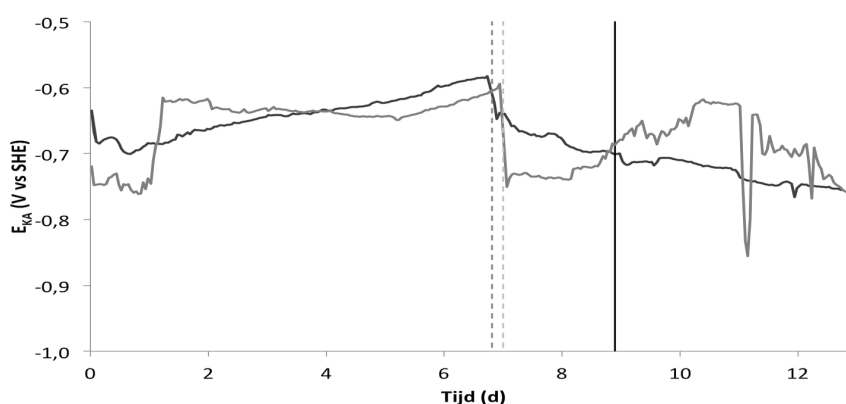


Figuur 4.20: Gasproductie BES *L. reuteri*: cumulatieve productie van H₂ (lichtgrijs) en CO₂ (donkergrijs) in functie van de tijd (in aantal dagen). Met de BES test op stikstofrijk (○) en stikstofarm (△) medium. De verticaal gestreepte lijn duidt op de overgang tussen -10 mA en -100 mA; de volle lijn duidt op glycerolsupplementatie.

Bij een stroomsterkte van -10 mA wordt H₂ minimaal geproduceerd, maar na omschakeling naar -100 mA en vooral na de tweede glycerolsupplementatie neemt de productie toe (Figuur 4.20). De productie van CO₂ is bij -10 mA nagenoeg afwezig en stijgt minimaal na de tweede glycerolsupplementatie.

Kathodepotentiaal

Na stabilisatie is de potentiaal bij beide experimenten quasi gelijk (gemiddeld $-0,65 \pm 0,04$ V vs SHE met en $-0,64 \pm 0,03$ V vs SHE zonder stikstofbron) (Figuur 4.21). Na omschakeling naar een stroomsterkte van -100 mA daalt de potentiaal om dan opnieuw te stabiliseren. De gemiddelde potentiaal bij -100 mA bedroeg $-0,70 \pm 0,05$ V vs SHE in aanwezigheid van een stikstofbron en $-0,71 \pm 0,03$ V vs SHE in de afwezigheid ervan.



Figuur 4.21: Verloop kathodepotentiaal BES *L. reuteri*: kathodepotentiaal (V vs SHE) in functie van de tijd (in aantal dagen) op stikstofrijk (lichtgrijs) en -arm (donkergrijs) medium. De verticaal gestreepte lijn duidt op de overgang van -10 mA naar -100 mA, de volle lijn duidt op Boenigk MM glycerolsupplementatie.

Op dag 11 werd bij de test op stikstofrijk medium gehaperd aan de *working elektrode*, vandaar de piek.

Cyclische voltammetrie

Metingen bij 1 mV/s vertonen een verschuiving in de tijd van een irreversibele oxidatieve piek zowel met als zonder stikstofbron in het medium (Figuur C.5A & B). Tussen beide media liggen de pieken wel op een verschillende kathodepotentiaal. In aanwezigheid van stikstof verschuift de piek van bij de wissel in stroomsterkte van 0 V vs SHE naar -0,1 V vs SHE op het einde van het experiment. Op een stikstofarm medium bevinden de pieken zich op -0,1 V vs SHE en -0,2 V vs SHE respectievelijk halfweg en op het eind van het experiment. De bekomen stroomdichtheden zijn in afwezigheid van stikstof ook steeds hoger.

Op een stikstofrijk medium is geen verandering waarneembaar in de tijd bij 50 mV/s (Figuur C.5C & D). In de afwezigheid van stikstof is bij de meting halfweg het experiment een kleine oxidatieve piek zichtbaar bij 0 V vs SHE en een reductieve piek bij -0,2 V vs SHE. Op het einde van het experiment zijn deze pieken verdwenen. De oxidatie van zuurstof en vorming van H₂ gebeurt bij respectievelijk lagere en hogere potentiaal bij de wissel van stroomsterkte in vergelijking met de meting in het begin van het experiment.

Coulombische efficiëntie

De sterke stijging in groei en de productie van butyraat na dag 9 bij de test op stikstofrijk medium, doet vermoeden dat bij de tweede glycerol supplementatie een contaminatie is opgetreden. Vandaar dat de coulombische efficiëntie berekend wordt tot en met dag 9 (Tabel 4.4). Opvallend zijn de lage waarden bij -100 mA, waarbij de waarde met stikstofrijk medium nog lager ligt dan in afwezigheid van stikstof. Verder valt het op dat voor -100 mA op stikstofrijk medium $\varepsilon_{Cb}(1,3\text{-PDO})$ hoger is dan $\varepsilon_{Cb}(\text{H}_2)$. De H_2 -productie in afwezigheid van stikstof is ook opvallend hoger.

Tabel 4.4: Coulombische efficiëntie BES *L. reuteri*: $\varepsilon_{Cb}(1,3\text{-PDO})$, $\varepsilon_{Cb}(\text{H}_2)$ en de som (' $\Sigma \varepsilon_{Cb}$ ') van de testen op stikstofrijk ('N-rijk') en stikstofarm ('N-arm') medium en met een opgelegde stroomsterkte van -10 mA en -100 mA.

		$\varepsilon_{Cb}(1,3\text{-PDO})$	$\varepsilon_{Cb}(\text{H}_2)$	$\Sigma \varepsilon_{Cb}$
N-rijk	-10 mA	116,9 %	0,1 %	116,9 %
	-100 mA	9,6 %	2,6 %	12,1 %
N-arm	-10 mA	65,2 %	19,2 %	84,4 %
	-100 mA	3,8 %	27,4 %	31,3 %

4.3 Overzicht

4.3.1 1,3-propaandiol productie

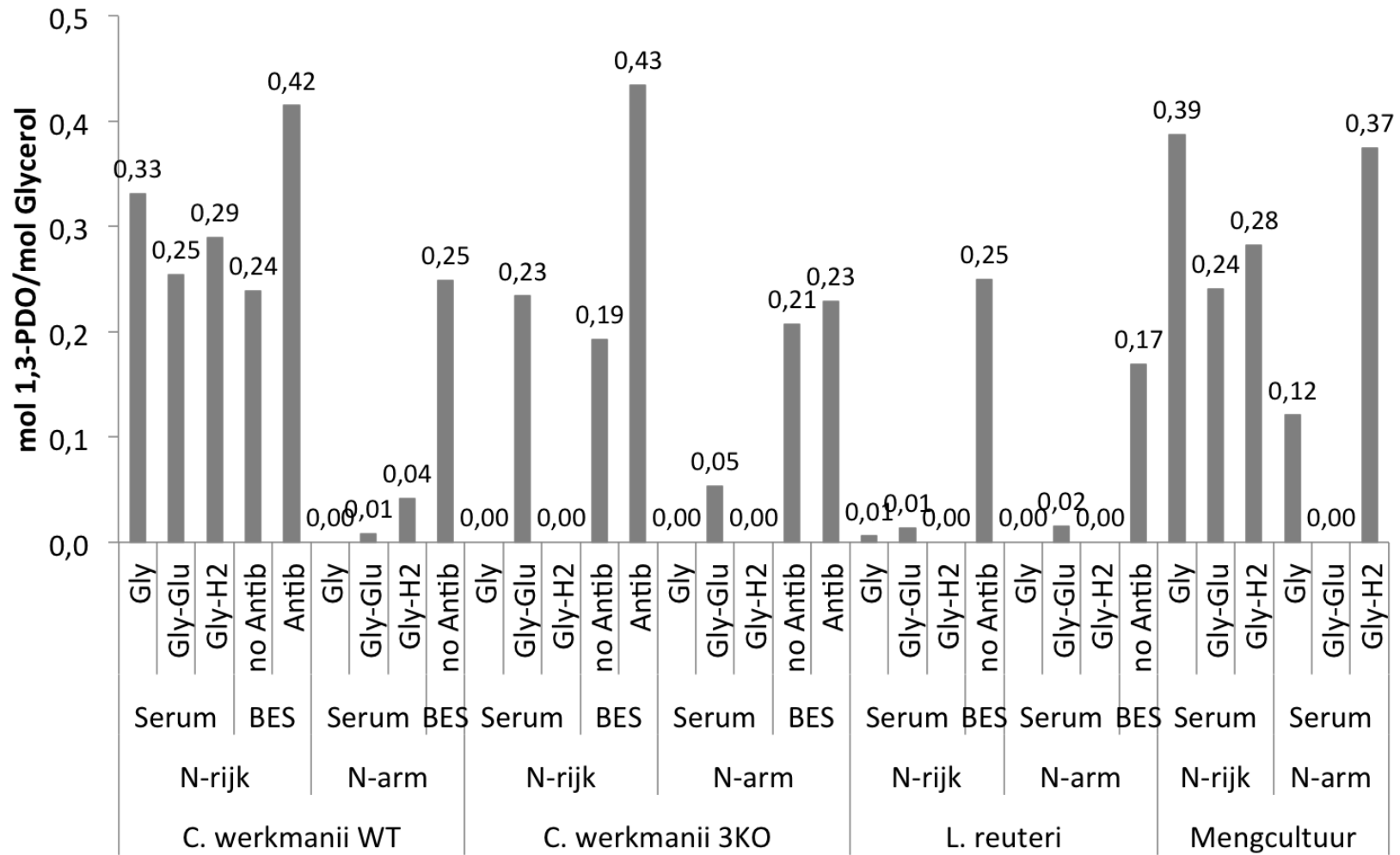
Opbrengstefficiëntie

De opbrengstefficiënties van *C. werkmanii* wild type zijn bij alle testen in aanwezigheid van stikstof in dezelfde orde van $0,28 \pm 0,04$ mol/mol, behalve de BES test met antibiotica ligt een stuk hoger (0,42 mol/mol)(Figuur 4.22). Op media zonder stikstofbron is de efficiëntie bij de serumtesten minimaal of zelfs nul. De BES test daarentegen behaalt 0,25 mol/mol.

Daar waar productie voorkomt bij *C. werkmanii* triple knock-out ligt de efficiëntie in dezelfde orde als bij het wild type. Bovendien is ook bij de triple knock-out de efficiëntie in aanwezigheid van antibiotica een stuk hoger dan zonder (in aanwezigheid van stikstof).

L. reuteri heeft zowel op stikstofrijk als stikstofarm medium een lage efficiëntie. Enkel de testen in BES behalen hoge waarden in dezelfde orde als de geteste *Citrobacter* stammen. Voor de BES test op stikstofrijk medium van *L. reuteri* worden de waarden gebruikt op dag 9 in plaats van 13, door een vermoedelijke contaminatie bij de tweede glycerolsupplementatie.

De gemengde cultuur werd niet getest in BES, maar de efficiënties van de serumtesten zijn vergelijkbaar met *C. werkmanii* wild type in aanwezigheid van stikstof en beter dan alle geteste stammen op stikstofarm medium. In aanwezigheid van glucose is opvallend geen productie bij gebrek aan stikstof.



Figuur 4.22: Overzicht van de 1,3-PDO productie bij de verschillende testen: met *C. werkmanii* wild type ('*C. werkmanii* WT'), *C. werkmanii* triple knock-out ('*C. werkmanii* 3KO'), *L. reuteri* en de mengcultuur; zowel de serumtesten ('Serum') op een glycerol ('Gly'), glycerol-glucose ('Gly-Glu') of glycerol-H₂ ('Gly-H₂') substraat, als de testen in BES en alles zowel op een stikstofrijk ('N-rijk') als stikstofarm ('N-arm') medium en eventueel met antibiotica ('Antib'). De 1,3-PDO productie wordt weergegeven als $\frac{\text{mol 1,3-PDO geproduceerd}}{\text{mol glycerol verwijderd}}$.

Maximale concentraties

Behalve voor de test met *C. werkmanii* triple knock-out (met antibiotica) ligt de maximale concentratie per test steeds hoger in aanwezigheid van stikstof en is het verschil tussen met en zonder antibiotica klein (Tabel 4.5). Verder is de bereikte concentratie steeds hoger in BES in vergelijking met de serumtesten. Bij de serumtesten onderling zijn sterke verschillen te zien per stam, *C. werkmanii* wild type behaalt de hoogste waarden op een medium zonder cosubstraat (6,81 g/L) en de triple knock-out in aanwezigheid van glucose (2,81 g/L). De titers van *L. reuteri* zijn eveneens het hoogst in aanwezigheid van glucose (0,05 g/L) en met de mengcultuur behaalt de test zonder cosubstraat de hoogste concentratie (7,21 g/L).

Voor de meeste BES testen werd de maximale concentratie 1,3-PDO bereikt op het eind van de test. Bij testen die hiervan afwijken daalt de concentratie opnieuw op het einde van het experiment wat ook kan gezien worden in de paragrafen hierboven.

Tabel 4.5: Titters 1,3-PDO productie: maximale concentratie (g/L) bereikt in de diverse experimenten, zowel de serumtesten ('Serum') op een glycerol ('Gly'), glycerol-glucose ('Gly-Glu') of glycerol-H₂ ('Gly-H₂') substraat, als de testen in BES en alles zowel op een stikstofrijk ('N-rijk') als stikstofarm ('N-arm') medium en eventueel met antibiotica ('Antib.'). Titters zijn voor serumtesten de gemeten waarden op het eind, voor de BES resultaten wordt het tijdstip steeds tussen haakjes (in aantal dagen) weergegeven.

* Een concentratie van 11,11 g/L werd bereikt op dag 13, maar vanwege een vermoedelijke contaminatie wordt de waarde op dag 9 weergegeven.

		<i>C. werkmanii</i> WT	<i>C. werkmanii</i> 3KO	<i>L. reuteri</i>	Mengcultuur
		g/L	g/L	g/L	g/L
N-rijk					
Serum	Gly	6,81	0,00	0,03	7,21
	Gly-Glu	3,18	2,81	0,05	2,50
	Gly-H2	5,62	0,00	0,00	4,72
BES	no Antib	10,60 (9 d)	9,42 (10 d)	7,01 (9 d*)	-
	Antib	11,20 (13 d)	12,04 (9 d)	-	-
N-arm					
Serum	Gly	0,00	0,00	0,00	1,47
	Gly-Glu	0,07	0,61	0,12	0,00
	Gly-H2	0,45	0,00	0,00	4,86
BES	no Antib	7,78 (4 d)	5,97 (13 d)	4,78 (13 d)	-
	Antib	-	13,71 (10 d)	-	-

Productiviteit

Bij de serumtesten op stikstofarm medium ligt de productiviteit lager in vergelijking met dezelfde testen in aanwezigheid van stikstof (Tabel 4.6). Bij *C. werkmanii* wild type is de productiviteit in serumflessen aan de lage kant (gemiddeld 0,05 g/L.u) met de laagste waarde op een glycerol-glucose substraat. In BES is de productiviteit hoger (gemiddeld 0,18 g/L.u) met het maximum tijdens de eerste dag. Bij *C. werkmanii* triple knock-out wordt het maximum bereikt tijdens de eerste dag na de wissel. In serumflessen is de productiviteit gelijk als het wild type (0,03 g/L.u) in aanwezigheid van stikstof.

L. reuteri heeft zowel in serumflessen als in BES een lage productiviteit, waar de aan- of afwezigheid van stikstof geen invloed op heeft. De maximale productiviteit in BES wordt gezien de tweede dag na supplementatie. Bij de gemende cultuur zijn de waarden gelijkaardig als de andere serumtesten.

Tabel 4.6: Productiviteit 1,3-PDO productie: maximale productiviteit (g/L.u) bereikt in de diverse experimenten, zowel de serumtesten ('Serum') op een glycerol ('Gly'), glycerol-glucose ('Gly-Glu') of glycerol-H₂ ('Gly-H₂') substraat, als de testen in BES en alles zowel op een stikstofrijk ('N-rijk') als stikstofarm ('N-arm') medium en eventueel met antibiotica ('Antib.'). Productiviteit is voor serumtesten de gemeten waarden op het eind, voor de BES resultaten wordt het tijdstip steeds tussen haakjes (in aantal dagen) weergegeven.

		<i>C. werkmanii</i> WT	<i>C. werkmanii</i> 3KO	<i>L. reuteri</i>	Mengcultuur
		g/L.u	g/L.u	g/L.u	g/L.u
N-rijk					
Serum	Gly	0,07	0,00	0,00	0,04
	Gly-Glu	0,03	0,03	0,001	0,03
	Gly-H ₂	0,06	0,00	0,00	0,06
BES	no Antib	0,24 (1 d)	0,16 (9 d)	0,18 (1 d)	-
	Antib	0,19 (1 d)	0,29 (9 d)	-	-
N-arm					
Serum	Gly	0,00	0,00	0,00	0,03
	Gly-Glu	0,001	0,01	0,001	0,00
	Gly-H ₂	0,01	0,00	0,00	0,03
BES	no Antib	0,11 (1 d)	0,06 (2 d)	0,04 (10 d)	-
	Antib	-	0,30 (9 d)	-	-

Coulombische efficiënties

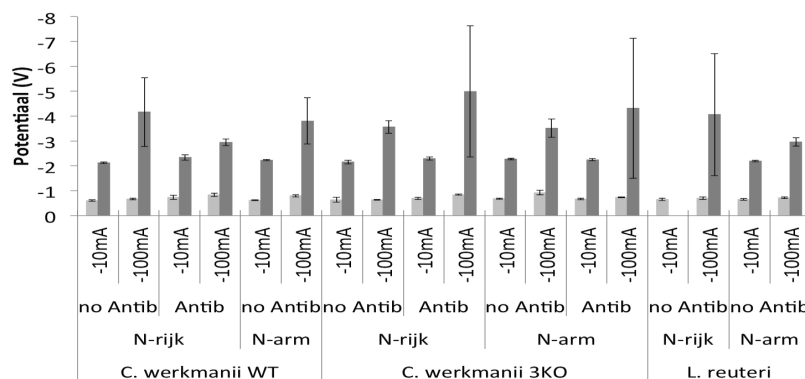
Algemeen is $\varepsilon_{Cb}(1,3\text{-PDO})$ steeds hoger bij -10 mA (Tabel 4.7). Bij een hogere stroomsterkte stijgt $\varepsilon_{Cb}(\text{H}_2)$ sterk in het nadeel van $\varepsilon_{Cb}(1,3\text{-PDO})$. De som van beiden ligt steeds lager bij -100 mA in vergelijking met -10 mA.

Tabel 4.7: Overzicht Coulombische efficiënties BES: $\varepsilon_{Cb}(1,3\text{-PDO})$, $\varepsilon_{Cb}(\text{H}_2)$ en de som (' $\Sigma \varepsilon_{Cb}$ ') van de testen op stikstofrijk ('N-rijk') en stikstofarm ('N-arm') medium, met ('Antib') en zonder ('no Antib') antibiotica en met een opgelegde stroomsterkte van -10 mA en -100 mA met *C. werkmanii* wild type ('WT'), *C. werkmanii* triple knock-out ('3KO') en *L. reuteri*.

				$\varepsilon_{Cb}(1,3\text{-PDO})$	$\varepsilon_{Cb}(\text{H}_2)$	$\Sigma \varepsilon_{Cb}$
WT	N-rijk	no Antib	-10 mA	104,5 %	0,5 %	105,1 %
			-100 mA	9,1 %	64,2 %	73,2 %
		Antib	-10 mA	107,8 %	3,3 %	111,1 %
	N-arm	no Antib	-10 mA	136,4 %	11,2 %	147,6 %
			-100 mA	2,2 %	60,5 %	62,6 %
		Antib	-10 mA	94,6 %	37,6 %	132,3 %
3KO	N-rijk	no Antib	-10 mA	90,7 %	2,7 %	93,5 %
			-100 mA	8,3 %	40,5 %	48,8 %
		Antib	-10 mA	94,6 %	37,6 %	132,3 %
	N-arm	no Antib	-10 mA	92,8 %	11,0 %	103,8 %
			-100 mA	2,9 %	66,2 %	69,1 %
		Antib	-10 mA	127,6 %	16,4 %	144,0 %
<i>L. reuteri</i>	N-rijk	no Antib	-10 mA	116,9 %	0,1 %	116,9 %
			-100 mA	9,6 %	2,6 %	12,1 %
		Antib	-10 mA	65,2 %	19,2 %	84,4 %
	N-arm	no Antib	-10 mA	65,2 %	19,2 %	84,4 %
			-100 mA	3,8 %	27,4 %	31,3 %

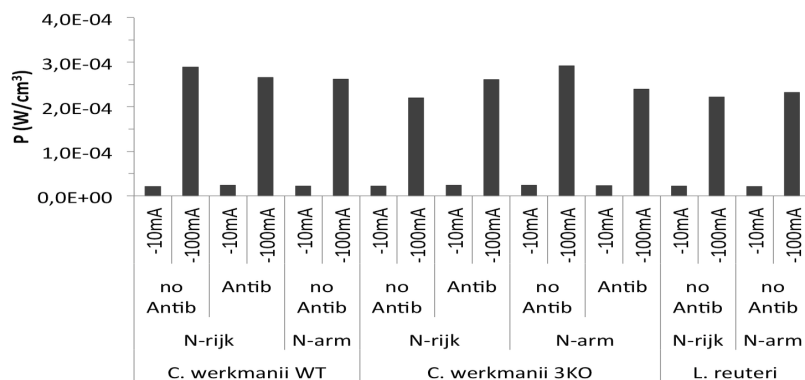
4.3.2 BES parameters

De kathodepotentiaal is bij alle testen gemiddeld $-0,658 \pm 0,041$ V vs SHE bij -10 mA en $-0,760 \pm 0,094$ V vs SHE bij -100 mA (Figuur 4.23). De celpotentiaal toont grotere verschillen tussen beide stroomsterktes, waarbij de waarden steeds lager liggen bij -100 mA, maar ook de standaarddeviaties nemen vanwege schommelingen sterk toe. Een gemiddelde over alle testen voor de celpotentiaal is $-2,23 \pm 0,07$ V bij -10 mA en $-3,81 \pm 0,66$ V bij -100 mA.



Figuur 4.23: Overzicht van de kathode- (licht, V vs SHE) en de celpotentiaal (donker, V) bij -10 mA en -100 mA van de verschillende BES testen: met *C. werkmanii* wild type ('C. werkmanii WT'), *C. werkmanii* triple knock-out ('C. werkmanii 3KO') en *L. reuteri* op een stikstofrijk ('N-rijk') als stikstofarm ('N-arm') medium en eventueel met antibiotica ('Antib'). De weergegeven foutbalken zijn standaarddeviaties.

Het vermogen ligt bij alle testen gemiddeld 11 maal hoger bij -100 mA in vergelijking met -10 mA (Figuur 4.24). De waarden bij -10 mA zijn bij alle BES testen quasi gelijk rond $2,25 \cdot 10^{-5} \pm 1,1 \cdot 10^{-6}$ W/cm³. Voor de testen bij -100 mA variëren de waarden iets meer ($2,54 \cdot 10^{-4} \pm 27 \cdot 10^{-5}$ W/cm³).



Figuur 4.24: Overzicht van het vermogen: Overzicht van het vermogen (in W/cm³) bij -10 mA en -100 mA van de verschillende BES testen: met *C. werkmanii* wild type ('C. werkmanii WT'), *C. werkmanii* triple knock-out ('C. werkmanii 3KO') en *L. reuteri* op een stikstofrijk ('N-rijk') als stikstofarm ('N-arm') medium en eventueel met antibiotica ('Antib'). De hoge standaarddeviaties worden niet weergegeven en zijn afkomstig van een error in de potentiostaat door vervuiling aan de anode, waardoor die laatste op een te hoge potentiaal moest werken om de gewenste stroomsterkte te kunnen opleveren.

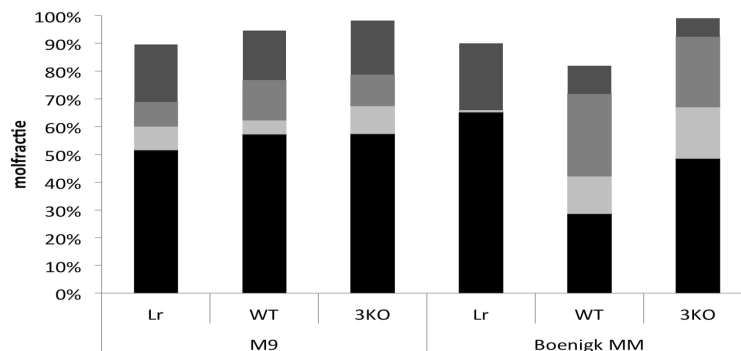
4.4 Medium testen

Binnen het idee om toekomstige experimenten of opschalen mogelijks te vereenvoudigen, wordt nog eens gekeken naar een eenvoudiger medium, want Boenigk MM heeft nog steeds een relatief complexe samenstelling. Vanuit dit standpunt werd eveneens groei en productie eens bekeken op een eenvoudiger medium, M9. De volgende testen werden uitgevoerd in serumflessen. De mengculturen werden in deze reeks testen niet meegenomen.

Alle testen op M9-medium gebeurden om een eerste idee te krijgen en dus onder aërobe omstandigheden. De waarden van de testen op Boenigk MM zijn dezelfde als gebruikt bij de serumtesten en dus onder anaërobe omstandigheden. De testen gebeurden allen op een medium met glycerol en glucose als cosubstraat en op stikstofrijk medium. Bij de testen op Boenigk MM was antibiotica aanwezig naargelang de stam.

De glycerol en glucose degradatie is voor *L. reuteri* hoger op M9 en ook de metaboliëtoproductie is er hoger met als voornaamste zuur acetaat (15,5 mmol/L) (Figuur 4.25). Op Boenigk MM wordt enkel 1,3-PDO geproduceerd, maar slecht een kleine hoeveelheid (0,64 mmol/L).

Voor beide *C. werkmanii* stammen is de degradatie lager op M9 en ook de metaboliëtoproductie is lager. De verhouding tussen glycerol en glucose degradatie en productie van 1,3-PDO en organische zuren is wel ongeveer gelijk. Op beide media zijn de voornaamste zuren succinaat (gemiddeld 4,3 mmol/L op M9 en 16,0 mmol/L op Boenigk MM) en acetaat (gemiddeld 15,3 mmol/L op M9 en 34,3 mmol/L op Boenigk MM). Bij het wild type wordt op beide media ook een kleine hoeveelheid formiaat (gemiddeld 10 mmol/L) gedetecteerd.



Figuur 4.25: Substraatconversie mediumtesten: Overzicht van de geproduceerde metaboliëten op M9 (na 75 uur) en Boenigk MM (na 92 uur) in molaire fractie versus de initiële molaire glycerol en glucose concentratie. Met glycerol (zwart), 1,3-PDO (lichtgrijs), organische zuren (grijs) en glucose (donkergrijs) bij *L. reuteri* ('Lr'), *C. werkmanii* wild type ('WT') en *C. werkmanii* triple knock-out ('3KO').

Voorals bij *C. werkmanii* wild type loopt de groeicurve quasi gelijk bij beide media (Figuur D.1). Voor de triple knock-out is de groei sneller, maar volgens een gelijk patroon op M9 in vergelijking met Boenigk MM. Enkel voor *L. reuteri* lijkt er een groot verschil te zijn qua groei. Op Boenigk MM kan geen groei gedetecteerd worden met OD_{620} , maar visueel was echter wel groei aanwezig. Dit probleem werd al eerder beschreven bij de serumtesten van *L. reuteri* (zie 4.1.3). De pH verandert weinig bij *L. reuteri* op Boenigk MM (initieel werd geen pH opgevolgd)(Figuur D.2). Beide *Citrobacter* stammen reageren bij beide media volgens een zelfde dalend patroon waarbij de waarden bij M9 steeds lager liggen dan deze bij Boenigk MM. Voor deze mediumtesten werd de samenstelling van het gas niet opgevolgd.

Hoofdstuk 5

Discussie

Aan de hand van de resultaten wordt getracht een antwoord te geven op de onderzoeksvragen (zie Hoofdstuk 2).

Als eerste wordt de productie van 1,3-propaandiol (1,3-PDO) in een bio-elektrochemisch systeem (BES) bekeken en vergeleken met omzettingsefficiënties van de batchtesten door delen van Figuur 4.22 uit te lichten. De resultaten worden getoetst aan de literatuur en mogelijke verklaringen worden naar voor geschoven. Vervolgens wordt een vergelijking gemaakt tussen de geteste cosubstraten en elektrische stroom. Hierbij wordt de productie eens nader onder de loep genomen, vooraleer een blik te werpen op het mogelijke mechanisme van elektronentransport dat de diverse stammen gebruiken. Daarna wordt onderzocht welke invloed de opgelegde stroomsterkte speelt op de productie van 1,3-PDO in BES. Verder wordt het katalytisch vermogen van de verschillende stammen van naderbij bekeken. De relatie groei-productie wordt geanalyseerd aan de hand van een vergelijkende studie tussen de testen op een stikstofrijk en stikstofarm medium. Als voorlaatste wordt het effect van antibiotica op de productie en de productie op een eenvoudiger medium nog kort besproken, om tot slot een productieproces door te rekenen om de economische haalbaarheid in kaart te brengen.

5.1 1,3-PDO productie in BES

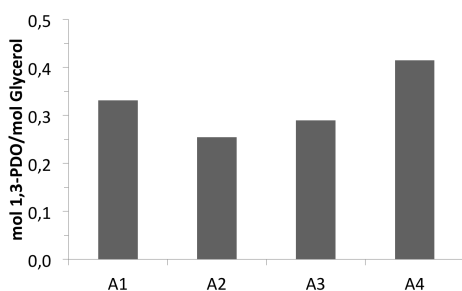
Onafhankelijk van de mediumsamenstelling wordt met alle geteste stammen productie van 1,3-PDO verwezenlijkt in BES (Figuur 4.22). Met een opbrengstefficiëntie tussen 0,17 en 0,43 mol/mol en gemiddelde maximale concentraties van $10,1 \pm 1,95$ g/L op stikstofrijk medium lijkt het er op dat productie in BES een goed substituut kan vormen voor de fermentaties met suiker als cosubstraat. Een vergelijking met de hoge waarden in de literatuur stelt dit besluit enigszins in twijfel (Tabel 5.1). De lange incubatietijden in batch en het werken met de eindconcentraties in plaats van de maximale waarden in BES kan hier een gedeeltelijke verklaring zijn.

Tabel 5.1: Beknopt overzicht van enkele gemodificeerde 1,3-PDO producenten (deel van Tabel 1.1). ^a percentage van theoretisch maximum.

Organisme	Opbrengst (product/glycerol)	Titer	Ref.
<i>K. pneumoniae</i> DSM 2026	0,52 mol/mol	59,50 g/L	Chen <i>et al.</i> (2003)
<i>K. pneumoniae</i> LDH 526	0,52 mol/mol	102,1 g/L	Xu <i>et al.</i> (2009)
<i>C. butyricum</i> F2b	0,53 g/g	47,1 g/L	Papanikolaou <i>et al.</i> (2008)
<i>E. coli</i> K12	90,2 % ^a	104,4 g/L	Tang <i>et al.</i> (2009)
<i>K. pneumoniae</i>	61 % ^a	75 g/L	Liu <i>et al.</i> (2007)
<i>C. werkmanii</i> DSM17579	1,00 mol/mol	107,2 mM	Maervoet (2012)

De 1,3-PDO productie in BES zijn van een gelijke efficiëntie (gemiddeld $0,21 \pm 0,03$ mol/mol) bij de diverse stammen (de testen op antibiotica even buiten beschouwing genomen), maar de verschillen met de serumtesten zijn vaak groot. Hieronder worden de testen per stam vergeleken, vooraleer de stammen naast elkaar op te stellen.

5.1.1 *C. werkmanii* wild type



Figuur 5.1: 1,3-PDO productie *C. werkmanii* wild type op stikstofrijk medium met antibiotica: de serumtesten op glycerol (A1), glycerol-glucose (A2) of glycerol-H₂ (A3) substraat en de test in BES (A4). Productie wordt weergegeven als $\frac{\text{mol 1,3-PDO geproduceerd}}{\text{mol glycerol verwijderd}}$.

Met een opbrengstefficiëntie van 0,42 mol/mol overstijgt BES (met antibiotica) de resultaten van de serumtesten (Figuur 5.1). Deze waarde ligt echter nog gevoelig lager dan beschreven in de literatuur. Op een substraat van glycerol en glucose (3:1 molaire verhouding) werden al efficiënties beschreven van 0,64 mol/mol (Maervoet, 2012).

Een mogelijke verklaring is de afbraak van 1,3-PDO eenmaal de concentratie aan glycerol lager wordt, zoals ook te zien bij de BES test zonder antibiotica (Figuur 4.11). In aanwezigheid van antibiotica treedt dit fenomeen echter niet op in BES en volgens die logica dus ook niet in batchtesten. De degradatie van 1,3-PDO is reeds waargenomen bij een *Desulfovibrio* stam, maar dit in syntrofie met methanogenen (Oppenberg & Schink, 1990). Bij pure culturen werd dit fenomeen volgens de auteurs weten nog niet waargenomen.

5.1.2 *C. werkmanii* triple knock-out

C. werkmanii DSM17579 $\Delta dhaD \Delta ldhA \Delta adhE::ChlFRT$ is onder andere gemodificeerd in het gen coderend voor glycerol dehydrogenase (*dhaD*), wat glycerolconversie via de oxidatieve pathway uitsluit. In de afwezigheid van een cosubstraat is groei dan ook onmogelijk. De minimale toename van OD₆₂₀ (Figuur B.2) is te verklaren door een niet-specifiek dehydrogenase die de rol van het gemuteerde glycerol dehydrogenase overneemt op een substraat enkel bestaande uit glycerol (Maervoet, 2012).

Zonder oxidatieve pathway kan de nodige energie niet geleverd worden om glycerol om te zetten (Figuur 5.2). In de aanwezigheid van waterstofgas lijkt deze vergelijking eveneens op te gaan, wat er op kan duiden dat waterstofgas geen ideale elektrondonor is om de oxidatieve pathway te omzeilen. Het gebruik van glucose als donor werd eerder beschreven en zou een maximale conversie kunnen opleveren (1 mol/mol), doch de bereikte efficiëntie bedraagt slechts 0,23 mol/mol.

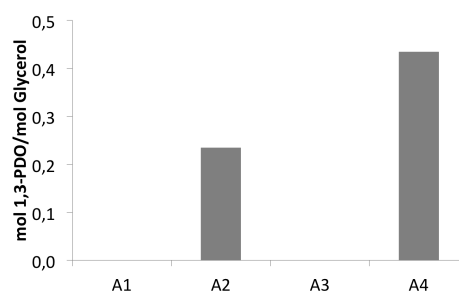
De reden waarom BES testen zonder cosubstraat toch 1,3-PDO opleveren kan meerdere verklaringen hebben. De kans bestaat dat *C. werkmanii* elektronen rechtstreeks kan opnemen van het elektrode-oppervlak (zie ook 5.2). Anderzijds is de concentratie van H_2 aan de elektrode enorm veel hoger dan bij de serumtesten. Omrekening van de pH en de kathodepotentiaal met de Nernst vergelijking leveren lokale concentraties van gemiddeld $7,1 \cdot 10^8$ mol/L en $1,4 \cdot 10^{13}$ mol/L, respectievelijk voor -10 mA en -100 mA op stikstofrijk medium, waar in serumflessen de opgeloste concentratie slechts 4,5 mmol/L bedraagt. Deze lage concentratie in serumflessen kan ontoereikend zijn om de conversie te verwezenlijken in vergelijking met de overmatige beschikbaarheid aan H_2 in BES. Opvallend bij de BES testen is de detectie van lactaat, wat kan duiden op contaminatie.

5.1.3 *Lactobacillus reuteri*

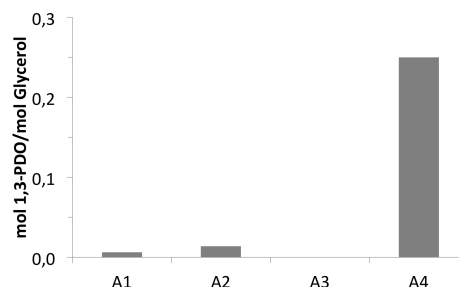
Veiga da Cunha & Foster (1992) beschrijven dat *L. reuteri* onmogelijk kan groeien op een medium met glycerol als enige koolstofbron, daar het de genen van de oxidatieve pathway ontbreekt. Alhoewel in dit onderzoek geen of minimale groei verwezenlijkt werd (Figuur B.3), is *L. reuteri* wel in staat tot het omzetten van glycerol naar 1,3-PDO, hoe miniem ook (0,006 mol/mol)(Figuur 5.3).

Deze minimale hoeveelheden kunnen duiden op resterende intracellulaire concentraties van een elektrondonor van bij de précultuur. Verder onderzoek met een intermediaire incubatiefase op enkel glycerol gevolgd en vooraf gegaan door een wasstap, kan hier meer uitsluitsel over geven.

Opvallend is dan de relatief hoge productie in een BES (0,25 mol/mol), zeker gezien op medium met glucose als cosubstraat nauwelijks 1,3-PDO geproduceerd wordt (0,013 mol/mol). BES is ook de enige test waar stijging van OD_{620} voorkomt (Figuur 4.18). Het gebrek aan productie op een glycerol- H_2 substraat in serumfles kan duiden op een gebrek om H_2 te gebruiken als elekt-



Figuur 5.2: 1,3-PDO productie *C. werkmanii* triple knock-out op stikstofrijk medium met antibiotica: de serumtesten op glycerol (A1), glycerol-glucose (A2) of glycerol- H_2 (A3) substraat en de test in BES (A4). Productie wordt weergegeven als $\frac{\text{mol 1,3-PDO geproduceerd}}{\text{mol glycerol verwijderd}}$.



Figuur 5.3: 1,3-PDO productie *L. reuteri* op stikstofrijk medium: de serumtesten op glycerol (A1), glycerol-glucose (A2) of glycerol- H_2 (A3) substraat en de test in BES (A4). Productie wordt weergegeven als $\frac{\text{mol 1,3-PDO geproduceerd}}{\text{mol glycerol verwijderd}}$.

rondonor (zie ook 5.2). Bij deze serumtest neemt P_{H_2} echter af en veel meer bij gebrek aan een stikstofbron, terwijl de stijging van P_{CO_2} veel hoger is in aanwezigheid van stikstof (Figuur 4.7).

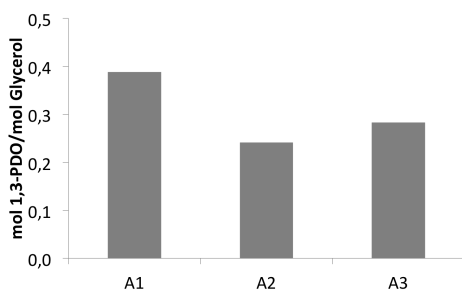
H_2 kan blijkbaar dus wel opgenomen worden, maar wat er met de energie gebeurt is onduidelijk, gezien geen detecteerbare metabolietproductie optreedt en slechts een minimale concentratie glycerol (21 mmol/L en 3 mmol/L respectievelijk in aan- en afwezigheid van stikstof) gedegradeerd wordt.

5.1.4 1,3-PDO productie bij verschillende stammen

C. werkmanii wild type is duidelijk koploper in de conversie van glycerol in serumflessen (Figuur 4.22). Met productie op alle substraten mits aanwezigheid van stikstof overtreft het zijn gemodificeerde stam en *L. reuteri* overduidelijk. Enkel in aanwezigheid van glucose wordt de opbrengstefficiëntie geëvenaard door de triple knock-out, wat logisch is.

De BES testen leveren gelijke resultaten voor alle stammen (op medium zonder antibiotica) die in lijn liggen met de resultaten van de serumtest met *C. werkmanii* wild type. Terwijl dit voor de triple knock-out en *L. reuteri* een enorme vooruitgang betekent, is enkel de hogere titer (verdubbeling naar 10,6 g/L in afwezigheid van antibiotica) een pluspunt bij *C. werkmanii* wild type. In aanwezigheid van antibiotica neemt de opbrengstefficiëntie bij de *C. werkmanii* stammen sterk toe (zie ook 5.5). De maximaal gedetecteerde concentraties nemen eveneens toe doch beperkter.

5.1.5 Gemengde culturen



Figuur 5.4: 1,3-PDO productie bij een gemengde cultuur op stikstofrijk medium: de serumtesten op glycerol (A1), glycerol-glucose (A2) en glycerol- H_2 (A3) substraat. Productie wordt weergegeven als $\frac{\text{mol 1,3-PDO geproduceerd}}{\text{mol glycerol verwijderd}}$.

Op een substraat enkel bestaande uit glycerol wordt wel degelijk 1,3-PDO productie waargenomen bij de gemengde cultuur (Figuur 5.4). In vergelijking met de pure culturen is de efficiëntie de beste (0,39 mol/mol), waarbij enkel *C. werkmanii* wild type een gelijkaardige waarde behaalt (0,33 mol/mol). Deze efficiëntie ligt wel veel lager dan deze bekomen in Selembo *et al.* (2009) van 0,65 mol/mol voor ruwe glycerol. De bereikte concentraties in serumflessen zijn in dit onderzoek het hoogst van alle geteste stammen bij de mengcultuur (7,21 g/L).

De test met glucose als cosubstraat levert eveneens 1,3-PDO op, maar een beduidend lagere concentratie (2,50 g/L). De bereikte efficiëntie (0,24 mol/mol) is quasi gelijk aan deze van *C. werkmanii* wild type en triple

knockout (respectievelijk 0,25 en 0,23 mol/mol), maar nog beduidend hoger dan de 0,013 mol/mol van *L. reuteri*.

Het resultaat van de testen met waterstofgas als cosubstraat brengen een gelijkaardig beeld als deze zonder cosubstraat. De efficiëntie van 0,28 mol/mol is lager dan de testen zonder cosubstraat (0,39 mol/mol), maar evenaart opnieuw de waarde bereikt door *C. werkmanii* wild type (0,29 mol/mol). De concentratie aan 1,3-PDO bereikt door de gemengde cultuur (4,72 g/L) ligt tussen de waarden van de testen zonder cosubstraat en met glucose als cosubstraat. *C. werkmanii* wild type doet echter opnieuw beter met 5,62 g/L.

Gebaseerd op deze resultaten zou een interessante opvolging de introductie van de gemengde cultuur in een bio-elektrochemisch systeem zijn.

5.2 Elektrische stroom als cosubstraat & Elektronentransport

Hoewel de 1,3-PDO productie met H_2 als cosubstraat in serumtesten meestal laag ligt of afwezig is, dient dit gerelativeerd te worden gezien de lage opgeloste H_2 concentratie (gemiddeld $0,58 \pm 0,13$ mmol/L). Enkel *C. werkmanii* wild type blijkt met de lage concentratie om te kunnen gaan en H_2 als elektrondonor te gebruiken.

In BES produceren alle stammen 1,3-PDO, maar de lokale concentratie aan opgeloste H_2 bij het elektrode-oppervlak is opmerkelijk hoger in vergelijking met de serumtesten (zie ook 5.1.2). De kans is dus reëel dat H_2 gevormd wordt en dienst doet als elektrondonor voor de micro-organismen.

Uit de cyclische voltammetrie metingen (1 mV/s) bij alle stammen wordt een irreversibele oxidatieve piek gedetecteerd na 13 dagen bij een kathodepotential van -0,2 V vs SHE. Hieruit kan afgeleid worden dat een component aan het elektrode-oppervlak kan geoxideerd worden, maar dat deze reactie niet reversibel is. Dit duidt er op dat het elektronentransport vermoedelijk niet direct gebeurt met membraangebonden componenten (bijvoorbeeld cytochromen). Een tweede oxidatieve piek is eveneens gedetecteerd bij 0 V vs SHE, maar deze is eveneens irreversibel.

Verder kan onder andere bij *C. werkmanii* - in aanwezigheid van stikstof en antibiotica - een verschuiving gezien worden van de potentiaal waar H_2 productie optreedt, zowel bij het wild type als de gemodificeerde triple knock-out. Dit wijst er op dat H_2 al bij een hogere potentiaal gevormd wordt.

1,3-PDO productie wordt vermoedelijk gestuurd door de vrijstelling van energiedragers (bijvoorbeeld NADH, vandaar het verband met groei (zie ook 5.4)) beschikbaar voor de omzetting van glycerol. Aangezien $\varepsilon_{Cb}(1,3-PDO)$ bij -10 mA steeds groter is dan 100% bij *C. werkmanii* wild type (Tabel 4.7), is niet alle productie stroomgerelateerd. Naast de elektronen die vrijkomen aan het elektrode-oppervlak kan het organisme nog uit andere componenten energie winnen of deze productie kan een gevolg zijn van intracellulaire reserves opgebouwd tijdens de précultuur.

De veel lagere $\varepsilon_{Cb}(1,3-PDO)$ bij -100 mA kan er op duiden dat de vrijgestelde elektronen door de kathode hoogstwaarschijnlijk niet onmiddellijk bruikbaar zijn voor de cel en intermediaire extra- of intracellulaire conversies nodig zijn. Deze intermediairen kunnen bij hoge stroomsterktes niet snel genoeg hun elektronen afgeven of zijn in te kleine getale aanwezig om alle elektronen te gebruiken. De onwaarschijnlijkheid van direct membraangebonden elektronttransport (zie hierboven) kan deze lagere efficiënties bij -100 mA helpen verklaren door diffusie verschijnselen van deze intermediairen. De tijd nodig voor de intermediairen om van de kathode naar de cel te diffunderen, hun energie af te geven en terug te diffunderen is te traag om alle vrijgestelde elektronen te gebruiken. Aangezien de maximale productiviteit wordt waargenomen in het begin van het experiment (Tabel 4.6) lijkt het er op dat de hoeveelheid van deze intermediairen niet snel kan aangepast worden. Bij een hogere stroomsterkte kan hun aantal dus niet snel worden verhoogd om meer energie te capteren. De kans bestaat dat H_2 dit intermediair is en de slechte oplosbaarheid in het medium aan de oorzaak ligt van deze lage conversie.

Indien deze hypothese klopt zouden deze intermediairen normaal moeten zichtbaar zijn in

de cyclische voltammetrie metingen, aangezien hun elektronopname reversibel is. De kathodepotentiaal ligt echter steeds lager dan $-0,6$ V vs SHE, terwijl de metingen met cyclische voltammetrie slechts tot $-0,5$ V vs SHE gaan. Verder onderzoek is vereist om meer rond het mechanisme van elektrontransport te weten te komen. Microscopische studies van de biofilm aan de kathode en cyclische voltammetrie metingen over een groter potentiaalbereik kunnen mogelijk al enkele antwoorden brengen.

5.3 Effect van stroomsterkte

Uit de evolutie van H_2 -productie en $\varepsilon_{C_b}(H_2)$ is duidelijk dat weinig H_2 vrijkomt uit het kathode compartiment bij -10 mA (Tabel 4.7). Bij dergelijke lage stroomsterktes zijn de verschillende stammen blijkbaar capabel om het merendeel van de elektronen (of opgeloste H_2) op te nemen en te gebruiken voor reductie van organische componenten of cellulair onderhoud. Bij een hogere stroomsterkte (-100 mA) is de elektronen- of H_2 -concentratie aan de elektrode blijkbaar te hoog om allen door de cellen gebruikt te worden, met een hoge productie en vrijstelling van H_2 tot gevolg.

Opvallend is dat bij *L. reuteri* slechts meer H_2 wordt vrijgesteld nadat de BES al twee dagen op een stroomsterkte van -100 mA wordt ingesteld (Figuur 4.20). Bij het experiment op stikstofrijk medium kan deze plotse verandering mogelijks verklaard worden door de contaminatie, maar dit fenomeen komt eveneens voor in afwezigheid van stikstof. Mogelijk slaagt *L. reuteri* er initieel in om de hogere dosis elektronen te verwerken.

In vergelijking met 1,3-PDO productie bij -10 mA, ligt $\varepsilon_{C_b}(1,3-PDO)$ bij -100 mA veel lager. Onder stikstofrijke omstandigheden is bij een opgelegde stroom van -10 mA bij *C. werkmanii* wild type de meeste glycerol gedegrademd na zo'n 4 à 5 dagen, bij de triple knock-out wordt nauwelijks glycerol afgebroken. In aanwezigheid van stikstof is bij beide *C. werkmanii* stammen de meeste glycerol bij -100 mA gedegrademd in de eerste drie dagen. Bij *L. reuteri* is de glycerolafbraak sneller bij -10 mA (2 in plaats van 4 dagen). De stroomsterkte kan dus blijkbaar wel een rol spelen bij de productiviteit, maar -100 mA is te hoog om hoge $\varepsilon_{C_b}(1,3-PDO)$ te behalen en -10 mA te laag voor *C. werkmanii* om glycerolreductie te verwezenlijken.

5.4 Katalytisch vermogen

Nadat productie van 1,3-propaandiol is verwezenlijkt, werd de relatie groei-productie verder onderzocht door de verschillende testen te herhalen op stikstofvrij medium. Door het gebrek aan stikstof kunnen organismen niet groeien en indien productie nog steeds voorkomt, is de conversie niet of niet noodzakelijk groei gerelateerd. Indien groei voorkomt, is dit vermoedelijk te wijten aan intracellulaire stikstofreserves. Een intermediaire incubatiefase bij medium zonder stikstofbron, gevolgd en vooraf gegaan door een wasstap, kan deze hypothese bevestigen. In dit deel worden de resultaten per stam besproken en vergeleken met de waarden bekomen in een stikstofrijk medium. Voor de *Citrobacter* species worden enkel de resultaten met antibiotica in beschouwing genomen.

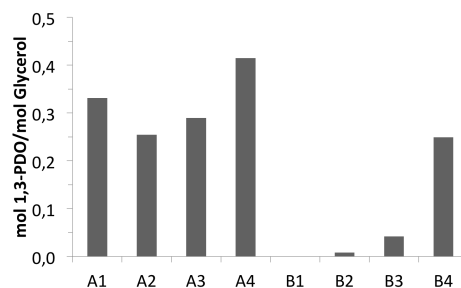
Algemeen wordt de productie van 1,3-PDO in BES behouden bij alle stammen, maar bij een lagere opbrengstefficiëntie. De vrijgestelde elektronen aan de elektrode kunnen vermoedelijk een zelfde effect hebben op glycerolconversie als NADH overschotten uit de oxidatieve pathway.

De lagere efficiëntie duidt er echter op dat energie in de vorm van NADH beter beschikbaar is voor conversie.

5.4.1 *Citrobacter werkmanii* wild type

Een algemene indruk voor het wild type over alle testen heen is de veel lagere tot afwezige productie van 1,3-PDO in afwezigheid van stikstof (Figuur 5.5). Enkel de BES test weet de waarde van zijn gelijke op stikstofrijk medium te evenaren.

In de afwezigheid van stikstof wordt geen productie van 1,3-PDO verwezenlijkt met glycerol als enige substraat. Dit resultaat ligt in lijn met de literatuur (Xu *et al.*, 2009), waar 1,3-PDO als groeigereleerd beschreven staat en productie voornamelijk voorkomt tijdens de exponentiële fase. Wanneer cosubstraten worden toegevoegd, vindt er een minimale productie plaats met concentraties van 0,07 g/L met glucose en 0,45 g/L met waterstofgas. Gezien de lage glycerol verwijdering (Figuur 4.2) levert dit efficiënties van respectievelijk 0,01 en 0,04 mol/mol.



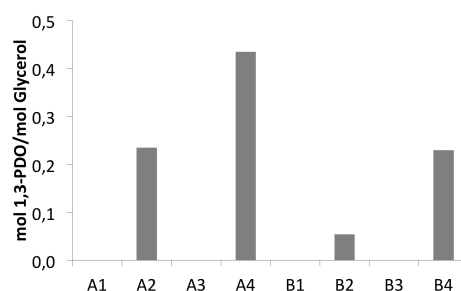
Figuur 5.5: 1,3-PDO productie bij *C. werkmanii* wild type: grafische weergave van aantal mol 1,3-PDO geproduceerd volgens het aantal mol glycerol verwijderd onder anaërobe omstandigheden. Met 1) serumtest op enkel glycerol, 2) glycerol-glucose, 3) glycerol-H₂ en 4) BES test op stikstofrijk (A) en stikstofarm (B) medium met antibiotica, behalve B4.

5.4.2 *Citrobacter werkmanii* triple knock-out

Net als bij de testen op een stikstofrijk medium komt bij *C. werkmanii* triple knock-out geen productie voor op een substraat van enkel glycerol en glycerol-H₂ (Figuur 5.6).

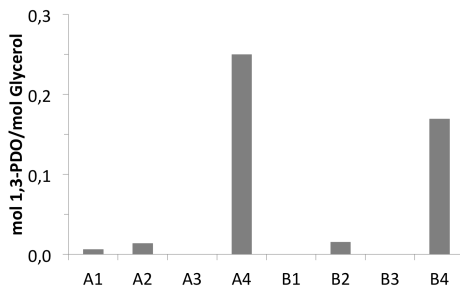
Op een glycerol-glucose substraat is een sterke terugval van de efficiëntie waarneembaar. De bereikte 0,23 mol/mol op een stikstofrijk medium daalt zo'n 80% naar 0,05 mol/mol op een medium gebrekking aan stikstof. Deze waarde is echter nog vijf maal hoger dan bij het wild type onder dezelfde omstandigheden (0,01 mol/mol).

Een vergelijking van de BES testen levert een ander beeld. In de afwezigheid van stikstof blijkt de productie van 1,3-PDO hoger te liggen (13,71 g/L) dan met (12,04 g/L) (Tabel 4.5). De efficiëntie is dan weer afgenomen tot 0,23 mol 1,3-PDO per mol glycerol verwijderd (in vergelijking met 0,43 mol/mol) (Figuur 5.6). Opvallend is dat groei pas optreedt op stikstofrijk medium als alle glycerol bijna verdwenen is (Figuur 4.14 en 4.15).



Figuur 5.6: 1,3-PDO productie bij *C. werkmanii* triple knock-out: grafische weergave van aantal mol 1,3-PDO geproduceerd volgens het aantal mol glycerol verwijderd onder anaërobe omstandigheden. Met 1) serumtest op enkel glycerol, 2) glycerol-glucose, 3) glycerol-H₂ en 4) BES test op stikstofrijk (A) en stikstofarm (B) medium met antibiotica.

5.4.3 *Lactobacillus reuteri*



Figuur 5.7: 1,3-PDO productie bij *L. reuteri*: grafische weergave van aantal mol 1,3-PDO geproduceerd volgens het aantal mol glycerol verwijderd onder anaërobe omstandigheden. Met 1) serumtest op enkel glycerol, 2) glycerol-glucose, 3) glycerol-H₂ en 4) BES test op stikstofrijk (A) en stikstofarm (B) medium.

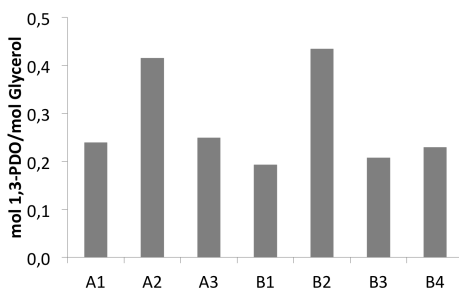
leid worden voor de conversie van glycerol tot 1,3-PDO.

Tegengesteld aan de resultaten van *Citrobacter*, daalt de opbrengstefficiëntie van *L. reuteri* in een bio-elektrochemisch systeem (0,17 mol/mol in vergelijking met 0,25 mol/mol). Ook de concentratie aan 1,3-PDO neemt ook sterk af (4,78 g/L i.v.m. 7,01 g/L). Een reden kan zijn dat de energie vrijgesteld aan de elektrodes niet in dezelfde mate beschikbaar is voor de bacteriële cel als deze die glucose aanlevert. In de BES test zonder stikstofbron wordt ook minder snel glycerol afgebroken dan in stikstofrijke omstandigheden (Figuur 4.19).

De productie van 1,3-propaandiol valt volledig stil op een stikstofarm medium met glycerol als enige substraat (Figuur 5.7). Hieruit kan afgeleid worden dat de relatie tussen groei en 1,3-PDO productie sterker is dan bij *Citrobacter* species. Het volledige wegvallen van productie kan duiden op een groeigerelateerd enzym of de noodzaak aan energie die vrijkomt uit de oxidatieve pathway. Ook op een substraat van glycerol en waterstofgas is er geen productie, maar dit is ook te zien in aanwezigheid van stikstof.

De resultaten van de test met glucose als cosubstraat zijn dan verrassend, want een hogere concentratie wordt bereikt (0,12 g/L i.v.m. 0,05 g/L). Een mogelijke verklaring is dat een groot deel van de energie die gewonnen wordt uit glucose normaal gebruikt wordt voor groei, maar in de afwezigheid hiervan kan omge-

5.5 Effect van antibiotica



Figuur 5.8: Effect van antibiotica op 1,3-PDO productie: met *C. werkmanii* wild type (A) en *C. werkmanii* triple knock-out (B) op stikstofrijk medium zonder (1) en met (2) antibiotica en stikstofarm medium zonder (3) en met (4) antibiotica.

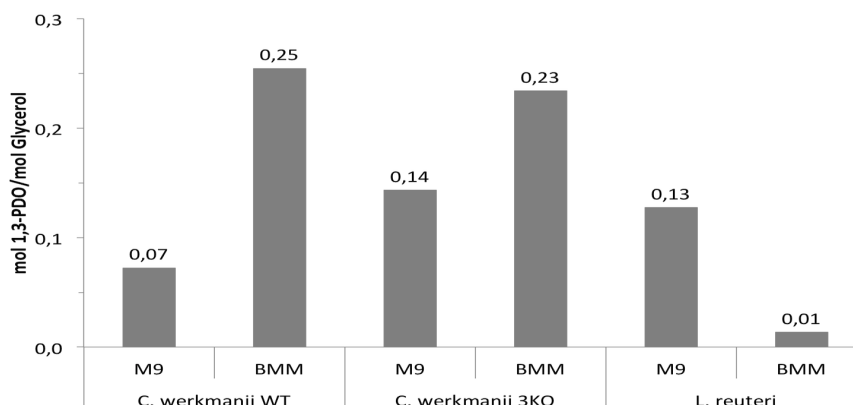
De resistentie van *C. werkmanii* voor ampicilline en de bijkomende resistentie van de triple knock-out voor chlooramphenicol is een handig selectiemiddel en vermindert bovendien het risico op contaminaties tijdens productie processen. Na het modificeren van het wild type werd de chlooramphenicolresistentie behouden omdat deze toch geen invloed had op groei of 1,3-PDO productie (Maervoet, 2012).

In dit onderzoek blijkt de opbrengstefficiëntie in BES altijd hoger te zijn in aanwezigheid van antibiotica (Figuur 5.8). Op een medium rijk aan stikstof wordt de efficiëntie zelfs quasi verdubbeld in vergelijking met testen zonder antibiotica. Voor *C. werkmanii* triple

knock-out kan dit wijzen op gedeeltelijke instabiliteit van het genoom, waarbij mutanten hun productievermogen gedeeltelijk verliezen. Een andere mogelijke verklaring is het voorkomen van contaminaties in de afwezigheid van antibiotica.

5.6 M9 als minimaal medium

Een eerste test met M9 levert betere resultaten voor *L. reuteri* dan voor *C. werkmanii* (Figuur 5.9).



Figuur 5.9: Opbrengstefficiënties op verschillende media: met *C. werkmanii* wild type ('*C. werkmanii* WT'), *C. werkmanii* triple knock-out ('*C. werkmanii* 3KO') en *L. reuteri* op Boenigk MM ('BMM') (anaëroob) en M9 medium (aëroob) op een glycerol-glucose substraat in aanwezigheid van stikstof (en zonder antibiotica bij M9).

De sterke stijging in opbrengstefficiëntie bij *L. reuteri* kan te wijten zijn aan de aërobe condities, hoewel de productie op Boenigk MM hoger is anaëroob (0,049 g/L) dan aëroob (0,01 g/L). Voor de *Citrobacter* stammen blijkt M9 minder geschikt in functie van de 1,3-PDO productie, hoewel dit hier eveneens aan de aërobe omstandigheden of de lagere concentraties aan sulfaat in vergelijking met Boenigk MM kan te wijten zijn. De afwezigheid van antibiotica bij M9 kan eveneens een rol spelen zoals gezien in deel 5.5.

5.7 Economische haalbaarheid

Voor de meest efficiënte stam van dit onderzoek, *C. werkmanii* triple knock-out (0,43 mol/mol) wordt een vergelijking gemaakt tussen de kosten gerelateerd met fermentatie of microbiële electrosynthese (MES). Voor de fermentatie worden de resultaten van de serumtest op een substraat van glycerol-glucose in aanwezigheid van stikstof en antibiotica gebruikt, bij MES is dit BES met antibiotica en eveneens op stikstofrijk medium. Alles wordt berekend op een startconcentratie van 15 g/L glycerol (0,16 mol/L en 17,9 gCOD/L) en bij MES met een opgelegde stroomdichtheid van $-0,1 \text{ mA/cm}^2$ aangezien dit de hoogste $\varepsilon_{Cb}(1,3\text{-PDO})$ oplevert. Er wordt een reactorvolume van 1.000 m^3 verondersteld

Voor de fermentatie wordt een molaire verhouding 1:3 (glucose:glycerol) gebruikt en dus 9,8 ton glucose. Met een marktprijs van ongeveer 0,55 euro/kg (United States Departement of Agriculture, 2013) betekent dit een meerkost bovenop de glycerolprijs van zo'n €5.375. Met een efficiëntie van 0,23 mol/mol op een glycerol-glucose substraat levert deze fermentatie zo'n 2,85 ton 1,3-PDO op. Na opzuiveren van deze stof (*downstream processing*) met een

efficiëntie van 75% (Anand *et al.*, 2011) startende van het fermentatiemedium levert dit een totaal eindproduct van 2,15 ton 1,3-PDO. Uitgerekend met een marktprijs van 1,36 euro/kg Kraus (2008) betekent dit een opbrengst van €2.926, een bedrag lager dan de glucose kost. Bij dergelijke lage efficiënties is het blijkbaar niet rendabel om fermentatieprocessen te gebruiken.

Als we de productie in BES doorrekenen met een gemiddeld energieverbruik van 3,92 kWh/m³ bij -10 mA en een kostprijs van 0,18 euro/kWh (VREG, 2012) dan bekomen we een extra energiekost van 706 euro voor de conversie van glycerol naar 1,3-PDO.

Met een opbrengstefficiëntie van 0,43 mol/mol levert dit 5,3 ton 1,3-PDO in het fermentatiemedium. Na *downstream processing* wordt dit 4,0 ton 1,3-PDO met een waarde van €5.470.

De glycerolkost is voor beide processen logischerwijs gelijk. De operationele en investeringskosten zijn niet gedefinieerd. Het MES systeem kan nog een extra winst genereren als het geproduceerde H₂ eveneens kan opgezuiverd en verkocht worden (0.5 euro/Nm³ H₂¹ (Rozendal *et al.*, 2008)).

Indien deze simulatie berekend wordt met een efficiëntie van 1,00 mol/mol zoals beschreven in Maervoet (2012), dan brengen beide processen zo'n 9,35 ton 1,3-PDO op met een waarde van €12.722. Vanwege de veel lagere energiekost bij MES in vergelijking met de kostprijs van glucose, is een MES meer dan anderhalf keer winstgevender indien enkel deze factoren in rekening worden gebracht.

MES en BES in het algemeen zijn echter nog geen systemen die momenteel commercieel gebruikt worden. Een eerste realisatie zou met de grote toename aan kennis binnen dit vakgebied niet lang meer op zich mogen laten wachten.

¹Normaal kubieke meters: Volume bij standaardomstandigheden (atmosfeerdruk en 0°C)

Hoofdstuk 6

Conclusie

Is het mogelijk 1,3-PDO productie te realiseren met pure culturen van wild types of gemodificeerde stammen in een BES?

Alle geteste pure (*Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 6475 en *Citrobacter werkmanii* DSM17579) en gemodificeerde culturen (*C. werkmanii* DSM17579 Δ dhaD Δ ldhA Δ adhE::ChlFRT) zijn wel degelijk in staat tot productie van 1,3-propaandiol in een bio-elektrochemisch systeem, met maximale concentraties die steeds hoger liggen dan in de batch testen. De bekomen opbrengstefficiënties in BES liggen van *C. werkmanii* wild type en de mutant lager dan de testen met glucose als cosubstraat in afwezigheid van antibiotica. Voor *L. reuteri* bereikt de efficiëntie in BES een 25 maal hogere waarde. De resultaten van de gemengde culturen in batch zijn ook veelbelovend voor verder onderzoek.

Kan elektrische stroom de rol van cosubstraten overnemen?

De elektronen vrijgesteld aan de kathode kunnen gebruikt worden voor de bacteriële conversie van glycerol naar 1,3-PDO. De kans bestaat echter dat elektrische stroom wordt omgezet in H_2 dat op zijn beurt dienst doet als cosubstraat voor de micro-organismen. Batchtesten met H_2 als cosubstraat onder een veel hogere partiële druk dan de 0,5 bar in dit onderzoek, kunnen hier in de toekomst duidelijkheid bieden.

Hoe verloopt het elektronentransport in een BES bij de verschillende culturen?

De transfer van elektronen tussen de kathode en de cel gebeurt hoogstwaarschijnlijk niet via direct membraangebonden elektrontransport. Een mogelijke route voor de elektronen is via een intermediaire component die diffundeert tussen de kathode en de cel. Meer onderzoek is echter vereist om deze hypothese te onderbouwen.

Kan een opgelegde stroomsterkte de productie van 1,3-PDO beïnvloeden?

De stroomsterkte heeft vermoedelijk een invloed op de productiviteit, gezien deze bij *C. werkmanii* wild type en triple knock-out toeneemt bij hogere stroomsterktes. *L. reuteri* vertoont echter een daling in productiviteit. Hogere stroomsterktes gaan bij alle geteste stammen gepaard met een veel lagere $\varepsilon_{C_b}(1,3-PDO)$ en toenemende H_2 productie. Verder onderzoek bij verschillende stroomsterktes en zonder gelijktijdige glycerol supplementatie zijn vereist om dit besluit te staven.

Is 1,3-PDO productie groeigerelateerd of kan het organisme een zuiver katalytische werking uitoefenen?

De relatie tussen groei en productie is bij *L. reuteri* vermoedelijk meer gecorreleerd dan bij *Citrobacter*, doch in BES weten beide species deze relatie te omzeilen. De 1,3-PDO productie valt sterk terug bij beide *C. werkmanii* stammen in de afwezigheid van stikstof. Voor *L. reuteri* daarentegen wordt productie op enkel glycerol onmogelijk, maar met glucose als cosubstraat neemt de opbrengstefficiëntie lichtjes toe.

Heeft het toevoegen van antibiotica bij *C. werkmanii* een effect op de 1,3-PDO productie?

Hoewel vanwege redenen als antibiotica stress een lagere opbrengstefficiëntie wordt verwacht in aanwezigheid van antibiotica, presteren de geteste stammen in BES steeds beter. Op een medium rijk aan stikstof is zelfs quasi een verdubbeling van de efficiëntie zichtbaar.

Is 1,3-PDO productie mogelijk op M9, een eenvoudiger medium?

Hoewel 1,3-PDO productie verwezenlijkt wordt op M9 medium is verder onderzoek nodig vooraleer kan beslist worden over het al dan niet overschakelen naar dit minder complex medium. Vooral *L. reuteri* lijkt beter te presteren op dit eenvoudiger medium.

Kan 1,3-PDO productie in BES op economisch vlak concurreren met fermentatieprocessen?

Vanwege de veel lagere energieprijzen in vergelijking met de aankoop van glucose is synthese van 1,3-PDO in BES meer winstgevend zelfs al wordt een gelijke efficiëntie verondersteld. Verschillen in investerings- en operationele kosten werden echter niet in rekening genomen. Verder zijn tot op heden nog geen commerciële toepassingen van BES op de markt.

Hoofdstuk 7

Toekomstperspectieven

Als uitbreiding van dit onderzoek is voor vele aspecten verder onderzoek vereist om een grotere kennis op te doen omtrent alle mechanismen van glycerolconversie naar 1,3-PDO. De testen in BES en batch dienen minstens herhaald te worden in triplicaat vooraleer hun efficiënties statistisch kunnen onderling vergeleken worden. Een verderzetting van het onderzoek op M9 medium kan mits gunstige resultaten toekomstig werk vereenvoudigen.

Een intermediaire incubatiestap kan meer uitsluitsel geven betreffende sommige fenomenen zoals 1,3-PDO productie bij *L. reuteri* in afwezigheid van een cosubstraat of groei door de verschillende stammen op media vrij van stikstof. Op die manier kunnen effecten van intercellulaire reserves vermeden worden.

Meer cyclische voltammetrie metingen en onderzoek naar mogelijke pathways van H₂ opname in het metabolisme zijn twee mogelijkheden die meer duidelijkheid kunnen scheppen omtrent het mechanisme van elektrontransport.

De interessante resultaten van de gemengde cultuur in batch bieden mooie vooruitzichten voor een test in BES. Bovendien zijn verdere modificaties, zoals knock-outs in de productie van acetaat, mogelijkheden om efficiënties te verhogen.

Indien een stam kan gevonden worden die, los van groei, productie kan verwezenlijken, kan getracht worden de betrokken enzymen op te zuiveren. Het gebruik van dergelijke enzymen kan de complexiteit van media sterk verlagen en de specificiteit van de glycerol conversie verbeteren wat leidt tot een eenvoudigere opzuivering van 1,3-PDO.

Verder onderzoek op grotere schaal met BES systemen in batch, fed-batch en continue modus kunnen een verdere stap zijn in de ontwikkeling van een commercieel productieproces. Het koppelen van dit proces aan interessante oxidaties in het anode compartiment - bijvoorbeeld binnen de afvalwater behandeling - kan kosten nog verder doen dalen, mits een stabiele stroom kan verkregen worden.

Bibliografie

- Abbad-Andaloussi S., Manginot-Durr C., Amine J., Petitdemange E. & Petitdemange H.**, 1995. Isolation and characterization of *Clostridium butyricum* DSM 5431 mutants with increased resistance to 1,3-propanediol and altered production of acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61** (12), 4413–4417.
- Aelterman P., Rabaey K., Pham H.T., Boon N. & Verstraete W.**, 2006. Continuous electricity generation at high voltages and currents using stacked microbial fuel cells. *Environ. Sci. Technol.*, **40** (10), 3388–94.
- Almeida J.R., Favaro L.C. & Quirino B.F.**, 2012. Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. *Biotechnol. Biofuels*, **5** (1), 48.
- Anand P. & Saxena R.K.**, 2012. A comparative study of solvent-assisted pretreatment of biodiesel derived crude glycerol on growth and 1,3-propanediol production from *Citrobacter freundii*. *New Biotechnology*, **29** (2), 199–205.
- Anand P., Saxena R.K. & Marwah R.G.**, 2011. A novel downstream process for 1,3-propanediol from glycerol-based fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **90** (4), 1267–1276.
- Arends J.B., Desloover J., Puig S. & Verstraete W.**, 2012. Principles and technology of microbial fuel cells. In D. Stolten & B. Emonts, red., *Fuel Cell Science and Engineering: Materials, Processes, Systems and Technology*, volume 1, hoofdstuk 6, pag. 147–184. Wiley-VCH Verlag GmbH I& Co.
- Arends J.B.A. & Verstraete W.**, 2012. 100 years of microbial electricity production: three concepts for the future. *Microbial Biotech.*, **5** (3), 333–46.
- Axelsson L., Chung T.C., Dobrogosz W. & Lindgren S.**, 1989. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microb. Ecol. Health D.*, **2**, 131–136.
- Barbirato F., Camarasa-Claret C., Grivet J.P. & Bories A.**, 1995. Glycerol fermentation by a new 1,3-propanediol-producing microorganism: *Enterobacter agglomerans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **43** (5), 786–793.
- Barbirato F., Grivet J., Soucaille P. & Bories A.**, 1996. 3-hydroxypropionaldehyde, an inhibitory metabolite of glycerol fermentation to 1,3-propanediol by enterobacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62** (4), 1448–51.
- Biebl H., Menzel K., Zeng A.P. & Deckwer W.D.**, 1999. Microbial production of 1,3-propanediol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **52**, 289–297.

- Boden T., Marland G. & Andres R.**, 2010. Global, regional, and national fossil-fuel CO₂ emissions. *Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, U.S. Department of Energy, Oak Ridge, Tenn., U.S.A.*
- Boenigk R., Bowien S. & Gottschalk G.**, 1993. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol in continuous cultures of *Citrobacter freundii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 453–457.
- Bretschger O., Gorby Y.A. & Nealson K.H.**, 2010. *Bioelectrochemical Systems: From Extracellular Electron Transfer to Biotechnological Application*, hoofdstuk 5, pag. 81–100. Integrated Environmental Technology Series. IWA Publishing.
- Celińska E.**, 2010. Debottlenecking the 1,3-propanediol pathway by metabolic engineering. *Biotechnol. Adv.*, **28** (4), 519–30.
- Chen X., Zhang D.J., Qi W.T., Gao S.J., Xiu Z.L. & Xu P.**, 2003. Microbial fed-batch production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **63** (2), 143–6.
- Cheng S. & Logan B.E.**, 2007. Sustainable and efficient biohydrogen production via electrohydrogenesis. *PNAS*, **104** (47), 18871–18873.
- De Weirdt R., Crabbé A., Roos S., Vollenweider S., Lacroix C., van Pijkeren J.P., Britton R.A., Sarker S., Van de Wiele T. & Nickerson C.A.**, 2012. Glycerol supplementation enhances *L. reuteri*'s protective effect against *S. Typhimurium* colonization in a 3-d model of colonic epithelium. *PLoS One*, **7** (5), e37116.
- De Weirdt R., Possemiers S., Vermeulen G., Moerdijk-Poortvliet T.C.W., Boschker H.T.S., Verstraete W. & Van de Wiele T.**, 2010. Human faecal microbiota display variable patterns of glycerol metabolism. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **74** (3), 601–11.
- Dennis P.G., Harnisch F., Yeoh Y.K., Tyson G.W. & Rabaey K.**, 2013. Dynamics of cathode-associated microbial communities and metabolite profiles in a glycerol-fed bioelectrochemical system. *Appl. Environ. Microbiol.* Published ahead of print.
- DSMZ G.**, 2008. Medium 465. URL [\url{http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium465.pdf}](http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium465.pdf).
- Emonts B., Blum L., Grube T., Lehnert W., Mergel J., Müller M. & Peters R.**, 2012. Technical advancements of fuel-cell research and development. In D. Stolten & B. Emonts, red., *Fuel Cell Science and Engineering: Materials, Processes, Systems and Technology*, volume 1, hoofdstuk 1, pag. 3–42. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
- Fisher L., Erfle J., Lodge G. & Sauer F.**, 1973. Effects of propylene glycol or glycerol supplementation of the diet of dairy cows on feed intake, milk yield and composition, and incidence of ketosis. *Can. J. Anim. Sci.*, **53**, 289–296.
- Foley J.M., Rozendal R.A., Hertle C.K., Lant P.A. & Rabaey K.**, 2010. Life cycle assessment of high-rate anaerobic treatment, microbial fuel cells, and microbial electrolysis cells. *Environ. Sci. Technol.*, **44** (9), 3629–3637.
- Forage R. & Foster A.**, 1982. Glycerol fermentation in *Klebsiella pneumoniae*: functions of the coenzyme B12-dependent glycerol and diol dehydratases. *J. Bacteriol.*, **149**, 413–419.

- Greenberg A., Clescleri L. & Eaton A.**, 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater. *American Public Health Association*.
- Gröhn Y.T., McDermott J.J., Schukken Y.H., Hertl J.A. & Eicker S.W.**, 1999. Analysis of correlated continuous repeated observations: modelling the effect of ketosis on milk yield in dairy cows. *Prev. Vet. Med.*, **39** (2), 137–53.
- Gungormusler M., Gonen C. & Azbar N.**, 2013. Effect of cell immobilization on the production of 1,3-propanediol. *New Biotechnology*.
- Hill H.A.O. & Higgins I.J.**, 1981. Bioelectrocatalysis. *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. A, Math. Phys. Sci.*, **302**, 267273.
- Homann T., Tag C., Biebl H., Deckwer W.D. & Schink B.**, 1990. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33** (2), 121–126.
- IPCC**, 2007. Fourth assessment report: Climate change, synthesis report. Technisch rapport, Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC).
- Kaur G., Srivastava A. & Chand S.**, 2012. Advances in biotechnological production of 1,3-propanediol. *Biochem. Eng. J.*, **64**, 106–118.
- Kerr B.J., Dozier W.A. & Bregendahl K.**, 2007. Nutritional value of crude glycerin for nonruminants. *Proceedings of the 23rd Annual Carolina Swine Nutrition Conference Raleigh, NC*, pag. 6–18.
- Kraus G.A.**, 2008. Synthetic methods for the preparation of 1,3-propanediol. *Clean*, **36** (8), 648–651.
- Lawrence F. & Sullivan R.**, 1972. Process for making a dioxane. *U.S Patent 3,687,981*.
- Li C. & Fang H.H.P.**, 2007. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.*, **37** (1), 1–39.
- Liu H., Grot S. & Logan B.**, 2005. Electrochemically assisted microbial production of hydrogen from acetate. *Environ. Sci. Technol.*, **39**, 4317–4320.
- Liu H.J., Zhang D.J., Xu Y.H., Mu Y., Sun Y.Q. & Xiu Z.L.**, 2007. Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions up to a pilot scale. *Biotechnol. Lett.*, **29**, 1281–1285.
- Logan B.E., Hamelers B., Rozendal R.A., Schröder U., Keller J., Freguia S., Aelterman P., Verstraete W. & Rabaey K.**, 2006. Microbial fuel cells: methodology and technology. *Environ. Sci. Technol.*, **40** (17), 5181–5192.
- Luperchio S.A. & Schauer D.B.**, 2001. Molecular pathogenesis of *Citrobacter rodentium* and transmissible murine colonic hyperplasia. *Microbes. Infect.*, **3** (4), 333–40.
- Lüthi-Peng Q., Dileme F. & Puhan Z.**, 2002. Effect of glucose on glycerol bioconversion by *Lactobacillus reuteri*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **59** (2-3), 289–296.
- Maervoet V., De Mey M., Beauprez J., De Maeseneire S. & Soetaert W.**, 2011. Enhancing the microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol using metabolic engineering. *Org. Process Res. Dev.*, **15** (1), 189–202.

- Maervoet V.E.**, 2012. Enhanced production of 1,3-propanediol in *Citrobacter* sp. through metabolic engineering. proefschrift, Ghent University, Ghent.
- Markets and Markets**, 2012. 1,3-propanediol (PDO) market by applications (PTT [polytrimethylene terephthalate], polyurethane, cosmetic, personal care & home cleaning & other applications) & geography - global market trends & forecasts to 2019. URL <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/1-3-propanediol-pdo-market-760.html>.
- Marsili E. & Zhang X.**, 2010. *Bioelectrochemical Systems: From Extracellular Electron Transfer to Biotechnological Application*, hoofdstuk 4, pag. 59–79. Integrated Environmental Technology Series. IWA Publishing.
- Molly K., Woestyne M.V. & Verstraete W.**, 1993. Development of a 5-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **39** (2), 254–258.
- Nevin K.P., Hensley S.A., Franks A.E., Summers Z.M., Ou J., Woodard T.L., Snoeyenbos-West O.L. & Lovley D.R.**, 2011. Electrosynthesis of organic compounds from carbon dioxide is catalyzed by a diversity of acetogenic microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77** (9), 2882–6.
- Nevin K.P., Woodard T.L., Franks A.E., Summers Z.M. & Lovley D.R.**, 2010. Microbial electrosynthesis: feeding microbes electricity to convert carbon dioxide and water to multicarbon extracellular organic compounds. *mBio*, **1** (2).
- Oppenberg B. & Schink B.**, 1990. Anaerobic degradation of 1,3-propanediol by sulfate-reducing and by fermenting bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **57** (4), 205–213.
- Papanikolaou S., Fakas S., Fick M., Chevalot I., Galiotou-Panayotou M., Komaitis M., Marc I. & Aggelis G.**, 2008. Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. *Biomass Bioenergy*, **32** (1), 60–71.
- Rabaey K.**, 2010. *Bioelectrochemical Systems: From Extracellular Electron Transfer to Biotechnological Application*, hoofdstuk 1, pag. 1–16. Integrated Environmental Technology Series. IWA Publishing.
- Rabaey K., Boon N., Siciliano S.D., Verhaege M. & Verstraete W.**, 2004a. Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70** (9), 5373–82.
- Rabaey K., Ossieur W., Verhaege M. & Verstraete W.**, 2004b. Continuous microbial fuel cells convert carbohydrates to electricity. In *Proceedings of the 10th world congress on Anaerobic Digestion*, International Symposium on Anaerobic Digestion, Montreal Canada, pag. 129–135.
- Rabaey K. & Rozendal R.A.**, 2010. Microbial electrosynthesis - revisiting the electrical route for microbial production. *Nature Rev. Microbiol.*, **8**, 706–716.
- Rabaey K. & Verstraete W.**, 2005. Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *Trends Biotechnol.*, **23** (6), 291–8.
- Reguera G., McCarthy K.D., Mehta T., Nicoll J.S., Tuominen M.T. & Lovley D.R.**, 2005. Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*, **435** (7045), 1098–101.

- Ringeisen B.R., Henderson E., Wu P.K., Pietron J., Ray R., Little B., Biffinger J.C. & Jones-Meehan J.M., 2006. High power density from a miniature microbial fuel cell using *Shewanella oneidensis* dsp10. *Environ. Sci. Technol.*, **40** (8), 2629–2634.
- Rosander A., Connolly E. & Roos. S., 2008. Removal of antibiotic resistance gene-carrying plasmids from *Lactobacillus reuteri* atcc 55730 and characterization of the resulting daughter strain, *L. reuteri* dsm 17938. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 6032–6040.
- Rosenbaum M., Aulenta F., Villano M. & Angenent L.T., 2011. Cathodes as electron donors for microbial metabolism: which extracellular electron transfer mechanisms are involved? *Bioresour. Technol.*, **102** (1), 324–33.
- Rozendal R.A., Hamelers H.V.M., Rabaey K., Keller J. & Buisman C.J.N., 2008. Towards practical implementation of bioelectrochemical wastewater treatment. *Trends Biotechnol.*, **26** (8), 450–9.
- Saxena R.K., Anand P., Saran S. & Isar J., 2009. Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnol. Adv.*, **27** (6), 895–913.
- Schütz H. & Radler F., 1984. Propanediol-1,2-dehydratase and metabolism of glycerol of *Lactobacillus brevis*. *Arch. Microbiol.*, **139** (4), 366–370.
- Selembo P.A., Perez J.M., Lloyd W.A. & Logan B.E., 2009. Enhanced hydrogen and 1,3-propanediol production from glycerol by fermentation using mixed cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, **104** (6), 1098–1106.
- Shafiee S. & Topal E., 2009. When will fossil fuel reserves be diminished? *Energy Policy*, **37** (1), 181–189.
- Sharpe M.E., Fryer T.F. & Smith D.G., 1966. *Identification Method for Microbiologists Part A*, hoofdstuk Identification of the Lactic Acid Bacteria, pag. 65–79. London and New York, Academic Press.
- Shornikova A.V., Casas I.A., Isolauri E., Mykkanen H. & Vesikari. T., 1997a. *Lactobacillus reuteri* as a therapeutic agent in acute diarrhea in young children. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **24**, 399–404.
- Shornikova A.V., Casas I.A., Mykkanen H., Salo E. & Vesikari. T., 1997b. Bacteriotherapy with *Lactobacillus reuteri* in rotavirus gastroenteritis. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **16**, 1103–1107.
- Sullivan C.J., 2000. Propanediols. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, **30**, 233–241.
- Talarico T.L., Axelsson L.T., Novotny J., Fiuzat M. & Dobrogosz W.J., 1990. Utilization of glycerol as a hydrogen acceptor by *Lactobacillus reuteri*: Purification of 1,3-propanediol:nad⁺ oxidoreductase. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56** (4), 943–948.
- Tang X., Tan Y., Zhu H., Zhao K. & Shen W., 2009. Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol by an engineered strain of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75** (6), 1628–34.
- United States Department of Agriculture, 2013. U.S. wholesale list price for glucose syrup. URL http://www.ers.usda.gov/datafiles/Sugar_and_Sweeteners_Yearbook_Tables/World_and_US_Sugar_and_Corn_Sweetener_Prices/TABLE07.XLS.

- Veiga da Cunha M. & Foster M.A.**, 1992. Sugar-glycerol cofermentations in lactobacilli: the fate of lactate. *J. Bacteriol.*, **174** (3), 1013–1019.
- VREG**, 2012. Evolutie elektriciteits-en aardgasrijzen (excl. btw) voor kleine professionele afnemers. URL <http://www.vreg.be/hoeveel-kost-1-kwh-elektriciteit-en-aardgas>.
- Weizman Z., Asli G. & Alsheikh A.**, 2005. Effect of a probiotic infant formula on infections in child care centers: Comparison of two probiotic agents. *Pediatrics*, **115**, 5–9.
- Wolf B.W., Garleb K.A., Ataya D.G. & Casas. I.A.**, 1995. Safety and tolerance of *Lactobacillus reuteri* in healthy adult male subjects. *Microb. Ecol. Health D.*, **8**, 41–50.
- Xiu Z.L., Chen X., Sun Y.Q. & Zhang D.J.**, 2007. Stoichiometric analysis and experimental investigation of glycerol–glucose co-fermentation in *Klebsiella pneumoniae* under microaerobic conditions. *Biochem. Eng. J.*, **33** (1), 42–52.
- Xu Y.Z., Guo N.N., Zheng Z.M., Ou X.J., Liu H.J. & Liu D.H.**, 2009. Metabolism in 1,3-propanediol fed-batch fermentation by a D-lactate deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae*. *Biotechnol. Bioeng.*, **104** (5), 965–72.
- Yang F., Hanna M.A. & Sun R.**, 2012. Value-added uses for crude glycerol—a byproduct of biodiesel production. *Biotechnol. Biofuels*, **5** (13).
- Zhou M., Chi M., Luo J., He H. & Jin T.**, 2011. An overview of electrode materials in microbial fuel cells. *J. Power Sources*, **196** (10), 4427–4435.

Bijlage A

Colony PCR

Naast antibiotica resistentie werd *C. werkmanii* wild type en de triple knock-out gecontroleerd aan de hand van colony polymerase chain reaction (cPCR). Vanwege diverse problemen zijn de resultaten niet steeds even duidelijk. Hieronder wordt een voorbeeld gegeven van het wild type.

A.1 Materiaal en Methoden

Alle methoden gebeurden volgens een intern protocol bij InBio.

A.1.1 Polymerase chain reaction

De stam werd uitgeplaat op LB agar zonder antibiotica en geïncubeerd overnacht bij 37°C. Na incubatie werd een kolonie opgepikt en bij 25 µL mastermix (Tabel A.1) in een 96-well plaat gevoegd.

Het DNA wordt eerst gedenatureerd door 7 minuten incubatie bij 94°C. Daarna volgen 30 cycli van telkens 30 seconden denaturatie (94°C), 30 seconden hybridisatie (47°C) en 2,5 minuten elongatie (68°C). Er wordt geëindigd met 7 minuten elongatie bij 68°C, waarna de plaat op een temperatuur van 16°C wordt gehouden tot ze wordt uigehaald.

De verschillende primers worden hieronder weergegeven met 'WT' het resulterende aantal basenparen ('bp') bij *C. werkmanii* wild type en '3KO' bij de gemodificeerde stam.

Tabel A.1: Samenstelling mastermix voor cPCR: samenstelling voor 15 kolonies (+ 5 reserve). De primers (forward ('Fw') en reverse ('Rv')) worden hieronder weergegeven.

Component	Volume µL
milliQ water	358
Taq DNA polymerase buffer (10x)	50
dNTP mix (2 mM)	50
Fw primer (10 µM)	20
Rv primer (10 µM)	20
Taq polymerase (5 U/µL)	2

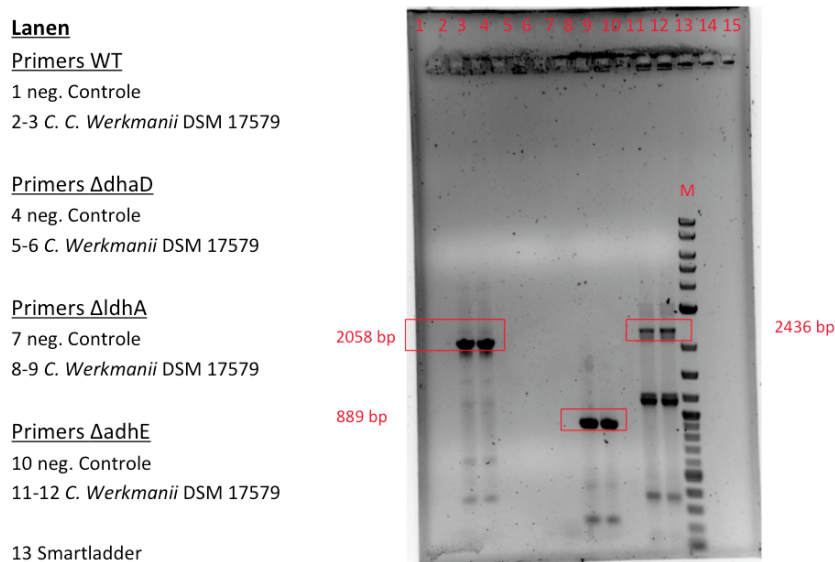
<i>C. werkmanii</i>	Forward primer: PDO061-dhaR-Fw3: ACGTCAGCGTTCTGTCCATC Reverse primer: PDO055-dhaT-Rv: TGGCGGTACTGTCTGAACAAG Resultaat: 2058 bp
Δ dhaD	Forward primer: PDO078-Fw-dhaD-in-out: GGTCTGCATAGCCATGACATTAGC Reverse primer: PDO076-Rv-dhaD-in-out: TAGCCACGGCCATGATCTTG Resultaat: 829 bp (WT); 170 bp (3KO)
Δ ldhA	Forward primer: PDO108-ldhA-out-Fw: GTATCTGCAGCAGGTTAACG Reverse primer: PDO109-ldhA-out-Rv: CGTTTCAGAAATGCTGGTCAACG Resultaat: 889 bp (WT); 146 bp (3KO)
Δ adhE	Forward primer: PDO144-Fw-adhE-out: AACGTGTGCCAGGAAGTCAG Reverse primer: PDO145-Rv-adhE-out: AAAGCCCAGCGTGAATATGC Resultaat: 2436 bp (WT); 177 bp (3KO)

A.1.2 Gelelektroforese

Een agargel wordt bereid met 1 % agar en 15 lanen. Na stollen van de agar wordt 3 μ L van een ladder (Eurogentec SmartLadder) in een laan gepipetteerd. Vijf μ L van het resultaat na cPCR wordt vermengd met 2 μ L dye (10x loading buffer TaKaRa) op een parafilm vooraleer te pipetteren in een laan. De gel wordt 60 minuten in een bufferoplossing gelegd met een opgelegde potentiaal van 120 V. Na een uur wordt de gel 30 minuten in ethidiumbromide gelegd, waarna een foto genomen wordt onder UV belichting.

A.2 Resultaten

Behalve de voorspelde banden zijn nog andere bandjes zichtbaar, doch lichter (Figuur A.1). Vooral met de primers van Δ adhE is nog een tweede band zichtbaar, nog duidelijker dan de gezochte bij 2436 bp. Met de primers Δ dhaD werden geen banden gedetecteerd, de reden hiervoor is onduidelijk.



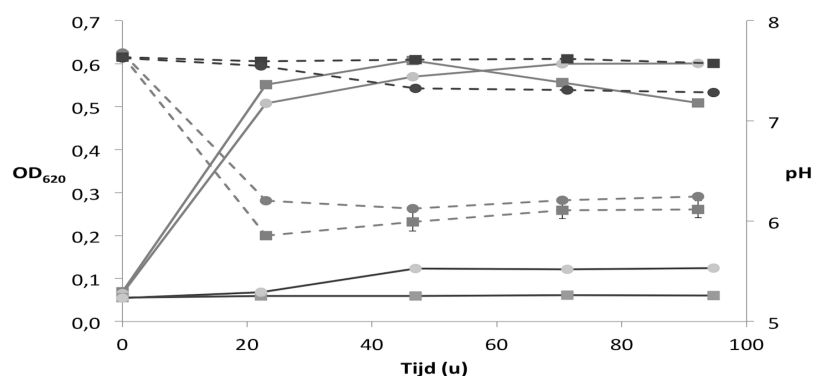
Figuur A.1: cPCR *C. werkmanii* wild type: Foto van de gel na cPCR en gelelektroforese met de definitie van de lanen.

Bijlage B

Serumtesten: Groei en pH-curves

B.1 *Citrobacter werkmanii* wild type

De batch testen op *C. werkmanii* wild type gebeurden allemaal met antibiotica (ampicilline, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en onder anaërobe omstandigheden. De test duurde zo'n 92 uur. De groei (OD_{620}) en pH wordt weergegeven in Figuur B.1.

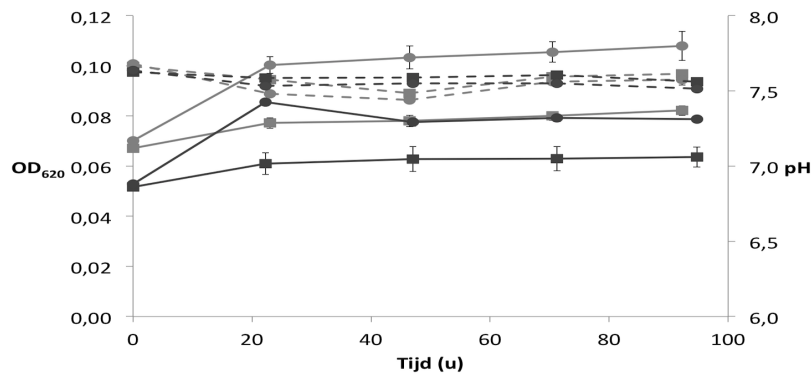


Figuur B.1: Groei- en pH-curve serumtest *C. werkmanii* wild type: OD_{620} (volle lijn) en pH (gestreepte lijn) in functie van de tijd (in uur). De test werd uitgevoerd op media met (lichtgrijs) en zonder (donkergrijs) stikstofbron met als substraat glycerol (\square) en glycerol- H_2 (\circ). De weergegeven foutbalken bij OD_{620} zijn standaarddeviaties van drie metingen.

B.2 *Citrobacter werkmanii* triple knock-out

De serumtest met *C. werkmanii* triple knock-out werden uitgevoerd met antibiotica (chloramphenicol, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in het medium aanwezig en onder anaërobe omstandigheden. De test duurde zo'n 92 uur.

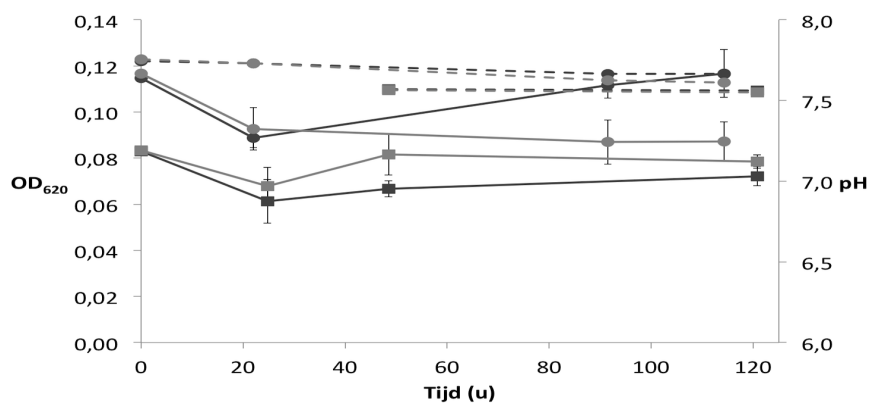
Figuur B.2 toont de groei (OD_{620}) en pH in functie van de tijd.



Figuur B.2: Groei- en pH-curve serumtest *C. werkmanii* triple knock-out: OD₆₂₀ (volle lijn) en pH (gestreepte lijn) in functie van de tijd (in uur). De test werd uitgevoerd op media met (lichtgrijs) en zonder (donkergrijs) stikstofbron met als substraat glycerol (□) en glycerol-H₂ (○). De weergegeven foutbalken bij OD₆₂₀ zijn standaarddeviaties van drie metingen.

B.3 *Lactobacillus reuteri*

Net als *Citrobacter* werd ook *Lactobacillus reuteri* getest op stikstofrijke en -arme media met en zonder waterstofgas als co-substraat, zonder antibiotica aanwezig. Figuur B.3 toont de resultaten van groei OD₆₂₀ en pH onder anaërobe omstandigheden

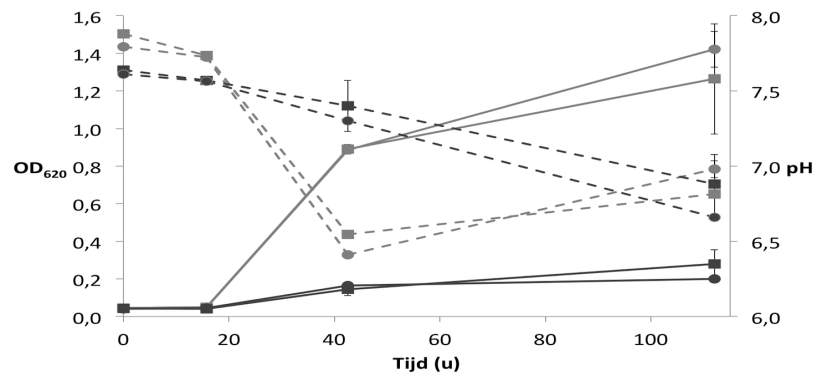


Figuur B.3: Groei- en pH-curve serumtest *L. reuteri* onder anaërobe omstandigheden: OD₆₂₀ (volle lijn) en pH (gestreepte lijn) in functie van de tijd (in uur). De test werd uitgevoerd op media met (lichtgrijs) en zonder (donkergrijs) stikstofbron met als substraat glycerol (□) en glycerol-H₂ (○). De weergegeven foutbalken bij OD₆₂₀ zijn standaarddeviaties van drie metingen.

B.4 Mengculturen

De mengculturen werden getest op medium zonder antibiotica.

Figuur B.4 toont de resultaten van groei OD_{620} en pH onder anaërobe omstandigheden



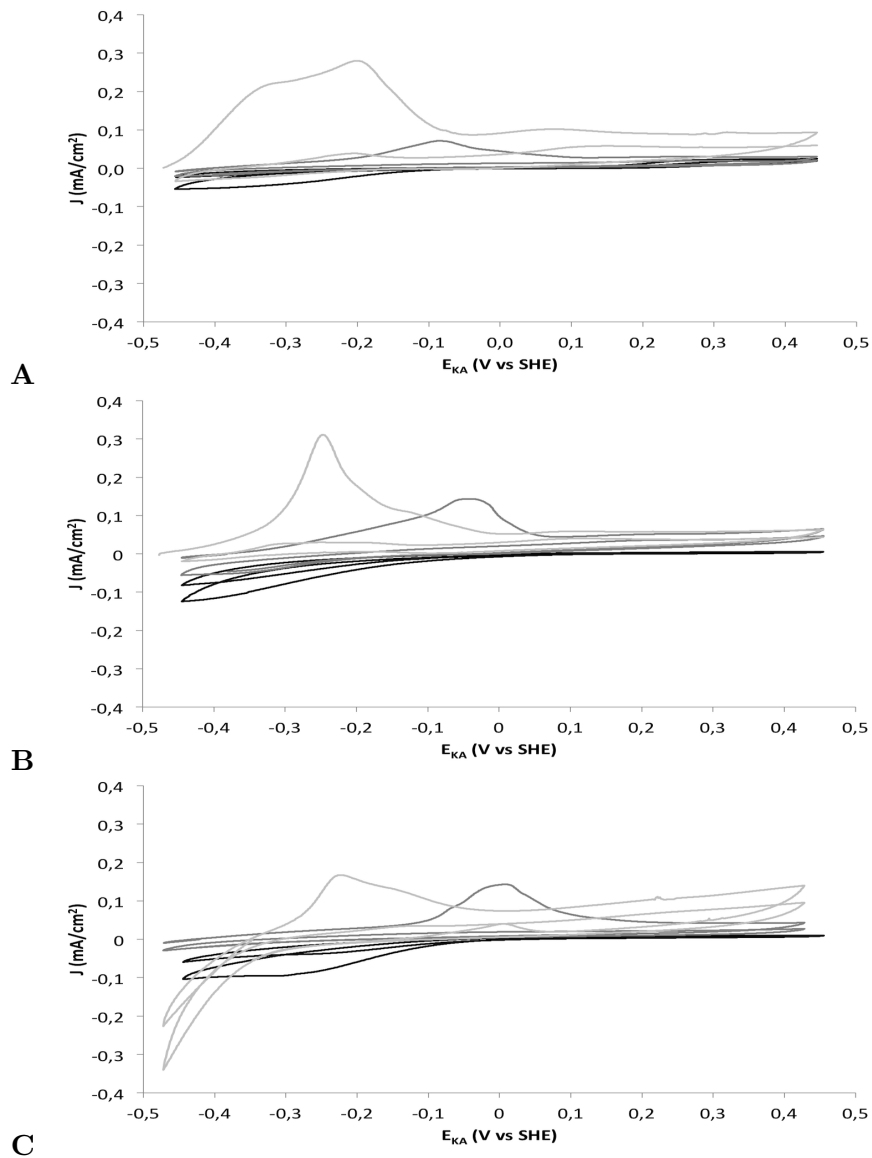
Figuur B.4: Groei- en pH-curve serumtest mengcultuur: OD_{620} (volle lijn) en pH (gestreepte lijn) in functie van de tijd (in uur). De test werd uitgevoerd op media met (lichtgrijs) en zonder (donkergrijs) stikstofbron met als substraat glycerol (\square) en glycerol- H_2 (\circ). De weergegeven foutbalken bij OD_{620} zijn standaarddeviaties van drie metingen.

Bijlage C

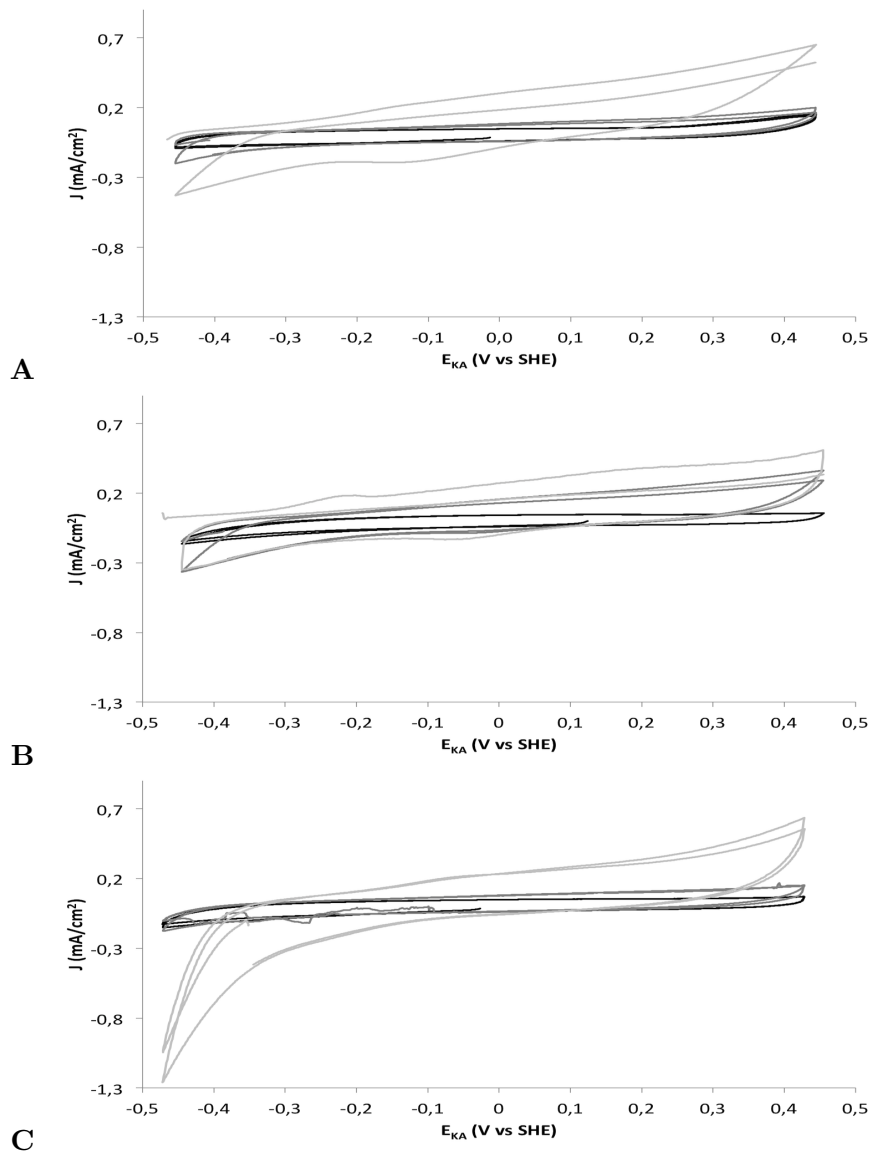
Bio-elektrochemische systemen

C.1 Cyclische voltammetrie

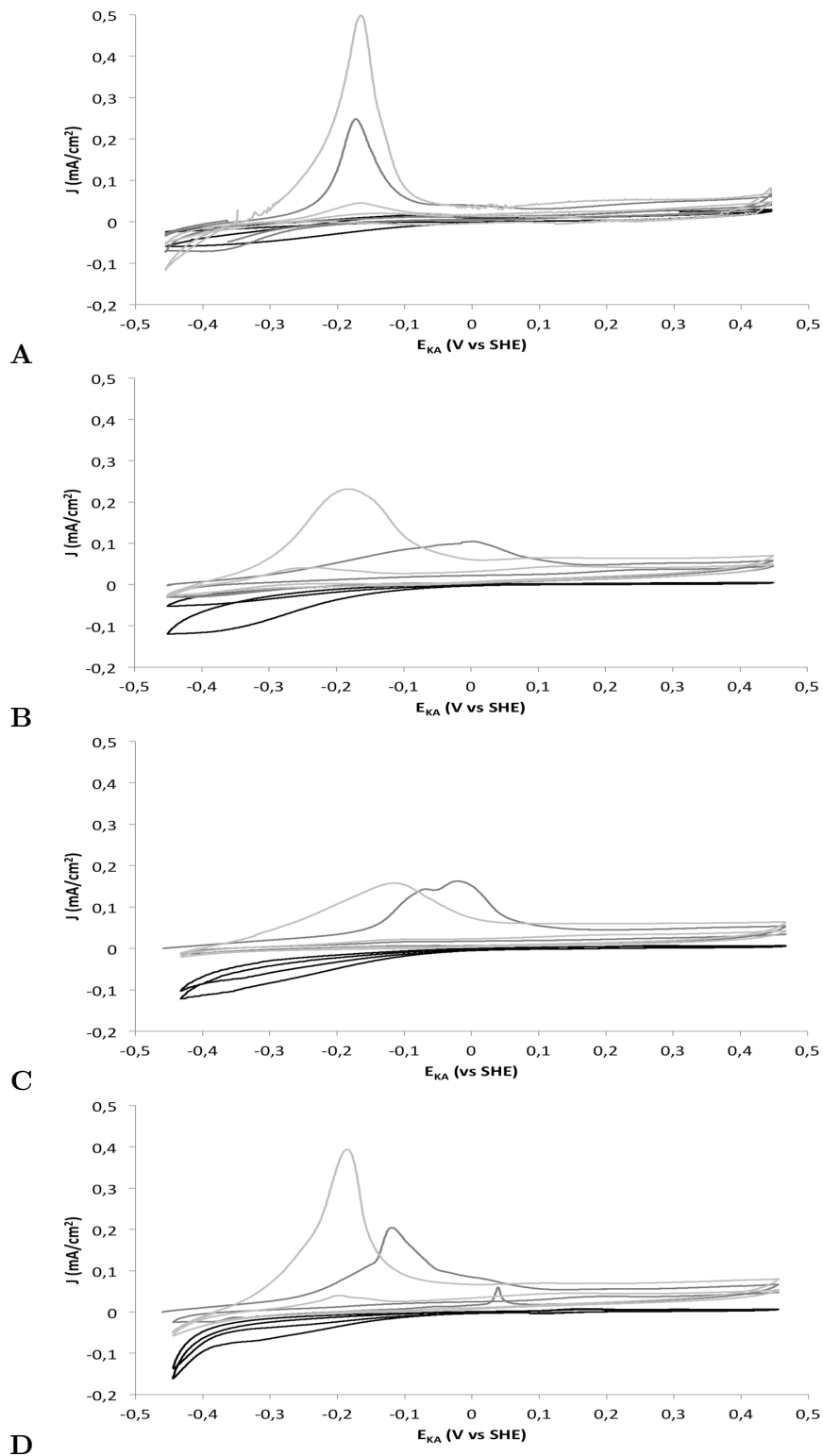
C.1.1 *Citrobacter werkmanii* wild type



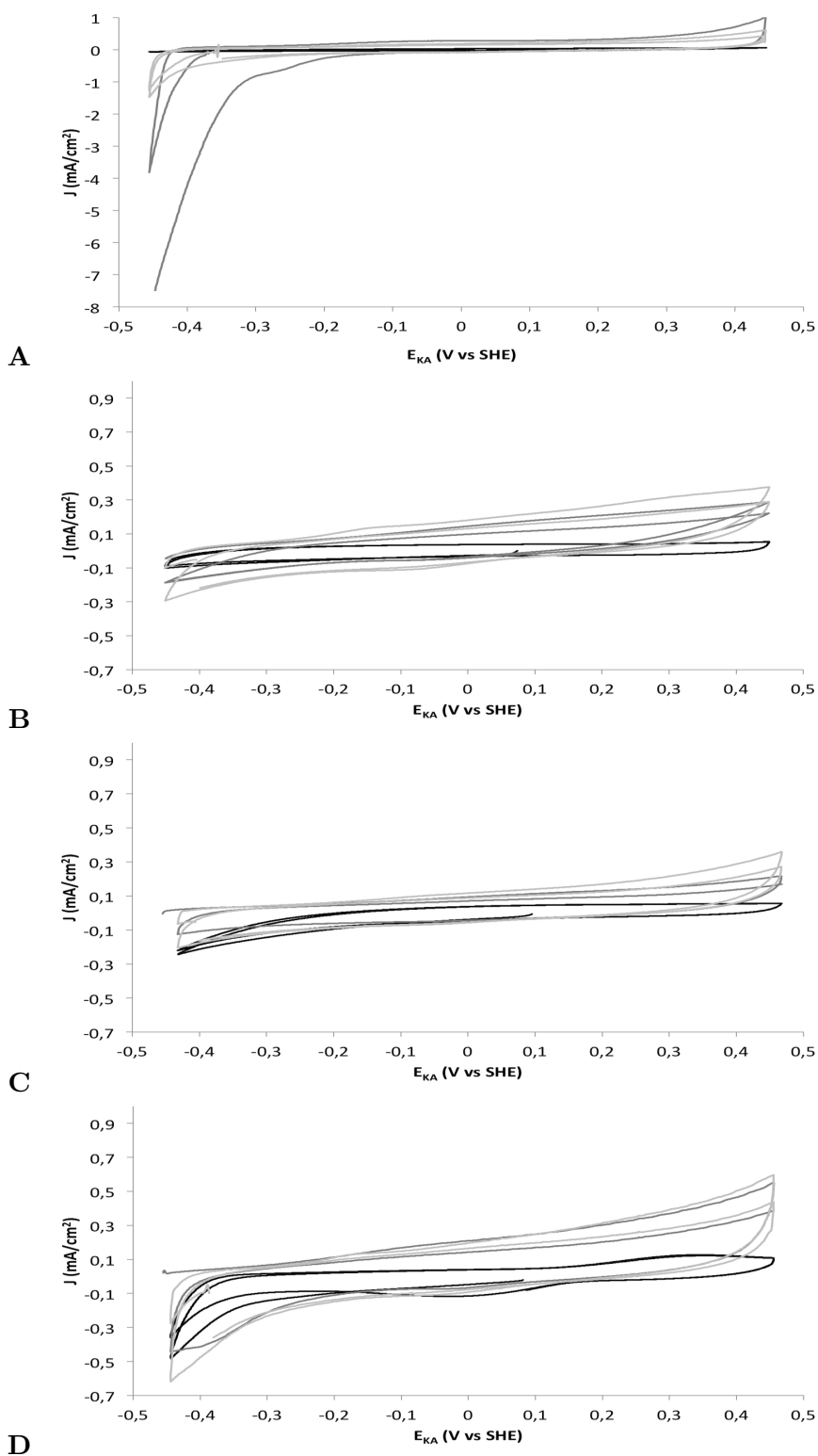
Figuur C.1: Cyclische voltammetrie scan BES *C. werkmanii* wild type bij 1 mV/s: kathodepotentiaal (V vs SHE) in functie van de stroomdichtheid (mA/cm²) bij het begin (zwart), de wissel tussen de verschillende stroomsterktes (donkergrijs) en op het eind (lichtgrijs). Met A) stikstofrijk medium zonder antibiotica; B) stikstofarm medium zonder antibiotica en C) stikstofrijk medium met antibiotica.



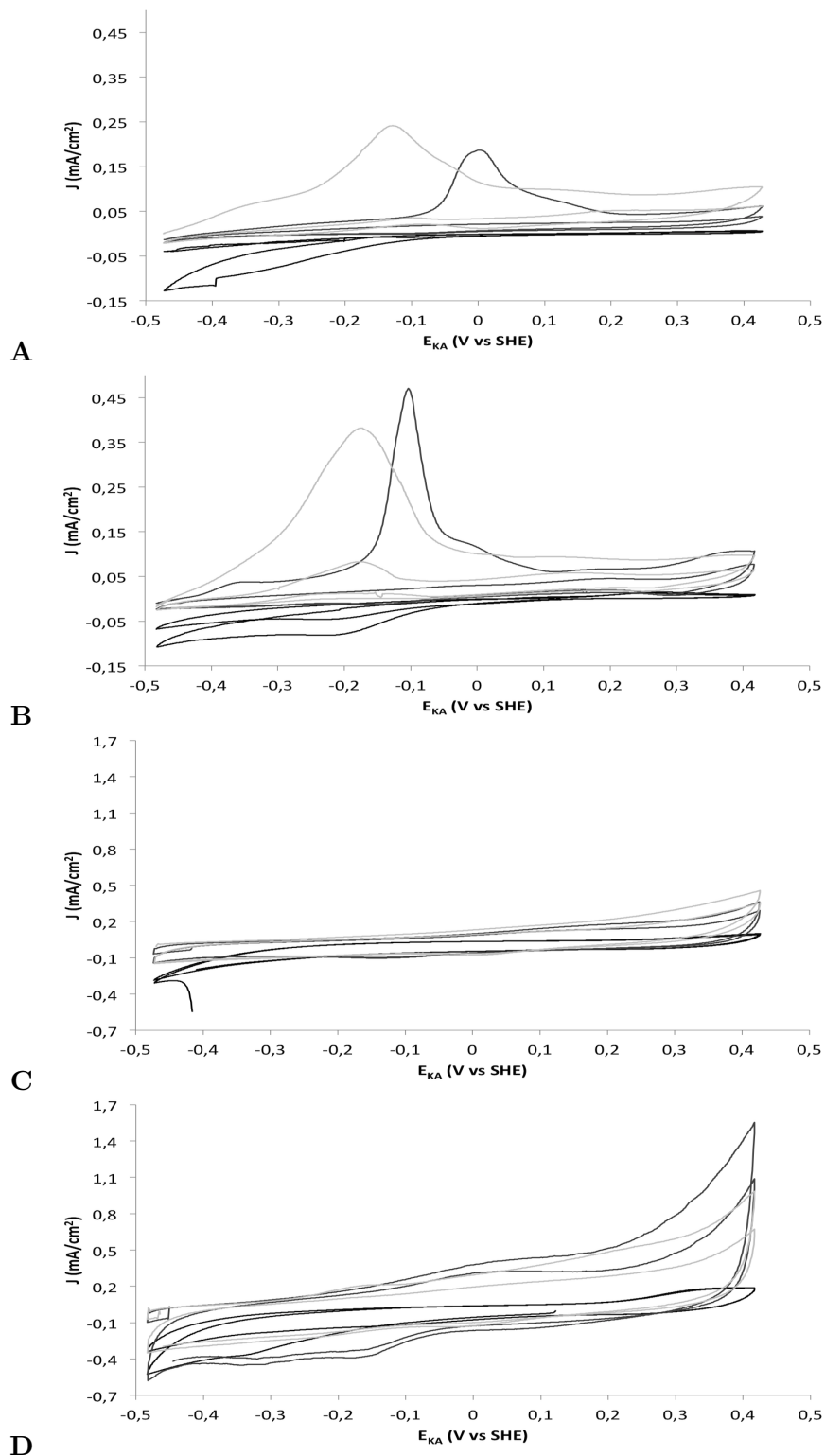
Figuur C.2: Cyclische voltammetrie scan BES *C. werkmanii* wild type bij 50 mV/s: kathodepotentiaal (V vs SHE) in functie van de stroomdichtheid (mA/cm²) bij het begin (zwart), de wissel tussen de verschillende stroomsterktes (donkergrijs) en op het eind (lichtgrijs). Met A) stikstofrijk medium zonder antibiotica; B) stikstofarm medium zonder antibiotica en C) stikstofrijk medium met antibiotica.

C.1.2 *Citrobacter werkmanii* triple knock-out

Figuur C.3: Cyclische voltammetrie scan BES *C. werkmanii* triple knock-out bij 1 mV/s: kathodepotentiaal (V vs SHE) in functie van de stroomdichtheid (mA/cm²) bij het begin (zwart), de wissel tussen de verschillende stroomsterktes (donkergrijs) en op het eind (lichtgrijs). Met A) stikstofrijk medium zonder antibiotica; B) stikstofarm medium zonder antibiotica; C) stikstofrijk medium met antibiotica en D) stikstofarm medium met antibiotica.



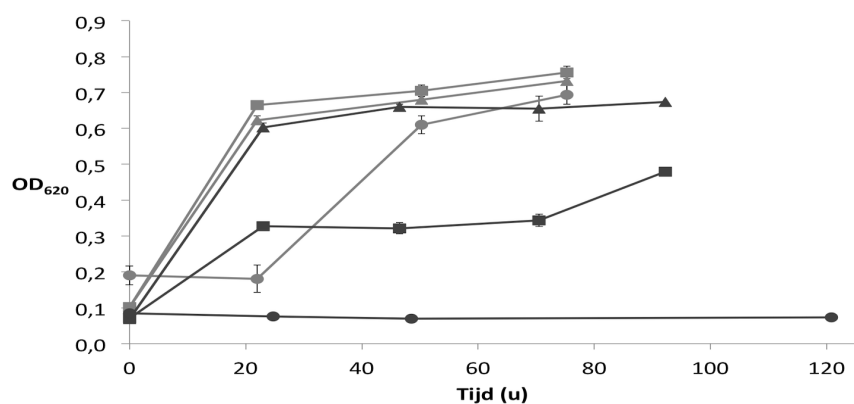
Figuur C.4: Cyclische voltammetrie scan BES *C. werkmanii* triple knock-out bij 50 mV/s: kathodepotentiaal (V vs SHE) in functie van de stroomdichtheid (mA/cm²) bij het begin (zwart), de wissel tussen de verschillende stroomsterktes (donkergrijs) en op het eind (lichtgrijs). Met A) stikstofrijk medium zonder antibiotica; B) stikstofarm medium zonder antibiotica; C) stikstofrijk medium met antibiotica en D) stikstofarm medium met antibiotica.

C.1.3 *Lactobacillus reuteri*

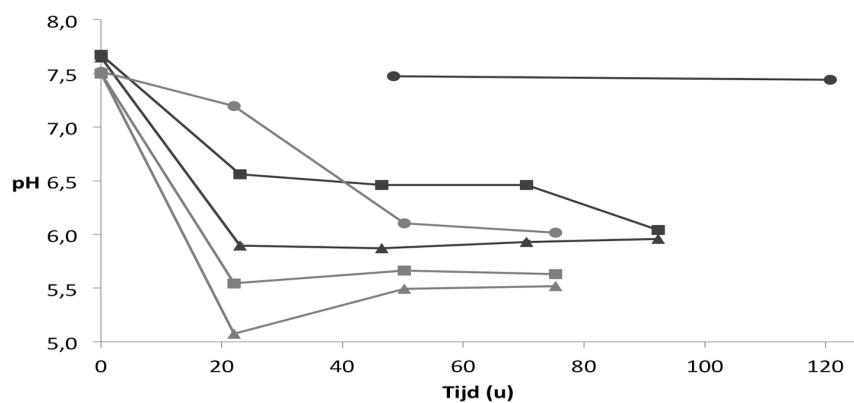
Figuur C.5: Cyclische voltammetrie scan BES *L. reuteri* bij 1 mV/s (A en B) en 50 mV/s (C en D): kathodepotentiaal (V vs SHE) in functie van de stroomdichtheid (mA/cm^2) bij het begin (zwart), de wissel tussen de verschillende stroomsterktes (donkergrijs) en op het eind (lichtgrijs). Met A) & C) stikstofrijk medium en B) & D) stikstofarm medium zonder antibiotica.

Bijlage D

Medium testen



Figuur D.1: Groeicurve op Boenigk MM (donkergrijs) en M9 (lichtgrijs): OD₆₂₀ in functie van de tijd (in uur), met *L. reuteri* (○), *C. werkmanii* wild type (△) en *C. werkmanii* triple knock-out (□). De weergegeven foutbalken zijn standaarddeviaties van drie metingen van twee herhalingen.



Figuur D.2: pH-curve op Boenigk MM (donkergrijs) en M9 (lichtgrijs): pH in functie van de tijd (in uur), met *L. reuteri* (○), *C. werkmanii* wild type (△) en *C. werkmanii* triple knock-out (□).