

Eindrapport
Project TEI216054
Isobuteenproductie van afvalgassen via gemanipuleerde microben

Inhoudsopgave

1	Project	2
2	Eindrapport op inhoud	2
2.1	Samenvatting	2
2.2	Inleiding	2
2.3	Doelstelling	3
2.4	Werkwijze	4
2.4.1	Analytische werkwijzen	4
2.4.2	Basismaterialen	4
2.4.3	Apparatuur	4
2.5	Resultaten	5
2.5.1	Resultaten van het project zelf: resultaten bij Syngip BV	5
2.5.2	Resultaten van het project zelf: werk bij BBEPP	6
2.5.3	Mogelijkheden voor spin-off en vervolgactiviteiten	6
2.6	Bespreking	6
2.7	Conclusies en aanbevelingen	6
3	Uitvoering van het project	7
3.1	De problemen (technisch en organisatorisch) die zich tijdens het project voordeden en hoe deze werden opgelost	7
3.2	Verklaring van wijzigingen van het projectplan	7
3.3	Verklaring van de verschillen tussen het budget en de feitelijk gemaakte kosten	7
3.4	Verklaring ten aanzien van verspreiding van kennis	7
3.5	Verklaring van PR-project en verdere gelegenheden voor PR	7

1 Project

Projectreferentienummer: TEEI216054

Titel: Isobuteenproductie van afvalgassen via gemanipuleerde microben

Coördinator: Syngip B.V.

Andere partners: Arcelor Mittal Belgium NV, Dow Benelux BV, Bio Base Europe Pilot Plant (BBEPP)

Derde partijen: Bio Base Europe Pilot Plant, Institute for Sustainable Process Technology

Projectperiode: 1 oktober 2016 – 31 maart 2017

2 Eindrapport op inhoud

2.1 Samenvatting

Syngip heeft een als bedrijfseigendom beschermde snelgroeiende, thermofiele microbe geïsoleerd en gekenmerkt, die een voordeel gevend platform voor de bioproductie van hoogwaardige verbindingen van industrieel afvalgas zou kunnen vormen. Een van de primaire commerciële doelen is isobuteen, een belangrijke bouwsteen in de tegenwoordige petrochemische industrie. Het project behelst het opschalen van de technologie van Syngip, thans op laboratoriumschaal, bij de BBEPP-faciliteit, in een 10L-bioreactor die specifiek ontworpen is voor gasfermentatie. Anaërobische cultiveringsomstandigheden op laboratoriumschaal zouden kunnen worden gestandaardiseerd bij Syngip en worden overgedragen aan BBEPP. Bij het opschalen naar de 10L-bioreactorschaal, konden significante groeisnelheden echter niet worden gerealiseerd, waaruit bleek dat cryopreservatie-/cultiveringsomstandigheden nog niet geheel worden beheerst. Deze resultaten laten de specifieke moeilijkheden zien die zich voordoen bij de ontwikkeling van nieuwe microbiële anaërobische platformen. Verdere studies zullen worden uitgevoerd om de huidige problemen op te lossen. Na het einde van het project is Syngip met een serie studies begonnen om de robuustheid van haar cryopreservatiemethoden en de eigenschappen van cryoculturen in de loop van de tijd te evalueren. De tegenwoordige resultaten lijken zeer bevredigend en nieuwe experimenten zouden met meer vertrouwen kunnen worden gelanceerd.

2.2 Inleiding

IBN, bekend als isobuteen of isobutyleen, is een belangrijke bouwsteen die tegenwoordig in de petrochemische industrie wordt gebruikt. Op fossiele olie gebaseerd IBN is tegenwoordig een uitvoerproduct van de “petrochemische kraakinstallaties” en ook een bijproduct van het propyleenoxideproces. De wereldwijde markt daarvoor bedraagt ongeveer 15Mt per jaar en groeit met 2,5% per jaar (Bron HIS/CCCEH-rapport). Met een trend waarbij nafta in kraakinstallaties wordt vervangen door LPG (*liquefied petroleum gas*), neemt de verhouding van IBN in het uitvoerproduct van kraakinstallaties af, zodat het aanbod van dit product onder druk komt te staan. Tegelijkertijd vragen klanten van op fossiele IBN gebaseerde goederen naar duurzamere alternatieven. Als een gevolg hiervan overwegen chemische industrieën die tegenwoordig op fossiele olie gebaseerde IBN

transformeren tot een veelzijdige reeks producten met toegevoegde waarde, meer hernieuwbare alternatieven.

Technologieën voor de productie van bio-isobuteen van hernieuwbare bronnen zijn reeds beschreven. Bijvoorbeeld, Global Bioenergies produceert isobuteen van suikers op Demo-Plant-schaal, gebruikmakende van een gemanipuleerde *Escherichia coli* bacterie. Het gebruik van carboxidotrofische bacteria, in staat om industrieel afvalgas te transformeren tot organische verbindingen, zou de productie van isobuteen uit syngas in plaats van suikers mogelijk maken, waardoor de positieve milieukundige impact van het proces wordt verhoogd en de kosten daarvan verlaagd. Syngas is een mengsel van hoofdzakelijk CO, CO₂ en H₂ (in verschillende verhoudingen) gevormd in industriële processen, bijv. bij het vervaardigen van staal, maar ook wanneer biomassa of vast gemeentelijk afval (*municipal solid waste*, MSW) in gas wordt omgezet. Afvalgasstromen die CO bevatten, worden thans verbrand om elektriciteit te genereren, bijv. in staalfabrieken om de energiebehoefte van de fabriek te dekken. Dit is zeer niet-duurzaam, omdat bij verbranding uitstoot van broeikasgassen in de atmosfeer plaatsvindt. Het omzetten van het syngas in IBN zou het mogelijk maken om dergelijke emissies in de atmosfeer te verminderen.

Syngip BV heeft een nieuw microbieel platform vastgesteld voor het omzetten van syngas in organische verbindingen. Deze snelgroeiende bacterie is thermofiel, hetgeen een belangrijk voordeel voor het proces zou kunnen zijn door de noodzaak van koeling te verminderen (vandaag de dag een belangrijk deel van OPEX in klassieke fermentatieprocessen). De overdracht van een IBN metabolisch pad in de microbe van Syngip vereist echter toepasselijke genetische hulpmiddelen voor de expressie van heterologe enzymen. Dit project, hoewel nog in een vroeg stadium, is aantrekkelijk: de productie van IBN uit syngas in een thermofiele bacterie zou uitermate voordeel gevend zijn uit economisch en milieukundig oogpunt.

Metabolische engineering van een nieuw microbieel platform is uitdagend. Het opschalen van het proces is dat echter ook, en staat op het gebied van de industriële biologie bekend als een moeilijke taak – in het geval van Syngip zelfs nog complexer door de specifieke aspecten van gasfermentatie. In de loop van dit project wenste Syngip haar technologie op te schalen in een 10-liter fermenter, specifiek gebouwd voor gasfermentatie bij BBEPP. In dit stadium is een van de doelen van de opschalingsactiviteit het verschaffen van data van een continue operatie, teneinde het ontwerp en de constructie van een grotere fermenter voor demonstratie-activiteiten op een grotere schaal voor te bereiden.

Twee eindgebruikers, Arcelor Mittal Belgium NV en Dow Benelux BV zouden bijdragen aan het project door grondstof (Arcelor) en testproducten (Dow) te leveren.

2.3 Doelstelling

De doelstelling is een aanzienlijke validatie voor opschalen (100x) uit te voeren voor de conversietechnologie van Syngip van syngas naar isobuteen bij eindgebruikers (technische evaluatie van de Syngip-technologie op pilot-schaal bij Bio Base Europe Pilot Plant). Eindgebruikers zijn ArcelorMittal (staalfabrikant) in samenwerking met BBEPP (Gent, België) en DOW Benelux BV.

2.4 Werkwijze

2.4.1 Analytische werkwijzen

Parameter	Analytische werkwijze
Optische dichtheid (OD)	Beckmann Coulter spectrofotometer (600 nm) Agilent Technologies Cary 60 spectrofotometer (600 nm) Verdunning indien nodig in het bereik 0,25-0,75
Suikers, zuren (g/L)	Agilent Technologies 1260 Infinity HPLC Kolom = metacarb 67H 300 x 6,5 mm Debiet = 0,8mL/min, mobiele fase = 2,5mM H ₂ SO ₄ Kolom T° = 35°C, detector = RID

2.4.2 Basismaterialen

Stam

De door Syngip ontwikkelde stam is een thermofiele carboxidotrofische microbe, die het beste groeit bij 55°C.

Mediumcomponenten

De mediumcomponenten werden geleverd door Syngip.

2.4.3 Apparatuur

De ATEX-bioreactor werd gebouwd en gebruikt door BBEPP voor gasfermentatie. Deze werd gebruikt in alle experimenten op 10L-schaal.



Figuur 1: ATEX-reactor

2.5 Resultaten

2.5.1 Resultaten van het project zelf: resultaten bij Syngip BV

Een werkwijze voor de bereiding van anaërobische culturen werd aangepast aan het werk zonder een anaërobische kamer. Protocol werd overgedragen naar BBEPP. Prestatietesten met oude cryoculturen werden uitgevoerd om de groeimogelijkheden te verifiëren van de bevroren cellen, bereid met en zonder cryoprotectant. Verschillende cryoprotectanten werden getest: dimethylformamide (DMF), polyethyleenglycol (PEG400), dimethylsulfoxide (DMSO) en glycerol (Figuur 2 en niet getoonde data). Hoewel de beste groei werd waargenomen zonder cryoprotectant, werd besloten een mastercelbank te bereiden met PEG400, aangezien op dit moment geen langetermijn stabiliteitstest beschikbaar was. Geteste cryoculturen met 20% PEG400 werden bereid en naar BBEPP verzonden.

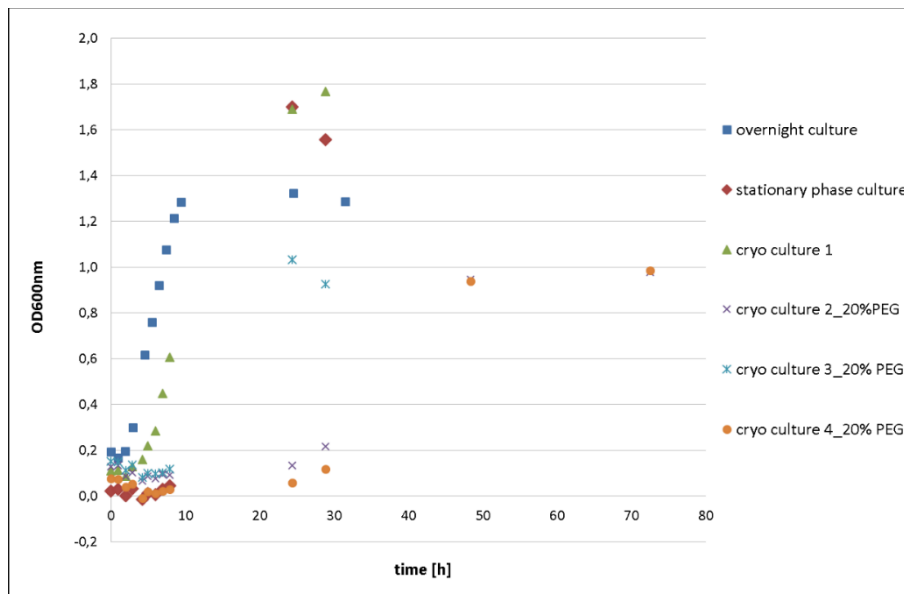


Fig. 2: Groei van nacht- en stationaire-faseculturen vergeleken met groei van verschillende cryoculturen.

Figuurvertalingen:

overnight culture	nachtcultuur
stationary phase culture	stationaire-fasecultuur
cyro culture	cyrocultuur
time	tijd

Teneinde groeiproblemen te beoordelen die bij BBEPP werden waargenomen (zie hieronder), onderzocht Syngip de invloed van verschillende parameters, inclusief pH, roeren (potentiële schuifspanning) en gasontwikkeling. Het bleek dat de vertragingfase werd verminderd en groeisnelheid verhoogd bij hogere pH, en dat groeisnelheid en biomassa-eindconcentratie beide werden verhoogd met CO-druk (niet getoond).

2.5.2 Resultaten van het project zelf: werk bij BBEPP

Groeitesten werden eerst uitgevoerd in kolven, teneinde technologieoverdracht te beoordelen. De eerste test (oktober 2016) werd uitgevoerd volgens een Syngip-protocol, maar groei bleek slecht en zeer variabel. Om technologieoverdracht te optimaliseren, werden de volgende experimenten, met deelname van een Syngip-werknemer, uitgevoerd en werden verschillende protocolaanpassingen gemaakt. Ten gevolge hiervan kon BBEPP de bij Syngip bereikte resultaten niet op laboratoriumschaal reproduceren. Op basis van deze resultaten werden fermentaties gepland. In vijf opeenvolgende runs konden in de 10L-bioreactor echter geen significante groeisnelheden worden gerealiseerd, ondanks verschillende aanpassingen en pogingen.

2.5.3 Mogelijkheden voor spin-off en vervolgactiviteiten

Op 2 februari 2017 werd Syngip overgenomen door Global Bioenergies SA, een in Parijs (Frankrijk) gebaseerde onderneming. De acquisitie resulteerde niet in enige belangrijke strategische wijzigingen in de activiteiten van Syngip, en de inspanningen van Syngip om een thermofiele, carboxidotrofische bacterie te ontwikkelen als een microbieel platform voor bioproductie zullen worden voortgezet en geïntensiveerd.

2.6 Bespreking

Ondanks een aanvankelijk succesvolle overdracht van technologie betreffende de cultivering van de microbe op kolschaal, konden pogingen tot opschalen in de 10L-bioreactor geen significante groeisnelheden opleveren. Productieproblemen werden als gevolg daarvan buiten het project gehouden, dat zich snel richtte op het opschalen van de culturomstandigheden. Verschillende pogingen werden ondernomen om de problemen vast te stellen en op te lossen. Resultaten konden worden verklaard door een variabiliteit van de kwaliteit van cryopreservatie, hoewel niet valt uit te sluiten dat andere, nog te definiëren parameters eveneens van invloed zijn.

2.7 Conclusies en aanbevelingen

De discrepanties die op laboratoriumschaal werden waargenomen (herleving van bevroren culturen) en de problemen die zich voordeden op 10L-fermenterschaal, hebben er de aandacht op gevestigd dat de cultivering van de in deze studie gebruikte thermofiele, carboxidotrofische micro-organisme in feite een gevoelige zaak is.

Syngip zet zich in voor het hervatten van opschalingsexperimenten. Sinds het einde van het project heeft Syngip haar werk op standaardprotocollen geïntensiveerd om deze meer robuust te maken, en heeft gewerkt aan het maken van een bevroren mastercelbank, gemonitord over een lange tijdsperiode (nu verschillende maanden). Syngip is thans bezig met de aanschaf van een bioreactor voor gasfermentatie op 100ml-schaal. Deze apparatuur zou een eerste stap in het opschalingsproces mogelijk moeten maken, ook in de test fed-batchomstandigheden. Wanneer Syngip de culturomstandigheden met deze nieuwe apparatuur heeft gestabiliseerd, zal de onderneming de samenwerking met BBEPP hervatten om het opschalen voort te zetten tot 10L-schaal, ten eerste gericht op groei. Productie wordt in een later stadium verwacht.

3 Uitvoering van het project

3.1 De problemen (technisch en organisatorisch) die zich tijdens het project voordeden en hoe deze werden opgelost

Het eerste probleem dat zich voordeed was de kennisoverdracht voor de cultivering in cultuurkolven van de microbe van Syngip op laboratoriumschaal. Tijdens de eerste experimenten kon BBEPP de resultaten van Syngip niet reproduceren. Intensievere interacties tussen Syngip en BBEPP resulteerden in een snelle overeenstemming van prestaties van verse culturen op laboratoriumschaal. Het tweede probleem dat zich voordeed was het opschalen van cultuurkolven naar de 10L ATEX-bioreactor. In dit geval werden door BBEPP verschillende pogingen gedaan. Verschillende parameters, vooral betreffende anaërobiciteit, zouden van invloed kunnen zijn (de microbe van Syngip is uitermate gevoelig voor zuurstof). Het grootste probleem zou echter de robuustheid van cryopreservatie kunnen zijn. In de tussentijd heeft Syngip een van studies gelanceerd om de robuustheid van zijn cryopreservatiewerkwijzen en de eigenschappen van cryoculturen in de loop van de tijd te beoordelen. De huidige resultaten lijken zeer bevredigend en nieuwe experimenten zouden met groter vertrouwen kunnen worden gelanceerd.

3.2 Verklaring van wijzigingen van het projectplan

Arcelor Mittal verschafte alle noodzakelijke informatie betreffende syngas, zoals verwacht. Gegeven de problemen die zich in een vroeg stadium bij het opschalen van microbecultivering voordeden, kon isobuteenproductie niet worden aangepakt op 10L-schaal. Bijgevolg kon Workpackage 2, bestaande uit de analyse van monsters bij de faciliteit van Dow, niet worden uitgevoerd. De problemen die verband houden met het opschalen van cultivering (zie boven) sloten enige poging tot productie uit. Tegelijkertijd werd de stand van de techniek betreffende het maken van isobuteen-producerende stammen opnieuw beoordeeld. In dit stadium kon een metabolisch pad van syngas naar isobuteen nog niet worden overgedragen in de stam. Syngip zal blijven werken aan de metabolische engineeringaspecten, samen met de opschalingsproblemen, en zou nu in termen van metabolische engineering voordeel moeten hebben van een krachtige input van Global Bioenergies.

3.3 Verklaring van de verschillen tussen het budget en de feitelijk gemaakte kosten

Er werden geen verschillen geconstateerd tussen het budget en de feitelijk gemaakte kosten. De meeste kosten bestonden uit uitbesteed onderzoek bij BBEPP dat stopte toen het toegewezen budget verbruikt was.

3.4 Verklaring ten aanzien van verspreiding van kennis

Bij deze stap was de verspreiding van kennis beperkt tot de overdracht van kennis aan BBEPP en de uitwisselingen met de twee eindgebruikers. Een bredere kennisverspreiding zal afhankelijk zijn van succes bij opschaling, eerst op groeiniveau en vervolgens op productieniveau.

3.5 Verklaring van PR-project en verdere gelegenheden voor PR

Syngip is een kleine onderneming met in dit stadium weinig aangrijpingspunten voor een ambitieus beleid op het gebied van public relations. Het werk dat thans bij Syngip wordt uitgevoerd zou nu echter profijt moeten hebben van ondersteuning van de Global Bioenergies-groep. Global

Bioenergies, een op Alternext genoteerde publieke vennootschap, heeft een sterk communicatie- en PR-beleid. Het bij Syngip uitgevoerde werk maakt deel uit van de strategie van Global Bioenergies om de lijst van mogelijke grondstoffen voor isobuteenproductie uit te breiden, inclusief eerste- en tweedegeneratie suikers en derde generatie grondstoffen zoals syngas. Deze stap wordt publiekelijk voorgestaan door Global Bioenergies op wetenschappelijke congressen en in bijeenkomsten van investeerders.