

19



Octrooi Centrum
Nederland

11 **1034123**

12 **C OCTROOI**²⁰

21 Aanvraagnummer: **1034123**

51 Int.Cl.:
C12N11/14 (2006.01) **C12N1/36** (2006.01)
C12N13/00 (2006.01) **C12M1/42** (2006.01)

22 Ingediend: **12.07.2007**

41 Ingeschreven:
13.01.2009

47 Verleend:
13.01.2009

45 Uitgegeven:
02.03.2009

73 Octrooihouder(s):
Stichting Wetsus Centre of Excellence for Sustainable Water Technology te Leeuwarden.

72 Uitvinder(s):
**René Alexander Rozendal te Hoorn.
Hubertus Victor Marie Hamelers te Heelsum.
Cees Jan Nico Buisman te Harich.
Adriaan Willem Jeremiasse te Leeuwarden.**

74 Gemachtigde:
Ir. A.A.G. Land c.s. te 2502 EN Den Haag.

54 **Werkwijze voor het verkrijgen van een kathodofiele, waterstof producerende microbiële cultuur, microbiële cultuur verkregen met deze werkwijze en gebruik van deze microbiële cultuur.**

57 De onderhavige uitvinding heeft volgens een eerste aspect betrekking op een werkwijze voor het verkrijgen van een kathodofiele, waterstof producerende microbiële cultuur. Volgens verdere aspecten heeft de uitvinding betrekking op de kathodofiele, waterstof producerende microbiële cultuur en het gebruik van deze microbiële cultuur voor de productie van waterstof. Verdere aspecten van de uitvinding hebben betrekking op een werkwijze voor het vervaardigen van een bifunctionele bioelektrode waarin de kathodofiele, waterstof producerende microbiële cultuur wordt toegepast en de bifunctionele bioelektrode die wordt verkregen met deze werkwijze. Overige aspecten van de uitvinding hebben betrekking op een inrichting voor de productie van waterstof waarin de elektrochemisch actieve, waterstof producerende microbiële cultuur wordt toegepast.

NL C 1034123

Dit octrooi is verleend ongeacht het bijgevoegde resultaat van het onderzoek naar de stand van de techniek en schriftelijke opinie. Het octrooischrift komt overeen met de oorspronkelijk ingediende stukken. Octrooi Centrum Nederland is een agentschap van het ministerie van Economische Zaken.

Werkwijze voor het verkrijgen van een kathodofiele, waterstof producerende microbiële cultuur, microbiële cultuur verkregen met deze werkwijze en gebruik van deze microbiële cultuur.

5 De onderhavige uitvinding heeft volgens een eerste aspect betrekking op een werkwijze voor het verkrijgen van een kathodofiele, waterstof producerende microbiële cultuur.

Volgens verdere aspecten heeft de uitvinding betrekking op de kathodofiele, waterstof producerende microbiële cultuur en het gebruik van deze microbiële cultuur
10 voor de productie van waterstof.

Verdere aspecten van de uitvinding hebben betrekking op een werkwijze voor het vervaardigen van een bifunctionele bioelektrode waarin de kathodofiele, waterstof producerende microbiële cultuur wordt toegepast en de bifunctionele bioelektrode die wordt verkregen met deze werkwijze.

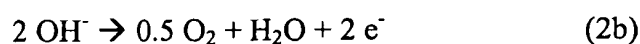
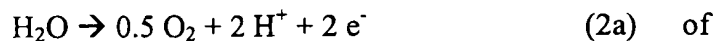
15 Overige aspecten van de uitvinding hebben betrekking op een inrichting voor de productie van waterstof waarin de elektrochemisch actieve, waterstof producerende microbiële cultuur wordt toegepast.

Waterstof producerende kathodes worden typisch gebruikt in water elektrolyse processen. Bij water elektrolyse wordt water onder invloed van een aangebracht
20 potentiaalverschil tussen anode en kathode gesplitst in waterstof en zuurstof volgens de reactie:

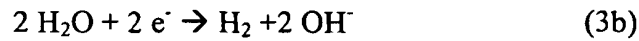


25 Bij water elektrolyse vinden de volgende elektrode reacties plaats:

Een zuurstof producerende oxidatie-reactie aan de anode:

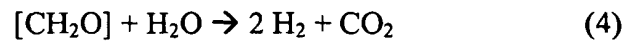


30 Een waterstof producerende reductie-reactie aan de kathode:



Recentelijk hebben waterstof producerende kathodes ook hun toepassing
 5 gevonden in een nieuw soort elektrolyse proces, te weten biogekatalyseerde elektrolyse
 van opgelost bio-oxideerbaar materiaal (bijv. in afvalwater). Bij biogekatalyseerde
 elektrolyse wordt bio-oxideerbaar materiaal onder invloed van een potentiaalverschil
 tussen anode en kathode gesplitst in koolstofdioxide en waterstof. Dit kan schematische
 worden weergegeven als:

10

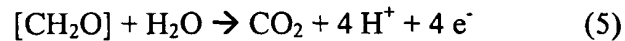


Dit proces is beschreven in de internationale octrooiaanvraag WO 2005/005981
 en in de publicatie "Principle and perspectives of hydrogen production through
 15 biocatalyzed electrolysis" (*International Journal of Hydrogen Energy* 2006, 31, 1632-
 1640) op naam van Rozendal., R.A. et al.

De term biogekatalyseerde elektrolyse is afgeleid uit het feit dat de oxidatie van
 bio-oxideerbaar materiaal aan de anode wordt gekatalyseerd door elektrochemisch
 actieve micro-organismen. De waterstof producerende reductie-reactie aan de kathode
 20 daarentegen wordt in zijn standaard uitvoering net zoals bij water elektrolyse chemisch
 gekatalyseerd (bijv. met platina). Bij biogekatalyseerde elektrolyse van opgelost bio-
 oxideerbaar materiaal (bijv. in afvalwater) vinden de volgende elektrode reacties plaats:

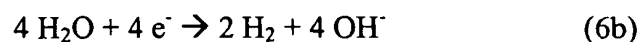
De oxidatie van bio-oxideerbaar materiaal aan de anode, schematische
 weergegeven door:

25



Een waterstof producerende reductie-reactie aan de kathode:

30



Omdat waterstof producerende elektrolyse processen plaatsvinden onder invloed van een potentiaalverschil tussen anode en kathode, wordt energie verbruikt. Deze energie kan worden ingebracht door een vermogensbron. In principe geldt dat hoe hoger het voor elektrolyse benodigde voltage, hoe hoger het verbruik van elektrische energie per hoeveelheid geproduceerde waterstof. Energieverliezen in het elektrolyse proces verhogen het benodigde voltage en daarmee dus de benodigde hoeveelheid elektrische energie per hoeveelheid geproduceerde waterstof. Ook bij de elektrode reacties kunnen dergelijke energieverliezen optreden. Energieverlies aan een kathode wordt ook wel kathode overpotential genoemd en wordt uitgedrukt in Volts (V).

Over het algemeen hebben overpotentialen de eigenschap dat ze toenemen (d.w.z. energieverlies wordt groter) bij een toenemende stroomdichtheid (d.w.z. toenemende reactiesnelheid). Dit is ook het geval voor kathode overpotentialen. De relatie tussen de kathode potentiaal en stroomdichtheid kan worden weergegeven in een zogenaamde E-j curve of polarisatiecurve, die de kathode potentiaal weergeeft als functie van de stroomdichtheid (j).

Een kathode is over het algemeen samengesteld uit twee elementen, te weten een ladingsverdeler van een elektrisch geleidend materiaal en een katalysator om de kathodereactie te versnellen. Koolstof is een veelgebruikte ladingsverdeler, aangezien het een lage kostprijs, een hoge elektrische geleiding en een hoge chemische resistentie heeft. Echter, met alleen een ladingsverdeler zonder katalysator is de elektrochemische productie van waterstof aan een kathode kinetisch gezien zeer langzaam. Hierdoor kunnen grote overpotentialen (d.w.z. grote energieverliezen) al ontstaan bij relatief lage stroomdichtheden. Als katalysator voor elektrochemische waterstof productie aan een kathode wordt vaak gebruik gemaakt van platina.

Voor water elektrolyse processen is platina inderdaad een zeer effectieve kathode katalysator, die de overpotential tot een minimum kan beperken bij zeer hoge stroomdichtheden (bijv. 0.025 V overpotential bij 1.08 A/cm^2 zoals beschreven in het boek *Electrochemical oxygen technology* geschreven door Kinoshita, K.; John Wiley & Sons, Inc.: New York, 1992).

Helaas blijkt platina om meerdere redenen een veel minder geschikte kathodekatalysator te zijn voor biogekatalyseerde elektrolyse. Ten eerste is platina een zeer duur materiaal. Daar komt bij dat de stroomdichtheden van biogekatalyseerde elektrolyse typisch 3 tot 5 ordes van grootte lager zijn dan die bij water elektrolyse (d.w.z. orde grootte $\sim 0.00001\text{-}0.001\text{ A/cm}^2$). Hierdoor is de hoeveelheid geproduceerd waterstof per hoeveelheid platina bij biogekatalyseerde elektrolyse veel lager dan bij water elektrolyse. Dit maakt de toepassing van platina bij biogekatalyseerde elektrolyse veel te duur om tot een commercieel interessant proces te kunnen komen.

Verder is gebleken dat platina bij biogekatalyseerde elektrolyse lang niet zo effectief werkt als bij water elektrolyse, zoals beschreven in de publicatie “Principle and perspectives of hydrogen production through biocatalyzed electrolysis” (*International Journal of Hydrogen Energy* 2006, 31, 1632-1640) op naam van Rozendal., R.A. et al. Bij een stroomdichtheid van slechts 0.00005 A/cm^2 was de kathode overpotentiaal al meer dan 0.28 V. De relatief milde condities die typische voorkomen bij biogekatalyseerde elektrolyse processen kunnen een mogelijke reden zijn voor deze lage effectiviteit van de platina katalyse bij biogekatalyseerde elektrolyse. Met relatief milde condities worden o.a. bedoeld, de lage temperatuur (bijv. kamertemperatuur), de lage druk (bijv. atmosferische druk), en de milde pH (bijv. pH 7).

De hoge kostprijs van platina in combinatie met de relatief lage stroomdichtheden bij biogekatalyseerde elektrolyse en de relatief lage effectiviteit van platina katalyse onder de typische condities van biogekatalyseerde elektrolyse processen maken het interessant om op zoek te gaan naar alternatieve manieren om elektrochemische productie van waterstof aan een kathode te katalyseren.

25 Stand van de techniek

Er is in het verleden reeds eerder aandacht besteed aan de problemen van het gebruik van platina als kathode katalysator in de context van (bio)brandstofcellen en elektrolyse cellen. In deze context is onder andere gekeken naar biologische katalysatoren. Onder (bio)brandstofcel wordt verstaan “een elektrochemisch ‘apparaat’ dat continu chemische energie omzet in elektrische energie (en enige warmte) zolang brandstof en oxidator worden toegevoerd” (Hoogers, G, “Fuel Cell Technology

Handbook”, CRC Press 2003). In een elektrolyse cel gebeurt het omgekeerde: elektrische energie wordt geïnvesteerd om gewenste chemische reacties te laten verlopen (Bard, A.J., Faulkner, L.R., “Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications”, Wiley 2001), oftewel elektrische energie wordt omgezet in chemische energie (en enige warmte). Voorbeelden van elektrolyse processen zijn water elektrolyse en biogekatalyseerde elektrolyse.

In de internationale octrooiaanvraag WO2004/015806 wordt een roestvrijstalen elektrode beschreven waarvan het oppervlak bedekt is met een biofilm (in WO2004/015806 gedefinieerd als “een film bestaande uit micro-organismen afkomstig van biologisch water zoals zeewater, rivierwater etc., die zich spontaan hebben afgezet op een oppervlak”), die bedoeld is om de reactie aan de elektrode van een brandstofcel te katalyseren. De biofilm wordt gevormd door de elektrode in een medium onder te dompelen dat de groei van biofilms bevordert en tegelijkertijd een polarisatiepotentiaal aan te brengen op de elektrode (waarde tussen -0.5 en 0.0 V t.o.v. een standaard kalomel elektrode). De met biofilm bedekte elektrode van een brandstofcel kan zowel een kathode als een anode zijn. In geval van een kathode katalyseert de biofilm zuurstofreductie. In geval van een anode katalyseert de biofilm een anodische brandstofcel reactie. Echter, de octrooiaanvraag richt zich niet op mogelijke biofilm toepassingen voor katalyse van elektrochemische waterstof productie aan een kathode in een elektrolyse cel, noch beschrijft deze aanvraag hoe een elektrochemisch actieve microbiële cultuur die geschikt is voor elektrochemische waterstof productie verkregen zou kunnen worden.

Het gebruik van een biofilm op een kathode wordt ook beschreven in de octrooiaanvraag JP11057782 en door Sakakibara & Kuroda (Biotechnology and Bioengineering, vol. 42, pag. 535-537, 1993). Echter, deze referenties beschrijven de abiotische productie van waterstof aan de kathode, dat vervolgens door de biofilm gebruikt wordt om nitraat te reduceren tot stikstof en water. In dit geval is dus geen sprake van een microbiële cultuur die de productie van waterstof aan de kathode katalyseert, maar van een biofilm die elektrochemisch gevormd waterstof consumeert.

Tatsumi et al. (Analytical Chemistry, vol. 71, pag. 1753-1759, 1999), Tsujimura et al. (Phys. Chem. Chem. Phys., vol. 3, pag. 1331-1335, 2001) Lojou et al. (Electroanalysis, vol.14, pag. 913-922, 2002) beschrijven het gebruik van elektroden met

geïmmobiliseerde *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (DvH) cellen voor de productie en/of oxidatie van waterstof. De cellen werden geïmmobiliseerd door een suspensie met betreffende cellen op te sluiten tussen een membraan en een elektrisch geleidend drager materiaal. Voor hun katalytische werking op de elektrode vereisen deze DvH cellen echter extern toegevoerde redox mediators.

Naast biofilm toepassingen zijn er ook systemen beschreven in de literatuur en in octrooiaanvragen waarbij geïsoleerde enzymen (en niet hele micro-organismen) als biokatalysator werden toegepast. Guiral-Brugna et al. (*Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 510, pag. 136-143, 2001) en Morozov et al. (*International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 27, pag. 1501-1505, 2002) beschrijven mediator-loze waterstofproductie aan elektroden gemaakt van koolstof materiaal met geïmmobiliseerde hydrogenases. Morozov et al. (*Russian Journal of Electrochemistry*, vol. 38, pag. 97-102, 2002) lieten bovendien zien dat van één van dergelijke elektroden, 50% van de oorspronkelijke activiteit was behouden na een conservering van een half jaar in buffer oplossing bij 4°C. In de octrooiaanvraag WO2004/114494 wordt een brandstofcel beschreven die gebruik maakt van geïmmobiliseerde hydrogenases aan de anode voor het katalyseren van waterstof oxidatie en geïmmobiliseerde oxidases aan de kathode voor het katalyseren van zuurstof reductie. De immobilisatie kan worden bewerkstelligd middels sorptie uit een waterige oplossing of middels chemische binding. In US 2006/0159981 wordt een biologische brandstofcel beschreven die bestaat uit een anode met een bevestigd anode enzym en een kathode met een bevestigd kathode enzym. Het enzym op de anode katalyseert de oxidatie van een niet nader omschreven reductor en het enzym op de kathode katalyseert de reductie van een niet nader omschreven oxidator.

Uit het voorgaande blijkt dat, in het geval dat geïsoleerde hydrogenases werden gebruikt als katalysator voor de elektrochemische waterstof productie aan een kathode er geen mediators nodig waren om een katalytisch effect te bewerkstelligen. Het gebruik van geïsoleerde hydrogenases heeft echter als nadeel dat deze geïsoleerde hydrogenases enkel na een bewerkelijke zuivering kunnen worden verkregen. Voorts missen geïsoleerde hydrogenases de vereiste stabiliteit voor langdurige toepassing en hebben ze geen zelf-regenererend vermogen. Wanneer hele micro-organismen als katalysator voor de elektrochemische waterstof productie aan een kathode werden gebruikt waren tot nu

toe altijd extern toegevoegde mediators (bijvoorbeeld methyl viologen of cytochroom c_3) nodig om een katalytisch effect te bewerkstelligen. Het gebruik van mediators heeft als nadeel dat dit kostbare verbindingen zijn met in een aantal gevallen een hoge toxiciteit.

5

Omschrijving van de uitvinding

De onderhavige uitvinding beoogt een alternatief te bieden voor de kathodesystemen voor de elektrochemische waterstof productie die tot dusver beschreven zijn. De vinding verschaft hiervoor volgens een eerste aspect een werkwijze voor het verkrijgen van een kathodofiele, waterstof producerende microbiële cultuur. De werkwijze omvat de stappen van:

10

- (i) het verschaffen van een bioelektrode omvattende een elektrochemisch actieve microbiële cultuur op een elektrische geleider, welke microbiële cultuur in staat is tot waterstof oxidatie;
- (ii) het plaatsen van de bioelektrode in een medium, het voedingsmedium dat geschikt is om de fysiologie van de microbiële cultuur te ondersteunen;
- (iii) het op de bioelektrode aanbrengen van een potentiaal die lager is dan de evenwichtpotentiaal van het H^+/H_2 redoxkoppel in het voedingsmedium;

15

De bioelektrode welke in de werkwijze wordt verschaft omvat een elektrochemisch actieve microbiële cultuur op een elektrische geleider. Deze microbiële cultuur is in staat is tot waterstof oxidatie. Met de term elektrochemisch actieve microbiële cultuur wordt in het kader van de onderhavige uitvinding bedoeld een cultuur van micro-organismen die een elektrode direct, dat wil zeggen zonder gebruik van extern toegevoerde redox mediators, kunnen gebruiken als elektronendonor (kathodofiele organismen) dan wel als elektronenacceptor (anodofiele organismen). Het bestaan van dergelijke anodofiele organismen is bekend in het vakgebied uit onder andere "Principle and perspectives of hydrogen production through biocatalyzed electrolysis" (*International Journal of Hydrogen Energy* 2006, 31, 1632-1640) op naam van Rozendal., R.A. et al. en in "Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes" *Applied and Environmental Microbiology* 2003, 69, 1548-1555 op naam van Bond, D. R. en Lovley, D. R.).

20
25
30

De microbiële cultuur is aanwezig op een elektrische geleider, dat wil zeggen een materiaal dat een elektrische stroom kan geleiden. Als elektrische geleider is koolstof, bijvoorbeeld in de vorm van koolstofvilt of koolstofpapier of grafietvilt of grafietpapier bijzonder geschikt. De deskundige kan echter geschikte andere materialen selecteren.

5 Naar een elektrische geleider wordt in deze beschrijving en de conclusies tevens verwezen met de term ladingsverdeler.

De elektrochemisch actieve microbiële cultuur die aanwezig is op de bioelektrode is in staat tot waterstof oxidatie. Waterstof oxidatie is een proces waarbij H_2 wordt omgezet naar protonen en elektronen volgens de omgekeerde reactie van bovenstaande reactievergelijking (3a en/of 3b). De deskundige zal begrijpen dat de reacties volgens reactievergelijking 3a en 3b overeenkomstige reacties zijn, en dat reactie 3a wordt verkregen door links en rechts 2 OH^- weg te strepen uit reactie 3b. De organismen van een elektrochemisch actieve microbiële cultuur die in staat is tot waterstof oxidatie zijn hierbij in staat om de gevormde elektronen direct, dat wil zeggen zonder een extern

10 toegevoerde redox mediator, af te geven aan een anode als elektronen acceptor.

In de werkwijze volgens de uitvinding wordt de bioelektrode geplaatst in een medium, het voedingsmedium, dat geschikt is om de fysiologie van tenminste een deel van de organismen in de microbiële cultuur te ondersteunen. Ondersteuning van de fysiologie wil hierbij zeggen dat de organismen metaboolactief kunnen zijn. In het kader van de huidige uitvinding is met name metabole activiteit van de organismen in de microbiële cultuur met betrekking tot waterstof vorming via bijvoorbeeld één of meer van de bovenstaande reacties 3a en 3b van belang. Media die geschikt zijn als voedingsmedium zijn bekend voor de deskundige. Een dergelijk geschikt medium is bijvoorbeeld Postgate's medium. Andere geschikte media staan beschreven in

20 voorbeelden 1 en 2.

Voor waterstofproductie is het verder van belang dat het voedingsmedium een lage zuurstof spanning heeft. Het medium is derhalve bij voorkeur microaerofiel, en met meer voorkeur in hoofdzaak anaeroob.

Over het algemeen is een waterige oplossing van sporenelementen die verder een koolstof bron, bijvoorkeur kooldioxide, omvat met een pH van 2-10, zoals pH 3-9, bij voorkeur pH 5-7 geschikt.

30

Om groei van methanogene organismen, die watersof consumeren, te beperken heeft het de voorkeur om een lage pH van beneden pH 5,0, zoals beneden pH 4,0, te gebruiken. Bekend is dat methanoge organismen worden geremd door een dergelijke lage pH waarde. Daarnaast kan groei van methanogene bacteriën worden geremd door de concentratie kooldioxide te minimaliseren nadat de microbiele cultuur voldoende is gegroeid. Een P_{CO_2} van beneden 0,0003 atmosfeer, zoals beneden 0,0002 of beneden 0,0001 atmosfeer kan hiervoor worden gebruikt.

In de werkwijze volgens de uitvinding wordt een potentiaal aangebracht op de bioelektrode die lager is dan de evenwichtspotentiaal in het voedingsmedium van het H^+/H_2 redoxkoppel. De evenwichtspotentiaal van het H^+/H_2 redoxkoppel in het voedingsmedium kan door de vakman bepaald worden op theoretische basis (op basis van kennis van de samenstelling van het voedingsmedium en de overige reactiecondities). Verder kan de evenwichtspotentiaal in een aantal gevallen bepaald worden door het bepalen van het open-circuit voltage van een cel. Het aanbrengen van de potentiaal kan met behulp van een potentiostaat of een andere geschikte elektrische vermogensbron.

Voor elektrochemisch actieve micro-organismen die aangepast zijn aan waterstof oxidatie, waarbij elektronen worden afgegeven aan de als anode functionerende ladingsverdeler van de elektrode betekent de overschakeling naar een potentiaal die lager is dan de evenwichtspotentiaal van het H^+/H_2 redox koppel in het voedingsmedium een omkering van hun elektro-chemische reactie. Doordat deze potentiaal onder de evenwichtspotentiaal van het H^+/H_2 koppel ligt zullen de cellen gedwongen zijn om de reactie in de richting van proton reductie te katalyseren. Aldus zullen ze op elektro-actieve wijze waterstof produceren.

De in stap (iii) van de werkwijze aangebrachte potentiaal is bijvoorbeeld tenminste 5, 10, 15, 20, 25, 40, 50, 60 mV lager dan de evenwichtspotentiaal van het H^+/H_2 redox koppel in het voedingsmedium, zoals meer dan 70, 80, 90, 100, 120, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 of meer dan 1000 mV lager dan de evenwichtspotentiaal van het H^+/H_2 redox koppel in het voedingsmedium.

Hierbij zijn voor bepaalde toepassingen geringe verschillen van de opgelegde potentiaal ten opzichte van de evenwichtspotentiaal van het H^+/H_2 redox koppel

voordelig, daar hiermee organismen worden geselecteerd die met een geringe energie investering H_2 kunnen produceren.

De opgelegde potentiaal kan worden aangebracht met behulp van een vermogensbron. Als vermogensbron is bijvoorbeeld een potentiostaat **bijzonder** geschikt.
5 Een dergelijke potentiostaat kan gekoppeld worden aan een referentie elektrode, bijvoorbeeld een standaard waterstofelektrode, een kalomelektrode of een Ag/AgCl elektrode, om de potentiaal van de bioelektrode nauwkeurig te regelen ten opzichte van de evenwichtspotentiaal van het H^+/H_2 koppel in het voedingsmedium. Het gebruik van een potentiostaat is echter niet noodzakelijk en elke andere elektrische vermogensbron,
10 waarvan de deskundige begrijpt dat deze geschikt is om een potentiaal aan te brengen op de bioelektrode kan worden gebruikt.

Op alternatieve wijze kan de potentiaal geregeld worden onder de evenwichtspotentiaal van het H^+/H_2 redoxkoppel, door deze evenwichtspotentiaal van het H^+/H_2 redoxkoppel te verschuiven, zoals te verlagen, bijvoorbeeld door het verlagen van
15 de pH van het voedingsmedium en/of het verlagen van de waterstof spanning of door andere veranderingen in de reactie condities zoals de temperatuur, zoals bekend is voor de deskundige. De evenwichtspotentiaal van het H^+/H_2 koppel is bijvoorbeeld 0,0 V bij pH 0,0 onder standaard condities ($T= 25\text{ }^\circ\text{C}$ en $P_{H_2} = 1\text{ atm}$) Bij pH 7,0 is deze evenwichtspotentiaal onder dezelfde standaard condities $-0,42\text{ V}$. Hieruit is een
20 potentiaal stijging van $\pm 60\text{ mV}$ per pH eenheid af te leiden. Een pH verlaging van het voedingsmedium kan aldus ook gebruikt worden om een aanwezige potentiaal op een kathode een waarde te laten krijgen, die onder de evenwichtspotentiaal van het H^+/H_2 redoxkoppel in het voedingsmedium ligt.

Volgens een voorkeursuitvoeringsvorm van de werkwijze wordt de bioelektrode
25 verkregen door een bioanode, omvattende een elektrochemisch actieve microbiële cultuur op een ladingsverdeler, welke microbiële cultuur in staat is tot oxidatie van een biologisch oxideerbare koolstofverbinding te plaatsen in een voedingsmedium, dat in staat is de fysiologie van tenminste een deel van de microbiële cultuur te ondersteunen, bij een potentiaal die hoger is dan de evenwichtspotentiaal van het H^+/H_2 redox koppel in
30 het voedingsmedium. Dit geschiedt onder condities van limitatie van de biologisch oxideerbare koolstofverbinding in de aanwezigheid van waterstof. De aangebrachte

potentiaal kan bijvoorbeeld tot 1000 mV, tot 800 mV, zoals tot 500 mV hoger zijn dan de evenwichtspotentiaal van het H^+/H_2 redox koppel in het voedingsmedium. Bij voorkeur is de aangebrachte potentiaal tot 200 mV hoger, zoals tot 150 mV, 100 mV, of 50 mV hoger.

- 5 Geschikte biologisch oxideerbare koolstof verbindingen kunnen door de deskundige worden geselecteerd. Voorbeelden van geschikte biologisch oxideerbare koolstof verbindingen zijn bijvoorbeeld kortketenige (C_1 - C_6) organische zuren, zoals melkzuur, azijnzuur en gedissocieerde vormen hiervan, kortketenige (C_1 - C_6) alcoholen, zoals ethanol en propanol of koolhydraten zoals glucose, fructose, lactose of sacharose.
- 10 Door deze stap wordt op de bioanode een elektrochemisch actieve microbiële cultuur geselecteerd die in staat is tot waterstof oxidatie bijvoorbeeld via een reactie die omgekeerd verloopt aan de reactie weergegeven in bovenstaande reactievergelijking 3a of 3b. De uitvinders van de huidige uitvinding hebben gevonden dat een dergelijke elektrochemisch actieve microbiële cultuur, die in staat is tot waterstof oxidatie,
- 15 elektrochemisch waterstof kunnen produceren bij een potentiaal lager dan de evenwichtspotentiaal van het H^+/H_2 redox koppel in het voedingsmedium waarin zij zich bevinden.

 Volgens een verdere voorkeursuitvoeringsvorm van de werkwijze is een biologisch niet-oxideerbare koolstofbron, zoals een kooldioxide bron aanwezig onder

20 condities van limitatie van de biologisch oxideerbare koolstofverbinding . De aanwezigheid van een koolstofbron maakt microbiële groei mogelijk. Een kooldioxide bron is bijvoorbeeld kooldioxide of een oplossing die H_2CO_3 en/of HCO_3^- en/of CO_3^{2-} bevat.

 Een verdere voorkeursuitvoeringsvorm omvat het overenten van de kathodofiele,

25 waterstof producerende microbiële cultuur op een ladingsverdeler. Door het overenten van de kathodofiele, waterstof producerende microbiële cultuur kan deze cultuur op eenvoudige wijze verveelvoudigd worden en/of kan een veelvoud elektrodes met de kathodofiele microbiële cultuur worden verkregen. Het overenten kan geschieden op elke geschikte wijze die voor de deskundige bekend is voor het overenten van micro-

30 organismen.

Een verder aspect van de uitvinding heeft betrekking op een kathodofiele, waterstof producerende microbiële cultuur. Een dergelijke microbiële cultuur die zonder gebruik van externe redox mediators in staat is om op elektro-chemische wijze waterstof te produceren is niet eerder beschreven. De microbiële cultuur bevat micro-organismen die in staat zijn om waterstof te produceren door middel van protonreductie en/of waterreductie, zoals beschreven in bijvoorbeeld reactievergelijkingen 3a en 3b. De microbiële cultuur kan een monocultuur zijn of een gemengde cultuur. Volgens een voorkeursuitvoeringsvorm is de microbiële cultuur verkrijgbaar met de werkwijze volgens de uitvinding voor het verkrijgen van de genoemde microbiële cultuur.

Verdere aspecten van de uitvinding hebben betrekking op het gebruik van een microbiële cultuur volgens de uitvinding voor de productie van waterstof. Zoals boven beschreven is de microbiële cultuur geschikt voor de productie van waterstof.

Weer verdere aspecten van de onderhavige uitvinding hebben betrekking op een werkwijze voor het vervaardigen van een bioelektrode welke bijvoorbeeld geschikt is als biokathode, bijvoorbeeld voor gebruik in biogekatalyseerde elektrolyse van water. De werkwijze omvat het verschaffen van een lichaam van een elektrisch geleidend materiaal en het aanbrengen van een kathodofiele, waterstof producerende microbiële cultuur op het oppervlak van het elektrisch geleidend materiaal.

Volgens een voorkeursuitvoeringsvorm is dit een werkwijze waarbij:

- (i) het verschafte lichaam van het elektrisch geleidend materiaal twee gescheiden oppervlakken omvat;
- (ii) op een eerste oppervlak, het kathode-oppervlak, de kathodofiele, waterstof producerende microbiële cultuur wordt aangebracht;
- (iii) op een tweede oppervlak, het anode-oppervlak, een katalysator voor een elektrochemische oxidatiereactie wordt aangebracht.

Aldus wordt in deze werkwijze gebruik gemaakt van de kathodofiele, waterstof producerende microbiële cultuur volgens de uitvinding.

In de werkwijze wordt een lichaam van een elektrisch geleidend materiaal of wel een ladingsverdeler verschaft. In het kader van deze uitvinding wordt met de term ladingsverdeler bedoeld een materiaal dat elektrische lading kan geleiden. Geschikte

ladingsverdelers zijn bijvoorbeeld koolstof, bijvoorbeeld koolstofpapier, een koolstofplaat, grafietpapier, een grafietplaat of een elektrisch geleidend metaal zoals koper of titaan.

In de werkwijze wordt het op het oppervlak van het lichaam van de elektrische geleider een kathodofiele, waterstof producerende microbiële cultuur volgende de
5 uitvinding aangebracht. Het aanbrengen kan op elke wijze waarvan de deskundige begrijpt dat deze geschikt is voor het aanbrengen van een microbiële cultuur.

Het lichaam omvat volgens een voorkeursuitvoeringsvorm twee gescheiden oppervlakken. Hiermee wordt bedoeld dat de twee oppervlakken gescheiden moeten kunnen worden van elkaar dusdanig dat één oppervlak dienst kan doen als kathode en het
10 ander dienst kan doen als anode. Dit kan bij voorbeeld door het lichaam te selecteren als een in hoofdzaak twee dimensionaal lichaam zoals een plaatvormig lichaam, bij voorkeur een vlakke plaat.

In deze voorkeursuitvoeringsvorm wordt op het eerste oppervlak, het kathode oppervlak een kathodofiele, waterstof producerende microbiële cultuur volgende de
15 uitvinding aangebracht. Op een tweede oppervlak, het anode oppervlak, wordt een katalysator voor een elektrochemische oxidatie reactie, bijvoorbeeld een anaërobe oxidatie reactie, aangebracht. De katalysator kan elke geschikte katalysator zijn en het aanbrengen kan op elke wijze waarvan de deskundige begrijpt dat deze geschikt is voor het aanbrengen van het gebruikte type katalysator. De katalysator kan bijvoorbeeld
20 worden geselecteerd uit de groep van platina en/of een elektrochemisch actieve microbiële cultuur die in staat is tot elektrochemische oxidatie, bijvoorbeeld een anaërobe oxidatie, van een biologisch oxideerbaar substraat, zoals een biologisch oxideerbare koolstofverbinding. Laatst genoemde microbiële cultuur kan organismen omvatten uit de groep van *Geobacter sulfurreducens*, *Shewanella putrefaciens*, *Geobacter metallireducens*
25 en *Rhodospirillum rubrum* of andere organismen uit de genera waartoe deze genoemde species behoren of een consortium van deze organismen.

De bifunctionele bioelektrode die wordt verkregen met de bovenbeschreven voorkeursuitvoeringsvorm van de werkwijze omvat een lichaam van een ladingsverdeler, welk lichaam twee gescheiden oppervlakken omvat, met op het eerste oppervlak, het
30 kathode oppervlak, een kathodofiele, waterstof producerende microbiële cultuur en op het

tweede oppervlak, het anode oppervlak, een katalysator voor een elektrochemische oxidatie reactie.

De onderhavige uitvinding heeft tevens betrekking op de bioelektrode, in het bijzonder een bifunctionele bioelektrode, die wordt verkregen met deze werkwijze. De kenmerken van deze bioelektrode en de bifunctionele bioelektrode alsmede die van de in de conclusies genoemde voorkeursuitvoeringsvormen zullen voor de vakman duidelijk zijn uit de beschrijving betreffende de werkwijze voor de vervaardiging van deze bifunctionele bioelektrode.

Volgens een verder aspect heeft de uitvinding betrekking op een inrichting. Deze inrichting is geschikt voor gebruik als elektrolyse inrichting. De inrichting omvat een aantal compartimenten, met in elk der compartimenten een op afstand van elkaar geplaatste anode en een kathode. Op de anode is er een katalysator voor de elektrochemische oxidatie van een oxideerbaar substraat en op de kathode een kathodofiele, waterstof producerende microbiële cultuur. Verder is er tussen de anode en kathode een iongeleidende scheiding aanwezig is, die het aantal compartimenten deelt in een kathodedeelcompartiment aan de zijde van de kathode en een anodedeelcompartiment aan de zijde van de anode. In de kathode deelcompartimenten is een voedingsmedium aanwezig, dat geschikt is voor het ondersteunen van de fysiologie van de kathodofiele, waterstof producerende microbiële cultuur. De inrichting omvat verder middelen voor het toevoeren aan de anodedeelcompartimenten van een substraatmedium omvattende het oxideerbaar substraat en middelen voor het afvoeren van waterstof uit de kathodedeelcompartimenten. Voorts is er een elektrische verbinding tussen een aantal anodes en een aantal kathodes.

De iongeleidende scheiding kan een kation of anion geleidend materiaal zijn, zoals een kation selectief membraan, een anion selectief membraan of een bipolaire membraan. Ook (micro)poreuze membranen zoals microfiltratie, ultrafiltratie of nanofiltratie membranen zijn geschikt. Dergelijke materialen zijn bekend voor de deskundige.

Een inrichting voor elektrolyse van het bovengenoemde type is op zich bekend in het vakgebied. De elektrolyse inrichting volgens de uitvinding onderscheidt zich echter van die welke bekend zijn in de stand der techniek door de aanwezigheid van een

kathodofiele, waterstof producerende microbiële cultuur op de kathode. In het kader van deze beschrijving betekent de term een aantal één of meer.

Volgens een voorkeursuitvoeringsvorm van de elektrolyse inrichting is het aantal compartimenten een veelvoud compartimenten. Het veelvoud compartimenten is
5 onderverdeeld in een eerste en een tweede eindstandig compartiment en een aantal daar tussen gelegen tussencompartimenten. Hierbij is het aantal anodes en kathodes alternerend aanwezig in de inrichting. Verder is in deze uitvoeringsvorm de elektrische verbinding tussen het aantal anodes en het aantal kathodes ingericht als een elektrische verbinding tussen de anode en kathode van aangrenzende tussencompartimenten, een
10 elektrische verbinding tussen de kathode van het eerste eindstandigcompartiment en de anode van het aan het eerste eindstandigcompartiment grenzende tussencompartiment, een elektrisch verbinding tussen de anode van het tweede eindstandigcompartiment en de kathode van het aan het tweede eindstandigcompartiment grenzende tussencompartiment en een elektrisch verbinding tussen de anode en kathode van de eindstandige
15 compartimenten. Deze elektrische verbindingen zijn dusdanig, dat elke anode elektrisch verbonden is met één kathode.

De elektrolyse inrichting volgens deze uitvoeringsvorm kan worden vorm geven als een stack van elektrolyse cellen.

De elektrische verbinding tussen een aantal anodes en kathodes omvat volgens
20 een verdere voorkeursuitvoeringsvorm een vermogensbron voor het instellen van de potentiaal van de kathode. Indien een vermogensbron aanwezig is zal deze voor een stack opgenomen zijn in de elektrisch verbinding tussen de anode en kathode van de eindstandige compartimenten.

Volgens een andere voorkeursuitvoeringsvormen van de elektrolyse inrichting
25 omvat de katalysator voor de elektrochemische oxidatie van een oxideerbaar substraat op de anodes een katalysator uit de groep omvattende platina en/of een micro-organisme geselecteerd uit de groep van *Geobacter sulfurreducens*, *Shewanella putrefaciens*, *Geobacter metallireducens* en *Rhodospirillum rubrum* andere organismen uit de genoemde genera of een consortium van een of meer organismen hieruit. Van deze
30 organismen is bekend dat ze anodofiel kunnen werken.

Volgens een verdere voorkeursuitvoeringsvormen van de elektrolyse inrichting zijn de anodes en kathodes van de tussencompartimenten ingericht als bifunctionele elektrodes volgens de uitvinding. Door de lage interne weerstand van de bifunctionele elektrode is de interne weerstand van de elektrolyse richting tevens verlaagd ten opzichte van een elektrolyse inrichting uit de stand der techniek met een vergelijkbaar elektrode oppervlak.

Volgens een verder aspect heeft de uitvinding betrekking op een werkwijze voor het produceren van waterstof. De werkwijze omvat:

- (i) het verschaffen van een inrichting voor elektrolyse volgens de uitvinding;
- 10 (ii) het aan de anodedeelcompartimenten toevoeren van een substraatmedium omvattende een oxideerbaar substraat;
- (iii) het aanbrengen van een potentiaal op het aantal kathodes welke potentiaal ligt onder de evenwichtspotentiaal van het H^+/H_2 redoxkoppel in het voedingsmedium;
- 15 (iv) het afvoeren van het waterstof geproduceerd aan de kathode.

Het aan de anodedeelcompartimenten toevoeren van het substraat medium kan op elke geschikte wijze zoals (continue) verpompung. Het oxideerbaar substraat kan elk geschikt substraat zijn zoals bekend voor de deskundige. Het substraatmedium kan bijvoorbeeld een afvalwaterstroom zijn met een hooggehalte aan organische verbindingen.

Het aanbrengen van de potentiaal op het aantal kathodes welke potentiaal ligt onder de evenwichtspotentiaal van het H^+/H_2 redoxkoppel kan met behulp van een eventuele vermogensbron waarmee een anode en kathode zijn verbonden in de elektrolyse inrichting volgens de uitvinding. Op alternatieve wijze kan zoals boven beschreven de potentiaal geregeld worden onder de evenwichtspotentiaal van het H^+/H_2 redoxkoppel, door deze evenwichtspotentiaal van het H^+/H_2 redoxkoppel te verschuiven, zoals te verlagen, bijvoorbeeld door het verlagen van de pH van het voedingsmedium en/of het verlagen van de waterstof spanning.

De op de kathode opgelegde potentiaal is bij voorkeur dusdanig, dat een gewenste hoeveelheid H_2 wordt geproduceerd per tijdseenheid. Deze gewenste hoeveelheid H_2 kan vooraf worden vastgesteld. Een ander mogelijk criterium voor de productie van H_2 is de

geïnvesteerde energie in de vorm van de opgelegde potentiaal. Een hogere energie investering kan de kostprijs van het geproduceerd H₂ doen stijgen. De deskundige zal in staat zijn om de opgelegde potentiaal te optimaliseren met betrekking tot kostprijs van de waterstof.

- 5 Het waterstof, dat aan de kathode deelcompartimenten wordt geproduceerd kan op elke geschikte wijze worden afgevoerd voor direct gebruik en/of opslag.

Figuurbeschrijving

10 De uitvinding wordt nu nader toegelicht aan de hand van de navolgende voorbeelden en de bijgesloten figuren, die niet-limiterende uitvoeringsvoorbeelden geven van de uitvinding.

Figuur 1A-1C toont een overzicht van een uitvoeringsvorm van de werkwijze voor het verkrijgen van de kathodofiele, waterstof producerende microbiële cultuur;

15 Figuur 2 toont een uitvoeringsvorm van een elektrolyse inrichting volgens de uitvinding;

Figuur 3 toont een detail van de biokathode van de elektrolyse inrichting van figuur 2;

Figuur 4 toont een doorsnede door een bifunctionele elektrode volgens de uitvinding;

20 Figuur 5 toont een detail van de doorsnede door de bifunctionele elektrode van figuur 4;

Figuur 6 toont een andere uitvoeringsvorm van een elektrolyse inrichting volgens de uitvinding, die gebruik maakt van de bifunctionele elektrode;

25 Figuur 7 toont een polarisatiecurve van de stroomdichtheid als functie van de kathodepotentiaal, zoals verkregen met behulp van de kathodofiele, waterstof producerende microbiële cultuur en twee referentie experimenten;

Figuur 8 toont het volume waterstof als functie van de tijd voor een proef, waarin de kathodofiele microbiële cultuur is gebruikt, en een referentie experiment;

30 In de werkwijze volgens de uitvinding wordt in een uitvoeringsvorm gebruik gemaakt van een elektrochemische cel 1 zoals wordt weergegeven in figuur 1A, 1B, 1C. Een dergelijke cel bestaat bijvoorbeeld uit twee compartimenten 2, 3 gescheiden door een

iongeleidende scheiding 4 (bijvoorbeeld Nafion® 117). Een compartiment 3 bevat een koolstofstaaf elektrode 5. Deze elektrode dient als de bio-elektrode (werk elektrode) en is verbonden met een als vermogensbron functionerende potentiostaat 6. Het andere compartiment 2 bevat een met de vermogensbron verbonden platina elektrode 7 die dient als tegen elektrode. In het bio-elektrode compartiment kan tevens een referentie elektrode worden geplaatst (niet weergegeven in figuur 1A, 1B, 1C). Beide compartimenten 2, 3 worden gevuld met een geschikt medium (bijvoorbeeld een medium bestaande uit 0.74 g/L KCl, 1.36 g/L KH₂PO₄, 0.28 g/L NH₄Cl, 0.84 g/L NaHCO₃⁻, 0.1 g/L CaCl₂·2H₂O, 1 g/L MgSO₄·7H₂O and 1 mL/L sporen elementen).

Het bio-elektrode compartiment 3 van de elektrochemische cel 1 wordt geënt met elektrochemisch actieve micro-organismen afkomstig uit het anode compartiment van een biogekatalyseerde elektrolyse cel. Vervolgens wordt deze cultuur in de weergegeven uitvoeringsvorm gevoed met acetaat en waterstof en gecontroleerd bij een potentiaal van +0.1 V (vs. standaard waterstof elektrode; NHE) en pH 7. Elektrochemisch actieve micro-organismen vormen onder deze condities een biofilm 8 op de bio-elektrode en leveren een anodische stroom. Vervolgens wordt de pH verlaagd naar bijvoorbeeld pH 6 en de potentiaal naar -0.1 V (vs. NHE) en na aanpassing van de biofilm 8 bij deze condities wordt de bio-elektrode gevoed met waterstof en medium waarin enkel bicarbonaat als koolstofbron is opgelost om waterstof oxiderende micro-organismen 8a te selecteren (Figuur 1B). Nadat onder deze condities een constante stroom wordt gegenereerd, wordt de potentiaal van de bio-elektrode verlaagd naar -0.65 V (vs. NHE, bij pH 6) zodat de anodische stroom verandert in een kathodische stroom (Figuur 1C). De biofilm 8a zal na deze potentiaalverlaging waterstof produceren. Aldus is een kathodofiele, waterstof producerende microbiële cultuur 8a verkregen.

Figuur 2 toont een overzicht van een biogekatalyseerde elektrolyse inrichting. De biogekatalyseerde elektrolyse cel bevat vergelijkbare onderdelen als de elektrochemische cel van figuur 1C, te weten twee compartimenten 2, 3, gescheiden door een iongeleidende scheiding 4. Beide compartimenten 2, 3 bevatten in dit geval een bioelektrode. De bioelektrode 5 in compartiment 3 bevat een kathodofiele waterstof producerende microbiële cultuur 8a volgens de uitvinding. De bioelektrode 7 in compartiment 2 (de anode) bevat een anodofiele microbiële cultuur 10, welke in staat is een biologisch

oxideerbare koolstofverbinding om te zetten in CO_2 , H^+ en elektronen. De aan de anode 7 geproduceerde elektronen worden via een elektrisch circuit geleid naar de kathode 5. Hier worden de elektronen door de kathodofiele microbiële cultuur 8 gebruikt om protonen te reduceren tot H_2 . In het elektrisch circuit is een vermogensbron 6 opgenomen voor het

5 leveren van de benodigde energie. De protonen worden gevormd in het anodecompartiment 2, en stromen via de iongeleidende scheiding 4 (bijvoorbeeld een Nafion membraan) naar het kathodecompartiment 3. De biologisch oxideerbare koolstofverbinding OM is afkomstig van afvalwater, dat via een inlaat 11 het anodecompartiment 2

10 intreedt. Het verwerkte afvalwater verlaat via uitlaat 12 als effluent het anodecompartiment. CO_2 en H_2 verlaten respectievelijk het anodecompartiment en kathodecompartiment via de uitlaten 13 en 14. Het geproduceerde waterstof kan verder worden afgevoerd voor opslag en/of gebruik.

Figuur 3 toont een schematisch overzicht van de protonreductie reactie, die wordt gekatalyseerd door de kathodofiele, waterstof producerende microbiële cultuur in de

15 biofilm 8a op de kathode 5. Het schematisch overzicht beoogt niet een stoichiometrische weergave van de reactie te presenteren.

Figuur 4 toont een bifunctionele elektrode 15 volgens de uitvinding. De bifunctionele elektrode 15 omvat een elektrische geleider 16, hier een koolstofplaat. Op de koolstofplaat 16 is op één oppervlak een film van een kathodofiele microbiële cultuur

20 8a aangebracht. Op het andere oppervlak van de koolstofplaat 16 is een katalysator voor een oxidatiereactie aangebracht. In dit geval een biofilm van een anodofiele microbiële cultuur.

Figuur 5 geeft schematisch de reacties weer, die plaatsvinden aan beide zijden van de bifunctionele elektrode 15. Dit schematisch overzicht beoogt wederom niet een

25 stoichiometrische weergave van de reacties weer te geven. Zichtbaar is dat aan de anodezijde een biologisch oxideerbare koolstofverbinding (OM) wordt omgezet door de anodofiele micro-organismen in elektronen, CO_2 en H^+ . De elektronen stromen door de elektrische geleider 16 naar de kathodezijde, waar zij door de kathodofiele, waterstof producerende microbiële cultuur 8a worden gebruikt om protonen te reduceren tot H_2 .

30 De bifunctionele elektrode kan worden toegepast in een elektrolyse inrichting volgens de uitvinding. Een uitvoeringsvorm van een elektrolyse inrichting is

weergegeven in figuur 6. Deze elektrolyse inrichting 17 omvat een veelvoud
bifunctionele elektroden 15 volgens de uitvinding. De bifunctionele elektroden 15 zijn
geplaatst tussen een eindstandige anode 18 en een eindstandige kathode 19. De
bifunctionele elektroden 15 vormen compartimenten tussen de eindstandige anode en
5 eindstandige kathode. Deze compartimenten worden door een iongeleidende scheiding 4
onderverdeeld in een anodedeel compartiment 20 en een kathodedeel compartiment 21.
Aan de anodedeel compartimenten wordt een voedingsstroom 22 toegevoerd, die
afvalwater bevat. Biologisch oxideerbare koolstofverbindingen in het afvalwater worden
door de anodofiele biofilm 10 omgezet tot protonen, CO₂ en elektronen. De protonen
10 stromen door de protongeleidende scheiding 4 naar het kathodedeelcompartiment 21.
CO₂ verlaat het anodedeelcompartiment via een uitlaat 22, bijvoorbeeld tezamen met het
effluent van het afvalwater.

De elektronen die aan de anodezijde van een bifunctionele elektrode worden
gegenereerd, worden door het elektrisch geleidend materiaal van de bifunctionele
15 elektrode direct geleid naar de kathodezijde van de bifunctionele elektrode. De elektronen
die aan de monofunctionele eindstandige anode worden gegenereerd worden via een
elektrisch circuit geleid naar de monofunctionele eindstandige kathode. In dit elektrisch
circuit is een vermogensbron 6 aangebracht. Aan de kathodezijde van de bifunctionele
elektroden 15 worden de elektronen gebruikt door de kathodofiele waterstof
20 producerende microbiële cultuur 8a voor de reductie van protonen. Hierbij wordt
waterstof geproduceerd, dat de kathodedeel compartimenten 21 verlaat via een uitlaat 23.
De vermogensbron 6 levert voldoende elektrische energie voor de productie van
waterstof in het systeem. Door de geringe elektrische weerstand in de bifunctionele
elektroden, is de elektrische weerstand in deze inrichting lager dan een inrichting uit de
25 stand der techniek met een vergelijkbaar elektrode oppervlak.

Voorbeelden

Voorbeeld 1

Een elektrochemische cel werd gemaakt van glas. De cel bestond uit twee
30 compartimenten gescheiden door een kationselectief membraan (Nafion® 117) met een
oppervlak van 9.5 cm². Een compartiment (volume: 1L) bevatte een koolstofstaaf

elektrode met een oppervlak van 10 cm^2 . Deze elektrode diende als de bio-elektrode (werk elektrode) en was verbonden met een potentiostaat 6 (μ AutolabIII, Eco Chemie B.V., Nederland). Het andere compartiment (volume: 100 mL) bevatte een met de potentiostaat verbonden platina elektrode 7 (1.25 cm^2) die verticaal georiënteerd was t.o.v. de bio-elektrode en die diende als tegen elektrode. De afstand van beide elektroden tot het membraan bedroeg 1 cm. In het bio-elektrode compartiment werd tevens een Ag/AgCl, 3 M KCl referentie elektrode geplaatst. Beide compartimenten werden gevuld met een medium bestaande uit 0.74 g/L KCl, 1.36 g/L KH_2PO_4 , 0.28 g/L NH_4Cl , 0.84 g/L NaHCO_3 , 0.1 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 1 mL/L sporen elementen.

10 Het bio-elektrode compartiment van de elektrochemische cel werd geënt met elektrochemisch actieve micro-organismen afkomstig uit het anode compartiment van een biogekatalyseerde elektrolyse cel, vervolgens gevoed met acetaat en waterstof en gecontroleerd bij een potentiaal van +0.1 V (vs. standaard waterstof elektrode; NHE) en pH 7. Elektrochemisch actieve micro-organismen vormden onder deze condities een biofilm op de bio-elektrode en leverden anodische stroom. Vervolgens werd de pH verlaagd naar pH 6 en de potentiaal naar -0.1 V (vs. NHE) en na aanpassing van de biofilm bij deze condities werd de bio-elektrode gevoed met waterstof en medium waarin enkel bicarbonaat als koolstofbron was opgelost om waterstof oxiderende micro-organismen te selecteren. Nadat onder deze condities een constante stroom werd 20 gegenereerd, werd de potentiaal van de bio-elektrode verlaagd naar -0.65 V (vs. NHE, bij pH 6) zodat de anodische stroom veranderde in een kathodische stroom. In de daarop volgende week nam de kathodische stroom toe tot een waarde van 1 A/m^2 bio-elektrode oppervlak terwijl de potentiaal constant op -0.65 V (vs. NHE) werd gehouden. De toename van de kathodische stroomdichtheid bij gelijkblijvende condities wees op een 25 aanpassing van de microbiële gemeenschap in de biofilm. De gemeten kathodische stroomdichtheid (1 A/m^2) was meer dan twee keer zo hoog als die gemeten met een platina gekatalyseerde elektrode zoals gebruikt in een voorgaande studie (Rozendal et al., International Journal of Hydrogen Energy, vol. 31, pag. 1632-1640, 2006) onder vergelijkbare condities (pH 7 en een kathode potentiaal van -0.71 V). Waterstof werd 30 gedetecteerd in de gasfase van het bio-elektrode compartiment (met behulp van een Shimadzu GC-2010 gaschromatograaf).

Voorbeeld 2

Het experiment beschreven in voorbeeld 1 werd herhaald in een enigszins gewijzigde opzet. Er werd nu gebruik gemaakt van een cel ontwerp bestaand uit 4 plexiglas platen. De 2 binnenste platen vormden de anode en kathode compartimenten, terwijl de 2 buitenste platen dienden als verwarmingsmantel en versteviging. De binnenste platen bevatten kanalen (kanaaldiepte: 1 cm) voor vloeistof transport (volume: 0.25 L) en een headspace voor gas accumulatie (volume 0.029 L). Tussen de binnenste platen waren 2 grafiet vilten elektroden (effectief oppervlak: 250 cm²), gescheiden door een kationselectief membraan (Fumasep® FKE, 20 x 30 cm) geplaatst. De beide elektroden werden verbonden met een potentiostaat (Wenking Potentiostat/Galvanostat KP5V3A, Bank IC, Duitsland) De bio-elektrode was de werk elektrode. De Ag/AgCl, 3 M KCl referentie elektroden (QM710X, ProSense BV, Nederland) werden verbonden met Haber-Luggin capillairen. De Haber-Luggin capillairen werden op korte afstand van de elektroden geplaatst om het ohmse spanningsverlies tussen de referentie elektrode en werk of tegen elektrode te minimaliseren. Het bio-elektrode compartiment werd gevuld met medium zoals omschreven in voorbeeld 1. Het tegen elektrode compartiment was gevuld met een oplossing van hexacyanoferraat(III) wanneer de bio-elektrode anodisch werd bedreven en met een oplossing van hexacyanoferraat(II) wanneer de bio-elektrode kathodisch werd bedreven.

Het bio-elektrode compartiment van de elektrochemische cel werd geënt met elektrochemisch actieve micro-organismen afkomstig uit het anode compartiment van een biogekatalyseerde elektrolyse cel, vervolgens gevoed met acetaat en waterstof en gecontroleerd bij een potentiaal van +0.1 V (vs. standaard waterstof elektrode; NHE) en pH 7. Elektrochemisch actieve micro-organismen vormden onder deze condities een biofilm op de bio-elektrode en leverden anodische stroom. Vervolgens werd de bio-elektrode gevoed met waterstof en medium waarin natrium bicarbonaat als enige koolstofbron was opgelost om waterstof oxiderende micro-organismen te selecteren. Nadat een constante stroom werd gegenereerd bij een potentiaal van -0.2 V (vs NHE), werd de potentiaal van de bio-elektrode verlaagd naar -0.7 V (vs. NHE; pH 7) zodat de anodische stroom veranderde in een kathodische stroom. De kathodische stroom nam in

de daarop volgende tijd toe tot een waarde van 1.1 A/m^2 bio-elektrode oppervlak terwijl de potentiaal constant op -0.7 V (vs. NHE) werd gehouden. De toename van de kathodische stroom bij gelijkblijvende condities wees op een aanpassing van de microbiële gemeenschap in de biofilm. De zo gevormde biokathode werd vervolgens
5 gevoed met medium dat geprepareerd was zonder koolstofbron.

Bij een kathode potentiaal van -0.7 V (vs NHE, bij pH 7) bleek, zoals is weergegeven in figuur 7, dat de kathodische stroomdichtheid van de biokathode (gesloten cirkels) 4 maal zo groot was als de kathodische stroom van een controle kathode (open cirkels) die niet geïnoculeerd was met elektrochemisch actieve micro-organismen. De
10 gemeten kathodische stroom (1.1 A/m^2) van de biokathode is vergelijkbaar met de stroom gemeten in voorbeeld 1. De kathodische stroomdichtheid van een gemiddelde platina gekatalyseerde elektrode uit een voorgaande studie (Rozendal et al., International Journal of Hydrogen Energy, vol. 31, pag. 1632-1640, 2006) onder vergelijkbare condities (pH 7 en een kathode potentiaal van -0.71 V) is in figuur 7 weergegeven als X. Analyse van het
15 geproduceerde gas (met behulp van een Shimadzu GC-2010 gaschromatograaf) toonde aan dat waterstof werd geproduceerd met een gemeten efficiency van 50% (op basis van elektronen naar H_2). De hoeveelheid geproduceerde waterstof is weergegeven in figuur 8. Deze hoeveelheid waterstof was voor de biokathode (gesloten cirkels) ongeveer 10 keer zo hoog als die aan de controle kathode (open cirkels). In een experiment waarin de
20 biokathode werd gevoed met koolmonoxide daalde de kathodische stroom van de biokathode. Koolmonoxide staat bekend als een remmer van hydrogenases, de enzymen die waterstof productie in waterstof producerende micro-organismen katalyseren. De daling van de kathodische stroom is een indicatie dat elektrochemisch actieve micro-organismen de waterstof productie aan de biokathode katalyseren. Na verwijdering van
25 koolstofmonoxide van de biokathode middels het flushen met stikstof herstelde de kathodische stroom zich tot 1.1 A/m^2 . De controle kathode werd geënt met elektrochemisch actieve micro-organismen door het effluent van de biokathode te koppelen aan het influent van de controle kathode. Na 8 dagen werd de controle kathode ontkoppeld van de biokathode en gevoed met het eerder omschreven 10 mM bicarbonaat
30 medium. In de daaropvolgende 10 dagen nam de stroom aan de 'controle' kathode toe van -0.3 A/m^2 tot -1.0 A/m^2 . Dit wijst op groei van elektrochemisch actieve micro-

organismen aan de 'controle' kathode. Tevens wees elektronen microscopie uit dat op de biokathode en de nabegente 'controle' kathode een microbiële film aanwezig was. Hiermee is dus aangetoond dat een biokathode voor waterstof productie ook verkregen kan worden door het enten van de elektrochemisch active micro-organisms afkomstig van

5 een reeds opererende biokathode voor waterstof productie.

Conclusies

1. werkwijze voor het verkrijgen van een kathodofiele, waterstof producerende microbiële cultuur omvattende:

- 5 (i) het verschaffen van een bioelektrode omvattende een elektrochemisch actieve microbiële cultuur op een elektrische geleider, welke microbiële cultuur in staat is tot waterstof oxidatie;
- (ii) het plaatsen van de bioelektrode in een medium, het voedingsmedium, dat geschikt is om de fysiologie van tenminste een deel van de organismen in
10 de microbiële cultuur te ondersteunen;
- (iii) het op de bioelektrode aanbrengen van een potentiaal die lager is dan de evenwichtspotentiaal van het H^+/H_2 redoxkoppel in het voedingsmedium.

2. werkwijze volgens conclusie 1, waarbij de bioelektrode wordt verkregen door:

- 15 a) het verschaffen van een bioanode, omvattende een anodofiele elektrochemisch actieve microbiële cultuur op een elektrische geleider, welke microbiële cultuur in staat is tot waterstof oxidatie, geplaatst in een voedingsmedium dat geschikt is voor de ondersteuning van de fysiologie van tenminste een deel van de microbiële cultuur;
- 20 b) het in de aanwezigheid van waterstof onder condities van limitatie van een biologisch oxideerbare koolstofverbinding aanbrengen van een potentiaal op de bioanode hoger dan de evenwichtspotentiaal van het H^+/H_2 redox koppel in het voedingsmedium.

25 3. Werkwijze volgens conclusie 2, waarbij een biologisch niet-oxideerbare koolstofbron, zoals een kooldioxide bron aanwezig is onder condities van limitatie van de biologisch oxideerbare koolstofverbinding.

4. Een kathodofiele, waterstof producerende microbiële cultuur.

30

5. Een microbiële cultuur volgens conclusie 4, welke verkrijgbaar is met de werkwijze volgens een der conclusies 1-3.

6. Gebruik van een microbiële cultuur volgens een der conclusies 4-5, als elektrochemische katalysator voor de productie van waterstof.

7. werkwijze voor het vervaardigen van een bioelektrode, omvattende het verschaffen van een lichaam van een elektrisch geleidend materiaal en het aanbrengen van een kathodofiele, waterstof producerende microbiële cultuur op het oppervlak van het elektrisch geleidend materiaal.

8. Werkwijze volgens conclusie 7, waarbij:

- (iv) het verschaft lichaam van het elektrisch geleidend materiaal twee gescheiden oppervlakken omvat;
- (v) op een eerste oppervlak, het kathode-oppervlak, de kathodofiele, waterstof producerende microbiële cultuur wordt aangebracht;
- (vi) op een tweede oppervlak, het anode-oppervlak, een katalysator voor een elektrochemische oxidatiereactie wordt aangebracht.

9. Werkwijze volgens een der conclusies 7-8, waarbij het lichaam in hoofdzaak tweedimensionaal is, zoals bij voorkeur een plaatvormig lichaam.

10. Werkwijze volgens een der conclusies 7-9, waarbij de katalysator voor de anaërobe oxidatiereactie wordt geselecteerd uit de groep omvattende platina en/of een elektrochemisch actieve microbiële cultuur die in staat is tot oxidatie van een biologisch oxideerbare koolstofverbinding.

11. Een bifunctionele bioelektrode omvattende een lichaam van een elektrisch geleidend materiaal, welk lichaam twee gescheiden oppervlakken omvat, met op het eerste oppervlak, het kathode-oppervlak, een kathodofiele, waterstof producerende

microbiële cultuur en op het tweede oppervlak, het anode oppervlak, een katalysator voor een elektrochemische oxidatie reactie.

12. Een bifunctionele bioelektrode volgens conclusie 11, waarbij het lichaam in
5 hoofdzaak tweedimensionaal is, zoals bij voorkeur een plaatvormig lichaam, met meer voorkeur een vlakke plaat.

13. Een bifunctionele bioelektrode volgens een der conclusies 11-12, waarbij de
10 katalysator voor de anaërobe oxidatie reactie geselecteerd is uit de groep omvattende platina en/of een elektrochemisch actieve microbiële cultuur die in staat is tot oxidatie van een biologisch oxideerbare koolstofverbinding.

14. Inrichting omvattende een aantal compartimenten, met in elk der
15 compartimenten een op afstand van elkaar geplaatste anode en een kathode met op de anode een katalysator voor de elektrochemische oxidatie van een oxideerbaar substraat en op de kathode een kathodofiele, waterstof producerende microbiële cultuur, waarbij
20 verder tussen de anode en kathode een iongeleidende scheiding aanwezig is, die het aantal compartimenten deelt in een kathodedeelcompartiment aan de zijde van de kathode en een anodedeelcompartiment aan de zijde van de anode, met in het
25 kothodedeelcompartiment een voedingsmedium voor de ondersteuning van de fysiologie van de kathodofiele, waterstof producerende microbiële cultuur en waarbij de inrichting verder middelen omvat voor het toevoeren van een substraatmedium omvattende het oxideerbaar substraat aan de anodedeelcompartimenten en middelen voor het afvoeren van waterstof uit de kathodedeelcompartimenten en voorts er een elektrische verbinding
is tussen een aantal anodes en een aantal kathodes.

15. Inrichting volgens conclusie 14, waarbij de elektrische verbinding tussen een anode en een kathode een vermogensbron omvat.

30 16. Inrichting volgens conclusie 14 waarbij het aantal compartimenten een veelvoud compartimenten is onderverdeeld in een eerste en een tweede eindstandig

compartiment en een aantal daar tussen gelegen tussencompartimenten, waarbij in de inrichting de anodes en kathodes alternerend aanwezig zijn, en waarbij de elektrische verbinding tussen het aantal anodes en het aantal kathodes is ingericht als een elektrische verbinding tussen de anode en kathode van aangrenzende tussencompartimenten, een
 5 elektrisch verbinding tussen de kathode van het eerste eindstandigcompartiment en de anode van het aan het eerste eindstandigcompartiment grenzende tussencompartiment, een elektrisch verbinding tussen de anode van het tweede eindstandigcompartiment en de kathode van het aan het tweede eindstandigcompartiment grenzende tussencompartiment en een elektrisch verbinding tussen de anode en kathode van de eindstandige
 10 compartimenten, dusdanig dat elke anode elektrisch verbonden is met één kathode.

17. Inrichting volgens conclusie 16, waarbij de elektrische verbinding tussen de anode en kathode van de eindstandige compartimenten een vermogensbron omvat.

15 18. Inrichting volgens een der conclusies 14-17, waarbij de katalysator voor de elektrochemische oxidatie van een oxideerbaar substraat op de anodes een katalysator omvat uit de groep omvattende platina en/of een micro-organisme geselecteerd uit de groep van *Geobacter sulfurreducens*, *Shewanella putrefaciens*, *Geobacter metallireducens* en *Rhodospirillum rubrum*, andere organismen uit de genoemde genera of een
 20 consortium van een of meer organismen hieruit.

19. Inrichting volgens een der conclusies 16-18, waarbij de anodes en kathodes van de tussencompartimenten zijn ingericht als bifunctionele elektrodes volgens conclusies 11-13.

25

20. Werkwijze voor het produceren van waterstof omvattende:

- (i) het verschaffen van een inrichting volgens een der conclusies 14-19;
- (ii) het aan de anodedeelcompartimenten toevoeren van een substraatmedium
 30 omvattende een oxideerbaar substraat;

- (iii) het aanbrengen van een potentiaal op het aantal kathodes die lager is dan de evenwichtpotentiaal van het H^+/H_2 redox koppel in het voedingsmedium;
- (iv) het afvoeren van het waterstof geproduceerd aan de kathode.

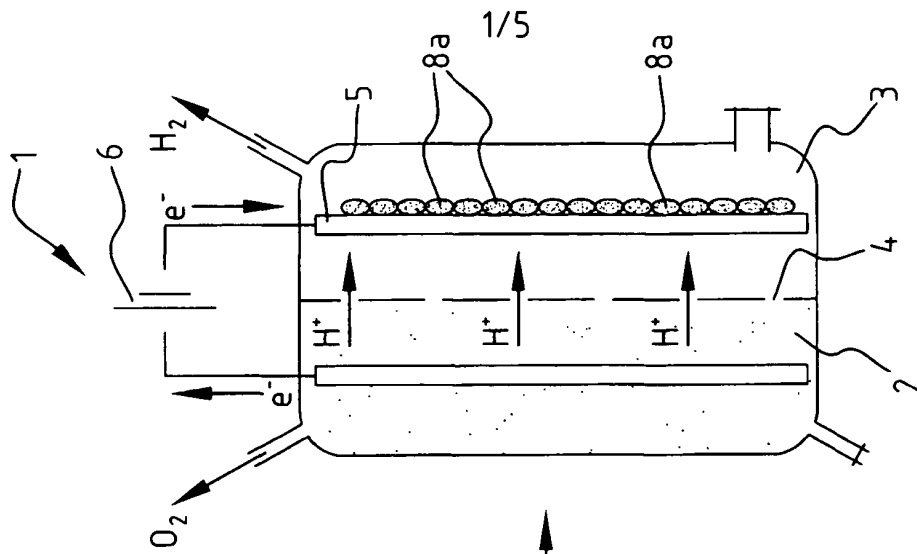
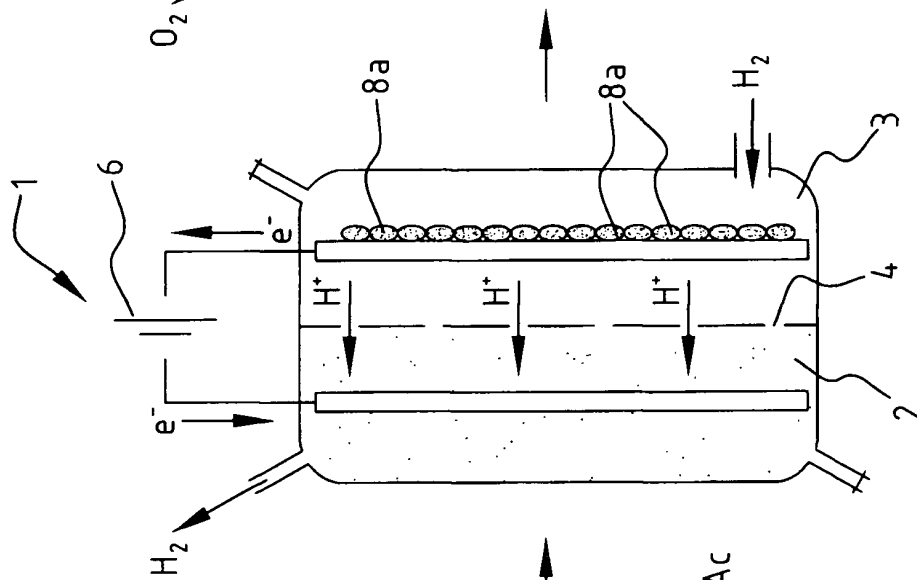
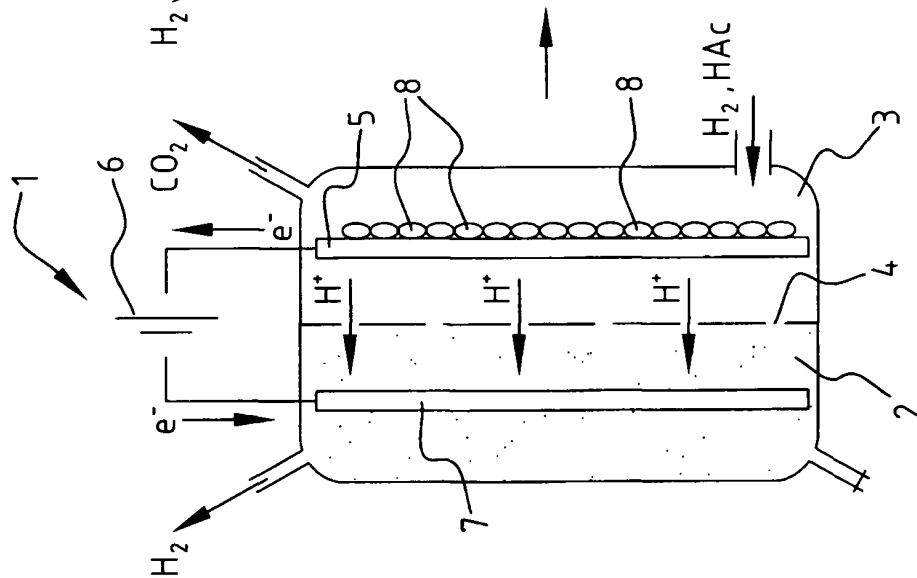


FIG. 1A

FIG. 1B

FIG. 1C

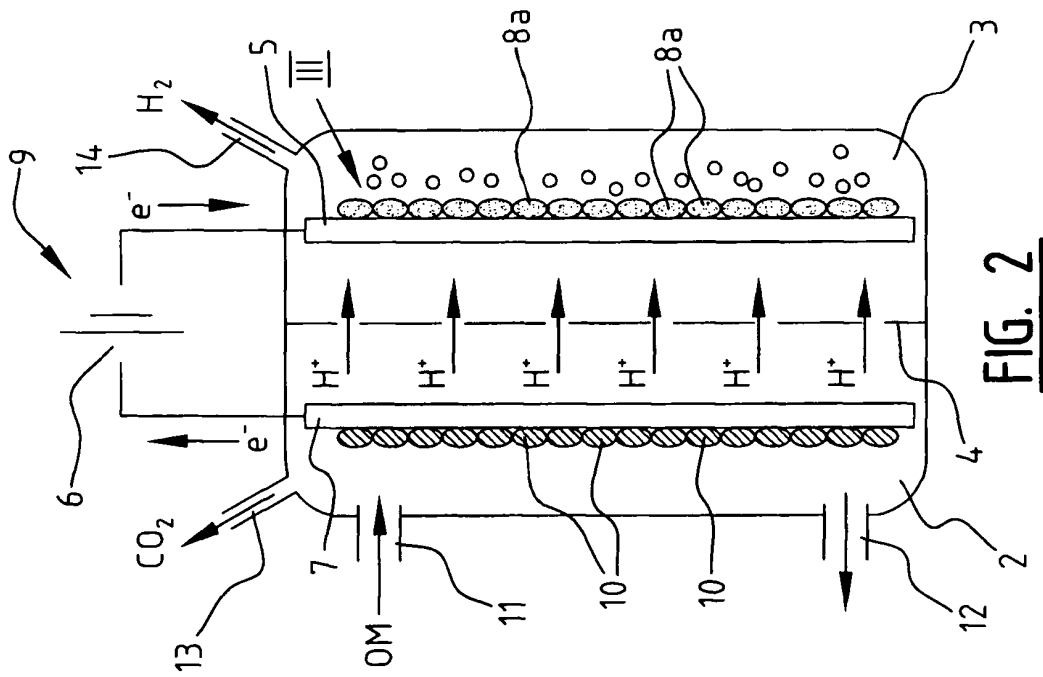


FIG. 2

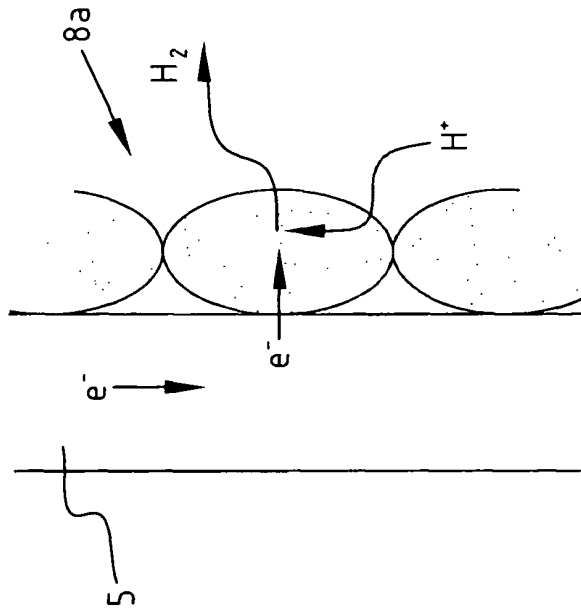


FIG. 3

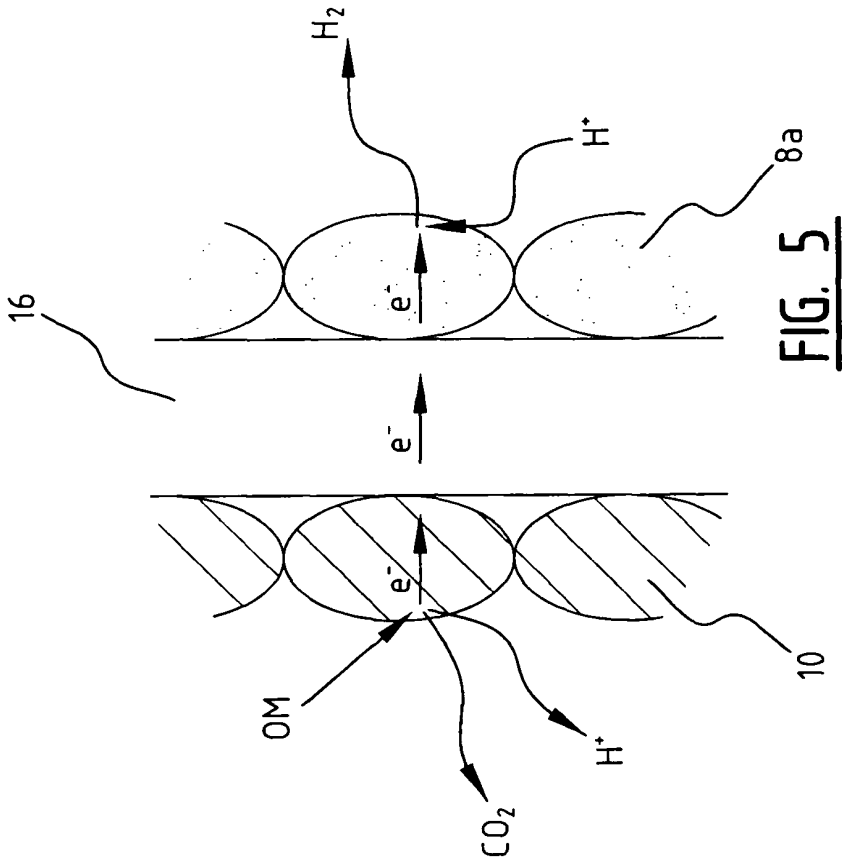


FIG. 5

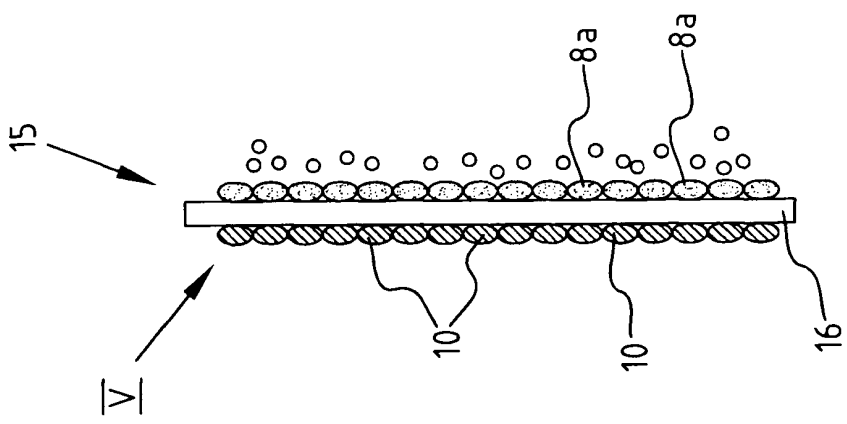


FIG. 4

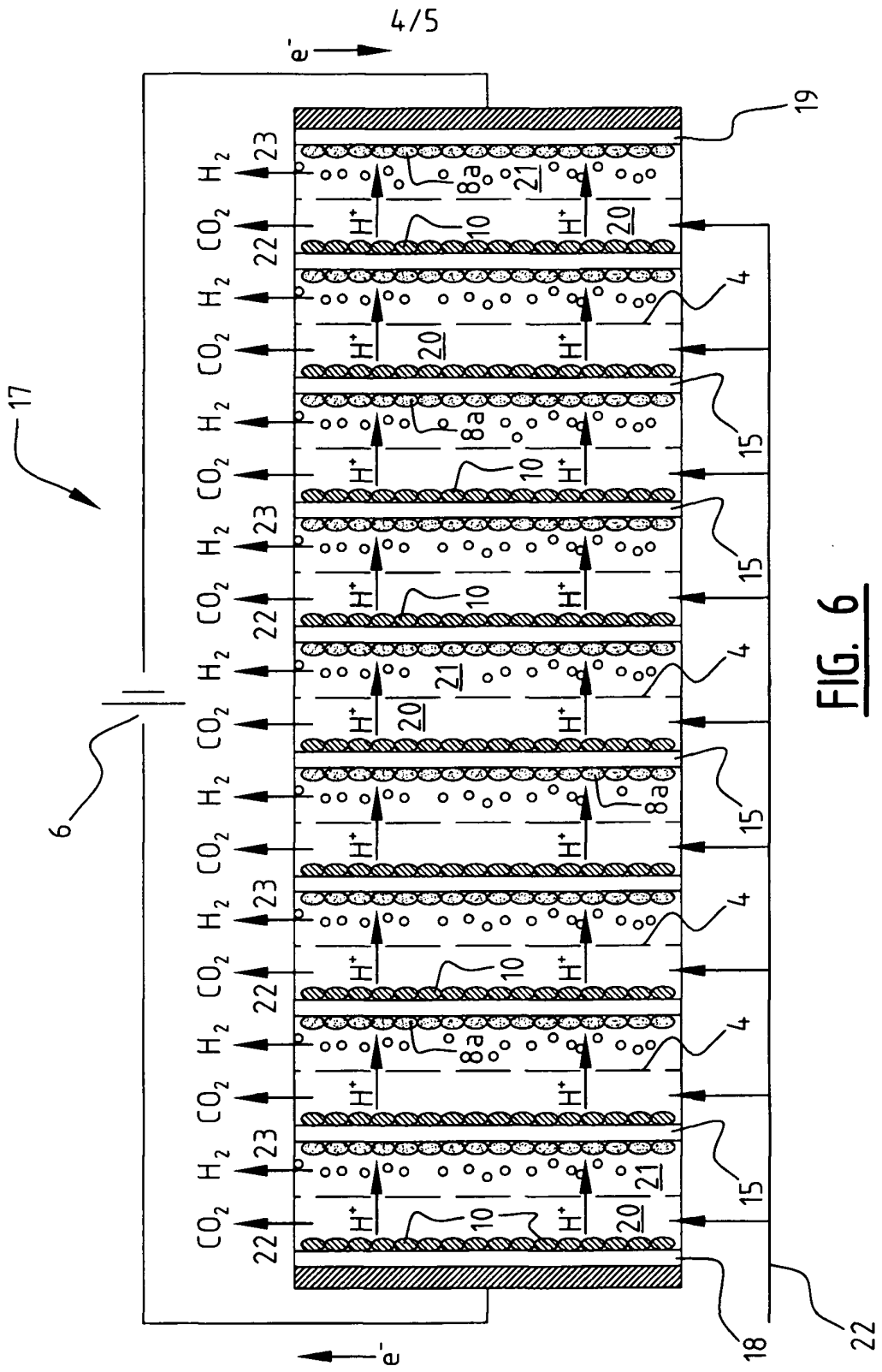


FIG. 6

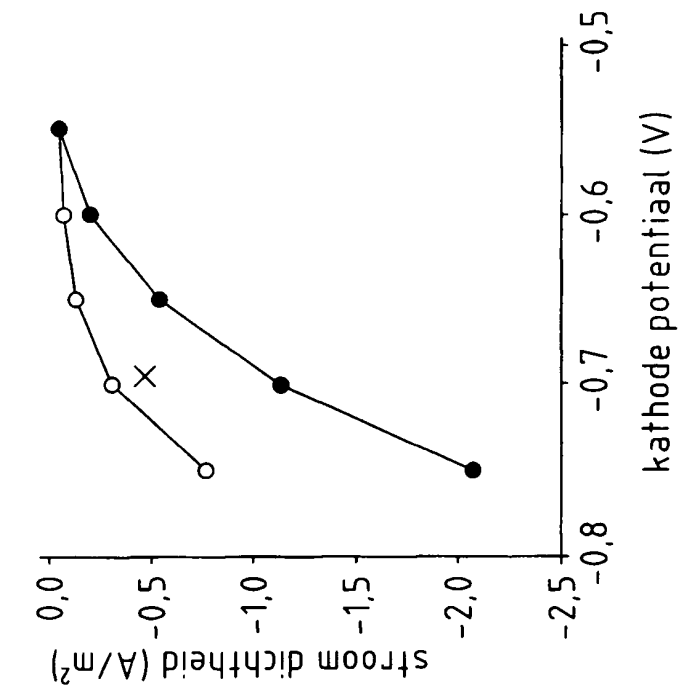


FIG. 7

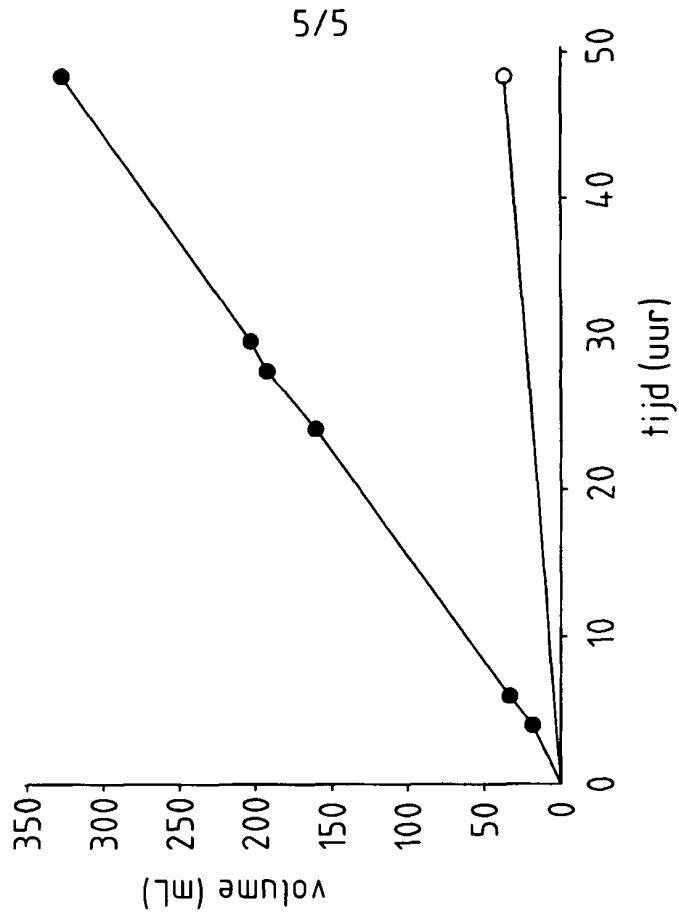


FIG. 8

SAMENWERKINGSVERDRAG (PCT)

RAPPORT BETREFFENDE NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN INTERNATIONAAL TYPE

IDENTIFICATIE VAN DE NATIONALE AANVRAGE	KENMERK VAN DE AANVRAGER OF VAN DE GEMACHTIGDE		
	2S/2ER48/BW/11		
Nederlands aanvraag nr.	Indieningsdatum		
1034123	12-07-2007		
	Ingeroepen voorrangdatum		
Aanvrager (Naam)			
Stichting Wetsus Centre fo Sustainable Water Technology			
Datum van het verzoek voor een onderzoek van internationaal type	Door de Instantie voor Internationaal Onderzoek aan het verzoek voor een onderzoek van internationaal type toegekend nr.		
27-09-2007	SN 49130		
I. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP (bij toepassing van verschillende classificaties, alle classificatiesymbolen opgeven)			
Volgens de internationale classificatie (IPC)			
C12N11/14 C21N1/36 C12N13/00 C12M1/42			
II. ONDERZOCHE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK			
Onderzochte minimumdocumentatie			
Classificatiesysteem	Classificatiesymbolen		
IPC8	C12N	C12P	C12M H01M
Onderzochte andere documentatie dan de minimum documentatie, voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen			
III.	<input type="checkbox"/>	GEEN ONDERZOEK MOGELIJK VOOR BEPAALDE CONCLUSIES	(opmerkingen op aanvullingsblad)
IV.	<input type="checkbox"/>	GEBREK AAN EENHEID VAN UITVINDING	(opmerkingen op aanvullingsblad)

RESULTAAT VAN HET ONDERZOEK NAAR DE STAND VAN DE TECHNIEK VAN HET INTERNATIONALE TYPE

Nummer van het verzoek om een onderzoek naar de stand van de techniek
NL 1034123

A. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP

INV. C12N11/14 C12N1/36 C12N13/00 C12M1/42 C12P3/00
 H01M8/16 C12N1/20

Volgens de Internationale Classificatie van octroolen (IPC) of zowel volgens de nationale classificatie als volgens de IPC.

B. ONDERZOCHETE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK

Onderzochte minimum documentatie (classificatie gevolgd door classificatiesymbolen)

C12N C12P C12M H01M

Onderzochte andere documentatie dan de minimum documentatie, voor dergelijke documenten, voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen

Tijdens het onderzoek geraadpleegde elektronische gegevensbestanden (naam van de gegevensbestanden en, waar uitvoerbaar, gebruikte trefwoorden)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie °	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
X	WO 2005/005981 A (WAGENINGEN UNIVERSITEIT [NL]; ROZENDAL RENE ALEXANDER [NL]; BUISMAN CE) 20 januari 2005 (2005-01-20) in de aanvraag genoemd het gehele document	4,5
X	ROZENDAL ET AL: "Principle and perspectives of hydrogen production through biocatalyzed electrolysis" INTERNATIONAL JOURNAL OF HYDROGEN ENERGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., BARKING, GB, deel 31, nr. 12, september 2006 (2006-09), bladzijden 1632-1640, XP005606758 ISSN: 0360-3199 in de aanvraag genoemd het gehele document	4,5



Verdere documenten worden vermeld in het vervolg van vak C.



Leden van dezelfde octroofamilie zijn vermeld in een bijlage

° Speciale categorieën van aangehaalde documenten

A niet tot de categorie X of Y behorende literatuur die de stand van de techniek beschrijft

D in de octrooiaanvraag vermeld

E eerdere octrooi(aanvraag), gepubliceerd op of na de indieningsdatum, waarin dezelfde uitvinding wordt beschreven

L om andere redenen vermelde literatuur

O niet-schriftelijke stand van de techniek

P tussen de voorrangdatum en de indieningsdatum gepubliceerde literatuur

T na de indieningsdatum of de voorrangdatum gepubliceerde literatuur die niet bezwarend is voor de octrooiaanvraag, maar wordt vermeld ter verheldering van de theorie of het principe dat ten grondslag ligt aan de uitvinding

X de conclusie wordt als niet nieuw of niet inventief beschouwd ten opzichte van deze literatuur

Y de conclusie wordt als niet inventief beschouwd ten opzichte van de combinatie van deze literatuur met andere geciteerde literatuur van dezelfde categorie, waarbij de combinatie voor de vakman voor de hand liggend wordt geacht

Z lid van dezelfde octroofamilie of overeenkomstige octrooipublicatie

Datum waarop het onderzoek naar de stand van de techniek van internationaal type werd voltooid

4 Maart 2008

Verzenddatum van het rapport van het onderzoek naar de stand van de techniek van internationaal type

Naam en adres van de instantie

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

De bevoegde ambtenaar

van Voorst, Frank

C. (Vervolg). VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie °	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
A	LOGAN BRUCE E ET AL: "Microbial fuel cells: Methodology and technology" ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY, deel 40, nr. 17, september 2006 (2006-09), bladzijden 5181-5192, XP007904192 ISSN: 0013-936X het gehele document -----	1-20
X	LOJOU E ET AL: "Hydrogenase activity control at Desulfovibrio vulgaris cell-coated carbon electrodes: Biochemical and chemical factors influencing the mediated bioelectrocatalysis" ELECTROANALYSIS, deel 14, nr. 13, juli 2002 (2002-07), bladzijden 913-922, XP007904195 ISSN: 1040-0397 in de aanvraag genoemd het gehele document -----	4,5
A	WO 2007/039661 A (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION [ES]; FERNANDEZ LOPEZ VICTOR MANUEL [ES] 12 april 2007 (2007-04-12) het gehele document -----	1-20
T	ROZENDAL RENE A ET AL: "Hydrogen production with a microbial biocathode" ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY, deel 42, nr. 2, januari 2008 (2008-01), bladzijden 629-634, XP007904197 ISSN: 0013-936X het gehele document -----	1-20

**RESULTAAT VAN HET ONDERZOEK NAAR DE STAND
VAN DE TECHNIEK VAN HET INTERNATIONALE TYPE**

Informatie over leden van dezelfde octrooifamilie

Nummer van het verzoek om een onderzoek naar
de stand van de techniek

NL 1034123

In het rapport genoemd octrooigeschrift	Datum van publicatie	Overeenkomend(e) geschrift(en)	Datum van publicatie
WO 2005005981	A	20-01-2005	CA 2531682 A1 20-01-2005
			CN 1856706 A 01-11-2006
			JP 2007528709 T 18-10-2007
			US 2007042480 A1 22-02-2007
<hr/>			
WO 2007039661	A	12-04-2007	GEEN
<hr/>			



OCTROOICENTRUM NEDERLAND

WRITTEN OPINION

File No. SN49130	Filing date (day/month/year) 12.07.2007	Priority date (day/month/year)	Application No. NL1034123
International Patent Classification (IPC) INV. C12N11/14 C12N1/36 C12N13/00 C12M1/42 C12P3/00 H01M8/16 C12N1/20			
Applicant Stichting Wetsus Centre for Sustainable Water Tech			

This opinion contains indications relating to the following items:

- Box No. I Basis of the opinion
- Box No. II Priority
- Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- Box No. IV Lack of unity of invention
- Box No. V Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- Box No. VI Certain documents cited
- Box No. VII Certain defects in the application
- Box No. VIII Certain observations on the application

	Examiner van Voorst, Frank
--	-------------------------------

WRITTEN OPINION**Box No. I Basis of this opinion**

1. This opinion has been established on the basis of the latest set of claims filed before the start of the search.
2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - a sequence listing
 - table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - on paper
 - in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - contained in the application as filed.
 - filed together with the application in electronic form.
 - furnished subsequently for the purposes of search.
3. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

Box No. V Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty	Yes: Claims	2, 3, 6, 8-13, 16-19
	No: Claims	1, 4, 5, 7, 14, 15, 20
Inventive step	Yes: Claims	
	No: Claims	1-20
Industrial applicability	Yes: Claims	1-20
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty and inventive step.

Reference is made to the following documents:

- D1: WO 2005/005981 A (WAGENINGEN UNIVERSITEIT [NL]; ROZENDAL RENE ALEXANDER [NL]; BUISMAN CE) 20 januari 2005 (2005-01-20)
- D2: ROZENDAL ET AL: "Principle and perspectives of hydrogen production through biocatalyzed electrolysis" INTERNATIONAL JOURNAL OF HYDROGEN ENERGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., BARKING, GB, deel 31, nr. 12, september 2006 (2006-09), bladzijden 1632-1640, ISSN: 0360-3199
- D3: LOGAN BRUCE E ET AL: "Microbial fuel cells: Methodology and technology" ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY, deel 40, nr. 17, september 2006 (2006-09), bladzijden 5181-5192, ISSN: 0013-936X
- D4: LOJOU E ET AL: "Hydrogenase activity control at Desulfovibrio vulgaris cell-coated carbon electrodes: Biochemical and chemical factors influencing the mediated bioelectrocatalysis" ELECTROANALYSIS, deel 14, nr. 13, juli 2002 (2002-07), bladzijden 913-922, ISSN: 1040-0397

1 Novelty

- 1.1 Document D1 discloses a process for producing hydrogen in a bio-electrical cell. The process comprises a reactor in which a bio-oxidizable material is oxidized by anodophylic bacteria that donate electrons to the anode. Said electrons are used to produce hydrogen at the cathode. A voltage of between 0.05 and 1.5 volt is applied between the anode and the cathode (abstract). The bio-oxidizable material may be acetate (reaction 3). Document D2 is a scientific paper disclosing the same type of biological fuel cell. Document D3 is a review paper on biological fuel cells that also discloses anodophylic bacteria donating electrons to an anode in a biological fuel cell (fig 1).
- 1.2 Claims 4 relates to cathodophylic hydrogen producing microbial cultures and claim 5 to such cultures obtainable by the processes of claims 1-3. Claim 5 is a product-by-process claim and is only allowable if the products per se fulfil the criteria of

patentability inter alia that they are novel and inventive.

- 1.3 The microbial culture of the present application was obtained from the anode of a biocatalized electrolytic cell such as disclosed in D1-D3. The microbial culture was inoculated in a compartment of an electrical cell and a potential of +0.1 V was applied such that the electrode in said electrical cell in which the bacteria are inoculated functions as an anode (page 21, line 13) i.e. electrons are generated at the expense of hydrogen. In a further step a voltage of -0.65 V is applied, now the previous anode functions as a cathode and hydrogen is produced. The microbial culture at the cathode is, hence, identical to the culture originally present at the anode. Such cultures are disclosed in D1-D3. Consequently the subject matter of claims 4 and 5 is not novel.
- 1.4 Even if the Applicant were to argue that the microbial culture is distinct because it is physiologically adapted to its new environment at the cathode (page 21, lines 23-25) then the subject matter of claims 4 and 5 is still not considered novel because physiological adaptation is considered an implicit property of microbiological cultures. Alternatively, claims 4 and 5 might be objected to for lack of clarity because an essential technical feature is missing from the claims. A physiologically adapted culture will only remain adapted in the environment it is adapted to i.e. in the electrical cell with the electrode and the relevant potential applied.
- 1.5 Document D4 discloses glassy carbon electrodes modified by a coating made of whole *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough cells. Said electrodes can be used to generate hydrogen using methyl viologen as a mediator. The *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough cells are considered cathodophilic hydrogen producing bacteria (abstract). Document D4 anticipates the subject matter of claim 4.
- 1.6 Document D4 also discloses the use of the electrode in an electrical cell comprising acetate buffer to produce hydrogen (page 915-916 3rd paragraph, fig 1). Acetate supports the physiology of microorganisms, hence, acetate buffer is considered a medium that supports the physiology of at least some of the organisms of the microbial culture. Document D4 anticipates the subject matter of claim 1.
- 1.7 The bioelectrode disclosed in D4 is also considered to fall within the scope of claim 7. The electrical cell used in D4 is considered to fall within the scope of claims 14 and

15. Consequently the subject matter of claim 20 is not considered novel either.

1.8 The present application does not meet the requirements for patentability because the subject matter of claims 1, 4, 5, 7, 14, 15 and 20 is not new.

2 Inventive step

2.1 Even if the above novelty objections can be overcome through amendments an inventive step can still not be acknowledged.

2.2 The closest prior art is considered document D2 which discloses hydrogen production through biocatalyzed electrolysis. Said process involves the use of electrochemically active microorganisms present at the anode of the electrical cell (abstract). Document D2 also discloses the problem of energy losses at the cathode reaction despite the use of platinum catalysis (page 1637, column 1). D2 indicates that much attention needs to be spent towards lowering the cathode potential loss (page 1637, column 2).

2.3 The technical difference with the present application is the presence of a microbial culture on the cathode to catalyze the formation of hydrogen. The objective problem solved by the present application may, therefore, be regarded as the provision of a further catalyst for the formation of hydrogen on a cathode in a biological hydrogen producing electrical cell; and the solution as a hydrogen producing microbial culture. This solution is, however, considered obvious because D4 discloses the use of a microbial culture present on a cathode for the catalysis of hydrogen production.

2.4 The further technical features in the dependent claims relating to the structure of the electrode and the electrolytical device are also not considered to involve an inventive step. If the Applicant were to argue that these are inventive then an objection for lack of unity of invention may be made because these are not linked by a special technical feature such as to form one single general inventive concept.

2.5 The present application does not meet the requirements for patentability because the subject matter of claims 1-20 does not involve an inventive step.