



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105392890 B

(45)授权公告日 2019.07.12

(21)申请号 201480032872.4

(22)申请日 2014.06.05

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105392890 A

(43)申请公布日 2016.03.09

(30)优先权数据
61/833240 2013.06.10 US
14/293111 2014.06.02 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.12.09

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/041115 2014.06.05

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/200810 EN 2014.12.18

(73)专利权人 伊内奥斯生物股份公司
地址 瑞士罗勒

(72)发明人 R.H.塞纳拉特涅 P.S.贝尔 S.刘
S.R.斯科特

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公
司 72001

代理人 周李军 杨思捷

(51)Int.Cl.

C12P 7/06(2006.01)

C12P 7/08(2006.01)

C12P 7/16(2006.01)

C12N 1/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 102131936 A,2011.07.20,

WO 2010064933 A1,2010.06.10,

WO 2011028137 A1,2011.03.10,

WO 2011112103 A1,2011.09.15,

Michael Kopke 等.Fermentative

production of ethanol from carbon
monoxide.《Current Opinion in

Biotechnology》.2011,第22卷(第3期),第321页
右栏第1段.

Mark R Wilkins等.Microbial production
of ethanol from carbon monoxide.《Current
Opinion in Biotechnology》.2011,第22卷(第3
期),第328页左栏第4段-右栏第1段.

审查员 贾麒

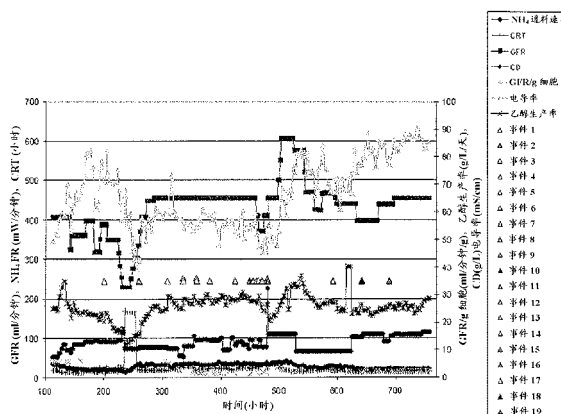
权利要求书3页 说明书10页 附图1页

(54)发明名称

用于在有效降低水用量的低磷酸盐培养基
中发酵含有CO的气态底物的方法

(57)摘要

提供了在低磷酸盐培养基中发酵含有CO的
气态底物的方法。所述方法包括使包括至少一种
过渡金属元素的液体培养基与包括至少一种其
它过渡金属元素和一种非金属元素的液体培养
基共混,以提供发酵培养基。所述方法有效防止
一种或多种过渡金属元素与一种或多种非金属
元素沉淀。用于所述方法的发酵培养基采用需要
显著较低量的水和降低水平的磷酸盐的方式制
备。



1. 一种发酵方法,所述方法包括:

使包括至少一种选自Zn、Co和Ni的过渡金属元素的液体培养基与包括过渡金属元素W和一种非金属元素Se的液体培养基共混,以提供发酵培养基;

使含有CO的底物与所述发酵培养基接触;和

发酵所述含有CO的底物,以提供酸性pH,

所述方法有效防止一种或多种过渡金属元素与一种或多种非金属元素沉淀,和

其中所述发酵方法有效利用2美制加仑或更少的提供至发酵培养基的水/美制加仑产生的乙醇,

其中所述发酵培养基包括3 mM或更少的磷酸盐。

2. 权利要求1的发酵方法,其中发酵有效提供4.2-4.8的pH。

3. 权利要求1的发酵方法,其中所述至少一种过渡金属元素和至少一种非金属元素的共混物在580nm下的光学密度为0.7或更少。

4. 权利要求1的方法,其中所述提供至发酵器的含有CO的底物的CO/CO₂摩尔比为0.75或更多。

5. 权利要求1的方法,其中所述发酵培养基具有30 mS/cm或更少的电导率。

6. 权利要求1的方法,其中所述方法有效提供10 g总醇/(L·天)或更多的STY。

7. 权利要求1的方法,其中所述方法包括使用选自以下的产乙酸菌发酵所述含有CO的底物:凯伍产醋菌(*Acetogenium kivui*)、潮湿厌氧醋菌(*Acetoanaerobium noterae*)、伍氏醋酸杆菌(*Acetobacterium woodii*)、巴奇嗜碱菌(*Alkalibaculum bacchi*) CP11 ATCC BAA-1772、产生性布洛提菌(*Blautia producta*)、嗜甲基丁酸杆菌(*Butyribacterium methylotrophicum*)、地下嗜热厌氧菌(*Caldanaerobacter subterraneus*)、太平洋地下嗜热厌氧菌(*Caldanaerobacter subterraneus pacificus*)、产氢羧基嗜热菌(*Carboxydotherrmus hydrogenoformans*)、醋酸杆菌(*Clostridium aceticum*)、丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)、丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*) P262、自产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*) 德国DSMZ之DSM 19630、自产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*) 德国DSMZ之DSM 10061、自产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*) 德国DSMZ之DSM 23693、自产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*) 德国DSMZ之DSM 24138、食羧基梭菌(*Clostridium carboxidivorans*) P7 ATCC PTA-7827、克氏梭菌(*Clostridium coskatii*) ATCC PTA-10522、德可氏梭菌(*Clostridium drakei*)、杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*) PETC ATCC 49587、杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*) ERI2 ATCC 55380、杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*) C-01 ATCC 55988、杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*) 0-52 ATCC 55889、大梭菌(*Clostridium magnum*)、巴氏梭菌(*Clostridium pasteurianum*) 德国DSMZ之DSM 525、拉格利梭菌(*Clostridium ragsdali*) P11 ATCC BAA-622、粪味梭菌(*Clostridium scatologenes*)、热醋酸梭菌(*Clostridium thermoaceticum*)、突那梭菌(*Clostridium ultunense*)、库氏脱硫肠状菌(*Desulfotomaculum kuznetsovii*)、粘液真杆菌(*Eubacterium limosum*)、硫还原地杆菌(*Geobacter sulfurreducens*)、噬乙酸甲烷八叠球菌(*Methanosarcina acetivorans*)、巴氏甲烷八叠球菌(*Methanosarcina barkeri*)、热乙酸穆尔氏菌(*Morrella thermoacetica*)、热自养穆尔氏菌(*Morrella*

thermoautotrophica)、芬妮产醋杆菌(*Oxobacter pfennigii*)、产生消化链球菌(*Peptostreptococcus productus*)、产生瘤胃球菌(*Ruminococcus productus*)、凯伍嗜热厌氧菌(*Thermoanaerobacter kivui*)及它们的混合物。

8. 一种用于发酵含有CO的底物的方法,所述方法包括:

向发酵器提供含有CO的底物,和使所述含有CO的底物与发酵培养基接触,所述发酵培养基通过以下方法提供:所述方法包括使包括一种或多种选自Zn、Co和Ni的元素的第二溶液与包括一种或多种选自W和Se的元素的第二溶液共混,其量有效提供具有30 mS/cm或更少的电导率的发酵培养基,其中所述发酵培养基包括3 mM或更少的磷酸盐;和

发酵所述含有CO的底物,

其中所述方法有效提供10 g总醇/(L·天)或更多的STY,

其中所述发酵方法有效利用2美制加仑或更少的提供至发酵培养基的水/加仑产生的乙醇。

9. 权利要求8的发酵方法,其中所述发酵培养基提供有至少一种或多种以下元素:

0.04 μg或更多的Zn/分钟/g细胞,

0.018 μg或更多的Co/分钟/g细胞,

0.02 μg或更多的Ni/分钟/g细胞,

0.29 μg或更多的W/分钟/g细胞,和

0.01 μg或更多的Se/分钟/g细胞。

10. 权利要求8的发酵方法,其中所述发酵培养基包括小于0.02重量% NaHCO₃。

11. 权利要求8的发酵方法,其中所述发酵培养基提供有至少一种或多种以下元素:

0.044 μg或更多的氮/g细胞,

0.2 μg或更多的磷/g细胞,或

0.01 μg或更多的钾/g细胞。

12. 权利要求8的发酵方法,其中所述提供至发酵器的含有CO的底物的CO/CO₂摩尔比为0.75或更多。

13. 权利要求8的发酵方法,其中发酵有效提供4.2-4.8的pH。

14. 权利要求8的发酵方法,其中所述元素的共混物在580 nm下的光学密度为0.7或更少。

15. 权利要求8的方法,其中所述发酵包括产乙酸菌。

16. 权利要求15的方法,其中所述产乙酸菌选自凯伍产醋菌(*Acetogenium kivui*)、潮湿厌氧醋菌(*Acetoanaerobium noterae*)、伍氏醋酸杆菌(*Acetobacterium woodii*)、巴奇嗜碱菌(*Alkalibaculum bacchi*) CP11 ATCC BAA-1772、产生性布洛提菌(*Blautia producta*)、嗜甲基丁酸杆菌(*Butyribacterium methylotrophicum*)、地下嗜热厌氧菌(*Caldanaerobacter subterraneus*)、太平洋地下嗜热厌氧菌(*Caldanaerobacter subterraneus pacificus*)、产氢羧基嗜热菌(*Carboxydotherrmus hydrogenoformans*)、醋酸杆菌(*Clostridium aceticum*)、丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)、丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*) P262、自产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*) 德国DSMZ之DSM 19630、自产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*) 德国DSMZ之DSM 10061、自产乙醇梭菌(*Clostridium*

autoethanogenum) 德国DSMZ之DSM 23693、自产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*) 德国DSMZ之DSM 24138、食羧基梭菌(*Clostridium carboxidivorans*) P7 ATCC PTA-7827、克氏梭菌(*Clostridium coskatii*) ATCC PTA-10522、德可氏梭菌(*Clostridium drakei*)、杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*) PETC ATCC 49587、杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*) ERI2 ATCC 55380、杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*) C-01 ATCC 55988、杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*) 0-52 ATCC 55889、大梭菌(*Clostridium magnum*)、巴氏梭菌(*Clostridium pasteurianum*) 德国DSMZ之DSM 525、拉格利梭菌(*Clostridium ragsdali*) P11 ATCC BAA-622、粪味梭菌(*Clostridium scatologenes*)、热醋酸梭菌(*Clostridium thermoaceticum*)、突那梭菌(*Clostridium ultunense*)、库氏脱硫肠状菌(*Desulfotomaculum kuznetsovii*)、粘液真杆菌(*Eubacterium limosum*)、硫还原地杆菌(*Geobacter sulfurreducens*)、噬乙酸甲烷八叠球菌(*Methanosarcina acetivorans*)、巴氏甲烷八叠球菌(*Methanosarcina barkeri*)、热乙酸穆尔氏菌(*Morrella thermoacetica*)、热自养穆尔氏菌(*Morrella thermoautotrophica*)、芬妮产醋杆菌(*Oxobacter pfennigii*)、产生消化链球菌(*Peptostreptococcus productus*)、产生瘤胃球菌(*Ruminococcus productus*)、凯伍嗜热厌氧菌(*Thermoanaerobacter kivui*)及它们的混合物。

17. 权利要求8的方法,其中所述总醇包括75重量%或更多的乙醇。

18. 权利要求8的方法,其中所述总醇包括25重量%或更少的丁醇。

19. 一种用于在制备发酵培养基中降低水用量的方法,所述方法包括:

使包括选自Zn、Co、Ni中的一种或多种的元素的溶液与包括选自W、Se中的一种或多种的元素的溶液共混,其量有效提供具有30 mS/cm或更少的电导率的发酵培养基,

其中所述发酵培养基需要比具有多于3 mM磷酸盐的发酵培养基少10%-40%的水。

20. 权利要求19的发酵方法,其中所述发酵培养基提供有至少一种或多种以下元素:

0.04 µg或更多的Zn/分钟/g细胞,

0.018 µg或更多的Co/分钟/g细胞,

0.02 µg或更多的Ni/分钟/g细胞,

0.29 µg或更多的W/分钟/g细胞,和

0.01 µg或更多的Se/分钟/g细胞。

21. 权利要求19的发酵方法,其中所述发酵培养基包括小于0.02重量% NaHCO₃。

22. 权利要求19的发酵方法,其中发酵有效提供4.2-4.8的pH。

23. 权利要求19的发酵方法,其中所述元素的共混物在580 nm下的光学密度为0.7或更少。

24. 权利要求19的发酵方法,其中所述发酵培养基提供有至少一种或多种以下元素:

0.044 µg或更多的氮/g细胞,

0.2 µg或更多的磷/g细胞,或

0.01 µg或更多的钾/g细胞。

用于在有效降低水用量的低磷酸盐培养基中发酵含有CO的气态底物的方法

[0001] 本申请要求2013年6月10日提交的美国临时申请61/833,240的权益,其通过引用而全文结合到本文中。

[0002] 提供了在低磷酸盐培养基中发酵含有CO的气态底物的方法。更具体地,所述方法包括在采用需要较低量的水的方式制备的培养基中发酵所述含有CO的气态底物。

[0003] 背景

[0004] 产乙酸微生物可通过气态底物的发酵由一氧化碳(CO)产生乙醇。利用来自梭状芽孢杆菌(*Clostridium*)属的厌氧微生物的发酵产生乙醇和其它有用的产物。例如,美国专利5,173,429描述杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*) ATCC No. 49587,一种由合成气体产生乙醇和乙酸盐的厌氧微生物。美国专利5,807,722描述了利用杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*) ATCC No. 55380用于将废气转化为有机酸和醇的方法和设备。美国专利6,136,577描述了利用杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*) ATCC No. 55988和55989用于将废气转化为乙醇的方法和设备。

[0005] 发酵方法通常需要大量的水和营养物。降低水用量,消除某些组分,和降低所需浓度水平的其它组分同时保持醇生产率可提供显著的成本节约,尤其是在工业规模发酵中。

[0006] 概述

[0007] 提供了利用较低量的水用于发酵含有CO的气态底物的方法。用于所述方法的发酵培养基采用需要显著较低量的水和降低水平的磷酸盐的方式制备。

[0008] 发酵方法包括使包括至少一种过渡金属元素的液体培养基与包括至少一种其它过渡金属元素和一种非金属元素的液体培养基共混,以提供发酵培养基。所述方法包括使含有CO的底物与所述发酵培养基接触,和发酵所述含有CO的底物,以提供酸性pH。所述方法有效防止一种或多种过渡金属元素与一种或多种非金属元素沉淀,并且有效利用约2美制加仑或更少的提供至发酵培养基的水/美制加仑产生的乙醇。

[0009] 用于发酵含有CO的底物的方法包括向发酵器提供含有CO的底物,和使所述含有CO的底物与发酵培养基接触。所述方法包括通过以下方法提供发酵培养基:所述方法包括使包括一种或多种选自Zn、Co和Ni的元素的第二溶液与包括一种或多种选自W和Se的元素的第二溶液共混,其量有效提供具有约30 mS/cm或更少的电导率和约3 mM或更少的磷酸盐的发酵培养基。发酵所述含有CO的底物有效提供10 g总醇/(L·天)或更多的STY,并且有效利用约2美制加仑或更少的提供至发酵培养基的水/美制加仑产生的乙醇。

[0010] 在另一方面,在制备发酵培养基中用于降低水用量的方法包括使包括选自Zn、Co、Ni中的一种或多种的元素的溶液与包括选自W、Se中的一种或多种的元素的溶液共混,其量有效提供具有约30 mS/cm或更少的电导率的发酵培养基。发酵培养基需要比具有多于约3 mM磷酸盐的发酵培养基少约10%-约40%的水。

[0011] 附图简述

[0012] 由下图,所述方法的若干方面的以上和其它方面、特征和优点将更加显而易见。

[0013] 图1说明在低磷酸盐培养基上稳态杨氏梭菌培养物的性能,并且使用NH₄OH作为碱

来控制pH和用作氮源。

[0014] 详述

[0015] 以下描述不是采用限制性含义,而是仅用于描述示例性实施方案的通用原则的目的。本发明的范围应参考权利要求来确定。

[0016] 在一方面,优化通向发酵器的营养物进料中的营养物水平,使得在发酵器中产乙酸菌的每一种营养物%消耗基本上相同。出乎意料地,消耗的营养物的量和在培养基中所得到的营养物的残余量的不平衡导致提高的电导率和降低发酵性能。为了减轻提高的电导率,需要大量的水。仔细平衡提供的营养物和消耗的营养物导致降低的水用量和降低的营养物用量。在该方面,营养物培养基和发酵方法优化营养物利用率,使得利用90%或更多的营养物,和在另一方面,利用至少约95%或更多的营养物。

[0017] 在具有本文描述的培养基和产乙酸菌的生物反应器中进行的合成气发酵有效提供合成气中的CO成为醇和其它产物的转化率。在该方面,生产率可表述为STY (空时收率,表述为g总醇/(L·天))。在该方面,所述方法有效提供至少约10 g或更多总醇/(L·天)的STY (空时收率)。可能的STY值包括约10 g总醇/(L·天)-约200 g总醇/(L·天),在另一方面,约10 g总醇/(L·天)-约160 g总醇/(L·天),在另一方面,约10 g总醇/(L·天)-约120 g总醇/(L·天),在另一方面,约10 g总醇/(L·天)-约80 g总醇/(L·天),在另一方面,约20 g总醇/(L·天)-约140 g总醇/(L·天),在另一方面,约20 g总醇/(L·天)-约100 g总醇/(L·天),在另一方面,约40 g总醇/(L·天)-约140 g总醇/(L·天),和在另一方面,约40 g总醇/(L·天)-约100 g总醇/(L·天)。

[0018] 定义

[0019] 除非另外限定,否则从始至终在本说明书中用于本公开的以下术语如下定义,并且可包括以下限定的定义的单数或复数形式:

[0020] 修饰任何量的术语“约”指在实际的条件下遇到的该量的变动,例如,在实验室、中试或生产设备中。例如,当被“约”修饰时,用于混合物或量的成分或测量的量包括在实验条件下在生产设备中或在实验室中通常用于测量的关注的变动和程度。例如,当被“约”修饰时,产品的组分的量包括在设备中或在实验室中在多个实验的批次之间的变动以及在分析方法中固有的变动。无论是否被“约”修饰,该量包括那些量的等价物。本文陈述的和被“约”修饰的任何量也可用于本公开作为不被“约”修饰的量。

[0021] 术语“气态底物”以非限制性含义使用,包括含有或源自一种或多种气体的底物。

[0022] 术语“合成气”或“合成气体”表示对于含有不同量的一氧化碳和氢的气体混合物命名的合成气体。生产方法的实例包括天然气或烃的蒸汽重整以产生氢,煤的气化和一些类型的废物至能量气化设备。该名字来自它们在产生合成天然气(SNG)和用于生产氨或甲醇中用作中间体。合成气可燃并且通常用作燃料来源或用于生产其它化学品的中间体。

[0023] 术语“发酵器”包括由一个或多个容器和/或塔或管道装置组成的发酵装置,其包括连续搅拌槽反应器(CSTR)、固定单元反应器(ICR)、滴流床反应器(TBR)、移动床生物膜反应器(MBBR)、泡罩塔、气体上升发酵器、膜反应器例如中空纤维膜生物反应器(HFMBR)、静态搅拌器或适用于气-液接触的其它容器或其它装置。

[0024] 术语“发酵”、发酵过程”或“发酵反应”等旨在包括过程的生长阶段和产物生物合

成阶段二者。在一方面,发酵指CO转化为醇。

[0025] 术语“细胞密度”指每单位体积的发酵培养液中微生物细胞的质量,例如,克/升。

[0026] 术语“提高效率”、“提高效率”等当关于发酵方法使用时,包括提高以下一个或多个:在发酵中微生物的生长速率、每单位体积或质量的消耗的底物(例如一氧化碳)产生的期望的产物(例如醇)的体积或质量,期望的产物的生产速率或生产水平,和与发酵的其它副产物相比产生的期望产物的相对比例。

[0027] 本文使用的“总醇”包括乙醇、丁醇、丙醇和甲醇。在一方面,总醇可包括至少约75重量%或更多的乙醇,在另一方面,约80重量%或更多的乙醇,在另一方面,约85重量%或更多的乙醇,在另一方面,约90重量%或更多的乙醇,和在另一方面,约95重量%或更多的乙醇。在另一方面,总醇可包括约25重量%或更少的丁醇。

[0028] 术语“比CO吸收”指每单位时间(以分钟计)单位质量的微生物细胞(g)消耗的CO的量(以mmol计),即,mmol/g/分钟。

[0029] 含有CO的底物

[0030] 含有CO的底物可包括包括CO的任何气体。在该方面,含有CO的气体可包括合成气、工业用气和它们的混合物。

[0031] 合成气可由任何已知的来源提供。在一方面,合成气可源自碳质材料的气化。气化涉及在限制供应的氧中部分燃烧生物质。所得到的气体主要包括CO和H₂。在该方面,合成气将含有至少约10 mol % CO,在一方面,至少约20 mol %,在一方面,约10-约100 mol %,在另一方面,约20-约100 mol % CO,在另一方面,约30-约90 mol % CO,在另一方面,约40-约80 mol % CO,和在另一方面,约50-约70 mol % CO。合适的气化方法和设备的一些实例在均在2011年4月6日提交的美国序列号61/516,667、61/516,704和61/516,646和均在2012年3月22日提交的美国序列号13/427,144、13/427,193和13/427,247中提供,均通过引用结合到本文中。

[0032] 在另一方面,所述方法适用于支持由气态底物(例如高体积含有CO的工业烟道气)生产醇。在一些方面,包括CO的气体源自含碳废物(例如,工业废气)或源自其它废物的气化。因此,所述方法代表用于捕集原本排放至环境的碳的有效方法。工业烟道气的实例包括在黑色金属产品制造、有色金属产品制造、石油精炼过程、煤的气化、生物质气化、电力生产、炭黑生产、氨生产、甲醇生产和焦炭制造期间产生的气体。

[0033] 取决于含有CO的底物的组成,含有CO的底物可直接提供至发酵过程或可进一步改性以包括合适的H₂:CO摩尔比。在一方面,提供至发酵器的含有CO的底物的H₂:CO摩尔比为约0.2或更多,在另一方面,约0.25或更多,和在另一方面,约0.5或更多。在另一方面,提供至发酵器的含有CO的底物可包括约40摩尔%或更多的CO加上H₂和约30摩尔%或更少的CO,在另一方面,约50摩尔%或更多的CO加上H₂和约35摩尔%或更少的CO,和在另一方面,约80摩尔%或更多的CO加上H₂和约20摩尔%或更少的CO。

[0034] 在一方面,含有CO的底物主要包括CO和H₂。在该方面,含有CO的底物将含有至少约10 mol % CO,在一方面,至少约20 mol %,在一方面,约10-约100 mol %,在另一方面,约20-约100 mol % CO,在另一方面,约30-约90 mol % CO,在另一方面,约40-约80 mol % CO,和在另一方面,约50-约70 mol % CO。含有CO的底物的CO/CO₂比率为至少约0.75,在另一方面,至少约1.0,和在另一方面,至少约1.5。

[0035] 在一方面,气体分离器设置以基本上分离至少一部分气体流,其中该部分包括一种或多种组分。例如,气体分离器可由包含以下组分CO、CO₂、H₂的气体流分离CO₂,其中可将CO₂通向CO₂去除器,剩余的气体流(包含CO和H₂)可通向生物反应器。可利用本领域已知的任何气体分离器。在该方面,提供至发酵器的合成气将具有约10 mol %或更少的CO₂,在另一方面,约1 mol %或更少的CO₂,和在另一方面,约0.1 mol %或更少的CO₂。

[0036] 某些气体流可包括高浓度的CO和低浓度的H₂。在一方面,可期望优化底物流的组成,以实现较高效率的醇生产和/或总体碳捕集。例如,在将流通向生物反应器之前可提高底物流中H₂的浓度。

[0037] 根据本发明的具体的方面,可将来自两个或更多个来源的流合并和/或共混,以产生期望的和/或优化的底物流。例如,包含高浓度的CO的流(例如来自轧钢机转化炉的排气)可与包含高浓度的H₂的流(例如来自轧钢机焦炭炉的尾气)合并。

[0038] 取决于含有CO的气态底物的组成,还可期望在将其引入到发酵之前进行处理以除去任何不期望的杂质,例如灰尘颗粒。例如,可利用已知的方法过滤或洗涤气态底物。

[0039] 生物反应器设计和操作

[0040] 发酵器设计的说明描述于均在2012年5月15日提交的美国序列号13/471,827和13/471,858和2012年5月16日提交的美国序列号13/473,167,均通过引用结合到本文中。

[0041] 根据一方面,通过向反应器容器加入培养基,开始发酵过程。培养基组成的一些实例描述于2012年5月22日提交的美国序列号61/650,098和61/650,093和2001年7月23日提交的美国专利7,285,402,均通过引用结合到本文中。可将培养基灭菌以除去不期望的微生物,并且反应器用期望的微生物接种。可能不总是需要灭菌。

[0042] 在一个方面,所用微生物包括产乙酸菌。可用产乙酸菌的实例包括梭菌属(*Clostridium*)产乙酸菌,例如杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*)菌株,包括WO 2000/68407、EP 117309、美国专利5,173,429、5,593,886和6,368,819、WO 1998/00558和WO 2002/08438中所述的那些菌株;自产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*) (DSMZ的DSM 10061和DSM 19630, 德国)菌株,包括WO 2007/117157和WO 2009/151342中所述的那些菌株;和拉格利梭菌(*Clostridium ragsdali*) (P11, ATCC BAA-622)及巴奇嗜碱菌(*Alkalibaculum bacchi*) (CP11, ATCC BAA-1772),包括分别描述于美国专利7,704,723和“Biofuels and Bioproducts from Biomass-Generated Synthesis Gas”(来自生物质产生的合成气的生物燃料和生物产物), Hasan Atiyeh, 提出于Oklahoma EPSCoR Annual State Conference, 2010年4月29日的那些菌株;及食羧基梭菌(*Clostridium carboxidivorans*) (ATCC PTA-7827),描述于美国专利申请2007/0276447。其它适用的微生物包括穆尔菌(*Moorella*)属,包括穆尔菌种(*Moorella* sp.) HUC22-1;和羧基嗜热菌(*Carboxydotherrmus*)属。这些文献分别通过引用结合到本文中。可使用两种或更多种微生物的混合培养物。

[0043] 有用的细菌的一些实例包括凯伍产醋菌(*Acetogenium kivui*)、潮湿厌氧醋菌(*Acetoanaerobium noterae*)、伍氏醋酸杆菌(*Acetobacterium woodii*)、巴奇嗜碱菌(*Alkalibaculum bacchi*) CP11(ATCC BAA-1772)、产生性布洛提菌(*Blautia producta*)、嗜甲基丁酸杆菌(*Butyribacterium methylotrophicum*)、地下嗜热厌氧菌(*Caldanaerobacter subterraneus*)、太平洋地下嗜热厌氧菌(*Caldanaerobacter*

subterraneus pacificus)、产氢羧基嗜热菌(*Carboxydotherrmus hydrogenoformans*)、醋酸杆菌(*Clostridium aceticum*)、丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)、丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*) P262 (德国DSMZ之DSM 19630)、自产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*) (德国DSMZ之DSM 19630)、自产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*) (德国DSMZ之DSM 10061)、自产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*) (德国DSMZ之DSM 23693)、自产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*) (德国DSMZ之DSM 24138)、食羧基梭菌(*Clostridium carboxidivorans*) P7 (ATCC PTA-7827)、克氏梭菌(*Clostridium coskatii*) (ATCC PTA-10522)、德可氏梭菌(*Clostridium drakei*)、杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*) PETC (ATCC 49587)、杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*) ERI2 (ATCC 55380)、杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*) C-01 (ATCC 55988)、杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*) 0-52 (ATCC 55889)、大梭菌(*Clostridium magnum*)、巴氏梭菌(*Clostridium pasteurianum*) (德国DSMZ之DSM 525)、拉格利梭菌(*Clostridium ragsdali*) P11 (ATCC BAA-622)、粪味梭菌(*Clostridium scatologenes*)、热醋酸梭状芽胞杆菌(*Clostridium thermoaceticum*)、突那梭菌(*Clostridium multunense*)、库氏脱硫肠状菌(*Desulfotomaculum kuznetsovii*)、粘液真杆菌(*Eubacterium limosum*)、硫还原地杆菌(*Geobacter sulfurreducens*)、噬乙酸甲烷八叠球菌(*Methanosarcina acetivorans*)、巴氏甲烷八叠球菌(*Methanosarcina barkeri*)、热乙酸穆尔氏菌(*Morrella thermoacetica*)、热自养穆尔氏菌(*Morrella thermoautotrophica*)、芬妮产醋杆菌(*Oxobacter pfennigii*)、产生消化链球菌(*Peptostreptococcus productus*)、产生瘤胃球菌(*Ruminococcus productus*)、凯伍嗜热厌氧菌(*Thermoanaerobacter kivui*)及它们的混合物。

[0044] 发酵应期望在发生期望的发酵(例如,CO至乙醇)的适当的条件下进行。应考虑的反应条件包括压力、温度、气体流速、液体流速、培养基pH、培养基氧化还原电位、搅拌速率(如果利用连续搅拌槽反应器)、接种物水平、最大气体底物浓度,以确保液相中的CO不会变为限制性,且确保最大产物浓度以避免产物抑制。

[0045] 本发明的方法可用于维持微生物培养物的生存能力,其中微生物培养物为CO受限,使得CO传递到溶液中的速率低于培养物的吸收速率。当包含CO的底物不能连续提供至微生物培养物时,可出现这种情况;传质速率低;或在底物流中存在不足够的CO以在优化的温度下维持培养物活力。在这样的实施方式中,微生物培养物将快速耗尽在液体营养培养基中溶解的CO,并且由于其它底物不能足够快速提供而变得底物受限。

[0046] 启动:在接种后,建立有效供应初始微生物群落的初始进料气体供应速率。分析流出物气体,以测定流出物气体的含量。气体分析的结果用于控制进料气体速率。在该方面,所述方法提供约0.5-约0.9的计算CO浓度:初始细胞密度比率,在另一方面,约0.6-约0.8,在另一方面,约0.5-约0.7,和在另一方面,约0.5-约0.6。

[0047] 在另一方面,发酵方法包括向发酵培养基提供合成气,其量有效提供在发酵培养基中约0.15 mM-约0.70 mM的初始计算CO浓度,在另一方面,约0.15 mM-约0.50 mM,在另一方面,约0.15 mM-约0.35 mM,在另一方面,约0.20 mM-约0.30 mM,和在另一方面,约0.23 mM-约0.27 mM。与起始细胞密度相比,所述方法有效提高细胞密度。

[0048] 启动后:在达到期望的水平后,从反应器取出液相和细胞材料并且补充培养基。所

述方法有效提高细胞密度至约2.0 克/升或更多,在另一方面,约2-约30 克/升,在另一方面,约2-约25 克/升,在另一方面,约2-约20 克/升,在另一方面,约2-约10 克/升,在另一方面,约2-约8 克/升,在另一方面,约3-约30 克/升,在另一方面,约3-约6 克/升,和在另一方面,约4-约5 克/升。

[0049] 在一方面,所述方法包括通过以下方法提供发酵培养基:所述方法包括使包括选自Zn (也称为不良培养基)、Co、Ni中的一种或多种的元素的第二溶液与包括选自W和Se中的一种或多种的元素的第二溶液共混,其量有效提供具有约30 mS/cm或更少的电导率的发酵培养基。在另一方面,发酵培养基具有约1-约30 mS/cm的电导率,在另一方面,约1-约25 mS/cm,在另一方面,约1-约20 mS/cm,在另一方面,约1-约15 mS/cm,在另一方面,约1-约10 mS/cm,在另一方面,约1-约5 mS/cm,在另一方面,约1-约4 mS/cm,在另一方面,约1-约3 mS/cm,在另一方面,约1-约2 mS/cm,在另一方面,约2-约30 mS/cm,在另一方面,约2-约25 mS/cm,在另一方面,约2-约20 mS/cm,在另一方面,约2-约15 mS/cm,在另一方面,约2-约10 mS/cm,在另一方面,约2-约5 mS/cm,约2-约4 mS/cm,在另一方面,约2-约3 mS/cm,在另一方面,约3-约30 mS/cm,在另一方面,约3-约25 mS/cm,在另一方面,约3-约20 mS/cm,在另一方面,约3-约15 mS/cm,在另一方面,约3-约10 mS/cm,在另一方面,约3-约5 mS/cm,在另一方面,约4-约30 mS/cm,在另一方面,约4-约25 mS/cm,在另一方面,约4-约20 mS/cm,在另一方面,约4-约15 mS/cm,在另一方面,约4-约10 mS/cm,和在另一方面,约4-约5 mS/cm。

[0050] 在另一方面,元素的共混物在580 nm下的光学密度为约0.70或更少。在另一方面,共混物的光学密度为约0-约0.70,在另一方面,约0.001-约0.65,在另一方面,约0.01-约0.65,在另一方面,约0.01-约0.50,和在另一方面,约0.01-约0.45。在该方面,浊度可通过任何已知的方法测定。光学密度测量的一些实例描述于EPA Guidance Manual,Turbidity Processes,1999年4月,其通过引用而全文结合到本文中。

[0051] 在另一方面,发酵培养基具有小于约14 mM磷酸盐。在一个相关的方面,发酵培养基具有约2-约14 mM磷酸盐,在另一方面,约3-约12 mM磷酸盐,在另一方面,约3-约6 mM磷酸盐,在另一方面,约1-约3 mM磷酸盐,在另一方面,约1-约2 mM磷酸盐,和在另一方面,约2-约3 mM磷酸盐。

[0052] 在一方面,所述方法有效利用约2美制加仑或更少的提供至发酵培养基的水/美制加仑乙醇。在另一方面,所述方法有效利用约0.5-约2加仑水/加仑乙醇,在另一方面,约0.5-约1.8加仑水/加仑乙醇,在另一方面,约0.5-约1.5加仑水/加仑乙醇,在另一方面,约0.5-约1.35加仑水/加仑乙醇,在另一方面,约0.5-约1.2加仑水/加仑乙醇,在另一方面,约0.5-约1加仑水/加仑乙醇,在另一方面,约0.5-约0.9加仑水/加仑乙醇,在另一方面,约0.75-约2加仑水/加仑乙醇,在另一方面,约0.75-约1.75加仑水/加仑乙醇,在另一方面,约0.75-约1.5加仑水/加仑乙醇,在另一方面,约0.75-约1.35加仑水/加仑乙醇,在另一方面,约0.75-约1.2加仑水/加仑乙醇,在另一方面,约0.75-约1加仑水/加仑乙醇,在另一方面,约1-约2加仑水/加仑乙醇,在另一方面,约1-约1.75加仑水/加仑乙醇,在另一方面,约1-约1.5加仑水/加仑乙醇,在另一方面,约1-约1.35加仑水/加仑乙醇,在另一方面,约1-约1.2加仑水/加仑乙醇,在另一方面,约1.5-约2加仑水/加仑乙醇,在另一方面,约1.5-约1.75加仑水/加仑乙醇,和在另一方面,约1.75-约2加仑水/加仑乙醇。

[0053] 在另一方面,比起具有约3 mM或更多磷酸盐的发酵培养基,发酵培养基需要少约

10%-约40%的水。在另一方面,比起具有约3 mM或更多磷酸盐的发酵培养基,发酵培养基需要少约10%-约30%的水,在另一方面,少约10%-约20%的水,在另一方面,少约15%-约40%的水,在另一方面,少约15%-约30%的水,在另一方面,少约15%-约20%的水,在另一方面,少约20%-约40%的水,在另一方面,少约20%-约30%的水,和在另一方面,少约25%-约30%的水。在另一方面,磷酸盐浓度可为约2-约2.5 mM,和在另一方面,约2.5 mM-约3.0 mM,并且在指示的范围有效得到水降低。

[0054] 在另一方面,发酵培养基提供有约0.005 μg 或更多的Zn/分钟/g细胞,约0.0002 μg 或更多的Co/分钟/g细胞,约0.003 μg 或更多的Ni/分钟/g细胞,约0.039 μg 或更多的W/分钟/g细胞,和约0.001 μg 或更多的Se/分钟/g细胞。在该方面,发酵培养基可包括以下量的一种或多种以下元素:

[0055] Zn:在一方面,约0.005-约0.11 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.005-约0.09 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.005-约0.065 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.005-约0.04 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.01-约0.075 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.01-约0.055 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.02-约0.075 μg /分钟/g细胞,和在另一方面,约0.02-约0.055 μg /分钟/g细胞;作为一个实例,3 g/L/天/g细胞的比乙醇生产率需要约0.04 μg /分钟/g细胞的Zn进料速率;

[0056] Co:在一方面,约0.002-约0.05 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.002-约0.04 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.002-约0.03 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.002-约0.02 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.005-约0.035 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.005-约0.025 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.01-约0.035 μg /分钟/g细胞,和在另一方面,约0.01-约0.025 μg /分钟/g细胞;作为一个实例,3 g/L/天/g细胞的比乙醇生产率需要约0.018 μg /分钟/g细胞的Co进料速率;

[0057] Ni:在一方面,约0.003-约0.055 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.003-约0.045 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.003-约0.035 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.003-约0.02 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.005-约0.04 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.005-约0.03 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.01-约0.04 μg /分钟/g细胞,和在另一方面,约0.01-约0.03 μg /分钟/g细胞;作为一个实例,3 g/L/天/g细胞的比乙醇生产率需要约0.02 μg /分钟/g细胞的Ni进料速率;

[0058] W:在一方面,约0.035-约0.80 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.035-约0.65 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.035-约0.47 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.035-约0.30 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.075-约0.55 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.075-约0.40 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.155-约0.55 μg /分钟/g细胞,和在另一方面,约0.155-约0.40 μg /分钟/g细胞;作为一个实例,3 g/L/天/g细胞的比乙醇生产率需要0.29 μg /分钟/g细胞的W进料速率;

[0059] Se:在一方面,约0.001-约0.03 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.035-约0.65 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.035-约0.47 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.035-约0.30 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.075-约0.55 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.075-约0.40 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.155-约0.55 μg /分钟/g细胞,和在另一方面,约0.155-约0.40 μg /分钟/g细胞;作为一个实例,3 g/L/天/g细胞的比乙醇生产率需要

约0.01 μg /分钟/g细胞的Se进料速率。

[0060] 在另一方面,发酵培养基提供有约0.006 μg 或更多的N/分钟/g细胞、约0.025 μg 或更多的P/分钟/g细胞和约0.001 μg 或更多的K/分钟/g细胞。在该方面,发酵培养基可包括以下量的一种或多种以下元素:

[0061] N:在一方面,约0.006-约0.12 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.006-约0.095 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.006-约0.07 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.006-约0.045 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.01-约0.085 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.01-约0.06 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.02-约0.085 μg /分钟/g细胞,和在另一方面,约0.02-约0.06 μg /分钟/g细胞;作为一个实例,3 g/L/天/g细胞的比乙醇生产率需要约0.044 μg /分钟/g细胞的N进料速率;

[0062] P:在一方面,约0.025-约0.55 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.025-约0.45 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.025-约0.35 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.025-约0.20 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.05-约0.38 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.05-约0.27 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.1-约0.38 μg /分钟/g细胞,和在另一方面,约0.1-约0.3 μg /分钟/g细胞;作为一个实例,3 g/L/天/g细胞的比乙醇生产率需要约0.2 μg /分钟/g细胞的P进料速率;

[0063] K:在一方面,约0.001-约25 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.001-约0.03 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.001-约0.025 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.001-约0.02 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.001-约0.01 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.003-约0.02 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.003-约0.015 μg /分钟/g细胞,在另一方面,约0.005-约0.02 μg /分钟/g细胞,和在另一方面,约0.005-约0.015 μg /分钟/g细胞;作为一个实例,3 g/L/天/g细胞的比乙醇生产率需要约0.01 μg /分钟/g细胞的K进料速率;

[0064] 在另一方面,发酵培养基包括小于约0.02重量% NaHCO_3 ,在另一方面,小于约0.01重量% NaHCO_3 ,和在另一方面,小于约0.005重量% NaHCO_3 。 NH_4OH 可替代 NaHCO_3 用于pH调节。单独的低磷酸盐水平或与 NaHCO_3 降低的用量组合导致较低的培养基电导率。降低的培养基电导率需要较少稀释和降低的水需求,如所描述的。在一个相关的方面,发酵培养基的pH为约4.2-约4.8。

[0065] CO 进料速率可表述为标准立方英尺/分钟(SCFM)或标准立方英尺/小时/升。在该方面,标准立方英尺/小时/升可在约0.9-约2.0范围,和在另一方面,约1.25-约1.75 SCFM。在另一方面,平均 CO 进料速率为有效保持 CO 进料速率:发酵器体积的比率为约0.016:1-约0.04:1的 CO 进料速率,在另一方面,约0.02:1-约0.04:1,在另一方面,约0.02:1-约0.035:1,在另一方面,约0.025:1-约0.035:1,和在另一方面,约0.025:1-约0.03:1。

[0066] 在另一方面,所述方法包括监测 H_2 转化率和保持 H_2 转化率为约25%或更多,在另一方面,约25%-约95%,在另一方面,约30%-约90%,在另一方面,约35%-约85%,在另一方面,约40%-约80%,在另一方面,约40%-约70%,在另一方面,约40%-约60%,和在另一方面,约40%-约50%。所述方法还可包括监测 CO 吸收和保持 CO 吸收为约0.001-约10 mmol/分钟/g干细胞,在另一方面,约0.001-约5 mmol/分钟/g干细胞,在另一方面,约0.001-约4 mmol/分钟/g干细胞,在另一方面,约0.001-约3 mmol/分钟/g干细胞,在另一方面,约0.001-约2 mmol/分钟/g干细胞,在另一方面,约0.001-约1 mmol/分钟/g干细胞,在另一方面,约0.05-约9 mmol/

分钟/g干细胞,在另一方面,约0.05-约5 mmol/分钟/g干细胞,在另一方面,约0.05-约4 mmol/分钟/g干细胞,在另一方面,约0.05-约3 mmol/分钟/g干细胞,在另一方面,约0.05-约2 mmol/分钟/g干细胞,在另一方面,约0.05-约1 mmol/分钟/g干细胞,在另一方面,约1-约8 mmol/分钟/g干细胞,在另一方面,约1-约5 mmol/分钟/g干细胞,在另一方面,约1-约4 mmol/分钟/g干细胞,在另一方面,约1-约3 mmol/分钟/g干细胞,和在另一方面,约1-约2 mmol/分钟/g干细胞。

实施例

[0067] 实施例1:相容性测试

[0068] 先前利用的微量金属溶液包括以下组分(均表述为克/升)。

	储液	相容性测试
	1) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5222
	2) $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.6
[0069]	3) $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.4944
	4) Na_2SeO_3	0.16
	5) $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.2
	6) H_3PO_4 (85%)	10%
		2.35
		7.196
		2.222
		0.72
		14.404
		N/A

[0070] 需要酸性基质来保持所有以上5种微量金属在一种溶液中。然而,这些金属本身高度可溶于水。因此,如下所述进行相容测试。制备每一种微量金属的单个溶液。每一种溶液的浓度等于每一种微量金属在储液中的浓度。每一种溶液与另一种彼此混合,并且在室温下培养过夜。目视检查第二天早晨的溶液的浊度,并且用分光光度计测量(涡流的)溶液的光学密度。结果如下所示。

	1	2	3	4	5
		C	C	C	T
	1	0.007	0.016	0.001	0.487
			C	ST	T
	2		0.004	0.025	0.736
[0071]				ST	C
	3			0.051	0.001
					C
	4				0.002
	C-澄清	ST-稍微混浊			
	T-混浊			1,2,3- C	
				0.002	

[0072] 以上数据指示需要酸性基质来保持Se和W质子化,使得它们不与Zn、Co和Ni形成沉淀。基于以上发现,制备两种微量金属储液代替一种微量金属储液。第一储液包括Zn、Co和Ni,而第二储液包括W和Se。该制备方法降低 H_3PO_4 用量。为了补偿在实验室储液中完全消除磷酸,向第一储液中加入的磷酸的量从0.075 ml/L提高至0.2 ml/L。因此,在培养基中 H_3PO_4 的总净降低为76%。

[0073] 实施例2:使用降低的磷酸盐培养基

[0074] 如下在4个阶段中在稳态培养物上测试以上提及的(含有少76%磷酸的)培养基。

[0075] 1. 在稳态培养物上(T=0小时)以改性培养基代替现有培养基。

[0076] 2. 生长培养基中的 NH_4Cl 用 NH_4OH 代替。作为预防测量,将 H_2SO_4 加入到生长培养基中,以保持反应器的pH在4.5 (T=108.74小时)。

[0077] 3. 从培养基除去 H_2SO_4 , NaHCO_3 用 NH_4OH 代替作为碱,以控制反应器的pH (T=158.42小时)。

[0078] 4. 将第一储液中的组分直接加入到发酵培养基(T=489.07小时)。

[0079] 图1显示在低磷酸盐培养基上稳态杨氏梭菌培养物的性能并且使用 NH_4OH 作为碱以控制pH和用作氮源。在发酵期间的事件如下。

[0080]

事件编号	时间(小时)	行为
1	0	培养基变为低磷酸盐培养基 (2.92 mM H_3PO_4)
2	59.82	培养基变为低磷酸盐培养基 (4.38 mM H_3PO_4)
3	108.74	培养基变为含有 H_2SO_4 的低磷酸盐培养基 (2.93 mM H_3PO_4), 开始以0.4 ml/分钟的182 mM NH_4OH 泵送。
4	135.32	碱溶液从7.7% NaHCO_3 变为182 mM NH_4OH 。 NH_4OH 泵送溶液从182 mM变为92 mM
5	135.41	NH_4OH 泵送流速从0.3 ml/分钟提高至0.5 ml/分钟
6	158.42	培养基变为低磷酸盐培养基 (2.92 mM H_3PO_4), 无 NH_4Cl , 无 H_2SO_4
7	158.47	NH_4 泵送从0.6 ml/分钟降低至0.5 ml/分钟
8	181.49	NH_4 泵送从0.5 ml/分钟降低至0.4 ml/分钟
9	224.74	NH_4 泵送从0.4 ml/分钟降低至0.2 ml/分钟
10	250.09	碱溶液从182 mM变为364 mM
11	255.86	NH_4 泵送停止
12	261.61	加入5 mL 0.5M NH_4 溶液
13	264.74	以0.2 ml/分钟再次开始 NH_4 泵送
14	270.57	NH_4 泵送停止
15	279.32	维生素浓度从0.5 ml/L提高至1 ml/L
16	280.66	碱溶液从364 mM变为0.5M
17	392.22	降低的渗透物流量, 以降低细胞密度。目标3 g/L
18	441.82	维生素浓度从1.0 ml/L提高至1.6 ml/L
19	489.07	培养基变为具有作为干粉末加入的第一储液组分和以含水形式加入的第二储液的低磷酸盐培养基

[0081] 在108.74小时, 将含有0.35 ml/L H_2SO_4 (75%) 的培养基加入到反应器。从培养基除去 NH_4Cl , 并且开始 NH_4OH 泵送。这样做是为了确保将另外的碱泵送至反应器中不会超越pH设定点。基于作为 H_3PO_4 消除的质子的量计算加入的量, 考虑在该pH下 H_3PO_4 为单质子而 H_2SO_4 为二质子。后来证实培养物仍利用碱并且消除 H_2SO_4 。

[0082] 在135.32小时开始, NaHCO_3 碱溶液用 NH_4OH 代替。随着 NH_4OH 泵送的流速调节碱的浓度, 直至稳定在0.5M最终溶液。利用该浓度无需加入补充的 NH_4OH , 以向培养物提供氮。

[0083] 在279.32小时-441.82小时之间, 在培养基中维生素的浓度提高至1.6 ml/L。

[0084] 在392.22小时, 细胞密度降低至3 g/L。

[0085] 在489.07小时, 通过将第一储液组分以其固体形式直接加入到培养基(所有其它组分也这么做), 进行最终的培养基组成变化。第二储液组分作为含水溶液加入。

[0086] 虽然已借助具体的实施方案、实施例及其应用描述了本文公开的本发明, 但是在不偏离在权利要求阐述的本发明的范围下, 本领域技术人员可以对其进行许多修改和变化。

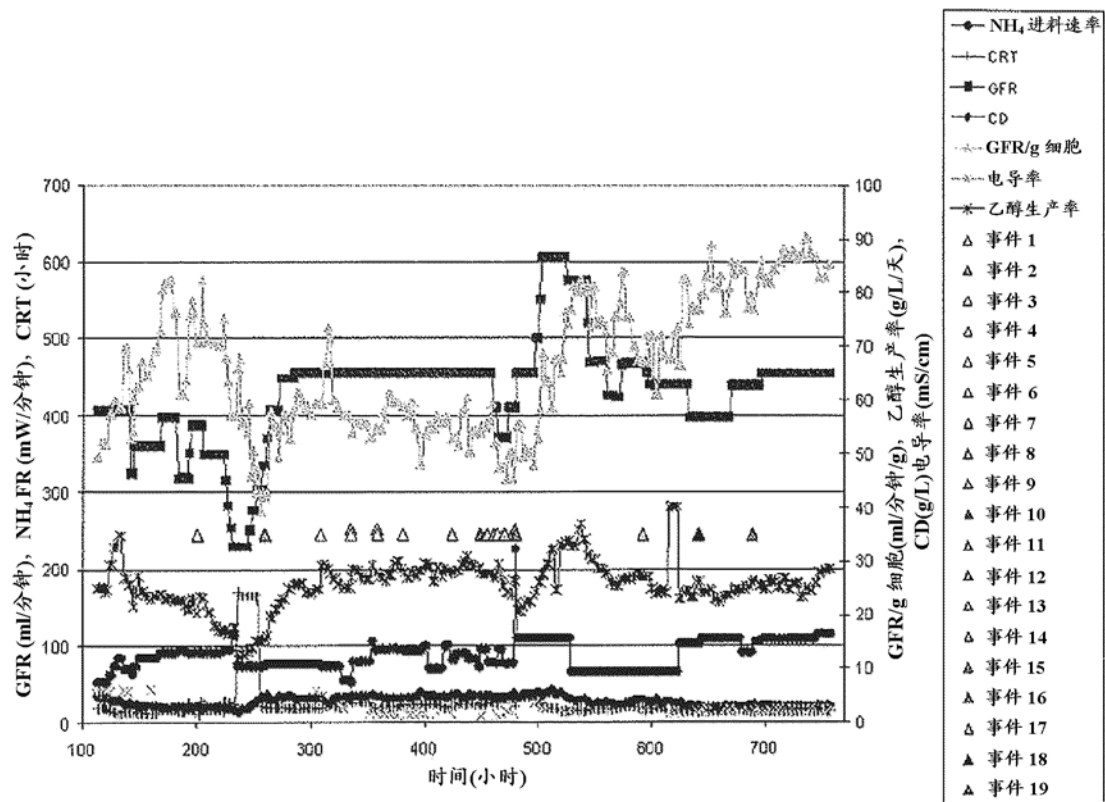


图 1