



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112955559 A

(43) 申请公布日 2021.06.11

(21) 申请号 201980063722.2

(22) 申请日 2019.09.26

(30) 优先权数据

1871106 2018.09.28 FR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.03.26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2019/075972 2019.09.26

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2020/064900 FR 2020.04.02

(71) 申请人 IFP 新能源公司

地址 法国吕埃-马迈松

(72) 发明人 H·冈萨雷斯佩纳斯 M·罗帕尔斯

E·托特 V·库帕尔德

S·梅尼尔 N·洛佩斯费雷拉

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 郭佩 杨思捷

(51) Int.Cl.

C12P 7/04 (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01)

C12P 7/16 (2006.01)

C12P 7/28 (2006.01)

C12N 11/093 (2006.01)

C12M 1/12 (2006.01)

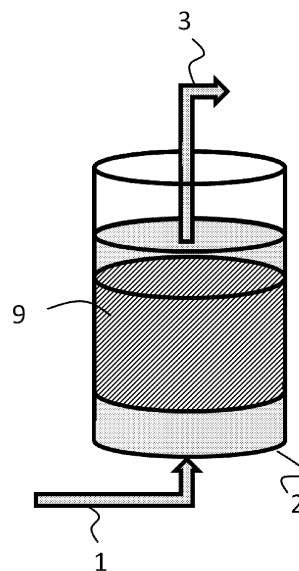
权利要求书1页 说明书12页 附图4页

(54) 发明名称

采用固体载体上的梭菌生产醇的方法

(57) 摘要

本发明涉及生产醇的方法,其中将糖液引入发酵反应器(2)中以产生相对于所述糖液而言富含异丙醇、丁醇、乙醇和丙酮的发酵醪,所述发酵反应器(2)包含由属于梭菌属的菌株产生的生物质,所述生物质被负载于包含聚氨酯泡沫的固体载体(9)上;本发明还涉及包含负载于所述固体载体(9)上的所述生物质的发酵反应器(2)。



1. 生产醇的方法, 其中将糖液引入发酵反应器 (2) 中以产生相对于所述糖液而言富含异丙醇、丁醇、乙醇和丙酮的发酵醪, 所述发酵反应器 (2) 包含由属于梭菌属的菌株产生的生物质, 所述生物质被负载于包含聚氨酯泡沫的固体载体 (9) 上。

2. 如权利要求1所述的方法, 其中所述聚氨酯泡沫具有: 其等效球直径为0.1-5mm的体积空穴; 和/或在空气中测得的10-90g/L的堆积密度。

3. 如权利要求1或权利要求2所述的方法, 其中将所述糖液连续地引入所述发酵反应器 (2) 中。

4. 如权利要求3所述的方法, 其中所述发酵以所述糖液相对于所述发酵反应器 (2) 的体积之比为 0.04h^{-1} - 1h^{-1} 的稀释率 (D) 进行。

5. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述由属于梭菌属的菌株产生的生物质包括属于选自以下的物种的细菌: 丙酮丁醇梭菌、拜氏梭菌、糖丁酸梭菌、酪丁酸梭菌、糖乙酸多丁醇梭菌、丁酸梭菌。

6. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述由属于梭菌属的菌株产生的生物质包括属于天然产生异丙醇的拜氏梭菌和/或经基因修饰以产生异丙醇的丙酮丁醇梭菌的经基因修饰的细菌。

7. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中在辅助罐 (7) 中将所述由属于梭菌属的菌株产生的生物质固定化在固体载体 (9) 上, 并将负载了所述由属于梭菌属的菌株产生的生物质的所述固体载体 (9) 引入发酵反应器 (2) 中。

8. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中将所述由属于梭菌属的菌株产生的生物质以生物膜的形式固定化在所述固体载体上。

9. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中将所述固体载体 (9) 以一个或多个块体的形式和/或以网或网格化容器 (10) 的形式引入发酵反应器 (2) 中, 所述网或网格化容器 (10) 包括多个聚氨酯泡沫立方体、平行六面体或任何其他三维形式。

10. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述固体载体 (9) 基本上为直圆柱体的形式, 其直径小于或基本上等于所述发酵反应器 (2) 的内直径。

11. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述固体载体 (9) 在所述发酵反应器 (2) 中形成流化床或固定床。

12. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中将所述固体载体 (9) 放置在所述发酵反应器 (2) 中, 以便与所述发酵反应器 (2) 的反应培养基的表面齐平。

13. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述发酵醪的产生通过厌氧发酵来进行。

14. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述发酵在 28°C - 40°C 的温度和/或约0.1MPa-0.15MPa的压力下进行, 和/或进行至少250小时的时间。

15. 发酵反应器 (2), 其包含适于产生异丙醇、丁醇、乙醇和丙酮并由属于梭菌属的菌株产生的生物质, 所述生物质负载于包含聚氨酯泡沫的固体载体 (9) 上。

采用固体载体上的梭菌生产醇的方法

技术领域

[0001] 本说明书涉及通过糖液的发酵生产醇的方法。

背景技术

[0002] 为了应对能源转型挑战,正在进行大量研究以开发“绿色”工艺,实现以替代石油精炼和/或石油化学的方式获得化学中间体。

[0003] 从发酵方法获得的醇(例如异丙醇和正丁醇)是石油化学衍生生物的最有希望的替代品。由属于梭菌属的微生物进行的ABE(丙酮-丁醇-乙醇)发酵是最古老的工业化发酵之一(在20世纪初),并且自那时以来已被广泛研究。最近,产生异丙醇、丁醇和乙醇的混合物并且也由属于梭菌属的微生物进行的IBE(异丙醇-丁醇-乙醇)发酵已经成为许多研究的主题。

[0004] 关于在这类方法中使用的发酵方法,间歇生产仍然是ABE和IBE发酵的常规方法,但是这类方法表现出低生产率,其范围为0.1-0.7g/L·h(参见,例如Jones D.T.,Woods D.R.,1986,Acetone-Butanol Fermentation Revisited. Microbiol. Rev.,50(4),484-524或表16.6 Lopez-Contreras A.等人,第16章,Bioalcohol Production: Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass,2010)。但是,这些生产率仍然太低而无法设想出经济上可行的工业方法。

[0005] 还可以设想在均质反应器中采用悬浮态细胞的连续方法。然而,生产率也相对较低并且不容易获得显著的提高。主要的技术问题之一是发酵培养基中细胞的浓度,这主要受该方法中所用的稀释率的控制。该稀释率不能高,以避免发酵罐中的细胞被“洗掉”。由于这些原因,近年来对针对微生物生物物质的高度保留的方法表现出了浓厚的兴趣。存在两种途径:“细胞的固定化”和采用借助滤膜保留的细胞“再循环”。

[0006] 经常引用用于连续方法的两种固定化技术:吸附于固体载体上和封闭(confinement),这两种技术均已在生产ABE的文献中被研究。

[0007] 在吸附于固体载体上的第一种情况下,通过静电力、范德华力或通过细菌细胞膜与载体之间的共价键合而发生微生物被物理吸附于固体表面上。由于在微生物生物膜和发酵溶液之间不存在物理屏障,可以根据固体载体、实施方式和操作条件,在固体载体的吸附程度、细胞脱附程度和再定殖(recolonization)程度之间获得各种平衡。应当注意的是,固定化的细胞通常被微生物自身分泌的多糖所包围(EPS:“胞外聚合物”),并且仅在细胞处于悬浮状态时才具有不同的生长和生物活性机制(例如,参见Halan B.,Buehler K.,Schmid A.,2012,Biofilms as living catalysts in continuous chemical syntheses,Trends in Biotechnol.,30(9),453-465)。

[0008] 已经根据ABE型发酵的文献测试了若干种固体载体,并证明它们是有利的,所述固体载体包括木炭(参见,例如Qureshi N.,Maddox I.S.,1987,Continuous solvent production from whey permeate using cells of Clostridium acetobutylicum immobilized by adsorption onto bonechar, Enzyme Microb. Technol.,(9),668-

371)、砖块(参见,例如Qureshi N.,Schripsema J.,Lienhardt J.,Blaschek H.P.,2000, Continuous solvent production by *Clostridium beijerinckii* BA101 immobilized by adsorption onto brick, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, (16), 377-382)和纸浆(参见,例如Survase S.A.,van Heiningen A.,Granström T.,2012, Continuous bio-catalytic conversion of sugar mixture to acetone-butanol-ethanol by immobilized *Clostridium acetobutylicum* DSM 792, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (93), 2309-2316)。另一方面,这样的固体载体不是合成的并造成发酵方法的再现性的主要问题。

[0009] 在包封(encapsulation)(通过封闭固定化)的情况下,将微生物引入多孔基质内,以避免它们扩散到外部培养基中,同时允许底物和营养物以及反应产物的传质。使用包封封闭技术的载体的实例包括藻酸盐珠粒(参见,例如Mollah A.H.,Stuckey D.C.,1993, Maximizing the production of acetone-butanol in alginate bead fluidized bed reactor using *Clostridium acetobutylicum*, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, (56), 83-89)和k-角叉菜胶(参见,例如Godia F.,Howard I.,Scott D.,Davison B.H.,1990, Use of immobilized microbial membrane fragments to remove oxygen and favor the acetone-butanol fermentation, *Biotechnol. Prog.*, 1990, 210-213)。

[0010] 发明概述

本说明书的第一目的是提供在反应器中进行IBEA(异丙醇-丁醇-乙醇-丙酮)型发酵的方法,其中的水力(hydraulic)稀释率不同于活性生物物质的稀释率。为此,下文描述了能够在发酵反应器中通过以生物膜形式吸附而至少部分固定细菌生物物质、改善基于体积的生产率的方法。

[0011] 根据第一方面,通过生产醇的方法获得上述目的以及其他优点,在所述方法中将糖液引入发酵反应器中以产生相对于糖液而言富含异丙醇、丁醇、乙醇和丙酮的发酵醪(fermentation must),所述发酵反应器包含由属于梭菌属的菌株产生的生物物质,所述生物物质被负载(即被固定化)于包含聚氨酯泡沫的固体载体上。

[0012] 根据一个或多个实施方案,相对于糖液,所述发酵醪包含至少0.2g/L的异丙醇、至少0.2g/L的丁醇、至少0.2g/L的乙醇和至少0.2g/L的丙酮的供给。根据一个或多个实施方案,相对于糖液,所述发酵醪包含至少0.2g/L的异丙醇、至少0.2g/L的丁醇、小于0.2g/L的乙醇和至少0.2g/L的丙酮的供给。根据一个或多个实施方案,相对于糖液,所述发酵醪包含至少0.2g/L的异丙醇、至少0.2g/L的丁醇、小于0.2g/L的乙醇和小于0.2g/L的丙酮的供给。根据一个或多个实施方案,相对于糖液,所述发酵醪包含至少1g/L的异丙醇、至少2g/L的丁醇的供给。根据一个或多个实施方案,相对于糖液,所述发酵醪包含至少2g/L的异丙醇、至少4g/L的丁醇的供给。根据一个或多个实施方案,相对于糖液,所述发酵醪包含至少3g/L的异丙醇、至少6g/L的丁醇的供给。根据一个或多个实施方案,相对于糖液,所述发酵醪包含至少4g/L的异丙醇、至少8g/L的丁醇的供给。根据一个或多个实施方案,相对于糖液,所述发酵醪包含至少10g/L的异丙醇、至少20g/L的丁醇的供给。根据一个或多个实施方案,相对于糖液,所述发酵醪包含至少15g/L的异丙醇、至少30g/L的丁醇的供给。根据一个或多个实施方案,所述发酵醪包含至少0.4g/L的异丙醇+丁醇的供给,异丙醇/(异丙醇+丁醇)之比可为0-1(例如0.01-0.99)。根据一个或多个实施方案,所述发酵醪包含至少3g/L的异丙醇+丁

醇的供给,异丙醇/(异丙醇+丁醇)之比可为0-1(例如0.01-0.99)。根据一个或多个实施方案,所述发酵醪包含至少6g/L的异丙醇+丁醇的供给,异丙醇/(异丙醇+丁醇)之比可为0-1(例如0.01-0.99)。根据一个或多个实施方案,所述发酵醪包含至少9g/L的异丙醇+丁醇的供给,异丙醇/(异丙醇+丁醇)之比可为0-1(例如0.01-0.99)。根据一个或多个实施方案,所述发酵醪包含至少12g/L的异丙醇+丁醇的供给,异丙醇/(异丙醇+丁醇)之比可为0-1(例如0.01-0.99)。根据一个或多个实施方案,所述发酵醪包含至少30g/L的异丙醇+丁醇的供给,异丙醇/(异丙醇+丁醇)之比可为0-1(例如0.01-0.99)。根据一个或多个实施方案,所述发酵醪包含至少60g/L的异丙醇+丁醇的供给,异丙醇/(异丙醇+丁醇)之比可为0-1(例如0.01-0.99)。

[0013] 此外,根据第一方面的生产方法使得可以保持微生物的较好的稳定性(例如,随着时间保持性能品质)。此外,尽管已知在发酵培养基中等于和高于一定含量时,发酵产物、特别是醇(例如丁醇)对微生物具有抑制作用,但是根据第一方面的生产方法可以至少部分地减少这些抑制产物对培养基中存在的生物活性的负面影响。

[0014] 根据一个或多个实施方案,将所述糖液连续地引入发酵反应器中。

[0015] 根据一个或多个实施方案,所述聚氨酯泡沫包括以下特征中的至少一项:

-其等效球直径为0.1-5mm、优选0.25mm-1.1mm、优选0.55-0.99mm的体积空穴(即孔洞或小室),和

-在空气中测得的10-90g/L,优选为10-80g/L,优选为15-45g/L,例如20-45g/L的堆积密度(即每单位体积的表观质量)。

[0016] 根据一个或多个实施方案,所述发酵以 0.04h^{-1} - 1h^{-1} 、优选 0.08h^{-1} - 0.5h^{-1} 、例如 0.12h^{-1} - 0.3h^{-1} 的稀释率(被定义为待转化的原料的流量(糖液的液体体积)相对于发酵反应器的液体体积之比)进行。

[0017] 根据一个或多个实施方案,相对于发酵反应器的总体积,所述发酵反应器包含按表观体积计10%-90%、优选20%-50%、优选20%-40%(例如25-30%)的固体载体。

[0018] 根据一个或多个实施方案,将固体载体至少部分地浸入、优选完全浸入反应培养基中。根据一个或多个实施方案,通过自然或强制对流用糖液物流穿过所述固体载体(例如向下、向上或径向流体循环,任选地在强制对流中(例如,Rushton型径向涡轮混合器或轴向涡轮混合器或通过载体))。

[0019] 根据一个或多个实施方案,所述发酵反应器是具有向上或向下或径向流体循环并且任选地具有逆流释放(evolution)气体的反应器。

[0020] 根据一个或多个实施方案,所述生物质由属于梭菌属且能够产生IBEA型混合物的微生物产生(和/或所述生物质包含属于梭菌属且能够产生IBEA型混合物的微生物)(所述微生物例如丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)、拜氏梭菌(*Clostridium beijerinckii*)、糖丁酸梭菌(*Clostridium saccharobutylicum*)、酪丁酸梭菌(*Clostridium tyrobutyricum*)、糖乙酸多丁醇梭菌(*C. saccharoperbutylacetonicum*)、丁酸梭菌(*C. butylicum*)和其他梭菌属物种)。所使用的微生物可以或可以不经基因修饰。更总体来说,可以使用大部分的“产生溶剂的”梭菌属物种。优选使用的菌株是属于拜氏梭菌或丙酮丁醇梭菌的菌株。它们可以或可以不是经基因修饰的菌株。经基因修饰的菌株对应于其遗传物质(DNA)相对于初始菌株已被修饰的菌株。使用本领域技术人员众所周知的

基因工具进行基因修饰(参见Pyne等人Biotech Adv. 2014 32(3):623-41和Wasels等人J. Microbiol. Methods 2017 140:5-11)。基因修饰可以对应于所用菌株的实际基因组内容的修饰,以改善其生产异丙醇/丁醇/乙醇的性能品质或其改变针对异丙醇或正丁醇的选择性的能力。基因修饰还可以对应于一种(或多种)遗传物质的整合,以改善所述方法中使用的梭菌属菌株的性能品质或针对异丙醇或正丁醇的选择性。术语“遗传物质”是指包含整合到经基因修饰的菌株的基因组中的一种或多种遗传因子(启动子、基因、终止子、调控结构等)的DNA片段(参见Walther&Francois Biotechnology Advances 34(2016)984-996中关于丙酮丁醇梭菌的综述)。根据一个或多个实施方案,由属于梭菌属的菌株产生的生物质包含属于拜氏梭菌和/或丙酮丁醇梭菌的可以或可以不经基因修饰的细菌。

[0021] 根据一个或多个实施方案,所述糖液包括获自木质纤维素的C5和/或C6糖的水溶液、和/或获自产糖植物的糖(例如葡萄糖、果糖和蔗糖)的水溶液、和/或获自淀粉类植物的糖(例如糊精、麦芽糖和其他低聚物,或甚至淀粉)的水溶液。根据一个或多个实施方案,所述水溶液包含20-800g/L(例如20-500g/L)的糖。

[0022] 根据一个或多个实施方案,所述糖液由生物质原料产生。根据一个或多个实施方案,所述生物质原料产生自可再生资源的处理。根据一个或多个实施方案,所述可再生资源包括木质纤维素生物质(例如,木质底物,例如针叶植物和落叶植物(例如针叶植物,例如云杉或松树,或落叶植物,例如桉树)、农业副产物(例如,秸秆)、或来自产生木质纤维素废料的行业(农业食品和造纸行业)的副产物、和/或专门培养的植物(例如,芒属植物、柳枝稷(风倾草))和/或产糖的植物,例如甜菜、甘蔗、菊芋和/或淀粉类植物(例如玉米和小麦)和/或块茎植物(例如木薯、菊芋和马铃薯)。根据一个或多个实施方案,所述可再生资源还包括来自造纸行业的产物和残渣的木质纤维素生物质以及木质纤维素材料转化产物。

[0023] 根据一个或多个实施方案,相对于生物质原料的总重量,所述生物质原料包含约35重量%-50重量%的纤维素,20重量%-30重量%的半纤维素和15重量%-25重量%的木质素。

[0024] 根据一个或多个实施方案,在将由属于梭菌属的菌株产生的生物质固定化(例如通过吸附)在固体载体上之前和/或之后,将固体载体放置在发酵反应器内。

[0025] 根据一个或多个实施方案,在辅助罐中将由属于梭菌属的菌株产生的生物质固定化在固体载体上,并将负载了由属于梭菌属的菌株产生的生物质(下文也称为细菌生物质)的固体载体引入发酵反应器中。可以在相对于发酵反应器而言以快速回路(“并入物流(in stream)”)运行的辅助罐内将细菌生物质固定化。在本说明书的方法中,特别可以执行间歇步骤,例如持续4-5小时,例如在将糖液连续地引入发酵反应器之前。根据一个或多个实施方案,相对于反应体积的总体积,采用细菌生物质接种溶液(例如,采用处于基本上最大生长速率的细胞)对包含/浸没所述固体载体的反应培养基实施0.5体积%-20体积%、优选1体积%-20体积%(例如10体积%)的接种率。根据一个或多个实施方案,在所述“间歇”步骤期间,将固体载体至少部分地浸入、优选完全浸入接种溶液中。根据一个或多个实施方案,将所述细菌生物质以生物膜的形式(即微生物组,其可以附着于(有机或无机的)固体表面或以离散的方式在固体表面上形成絮状物或聚集体,特别是通过自粒化)固定化在固体载体上。

[0026] 根据一个或多个实施方案,将所述固体载体以一个或多个块体的形式引入发酵反

反应器中。根据一个或多个实施方案,所述固体载体(例如以单个块体的形式)基本上为直圆柱体的形式,其直径小于或基本上等于发酵反应器的内直径。根据一个或多个实施方案,所述块体具有基本上等于发酵反应器的内直径的直径。尽管此处将块体和发酵反应器描述为直圆柱体,但是应当理解,所述块体和发酵反应器可以具有任何形状。根据一个或多个实施方案,所述块体相对于所述发酵反应器的主轴线(垂直)是同心或偏心的,或者与所述发酵反应器的径向壁相邻。

[0027] 根据一个或多个实施方案,将所述固体载体以网或网格化容器的形式引入发酵反应器中,所述网或网格化容器包括多个聚氨酯泡沫立方体、平行六面体或任何其他三维形状(条状物),例如其至少一个维度为至少3mm。根据一个或多个实施方案,所述网或网格化容器是直圆柱体,其直径小于或基本上等于发酵反应器的内直径。根据一个或多个实施方案,所述网或网格化容器具有基本上等于发酵反应器的内直径的直径。尽管此处将所述网、网格化容器和发酵反应器描述为直圆柱体,但是应当理解,所述网、网格化容器和发酵反应器可以具有任何形状。

[0028] 根据一个或多个实施方案,所述固体载体在发酵反应器中形成流化床或固定床。根据一个或多个实施方案,所述固体载体形成流化床,其保持为通过格栅(grate)至少部分并且优选完全被浸没。

[0029] 根据一个或多个实施方案,搅拌(例如机械搅拌)所述固体载体。根据一个或多个实施方案,将所述固体载体固定化在同心、例如与搅拌轴线同心的网或网格化容器内(例如,使用Robinson-Mahoney型反应器)。

[0030] 根据一个或多个实施方案,将所述固体载体(例如,一个或多个块体、网或网格化容器)放置在发酵反应器中,以便与反应培养基的表面齐平。根据一个或多个实施方案,将所述糖液直接引入所述一个或多个块体、所述网或网格化容器的上方或下方。

[0031] 根据一个或多个实施方案,所述发酵是厌氧发酵(例如严格厌氧发酵),例如在惰性气体的供给下(例如在氮气下)。

[0032] 根据一个或多个实施方案,所述发酵在28°C-40°C、优选30°C-37°C(例如36°C)的温度、和/或约0.1MPa-0.15MPa的压力(即大气压+水压头)下进行。

[0033] 根据一个或多个实施方案,所述发酵连续进行至少250小时,优选至少500小时,没有任何上限(例如5000小时)。

[0034] 根据第二方面,通过发酵反应器(2)获得上述主题以及其他优点,所述发酵反应器(2)包含由属于梭菌属的菌株产生的生物质,所述生物质负载于包含聚氨酯泡沫的固体载体(9)上。

[0035] 根据一个或多个实施方案,将在发酵反应器的出口处获得的发酵醪的至少一部分再循环到发酵反应器的入口中。特别地,可以实现与总停留时间无关的线速度。

[0036] 在阅读下文的描述并参考以下附图时,提供上文提及的方法的实施方案以及所述方法的其他特征和优点,下文的描述仅出于非限制性的举例说明目的给出。

附图说明

[0037] 图1是根据本说明书的实施方案的生产醇的方法的示意图。

[0038] 图2是根据本说明书的实施方案的固体载体的示意图,该固体载体的直径基本上

等于发酵反应器的内直径。

[0039] 图3是根据本说明书的实施方案的固体载体的示意图,该固体载体与所述发酵反应器同心、偏心或者与所述发酵反应器的壁相邻。

[0040] 图4是根据本说明书的实施方案的固体载体的示意图,该固体载体包括被限制在网或网格化容器中的由聚氨酯泡沫制成的元件。

[0041] 图5是根据本说明书的实施方案的固体载体的示意图,该固体载体形成被浸没包括在发酵反应器中的流化床。

[0042] 图6是根据本说明书的实施方案的生产醇的方法的示意图,所述方法还包括发酵精制步骤。

[0043] 图7显示了参比方法的IBEA体积生产率随所施加的稀释率的变化。

[0044] 实施方案的描述

现在将详细描述根据第一方面的方法和根据第二方面的反应器的实施方案。在下文的详细描述中,呈现了许多具体细节以便提供对所述方法的更深入的理解。然而,对于本领域技术人员而言显而易见的是,可以在没有这些具体细节的情况下执行所述方法。在其他情况下,没有详细描述众所周知的特征,以避免不必要地使描述复杂。

[0045] 在下文中,术语“包括”与“含有”和“包含”同义(表示相同的意思),是包括性或开放性的,并且不排除其他未指定的要素。另外,在本说明书中,术语“大致”、“基本上”、“根本上”和“大约”与给定值的大于和/或小于10%的裕度同义(表示相同的意思)。

[0046] 糖液

根据一个或多个实施方案,所述糖液包括获自木质纤维素的C5和/或C6糖的水溶液、和/或获自产糖植物的糖(例如葡萄糖、果糖和蔗糖)的水溶液、和/或获自淀粉类植物的糖(例如糊精、麦芽糖和其他低聚物,或甚至淀粉)的水溶液。根据一个或多个实施方案,所述C5和/或C6糖的水溶液产生自可再生资源的处理。根据一个或多个实施方案,所述可再生资源为木质纤维素生物质的类型,其可特别地包括木质底物(例如针叶植物和落叶植物)、农业副产物(例如,秸秆)、或来自产生木质纤维素废料的行业(例如农业食品和造纸行业)的副产物。所述可再生资源也可以产生自产糖的植物(例如甜菜和甘蔗)或产生自淀粉类植物(例如玉米和小麦)。所述C5和/或C6糖的水溶液也可以产生自各种可再生资源的混合物。

[0047] 由属于梭菌属的菌株产生的生物质

细菌生物质主要以生物膜的形式吸附于固体载体上。优选地,所述细菌是属于拜氏梭菌和/或丙酮丁醇梭菌的菌株。在所述方法中使用的细菌可以是或可以不经基因修饰并且天然产生异丙醇的菌株、和/或天然产生丙酮并且经基因修饰以产生异丙醇的梭菌属菌株。

[0048] 固体载体

所述固体载体包含聚氨酯泡沫。聚氨酯泡沫是特别有利的,因为它不仅实现IBEA型混合物的生产,而且还允许通过固定化细菌生物质来获得连续型生产。具体而言,本申请人已经证明聚氨酯泡沫能够以足够显著的方式(即超出导致细胞被洗掉的稀释率)固定梭菌属细菌,从而可以连续生产IBEA型混合物。此外,聚氨酯泡沫适合通过浸在反应器中来固定化。

[0049] 根据一个或多个实施方案,所述聚氨酯泡沫具有:

-其等效球直径为0.1-5mm、优选0.25mm-1.1mm、优选0.55-0.99mm的体积空穴(即孔洞或小室),和/或

-在空气中测得的10-90g/L,优选为10-80g/L,优选为15-45g/L,例如20-45g/L或25-45g/L的堆积密度(即每单位体积的表观质量)。

[0050] 孔径测量方法的描述:X射线断层扫描法

特别地,可以通过使用X射线微扫描仪(例如HR 70kV 200 microA点聚焦介质管;Varian像素检测器:6微米;采集时间:2小时)对样品(例如7mm×7mm×15mm)进行分析以及对泡沫的代表性体积的重建(例如重建体积为5mm×5mm×5mm,体素尺寸为6微米)(假设是球形小室)来获得体积空穴的等效球直径。

[0051] 直径测量通过使用Avizo软件对用X射线微扫描仪采集的3D体积进行3D图像分析完成。通过图像分析将小室人为封闭,以便估算其体积,然后估算其直径。给定小室的直径相当于具有相同体积的球体的直径。图像分析的各种步骤如下:

- 图像的阈值化(黑色=小室,白色=壁);
- 通过在Avizo上的xy集水区法(catchment basin method)对“小室”进行2D划分;
- 通过在Avizo上的3D集水区法对小室进行3D划分;
- 去除边缘小室(不完整的小室);
- 测量重建小室的体积;
- 估算小室的直径(具有相同体积的等效球体的直径);和
- 用于比较的小室的尺寸分布。

[0052] 方法

图1示出了由木质纤维素生物质类型的底物生产醇混合物的示意图。

[0053] 参考图1,将包含例如C5和/或C6糖的糖液经由管线1引入发酵反应器2中以进行发酵步骤。

[0054] 在发酵反应器2中,使糖液与负载于包含聚氨酯泡沫的固体载体上的细菌生物质接触。由此通过微生物将可发酵的糖(例如C5和/或C6糖)转化为醇和/或溶剂,以产生(第一)发酵醪(或含酒精物质(liquor)或发酵酒(wine)),相对于糖液而言,所述发酵醪尤其富含异丙醇、丁醇、乙醇和丙酮。

[0055] 发酵反应器2中的发酵步骤可以在28°C-40°C、优选30°C-37°C的温度下进行,从而使得所述发酵醪包含IBEA型的发酵反应产物,例如异丙醇,然后经由管线3将所述发酵醪排出。

[0056] 将所述发酵醪经由管线3引入分离单元4(任选的),以从发酵醪中分离和提取目标化合物,所述化合物经由管线5移除。经由管线6将分离残渣(通常称为酒糟(vinasses))从分离单元4中移除。所述酒糟通常由水以及在前述步骤过程中未转化或未提取的任何液体或固体产物组成。分离单元4可以执行一次或多次蒸馏,并且任选地通过例如离心、倾析和/或过滤来分离固体物质和/或悬浮态的物质。

[0057] 现有技术中存在的若干种发酵反应器实施方式或技术适于通过将细菌生物质吸附于固体载体上来将其固定化,并且无论是在发酵反应器2内部还是在“并入物流”模式的辅助罐中进行,都可以这样做。例如,在发酵反应器2中可以直接将细菌生物质固定化在固体载体上,或者在辅助罐7(任选的)(例如相对于发酵反应器2而言其以“并入物流”模式运

行)中将细菌生物物质间接固定化在固体载体上。然后可以例如经由管线8或经由任何其他方式将如此负载了细菌生物物质的固体载体引入发酵反应器中。

[0058] 根据一个或多个实施方案,所述固体载体形成流化床或固定床。

[0059] 在流化床的情况下,可以沿向下的方向直接在聚氨酯泡沫床上形成液体物流(因为发酵醪的密度通常大于聚氨酯泡沫的密度)。根据一个或多个实施方案,糖液的液体表面速度大于最小流化速度。根据一个或多个实施方案,随着发酵过程中发生的密度差变化来改变(例如增加)糖液的液体表面速度。例如,随着生物膜在固体载体上的逐渐形成,固体载体的密度可能会发生变化(例如增加),从而产生不断发展的水力工况(例如在发酵开始和发酵结束时不同的任选再循环速率)。

[0060] 在固定床的情况下,可以设想包含松散或结构化堆叠的聚氨酯泡沫颗粒的固体载体,存在或不存在机械搅拌(例如在柱体(column)内)。

[0061] 根据一个或多个实施方案,发酵培养基作为上升流或下降流流过固体床。例如,在向下的液体循环的情况下,可以提供使气体逆流释放的系统。根据一个或多个实施方案,也可以在发酵反应器2中设想径向循环,例如,在发酵反应器2的中心处施加机械搅拌(例如,Rushton型径向涡轮混合器)的情况下。根据一个或多个实施方案,将所述固体固定化在与搅拌轴线同心的篮内,特别是使得可以控制反应培养基的速度和施加在所述培养基周围的流体动力学(例如Robinson-Mahoney型反应器)。

[0062] 浸入和使用固体载体

根据一个或多个实施方案,将所述固体载体部分或全部浸入,以特别地增加生物膜的形成并改善性能。

[0063] 根据一个或多个实施方案,将所述固体载体以单个块体的形式引入,例如以直径小于或基本上等于发酵反应器2的内直径的圆柱体的形式引入。根据一个或多个实施方案,如图2所示,固体载体9的直径基本上等于发酵反应器2的内直径。该块体因此可以相当于其内生长有生物膜的过滤介质。尽管控制可能被糖液夹带的不溶性材料的供给可能是更加困难的,但是如图1所示的使用发酵反应器2的方法的性能品质是最高的。另一方面,如图2所示的固体载体9可以在较低的水平处在游离液相中产生轻微的正压。应该注意的是,如果在发酵过程中释放大量气体,则在固体载体的下方可能会形成气袋(gas pocket),并且在气体排出期间可能会在固体载体9内部产生优先通道。

[0064] 根据一个或多个实施方案,如图3所示,固体载体9的块体可以与发酵反应器2同心、偏心或与发酵反应器2的壁相邻。有利地,固体载体9以任何方式都不会破坏所述方法的入口或出口处的液体循环,特别是当所述方法连续进行时。此外,可能存在的不溶性材料,例如产生自主要谷物的那些,不会引起任何问题。经由管线1到达的糖液物流也可以在固体载体9的块体的水平处引入,例如当固体载体9的块体与发酵反应器2的反应培养基的表面齐平时。有利地,当固体载体在糖液入口的水平处与反应培养基的表面齐平时,该培养基的局部醇浓度较低,并且促进了细菌的生长。

[0065] 应当理解,不需要使用整体式固体载体9。根据一个或多个实施方案,所述固体载体包括网或网格化容器10,其包括具有或大或小的尺寸(例如,至少一个维度为3mm-10m,例如2cm-1m)的立方体或平行六面体或具有任何形状的其他三维元件(例如,多面体),如图4所示,所述元件由聚氨酯泡沫构成。根据一个或多个实施方案,网或网格化容器10形成圆柱

体,其直径小于或基本上等于发酵反应器2的内直径。根据一个或多个实施方案,网或网格化容器10具有基本上等于发酵反应器2的内直径的直径。

[0066] 可能会出现气体释放具有使固体载体9上升的趋势。另一方面,穿孔板、简单的网或格栅11(参见图5)可足以使(例如移动中的)固体载体保持在发酵反应器2中。

[0067] 在图2至图5的实施方案中,发酵反应器2具有向上的流体循环。另一方面,可以理解,糖液的循环方向可以是向下的。还应理解,循环方向可以是总体向上或向下的(从发酵反应器的外部来看),和在发酵反应器2的内部是径向的。

[0068] 精制步骤

如图6所示,醇生产方法可以使用被称为“精制器”(任选的)的精制反应器12。根据一个或多个实施方案,将经由管线3从发酵反应器2中取出的发酵醪引入适于产生第二发酵醪的精制反应器12中,所述第二发酵醪相对于从发酵反应器2中取出的发酵醪而言富含IBEA。然后从精制反应器12中取出第二发酵醪,并经由管线6排出,并引入分离单元4(任选的)中以从发酵醪中分离和提取目标化合物,所述化合物经由管线5移除。精制反应器12优选不含PU泡沫。所述精制器优选是均质的,并且其目的在于通过延长的停留时间来最佳利用梭菌属菌株的IBEA效价潜力(titer potential),以及增加一定量的满足该菌株需求的碳基底物。精制反应器12特别可以确保糖的消耗。

[0069] 根据一个或多个实施方案,醇生产方法包括部分回收所产生的存在于第一发酵醪和/或第二发酵醪中的IBEA化合物的步骤。提取IBEA化合物的步骤包括采用送入发酵反应器2和/或精制反应器12中的加压气体来汽提从而夹带存在于水相中的醇的步骤。

[0070] 根据一个或多个实施方案,汽提气体是直接通过发酵产生的气体,并且在使用其之前已经预先存储(通过本领域技术人员已知的方法)。汽提气体通常包含二氧化碳以及可能的氢气。采用气体汽提的步骤可以有利地在发酵过程中控制培养基中存在的醇的含量,从而限制当醇含量达到临界值时产生的对微生物的抑制。根据一个或多个实施方案,采用气体汽提的步骤可以连续或间歇进行。发酵气体的流量相对于发酵罐体积之比为例如0.5-2.5l/l/min,优选为0.7-1.1l/l/min。

[0071] 根据一个或多个实施方案,还可以进行回收过程,从而使采用气体汽提的步骤在含有与水不混溶的有机溶剂的精制器12中进行,该溶剂在发酵醪的上方形成上层有机相。此外,将溶剂选择为与微生物是生物相容的。

[0072] 因此,将汽提气体注入发酵醪中,从而将产生的醇夹带至上层有机相中,从而当汽提气体通过所述有机相时,一部分的醇被转移到有机相中。

实施例

[0073] 参比例:悬浮态细胞的连续测试

采用悬浮态细胞的连续测试是通过实验进行的。在总体积为5 L的生物反应器中装入1.8 L的发酵培养基。将初始的葡萄糖设定为60g/L,接种量为0.2L,即在为了确保从测试开始起的(严格)厌氧条件而采用氮气吹扫1小时后,采用处于最大生长速率下的细胞相对于发酵培养基的总体积实施10体积%的接种率。在初始的间歇步骤期间(4-5小时),保持用氮气吹扫。使用的微生物是拜氏梭菌DSM6423。从测试开始起,将温度和机械搅拌分别设定为36°C和60rpm;压力基本上是大气压+生物反应器的水压头。该测试分2个步骤进行:

-对应于滞后时间和指数生长开始的第一间歇步骤(持续4-8小时)(伴随发酵气体的产生);和

-第二连续模式步骤,其中施加不同的稀释率。

[0074] 出于稳定的目的,在每个新的标称值下允许经过对应于至少三倍(优选至少五倍)的停留时间的时段。接下来,分析发酵醪的葡萄糖和主要代谢产物(即异丙醇、丁醇、乙醇和丙酮)。

[0075] 图7显示了IBEA的体积生产率 r (g/L·h)随生物反应器中施加的稀释率 D (h^{-1})的变化。将稀释率 D 定义为进入反应器的体积流量除以反应器体积。在采用悬浮态微生物的方法的情况下,该参数可以同时视为流体和微生物的停留时间的倒数。因此,高于特定的稀释率时,出现细胞被洗掉,从而导致体积生产率的损失。在这种情况下,临界稀释率为0.04-0.06 h^{-1} ,此时IBEA的最大生产率达到约0.45g/L·h的值。

[0076] 根据本说明书的实施例1:采用聚氨酯泡沫的间歇模式的测试

通过实验进行间歇模式的方法:采用具有不同物理和结构特征的聚氨酯泡沫类型的固体载体(泡沫1,泡沫2)的两种发酵和对照发酵(悬浮态细胞)。下表1列出了这两种泡沫的主要特征:

表1

固体载体	泡沫1	泡沫2
孔径(mm)	0.73	1
堆积密度(g/L)	29.8	20.5

[0077] 在若干个生物反应器中装入20mL的发酵培养基,为了确保不存在氧气,该发酵培养基已被预先放置在厌氧条件下。将相对于生物反应器的总体积的40%的固体体积(表观体积)引入每个生物反应器中。将初始葡萄糖设定为90g/L,采用处于最大生长速率下的细胞的接种率为10%(液体体积)(所有发酵的接种量相同)。使用的微生物是拜氏梭菌DSM6423。将生物反应器全部置于厌氧罐中并在设定温度(36°C)下放置12天。压力基本上是大气压+生物反应器的水压头。接下来,分析最终发酵醪以及负载了生物膜的固体。每个操作条件都按一式三份执行,以确保实验的可重复性。

[0078] 聚氨酯泡沫类型的固体的存在对随后的葡萄糖消耗上升率(overconsumption)(见下表2)和最终的IBEA效价有若干影响。

[0079] 表2

固体载体	泡沫1	泡沫2
葡萄糖消耗量(g/L)	51.4	44.7
葡萄糖消耗上升率(%) (相对于不含根据本说明书的固体载体的对照而言)	31.4	14.3

[0080] 由被认为是恒定的发酵收率和基于每次测试的葡萄糖消耗量来定量效价。因此,采用泡沫1和泡沫2的间歇发酵分别产生17.5g/L的IBEA和15.2g/L的IBEA,在这两种情况下的效价均大于采用对照发酵获得的效价(13.3g/L的IBEA)。

[0081] 根据本说明书的实施例2:采用聚氨酯泡沫的连续测试

根据本说明书的实施方案通过实验进行该方法,使用连续模式并固定化在具有不同物理和结构特征的聚氨酯泡沫类型的固体载体(泡沫1,泡沫2)上的两种发酵。这两种泡沫的主要特征列于表1。填充以松散模式进行,立方体尺寸为3mm×5mm×5mm。

[0082] 将固体载体引入112ml的玻璃柱中(尺寸:内直径= 32mm,H = 13.9cm),该固体载体在柱中的体积占柱的总内部体积的50%。将该柱放置在第二发酵瓶的再循环回路中,第二发酵瓶的发酵培养基的体积达到80ml。通过用氮气吹扫将整个发酵系统预先置于厌氧条件下,以确保没有氧气。将原料罐中的葡萄糖设定为90g/L,并且相对于发酵培养基的总体积,采用处于最大生长速率下的细胞对固体载体实施10体积%的接种率。使用的微生物是拜氏梭菌DSM6423。在不搅拌的情况下将系统温度设定为(36℃)。压力基本上是大气压+玻璃柱的水压头。该测试分2个步骤进行:

-对应于“滞后时间”和指数生长开始的第一间歇步骤(持续4-5小时)(伴随发酵气体的产生);和

-第二连续模式步骤,其中施加不同的稀释率。

[0083] 出于稳定的目的,允许在每个新的标称值下经过对应于至少三倍的停留时间的时段。在无菌条件下从柱中定期收集最终发酵醪,并分析葡萄糖和主要代谢产物(即异丙醇,丁醇,乙醇和丙酮)。

[0084] 聚氨酯泡沫类型的固体载体的存在对连续模式的发酵有若干影响:下表3示出了发酵随着施加的稀释率的变化,葡萄糖消耗百分数(%)的变化、IBEA的总含量(g/L)的变化和IBEA的体积生产率(g/L·h)的变化。相对于悬浮态细胞的情况(参比例)而言,在将细胞固定化在泡沫1(6倍)或泡沫2(3倍)上的情况下,观察到生产率的提高。

[0085] 表3

	泡沫 1	泡沫 2	游离细胞
稀释率(h ⁻¹)	0.14	0.14	0.05
葡萄糖消耗量(g/L)	48.6	23.4	28.8
IBEA 含量(g/L)	17	9	9
体积生产率(g/L·h)	2.46	1.3	0.4

[0086] 尽管详细描述了上文提及的实施方案和实施例,但是应当理解,还可以设想其他实施方案。例如,根据本说明书的方法中使用的细菌生物物质可以对应于拜氏梭菌DSM 6423以外的菌株。此外,根据本说明书的聚氨酯泡沫可以不同于表1中所述的那些。此外,可以通过除了在实施例中指出的那些以外的接种率、糖含量、稀释率、温度、压力、搅拌条件、持续时间等获得改善的IBEA含量和体积生产率。

[0087] 除非在本说明书中另外提及,否则对于本领域技术人员显而易见的是,可以将上述所有实施方案组合在一起。例如,除非另有说明,否则上述实施方案的所有特征可以与其他实施方案的其他特征组合或用其替换。

[0088] 根据本说明书的实施例3:采用聚氨酯泡沫的连续测试

根据本说明书的实施方案通过实验进行该方法,使用连续模式并固定化在聚氨酯泡沫类型的固体载体上的两种发酵。填充以松散模式进行,立方体尺寸为10mm×10mm×7mm。所述泡沫具有约1mm的大孔尺寸。

[0089] 两个发酵罐均为玻璃柱的形式,工作体积为250ml。发酵罐的填充条件列于表4。

[0090] 表4

	发酵罐 1	发酵罐 2
泡沫质量(g)	2.03	3.04
液体的工作体积(mL)	250	250
堆积密度(g/L)(%)	37	37

[0091] 在反应器的入口和出口之间设置再循环回路,以在发酵罐中保持良好的均化。液体出口呈现溢流。通过用氮气吹扫将整个发酵系统预先置于厌氧条件下,以确保没有氧气。将原料罐中的葡萄糖浓度设定为60g/L。相对于发酵培养基的总体积,采用处于最大生长速率下的细胞将发酵罐接种至10体积%。使用的微生物是拜氏梭菌DSM6423。将系统的温度设定为34℃,除了再循环以外不进行搅拌。压力基本上是大气压。

[0092] 该测试分2个步骤进行:

-对应于“滞后时间”和指数生长开始的第一间歇步骤(持续7小时)(伴随发酵气体的产生);和

-第二连续模式步骤,其中施加不同的稀释率。

[0093] 在第二步骤中,稀释率随溶剂浓度连续增加。在无菌条件下定期收集发酵醪,并分析葡萄糖和主要代谢产物(即异丙醇、丁醇、乙醇和丙酮)。还测量pH值。

[0094] 将这两个发酵罐运行912小时。稀释率为 0.02h^{-1} - 0.23h^{-1} 。在发酵200小时后,IBEA的总含量为8-16g/L。在500小时之前,两个反应器的最大体积生产率为 $1.5\text{g/L}\cdot\text{h}$ 的IBEA。在整个测试中,最佳性能为发酵罐1提供 2.44g/L/h 的IBEA的最大体积生产率,为发酵罐2提供 2.24g/L/h 的IBEA的最大体积生产率。

[0095] 根据本说明书的实施例4:在搅拌反应器中采用聚氨酯泡沫的连续测试

采用固定化在聚氨酯泡沫类型载体上的细胞通过实验进行连续模式的测试。在总体积为5L的生物反应器中装入2L的发酵培养基。将初始葡萄糖设定为60g/L,接种量为0.2L,即在为了确保从测试开始起的(严格)厌氧条件而采用氮气吹扫1小时后,采用处于最大生长速率的细胞相对于发酵培养基的总体积实施10体积%的接种率。在初始间歇步骤期间(7小时),保持用氮气吹扫。使用的微生物是拜氏梭菌DSM6423。将温度设定为34℃。机械搅拌为60-170rpm。压力基本上是大气压+生物反应器的水压头。

[0096] 该测试分2个步骤进行:

-对应于“滞后时间”和指数生长开始的第一间歇步骤(持续7小时)(伴随发酵气体的产生);和

-第二连续模式步骤,其中施加不同的稀释率。

[0097] 在第二步骤中,稀释率随溶剂浓度连续增加。在无菌条件下定期收集发酵醪,并分析葡萄糖和主要代谢产物(即异丙醇、丁醇、乙醇和丙酮)。还测量pH值。

[0098] 将这两个发酵罐运行约765小时。稀释率为 0.02h^{-1} - 0.2h^{-1} 。在100小时后,IBEA的总含量为5-16g/L。该发酵获得的最大体积生产率为 $1.6\text{g/L}\cdot\text{h}$ 的IBEA。

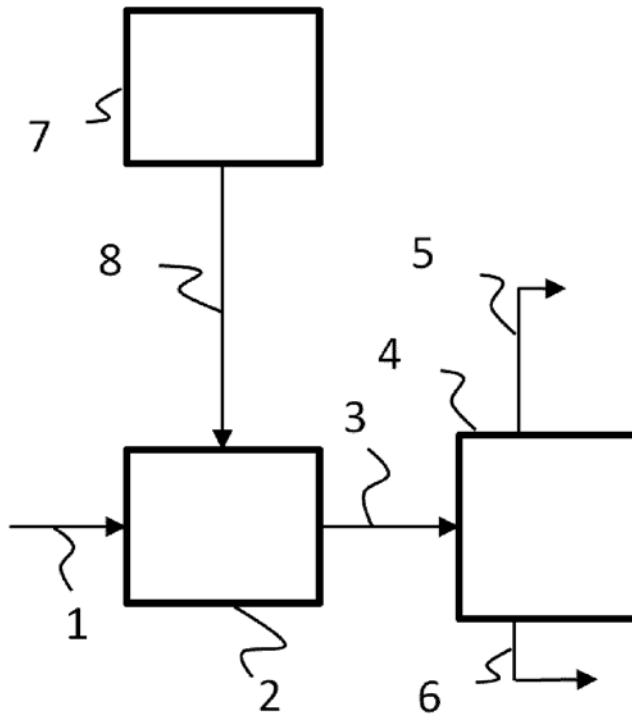


图 1

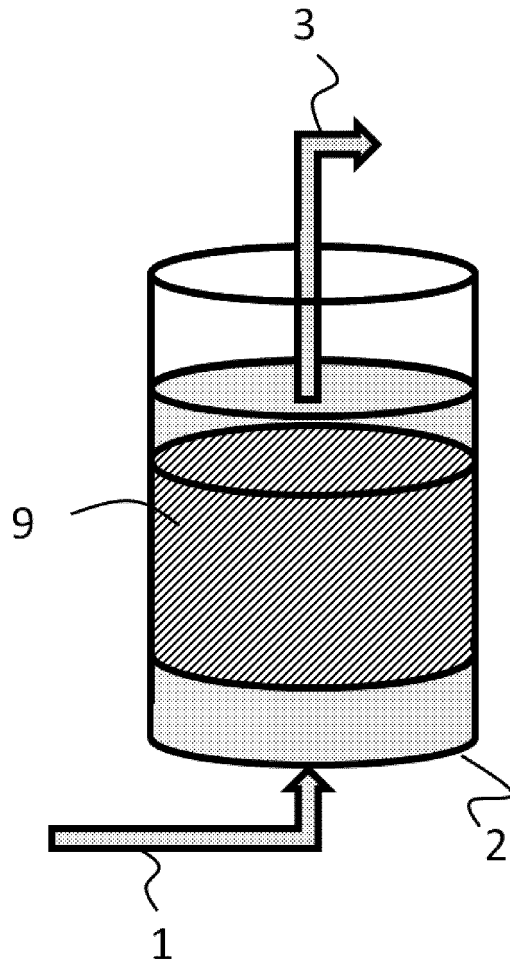


图 2

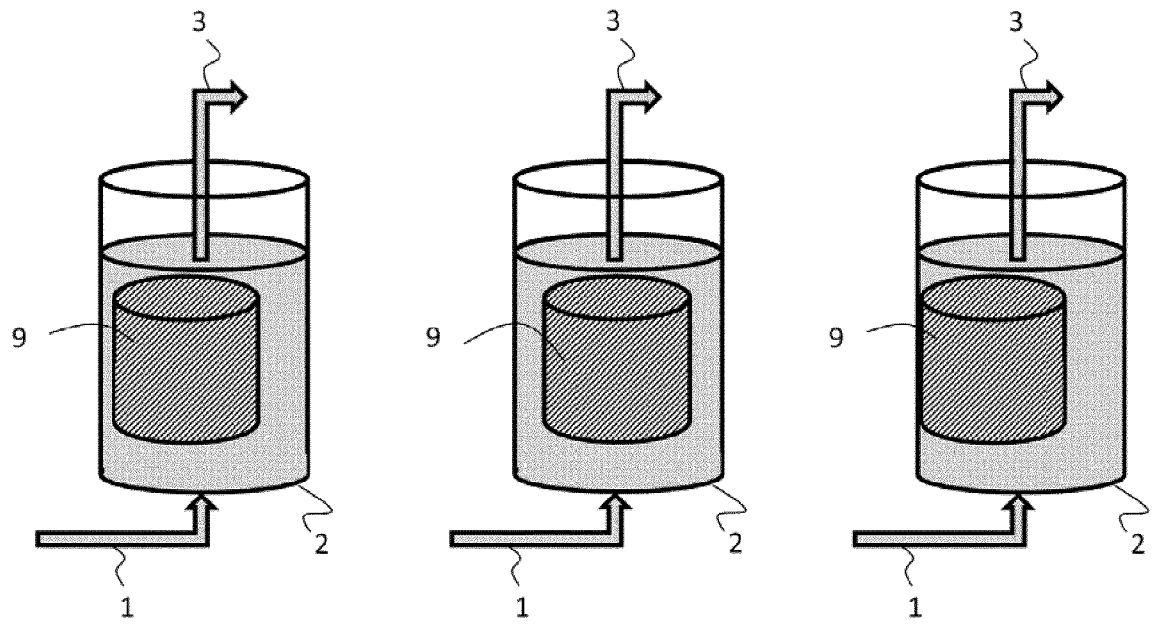


图 3

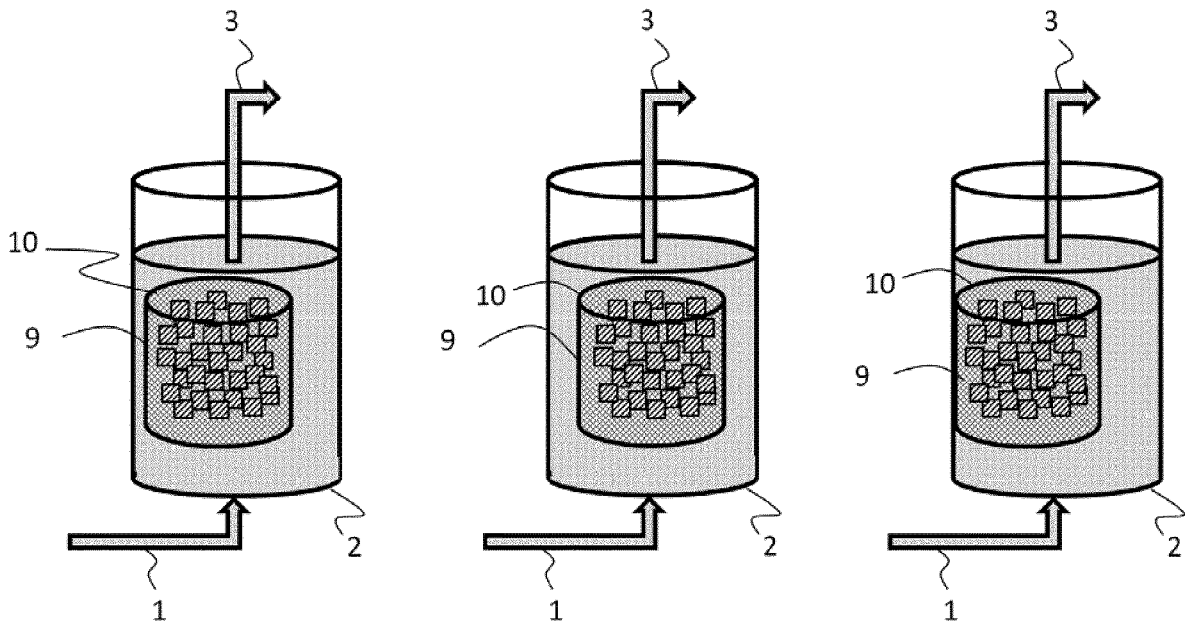


图 4

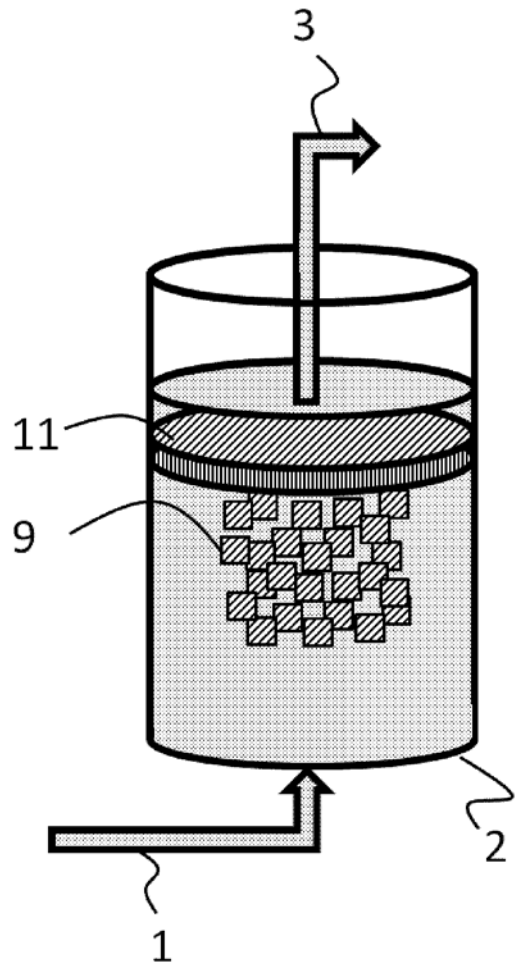


图 5

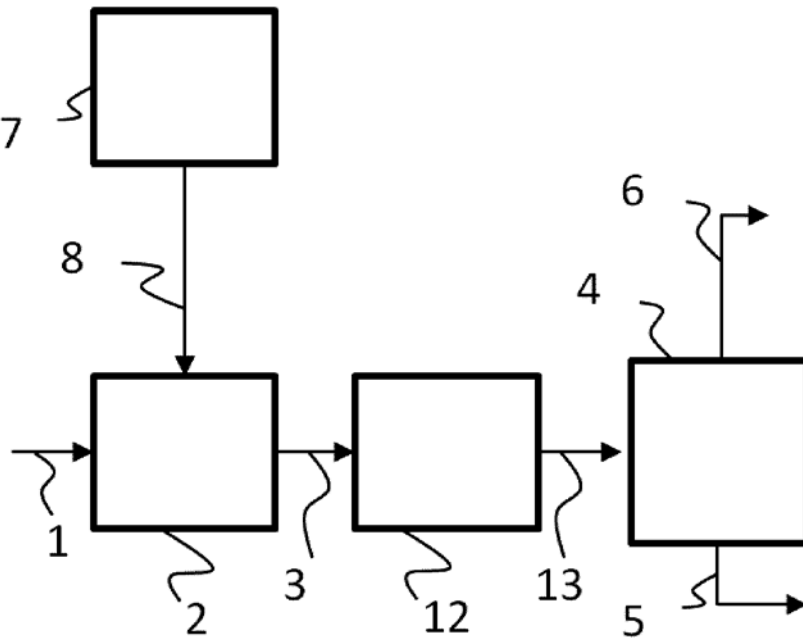


图 6

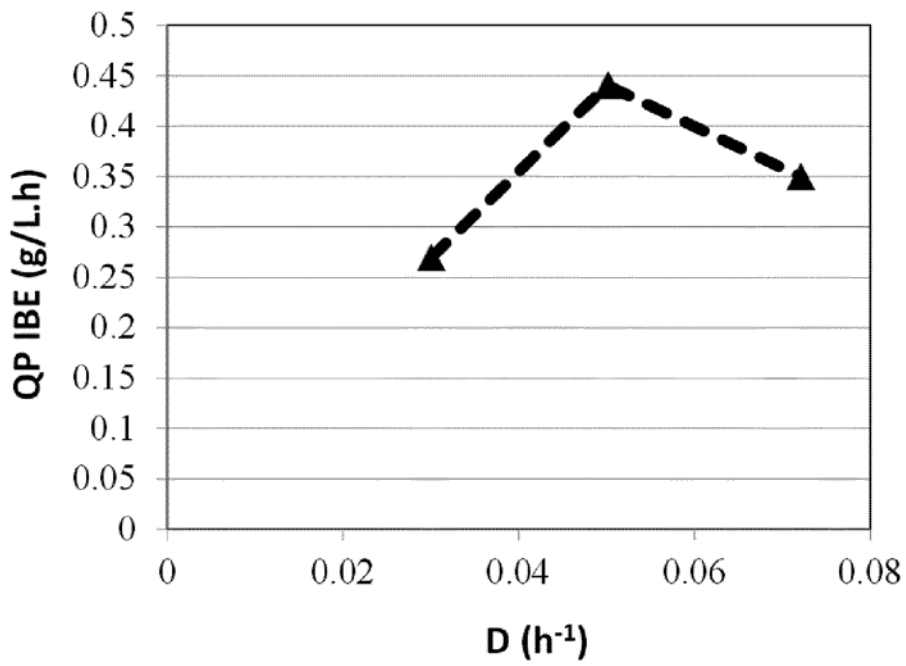


图 7