



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113646437 A

(43) 申请公布日 2021.11.12

(21) 申请号 202080024671.5

(22) 申请日 2020.03.24

(30) 优先权数据

19165775.8 2019.03.28 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.09.26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2020/058097 2020.03.24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/193516 EN 2020.10.01

(71) 申请人 帝斯曼知识产权资产管理有限公司

地址 荷兰海尔伦

(72) 发明人 亨德里克·简·诺曼

(74) 专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理
有限责任公司 11258

代理人 肖善强

(51) Int.Cl.

C12P 7/08 (2006.01)

C12P 7/02 (2006.01)

C12P 7/40 (2006.01)

C12M 1/107 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书10页 附图8页

(54) 发明名称

温室气体改进发酵

(57) 摘要

本发明涉及一种培养能够利用有机原料的微生物的方法,所述方法包括以下步骤:(i)在一个或多个生物反应器(1)中培养微生物;(ii)从一个或多个生物反应器(1)中捕获CO₂并在还原单元(3)中将CO₂还原为有机原料;(iii)将至少一部分来自还原单元(3)的有机原料进料到一个或多个生物反应器(1)中。

1. 一种培养能够利用有机原料的微生物的方法,所述方法包括以下步骤:
 - (i) 在一个或多个生物反应器 (1) 中培养微生物;
 - (ii) 从所述一个或多个生物反应器 (1) 捕获 CO_2 并在还原单元 (3) 中将 CO_2 还原为有机原料;和
 - (iii) 将至少一部分来自所述还原单元 (3) 的有机原料进料到所述一个或多个生物反应器 (1) 中。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述有机原料选自甲酸、甲醇、乙烯、乙醇、1-丙醇、甲烷、乙酸和一氧化碳。
3. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述有机原料是甲酸。
4. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述微生物选自酵母、丝状真菌、细菌和异养藻类。
5. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法还包括以下步骤:
 - (iv) 在电解单元 (4) 中将水电解成 H_2 和 O_2 ,并将至少一部分 H_2 进料到所述还原单元 (3) 中以将 CO_2 还原为所述有机原料。
6. 根据权利要求5所述的方法,所述方法还包括以下步骤:
 - (v) 将至少一部分 O_2 进料到所述一个或多个生物反应器 (1) 中。
7. 根据权利要求5或权利要求6所述的方法,所述方法还包括以下步骤:
 - (v) 将至少一部分 H_2 进料到所述一个或多个生物反应器 (1) 中。
8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中能够利用有机原料的微生物包含至少一种编码感兴趣的化合物的多核苷酸或至少一种编码参与通过细胞产生感兴趣的化合物的化合物的多核苷酸。
9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法包括监测所述发酵过程,所述发酵过程包括以下步骤:
 - (vi) 选择所述发酵过程的至少一个过程参数,在所述发酵过程的进程期间为其确定当前测量值;
 - (vii) 将所述至少一个所选过程参数的相应当前测量值与由所述过程模型为该至少一个过程参数评估的模型参数的相应评估值进行比较;
 - (viii) 将所述至少一个所选过程参数的所述相应的当前测量值与相应评估值之间的方差与预定阈值进行比较;和
 - (ix) 当所述方差超过所述预定阈值时,改变所述过程模型中采用的至少一个定义的模型参数:其中执行具有相应改变的模型参数的步骤 (vii) 至 (ix),直到将所述方差位于所述预定阈值以下;和任选地
- 其中在步骤 (vii) 至 (ix) 的预定重复次数之后所述阈值被所述方差满足的情况下,停止所述方法并且生成警告作为输出。
10. 用于培养能够利用有机原料的微生物的系统,所述系统包括用于培养所述微生物的一个或多个生物反应器 (1)、用于从所述一个或多个生物反应器 (1) 捕获 CO_2 的 CO_2 捕获单元 (2)、用于将 CO_2 还原为有机原料的 CO_2 还原单元 (3),以及用于将所述有机原料引入到一个或多个生物反应器 (1) 中的一个或多个导管 (10)。

11. 根据前述权利要求所述的系统,还包括用于电解水的电解单元(4)和将来自所述电解单元(4)的 H_2 引入到所述 CO_2 还原单元(3)中的导管(11)。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的系统,还包括用于将 H_2 和/或 O_2 引入到所述一个或多个生物反应器(1)中的一个或多个导管(12)。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的系统,还包括一个或多个用于将底物引入到所述一个或多个生物反应器(1)中的入口(13)和一个或多个用于在所述一个或多个生物反应器(1)中形成的产物的出口(14)。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的系统,还包括用于模拟如前述权利要求中任一项所定义的发酵方法的发酵模拟工具的计算机实现系统,所述计算机实现系统包括至少一个处理器、用户界面、被配置为调节所述发酵方法的一个或多个过程参数的控制系统接口、包括存储用于模拟所述发酵方法的指令的计算机可读介质的存储器,其中用于模拟所述发酵方法的指令将所述处理器配置为:

(vi) 选择所述发酵方法的至少一个过程参数,在所述发酵方法的进程期间为其确定当前测量值;

(vii) 将所述发酵方法的至少一个所选过程参数的相应当前测量值与由过程模型为该至少一个过程参数评估的模型参数的相应评估值进行比较;

(viii) 将所述至少一个所选过程参数的所述相应的当前测量值与相应评估值之间的方差与预定阈值进行比较;和

(ix) 当所述方差超过所述预定阈值时,改变所述过程模型中采用的至少一个定义的模型参数;

其中执行具有相应改变的模型参数的步骤(vii)至(ix),直到将所述方差位于所述预定阈值以下;和任选地

其中,在步骤(vii)至(ix)的预定重复次数之后所述阈值被所述方差满足的情况下,停止所述方法并且在用户界面上生成警告作为输出。

温室气体改进发酵

技术领域

[0001] 本发明涉及一种培养能够利用有机原料的微生物的方法。根据另一方面,本发明涉及一种用于培养能够利用有机原料的微生物的系统。

背景技术

[0002] 微生物被大规模用于微生物本身或通过微生物产生的代谢物的工业生产。这些工业发酵过程和工厂或生物精炼厂中的侧翼操作是能源密集型的,并且由于能源使用和微生物本身的新陈代谢会排放 CO_2 。鉴于气候变化,迫切需要减少 CO_2 排放或不排放 CO_2 甚至负 CO_2 排放的工业发酵过程。

具体实施方式

[0003] 根据第一方面,本发明涉及一种培养能够利用有机原料的微生物的方法,所述方法包括以下步骤:

[0004] (i) 在一个或多个生物反应器(1)中培养微生物;

[0005] (ii) 从一个或多个生物反应器(1),优选在捕获单元(2)中捕获 CO_2 ,并优选在还原单元(3)中将 CO_2 还原为有机原料;和

[0006] (iii) 将至少一部分优选来自还原单元(3)的有机原料进料到一个或多个生物反应器(1)中,优选将至少一部分来自还原单元(3)的有机原料进料到一个或多个生物反应器中。

[0007] 本发明人发现本发明提供减少 CO_2 排放或甚至不排放 CO_2 的微生物培养。此外,通过将有机原料加到一个或多个生物反应器中,可以减少用于微生物生长的碳底物,即糖、乙醇、甘油、寡糖、多糖、油或糖醇。这表示每个使用的糖的生物质产量增加,这提供改进的生产过程。

[0008] 在本上下文中使用的“生物反应器”是适合于在存在或不存在氧气的情况下受控培养微生物的发酵容器。

[0009] “ CO_2 捕获单元”是适用于从一个或多个生物反应器(1)的废气中捕获 CO_2 的物理工具。

[0010] CO_2 还原单元是适用于将 CO_2 还原为有机原料的物理工具,如装置或设备。

[0011] 在本文中使用的能够利用有机原料的微生物是指可以同化有机原料的微生物。

[0012] 在本上下文中使用的“有机原料”是通过还原 CO_2 产生的含碳原材料。优选地,本发明的有机原料可衍生自 CO_2 。更优选地,本发明的有机原料可使用 CO_2 的电化学还原、 CO_2 的微生物还原、转化 CO_2 的酶促过程或有机合成过程衍生自 CO_2 。或者,如在本上下文中使用的有机原料可定义为 CO_2 衍生的能量载体。优选地,引入到一个或多个生物反应器中的有机原料的量小于进入一个或多个生物反应器的底物的量。

[0013] 在一个优选的实施方案中,本发明的有机原料或 CO_2 衍生的能量载体选自甲酸(HCOOH)、甲醇(CH_3OH)、乙烯(C_2H_4)、乙醇($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)、1-丙醇($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$)、甲烷(CH_4)、乙酸

(CH₃COOH) 和一氧化碳 (CO)。更优选地,本发明的有机原料是甲酸。使用甲酸的优点是有效地从CO₂生产甲酸,并且微生物可以利用甲酸。微生物可以固有地利用甲酸,或可以将微生物改造为能够利用甲酸。因此,本发明的微生物优选能够利用甲酸。

[0014] 在一个优选的实施方案中,本发明的有机原料不是甲酸盐。甲酸盐的缺点是甲酸盐是需要用阳离子平衡的阴离子,阳离子需要经由滴定来提供。随后在发酵中,甲酸的吸收导致需要反滴定以平衡阳离子。结果,盐将作为副产物产生,出于经济和环境原因,这是非常不希望的。

[0015] 在本上下文中使用的“培养微生物”包括生物质的生产和/或感兴趣的化合物的生产,感兴趣的化合物如细胞外代谢物和/或细胞内代谢物,包括复杂的化合物,例如酶、脂质、多糖、维生素和抗生素。

[0016] 优选地,发酵是工业规模的。更优选地,一个或多个生物反应器 (1) 各自具有超过10升,更优选地超过100升,甚至更优选地超过1000升,最优选地超过10,000升的体积。

[0017] 在一个或多个生物反应器 (1) 中培养微生物的步骤 (i) 可以是厌氧发酵和/或需氧发酵。

[0018] 从一个或多个生物反应器 (1) 中捕获CO₂并在还原单元 (3) 中将CO₂还原为有机原料的步骤 (ii) 是指从一个或多个生物反应器 (1) 的废气中捕获CO₂并将捕获的CO₂还原为有机原料。在还原单元 (3) 中捕获CO₂并将其还原为有机原料可以通过已知的方法和设备进行。优选地,CO₂的还原是CO₂的电化学还原。或者,在还原单元 (3) 中将CO₂还原为有机原料是CO₂的光电化学还原、CO₂的酶促还原或CO₂的微生物还原。US2012/0228147中公开用于将CO₂还原为甲酸的电化学方法的实例。

[0019] 在一个优选的实施方案中,一个或多个生物反应器的废气包含的CO₂浓度超过50%,优选地超过55%,优选地超过60%,优选地超过65%,优选地超过70%,优选地超过75%,优选地超过80%,优选地超过85%,优选地超过90%,优选地超过95%。或者,废气包含的CO₂浓度小于50%,优选小于40%,优选小于30%,优选小于20%,优选小于10%,优选小于5%。优选地,一个或多个生物反应器的废气包含大于90%的CO₂浓度,并且来自一个或多个其他生物反应器的废气包含小于10%的CO₂浓度。例如,厌氧过程提供的废气具有非常高的CO₂浓度,而需氧过程提供的废气的CO₂浓度很低。

[0020] 将来自还原单元的至少一部分有机原料进料到一个或多个生物反应器 (1) 的步骤 (iii) 包括从还原单元 (3) 进料至少10% (w/w) 的有机原料。更优选地,从还原单元 (3) 进料至少20% (w/w)、至少30% (w/w)、至少40% (w/w)、至少50% (w/w)、至少60% (w/w)、至少70% (w/w)、至少80% (w/w)、至少90% (w/w)、至少95% (w/w) 或至少99% (w/w) 的有机原料到生物反应器 (1)。更优选地,100%的形成的有机原料被进料到一个或多个生物反应器 (1) 中。有利地,本发明的方法可以被优化,因为从CO₂还原的有机原料的量与可用于共同进料到生物反应器中的有机原料的量相匹配。这提供一种减少二氧化碳排放的改进方法,并且可以以更低的成本实施,因为还原二氧化碳所需的设备可以更小。另一方面,考虑到碳定价,将所有形成的CO₂还原为有机原料可能是有利的。任何多余的有机原料,即不能共同加入生物反应器 (1) 的原料,可用于其他商业目的。因此,本发明的方法可包括收集形成的有机原料并对其进行包装和/或运输的步骤。

[0021] 在优选的实施方案中,本发明的方法使用两个或至少两个生物反应器,更优选三

个或至少三个生物反应器,最优选四个或至少四个生物反应器。生物反应器可以发酵相同的微生物,或每个生物反应器可以发酵不同类型的微生物。例如,在使用两个生物反应器的情况下,可以发酵相同的微生物,但也可以发酵两种不同类型的微生物。组合不同类型的微生物的优点是可以选择有效利用彼此废物流的组合。或者,不同的微生物可以使用从CO₂中还原的不同类型的有机原料,因为一种微生物可能比另一种微生物更好地利用一种类型的有机原料。这种灵活性增加本发明的适用性。

[0022] 在一个优选的实施方案中,本发明的微生物选自酵母、丝状真菌、细菌和藻类。在进一步优选的实施方案中,微生物包括选自由酵母、丝状真菌、细菌和藻类组成的组的两种不同微生物。更优选地,微生物包括选自由酵母、丝状真菌、细菌和藻类组成的组的甚至四种不同微生物中的三种。例如,本发明的微生物包括酵母和丝状真菌。更优选地,本发明的方法包括在一个生物反应器中培养酵母,并在第二个生物反应器中培养丝状真菌。

[0023] 酵母细胞优选是属于念珠菌属、汉逊酵母属、克鲁维酵母属、毕赤酵母属、酵母属、裂殖酵母属或耶氏酵母属的酵母。更优选地,目前的酵母是乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、多形汉逊酵母(*Hansenula polymorph*)、解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)或毕赤酵母(*Pichia pastoris*)。

[0024] 丝状真菌包括真菌门和卵菌门亚门的所有丝状形式(由Hawksworth等人在Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8th edition, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK中定义)。丝状真菌的特征是菌丝壁由几丁质、纤维素、葡聚糖、壳聚糖、甘露聚糖和其他复合多糖组成。营养生长是通过菌丝伸长进行的并且碳分解代谢是完全需氧的。丝状真菌菌株包括但不限于枝顶孢属(*Acremonium*)、伞草属(*Agaricus*)、曲霉属(*Aspergillus*)、金球孢属(*Aureobasidium*)、金孢属(*Chrysosporium*)、鬼伞属(*Coprinus*)、隐球菌属(*Cryptococcus*)、丝状孢霉属(*Filibasidium*)、镰刀菌属(*Fusarium*)、腐质霉属(*Humicola*)、稻瘟菌属(*Magnaporthe*)、毛霉属(*Mucor*)、毁丝霉属(*Myceliophthora*)、*Neocallimastix*、脉孢菌属(*Neurospora*)、拟青霉属(*Paecilomyces*)、青霉菌属(*Penicillium*)、瘤胃壶菌属(*Piromyces*)、*Panerochaete*、侧耳属(*Pleurotus*)、裂褶菌属(*Schizophyllum*)、踝节菌属(*Talaromyces*)、*Rasamsonia*、热子囊菌属(*Thermoascus*)、梭孢壳属(*Thielavia*)、弯颈霉属(*Tolypocladium*)和木霉属(*Trichoderma*)的菌株。

[0025] 优选的丝状真菌属于枝顶孢属(*Acremonium*)、曲霉属(*Aspergillus*)、金孢属(*Chrysosporium*)、毁丝霉属(*Myceliophthora*)、青霉菌属(*Penicillium*)、踝节菌属(*Talaromyces*)、*Rasamsonia*、梭孢壳属(*Thielavia*)、镰刀菌属(*Fusarium*)或木霉属(*Trichoderma*)的物种,并且最优选黑曲霉(*Aspergillus niger*)、阿拉巴枝顶孢(*Acremonium alabamense*)、泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)、臭曲霉(*Aspergillus foetidus*)、酱油曲霉(*Aspergillus sojae*)、烟曲霉菌(*Aspergillus fumigatus*)、埃默森篮状菌(*Talaromyces emersonii*)、*Rasamsonia emersonii*、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、*Chrysosporium lucknowense*、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、嗜热毁丝霉(*Myceliophthora thermophila*)、里氏木霉(*Trichoderma reesei*)、土生梭孢霉(*Thielavia terrestris*)或产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)的物种。更优选的丝状

真菌属于曲霉属,更优选地,丝状真菌属于黑曲霉物种或为黑曲霉。

[0026] 术语“细菌”包括革兰氏阴性和革兰氏阳性微生物。合适的细菌可以选自例如埃希氏菌、鱼腥藻、茎菌属、葡糖杆菌、红杆菌、假单胞菌、副球菌、芽孢杆菌、短杆菌、棒状杆菌、根瘤菌(中华根瘤菌)、黄杆菌、克雷伯菌、肠杆菌、乳酸杆菌、乳球菌、甲基杆菌、葡萄球菌、链球菌、放线菌、黄杆菌或鞘氨醇单胞菌。优选地,细菌细胞选自枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、蓬蒂芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、嗜盐芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、氧化芽孢杆菌、新月柄杆菌CB 15、甲基营养菌(*Methylobacterium extorquens*)、球形红杆菌、玉米黄质假单胞菌、反硝化副球菌、大肠杆菌、谷氨酸棒杆菌、肉葡萄球菌、青色链霉菌、苜蓿根瘤菌和放射根瘤菌。

[0027] 本发明的藻类优选选自绿藻、红质体和叶绿体。更优选地,本发明的藻类是异养藻类,更优选地,异养藻类如小球藻(*Chlorella*)、微拟球藻(*Nannochloropsis*)、菱形藻属(*Nitzschia*)、破囊壶菌(*Thraustochytrium*)或*Schizochytrium*。

[0028] 在一个优选的实施方案中,根据本发明的微生物包含至少一种编码感兴趣的化合物的多核苷酸或至少一种编码参与通过细胞产生感兴趣的化合物的化合物的多核苷酸。

[0029] 感兴趣的化合物可以是任何生物化合物。生物化合物可以是生物质或生物聚合物或代谢物。生物化合物可以由组成生物合成或代谢途径的单个多核苷酸或一系列多核苷酸编码,或可以是单个多核苷酸的产物或一系列多核苷酸的产物的直接结果。生物化合物对于宿主细胞可以是天然的或异源的。

[0030] 术语“异源生物化合物”在本文中定义为细胞非天然的生物化合物;或天然生物化合物,其中已经进行结构修饰以改变天然生物化合物。

[0031] 术语“生物聚合物”在本文中定义为相同、相似或不同亚单元(单体)的链(或聚合物)。生物聚合物可以是任何生物聚合物。生物聚合物可以是例如但不限于核酸、多胺、多元醇、多肽(或聚酰胺)或多糖。

[0032] 生物聚合物可以是多肽。多肽可以是具有感兴趣的生物活性的任何多肽。术语“多肽”在本文中不是指编码产物的特定长度,因此包括肽、寡肽和蛋白质。多肽还包括上述多肽和杂合多肽的天然存在的等位基因和工程变体。多肽对于宿主细胞可以是天然的或可以是异源的。多肽可以是胶原蛋白或明胶,或其变体或杂交体。多肽可以是抗体或其部分、抗原、凝血因子、酶、激素或激素变体、受体或其部分、调节蛋白、结构蛋白、报告子或转运蛋白、参与分泌过程的蛋白质、参与折叠过程的蛋白质、分子伴侣、肽氨基酸转运蛋白、糖基化因子、转录因子、合成肽或寡肽、细胞内蛋白质。细胞内蛋白质可以是酶,例如蛋白酶、神经酰胺酶、环氧化物水解酶、氨肽酶、酰化酶、醛缩酶、羟化酶、氨肽酶、脂肪酶。多肽也可以是细胞外分泌的酶。这样的酶可以属于氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂解酶、异构酶、连接酶、过氧化氢酶、纤维素酶、几丁质酶、角质酶、脱氧核糖核酸酶、葡聚糖酶、酯酶的组。酶可以是糖酶,例如纤维素酶如内切葡聚糖酶、 β -葡聚糖酶、纤维二糖水解酶或 β -葡萄糖苷酶、半纤维素酶或果胶分解酶如木聚糖酶、木糖苷酶、甘露聚糖酶、半乳聚糖酶、半乳糖苷酶、果胶甲酯酶、果胶裂解酶、果胶裂解酶、聚半乳糖醛酸内切酶、外多聚半乳糖醛酸酶聚鼠李半乳糖醛酸酶(*exopolysaccharuronases rhamnogalacturonases*)、阿拉伯聚糖酶、阿拉伯呋喃糖酶、阿糖基木聚糖水解酶、半乳糖醛酸酯、裂解酶或淀粉分解酶;水解酶、异构酶或连接酶、磷酸酶如植酸酶、酯酶如脂肪酶、蛋白水解酶、氧化还原酶如氧化酶、转移酶或异构酶。该酶可以

是植酸酶。该酶可以是氨肽酶、天冬酰胺酶、淀粉酶、麦芽糖淀粉酶、糖酶、羧肽酶、内切蛋白酶、金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、过氧化氢酶、几丁质酶、角质酶、环糊精糖基转移酶、脱氧核糖核酸酶、 α -乳糖酶、 β -乳糖酶、葡糖淀粉酶、 α -葡糖苷酶、 β -葡糖苷酶、卤代过氧化物酶、蛋白质脱氨酶、转化酶、漆酶、脂肪酶、甘露糖苷酶、多聚糖酶、氧化酶、果胶分解酶、过氧化物酶、磷脂酶、半乳糖脂肪酶、叶绿素酶、多酚氧化酶、核糖核酸酶、转谷氨酰胺酶或葡糖氧化酶、己糖氧化酶或单加氧酶。

[0033] 优选地，感兴趣的化合物是异源产物。优选地，感兴趣的化合物是葡萄糖氧化酶。更优选地，感兴趣的化合物是异源葡萄糖氧化酶。在另一个优选的实施方案中，感兴趣的化合物是脂解酶，例如具有选自以下组成的组的一种或多种活性物的脂解酶：脂肪酶（三酰基甘油脂肪酶）、磷脂酶（例如磷脂酶A1和/或磷脂酶A2和/或磷脂酶B和/或磷脂酶C）、半乳糖脂肪酶。

[0034] 根据本发明，多肽或酶也可以是W02010/102982中描述的产物。根据本发明，多肽也可以是融合或杂合多肽，另一多肽在该多肽或其片段的N-末端或C-末端与其融合。融合多肽是通过将编码一种多肽的核酸序列（或其部分）与编码另一种多肽的核酸序列（或其部分）融合而产生的。

[0035] 产生融合多肽的技术是本领域已知的，包括连接编码多肽的编码序列，使得它们在读框内并且融合多肽的表达在相同启动子和终止子的控制下。杂合多肽可以包含从至少两种不同多肽获得的部分或完整多肽序列的组合，至少两种不同多肽中的一种或多种可以与宿主细胞异源。融合多肽和信号序列融合的实例例如如W02010/121933中所述。

[0036] 生物聚合物可以是多糖。多糖可以是任何多糖，包括但不限于粘多糖（例如肝素和透明质酸）和含氮多糖（例如甲壳质）。在更优选的选择中，多糖是透明质酸。在另一个优选的选择中，多糖是水胶体，例如黄原胶、结冷胶、果胶、韦兰或其他多糖。

[0037] 编码感兴趣的化合物或编码参与产生根据本发明的感兴趣的化合物的化合物的多核苷酸可以编码参与初级或次级代谢物，例如有机酸、醇、脂质、类胡萝卜素、 β -内酰胺、抗生素和维生素的合成的酶。这种代谢物可以被认为是根据本发明的生物化合物。优选地，本发明感兴趣的化合物是 β -内酰胺。优选地，本发明的感兴趣的化合物是乙醇。

[0038] 术语“代谢物”包括初级和次级代谢物；代谢物可以是任何代谢物。优选的代谢物是柠檬酸、葡糖酸、己二酸、富马酸、衣康酸和琥珀酸。

[0039] 代谢物可由一种或多种基因编码，例如在生物合成或代谢途径中的一种或多种基因编码。初级代谢物是与能量代谢、生长和结构有关的细胞初级或一般代谢的产物。次级代谢物是次级代谢的产物（参见，例如R.B.Herbert, *The Biosynthesis of Secondary Metabolites*, Chapman and Hall, New York, 1981）。

[0040] 初级代谢物可以是但不限于氨基酸、脂肪酸、核苷、核苷酸、糖、甘油三酯或维生素。例如，维生素A、B2、C、D或E。

[0041] 次级代谢物可以是但不限于生物碱、香豆素、类黄酮、聚酮化合物、奎宁、类固醇、肽或萜。次级代谢物可以是抗生素、拒食剂、引诱剂、杀菌剂、杀真菌剂、激素、杀虫剂或杀鼠剂。优选的抗生素是头孢菌素类和 β -内酰胺类。其他优选的代谢物是外代谢物。外代谢物的实例是Aurasperone B、Funalenone、Kotanin、Nigragillin、Orlandin、其他萘并- γ -吡喃酮、吡喃酮A、Tensidol B、伏马菌素B2和赭曲霉毒素A。

[0042] 生物化合物也可以是选择标记的产物。选择标记是目标多核苷酸的产物,该产物提供杀生物剂或病毒抗性、重金属抗性、营养缺陷型原养型等。选择标记包括但不限于amdS(乙酰胺酶)、argB(鸟氨酸氨基甲酰基转移酶)、bar(膦丝菌素乙酰转移酶)、hygB(潮霉素磷酸转移酶)、niaD(硝酸还原酶)、pyrG(乳清蛋白-5'-磷酸脱羧酶)、sC(硫酸腺苷转移酶)、trpC(邻氨基苯甲酸合酶)、ble(腐草霉素抗性蛋白)、hyg(潮霉素)、NAT或NTC(诺尔丝菌素)及其等价物。

[0043] 根据本发明,感兴趣的化合物优选是感兴趣的化合物列表中描述的多肽。

[0044] 优选地,多肽是如感兴趣的化合物列表中描述的酶。优选葡萄糖氧化酶。在另一个实施方案中,酶是脂解酶。

[0045] 根据本发明的另一个实施方案,感兴趣的化合物优选是代谢物。

[0046] 根据又一个实施方案,感兴趣的化合物是沼气。

[0047] 本发明的微生物可能已经能够产生感兴趣的化合物。微生物还可以具有编码多肽的同源或异源核酸构建体,其中多肽可以是感兴趣的化合物或参与感兴趣的化合物的产生的多肽。本领域技术人员知道如何修饰微生物以使其能够产生感兴趣的化合物。

[0048] 在进一步优选的实施方案中,本发明的方法还包括以下步骤:

[0049] (iv) 在电解单元(4)中将水电解成 H_2 和 O_2 ,并将至少一部分 H_2 进料到还原单元(3)中,用于将 CO_2 还原为有机原料。

[0050] 将水电解成 H_2 和 O_2 的优点是不需要从外部来源获得 H_2 。电解单元(4)所需的电力可以有利地从现场其他设备的剩余电力中获得,从而为所需电力提供可持续的解决方案。或者,电力由可再生能源产生,例如太阳能、风能或水能。

[0051] 在进一步优选的实施方案中,电解单元(4)与还原单元(3)组合。优选地,电解水的步骤(iv)与 CO_2 还原步骤同时进行并且在 CO_2 还原步骤存在下进行。优选地,在 CO_2 还原和水电解过程中进行以下反应:

[0052] $CO_2 + H_2O \rightarrow CHOOH + 1/2 O_2$ 。

[0053] 换句话说,优选在 CO_2 存在下进行电解水的步骤。优点是提供改进的过程或改进的系统。因此优选的是,优选在捕获单元(2)中从一个或多个生物反应器(1)捕获 CO_2 并优选在还原单元(3)中将 CO_2 还原为有机原料的本发明的步骤(ii)进一步包括在 CO_2 存在下电解水。在进一步优选的实施方案中,本发明的方法还包括以下步骤:

[0054] (v) 将至少一部分 O_2 进料到一个或多个生物反应器(1)中。 O_2 是电解水的副产物。它可以有利地用于一个或多个生物反应器中,例如用于需氧发酵。此外,发现一个或多个生物反应器的所有曝气可以通过使用来自电解单元(4)的 O_2 来实现。因此,不再需要来自不同来源的 O_2 ,这进一步提高可持续性。例如,不再需要空气压缩机,或可以使用更小的压缩机,因为电解单元(4)可以在与常规压缩机压力相当的压力下输送 O_2 。优选地,在电解单元(4)中将水电解成 H_2 和 O_2 的步骤(iv)在0.5至10巴、优选1至8巴、更优选1.5至6巴、最优选2至4巴,优选巴绝对压力范围内的压力下进行。

[0055] 在进一步优选的实施方案中,本发明的方法还包括以下步骤:

[0056] (v) 将至少一部分 H_2 进料到一个或多个生物反应器(1)中。任何多余的 H_2 ,即 CO_2 还原不需要的 H_2 可以有利地共同进料到一个或多个生物反应器中。可以利用 H_2 的微生物可以通过与 H_2 共同进料来发酵。通过这样做,可以减少微生物代谢产生的 CO_2 量。这提供进一步的

可持续性优势。此外,通过与 H_2 共同进料,可以减少发酵所需的糖或其他含碳原料的量,这提供显著的成本改进。因此,本发明的微生物或本发明的微生物之一优选能够利用 H_2 。更优选地,本发明的微生物能够利用本发明的有机原料和 H_2 。或者,一种微生物能够利用本发明的有机原料,而另一种微生物能够利用 H_2 。例如,本发明的方法包括在一个生物反应器中发酵能够利用甲酸的酵母和在另一个生物反应器中发酵能够利用 H_2 的丝状真菌的步骤。更具体地,本发明的方法包括在一个生物反应器中培养能够利用甲酸的酿酒酵母和培养能够利用 H_2 的产黄青霉,或在一个生物反应器中培养能够利用 H_2 的酿酒酵母和在另一个生物反应器中培养能够利用甲酸的产黄青霉的步骤。

[0057] 在进一步优选的实施方案中,培养酵母产生酵母生物质,而培养丝状真菌产生感兴趣的化合物。因此,本发明的方法优选包括收获生物质或酵母生物质的步骤和/或包括收获感兴趣的化合物的步骤。

[0058] 本发明的方法可以通过监测发酵过程进一步改进。在一个优选的实施方案中,本发明的方法还包括以下步骤:

[0059] (vi) 选择发酵过程的至少一个过程参数,在发酵过程的进程期间为其确定当前测量值;

[0060] (vii) 将至少一个所选过程参数的相应当前测量值与由过程模型为该至少一个过程参数评估的模型参数的相应评估值进行比较;

[0061] (viii) 将至少一个所选过程参数的相应的当前测量值与相应评估值之间的方差与预定阈值进行比较;和

[0062] (ix) 当方差超过预定阈值时,改变过程模型中采用的至少一个定义的模型参数:

[0063] 其中执行具有相应改变的模型参数的步骤(vii)至(ix),直到将方差位于预定阈值以下;和任选地

[0064] 其中在步骤(vii)至(ix)的预定重复次数之后阈值被方差满足的情况下,停止该方法并且生成警告作为输出。

[0065] 在一个或多个生物反应器(1)、 CO_2 捕获单元(2)、 CO_2 还原单元(3)中和/或电解单元(4)中,可以针对各个发酵过程调节和控制各个环境和/或过程参数,例如pH值、温度、 CO_2 供应、 H_2 供应、氧气供应、氮气供应、糖含量、有机原料含量和/或混合器设置。然而,发酵过程在生物学上是复杂的并且非常敏感。因此,有必要对发酵过程进行持续密切监测,以保持一个或多个生物反应器中相应环境条件以实现一致和最佳的过程,从而使营养液中使用的生物质或生物活性细胞生长并产生所需的生物质和/或感兴趣的化合物。

[0066] 有利的是,选择发酵过程的过程参数作为待测量的过程参数,在发酵过程的进程期间可以近似实时地确定测量值。为此,可以近似实时地确定过程模型和发酵过程进程之间的方差,特别是如果过程模型与正在进行的发酵过程并行计算。因此可以针对过程参数执行所选过程参数的测量值与由过程模型计算或预测的评估值之间的直接比较。因此,如果发酵过程中出现错误,也可以进行近乎即时的干预。

[0067] 方便地执行本发明的方法的步骤(vii)至(ix)的重复,即在所选过程参数的测量值和评估值之间进行比较。这里,对各个模型参数而言,方差与预定阈值的比较以及当阈值过大时对过程模型的模型参数的修改以短时间间隔例如每10秒执行。因此可以快速调节过程模型,例如在过程控制中存在生物变异性或变异性(例如,原材料的差异,或底物组成的

波动),从而对该过程的进一步进程进行发酵过程的相应有效的预测。如果生物过程中出现错误,则会发生近乎即时的响应。例如,近乎即时的干预可以避免或防止对生物过程和/或设备的损坏。

[0068] 在本发明的优选实施方案中,选择所谓的呼吸商,也缩写为RQ,作为在发酵过程的进程期间测量的过程参数。呼吸商是发酵过程中的一个过程参数,代表生物活性细胞内过程的指标。呼吸商描述给定时间产生的 CO_2 与同时消耗的 O_2 的比率。在发酵过程的进程期间,可以非常轻松地实时测量呼吸商,例如使用所谓的废气分析。

[0069] 作为备选方案或另外地,可以选择生物质的浓度和/或底物的浓度作为在发酵过程过程中测量的过程参数。例如,基于生物质的电性质确定发酵过程中生物质浓度的当前测量值。底物(例如糖等)的浓度的当前测量值同样可以在发酵过程的进程中确定,例如基于使用光谱学,特别是使用反射光谱学的光谱性质。

[0070] 此外,如果采用所谓的确定性过程模型来评估发酵过程的过程参数,则这是有利的。用将发酵过程作为模型进行说明的确定性方法,在发酵过程的进程期间,所用生物质或细胞内部和外部的各个过程特定的生化过程的知识被转换为数学方程。

[0071] 在进一步优选的实施方案中,步骤(vi)至(ix)通过计算机实施的方法,更优选地使用算法的计算机实施的方法进行。计算机和算法的帮助是有益的,因为可以很容易地将过程参数的变化与来自历史发酵过程的数据进行比较,并且这些历史数据可以用于正确解释过程参数的变化。

[0072] 鉴于本发明的有益的可可持续性成就,根据另一方面,本发明涉及一种用于培养能够利用有机原料的微生物的系统,所述系统包括用于培养所述微生物的一个或多个生物反应器(1)、用于从一个或多个生物反应器(1)捕获 CO_2 的 CO_2 捕获单元(2)、用于将 CO_2 还原为甲酸的 CO_2 还原单元(3)和/或用于将有机原料引入到一个或多个生物反应器(1)中的一个或多个导管(10)。

[0073] 在一个优选的实施方案中,本发明的系统进一步包括用于电解水的电解单元(4)和/或用于将来自电解单元(4)的 H_2 引入 CO_2 还原单元(3)中的导管(11)。优选地,本发明的电解单元(4)包括用于对 O_2 和/或电解反应加压的装置。这是有利的,因为可以将加压 O_2 引入一个或多个生物反应器(1)。

[0074] 在又一个优选的实施方案中,本发明的系统进一步包括用于将 H_2 和/或 O_2 引入到一个或多个生物反应器(1)中的一个或多个导管(12)。这是有利的,因为可以在 CO_2 还原单元(3)和一个或多个生物反应器(1)之间优化使用两种产品。取决于发酵过程的进程,可以调节进料到 CO_2 还原单元(3)的 H_2 量和/或进料到一个或多个生物反应器(1)的 H_2 和/或 O_2 量以实现最佳 CO_2 还原、最佳出口和/或底物摄入量减少。

[0075] 在一个优选的实施方案中,本发明的系统进一步包括一个或多个用于将底物引入到一个或多个生物反应器(1)中的入口(13)和一个或多个用于在一个或多个生物反应器(1)中形成的产物的出口(14)。

[0076] 在又一优选的实施方案中,本发明的系统进一步包括用于模拟和/或监测如前述权利要求中任一项所定义的发酵方法的发酵监测工具的计算机实现系统,所述计算机实现系统包括至少一个处理器、用户界面、配置为调节发酵方法的一个或多个过程参数的控制系统接口、包括存储用于模拟和/或监测发酵方法的指令的计算机可读介质的存储器,其中

用于模拟和/或监测发酵方法的指令将处理器配置为:

[0077] (vi) 选择发酵方法的至少一个过程参数,在发酵方法的进程期间为其确定当前测量值;

[0078] (vii) 将发酵方法的至少一个所选过程参数的相应当前测量值与由过程模型为该至少一个过程参数评估的模型参数的相应评估值进行比较;

[0079] (viii) 将至少一个所选过程参数的相应的当前测量值与相应评估值之间的方差与预定阈值进行比较;和

[0080] (ix) 当方差超过预定阈值时,改变过程模型中采用的至少一个定义的模型参数:

[0081] 其中执行具有相应改变的模型参数的步骤(vii)至(ix),直到将方差位于预定阈值以下;和任选地

[0082] 其中,在步骤(vii)至(ix)的预定重复次数之后阈值被方差满足的情况下,停止该方法并且在用户界面上生成警告作为输出。

附图说明

[0083] 在图1的实施方案中,底物糖经由导管13被引入到生物反应器1中。生物反应器1提供允许能够利用有机原料的微生物发酵的条件。产生的产物,如微生物或由微生物产生的感兴趣的化合物,经由导管14离开生物反应器1。在生物反应器1中形成的 CO_2 经由导管15被引入 CO_2 捕获单元2。在还原单元3中,使用 H_2 将 CO_2 还原为有机原料。有机原料经由导管10被引入到生物反应器1,使得能够利用有机原料的微生物发酵。优选地,引入到生物反应器的有机原料的量小于底物糖的量。优点是 CO_2 不会释放到环境中,并且可以减少发酵过程所需的糖量。将 CO_2 还原成有机原料所需的 H_2 可以引入到还原单元3中并且可以来自供应者。优选地,电解单元4将水电解成 H_2 和 O_2 。 H_2 可以经由导管11引入到还原单元3。可以将 O_2 引入到生物反应器1中。或者,可以将空气引入到生物反应器1中以进行需氧过程。

[0084] 在图2的实施方案中,除了图1的实施方案外,还存在第二生物反应器1'。电解单元4将水电解成 H_2 和 O_2 。 H_2 可以经由导管11引入到还原单元3中。有利地,可以将 H_2 引入到生物反应器1'中以发酵能够利用 H_2 的微生物。这是有利的,因为 H_2 共同进料减少所需的糖量,并且可以减少生物反应器1'中微生物形成的 CO_2 量。

[0085] 图3显示常规系统中所需底物和 O_2 、产生的乙醇和酵母以及排放的 CO_2 的计算。

[0086] 在图4的实施方案中,需氧生物反应器1经由出口14生产酵母,经由入口13使用糖和经由入口12使用 O_2 。 O_2 由电解单元4产生。电解单元4产生 H_2 , H_2 经由导管11引入到还原单元3。来自需氧生物反应器1的 CO_2 在单元2中经由导管15捕获。 CO_2 在还原单元3中被还原为甲酸,并经由导管10引入到酵母生物反应器1中。

[0087] 在操作中,图4的实施方案允许生产与图3中相同量的酵母。然而,没有二氧化碳释放到环境中,酵母发酵所需的糖和氧气量显著减少。

[0088] 在图5的实施方案中,用于在生物反应器1中生产酵母的需氧发酵与用于在生物反应器1'中生产乙醇的厌氧乙醇发酵结合。电解单元4产生的 O_2 经由导管12引入到需氧酵母生物反应器1中。电解单元4产生的 H_2 经由导管12'引入到厌氧乙醇生物反应器1'中并经由导管11引入到还原单元3中。 CO_2 仅经由导管15从需氧酵母生物反应器1中捕获。甲酸仅经由导管10被引入到需氧酵母生物反应器1中,并且收集任何多余的甲酸供外部使用。

[0089] 在操作中,图5的实施方案允许在不产生 CO_2 的情况下生产乙醇。此外,由于进料 H_2 ,生产乙醇所需的糖量减少。需氧酵母发酵使用减少的糖量生产相同量的酵母。没有二氧化碳排放到环境中。发酵所需的氧气完全来自电解单元。因此,图5显示允许 CO_2 中性发酵过程的系统。

[0090] 在图6的实施方案中,生物反应器1中的需氧酵母生产与生物反应器1'中的厌氧乙醇生产组合。电解单元4产生的 O_2 经由导管12引入到需氧酵母生物反应器1中。电解单元4产生的 H_2 经由导管11被引入到还原单元3中。 CO_2 仅经由导管15从厌氧乙醇生物反应器1'中捕获。甲酸仅经由导管10被引入到需氧酵母生物反应器1中。

[0091] 在操作中,图6的实施方案仅产生生物反应器1中的需氧酵母发酵所需的甲酸量。来自两个生物反应器1的任何生产甲酸不需要的多余 CO_2 都能被释放。该实施方案允许减少酵母发酵所需的糖,同时最大限度地减少电解单元4中电解水所需的能量。

[0092] 在图7的实施方案中,需氧生物反应器1经由出口14生产酵母,经由入口13使用糖和经由入口12使用 O_2 。厌氧生物反应器1'经由出口14'生产乙醇,经由入口13'使用糖。来自需氧酵母生物反应器1和厌氧乙醇发酵生物反应器1'的 CO_2 经由导管15在单元2中被捕获。 CO_2 在还原单元3中被还原为甲酸,并使用导管10引入到需氧酵母生物反应器1和厌氧乙醇发酵生物反应器1'中。经由导管10上的出口收集任何多余的甲酸。电解单元4将水电解成 H_2 和 O_2 。 H_2 经由导管11引入到还原单元3中。氧气被引入到需氧酵母发酵生物反应器1中。任何多余的 O_2 经由导管16离开系统。

[0093] 在操作中,图7的实施方案使用最少量的糖达到乙醇和酵母生产。所有的 CO_2 都被捕获并还原为甲酸。在生物反应器中生长的微生物能够利用甲酸。

[0094] 在图8的实施方案中,来自需氧酵母生物反应器1和厌氧生物反应器1'的 CO_2 经由导管15在单元2中被捕获。 CO_2 在还原单元3中被还原为甲酸,并使用导管10引入到需氧酵母生物反应器1和厌氧生物反应器1'中。电解单元4将水电解成 H_2 和 O_2 。 H_2 经由导管11引入到还原单元3中。氧气被引入到需氧酵母发酵生物反应器1中。任何多余的 O_2 经由导管16离开系统。

[0095] 在操作中,图8的实施方案使用最少量的糖达到乙醇和酵母生产。捕获并还原为甲酸的 CO_2 量适合生产甲酸所需的量。排放任何多余的二氧化碳。在生物反应器中生长的微生物只需要能够利用甲酸。在该实施方案中,电力被减少到为了形成甲酸所需要的最小水电解的水平。

[0096] 图9显示常规系统中所需底物和 O_2 、产生的青霉素和酵母以及排放的 CO_2 的计算。

[0097] 图10显示本发明的一个实施方案,其中来自需氧酵母生物反应器1和需氧青霉素生物反应器1'两者的 CO_2 经由导管15被捕获在单元2中。 CO_2 在还原单元3中被还原为甲酸,并使用导管10引入到需氧酵母生物反应器1和需氧青霉素生物反应器1'中。电解单元4将水电解成 H_2 和 O_2 。 H_2 经由导管11引入到还原单元3中。氧气被引入到需氧酵母发酵生物反应器1和需氧青霉素生物反应器1'中。生物反应器1中的酵母能够利用甲酸。生物反应器1'中的青霉菌能够利用甲酸。

[0098] 在操作中,图10的实施方案产生与比较图9中相同量的青霉和酵母,而产生相同产量所需的糖量从63.3kt减少到48.6kt,并且外部供应的 O_2 量从31.8kt减少到16.1kt。

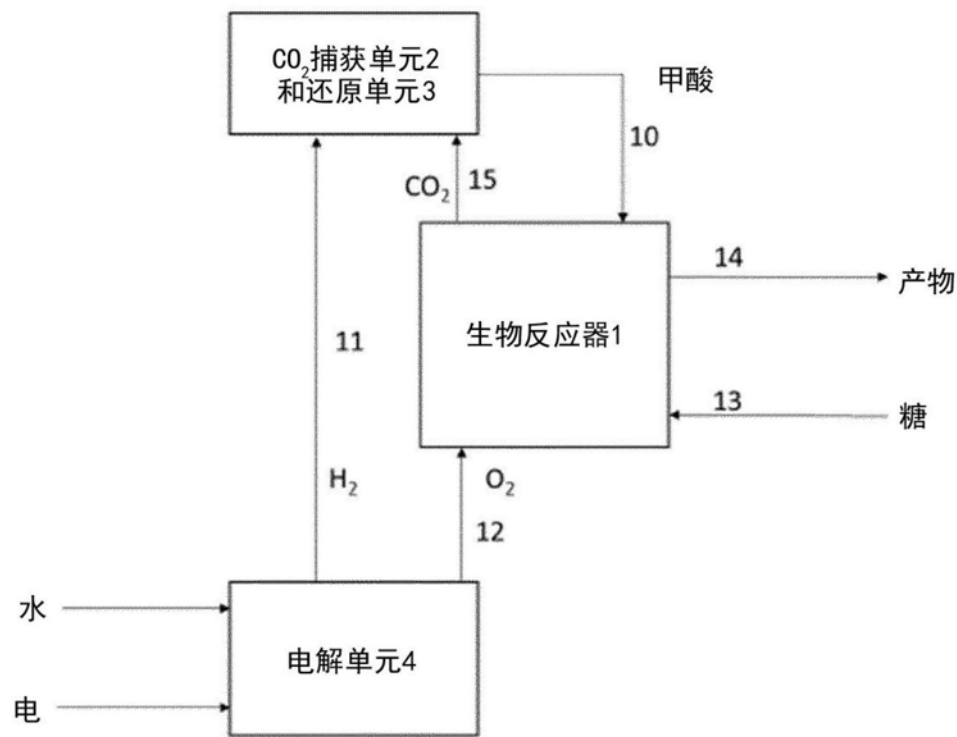


图1

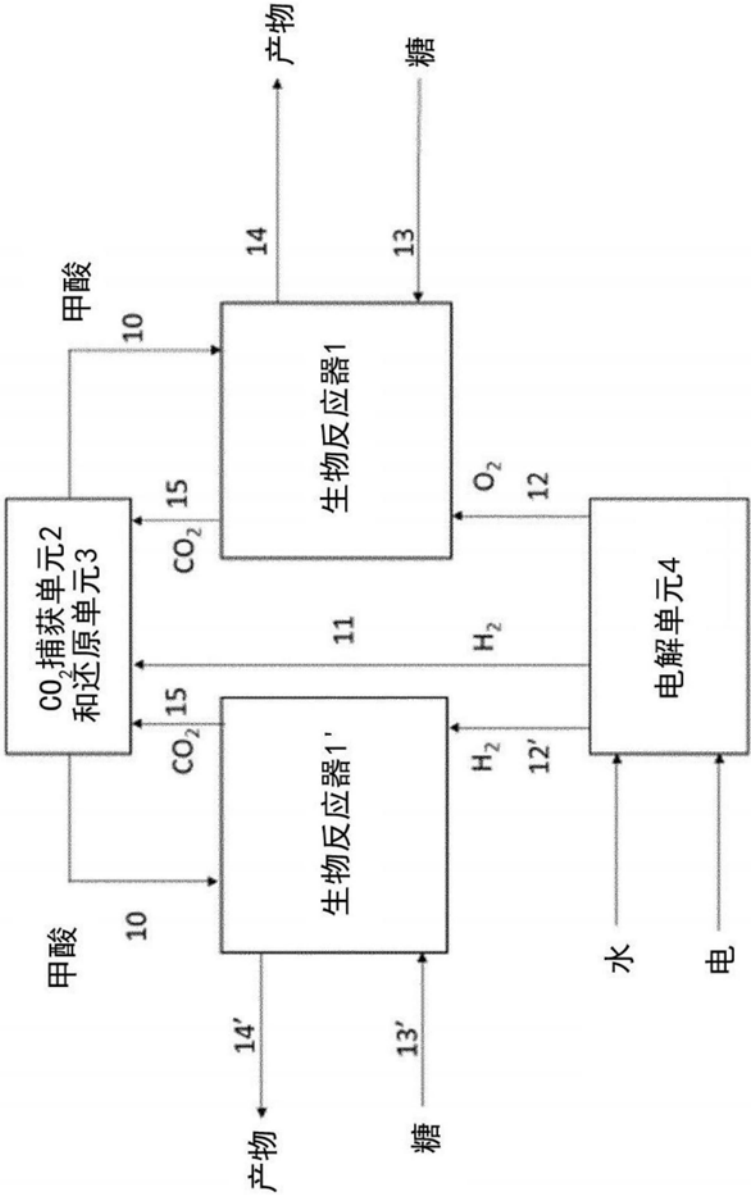


图2

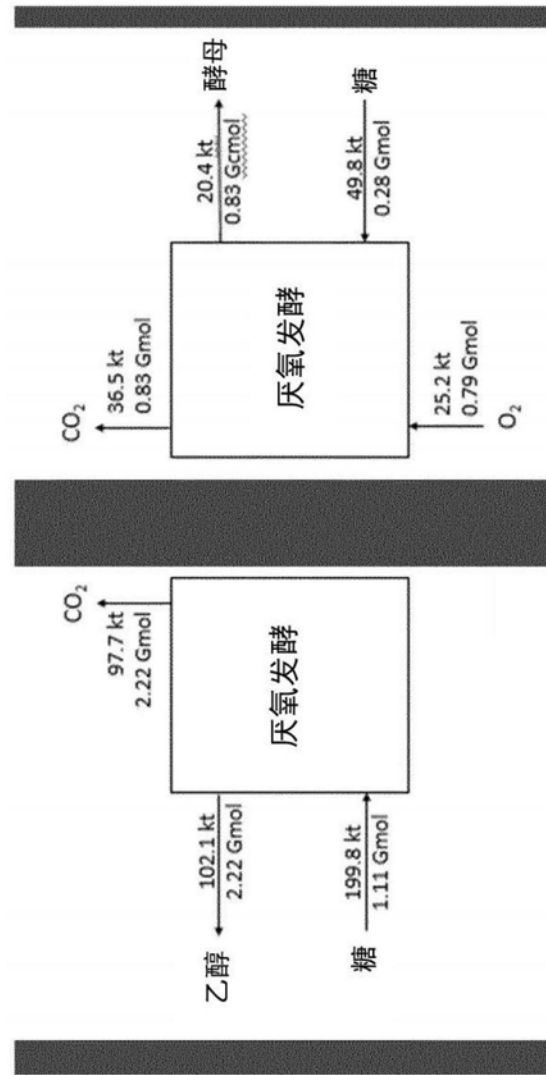


图3

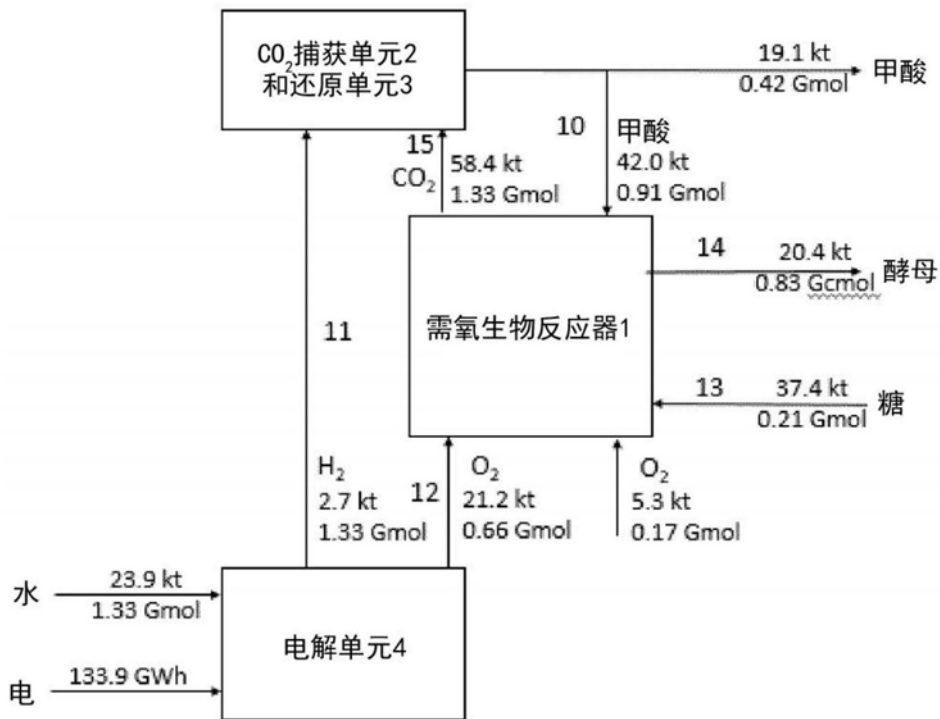


图4

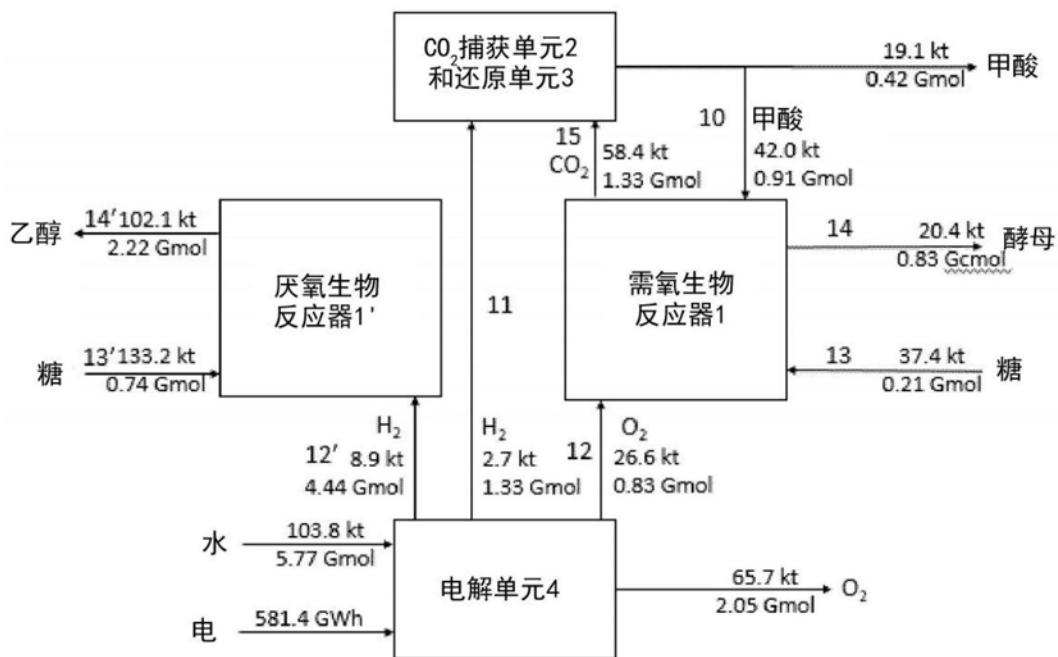


图5

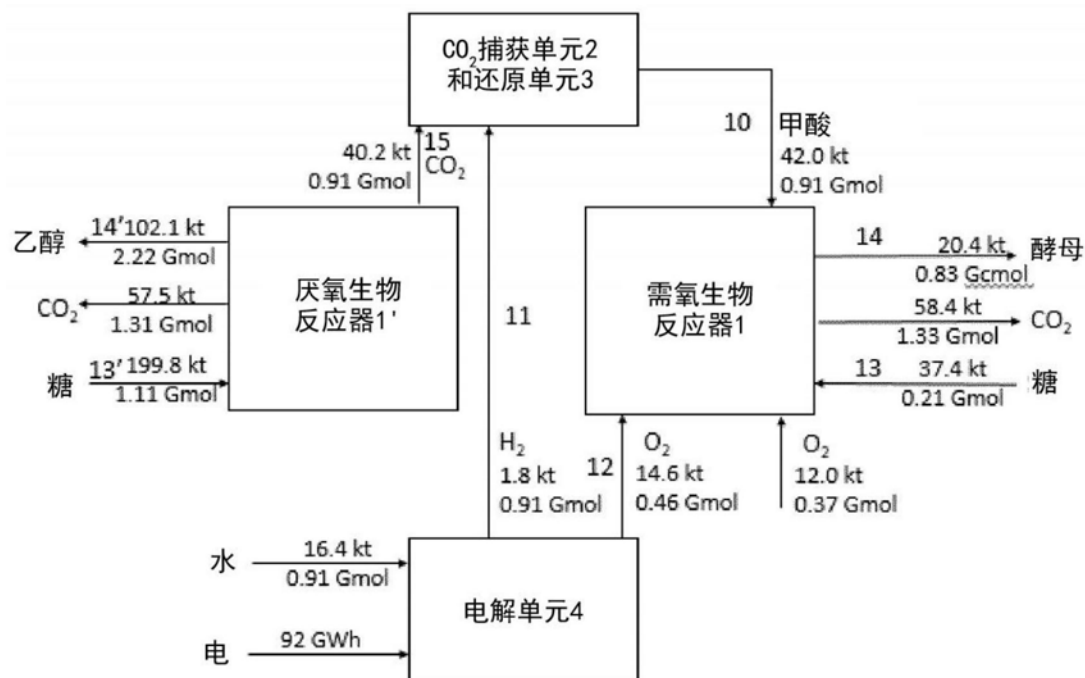


图6

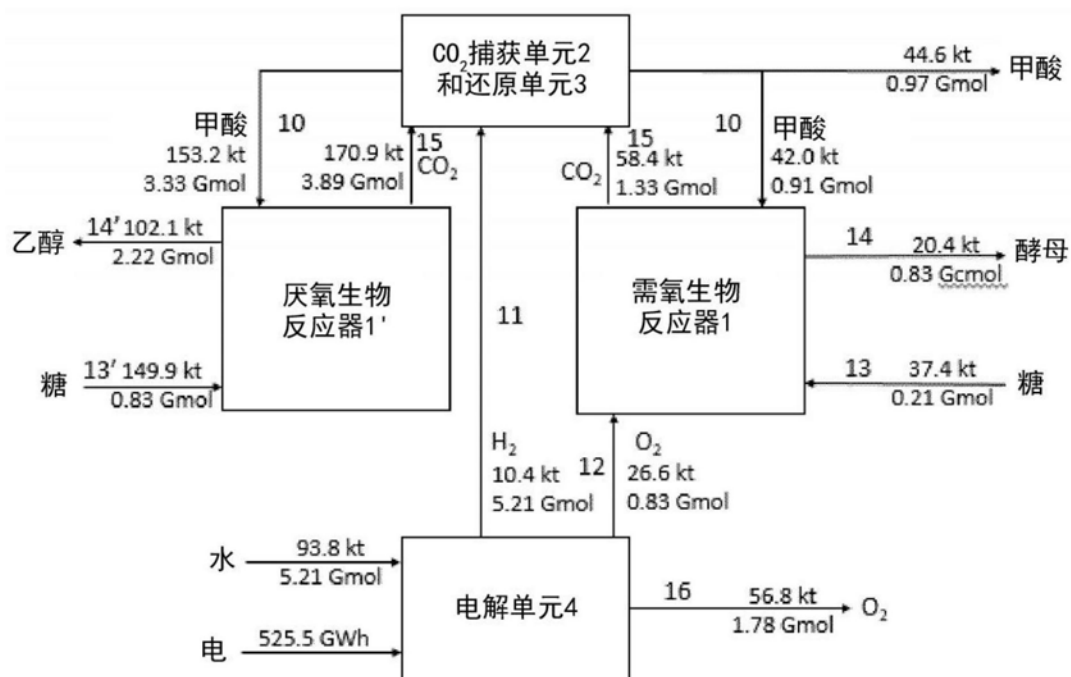


图7

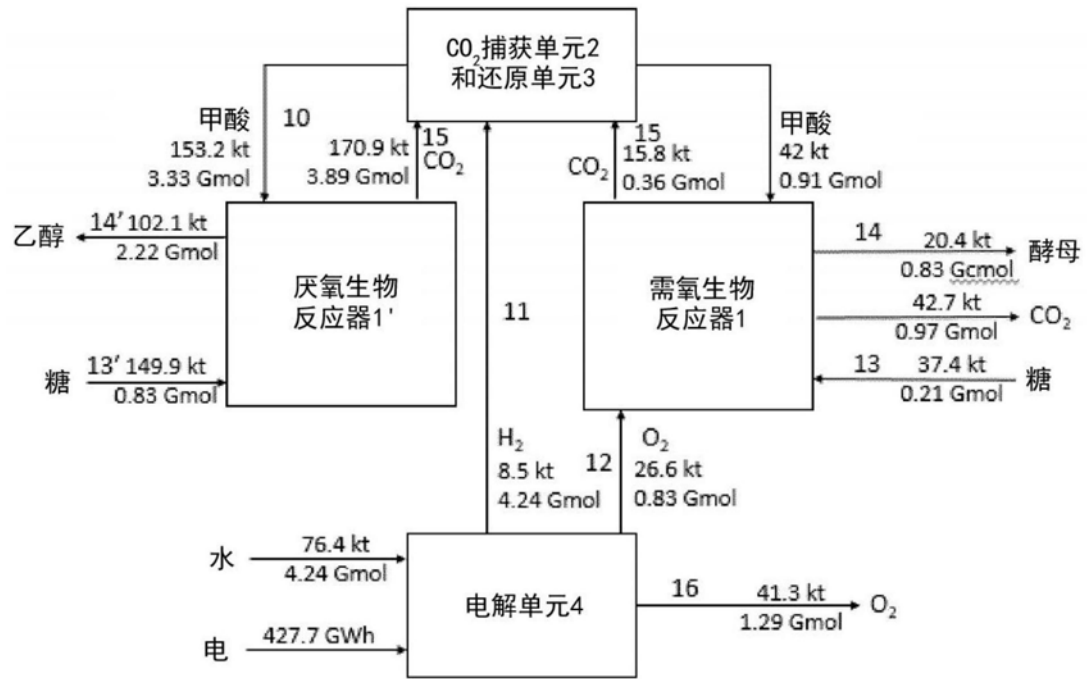


图8

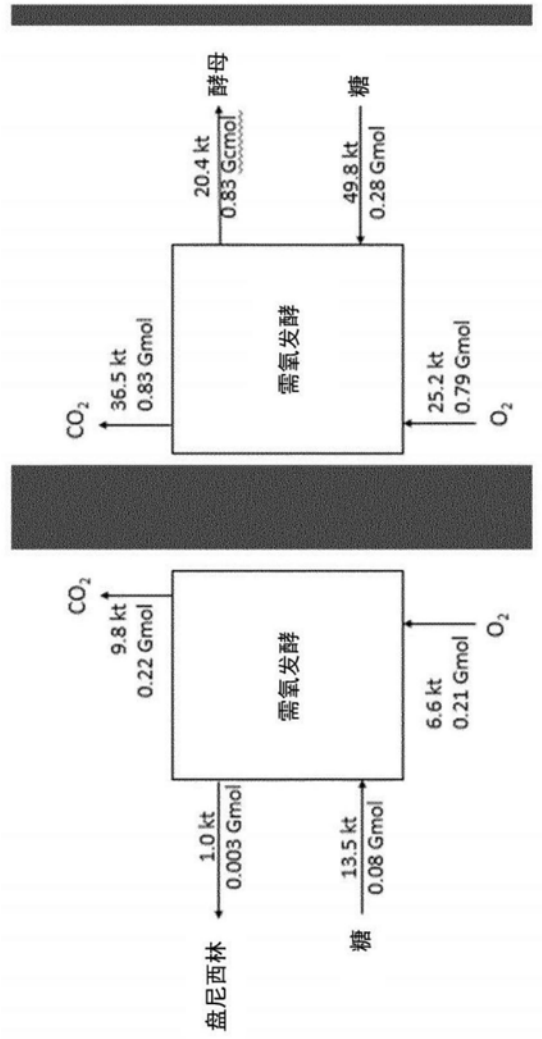


图9

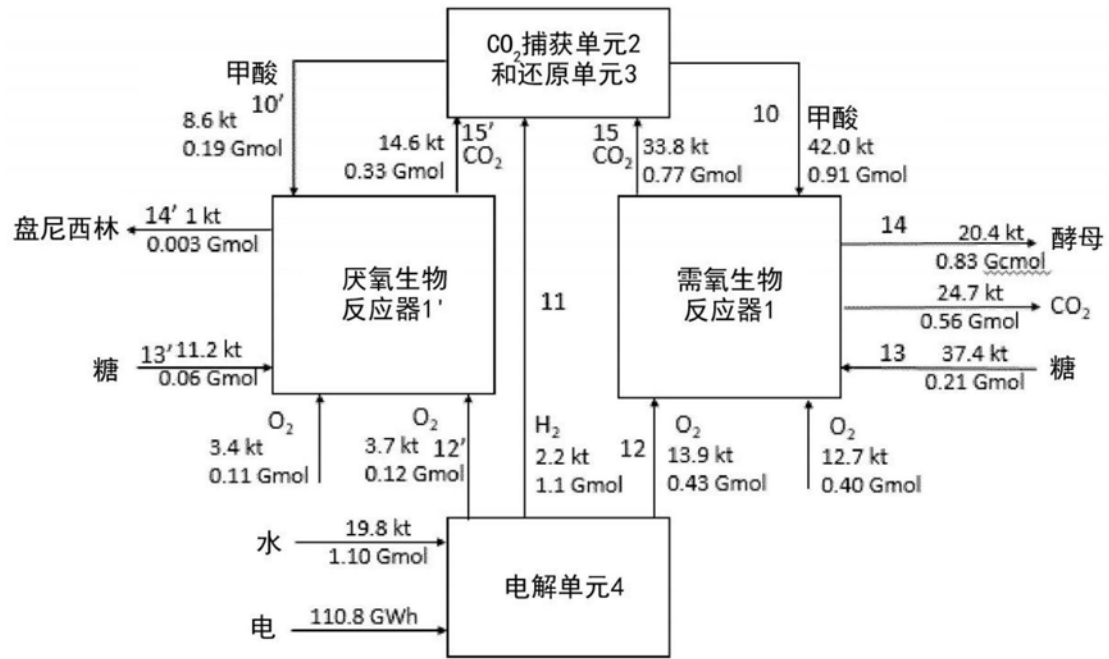


图10