



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I595094 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 08 月 11 日

(21)申請案號：100143704

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 11 月 29 日

(51)Int. Cl. : C12P7/02 (2006.01)

(30)優先權：2010/12/03 美國 61/458,903

(71)申請人：億諾斯生物有限公司(瑞士) INEOS BIO SA (CH)

瑞士

(72)發明人：瑟納拉尼 萊恩 H SENARATNE, RYAN H. (US)；比爾德 布蘭登 BEARD, BRANDON (US)

(74)代理人：惲軼群；陳文郎

(56)參考文獻：

WO 2010093262A1

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：5 項 圖式數：1 共 42 頁

(54)名稱

操作含有一氧化碳之氣態基質發酵的方法

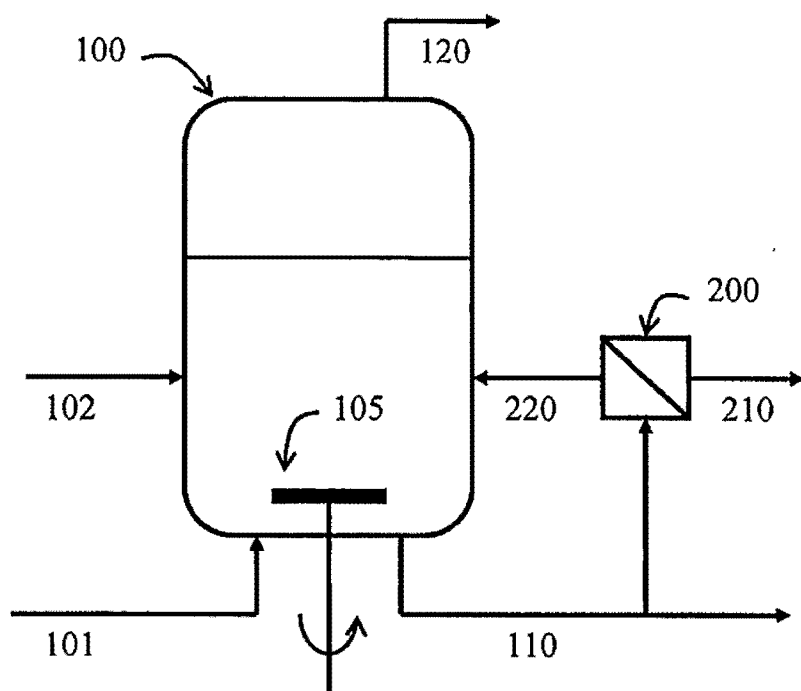
METHOD OF OPERATION OF FERMENTATION OF CARBON MONOXIDE CONTAINING GASEOUS SUBSTRATE

(57)摘要

本揭示文提供氣態基質發酵的方法，其包括：添加氣態基質至生物反應器中之水性培養基內。本揭示文之方法包括：測定細胞密度；調整氣態基質之投入量以增加細胞密度；以預定量改變比 CO 吸收量。

The present disclosure provides methods of gaseous substrate fermentation comprising: adding gaseous substrate into an aqueous medium in a bioreactor. The methods of the present disclosure comprise: measuring cell density; adjusting input of gaseous substrate to increase cell density; changing specific CO uptake in predetermined amounts.

指定代表圖：



符號簡單說明：

100 . . . 生物反應器

101 . . . 含 CO 之氣
態基質的氣態物料流

102 . . . 發酵培養基
之物料流

105 . . . 攪拌器

110、210 . . . 發酵
槽肉湯之物料流

120 . . . 發酵槽廢氣
之物料流

200 . . . 細胞再循環
裝置

220 . . . 經濃縮並返
回的細胞

第 1 圖

發明專利說明書

公告本

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：100143704

※申請日：100.11.29

※IPC 分類：C12P7/02 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

操作含有一氧化碳之氣態基質發酵的方法

METHOD OF OPERATION OF FERMENTATION OF CARBON MONOXIDE
CONTAINING GASEOUS SUBSTRATE

二、中文發明摘要：

本揭示文提供氣態基質發酵的方法，其包括：添加氣態基質至生物反應器中之水性培養基內。本揭示文之方法包括：測定細胞密度；調整氣態基質之投入量以增加細胞密度；以預定量改變比CO吸收量。

三、英文發明摘要：

The present disclosure provides methods of gaseous substrate fermentation comprising: adding gaseous substrate into an aqueous medium in a bioreactor. The methods of the present disclosure comprise: measuring cell density; adjusting input of gaseous substrate to increase cell density; changing specific CO uptake in predetermined amounts.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

100...生物反應器

101...含CO之氣態基質的氣態物料流

102...發酵培養基之物料流

105...攪拌器

110、210...發酵槽肉湯之物料流

120...發酵槽廢氣之物料流

200...細胞再循環裝置

220...經濃縮並返回的細胞

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

發明領域

本揭示文包括一含有一氧化碳之氣態基質的發酵方法。本揭示文提供可製造一或多種醇之含有一氧化碳之氣態基質的發酵方法。

【先前技術】

發明背景

使用某些微生物，諸如得自梭菌屬(*Clostridium*)之微生物，自在含合適營養物及微量礦物的培養基內之含有一氧化碳的氣態基質之微生物發酵製造化學品(諸如有機酸，例如乙酸、及醇類，例如乙醇)的方法業經說明。例如頒予Gaddy等人之美國專利第5,173,429號揭示將達梭菌(*Clostridium ljungdahlii*) ATCC第49587號，其係為一可自合成氣產生乙醇及乙酸酯的厭氣性微生物。頒予Gaddy等人之美國專利第5,807,722號揭示一使用厭氣性細菌，諸如將達梭狀桿菌 ATCC第55380號使廢氣轉化成有用產物(諸如有機酸及醇類)的方法及裝置。頒予Gaddy等人之美國專利第6,136,577號揭示一使用厭氣性細菌，諸如將達梭狀桿菌 ATCC第55988號及第55989號使廢氣轉化成有用產物(諸如有機酸及醇類(尤其乙醇))的方法及裝置。

美國專利申請案第20070275447號揭示一可自廢氣合成可作為生物燃料的產物之梭菌屬細菌物種(卡波西迪伐倫梭菌 (*Clostridium carboxidivorans*), ATCC BAA-624,

“P7”)。美國專利第7,704,723號揭示一可自廢氣合成可作為生物燃料之產物的梭菌屬細菌物種(雷格達利梭菌(*Clostridium ragsdalei*), ATCC BAA-622, “P11”)。

WO 2007/117157揭示藉含有一氧化碳之基質的厭氣性發酵而製造乙醇之自生乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)(登錄號第DSM 10061號, 德國DSMZ)的用途。WO 2009/064200揭示藉含有一氧化碳之基質的厭氣性發酵而製造乙醇之另一細菌(自生乙醇梭菌, 登錄號第DSM 19630號, 德國DSMZ)。

如本項技藝內所述,化學品(諸如醇)之製造速率取決於該發酵培養基內之細胞密度。為了獲得並維持化學品製造之高速率,該生物反應器內之細胞密度必需合適地高。

頒予Gaddy之美國專利第6,136,577號揭示一在一發酵過程中製造乙醇的方法,其中係使用細胞再循環以增加細胞密度。

頒予Gaddy等人之美國專利第7,285,402號揭示一用於製造醇之厭氣性微生物發酵法,其中係在開始期間使用一含過量 H_2 之儲備培養基提供一增加細胞密度的方法。

使用一得自儲備培養基之分批式接種物進行之開始步驟可確保一健康的接種物不含污染物,但並非總是可成功地作為接種程序,因為所使用之細胞密度相當低,尤其若就在接種後,方法參數(諸如氣體速率及攪動速率)被向上推的太多時,更不能成功。

目前,本項技藝需要可在一氣態基質之微生物發酵內

增加細胞密度的改良方法。就一氣態基質之微生物發酵法而言，本揭示文提供一以更快速率增加細胞密度的方法。

【發明內容】

發明概要

本揭示文提供一自一氣態基質製造一或多種醇的方法，其包括：在一生物反應器中之水性培養基內使一含一氧化碳(CO)之氣態基質發酵，該方法包含藉調整該水性培養基內之比CO吸收量(specific CO uptake)而增加細胞密度；其中比CO吸收量之改變速率包括控制CO之輸入速率；其中比CO吸收量之改變速率包括測定CO輸入之速率；測定CO輸出的速率；並測定細胞質量；其中進一步包括以預定量改變比CO吸收量；其中該等預定量包含約0.001至約10.0毫莫耳/分鐘/克乾細胞的範圍；其中該等預定量包含約0.01至約5.0毫莫耳/分鐘/克乾細胞的範圍；其中該等預定量包含約0.1至約1.0毫莫耳/分鐘/克細胞的範圍；其進一步包括添加一水性培養基流至生物反應器內；自該生物反應器移除發酵肉湯流；其進一步包括添加一水性培養基連續流至生物反應器內；自該生物反應器移除發酵肉湯之連續流，其中該水性培養基包含一或多種包括以下之微生物：生物學上純的微生物、天然產生的微生物、非天然產生的微生物、藉基因改造而製成的非天然產生之微生物、天然產生的微生物之突變種、非天然產生的微生物之突變種、重組型微生物、工程微生物、人工合成的微生物；其中該生物反應器包含一或多種反應器；其中該生物反應器包含細胞

再循環單元；其中該含CO之基質包含氫；其進一步包括添加營養培養基至該生物反應器。

作為一實施例，本揭示文提供一氣態基質發酵法，其包括添加含一氧化碳之氣態基質至一生物反應器中之一水性培養基內；該方法包括選擇靶比CO吸收量；調整氣態基質之流量以致使比CO吸收量等於在約0.01至約10毫莫耳/分鐘/克乾細胞之範圍內的該靶比CO吸收量。

作為一實施例，本揭示文提供一氣態基質發酵法，其包括添加含一氧化碳之氣態基質至一生物反應器中之一水性培養基內。該方法包括以下步驟：選擇在約0.01至約10毫莫耳/分鐘/克乾細胞之範圍內的靶比CO吸收量，調整氣態基質之流量以致使比CO吸收量等於該靶比CO吸收量；重複該等步驟，直到獲得在約0.1至約15克/升之範圍內的所欲細胞密度為止；一旦獲得該所欲細胞密度，則轉回連續的操作模式。

作為一實施例，本揭示文提供一氣態基質發酵法，其包括，添加含一氧化碳之氣態基質至一生物反應器中之一水性培養基內；該方法包括選擇靶比CO吸收量；調整氣態基質的流量以致使比CO吸收量等於在約0.01至約10毫莫耳/分鐘/克乾細胞之範圍內的該靶比CO吸收量。

作為一實施例，本揭示文提供一氣態基質發酵法，其包括：添加含一氧化碳之氣態基質至一生物反應器中之一水性培養基內，該方法包括以下步驟：選擇在約0.01至約10毫莫耳/分鐘/克乾細胞之範圍內的靶比CO吸收量，調整

氣態基質的流量以致使比CO吸收量等於該靶比CO吸收量；重複該等步驟，直到獲得在約0.1至約15克/升之範圍內的所欲細胞密度為止；一旦獲得該所欲細胞密度，則轉回連續的操作模式。

本揭示文提供一氣態基質發酵法，其包括添加含一氧化碳(CO)之氣態基質至一生物反應中之一水性培養基內；該水性培養基包含一或多種微生物；該方法包括藉調整該水性培養基內之一或多種該微生物的比CO吸收量而增加細胞密度；在一實施例中，比CO吸收量之改變速率包括調整一或多項步驟；在一實施例中，比CO吸收量之改變速率包括控制CO之輸入速率；在一實施例中，比CO吸收量之改變速率包括測定CO輸入之速率；測定CO輸出之速率；並測定細胞質量；其進一步包括以預定量改變比CO吸收量；在一實施例中，該等預定量包含約0.001至約10.0毫莫耳/分鐘/克乾細胞之範圍；在一實施例中，該等預定量包含約0.01至約5.0毫莫耳/分鐘/克乾細胞之範圍；在一實施例中，該等預定量包含約0.1至約1.0毫莫耳/分鐘/克乾細胞之範圍；在一實施例中，係添加水性培養基之連續流至生物反應器內；自該生物反應器移除發酵肉湯之連續流；其中係重複該等步驟，直到獲得在約1至約50克/升之範圍內的所欲乙醇生產率為止；在一實施例中，係添加水性培養基之連續流至生物反應器內；自該生物反應器移除發酵肉湯之連續流；其中係重複該等步驟，直到在該發酵肉湯內獲得約1至約50克/升之範圍的所欲乙醇濃度為止。

作為一實施例，本揭示文提供一氣態基質發酵法，其包括：添加含一氧化碳之氣態基質至一生物反應器中的水性培養基內，該水性培養基包含一或多種微生物；該方法包括選擇靶比CO吸收量；調整氣態基質的流量以致使比CO吸收量等於在約0.01至約10毫莫耳/分鐘/克乾細胞之範圍內的該靶比CO吸收量。

作為一實施例，本揭示文提供一氣態基質發酵法，其包括：添加含一氧化碳之氣態基質至一生物反應器中之水性培養基內；該水性培養基包含一或多種微生物；該方法包括以下步驟：選擇在約0.01至約10毫莫耳/分鐘/克乾細胞之範圍內的靶比CO吸收量，調整氣態基質的流量以致使比CO吸收量等於該靶比CO吸收量；重複該等步驟，直到獲得在約0.1至約15克/升之範圍內的所欲細胞密度為止；一旦獲得該所欲細胞密度，轉回連續操作模式。

本揭示文提供一氣態基質發酵法，其包括：添加含一氧化碳之氣態基質至一生物反應器中之一水性培養基內；該水性培養基含有一或多種微生物；該方法包括測定細胞密度；調整氣態基質之輸入量以增加細胞密度；以在約0.001至約10.0毫莫耳/分鐘/克乾細胞之範圍內的預定量改變比CO吸收量。

作為一實施例，本揭示文提供一氣態基質發酵法，其包括：添加含一氧化碳之氣態基質至一生物反應器中之一水性培養基內；該水性培養基含有一或多種微生物；該方法包括選擇靶比CO吸收量；調整氣態基質之流量以致使比

CO吸收量等於在約0.01至約10毫莫耳/分鐘/克乾細胞之範圍內的該靶比CO吸收量。

作為一實施例，本揭示文提供一氣態基質發酵法，其包括：添加含一氧化碳之氣態基質至一生物反應器中之一水性培養基內；該水性培養基包含一或多種微生物；該方法包括以下步驟：選擇在約0.01至約10毫莫耳/分鐘/克乾細胞之範圍內的靶比CO吸收量，調整氣態基質之流量以致使比CO吸收量等於該靶比CO吸收量；重複該等步驟，直到獲得在約0.1至約15克/升之範圍內的所欲細胞密度為止；一旦獲得該所欲細胞密度，轉回連續操作模式。

作為實施例，本揭示文之方法包括其中：該微生物含有一或多種生物學上純的厭氧性乙酸生成細菌；其中該微生物包含一或多種天然產生的厭氧性乙酸生成細菌；其中該微生物包含一或多種非天然產生的厭氧性乙酸生成細菌；其中該微生物包含一或多種藉使用厭氧性乙酸生成細菌作為宿主有機體而進行基因改造所製成的非天然產生之厭氧性乙酸生成細菌；其中該微生物包含一或多種藉將厭氧性乙酸生成細菌之基因插入一宿主有機體內而製成的非天然產生之厭氧性乙酸生成細菌。

作為一實施例，本揭示文之該微生物含有一或多種微生物，其包含：生物學上純的微生物、天然產生的微生物、非天然產生的微生物、藉基因改造而製成的非天然產生之微生物，天然產生的微生物之突變種、非天然產生的微生物之突變種、重組型微生物、工程微生物、人工合成的微

生物；其中該微生物包含得自以下之選擇物；基伍乙酸生成菌(*Acetogenium kivui*)、伍迪乙酸菌屬(*Acetobacterium woodii*)、諾特乙酸厭氧菌屬(*Acetoanaerobium noterae*)、甲基營生酪酸菌屬(*Butyribacterium methylotrophicum*)、地下卡登厭氧菌(*Caldanaerobacter subterraneus*)、太平洋地下卡登厭氧菌、生氫羧基嗜熱菌(*Carboxydothemus hydrogenoformans*)、乙酸梭菌(*Clostridium aceticum*)、乙醯丁基梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)、自生乙醇梭菌(DSM 23693)、自生乙醇梭菌(德國DSMZ之DSM 19630)、自生乙醇梭菌(德國DSMZ之DSM 10061)、嗜熱乙酸梭菌(*Clostridium thermoaceticum*)、黏液真桿菌(*Eubacterium limosum*)、將達梭菌PETC(ATCC 49587)、將達梭菌ER12(ATCC 55380)、將達梭菌C-01(ATCC 55988)、將達梭菌O-52(ATCC 55889)、歐丟斯梭菌(*Clostridium ultunense*)、雷格達利梭菌P11(ATCC BAA-622)、貝吉嗜鹼桿菌(*Alkalibaculum bacchi*) CP11 (ATCC BAA-1772)、可斯卡替梭菌(*Clostridium coskatii*)、卡波西迪伐倫梭菌P7(ATCC PTA-7827)、硫還原地桿菌(*Geobacter sulfurreducens*)、熱醋穆爾氏菌(*Morrella thermacetica*)、腴鏈球菌屬(*Peptostreptococcus*)產物、卓拉肯梭菌(*Clostridium drakei*)、重組型微生物(DSM 24138)、及其等之混合物。

作為一實施例，本揭示文該方法之微生物含有將達梭菌中之一或多種菌株、或雷格達利梭菌中之一或多種菌株、或卡波西迪伐倫梭菌中之一或多種菌株、或自生乙醇

梭菌中之一或多種菌株。

作為一實施例，本揭示文該方法之微生物包含一或多種藉將一或多種特選基因插入選自任何將達梭菌菌株、或任何雷格達利梭菌菌株、或任何卡波西迪伐倫梭菌菌株、或任何自生乙醇梭菌菌株之宿主微生物內而製成的基因改造微生物。

作為一實施例，本揭示文該方法之微生物包含一或多種藉將一或多種得自任何將達梭菌菌株、或任何雷格達利梭菌菌株、或任何卡波西迪伐倫梭菌菌株、或任何自生乙醇梭菌菌株之基因插入任何宿主微生物內而製成的基因改造微生物。

作為實施例，本揭示文該方法之生物反應器包含一或多種反應器；其中該生物反應器包含細胞再循環單元；其中該含CO之基質包含氫。

作為一實施例，其進一步包括添加營養培養基至該生物反應器內。

圖式簡單說明

第1圖包含闡明一氣態基質之微生物發酵之方法的一實施例之示意圖。

【實施方式】

定義

除非另有定義，如在本揭示文之專利說明書從頭至尾所使用的以下名詞之定義如下，且可包括下文界定之定義的單數形式或複數形式：

可修飾任何數量之名詞“約”係指，例如在實驗室、試驗設備或製造設施內，維持微生物培養基之真實環境下所遭遇的數量之變化程度。例如當藉“約”而修飾時，一混合物或數量內所使用的成份或測定量包括在製造工廠或實驗室內之一實驗條件下測定時典型上使用之受化量及小心程度。例如當藉“約”而修飾時，一產物之一組份的用量包括在工廠或實驗室內之多次實驗批間的變化量以及該分析法固有的變化量。不管是否藉“約”而修飾，該等用量包括彼等用量之同等詞。文中詳述且藉“約”而修飾的任何數量亦可用於本揭示文，就如同本經“約”而修飾的該用量。

該名詞“乙酸生成菌(acetogen)”或“乙酸生成性”係指可產生作為厭氧性呼吸之產物的乙酸鹽之細菌。由於所有已知乙酸生成菌皆為細菌，所以這些有機體亦稱為乙酸生成性細菌。在多種具厭氧性(缺氧)之棲息地可發現乙酸生成菌。乙酸生成菌可利用多種化合物以作為能量及碳之來源；乙酸生成性代謝之最佳研究形式包括使用二氧化碳作為碳源以及使用氫作為能量源。

該等名詞“生物反應器”、“反應器”或“發酵生物反應器”包括一由一或多種容器及/或塔或管路配置所組成的發酵裝置，其包括連續攪拌槽反應器(CSTR)、泡柱、氣舉式發酵槽、靜電混合器、或適於氣液接觸之其它裝置。就本揭示文之方法而言，該發酵生物反應器可包括一能將發酵肉湯餵至第二發酵生物反應器的生長反應器，於其中可產生大部份產物(乙醇)。

該名詞“細胞密度”意指每單位體積之發酵肉湯的微生物細胞質量，例如克/升。

該名詞“細胞再循環”意指在發酵肉湯內使液體(濾液)與固體微生物細胞分離並使所有或部份該等經分離固體微生物細胞返回可利用該微生物產生該發酵肉湯的發酵槽之裝置。一般而言，係使用過濾裝置以進行該分離步驟。自該過濾裝置產生無固體微生物之濾液物料流及濃縮固體微生物物料流。該無固體之濾液物料流可含有小於一特定粒度的固體顆粒。

該名詞“轉化”意指一部份輸入數量已轉化成產物(群)；其係以下述方程式表示： $(\text{輸入數量} - \text{輸出數量}) / (\text{輸入數量})$ 。

該名詞“乙醇產生率”意指每天每單位發酵槽體積所產生的乙醇數量。該發酵槽體積為該發酵槽內的有效體積或液體體積。

該名詞“發酵”意指CO發酵成為醇類或乙酸鹽。已知許多細菌可進行CO轉化成醇類(其包括丁醇及乙醇、與乙酸的發酵，且適用於本揭示文該方法。適用於本揭示文之此等細菌的實例包括梭菌屬的細菌，諸如將達梭菌之菌株，其包括在WO 2000/68407、EP 117309、美國專利第5,173,429號、第5,593,886號、及第6,368,819號、WO 1998/00558及WO 2002/08438中所述的菌株；自生乙醇梭菌之菌株(德國DSMZ之DSM 10061及DSM 19630)，其包括在WO 2007/11715及WO 2009/151342中所述的菌株；及雷格達利

梭菌(P11 ATCC BAA-622)，其包括分別在美國專利第7,704,723號及Hasan Atiyeh於2010年4月29日在Oklahoma EPSCoR Annual State Conference中所提出的“Biofuels and Bioproducts from Biomass-Generated Synthesis Gas.”內所述的梭菌；及在美國專利申請案第20070275447號中所述的卡波西迪伐倫梭菌(ATCC BAA-624)。其它合適細菌包括穆爾氏菌屬，其包括Moorella sp HUC22-1；及生氫梭基嗜熱菌屬之細菌。各該公開案之揭示文全部在此併入本案以為參考資料。此外，可藉熟悉本項技藝者而選擇適用於本揭示文之方法的其它細菌。亦可知含2或多種細菌之混合培養基可用於本揭示文之方法。一適用於本揭示文的微生物為自生乙醇梭菌。可在任何合適生物反應器(諸如連續攪拌槽反應器(CTSR)、泡柱反應器(BCR)或滴流床反應器(TBR))內進行發酵。而且，在本揭示文之某些較佳實施例中，該生物反應器可包括其中該等微生物係經培養的第一生長反應器以及得自該生長反應器之發酵肉湯經饋入且其中大部份該發酵產物(乙醇及乙酸鹽)經產生的第二發酵反應器。

該名詞“發酵肉湯”意指：發酵培養基之組成物包含最後可成為該發酵肉湯的任何組份，其包括未經處理的基質、發酵產物、微生物(群)及所衍生的組份、化學添加物、營養物、氣體。所有主要三相：固體、液體及氣體係存在於該發酵肉湯及其等之可能交互作用內。

該名詞“基因”意指DNA之一片段；其可包括在該編碼DNA前及後的區域以及在外基因間的內含子(intron)；其可

以是遺傳之一單位；在本揭示文內，該名詞“基因”包括可促成遺傳表型/功能的一DNA片段；其細胞可轉譯成RNA且至少部份轉譯成蛋白質的DNA之片段；由A、T、C、及G之組合所製成之鹼基的一序列(一索狀結構)。一般而言，如本揭示文所提供，該定義可指單數或複數意義。

該名詞“微生物”或“microbe”包括細菌、真菌、酵母、原始細菌(archaea)、及原生生物界(protists)；微細植物(稱為綠藻)；及動物，諸如浮游生物、渦蟲及阿米巴。有些微生物亦包括病毒，但是其它人將病毒視為非活體。微生物居住在有液體水之生物域的所有部位內，其包括土壤、熱泉、在海床上、大氣層之高處、及地球之地殼內的岩石內之深處。對在生態系內之營養物再循環而言，微生物必不可少，因為其等可作為分解劑。在生物科技、在傳統食品及飲料製劑、及在以基因工程為主的現代科技中，微生物亦受人利用。而且，已預期基因定向演化可選擇性篩選可用於本揭示文之微生物。進一步預期重組型DNA科技可利用現有微生物之特選菌株以創造微生物。而且，化學引起基因突變的科技(使用各種化學品以使細菌的DNA突變)可使用現有微生物的特選菌株以創造微生物。已預期可以使CO及水或H₂及CO₂轉化成乙醇及乙酸產物的細菌可用於本揭示文。有用的細菌之某些實例包括基伍乙酸生成菌、伍迪乙酸菌屬、諾特乙酸厭氧菌屬、甲基營生酪酸菌屬、地下卡登厭氧菌、太平洋地下卡登厭氧菌、生氫羧基嗜熱菌、乙酸梭菌、乙醃丁基梭菌、自生乙醇梭菌(DSM 23693)、

自生乙醇梭菌(德國DSMZ之DSM 19630)、自生乙醇梭菌(德國DSMZ之DSM 10061)、嗜熱乙酸梭菌、黏液真桿菌、將達梭菌PETC(ATCC 49587)、將達梭菌ER12(ATCC 55380)、將達梭菌C-01(ATCC 55988)、將達梭菌O-52(ATCC 55889)、歐丟斯梭菌、雷格達利梭菌P11(ATCC BAA-622)、貝吉嗜熱桿菌CP11(ATCC BAA-1772)、可斯卡替梭菌、卡波西迪伐倫梭菌P7(ATCC PTA-7827)、硫還原地桿菌、熱醋穆爾氏菌、腺鏈球菌屬產物、卓拉肯梭菌、重組型微生物(DSM 24138)、及其等之混合物。可藉熟悉本項技藝者而選擇適用於這些方法的其它細菌。一般而言，如本揭示文內所提供，該定義可指單數或複數。

該名詞“營養培養基”包含可含有一或多種能夠使特選微生物生長的維生素及礦物質之微生物生長培養基。適於本發明之用途的多種營養培養基之組份係已知且報告在以下之先前公開案內，諸如國際專利申請案第WO 2008/00558號、美國專利第7,285,402號、美國專利第5,807,722號、美國專利第5,593,886號、及美國專利第5,821,111號。

該名詞“比CO吸收量”意指藉每單位時間(分鐘)之每單位微生物細胞質量(克)而消耗之CO數量(毫莫耳)，亦即毫莫耳/克/分鐘。

該名詞“基質”意指一旦藉酵素或微生物而作用時，可製造發酵產物的物質。例如糖在藉酵素而作用之糖發酵中可產生乙醇，CO、CO₂及H₂中之一或多者在藉微生物而作用之合成氣體(syngas)發酵中可產生羧酸及醇中之一或多者。

該名詞“syngas”或“合成氣體”意指一含有各種數量之一氧化碳及氫的氣體混合物之別稱的合成氣體。製造方法的實例包括可產生氫之天然或煙之蒸汽重組法、煤之氯化法、及在某些廢氣產生能源(waste-to-energy)之氯化設施的類型中進行的方法。該名稱來自其等作為創造合成天然氣(SNG)之中間產物並用於製造氨或甲醇的用途。經由費雪-拖布希(Fischer-Tropsch)合成法以及先前該Mobil之甲醇產生汽油的方法，合成氣體亦可作為製造可作為燃料或潤滑劑之合成石油的中間產物。合成氣體主要由氫、一氧化碳、以及通常為少許二氧化碳所組成。

實施方式

本揭示文提供一氣態基質發酵之方法，其包括添加含一氧化碳(CO)之氣態基質至一生物反應器內之一水性培養基中；該水性培養基包含一或多種微生物；該方法包括藉調整該水性培養基內之一或多種該等微生物的比CO吸收量而增加細胞密度；其中比CO吸收量之改變速率包括調整及/或控制以下步驟中之一或多者：控制CO之輸入速率；測定CO輸入之速率；測定CO輸出之速率；測定細胞質量；進一步包括以預定量改變比CO吸收量；其中該等預定量包含一約0.001至約10.0毫莫耳/分鐘/克乾細胞之範圍；在一實施例中，該等預定量可選擇性包含一約0.01至約5.0毫莫耳/分鐘/克乾細胞之範圍及/或一約0.1至約1.0毫莫耳/分鐘/克乾細胞之範圍；一實施例可選擇性包括添加水性培養基之連續流至生物反應器內；自該生物反應器移除發酵肉湯之連

續流；其中係重複該等步驟，直到獲得一約1至約50克/升之範圍的所欲乙醇生產率為止；一實施例可選擇性包括添加水性培養基之連續流至生物反應器內；自該生物反應器移除發酵肉湯流；其中係重複該等步驟，直到在該發酵肉湯內獲得一約1至約50克/升之範圍的所欲乙醇濃度為止。

作為一實施例，本揭示文提供一氣態基質發酵的方法，其包括：添加含一氧化碳之氣態基質至一生物反應器內之一水性培養基中；該水性培養基包含一或多種微生物；該方法包括選擇靶比CO收吸量；調整氣態基質的流量以致使比CO吸收量等於在一約0.01至約10毫莫耳/分鐘/克乾重的範圍內之該靶比CO吸收量。

作為一實施例，本揭示文提供一氣態基質發酵之方法，其包括：添加含一氧化碳之氣態基質至一生物反應器內之一水性培養基中；該水性培養基包含一或多種微生物；該方法包括以下步驟：選擇在約0.01至約10毫莫耳/分鐘/克乾細胞之範圍內的靶比CO吸收量，調整氣態基質之流量以致使比CO吸收量等於該靶比CO吸收量；重複該等步驟，直到獲得在一約0.1至約15克/升之範圍內的所欲細胞密度為止；一旦獲得該所欲細胞密度，轉回連續操作模式。

本揭示文提供一氣態基質發酵之方法，其包括：添加含一氧化碳之氣態基質至一生物反應器內之一水性培養基中；該水性培養基包含一或多種微生物；該方法包括測定細胞密度；調整氣態基質之輸入量以增加細胞密度；以在一約0.001至約10.0毫莫耳/分鐘/克乾細胞之範圍內的預定

量改變比CO吸收量。

作為一實施例，本揭示文提供一氣態基質發酵的方法，其包括：添加含一氧化碳之氣態基質至一生物反應器內之一水性培養基中；該水性培養基包含一或多種微生物；該方法包括選擇靶比CO收吸量；調整氣態基質的流量以致使比CO吸收量等於在一約0.01至約10毫莫耳/分鐘/克乾重的範圍內之該靶比CO吸收量。

作為一實施例，本揭示文提供一氣態基質發酵之方法，其包括：添加含一氧化碳之氣態基質至一生物反應器內之一水性培養基中；該水性培養基包含一或多種微生物；該方法包括以下步驟：選擇在約0.01至約10毫莫耳/分鐘/克乾細胞之範圍內的靶比CO吸收量，調整氣態基質之流量以致使比CO吸收量等於該靶比CO吸收量；重複該等步驟，直到獲得在一約0.1至約15克/升之範圍內的所欲細胞密度為止；一旦獲得該所欲細胞密度，轉回連續操作模式。

作為實施例，本揭示文之方法包括其中：該微生物含有一或多種生物學上純的缺氧性乙酸生成細菌；其中該微生物包含一或多種天然產生的厭氧性乙酸生成細菌；其中該微生物包含一或多種非天然產生的厭氧性乙酸生成細菌；其中該微生物包含一或多種藉使用厭氧性乙酸生成細菌作為宿主有機體而進行基因改造所製成的非天然產生之厭氧性乙酸生成細菌；其中該微生物包含一或多種藉將厭氧性乙酸生成細菌之基因插入一宿主有機體內而製成的非天然產生之厭氧性乙酸生成細菌。

作為一實施例，本揭示文之該方法中之微生物包含一或多種選自以下之細菌：基伍乙酸生成菌、伍迪乙酸菌屬、諾特乙酸厭氧菌屬、甲基營生酪酸菌屬、地下卡登厭氧菌、太平洋地下卡登厭氧菌、生氫羧基嗜熱菌、乙酸梭菌、乙醯丁基梭菌、自生乙醇梭菌(DSM 23693)、自生乙醇梭菌(德國DSMZ之DSM 19630)、自生乙醇梭菌(德國DSMZ之DSM 10061)、嗜熱乙酸梭菌、黏液真桿菌、將達梭菌PETC(ATCC 49587)、將達梭菌ER12(ATCC 55380)、將達梭菌C-01(ATCC 55988)、將達梭菌O-52(ATCC 55889)、歐丟斯梭菌、雷格達利梭菌P11(ATCC BAA-622)、貝吉嗜熱桿菌CP11(ATCC BAA-1772)、可斯卡替梭菌、卡波西迪伐倫梭菌P7(ATCC PTA-7827)、硫還原地桿菌、熱醋穆爾氏菌、腓鏈球菌屬產物、卓拉肯梭菌、重組型微生物(DSM 24138)、及其等之混合物。

作為一實施例，本揭示文該方法之微生物含有將達梭菌中之一或多種菌株、或雷格達利梭菌中之一或多種菌株、或卡波西迪伐倫梭菌中之一或多種菌株、或自生乙醇梭菌中之一或多種菌株。

作為一實施例，本揭示文該方法之微生物包含一或多種藉將一或多種特選基因插入選自任何將達梭菌菌株、或任何雷格達利梭菌菌株、或任何卡波西迪伐倫梭菌菌株、或任何自生乙醇梭菌菌株之宿主微生物內而製成的基因改造微生物。

作為一實施例，本揭示文該方法之微生物包含一或多

種藉將一或多種得自任何將達梭菌菌株、或任何雷格達利梭菌菌株、或任何卡波西迪伐倫梭菌菌株、或任何自生乙醇梭菌菌株之基因插入任何宿主微生物內而製成的基因改造微生物。

作為實施例，本揭示文該方法之生物反應器包含一或多種反應器；其中該生物反應器包含細胞再循環單元；其中該含CO之基質包含氫。

作為一實施例，其進一步包括添加營養培養基至該生物反應器內。

第1圖描述一藉使用細菌進行發酵而自含一氧化碳(CO)之氣態基質(諸如合成氣體)製造化學品(諸如醇產物混合物)的方法，其中該方法包括一含包含該等細菌細胞及一發酵培養基之發酵肉湯的生物反應器(100)。可將一含CO之氣態基質的氣態物料流(101)連同發酵培養基物料流(102)饋至該生物反應器內。可自該生物反應器移除含該細菌細胞及該產物化學品(群)之發酵肉湯物料流(102)。自該生物反應器排放含氣態基質之該氣態物料流之從未用過的部份之發酵槽廢氣物料流(120)。在一實施例中，該發酵槽肉湯之物料流(110)可流至一細菌再循環裝置(200)，其中該等細胞係經濃縮且返回(220)至該生物反應器。將得自該細胞循環裝置之濾液流(210)送至該化學品(群)之回收製程。在一實施例中，係將發酵槽肉湯物料流(110)之至少一部份送至該醇產物混合物之回收製程。在一實施例中，係將該發酵槽肉湯物料流(210)之至少一部份送至該醇產物混合物之回收

製程。

在一實施例中，該生物反應器(100)配備一攪拌器(105)，該攪拌器可提供攪拌作用以促進含氣態基質之氣態物料流的接觸並增強氣態基質與液體發酵培養基之質量轉移。較佳具有良好質量轉移速率，因此在該發酵法從頭至尾，該生物反應器內可得到合適攪拌作用。

有用於收集經導至生物反應器之含氣態基質的氣態物料流(101)之試樣以及離開生物反應器之廢氣(120)的裝置(第1圖內並未顯示)。有一用於收集生物反應器之發酵肉湯的試樣之裝置(第1圖內並未顯示)。不時收集該等氣體及液體試樣並分析各種氣體組份之消耗或產生、各種產物之產生以及該發酵肉湯之光學密度。

可使用這些測定值，藉以下方程式而計算發酵肉湯內之比一氧化碳(CO)吸收量(SCU)及細胞密度：

$$\text{CO吸收量, 毫莫耳/分鐘} = (\text{毫莫耳/分鐘之CO輸入量}) - (\text{毫莫耳/分鐘之CO輸出量}) \quad (1)$$

$$\text{細胞密度, 克/升} = (\text{光學密度}) \cdot (\text{稀釋因數}) \cdot (\text{細胞質量常數}) \quad (2)$$

$$\text{細胞質量, 克} = (\text{細胞密度}) \cdot (\text{生物反應器之體積}) \quad (3)$$

$$\text{比CO吸收量, 毫莫耳/分鐘/克} = (\text{CO吸收量}) / (\text{細胞質量}) \quad (4)$$

細胞密度為每單位體積之發酵槽肉湯的細胞質量。生物反應器之體積為當停止攪拌時，該生物反應器內之液體體積。細胞質量常數為具有光學密度為1之每升發酵肉湯之乾

細菌細胞的質量(克)。光學密度為發酵槽肉湯經一合適溶劑(諸如鹽液)稀釋後所獲得之一試樣的光學密度。

用於本揭示文之該方法的微生物可包含生物學上純厭氧性乙酸生成細菌中之一或多種。

用於本揭示文之該方法的微生物：可包含天然產生的厭氧性乙酸生成細菌中之一或多種；可包含非天然產生的厭氧性乙酸生成細菌中之一或多種；可包含一或多種藉使用厭氧性乙酸生成細菌作為宿主有機體而進行基因改造所製成的非天然產生之厭氧性乙酸生成細菌；可包含一或多種藉將厭氧性乙酸生成細菌之基因插入一宿主有機體內而製成的非天然產生之厭氧性乙酸生成細菌。

用於本揭示文該方法之微生物可包含一或多種選自以下之細菌：基伍乙酸生成菌、伍迪乙酸菌屬、諾特乙酸厭氧菌屬、甲基營生酪酸菌屬、地下卡登厭氧菌、太平洋地下卡登厭氧菌、生氫羧基嗜熱菌、乙酸梭菌、乙醃丁基梭菌、自生乙醇梭菌(DSM 23693)、自生乙醇梭菌(德國DSMZ之DSM 19630)、自生乙醇梭菌(德國DSMZ之DSM 10061)、嗜熱乙酸梭菌、黏液真桿菌、將達梭菌PETC(ATCC 49587)、將達梭菌ER12(ATCC 55380)、將達梭菌C-01(ATCC 55988)、將達梭菌O-52(ATCC 55889)、歐丟斯梭菌、雷格達利梭菌P11(ATCC BAA-622)、貝吉嗜熱桿菌CP11(ATCC BAA-1772)、可斯卡替梭菌、卡波西迪伐倫梭菌P7(ATCC PTA-7827)、硫還原地桿菌、熱醋穆爾氏菌、腓鏈球菌屬產物、卓拉肯梭菌、重組型微生物(DSM 24138)、及其等之混

合物。

在一實施例中，用於本揭示文該方法之微生物包含將達梭菌中之一或多種菌株、或雷格達利梭菌中之一或多種菌株、或卡波西迪伐倫梭菌中之一或多種菌株、或自生乙醇梭菌中之一或多種菌株。

在一實施例中，用於本揭示文該方法之微生物包含一或多種藉將一或多種特選基因插入選自任何將達梭菌菌株、或任何雷格達利梭菌菌株、或任何卡波西迪伐倫梭菌菌株、或任何自生乙醇梭菌菌株之宿主微生物內而製成的基因改造微生物。

在一實施例中，用於本揭示文該方法之微生物包含一或多種藉將一或多種得自任何將達梭菌菌株、或任何雷格達利梭菌菌株、或任何卡波西迪伐倫梭菌菌株、或任何自生乙醇梭菌菌株之基因插入任何宿主微生物內而製成的基因改造微生物。

本揭示文該方法之一實施例包括測定細胞密度，並藉增加比CO吸收量而調整氣態基質的輸入量以增加細胞密度。在一實施例中，本揭示文該方法包括測定細胞密度並藉減少比CO吸收量而調整氣態基質的輸入量以增加細胞密度。在一實施例中，本揭示文該方法包括測定細胞密度並藉增加比CO吸收量而調整氣態基質的輸入量以使細胞密度逐漸增至所欲細胞密度。在一實施例中，本揭示文該方法包括測定細胞密度並藉減少比CO吸收量而調整氣態基質的輸入量以使細胞密度逐漸增至所欲細胞密度。在一實施例中，本揭示文

該方法包括測定細胞密度並藉使比CO吸收量逐漸增至所欲比CO吸收量而增加細胞密度。在一實施例中，本揭示文該方法包括測定細胞密度並藉使比CO吸收量逐漸減至所欲比CO吸收量而增加細胞密度。在一實施例中，本揭示文該方法包括測定細胞密度、增加細胞密度並藉增加比CO吸收量而使醇生產率逐漸增至所欲醇生產率。在一實施例中，本揭示文該方法包括測定細胞密度、增加細胞密度並藉增加比CO吸收量而使醇生產率逐漸增至所欲醇生產率。在一實施例中，比CO吸收量之改變包括預定數值之等級的增加。在一實施例中，比CO吸收量之改變包括預定數值之等級的減少。在一實施例中，預定數值之等級包括同等的數值等級。在實施例中，預定數值之等級包括不相等的數值等級。

在一實施例中，若細胞密度小於一靶細胞密度，則該方法包括選擇一靶比CO吸收量並調整含氣態基質之氣態物料流的流量，直到比CO吸收量等於該靶比CO吸收量為止。

在一實施例中，若細胞密度小於一靶細胞密度，則該方法包括選擇一靶比CO吸收量並調整含氣態基質之氣態物料流的流量，直到比CO吸收量等於該靶比CO吸收量為止；並重複選擇一靶比CO吸收量且調整含氣態基質之氣態物料流的流量，直到比CO吸收量等於該靶比CO吸收量為止。

該靶比CO吸收量之數值可包含一每分鐘每克乾微生物之約0.1至約10.0毫莫耳的範圍。該所欲比CO吸收量之數值可包含一約0.1至約10毫莫耳/分鐘/克的範圍。

該靶細胞密度之數值可包含一約0.1至約50克/升的範

圍。該所欲細胞密度之數值可包含一0.5至50克/升的範圍。

該所欲乙醇生產率的數值包含一1至50克/升/天的範圍。

該發酵肉湯內之該所欲乙醇濃度值包含一1至20克/升的範圍。

典型上，在實驗室規模的生物反應器(諸如 New Brunswick Bioflow I 生物反應器)內，在每分鐘300-900轉(rpm)的範圍內之攪拌器速度可提供用於較佳質量轉移速率的合適攪拌。在一實施例中，係使用在500-700rpm之範圍內的攪拌器速度。在一實施例中，係使用約600rpm之攪拌器速度。

在一實施例中，就大規模的生物反應器(諸如約100至500升大小之生物反應器)而言，係使用在約50至約500rpm之範圍內的攪拌器速度以進行攪拌。在一實施例中，就約100,000至約1,000,000升大小之商業規格的生物反應器而言，係使用在約1至約50rpm之範圍內的攪拌器速度以進行攪拌。在各實施例中，與較小的生物反應器比較，較大的生物反應器需要較小的rpm。

作為一實施例，本揭示文提供在25至50°C之範圍內之該生物反應器內的溫度控制。

在本揭示文該方法之一實施例中，該生物反應器包含一反應器。

在本揭示文該方法之一實施例中，該生物反應器包含二或更多反應器。

在本揭示文該方法之一實施例中，該生物反應器包含細胞再循環單元。

在本揭示文該方法之一實施例中，該含CO之含氣態基質的氣態物料流亦包含氫。在一實施例中，該含CO之含氣態基質的氣態物料流包含合成氣體。在一實施例中，該含CO之含氣態基質的氣態物料流包含鋼鐵廠廢氣。在一實施例中，該含CO之含氣態基質的氣態物料流包含藉含生物質(biomass)之碳質材料的氣化作用而獲得之合成氣體。

在一實施例中，一或多個生長或種菌發酵槽可提供細菌細胞之接種物的初供應。在一實施例中，一或多個生長或種菌發酵槽連同本揭示文該方法可持續對生物反應器供應細菌細胞。在本揭示文之一實施例中，該方法包含細胞再循環。

一製造醇產物混合物的方法包括：

添加含一氧化碳之氣態基質至一生物反應器內之一水性培養基中；該水性培養基包含一或多種微生物；該方法包括以下步驟：選擇在約0.01至約10毫莫耳/分鐘/克乾細胞之範圍內的靶比CO吸收量，調整氣態基質之流量以致使比CO吸收量等於該靶比CO吸收量；重複該等步驟，直到獲得在一約0.01至約10毫莫耳/分鐘/克乾細胞的範圍內的所欲比CO吸收量為止；進一步包括添加水性培養基之連續流至生物反應器內；自該生物反應器移除發酵肉湯之連續流。

一製造醇產物混合物的方法包括：

添加含一氧化碳之氣態基質至一生物反應器內之一水性培養基中；該水性培養基包含一或多種微生物；該方法包括以下步驟：選擇在約0.01至約10毫莫耳/分鐘/克乾細胞之範圍內的靶比CO吸收量，調整氣態基質之流量以致使比CO吸收

量等於該靶比CO吸收量；重複該等步驟，直到獲得一約1至約50克/升的範圍之所欲乙醇生產率為止；進一步包括添加水性培養基之連續流至生物反應器內；自該生物反應器移除發酵肉湯之連續流。

一製造醇產物混合物的方法包括：

添加含一氧化碳之氣態基質至一生物反應器內之一水性培養基中；該水性培養基包含一或多種微生物；該方法包括以下步驟：選擇在約0.01至約10毫莫耳/分鐘/克乾細胞之範圍內的靶比CO吸收量，調整氣態基質之流量以致使比CO吸收量等於該靶比CO吸收量；重複該等步驟，直到在該發酵肉湯內獲得一約1至約50克/升的範圍之所欲乙醇濃度為止；進一步包括添加水性培養基之連續流至生物反應器內；自該生物反應器移除發酵肉湯之連續流。

已預期本揭示文該方法包括：一批式法、一半批式法、一饋料批式法、轉移至一連續法的方法、連續法。

本揭示文提供一氣態基質發酵的方法，其包括：添加含一氧化碳(CO)之氣態基質至一生物反應器內之一水性培養基中；該水性培養基包含一或多種微生物；該方法包括測定細胞密度；測定CO之輸入速率及CO之輸出速率；測定比CO吸收量；調整CO之輸入速率以增加細胞密度，其方式可致使比CO吸收量以預定量改變；可選擇性重複這些步驟。

營養培養基包含可以使特選微生物成長之可含有維生素及礦物質中之一或多種的微生物生長培養基。表1提供如藉本揭示文而涵蓋之營養培養基的一實施例。適於本揭示文

之其它營養培養基在本項技藝中係已知。而且本發明可利用非本項技藝中所揭示，但係衍生自表1內所述之各組份的營養培養基。本揭示文提供改良的營養培養基之組成物。

表1：培養基組份及其等之濃度

組份/離子	以下述形式添加	以ppm表示的濃度
NH_4^+	$\text{NH}_4\text{Cl}/(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	≤ 838
Fe	$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	≤ 17
Ni	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	≤ 0.2
Co	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	≤ 1.0
Se	Na_2SeO_3	≤ 0.1
Zn	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	≤ 0.5
Mo	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	≤ 0.3
Mn	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	≤ 0.2
B	H_3BO_3	≤ 1.1
Cu	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	≤ 0.15
W	$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	≤ 1.2
K	KCl	≤ 79
Mg	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	≤ 60
Na	NaCl	$\leq 80^*$
Ca	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	≤ 55
胱胺酸HCl	胱胺酸HCl	≤ 250
PO_4^{-2}	$\text{H}_3\text{PO}_4/(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	≤ 820
泛酸	泛酸	≤ 0.04
生物素	生物素	≤ 0.02
硫胺素	硫胺素	≤ 0.05

* Ni^+ 濃度係僅得自NaCl。其並不包括得自其它組份(諸如 $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)之 Na^+ 。

** Ca^{+2} 濃度並不包括得自泛酸鈣鹽(亦即d-泛酸鈣)之鈣。

實例

比較例(見美國專利US 7,285,402中之實例11)

為了製備供該反應器之接種的儲備培養物，使將達梭菌菌株C-01(ATCC登錄號第55988號)之培養物在含1克/升酵素萃取物及1克/升胰化酪蛋白在鹽類及維生類內的一富集培養基內之150毫升血清瓶中的 CO 、 CO_2 及 H_2 上成長。所

使用該維生素濃度為0.4毫升/升之一含50.5毫克/升之泛酸鈣、20.6毫克/升之d-生物素及50.6毫克/升之硫胺素HCl的水性溶液之培養基。於37°C下在一搖動器培養器內培養該等瓶。如藉目測法而測定，使該等培養基成長至指數成長期。經由各接種，自血清瓶將約90毫升儲備培養物轉移至1升培養基，其代表9體積%接種。成功的接種描述在下文。可數次重複所描述程序以獲得成功的接種。

在獲得成功的接種時，添加90毫升/升之接種物至1升之含0.4毫升/升之維生素及鹽的基礎培養基批($t=0$)。該攪拌速率為240rpm，該pH為5.3，該溫度為38.5°C且該氣體滯留時間(持續氣體流體)為110分鐘。該氣體進料含有62% H_2 、31% CO及7% C_2H_6 。經13小時($t=3$ 小時)後，注意到一些CO轉化現象，且於 $t=23$ 小時下，該攪拌速率自240rpm增至300rpm。於 $t=27$ 小時下，該氣體滯留時間降至100分鐘，且於 $t=46$ 小時下，氣體滯留時間進一步降低。於 $t=28$ 小時、59小時、72小時及85小時下，該攪拌速率亦以100rpm增量增加。

在 $t=110$ 小時下，係使用80分鐘之氣體滯留時間及600rpm之攪拌速率操作該系統。該細胞濃度為0.5克/升，且該CO轉化率為35%。仍無 H_2 轉化現象，但是少量乙醇及乙酸鹽(各約1克/升)已聚集在該批式培養肉湯內。持續努力，直到已可強調該反應器內之細胞生長的時間為止。

於 $t=120$ 小時下，以0.4毫升/分鐘之速率開始使用與基礎培養基內相同之濃度的培養基流動。然後開始進行使氣

體速率、攪拌速率及培養基速率標稱增加的程序，且在過量 H_2 下小心地維持該系統。在 $t=210$ 小時下，該乙醇濃度為17克/升，該乙酸鹽濃度為1克/升，該細胞濃度為1.6克/升，該CO轉化率為約100%且該 H_2 轉化率為90%。該乙醇生產率可達每天11.4克/升。

再開始逐漸氣體速率增加的程序。同時進行維生素增加以使該維生素添加速率達0.7毫升/升之培養基。在 $t=610$ 小時下，該反應器可產生20克/升之乙醇及約2克/升之乙酸鹽。該CO轉化率為約100%且該 H_2 轉化率為85%。該乙醇生產率可達每天14克/升。

實例1-5之發酵培養基包含一或多種選自表1內所示的組份。

實例1：將達梭菌PETC；使用特定一氧化碳作為一可增加氣體之指標物以啟動一反應器

使用0.32克/升之劇烈成長的將達梭菌PETC菌株開始含發酵培養基之New Brunswick bioflow I反應器。於該實驗開始時，將該反應器之攪拌速率設定為600rpm。在該實驗從頭至尾，使該生物反應器內之溫度維持在約38.5至約39°C之範圍內。將合成氣體之試樣饋入該生物反應器內並不時取出得自該生物反應器之廢氣、及該生物反應器內之發酵肉湯，例如分別大約每天、每兩小時一次、及每四小時一次採集進料氣體、廢氣及發酵肉湯之試樣。分析上述試樣之各氣體組份的消耗或產生、肉湯乙酸濃度、肉湯乙醇濃度、及該培養基之光學密度(細胞密度)。在該實驗從頭至

尾，使該反應器之未經反應體積維持在1300至1400毫升之間。

因此，係使用上述方程式(1)-(4)測定比CO吸收量(SCU)。

在本特定實例中，係將靶定SCU值設定在0.75與0.89毫莫耳/分鐘/克(細胞)之間。而且，若該培養基未使用於一特定時間提供至該反應器之CO的80%，則氣體流至該反應器之速率並未增加。

在本特定實驗中，在該實驗開始前，使一細胞再循環系統(CRS)連接至該反應器。接種後18.6小時，直接添加60毫升生長培養基至該培養基，然後以0.41毫升/分鐘之速率，使培養基流至該反應器。該接種後21.5小時，使營養物流至該反應器的速率增至1.1毫升/分鐘，並經由該細胞再循環系統，自該反應器抽出1毫升/分鐘之濾液。採取上述步驟以防止抑制量之乙酸及乙醇聚集在該培養基內，且亦將合適量之營養物提供至該培養基。

該反應器之細胞密度隨時間而增加且在該反應器之接種後4.5小時內達3克/升之細胞。於此時，培養基產生超過6克/升之乙醇及約8克/升之乙酸。

在本特定實驗中，在該實驗從頭至尾，使該培養基之pH維持在4.69與4.71之間。

在該反應器內細菌開始激烈生長(當該反應器之細胞密度達比該初細胞密度多約50%時)後，若該培養基肉湯之乙酸濃度低於一預定值時，以維生素(不同於已存在於該培

養基內之維生素)增補該培養基。用以添加維生素之混合劑至該培養基的標準如下：若該培養基肉湯之乙酸少於約2.5克/升，則每升培養基添加約0.34毫升維生素，若該培養基肉湯之乙酸少於約2克/升，則每升培養基添加約0.67毫升維生素，若該培養基肉湯之乙酸少於約1.5克/升，則每升培養基添加約1毫升維生素。用於這些實驗之維生素的組成如下：

生物素	0.08-1微莫耳濃度(μM)
硫胺素HCl	0.12-1.5微莫耳濃度
d-冷酸鈣	0.15-2微莫耳濃度

除了該生物素、硫胺素及泛酸鈣外，添加ATCC維生素增補物(登錄號第MD-VS號)至PETC實例以達1%之最終濃度(發酵培養基)。

實例2：將達梭菌C-01

以約0.3克/升之激烈生長的將達梭菌C-01菌株開始含約1.5升(例如在1.45至1.65升之範圍內)之發酵培養基的New Brunswick Bioflow I生物反應器之反應。於該實驗開始時，將該生物反應器內之攪拌速率設定為600rpm。在該實驗從頭至尾，維持本攪拌速率。在該實驗從頭至尾，使該生物反應器內之溫度維持在約36至約37.5°C之範圍內。於不同的時間間隔(例如1至4小時間隔)取出並分析以下試樣：饋入該生物反應器內之合成氣體；得自該生物反應器之廢氣；該生物反應器內之發酵肉湯。該試樣分析可得到：各種氣態組份之消耗量、各種氣態組份之製造量、乙酸之

濃度、乙醇之濃度以及該發酵肉湯的光學密度。

因此，係使用上述方程式(1)-(4)測定比CO吸收量(SCU)。

起先，使用上述方程式計算出合成氣體輸出值，其相當於約1.4毫莫耳/分鐘/克之SCU數值，且在本計算值下維持合成氣體之流量，直到細胞密度增加並達約1.5克/升之數值為止。

一旦該反應器之細胞密度達約1.5克/升時，將可預測氣體之該預定SCU值降低至約1.2毫莫耳/分鐘/克。因此，一旦該反應器之細胞質量達約2.5克/升時，將可預測氣體之該預定SCU值降低至約1.0毫莫耳/分鐘/克。細胞質量會隨時間而增加，且在該反應器之接種後約79小時內可達約2.8克/升之預定細胞質量。於此時，培養基可產生超過約20克/升之乙醇。

在該接種後約13.97小時，使培養基以約0.2毫升/分鐘之速率流至該反應器(大概的細胞滯留時間：約125小時)。在該接種後約28.08小時，使流至該反應器之培養基流率增至約0.5毫升/分鐘(大概的細胞滯留時間：約52小時)。在該實驗進行期間，使pH維持在接近約4.5。

在該開始作用之程序從頭至尾，該預定SCU值之逐漸降低可在該反應器之製造模式(穩態)期間有助於維持該培養基逐漸轉換至低SCU(介於約0.7至約0.9毫莫耳/分鐘/克之間)。

上述方法僅花低於約80小時即可獲得該反應器之細胞

質量的預定目標(約2.8克/升)。

實例3：自生乙醇梭菌

以約0.47克/升之激烈生長的自生乙醇梭菌開始含約1.5升(例如在約1.45至約1.65升之範圍內)發酵培養基之New Brunswick Bioflow I生物反應器之反應。於該實驗開始時，將該反應器內之攪拌速率設定為600rpm。在該實驗從頭至尾，維持本攪拌速率。在該實驗從頭至尾，使該生物反應器內之溫度維持在約36至約37.5°C之範圍內。於不同的時間間隔(例如約1至4小時間隔)取出並分析以下試樣：饋入該生物反應器內之合成氣體；得自該生物反應器之廢氣；該生物反應器內之發酵肉湯。該試樣分析可得到：各氣態組份之消耗量、各氣態組份的生產量、乙酸之濃度、乙醇的濃度及該發酵肉湯的光學密度。

因此，係使用上述方程式(1)-(4)測定比CO吸收量(SCU)。

起先，使用上述方程式計算合成氣體輸入量的數值，其相當於約0.4毫莫耳/分鐘/克之SCU數值，且於本計算值下維持合成氣體的流量，直到細胞密度增加為止。維持相當於約0.4毫莫耳/分鐘/克之靶SCU數值的氣體流量，費時約19小時。在該接種後的19與21小時之間，靶定SCU值為約0.5毫莫耳/分鐘/克。於該接種後約21小時，將靶定SCU值設定為約0.6。細胞密度隨時間而增加且在該反應器之接種後約79小時內達約2克/升。於此時，培養基可產生超過約15克/升之乙醇。該接種後約26小時，使培養基以約0.1

毫升/分鐘之流率流至該反應器(大概的細胞滯留時間：約240小時)。該接種後約50小時，使流至該反應器之培養基的流率增至約0.2毫升/分鐘(大概的細胞滯留時間：約119小時)。該接種後約71小時，使流至該反應器之培養基的流率增至約0.5毫升/分鐘(大概的細胞滯留時間：約50小時)。在該實驗進行期間，使pH維持在接近約4.5。

實例4：自生乙醇梭菌

以約0.47克/升之激烈生長的自生乙醇梭菌開始含約1.5升(例如在約1.45至約1.65升之範圍內)發酵培養基之New Brunswick Bioflow I生物反應器之反應。於該實驗開始時，將該反應器內之攪拌速率設定為600rpm。在該實驗從頭至尾，維持本攪拌速率。在該實驗從頭至尾，使該生物反應器內之溫度維持在約36至約37.5°C之範圍內。於不同時間間隔(例如1至4小時間隔)取出並分析以下試樣：饋入該生物反應器內之合成氣體；得自該生物反應器之廢氣；該生物反應器內之發酵肉湯。該試樣分析可得到：各氣態組份之消耗量、各氣態組份的生產量、乙酸的濃度、乙醇的濃度及該發酵肉湯的光學密度。

因此，係使用上述方程式(1)-(4)測定比CO吸收量(SCU)。

起先，使用上述方程式計算合成氣體輸入量的數值，其相當於約0.6毫莫耳/分鐘/克之SCU數值，且於本計算值下維持合成氣體的流量，直到細胞密度增加為止。於該接種後約26小時之間，將靶定SCU數值設定為約0.7。細胞質

量隨時間而增加，且在該反應器之接種後64小時內達約2.97克/升之細胞質。於此時，培養基可產生超過約18克/升之乙醇。在該接種後約18.3小時，使培養基以約0.1毫升/分鐘的流率流至該反應器(大概的細胞滯留時間：約242小時)。在該接種後約41.6小時，使流至該反應器之培養基的流率增至約0.2毫升/分鐘(大概的細胞滯留時間：約121小時)。在該實驗進行期間，使pH維持在接近約4.5。

實例5：甲基營生酪酸菌屬(ATCC 33266)；使用特定一氧化碳作為一可增加氣體之指標物以啟動一反應器

在本實驗內係使用一非梭菌的乙酸生成菌以測試比一氧化碳吸收量啟動法。

在含1.31克/升之激烈生成的甲基營生酪酸菌屬在先前所述的發酵培養基內之New Brunswick bioflow I反應器內進行本實驗。於該實驗開始時，將該反應器內之攪拌速率設定為700rpm。在該實驗從頭至尾，維持本攪拌速率。在該實驗從頭至尾，使該生物反應器內之溫度維持在38.5至約38.6°C之間。

不時取出饋至該生物反應器內之合成氣體、得自該生物反應器之廢氣以及該生物反應器內的發酵肉湯之試樣，例如分別約每天、每兩小時一次以及每4小時一次採集進料氣體、廢氣及發酵肉湯的試樣。分析上述試樣之各氣體組份的消耗量或生產量、肉湯之乙酸濃度、肉湯之乙醇濃度、及該培養基之光學密度(細胞密度)。在該實驗從頭至尾，使該反應器之未進行反應的體積維持在1150至1100毫升之間。

因此，係使用上述方程式(1)-(4)測定比CO吸收量(SCU)。

在本特定實例中，係將靶定SCU數值設定為0.8毫莫耳/分鐘/克(細胞)。

為了維持該培養基的穩定性，若於任何特定時刻下，該培養基並未利用經提供至該反應器之CO的80%，則流至該反應器之氣體流率並未增加。

在本實驗內，係在該實驗開始前，使一細胞再循環系統(CRS)連接至該反應器。使發酵培養基(營養物)以1毫升/分鐘之速率流至該反應器，並經由該CRS，自該反應器抽出0.9毫升/分鐘之濾液。

該反應器之細胞密度隨時間而增加且在該反應器接種後的24小時內達5.27克/升之細胞。於此時，培養基可產生超過15克/升之乙醇、0.3克/升之丁醇、及超過2克/升之乙酸。

在本特定實驗中，在該實驗從頭至尾，使該培養基之pH維持在4.67與4.71之間。

只要不違背本揭示文之具體實施例、實例、申請專利範圍、申請案等所包括之本揭示文的範圍，熟悉本項技藝者可對本揭示文進行許多修飾及變異。所有已公開的文件在此併入本案以為參考資料。

【圖式簡單說明】

第1圖包含闡明一氣態基質之微生物發酵之方法的一實施例之示意圖。

【主要元件符號說明】

100...生物反應器

101...含CO之氣態基質的氣態物料流

102...發酵培養基之物料流

105...攪拌器

110、210...發酵槽肉湯之物料流

120...發酵槽廢氣之物料流

200...細胞再循環裝置

220...經濃縮並返回的細胞

105年9月26日修(×)正本

第100143704 專利再審查案申請專利範圍替換頁

日期：105年9月26日

七、申請專利範圍：

1. 一種氣態基質的發酵法，其包括：

添加含一氧化碳(CO)之氣態基質至一生物反應器內的一水性營養培養基中；該水性營養培養基包含一或多種微生物；

藉調整該水性培養基內之該一或多種微生物的比CO吸收量(specific CO uptake)來增加細胞密度；

控制該比CO吸收量之改變速率，其包含控制CO之輸入速率、測定CO輸入之速率、測定CO輸出之速率，以及測定細胞質量；

以範圍為從0.1至1.0毫莫耳/分鐘/克乾細胞的量改變該比CO吸收量，直到獲得0.1至15克/升的一細胞密度為止；

添加水性營養培養基之一連續流至該生物反應器內；以及

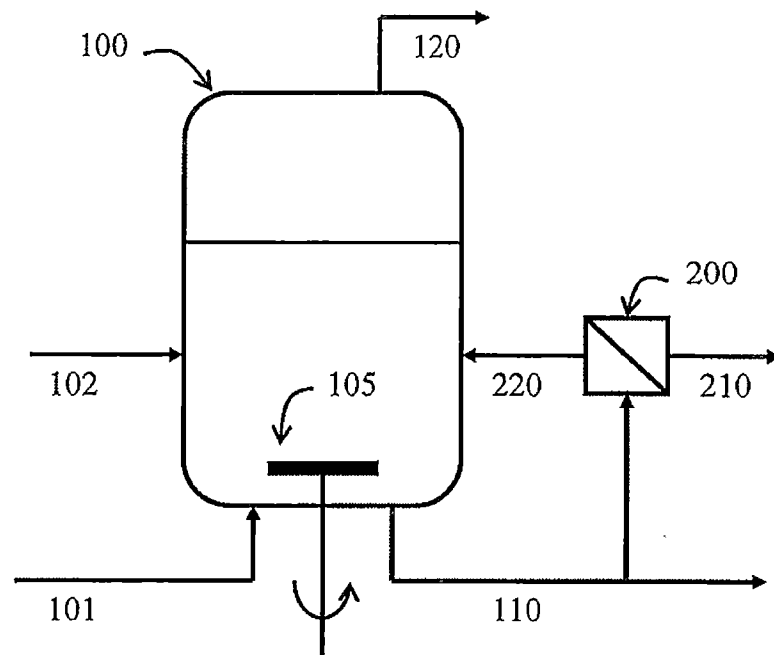
自該生物反應器移除發酵肉湯之一連續流；

其中該方法被重複至獲得範圍為從1至50克/升/天的乙醇生產率為止。

2. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該水性營養培養基所包含的一或多種微生物包括：生物學上純的微生物、天然發生的微生物、非天然發生的微生物、藉基因改造而製成之非天然發生的微生物、天然發生的微生物之突變種、非天然發生的微生物之突變種、重組型微生物、工程微生物(engineered microorganism)、人工合成的微

生物。

3. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之方法，其中該生物反應器包含二或多種反應器。
4. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之方法，其中該生物反應器包含細胞再循環單元。
5. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之方法，其中該含 CO 之基質包含氫。



第 1 圖