



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103476935 B

(45) 授权公告日 2016. 06. 01

(21) 申请号 201180058216. 8

(22) 申请日 2011. 11. 14

(30) 优先权数据

61/458, 903 2010. 12. 03 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 06. 03

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/001900 2011. 11. 14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/074543 EN 2012. 06. 07

(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 瑞安·塞纳拉特纳 布兰顿·贝尔德

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 刘慧 杨青

(51) Int. Cl.

C12P 7/02(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2010093262 A1, 2010. 08. 19,

US 2008213848 A1, 2008. 09. 04,

审查员 劳芳

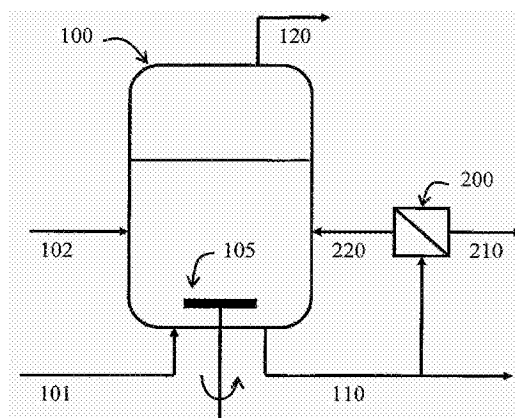
权利要求书1页 说明书17页 附图1页

(54) 发明名称

涉及调节比共摄入率的发酵方法

(57) 摘要

本公开提供了气态底物发酵方法,所述方法包括:将气态底物添加到生物反应器中的水性培养基中。本公开的方法包括:测量细胞密度,调整气态底物的输入以提高细胞密度,以预定量改变C0比摄入率。



1. 从气态底物生产一种或多种醇的方法,所述方法包括:

在生物反应器中的水性培养基中,对包含一氧化碳(CO)的气态底物进行发酵;

测量CO输入速率;

测量CO输出速率;

测量细胞质量;

确定CO比摄入率;以及

在0.4至1.4mmol/min/g干细胞的范围内调整CO比摄入率直至获得在0.1g/L至15g/L范围内的细胞密度和在1g/L/天至50g/L/天范围内的乙醇生产率,

其中,CO比摄入率是指在以分钟为单位的每单位时间中由以克为质量单位表示的微生物细胞所消耗的以毫摩尔为单位的CO量。

2. 权利要求1的方法,其还包括将水性培养基流添加到生物反应器中,从所述生物反应器移除发酵液流。

3. 权利要求1的方法,其还包括将水性培养基的连续流添加到生物反应器中,从所述生物反应器移除发酵液的连续流。

4. 权利要求1的方法,其中所述水性培养基包含一种或多种微生物,所述微生物包括:天然存在的微生物,非天然存在的微生物,天然存在的微生物的突变体,非天然存在的微生物的突变体。

5. 权利要求1的方法,其中所述水性培养基包含一种或多种微生物,所述微生物是工程改造的微生物。

6. 权利要求1的方法,其中所述水性培养基包含一种或多种微生物,所述微生物是通过遗传修饰产生的非天然存在的微生物。

7. 权利要求1的方法,其中所述生物反应器包含一个或多个反应器。

8. 权利要求1的方法,其中所述生物反应器包含细胞再循环单元。

9. 权利要求1的方法,其中所述包含CO的底物包含氢气。

10. 权利要求1的方法,其还包括向所述生物反应器添加营养培养基。

11. 气态底物发酵方法,所述方法包括:

将包含一氧化碳的气态底物添加到生物反应器中的水性培养基中;所述方法包括选择目标CO比摄入率;调整气态底物的流量以使CO比摄入率等于在0.4至1.4mmol/min/g干细胞的范围内的所述目标CO比摄入率,其中,CO比摄入率是指在以分钟为单位的每单位时间中由以克为质量单位表示的微生物细胞所消耗的以毫摩尔为单位的CO量。

涉及调节比共摄入率的发酵方法

技术领域

[0001] 本公开涉及包含一氧化碳的气态底物的发酵方法。本公开提供了发酵包含一氧化碳的气态底物以生产一种或多种醇的方法。

背景技术

[0002] 使用某些微生物例如来自于梭状芽胞杆菌属(*Clostridium*)的细菌,在含有适合的营养物和微量矿物质的培养基中,从包含一氧化碳的气态底物的微生物发酵生产化学物质例如有机酸如乙酸和醇如乙醇的方法,已得到证实。例如,Gaddy等的美国专利号5,173,429公开了杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*)ATCC No.49587,一种从合成气体生产乙醇和乙酸盐的厌氧微生物。Gaddy等的美国专利号5,807,722公开了使用厌氧细菌例如杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*)ATCC No.55380将废气转化成有用产物例如有机酸和醇的方法和装置。Gaddy等的美国专利号6,136,577公开了使用厌氧细菌例如杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*)ATCC No.55988和55989将废气转化成有用产物例如有机酸和醇(特别是乙醇)的方法和装置。

[0003] 美国专利申请号20070275447公开了一种梭状芽胞杆菌属菌种(食一氧化碳梭菌(*Clostridium carboxidivorans*),ATCC BAA-624,“P7”),其能够从废气合成可用作生物燃料的产物。美国专利号7,704,723公开了一种梭状芽胞杆菌属菌种(拉氏梭菌(*Clostridium ragsdalei*),ATCC BAA-622,“P11”),其能够从废气合成可用作生物燃料的产物。

[0004] W02007/117157公开了产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)(登记号DSM10061,DSMZ,德国)在通过含一氧化碳的底物的厌氧发酵来生产乙醇中的应用。W02009/064200公开了通过含一氧化碳的底物的厌氧发酵来生产乙醇的另一种细菌(产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*),登记号DSM19630,DSMZ,德国)。

[0005] 正如在本技术领域中所描述的,化学物质例如醇的生产速率取决于发酵培养基中的细胞密度。为了获得并维持化学物质的高生产速率,需要在生物反应器中具有适当高的细胞密度。

[0006] Gaddy的美国专利号6,136,577公开了一种在发酵过程中生产乙醇的方法,其中使用细胞再循环来提高细胞密度。

[0007] Gaddy等的美国专利号7,285,402公开了一种用于生产醇的厌氧微生物发酵方法,其中提出了在启动期间使用储用培养物来提高细胞密度的方法,其中存在过量的H₂。

[0008] 使用来自于储用培养物的分批接种物进行启动确保了不含污染物的健康的接种物,但是作为接种程序不总是成功的,这是因为使用的细胞密度相当低,特别是如果在接种后就立即将方法参数例如气体速率和搅拌速率快速提高的话。

[0009] 目前,在本技术领域,对在气态底物的微生物发酵中提高细胞密度的改进方法存在着需求。本公开提供了以更快的速率为气态底物的微生物发酵方法提高细胞密度的方法。

发明内容

[0010] 本公开提供了从气态底物生产一种或多种醇的方法,所述方法包括:在生物反应器中的水性培养基中,对包含一氧化碳(CO)的气态底物进行发酵;所述方法包括通过调整所述水性培养基中的CO比摄入率来提高细胞密度;其中CO比摄入率的变化速率包含控制CO的输入速率;其中CO比摄入率的变化速率包含测量CO输入速率,测量CO输出速率,以及测量细胞质量;其中还包括以预定量改变CO比摄入率;其中所述预定量包含约0.001至约10.0mmol/min/g干细胞的范围;其中所述预定量包含约0.01至约5.0mmol/min/g干细胞的范围;其中所述预定量包含约0.1至约1.0mmol/min/g干细胞的范围;其还包括将水性培养基流添加到生物反应器中,从所述生物反应器移除发酵液流;其还包括将水性培养基的连续流添加到生物反应器中,从所述生物反应器移除发酵液的连续流;其中所述水性培养基包含一种或多种微生物,所述微生物包括:生物纯微生物,天然存在的微生物,非天然存在的微生物,通过遗传修饰产生的非天然存在的微生物,天然存在的微生物的突变体,非天然存在的微生物的突变体,重组微生物,工程改造的微生物,人工合成的微生物;其中所述生物反应器包含一个或多个反应器;其中所述生物反应器包含细胞再循环单元;其中所述包含CO的底物包含氢气;其还包括向所述生物反应器添加营养培养基。

[0011] 作为一种实施方式,本公开提供了一种气态底物发酵方法,所述方法包括:将包含一氧化碳的气态底物添加到生物反应器中的水性培养基中;所述方法包括选择目标CO比摄入率;调整气态底物的流量以使CO比摄入率等于在约0.01至约10mmol/min/g干细胞的范围内的所述目标CO比摄入率。

[0012] 作为一种实施方式,本公开提供了一种气态底物发酵方法,所述方法包括:将包含一氧化碳的气态底物添加到生物反应器中的水性培养基中;所述方法包括选择在约0.01至约10mmol/min/g干细胞的范围内的目标CO比摄入率、调整气态底物的流量以使CO比摄入率等于所述目标CO比摄入率的步骤;重复所述步骤直至获得在约0.1g/L至约15g/L范围内的所需细胞密度;在获得所述所需细胞密度后转变成连续操作模式。

[0013] 作为一种实施方式,本公开提供了一种气态底物发酵方法,所述方法包括:将包含一氧化碳的气态底物添加到生物反应器中的水性培养基中;所述方法包括选择目标CO比摄入率;调整气态底物的流量以使CO比摄入率等于在约0.01至约10mmol/min/g干细胞的范围内的所述目标CO比摄入率。

[0014] 作为一种实施方式,本公开提供了一种气态底物发酵方法,所述方法包括:将包含一氧化碳的气态底物添加到生物反应器中的水性培养基中;所述方法包括选择在约0.01至约10mmol/min/g干细胞的范围内的目标CO比摄入率、调整气态底物的流量以使CO比摄入率等于所述目标CO比摄入率的步骤;重复所述步骤直至获得在约0.1g/L至约15g/L范围内的所需细胞密度;在获得所述所需细胞密度后转变成连续操作模式。

[0015] 本公开提供了一种气态底物发酵方法,所述方法包括:将包含一氧化碳(CO)的气态底物添加到生物反应器中的水性培养基中;所述水性培养基包含一种或多种微生物;所述方法包括通过调整所述水性培养基中的一种或多种所述微生物的CO比摄入率来提高细胞密度;在一种实施方式中,CO比摄入率的变化速率包含调整一个或多个步骤;在一种实施方式中,CO比摄入率的变化速率包含控制CO输入速率;在一种实施方式中,CO比摄入率的变

化速率包含测量CO输入速率,测量CO输出速率,以及测量细胞质量;还包含以预定量改变CO比摄入率;在一种实施方式中,所述预定量包含约0.001至约10.0mmol/min/g干细胞的范围;在一种实施方式中,所述预定量包含约0.01至约5.0mmol/min/g干细胞的范围;在一种实施方式中,所述预定量包含约0.1至约1.0mmol/min/g干细胞的范围;在一种实施方式中,将水性培养基的连续流添加到生物反应器中,从所述生物反应器移除发酵液的连续流;其中重复所述步骤直至获得在约1g/L至约50g/L范围内的所需乙醇生产率;在一种实施方式中,将水性培养基的连续流添加到生物反应器中,从所述生物反应器移除发酵液的连续流;其中重复所述步骤直至在发酵液中获得在约1g/L至约50g/L范围内的所需乙醇浓度。

[0016] 作为一种实施方式,本公开提供了一种气态底物发酵方法,所述方法包括:将包含一氧化碳的气态底物添加到生物反应器中的水性培养基中;所述水性培养基包含一种或多种微生物;所述方法包括选择目标CO比摄入率;调整气态底物的流量以使CO比摄入率等于在约0.01至约10mmol/min/g干细胞的范围内的所述目标CO比摄入率。

[0017] 作为一种实施方式,本公开提供了一种气态底物发酵方法,所述方法包括:将包含一氧化碳的气态底物添加到生物反应器中的水性培养基中;所述水性培养基包含一种或多种微生物;所述方法包括选择在约0.01至约10mmol/min/g干细胞的范围内的目标CO比摄入率、调整气态底物的流量以使CO比摄入率等于所述目标CO比摄入率的步骤;重复所述步骤直至获得在约0.1g/L至约15g/L范围内的所需细胞密度;在获得所述所需细胞密度后转变成连续操作模式。

[0018] 本公开提供了一种气态底物发酵方法,所述方法包括:将包含一氧化碳的气态底物添加到生物反应器中的水性培养基中;所述水性培养基包含一种或多种微生物;所述方法包括测量细胞密度;调整气态底物的输入以提高细胞密度;以在约0.001至约10.0mmol/min/g干细胞的范围内的预定量改变CO比摄入率。

[0019] 作为一种实施方式,本公开提供了一种气态底物发酵方法,所述方法包括:将包含一氧化碳的气态底物添加到生物反应器中的水性培养基中;所述水性培养基包含一种或多种微生物;所述方法包括选择目标CO比摄入率;调整气态底物的流量以使CO比摄入率等于在约0.01至约10mmol/min/g干细胞的范围内的所述目标CO比摄入率。

[0020] 作为一种实施方式,本公开提供了一种气态底物发酵方法,所述方法包括:将包含一氧化碳的气态底物添加到生物反应器中的水性培养基中;所述水性培养基包含一种或多种微生物;所述方法包括选择在约0.01至约10mmol/min/g干细胞的范围内的目标CO比摄入率、调整气态底物的流量以使CO比摄入率等于所述目标CO比摄入率的步骤;重复所述步骤直至获得在约0.1g/L至约15g/L范围内的所需细胞密度;在获得所述所需细胞密度后转变成连续操作模式。

[0021] 作为本公开方法的实施方式,其中所述微生物包含一种或多种生物纯的厌氧产乙酸细菌;其中所述微生物包含一种或多种天然存在的厌氧产乙酸细菌;其中所述微生物包含一种或多种非天然存在的厌氧产乙酸细菌;其中所述微生物包含一种或多种使用厌氧产乙酸细菌作为宿主生物体通过遗传修饰产生的非天然存在的厌氧产乙酸细菌;其中所述微生物包含一种或多种通过将厌氧产乙酸细菌的基因插入到宿主生物体中产生的非天然存在的厌氧产乙酸细菌。

[0022] 作为一种实施方式,本公开的所述微生物包含一种或多种微生物,所述微生物包

括:生物纯微生物,天然存在的微生物,非天然存在的微生物,通过遗传修饰产生的非天然存在的微生物,天然存在的微生物的突变体,非天然存在的微生物的突变体,重组微生物,工程改造的微生物,人工合成的微生物;其中所述微生物包含选自下列的微生物:凯伍产乙酸菌(*Acetogenium kivui*),伍氏醋酸杆菌(*Acetobacterium woodii*),潮湿厌氧醋菌(*Acetoanaerobium noterae*),食甲基丁酸杆菌(*Butyribacterium methylotrophicum*),*Caldanaerobacter subterraneus*,*Caldanaerobacter subterraneus pacificus*,生氢一氧化碳嗜热菌(*Carboxydothemus Hydrogenoformans*),醋酸梭菌(*Clostridium aceticum*),丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*),产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)(DSM23693),产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)(德国DSMZ的DSM19630),产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)(德国DSMZ的DSM10061),热醋梭菌(*Clostridium thermoaceticum*),粘液真杆菌(*Eubacterium limosum*),杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*)PETC(ATCC49587),杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*)ERI2(ATCC55380),杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*)C-01(ATCC55988),杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*)O-52(ATCC55889),*Clostridium ultunense*,拉氏梭菌(*Clostridium ragsdali*)P11(ATCC BAA-622),*Alkalibaculum bacchi* CP11(ATCC BAA-1772),*Clostridium coskatii*,食一氧化碳梭菌(*Clostridium carboxidivorans*)P7(ATCC PTA-7827),硫还原泥土杆菌(*Geobacter sulfurreducens*),*Morrella thermacetica*,产生消化链球菌(*Peptostreptococcus productus*),*Clostridium drakei*,重组微生物(DSM24138)及其混合物。

[0023] 作为本公开方法的一种实施方式,其中所述微生物包含一种或多种杨氏梭菌(*Clostridium ljundahlii*)菌株,或一种或多种拉氏梭菌(*Clostridium ragsdalei*)菌株,或一种或多种食一氧化碳梭菌(*Clostridium carboxidivorans*)菌株,或一种或多种产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)菌株。

[0024] 作为本公开方法的一种实施方式,其中所述微生物包含一种或多种遗传修饰的微生物,所述遗传修饰的微生物通过将一个或多个所选基因插入到选自任何杨氏梭菌(*Clostridium ljundahlii*)菌株或任何拉氏梭菌(*Clostridium ragsdalei*)菌株或任何食一氧化碳梭菌(*Clostridium carboxidivorans*)菌株或任何产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)菌株的宿主生物体中而产生。

[0025] 作为本公开方法的一种实施方式,其中所述微生物包含一种或多种遗传修饰的微生物,所述遗传修饰的微生物通过将一个或多个来自于任何杨氏梭菌(*Clostridium ljundahlii*)菌株或任何拉氏梭菌(*Clostridium ragsdalei*)菌株或任何食一氧化碳梭菌(*Clostridium carboxidivorans*)菌株或任何产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)菌株的基因插入到任何宿主生物体中而产生。

[0026] 作为本公开方法的实施方式:其中所述生物反应器包含一个或多个反应器;其中所述生物反应器包含细胞再循环单元;其中所述包含CO的底物包含氢气。

[0027] 作为一种实施方式,本公开的方法还包括向所述生物反应器添加营养培养基。

附图说明

[0028] 图1是示意图,其示出了气态底物的微生物发酵方法的实施方式。

[0029] 定义

[0030] 除非另有定义,否则在本公开的整个说明书中使用的下列术语如下所定义,并且可以包括下面所确定的定义的单数或复数形式:

[0031] 修饰任何量的术语“约”是指在维持微生物培养的真实世界条件中例如在实验室、中试厂或生产设施中所遇到的所述量的变差。例如,当被“约”修饰时,混合物或参量中采用的成分或测量结果的量包括在生产厂或实验室中的实验条件下测量时的变差和通常所采用的关注程度。例如,当被“约”修饰时,产物组分的量包括在工厂或实验室的多次实验中不同批次之间的变差以及分析方法所固有的变差。不论是否被“约”修饰,量包括所述量的等效值。本文中所陈述的并被“约”修饰的任何数量也可以作为未被“约”修饰的量用于本公开中。

[0032] 术语“产乙酸菌”或“产乙酸”是指产生乙酸盐作为厌氧呼吸产物的细菌。这些生物也被称为产乙酸细菌,因为所有已知的产乙酸菌都是细菌。产乙酸菌存在于多种生境中,一般为厌氧(缺乏氧气)的生境。产乙酸菌能够利用多种化合物作为能源和碳源;研究最透彻的产乙酸代谢包括使用二氧化碳作为碳源并使用氢气作为能源。

[0033] 术语“生物反应器”、“反应器”或“发酵生物反应器”包括由一个或多个容器和/或塔或管线排列构成的发酵装置,其包括连续搅拌釜式反应器(CSTR)、鼓泡塔、气升式发酵罐、静态混合器或适合于气-液接触的其他装置。对于本公开的方法来说,发酵生物反应器可以包括生长反应器,生长反应器将发酵液进料到第二发酵生物反应器,在第二发酵生物反应器中产生大部分的产物乙醇。

[0034] 术语“细胞密度”是指每单位体积发酵液的微生物细胞质量,例如g/L。

[0035] 术语“细胞再循环”是指将发酵液中的固体微生物细胞与液体(渗透液)分离开并将全部或部分所述分离的固体微生物细胞返回到使用所述微生物产生所述发酵液的发酵罐中的配置。一般来说,使用过滤装置来实现所述分离。从过滤装置产生不含固体微生物的渗透液料流和浓缩的固体微生物料流。不含固体的渗透液料流可能含有小于特定粒径的固体粒子。

[0036] 术语“转化率”是指被转化成产物的输入量的分数;这用下述方程表示:(输入量-输出量)/(输入量)。

[0037] 术语“乙醇生产率”是指每天每单位发酵罐体积生产的乙醇的量。发酵罐体积是发酵罐中的有效体积或液体体积。

[0038] 术语“发酵”是指CO发酵成醇和乙酸盐。已知许多细菌能够实现将CO发酵成包括丁醇和乙醇的醇以及乙酸,并且适合于在本公开的方法中使用。适合在本公开中使用的这样的细菌的实例包括梭状芽孢杆菌属的细菌,例如杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*)菌株,包括在W02000/68407、EP117309、美国专利号5,173,429、5,593,886和6,368,819、W01998/00558和W02002/08438中所描述的菌株;产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)菌株(德国DSMZ的DSM10061和DSM19630),包括在W02007/117157和W02009/151342中所描述的菌株;以及拉氏梭菌(*Clostridium ragsdalei*)(P11,ATCC BAA-622),包括分别在美国专利号7,704,723和“来自于生物质产生的合成气体的生物燃料和生物产物”(Biofuels and Bioproducts from Biomass-Generated Synthesis Gas,Hasan Atiyeh,在Oklahoma EPSCoR Annual State Conference上的报告,2010年4月29日)中所描

述的;以及在美国专利申请号20070275447中所描述的食一氧化碳梭菌(*Clostridium carboxidivorans*)(ATCC BAA-624)。其他适合的细菌包括穆尔氏菌属(*Moorella*)的细菌,包括*Moorella* sp HUC22-1;以及一氧化碳嗜热菌属(*Carboxydotherrmus*)的细菌。这些出版物中每一个的公开内容在此全部引为参考。此外,本领域技术人员可以选择其他细菌用于本公开的方法中。还应该认识到,在本公开的方法中可以使用两种或更多种细菌的混合培养物。适合用于本公开的一种微生物是产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)。发酵可以在任何适合的生物反应器中进行,例如连续搅拌釜式反应器(CTSR)、鼓泡塔反应器(BCR)或滴流床反应器(TBR)。此外,在本公开的某些优选实施方式中,生物反应器可以包含培养微生物的第一生长反应器,以及来自于生长反应器的发酵液被进料到其中并在其中产生大部分的发酵产物(乙醇和乙酸盐)的第二发酵反应器。

[0039] 术语“发酵液”是指发酵培养基的组合物,其包含结束时发酵液中的任何物质,包括:原始底物,发酵产物,微生物和产生的组分,化学添加剂,营养物,气体。发酵液中存在所有三种主要相:固相、液相和气相,并且它们可能相互作用。

[0040] 术语“基因”是指一段DNA;它可以包括编码DNA之前和之后的区域,以及外显子之间的内含子;可以是遗传单位;在本公开中,术语“基因”包括对表型/功能有贡献的DNA区段;被细胞转录成RNA并至少部分翻译成蛋白质的DNA区段;一段由A、T、C和G的组合构成的碱基序列(串)。总的来说,当在本公开中提供时,所述定义可以是指单数或复数含义。

[0041] 术语“微生物”包括细菌、真菌、酵母、古菌和和原生生物;微生物(被称为绿藻);以及动物例如浮游生物、真涡虫和变形虫。有些人认为还包括病毒,但其他人认为它们没有生命。微生物生活在生物圈中有液体水的所有部分中,包括土壤、温泉、海底、大气层高处和地壳内岩石深部。微生物对于生态系统中营养物质的再循环来说是关键的,因为它们起到分解者的作用。微生物也被人类用于生物技术中,既被用在传统食品和饮料的制备中,也被用在基于遗传工程的现代技术中。设想了在本公开中使用可能含有或可能不含各种微生物菌株的混合菌株微生物。此外,据设想,定向进化能够选择性筛选可以在本公开中使用的微生物。还设想了重组DNA技术能够使用现有微生物的所选菌株来产生微生物。此外,化学诱变技术(使用各种化学物质来突变细菌DNA)能够使用现有微生物的所选菌株来产生微生物。还设想了在本公开中使用能够将CO和水或H₂和CO₂转化成乙醇和乙酸产物的细菌。可用的细菌的一些实例包括凯伍产乙酸菌(*Acetogenium kivui*),伍氏醋酸杆菌(*Acetobacterium woodii*),潮湿厌氧醋菌(*Acetoanaerobium noterae*),食甲基丁酸杆菌(*Butyribacterium methylotrophicum*),*Caldanaerobacter subterraneus*, *Caldanaerobacter subterraneus pacificus*,生氢一氧化碳嗜热菌(*Carboxydotherrmus Hydrogenoformans*),醋酸梭菌(*Clostridium aceticum*),丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*),产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)(DSM23693),产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)(德国DSMZ的DSM19630),产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)(德国DSMZ的DSM10061),热醋梭菌(*Clostridium thermoaceticum*),粘液真杆菌(*Eubacterium limosum*),杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*)PETC(ATCC49587),杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*)ERI2(ATCC55380),杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*)C-01(ATCC55988),杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*)O-52(ATCC55889),*Clostridium ultunense*,拉氏梭菌(*Clostridium ragsdali*)P11(ATCC

BAA-622), *Alkalibaculum bacchi* CP11(ATCCBAA-1772), *Clostridium coskatii*, 食一氧化碳梭菌(*Clostridium carboxidivorans*) P7(ATCC PTA-7827), 硫还原泥土杆菌(*Geobacter sulfurreducens*), *Morrella thermacetica*, 产生消化链球菌(*Peptostreptococcus productus*), *Clostridium drakei*, 重组微生物(DSM24138)及其混合物。本领域技术人员可以选择其他细菌用在这些方法中。总的来说, 当在本公开中提供时, 所述定义可以是指单数或复数含义。

[0042] 术语“营养培养基”包含微生物生长培养基, 其可以含有允许所选微生物生长的一种或多种维生素和矿物质。适合于本发明使用的多种营养培养基的组分是已知的, 并被报告在以前的出版物例如国际专利申请号W02008/00558、美国专利号7,285,402、美国专利号5,807,722、美国专利号5,593,886和美国专利号5,821,111中。

[0043] 术语“CO比摄入率”是指在以min为单位的每单位时间中由单位质量的微生物细胞(g)所消耗的以毫摩尔为单位的CO量, 即mmol/g/min。

[0044] 术语“底物”是指被酶或微生物作用以产生发酵产物的物质。例如, 在糖发酵中被酶作用以产生乙醇的糖, 在合成气发酵中被微生物作用以产生一种或多种羧酸和醇的CO、CO₂和H₂中的一种或多种。

[0045] 术语“合成气”或“合成气体”是指为含有可变量的一氧化碳和氢气的气体混合物所命名的合成气体。生产方法的实例包括用于生产氢气的天然气或烃的蒸汽重整、煤的气化、以及在某些类型的废物变能源的气化设施中。该名称来自于它们作为中间体在产生合成天然气(SNG)和生产氨或甲醇中的用途。合成气还在通过费-托(Fischer-Tropsch)合成法或以前的Mobil甲醇制汽油方法来生产用作燃料或润滑剂的合成石油的过程中用作中间体。合成气主要由氢气、一氧化碳和通常还有一些二氧化碳构成。

具体实施方式

[0046] 本公开提供了一种气态底物发酵方法, 所述方法包括: 将包含一氧化碳(CO)的气态底物添加到生物反应器中的水性培养基中; 所述水性培养基包含一种或多种微生物; 所述方法包括通过调整所述水性培养基中一种或多种所述微生物的CO比摄入率来提高细胞密度; 其中CO比摄入率的变化速率包括调整和/或控制一个或多个下列步骤: 控制CO输入速率, 测量CO输入速率, 测量CO输出速率, 测量细胞质量; 还包含以预定量改变CO比摄入率; 其中所述预定量包含约0.001至约10.0mmol/min/g干细胞的范围; 任选地, 在一种实施方式中, 所述预定量包含约0.01至约5.0mmol/min/g干细胞的范围和/或约0.1至约1.0mmol/min/g干细胞的范围; 一种实施方式任选包括将水性培养基的连续流添加到生物反应器中, 从所述生物反应器移除发酵液的连续流; 其中重复所述步骤直至获得在约1g/L至约50g/L范围内的所需乙醇生产率; 一种实施方式任选包括将水性培养基的连续流添加到生物反应器中, 从所述生物反应器移除发酵液的连续流; 其中重复所述步骤直至在发酵液中获得在约1g/L至约50g/L范围内的所需乙醇浓度。

[0047] 作为一种实施方式, 本公开提供了一种气态底物发酵方法, 所述方法包括: 将包含一氧化碳的气态底物添加到生物反应器中的水性培养基中; 所述水性培养基包含一种或多种微生物; 所述方法包括选择目标CO比摄入率; 调整气态底物的流量以使CO比摄入率等于在约0.01至约10mmol/min/g干细胞的范围内的所述目标CO比摄入率。

[0048] 作为一种实施方式,本公开提供了一种气态底物发酵方法,所述方法包括:将包含一氧化碳的气态底物添加到生物反应器中的水性培养基中;所述水性培养基包含一种或多种微生物;所述方法包括选择在约0.01至约10mmol/min/g干细胞的范围内的目标C0比摄入率、调整气态底物的流量以使C0比摄入率等于所述目标C0比摄入率的步骤;重复所述步骤直至获得在约0.1g/L至约15g/L范围内的所需细胞密度;在获得所述所需细胞密度后转变成连续操作模式。

[0049] 本公开提供了一种气态底物发酵方法,所述方法包括:将包含一氧化碳的气态底物添加到生物反应器中的水性培养基中;所述水性培养基包含一种或多种微生物;所述方法包括测量细胞密度;调整气态底物的输入以提高细胞密度;以在约0.001至约10.0mmol/min/g干细胞的范围内的预定量改变C0比摄入率。

[0050] 作为一种实施方式,本公开提供了一种气态底物发酵方法,所述方法包括:将包含一氧化碳的气态底物添加到生物反应器中的水性培养基中;所述水性培养基包含一种或多种微生物;所述方法包括选择目标C0比摄入率;调整气态底物的流量以使C0比摄入率等于在约0.01至约10mmol/min/g干细胞的范围内的所述目标C0比摄入率。

[0051] 作为一种实施方式,本公开提供了一种气态底物发酵方法,所述方法包括:将包含一氧化碳的气态底物添加到生物反应器中的水性培养基中;所述水性培养基包含一种或多种微生物;所述方法包括选择在约0.01至约10mmol/min/g干细胞的范围内的目标C0比摄入率、调整气态底物的流量以使C0比摄入率等于所述目标C0比摄入率的步骤;重复所述步骤直至获得在约0.1g/L至约15g/L范围内的所需细胞密度;在获得所述所需细胞密度后转变成连续操作模式。

[0052] 作为本公开方法的实施方式,其中所述微生物包含一种或多种生物纯的厌氧产乙酸细菌;其中所述微生物包含一种或多种天然存在的厌氧产乙酸细菌;其中所述微生物包含一种或多种非天然存在的厌氧产乙酸细菌;其中所述微生物包含一种或多种使用厌氧产乙酸细菌作为宿主生物体通过遗传修饰产生的非天然存在的厌氧产乙酸细菌;其中所述微生物包含一种或多种通过将厌氧产乙酸细菌的基因插入到宿主生物体中产生的非天然存在的厌氧产乙酸细菌。

[0053] 作为本公开方法的一种实施方式,其中所述微生物包含一种或多种选自下列的细菌:生物纯微生物,天然存在的微生物,非天然存在的微生物,通过遗传修饰产生的非天然存在的微生物,天然存在的微生物的突变体,非天然存在的微生物的突变体,重组微生物,工程改造的微生物,人工合成的微生物;其中所述微生物包含选自下列的微生物:凯伍产乙酸菌(*Acetogenium kivui*),伍氏醋酸杆菌(*Acetobacterium woodii*),潮湿厌氧醋菌(*Acetoanaerobium noterae*),食甲基丁酸杆菌(*Butyribacterium methylotrophicum*),*Caldanaerobacter subterraneus*,*Caldanaerobacter subterraneus pacificus*,生氢一氧化碳嗜热菌(*Carboxydotherrmus Hydrogenoformans*),醋酸梭菌(*Clostridium aceticum*),丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*),产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)(DSM23693),产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)(德国DSMZ的DSM19630),产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)(德国DSMZ的DSM10061),热醋梭菌(*Clostridium thermoaceticum*),粘液真杆菌(*Eubacterium limosum*),杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*)PETC(ATCC49587),杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*)

ERI2(ATCC55380),杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*)C-01(ATCC55988),杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*)0-52(ATCC55889),*Clostridium ultunense*,拉氏梭菌(*Clostridium ragsdali*)P11(ATCC BAA-622),*Alkalibaculum bacchi* CP11(ATCC BAA-1772),*Clostridium coskatii*,食一氧化碳梭菌(*Clostridium carboxidivorans*)P7(ATCC PTA-7827),硫还原泥土杆菌(*Geobacter sulfurreducens*),*Morrella thermacetica*,产生消化链球菌(*Peptostreptococcus productus*),*Clostridium drakei*,重组微生物(DSM24138)及其混合物。

[0054] 作为本公开方法的一种实施方式,其中所述微生物包含一种或多种杨氏梭菌(*Clostridium ljundahlii*)菌株,或一种或多种拉氏梭菌(*Clostridium ragsdalei*)菌株,或一种或多种食一氧化碳梭菌(*Clostridium carboxidivorans*)菌株,或一种或多种产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)菌株。

[0055] 作为本公开方法的一种实施方式,其中所述微生物包含一种或多种遗传修饰的微生物,所述遗传修饰的微生物通过将一个或多个所选基因插入到选自任何杨氏梭菌(*Clostridium ljundahlii*)菌株或任何拉氏梭菌(*Clostridium ragsdalei*)菌株或任何食一氧化碳梭菌(*Clostridium carboxidivorans*)菌株或任何产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)菌株的宿主生物体中而产生。

[0056] 作为本公开方法的一种实施方式,其中所述微生物包含一种或多种遗传修饰的微生物,所述遗传修饰的微生物通过将一个或多个来自于任何杨氏梭菌(*Clostridium ljundahlii*)菌株或任何拉氏梭菌(*Clostridium ragsdalei*)菌株或任何食一氧化碳梭菌(*Clostridium carboxidivorans*)菌株或任何产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)菌株的基因插入到任何宿主生物体中而产生。

[0057] 作为本公开方法的实施方式:其中所述生物反应器包含一个或多个反应器;其中所述生物反应器包含细胞再循环单元;其中所述包含CO的底物包含氢气。

[0058] 作为一种实施方式,本公开的方法还包括向所述生物反应器添加营养培养基。

[0059] 图1显示了通过用细菌发酵从包含一氧化碳(CO)的气态底物例如合成气生产化学物质例如醇产物混合物的方法,其中所述方法包含生物反应器(100),所述生物反应器含有包含所述细菌细胞和发酵培养基的发酵液。包含含有CO的气态底物的气态料流(101)可以与发酵培养基料流(102)一起被进料到生物反应器中。可以从所述生物反应器移除包含所述细菌细胞和所述化学物质产物的发酵液料流(110)。包含含有气态底物的所述气态料流的未使用部分的发酵罐排放气料流(120),从生物反应器排出。在一种实施方式中,发酵液料流(110)流向细胞再循环装置(200),在其中将细胞浓缩并返回(220)到生物反应器。来自于所述细胞再循环装置的渗透液料流(210)被导向回收所述化学物质的过程。在一种实施方式中,将发酵液料流(110)的至少一部分导向回收所述醇产物混合物的过程。在一种实施方式中,将发酵液料流(210)的至少一部分导向回收所述醇产物混合物的过程。

[0060] 在一种实施方式中,生物反应器(100)装备有提供搅拌的搅拌器(105),以便促进包含气态底物的气态料流与液体发酵培养基的接触并增强气态底物与液体发酵培养基的质量传递。在整个发酵过程中获得良好的质量传递速率是合乎需要的,因此,在生物反应器中获得足够搅拌是合乎需要的。

[0061] 存在有用于收集被导入到生物反应器中的包含气态底物的气态料流(101)和离开

生物反应器的排放气(120)的样品的配置(在图1中未示出)。存在有用于收集生物反应器的发酵液样品的配置(在图1中未示出)。每隔一定时间收集所述气体和液体的样品,并分析各种气体组分的消耗或生产、各种产物的产量和发酵液的光密度。

[0062] 使用下述方程,这些测量值可用于计算一氧化碳(CO)比摄入率(SCU)和生物反应器中的发酵液中的细胞密度:

[0063] $\text{CO摄入率, mmol/min} = (\text{mmol/min CO输入}) - (\text{mmol/min CO输出})$ (1)

[0064] $\text{细胞密度, g/L} = (\text{光密度}) \cdot (\text{稀释倍数}) \cdot (\text{细胞质量常数})$ (2)

[0065] $\text{细胞质量, g} = (\text{细胞密度}) \cdot (\text{生物反应器的体积})$ (3)

[0066] $\text{CO比摄入率, mmol/min/g} = (\text{CO摄入}) / (\text{细胞质量})$ (4)

[0067] 细胞密度是每单位体积发酵液的细胞质量。生物反应器的体积是当搅拌关闭时生物反应器中的液体体积。细胞质量常数是光密度为1时每升发酵液的细菌干细胞的质量(g)。光密度是将发酵液用适合的溶剂例如盐水稀释后获得的样品的光密度。

[0068] 在本公开的方法中使用的微生物可以包含一种或多种生物纯的厌氧产乙酸细菌。

[0069] 在本公开的方法中使用的微生物可以包含一种或多种天然存在的厌氧产乙酸细菌;可以包含一种或多种非天然存在的厌氧产乙酸细菌;可以包含一种或多种使用厌氧产乙酸细菌作为宿主生物体通过遗传修饰产生的非天然存在的厌氧产乙酸细菌;可以包含一种或多种通过将厌氧产乙酸细菌的基因插入到宿主生物体中而产生的非天然存在的厌氧产乙酸细菌。

[0070] 在本公开的方法中使用的微生物可以包含一种或多种选自下列的细菌:凯伍产乙酸菌(*Acetogenium kivui*),伍氏醋酸杆菌(*Acetobacterium woodii*),潮湿厌氧醋菌(*Acetoanaerobium noterae*),食甲基丁酸杆菌(*Butyribacterium methylotrophicum*), *Caldanaerobacter subterraneus*, *Caldanaerobacter subterraneus pacificus*, 生氢一氧化碳嗜热菌(*Carboxydothemus Hydrogenoformans*), 醋酸梭菌(*Clostridium aceticum*), 丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*), 产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*) (DSM23693), 产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*) (德国DSMZ的DSM19630), 产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*) (德国DSMZ的DSM10061), 热醋梭菌(*Clostridium thermoaceticum*), 粘液真杆菌(*Eubacterium limosum*), 杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*) PETC(ATCC49587), 杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*) ERI2(ATCC55380), 杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*) C-01(ATCC55988), 杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*) 0-52(ATCC55889), *Clostridium ultunense*, 拉氏梭菌(*Clostridium ragsdalei*) P11(ATCC BAA-622), *Alkalibaculum bacchi* CP11(ATCC BAA-1772), *Clostridium coskatii*, 食一氧化碳梭菌(*Clostridium carboxidivorans*) P7(ATCC PTA-7827), 硫还原泥土杆菌(*Geobacter sulfurreducens*), *Morrella thermacetica*, 产生消化链球菌(*Peptostreptococcus productus*), *Clostridium drakei*, 重组微生物(DSM24138)及其混合物。

[0071] 在一种实施方式中,在本公开的方法中使用的微生物包含一种或多种杨氏梭菌(*Clostridium ljundahlii*)菌株,或一种或多种拉氏梭菌(*Clostridium ragsdalei*)菌株,或一种或多种食一氧化碳梭菌(*Clostridium carboxidivorans*)菌株,或一种或多种产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)菌株。

[0072] 在一种实施方式中,在本公开的方法中使用的微生物包含一种或多种遗传修饰的微生物,所述遗传修饰的微生物通过将个或多个所选基因插入到选自任何杨氏梭菌(*Clostridium ljundahlii*)菌株或任何拉氏梭菌(*Clostridium ragsdalei*)菌株或任何食一氧化碳梭菌(*Clostridium carboxidivorans*)菌株或任何产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)菌株的宿主生物体中而产生。

[0073] 在一种实施方式中,在本公开的方法中使用的微生物包含一种或多种遗传修饰的微生物,所述遗传修饰的微生物通过将个或多个来自于任何杨氏梭菌(*Clostridium ljundahlii*)菌株或任何拉氏梭菌(*Clostridium ragsdalei*)菌株或任何食一氧化碳梭菌(*Clostridium carboxidivorans*)菌株或任何产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)菌株的基因插入到任何宿主生物体中而产生。

[0074] 在一种实施方式中,本公开的方法包括测量细胞密度并通过增加C0比摄入率以调整气态底物的输入来提高细胞密度。在一种实施方式中,本公开的方法包括测量细胞密度并通过降低C0比摄入率以调整气态底物的输入来提高细胞密度。在一种实施方式中,本公开的方法包括测量细胞密度,并通过增加C0比摄入率以调整气态底物的输入来逐渐将细胞密度提高到所需细胞密度。在一种实施方式中,本公开的方法包括测量细胞密度,并通过降低C0比摄入率以调整气态底物的输入来逐渐将细胞密度提高到所需细胞密度。在一种实施方式中,本公开的方法包括测量细胞密度并通过将C0比摄入率逐渐增加到所需C0比摄入率来提高细胞密度。在一种实施方式中,本公开的方法包括测量细胞密度并通过将C0比摄入率逐渐降低到所需C0比摄入率来提高细胞密度。在一种实施方式中,本公开的方法包括测量细胞密度,通过增加C0比摄入率来提高细胞密度并将醇生产率逐渐增加到所需醇生产率。在一种实施方式中,本公开的方法包括测量细胞密度,通过增加C0比摄入率来提高细胞密度并将醇生产率逐渐增加到所需醇生产率。在一种实施方式中,C0比摄入率的改变包含以预定幅度的步阶增加。在一种实施方式中,C0比摄入率的改变包含以预定幅度的步阶降低。在一种实施方式中,预定幅度的步阶包含相等幅度的步阶。在一种实施方式中,预定幅度的步阶包含不等幅度的步阶。

[0075] 在一种实施方式中,如果细胞密度低于目标细胞密度,所述方法包括选择目标C0比摄入率并调整包含气态底物的气态料流的流量,直至C0比摄入率等于所述目标C0比摄入率。

[0076] 在一种实施方式中,如果细胞密度低于目标细胞密度,所述方法包括选择目标C0比摄入率并调整包含气态底物的气态料流的流量,直至C0比摄入率等于所述目标C0比摄入率;以及重复选择目标C0比摄入率并调整包含气态底物的气态料流的流量,直至C0比摄入率等于所述目标C0比摄入率。

[0077] 所述目标C0比摄入率的值可以包含约0.1至约10.0mmol C0/分钟/克干微生物的范围。所述所需C0比摄入率的值可以包含约0.1至约10mmol/min/g的范围。

[0078] 所述目标细胞密度的值可以包含约0.1g/L至约50g/L的范围。所述所需细胞密度的值可以包含0.5g/L至50g/L的范围。

[0079] 所述所需乙醇生产率的值包含1至50g/L/天的范围。

[0080] 所述发酵液中所需乙醇浓度的值包含1g/L至20g/L的范围。

[0081] 通常,在实验室规模的生物反应器例如New Brunswick Bioflow I生物反应器中,

在300-900转/分钟(rpm)范围内的搅拌器速度提供足以获得所需质量传递速率的搅拌。在一种实施方式中,使用在500-700rpm范围内的搅拌器速度。在一种实施方式中,使用在550-650rpm范围内的搅拌器速度。在一种实施方式中,使用约600rpm的搅拌器速度。

[0082] 在一种实施方式中,对于较大规模的生物反应器例如尺寸为约100至500升的生物反应器来说,使用在约50rpm至约500rpm范围内的搅拌器速度进行搅拌。在一种实施方式中,对于尺寸为约100,000至约1000,000升的商业化规模的生物反应器来说,使用在约1rpm至约50rpm范围内的搅拌器速度进行搅拌。在各种实施方式中,较大的生物反应器与较小的生物反应器相比需要较低的rpm。

[0083] 作为一种实施方式,本公开在生物反应器中提供在25至50℃范围内的温度控制。

[0084] 在本公开方法的一种实施方式中,所述生物反应器包含一个反应器。在本公开方法的一种实施方式中,所述生物反应器包含两个或更多个反应器。

[0085] 在本公开方法的一种实施方式中,所述生物反应器包含细胞再循环单元。

[0086] 在本公开方法的一种实施方式中,包含含有CO的气态底物的所述气态料流还包含氢气。在一种实施方式中,包含含有CO的气态底物的所述气态料流包含合成气。在一种实施方式中,包含含有CO的气态底物的所述气态料流包含钢铁厂排放气。在一种实施方式中,包含含有CO的气态底物的所述气态料流包含通过包含生物质的碳质材料的气化而获得的合成气。

[0087] 在一种实施方式中,一个或多个生长或种子发酵罐提供了细菌细胞接种物的初始供应。在一种实施方式中,一个或多个生长或种子发酵罐与本公开的方法相结合,向生物反应器连续供应细菌细胞。在本公开的一种实施方式中,该过程包括细胞再循环。

[0088] 一种生产醇产物混合物的方法,所述方法包括:

[0089] 将包含一氧化碳的气态底物添加到生物反应器中的水性培养基中;所述水性培养基包含一种或多种微生物;所述方法包括选择在约0.01至约10mmol/min/g干细胞的范围内的目标CO比摄入率、调整气态底物的流量以使CO比摄入率等于所述目标CO比摄入率的步骤;重复所述步骤直至获得在约0.01至约10mmol/min/g干细胞的范围内的所需CO比摄入率;还包括将水性培养基的连续流添加到生物反应器中,从生物反应器移除发酵液的连续流。

[0090] 一种生产醇产物混合物的方法,所述方法包括:

[0091] 将包含一氧化碳的气态底物添加到生物反应器中的水性培养基中;所述水性培养基包含一种或多种微生物;所述方法包括选择在约0.01至约10mmol/min/g干细胞的范围内的目标CO比摄入率、调整气态底物的流量以使CO比摄入率等于所述目标CO比摄入率的步骤;重复所述步骤直至获得在约1g/L至约50g/L范围内的所需乙醇生产率;还包括将水性培养基的连续流添加到生物反应器中,从生物反应器移除发酵液的连续流。

[0092] 一种生产醇产物混合物的方法,所述方法包括:

[0093] 将包含一氧化碳的气态底物添加到生物反应器中的水性培养基中;所述水性培养基包含一种或多种微生物;所述方法包括选择在约0.01至约10mmol/min/g干细胞的范围内的目标CO比摄入率、调整气态底物的流量以使CO比摄入率等于所述目标CO比摄入率的步骤;重复所述步骤直至在发酵液中获得在约1g/L至约50g/L范围内的所需乙醇浓度;还包括将水性培养基的连续流添加到生物反应器中,从生物反应器移除发酵液的连续流。

[0094] 还设想了,本公开的方法实施为:分批过程,半分批过程,分批进料过程,向连续过程转变,连续过程。

[0095] 本公开提供了一种气态底物发酵方法,所述方法包括:将包含一氧化碳(CO)的气态底物添加到生物反应器中的水性培养基中;所述水性培养基包含一种或多种微生物;所述方法包括测量细胞密度;测量CO输入速率和CO输出速率;确定CO比摄入率;以按预定量改变CO比摄入率的方式调整CO输入速率,以提高细胞密度;任选地重复这些行动。

[0096] 营养培养基包含微生物生长培养基,其可以含有允许所选微生物生长的一种或多种维生素和矿物质。表1提供了本公开所设想的营养培养基的实施方式。适合于本公开的其他营养培养基在本技术领域中公知的。此外,本发明可以利用本技术领域中公知的但源自于表1中所描述的各种组分的营养培养基。本公开提供了改进的营养培养基组合物。

[0097] 表1. 培养基组分及其浓度

[0098]

组分/离子	添加形式	以ppm为单位的浓度
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

[0099]

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
盐酸半胱氨酸	盐酸半胱氨酸	≤ 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

[0100] * Na^+ 浓度仅仅来自于NaCl。它不包括来自于其他组分例如 $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的 Na^+ 。

[0101] ** Ca^{+2} 浓度不包括来自于泛酸钙盐(即d-泛酸钙)的钙。

实施例

[0102] 比较例(参见US7,285,402中的实施例11)

[0103] 为了制备用于反应器接种的储用培养物,在含有1g/L酵母提取物和1g/L胰蛋白酶解酪蛋白以及盐和维生素的丰富培养基中,在CO、CO₂和H₂上,在150mL血清瓶中生长杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*)菌株C-01(ATCC登记号55988)培养物。使用的维生素浓度为每升培养基0.4mL含有50.5mg/L泛酸钙、20.6mg/L d-生物素和50.6mg/L盐酸硫胺素的水溶液。将瓶在摇床中在37℃下温育。通过目测确定,将培养物生长至指数生长期。对于每次接种来说,将约90mL储用培养物从血清瓶转移至1升培养基,接种量以体积计为9%。成功的接种如下所述。所描述的程序可以重复数次,以获得成功接种。

[0104] 在获得成功接种中,向1升含有0.4mL/L的维生素和盐的基础培养基批料加入90mL/L的接种物(t=0)。搅拌速率为240rpm,pH为5.3,温度为38.5℃,气体保留时间(连续气体流)为110分钟。气体进料含有62%H₂、31%CO和7%C₂H₆。在13小时后(t=13小时),观察到一定的CO转化,在t=23小时时,将搅拌速率从240rpm增加到300rpm。在t=27小时时,将气体保留时间减少至100分钟,在t=46小时时进一步减少气体停留时间。在t=28小时、59小时、72小时和85小时时,也以100rpm的增量提高搅拌速率。

[0105] 到t=110小时时,系统以80分钟的气体停留时间和600rpm的搅拌速率运行。细胞浓度为0.5g/L,CO转化率为35%。仍然没有H₂转化,但是在分批培养液中已经积累少量乙醇和乙酸盐(各约.1g/L)。直到这时为止的工作强调的是反应器中的细胞生长。

[0106] 在t=120小时时,以0.4ml/min的速率开始培养基流,所述培养基使用与基础培养基中相同的浓度。然后开始气体速率、搅拌速率和培养基速率的标称增加程序,同时小心地将系统维持在过量H₂下。到t=210小时时,乙醇浓度为17g/L,乙酸盐浓度为1g/L,细胞浓度为1.6g/L,CO转化率接近100%,H₂转化率为90%。乙醇生产率达到11.4g/L-天。

[0107] 再次开始气体速率的逐渐增加程序。同时进行维生素增加,以使维生素添加速率达到0.7mL/L培养基。到t=610小时时,反应器产生20g/L乙醇和约2g/L乙酸盐。CO转化率接近100%,H₂转化率为85%。乙醇生产率达到14g/L天。

[0108] 用于实施例1-5的发酵培养基包含选自表1中列出的一种或多种组分。

[0109] 实施例1:杨氏梭菌(*Clostridium ljundahalii*)PETC:使用一氧化碳比摄入率作为增加气体的指导来启动反应器

[0110] 含有发酵培养基的New Brunswick bioflow I反应器在开始时含有0.32g/L的活跃生长的杨氏梭菌PETC菌株。在实验开始时,将反应器的搅拌速率设置成600rpm。在整个实验中维持该搅拌速率。在整个实验中将生物反应器中的温度维持在约38.5至约39℃的范围内。每隔一定时间获取进入生物反应器的合成气进料、来自于生物反应器的排放气和生物反应器中的发酵液的样品,例如大约每天、两小时一次和四小时一次分别对进料气体、排放气和发酵液进行取样。分析上述样品的各种气体组分的消耗或生产、培养液乙酸浓度、培养液乙醇浓度和培养物的光密度(细胞密度)。在整个实验期间,将反应器的未使用体积维持在1300至1400mL之间。

[0111] 因此,使用上面描述的方程(1)-(4)确定CO比摄入率(SCU)。

[0112] 在该具体实施例中,目标SCU值被设定在0.75和0.89mmol/min/g(细胞)之间。如果在给定时间点培养物没有利用80%的被提供到反应器中的CO,也不增加通往反应器的气体流速。

[0113] 在该具体实验中,在实验开始之前将细胞再循环系统(CRS)连接到反应器。在接种

后18.6小时,直接向培养基添加60mL生长培养基,然后以0.41mL/min的速率开始通往反应器的培养基流。在接种后21.5小时,将通往反应器的营养物的流速提高到1.1mL/min,并通过细胞再循环系统以1mL/min从反应器抽出渗透液。采取上述步骤是为了防止抑制性量的乙酸和乙醇在培养物中积累,同时也向培养物提供足够量的营养物。

[0114] 反应器的细胞密度随时间增加,并在反应器接种后45小时内达到3g/L的细胞。此时,培养物产生超过6g/L的乙醇和约8g/L的乙酸。

[0115] 在该具体实验中,在整个实验中将培养物的pH维持在4.69和4.71之间。

[0116] 在细菌开始在反应器中活跃生长之后(当反应器的细胞密度达到初始细胞密度的约50%以上时),如果培养液的乙酸浓度低于预定值,则向培养物增补维生素组合物(除了培养基中已有的维生素之外)。用于向培养物添加维生素混合物的判据如下:如果培养液乙酸少于约2.5g/L,则向每升培养物添加约0.34mL维生素,如果培养液乙酸少于约2g/L,则向每升培养物添加约0.67mL维生素,如果培养液乙酸少于约1.5g/L,则向每升培养物添加约1mL维生素。在这些实验中使用的维生素组合物如下:

[0117] 生物素 0.08-1 μ M

[0118] 盐酸硫胺素 0.12-1.5 μ M

[0119] d-泛酸钙 0.15-2 μ M

[0120] 除了生物素、硫胺素和泛酸钙之外,向PETC实施例添加ATCC维生素增补物(目录号MD-VS)至终浓度为1%(相对于发酵培养基)。

[0121] 实施例2:杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*)C-01

[0122] 含有约1.5升(例如在1.45升至1.65升范围内)发酵培养基的New Brunswick Bioflow I反应器在开始时含有约0.3g/L的活跃生长的杨氏梭菌C-01菌株。在实验开始时,将生物反应器中的搅拌速率设置成600rpm。在整个实验中维持该搅拌速率。在整个实验中将生物反应器中的温度维持在约36至约37.5 $^{\circ}$ C的范围内。以不同时间间隔(例如1-4小时的时间间隔)获取下列样品并进行分析:进入生物反应器的合成气进料,来自于生物反应器的排放气,生物反应器中的发酵液。样品分析提供:各种气体组分的消耗,各种气体组分的生产,发酵液的乙酸浓度、乙醇浓度和光密度。

[0123] 因此,使用上面描述的方程(1)-(4)确定CO比摄入率(SCU)。

[0124] 开始时,使用上述方程计算对应于约1.4mmol/min/g的SCU值的合成气输入值,并将合成气流量维持在该计算值,直至细胞密度增加并达到约1.5g/L的值。

[0125] 在反应器的细胞密度达到约1.5g/L后,将预测气体的SCU设定值降低至约1.2mmol/min/g。其后,在反应器的细胞质量达到约2.5g/L后,将预测气体的SCU设定值降低至约1.0mmol/min/g。细胞质量随时间增加,并在反应器接种后约79小时内达到约2.8g/L的预期细胞质量。此时培养物产生超过约20g/L的乙醇。

[0126] 在接种后约13.97小时,以约0.2mL/min的速率开始通往反应器的培养基流(细胞保留时间近似值:约125小时)。在接种后约28.08小时,将通往反应器的培养基流量提高至约0.5mL/min(细胞保留时间近似值:约52小时)。在实验期间,将pH维持在约4.5左右。

[0127] 在整个启动过程中逐渐降低SCU设定值是为了在反应器的生产模式(稳态)期间促进培养物向低SCU(在约0.7至约0.9mmol/min/g之间)维持的逐步转变。

[0128] 上述过程花费小于约80小时来达到反应器的设定细胞质量目标(约2.8g/L)。

[0129] 实施例3:产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)

[0130] 含有约1.5升(例如在约1.45升至约1.65升范围内)发酵培养基的New Brunswick Bioflow I反应器在开始时含有约0.47g/L的活跃生长的产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)。在实验开始时,将生物反应器中的搅拌速率设置成约600rpm。在整个实验中维持该搅拌速率。在整个实验中将生物反应器中的温度维持在约36至约37.5°C的范围内。以不同时间间隔(例如约1小时至约4小时的时间间隔)获取下列样品并进行分析:进入生物反应器的合成气进料,来自于生物反应器的排放气,生物反应器中的发酵液。样品分析提供:各种气体组分的消耗,各种气体组分的生产,发酵液的乙酸浓度、乙醇浓度和光密度。

[0131] 因此,使用上面描述的方程(1)-(4)确定CO比摄入率(SCU)。

[0132] 开始时,使用上述方程计算对应于约0.4mmol/min/g的SCU值的合成气输入值,并将合成气流量维持在该计算值,直至细胞密度增加。将对应于约0.4mmol/min/g的SCU目标值的气体流量维持约19小时。在接种后19小时至21小时的时间段中,SCU目标值为约0.5mmol/min/g。在接种后约21小时,将SCU目标值设置成约0.6。细胞密度随时间增加并在反应器接种后约79小时内达到约3g/L。此时培养物产生超过约15g/L的乙醇。在接种后约26小时,以约0.1mL/min的速率开始通往反应器的培养基流(细胞保留时间近似值:约240小时)。在接种后约50小时,将通往反应器的培养基流量提高至约0.2ml/min(细胞保留时间近似值:约119小时)。在接种后约71小时,将通往反应器的培养基流量提高至约0.5ml/min(细胞保留时间近似值:约50小时)。在实验期间将pH维持在约4.5左右。

[0133] 实施例4:产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)

[0134] 含有约1.5升(例如在约1.45升至约1.65升范围内)发酵培养基的New Brunswick Bioflow I反应器在开始时含有约0.47g/L的活跃生长的产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)。在实验开始时,将生物反应器中的搅拌速率设置成约600rpm。在整个实验中维持该搅拌速率。在整个实验中将生物反应器中的温度维持在约36至约37.5°C的范围内。以不同时间间隔(例如1-4小时的时间间隔)获取下列样品并进行分析:进入生物反应器的合成气进料,来自于生物反应器的排放气,生物反应器中的发酵液。样品分析提供:各种气体组分的消耗,各种气体组分的生产,发酵液的乙酸浓度、乙醇浓度和光密度。

[0135] 因此,使用上面描述的方程(1)-(4)确定CO比摄入率(SCU)。

[0136] 开始时,使用上述方程计算对应于约0.6mmol/min/g的SCU值的合成气输入值,并将合成气流量维持在该计算值,直至细胞密度增加。在接种后约26小时,将SCU目标值设置成约0.7。细胞质量随时间增加并在反应器接种后64小时内达到约2.97g/L的细胞质量。此时培养物产生超过约18g/L的乙醇。在接种后约18.3小时,以约0.1ml/min的速率开始通往反应器的培养基流(细胞保留时间近似值:约242小时)。在接种后约41.6小时,将通往反应器的培养基流量提高至约0.2ml/min(细胞保留时间近似值:约121小时)。在实验期间将pH维持在约4.5左右。

[0137] 实施例5:食甲基丁酸杆菌(*Butyribacterium Methylophilum*)(ATCC33266):使用一氧化碳比摄入率作为增加气体的指导来启动反应器

[0138] 在该实验中,使用非梭菌的产乙酸菌来测试一氧化碳比摄入率启动方法。

[0139] 该实验在含有1.31g/L的活跃生长的食甲基丁酸杆菌(*Butyribacterium Methylophilum*)和上述发酵培养基的New Brunswick bioflow I反应器中开始。在实验

开始时,将反应器的搅拌速率设置成700rpm。在整个实验中维持该搅拌速率。在整个实验中将生物反应器中的温度维持在38.5至38.6℃之间。

[0140] 每隔一定时间获取进入生物反应器的合成气进料、来自于生物反应器的排放气和生物反应器中的发酵液的样品,例如大约每天、两小时一次和四小时一次分别对进料气体、排放气和发酵液进行取样。分析上述样品的各种气体组分的消耗或生产、培养液乙酸浓度、培养液乙醇浓度和培养物的光密度(细胞密度)。在整个实验期间,将反应器的未使用体积维持在1150至1100mL之间。

[0141] 因此,使用上面描述的方程(1)-(4)确定CO比摄入率(SCU)。

[0142] 在该具体实施例中,目标SCU值被设置成0.8mmol/min/g(细胞)。

[0143] 为了维持培养物的稳定性,如果在任何给定时间点培养物没有利用80%的被提供到反应器中的CO,则不增加通往反应器的气体流速。

[0144] 在该实验中,在实验开始之前将细胞再循环系统(CRS)连接到反应器。以1mL/min的速率开始通往反应器的发酵培养基(营养物)流,并通过CRS以0.9mL/min从反应器抽出渗透液。

[0145] 反应器的细胞密度随时间增加,并在反应器接种后24小时内达到5.27g/L的细胞。此时,培养物产生超过15g/L的乙醇、0.3g/L的丁醇和超过2g/L的乙酸。

[0146] 在该具体实验中,在整个实验中将培养物的pH维持在4.67和4.71之间。

[0147] 本领域技术人员可以在不背离本公开的具体实施方式、实施例、权利要求书、应用等中包括的本公开的范围的情况下,对本公开做出大量修改和改变。所有出版的文献在此引为参考。

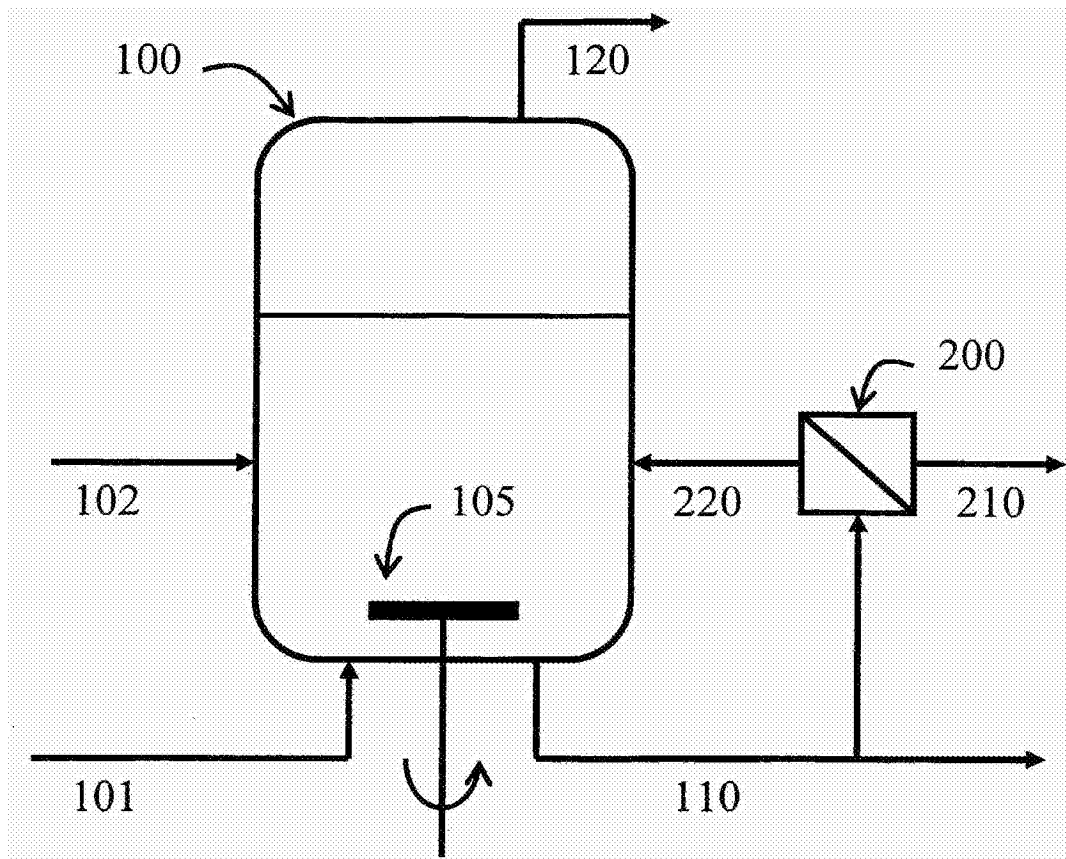


图1