



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102741417 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 27

(21) 申请号 201180006104. 8

C12P 7/06(2006. 01)

(22) 申请日 2011. 01. 14

C12P 7/40(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/295, 145 2010. 01. 14 US

(56) 对比文件

WO 02097106 A1, 2000. 12. 05, 第 5 页第 4-7 行, 第 10 页第 13-30 行, 实施例 6).

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 07. 13

CN 101182555 A, 2008. 05. 21, 全文.

CN 101384696 A, 2009. 03. 11, 全文.

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/NZ2011/000002 2011. 01. 14

审查员 刘铮

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/087380 EN 2011. 07. 21

(73) 专利权人 朗泽科技新西兰有限公司

地址 新西兰奥克兰

(72) 发明人 W·D·巴克 J·C·布罗姆雷

C·D·米哈尔策

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限

公司 11285

代理人 张广育 姜建成

(51) Int. Cl.

C12P 1/04(2006. 01)

C12P 7/02(2006. 01)

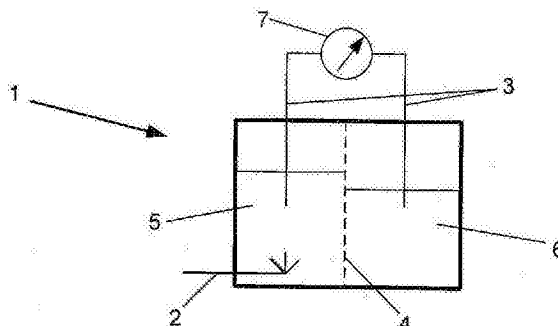
权利要求书1页 说明书14页 附图1页

(54) 发明名称

醇的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及用于在微生物发酵包含 CO 和 / 或 H<sub>2</sub> 的气态底物中提高碳捕获效率的方法 ; 所述方法包括将电位施加于整个发酵。在某些方面, 本发明涉及在微生物发酵包含 CO 和 / 或 H<sub>2</sub> 的气态底物以生成醇和 / 或酸中提高碳捕获效率。具体地, 本发明涉及用于在一氧化碳营养发酵中提高碳捕获效率的方法。



1. 一种用于微生物发酵包含一氧化碳 CO 的气态底物提高碳捕获的方法,所述发酵在生物反应器中进行,其中所述方法包含将电位差施加于包含一种或多种一氧化碳营养细菌的培养物的整个发酵液,以产生包括醇、酸或它们的混合物的产物。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述产物是乙醇。

3. 上述权利要求中任一项的方法,其中所述整个发酵液的电位差是通过电解施加。

4. 权利要求 3 的方法,其中将直流电施加于两个电极,所述电极浸在电解质中。

5. 权利要求 4 的方法,其中所述直流电具有至少 2V 的电位差。

6. 权利要求 4 或 5 的方法,其中所述直流电的电位差被控制以使得基本恒定的电流通过所述电解质。

7. 权利要求 6 的方法,其中所述通过所述电解质的基本恒定的电流被维持在大于 1mA。

8. 权利要求 3 的方法,其中将一种或多种电子穿梭介质提供至包含于所述生物反应器中的发酵液中。

9. 权利要求 6 的方法,其中将一种或多种电子穿梭介质提供至包含于所述生物反应器中的发酵液中。

10. 权利要求 1-2、4-5 和 7 中任一项的方法,其中将一种或多种电子穿梭介质提供至包含于所述生物反应器中的发酵液中。

11. 一种在发酵包含 CO 的底物中增加微生物生长的方法,所述方法包含将电位差施加于整个发酵液,其中所述微生物为一氧化碳营养细菌。

12. 权利要求 11 的方法,其中微生物发酵所述包含 CO 的底物产生一种或多种产物,所述产物包括醇和 / 或酸。

13. 权利要求 12 的方法,其中所述一种或多种产物是乙醇。

14. 权利要求 11-13 中任一项的方法,其中将所述电位差通过电解施加于整个发酵。

15. 权利要求 14 的方法,其中将直流电施加于两个电极,所述电极浸在电解质中。

16. 权利要求 15 的方法,其中所述直流电具有至少 2V 的电位差。

17. 权利要求 15 或 16 的方法,其中将所述直流电的电位差被控制以使得基本恒定的电流通过电解质。

18. 权利要求 17 的方法,其中所述通过所述电解质的基本恒定的电流维持在大于 1mA。

19. 权利要求 11-18 中任一项的方法,其中将一种或多种电子穿梭介质提供至包含于生物反应器中的发酵液中。

## 醇的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明总体上涉及通过微生物发酵生产产物(特别是醇)的方法。具体而言,本发明涉及用于改进在一氧化碳营养发酵中的碳捕获效率的方法。

### 背景技术

[0002] 乙醇迅速在世界范围内成为一种主要的富含氢的液体运输燃料。2005年全世界的乙醇消费估计为122亿加仑。燃料乙醇工业的全球市场也已被预测在未来持续快速增长,这是由于欧洲、日本、美国和数个发展中国家对乙醇的兴趣增加。

[0003] 例如,在美国,乙醇用于生产E10,10%乙醇在汽油中的混合物。在E10掺混物中,乙醇组分作为氧化剂起作用,改进燃烧效率并降低空气污染物的产生。在巴西,乙醇满足约30%的运输燃料需求,既作为掺混在汽油中的氧化剂,又本身作为纯净燃料。同样,在欧洲,围绕温室气体(GHG)排放后果的环境问题已促使欧盟(EU)规定其成员国对可持续运输燃料(例如,由生物质获得的乙醇)的消费有强制性目标。

[0004] 极大多数燃料乙醇是经过传统酵母基发酵方法生产的,该方法使用来自于作物的碳水化合物,如从甘蔗提取的蔗糖或从谷类作物提取的淀粉,作为主要碳源。但是,这些碳水化合物原料的成本受到它们有作为人的食物或动物饲料的价值的影 响,并且用于乙醇生产的产生淀粉或蔗糖的作物的种植不是在所有地理条件下都是在经济上可持续的。因此,人们对开发将更低成本和/或更丰富的碳源转化为燃料乙醇的技术有兴趣。

[0005] CO是有有机材料(如煤、石油或石油衍生产物)燃烧不完全的主要的、无成本、富含能量的副产物。例如,据报道,澳大利亚的钢铁工业每年产生并释放入大气超过500,000吨的CO。

[0006] 催化方法可用于将主要由CO和/或CO和氢气(H<sub>2</sub>)组成的气体转化为多种燃料和化学制品。微生物还可用于将这些气体转化为燃料和化学制品。这些生物学方法虽然通常比化学反应慢,但与催化方法相比具有数个优点,包括更高的特异性、更高的收率、更低的能量成本和更大的中毒抗性。

[0007] 微生物依靠以CO作为唯一碳源生长的能力首先发现于1903年。这随后被确定是使用自养生长的乙酰辅酶A(乙酰CoA)生物化学途径(也称为Woods-Ljungdahl途径和一氧化碳脱氢酶/乙酰CoA合酶(CODH/ACS)途径)的物的性质。大量厌氧生物(包括一氧化碳营养生物、光合成生物、产甲烷生物和产丙酮生物)已显示出可将CO代谢为多种终产物,即CO<sub>2</sub>、H<sub>2</sub>、甲烷、正丁醇、乙酸盐和乙醇。当使用CO作为唯一碳源时,所有所述生物均产生至少两种的这些终产物。

[0008] 厌氧菌,如来自梭菌属的厌氧菌,已被证实可从CO、CO<sub>2</sub>和H<sub>2</sub>经乙酰基CoA生物化学途径产生乙醇。例如,可从气体产生乙醇的杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*)的多个菌株描述于WO 00/68407、EP117309、美国专利5,173,429、5,593,886和6,368,819、WO 98/00558和W002/08438。还已知产醇梭菌属(*Clostridium autoethanogenum* sp.)细菌可从气体产生乙醇(Abrini et al., Archives of Microbiology 161, pp 345-351(1994))。

[0009] 但是,由微生物通过发酵气体的乙醇生产经常与共产生乙酸盐和 / 或乙酸有关。由于一些可用的碳被转化为乙酸盐 / 乙酸而非乙醇,使用所述发酵方法生产乙醇的效率可低于理想的。同样,除非乙酸盐 / 乙酸副产物可用于一些其他目的,否则会造成废物处理问题。乙酸盐 / 乙酸通过微生物转化为甲烷,因此具有有利于 GHG 排放的潜力。

[0010] 现已知,与微生物使用一氧化碳作为其唯一碳源和能量来源的能力有关的数种已知酶的活性需要金属辅因子。其活性需要结合金属辅因子的关键酶的实例包括一氧化碳脱氢酶(CODH)和乙酰基 -CoA 合酶(ACS)。

[0011] W02007/117157、W02008/115080、W02009/022925、W02009/058028、W02009/064200、W02009/064201 和 W02009/113878,其公开内容通过引证的方式纳入本文,描述了通过厌氧发酵含一氧化碳的气体的厌氧发酵而生产醇(特别是乙醇)的方法。作为描述于 W02007/117157 中的发酵方法的副产物所产生的乙酸盐被转化为氢气和二氧化碳气体,二者之一或二者均可用于厌氧发酵方法中。W02009/022925 公开了 pH 和 ORP 在通过发酵转化含 CO 的底物为产物(如酸和醇)中的作用。W02009/058028 描述了使用工业废气通过发酵体通过发酵用于产生产物(例如醇)。W02009/064201 公开了 CO 的载体和在发酵中使用 CO。W02009/113878 公开了在发酵含 CO 的底物过程中一种或多种酸转化成一种或多种醇。

[0012] 发酵含 CO 和 / 或 CO<sub>2</sub>的底物需要能量(通常称为“还原当量”)以使碳固定在微生物细胞团块和 / 或产物(如乙醇)中。用于碳在细胞团块和产物中固定所需的还原当量通常通过氧化 CO 和 / 或 H<sub>2</sub>产生。在缺乏 H<sub>2</sub>时,所有还原当量均来自 CO 氧化成 CO<sub>2</sub>。当氢气可利用时,至少一部分 H<sub>2</sub>可用于产生还原当量,并且较少的 CO 需被氧化为 CO<sub>2</sub>。在极端的情况中,当丰富的 H<sub>2</sub>可利用时,在 CO 和 / 或 CO<sub>2</sub>中的所有碳均可固定在细胞团块和产物(如醇)中,并且还原当量均可来自 H<sub>2</sub>。当 CO<sub>2</sub>产生时,代表碳捕获无效,因为其被从发酵体系排出而非被固定。

[0013] 本发明的目的是提供一种至少部分克服以上缺点的方法,或至少向公众提供有用的选择。

## 发明内容

[0014] 本发明的第一大方面提供了一种在经 Wood-Ljungdahl 途径的一氧化碳营养发酵中提高碳捕获效率的方法,所述方法包括将电位施加于整个发酵中。在具体实施方案中,经将 CO 和 / 或 CO<sub>2</sub>固定在细胞团块和 / 或产物中而将碳捕获。

[0015] 在具体实施方案中,通过发酵生产的产物是酸和 / 或醇。

[0016] 本发明的第二大方面提供了一种在发酵含 CO 的底物中增加微生物的微生物生长的方法,所述方法包括将电位施加于整个发酵中。

[0017] 在具体实施方案中,微生物生长速率增加了至少 5%。在具体实施方案中,微生物生长速率增加了至少 10%。在具体实施方案中,微生物生长速率增加了至少 15%。在具体实施方案中,微生物生长速率增加了至少 20%。

[0018] 在第一和第二方面的具体实施方案中,通过电解将电位施加于整个发酵。在具体实施方案中,电解包括以两个电极间最高达 20V 的电压通直流电。在具体实施方案中,施加至少 2V、或至少 4V、或至少 6V、或至少 8V、或至少 10V、或至少 15V、或至少 20V 的电位。在

本发明的具体实施方案中,可控制电位使得通过电解质的基本恒定电流维持在约 1mA、或约 2mA、或约 3mA、或约 4mA、或约 5mA、或约 6mA、或约 7mA、或约 8mA、或约 9mA、或约 10mA。

[0019] 在第一和第二方面的具体实施方案中,所述方法包括将一种或多种电子穿梭介质加入发酵液中。或者,发酵可在不存在一种或多种电子穿梭介质下进行。

[0020] 本发明的另一方面提供了一种发酵含 CO 和 / 或 H<sub>2</sub>的底物的方法,其中至少一部分的 CO 和 / 或 H<sub>2</sub>用于生产一个或多个还原当量。本发明该方面的方法包括向所述发酵提供一个或多个电子使得用于生产所述一个或多个还原当量的 CO 和 / 或 H<sub>2</sub>的量可以减少或降低。

[0021] 本发明的实施方案特别可应用于通过发酵含 CO 的气态底物生产酸和醇(特别是乙醇)中。所述底物可包含作为工业过程的副产物所获得的气体。在某些实施方案中,所述工业过程选自铁金属产品制造、非铁产品制造、石油精炼过程、生物质气化、煤气化、电力生产、碳黑生产、氨生产、甲醇生产和焦炭制造。在本发明的一个实施方案中,所述气态底物是合成气。在一个实施方案中,所述气态底物包含由钢铁厂获得的气体。

[0022] 在第一和第二方面的具体实施方案中,所述含 CO 的底物通常包含主要比例的 CO,如至少约 20 体积%至约 100 体积%CO,40 体积%至 95 体积%CO,40 体积%至 60 体积%CO,以及 45 体积%至 55 体积%CO。在具体实施方案中,所述底物包含约 25 体积%、或约 30 体积%、或约 35 体积%、或约 40 体积%、或约 45 体积%、或约 50 体积%CO、或约 55 体积%CO、或约 60 体积%CO。具有较低浓度 CO (如 6%)的底物也可以是适当的,特别是当 H<sub>2</sub>和 CO<sub>2</sub>也存在时。

[0023] 在多个实施方案中,发酵使用一种或多种一氧化碳营养细菌的菌株培养物进行。在多个实施方案中,一氧化碳营养细菌选自梭菌属、穆尔氏菌属(Moorella)、产醋杆菌属(Oxobacter)、消化链球菌属(Peptostreptococcus)、醋酸杆菌属(Acetobacterium)、真杆菌属(Eubacterium)或丁酸杆菌属(Butyribacterium)。在一个实施方案中,所述一氧化碳营养细菌是产醇梭菌(Clostridium autoethanogenum)。

[0024] 本发明的另一实施方案提供了一种电化学生物反应器,其包含用于将含 CO 和 / 或 CO<sub>2</sub>的底物和任选的 H<sub>2</sub>引入发酵液的器件以及将电位施加于整个发酵液的器件。在具体实施方案中,施加电位的器件是可控制的,使得可维持所需电流通过所述发酵液。

[0025] 在具体实施方案中,所述电化学生物反应器被配置成使得所述发酵液可维持在半电池中。在具体实施方案中,所述半电池不含有氧。

[0026] 本发明还可单独地或综合地包括在本申请说明中提及或指出的部分、要素或特征,其以两个或更多个所述部分、要素或特征的任意结合或所有结合,并且当本文提及在本发明涉及领域中有已知等价物的具体整体时,所述已知等价物被认为是纳入本文的,正如其被单独提出一样。

## 附图说明

[0027] 图 1 是将 CO 和 / 或 CO<sub>2</sub>经 Wood-Ljungdahl 途径转化为细胞物质和产物的示意图;

[0028] 图 2 是具有用于依照本发明的一个实施方案施加电位的器件的生物反应器的平面图。

### 具体实施方式

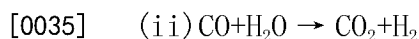
[0029] 本发明提供了一种在经 Wood-Ljungdahl 途径的发酵中提高碳捕获效率的方法, 所述方法包括将电位施加于整个发酵。在具体实施方案中, 经将 CO 和 / 或 CO<sub>2</sub> 固定在细胞团块和 / 或产物中将碳捕获。在具体实施方案中, 一氧化碳营养微生物用于发酵中。在具体实施方案中, 通过发酵生产的产物是酸和 / 或醇。例如, 通过产醇梭菌发酵含碳的底物生产包括乙酸盐和乙醇的产物。

[0030] 通常, 含 CO 和 / 或 CO<sub>2</sub> 的底物经图 1 中简化示出的 Wood-Ljungdahl 途径转化为细胞物质和产物。

[0031] 为本发明的目的, 还原当量可定义为生物还原能如 NADH 或类似物。还原当量用于细胞过程(如发酵) 以将碳固定在产物和细胞团块中, 并且用作产生和还原发酵中所形成的代谢产物的还原力。

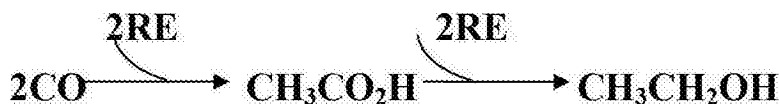
[0032] 如本领域技术人员理解的, 发酵是使得细胞从氧化有机化合物获得能量的过程。在缺氧条件下, 发酵使得在缺乏氧气下进行呼吸。存在大量公知的厌氧发酵过程, 包括乙醇发酵、乳酸发酵和糖酵解。经 Wood-Ljungdahl 途径发酵含 CO 和 / 或 CO<sub>2</sub> 的底物需要能量以将碳固定在细胞团块和 / 或产物中。还原当量提供这些反应所需的能量。发酵含 CO 的底物可产生一种或多种产物, 包括但不限于一种或多种醇和 / 或一种或多种酸。通过所述发酵形成的代谢产物的实例包括但不限于酸, 如乙酸盐、丙酸盐、丁酸盐、乳酸盐、丙烯酸盐; 和其他产物, 如乙醇、丙酮、丙醇、丁醇和 2, 3- 丁二醇。

[0033] 还原当量通过 (i) 氢化酶或 (ii) 水气变换反应(Water Gas Shift Reaction) 来自 H<sub>2</sub> 或 CO:

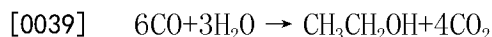


[0036] 以下(非限制性) 实例证明了在 CO 转化成乙醇(CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH) 中需要还原当量(RE)。

[0037]



[0038] 如在以上反应式中可看出的, CO 转化成乙醇需要两个碳分子, 由所示 2CO 提供。碳固定和 CO 还原成 CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H 需要两个还原当量。CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H 还原成 CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH 需要另外两个还原当量。需要这些还原当量满足以下化学计量:



[0040] 在该情况中, 所述还原当量通过水气变换反应从 CO 获得。根据本发明的一个方面, 固定 CO 和 / 或 CO<sub>2</sub> 所需的至少一部分还原当量通过电的方式提供。不希望囿于理论, 认为将电位施加于整个发酵可导致还原力或还原当量再生, 使得其可用于固定碳所需的细胞还原反应。在具体实施方案中, 向一种或多种微生物提供电子以降低将碳固定在细胞团块和 / 或产物中所需的 CO 和 / 或 H<sub>2</sub> 的量。相应地, 随着将碳固定在细胞团块和 / 或产物中所需的 CO 的量减少, 作为反应副产物所产生的 CO<sub>2</sub> 的量也减少。在具体实施方案中, 电子通过电解提供。

[0041] 在已知的电化学碳水化合物发酵中, 电子通常使用电子穿梭介质制备, 所述电子穿梭介质有例如甲基紫精、苜基紫精或中性红。所述发酵的实例详述于 Zeikus et

al., Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 58:476-481 和本文参考文献中,其全部通过引证的方式纳入本文。在本发明的具体实施方案中,电子以不需要电子穿梭介质提供。不希望囿于理论,认为在本文实施例部分所述的一种或多种培养基组分可作为电子穿梭物质。

[0042] 还惊奇地意识到当电位施加于整个发酵时,微生物的代谢可以有变化。在本发明的具体实施方案中,施加电位可导致微生物生长增加。在具体实施方案中,微生物生长速率增加至少 5%、或至少 10%、或至少 15%、或至少 20%。如此,本发明提供了一种增加微生物生长速率的方法。应注意,可能有碳固定代谢变换导致的代谢物产生的稍微减少。

[0043] 另外,应认识到在发酵过程中,可存在微生物生长优先的阶段,例如在起始阶段。在该阶段中,电位可施加于整个发酵以使得生长速率增加。在产物形成优先的发酵阶段中,电位可被降低或除去。

[0044] 在另一方面,本发明提供了一种电化学生物反应器,其包含向一种或多种微生物提供含 CO 和 / 或 CO<sub>2</sub> 的底物的器件以及向一种或多种微生物提供电子的器件。一氧化碳营养微生物经常是厌氧的,发酵含 CO 和 / 或 CO<sub>2</sub> 的底物通常以气态形式提供。发酵含 CO 和 / 或 CO<sub>2</sub> 的底物可在含发酵液的生物反应器中进行,所述发酵液包含一种或多种微生物和细胞生长和代谢所需的必需营养素。根据本发明,电子可通过将电位施加于整个发酵液而提供给微生物。发酵液通常是含微生物、金属和非金属营养素的水性营养素培养基。所述液体营养素培养基是合适的电解质,其中电子可以经一个或多个电极提供。

[0045] 在具体实施方案中,发酵必须维持厌氧,因此不可使用水的简单电解,因为电解产生的氧可有损于微生物细胞发挥功能。但是,电子可经半电池提供至发酵液,其中所述阴极可置于生物反应器中并且阳极可置于生物反应器外,在阳极处产生氧不会有损于发酵。在所述半电池中,电路可通过提供盐桥和 / 或可透膜以支持离子流而维持。

[0046] 还应认识到,本发明的方法也可增加发酵含 CO 和 / 或 CO<sub>2</sub> 以及任选的 H<sub>2</sub> 的底物的总能量效率。这些底物通常以气态形式提供,存在与将所述化合物转移至溶液用于转化为产物有关的显著能量消耗。然而,将相同量的还原当量(以电子形式)转移至溶液所需的能量小得多。

[0047] 定义

[0048] 除非另外定义,在整个本说明书中所用的以下术语定义如下:

[0049] 术语“含一氧化碳的底物”及类似术语应理解为包括任何这样的底物,其中一氧化碳可用于一个或多个细菌菌株的生长和 / 或发酵。

[0050] “含一氧化碳的气态底物”包括任何包含一氧化碳的气体。气态底物通常包含大比例的 CO, 优选至少约 5 体积% 至约 100 体积% 的 CO。

[0051] 在发酵产物的上下文中,本文所用的术语“酸”既包括羧酸也包括相关的羧酸阴离子,如在本文所述的发酵液中存在的游离乙酸和乙酸盐的混合物。在发酵液中分子酸与羧酸盐的比率取决于体系的 pH。术语“乙酸盐”既包括单独的乙酸盐也包括分子或游离乙酸和乙酸盐的混合物,如在本文描述的发酵液中存在的乙酸盐和游离乙酸的混合物。在发酵液中分子乙酸与乙酸盐的比率取决于体系的 pH。

[0052] 本文所使用的“电子穿梭介质”或“氧化还原介质”等旨在指作为可逆的电子供体和 / 或电子受体发挥作用的电子穿梭物质。介质包括紫精染料(如甲基紫精)、葱醌

和其他醌染料、三苯甲烷染料、酞菁染料、次甲基染料、吡咯染料、卟啉染料、喋啶、喋啶酮(pteridone)、黄素、和第 VI、VII 和 VIII 副族的金属复合物。

[0053] 术语“生物反应器”包括由一个或多个容器和 / 或塔或管线排列组成的发酵装置, 其包括连续搅拌釜反应器(CSTR)、固定化细胞反应器(ICR)、滴流床反应器(TBR)、移动床生物被膜反应器(MBBR)、鼓泡塔、气升式发酵罐(Gas Lift Fermenter)、膜反应器如中空纤维膜生物反应器(HFMBR)、静态混合器或适用于气液接触的其他容器或其他装置。

[0054] 除非本文另外要求, 本文所使用的短语“发酵”、“发酵过程”或“发酵反应”等旨在同时包括所述过程的生长期和产物生物合成期。如本文将要进一步描述的, 在一些实施方案中, 生物反应器可包含第一生长反应器和第二发酵反应器。如此, 向发酵反应中加入金属或组合物应被理解为包括向这些反应器之一或二者中加入。

[0055] 虽然以下说明集中于本发明的具体实施方案, 即使用 CO 作为主要底物生产乙醇和 / 或乙酸盐, 但是应理解, 本发明可适用于生产替代的醇和 / 或酸以及使用本发明所属领域普通技术人员已知的替代底物。例如, 可使用含二氧化碳和氢气的气态底物。另外, 本发明可适用于发酵以产生丁酸盐、丙酸盐、己酸盐、乙醇、丙醇和丁醇。所述方法也可用于产生氢气。例如, 这些产物可通过使用选自以下属的微生物进行发酵而生产: 穆尔氏菌属、梭菌属、瘤胃球菌属(Ruminococcus)、醋酸杆菌属、真杆菌属、丁酸杆菌、产醋杆菌、甲烷八叠球菌属(Methanosarcina)、甲烷八叠球菌属(Methanosarcina) 和脱硫肠状菌属(Desulfotomaculum)。

[0056] 发酵

[0057] 本发明的某些实施方案被调整为适合使用由一种或多种工业过程所生产的气体流。所述过程包括钢铁制造过程, 特别是产生具有高 CO 含量或超过预定水平(即 5%) 的 CO 含量的气体流的过程。根据所述实施方案, 产乙酸细菌(acetogenic bacteria)优选被用于在一个或多个生物反应器内生产酸和 / 或醇, 特别是乙醇或丁醇。本领域技术人员会知道, 考虑本公开的内容, 本发明可适用于多种工业气体流或废气体流, 包括具有内部内燃机的机动车的气体流。同样, 本领域技术人员会知道, 考虑本公开的内容, 本发明可适用于其他发酵反应, 包括使用相同或不同的微生物的那些反应。因此旨在本发明的范围不限于所描述的具体实施方案和 / 或应用, 而是应被理解为更广含义; 例如, 气体流的来源不受限制, 只要至少其组分可用于供料至发酵反应。本发明特别适用于提高总碳捕获和 / 或从含 CO 的气态底物产生乙醇和其他醇。从气态底物产生乙醇和其他醇的方法是已知的。示例性方法包括例如描述于 W02007/117157、W02008/115080、W02009/022925、W02009/064200、美国 6, 340, 581、美国 6, 136, 577、美国 5, 593, 886、美国 5, 807, 722 和美国 5, 821, 111 中的那些方法, 它们各自通过引证的方式纳入本文。

[0058] 已知大量厌氧菌能够进行将 CO 发酵成醇(包括正丁醇和乙醇)和乙酸, 并且适合于本发明的方法中。适合用于本发明中的所述细菌的实例包括梭菌属的细菌, 如杨氏梭菌的菌株, 包括描述于 W0 00/68407、EP117309、美国专利 5, 173, 429、5, 593, 886 和 6, 368, 819、W0 98/00558 和 W0 02/08438 中的那些, Clostridium carboxydivorans (Liou et al., International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 33:pp2085-2091)、Clostridium ragsdalei (W02008/028055) 和产醇梭菌(Abrini et al, Archives of Microbiology 161:pp 345-351)。其他合适的细菌包括穆尔氏菌属的那



些,包括 *Moorella* sp HUC22-1 (Sakai et al, *Biotechnology Letters* 29:pp1607-1612) 以及一氧化碳嗜热菌 (*Carboxydothemus*) 属的那些 (Svetlichny, V. A., Sokolova, T. G. et al (1991), *Systematic and Applied Microbiology* 14:254-260)。其他实例包括热乙酸穆尔氏菌 (*Moorella thermoacetica*)、热自养穆尔氏菌 (*Moorella thermoautotrophica*)、产生瘤胃球菌 (*Ruminococcus productus*)、伍氏醋酸杆菌 (*Acetobacterium woodii*)、粘液真杆菌 (*Eubacterium limosum*)、食甲基丁酸杆菌 (*Butyribacterium methylotrophicum*)、普氏产醋杆菌 (*Oxobacter pfennigii*)、巴氏甲烷八叠球菌 (*Methanosarcina barkeri*)、噬乙酸甲烷八叠球菌 (*Methanosarcina acetivorans*)、库氏脱硫肠状菌 (*Desulftomaculum kuznetsovii*) (Simpa et. al. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2006 Vol. 26. Pp41-65)。另外,应理解,其他厌氧型产乙酸细菌可如本领域技术人员的理解应用于本发明。还应理解,本发明可应用于两种或更多种细菌的混合培养物。

[0059] 适用于本发明的一种示例性微生物是产醇梭菌。在一个实施方案中,产醇梭菌是具有在 German Resource Centre for Biological Material (DSMZ) 中以标识保藏号 19630 的保藏的菌株的标识特征的产醇梭菌。在另一实施方案中,产醇梭菌是具有 DSMZ 保藏号 DSMZ10061 的标识特征的产醇梭菌。

[0060] 培养本发明方法中使用的细菌可使用本领域已知的任意数目的方法进行,用于使用厌氧菌培养和发酵底物。示例性技术在以下“实施例”部分中提供。例如,可利用在以下文章中通常描述的使用气态底物进行发酵的那些方法:(i) K. T. Klasson, et al. (1991). *Bioreactors for synthesis gas fermentations resources. Conservation and Recycling*, 5; 145-165;(ii) K. T. Klasson, et al. (1991). *Bioreactor design for synthesis gas fermentations. Fuel*. 70. 605-614;(iii) K. T. Klasson, et al. (1992). *Bioconversion of synthesis gas into liquid or gaseous fuels. Enzyme and Microbial Technology*. 14; 602-608;(iv) J. L. Vega, et al. (1989). *Study of Gaseous Substrate Fermentation: Carbon Monoxide Conversion to Acetate. 2. Continuous Culture. Biotech. Bioeng.* 34. 6. 785-793;(v) J. L. Vega, et al. (1989). *Study of gaseous substrate fermentations: Carbon monoxide conversion to acetate. 1. Batch culture. Biotechnology and Bioengineering*. 34. 6. 774-784;(vi) J. L. Vega, et al. (1990). *Design of Bioreactors for Coal Synthesis Gas Fermentations. Resources, Conservation and Recycling*. 3. 149-160;所有这些文章均通过引证的方式纳入本文。

[0061] 发酵可在任何合适的生物反应器中进行,所述生物反应器例如连续搅拌釜反应器 (CSTR)、固定化细胞反应器、气升式反应器、鼓泡塔反应器 (BCR)、膜反应器如中空纤维膜生物反应器 (HFMBR) 或滴流床反应器 (TBR)。同时,在本发明的一些实施方案中,生物反应器可包含第一生长反应器,其中培养微生物,和第二发酵反应器,向其中供应来自生长反应器的发酵液并且在其中产生大部分发酵产物(例如乙醇和乙酸盐)。

[0062] 根据本发明的多个实施方案,发酵反应的碳源是含 CO 的气态底物。底物可为作为工业过程的副产物得到的含 CO 的废气,或来自其他来源如来自汽车废气得到的含 CO 的废气。在某些实施方案中,所述工业过程选自铁金属产品制造如钢铁厂、非铁产品制造、石油精炼过程、煤的气化、电力生产、碳黑生产、氨生产、甲醇生产和焦炭制造。在这些实施方案

中,含 CO 的底物可使用任何常规方法在其被排放至大气之前从工业过程中捕获。根据含 CO 底物的组成,在将其引入发酵之前还可能需要对其进行处理以除去任何不需要的杂质(如尘粒)。例如,可以将气态底物使用已知方法进行过滤或涤气。

[0063] 或者,含 CO 的底物可来自对生物质气化。气化过程包括生物质在有限供应空气或氧气下不完全燃烧。所生成的气体通常主要包含 CO 和 H<sub>2</sub>,以及少量的 CO<sub>2</sub>、甲烷、乙烯和乙烷。例如,在食品提取和加工过程中所得到的生物质副产物,如来自甘蔗的蔗糖、或来自玉米或谷物的淀粉,或由林业生成的非食物生物质废物,可被气化以生产适用于本发明的含 CO 的气体。

[0064] 含 CO 的底物通常包含大比例的 CO,如至少约 20 体积%至约 100 体积%CO,40 体积%至 95 体积%CO,60 体积%至 90 体积%CO,以及 70 体积%至 90 体积%CO。在具体实施方案中,所述底物包含 25 体积%、或 30 体积%、或 35 体积%、或 40 体积%、或 45 体积%、或 50 体积%的 CO。具有更低浓度 CO(例如 6%)的底物,也可以是适当的,特别当 H<sub>2</sub>和 CO<sub>2</sub>也存在时。

[0065] 虽然底物不需要包含任何氢气,但根据本发明方法,存在 H<sub>2</sub>不应该有损于产物形成。在具体实施方案中,存在氢气可导致醇产生的总效率提高。例如,在具体实施方案中,所述底物可包含约 2:1、或 1:1、或 1:2 比率的 H<sub>2</sub>:CO。在其他实施方案中,所述底物流包含低浓度的 H<sub>2</sub>,例如低于 5%、或低于 4%、或低于 3%、或低于 2%、或低于 1%,或其基本不含氢气。所述底物还可包含一些 CO<sub>2</sub>,例如约 1 体积%至约 80 体积%CO<sub>2</sub>、或 1 体积%至约 30 体积%CO<sub>2</sub>。在具体实施方案中,底物流包含 CO<sub>2</sub>且不包含或包含最少量的 CO。

[0066] 通常,一氧化碳以气态加入发酵反应。但是,本发明方法不限于以该形态添加该底物。例如,一氧化碳可以液体提供。例如,液体可用含一氧化碳的气体饱和并且将该液体加入生物反应器。这可使用标准方法实现。例如,微气泡分散发生器(Hensirisak et. al. Scale-up of microbubble dispersion generator for aerobic fermentation; Applied Biochemistry and Biotechnology Volume 101, Number 3/October, 2002)可用于此目的。

[0067] 应理解,为了发生细菌生长和 CO 向醇发酵,除了含 CO 的底物气体以外,还需要将合适的液体营养素培养基加料至生物反应器。营养素培养基应包含足以使得所使用微生物生长的维生素和矿物质。适用于使用 CO 作为唯一碳源发酵乙醇的厌氧培养基是本领域已知的。例如,合适的培养基描述于以上引用的美国专利 5,173,429 和 5,593,886 和 W002/08438、W02007/117157、W02008/115080、W02009/022925、W02009/058028、W02009/064200、W02009/064201 和 W02009/113878 中。本发明提供了新型培养基,其在发酵过程中在支持微生物生长和 / 或醇产生方面具有增加的效率。该培养基在下文中将更加详细描述。

[0068] 发酵理想应在适当条件下进行,用于发生所需发酵(例如 CO 到乙醇)。应考虑的反应条件包括压力、温度、气体流速、液体流速、培养基 pH、培养基氧化还原电位、搅拌速率(如果使用连续搅拌釜反应器)、接种物水平、确保在液相中的 CO 不成为限制的最大气体底物浓度和避免产物抑制的最大产物浓度。合适的条件描述于 W002/08438、W007/117157、W008/115080 和 W02009/022925 中。

[0069] 最适宜的反应条件将部分取决于所使用的具体微生物。但是,通常,发酵优选在高于环境压力的压力下进行。在增加的压力下操作允许 CO 从气相转化成液相的速率显著增

加,在液相中 CO 可由微生物摄取作为碳源用于产生乙醇。这进而意味着,当生物反应器维持在升高的压力而非大气压力时可以减少保留时间(定义为生物反应器中的液体体积除以输入气体流速)。

[0070] 同样,因为给定的 CO 到乙醇转化速率部分是底物保留时间的函数,并且实现所需的保留时间进而表明所需的生物反应器体积,使用加压体系可极大地减少所需的生物反应器体积,并因此减少发酵设备的主要费用。根据美国专利 5,593,886 中给出的实施例,反应器体积可以以与反应器操作压力增加成线性比例地减少,即在 10 个大气压下操作的生物反应器仅需要在 1 个大气压下操作的反应器体积的十分之一。

[0071] 在升高的压力下进行气体到乙醇发酵的优点也已在别处描述。例如,WO 02/08438 描述了在 30psig 和 75psig 压力下进行的气体到乙醇发酵,获得的乙醇生产率分别为 150g/1/天和 369g/1/天。但是,使用类似培养基和输入气体组合物在大气压力下进行的示例性发酵被发现每天每升产生低 10-20 倍的乙醇。

[0072] 还需要,含 CO 的气态底物的引入速率确保在液相中的 CO 浓度不成为限制。这是因为 CO 限制的结果可为乙醇产物被培养物消费。

[0073] 产物回收

[0074] 发酵反应的产物可使用已知方法回收。示例性方法包括描述于 W007/117157、W008/115080、美国 6,340,581、美国 6,136,577、美国 5,593,886、美国 5,807,722 和美国 5,821,111 中的方法。但是,简而言之且仅作为示例,可以将乙醇通过诸如分馏或蒸发、以及萃取发酵的方法从发酵液中回收。

[0075] 从发酵液中蒸馏乙醇得到乙醇和水的共沸混合物(即,95%乙醇和 5%水)。无水乙醇可随后通过使用分子筛乙醇脱水技术而获得,所述技术也是本领域公知的。

[0076] 萃取发酵步骤包括使用对发酵生物呈现出低毒性风险的水混溶性溶剂,以从稀的发酵液中回收乙醇。例如,油醇是可用于该类型萃取过程的溶剂。将油醇连续引入发酵罐中,借此该溶剂上升在发酵罐顶部形成一个层,该层被连续萃取和供应至离心机。随后水和细胞容易从油醇中分离并返回发酵罐,同时负载乙醇的溶剂被供应至闪蒸单元。大多数乙醇气化并浓缩,而油醇是非挥发性的,其在发酵中回收再利用。

[0077] 乙酸盐,在发酵中作为副产物产生,也可使用本领域已知的方法从发酵液中回收。

[0078] 例如,可使用包括活性炭过滤器的吸附体系。在该情况下,优选使用合适的分离单元将微生物细胞首先从发酵液中移出。生成不含细胞的发酵液用于产物回收的基于过滤的很多方法是本领域已知的。随后,不含细胞的含渗透物的乙醇——和乙酸盐——通过含活性炭的柱以吸附乙酸盐。酸形式(乙酸)而非盐形式(乙酸盐)的乙酸盐更容易被活性炭吸附。因此,优选将发酵液的 pH 降至低于约 3,然后通过活性炭柱,以将大部分乙酸盐转化为乙酸形式。

[0079] 可以将活性炭所吸附的乙酸通过使用本领域已知的方法洗脱而回收。例如,乙醇可用于洗脱结合的乙酸盐。在某些实施方案中,由发酵过程所生产的乙醇自身可用于洗脱乙酸盐。因为乙醇的沸点为 78.8°C,乙酸的沸点为 107°C,可以将乙醇和乙酸盐使用基于挥发性的方法(如蒸馏)而容易地彼此分离。

[0080] 从发酵液中回收乙酸盐的其他方法也是本领域已知的,并且可用于本发明的方法中。例如,美国专利 6,368,819 和 6,753,170 描述了其可用于从发酵液中萃取乙酸的溶剂和

共溶剂体系。作为用于萃取发酵乙醇所描述的油醇基体系的实例,美国专利 6,368,819 和 6,753,170 中所描述的体系描述了在发酵的微生物存在或不存在下可与发酵液混合以便萃取乙酸产物的水不混溶性溶剂/共溶剂。随后,将含乙酸产物的溶剂/共溶剂通过蒸馏从发酵液中分离。随后,可以将第二蒸馏步骤用于从所述溶剂/共溶剂体系纯化乙酸。

[0081] 可以将发酵反应的产物(例如乙醇和乙酸盐)通过以下步骤从发酵液回收:从发酵生物反应器中连续移出一部分发酵液,将微生物细胞从所述发酵液分离(方便地通过过滤),和从发酵液中同时或连续回收一种或多种产物。对于乙醇,可通过蒸馏将其方便地回收,乙酸盐可通过使用上述方法在活性炭上的吸附而回收。优选使所分离的微生物细胞返回至发酵生物反应器。也优选使乙醇和乙酸盐已移除后剩余的不含细胞的渗透物返回至发酵生物反应器。可将另外的营养素(如 B 族维生素)加入不含细胞的渗透物以补充所述营养素培养基,然后返回至生物反应器。同样,如果如上所述调节发酵液的 pH 以增加乙酸对活性炭的吸附,则应将 pH 再次调节至与发酵生物反应器中发酵液相似的 pH,然后返回生物反应器。

#### [0082] 电化学发酵

[0083] 本发明提供了一种在经 Wood-Ljungdahl 途径的一氧化碳营养发酵中提高碳捕获效率的方法,所述方法包括将电位施加于整个发酵。电位可通过本领域技术人员已知的任何方式施加于整个发酵。例如,用于施加电位的已知方式是电化学电池。具体而言,适用于本发明方法的电化学电池是电解电池。根据本发明,发酵通常以包含一种或多种微生物和包含必需营养素(包括金属离子)的水性营养素培养基的发酵液进行。如此,所述液体营养素培养基可提供用于电解的理想电解质。因此,电位可以通过提供连接至电路的电极施加。

[0084] 在本发明的具体实施方案中,所述微生物是厌氧的并且必须维持基本不含氧气。在电解中,其中两个电极均伸入电解质,氧将通过解离水在阳极形成。这将有损于微生物培养物。如此,在具体实施方案中,所述方法包括将电位通过半电池施加至整个发酵,其中所述阳极经离子可透性膜或替代的盐桥与发酵液分开。在这样实施方案中,氧可被释放,而不有损于微生物培养物。

[0085] 根据本发明,施加于所述发酵的电位可增加碳固定的效率。在本发明的具体实施方案中,一氧化碳营养细菌将至少一部分的含 CO 和 / 或 CO<sub>2</sub> 的底物固定于细胞团块和 / 或产物(如乙醇)中。固定碳所需的能量通常被标记为“还原当量”,可通过氧化大量还原实体获得。一氧化碳营养细菌(如产醇梭菌)通常通过氧化 CO 和 / 或 H<sub>2</sub> 得到还原当量。但是,根据本发明,碳固定的效率可通过将电位施加于整个发酵而提高。根据本发明,碳被固定为细胞团块和产物(如乙醇),具有较低的 CO 和 / 或 H<sub>2</sub> 需求作为还原当量。因此,将电位施加于一氧化碳营养发酵可减少单位量的固定为细胞团块和 / 或产物的碳产生的 CO<sub>2</sub> 的量。

[0086] 通常,当电位施加于整个发酵时,一种或多种电子穿梭介质会减少,所述电子穿梭介质如存在于发酵液中的苜基紫精或甲基紫精。这些介质进而辅助微生物细胞还原机构的还原,如铁氧化还原蛋白氧 / 还偶联物或 NAD(P)H/NAD(P) 偶联物。因此,根据本发明的具体实施方案,一种或多种电子穿梭介质在发酵液中提供。但是,在具体实施方案中,所述方法在不需要电子穿梭介质下进行。

[0087] 还认识到,施加电位还可改变微生物固定碳的方式。在本文所提供的实例中,将电位施加于整个发酵可增加指向细胞团块的碳比例并因此增加微生物生长。在具体实施方案

中,微生物生长增加至少 5%、或至少 10%、或至少 15%、或至少 20%。

[0088] 本领域技术人员应理解如何确定提高碳固定效率和 / 或改善微生物生长所必需的电位。但是,例如,具有最高达 20V 电压的直流电可施加于电极。在具体实施方案中,施加至少 2V、或至少 4V、或至少 6V、或至少 8V、或至少 10V、或至少 15V、或至少 20V 的电位。在本发明的具体实施方案中,可控制电位,使得通过电解质的基本恒定电流维持在约 1mA、或约 2mA、或约 3mA、或约 4mA、或约 5mA、或约 6mA、或约 7mA、或约 8mA、或约 9mA、或约 10mA。此外,本领域技术人员应理解如何确定最适宜电流,所述电流可随时间改变并且对于不同的微生物可以不同。

[0089] 本发明的另一实施方案提供了一种电化学生物反应器,其包含用于将含 CO 和 / 或 CO<sub>2</sub>和任选的 H<sub>2</sub>的底物引入发酵液的器件,以及用于将电位施加于整个发酵液的器件。在具体实施方案中,用于施加电位的器件是可控制的,使得维持所需的电流通过所述发酵液。

[0090] 图 2 显示出了根据本发明具体实施方案的电化学生物反应器。生物反应器 1,包括用于供应气态底物的器件(2)和用于将电位施加于整个发酵的器件。在具体实施方案中,发酵是厌氧的,因此所述电化学生物反应器包含被离子可透性隔物 4 分开的两个电极 3。所述离子可透性隔物可为多孔膜或陶瓷材料或本领域已知的其他合适材料。在使用中,一部分生物反应器 5 可用含一种或多种微生物和液体营养素培养基的发酵液填充。在使用中,另一部分生物反应器 6 可填充有传导性盐溶液。配置电极 3,使得在使用中其可伸入发酵液和传导性盐溶液中。所述生物反应器还可包括电路和控制所述电极间电位(7)的器件。

[0091] 实施例

[0092] 材料和方法

[0093]

溶液 A			
<b>NH<sub>4</sub>Ac</b>	<b>3.083 g</b>	<b>KCl</b>	<b>0.15 g</b>
<b>MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O</b>	<b>0.61 g</b>		
<b>CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O</b>	<b>0.294 g</b>	蒸馏水	直至 1 L
溶液 B			
组分	摩尔/L H <sub>2</sub> O	组分	摩尔/L H <sub>2</sub> O
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	<b>0.1</b>	<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub></b>	<b>0.01</b>
<b>CoCl<sub>2</sub></b>	<b>0.05</b>	<b>ZnCl<sub>2</sub></b>	<b>0.01</b>
<b>NiCl<sub>2</sub></b>	<b>0.05</b>	<b>MnCl<sub>2</sub></b>	<b>0.01</b>
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	<b>0.01</b>	<b>NTA</b>	<b>0.3</b>
<b>Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub></b>	<b>0.01</b>		
溶液 C			
<b>生物素</b>	<b>20.0 mg</b>	<b>D-(*)-泛酸钙盐</b>	<b>50.0 mg</b>
<b>叶酸</b>	<b>20.0 mg</b>		
<b>吡哆素·HCl</b>	<b>10.0 mg</b>	<b>维生素 B12</b>	<b>50.0 mg</b>
<b>硫胺素·HCl</b>	<b>50.0 mg</b>	<b>对氨基苯甲酸</b>	<b>50.0 mg</b>
<b>核黄素</b>	<b>50.0 mg</b>	<b>硫辛酸</b>	<b>50.0 mg</b>
<b>烟酸</b>	<b>50.0 mg</b>	蒸馏水	至 1 升

[0094] Cr(II) 溶液的制备

[0095] 将 1L 三颈烧瓶装有不漏气入口和出口以使得可在惰性气体下操作并随后将所需产物转移至合适的储存烧瓶中。向烧瓶中装入 CrCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (40g, 0.15 摩尔)、锌粒 [20 目] (18.3g, 0.28 摩尔)、汞 (13.55g, 1mL, 0.0676 摩尔) 和 500mL 的蒸馏水。接着,用 N<sub>2</sub> 冲洗一小时,将混合物升温至约 80℃ 以引发反应。接着,在恒定 N<sub>2</sub> 流下搅拌两小时,将混合物冷却至室温并继续搅拌另外 48 小时,至此反应混合物已变为深蓝色溶液。将溶液转移至 N<sub>2</sub> 净化的血清瓶中并在冰箱中储存备用。

[0096] 细菌:所使用的产醇梭菌保藏在 German Resource Centre for Biological Material (DSMZ),分配的保藏号为 DSMZ19630。

[0097] 取样和分析操作

[0098] 自 CSTR 反应器中以最高达 20 天的时期间隔取培养基样品。每次对培养基进行小心取样以确保无气体进入反应器或从反应器逸出。

[0099] HPLC:

[0100] HPLC 系统为 Agilent1100 系列。流动相:0.0025N 硫酸。流速和压力:0.800mL/min。柱:Alltech IOA;货号 9648,150×6.5mm,粒度为 5 μm。柱温:60℃。检测器:Refractive Index。检测器温度:45℃。

[0101] 样品制备的方法:

[0102] 将 400  $\mu\text{L}$  样品和 50  $\mu\text{L}$  的 0.15M  $\text{ZnSO}_4$  和 50  $\mu\text{L}$  的 0.15M  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  装载入埃彭道夫管 (Eppendorf tube)。将所述管在 12,000rpm、4 $^\circ\text{C}$  下离心 10min。将 200  $\mu\text{L}$  上清液转移入 HPLC 小瓶, 并将 5  $\mu\text{L}$  注射入 HPLC 仪器。

[0103] 液上气体分析:

[0104] 测量在具有两个安装通道的 Varian CP-4900micro GC 上进行。通道 1 是在 70 $^\circ\text{C}$ 、200kPa 氩气下运行且回洗时间为 4.2s 的 10m 分子筛柱, 而通道 2 是在 90 $^\circ\text{C}$ 、150kPa 氦气下运行且无回洗的 10m PPQ 柱。两个通道的注射器温度均为 70 $^\circ\text{C}$ 。运行时间设定为 120s, 但感兴趣的所有峰通常在 100s 之前洗脱。

[0105] 实施例 1: 在 CSTR 中的分批发酵

[0106] 将两个 2L CSTR's (A) 和 (B) 在以下条件下装配: 培养基制备如下: 将 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (30mM) 加入 1.5L 溶液 A 中。培养基的 pH 通过添加  $\text{NH}_4\text{OH}$  调至 5.3。将培养基溶液在 121 $^\circ\text{C}$  下通过高压灭菌灭菌 30 分钟, 或在使用前通过过滤灭菌。将刃天青加入作为氧化还原指示剂。将培养基溶液无菌且缺氧地转移至 1.5L CSTR 容器, 并持续用  $\text{N}_2$  净化。一经转移入发酵容器, 所转移的培养基的还原状态和 pH 可经探针直接测量。将培养基加热至 37 $^\circ\text{C}$  并在 300rpm 搅拌。

[0107] 加入硫化钠溶液 (3.75mL 的 0.2M 溶液), 接着加入痕量金属溶液 B (1.5mL)、 $\text{Na}_2\text{WO}_4$  (1.5mL 的 0.01M 溶液), 随后加入溶液 C (15mL)。将溶液的 ORP 使用 Cr(II) 溶液调至约 -200mV。

[0108] 通过用两个不锈钢电极改造 CSTR, 将发酵罐 B 转变为电化学生物反应器。阴极伸入液体营养素培养基而阳极伸入由离子可透性膜与液体营养素培养基分开的半电池容器。所述阳极半电池容器包含 3M 的 KCl 溶液。将直流电施加于所述电极, 电位为 10-15V, 使得在整个发酵中电流维持在约 7mA。

[0109] 在接种之前, 将气体转换为 2%  $\text{H}_2$ 、33%  $\text{N}_2$ 、44%  $\text{CO}$ 、21%  $\text{CO}_2$  和 10%  $\text{H}_2$  的混合物。将活跃生长的产醇梭菌培养物以约 10% (v/v) 的水平接种在 CSTR 中。在该试验过程中, 将  $\text{Na}_2\text{S}$  溶液以约 0.16 毫摩尔 / 天的速率加入。将发酵罐在基本类似的条件下操作并且使底物供应适应每个微生物培养物的需求而增加, 以将对照发酵罐 (A) 与电化学生物反应器 (B) 进行比较。

[0110]

发酵罐	天	生物质 (g/L)	乙醇 (g/L)	总 CO 吸 收(毫摩尔 /L)	总 CO <sub>2</sub> 生 成(毫摩尔 /L)	CO <sub>2</sub> 生成 /CO 消耗 比率
A	0.6	0.60*	1.0*	382	252	0.66
	0.8	0.78*	1.9*	604	398	0.66
	1.0	1.02	3.8	850	563	0.66
	1.2	1.28*	5.7*	1121	749	0.67
	1.4	1.59*	7.6*	1427	962	0.67
	1.6	1.90*	9.5*	1783	1209	0.68
	1.8	2.12	12.1	2205	1500	0.68
	2.0	2.40	14.9	2711	1848	0.68
B	0.6	0.70*	1.0*	591	272	0.46
	0.8	0.82*	1.8*	753	366	0.49
	1.0	1.16	3.3	940	483	0.51
	1.2	1.51*	5.0*	1173	638	0.54
	1.4	1.80*	6.9*	1470	837	0.57
	1.6	2.18*	8.7*	1844	1090	0.59
	1.8	2.61	10.9	2308	1403	0.61
	2.0	3.00	13.7	2869	1778	0.62

[0111] \*从发酵参数曲线图外推

[0112] 在整个发酵中,在电化学生物反应器(B)中所产生的 CO<sub>2</sub>显著少于(A)中所产生的 CO<sub>2</sub>。这表明在(B)中比在(A)中更少的 CO 用于产生还原当量。这是未预料到的,因为微生物生长和代谢产物产生是类似的。认为在电化学生物反应器(B)中可用的电子会抵消了固定一些碳作为细胞团块和/或产物所需的还原当量的量。另一个令人惊奇的结果是,在电化学生物反应器(B)中的微生物生长超过发酵罐(A)约 20%,而乙醇产生仅略微减少。

[0113] 本发明已参照某些优选实施方案在本文进行描述,以便能够使读者实施本发明而无需过度实验。本领域技术人员将理解,除了具体描述的实施方案外,可以将本发明容易地进行变化和改进。应理解,本发明包括所有这类变化方案和改变方案。另外,提供标题、题目等用于增强读者对该文献的理解,并且不应解释为限制本发明的范围。以上和以下所引用的所有申请、专利和出版物的全部公开内容,如果有的话,通过引证的方式纳入本文。

[0114] 在本说明书中参考任何现有技术不是,且不应被认为是,承认或以任何形式说明,现有技术形成了世界上任一国家中本领域的公知常识。

[0115] 在该说明书和随后的任何权利要求中,除非上下文另外要求,词语“包含(comprise, comprising)”等,应解释为开放的含义而非排除的含义,即为“包括,但不限于”的含义。



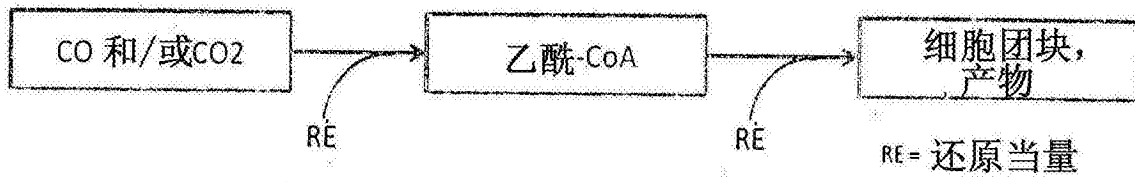


图 1

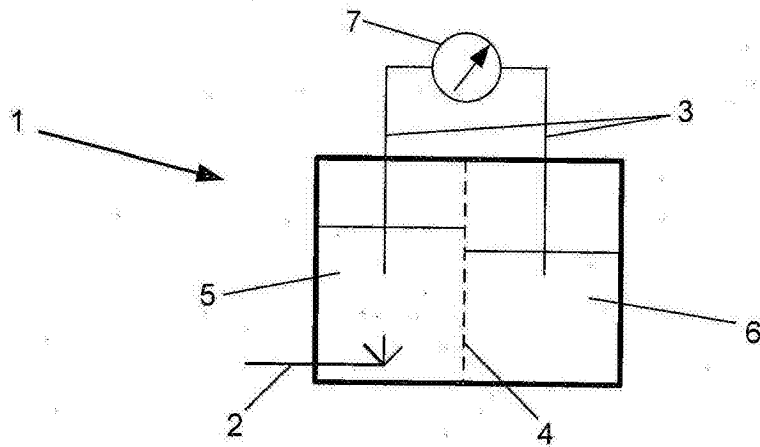


图 2