

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **033669**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.11.14

(21) Номер заявки
201690646

(22) Дата подачи заявки
2014.10.16

(51) Int. Cl. **C12P 7/06** (2006.01)
C12P 7/16 (2006.01)
C12P 7/18 (2006.01)
C12P 7/54 (2006.01)

(54) **УЛУЧШЕННОЕ УЛАВЛИВАНИЕ УГЛЕРОДА ПРИ ФЕРМЕНТАЦИИ**

(31) **61/892,405**

(32) **2013.10.17**

(33) **US**

(43) **2016.08.31**

(86) **PCT/US2014/060980**

(87) **WO 2015/058011 2015.04.23**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЛАНЦАТЕК НЬЮ ЗИЛЭНД
ЛИМИТЕД (NZ)**

(72) Изобретатель:
**Тизард Джозеф Генри, Секрист Пол
Элвин (US)**

(74) Представитель:
**Осипов К.В., Ильмер Е.Г., Пантелеев
А.С., Хмара М.В., Дошечкина В.В.,
Новоселова С.В., Липатова И.И. (RU)**

(56) **US-A1-20120309066
US-A1-20120045807
WO-A1-2013119866
US-A1-20120052541
US-A1-20050266540**

(57) В изобретении предложены процессы и способы утилизации диоксида углерода (CO₂) при ферментации газообразного субстрата, содержащего водород (H₂) и CO₂. В частности, настоящее изобретение позволяет проводить преобразование по меньшей мере части CO₂ из газообразного субстрата в один или более продуктов, таких как этанол, ацетат и/или 2,3-бутандиол.

B1

033669

033669

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки США № 61/892405 поданной 17 октября 2013 года, содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Область техники

Настоящее изобретение относится к области микробиологической ферментации газов, в частности, к новому способу утилизации диоксида углерода при анаэробной ферментации газообразных субстратов.

Уровень техники

Во всем мире этанол стремительно становится основным жидким топливом для транспортных средств, богатым водородом. Согласно оценкам, в одних только США потребление этанола в 2013 году составило 13,18 миллиардов галлонов. Также, согласно прогнозам, в будущем мировой рынок промышленности топливного этанола резко возрастет вследствие увеличения интереса к этанолу в Европе, Японии, США и в нескольких развивающихся странах.

Например, в США этанол используют для получения E10, 10% смеси этанола в бензине. В смесях E10 компонент этанол выступает в качестве окисляющего средства, которое улучшает эффективность сгорания и уменьшает образование загрязнителей воздуха. В Бразилии этанол удовлетворяет приблизительно 30% потребности в топливе для транспортных средств как в качестве окисляющего средства, которое смешивают с бензином, так и в качестве чистого топлива самого по себе. Существующая в Европе обеспокоенность, обусловленная состоянием окружающей среды, причиной которой стали последствия выбросов парникового газа, также стала стимулом для введения в государствах-членах Европейского Союза (ЕС) обязательных программ, направленных на потребление экологически безопасных видов топлива для транспортных средств, таких как этанол, полученный из биомассы.

подавляющее большинство топливного этанола получают посредством традиционных способов ферментации на основе дрожжей, в которых в качестве основного источника углерода используются углеводороды, полученные из сельскохозяйственных культур, такие как сахароза, экстрагированная из сахарного тростника, или крахмал, экстрагированный из зерновых культур. Однако на стоимость данного углеводного сырья влияет его ценность в качестве пищи для человека или корма для животных, тогда как культивирование сельскохозяйственных культур, источников крахмала или сахарозы, для получения этанола является экономически нецелесообразным во всех регионах. Вследствие этого интерес представляет разработка технологий для преобразования менее дорогостоящих и/или более многочисленных углеродных ресурсов в топливный этанол.

Для преобразования газов, состоящих преимущественно из CO и/или CO₂ и H₂, во множество видов топлива и химических соединений можно использовать каталитические способы. Для преобразования данных газов в различные виды топлива и химических соединений также можно использовать микроорганизмы. Хотя данные биологические способы, как правило, являются более медленными, чем химические реакции, такие способы обладают несколькими преимуществами по сравнению с каталитическими способами, включая более высокую специфичность, более высокие выходы, меньшую энергозатратность и большую устойчивость к отравлению.

Способность микроорганизмов расти на CO в качестве единственного источника углерода была впервые обнаружена в 1903 году. Позже было установлено, что данное свойство присуще организмам, которые используют биохимический путь ацетил-кофермента А (ацетил-КоА) для автотрофного роста (также известен как путь Вуда-Льюнгаля и путь дегидрогеназы монооксида углерода / ацетил-КоА синтазы (carbon monoxide dehydrogenase / acetyl CoA synthase, CODH/ACS)). Было показано, что большое количество анаэробных организмов, включая карбоксидотрофные, фотосинтезирующие, метанообразующие и ацетогенные организмы, метаболизируют CO до различных конечных продуктов, а именно CO₂, H₂, метана, n-бутанола, ацетата и этанола. При использовании CO в качестве единственного источника углерода все такие организмы образуют по меньшей мере два из данных конечных продуктов.

Было продемонстрировано, что анаэробные бактерии, такие как бактерии рода Clostridium, образуют этанол из CO, CO₂ и H₂ посредством биохимического пути ацетил-КоА. Например, различные штаммы Clostridium ljungdahlii, которые образуют этанол из газов, описаны в публикациях WO 1998/00558, WO 2000/068407, WO 2002/008438, патенте США 5173429, патенте США 5593886 и патенте США 6368819. Также известно, что бактерия вида Clostridium autoethanogenum образует этанол из газов (Abrini, Arch Microbiol, 161: 345-351, 1994).

В исследованиях ферментации газа было продемонстрировано, что CO является доминирующим источником углерода, который утилизируется карбоксидотрофными микроорганизмами для образования этанола, в то время как CO₂ преимущественно не утилизируется микроорганизмами. Соответственно, существует острая потребность в улучшенных способах ферментации газа, позволяющих преобразовать хотя бы часть CO₂ в газообразный субстрат для получения полезных продуктов, таких как спирты и/или кислоты.

Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении предложен способ улучшения улавливания углерода при ферментации газа посредством обеспечения газообразного субстрата, содержащего H₂ и CO₂, в бактериальную культуру.

ру, которая преобразует по меньшей мере часть CO_2 из газообразного субстрата в один или более продуктов. В настоящем изобретении также предложен способ получения одного или более продуктов с помощью ферментации газа посредством обеспечения газообразного субстрата, содержащего H_2 и CO_2 , в бактериальную культуру, которая преобразует по меньшей мере часть CO_2 из газообразного субстрата в один или более продуктов. В идеальном случае количество CO_2 , потребленного культурой, превышает количество CO_2 , образованного культурой, или равно указанному количеству.

Газообразный субстрат, помимо H_2 и CO_2 , может содержать CO . Соотношение газов-компонентов (например, $\text{H}_2:\text{CO}_2$ или $\text{H}_2:\text{CO}_2:\text{CO}$) в газообразном субстрате может варьировать. Кроме того, соотношение поглощения или специфичного поглощения газов-компонентов (например, $\text{H}_2:\text{CO}_2$) в газообразном субстрате может варьировать. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения специфичное поглощение культурой H_2 превышает специфичное поглощение культурой CO .

Продукты ферментации могут включать, например, спирты и/или кислоты. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения продукты включают одно или более соединений, которые выбраны из этанола, ацетата и 2,3-бутандиола.

Бактерия может представлять собой любую бактерию, способную к ферментации газообразного субстрата, содержащего H_2 , CO_2 и/или CO . Бактерия может представлять собой карбоксидотрофную бактерию, такую как бактерия, полученная из одного или более из следующих родов: *Clostridium*, *Moorella*, *Oxobacter*, *Peptostreptococcus*, *Acetobacterium*, *Eubacterium* или *Butyribacterium*. Более конкретно, бактерии могут включать виды *Clostridium autoethanogenum* или *Clostridium ljungdahlii*, такой как вид *Clostridium autoethanogenum*, депонированный в DSMZ (Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур) под регистрационным номером DSM23693, или бактерии, полученные из данных видов.

Процесс или способ может дополнительно включать извлечение одного или более продуктов.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет собой график, на котором представлены изменения поглощения CO , CO_2 и H_2 культурой, которая содержится в первом реакторе, в ответ на изменения состава подаваемого газа.

Фиг. 2 представляет собой график, на котором представлены изменения поглощения CO , CO_2 и H_2 культурой, которая содержится во втором реакторе, в ответ на изменения состава подаваемого газа.

Фиг. 3 представляет собой график, на котором представлены изменения поглощения CO , CO_2 и H_2 культурой, которая содержится в третьем реакторе, в ответ на изменения состава подаваемого газа.

Фиг. 4 представляет собой график, на котором представлены изменения поглощения CO , CO_2 и H_2 культурой, которая содержится в третьем реакторе, в ответ на изменения состава подаваемого газа.

Фиг. 5 представляет собой график, на котором представлено чистое потребление культурой CO_2 .

Фиг. 6 представляет собой график, на котором представлены продукты метаболизма ферментационной культуры.

Фиг. 7 представляет собой график, на котором представлены эффекты соотношения вступивших в реакцию H_2/CO на образование продукта.

Подробное описание изобретения

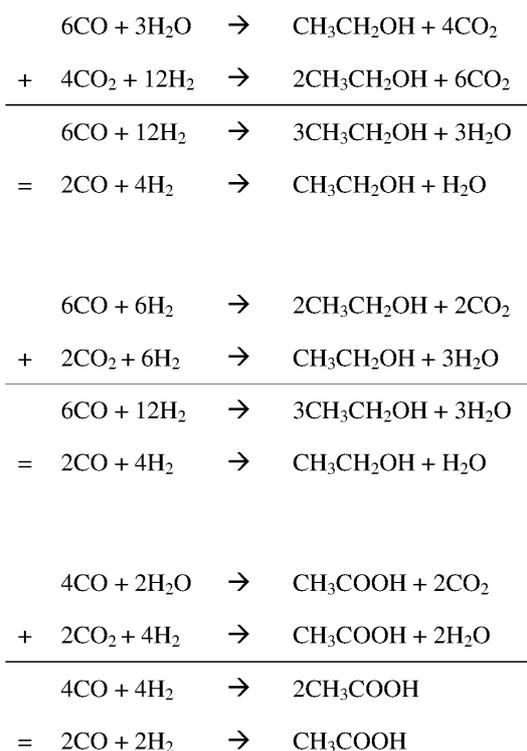
В настоящем изобретении предложен способ улучшения улавливания углерода при ферментации газа посредством обеспечения газообразного субстрата, содержащего H_2 и CO_2 , в бактериальную культуру, которая преобразует по меньшей мере часть CO_2 из газообразного субстрата в один или более продуктов. В настоящем изобретении также предложен способ получения одного или более продуктов с помощью ферментации газа посредством обеспечения газообразного субстрата, содержащего H_2 и CO_2 , в бактериальную культуру, которая преобразует по меньшей мере часть CO_2 из газообразного субстрата в один или более продуктов.

Было продемонстрировано, что анаэробные бактерии образуют этанол и ацетат из H_2 и CO посредством биохимического пути ацетил-КоА, который может включать множество различных реакций в зависимости от условий реакции и концентраций субстратов и продуктов. Например, ацетат может быть получен в результате поглощения H_2 и CO в соотношении 1:1: $2\text{CO}+2\text{H}_2\rightarrow\text{CH}_3\text{COOH}$. Этанол и CO_2 могут быть получены в результате поглощения H_2 и CO в соотношении 1:1: $3\text{CO}+3\text{H}_2\rightarrow\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}+\text{CO}_2$.

Этанол может быть получен в результате поглощения H_2 и CO в соотношении 2:1: $2\text{CO}+4\text{H}_2\rightarrow\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}+\text{H}_2\text{O}$. Ацетат может быть получен в результате потребления CO при отсутствии H_2 : $4\text{CO}+2\text{H}_2\text{O}\rightarrow\text{CH}_3\text{COOH}+2\text{CO}_2$. Этанол может быть получен в результате потребления CO при отсутствии H_2 : $6\text{CO}+3\text{H}_2\text{O}\rightarrow\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}+4\text{CO}_2$.

Кроме того, анаэробные бактерии могут утилизировать CO_2 для образования продуктов. Например, ацетат может быть образован в результате поглощения H_2 и CO_2 в соотношении 2:1: $2\text{CO}_2+4\text{H}_2\rightarrow\text{CH}_3\text{COOH}+2\text{H}_2\text{O}$. Этанол может быть образован в результате поглощения H_2 и CO_2 в соотношении 3:1: $2\text{CO}_2+6\text{H}_2\rightarrow\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}+3\text{H}_2\text{O}$.

Реакции, в ходе которых образуется CO_2 , такие как реакции, включающие специфичное поглощение CO и H_2 , и реакции потребления CO_2 можно объединить, чтобы свести к нулю чистый поток CO_2 :



В идеальном случае количество CO_2 , потребленного культурой, превышает количество CO_2 , образованного культурой, или равно указанному количеству. Другими словами, ферментация может привести к улавливанию чистого углерода.

Газообразный субстрат ("газ" или "подаваемый газ", или "ферментационный газ", или "субстрат") может представлять собой любой газ, содержащий соединение или элемент, который используется микроорганизмом в качестве источника углерода и/или энергии при ферментации. Газообразный субстрат, как правило, содержит значительную долю H_2 , CO_2 и/или CO и может, кроме того, содержать N_2 или другие газы. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения газообразный субстрат содержит H_2 и CO_2 , но не содержит CO . Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения газообразный субстрат содержит H_2 , CO_2 и CO . При анаэробной ферментации газообразный субстрат, как правило, не содержит или по существу не содержит O_2 .

Состав газообразного субстрата может варьировать. В частности, соотношения H_2 , CO_2 и/или CO в газообразном субстрате могут варьировать. Например, соотношение H_2 : CO в газообразном субстрате может составлять по меньшей мере 0,1:1, по меньшей мере 0,5:1, по меньшей мере 1:1, по меньшей мере 1,5:1, по меньшей мере 2:1, по меньшей мере 3:1, по меньшей мере 5:1 или по меньшей мере 10:1. Газообразный субстрат может содержать, например, 5-40% CO_2 , 10-25% CO_2 , 20-50% CO_2 или 30-60% CO_2 . Газообразный субстрат может содержать CO и CO_2 , например, в соотношении 1:1. Количество CO_2 в газообразном субстрате может в 1,5-4 раза превышать количество CO в газообразном субстрате.

Газообразный субстрат может содержать избыток H_2 , либо состав газообразного субстрата может быть откорректирован так, чтобы последний содержал избыток H_2 . Например, газообразный субстрат может содержать приблизительно 30 - 90% H_2 или приблизительно 60-90% H_2 . Газообразный субстрат может содержать по существу больший объем H_2 , чем CO_2 и CO . Например, соотношение H_2 : CO_2 : CO в газообразном субстрате может составлять по меньшей мере 2:1:1 или по меньшей мере 3:1:1, или по меньшей мере 5:1:1. Количество H_2 в газообразном субстрате может в 1,5 - 5 раз превышать количество CO в газообразном субстрате. Поток газа или источник газа может содержать добавки H_2 (или CO_2 , или CO) для получения газообразного субстрата желаемого состава.

Газообразный субстрат может быть получен в результате промышленного способа. В частности, газообразный субстрат может представлять собой побочный газ, полученный в результате осуществления промышленного способа, такого как производство черных металлов (например, производство стали), производство цветных металлов, переработка нефти, газификация угля, производство электроэнергии, производство чистого углерода, производство аммиака, производство метанола или производство кокса. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения газообразный субстрат получают из газа, образованного в процессе производства стали.

Газообразный субстрат может быть получен в результате газификации органического вещества, такого как метан, этан, пропан, уголь, природный газ, сырая нефть, малоценные продукты нефтепереработки (включая нефтяной кокс или петкокс), твердые бытовые отходы или биомасса. Биомасса включает субпродукты, полученные в ходе экстракции и процессинга продуктов питания, таких как сахар из са-

харного тростника или крахмал из маиса или зерновых культур, или непищевые отходы биомассы, образующиеся в лесной промышленности. Любое из данных углеродистых веществ можно газифицировать, т.е. частично сжечь с кислородом для получения синтетического газа (сингаза). Сингаз, как правило, содержит, главным образом, CO, H₂ и/или CO₂ и может дополнительно содержать некоторые количества метана, этилена, этана или других газов. Условия работы газогенератора можно откорректировать для получения потока субстрата желаемого состава для ферментации или смешивания с одним или несколькими другими потоками для обеспечения оптимизированного или желаемого состава с целью увеличения производительности спирта и/или общего улавливания углерода в процессе ферментации.

Газообразный субстрат может быть получен в системе адсорбции при переменном давлении (АПД). Например, остаточный газ из АПД может содержать ~10-12% H₂, который поступает в АПД из установки для парового риформинга метана, помимо CO и CO₂ из реакторов конверсии водяного газа в установке для парового риформинга метана. CO в газе, покидающем первичную установку для риформинга метана (в соотношении приблизительно 3 H₂/CO), может вступить в реакцию с водой с образованием H₂ и CO₂ с использованием реакторов конверсии водяного газа (высокотемпературных и низкотемпературных). Условия реакции могут быть адаптированы для контроля количества CO, присутствующего в остаточном газе АПД, относительно количества CO₂, присутствующего в остаточном газе АПД. Также может быть желательно позволить некоторому количеству H₂ остаться в остаточном газе АПД или добавить H₂ обратно к остаточному газу АПД для достижения желаемого соотношения H₂/CO/CO₂. Например, соотношение H₂:CO может составлять приблизительно 2:1 и/или соотношение H₂:CO₂ может составлять приблизительно 3:1. Как правило, АПД будет способствовать получению продукта H₂ очень высокой чистоты. На извлечение H₂ влияет, главным образом, соотношение давления подаваемого газа к давлению остаточного газа. Пропускание остаточного газа при минимальном давлении позволяет достичь максимального извлечения H₂. Поскольку остаточный газ обычно направляют к коллектору топливного газа (для использования где-либо на нефтеперерабатывающем заводе), данный газ может находиться под давлением ~15 фунт/дюйм². Если остаточный газ сжигают в специальных горелках в первичной установке для риформинга, данный газ может находиться под давлением до 5 фунт/дюйм². Если остаточный газ АПД используют в качестве источника подаваемого газа для ферментера, давление остаточного газа можно откорректировать до 30 - 45 фунт/дюйм² во избежание необходимости компрессии газа.

Газообразный субстрат можно целиком или частично направить на ферментацию посредством любых подходящих трубопроводов. Например, трубы или другие средства для переноса можно присоединить к выводной трубе побочного газа на сталелитейном заводе, чтобы направить по меньшей мере часть побочного газа в систему ферментации. Можно использовать один или более вентиляторов, чтобы направить по меньшей мере часть побочного газа в систему ферментации. Хотя сталелитейные заводы могут быть приспособлены для по существу непрерывного производства стали (и, соответственно, побочных газов), определенные аспекты способа могут являться прерывающимися. Как правило, обезуглероживание стали представляет собой периодический процесс, который длится от нескольких минут до нескольких часов. Трубопроводы могут быть приспособлены для направления по меньшей мере части побочного газа в систему ферментации, если было определено, что побочный газ характеризуется желаемым составом.

Может быть желательно отфильтровать, промыть или каким-либо другим способом предварительно обработать газообразный субстрат перед его использованием в ферментации для удаления химических или физических примесей или загрязняющих веществ. Например, исходные газы можно пропустить через воду или отфильтровать каким-либо способом для удаления твердых частиц, длинноцепочечных углеводородов или смол. Однако такая фильтрация или предварительная обработка требуется не всегда. Иногда возможно ввести нефилтрованный необработанный газообразный субстрат непосредственно в ферментационную культуру.

Состав газообразного субстрата можно изменить для улучшения эффективности ферментации, получения продукта и/или общего улавливания углерода. В частности, газообразный субстрат можно изменить так, чтобы данный субстрат содержал большее или меньшее количество H₂, CO₂ и/или CO, посредством объединения или смешивания потоков из двух или нескольких источников. Например, поток, содержащий высокую концентрацию CO₂, такой как выпускная труба преобразователя сталелитейного завода, можно объединить или смешать с потоком, содержащим высокие концентрации H₂ и CO, таким как топочный отработанный газ из коксовой печи сталелитейного завода. В качестве альтернативы или дополнительно, прерывающийся поток, содержащий CO₂, такой как выходящий поток преобразователя сталелитейного завода, можно объединить или смешать с по существу непрерывным потоком, содержащим CO, CO₂ и H₂, таким как сингаз, образованный в процессе газификации. Например, поток, образуемый газогенератором, можно увеличить и/или уменьшить в соответствии с прерывающимся образованием CO₂ из промышленного источника с целью поддержания по существу непрерывного потока субстрата с желаемым или оптимизированным составом.

Потоки субстрата, как правило, будут газообразными, но могут также являться жидкими или твердыми. Например, CO₂ можно обеспечивать в реактор в виде жидкости или в виде жидкости, насыщенной CO₂. В качестве примера, можно использовать микропузырьковый дисперсионный генератор (microbub-

ble dispersion generator), например, описанный в публикации Hensirisak, Appl Biochem Biotechnol, 101: 211-227, 2002.

Ферментация газа представляет собой метаболический процесс, посредством которого газообразный субстрат используют в качестве источника углерода и/или энергии для получения этанола или других продуктов или химических соединений. В настоящей заявке термин "ферментация" охватывает как фазу роста, так и фазу биосинтеза продукта согласно способу. Ферментация газа осуществляется микроорганизмом, как правило, бактерией.

Бактерии могут представлять собой любые бактерии, способные к ферментации газообразного субстрата, содержащего H₂, CO₂ и/или CO. Бактерии могут являться карбоксидотрофными, такими как бактерии, полученные из родов *Clostridium*, *Moorella*, *Oxobacter*, *Peptostreptococcus*, *Acetobacterium*, *Eubacterium* или *Butyribacterium*. В частности, бактерии могут представлять собой виды *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium magnum*, *Butyribacterium methylotriphocum*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchi*, *Blautia producta*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermoacetica*, *Sporomusa ovata*, *Sporomusa silvacetica*, *Sporomusa sphaeroides*, *Oxobacter pfennigii* и *Thermoanaerobacter kivui*. Бактерии могут также представлять собой штамм, полученный из любого из вышеупомянутых родов или видов.

Бактерии могут быть получены из кластера карбоксидотрофных бактерий *Clostridia*, включающего виды *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii*, *C. ragsdalei* и родственные изоляты. Таковые включают, но не ограничены указанными, штаммы JAI-1T *C. autoethanogenum* (DSM10061) (Abrini, Arch Microbiol, 161: 345-351, 1994), LBS1560 *C. autoethanogenum* (DSM19630) (WO 2009/064200), LBS1561 *C. autoethanogenum* (DSM23693), PETCT *C. ljungdahlii* (DSM13528 = ATCC 55383) (Tanner, Int J Syst Bacteriol, 43: 232-236, 1993), ERI-2 *C. ljungdahlii* (ATCC 55380) (патент США 5,593,886), C-01 *C. ljungdahlii* (ATCC 55988) (патент США 6,368,819), 0-52 *C. ljungdahlii* (ATCC 55989) (патент США 6,368,819), P11T *C. ragsdalei* (ATCC BAA-622) (WO 2008/028055), родственные изоляты, такие как "*C. Coskatii*" (публикация США 2011/0229947) и "*Clostridium sp.*" (Berzin, Appl Biochem Biotechnol, 167: 338-347, 2012), или мутантные штаммы, такие как OTA-1 *C. ljungdahlii* (Tirado-Acevedo, Production of Bioethanol from Synthesis Gas Using *Clostridium ljungdahlii*, PhD thesis, North Carolina State University, 2010). Данные штаммы из подкластера кластера I рПНК *Clostridia* и их гены 16S рПНК более чем на 99% идентичны и характеризуются аналогичным низким содержанием GC, которое составляет приблизительно 30%. Однако эксперименты по реассоциации ДНК-ДНК и фингерпринту ДНК продемонстрировали, что данные штаммы принадлежат к различным видам (WO 2008/028055).

Все виды вышеупомянутого кластера характеризуются аналогичной морфологией и размером (размер клеток в фазе логарифмического роста составляет 0,5-0,7×3-5 мкм), являются мезофильными (оптимальная температура для роста 30-37°C) и исключительно анаэробными (Abrini, Arch Microbiol, 161: 345-351, 1994; Tanner, Int J Syst Bacteriol, 43: 232-236, 1993; и WO 2008/028055). Более того, все данные виды обладают одинаковыми основными филогенетическими характеристиками, такими как одинаковый диапазон pH (pH 4 - 7,5 с оптимальным исходным значением pH 5,5 - 6), устойчивый аутоτροφный рост на СО-содержащих газах с аналогичными скоростями роста и аналогичный метаболический профиль с образованием этанола и уксусной кислоты в качестве основных конечных продуктов ферментации и образованием небольших количеств 2,3-бутандиола и молочной кислоты в определенных условиях (Abrini, Arch Microbiol, 161: 345-351, 1994; Köpke, Curr Opin Biotechnol, 22: 320-325, 2011; Tanner, Int J Syst Bacteriol, 43: 232-236, 1993; и WO 2008/028055). У всех трех видов также наблюдалось образование индола. Однако данные виды отличаются утилизацией субстратов, представляющих собой различные сахара (например, рамнозу, арабинозу), кислоты (например, глюконат, цитрат), аминокислоты (например, аргинин, гистидин), или других субстратов (например, бетаина, бутанола). Более того, было установлено, что некоторые виды являются ауксотрофными в отношении некоторых витаминов (например, тиамина, биотина), тогда как другие виды таковыми не являются. Было установлено, что организация и количество генов пути Вуда-Льюнгаля, отвечающего за поглощение газа, является одинаковой у всех видов, за исключением различий в последовательности нуклеиновых кислот и аминокислот (Köpke, Curr Opin Biotechnol, 22: 320-325, 2011). Также в ряде данных микроорганизмов было показано восстановление карбоновых кислот до соответствующих спиртов (Perez, Biotechnol Bioeng, 110:1066-1077, 2012). Вследствие этого данные характеристики не являются свойственными одному организму, наподобие *C. autoethanogenum* или *C. ljungdahlii*, но скорее являются общими характеристиками карбоксидотрофных этанол-синтезирующих бактерий *Clostridia*; можно предположить, что данные механизмы функционируют у данных штаммов аналогичным образом, хотя в работе таких механизмов могут наблюдаться различия (Perez, Biotechnol Bioeng, 110:1066-1077, 2012).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения бактерия представляет собой *Clostridium autoethanogenum* или *Clostridium ljungdahlii*. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения бактерия представляет собой вид *Clostridium autoethanogenum*, который обладает отличительными характеристиками штаммов, депонированных в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под регистрационным номером DSM10061 или

DSM23693. Согласно следующему предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения бактерия представляет собой вид *Clostridium autoethanogenum*, который депонирован в DSMZ под регистрационным номером DSM10061 или DSM23693, или бактерию, полученную из вида *Clostridium autoethanogenum*, который депонирован в DSMZ под регистрационным номером DSM10061 или DSM23693.

Поглощение ("потребление") и специфичное поглощения ("специфичное потребление") газообразного субстрата бактериальной культурой может варьировать. Поглощение, как правило, характеризуют единицей компонента газа (например, ммоль H_2 , CO_2 или CO), потребленной единицей ферментативного бульона (например, литром ферментативного бульона) за единицу времени (например, день), например, ммоль/л/день. Культура может поглощать, например, по меньшей мере 1000 ммоль/л/день H_2 , по меньшей мере 2000 ммоль/л/день H_2 , по меньшей мере 4000 ммоль/л/день H_2 или по меньшей мере 6000 ммоль/л/день H_2 . Кроме того, культура может поглощать, например, по меньшей мере 500 ммоль/л/день CO_2 , по меньшей мере 1000 ммоль/л/день CO_2 , по меньшей мере 2000 ммоль/л/день CO_2 или по меньшей мере 3000 ммоль/л/день CO_2 . Специфичное поглощение, как правило, характеризуют единицей компонента газа (например, ммоль H_2 , CO_2 или CO), потребленной единицей микроорганизма (например, граммом бактериальных клеток) за единицу времени (например, минуту), например, ммоль/г/мин. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения специфичное поглощение культурой H_2 превышает специфичное поглощение культурой CO . Например, соотношение специфичного поглощения $H_2:CO$ культурой может составлять по меньшей мере 1,1:1, по меньшей мере 1,4:1, по меньшей мере 1,6:1, по меньшей мере 2:1, по меньшей мере 3:1, по меньшей мере 5:1 или по меньшей мере 10:1.

Поглощение H_2 и/или CO_2 может быть нарушено, если концентрация этанола и/или ацетата в ферментативном бульоне является высокой или по меньшей мере превышает определенный порог. Например, поглощение H_2 может быть нарушено, если концентрация ацетата превышает приблизительно 10 г/л или приблизительно 20 г/л. Для уменьшения степени нарушения поглощения H_2 продукты, образованные бактериальной культурой, можно непрерывно удалять из реактора или ферментативного бульона. Для достижения эффективного потребления H_2 культурой может быть необходима достаточно высокая плотность клеток. Поглощение CO_2 может быть заингибировано нездоровой биомассой, переизбытком газа, высокой концентрацией этанола и/или присутствием загрязняющих веществ.

Бактериальную культуру можно выращивать в любой жидкой питательной среде, которая обеспечивает культуру достаточными ресурсами. Жидкая питательная среда может содержать, например, витамины, минералы и воду. Примеры подходящей жидкой питательной среды известны в данной области техники, включая анаэробную среду, подходящую для ферментации этанола или других продуктов (см., например, патент США 5,173,429, патент США 5,593,886 и публикацию WO 2002/08438).

Бактериальная культура может содержаться в реакторе (биореакторе). Реактор может представлять собой любое устройство для ферментации, состоящее из одного или более сосудов и/или колонн или трубопроводов для роста бактериальной культуры. Реактор может представлять собой, например, реактор с иммобилизованными клетками, газлифтный реактор, барботажный колоночный реактор (bubble column reactor, BCR), реактор с циркуляционной петлей, мембранный реактор, такой как мембранный биореактор с системой полых волокон (hollow fibre membrane bioreactor, HFM BR), реактор непрерывного действия с механическим перемешиванием (continuous flow stirred-tank reactor, CSTR) или реактор с орошаемым слоем (trickle bed reactor, TBR). Реактор предпочтительно приспособлен для получения газообразного субстрата, содержащего H_2 , CO_2 и/или CO . Реактор может содержать несколько реакторов (стадий), расположенных параллельно или последовательно. Например, реактор может содержать первый реактор роста, в котором культивируются бактерии, и второй реактор ферментации, в который может подаваться ферментативный бульон из реактора роста и в котором может быть образовано большинство продуктов ферментации.

Варианты реализации настоящего изобретения описаны в качестве примера. Однако конкретные этапы или стадии, необходимые в одном варианте реализации, могут не являться необходимыми в другом. И наоборот, этапы или стадии, включенные в описание конкретного варианта реализации, могут необязательно преимущественно использоваться в вариантах реализации, в которых такие этапы и стадии конкретно не упоминаются.

Несмотря на то, что настоящее изобретение в общих чертах описано со ссылкой на любой тип потока, который может перемещаться по системе или поблизости от системы ферментации посредством любого известного способа переноса, согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения поток субстрата и/или выходящих веществ является газообразным. Конкретные стадии можно объединить посредством подходящих трубопроводов или настроить для получения или пропускания потоков через систему. Для облегчения доставки потоков на конкретные стадии можно применять насос или компрессор. Более того, компрессор можно использовать для увеличения давления газа, который подается на одну или более стадий.

Кроме того, системы или способы согласно настоящему изобретению могут необязательно включать способы регулирования и/или контроля других параметров для улучшения общей эффективности

способа. Для регулирования и/или контроля конкретных параметров способа в систему можно ввести один или более процессоров. Например, система может включать способы определения для мониторинга состава потоков субстрата и/или выходящих веществ. Кроме того, конкретные варианты реализации настоящего изобретения могут включать средства контроля доставки потоков субстрата на конкретные стадии или элементы в пределах конкретной системы, если с помощью средств для определения было установлено, что данный поток содержит состав, подходящий для конкретной стадии. Например, в случаях, когда поток газообразного субстрата содержит низкие уровни CO_2 или высокие уровни H_2 , или высокие уровни O_2 , которые могут пагубно сказаться на реакции ферментации, поток субстрата может быть отклонен от биореактора. Система может также содержать средства для мониторинга и контроля места назначения потока субстрата и/или скорости потока, так что поток с желаемым или подходящим составом может быть доставлен на конкретную стадию.

Более того, может быть необходимо нагреть или охладить конкретные компоненты системы или потоки субстрата перед или в течение одной или более стадий в способе. В таких случаях можно использовать известные способы для нагревания или охлаждения. Например, для нагревания или охлаждения потоков субстрата можно применять теплообменники.

Условия реакции можно контролировать и корректировать для оптимизации скорости роста бактерий и/или образования продукта в реакторе. Ферментацию желательно проводить в соответствующих условиях для осуществления необходимой ферментации (например, CO_2 в спирт). Такие условия реакции включают давление, температуру, скорость потока газа, скорость потока жидкости, pH среды, окислительно-восстановительный потенциал среды, скорость перемешивания (при использовании реактора непрерывного действия с механическим перемешиванием), содержание инокулюма, концентрации субстрата (для обеспечения того, что H_2 , CO_2 и/или CO в жидкой фазе не становятся лимитирующими) и концентрации продукта (во избежание ингибирования продуктом).

Общие способы культивирования анаэробных бактерий хорошо известны в данной области техники. Примеры методик приведены в следующих публикациях: (i) Klasson, Resour Conserv Recycl, 5: 145-165, 1991; (ii) Klasson, Fuel, 70: 605-614, 1991; (iii) Klasson, Enzyme Microbial Technol, 14: 602-608, 1992; (iv) Vega, Biotech Bioeng, 34: 785-793, 1989; (v) Vega, Biotech Bioeng, 34: 774-784, 1989; (vi) Vega, Resour Conserv Recycl, 3: 149-160, 1990. Более того, способы получения этанола и других спиртов из газообразных субстратов хорошо известны в данной области техники. Примеры способов включают таковые, описанные, например, в публикациях WO 2007/117157, WO 2008/115080, патенте США 6,340,581, патенте США 6,136,577, патенте США 5,593,886, патенте США 5,807,722 и патенте США 5,821,111.

pH содержимого реактора можно откорректировать до требуемого значения. Соответствующее значение pH зависит от условий, необходимых для конкретной реакции ферментации, с учетом применяемых жидкой питательной среды и бактерий. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения, включающему ферментацию газообразного субстрата, содержащего H_2 , CO_2 и CO , под действием *Clostridium autoethanogenum*, pH можно откорректировать до значения от приблизительно 4,5 до 6,5, более предпочтительно от приблизительно 5 до 5,5. Следующие примеры включают pH от 5,5 до 6,5 с применением *Moorella thermoacetica* для образования уксусной кислоты, pH от 4,5 до 6,5 с применением *Clostridium acetobutylicum* для образования бутанола и pH 7 с применением *Carboxydotherrmus hygrogenaformans* для образования водорода. Способы корректирования и поддержания pH реактора хорошо известны в данной области техники. Такие способы могут включать применение водных оснований, таких как NaOH или NH_4OH , и водных кислот, таких как H_2SO_4 .

Предпочтительно, реактор спроектирован таким образом, чтобы обеспечивать достаточный массоперенос, позволяющий бактериям получить доступ к газообразному субстрату, в частности, к H_2 в газообразном субстрате. Длительные времена пребывания газа приводят к высокому поглощению бактериями. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения реактор представляет собой реактор с циркуляционной петлей, содержащий вертикальный сегмент и выпускной сегмент, через которые циркулируют газообразный субстрат и жидкая питательная среда. Реактор может дополнительно содержать широкий диапазон подходящих контактных модулей газ/жидкость, которые могут обеспечить эффективный массоперенос. Контактный модуль может обеспечивать уникальное геометрическое окружение, которое позволяет газу и жидкости смешиваться надлежащим образом вдоль пути течения потока, в результате чего поступивший газ растворяется в жидкости более равномерно. В качестве примера, данные контактные модули могут включать, но не ограничены указанными, матрицу структурированной гофрированной металлической укладки, неупорядоченную укладку, ситчатые пластинки и статические смесители.

Скорость массопереноса газообразного субстрата к бактериальной культуре можно контролировать таким образом, чтобы бактериальная культура снабжалась газообразным субстратом при оптимальной скорости подачи или при скорости, приближенной к оптимальной скорости подачи. Скорость массопереноса можно контролировать посредством контроля парциального давления газообразного субстрата и/или посредством контроля скорости потока жидкости или задержки подачи газа. Скорость поступления газообразного субстрата можно контролировать для обеспечения того, что концентрация H_2 , CO_2 и/или CO в жидкой фазе не становится лимитирующей. Согласно конкретным вариантам реализации настоя-

шего изобретения массоперенос контролируют посредством контроля парциального давления газообразного субстрата, поступающего в реактор.

Может быть предпочтительно проводить ферментацию при увеличенном давлении, т.е. под давлением, превышающим атмосферное давление. Функционирование под увеличенным давлением позволяет значительно увеличить скорость переноса H_2 , CO_2 и/или CO из газовой фазы в жидкую фазу, где данные газы могут быть поглощены бактериями в качестве источника углерода для образования продуктов, таких как этанол. Время удержания (объем жидкости в биореакторе, разделенный на скорость потока входящего газа) можно уменьшить, если реактор поддерживают при повышенном давлении вместо атмосферного давления. Также, поскольку скорость данной конверсии $CO/CO_2/H_2$ в этанол является отчасти функцией времени удержания субстрата, а достижение желаемого времени удержания, в свою очередь, определяет требуемый объем биореактора, использование вытеснительных систем (систем с увеличенным давлением) может в значительной степени уменьшить требуемый объем биореактора и, следовательно, затраты основного капитала на оборудование для ферментации. В соответствии с примерами, приведенными в патенте США 5,593,886, объем реактора можно уменьшать прямо пропорционально увеличению рабочего давления в реакторе. Например, объем реакторов, которые работают под давлением 10 атмосфер, должен составлять всего лишь десятую часть от объема реакторов, которые работают под давлением 1 атмосфера. Преимущества проведения ферментации газа в этанол при увеличенном давлении также были описаны в других источниках. Например, в публикации WO 2002/08438 описаны варианты ферментации газа в этанол, которые проводили под давлением 30 фунт-сила/дюйм² и 75 фунт-сила/дюйм² и которые обеспечивали продуктивность этанола 150 г/л/день и 369 г/л/день, соответственно. При этом было обнаружено, что в типичных вариантах ферментации, которые проводили с применением аналогичных составов среды и входящего газа при атмосферном давлении, получали в от 10 до 20 раз меньше этанола на литр в день.

Бактериальная культура может образовывать один или более продуктов. По меньшей мере часть CO_2 в газообразном сырье преобразуется в продукты, так что по меньшей мере часть углерода в продуктах получена из углерода CO_2 из газообразного субстрата. Например, по меньшей мере 1%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 75% или по меньшей мере 90% углерода в продуктах может быть получена из углерода CO_2 из газообразного субстрата. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения количество CO_2 в газе, покидающем реактор, является меньшим, чем количество CO_2 в газе, поступающем в реактор (т.е. меньшим, чем количество CO_2 в газообразном субстрате). Например, количество CO_2 в газе, покидающем реактор, может являться по меньшей мере на 0,5%, по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 75% или по меньшей мере на 90% меньшим, чем количество CO_2 в газе, поступающем в реактор.

Продукты могут включать спирты, кислоты или другие химические соединения. Такие продукты могут также включать газы, образованные в результате процесса ферментации. В частности, культура может образовывать одно или более соединений, которые выбраны из этанола, уксусной кислоты (или ацетата), 2,3-бутандиола, бутанола, изопропанола, лактата, сукцината, метилэтилкетона (МЕК), пропандиола, 2-пропанола, ацетоина, изобутанола, цитратмалата, бутадиена, полимолочной кислоты, изобутилена, 3-гидрокси-пропионата (ЗНР), ацетона и жирных кислот. Авторы настоящего изобретения впервые продемонстрировали высокую производительность получения этанола в результате потребления CO_2 при ферментации газа. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения культура образует одно или более соединений, выбранных из этанола, ацетата и 2,3-бутандиола.

Культура может образовывать этанол и ацетат в различных количествах. Например, культура может образовывать этанол и ацетат в соотношении приблизительно 1:1. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения культура образует этанол и ацетат в соотношении по меньшей мере 1,5:1, по меньшей мере 2:1, по меньшей мере 3:1 или по меньшей мере 5:1. Культура может образовывать этанол в концентрации по меньшей мере 10 г/л или по меньшей мере 15 г/л. Культура может образовывать ацетат или уксусную кислоту в концентрации 20 г/л или менее или 10 г/л или менее.

Процесс или способ может включать извлечение одного или более продуктов с применением любых способов, известных в данной области техники. Примеры способов описаны в публикациях WO 2007/117157, WO 2008/115080, патенте США 6340581, патенте США 6136577, патенте США 5821111, патенте США 5807722 и патенте США 5593886.

Этанол может быть извлечен из ферментативного бульона, например, с применением способов, таких как фракционная перегонка или выпаривание или экстрактивная ферментация. Дистилляция этанола из ферментативного бульона позволяет получить азеотропную смесь этанола и воды (например, 95% этанола и 5% воды). Затем безводный этанол можно получить посредством технологии дегидратации этанола с применением молекулярных сит, которая хорошо известна в данной области техники. Экстрактивная ферментация включает применение водорастворимого растворителя, который характеризуется низким риском токсичности в отношении микроорганизма, осуществляющего ферментацию, для извле-

чения этанола из разведенного ферментативного бульона. Например, при экстрактивной ферментации в качестве растворителя можно использовать олеиловый спирт. Когда олеиловый спирт непрерывно вводят в ферментер, данный спирт поднимается с образованием слоя на поверхности ферментативного бульона. Затем данный слой можно экстрагировать и направить в центрифугу. После этого воду и клетки легко отделяют от олеилового спирта и возвращают в ферментер, тогда как растворитель, содержащий этанол, подают в блок мгновенного испарения. Большая часть этанола испаряется и конденсируется, тогда как нелетучий олеиловый спирт извлекают для повторного использования в ферментации.

Ацетат также можно извлечь из ферментативного бульона с применением способов, известных в данной области техники. Например, можно использовать систему адсорбции, содержащую фильтр с активированным углем. В данном случае клетки микроорганизмов, как правило, сначала удаляют из ферментативного бульона с применением подходящего способа разделения. В данной области техники известно множество способов получения бесклеточного ферментативного бульона с применением фильтрации для извлечения продукта. Затем бесклеточный фильтрат, содержащий этанол и ацетат, пропускают через колонку, содержащую активированный уголь, для адсорбирования ацетата. Ацетат в форме кислоты (уксусной кислоты) легче адсорбируется активированным углем, чем в форме соли (ацетата). Вследствие этого предпочтительно, чтобы значение pH ферментативного бульона было уменьшено до менее приблизительно 3 перед тем, как бульон пропустят через колонку с активированным углем, для превращения большей части ацетата в форму уксусной кислоты.

Продукты реакции ферментации можно извлечь из ферментативного бульона посредством непрерывного удаления части бульона из биореактора ферментации, отделения клеток микроорганизмов от бульона и одновременного или последовательного извлечения одного или более продуктов из бульона. Выделенные клетки микроорганизмов можно возвращать в реактор ферментации. Бесклеточный фильтрат, остающийся после удаления этанола и ацетата, можно также возвращать в реактор ферментации. Дополнительные питательные вещества, такие как витамины B, можно добавить для обогащения бесклеточного фильтрата перед возвращением последнего в реактор. Если значение pH бульона было откорректировано для увеличения адсорбирования уксусной кислоты активированным углем, возможно, значение pH бесклеточного фильтрата также будет необходимо повторно откорректировать.

Реактор можно объединить с системой рециркуляции клеток, которая обеспечивает средства для отделения бактерий от фильтрата для того, чтобы бактерии могли вернуться в реактор для последующей ферментации. Модуль рециркуляции клеток может непрерывно пропускать фильтрат бульона, при этом удерживая клетки. Система рециркуляции клеток может включать, но не ограничена указанными, мембраны для рециркуляции клеток и тарельчатые центрифужные разделители.

Примеры

Следующие примеры дополнительно иллюстрируют настоящее изобретение, однако, разумеется, данные примеры не следует подразумевать как ограничивающие объем настоящего изобретения каким-либо способом.

Пример 1.

В данном примере продемонстрирована подготовка, инокуляция и ферментация в четырех биореакторах (реакторы 1-4).

В биореактор объемом 2 л вносили следующие компоненты для получения рабочего объема 1,5 л: 1450 мл H₂O, 37,5 мл 1 М KCl, 3 мл 1 М NaCl, 3 мл 1 М MgCl₂, 3 мл 1 М CaCl₂, 0,6 мл 85% H₃PO₄, 1,5 мл резазурина (2 г/л), 7,5 мл раствора микроэлементов-металлов и 30 мл исходного раствора витамина B.

Среда	Концентрация (мм/л)	
MgCl ₂ 6 H ₂ O	2	
NaCl	2	
CaCl ₂ 6 H ₂ O	2	
KCl	25	
85% H ₃ PO ₄	0,375 мл	
Раствор микроэлементов-металлов	5 мл (1x)	
Раствор витамина B	20 мл (2x)	
Раствор микроэлементов-металлов	Конечная концентрация в среде (мкмоль/л) 1x	Концентрация (мм/л) в 200 x исходном растворе
FeCl ₂ 4 H ₂ O	100	20
CoCl ₂ 6 H ₂ O	5	1
ZnCl ₂	5	1
H ₃ BO ₃	2	0,4
MnCl ₂ 4 H ₂ O	2	0,4
Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O	2	0,4
NiCl ₂ 6 H ₂ O	2	0,4
Na ₂ WO ₄ 2 H ₂ O	2	0,4
Na ₂ SeO ₃	2	0,4

Исходный раствор витамина В	Конечная концентрация в среде (мг/л) 2х	Концентрация (мг/л) в 100 х исходном растворе
Тиамин гидрохлорид (В1)	1	50
Рибофлавин (В2)	1	50
Никотиновая кислота (В3)	1	50
Пантотеновая кислота (В5)	1	50
Пиридоксин гидрохлорид (В6)	0,2	10
Биотин (В7)	0,4	20
Фолиевая кислота (В9)	0,2	10
4-аминобензойная кислота (ПАВА или В10)	1	50
Цианокобаламин (В12)	1	50
Липоевая кислота (тиоктовая кислота)	1	50

Перемешивание включали при 300 об./мин., и реактор нагревали до температуры 37°C. N₂ барботировали со скоростью 200 мл/мин, в течение по меньшей мере 1 ч. Затем входящий газ заменяли на 50 мл/мин. RMG при перемешивании 300 об./мин. Добавление Na₂S по каплям начинали со скоростью 0,3 мл/ч. ОВП (окислительно-восстановительный потенциал) корректировали до значения от -150 мВ до -250 мВ. Cr (II) использовали для корректировки ОВП до требуемой величины для поддержания значения в пределах установленного диапазона. NH₄OH (5 М) использовали для корректировки основности.

Затем в реактор инокулировали 200 мл активно растущей культуры *Clostridium autoethanogenum*. Культура содержала штамм DSMZ23693 *Clostridium autoethanogenum*.

После этого в реакторах 1-4 проводили ферментацию, как описано ниже. Приведенные значения являются приблизительными, допускающими отклонение ~ +/-0,5% между результатами измерений методом ГХ (газовой хроматографии).

Реактор 1

День	Примечания	Газ
0	Состав подаваемого газа при начале работы	56,5% H ₂ , 4,7% N ₂ , 7,63% CO и 30,92% CO ₂
2,0	Водород в подаваемом газе заменяли азотом	1,1% H ₂ , 72,6% N ₂ , 18,1% CO и 6,0% CO ₂
7,01	Азот в подаваемом газе снова заменяли водородом	68,4% H ₂ , 11,5% N ₂ , 21,1% CO и 6,9% CO ₂
15	Скорость нагнетания среды увеличивали до 2,4 RPM; подаваемый газ корректировали для замены газом с прокатного завода	59,8% H ₂ , 12,1% N ₂ , 18,2% CO и 13,7% CO ₂
21	Содержание CO уменьшали до целевого значения 10%	59,6% H ₂ , 20,6% N ₂ , 10,7% CO и 14,1% CO ₂
27	Содержание CO уменьшали до целевого значения 7%	48,1% H ₂ , 23,8% N ₂ , 7,6% CO и 16,8% CO ₂

На фиг. 1 представлено количество CO, CO₂ и H₂, потребленное культурой в реакторе 1.

Реактор 2

День	Примечания	Газ
0	Состав подаваемого газа при начале работы: RMG	3,3% H ₂ , 27,2% N ₂ , 48,8% CO и 15,1% CO ₂
5,2	Смесь с высоким содержанием водорода	69,8% H ₂ , 9,9% N ₂ , 18,6% CO и 6,0% CO ₂
8,3		71,3% H ₂ , 3,4% N ₂ , 6,1% CO и 20,7% CO ₂
12,3		44,4% H ₂ , 33,3% N ₂ , 4,75% CO и 16,5% CO ₂
19,2	Подаваемый газ заменяли газом с прокатного завода, нагнетание среды увеличивали до 30% и скорость поступления фильтрата уменьшали до 0,7 мл/мин.; скорость подачи газа увеличивали в два раза со 100 до 200 мл/мин.	3,2% H ₂ , 26,5% N ₂ , 50,6% CO и 15,3% CO ₂
22,4	Скорость подачи газа уменьшали, состав газа изменяли так, чтобы газ содержал H ₂ и CO в соотношении 4:1	52,2% H ₂ , 7,3% N ₂ , 14,4% CO, 23,6% CO ₂
27,2	Водород в подаваемом газе заменяли азотом	0,9% H ₂ , 56,8% N ₂ , 13,9% CO и 22,2% CO ₂

29,04	Подаваемый газ снова заменяли смесью газа с прокатного завода	52,0% H ₂ , 3,2% N ₂ , 18,6% CO и 25,7% CO ₂
29,9	Соотношение H ₂ :CO на входе незначительно корректировали	54,6% H ₂ , 2,8% N ₂ , 16,1% CO и 25,9% CO ₂
33,0	Водород заменяли азотом	0,36% H ₂ , 52,95% N ₂ , 16,1% CO и 23,8% CO ₂

На фиг. 2 представлено количество CO, CO₂ и H₂, потребленное культурой в реакторе 2.

Реактор 3

День	Примечания	Газ
0	Состав подаваемого газа при начале работы: RMG	3,12% H ₂ , 26,6% N ₂ , 50,5% CO и 15,13% CO ₂
0,18		56,6% H ₂ , 2,54% N ₂ , 19,5% CO, 22,3% CO ₂
6,0	Водород заменяли азотом	0,28% H ₂ , 55,5% N ₂ , 18,6% CO и 20,3% CO ₂
10,9	Азот снова заменяли H ₂	57,3% H ₂ , 2,96% N ₂ , 19,5% CO и 22,2% CO ₂
17,2		68,1% H ₂ , 2,82% N ₂ , 19,1% CO и 14,4% CO ₂
19,1	Газ с прокатного завода в подаваемом газе заменяли смесью полностью синтетического газа	59,9% H ₂ , 10,3% N ₂ , 18,9% CO и 12,3% CO ₂
25	Состав подаваемого газа изменяли до целевого содержания CO 10%	50,7% H ₂ , 20,6% N ₂ , 9,9% CO и 15,8% CO ₂
31,2	Состав подаваемого газа изменяли до целевого содержания CO 7%	49,8% H ₂ , 23,4% N ₂ , 7,1% CO и 15,6% CO ₂
40,1		56,7% H ₂ , 4,8% N ₂ , 19,3% CO и 14,9% CO ₂

На фиг. 3 представлено количество CO, CO₂ и H₂, потребленное культурой в реакторе 3.

Реактор 4

День	Примечания	Газ
0	Состав подаваемого газа при начале работы	55,9% H ₂ , 6,6% N ₂ , 23,2% CO и 8,9% CO ₂
1,1	Культивирование непрерывной культуры начинали со степени разбавления, составляющей 1,18 объема реактора в день	
5,2	Смесь газа корректировали	59,5% H ₂ , 7,2% N ₂ , 17,5% CO и 10,2% CO ₂
7,1	Степень разбавления	
	уменьшали до 0,6 объема реактора в день	
7,94	Подачу среды изменяли для получения 1/10 от стандартного количества молибдена	
13,2	Концентрацию молибдена снова возвращали к нормальной	
15,5	Смесь газа корректировали	51,7% H ₂ , 3,1% N ₂ , 20,2% CO и 21,6% CO ₂
19	Начинали рециркуляцию клеток с D _{убыл.} , составляющей 0,06 объема реактора в день	
20	Рециркуляцию клеток уменьшали до D _{убыл.} , составляющей 0,15 объема реактора в день	

На фиг. 4 представлено количество CO, CO₂ и H₂, потребленное культурой в реакторе 4.

Во всех четырех реакторах было продемонстрировано потребление CO₂, когда состав подаваемого газа был изменен так, чтобы газ содержал избыток водорода. В реакторе 3 количество потребленного CO₂ превышало количество потребленного CO после уменьшения объема CO в подаваемом газе. Данный факт свидетельствует, что CO₂ утилизовался в качестве первичного источника углерода, когда в суб-

страте присутствовал избыток H_2 .

Пример 2.

В данном примере продемонстрировано, что H_2 вступает в реакцию с CO_2 в широком диапазоне.

Потребление H_2 , CO и CO_2 культурами *Clostridium autoethanogenum* измеряли с применением стандартных способов. В частности, скорости потока газов на входе и выходе из реактора измеряли с применением регулятора массового расхода, и составы газов на входе и выходе из реактора измеряли методом газовой хроматографии (ГХ). Скорость потребления H_2 , CO и CO_2 , выраженную в единицах ммоль/л бульона/день, рассчитывали, исходя из потока выходящего газа. N_2 не потреблялся культурой, вследствие чего содержание N_2 во входящем газе было эквивалентно содержанию N_2 в выходящем газе. Культура может потреблять CO_2 , присутствующий во входящем (подаваемом) газе, и/или CO_2 , образованный культурой.

На фиг. 5 показано, что CO_2 вступал в реакцию с H_2 в заданном соотношении, и что культура потребляла не только CO_2 , образованный в результате реакции с CO , но также CO_2 , присутствующий в подаваемом газе, поскольку был доступен H_2 . На фиг. 5 продемонстрировано, что было достигнуто чистое потребление CO_2 . Значения по оси "y" на фиг. 5 рассчитывали посредством деления чистого потребления (отрицательное число) или продукции (положительное число) CO_2 на потребление CO (отрицательное число) и преобразования дроби в значение в процентах. Значения по оси "x" на фиг. 5 рассчитывали в виде дробного соотношения скорости потребления H_2 к скорости потребления CO .

Пример 3.

В данном примере продемонстрировано, что увеличение процентного содержания H_2 в газообразном субстрате увеличивает соотношение этанол: 2,3-бутандиол (БДО), которые образуются ферментационной культурой.

На фиг. 6 представлены метаболические продукты ферментационной культуры *Clostridium autoethanogenum*. В день 20 содержание H_2 в подаваемом газе увеличивали с 5% до 34%, и содержание CO в подаваемом газе уменьшали с 26% до 20%. Образование БДО уменьшалось с 4,3 г/л до 0,9 г/л, и соотношение этанол: БДО увеличивалось. Утилизация H_2 увеличивалась с 15% до 58%. Биомасса уменьшалась с $D_{убыли}$, составляющей 0,7.

H_2 в подаваемом газе может потребляться в большей степени (>50%), когда утилизация CO является высокой, т.е. когда содержание растворенного CO является низким. С применением баланса АТФ было спрогнозировано, что скорость роста клеток будет более медленной, когда H_2 является косубстратом наравне с CO . Было установлено, что скорость образования БДО уменьшалась как непосредственный результат зависимости данного параметра от концентрации растворенного CO_2 в бульоне, и что содержание растворенного CO_2 в бульоне было линейно связано с парциальным давлением CO_2 (или линейно связано с концентрацией CO_2 на выходе при фиксированном атмосферном рабочем давлении), так что скорость образования БДО была обратно пропорциональна потреблению CO_2 . $D_{убыли}$, время пребывания бактерий в реакторе, можно откорректировать, чтобы поддерживать концентрацию бактерий в реакторе на оптимальном значении. При потреблении большего количества H_2 $D_{убыли}$ можно уменьшить посредством нагнетания большего количества бульона через клеточную мембрану.

Пример 4.

В данном примере продемонстрировано, что соотношение вступивших в реакцию H_2/CO влияет на образование продукта. В частности, в данном примере продемонстрировано, что количество биомассы и БДО уменьшается при увеличении соотношения $H_2:CO$ в подаваемом газе.

На фиг. 7 представлены точки измерений для серий экспериментов, аналогичных эксперименту, описанному в примере 3. Ось "y" представляет собой соотношение скорости преобразования углерода в биомассу и БДО к скорости потребления H_2 и CO . Если бы на образование продукта не влияло соотношение потребления H_2/CO , тогда линия тренда не уменьшалась бы с увеличением вступившего в реакцию H_2/CO (т.е. наблюдалась бы горизонтальная линия тренда).

Все ссылки, включая публикации, заявки на патент и патенты, упомянутые в настоящей заявке, включены в настоящую заявку посредством ссылки в той же степени, как если бы каждый источник был отдельно и конкретно указан как включенный посредством ссылки и изложен во всей своей полноте в настоящей заявке. Ссылка на любой предшествующий уровень техники в данной спецификации не является признанием того, что данный предшествующий уровень техники образует часть всеобщего обобщенного знания в данной области в стране, и данную ссылку не следует рассматривать в качестве такого признания.

Термины, используемые в единственном числе в контексте описания настоящего изобретения (в особенности в контексте прилагаемой формулы изобретения), следует трактовать как охватывающие единственное, а также множественное число, если в настоящей заявке не указано обратное или если обратное однозначно не противоречит контексту. Термины "содержащий", "имеющий" и "включающий" следует истолковывать как неограничивающие термины (т.е. которые означают "включая, но не ограничиваясь указанными"), если не указано обратное. Перечисление диапазонов значений в настоящей заявке выступает исключительно в качестве сокращенного способа индивидуального обозначения каждого отдельного значения, находящегося в пределах диапазона, если в настоящей заявке не указано обратное, и

каждое отдельное значение включено в данную спецификацию, как если бы оно было отдельно приведено в настоящей заявке. Все способы, описанные в настоящей заявке, можно осуществить в любом подходящем порядке, если в настоящей заявке не указано обратное или если обратное однозначно не противоречит контексту. Использование любого и всех примеров или типичных формулировок (например, "такие как"), приведенных в настоящей заявке, предназначено исключительно для лучшего пояснения настоящего изобретения и не создает ограничения объема настоящего изобретения, если не заявлено обратное. Ни одну из формулировок в данной спецификации не следует рассматривать как признание любого не заявленного элемента важным для реализации настоящего изобретения на практике. 81 Предпочтительные варианты реализации настоящего изобретения описаны в настоящей заявке, включая наилучшие способы, известные авторам настоящего изобретения, для осуществления настоящего изобретения. Варианты данных предпочтительных вариантов реализации могут быть очевидны специалисту со средними знаниями в данной области техники после прочтения вышеизложенного описания. Авторы настоящего изобретения ожидают, что специалисты в данной области техники при необходимости будут применять такие варианты, и авторы настоящего изобретения предполагают, что настоящее изобретение будет реализовано на практике иным способом, чем конкретно описано в настоящей заявке. Соответственно, настоящее изобретение включает все модификации и эквиваленты объекта, приведенного в прилагаемой формуле изобретения, в соответствии с действующим законодательством. Более того, в настоящем изобретении охватываются любые комбинации вышеописанных элементов во всех возможных их вариантах, если в настоящей заявке не указано обратное или если обратное однозначно не противоречит контексту.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ улучшения улавливания углерода при ферментации газа, включающий подготовку газообразного субстрата, содержащего CO, CO₂ и H₂, подачу указанного субстрата в бактериальную культуру в жидкой питательной среде и ферментацию указанного газообразного субстрата, причем по меньшей мере часть CO₂ из газообразного субстрата преобразуется культурой в один или более спиртов и/или кислот, где в указанном способе:

- а) соотношение H₂:CO составляет по меньшей мере 3:1;
- б) соотношение CO₂:CO составляет от 1,5:1 до 4:1;
- в) количество CO₂, потребленного указанной культурой, превышает или равно количеству CO₂, образованному культурой;
- г) соотношение специфического поглощения указанной культурой H₂:CO составляет по меньшей мере 1,4:1 и
- д) указанные бактерии включают один или более из карбоксидотрофных Clostridium, Moorella, Oxybacter, Peptostreptococcus, Acetobacterium, Eubacterium или Butyrivacterium.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанные бактерии включают вид Clostridium autoethanogenum или Clostridium ljungdahlii.

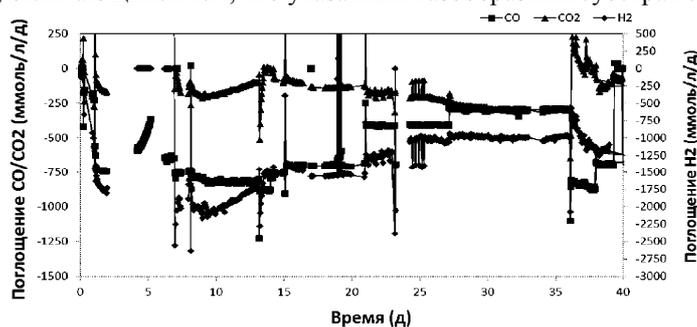
3. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный способ дополнительно включает извлечение одного или более продуктов.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что поглощение CO₂ указанной культурой составляет по меньшей мере 500 ммоль/л/день CO₂.

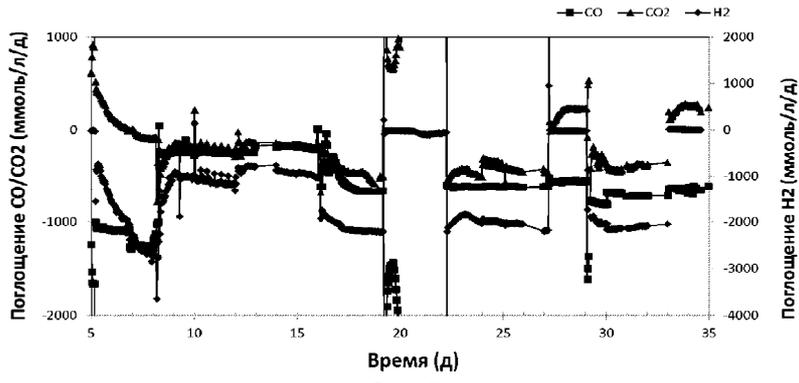
5. Способ по п.1, отличающийся тем, что количество CO₂, покидающее реактор, по меньшей мере на 5% ниже количества CO₂, поступающего в реактор.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что один или более спиртов и/или кислот выбраны из группы, состоящей из этанола, уксусной кислоты (или ацетата), 2,3-бутандиола, бутанола, изопропанола, лактата, сукцината, метилэтилкетона (МЕК), пропандиола, 2-пропанола, ацетоина, изобутанола, цитратмалата, бутадиена, полимолочной кислоты, изобутилена, 3-гидроксипропионата (ЗНР), ацетона и жирных кислот.

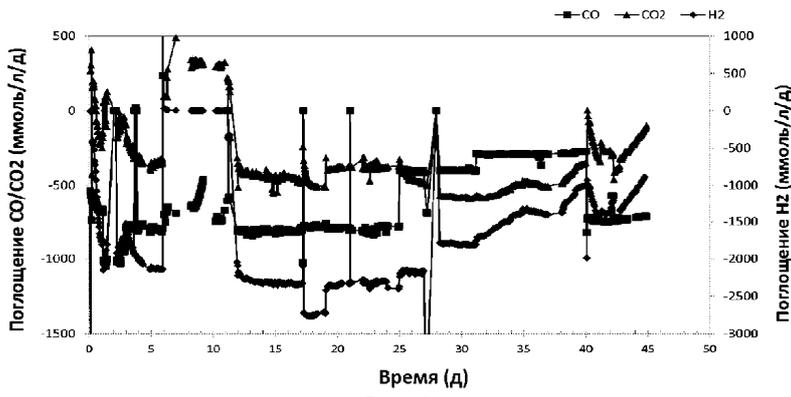
7. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный газообразный субстрат содержит 30-90% H₂.



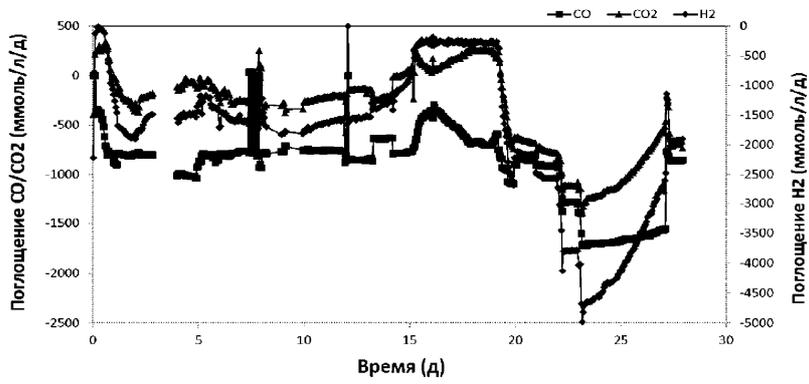
Фиг. 1



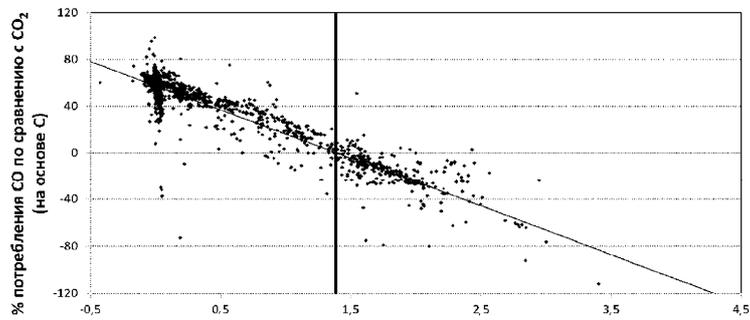
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5

