

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035153**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.05.06

(21) Номер заявки
201790864

(22) Дата подачи заявки
2015.10.22

(51) Int. Cl. **C12P 7/06** (2006.01)
C12P 1/00 (2006.01)
C12M 3/00 (2006.01)

(54) МНОГОСТАДИЙНЫЕ БИОРЕАКТОРНЫЕ ПРОЦЕССЫ

(31) **62/067,379; 62/067,405**

(32) **2014.10.22**

(33) **US**

(43) **2017.09.29**

(86) **PCT/US2015/057025**

(87) **WO 2016/065217 2016.04.28**

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

(72) Изобретатель:
**Треветик Саймон Ричард, Бромли
Джейсон Карл, Уотерс Гай Уильям,
Кёпке Михель, Тран Лоан Пхуонг,
Енсен Овергаард Расмус (US)**

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

(56) **US-A1-20100105115
US-A1-20110244538
US-A1-20120009638
US-A1-20140273115
US-A1-20090215139
US-A1-20120052541**

(57) Описаны многостадийные биологические процессы и системы для превращения источника C1-углерода в желательные товарные продукты. Процессы включают разделение газообразного C1-содержащего субстрата, по параллельной схеме, между множеством биореакторных стадий. Жидкие продукты последовательно подаются, по последовательной схеме, из первой биореакторной стадии в последующие биореакторные стадии. Процесс может быть упрощен путем устранения потребности в сепарации и рециркуляции микроорганизма на каждой стадии. Кроме того, общий массоперенос пар-жидкость для комбинации стадий является очень благоприятным, приводя к высокой производительности по товарному продукту со сравнительно низкой производительностью по побочному продукту-метаболиту.

035153 B1

035153

B1

Область техники

Аспекты изобретения относятся к процессам микробиологической ферментации C1-содержащего субстрата в товарные продукты с использованием множества биореакторных стадий. В репрезентативных процессах содержащий C1 субстрат разделен между стадиями для параллельной обработки газовой фазы, в то время как жидкие продукты переходят из одной стадии на следующую, дальнейшую стадию для последовательной обработки жидкой фазы.

Уровень техники

Озабоченность состоянием окружающей среды в связи с эмиссией парниковых газов (GHG) (от сжигания) ископаемого топлива привела к увеличению важности возобновляемых источников энергии. В результате, этанол быстро становится важным жидким топливом для транспортных средств с повышенным содержанием водорода во всем мире. В обозримом будущем ожидается продолжающийся рост топливной промышленности этанола на мировом рынке, основанный на повышенном внимании к производству этанола в Европе, Японии и США, а также нескольких развивающихся странах. Например, в США, этанол используется для производства E10, смеси 10% этанола с бензином. В смесях E10 этанольный компонент выступает в роли окисляющего агента, повышая эффективность сгорания и снижая образование веществ, вызывающих загрязнение воздуха. В Бразилии этанол покрывает около 30% спроса на топливо для транспортных средств как в виде окисляющего агента, смешанного с бензином, так и в чистом виде как отдельное топливо. Кроме того, Европейский союз (ЕС) установил плановые показатели для всех стран-членов по потреблению топлива для транспортных средств, получаемого из возобновляемых источников, такого как этанол, производимый из биомассы.

Подавляющую часть топливного этанола получают с помощью традиционных процессов дрожжевой ферментации, использующих углеводы из сельскохозяйственных культур, такие как сахароза из сахарного тростника или крахмал из зерновых, в качестве основного источника углерода. Однако на стоимость таких видов углеводного сырья влияет их рыночная цена в условиях конкуренции с другими областями применения, а именно, в качестве источников питания для людей и животных. Кроме того, выращивание культур, продуцирующих крахмал или сахарозу для производства этанола, экономически не оправдано во всех географических регионах, поскольку является функцией как стоимости местных земель, так и климата. По этим причинам особый интерес представляет разработка технологий по превращению более дешевых и/или более обильных углеродных ресурсов в топливный этанол. В этом отношении окись углерода (CO) представляет собой важный высокоэнергетический побочный продукт неполного сгорания органических материалов, таких как уголь, нефть и продукты нефтепереработки. Отходящие газы с высоким содержанием CO образуются в различных промышленных процессах. Например, сообщалось, что сталелитейная промышленность в Австралии производит и выбрасывает в атмосферу более 500000 метрических тонн CO в год.

Совсем недавно альтернативные процессы производства этанола из CO в промышленном масштабе с использованием микроорганизмов (бактерий) стали предметом коммерческого интереса и инвестиций. Способность культур микроорганизмов к росту с CO в качестве единственного источника углерода была впервые обнаружена в 1903 г. Позднее было определено, что эта характеристика основана на использовании организмом биохимического пути аутоτροφного роста ацетилкофермента А (ацетил-КоА) (также известного как путь Вуда-Льонгдалля (Woods-Ljungdahl) и путь окиси углерода-дегидрогеназы/ацетил-КоА-синтазы (CODH/ACS)). С тех пор было показано, что большое число анаэробных организмов, включая карбоксидотрофные, фотосинтезирующие, метаногенные и ацетогенные организмы, метаболизируют CO. Известно, что анаэробные бактерии, такие как принадлежащие к роду *Clostridium*, продуцируют этанол из CO, CO₂ и H₂ по биохимическому пути ацетил-КоА. Например, разные штаммы *Clostridium ljungdahlii*, продуцирующие этанол из газов, описаны в WO 00/68407; EP 1117309 A1; US 5173429; US 5593886; US 6368819; WO 98/00558 и WO 02/08438. Также известно, что бактерия *Clostridium autoethanogenum* sp продуцирует этанол из газов (Abrini et al., Archives of Microbiology, 161:345-351 (1994)).

Поскольку каждый фермент организма промотирует свое специфическое биологическое превращение, по существу, с полной селективностью, микробные пути синтеза могут обеспечивать более высокий выход с меньшими энергозатратами по сравнению с обычными каталитическими путями. Например, могут быть снижены потребности в энергии для отделения побочных продуктов, которые образуются в результате неселективных побочных реакций, от требуемых продуктов. Кроме того, уменьшаются проблемы, связанные с отравлением катализаторов вследствие примесей в реакционной среде. Несмотря на такие очевидные преимущества, однако, специалисты в данной области техники должны решить определенные проблемы, ассоциированные в настоящее время с микробным синтезом этанола из CO, особенно с учетом обеспечения производительности, конкурентной с другими технологиями. При использовании CO в качестве источника углерода анаэробные бактерии, описанные выше, продуцируют этанол путем ферментации, но они также продуцируют по меньшей мере один метаболит, например CO₂, метан, н-бутанол и/или уксусную кислоту. Образование любого из этих метаболитов может значительно повлиять на производительность и общую экономическую эффективность данного процесса, поскольку доступный углерод теряется на метаболит(ы) и эффективность производства желательного товарного про-

дукта снижается. Кроме того, если метаболит (например, уксусная кислота) сам по себе не имеет ценности во время и в месте протекания процесса микробиологической ферментации, он может создавать проблему утилизации отходов. Разные предложения, касающиеся решения проблем, связанных с образованием других продуктов кроме желательного товарного продукта при анаэробной ферментации СО-содержащих газов с целью получения этанола обсуждаются в WO 2007/117157, WO 2008/115080 и WO 2009/022925.

Производительность по этанолу, являющаяся ключевым фактором, определяющим экономическую привлекательность данного процесса ферментации, очень сильно зависит от поддержания надлежащих условий для роста бактерий. Например, из WO 2010/093262 известно, что должна быть обеспечена подача СО-содержащего субстрата в культуру микроорганизмов со скоростью, приводящей к оптимальному росту микроорганизмов и/или продуцированию желательного метаболита. При подаче недостаточного количества субстрата рост микробов замедляется и выход продуктов ферментации сдвигается в сторону уксусной кислоты за счет этанола. Подача избытка субстрата может привести к плохому росту бактерий и/или гибели клеток. Дополнительная информация, касающаяся соотношений между рабочими параметрами таких процессов, приведена в WO 2011/002318.

В технологии биологических процессов производства этанола из СО, и особенно потоков СО-содержащих отходов, таких как газообразные отходы сталелитейного производства, постоянно ведется поиск решений, позволяющих улучшить экономику процесса и, таким образом, конкурентоспособность отрасли. В соответствии с обычной практикой выделение и рециркуляция микроорганизмов, используемых для осуществления требуемого превращения, считаются существенными для достижения приемлемой производительности в непрерывных процессах. Известны эффективные для этих целей системы мембранного разделения, расположенные внутри или вне биореактора. Однако мембраны и ассоциированные с ними корпуса, клапаны, контрольно-измерительная аппаратура и средства управления значительно увеличивают общие капитальные и эксплуатационные затраты. Замена мембран и варианты "без-разборной очистки" (CIP), будь то в ручном или автоматическом режиме, обычно требуют или значительных количеств рабочего времени оператора, химикатов и нагрева (в случае работы в ручном режиме), или неприемлемо высоких капитальных затрат (в случае работы в автоматическом режиме). Например, некоторые системы биореакторов требуют использования дорогих растворов ферментов для очистки мембран для рециркуляции клеток, поскольку простая очистка щелочным (NaOH) раствором оказалась неэффективной на практике.

В общем, важным моментом в процессах биологического превращения СО является поиск усовершенствований, которые бы увеличивали технологическую гибкость, улучшали производительность по этанолу и качество продукта и/или более эффективно утилизировали СО. Достижение даже небольшого прогресса в любой из этих областей, без существенного влияния на капитальные и эксплуатационные затраты, может приводить к значительным последствиям при работе в промышленном масштабе.

Сущность изобретения

Аспекты изобретения относятся к усовершенствованиям биологических процессов и ассоциированных с ними систем для получения полезных товарных продуктов, таких как этанол, образующихся посредством метаболических путей С1-фиксирующего микроорганизма, утилизирующего в качестве питательного вещества источник С1-углерода из С1-содержащего субстрата, такого как промышленные отходящие газы. Типичные процессы и системы предусматривают альтернативные типы работы с использованием множества стадий со взаимосвязанными биореакторами и, в частности, работы, позволяющие избежать затрат и сложности, связанных с выделением карбоксидотрофных микроорганизмов для рециркуляции по меньшей мере в одну из стадий (например, по меньшей мере в один биореактор, используемый на стадиях), обычно в большинство стадий (например, во все стадии, за исключением первой стадии и/или последней или заключительной стадии), и часто во все стадии, используемые в общем процессе. Неожиданно, было продемонстрировано, что использование такой системы и особенно системы, в которой С1-содержащий субстрат подается параллельно во множество биореакторов, в то время как жидкие продукты подаются последовательно, приводит к высокой общей производительности по этанолу с соответственно низкой производительностью по нежелательным метаболитам, таким как уксусная кислота. Также достигаются другие преимущества, включая эффективную общую утилизацию источника С1 углерода, а также улучшенную эксплуатационную гибкость и контроль.

Варианты реализации изобретения касаются многостадийных процессов превращения источника С1-углерода в товарный продукт. Типичные процессы включают подачу газообразного С1-содержащего субстрата, параллельно, в первую биореакторную стадию и, по меньшей мере, вторую биореакторную стадию процесса, например, путем разделения содержащего С1 субстрата между биореакторными стадиями таким образом, чтобы состав газа, поступающего на каждую стадию, был одинаковым или по существу одинаковым и соответствовал содержащему С1 субстрату, подаваемому в процесс. Такие процессы дополнительно включают подачу по меньшей мере части жидкого продукта первой стадии, последовательно, из первой биореакторной стадии во вторую биореакторную стадию. Таким образом, состав жидкого продукта, поступающего на каждую стадию, или, по меньшей мере, его не содержащей биомассы жидкой фракции (например, фракции жидкой питательной среды, не содержащей С1-фиксирующий

микроорганизм) может соответствовать продукту, получаемому на предыдущей, предшествующей стадии. Таким образом, состав жидкого продукта, получаемого на каждой стадии, в отличие от состава газа обычно не будет одинаковым и может, действительно, значительно изменяться по показателям концентраций желательного товарного продукта и других метаболитов. Например, концентрация желательного товарного продукта может постепенно возрастать на протяжении, по меньшей мере, некоторых и предпочтительно всех стадий в направлении от предшествующих к последовательным последующим стадиям. Альтернативно или в комбинации с этим, концентрации других метаболитов могут постепенно снижаться на протяжении некоторых или всех таких стадий. Варианты реализации изобретения касаются многостадийных процессов превращения источника C1-углерода из C1-содержащего субстрата в желательный товарный продукт, причем многостадийный процесс увеличивает специфичность системы по отношению к желательному товарному продукту.

Кроме того, предпочтительно избегают выделения и рециркулирования C1-фиксирующего микроорганизма по меньшей мере на одной из биореакторных стадий в соответствии с типичными процессами, описанными выше. Этим они полностью отличаются от обычных непрерывных "хемостатных" биологических процессов, которые, конечно, требуют рециркуляции клеток для обеспечения приемлемых уровней производительности. Соответственно, жидкий продукт, поступающий по меньшей мере на одну из стадий (например, жидкий продукт первой стадии, который подается на вторую стадию), может содержать C1-фиксирующий микроорганизм, используемый на предыдущей (например, первой), предшествующей биореакторной стадии, который, например, не был выделен или отфильтрован на этой предшествующей стадии. Этот жидкий продукт обычно дополнительно содержит культуральную среду, желательный товарный продукт и другие метаболиты, поступающие с предшествующей стадии. Таким образом, в соответствии с предпочтительными вариантами реализации жидкий продукт по меньшей мере одной биореакторной стадии (например, жидкий продукт первой стадии) подается на последующую стадию, без увеличения затрат и сложностей, связанных с (1) выделением C1-фиксирующего микроорганизма (например, с использованием мембранного разделения) с последующей (2) рециркуляцией выделенного микроорганизма на ту же самую стадию, с которой он был отобран. В предпочтительных вариантах реализации процессы проводятся без какого-либо выделения C1-фиксирующего микроорганизма из и/или рециркуляции на любую из биореакторных стадий, хотя жидкий продукт, отобранный с заключительной стадии, нормально подвергают разделению для получения, таким образом, готового продукта (продуктов) в не содержащей клеток жидкости. В соответствии с некоторыми вариантами реализации, таким образом, культуральная среда C1-фиксирующего микроорганизма и/или клетки может быть отделена от жидкого продукта заключительной стадии и возвращена в процесс (например, на одну или несколько из биореакторных стадий).

Другие варианты реализации изобретения касаются многостадийных систем, состоящих из множества биореакторов. Биореакторы имеют впускной патрубок газа на первом конце и выпускной патрубок газа на втором конце напротив первого конца таким образом, чтобы впускной и выпускной патрубки газа позволяли осуществлять подачу газообразного C1-содержащего субстрата во множество биореакторов и удаление газообразных продуктов, включая непрореагировавший источник C1-углерода, по параллельной схеме. Биореакторы, за исключением первого биореактора и последнего биореактора (т.е., не крайнего с впускного конца биореактора, поскольку в него не поступает жидкий продукт из другого биореактора, или крайнего с выпускного конца биореактора, потому что жидкий продукт, отбираемый из этого биореактора, не подается в другой биореактор), имеют отдельные впускные и выпускные патрубки жидкости, для приема жидкого продукта, включая C1-фиксирующий микроорганизм (биомассу), из ближайшего предшествующего биореактора и перемещения жидкого продукта, включая C1-фиксирующий микроорганизм (клетки или биомассу), в соседний последующий биореактор, по последовательной схеме.

В общем, как впускные, так и выпускные патрубки жидкости расположены возле первых концов (т.е., концов, в которые подается газообразный C1-содержащий субстрат) таким образом, чтобы подача и отбор жидкого продукта могли производиться возле дна биореакторов, например, в пределах нижних 25% или нижних 10% от длины реактора. Выпускной патрубок жидкого продукта, в который должен поступать готовый жидкий продукт из последнего биореактора, аналогично расположен вблизи первого конца последнего биореактора. При определении положения различных деталей по отношению к "длине реактора" эта длина относится к секции, в которой находится содержимое реактора (смесь реагентов и продуктов реакции), которая обычно рассматривается как "объем реактора" или "рабочий объем реактора", и эта длина не включает технологические линии (например, подводящие линии сырья или отводящие линии продукта), которые могут выступать выше или ниже объема реактора, или секции колонны или другого сосуда, в котором размещен реактор, но в которых не размещается какое-либо содержимое реактора. Например, в случае цилиндрического реактора длина реактора относится к длине оси цилиндра. "Нижние 10%" длины реактора относятся к диапазону высот от дна реактора вверх на 10% длины реактора. "Верхние 10%" длины реактора относятся к диапазону высот от верхушки реактора вниз на 10% длины реактора. Аналогично, "нижние 1-10%" длины реактора относятся к диапазону высот, начиная с высоты, соответствующей 1% длины реактора над дном реактора, вверх до высоты, составляющей 10% длины реактора над дном реактора. Верхние "25-45%" длины реактора относятся к диапазону высот, на-

чина от высоты, соответствующей 25% длины реактора от верхушки реактора, вниз до высоты, составляющей 45% длины реактора от верхушки реактора.

Дополнительные варианты реализации изобретения касаются многостадийных биологических процессов превращения C1 в желательный товарный продукт. Процессы включают (i) разделение газообразного C1-содержащего субстрата, по параллельной схеме, между множеством биореакторных стадий многостадийного процесса и (ii) последовательную подачу жидких продуктов, содержащих C1-фиксирующий микроорганизм, по последовательной схеме, с первой биореакторной стадии в последующие биореакторные стадии. На заключительной стадии жидкий продукт заключительной стадии отбирается из последней биореакторной стадии. В определенных вариантах реализации жидкий продукт заключительной стадии отбирают из не содержащей биомассы жидкой фракции (например, жидкой фракции, не содержащей C1-фиксирующий микроорганизм/биомассу).

В конкретных вариантах реализации изобретение касается многостадийного биологического процесса превращения окиси углерода (CO) в этанол. Процесс включает (i) разделение CO-содержащего субстрата параллельно между множеством стадий многостадийного процесса, (ii) последовательную подачу жидких продуктов, содержащих карбоксидотрофный микроорганизм, последовательно, из первой биореакторной стадии в последующие биореакторные стадии. Жидкий продукт заключительной стадии, отбираемый из последней биореакторной стадии, может содержать по меньшей мере примерно 50 грамм на литр (г/л) этанола и иметь весовое соотношение этанол:уксусная кислота, равное по меньшей мере около 50:1. В определенных вариантах реализации жидкий продукт заключительной стадии отбирают из не содержащей биомассы жидкой фракции. Конкретные процессы могут включать по меньшей мере четыре биореакторные стадии. Такие типичные процессы, ассоциированные с данным режимом работы с параллельной подачей газа/последовательной подачей жидкости, могут предпочтительно обеспечивать высокие уровни производительности с минимальным образованием побочного продукта. В других вариантах реализации изобретение касается многостадийного биологического процесса превращения окиси углерода в 2,3-бутандиол, с пониженной производительностью по этанолу. В определенных вариантах реализации карбоксидотрофный микроорганизм выбирают из группы, состоящей из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ragsdalei* и *Clostridium ljungdahlii*.

В альтернативных вариантах реализации изобретение касается многостадийного биологического процесса превращения окиси углерода (CO) в ростозависимые товарные продукты (например, изопропанол). Процесс включает (i) разделение CO-содержащего субстрата параллельно между множеством стадий многостадийного процесса, (ii) последовательную подачу жидких продуктов, содержащих карбоксидотрофный микроорганизм, последовательно из первой биореакторной стадии в последующие биореакторные стадии. Жидкий продукт заключительной стадии, отбираемый из последней биореакторной стадии или, по меньшей мере, ее не содержащей биомассы жидкой фракции, может содержать по меньшей мере около 10 г/л изопропанола. В определенных вариантах реализации карбоксидотрофный микроорганизм, используемый в процессе продуцирования изопропанола, представляет собой рекомбинантный штамм *Clostridium autoethanogenum*, имеющий по меньшей мере один гетерологичный фермент в пути биосинтеза изопропанола. Использование многостадийного процесса по настоящему изобретению обеспечивает возможность проведения процесса с повышенной производительностью по ростозависимым товарным продуктам по сравнению с традиционными двухреакторными системами для ферментации. В соответствии с одним вариантом реализации изобретения ростозависимые товарные продукты выбирают из группы, состоящей из изопропанола, бутанола, ацетона, 2-оксимасляной кислоты (2-HIBA) и изобутилена.

В общем, как подробнее описано ниже, многостадийные биологические процессы, описанные в данном документе, могут улучшать стабильность операций биопревращения и обеспечивать большую гибкость при регулировании технических характеристик (например, титров товарного продукта и другого метаболита) для достижения на каждой стадии конкретных целевых значений. Даже при более низкой производительности в пересчете на объем реактора по сравнению с обычными процессами сравнительно более простая конструкция и системы управления могут эффективно компенсировать это с экономической точки зрения за счет снижения капитальных и/или эксплуатационных затрат, достигаемых при работе в промышленном масштабе. Кроме того, снижение производительности, в пересчете "на реактор", обеспечивает большую гибкость по показателям размеров биореактора, благодаря чему могут быть использованы относительно более короткие и имеющие большую ширину аппараты, имеющие размеры, более близкие к доступным резервуарам для хранения. Например, биореакторы одной или нескольких стадий (например, по меньшей мере одной из первой и второй биореакторных стадий, по меньшей мере четырех биореакторных стадий или всех биореакторных стадий) могут иметь соотношение длины к ширине (например, диаметру) менее около 15:1 (например, от около 2:1 до около 15:1), такое как менее около 10:1 (например, от около 5:1 до около 10:1). Допускаемое снижение производительности, в свою очередь, позволяет использовать более низкое давление в процессах/системах, описанных в данном документе. Например, биореакторы одной или нескольких стадий (например, по меньшей мере одной из первой и второй биореакторных стадий, по меньшей мере четырех биореакторных стадий, или всех биореакторных стадий) могут работать при манометрическом давлении менее около 500 килопаскаль (кПа) (т.е.,

выше атмосферного давления), например, при манометрическом давлении менее около 200 кПа или даже при манометрическом давлении менее около 100 кПа. Многостадийные процессы и системы, описанные в данном документе, могут также предпочтительно обеспечивать достижение более высокой степени утилизации газа по сравнению с обычными такими процессами, при данном коэффициенте массопередачи.

В многостадийных процессах биореакторные стадии, описанные в данном документе, или некоторая их часть могут представлять собой отдельные секции в единой емкости. Например, такая емкость (которая может быть стандартным промышленным резервуаром, имеющим объем 50000-3000000 л) может включать внутренние конструкции, разделяющие индивидуальные биореакторные стадии и направляющие потоки пара и жидкости, как описано в данном документе. Например, внутренние конструкции могут быть выполнены таким образом, чтобы они направляли потоки газов и жидкостей на стадиях по параллельной и последовательной схемам соответственно. Использование биореакторных стадий внутри емкости может способствовать осуществлению определенных рабочих вариантов реализации, описанных в данном документе, например работу с общим потоком газообразных продуктов, включающим непрореагировавший источник C1-углерода, выходящим из биореакторных стадий. В соответствии с одним вариантом реализации биореакторные стадии внутри емкости могут быть выполнены в виде многоярусной конструкции, причем первая биореакторная стадия является верхней по высоте и последняя биореакторная стадия является нижней по высоте, тем самым используя силу тяжести для облегчения перемещения жидких продуктов по стадиям. Общее число связанных биореакторных стадий, которые могут включать биореакторы, в одной емкости, может изменяться, и в типичных вариантах реализации емкость может содержать от около 4 до около 12 биореакторных стадий. Внутренние конструкции могут включать ассоциированные с ними системы трубопроводов и/или другое оборудование, описанное в данном документе со ссылками на фиг. 1 и 2 (например, впускные отверстия газа и жидкости и их соединительные элементы, распределительные устройства пара и жидкости, стояки, сливные трубки, внешние петли для рециркуляции жидкости, впускные патрубки для жидкой культуральной среды и другие дополнительные элементы и т.д.). Такие внутренние конструкции могут, таким образом, обеспечивать общие каналы подачи жидкости между стадиями для обеспечения желательной конфигурации потоков, включая принудительную подачу, внутреннюю циркуляцию и/или внешнюю циркуляцию с использованием петель для циркуляции, как подробнее описано ниже, тем самым создавая гидродинамические условия, необходимые для достижения высокого массопереноса и перемешивания при заданных скоростях подачи газового потока. Такие емкости могут быть оснащены дополнительными петлями для циркуляции жидкости, внешними по отношению к емкости в целом, например для циркуляции жидкости между биореакторными стадиями, необязательно расположенными рядом друг с другом (т.е., одна непосредственно перед или после другой). В некоторых вариантах реализации общее число биореакторных стадий, необходимых при данном процессе биологического превращения, может превышать число стадий, размещенных внутри емкости, таким образом, чтобы процесс мог использовать две или больше емкостей, одна или обе из которых содержат множество (например, две или больше) биореакторных стадий.

Использование многостадийных биологических процессов, как описано в данном документе, обеспечивает больший контроль за параметрами ферментации и управление технологическим процессом. Каждая из стадий многостадийного процесса может проводиться при разных условиях процесса для обеспечения желательного конечного результата. Например, определенные стадии могут проводиться с целью ускорения роста, а другие стадии могут быть оптимизированы для обеспечения производительности. Использование многостадийных биологических процессов может приводить к лучшим титрам продукта, большей специфичности по отношению к желательным товарным продуктам, улучшенному поглощению газа и большей гибкости по отношению к C1-содержащим субстратам различного состава.

Эти и другие варианты реализации, аспекты и преимущества настоящего изобретения будут понятны из приведенного далее подробного описания.

Краткое описание чертежей

Более полное понимание типичных примеров вариантов реализации настоящего изобретения и их преимуществ можно получить при прочтении следующего описания с учетом сопровождающих фигур, на которых схожие элементы обозначены одинаковыми номерами позиций (например, биореактор 100a на фиг. 1 и биореактор 100 на фиг. 2).

Фиг. 1 изображает типичный процесс с использованием по меньшей мере двух биореакторов, расположенных выше по ходу процесса, и двух биореакторов, расположенных ниже по ходу процесса, с пропущенными для простоты аналогичными промежуточными биореакторами.

Фиг. 2 изображает вид в увеличенном масштабе типичного биореактора, показанного на фиг. 1, и предоставляет дополнительные сведения, касающиеся внутренней конструкции и циркуляции жидкости.

Фиг. 3 представляет собой график, показывающий концентрации этанола и карбоксидотрофного микроорганизма, а также побочных продуктов-метаболитов уксусной кислоты и 2,3-бутандиола, при работе на протяжении периода более 40 дней, в образцах, отобранных из готового жидкого продукта биологического процесса, описанного в данном документе, с использованием шести биореакторных стадий.

Фиг. 4 представляет собой график зависимости измеренной концентрации этанола и побочных продуктов-метаболитов уксусной кислоты и 2,3-бутандиола, в образцах, отобранных из жидких продуктов каждой из шести биореакторных стадий, в день 23 периода работы, составляющего более 40 дней, концентрации готового жидкого продукта для которого представлены на фиг. 3.

Фиг. 5A представляет собой график, изображающий профиль метаболита при ферментации изопропанола.

Фиг. 5B представляет собой график, изображающий показатели производительности по изопропанолу.

Следует понимать, что фиг. 1-5 иллюстрируют описание и/или задействованные принципы. Для облегчения пояснения и понимания технологическая схема и оборудование изображены на фиг. 1 и 2 в упрощенном виде, и эти фигуры необязательно выполнены в масштабе. Детали, включая клапаны, контрольно-измерительную аппаратуру и другое оборудование и системы, не существенные для понимания данного описания, не приводятся. Как будет хорошо понятно квалифицированному специалисту в данной области техники, ознакомленному с данным описанием, способы биологического превращения C1-содержащих субстратов в соответствии с другими вариантами реализации изобретения будут иметь конфигурации и компоненты, определяемые, частично, их конкретным использованием.

Подробное описание

Настоящее изобретение касается процессов получения желательного товарного продукта путем подачи источника C1-углерода в газообразном C1-содержащем субстрате параллельно во множество биореакторных стадий, используемых, в свою очередь, для последовательной переработки жидких продуктов этих стадий. При работе каждый из биореакторов содержит жидкую культуральную среду, содержащую C1-фиксирующий микроорганизм. Помимо желательного товарного продукта, процессы, описанные в данном документе, дополнительно генерируют нежелательные или менее желательные метаболиты. Типичными C1-фиксирующими микроорганизмами являются организмы, принадлежащие к родам *Moorella*, *Clostridia*, *Ruminococcus*, *Acetobacterium*, *Eubacterium*, *Butyrifacterium*, *Oxobacter*, *Methanosarcina*, *Methanosarcina*, и *Desulfotomaculum*. Конкретные примеры микроорганизмов, относящихся к *Clostridia*, включают *C. ljundahlii*, *C. autoethanogenum*, *C. ragsdalei* и *C. beijerinckii*.

Типичные C1-содержащие субстраты включают в общем любой газ, содержащий источник C1-углерода, в котором по меньшей мере один источник C1-углерода, выбранный из группы, состоящей из CO, CO₂ и CH₄, может быть сделан доступным для одного или нескольких штаммов C1-фиксирующих микроорганизмов для роста и/или ферментации. Такие C1-содержащие субстраты предпочтительно не содержат загрязняющих примесей в степени, при которой такие загрязняющие примеси могут оказывать отрицательный эффект на рост C1-фиксирующего микроорганизма (например, одна или несколько загрязняющих примесей не присутствуют в таких концентрациях или количествах, чтобы скорость роста снижалась более чем на 10% при данных условиях, по сравнению со скоростью роста в таких же условиях, но без загрязняющей примеси (примесей)).

Типичные C1-содержащие субстраты, описанные в данном документе, включают в общем любой источник C1-углерода. Источник C1-углерода относится к молекуле, содержащей один атом углерода, которая служит частичным или единственным источником углерода для микроорганизмов по изобретению. Например, источник C1-углерода может включать одно или несколько веществ из CO, CO₂, CH₄. Предпочтительно источник C1-углерода включает что-то одно или оба из CO и CO₂. Субстрат может дополнительно содержать другие не углеродные компоненты, такие как H₂, N₂ или электроны.

C1-содержащий субстрат может включать значительную долю CO, предпочтительно по меньшей мере от около 5 до около 99.5% CO по объему. Такие субстраты часто образуются как отходы промышленных процессов, таких как процессы производства стали или процессы производства продуктов цветной металлургии. Другие процессы, в которых образуются газообразные CO-содержащие субстраты, включают процессы переработки нефти, процессы производства биотоплива (например, процессы пиролиза и процессы гидроконверсии жирных кислот/триглицеридов), процессы газификации угля и биомассы, процессы производства электрической энергии, процессы производства газовой сажи, процессы производства аммиака, процессы производства метанола и процессы производства кокса. Ряд стоков химической промышленности, а также синтез-газы (содержащие CO и H₂), получаемые из различных субстратов, могут аналогично служить потенциальными CO-содержащими субстратами. Конкретные примеры включают стоки производств фосфатов и хроматов. Предпочтительно отходы (например, отходящие газы) таких процессов могут использоваться, как описано в данном документе, для выгодного производства полезных товарных продуктов, таких как этанол.

Субстрат и/или источник C1-углерода может представлять собой или может быть получен из отходов или отходящих газов, образующихся как побочный продукт промышленного процесса или из некоторых других источников, таких как автомобильные выхлопные газы или при газификации биомассы. В определенных вариантах реализации промышленный процесс выбирают из группы, состоящей из производства изделий из черных металлов, такого как сталелитейное производство, производства продуктов из цветных металлов, процессов нефтепереработки, газификации угля, производства электроэнергии, производства газовой сажи, производства аммиака, производства метанола, и производства кокса. В этих

вариантах реализации субстрат и/или источник C1-углерода может улавливаться из промышленного процесса до его выброса в атмосферу с использованием любого удобного способа.

Субстрат и/или источник C1-углерода может представлять собой или может быть получен из синтез-газа, такого как синтез-газ, образующийся в результате газификации угля или остаточных нефтепродуктов, газификации биомассы или лигноцеллюлозного материала, или риформинга природного газа. В другом варианте реализации синтез-газ может быть получен в результате газификации твердых городских отходов или твердых промышленных отходов.

Применительно к субстратам и/или источникам C1-углерода термин "полученный из" относится к субстрату и/или источнику C1-углерода, который каким-то образом подвергается модификации или смешению. Например, субстрат и/или источник C1-углерода может быть обработан с целью добавления или удаления определенных компонентов или может быть смешан с потоками других субстратов и/или источников C1-углерода.

Состав субстрата может оказывать значительное влияние на эффективность и/или затраты реакции. Например, присутствие кислорода (O_2) может снижать эффективность анаэробного процесса ферментации. В зависимости от состава субстрата, может быть желательным проведение обработки, промывки газа или фильтрации субстрата для удаления каких-либо нежелательных примесей, таких как токсины, нежелательные компоненты или частицы пыли, и/или увеличения концентрации желательных компонентов.

Субстрат обычно содержит, по меньшей мере, некоторое количество CO, такое как около 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, или 100 мол.% CO. Субстрат может содержать CO в диапазоне значений, таком как около 20-80, 30-70 или 40-60 мол.% CO. Предпочтительно субстрат содержит около 40-70 мол.% CO (например, газ сталелитейного производства или доменной печи), около 20-30 мол.% CO (например, газ кислородного конвертера) или около 15-45 мол.% CO (например, синтез-газ). В некоторых вариантах реализации субстрат может содержать относительно низкое количество CO, такое как около 1-10 или 1-20 мол.% CO. Микроорганизм по изобретению типично конвертирует в продукт по меньшей мере часть CO субстрата. В некоторых вариантах реализации субстрат не содержит или по существу не содержит CO.

Субстрат может содержать некоторое количество H_2 . Например, субстрат может содержать около 1, 2, 5, 10, 15, 20, или 30 мол.% H_2 . В некоторых вариантах реализации субстрат может содержать относительно высокое количество H_2 , такое как около 60, 70, 80, или 90 мол.% H_2 . В дополнительных вариантах реализации субстрат не содержит или по существу не содержит H_2 .

Субстрат может содержать некоторое количество CO_2 . Например, субстрат может содержать около 1-80 или 1-30 мол.% CO_2 . В некоторых вариантах реализации субстрат может содержать менее около 20, 15, 10, или 5 мол.% CO_2 . В другом варианте реализации субстрат не содержит или по существу не содержит CO_2 .

Хотя субстрат типично является газообразным, он может быть также получен в альтернативных формах. Например, субстрат может быть растворен в жидкости, насыщенной CO-содержащим газом, с помощью генератора микропузырьковой дисперсии. В качестве дополнительного примера субстрат может быть адсорбирован на твердом носителе.

"Микроорганизм" представляет собой микроскопический организм, главным образом бактерию, простейшее, вирус или грибок. Микроорганизм по изобретению типично представляет собой бактерию. В используемом в данном документе значении указание на "микроорганизм" следует понимать как охватывающее "бактерию".

Микроорганизмы по изобретению можно дополнительно классифицировать по функциональным характеристикам. Например, микроорганизм по изобретению может представлять собой или может быть получен из C1-фиксирующего микроорганизма, анаэроба, ацетогена, этанологена, карбоксидотрофа и/или метанотрофа. В таблице приведен типичный перечень микроорганизмов и указаны их функциональные характеристики.

	C1-фиксирующий	Анаэроб	Ацетоген	Этанологен	Аутоτροφ	Карбоксидотроф	Метанотроф
<i>Acetobacterium woodii</i>	+	+	+	+/- ¹	-	+/- ²	-
<i>Alkalibaculum bacchii</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Blautia producta</i>	+	+	+	-	+	+	-
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Clostridium aceticum</i>	+	+	+	-	+	+	-
<i>Clostridium autoethanogenum</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Clostridium carboxidivorans</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Clostridium coskatii</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Clostridium drakei</i>	+	+	+	-	+	+	-
<i>Clostridium formicoaceticum</i>	+	+	+	-	+	+	-
<i>Clostridium ljungdahlii</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Clostridium magnum</i>	+	+	+	-	+	+/- ³	-
<i>Clostridium ragsdalei</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Clostridium scatologenes</i>	+	+	+	-	+	+	-
<i>Eubacterium limosum</i>	+	+	+	-	+	+	-
<i>Moorella thermautotrophica</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Moorella thermoacetica</i> (ранее <i>Clostridium thermoaceticum</i>)	+	+	+	- ⁴	+	+	-
<i>Oxobacter pfennigii</i>	+	+	+	-	+	+	-
<i>Sporomusa ovata</i>	+	+	+	-	+	+/- ⁵	-
<i>Sporomusa silvacetica</i>	+	+	+	-	+	+/- ⁶	-
<i>Sporomusa sphaeroides</i>	+	+	+	-	+	+/- ⁷	-
<i>Thermoanaerobacter kiuvi</i>	+	+	+	-	+	-	-

Acetobacterium woodii может продуцировать этанол из фруктозы, но не из газа.

Сообщалось, что *Acetobacterium woodii* может расти на CO, но методика вызывает сомнения.

Не проводилось исследований возможности роста *Clostridium magnum* на CO.

Один штамм *Moorella thermoacetica*, *Moorella* sp. HUC22-1 был описан как продуцирующий этанол из газа.

Не проводилось исследований возможности роста *Sporomusa ovata* на CO.

Не проводилось исследований возможности роста *Sporomusa silvacetica* на CO.

Не проводилось исследований возможности роста *Sporomusa sphaeroides* на CO.

"C1" относится к молекуле, содержащей один атом углерода, например CO, CO₂, CH₄ или CH₃OH. "C1-оксигенат" относится к молекуле, содержащей один атом углерода, которая содержит также по меньшей мере один атом кислорода, например CO, CO₂ или CH₃OH. "Источник C1-углерода" относится к молекуле, содержащей один атом углерода, служащей частичным или единственным источником углерода для микроорганизма по изобретению. Например, источник C1-углерода может содержать одно или несколько веществ из CO, CO₂, CH₄. Предпочтительно источник C1-углерода содержит что-то одно или оба из CO и CO₂. "C1-фиксирующий микроорганизм" представляет собой микроорганизм, обладающий способностью продуцировать один или несколько продуктов из источника C1-углерода. Типично, микроорганизм по изобретению представляет собой C1-фиксирующую бактерию. В предпочтительном варианте реализации микроорганизм по изобретению получают из C1-фиксирующего микроорганизма, указанного в таблице.

"Анаэроб" представляет собой микроорганизм, который не нуждается в кислороде для роста. Анаэроб может отрицательно реагировать или даже погибать, если содержание кислорода превышает определенное пороговое значение. Типично, микроорганизм по изобретению является анаэробом. В предпочтительном варианте реализации микроорганизм по изобретению получают из анаэроба, указанного в

таблице.

"Ацетоген" представляет собой микроорганизм, который продуцирует или способен продуцировать ацетат (или уксусную кислоту) в качестве продукта анаэробного дыхания. Типично, ацетогены представляют собой облигатно анаэробные бактерии, использующие путь Вуда-Льонгдалля (Wood-Ljungdahl) в качестве своего основного механизма запасания энергии и для синтеза ацетил-КоА и продуктов, производных от ацетил-КоА, таких как ацетат (Ragsdale, *Biochim Biophys Acta*, 1784: 1873-1898, 2008). Ацетогены используют путь ацетил-КоА как (1) механизм восстановительного синтеза ацетил-КоА из CO₂, (2) терминальный электроноакцепторный процесс запасания энергии, (3) механизм фиксации (ассимиляции) CO₂ в синтезе клеточного углерода (Drake, *Acetogenic Prokaryotes*, в *The Prokaryotes*, 3rd edition, p. 354, New York, NY, 2006). Все природные ацетогены являются C1-фиксирующими, анаэробными, аутоотрофными и неметанотрофными. Типично, микроорганизм по изобретению представляет собой ацетоген. В предпочтительном варианте реализации микроорганизм по изобретению получают из ацетогена, указанного в таблице.

"Этанологен" представляет собой микроорганизм, который продуцирует или способен продуцировать этанол. Типично, микроорганизм по изобретению представляет собой этанологен. В предпочтительном варианте реализации микроорганизм по изобретению получают из этанологена, указанного в таблице.

"Аутотроф" представляет собой микроорганизм, способный к росту в отсутствие органического углерода. Вместо этого, аутотрофы используют источники неорганического углерода, такие как СО и/или СО₂. Типично, микроорганизм по изобретению представляет собой аутотроф. В предпочтительном варианте реализации микроорганизм по изобретению получают из аутотрофа, указанного в таблице.

"Карбоксидотроф" представляет собой микроорганизм, способный использовать СО в качестве единственного источника углерода. Типично, микроорганизм по изобретению представляет собой карбоксидотроф. В предпочтительном варианте реализации микроорганизм по изобретению получают из карбоксидотрофа, указанного в таблице.

"Метанотроф" представляет собой микроорганизм, способный использовать метан в качестве единственного источника углерода и энергии. В определенных вариантах реализации микроорганизм по изобретению получают из метанотрофа.

В более широком смысле микроорганизм по изобретению может быть получен из любого рода или вида, указанного в таблице.

В предпочтительном варианте реализации микроорганизм по изобретению получают из кластера *Clostridia*, включающего виды *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei*. Эти виды были впервые описаны и охарактеризованы Abrini, *Arch Microbiol*, 161: 345-351, 1994 (*Clostridium autoethanogenum*), Tanner, *Int J System Bacteriol*, 43:232-236, 1993 (*Clostridium ljungdahlii*) и Huhnke, WO 2008/028055 (*Clostridium ragsdalei*).

Эти три вида имеют много общего. В частности, все эти виды являются C1-фиксирующими, анаэробными, ацетогенными, этанологенными и карбоксидотрофными членами рода *Clostridium*. Эти виды имеют схожие генотипы и фенотипы и способы запасания энергии и ферментативный метаболизм. Кроме того, эти виды объединены в группу гомологии I кластридиальной рРНК с 16S рРНК ДНК, которая является идентичной более чем на 99%, имеют содержание G + C в ДНК около 22-30 мол.%, являются грамположительными, обладают схожей морфологией и размерами (клетки стадии логарифмического роста в пределах 0,5-0,7×3-5 мкм), являются мезофильными (оптимальный рост при 30-37°C), имеют схожие диапазоны pH около 4-7,5 (с оптимальным pH около 5,5-6), не имеют цитохромов и запасают энергию с помощью комплекса Rnf. Также для этих видов было продемонстрировано восстановление карбоновых кислот до их соответствующих спиртов (Perez, *Biotechnol Bioeng*, 110:1066-1077, 2012). Важно, что все эти виды также демонстрируют сильный аутоотрофный рост на СО-содержащих газах, продуцируют этанол и ацетат (или уксусную кислоту) в качестве главных продуктов ферментации, и продуцируют небольшие количества 2,3-бутандиола и молочной кислоты в определенных условиях.

Однако, эти три вида также имеют ряд отличий. Эти виды были выделены из разных источников: *Clostridium autoethanogenum* из кишечника кролика, *Clostridium ljungdahlii* их отходов птицефермы и *Clostridium ragsdalei* - из осадка пресной воды. Эти виды различаются по утилизации различных сахаров (например, рамнозы, арабинозы), кислот (например, глюконата, цитрата), аминокислот (например, аргинина, гистидина) и других субстратов (например, бетаина, бутанола). Кроме того, эти виды различаются по ауксотрофии по отношению к определенным витаминам (например, тиамину, биотину). Эти виды имеют различия в нуклеиновых и аминокислотных последовательностях генов и белков пути Вуда-Льонгдалля, хотя было обнаружено, что общая организация и число этих генов и белков совпадают во всех видах (Корке, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 22:320-325, 2011).

Таким образом, в общем, многие характеристики *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei* не являются специфическими для этих видов, а представляют собой общие характеристики для данного кластера C1-фиксирующих, анаэробных, ацетогенных, этанологенных и карбоксидотрофных членов рода *Clostridium*. Однако, поскольку эти виды являются, в действительности, различными, генетическая модификация или манипуляция с одним из этих видов может не

давать идентичного эффекта для другого из этих видов. Например, могут наблюдаться различия в росте, характеристиках или продуцировании продукта.

Микроорганизм по изобретению также может быть получен из изолята или мутанта *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. Изоляты и мутанты *Clostridium autoethanogenum* включают JA1-1 (DSM10061) (Abrini, Arch Microbiol, 161:345-351, 1994), LBS1560 (DSM19630) (WO 2009/064200) и LZ1561 (DSM23693). Изоляты и мутанты *Clostridium ljungdahlii* включают ATCC 49587 (Tanner, Int. J. Syst. Bacteriol., 43:232-236, 1993), PETCT (DSM13528, ATCC 55383), ERI-2 (ATCC 55380) (US 5593886), C-01 (ATCC 55988) (US 6368819), 0-52 (ATCC 55989) (US 6368819) и OTA-1 (Tirado-Acevedo, Production of bioethanol from synthesis gas using *Clostridium ljungdahlii*, PhD thesis, North Carolina State University, 2010). Изоляты и мутанты *Clostridium ragsdalei* включают PI 1 (ATCC BAA-622, ATCC PTA-7826) (WO 2008/028055).

Микроорганизм по изобретению может культивироваться для получения одного или нескольких продуктов, например *Clostridium autoethanogenum* продуцирует или может быть генетически модифицирован для продуцирования этанола (WO 2007/117157), ацетата (WO 2007/117157), бутанола (WO 2008/115080 и WO 2012/053905), бутирата (WO 2008/115080), 2,3-бутандиола (WO 2009/151342), лактата (WO 2011/112103), бутена (WO 2012/024522), бутадиена (WO 2012/024522), метилэтилкетона (2-бутанона) (WO 2012/024522 и WO 2013/185123), этилена (WO 2012/026833), ацетона (WO 2012/115527), изопропанола (WO 2012/115527), липидов (WO 2013/036147), 3-гидроксипропионата (3-HP) (WO 2013/180581), изопрена (WO 2013/180584), жирных кислот (WO 2013/191567), 2-бутанола (WO 2013/185123), 1,2-пропандиола (WO 2014/0369152), и 1-пропанола (WO 2014/0369152). Помимо одного или нескольких целевых продуктов, микроорганизм по изобретению может также продуцировать этанол, ацетат и/или 2,3-бутандиол. В определенных вариантах реализации бактериальная биомасса сама по себе может считаться продуктом.

В контексте кислотного метаболита, представляющего собой уксусную кислоту, термины "уксусная кислота" или "ацетат" относятся к общему ацетату, присутствующему в культуральной среде, будь то в анионной (диссоциированной) форме (т.е., в виде ацетат-иона или CH_3COO^-) или в форме свободной молекулярной уксусной кислоты (CH_3COOH), причем соотношение между этими формами зависит от pH системы. Как описано ниже, основной нейтрализующий агент, такой как водный гидроксид натрия (NaOH), может быть использован для контроля pH культуральной среды в данном биореакторе (например, до заданного значения pH, которое может быть любым конкретным значением pH между 4,5 и 8,0) путем нейтрализации уксусной кислоты. Типичные диапазоны pH, в которых поддерживаются биореакторы для проведения процессов, описанных в данном документе, составляют от около 4,0 до около 8,0, в частности от около 5,0 до около 6,5.

"Жидкий продукт" в используемом в данном документе значении относится к жидкому потоку, который подается по меньшей мере на одну стадию многостадийного процесса (например, жидкий продукт первой стадии, который подается на вторую стадию). Жидкий продукт содержит (i) культуральную среду, содержащую C1-фиксирующий микроорганизм, (ii) желательный товарный продукт и (iii) другие метаболиты. Жидкий продукт может дополнительно содержать растворенный C1-содержащий субстрат. "Жидкий продукт заключительной стадии" в используемом в данном документе значении представляет собой жидкий продукт, отбираемый из последней реакторной стадии многостадийного процесса. Жидкий продукт заключительной стадии типично отбирают из не содержащей биомассу части жидкой фракции заключительной стадии.

"Товарные продукты" или "желательные товарные продукты" в используемом в данном документе значении относятся к метаболитам, продуцируемым микроорганизмами по изобретению. Микроорганизмы по изобретению могут культивироваться для получения одного или нескольких продуктов выбранных из группы, состоящей из этанола, ацетата, бутанола, бутирата, 2,3-бутандиола, лактата, бутана, бутадиена, метилэтилкетона (2-бутанона), этилена, ацетона, изопропанола, липидов, 3-гидроксипропионата (3-HP), изопрена, жирных кислот, 2-бутанола, 1,2-пропандиола и 1-пропанола. "Ростозависимые продукты" в используемом в данном документе значении относятся к метаболитам, демонстрирующим производимость, прямо пропорциональную производительности биомассы. Примеры ростозависимых продуктов включают, без ограничений, изопропанол, ацетат, ацетон, 2-оксимасляную кислоту (2-HIBA) и изобутилен.

Одним из преимуществ многостадийного реакторного процесса является возможность оптимизации процесса ферментации по отношению по меньшей мере к одному желательному товарному продукту. Следует понимать, что в зависимости от создаваемых параметров процесса желательный товарный продукт одного процесса ферментации может быть нежелательным метаболитом другого процесса ферментации, проводимого в других технологических условиях. Например, в многостадийном процессе производства этанола этанол является желательным товарным продуктом, однако в многостадийном процессе производства изопропанола желательным товарным продуктом является изопропанол, а этанол представляет собой побочный продукт-метаболит.

Как описано ниже, конкретным типом биореактора, особенно пригодного в практике настоящего изобретения, является петлевой циркуляционный реактор, использующий градиент плотности между

секцией относительно низкой плотности в подъемном стояке и секцией относительно высокой плотности в одной или нескольких внутренних или внешних сливных трубках. Секции как подъемного стояка, так и сливной трубки содержат жидкую культуральную среду в зоне непрерывной жидкой фазы, но газообразный СО-содержащий субстрат нормально распределяется (например, барботируется) в нижней части секции подъемного стояка. Поднимающиеся пузырьки газа заключены в этой секции во время их движения вверх через зону непрерывной жидкой фазы до тех пор, пока любой неизрасходованный и нерастворенный газ не выходит в зону непрерывной газовой фазы (т.е., паровоздушное пространство или свободное пространство над продуктом) над уровнем жидкости. Насос петли может создавать или способствовать циркуляции жидкости вниз, по внутренней или внешней сливной трубке для жидкости. В некоторых случаях, однако, насос петли не используется по меньшей мере для одного из множества биореакторов, и часто насос петли не используется для большинства или даже всех биореакторов, т.е. используется циркуляция только под действием эффекта плотности и, предпочтительно, снижаются энергозатраты.

Термин "биореактор", а также любой биореактор, который может быть включен как часть "биореакторной стадии", не ограничен петлевым циркуляционным реактором, но в более широком смысле включает любую пригодную емкость или секцию внутри емкости для размещения некоторого объема жидкой культуральной среды с карбоксидотрофным микроорганизмом, который может использоваться для проведения биологических процессов, описанных в данном документе, которые также могут быть названы процессами ферментации в той степени, в которой они обычно проводятся анаэробно. Конкретные типы биореакторов могут включать любые емкости, пригодные для двухфазового (газо-жидкостного) контакта, например противоточные реакторы (например, с восходящим потоком паровой фазы и нисходящим потоком жидкой фазы) или прямоточные реакторы (например, с восходящими потоками газовой и жидкой фаз). В таких емкостях для контакта двух фаз жидкая фаза может быть непрерывной фазой, как в случае пузырьков газа, текущих в движущемся столбе жидкости. В другом случае паровая фаза может быть непрерывной фазой, как в случае диспергированной жидкости (например, в форме капель), протекающей через паровоздушное пространство. В некоторых вариантах реализации, описанных ниже более подробно, разные зоны биореактора могут быть использованы для размещения непрерывной жидкой фазы и непрерывной газовой фазы.

Конкретные примеры биореакторов включают баковые реакторы с непрерывным перемешиванием (CSTRs), реакторы с иммобилизованными клетками (ICRs), реакторы с орошаемым слоем (TBRs), реакторы с биопленочным подвижным слоем (MBBRs), барботажные колонны, газлифтные ферментеры и мембранные реакторы, такие как мембранные биореакторы с пустотелыми волокнами (HFMBRs). Пригодные биореакторы могут включать статические смесители или другие емкости и/или аппараты (например, башни или трубопроводную обвязку), пригодные для введения в контакт газообразного С1-содержащего субстрата с жидкой бактериальной культуральной средой (например, с кинетикой растворения и массопереноса, благоприятной для проведения биологического превращения). Подразумевается, что фразы "множество биореакторов" или биореакторы, которые могут быть включены в "множество биореакторных стадий", включают биореакторы более чем одного типа, хотя в некоторых случаях множество биореакторов может быть одного типа (например, петлевые циркуляционные реакторы).

Некоторые пригодные технологические потоки, рабочие параметры и оборудование для использования в биологических процессах, описанных в данном документе, раскрыты в публикации патентной заявки США № US2011/0212433, которая настоящим в полном объеме включена в данный документ в качестве ссылки.

Настоящее изобретение более конкретно ассоциировано с открытием биологических процессов превращения источников С1-углерода в ценные товарные продукты, включая технологические схемы с параллельной подачей газа и последовательной подачей жидкости, как описано в данном документе, с использованием множества биореакторных стадий. Предпочтительно можно избежать использования одной или нескольких мембранных систем для отделения клеток (микроорганизмов или биомассы) и рециркуляции в данную биореакторную стадию, при достижении высокой общей производительности (например, для двух или больше биореакторов) по желательному товарному продукту с очень низким общим образованием побочного продукта.

В конкретных примерах изобретение ассоциировано с процессами превращения СО в этанол, с использованием многостадийного процесса, как описано в данном документе. В определенных вариантах реализации С1-фиксирующий микроорганизм представляет собой карбоксидотрофный микроорганизм. Более конкретно, карбоксидотрофный микроорганизм выбирают из группы, состоящей из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ragsdalei* и *Clostridium ljungdahlii*. В конкретных вариантах реализации карбоксидотрофный микроорганизм представляет собой штамм DSM23693 *Clostridium autoethanogenum*. Типичные концентрации этанола в жидком продукте промежуточной стадии или жидком продукте заключительной стадии, отбираемом из биореакторной стадии, расположенной после другой стадии (например, последней биореакторной стадии) обычно составляют по меньшей мере около 40 г/л (например, от около 40 до около 95 г/л), типично, по меньшей мере около 50 г/л (например, от около 50 до около 80 г/л) и часто по меньшей мере около 60 г/л (например, от около 60 до около 75 г/л). Типичные весовые соотношения этанол:уксусная кислота в таком жидком продукте промежуточной стадии или жидком

продукте заключительной стадии составляют обычно по меньшей мере около 50:1 (например, от около 50:1 до около 1000:1), типично, по меньшей мере около 75:1 (например, от около 75:1 до около 500:1) и часто по меньшей мере около 100:1 (например, от около 100:1 до около 250:1). Эти характеристики жидкого продукта могут относиться, более конкретно, к жидкому продукту, отбираемому из биореактора промежуточной стадии или биореактора заключительной стадии, и после сепарации (например, мембранной фильтрации) для удаления карбоксидотрофного микроорганизма (клеток или биомассы). В общем, аналитические методы (например, газовая хроматография (GC) или жидкостная хроматография высокого давления (HPLC)), используемые для определения концентраций метаболита, требуют не содержащих клеток образцы.

Помимо достижения высокой общей производительности по этанолу с минимальным общим образованием побочного продукта, многостадийные процессы, описанные в данном документе, могут дополнительно обеспечивать благоприятную общую утилизацию CO. Общая утилизация CO относится к проценту CO, подаваемого в многостадийный процесс (например, общей подачи CO в биореакторы), используемого для превращения в требуемый продукт (продукты) (например, этанол) и другие метаболиты микроорганизма. Если известен или может быть рассчитан суммарный состав всех газовых потоков (т.е., газообразных продуктов) на выходе процесса (например, по расходам и составам индивидуальных газовых потоков на выходе каждого используемого биореактора), то общая утилизация CO может быть рассчитана следующим образом:

(процент CO на выходе многостадийного процесса)/(процент CO на входе многостадийного процесса).

Общая утилизация CO определяется "за один проход" или "при однократной циркуляции", без учета использования рециркуляции газообразного продукта (и дополнительных затрат), которые могут обеспечивать более высокие показатели полной утилизации. В соответствии с типичными вариантами реализации утилизация CO карбоксидотрофным микроорганизмом обычно составляет по меньшей мере около 35% (например, от около 35 до около 85%), типично, по меньшей мере около 50% (например, от около 50 до около 80%) и часто по меньшей мере около 60% (например, от около 60 до около 75%). В некоторых случаях утилизация CO может составлять по меньшей мере около 70%.

В соответствии с одним вариантом реализации изобретения параметры ферментации для многостадийного процесса регулируют с целью увеличения продуцирования по меньшей мере одного ростозависимого продукта. В одном варианте реализации параметры ферментации многостадийного процесса регулируют для увеличения специфичности процесса по изопропанолу. В конкретных примерах изобретение ассоциировано с процессами превращения CO в изопропанол, с использованием многостадийного процесса, описанного в данном документе. В определенных вариантах реализации C1-фиксирующий микроорганизм представляет собой рекомбинантный штамм *Clostridium autoethanogenum*. В определенных вариантах реализации рекомбинантный микроорганизм адаптирован для экспрессии или сверхэкспрессии по меньшей мере одного фермента пути биосинтеза изопропанола.

Варианты реализации настоящего изобретения относятся к способам повышения производительности по метаболитам, которые демонстрируют производительность, прямо пропорциональную производительности по биомассе (например, по ростозависимым продуктам). Как показано на фиг. 5A и 5B, производительность по ацетону и/или изопропанолу связана (с) фазой роста ферментации. Как показано на графиках, фиг. 5A демонстрирует сильную корреляцию между концентрациями ацетата и изопропанола в процессе ферментации в баковом реакторе с непрерывным перемешиванием (CSTR). Концентрации ацетата и изопропанола возрастают на начальной фазе роста при ферментации (дни 1 и 2). С выходом кривой роста на стационарное значение, концентрации как ацетата, так и изопропанола снижаются. Фиг. 5B показывает соотношение между производительностью по изопропанолу и скоростью роста. Четко видно, что производительность по изопропанолу достигает наивысшего значения при наибольшей скорости роста.

Было показано, что фермент CtfAB катализирует образование ацетоацетата путем переноса фрагмента КоА от ацетоацетил-КоА к ацетату, приводящего к образованию ацетоацетата и ацетил-КоА. Активность этих ферментов зависит от доступности ацетата. Сообщалось о значениях K_m CtfAB для ацетата в широком диапазоне от 24 мМ (1,4 г/л) до 1200 мМ (71 г/л). Значение K_m представляет собой концентрацию субстрата, при которой фермент функционирует наполовину от его максимальной производительности. Таким образом, для активности CtfAB, соответствующей половине его максимальной производительности, требуется 1,4-71 г/л ацетата. По оценкам авторов изобретения, клеткам требуется по меньшей мере 14 г/л ацетата, чтобы ацетат не был лимитирующим субстратом в процессе ферментации изопропанола.

Многостадийный биореакторный процесс, предлагаемый в настоящем изобретении, обеспечивает большую адаптируемость процесса. За счет регулировки технологических параметров на различных стадиях многостадийного процесса можно изменять желательный результат. Например, многостадийный процесс может быть отрегулирован на большую специфичность по отношению к желательным товарным продуктам (например, этанолу или 2,3-бутандиолу или ростозависимым продуктам, таким как изопропанол). Примеры технологических параметров, которые могут контролироваться или регулироваться в ходе проведения многостадийного биореакторного процесса, включают состав C1-содержащего субстрата,

расход C1-содержащего субстрата, температуру, давление, степень разбавления бактериальной культуры и состав жидкой культуральной среды.

Примеры пригодных манипуляций включают подачу C1-содержащего субстрата на разные стадии многостадийного процесса с разными величинами расхода, подачу C1-содержащих субстратов, имеющих разный состав, на разные стадии многостадийного процесса, подачу жидких культуральных сред, имеющих разный состав, на разные стадии многостадийного процесса (например, подачу жидкой культуральной среды, имеющей ограниченный состав, по меньшей мере, на стадии многостадийного процесса), изменение температуры на разных стадиях многостадийной системы (например, понижение температуры после первой реакторной стадии на последующих реакторных стадиях), изменение степени разбавления бактериальной культуры на стадиях многостадийного реакторного процесса, изменение скорости перемешивания на каждой стадии многостадийного процесса (например, путем изменения скорости работы насоса устройств распределения жидкости или путем модификации внутренней конструкции реактора или размеров).

Важно, как описано выше, чтобы вышеуказанные технологические параметры могли быть достигнуты в многостадийных биореакторных процессах, не требующих выделения и рециркуляции карбоксидотрофного микроорганизма, который отбирается в жидком продукте одного (предшествующего) биореактора и подается в другой (последующий) биореактор, как обычно происходит на практике, непрерывных процессов биологического превращения. В общем, таким образом, жидкий продукт, который отбирают из предшествующей биореакторной стадии и подают на данную биореакторную стадию, может содержать карбоксидотрофный микроорганизм, используемый на предшествующей (предыдущей) биореакторной стадии, поскольку этот микроорганизм не отделяется от одного или нескольких, предпочтительно, всех, жидких продуктов, последовательно перемешиваемых с одной стадии на следующую. Жидкие продукты, подаваемые на данную биореакторную стадию, обычно дополнительно содержат культуральную среду, желательный товарный продукт и другие метаболиты, поступающие с предшествующей (предыдущей) стадии.

Таким образом, в соответствии с вариантами реализации, описанными в данном документе, которые предпочтительно избегают использования обычных систем сепарации и рециркуляции клеток (например, мембран), жидкий продукт, отбираемый из предшествующей биореакторной стадии, не подвергается выделению карбоксидотрофного микроорганизма и рециркуляции выделенного карбоксидотрофного микроорганизма на предшествующую биореакторную стадию, с которой он был отобран. Этот характерный признак процессов и системы, описанных в данном документе, однако, не исключает использования различных промежуточных стадий, после отбора жидкого продукта с предшествующей стадии и перед его подачей на данную биореакторную стадию, которые могут влиять или не влиять на состав жидкого продукта. Такие промежуточные стадии включают, например, (i) отделение части жидкого продукта (например, с целью отбора проб), необязательно, в комбинации с фильтрацией отделенной части (например, при необходимости проведения аналитического метода), (ii) смешение жидкого продукта (например, с культуральной средой, в частности с питательными веществами, или технологическими добавками, такими как поверхностно-активные вещества) и/или (iii) проведение реакции жидкого продукта (например, с нейтрализующим агентом, таким как NH_4OH или NaOH , для повышения pH). В некоторых вариантах реализации, однако, жидкий продукт, отбираемый из данной биореакторной стадии, может подаваться на данную биореакторную стадию без проведения (i), (ii) и/или (iii), описанных выше, или без проведения каких-либо их комбинаций.

Фиг. 1 изображает типичный многостадийный процесс биопревращения в соответствии с конкретным вариантом реализации данного изобретения, включающий по меньшей мере четыре взаимосвязанные биореакторные стадии (10a, 10b, ..., 10y, 10z), где пунктирная линия между второй и третьей стадиями (10a, 10y) используется для обозначения того, что одна или несколько дополнительных промежуточных стадий могут быть включены в данную многостадийную систему аналогичным образом и с использованием аналогичного оборудования и соединительных устройств. Как описано более подробно ниже, газообразный C1-содержащий субстрат может подаваться на стадии по параллельной схеме, в то время как жидкие продукты, которые могут включать биомассу, могут подаваться последовательно от первой биореакторной стадии (10a) к последней биореакторной стадии (10z), из которой может отбираться жидкий продукт заключительной стадии, имеющий типичные характеристики этого жидкого продукта, или, по меньшей мере, из его не содержащей биомассу фракции, как описано выше.

В соответствии с типичными процессами газообразный C1-содержащий субстрат подается на биореакторные стадии через впускные патрубки газа (12a, 12b, 12y, 12z), расположенные рядом с нижними концами вертикально ориентированных биореакторов (100a, 100b, 100y, 100z) каждой биореакторной стадии. Например, впускные патрубки газа могут заходить в свои соответствующие биореакторы на участке, соответствующем нижним 25%, предпочтительно нижним 10%, длины соответствующих биореакторов. Впускные патрубки газа будут нормально заходить в соответствующие биореакторы к газораспределительным устройствам, которые могут быть расположены по центру биореакторов на высоте, в общем соответствующей указанным процентам длины реактора. Конкретные газораспределительные устройства включают барботеры (14a, 14b, 14y, 14z), с которыми впускные патрубки газа могут сооб-

щаться каналами, внутри одного или нескольких биореакторов, вблизи их соответствующих первых концов. Газообразные продукты, включая непрореагировавший источник C1-углерода и любые газообразные примеси содержащего C1 субстрата (например, H_2), которые не используются в реакции биопревращения, отбирают из каждого биореактора и выходят через выпускные патрубки газа (16a, 16b, 16y, 16z), расположенные вблизи верхних концов биореакторов, напротив нижних концов. Выпускные патрубки газа могут заходить в соответствующие биореакторы на участке, соответствующем верхним 25%, предпочтительно верхним 10%, длины соответствующих биореакторов, или в другом случае газообразные продукты могут отбираться из верхней части соответствующих биореакторов, вообще без выпускных патрубков газа, заходящих в соответствующие биореакторы.

Каждый из промежуточных биореакторов (100b, 100y) включает впускные патрубки жидкости (18y) и выпускные патрубки жидкости (20b, 20y), которые могут принимать жидкий продукт, отбираемый из непосредственно примыкающего предшествующего биореактора, и передавать жидкий продукт в непосредственно примыкающий последующий биореактор. Например, биореактор 100b второй стадии имеет впускной патрубок жидкости для подачи жидкого продукта, отбираемого из биореактора 100a первой стадии (например, через его выпускной патрубок жидкости 20a), и выпускной патрубок жидкости 20b для подачи жидкого продукта в биореактор (не показан) третьей стадии (например, через его впускной патрубок жидкости, не показан). Биореактор 100a (т.е., биореактор первой стадии 10a) не имеет предшествующего биореактора и поэтому не имеет впускного патрубка жидкости, предназначенного специально для приема жидкого продукта из непосредственно предшествующего биореактора. Биореактор 100z (т.е., биореактор заключительной стадии 10z) не имеет последующего биореактора и поэтому не имеет выпускного патрубка жидкости, предназначенного специально для подачи жидкого продукта в непосредственно примыкающий последующий биореактор. Однако последний биореактор 100z имеет выпускное отверстие жидкого продукта 50 для отбора жидкого продукта заключительной стадии, например, имеющего типичные характеристики состава, как описано выше. Перемещение жидкого продукта (или "бульона") в/из последовательных стадий через впускные и выпускные патрубки (20a, ..., 20y) может осуществляться по открытым трубам малого диаметра (например, имеющим внутренние диаметры от около 1 до около 12 мм), сообщающимся с этими впускными и выпускными патрубками.

Как и в случае выпускных патрубков жидкости (20b, 20y) биореакторов промежуточных стадий, выпускное отверстие жидкого продукта 50 биореактора 100z заключительной стадии расположено вблизи нижнего конца биореактора. После отбора из биореактора 100z, жидкий продукт заключительной стадии, отбираемый через выпускное отверстие жидкого продукта 50, может поступать и необязательно подниматься выше высоты Н, соответствующей рабочему уровню негазированной жидкости (т.е., уровню жидкости, который существовал бы без подачи газа). Это означает, что наивысшая отметка Е, на которой может находиться жидкий продукт заключительной стадии, может находиться на уровне высоты Н или выше. Высота Н может регулироваться и может соответствовать, по существу, высоте Н разрядного устройства сифона 75 или другого типа точки отбора жидкости. В варианте реализации, изображенном на фиг. 1, таким образом, выпускное отверстие жидкого продукта 50 сообщается по жидкости с разрядным устройством сифона 75, которое регулируется по высоте, относительно биореакторов (100a, 100b, ..., 100y, 100z) многостадийного процесса. Высотная отметка Е и высота Н могут регулироваться для управления уровнем жидкости или гидравлическим напором биореактора 100z заключительной стадии и предпочтительно других биореакторов в такой степени, чтобы они могли быть соединены гидравлически, без нарушения условия наполненности жидкостью (или непрерывности жидкой фазы) во впускных и выпускных патрубках жидкости (20a, ..., 20y), передающих жидкий продукт последовательно с одной стадии на следующую. Высотная отметка Е и/или высота Н, таким образом, могут регулировать уровень жидкости в одном или нескольких и предпочтительно во всех биореакторах (100a, ..., 100z) и, в частности, могут управлять уровнями поверхностей раздела газ/жидкость (22a, ..., 22z) в соответствующих биореакторах.

В конкретном варианте реализации, изображенном на фиг. 1, впускные патрубки жидкости (18y) и выпускные патрубки жидкости (20b, 20y) предпочтительно расположены в статической секции ниже соответствующих впускных патрубков газа (12b, 12y) и барботеров (14b, 14y), для обеспечения возможности подачи жидкости и отбора из этой секции или участка реактора данной биореакторной стадии. Однако возможно также, чтобы впускные и выпускные патрубки были расположены в другом месте по длине соответствующих биореакторов, в зависимости от желательных мест подачи и отбора жидких продуктов. В альтернативном варианте реализации, например, выпускные патрубки жидкости могут быть расположены на уровне поверхностей раздела газ/жидкость (22a, 22b, 22y, 22z) или рядом с ними или в другом случае могут нарушать эффект сифонирования или условие заполненности жидкостью между биореакторными стадиями с целью обеспечения возможности независимого контроля уровня жидкости в одном или нескольких биореакторах.

Как также показано на фиг. 1, один или несколько, например все, биореакторов (100a, 100b, ..., 100y, 100z) могут иметь внешние петли для рециркуляции жидкости (25a, 25b...25y, 25z) (т.е., внешние по отношению к их соответствующим биореакторам) для улучшения перемешивания/однородности в данном биореакторе и/или улучшения скорости массопереноса пар-жидкость. При использовании внеш-

них петель для рециркуляции жидкости (25a, 25b, ..., 25y, 25z), жидкий продукт, содержащий культуральную среду и C1-фиксирующий микроорганизм, может отбираться из донной секции данного биореактора (например, из участка, соответствующего нижним 10% длины биореактора; из точки ниже газораспределительных устройств, таких как барботеры (14a, 14b, 14y или 14z); и/или из точки ниже впускных патрубков жидкости или выпускных патрубков жидкости) и рециркулироваться снаружи биореактора в верхнюю секцию биореактора (например, на участке, соответствующем верхний 10% биореактора и/или выше поверхности раздела газ/жидкость (22a, 22b, 22y, или 22z), определяющей границу раздела между зоной непрерывной газовой фазы и зоной непрерывной жидкой фазы). Внешние петли реактора для рециркуляции жидкости могут включать соответствующие насосы для внешней рециркуляции жидкости (30a, 30b, 30y, 30z) для обеспечения внешней циркуляции жидкости с желательной скоростью, например, при оптимальном компромиссе между расходом энергии и улучшением скорости массопереноса.

Удобно, чтобы внешние петли для рециркуляции жидкости (25a, 25b, ..., 25y, 25z) могли обеспечивать возможность отбора/анализа проб жидкости из биореактора, а также использоваться для управления биореактором. Например, биореакторы 100a и 100b первой и второй стадий имеют соответствующие внешние петли для рециркуляции жидкости 25a и 25b, в которые может добавляться нейтрализующий агент (например, водное основание, такое как NH_4OH или NaOH) через впускные патрубки основного нейтрализующего агента 35a и 35b. Прибавлением основного нейтрализующего агента в данный биореактор (биореакторы), например биореакторы 100a, 100b, можно отдельно управлять с использованием пригодных петлей управления с обратной связью, включающих, например, анализаторы pH 40a, 40b, измеряющие (например, непрерывно или периодически) значение pH жидкости биореактора во внешних петлях для рециркуляции жидкости 25a и 25b. Такие схемы управления также включают необходимое аппаратное обеспечение (например, управляющие клапаны или насосы с регулируемой производительностью, не показаны) и программное обеспечение (например, компьютерные программы) для сравнения измеренного значения pH с заданным значением для данного биореактора и затем управления потоком основного нейтрализующего агента для достижения или поддержания заданного значения. Таким образом, внешние циркуляционные петли одного или нескольких (например, всех) биореакторов могут сообщаться каналами с соответствующими одним или несколькими (например, всеми) впускными патрубками основного нейтрализующего агента и включать контрольно-измерительную аппаратуру для независимого управления величиной pH в одном или нескольких (например, всех) соответствующих биореакторах.

Также внешние петли для рециркуляции жидкости (25a, 25b, ..., 25y, 25z) одного или нескольких биореакторов (100a, 100b, ..., 100y, 100z) могут включать датчики температуры (41a, 41b, 41y, 41z), которые измеряют (например, непрерывно или периодически) температуру жидкости во внешних петлях для рециркуляции жидкости 25a и 25b соответствующих биореакторов (100a, 100b, ..., 100y, 100z), причем такие температуры являются типичными рабочими температурами биореакторов. Таким образом, может осуществляться отдельный контроль температуры биореактора с использованием схем управления, включающих, помимо датчиков температуры (41a, 41b, 41y, 41z), нагреватели или теплообменники (42a, 42b, 42y, 42z) и необходимое программное обеспечение (например, компьютерную программу) для сравнения измеренной температуры с заданным значением температуры для данного биореактора, и затем управления работой нагревателей или теплообменников (42a, 42b, ..., 42y, 42z) для достижения или поддержания заданного значения. Конкретные типы теплообменников включают системы труба-в-трубе и с пуклеванной рубашкой. Дополнительно, внешние петли для рециркуляции жидкости (25a, 25b, ..., 25y, 25z) одного или нескольких биореакторов (например, биореакторов 100a и 100b первой и второй стадий, как изображено на фиг. 1) могут включать впускные патрубки жидкой культуральной среды 45a и 45b или впускные патрубки для подачи других жидких разбавителей, реагентов (например, поверхностно-активных веществ) и/или питательных веществ в один или несколько биореакторов, независимо, с одинаковой или разными скоростями. Таким образом, внешние петли для циркуляции одного или нескольких (например, всех) биореакторов могут сообщаться каналами с соответствующими одним или несколькими нагревателями или теплообменниками и включать контрольно-измерительную аппаратуру для независимого контроля температуры в одном или нескольких соответствующих биореакторах.

Две или больше биореакторные стадии (например, первая и вторая биореакторные стадии 10a, 10b) могут, таким образом, иметь независимо регулируемые рабочие параметры процесса, включая требующие отбора проб/анализа жидкого продукта биореактора во внешних петлях для рециркуляции жидкости, как описано выше. Типичные рабочие параметры процесса включают скорость добавления жидкой культуральной среды, скорость подачи газообразного СО-содержащего субстрата, температуру реактора, pH в реакторе и их комбинации. Одно важное преимущество многостадийных процессов, описанных в данном документе, определяется возможностью независимо контролировать рост C1-фиксирующего микроорганизма в процессе его перемещения по последовательным биореакторным стадиям. Управление ростом бактерий, как и продуцирование товарного продукта и других метаболитов, может осуществляться путем регулирования условий данной биореакторной стадии (например, рабочих параметров процесса, описанных выше) для достижения цели данного процесса. Например, в соответствии с одним вариантом реализации жидкая культуральная среда добавляется в биореактор первой стадии с относительно

высокой скоростью для промотирования высокой скорости роста бактерий, а также получения стабильной гомогенной культуры для остальной части многостадийной биореакторной системы. Жидкая культуральная среда может добавляться со сравнительно более низкими скоростями в последующие биореакторы, имеющие более стабильные клеточные культуры, пригодные для достижения высокой производительности по товарному продукту. Таким образом, рост бактерий может быть предпочтительно отделен или отделен от получения продукта. В общем, можно понять, в более общем смысле, что системы, описанные в данном документе, обеспечивают высокое число степеней свободы по показателям контроля за метаболизмом С1-фиксирующего микроорганизма в процессе прохождения им разных фаз роста в каждом из последовательно расположенных реакторов. Такие возможности контроля обеспечивают возможность осуществления многостадийных процессов биологического превращения с получением жидкого продукта заключительной стадии, имеющего характеристики, описанные выше.

Таким же образом, уровни жидкости или высоты поверхностей раздела газ/жидкость (22a, 22b, ..., 22y, 22z) могут независимо контролироваться в одном или нескольких биореакторах (100a, 100b, ..., 100y, 100z) путем использования отдельных устройств управления уровнем жидкости и контрольно-измерительной аппаратуры (например, управляющих клапанов, датчиков уровня и передатчиков). Однако предпочтительно можно также избежать дополнительных расходов и сложностей применения такого оборудования и контрольно-измерительной аппаратуры, путем проведения многостадийных процессов таким образом, чтобы уровень жидкости в по меньшей мере одном биореакторе был зависимым от уровня жидкости в соответствующем следующем за ним биореакторе, например, путем использования единого управления уровнями, контролирующего уровни жидкости во всех биореакторах системы. В соответствии с конкретным режимом работы системы биореакторов (100a, 100b, ..., 100y, 100z), представленной на фиг. 1, жидкая культуральная среда добавляется в биореактор 100a первой стадии через входной патрубок 45a и протекает через все реакторы путем перетекания или иначе, под действием гидростатического напора, например, который можно регулировать путем изменения наибольшей высотной отметки E, до которой доходит или переходит жидкий продукт заключительной стадии.

В соответствии с одной возможной процедурой инициирования процесса биореактор 100a первой стадии может быть инокулирован или загружен С1-фиксирующим микроорганизмом, который после периода периодического выращивания культуры достигает достаточно высокой концентрации таким образом, чтобы можно было начинать непрерывное прибавление жидкой культуральной среды. Жидкий продукт первой стадии затем перемещается на последующие стадии, например, путем перетока с первой стадии на вторую стадию, с последующим перетоком со второй стадии на третью стадию и т.д. Уровень жидкости в системе может, в конечном счете, определяться уровнем, на котором производится отбор жидкого продукта заключительной стадии (также называемым уровнем "слива" с последней биореакторной стадии). Газообразный С1-содержащий субстрат прибавляют в каждый реактор отдельно, хотя возможно использование общего свободного пространства над продуктом, в котором собираются пары, выходящие из зон непрерывной жидкой фазы (например, в случае, когда несколько биореакторных стадий размещены в одной емкости, например, при многоярусной схеме размещения), и в соответствии с некоторыми вариантами реализации может уменьшаться вспенивание. Желательный товарный продукт ферментации, а также другие метаболиты выделяют из жидкого продукта заключительной стадии, отбираемого из последней биореакторной стадии. Жидкий продукт заключительной стадии может быть отделен (например, методом мембранной фильтрации) для удаления товарного продукта и метаболитов, и затем С1-фиксирующий микроорганизм и, возможно, другие твердые вещества, перед таким выделением. Некоторая часть или весь жидкий пермеат, который выделяют в результате такой сепарации (или основная среда), может быть рециркулирован для использования в биореакторной стадии, например, он может быть введен в биореактор первой стадии, необязательно, после добавления питательных веществ.

Фиг. 2 изображает один из возможных типов биореактора 100, а именно биореактор с петлей циркуляции, который может быть включен в биореакторную стадию 10 многостадийного процесса, включая процесс, изображенный на фиг. 1. Многие элементы являются такими же, как изображено на фиг. 1 (и обозначены такими же номерами позиций), за исключением некоторых внутренних конструкций реактора, которые могут использоваться специально для промотирования желательных характеристик потоков пара и жидкости, циркуляции, и распределения/массопереноса между фазами. Как более четко показано на фиг. 2, биореактор 100 работает с двумя зонами, которые различаются по непрерывным и диспергированным фазам. Зона А непрерывной паровой фазы содержит диспергированную жидкую фазу, за счет жидкого продукта, поступающего в эту зону (также называемую свободным пространством над продуктом) через одно или несколько устройств распределения жидкости, таких как разбрызгивающая головка 110, имеющая множество отверстий для диспергирования стекающего вниз жидкого продукта (например, с профилем в виде расширяющегося книзу конуса), поступающего из внешней петли рециркуляции жидкости 25.

Зона непрерывной жидкой фазы В содержит диспергированную газовую фазу за счет того, что С1-содержащий субстрат поступает в эту зону через одно или несколько газораспределительных устройств, таких как барботер 14, имеющих множество отверстий для диспергирования поднимающегося вверх С1-содержащего субстрата, поступающего из впускного патрубка газа 12. Поверхность раздела

газ/жидкость 22 определяет границу между зоной непрерывной газовой фазы А и зоной непрерывной жидкой фазы В. Зона непрерывной жидкой фазы В может занимать большую часть объема биореактора 100, и, например, она может быть расположена целиком в нижних 90%, нижних 80% или нижних 75% длины реактора. Соответственно, поверхность раздела газ/жидкость 22 может быть расположена на участке, соответствующем верхним 25%, верхним 20% или верхним 10% длины реактора. В некоторых случаях слой пены (не показан) может находиться над поверхностью раздела газ/жидкость, и в целях данного описания находится в зоне непрерывной газовой фазы А.

Таким образом, в соответствии с конкретным вариантом реализации, представленным на фиг. 2, жидкий продукт (или "бульон"), рециркулируемый через внешнюю петлю рециркуляции жидкости 25, подается в зону А непрерывной паровой фазы. Этот жидкий продукт может перемещаться из донной секции биореактора, из которой жидкий продукт отбирают, как описано выше, в верхнюю секцию биореактора (например, на участок, соответствующий верхним 10% длины биореактора 100, и в вышеупомянутое распределительное устройство (устройства) жидкости, такие как разбрызгивающая головка 110, через которую осуществляется введение жидкого продукта). Как описано выше для фиг. 1, внешняя петля рециркуляции жидкости 25, помимо улучшения циркуляции жидкости и массопереноса между жидкой и паровой фазами, может быть использована для осуществления функций управления процессом. Например, жидкий продукт, рециркулируемый через внешнюю петлю рециркуляции 25, может быть пропущен через внешний теплообменник 42 (например, перед подачей в зону А непрерывной паровой фазы) для контроля температуры биореактора 100. В другом случае основной нейтрализующий агент может быть добавлен к этому жидкому продукту, например, через впускной патрубок основного нейтрализующего агента 35 для контроля значения pH в биореакторе 100. В случае множества биореакторов, как показано на фиг. 1, внешние петли рециркуляции одного или нескольких (например, всех) биореакторов могут быть использованы для рециркуляции жидкого продукта, отбираемого вблизи одного или нескольких соответствующих первых концов биореакторов, в распределителе жидкости в одной или нескольких соответствующих зонах непрерывной паровой фазы, расположенных вблизи одного или нескольких соответствующих вторых концов (расположенных напротив первых концов).

C1-содержащий субстрат, подаваемый через барботер 14, может поступать в подъемный стояк 120, который расположен в зоне В непрерывной жидкой фазы, например, концентрически по отношению к биореактору 100, и удерживает поднимающиеся пузырьки газа в центральной области этой зоны. После выхода из верхней части подъемного стояка 120 остаточный газ, не растворенный или не использованный в зоне В непрерывной жидкой фазы, продолжает двигаться вверх и выходит из этой зоны на поверхности раздела газ/жидкость 22. Благодаря тому, что газ удерживается в подъемном стояке 120, общая плотность в подъемном стояке 120 меньше, чем плотность в сливной трубке 130, где (в жидкости), по существу, не остается пузырьков газа. Как показано на фиг. 2, сливная трубка 130 может быть расположена кольцеобразно по отношению к подъемному стояку 120, хотя возможны другие конфигурации для создания в зоне В непрерывной жидкой фазы областей с отличающимися плотностями. Например, в этой зоне может быть распределено множество вертикально ориентированных сливных трубок, проходящих от участка нижних 1-10% длины реактора до верхних 25-45% длины реактора. Как также показано с помощью стрелочек в этой зоне, указывающих направление потока жидкости в емкости, биореактор 100 работает с внутренней циркуляцией жидкости в зоне В непрерывной жидкой фазы, которая индуцируется именно разницей плотностей, и создает направленный вверх поток жидкости в подъемном стояке 120 и направленный вниз поток жидкости в сливной трубке 130, которые оба являются внутренними по отношению к биореактору 100. В соответствии с некоторыми вариантами реализации несколько подъемных стояков и/или несколько сливных трубок может быть использовано для контроля циркуляции жидкости.

Газ, выделяющийся на поверхности раздела газ/жидкость 22, продолжает двигаться вверх (в массе) через зону А непрерывной паровой фазы, где он контактирует с жидким продуктом, подаваемым в эту зону через разбрызгивающую головку 110 или другое устройство для распределения жидкости. Таким образом, биореактор 100 работает с противоположно направленными потоками газа и жидкости (поднимающийся вверх газ и опускающаяся вниз жидкость) в этой зоне, расположенной над зоной В непрерывной жидкой фазы, функционируя с внутренней циркуляцией жидкости, как описано выше. Обе эти зоны могут содержать устройства для осуществления контакта пар-жидкость. Вследствие различий во влиянии на массоперенос между фазами в этих зонах устройства для осуществления контакта пар-жидкость 125А в зоне А могут отличаться от устройств для осуществления контакта пар-жидкость 125В в зоне В, например, по геометрии (например, диаметр и/или толщина) и/или конфигурации их отверстий (например, по размеру, форме, расположению и/или общему числу). В соответствии с некоторыми вариантами реализации в разных зонах могут использоваться совершенно разные типы устройств для осуществления контакта пар-жидкость (например, перфорированные пластины и насадки из насыпных материалов, таких как кольца Рашига). Аналогично, в одной зоне могут использоваться устройства для осуществления контакта пар-жидкость, отличающиеся друг от друга или принадлежащие к совершенно разным типам.

Как будет понятно квалифицированным специалистам в данной области техники, касательно данного описания, многостадийные процессы и системы, описанные в данном документе, ассоциированы с рядом эксплуатационных преимуществ, включая любое одно, любую комбинацию или все из следующего:

(1) устойчивая ферментация (анаэробное биопревращение) с пониженной сложностью.

По сравнению с обычными процессами многостадийные процессы, описанные в данном документе, являются более простыми в эксплуатации и имеют значительно больший "рабочий диапазон" или диапазон условий, пригодных для работы. Это является следствием относительно низких требований к производительности каждого индивидуального биореактора и непрерывной подачей материала, который все реакторы (кроме биореактора первой стадии) получают из непосредственно предшествующего реактора, что стабилизирует ферментацию. Это предпочтительно решает одну из основных задач в данной области техники, а именно эксплуатационной надежности при масштабировании, что необходимо для долгосрочной стабильной коммерческой эксплуатации;

(2) значительное число степеней свободы.

Это обеспечивает больший контроль за метаболизмом бактериальной культуры в процессе ее прохождения через разные фазы роста в каждом биореакторе. Условия на каждой стадии (например, скорость подачи газа, температура и/или заданное значение pH) могут быть отрегулированы с целью контроля выхода ферментации, такого как соотношение метаболитов. Это может приводить к высоким и стабильным титрам товарного продукта. Например, авторы изобретения продемонстрировали высокие и стабильные титры этанола (>60 г/л по результатам непрерывных лабораторных испытаний), очень благоприятные и стабильные весовые соотношения готового жидкого продукта этанол:ацетат (свыше 100, по результатам непрерывных лабораторных испытаний). Соответственно, потенциально может быть реализована очень большая экономия затрат, связанная с использованием культуральной среды и систем рециркуляции воды, в которых побочный продукт ацетат является основным препятствием для прямой рециркуляции;

(3) возможность отделения роста от образования продукта.

Это значительное преимущество для продуцирования биологических товарных продуктов генетически модифицированными клетками, в процессах, в которых индуктор может быть добавлен на более поздних стадиях, после выращивания. Полезный эффект возникает вследствие возможности достижения высокой скорости роста в первой биореакторной стадии, при использовании высокой степени разбавления (т.е., скорости прибавления жидкой культуральной среды), которая создает стабильную гомогенную культуру для остальной части системы;

(4) большая экономия капитальных затрат, без необходимости в системе рециркуляции клеток.

В этом отношении мембраны, корпуса, клапаны и ассоциированные инструменты и средства управления составляют значительную часть общей стоимости биореакторов, особенно в промышленных масштабах. Требования к рециркуляции бактериальных клеток (например, производительность рециркуляционного насоса) также значительно снижены и могут требовать лишь незначительного расхода энергии при эксплуатации внешних петель для циркуляции (например, через разбрызгивающую головку или другой распределитель жидкости, как описано выше);

(5) упрощенная и более надежная работа с уменьшенными затратами.

Это связано с тем, что не требуется мембранное разделение и рециркуляция выделенных клеток на каждой биореакторной стадии. Затраты, связанные с заменой мембран и ручной безразборной очистке (CIP), являются значительными по показателям рабочего времени оператора, химикатов для безразборной очистки (CIP), и нагрева. При этом варианты автоматической безразборной очистки имеют недопустимо высокие капитальные затраты, ферментные растворы для очистки мембран для рециркуляции клеток аналогично являются дорогими, а простые процедуры очистки с помощью NaOH часто неэффективны;

(6) конструкции реакторов большего объема, меньшей длины и с меньшей высотой эрлифтных петель.

Такие конструкции могут легко производиться с использованием имеющихся стандартных промышленных наливных резервуаров, оборудованных внутрикорпусными устройствами. Это связано с более низкими требованиями к производительности биореакторов, и создает возможность значительной экономии затрат при производстве биореакторов. В соответствии с некоторыми вариантами реализации процессы и системы, описанные в данном документе, могут эффективно работать на одном лишь эффекте эрлифтной циркуляции, без использования внешней рециркуляции или петлевых насосов и, следовательно, также позволяют отказаться от ассоциированных с ними внешних трубопроводов и оборудования для рециркуляции. Возможно дополнительное снижение капитальных расходов на управляющие клапана и трубопроводы, в вариантах реализации с использованием простого перетока/контроля уровня напора жидкости между всеми стадиями;

(7) использование низкого рабочего давления.

Это дополнительный эффект более низких требований к производительности для индивидуальных биореакторов. В этом случае высокая степень удержания газа ограничивает скорость потока газа в био-

реактор, если только газ не находится под давлением. Возможность снижения рабочего давления приводит к снижению затрат на сжатие.

Приведенные далее примеры являются типичными для настоящего изобретения. Эти примеры не должны рассматриваться как ограничивающие объем изобретения, поскольку эти и другие эквиваленты вариантов реализации будут понятны с учетом данного описания и приложенной формулы изобретения.

Пример 1. Экспериментальная установка.

Испытательная установка, имеющая шесть стадий, включающих биореакторы, каждый с рабочим объемом 1,5 л (с полным объемом реакторов системы 9 л), использовалась для расширенной оценки многостадийного процесса биологического превращения, описанного в данном документе. Конкретнее, в этих процессах использовались работающие в режиме противотока петлевые реакторы со стеканием жидкости, имеющие основные колонны высотой примерно 1,2 м и диаметром 50 мм, сконструированные из прозрачного ПВХ-пластика для наблюдения за гидродинамическими параметрами. Пятая и шестая стадии имели немного более высокие главные колонны. Пластмассовый центробежный насос низкого давления (аквариумный, 500-2000 л/ч) на дне каждой колонны использовался для рециркуляции жидкости в распределитель жидкости с полноконусной разбрызгивающей головкой в верхней части колонны. Перепад давления на каждой разбрызгивающей головке был низким, порядка 20-40 кПа.

Газ поступал на каждую биореакторную стадию отдельно и вблизи дна колонн, через изготовленные путем спекания барботеры из нержавеющей стали. Неиспользованный и нерастворенный газ выходил в верхнюю часть каждой колонны, над разбрызгивающей головкой. Все шесть стадий работали при давлении, близком к атмосферному. Каждая стадия была соединена по жидкости со следующей (для перемещения жидких продуктов) с помощью трубопроводов из нержавеющей стали с малыми внутренними диаметрами (внутренний диаметр трубки 1,5 мм), присоединенных ко дну каждой основной колонны, сразу под их соответствующими барботерами. Жидкая культуральная среда подавалась на первую стадию и перемещалась по системе биореакторных стадий под воздействием одного лишь напора жидкости. Конечная или шестая стадия использовалась для контроля уровней жидкости в реакторах всей системы путем использования регулируемой по высоте точки отбора жидкости. Каждая стадия была оснащена отдельными линиями подачи химикатов и контролем температуры. За исключением двух последних стадий (т.е., пятой и шестой стадий), стадии были также оборудованы средствами измерения pH и системами управления.

Пример 2. Начальный пробный период работы.

Начальный период работы был предназначен для испытания эффективности многостадийной биореакторной системы при биологическом превращении СО в газообразном СО-содержащем субстрате в этанол и другие метаболиты, в присутствии бактериальной культуральной среды, содержащей *C. autoethanogenum*. Был использован упрощенный вариант испытательной установки, описанной в примере 1, без разбрызгивателей в свободном пространстве над продуктом, т.е., зона непрерывной паровой фазы представляла собой открытую трубу. Также не использовались какие-либо барботеры, т.е., газ подавался в зону непрерывной жидкой фазы через открытую трубку с внутренним диаметром 3 мм. Контроль температуры в биореакторах пятой и шестой стадий отсутствовал, и контроль уровня жидкости осуществлялся с помощью системы простого перетока жидкости (общий выпускной патрубок газа). Работа в режиме биопревращения достигала стабильного роста бактерий за 2 недели, с постепенным достижением рабочего режима с >43 г/л по производству этанола при <2 г/л продуцирования ацетата, в пересчете на жидкий продукт заключительной стадии, отбираемый из биореактора шестой стадии. Степень разбавления при стабильном режиме работы, или прибавление жидкой культуральной среды, составляла приблизительно 2,5 мл/мин (или примерно 2,3 объема реактора в день для каждого биореактора). Эти результаты подтвердили возможность использования системы для контроля уровня жидкости с помощью перетока, хотя наблюдалось удаление некоторого количества генерирующих массоперенос поверхностно-активных веществ с верхнего уровня жидкости начальных биореакторных стадий, что снижало массоперенос.

Пример 3. Модифицированный режим работы, основанный на результатах гидродинамических наблюдений.

Во втором режиме работе были выполнены модификации с целью получения испытательной установки, как она, по существу, описана в примере 1. Эти модификации, основанные на оценке результатов гидродинамических наблюдений за испытаниями, описанными в примере 2, включали создание соединений типа "только жидкость" между стадиями, с использованием трубок из нержавеющей стали с внутренним диаметром 1,5 мм, присоединенных ко дну колонн. Было определено, что этот диаметр достаточно мал для того, чтобы предотвращать обратное перемешивание при рабочих скоростях прибавления культуральной среды (степенях разбавления). С учетом этих жидкостных соединений в днищах реакторов в систему было добавлено для контроля уровня жидкости на выходе шестого биореактора выпускное отверстие для жидкого продукта заключительной стадии с регулируемой высотой. Также полноконусные разбрызгиватели в свободном пространстве над продуктом были установлены во всех биореакторах для распределения жидкости, и системы контроля температуры были добавлены во внешние петли для рециркуляции жидкости последних двух реакторных стадий. Отдельные газоотводы были предусмотрены

для всех шести биореакторов в отличие от объединения газообразных продуктов, содержащих неиспользованный CO, как описано в примере 2.

Были проведены 48-дневные испытания реакции биологического превращения, описанные в примере 2, со стабильной работой. В условиях непрерывной работы производительность и качество продукта имели очень благоприятные значения. Например, на протяжении 10-дневного периода работы со стабильными параметрами режима работы (например, давлением, температурами, скоростями потоков, значениями pH и т.д.) достигнутый титр жидкого продукта заключительной стадии этанола составлял в среднем более 61 г/л, а титр ацетата (уксусной кислоты) составлял в среднем всего 0,6 г/л (массовое (w/w) соотношение этанол/уксусная кислота около 100:1 или больше). Титр 2,3-бутандиола составлял в среднем 8,4 г/л. Эти результаты были достигнуты при добавлении жидкой культуральной среды со скоростью около 2,5 мл/мин (или при степени разбавления, равной около 2,3 объемов реактора в день для каждого биореактора). Важно, что на протяжении 33 дней непрерывной работы титры этанола стабильно держались выше 50 г/л, с неожиданно высокими титрами более 70 г/л в течение 3 дней и даже пиковым значением титра 76 г/л в ходе эксплуатации. При увеличении скорости добавления культуральной среды во вторую, третью и четвертую биореакторные стадии для получения степени разбавления 3,5 объемов реактора в день в последнем биореакторе, жидкий продукт заключительной стадии содержал более 50 г/л этанола. Эксплуатационные характеристики, достигнутые на протяжении этого продолжительного периода работы, представлены на фиг. 3, где приведены концентрации, в жидком продукте заключительной стадии, этанола и других метаболитов, а именно уксусной кислоты и 2,3-бутандиола, а также концентрация микроорганизмов (биомассы). Профили метаболитов (концентрации этанола, уксусной кислоты и 2,3-бутандиола) для жидких продуктов каждой стадии представлены на фиг. 4, по результатам определения в образцах жидкого продукта, взятых за 23 дня работы на потоке. Фиг. 4 показывает, в частности, быстро увеличивающиеся концентрации этанола, получаемого на последовательных стадиях, и в то же время лишь очень незначительное увеличение концентрации 2,3-бутандиола и снижение концентрации ацетата (уксусной кислоты). Результаты этого эксперимента включали показатели утилизации CO для индивидуальных биореакторных стадий, равные 65-75% при стабильной работе в начале 48-дневных испытаний, которые возросли до 80-90% в более поздние периоды времени, когда были достигнуты более высокие титры этанольного продукта. Эти результаты указывают на очень высокие коэффициенты массопередачи для колонны/петлевых реакторов такого масштаба.

Предпочтительно высокие титры товарного продукта этанола и исключительно стабильная работа были достигнуты, по меньшей мере частично, благодаря размещению трубопроводов подачи жидкости на дне реакторов и добавлению распределителей жидкости в свободном пространстве реакторов над продуктом. Это позволяло уменьшить некоторые недостатки, связанные с накоплением пены и предпочтительным выносом химических добавок с поверхности жидкой фазы. В общем, как массоперенос, так и контроль за ходом технологического процесса значительно улучшились в результате модификаций, проведенных в период между испытаниями, описанными в примерах 2 и 3. Кроме того, уровни поверхностей раздела газ-жидкость стабильно находились в верхней части соответствующих колонн/реакторов и более легко контролировались независимо от фактического запаса жидкости (реального объема жидкости). Таким образом, величина задержки могла напрямую контролироваться с помощью запаса жидкости, который в случае многостадийной биореакторной системы, используемой в примере 3, в свою очередь, регулировался с помощью внешней сливной линии. Эта линия, используемая для отбора жидкого продукта последней биореакторной стадии, была соединена с разрядным устройством сифона с регулируемой высотой, что позволяло установить любой желательный уровень жидкой фазы в колоннах. Особенно хорошие результаты были получены при гидростатической высоте на уровне верхних около 30-50% длины реактора (например, номинально 40% задержки).

На основании результатов, полученных в примерах 2 и 3, процессы и системы, описанные в данном документе, обладают исключительно высоким потенциалом для улучшения массопереноса пар-жидкость, при относительно низкой потребности в дополнительном подводе энергии и/или капитальных затратах или даже без такой потребности. Процесс упрощен, и экономия затрат может достигаться, например, путем устранения расходов, связанных, по меньшей мере, с некоторыми системами мембранного разделения и/или системами контроля уровня (и связанными с ними расходомерами, насосами, управляющими клапанами и другой контрольно-измерительной аппаратурой и оборудованием).

В общем, аспекты изобретения касаются многостадийных биореакторных процессов с использованием конкретных конфигураций потоков пара и жидкости, как описано выше, что приводит к ряду технологических преимуществ, особенно в отношении достижения высокой производительности по желательному товарному продукту, в сочетании с простотой изготовления ассоциированных систем.

Квалифицированным специалистам в данной области техники на основании знаний, полученных из данного описания, будет понятно, что могут быть выполнены различные изменения, не выходящие за пределы объема настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Многостадийный процесс превращения источника C1-углерода в конечный продукт, включающий

подачу газообразного C1-содержащего субстрата, по параллельной схеме, в первую биореакторную стадию и, по меньшей мере, вторую биореакторную стадию многостадийного процесса;

подачу по меньшей мере части жидкого продукта первой стадии, по последовательной схеме, из первой биореакторной стадии во вторую биореакторную стадию,

причем жидкий продукт первой стадии содержит C1-фиксирующий микроорганизм, используемый в первой биореакторной стадии для метаболизирования источника C1-углерода и получения конечного продукта,

причем C1-фиксирующий микроорганизм является организмом рода, выбранного из группы, состоящей из *Moorella*, *Clostridia*, *Ruminococcus*, *Acetobacterium*, *Eubacterium*, *Butyrivacterium*, *Oxobacter*, *Methanosarcina* и *Desulfotomaculum*,

при этом конечный продукт выбран из группы, состоящей из этанола, ацетата, бутанола, бутирата, 2,3-бутандиола, лактата, бутена, бутадиена, метилэтилкетона (2-бутанона), этилена, ацетона, изопропанола, липидов, 3-гидроксипропионата (3-HP), изопрена, жирных кислот, 2-бутанола, 1,2-пропандиола и 1-пропанола.

2. Процесс по п.1, отличающийся тем, что жидкий продукт первой стадии подается во вторую биореакторную стадию без сепарации C1-фиксирующего микроорганизма и рециркуляции выделенного C1-фиксирующего микроорганизма в первую биореакторную стадию.

3. Процесс по п.1, включающий по меньшей мере четыре биореакторные стадии, в котором газообразный C1-содержащий субстрат подается параллельно на стадии и жидкие продукты, включая жидкий продукт первой стадии, подаются последовательно от первой биореакторной стадии до последней биореакторной стадии, затем отбирается из последней биореакторной стадии.

4. Процесс по п.3, отличающийся тем, что общая утилизация C1 по меньшей мере четырех биореакторных стадий составляет по меньшей мере 60%.

5. Процесс по п.3, отличающийся тем, что жидкий продукт заключительной стадии, после его отбора из последней биореакторной стадии, поступает в устройство регулирования уровня жидкости, которое управляет уровнями жидкости во всех биореакторных стадиях.

6. Процесс по п.3, отличающийся тем, что по меньшей мере четыре биореакторные стадии работают при давлении, менее чем на 200 кПа превышающем атмосферное давление.

7. Процесс по п.1, отличающийся тем, что конечный продукт представляет собой этанол и, помимо этанола, C1-фиксирующий микроорганизм генерирует уксусную кислоту в качестве метаболита.

8. Процесс по п.7, дополнительно включающий отбор жидкого продукта заключительной стадии из последней биореакторной стадии многостадийного процесса, отличающийся тем, что не содержащая биомассы жидкая фракция жидкого продукта заключительной стадии содержит по меньшей мере 50 г/л этанола.

9. Процесс по п.8, отличающийся тем, что не содержащая биомассы жидкая фракция жидкого продукта заключительной стадии имеет весовое отношение этанола к уксусной кислоте, равное по меньшей мере 50:1.

10. Процесс по п.1, отличающийся тем, что конечный продукт выбран из группы, состоящей из изопропанола, бутанола, ацетата, ацетона, 2-оксиизомасляной кислоты и изобутилена.

11. Процесс по п.10, дополнительно включающий отбор жидкого продукта заключительной стадии из последней биореакторной стадии многостадийного процесса, отличающийся тем, что не содержащая биомассы жидкая фракция жидкого продукта заключительной стадии содержит по меньшей мере 10 г/л изопропанола.

12. Процесс по п.1, отличающийся тем, что первая и вторая биореакторные стадии имеют по меньшей мере один независимо контролируемый рабочий параметр процесса, выбранный из группы, состоящей из скорости прибавления жидкой культуральной среды, скорости подачи газообразного C1-содержащего субстрата, температуры реактора, значения pH реактора и их комбинаций.

13. Процесс по п.1, отличающийся тем, что по меньшей мере одна из первой и второй биореакторных стадий содержит биореактор, имеющий отношение длины к ширине менее 10:1.

14. Процесс по п.1, отличающийся тем, что по меньшей мере одна из первой и второй биореакторных стадий содержит биореактор с петлей циркуляции.

15. Процесс по п.14, отличающийся тем, что биореактор с петлей циркуляции работает с внутренней циркуляцией жидкости в зоне непрерывной жидкой фазы.

16. Процесс по п.15, отличающийся тем, что в зоне непрерывной жидкой фазы жидкость течет вверх по внутреннему подъемному стояку и вниз по одной или нескольким внутренним сливным трубкам.

17. Процесс по п.15, отличающийся тем, что биореактор с петлей циркуляции работает с потоками газа и жидкости в противотоке в зоне непрерывной паровой фазы, над зоной непрерывной жидкой фазы.

18. Процесс по п.17, отличающийся тем, что зона непрерывной жидкой фазы размещена на участке нижних 75% длины биореактора с петлей циркуляции.

19. Процесс по п.17, отличающийся тем, что зона непрерывной жидкой фазы и зона непрерывной газовой фазы содержат устройства для осуществления контакта пар-жидкость, причем устройства зоны непрерывной жидкой фазы отличаются от устройств зоны непрерывной паровой фазы.

20. Процесс по п.17, отличающийся тем, что жидкий продукт, рециркулируемый через внешнюю петлю рециркуляции, находится в зоне непрерывной паровой фазы.

21. Процесс по п.20, отличающийся тем, что жидкий продукт, рециркулируемый через внешнюю петлю рециркуляции, пропускается через внешний теплообменник для контроля температуры биореактора с петлей циркуляции.

22. Процесс по п.20, отличающийся тем, что основной нейтрализующий агент прибавляют к жидкому продукту, рециркулируемому через внешнюю петлю рециркуляции, для контроля pH биореактора с петлей циркуляции.

23. Многостадийная система для осуществления способа по любому из пп.1-22, содержащая множество биореакторов, имеющих впускной патрубок газа на первом конце и выпускной патрубок газа на втором конце напротив первого конца, причем впускные и выпускные патрубки газа обеспечивают возможность подачи газообразного C1-содержащего субстрата во множество биореакторов, по параллельной схеме,

причем биореакторы, но не первый биореактор или последний биореактор, имеют отдельные впускные и выпускные патрубки жидкости вблизи их соответствующих первых концов для подачи жидкого продукта предшествующей стадии, содержащего биомассу, из непосредственно предшествующего биореактора и перемещения жидкого продукта, содержащего биомассу, в непосредственно последующий биореактор, по последовательной схеме; и

выпускной патрубок жидкого продукта для подачи жидкого продукта заключительной стадии из последнего биореактора вблизи его первого конца,

причем жидкий продукт заключительной стадии выбран из группы, состоящей из этанола, ацетата, бутанола, бутирата, 2,3-бутандиола, лактата, бутена, бутадиена, метилэтилкетона (2-бутанона), этилена, ацетона, изопропанола, липидов, 3-гидроксипропионата (3-HP), изопрена, жирных кислот, 2-бутанола, 1,2-пропандиола и 1-пропанола.

24. Система по п.23, отличающаяся тем, что выпускное отверстие жидкого продукта сообщается по текучей среде с разрядным устройством сифона, который является регулируемым по высоте, по отношению к высоте биореакторов.

25. Система по п.23, отличающаяся тем, что впускные патрубки газа сообщаются по текучей среде с барботерами газа во множестве биореакторов вблизи их первых концов.

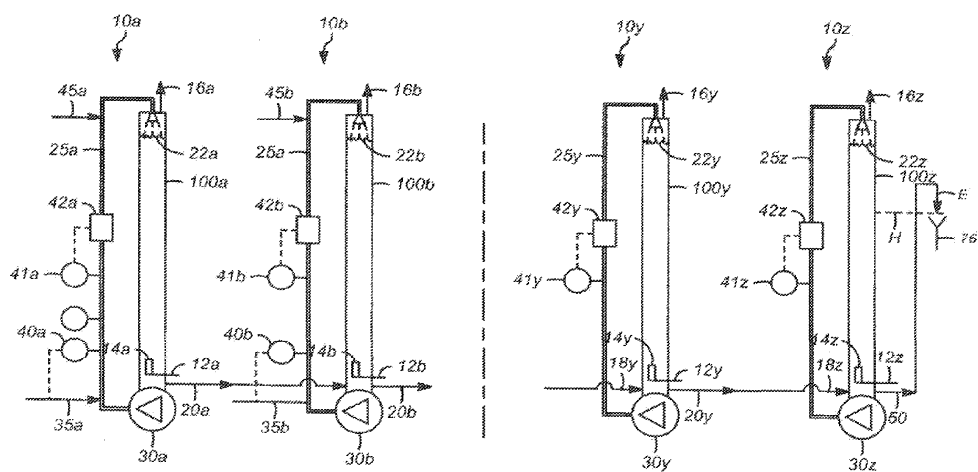
26. Многостадийный биологический процесс превращения CO в этанол, включающий разделение газообразного CO-содержащего субстрата, по параллельной схеме, между множеством биореакторных стадий многостадийного процесса;

последовательную подачу жидких продуктов, содержащих карбоксидотрофный микроорганизм, по последовательной схеме, из первой биореакторной стадии в последующие биореакторные стадии;

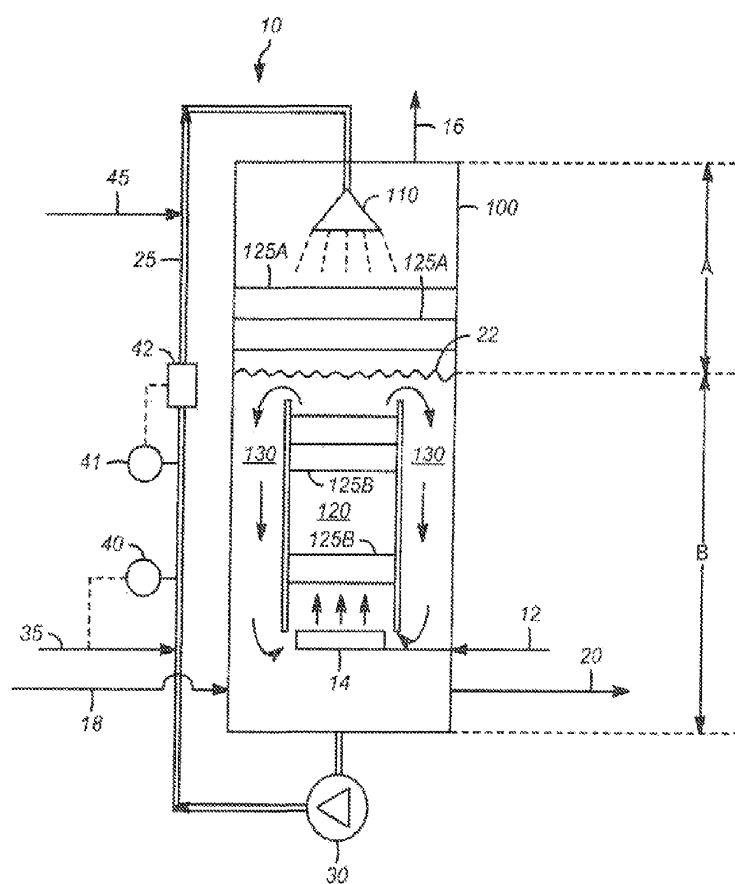
отбор из последней биореакторной стадии жидкого продукта заключительной стадии с не-карбоксидотрофным микроорганизмом, содержащего жидкую фракцию, содержащую по меньшей мере 50 г/л этанола и имеющую весовое отношение этанола к уксусной кислоте, равное по меньшей мере 50:1.

27. Процесс по п.26, включающий по меньшей мере четыре биореакторные стадии.

28. Процесс по п.26, отличающийся тем, что две или больше из множества биореакторных стадий представляют собой отдельные секции в одной емкости.

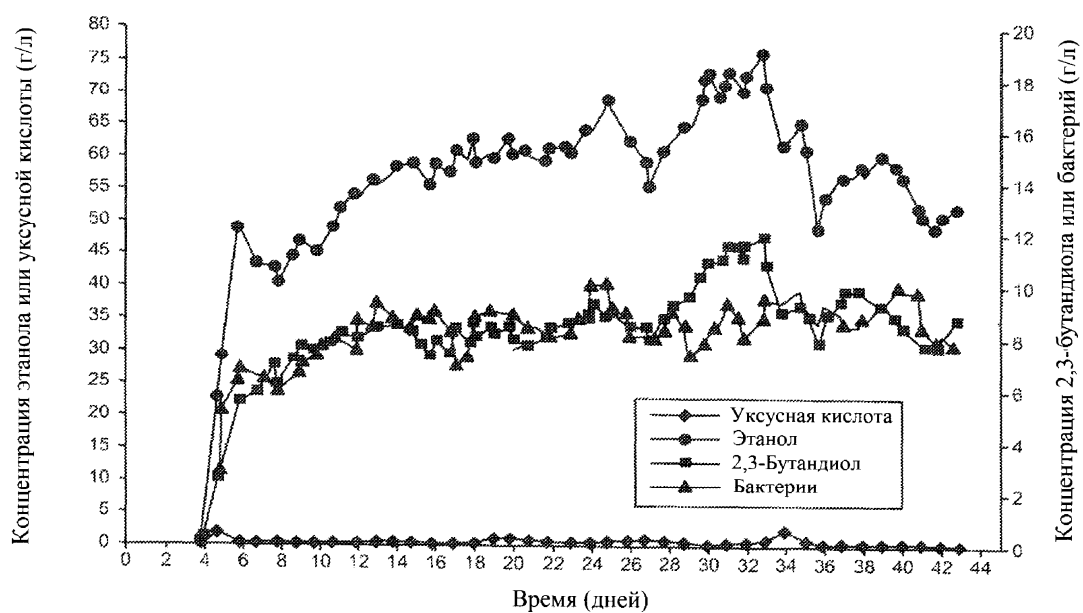


Фиг. 1



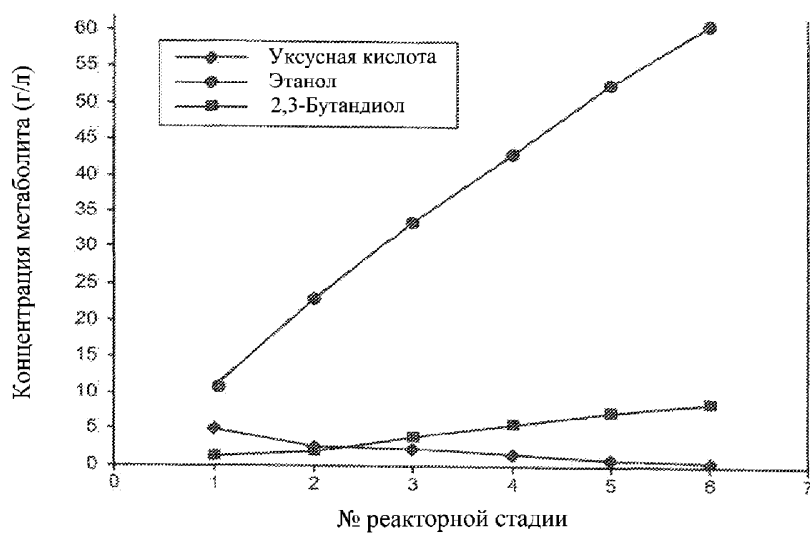
Фиг. 2

Характеристики многостадийного биореакторного процесса на протяжении длительного периода работы

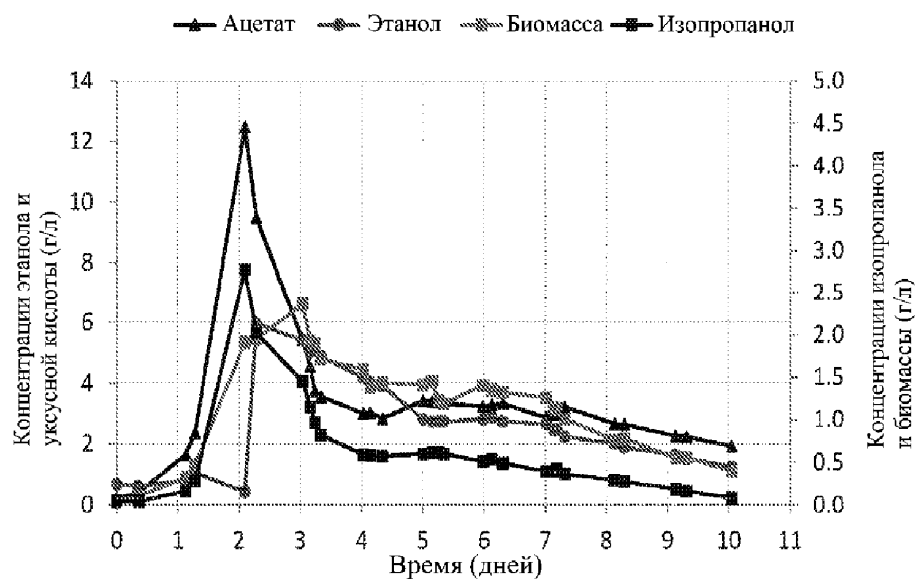


Фиг. 3

Концентрации метаболитов в жидком продукте реакторов на последовательных стадиях



Фиг. 4



Фиг. 5А



Фиг. 5В



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2