

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036274**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.10.21

(21) Номер заявки
201790865

(22) Дата подачи заявки
2015.10.21

(51) Int. Cl. **G01N 30/88** (2006.01)
G01N 30/62 (2006.01)
G01N 33/00 (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01)
C12M 3/00 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

(54) УСТАНОВКА И СПОСОБ АНАЛИЗА ГАЗА

(31) **62/067,392**

(32) **2014.10.22**

(33) **US**

(43) **2017.08.31**

(86) **PCT/US2015/056783**

(87) **WO 2016/065085 2016.04.28**

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

(72) Изобретатель:
**Хейстра Бьорн Дэниел, Симпсон Шон
Деннис, Бурдакос Николас, Бромли
Джейсон Карл, Яп Кай-Мин (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) **WO-A2-0208438
WO-A1-2011139163
US-A1-20070298478
WO-A1-2009058028
US-A-4568644**

(57) Описаны устройства и соответствующие способы для эффективной оценки субстратов, содержащих C1, и, в частности, для осуществления такой оценки локально или на месте предполагаемой промышленной установки для реализации процесса биологического превращения в требуемый конечный продукт с применением источника углерода C1. Точный состав данного промышленного субстрата, содержащего C1, а также диапазон колебаний состава обычно трудно воспроизвести на удаленной установке (например, в лабораторном, или пилотном, или демонстрационном процессе), но это необходимо для точного прогнозирования/моделирования промышленных характеристик для обоснования крупных капитальных инвестиций в промышленное производство.

036274 B1

036274 B1

Область техники

Аспекты настоящего изобретения относятся к устройствам, которые включают отдельные ступени биореактора для сравнительной оценки характеристик анализируемого субстрата, содержащего CO, относительно эталонного субстрата, содержащего CO. Преимущественно такие устройства могут быть расположены в контейнере, подходящем для транспортировки (например, к месту производства промышленного отработанного газа, содержащего CO).

Описание области техники

Озабоченность экологическими проблемами, связанными с выбросом парниковых газов при сжигании ископаемого топлива (GHG), обуславливает растущий интерес к возобновляемым источникам энергии. Как следствие, во всем мире этанол быстро становится главным жидким топливом для транспорта с высоким содержанием водорода. В обозримом будущем ожидается постоянный рост мирового рынка для промышленности топливного этанола на основании растущего внимания к производству этанола в Европе, Японии и США, а также в некоторых развивающихся странах. Например, в США этанол используют для получения E10, который представляет собой 10% смесь этанола в бензине. В смесях E10 компонент этанола действует как окислительный агент, повышающий эффективность сжигания и снижающий образование веществ, загрязняющих атмосферу. В Бразилии этанол удовлетворяет приблизительно 30% потребности в транспортном топливе, как в виде окислительного агента, смешанного с бензином, так и самостоятельно, в виде чистого топлива. Кроме того, в Европейском союзе (ЕС) установлены санкционированные требования для каждой страны-члена ЕС в отношении потребления экологически безопасных видов транспортного топлива, таких как этанол, полученный из биомассы.

Подавляющее большинство топливного этанола получают традиционным способом дрожжевой ферментации, в которой в качестве основного источника углерода используют углеводы из зерновых культур, такие как сахароза, выделенная из сахарного тростника, или крахмал, выделенный из зерновых культур. Однако стоимость такого углеводородного сырья зависит от его цены в конкурирующих рыночных нишах, а именно в качестве источника пищи для людей и животных. Кроме того, выращивание крахмалосодержащих или сахаросодержащих культур для производства этанола экономически обосновано не во всех регионах и зависит от локальных цен на землю и климата. Поэтому существует особый интерес к разработке технологий для превращения более дешевых и/или более распространенных углеродных источников для топливного этанола. В этом отношении монооксид углерода (CO) представляет собой главный, высокоэнергетический побочный продукт неполного сгорания органических материалов, таких как уголь, нефть и продукты нефтепереработки. Отработанные газы с высоким содержанием CO образуются во многих промышленных процессах. Например, описано, что черная металлургия Австралии ежегодно производит и выбрасывает в атмосферу свыше 500000 т CO.

Позже объектом промышленного интереса и инвестиций стали альтернативные способы получения этанола из CO с применением микроорганизмов (бактерий) в промышленном масштабе. Способность культур микроорганизмов расти на CO, как на единственном источнике углерода, была впервые открыта в 1903 г. Позже было установлено, что такая способность основана на использовании организмами биохимического пути аутоτροφного роста ацетил-кофермента А (ацетил-CoA) (также известного как путь Вуда-Льюнгдалля и путь дегидрогеназы монооксида углерода/синтазы ацетил-CoA (CODH/ACS)). С тех пор было показано, что большое количество анаэробных организмов, включая карбоксидотрофные, фотосинтезирующие, метаногенные и ацетогенные организмы, метаболизируют CO. Известно, что анаэробные бактерии, такие как бактерии рода *Clostridium*, вырабатывают этанол из CO, CO₂ и H₂ посредством биохимического пути ацетил-CoA. Например, различные штаммы *Clostridium ljungdahlii*, которые вырабатывают этанол из газов, описаны в WO 00/68407; EP 1117309 A1; US 5173429; US 5593886; US 6368819; WO 98/00558 и WO 02/08438. Бактерии *Clostridium autoethanogenum* sp, как известно, также вырабатывают этанол из газов (Abrini et al., Archives of Microbiology 161: 345-351 (1994)).

Поскольку каждый фермент организма ускоряет особое биологическое превращение, по существу, с идеальной селективностью, то микробиологические способы синтеза могут обеспечивать достижение более высокого выхода при более низких энергетических затратах по сравнению с обычными каталитическими способами. Например, могут быть снижены затраты 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. Однако несмотря на указанные очевидные преимущества, в данной области техники должны быть преодолены определенные трудности, связанные в настоящее время с микробиологическим синтезом этанола из CO, в частности, с точки зрения обеспечения такой производительности, которая может конкурировать с другими технологиями. При использовании CO в качестве источника углерода, анаэробные бактерии, описанные выше, вырабатывают этанол посредством ферментации, но они также вырабатывают по меньшей мере один метаболит, например CO₂, метан, н-бутанол и/или уксусную кислоту. Образование любого из указанных метаболитов потенциально может значительно влиять на производительность и общую экономическую обоснованность данного процесса, поскольку ценный углерод теряется вместе с метаболитом(ами), и эффективность производства требуемого конечного продукта снижается. Кроме того, если сам метаболит (например, уксусная кислота) не имеет определенной ценности во

время и в месте проведения микробиологического ферментативного процесса, он может создавать проблему утилизации отходов. Различные предложения, направленные на решение проблем образования продуктов, отличных от требуемого конечного продукта, при анаэробной ферментации газов, содержащих CO, для получения этанола, описаны в WO 2007/117157, WO 2008/115080 и WO 2009/022925.

Производительность по этанолу, которая является основным показателем экономической привлекательности данного ферментативного процесса, в значительной степени зависит от регулирования соответствующих условий бактериального роста. Например, из WO 2010/093262 известно, что субстрат, содержащий CO, необходимо подавать в микробиологическую культуру с такой скоростью, которая обеспечивает оптимальный микробиологический рост и/или получение требуемого метаболита. При подаче недостаточного количества субстрата микробиологический рост замедляется, и продукт ферментации смещается в сторону уксусной кислоты в ущерб этанолу. Подача избыточного количества субстрата может приводить к недостаточному микробиологическому росту и/или гибели клеток. Дополнительная информация о взаимосвязи между технологическими параметрами в указанных процессах представлена в WO 2011/002318.

Область техники, касающаяся биологических процессов для получения этанола из CO и, в частности, из отработанных потоков, содержащих CO, таких как газообразные отходы, выделяющиеся при производстве стали и в химической промышленности в целом, постоянно ориентирована на поиск решений, которые улучшают общую экономику процесса (и, следовательно, конкурентоспособность промышленности) и/или которые вселяют большую уверенность в возможности внедрения относительно новых технологий в промышленном масштабе. В этом отношении промышленные характеристики данной бактериальной культуры могут быть чувствительны к конкретному источнику субстрата, содержащего CO, и, в частности, к типу и количеству примесей, которые могут присутствовать в потоках газообразных отходов конкретного промышленного оператора (например, производителя стали), помимо колебаний состава газа. Крупные инвестиции в промышленный процесс биологического превращения представляют собой трудное финансовое обязательство, если предполагаемые риски, связанные с непроверенным, местным субстратом, содержащим CO, и системами обеспечения (например, источником воды), считаются слишком высокими. Следовательно, эффективные средства достижения уверенности клиента/инвестора в данной технологии имеют большое значение для продвижения процессов биологического превращения для производства этанола в промышленную реальность.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к разработке устройств и сопутствующих способов эффективной оценки субстратов, содержащих C1, и особенно оценки, осуществляемой локально или на производственной площадке, на предполагаемых мощностях для внедрения процесса биологического превращения для производства этанола из источника углерода C1. Как правило, субстрат, содержащий C1, содержит по меньшей мере один источник углерода C1, выбранный из группы, состоящей из CO, CO₂ и CH₄. Важно отметить, что было установлено, что точный состав данного промышленного субстрата, содержащего C1, зачастую трудно воспроизводить на удаленных мощностях (например, в лаборатории, или в пилотных, или в демонстрационных процессах), по меньшей мере, в той степени, которая необходима для точного прогнозирования промышленных характеристик. Важно отметить, что без достаточной уверенности в том, что данный процесс может обеспечивать достижение требуемых характеристик, крупные капитальные вложения, необходимые для увеличения масштаба (например, проектирования и разработки процесса) не могут быть оправданы. В этом отношении даже следовые количества некоторых примесей (например, углеводородов или углеводородов, содержащих гетероатом) могут неблагоприятно влиять на бактериальную культуру, которая представляет собой жидкую систему, склонную экстрагировать такие более тяжелые молекулы из субстрата, содержащего C1, в результате чего указанные молекулы накапливаются во внутреннем и внешнем рециркуляционном контуре жидкости в биореакторе. Кроме того, колебания состава локального газа также трудно воспроизвести в автономных испытательных установках, и во многих случаях степень таких колебаний не может быть известна или оценена без непосредственного, локального доступа к субстрату, содержащему C1. Кроме того, следует дополнительно оценить и подтвердить пригодность других аспектов, которые могут быть важными для расположения предполагаемого промышленного предприятия биологического превращения (например, локального источника воды, который будет использован в среде бактериальной культуры), прежде чем принимать решения о крупных инвестициях.

Преимущественно устройства и способы, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для идентификации и устранения причин неоптимальных характеристик (например, производительности по метаболитам и/или использования субстрата). Степень, до которой должна быть реализована или улучшена предварительная обработка субстрата, содержащего C1, и/или других технологических добавок из локального источника, может быть преимущественно определена до начала эксплуатации в промышленном масштабе, что улучшает точность промышленного проектирования и сопутствующих прогнозируемых расходов. Кроме того, демонстрация эффективности на месте проведения работ служит для поставщика и потребителя дополнительным подтверждением рациональности предполагаемого процесса биологического превращения, работы с локальными (т.е. фактическими или промышленными) по-

ставками субстрата, содержащего C1, и возможно другими локальными добавками.

Конкретные варианты реализации настоящего изобретения относятся к установкам для анализа газа, содержащим две ступени биореактора, и во многих случаях использующим только две ступени биореактора, содержащим достаточно измерительных приборов, технологического оборудования, и имеющим аналитическую возможность сравнительной оценки исследуемого субстрата, содержащего C1, и, что важно, имеющим достаточные ограничения по размеру для обеспечения возможности транспортировки.

В одном аспекте настоящего описания представлена установка для анализа газа, содержащая: (a) первую ступень биореактора для оценки характеристик эталонного субстрата, содержащего C1; (b) вторую ступень биореактора для оценки характеристик исследуемого субстрата, содержащего C1; и (c) аналитическую секцию, выполненную с возможностью анализа газообразных и жидких продуктов из первого и второго биореакторов; при этом установка для анализа газа может быть установлена в контейнере, имеющем объем менее чем примерно 6 м^3 , который может быть перевезен на различные участки.

Установка для анализа газа может быть установлена в ящике, имеющем размеры длины, ширины и высоты менее 1,8 м в каждом направлении, или менее примерно 1,6 м в каждом направлении, или менее 1,3 м в каждом направлении. В некоторых вариантах реализации ящик имеет один из размеров длины, ширины и высоты менее чем примерно 1,6 м, а два других размера из длины, ширины и высоты менее чем примерно 1,3 м.

Аналитическая секция системы для анализа газа содержит газовый хроматографический (ГХ) анализатор, имеющий первую и вторую хроматографическую колонки, выполненные с возможностью анализа газообразных и жидких продуктов соответственно.

Биореакторы первой и второй ступеней биореактора содержат циркуляционный петлевой биореактор. Первая и вторая ступени биореактора дополнительно содержат внешние контуры рецикла и рециркуляционные насосы для повторного использования жидкости, извлекаемой вблизи нижних частей биореакторов, в ближайшие противоположные верхние части биореакторов.

Установка для анализа газа может дополнительно содержать систему оперативного управления для регулирования одного или более технологических параметров, выбранных из группы, состоящей из скорости добавления свежей культуральной среды, скорости подачи газообразного субстрата, содержащего C1, температуры реактора и pH реактора. В некоторых вариантах реализации один или более технологических параметров включают pH реактора, а система управления содержит приборы для регулирования потока основного нейтрализующего агента в биореактор на основании измеренного pH в реакторе.

В некоторых вариантах реализации установка для анализа газа содержит систему обеспечения безопасности для приостановки потока по меньшей мере одного исследуемого субстрата, содержащего C1, или эталонного субстрата, содержащего C1, в ответ значению измеренной рабочей концентрации C1, превышающей пороговую концентрацию.

Во втором аспекте настоящего описания представлен способ оценки пригодности испытываемого субстрата, содержащего C1, для применения в процессе биологического превращения, включающий: (a) подачу эталонного субстрата, содержащего C1, в первый биореактор, содержащий первую культуру микроорганизма, усваивающего C1; (b) подачу исследуемого субстрата, содержащего C1, во второй биореактор, содержащий вторую культуру микроорганизма, усваивающего C1; и (c) анализ газообразных и жидких продуктов из первого и второго биореакторов для определения характеристик первого и второго биореакторов; при этом пригодность исследуемого субстрата, содержащего C1, определяют путем сравнения характеристик первого биореактора с характеристиками второго биореактора. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере часть стадии (a) и стадии (b) осуществляют одновременно.

В некоторых вариантах реализации микроорганизм, усваивающий C1, представляет собой карбоксидотрофный микроорганизм из рода *Clostridium*. Предпочтительно микроорганизм, усваивающий C1, выбран из группы, состоящей из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei*.

В конкретном варианте реализации способ включает подачу эталонного субстрата, содержащего C1, во второй биореактор с последующей подачей исследуемого субстрата, содержащего C1, во второй биореактор на стадии (b).

Исследуемый субстрат, содержащий C1, представляет собой поток промышленного отработанного газа, содержащего C1, который предварительно обработан для удаления примесей. В некоторых вариантах реализации исследуемый субстрат, содержащий C1, представляет собой поток сырьевого промышленного газа. В некоторых вариантах реализации способ включает анализ исходного субстрата, содержащего C1, для определения возможности осуществления биологического процесса на неочищенном потоке отработанного газа.

В одном из вариантов реализации стадия (c) анализа включает измерение концентраций C1 в газообразных продуктах первого и второго биореакторов и измерение концентраций этанола и по меньшей мере одного дополнительного метаболита в жидких продуктах первого и второго биореакторов. Кроме того, в соответствии с настоящим изобретением по меньшей мере одна из первой и второй культур микроорганизмов, усваивающих C1, может содержать культуральную среду, полученную с применением

или с добавлением воды из местного источника. В некоторых вариантах реализации характеристики первой и второй культур анализируют одновременно в течение экспериментального периода по меньшей мере примерно 7 дней.

В дополнительном аспекте настоящего описания представлен способ определения того, поддерживает ли исследуемый субстрат, содержащий C1, процесс биологического превращения. Указанный способ включает: (a) раздельное выдерживание первой и второй культур микроорганизмов, усваивающих C1, с применением эталонного субстрата, содержащего C1, в качестве питательной среды для получения этанола и по меньшей мере одного дополнительного метаболита; (b) замену эталонного субстрата, содержащего C1, в качестве питательной среды для второй культуры на исследуемый субстрат, содержащий C1; (c) анализ характеристик первой культуры относительно характеристик второй культуры в таком же наборе требуемых рабочих условий, но с применением других эталонных и исследуемых субстратов, содержащих C1; (d) в случае отсутствия минимального недостатка характеристик второй культуры на стадии (c) - подтверждение того, что исследуемый субстрат, содержащий C1, поддерживает процесс биологического превращения; (e) в случае наличия минимального недостатка характеристик на стадии (c) - предварительную обработку или улучшенную предварительную обработку исследуемого субстрата, содержащего C1, для обеспечения исследуемого субстрата, содержащего C1, более высокого качества относительно исследуемого субстрата, содержащего C1, использованного для оценки характеристик на стадии (c).

В одном из вариантов реализации способ дополнительно включает (f) анализ характеристик первой культуры относительно характеристик третьей культуры в таком же наборе требуемых рабочих условий, но с применением других, эталонных и более качественных исследуемых субстратов, содержащих C1; и (g) в случае отсутствия минимального недостатка характеристик третьей культуры на стадии (f) - подтверждение того, что более качественный исследуемый субстрат, содержащий C1, поддерживает процесс биологического превращения.

В некоторых вариантах реализации используют различные источники воды для получения первой и второй культур или для подпитки первой и второй культур.

Эти и другие варианты реализации, аспекты и преимущества, связанные с настоящим изобретением, станут понятны из следующего подробного описания.

Краткое описание графических материалов

Более полное понимание иллюстративных вариантов реализации настоящего изобретения и его преимуществ может быть получено со ссылкой на следующее описание с учетом сопроводительных фигур, на которых одинаковые элементы обозначены одинаковыми ссылочными номерами (например, биореактор 100 на фиг. 1A и биореакторы 100a, 100b на фиг. 2).

На фиг. 1A и 1B представлен вид в разрезе сбоку и сзади, соответственно, иллюстративных установок для анализа газа, пригодных для транспортировки, описанных в настоящем документе.

На фиг. 2 представлен вид крупным планом иллюстративных биореакторов для применения в установках для анализа газа, описанных в настоящем документе, и представлены дополнительные подробности, связанные с их эксплуатацией.

На фиг. 3 представлена схема, демонстрирующая иллюстративную методику, которая может быть осуществлена с применением установок для анализа газа, описанных в настоящем документе, для определения пригодности исследуемого субстрата, содержащего C1, необязательно после осуществления одного или более корректирующих действий, описанных в настоящем документе (например, повышения его чистоты), для процесса биологического превращения.

Следует понимать, что фиг. 1-3 представляют иллюстрацию представленного описания и/или подразумеваемых принципов. Для облегчения пояснения и понимания на фиг. 1 и 2 изображено упрощенное оборудование и технологические потоки, и относительные размеры различного оборудования не обязательно изображены в масштабе. Детали, включая некоторые клапаны, измерительные приборы и другое оборудование и системы, не принципиальные для понимания настоящего описания, не показаны. Как понятно специалистам в данной области техники, имеющим знания в области настоящего описания, устройства и способы проверки того, что данный субстрат, содержащий C1, и/или локальные добавки поддерживают определенный процесс биологического превращения, имеют конфигурации и компоненты, определяемые отчасти их конкретным применением.

Подробное описание

Настоящее изобретение связано с важным пониманием того, что исследуемый (или местный) субстрат, содержащий C1, может быть эффективно оценен для целей, указанных выше, с применением только выбранной части оборудования, используемого в остальных случаях для осуществления процесса биологического превращения C1 с максимальной производительностью и выходом требуемого продукта. Как правило, субстрат, содержащий C1, содержит по меньшей мере один источник углерода C1, выбранный из группы, состоящей из CO, CO₂ и CH₄. Например, субстрат, содержащий C1, может представлять собой газообразный субстрат, содержащий CO. Субстрат, содержащий C1, также может содержать H₂ и/или N₂. Например, система из параллельных ступеней биореактора с отдельными первым и вторым биореакторами для сравнительного анализа исследуемого газа и эталонного газа может обеспечивать

необходимую информацию для подтверждения того, что локально доступное газообразное сырье и/или добавки поддерживают промышленный процесс даже без достижения промышленных уровней производительности (например, в пересчете на титр жидкого продукта этанола). Необходимо лишь подмножество компонентов реального биореактора, технологических емкостей, измерительных приборов и анализаторов, что обеспечивает возможность вмещения иллюстративных установок для анализа газа в корпус и их транспортировки (например, в грузовом отделении реактивного самолета 747) к предполагаемым мощностям. Определенная эффективность может быть достигнута при наличии лишь двух биореакторов для оценки исследуемого и эталонного газов, соответственно, без внутренних распределительных устройств реактора, необязательно за исключением устройств распределения жидкости (например, разбрызгивающих головок) для подачи жидкости в верхней части биореакторов из внешних петель рецикла. Другое преимущество может быть достигнуто благодаря применению газовой хроматографии (ГХ) для анализа газообразных и жидких продуктов. Еще одно преимущество может быть достигнуто благодаря предотвращению разделения и рецикла микроорганизма, усваивающего C1, на каждой ступени биореактора. Используя эти и другие преимущества, установки для анализа газа могут быть преимущественно изготовлены в пригодном для транспортировки виде (например, воздушным, морским или наземным транспортом) для перевозки на удаленную площадку предполагаемого промышленного завода, осуществляющего процесс биологического превращения для получения этанола из субстрата, содержащего C1. Установки для анализа газа содержат достаточно оборудования для оценки на производственной площадке локально доступного субстрата, содержащего C1, и технологических добавок, таких как вода, но не требуют (i) систем реактора, необходимых для максимизации производительности, и/или (ii) аналитических систем и измерительных приборов для всестороннего мониторинга и контроля всех технологических переменных. Такие требования, как правило, несовместимы с пригодностью к транспортировке. Преимущественно было установлено, что качественные результаты (например, при сравнении с эталонным тестом) в отличие от количественных результатов могут обеспечивать важную оценку для проверки качества газа и/или определения областей, в которых необходимо предпринять корректирующее действие для преодоления недостатка качества.

Настоящее изобретение относится к установкам для анализа газа, которые эксплуатируют при получении требуемого конечного продукта, а также к сопутствующим способам, которые в остальных случаях включают получение требуемого конечного продукта, такого как этанол, из источника биологического превращения C1 углерода в газообразном субстрате, содержащем C1. В первую и вторую ступени биореактора в установках для анализа газа может быть загружен, например, эталонный (или контрольный) субстрат, содержащий C1, и исследуемый (или промышленно доступный) субстрат, содержащий C1, для параллельной или одновременной оценки характеристик, для проведения сравнения, которое обеспечивает полезную информацию с точки зрения определения пригодности конкретного исследуемого субстрата, содержащего C1, в данном процессе. Каждая из ступеней биореактора содержит биореактор, который при эксплуатации содержит жидкую культуральную среду, содержащую микроорганизм, усваивающий C1 (бактериальную культуру). Помимо требуемого конечного продукта в процессах биологического превращения, протекающих в каждой из ступеней биореактора, дополнительно образуются нежелательные или менее желательные метаболиты, которые, как и требуемый продукт (например, этанол), могут быть обнаружены в жидких продуктах, сливаемых из указанных ступеней. Примерами таких метаболитов являются ацетат (например, в форме уксусной кислоты) и 2,3-бутандиол. Термины "ацетат" или "уксусная кислота" относятся к общему ацетату, присутствующему в культуральной среде, в его анионной (диссоциированной) форме (т.е. ацетат-ион или CH_3COO^-) или в форме свободной, молекулярной уксусной кислоты (CH_3COOH), при этом соотношение указанных форм зависит от pH системы. Как описано ниже, может быть использован основной нейтрализующий агент, такой как водный раствор гидроксида аммония (NH_4OH) или водный раствор гидроксида натрия (NaOH), для регулирования pH культуральной среды в данном биореакторе (например, до заданного значения pH, которое может представлять собой любое конкретное значение pH от pH 4,5 до pH 8,0) посредством нейтрализации образовавшейся уксусной кислоты. Иллюстративные диапазоны pH, в которых поддерживают (или регулируют) биореакторы для осуществления процессов, описанных в настоящем документе, обычно представляют собой любое значение (заданную точку) pH в диапазоне от примерно 4,0 до примерно 8,0, например от примерно 5,0 до примерно 6,5 (например, pH 5,0, 5,5 или 6,0).

Иллюстративные бактерии, усваивающие C1, представляют собой бактерии рода *Moorella*, *Clostridia*, *Ruminococcus*, *Acetobacterium*, *Eubacterium*, *Butyribacterium*, *Oxobacter*, *Methanosarcina*, *Methanosarcina* и *Desulfotomaculum*.

"Микроорганизм" представляет собой микроскопический организм, в частности бактерии, археи, вирусы или грибы. Микроорганизм согласно настоящему изобретению, как правило, представляет собой бактерию. В данном контексте упоминание "микроорганизма" следует понимать как включающий "бактерии".

Микроорганизм согласно настоящему изобретению может быть дополнительно классифицирован по функциональным характеристикам. Например, микроорганизм согласно настоящему изобретению может представлять собой или может быть получен из бактерий, усваивающих C1, анаэроба, ацетогена,

этанологена, карбоксидотрофа и/или метанотрофа. В табл. 1 представлен иллюстративный перечень микроорганизмов и описание их функциональных характеристик.

Таблица 1

	Усвоение C1	Анаэроб	Ацетоген	Этанологен	Аутоτροφ	Карбоксидотроф	Метанотроф
<i>Acetobacterium woodii</i>	+	+	+	+/- ¹	-	+/- ²	-
<i>Alkalibaculum bacchii</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Blautia product</i>	+	+	+	-	+	+	-
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Clostridium acetivum</i>	+	+	+	-	+	+	-
<i>Clostridium autoethanogenum</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Clostridium carboxydovorans</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 thermoautotrophica</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Moorella thermoacetica</i> (панее <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 kiuvii</i>	+	+	+	-	+	-	-

¹ *Acetobacterium woodii* могут вырабатывать этанол из фруктозы, но не из газа.

² Описано, что *Acetobacterium woodii* могут расти на CO, но методика не достоверна.

³ В настоящее время не изучена возможность роста *Clostridium magnum* на CO.

⁴ Описано, что один штамм *Moorella thermoacetica*, *Moorella* sp. HUC22-1 вырабатывает этанол из газа.

⁵ В настоящее время не изучена возможность роста *Sporomusa ovata* на CO.

⁶ В настоящее время не изучена возможность роста *Sporomusa silvacetica* на CO.

⁷ В настоящее время не изучена возможность 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 и по меньшей мере один атом кислорода, например CO, CO₂ или CH₃OH. "Источник углерода C1" относится к молекуле, содержащей один атом углерода, которая служит в качестве частичного или единственного источника углерода для микроорганизма согласно настоящему изобретению. Например, источник углерода C1 может содержать один или более из CO, CO₂, CH₄. Предпочтительно источник углерода C1 содержит один или оба из CO и CO₂. "Микроорганизм, усваивающий C1", представляет собой микроорганизм, способный вырабатывать один или более продуктов из источника углерода C1. Как правило, микроорганизм согласно настоящему изобретению представляет собой бактерии, усваивающие C1. В предпочтительном варианте реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению получен из микроорганизма, усваивающего C1, указанного в табл. 1.

"Анаэроб" представляет собой микроорганизм, для роста которого не нужен кислород. Анаэроб

может отрицательно реагировать или даже погибать при содержании кислорода выше определенного порогового значения. Как правило, микроорганизм согласно настоящему изобретению представляет собой анаэроб. В предпочтительном варианте реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению получен из анаэроба, указанного в табл. 1.

"Ацетоген" представляет собой микроорганизм, который вырабатывает или может вырабатывать ацетат (или уксусную кислоту) в качестве продукта анаэробного дыхания. Как правило, ацетогены являются облигатно-анаэробными бактериями, использующими путь Вуда-Льюнгдалля в качестве основного механизма для превращения энергии и для синтеза ацетил-CoA и продуктов из ацетил-CoA, таких как ацетат (Ragsdale, Biochim Biophys Acta, 1784: 1873-1898, 2008). Ацетогены используют путь ацетил-CoA в качестве (1) механизма для восстановительного синтеза ацетил-CoA из CO₂, (2) терминального электроакцепторного процесса сохранения энергии, (3) механизма для усвоения (ассимиляции) CO₂ в синтезе клеточного углерода (Drake, Acetogenic Prokaryotes, в The Prokaryotes, 3-е изд., с. 354, Нью-Йорк, штат Нью-Йорк, 2006). Все природные ацетогены являются усваивающими C1, анаэробными, аутотрофными и не метанотрофными. Как правило, микроорганизм согласно настоящему изобретению представляет собой ацетоген. В предпочтительном варианте реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению получен из ацетогена, указанного в табл. 1.

"Этанологен" представляет собой микроорганизм, который вырабатывает или может вырабатывать этанол. Как правило, микроорганизм согласно настоящему изобретению представляет собой этанологен. В предпочтительном варианте реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению получен из этанологена, указанного в табл. 1.

"Аутотроф" представляет собой микроорганизм, способный расти в отсутствие органического углерода. Вместо него аутотрофы используют неорганические источники углерода, такие как CO и/или CO₂. Как правило, микроорганизм согласно настоящему изобретению представляет собой аутотроф. В предпочтительном варианте реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению получен из аутотрофа, указанного в табл. 1.

"Карбоксидотроф" представляет собой микроорганизм, способный использовать CO в качестве единственного источника углерода. Как правило, микроорганизм согласно настоящему изобретению представляет собой карбоксидотроф. В предпочтительном варианте реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению получен из карбоксидотрофа, указанного в табл. 1.

"Метанотроф" представляет собой микроорганизм, способный использовать метан в качестве единственного источника углерода и энергии. В некоторых вариантах реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению получен из метанотрофа.

В более широком смысле микроорганизм согласно настоящему изобретению может быть получен из любого рода или вида, указанного в табл. 1.

В предпочтительном варианте реализации микроорганизм согласно настоящему изобретению получен из кластера Clostridia, включающего виды Clostridium autoethanogenum, Clostridium ljungdahlii и Clostridium ragsdalei. Указанные виды были впервые описаны и охарактеризованы авторами 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).

Указанные три вида имеют много общего. В частности, указанные виды являются усваивающими C1 анаэробными, ацетогенными, этанологенными и карбоксидотрофными членами рода Clostridium. Указанные виды имеют родственные генотипы и фенотипы, а также способы сохранения энергии и ферментативного метаболизма. Кроме того, указанные виды объединены в кластер кластеридиальной гомологии рРНК группы I с ДНК 16S рРНК, которые идентичны более чем на 99%, имеют содержание G + C в ДНК примерно 22-30 мол.%, являются грамположительными, имеют одинаковую морфологию и размер (логарифмически растущие клетки от 0,5-0,7 × 3-5 мкм), являются мезофильными (оптимально растут при 30-37°C), имеют похожие диапазоны pH, примерно 4-7,5 (с оптимальным pH примерно 5,5-6), не имеют цитохромов и сохраняют энергию посредством комплекса Rnf. Кроме того, для указанных видов описано также восстановление карбоновых кислот до их соответствующих спиртов (Perez, Biotechnol Bioeng, 110:1066-1077, 2012). Важно отметить, что указанные виды также демонстрируют мощный аутотрофный рост на газах, содержащих CO, вырабатывают этанол и ацетат (или уксусную кислоту) в качестве основных продуктов ферментации и в некоторых условиях вырабатывают небольшое количество 2,3-бутандиола и молочной кислоты.

Однако между указанными тремя видами существует также ряд различий. Указанные виды выделены из различных источников: Clostridium autoethanogenum из кишечника кролика, Clostridium ljungdahlii из отходов выращивания цыплят и Clostridium ragsdalei из пресноводного осадка. Указанные виды отличаются по усвоению различных сахаров (например, рамнозы, арабинозы), кислот (например, глюконата, цитрата), аминокислот (например, аргинина, гистидина) или других субстратов (например, бетаина, бутанола). Кроме того, указанные виды отличаются по ауксотрофии в отношении некоторых витаминов (например, тиамина, биотина). Указанные виды отличаются по последовательности нуклеиновых кислот и аминокислот в генах и белках пути Вуда-Льюнгдалля, несмотря на то, что во всех видах обнаружена одинаковая общая организация и количество таких генов и белков (Körpe, Curr Opin Biotechnol, 22: 320-325, 2011).

Таким образом, подводя итог вышесказанному, многие характеристики *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei* являются не специфичными для указанных видов, а скорее общими характеристиками данного кластера усваивающих C1 анаэробных, ацетогенных, этанологенных и карбоксидотрофных членов рода *Clostridium*. Однако поскольку указанные виды фактически являются различными, то генетическая модификация или изменение одного из указанных видов может не иметь идентичного действия на другой из указанных видов. Например, могут возникать различия роста, характеристик или выработки продукта.

Микроорганизмы согласно настоящему изобретению могут быть получены 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*, докторская диссертация, Государственный университет Северной Каролины, 2010). Изоляты и мутанты *Clostridium ragsdalei* включают PI 1 (ATCC BAA-622, ATCC PTA-7826) (WO 2008/028055).

Микроорганизм согласно настоящему изобретению может быть выращен для выработки одного или более продуктов. Например, *Clostridium autoethanogenum* вырабатывает или может быть искусственно разработан для выработки 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), метил-этил-кетона (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 более требуемых продуктов микроорганизм согласно настоящему изобретению также может вырабатывать этанол, ацетат и/или 2,3-бутандиол. В некоторых вариантах реализации сама микробиологическая биомасса может считаться продуктом.

В целом, в первом и втором биореакторах используют одинаковые микроорганизмы; однако в некоторых вариантах реализации можно использовать также разные микроорганизмы, усваивающие C1, в различных биореакторах.

Иллюстративные субстраты, содержащие C1, и, в частности, исследуемые субстраты, содержащие C1, описанные в настоящем документе, содержат, в широком смысле, любой источник углерода C1. Источник углерода C1 относится к молекуле, содержащей один атом углерода, которая служит в качестве частичного или единственного источника углерода для микроорганизма согласно настоящему изобретению. Например, источник углерода C1 может содержать один или более из CO, CO₂ или CH₄. Предпочтительно источник углерода C1 содержит один или оба из CO и CO₂. Субстрат может дополнительно содержать другие неуглеродные компоненты, такие как H₂, N₂ или электроны.

Субстрат, содержащий C1, может содержать значительную долю CO предпочтительно по меньшей мере от примерно 5% до примерно 99,5% CO по объему. Такие субстраты зачастую образуются в качестве отходов промышленных процессов, таких как процессы изготовления стали или процесс изготовления цветных металлов. Другие процессы, в которых образуются газообразные субстраты, содержащие CO, включают процессы перегонки нефти, процессы производства биотоплива (например, процессы пиролиза и процессы гидроконверсии жирных кислот/триглицеридов), процессы газификации угля и биомассы, процессы выработки электрической энергии, процессы производства технического углерода, процессы производства аммиака, процессы производства метанола и процессы производства кокса. Множество отходящих потоков химической промышленности, как и синтез-газ (содержащий CO и H₂), получаемый из различных субстратов, могут точно так же служить в качестве потенциальных субстратов, содержащих CO. Конкретные примеры включают отходящие потоки от производства фосфата и хромата. Преимущественно отходы (например, отработанные газы) из указанных процессов могут быть использованы так, как описано в настоящем документе, для практически значимого получения ценных конечных продуктов, таких как этанол. Субстрат и/или источник углерода C1 может представлять собой или может быть получен из отработанного или отходящего газа, полученного в качестве побочного продукта промышленного процесса или из какого-либо другого источника, например из автомобильных выхлопных газов или в результате газификации биомассы. В некоторых вариантах реализации промышленный процесс выбран из группы, состоящей из производства продуктов черной металлургии, такого как сталелитейное производство, производства продуктов цветной металлургии, процессов нефтепереработки, газификации угля, производства электрической энергии, производства технического углерода, производства аммиака, производства метанола и производства кокса. В указанных вариантах реализации субстрат и/или источник углерода C1 может быть уловлен из промышленного процесса до его сброса в атмосферу с помощью любого стандартного способа.

Субстрат и/или источник углерода C1 может представлять собой или может быть получен из син-

тез-газа, такого как синтез-газ, получаемый газификацией угля или остатков нефтепереработки, газификацией биомассы или лигноцеллюлозного материала, или риформингом природного газа. В другом варианте реализации синтез-газ может быть получен в результате газификации бытовых твердых отходов или промышленных твердых отходов.

В отношении субстратов и/или источников углерода C1, термин "получен из" относится к субстрату и/или источнику углерода C1, который каким-либо образом модифицирован или смешан. Например, субстрат и/или источник углерода C1 может быть обработан для добавления или удаления некоторых компонентов или может быть смешан с потоками других субстратов и/или источников углерода C1.

Состав субстрата может оказывать значительное влияние на эффективность и/или стоимость реакции. Например, присутствие кислорода (O_2) может снижать эффективность процесса анаэробной ферментации. В зависимости от состава субстрата может быть необходимо обработать, очистить или отфильтровать субстрат для удаления нежелательных примесей, таких как токсины, нежелательные компоненты или частицы пыли, и/или для увеличения концентрации требуемых компонентов.

Субстрат, в целом, содержит, по меньшей мере, некоторое количество CO, например примерно 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мол.% CO. Субстрат может содержать диапазон CO, например, примерно 20-80, 30-70 или 40-60 мол.% CO. Предпочтительно субстрат содержит примерно 40-70 мол.% CO (например, газ металлургического комбината или доменный колошниковый газ), примерно 20-30 мол.% CO (например, газ основного кислородного конвертера) или примерно 15-45 мол.% CO (например, синтез-газ). В некоторых вариантах реализации субстрат может содержать относительно низкое количество CO, такое как примерно 1-10 или 1-20 мол.% CO. Микроорганизм согласно настоящему изобретению обычно превращает по меньшей мере часть CO в субстрате в продукт. В некоторых вариантах реализации субстрат не содержит или, по существу, не содержит CO.

Субстрат может содержать некоторое количество H_2 . Например, субстрат может содержать примерно 1, 2, 5, 10, 15, 20 или 30 мол.% H_2 . В некоторых вариантах реализации субстрат может содержать относительно большое количество H_2 , такое как примерно 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 примерно 1-80 или 1-30 мол.% CO_2 . В некоторых вариантах реализации субстрат может содержать менее чем примерно 20, 15, 10 или 5 мол.% CO_2 . В другом варианте реализации субстрат не содержит или, по существу, не содержит CO_2 .

Несмотря на то, что субстрат обычно является газообразным, субстрат также может быть представлен в альтернативных формах. Например, субстрат может быть растворен в жидкости, насыщенной газом, содержащим CO, с помощью генератора дисперсии микропузырьков. Например, субстрат может быть адсорбирован на твердую подложку.

Установлено, что точный состав данного промышленного субстрата, содержащего C1, зачастую трудно воспроизвести на удаленной установке (например, в лаборатории, или в пилотных, или в демонстрационных процессах), по меньшей мере, в той степени, которая необходима для точного прогнозирования промышленных характеристик. Важно отметить, что без достаточной уверенности в том, что данный процесс может обеспечивать достижение требуемых характеристик, крупные капитальные вложения, необходимые для увеличения масштаба (например, проектирования и разработки процесса) не могут быть оправданы. В этом отношении даже следовые количества некоторых примесей (например, углеводородов или углеводородов, содержащих гетероатом) могут неблагоприятно влиять на бактериальную культуру, которая представляет собой жидкую систему, склонную к экстракции таких более тяжелых молекул из субстрата, содержащего C1, обеспечивая возможность накопления таких молекул во внутреннем и внешнем контуре рецикла жидкости в биореакторе. Кроме того, точно так же трудно воспроизвести колебания состава локального газа в экспериментальной установке, расположенной за пределами производственной площадки, и во многих случаях степень таких колебаний не может быть известна или оценена без непосредственного, локального доступа к субстрату, содержащему C1. Кроме того, перед принятием решения о крупных инвестициях необходимо дополнительно оценить и подтвердить пригодность других аспектов, которые могут иметь значение при выборе местоположения предполагаемой промышленной установки биологического превращения (например, местный источник воды, которая будет использована в среде для выращивания бактерий).

Показано, что применение промышленных субстратов, содержащих C1, в процессе биологического превращения ставит многочисленные задачи. Присутствие веществ, отличных от исходных газообразных компонентов (таких как CO, H_2 , N_2 , CO_2), может оказывать неблагоприятный эффект на процесс ферментации. Кроме того, скорость потока газа из промышленного процесса зависит от технологических параметров указанного процесса и не приспособлена для обеспечения целесообразной объемной скорости подачи газа (например, в $Нм^3/ч$) в последующем процессе ферментации. Химическая природа газа с точки зрения относительного содержания каждого компонента (основных компонентов и примесей) изменяется, зачастую быстро, с течением времени в соответствии с технологическими параметрами и загрузкой предшествующего промышленного процесса.

Возможно, наиболее трудной задачей применения промышленного отработанного газа в качестве

единственного источника углерода и энергии в процессе ферментации газа для синтеза продукта является присутствие широкого спектра бактерицидных или токсичных примесей. Отрицательное влияние примесей из промышленно получаемого синтез-газа газифицированной биомассы на микробиологическую ферментацию имеет множество документальных подтверждений. Указанные газы содержат деготь и азотсодержащие соединения, которые, как было показано, ингибируют микробиологический рост и производительность, в частности, среди карбоксидотрофных организмов, использующих СО и Н₂ в качестве единственного источника углерода и энергии (Ahmed et al. 2006). В некоторых исследованиях показано, что оксид азота, встречающийся в синтез-газе, обладает ингибирующим действием на карбоксидотрофные организмы, такие как *C. carboxydovorans* и *C. ragsdalei*, уже в концентрации лишь 40 ppm (Datar et al. 2004; Lewis et al. 2006; Ahmed and Lewis, 2007; Kundiyana et al. 2010). В других исследованиях показано, что деготь, состоящий из бензола, толуола, этилбензола и п-ксилола (все соединения, встречающиеся в отработанных газах сталеварения, описанные в табл. 2), также обладает ингибирующим действием на производительность и жизнеспособность карбоксидотрофных организмов (Ahmed et al. 2006; Lewis et al. 2006).

Например, отработанные газы, неизбежно образующиеся в процессе производства стали, содержат СО и в некоторых случаях Н₂ и воплощают задачу, связанную с применением промышленных отходящих газов, описанную выше. Как правило, отработанные газы процессов черной металлургии содержат небольшое количество водорода или не содержат водород. Кроме того, многочисленные загрязняющие соединения, находящиеся в указанных отработанных газах, хорошо известны и документально описаны (см. табл. 2). Количество и разнообразие примесей, встречающихся в потоке отработанного газа сталеварения, безусловно, гораздо выше, чем в других промышленных газах, таких как синтез-газ из биомассы. Такое увеличение количества и разнообразия присутствующих примесей ставит более трудную задачу для системы ферментации. Хотя "аддитивный" эффект примесей на биологические процессы трудно предсказать точно, можно предположить, что неблагоприятный эффект будет гораздо более выраженным. К 15 наиболее распространенным примесям, поступающим в дымоход или дымовые трубы в составе отработанного газа сталелитейного производства, относятся такие соединения, как оксиды азота, диоксид серы, бензол, толуол, цианидные и фторидные соединения, каждое из которых является токсичным для бактерий.

Как упомянуто выше, было обнаружено, что деготь, состоящий из бензола, толуола, этилбензола и п-ксилола, оказывает крайне неблагоприятный эффект на жизнеспособность и производительность *C. carboxydovorans* (Lewis et al. 2006). Относительная токсичность бензола, толуола и ксилола на анаэробные бактерии описана авторами Payne и Smith (1983). Однако, как отмечено выше, эти и другие соединения присутствуют в газах сталелитейных заводов вместе с многими другими потенциально токсичными соединениями. Аддитивное влияние тяжелых металлов, таких как кадмий, никель и цинк, на токсичность толуола описано учеными (Amor et al. 2001). Представленные данные наглядно демонстрируют, что микробиологические характеристики в присутствии толуола существенно и резко ухудшаются при добавлении указанных тяжелых металлов по отдельности. В отработанном газе сталелитейного завода указанные металлы присутствуют вместе, поэтому можно предположить, что они еще сильнее влияют на микробиологические характеристики и производительность.

Важно отметить, что в лабораторных условиях трудно обеспечить исследуемый поток, который бы адекватно представлял поток промышленного газа. Важно, что даже в газообразных потоках сходных производств тип и количество примесей, присутствующих в отдельном газообразном потоке, в значительной степени варьируется. Даже в пределах одного завода или установки состав отходящего газа может варьироваться в зависимости от предшествующих условий и загружаемых сырьевых материалов, подаваемых в промышленный процесс. Кроме того, компримирование газа обычно приводит к изменению состава газа. В частности, при высоком давлении примеси склонны к выбыванию из газовой фазы. Это вызывает несоответствия/колебания между отходящим газом промышленной установки и экспериментальным образцом, направленным в лабораторию.

В табл. 2 представлены все воздушные выбросы (из точечного источника + неконтролируемые выбросы¹) в килограммах с металлургического завода BlueScope Steel Port Kembla Steelworks - Порт-Кембла, Новый Южный Уэльс, Австралия, опубликованные в National Pollution Inventory (NPI) (<http://www.npi.gov.au>). Они детализируют типичные загрязняющие компоненты отработанных газов металлургического завода BlueScope Steel Port Kembla Steelworks - Порт-Кембла, Новый Южный Уэльс, Австралия.

Таблица 2

Соединение	Суммарный выброс в воздух (кг)
Оксиды азота	7927779
Диоксид серы	7498915
Твердые частицы 10,0 мкм	1722175
Аммиак (всего)	735551
Серная кислота	259163
Всего летучих органических соединений	240305
Хлористоводородная кислота	190953
Бензол	130905
Твердые частицы 2,5 мкм	110063
Сероводород	81748
Толуол (метилбензол)	20220
Цианидные (неорганические) соединения	19483
Фторидные соединения	16780
Метанол	12131
Метил-изобутил-кетон	10775
Цинк и соединения	8228
Марганец и соединения	4001
Хлор и соединения	3221
Ксилолы (отдельные или смешанные изомеры)	2583
Свинец и соединения	2391
н-Гексан	1142
Стирол (этилбензол)	900
Медь и соединения	575
Кадмий и соединения	425
Никель и соединения	323
Бор и соединения	247
Полициклические ароматические углеводороды (B[a]Peq)	192
Соединения хрома (III)	176
Ртуть и соединения	168
Этанол	123
1,3-Бутадиен (винилэтилен)	120
Фенол	115
Селен и соединения	112
Соединения хрома (VI)	69
Бифенил (1,1-бифенил)	60
Мышьяк и соединения	47
Формальдегид (метилальдегид)	47
Ацетон	26
Сурьма и соединения	18
Этилбензол	18
Дисульфид углерода	13
Кобальт и соединения	8
Бериллий и соединения	2
Азотная кислота	1
Полихлорированные диоксины и фураны (TEQ)	1,35E-04

пень биореактора для оценки характеристик эталонного субстрата, содержащего C1. Аналитическая секция выполнена с возможностью анализа газообразных и жидких продуктов первого и второго биореакторов. Установка для анализа газа помещена в корпус или, по меньшей мере, может быть помещена в контейнер, имеющий, в целом, объем менее чем примерно 6 м^3 (например, от примерно $0,5$ до примерно 6 м^3), обычно менее чем примерно 3 м^3 (например, от примерно 1 до примерно 3 м^3) и зачастую менее чем примерно $2,5 \text{ м}^3$ (например, от примерно $1,5$ до примерно $2,5 \text{ м}^3$). С учетом таких ограничений по размеру установка для анализа газа может быть перевезена на различные площадки, например, для оценки исследуемого (или местного) субстрата, содержащего C1, и необязательно других местных добавок, таких как местный источник воды. В соответствии с дополнительными иллюстративными вариантами реализации установка для анализа газа расположена в корпусе или, по меньшей мере, может быть расположена в ящике или другом контейнере, имеющем размеры длины, ширины и высоты по меньшей мере примерно $1,8 \text{ м}$ в каждом направлении (например, каждый из указанных размеров составляет от примерно $1,0$ до примерно $1,8 \text{ м}$) или менее примерно $1,6 \text{ м}$ (например, каждый из указанных размеров составляет от примерно $1,0$ до примерно $1,6 \text{ м}$). Такой ящик или другой контейнер может иметь один из указанных размеров длины, ширины и высоты, составляющий меньше чем примерно $1,6 \text{ м}$ (например, от примерно $1,0$ до примерно $1,6 \text{ м}$) и другие два из указанных размеров, составляющие менее чем примерно $1,3 \text{ м}$ (например, от примерно $0,8$ до примерно $1,6 \text{ м}$).

Другие варианты реализации относятся к способам оценки пригодности исследуемого субстрата, содержащего C1, для применения в процессе биопревращения. Указанные способы включают (а) подачу эталонного субстрата, содержащего C1, в первый (эталонный) биореактор, содержащий первую культуру микроорганизма, усваивающего C1, и (b) подачу исследуемого субстрата, содержащего C1, во второй (исследуемый) биореактор, содержащий вторую культуру микроорганизма, усваивающего C1. Указанные способы дополнительно включают (с) анализ газообразных и жидких продуктов первого и второго биореакторов для определения характеристик первого и второго биореакторов. Пригодность исследуемого субстрата, содержащего C1, определяют посредством сравнения характеристик первого биореактора относительно характеристик второго биореактора. Предпочтительно по меньшей мере часть стадий (а) и (b), описанных выше, осуществляют одновременно (т.е. по меньшей мере часть указанных стадий перекрывается по времени). Обычно стадии (а) и (b) осуществляют одновременно (или по меньшей мере, по существу, одновременно) в течение одного рабочего периода или экспериментального периода, составляющего несколько дней (например, по меньшей мере примерно 3 дня, например от примерно 3 до примерно 21 дня; по меньшей мере 5 дней, например от примерно 5 дней до примерно 21 дня; или по меньшей мере 7 дней, например от примерно 7 дней до примерно 14 дней) для оценки характеристик культур микроорганизмов при осуществлении процесса биологического превращения. В соответствии с одним из вариантов реализации, например, общая продолжительность стадии (b), на которой исследуемый субстрат, содержащий C1, подают во второй реактор, может включать в себя продолжительность стадии (а), на которой эталонный субстрат, содержащий C1, подают в первый биореактор. Это происходит, например, в случае начала эксплуатации первого и второго биореакторов с применением эталонного субстрата, содержащего C1, с последующей заменой сырья, подаваемого во второй биореактор, с эталонного субстрата, содержащего C1, на исследуемый субстрат, содержащий C1. Таким образом, в иллюстративных вариантах реализации указанные способы могут дополнительно включать подачу эталонного субстрата, содержащего C1, во второй биореактор до стадии (b).

Помимо оценки исследуемых субстратов, содержащих C1, иллюстративные способы альтернативно или в комбинации могут обеспечивать оценку местных добавок, таких как местный источник воды, с применением устройств и способов, описанных в настоящем документе, посредством определения или оценки сравнительных характеристик. Например, в случае оценки качества воды могут быть использованы различные источники воды для получения и/или подпитки (например, свежей культуральной средой) первой и второй бактериальных культур. В соответствии с одним из вариантов реализации локальные условия могут быть оценены посредством применения местного источника воды (например, местной технологической воды или местной питьевой воды) для получения и подпитки (например, в свежей добавляемой культуральной среде) бактериальной культуры второго биореактора, в комбинации с подачей исследуемого субстрата, содержащего C1, в указанную культуру. В другом варианте реализации один и тот же местный источник воды может быть использован для получения и подпитки бактериальных культур в обоих биореакторах, так что может быть оценен сам исследуемый субстрат, содержащий C1, относительно исходного значения с применением одного и того же источника воды. В других вариантах реализации один и тот же субстрат, содержащий C1 (например, эталонный или исследуемый субстрат, содержащий C1), может быть подан в оба биореактора для оценки влияния только различных источников воды (например, местного источника технологической воды или местного источника питьевой воды по сравнению с очищенным источником воды, таким как дистиллированная вода).

Другие варианты реализации относятся к способам определения того, поддерживает ли исследуемый субстрат, содержащий C1, процесс биологического превращения. Иллюстративные способы включают (а) раздельное выдерживание первой и второй культур микроорганизмов, усваивающих C1, каждая из которых использует эталонный субстрат, содержащий C1, в качестве питательного вещества для вы-

работки этанола и по меньшей мере одного дополнительного метаболита, и (b) замену эталонного субстрата, содержащего C1 в качестве питательной среды во второй культуре, на исследуемый субстрат, содержащий C1. Указанные способы дополнительно включают (c) оценку характеристик первой культуры относительно характеристик второй культуры в одинаковых требуемых условиях эксплуатации (например, рабочих заданных значений регулируемых автоматически и/или вручную технологических параметров, например, в некоторых случаях pH биореактора), но с применением различных субстратов, содержащих СО, эталонного и исследуемого. Указанные способы дополнительно включают: (d) в случае отсутствия минимального недостатка (или изменения) характеристик второй культуры на стадии (c) - подтверждение того, что исследуемый субстрат, содержащий C1, поддерживает процесс биологического превращения. Указанные способы могут дополнительно включать (e) в случае наличия минимального недостатка характеристик или более высокого недостатка характеристик на стадии (c) - предварительную обработку или улучшение существующей предварительной обработки исследуемого субстрата, содержащего C1, для обеспечения исследуемого субстрата, содержащего C1, более высокого качества относительно исследуемого субстрата, содержащего C1, используемого для оценки характеристик на стадии (c).

В соответствии с альтернативными вариантами реализации стадия (e) в описанных выше способах может включать корректирующее действие, отличное от улучшения качества исследуемого субстрата, содержащего C1, посредством предварительной обработки или улучшения существующей предварительной обработки. Такое корректирующее действие может, например, включать улучшение качества местной добавки, такой как местный источник воды, или в противном случае замену добавкой более высокого качества, например, местной технологической воды местной питьевой водой. Другие корректирующие меры могут включать регулирование технологических условий, таких как температура, давление и/или pH биореактора. Любой тип корректирующего действия может сопровождаться повторной инокуляцией второго биореактора бактериальной культурой (например, третьей культурой), с последующей оценкой характеристик первой культуры (или другой культуры, использующей эталонный субстрат, содержащий C1 в качестве питательного вещества, или другого эталонного условия) относительно характеристик повторно инокулированной культуры для проверки корректирующего действия (например, при таком же наборе требуемых рабочих условий, но с применением других, эталонного и более качественного исследуемого субстратов, содержащих C1, и/или с применением других, эталонной и более качественной добавок, и/или с применением отрегулированных условий эксплуатации). В случае отсутствия минимального недостатка качества повторно инокулированной культуры (например, третьей культуры), указанные способы могут дополнительно включать подтверждение того, что корректирующее действие (например, применение более качественного исследуемого субстрата, содержащего C1, и/или более качественной добавки, и/или отрегулированных условий эксплуатации) поддерживает процесс биологического превращения. Таким образом можно оценить множество корректирующих действий (например, все более очищенный субстрат, содержащий C1), например, последовательно, с применением установок для анализа газа, описанных в настоящем документе. В соответствии с некоторыми вариантами реализации указанные способы анализа/оценки могут быть завершены, если установлено/подтверждено, что по меньшей мере одно качество исследуемого субстрата, содержащего C1, качество добавки и/или набор условий эксплуатации поддерживает процесс биологического превращения.

На фиг. 1А изображен вид сбоку в разрезе иллюстративной установки 1 для анализа газа, имеющей заднюю, "влажную" или содержащую ступень биореактора секцию 200 и переднюю, "сухую" или аналитическую секцию 300. Предпочтительно указанные секции 200, 300 разделены барьером, таким как вертикальная перегородка 250, который препятствует или, по меньшей мере, затрудняет взаимное смешивание внешних условий, окружающих оборудование, расположенное в указанных секциях. Иллюстративный биореактор 100 стадии биореактора в секции 200 имеет объем реактора, в целом, в диапазоне от примерно 0,25 до примерно 5 л и зачастую от примерно 1 до примерно 3 л. Типичная длина биореактора, который вмещает указанный объем реактора (т.е. который содержит газообразные и жидкофазные компоненты реактора), составляет от примерно 0,5 до примерно 1,5 м. Как правило, содержащая биореактор секция 200 содержит две отдельные стадии биореактора, что лучше видно на фиг. 1В, для осуществления одновременной оценки характеристик эталонного и исследуемого субстратов, содержащих СО.

Ступень биореактора в секции 200 может дополнительно содержать внешний контур 25 рецикла жидкости и сопряженный насос 30 внешнего рецикла (или рециркуляции) для улучшения перемешивания/однородности в данном биореакторе 100 и/или улучшения скорости переноса массы между паром и жидкостью. С помощью внешнего контура 25 рецикла жидкости жидкий продукт, содержащий культуральную среду и микроорганизм, усваивающий C1, может быть выведен из нижней секции (т.е. вблизи нижнего края) биореактора 100 (например, снизу под устройством распределения газа, таким как рассекаватель, и/или снизу под отверстием подачи или отвода жидкости) и возвращен в цикл внешним образом в верхней секции (т.е. вблизи противоположного, верхнего края) биореактора 100 (например, над поверхностью раздела газа/жидкости, которая определяет границу между зоной непрерывной газовой фазы и зоной непрерывной жидкой фазы). Как описано выше, внешний контур 25 рецикла жидкости предпочтительно работает без дополнительных компонентов, необходимых для разделения и повторного использования микроорганизма, усваивающего C1, включая мембранные системы фильтрации и сопутствующие

процедуры очистки. Внешний насос 30 рецикла жидкости обеспечивает внешнюю циркуляцию жидкости с требуемой скоростью, например, с оптимальным балансом между расходом энергии и улучшением скорости переноса массы. Другие компоненты, связанные с установкой и управлением биореактора 100, могут быть включены в содержащую ступень биореактора секцию 200, например стеллаж 201 и дополнительное оборудование снаружи биореактора 100, например, необходимое для регулирования температуры реактора (например, обогрев линий и/или вентилятор для повышения или понижения температуры биореактора 100, при необходимости).

Аналитическая секция 300 содержит газовый хроматографический (ГХ) анализатор 301, содержащий первую и вторую хроматографические колонки 302a, 302b, выполненные, соответственно, с возможностью анализа газообразных и жидких продуктов, полученных из ступени 10 биореактора. Такая конфигурация отличается от обычного применения жидкостной хроматографии высокого давления (ЖХВД) для анализа концентрации метаболитов в жидких продуктах. Несмотря на то, что варианты реализации настоящего изобретения включают применение ЖХВД для анализа жидкого продукта, установлено, что достигается преимущественная экономия пространства, если общие аналитические требования к установке для анализа газа консолидированы в одном ГХ анализаторе. В целом, колонки, используемые для анализа газообразных и жидких продуктов, содержат разные типы неподвижной фазы (например, смолы) для осуществления требуемого хроматографического разделения. Другое оборудование аналитической секции 300 может включать генератор воздуха высокой чистоты (генератор "очищенного воздуха", не показан) для применения в качестве источника фоновых газов для ГХ анализатора 301, изолированные электрические компоненты 303 и операционное программное обеспечение с необходимым экраном интерфейсом 304 (например, компьютер) и вспомогательный ящик 305. Также может быть включена система 315 спутниковой связи для передачи данных из установки 1 для анализа газа, в частности, при использовании на предполагаемом участке монтажа с недостаточной или ненадежной радиосвязью, на второй производственный участок, который может быть удален от данного участка (например, по меньшей мере на 100 миль, по меньшей мере 1000 миль или даже по меньшей мере 5000 миль от данного участка). Например, второй производственный участок может быть разработчиком или владельцем лицензии на процесс биологического превращения, заинтересованный в эксплуатации установки для анализа газа в реальном времени. Система 315 спутниковой связи может обеспечивать передачу на второй производственный участок информации для применения при составлении рабочих инструкций, касающихся установки 1 для анализа газа, например, рекомендованного регулирования или изменения рабочих параметров или добавления определенных технологических стадий (например, предварительной обработки газа). В соответствии с другими вариантами реализации система 315 спутниковой связи может обеспечивать непосредственное управление эксплуатации установки 1 для анализа газа, включая различные технологические параметры, описанные в настоящем документе. Дополнительные вспомогательные компоненты, такие как нижние выдвижные емкости 306, стеллажи (не показаны) и/или решетчатый вентилятор (не показан), также могут быть включены в аналитическую секцию 300.

Как показано на фиг. 1A, компоненты установки 1 для анализа газа расположены в контейнере 500, что обеспечивает простоту его транспортировки в удаленное положение для оценки конкретного субстрата, содержащего C1, на месте проведения работ. Такое преимущество возможности транспортировки исключает потенциально недостоверные (и дорогостоящие) ошибки, присущие попыткам воспроизведения промышленных газовых потоков, с точки зрения состава и колебаний состава, в стационарной лаборатории, на пилотной установке или демонстрационной установке. Изображение среднего размера человека 600 обеспечивает иллюстрацию типичных размеров контейнера 500. В верхней части аналитической секции 300 контейнер 500 может иметь соединение, такое как шарнирное соединение 550, для открывания контейнера и обеспечения лучшего доступа к оборудованию в аналитической секции 300. Следует понимать, что контейнер 500 не должен полностью вмещать установку 1 для анализа газа, и в контейнере 500 могут быть обеспечены отверстия, например, необходимые для работы вытяжных вентиляторов. При условии, что контейнер 500 содержит открытые или обнаженные области (или области, которые могут быть открыты), установка 1 для анализа газа, в остальном, по меньшей мере, может быть помещена в полностью закрытый контейнер, имеющий размеры, описанные выше. Как показано на фиг. 1A и 1B, контейнер 500 может быть транспортирован на паллете 575 и перемещен на относительно короткие расстояния с помощью вилочного автопогрузчика, захватывающего вилочные приемные отверстия 590.

Вид сзади в поперечном разрезе, представленный на фиг. 1B, иллюстрирует два биореактора 100a, 100b соответствующих ступеней 10a, 10b биореактора для оценки характеристик эталонного и исследуемого субстратов, содержащих C1 соответственно. Каждый из указанных биореакторов может быть оснащен внешним контуром 25 рецикла жидкости, как описано выше в отношении фиг. 1A. Таким образом, на фиг. 1B представлен более подробный вид "влажной" или содержащей ступень биореактора секции 200. Дополнительно или альтернативно, система оперативного управления, используемая для регулирования температуры реактора (описанная выше), другие системы оперативного управления могут быть, по меньшей мере частично, расположены в секции 200, хотя программное обеспечение измерительных приборов, связанное с контурами управления с обратной связью, может быть предпочтительно включено в аналитическую секцию 300. Такие дополнительные системы оперативного контроля могут быть исполь-

зованы для регулирования технологических параметров, таких как скорость добавления свежей культуральной среды, скорость подачи газообразного субстрата, содержащего C1, и pH реактора. В случае регулирования скорости подачи поверхностно-активного вещества, насосы 202a, 202b, работающие с переменной скоростью (например, поршневые насосы), могут быть использованы для независимой подачи поверхностно-активного вещества в биореакторы 100a, 100b. В случае регулирования скорости подачи газообразного субстрата, содержащего C1, могут быть использованы соответствующие клапаны для регулирования потока, которые имеют размер в соответствии с требуемой скоростью течения газа и предусматривают давление до клапана (давление подачи) и после клапана (рабочее давление). В случае регулирования pH реактора количество основного нейтрализующего агента, подаваемого в ступень биореактора (например, в контур 25 рецикла, показанный на фиг. 1A), можно регулировать с помощью насосов, работающих с переменной скоростью. Иллюстративная система регулирования pH подробнее описана со ссылкой на фиг. 2.

Как показано на фиг. 1B, включено, в целом, шесть насосов, при этом три насоса 206a используют для перекачивания основного нейтрализующего агента и других технологических жидкостей (Na_2S , среды и т.д.) в первый биореактор 100a, и три других насоса 206b используют для перекачивания указанных жидкостей во второй биореактор 100b. В секции 200, содержащей биореактор, расположены также дисплеи и контроллеры, связанные с технологическими параметрами, имеющими отношение к каждой ступени биореактора, включая дисплеи/контроллеры 207a, 207b скорости потока субстрата, содержащего CO, дисплеи/контроллеры 208a, 208b скорости потока свежей среды и дисплеи/контроллеры 209a, 209b температуры реактора. Указанные дисплеи/контроллеры могут быть расположены на откидной панели (не показана) для простоты доступа/просмотра оператором. Как описано выше в отношении использования системы спутниковой связи в аналитической секции, в альтернативном варианте реализации система 315 спутниковой связи может быть таким же образом расположена в секции 200, содержащей биореактор, выполняя те же функции, как описаны выше.

Как дополнительно показано на фиг. 1B, оборудование в секции 200, содержащей биореактор, включает приборы, связанные с непосредственной работой с сырьевыми потоками, которые подают, и с продуктами, которые выводят из биореакторов 100a, 100b. Примеры такого оборудования представляют собой контейнеры 203a, 203b со свежей средой и контейнеры 204a, 204b для отходов жидких продуктов, а также сопутствующие подключения к биореакторам 100a, 100b. Дополнительные примеры оборудования в данной секции представляют собой барботеры 205a, 205b, которые могут служить различным целям. Например, в конкретном варианте реализации каждый биореактор 100a, 100b может иметь группу из двух или более барботеров, сообщающихся по текучей среде с газообразными продуктами из указанных реакторов. Можно использовать один или более пустых барботеров непосредственно после каждого биореактора в качестве защитной меры от перелива жидкости через края биореакторов. Один или более наполненных жидкостью барботеров могут быть использованы после одного или более пустых барботеров для обеспечения источника обратного давления для отвода газообразного продукта на ГХ, если необходимо провести анализ образца газа. Секция 200, содержащая биореактор, может дополнительно содержать вытяжной вентилятор и каналы (не показаны) для обеспечения возможности циркуляции свежего воздуха в указанной секции. Это может затруднять или препятствовать накоплению источников углерода C1 (например, CO, CO_2 , CH_4) в указанной секции, в случае утечки, до опасных уровней с точки зрения риска для здоровья или риска взрыва. В этом отношении в секцию 200, содержащую биореактор, может быть включена также система обеспечения безопасности, содержащая датчик 210 газа C1 (например, датчик CO). Система обеспечения безопасности может быть выполнена с возможностью блокировки одной или более, например всех, систем оперативного управления, описанных выше (например, для регулирования скорости подачи газообразного субстрата, содержащего C1). Например, система обеспечения безопасности может приостанавливать поток исследуемого субстрата, содержащего C1, и/или эталонного субстрата, содержащего C1, и предпочтительно оба потока, в ответ на измерение рабочей концентрации C1, превышающей пороговую концентрацию (например, аварийную пороговую концентрацию).

На фиг. 2 представлены дополнительные подробности, касающиеся эксплуатации биореакторов 100a, 100b, используемых для сравнительной оценки характеристик эталонного и исследуемого субстратов, содержащих C1, соответственно. В соответствии с иллюстративными процессами указанные субстраты, содержащие C1, подают в ступени биореактора через входные отверстия 12a, 12b, расположенные вблизи нижних краев вертикально расположенных биореакторов 100a, 100b каждой ступени биореактора. Например, отверстия подачи газа могут входить в соответствующие биореакторы на длину в пределах нижних 25% и предпочтительно в пределах нижних 10% длины соответствующих биореакторов. Отверстия подачи газа обычно входят в соответствующие биореакторы к соответствующим распределительным устройствам, которые могут быть расположены по центру биореакторов на высоте, соответствующей, в целом, указанным процентным диапазонам длины реактора. Конкретные газораспределительные устройства включают рассекатели 14a, 14b, с которыми отверстия подачи газа могут сообщаться по текучей среде, и которые расположены вблизи их соответствующих первых концов. Газообразные продукты, включая не превращенный источник углерода C1, и любые газообразные примеси субстрата, содер-

жащего С1 (например, H_2), которые не израсходованы в реакции биопревращения, выводят из каждого биореактора через отверстия 16a, 16b отвода газа, расположенные вблизи верхних краев биореакторов, противоположно нижним краям. Отверстия отвода газа могут входить в соответствующие биореакторы на длину в пределах верхних 25% и предпочтительно в пределах верхних 10% длины соответствующих биореакторов, или в ином случае газообразные продукты могут быть отведены через верхнюю часть соответствующих биореакторов вовсе без применения отверстий для отвода газа, входящих в соответствующие биореакторы.

Жидкий продукт (или "бульон") может быть возвращен в цикл через внешние контуры 25a, 25b рецикла жидкости, например, посредством перекачивания, с применением жидкостных рециркуляционных насосов 30a, 30b, из нижней секции биореакторов 100a, 100b, откуда выведен жидкий продукт, в верхние секции биореакторов (например, в пределах верхних 10% длины биореакторов 100a, 100b и над устройством(ами) распределения жидкости, такими как разбрызгивающие головки 110a, 110b, через которые жидкий продукт вводят в зону непрерывной газовой фазы. Затем указанную жидкость приводят в контакт с газом, который высвобождается на поверхностях 22a, 22b раздела газа/жидкости и продолжает восходящее движение (в массе) через зону непрерывной газовой фазы. Таким образом, биореакторы 100a, 100b эксплуатируют с противоточным движением газообразных и жидких потоков (газ движется вверх, а жидкость движется вниз) в указанной зоне, которая расположена над зоной непрерывной жидкой фазы, работающей с внутренней циркуляцией жидкости, как описано выше.

При определении положения различных элементов относительно "длины реактора", указанная длина относится к той секции, которая вмещает содержимое реактора (смесь реагентов и продуктов реакции), обычно рассматриваемое как "объем реактора" или "рабочий объем реактора", и указанная длина не включает технологические линии (например, линии подачи сырья или линии вывода продукта), которые могут выходить выше или ниже объема реактора, или секции колонны или другой емкости, которые вмещают реактор, но не вмещают содержимое реактора. Например, в случае цилиндрического реактора длина реактора относится к длине оси цилиндра. "Нижние 10%" длины реактора относятся к диапазону высот, начина от дна реактора и до 10% длины реактора. "Верхние 10%" длины реактора относятся к диапазону высот, начиная от верха реактора и вниз на 10% длины реактора.

Биореакторы 100a, 100b содержат отверстия 18a, 18b подачи жидкости для загрузки свежей культуральной среды и отверстия 20a, 20b отвода жидкости для выгрузки жидких продуктов из реакторов, из которых могут быть взяты образцы для определения концентрации этанола и других метаболитов, а также при необходимости концентраций микроорганизма, усваивающего С1. Перенос свежей культуральной среды в каждый из биореакторов 100a, 100b и выгрузка жидкого продукта (или "бульона") из них через отверстия 18a, 18b, 20a, 20b подачи и отвода может быть осуществлен через открытые трубы небольшого размера (например, имеющие внутренний диаметр от примерно 1 до примерно 6 мм), сообщающиеся по текучей среде с указанными отверстиями подачи и отвода. Жидкие продукты, выгружаемые из биореакторов 100a, 100b, могут быть направлены и необязательно могут подниматься выше высоты Н, соответствующей рабочему уровню негазированной жидкости (т.е. уровню жидкости, который существует без поддержки газа). То есть наивысший подъем Е, до которого поднимается жидкий продукт последней ступени, может находиться на уровне или выше высоты Н. Высота Н может быть регулируемой и может соответствовать, по существу, высоте Н разрядных устройств сифона 75a, 75b или другого типа точки отбора жидкости. Так, в варианте реализации, изображенном на фиг. 2, отверстия 20a, 20b отвода жидкого продукта сообщаются по текучей среде с разрядными устройствами сифона 75a, 75b, которые являются регулируемыми по высоте относительно биореакторов 100a, 100b. Подъем Е и высоту Н можно регулировать для управления уровнями жидкости или гидравлическими напорами, т.е. уровнями границ раздела 22a, 22b газа/жидкости, независимо в соответствующих биореакторах 100a, 100b.

В конкретном варианте реализации, изображенном на фиг. 2, отверстия 18a, 18b подачи жидкости и отверстия 20a, 20b отвода жидкости предпочтительно расположены в статической секции под соответствующими отверстиями 12a, 12b подачи газа и рассекателями 14a, 14b для обеспечения возможности подачи жидкости и ее выгрузки из указанной секции или положения реактора данной ступени биореактора. Однако впускные и выпускные отверстия также могут быть расположены в ином месте вдоль длины их соответствующих биореакторов, в зависимости от требуемого положения отверстий загрузки и выгрузки жидких продуктов. Например, в альтернативном варианте отверстия отвода жидкости могут быть расположены на уровне или вблизи уровня границ раздела 22a, 22b газа/жидкости, например, для обеспечения контроля уровня жидкости на основании перелива на высоте отверстия для отвода жидкости.

Обычно внешние контуры 25a, 25b рецикла жидкости могут обеспечивать положения точек отбора образцов/анализа жидкости биореактора и также могут быть выполнены с возможностью управления биореактором. Например, основной нейтрализующий агент (например, водный раствор основания, такой как раствор NH_4OH или раствор $NaOH$) может быть добавлен в указанные контуры рецикла через отверстия 35a, 35b подачи основного нейтрализующего агента, входящие в состав системы технологического контроля для регулирования рН реактора. Технологическая система может дополнительно содержать измерительные приборы для регулирования потока основного нейтрализующего агента на основании

измеренного pH реактора и более конкретно может содержать подходящие контуры с обратным контролем, относящиеся к каждому из биореакторов 100a, 100b. Такие контуры управления содержат, например, анализаторы pH 40a, 40b, которые измеряют (например, непрерывно или периодически) значение pH жидкости биореактора во внешних контурах 25a, 25b рецикла жидкости. Такие контуры управления также содержат необходимые средства технического обеспечения (например, контрольные клапаны или питательные насосы, работающие с переменной скоростью, не показаны) и программное обеспечение измерительных приборов (например, компьютерные программы) для сравнения измеренного значения pH с заданным значением для данного биореактора с последующим регулированием потока основного нейтрализующего агента для достижения или сохранения заданного значения.

Таким образом, внешние контуры рецикла биореакторов 100a, 100b могут сообщаться по текучей среде с соответствующими отверстиями 35a, 35b подачи основного нейтрализующего агента и могут содержать измерительные приборы для независимого регулирования pH в указанных биореакторах. Внешние контуры 25a, 25b рецикла жидкости могут содержать измерительные приборы, связанные с регулированием других технологических параметров, таких как температура реактора. Например, преобразователи температуры, которые измеряют (например, непрерывно или периодически) температуру жидкости во внешних контурах рецикла жидкости, причем указанная температура представляет рабочую температуру в биореакторах, могут быть использованы для регулирования эксплуатации линии подогрева и/или вентилятора, описанного выше, для обеспечения температурного контроля реактора. Кроме того, внешние петли 25a, 25b рецикла жидкости могут содержать дополнительно отверстия 45a, 45b подачи жидкости для введения других жидких разбавителей, реагентов (например, поверхностно-активных веществ) и/или питательных веществ в биореакторы 100a, 100b независимо с одинаковыми или переменными скоростями.

Таким образом, ступени 10a, 10b биореактора могут иметь независимо регулируемые рабочие переменные технологического процесса, регулирование которых может включать отбор образцов/анализ жидкого продукта реактора во внешних контурах 25a, 25b рецикла жидкости, как описано выше, и/или введение свежей культуральной среды, основного нейтрализующего агента и/или других технологических жидкостей через любое из выпускных отверстий 18a, 18b, 35a, 35b, 45a, 45b. Иллюстративные рабочие переменные технологического процесса включают скорость добавления свежей культуральной среды, скорость подачи газообразного субстрата, содержащего C1, температуру реактора, pH реактора и их комбинации. В соответствии с различными другими иллюстративными технологиями регулирования (1) поток субстрата, содержащего C1 (например, поток эталонного субстрата, содержащего C1, в ступень биореактора 10a и/или поток исследуемого субстрата, содержащего C1, в ступень биореактора 10b), можно регулировать на основании измеренного pH реактора, (2) поток основного нейтрализующего агента в одну или обе ступени биореактора 10a, 10b можно регулировать на основании измеренной концентрации кислотного метаболита (например, концентрации ацетата) в жидком продукте соответствующего биореактора, и/или (3) поток свежей культуральной среды в одну или обе ступени 10a, 10b биореактора можно регулировать на основании измеренной концентрации микроорганизма, усваивающего C1, в жидком продукте соответствующего биореактора.

Установки для анализа газа, описанные выше, могут быть использованы в способах анализа исследуемого субстрата, содержащего C1, например, доступного на предполагаемом месте установки промышленного процесса биологического превращения. Первый и второй биореакторы могут быть использованы для переработки, соответственно, эталонного субстрата, содержащего C1 (например, газа, содержащего источник углерода C1, известного состава, который может быть усвоен в течение продолжительности указанного способа анализа), и исследуемого субстрата, содержащего C1, который может представлять собой доступный отработанный газ, содержащий C1, из промышленного предприятия, такого как металлургическое предприятие, необязательно предварительно обработанный для удаления одной или более примесей. В целом, предварительную обработку осуществляют для удаления одной или более примесей из исследуемого субстрата, содержащего C1, или по меньшей мере части одной или более примесей (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 99% одной или более примесей), которые негативно влияют на процесс биологического превращения (например, вредны для роста микроорганизма, усваивающего C1). Обычно примесь(и) в исследуемом субстрате, содержащем C1, которые удаляют посредством предварительной очистки, представляют собой примеси, которые в отсутствие такой предварительной очистки способствуют очевидному ухудшению характеристик процесса биологического превращения по сравнению с тем же процессом, осуществляемым в тех же условиях. Примеси включают углеводороды (например, бензол) и углеводороды, содержащие гетероатом (например, галогенированные углеводороды или углеводороды, содержащие по меньшей мере один из Cl, O, N и/или S, такие как дихлорпропан, эпихлоргидрин и диоксины). Любые из таких примесей присутствуют, в целом, в небольших количествах (например, в количестве менее 1%, менее 1000 ppm, менее 100 ppm или даже менее 10 ppm по объему) в неочищенном исследуемом субстрате, содержащем C1. Иллюстративная предварительная обработка включает приведение в контакт исследуемого субстрата, содержащего C1, с твердым материалом или жидкой очищающей средой, которая селективно удаляет одну или более примесей, например, посредством адсорбции или растворения.

Иллюстративные твердые материалы включают углерод (например, активированный древесный уголь), смолы и цеолиты. Другие примеси включают частицы пыли и другие твердые вещества (например, мелкие частицы катализатора), которые могут быть удалены фильтрацией и/или с помощью жидкой очищающей среды.

Иллюстративный эталонный субстрат, содержащий C1, может представлять собой чистый СО или синтетическую смесь СО и одного или более других газов (например, смесь СО/Н₂ или смесь СО, СО₂ и Н₂). Один или более других газов могут представлять собой газы, которые, как известно, присутствуют в исследуемом субстрате, содержащем C1, приблизительно в одинаковых концентрациях. Синтетическая смесь может быть типичной для композиции, для которой ранее были получены рабочие характеристики, которые необязательно коррелируют с характеристиками крупномасштабного производства. Таким образом, сравнительные характеристики эталонного субстрата, содержащего C1, с исследуемым субстратом, содержащим C1, могут быть использованы для расчета прогнозных характеристик последнего при крупномасштабном производстве, например, на пилотной установке, демонстрационной установке или промышленной установке. Во многих случаях эталонный субстрат, содержащий C1, который содержит чистый СО или синтетическую смесь СО, может быть подан и загружен в один или оба биореактора из цилиндра под давлением. Используя подходящий клапан регулирования давления (или группу клапанов), давление после цилиндра может быть снижено до рабочего давления биореакторов (например, от 0 до 5 бар абсолютного давления).

Характеристики первого и второго биореакторов, осуществляющих переработку эталонного и исследуемого субстратов, содержащих C1, соответственно, можно определить и сравнить в качестве основы для оценки пригодности исследуемого субстрата, содержащего C1. Для этого установка для анализа газа, описанная в настоящем документе, может быть выполнена с возможностью анализа газообразных и жидких продуктов первого и второго биореакторов. Например, газообразные продукты можно анализировать для определения количества оставшегося газа C1 с последующим расчетом усвоения бактериальной культурой газообразного C1 в эталонном и исследуемом субстратах, содержащих C1. Общее усвоение субстрата в биореакторе относится к проценту субстрата, который загружен в биореактор и использован при превращении в требуемый продукт(ы) (например, этанол) и другие метаболиты микроорганизма. Используя в качестве примера газ, содержащий СО, если определен состав газообразного продукта, выходящего из биореактора, то общий расход СО (выраженный в долях) может быть рассчитан следующим образом:

$$1 - (\text{скорость СО, выходящего из биореактора}) / (\text{скорость подачи СО в биореактор}).$$

Установка для анализа газа может обеспечивать или, по меньшей мере, обеспечивать достаточную информацию (например, скорости газообразного потока и композиции сырья и продукта) для определения расхода углерода C1 в каждом из биореакторов в качестве одного из эксплуатационных параметров для сравнения между указанными биореакторами. Расход источника углерода C1 определяют в пересчете "на цикл" или "за один раз", без учета расхода возвратного газообразного продукта (и добавленной стоимости), что может обеспечивать более высокие значения общего расхода. Однако расход углерода C1 за один цикл может быть использован для моделирования для предсказания общего расхода углерода C1 в процессе с применением такого рецикла.

Другие аналитические результаты, полученные в установке для анализа газа, могут быть использованы при сравнении характеристик между биореакторами, работающими с эталонным и исследуемым субстратами, содержащими C1. Например, жидкие продукты, полученные в указанных биореакторах, можно анализировать обычно после выделения микроорганизма, усваивающего C1 (например, фильтрацией), для определения концентраций (титров) этанола и других метаболитов, включая ацетат и 2,3-бутандиол. Используя ГХ анализатор, например, все указанные концентрации могут быть получены в граммах на литр, г/л. В некоторых случаях подходящее аналитическое устройство может быть включено в описанную установку для анализа газа или в противном случае использовано отдельно для измерения концентрации микроорганизма, усваивающего C1, в жидком продукте. Иллюстративные устройства включают приборы для измерения поглощения или пропускания электромагнитной энергии через образец (например, спектрофотометр), определенной биологической активности образца (например, планшет-ридер) или другого свойства образца (например, сопротивления/емкости) в одноразовом или многоразовом датчике (например, встроенном датчике биомассы). Анализ газообразного и жидкого продуктов может быть осуществлен непрерывно (например, с помощью встроенного анализатора) или периодически. Анализ также может быть осуществлен автоматически или вручную, при этом ручной ввод пробы в анализатор, такой как ГХ, зачастую предпочтителен вследствие гибкости при получении образца и для снижения требований к оборудованию. Например, системы отбора проб для автоматического анализа жидких продуктов биореакторов могут включать подходящие патрубки (например, трубки или трубы), клапаны, насосы и приводные механизмы для обеспечения возможности отбора проб из требуемого биореактора в заданное время, а также подходящие устройства для продувания (очистки) линий отбора образца для получения точных результатов. С учетом этих соображений и в соответствии с конкретными вариантами реализации, анализ газообразных продуктов может быть осуществлен автоматически, а анализ жидкого продукта может быть осуществлен вручную.

Анализ газообразных и жидких продуктов биореакторов с течением времени обеспечивает возможность контролирования одного или более рабочих параметров, используемых в качестве основы для определения пригодности данного исследуемого субстрата, содержащего C1, необязательно подверженного предварительной обработке, как описано выше. Сравнение характеристик первого биореактора (перерабатывающего эталонный субстрат, содержащий C1) с характеристиками второго биореактора (перерабатывающего исследуемый субстрат, содержащий C1) может, в целом, включать оценку существенного отклонения одного или более рабочих параметров (т.е. демонстрирующих недостаток или ухудшение качества) в отношении второго биореактора (или культуры биореактора) относительно первого биореактора (или культуры биореактора). Характеристики биореакторов можно сравнивать, например, в течение периода одновременной эксплуатации или экспериментального периода, как описано в настоящем документе. Для получения достаточных данных о характеристиках в течение рабочих периодов первого и второго биореакторов (т.е. в течение периодов времени, во время которых в указанные биореакторы загружали эталонный и исследуемый субстраты, содержащие C1, соответственно), газообразные и жидкие продукты биореакторов можно анализировать, если не непрерывно, то периодически в течение соответствующих рабочих периодов биореакторов с достаточными интервалами между отбором образцов. Иллюстративные интервалы между отбором образцов составляют от примерно 15 мин до примерно 10 ч и обычно от примерно 30 мин до примерно 8 ч. В соответствии с конкретным вариантом реализации образцы газообразных продуктов отбирают и анализируют с интервалами от примерно 30 мин до примерно 2 ч, а образцы жидких продуктов отбирают и анализируют с интервалами по примерно 4 до примерно 8 ч. Предпочтительно образцы газообразных и жидких продуктов отбирают и анализируют, по существу, с постоянными интервалами в течение экспериментальных периодов биореактора.

Как описано выше, один из рабочих параметров, которые можно сравнивать между биореакторами, представляет собой расход источника углерода C1. Другие рабочие параметры включают концентрацию (титр) этанола в жидких продуктах биореакторов и/или концентрации одного или более метаболитов (например, ацетата) в указанных жидких продуктах. Дополнительный рабочий параметр представляет собой отношение этанола к данному метаболиту (например, массовое отношение этанол/ацетат) в жидких продуктах. Пригодность данного исследуемого субстрата, содержащего C1, может быть установлена, если один или более из указанных рабочих параметров, по существу, не отличается во втором биореакторе (или культуре биореактора) по сравнению с первым биореактором (или культурой биореактора). Пороговое значение разницы, которая может быть допустима в соответствии с некоторыми вариантами реализации, может быть количественно определено как минимальный дефицит (или ухудшение) характеристик второго биореактора относительно первого биореактора.

Например, в случае описанных выше рабочих параметров ухудшение характеристик может быть основано на среднем значении рабочего параметра в течение испытательного периода (например, среднее значение использования источника углерода C1, измеренное в первом биореакторе, по сравнению с аналогичным параметром во втором биореакторе). Минимальный дефицит характеристик может составлять, например, по меньшей мере 5% дефицит, по меньшей мере 10% дефицит, по меньшей мере 15% дефицит или по меньшей мере 20% дефицит среднего значения измеренного рабочего параметра. Специалистам в данной области техники, имеющим интерес к представленному описанию, понятно, что другие конкретные минимальные значения ухудшения характеристик (например, значения в диапазоне от по меньшей мере 1% дефицита до по меньшей мере 75% дефицита) могут быть использованы для количественного определения пороговой разности, которая может быть приемлема для определения пригодности, в зависимости от конкретного рабочего параметра и других факторов. Специалистам в данной области техники, имеющим интерес к настоящему описанию, понятно также, что "дефицит" относится к снижению характеристик второго биореактора относительно первого биореактора, например, (1) к процентному снижению среднего использования источника углерода C1 во втором биореакторе по сравнению с первым биореактором, (2) к процентному снижению средней концентрации этанола в жидких продуктах второго биореактора по сравнению с аналогичным показателем в первом биореакторе, (3) к процентному увеличению средней концентрации ацетата или другого метаболита в жидких продуктах второго биореактора по сравнению с аналогичным показателем в первом биореакторе, или (4) к процентному снижению среднего отношения этанола к данному метаболиту (например, ацетату) в жидких продуктах второго биореактора по сравнению с аналогичным показателем в первом биореакторе.

В соответствии с другими вариантами реализации ухудшение характеристик может быть основано на скорости изменения рабочего параметра в течение периода исследования (например, скорости изменения использования источника углерода C1, измеренной в первом биореакторе, по сравнению с аналогичным показателем во втором биореакторе) и, следовательно, минимальный дефицит характеристик может отражать требуемую степень стабильности, которая должна быть достигнута с применением исследуемого субстрата, содержащего C1. Скорость изменения может быть выражена как средняя разность измеренного рабочего параметра в единицу времени (например, средний % снижения использования источника углерода C1/день) или, иначе, может быть выражена как константа скорости, полученная при подгонке измеренных значений рабочего параметра к модельному уравнению, такому как экспоненциальное уравнение скорости (например, экспоненциальное уравнение разложения или уравнение скорости

реакции первого порядка или более высокого порядка, или кинетическое выражение). В тех случаях, в которых скорость изменения используют в качестве основы для определения данного дефицита характеристик, также можно использовать иллюстративный, минимальный дефицит характеристик, описанный выше (выраженный в процентах). Кроме того, в таких случаях "дефицит" также относится к снижению характеристик второго биореактора по сравнению с первым биореактором, например, (1) к процентному увеличению средней скорости снижения использования C_1 или связанной константы скорости разложения во втором биореакторе по сравнению с первым биореактором, (2) к процентному увеличению средней скорости снижения концентрации этанола или связанной константы скорости разложения в жидких продуктах второго биореактора по сравнению с аналогичным показателем в первом биореакторе, (3) к процентному увеличению средней скорости увеличения концентрации ацетата или другого метаболита или связанной константы скорости в жидких продуктах второго биореактора по сравнению с аналогичным показателем в первом биореакторе или (4) к процентному увеличению средней скорости снижения отношения этанола к данному метаболиту (например, ацетату) или связанной константы скорости в жидких продуктах второго биореактора по сравнению с аналогичным показателем в первом биореакторе.

Другие рабочие параметры или другие изменения рабочих параметров могут быть использованы в качестве основы для определения пригодности данного исследуемого субстрата, содержащего C_1 , как понятно специалистам в данной области техники, имеющим интерес к настоящему описанию. Обычно сравнение между характеристиками биореакторов, используемое в качестве основы для определения пригодности исследуемого субстрата, содержащего C_1 , включает измерение, по меньшей мере, концентраций по меньшей мере одного источника углерода C_1 в газообразных продуктах первого и второго биореакторов и измерение концентраций этанола и по меньшей мере одного дополнительного метаболита (например, ацетата) в жидких продуктах указанных реакторов. Во многих случаях состав эталонного субстрата, содержащего C_1 , используемого для питания первого биореактора, известен, и, следовательно, его не анализируют в непрерывном или даже периодическом режиме в течение периода исследования. Это также может быть верно в случае исследуемого субстрата, содержащего C_1 , по меньшей мере, в течение некоторого ограниченного периода работы (например, от примерно 1 до примерно 5 дней), что может соответствовать периоду исследования). В соответствии с другими вариантами реализации состав исследуемого субстрата, содержащего C_1 , может значительно колебаться в течение периода исследования, и такие колебания могут быть действительно важными для оценки характеристик в реалистичном диапазоне состава, которые следует учитывать в промышленной практике. В конкретных вариантах реализации концентрация источника углерода C_1 или других газов в исследуемом субстрате, содержащем C_1 , может колебаться по меньшей мере на примерно 20% (например, от примерно 20% до примерно 500%) на основании значения $100\% \times (\text{максимальная концентрация/минимальная концентрация} - 1)$, где максимальная и минимальная концентрации представляют собой концентрации, измеренные во время периода исследования. В других вариантах реализации указанное колебание может составлять по меньшей мере примерно 40% (например, от примерно 40 до примерно 250%), по меньшей мере примерно 50% (например, от примерно 50 до примерно 100%).

В соответствии с конкретным способом, изображенным на фиг. 3, процесс биологического превращения, например микробиологическая ферментация для получения этанола из источника углерода C_1 с применением микроорганизма, усваивающего C_1 , осуществляют в обоих биореакторах, т.е. в первом и втором биореакторах, используя эталонный субстрат, содержащий C_1 (например, синтетический газ, который может представлять собой смесь газов, как описано выше). На указанной стадии по отдельности поддерживают первую и вторую культуры микроорганизмов, усваивающих C_1 , используя эталонный субстрат, содержащий C_1 , в качестве питательного вещества для обеих культур. В соответствии с одной из возможных технологий инициации процесса в первый и второй биореакторы сначала может быть внесен или загружен микроорганизм, усваивающий C_1 (например, в лиофилизированной форме), а затем по истечении периода роста в культуре микроорганизм может достигать достаточно высокой концентрации, так что может быть начато непрерывное добавление свежей культуральной среды.

В иллюстративных вариантах реализации культуру формируют, например, с применением сначала периодического, а затем непрерывного режима, в течение общего периода, составляющего 4 дня, или чаще от примерно 1 дня до примерно 10 дней, например от примерно 2 дней до примерно 7 дней. По истечении указанного периода эталонный субстрат, содержащий C_1 , который загружали во второй биореактор, меняют на исследуемый субстрат, содержащий C_1 (технологический газ), а эталонный субстрат, содержащий C_1 , непрерывно подают в первый биореактор. Работу первого биореактора поддерживают с помощью стабильной бактериальной культуры ("контрольной культуры/культуры для посева"), которая может быть при необходимости использована для посева или повторной инокуляции второго биореактора в случае недостаточной/нестабильной работы указанного биореактора. Первый биореактор, содержащий "контрольную культуру/культуру для посева", эксплуатируют в течение периода оценки характеристик второй культуры относительно характеристик первой культуры, например, посредством сравнения одного или более рабочих параметров, описанных выше, на основании аналитических результатов, полученных для газообразных и жидких продуктов биореакторов.

Как показано на фиг. 3, для установившегося режима работы во втором биореакторе после перехода

с эталонного на исследуемый субстрат, содержащий С1, может потребоваться 3 дня или чаще от примерно 1 до примерно 7 дней. Исследуемый субстрат, содержащий С1, может быть загружен в указанную "экспериментальную культуру" в условиях испытания (оценки) в установившемся режиме еще на 3 дня или чаще еще на 1-7 дней иллюстративного периода исследования. Для подтверждения пригодности исследуемого субстрата, содержащего С1, может быть осуществлен дополнительный период "испытания стабильности", при этом частота проведения анализа газообразных и жидких продуктов является такой же или возможно более редкой, чем предшествующая оценка характеристик "экспериментальной культуры". Период исследования для подтверждения стабильности в иллюстративных вариантах реализации может занимать от примерно 3 дней до примерно 28 дней и обычно от примерно 7 дней до примерно 21 дня. Таким образом, можно контролировать характеристики второго биореактора с экспериментальной культурой в течение времени с момента достижения условий установившегося режима для данной культуры и/или в течение последующего периода проверки стабильности. При возникновении нестабильности в течение любого одного или обоих указанных периодов или при достижении минимального дефицита характеристик, описанного выше (например, при превышении минимально приемлемого уровня дефицита рабочего параметра, как описано выше), во втором реакторе может быть повторно проведен посев или инокуляция. При отсутствии нестабильности (или при минимальном, или приемлемом уровне нестабильности) или если не достигнут минимальный дефицит характеристик, описанный выше (т.е. не превышен минимальный приемлемый уровень дефицита рабочего параметра, как описано выше), можно установить или подтвердить, что исследуемый субстрат, содержащий С1, подходит для данного процесса биологического превращения.

Если возникла необходимость посева или инокуляции второго биореактора (например, третьей бактериальной культурой), то корректирующая мера, описанная выше, может быть проверена с последующим повторением стадий в отношении второго биореактора: достижения работы на установившемся режиме, проведения оценки характеристик относительно первого биореактора и/или осуществления проверки стабильности. Иллюстративная корректирующая мера представляет собой исследуемый субстрат, содержащий С1, более высокого качества (например, более чистый), полученный после улучшенной обработки (очистки) газа до подачи во второй биореактор. Проверка корректирующей меры может включать оценку характеристик на основании получения такого же или другого минимального дефицита характеристик, как при первоначальном испытании. Как показано на фиг. 3, период "дополнительной проверки стабильности" может быть осуществлен для определения или подтверждения того, что корректирующее действие подходит для данного процесса биологического превращения. Условия и продолжительность дополнительной проверки стабильности могут быть такими же или другими по сравнению с условиями и продолжительностью первоначальной проверки стабильности. Как понятно специалистам в данной области техники, имеющим интерес к настоящему описанию, может быть осуществлена проверка дополнительных, последующих корректирующих действий (например, применение четвертой, пятой, шестой и т.д. бактериальных культур), если предыдущие корректирующие действия не были удачными.

Следующие примеры представлены для иллюстрации настоящего изобретения. Указанные примеры не следует толковать как ограничение сферы действия настоящего изобретения, поскольку эти и другие эквивалентные варианты реализации станут понятны с учетом представленного описания и прилагаемой формулы изобретения.

Пример 1. Конфигурация установки.

Сконструировали установку для анализа газа, содержащую секцию биореактора, содержащую два циркуляционных петлевых реактора (объем каждого реактора 2 л). Контроль субстратов, содержащих С1 (эталонного и исследуемого), был основан на настройках прибора учета расхода газа/контроллера, и для каждого реактора использовали автоматическую систему компенсации (контроля) pH на основании регулирования потока NH_4OH или другого основного нейтрализующего агента. Ступени реактора не содержали систем мембранного разделения для выделения и рецикла бактериальной культуры. В секции биореактора были установлены линии обогрева и вентилятор для регулирования температуры реактора. Оборудование в аналитической секции, которое располагали отдельно от секции биореактора, используя вертикальную перегородку, включало двухколоночный газовый хроматограф (отдельные ГХ колонки для образцов газа и жидкости) и клапаны/приводные устройства для обеспечения возможности автоматического отбора проб для анализа газа. Аналитическая секция была выполнена с возможностью ручного ввода проб жидких продуктов в ГХ из реакторов, определения концентраций этанола, уксусной кислоты (ацетата) и 2,3-бутандиола. Указанная секция содержала переносной компьютер для контролирования аналитических данных и технологических параметров процесса.

Более конкретно, газовый хроматограф был индивидуально изготовлен так, что содержал внешнюю печь, клапаны, приводные устройства и избирательный клапан с 6 отверстиями для обеспечения возможности автоматизированного и непрерывного анализа газообразных продуктов. Управление указанным клапаном осуществляли с помощью программного обеспечения, которое также обеспечивало управление ГХ и которое запускали с переносного компьютера. Снаружи главной печи ГХ располагали только клапаны и контур отбора проб; остальные компоненты колонки были расположены в печи. Изоляцию приводных устройств и клапанов от печи выбирали в качестве способа предотвращения термического рас-

ширения и сжатия и, следовательно, увеличения срока службы и уменьшения технического обслуживания. Ширина ГХ и расположенных вокруг него компонентов составляла примерно 80 см. Другое оборудование для применения с ГХ включало генератор чистого воздуха, детектор теплопроводности (TCD) (для работы с аргонном высокой чистоты) и пламенно-ионизационный детектор (FID) (для работы со сжатым воздухом и водородом).

Биореактор и аналитические секции (включая ГХ и расположенные вокруг него компоненты с расстоянием по периферии примерно 10 см для обеспечения охлаждения) устанавливали в автономный ящик для транспортировки. Предварительную обработку субстрата, содержащего C1, с применением, например, активированного углерода считали "нестандартной" опцией в зависимости от качества газа заказчика. Для дополнительного контроля/минимизации колебаний температуры установка для анализа газа может быть установлена в помещении (например, во временной постройке).

Пример 2.

Установку для анализа газа из примера 1 направляли на площадку заказчика для проведения испытания субстрата, содержащего C1 (исследуемого субстрата, содержащего C1), у заказчика. Анализируемый газ, содержащий C1, представлял собой промышленный газ, получаемый в качестве основного побочного продукта в процессе производства фосфора. Обычно заказчик сжигал на факеле газ, содержащий C1. Установку для анализа газа направляли на промышленную площадку для определения пригодности исследуемого субстрата, содержащего C1, для преобразования в продукты с применением процесса биологического превращения.

Состав исследуемого субстрата, содержащего C1, представлен в табл. 3.

Таблица 3

Средний химический состав				Известные примеси (ppm)			
CO	N ₂	CO ₂	H ₂	PH ₃	H ₂ S	P ₂ O ₅	P ₄
72%	20%	1%	6%	1200-1400	0-1000	1000-2000	300-1000

Очистка газа исследуемого субстрата, содержащего C1, обычно включала пропускание исследуемого субстрата, содержащего C1, через электростатический пылеуловитель и водяной скруббер. Исследуемый субстрат, содержащий C1, дополнительно обрабатывали для удаления известных примесей. Дополнительная обработка включала применение двух барботажно-пенных скрубберов и слоя активированного углерода. Первый барботажно-пенный скруббер содержал раствор карбоната натрия (5%), второй барботажно-пенный скруббер содержал раствор сульфата меди, а слой углерода содержал примерно 10 кг продукта "Sulfisorb 8 GAC" производства компании Calgon.

Использовали вспомогательную компрессорную установку со сжатым воздухом для повышения давления обработанного исследуемого субстрата, содержащего C1, для обеспечения минимум 2,0 бар и.д. на входе в установку для анализа газа.

На мощностях заказчика проводили три экспериментальных цикла для оценки пригодности исследуемого субстрата, содержащего C1. Экспериментальные циклы 1 и 2 проводили с применением обработанного исследуемого субстрата, содержащего C1, а испытание 3 проводили с применением исходного/необработанного исследуемого газа, содержащего C1.

Экспериментальный цикл 1 проводили с применением обработанного исследуемого субстрата, содержащего C1, имеющего следующий состав:

CO	PH ₃ (ppm)	H ₂ S (ppm)	P ₂ O ₅ (ppm)	P ₄ (ppm)
60%	1,0 - 1,8	53	15 - 60	20

В реакционную емкость добавляли жидкую питательную среду. Жидкая питательная среда содержала MgCl, CaCl₂ (0,5 mM), KCl (2 mM), H₃PO₄ (5 mM), Fe (100 мкМ), Ni, Zn (5 мкМ), Mn, B, W, Mo и Se (2 мкМ) на 1 л. Среду обрабатывали в автоклаве и после обработки в автоклаве среду дополняли тиамин, пантотенатом (0,05 мг) и биотином (0,02 мг) и восстанавливали с помощью 3 mM цистеина-HCl.

Газообразный азот продували через реакционный сосуд и регулировали pH и ОВП. Затем реакционный сосуд GTS инокулировали лиофилизированными клетками через шприц. Лيوфилизированные клетки представляли собой *Clostridium. Autoethanogenum*, штамм DSM23693, находящийся на хранении в DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур, Inhoffenstraße 7 B, 38124 Брауншвейг, Германия). Затем входящий газ меняли с газообразного азота на обработанный газ, содержащий C1.

Экспериментальный цикл осуществляли в течение 5 дней. Через 4,2 дня рост культуры *Clostridium autoethanogenum* подтверждали визуально. На 5 день анализ ГХ ферментативного бульона подтвердил концентрацию этанола 1,6 г/л и концентрацию ацетата 5,4 г/л.

Экспериментальный цикл 1 подтвердил успешное выживание лиофилизированного инокулята, показал непрерывный рост культуры и продемонстрировал выработку этанола данной культурой. Экспериментальный цикл 1 подтвердил, что обработанный исследуемый субстрат, содержащий C1, подходит для данного биологического процесса, и показал, что в исследуемом субстрате, содержащем C1, отсутствуют

неизвестные примеси, отрицательно влияющие на рост.

Экспериментальный цикл 2 проводили с применением обработанного субстрата, содержащего C1, содержащего 13% CO. Визуальное подтверждение роста получили через 3,75 дня. На 4,75 день была показана относительно стабильная концентрация уксусной кислоты 5-6 г/л, без параллельной выработки этанола. Такой результат согласуется с недостаточными условиями выращивания. Содержание CO в поступающем исследуемом субстрате, содержащем C1, на 9,73 день увеличивали до концентрации 72%. В течение следующих 3 дней наблюдали выработку этанола, измеренное значение составляло более 8 г/л этанола.

Экспериментальный цикл 2 подтвердил данные экспериментального цикла 1.

Экспериментальный цикл 3 начинали, используя обработанный исследуемый газ, содержащий C1, с содержанием CO 72%. После обнаружения роста культуры газ меняли на необработанный исследуемый субстрат, содержащий C1. Культура разрушилась в течение одного дня после подачи необработанного исследуемого субстрата, содержащего C1, в установку для анализа газа. Экспериментальный цикл 3 подтвердил, что исходный/необработанный исследуемый газ, содержащий C1, не подходит для данного биологического процесса.

Эксплуатация установки/вспомогательное оборудование.

В оба биореактора загружали (инокулировали) лиофилизированные организмы и формировали культуры с применением синтетического газа, такого как баллонный газ местного поставщика. После запуска с синтетическим газом один реактор переключали на подачу газа с промышленной площадки для проверки характеристик в действии в течение периода исследования от нескольких дней до нескольких недель. Если газ с промышленной площадки не может быть обеспечен с достаточным давлением, например, номинально по меньшей мере примерно 2 бар абсолютного давления, например, от примерно 3 до примерно 10 бар абсолютного давления, то при необходимости может быть использован бустерный компрессор для повышения доступного давления газа с промышленной площадки до указанного давления, что обеспечивает стабильную подачу в биореакторы. Клапан, используемый для переключения источника газа, подаваемого в биореактор, с синтетического газа (например, сжатого газа или баллонного газа) на газ с промышленной площадки, в некоторых случаях может иметь дополнительные отверстия для обеспечения возможности подачи потока газа из альтернативных источников. Например, 3-ходовой клапан может обеспечивать возможность изменения оператором источника, выбранного из синтетического газа, газа с промышленной площадки и продувочного газа, который может представлять собой инертный газ, такой как азот. Могут быть осуществлены необязательные пробные циклы для изучения повышения титра этанола в жидких продуктах. Вследствие низкой проектной скорости течения газа (порядка 2 л/мин), необходимой для проведения анализа, газообразные продукты, выходящие из установки для анализа газа, могут быть возвращены в исходный поток (например, поток отработанного газа заказчика) или в противном случае выпущены в атмосферу.

Ниже представлен иллюстративный перечень оборудования, вспомогательных материалов и технического обеспечения, подлежащего включению в установку для анализа газа, а также оборудование/требования предполагаемой промышленной установки (заказчика) и дополнительные требования местных поставщиков, необходимые для реализации/эксплуатации установки для анализа газа.

Входит в состав установки для анализа газа	Предполагаемая промышленная установка	Местные поставщики
Компрессор (при необходимости) Микробы 1х поддержка персонала Среда (в порошковой форме) Стеклянная посуда Химические вещества (поставляемые в упаковке) Обработка газа (необязательно) Рабочие инструкции/руководства Датчики биомассы (необязательно) Обычные лабораторные расходные материалы (шприцы, пробирки, иглы, фильтры и т.д.)	Газ с промышленной площадки с номинальным давлением 5 бар Вентиляционный клапан (или возврат в сырьевой поток) Корпус (проветриваемый) Вода Утилизация отходов Обработка газа (необязательно) Информация, касающаяся газа с промышленной площадки: колебания состава, природа и концентрация примесей. CO ₂ огнетушитель Стол	Синтетические газы (N ₂ , CO, аргон, водород) Аналитическая (ГХ-МС) лаборатория

Возможности/задачи/результаты.

Некоторые основные возможности, связанные с эксплуатацией установки для анализа газа, включают проверку (1) стабильной и иным образом приемлемой эксплуатации в диапазоне переменного состава газа, поставляемого с производственной площадки, (2) позитивного роста микроорганизмов на необработанном газе, (3) профиля примесей в газообразных и жидких образцах, (4) целевых показателей, полученных в ином месте (при автономном испытании) с применением синтетической смеси, (5) любых эксплуатационных несоответствий, обусловленных применением газа с промышленной площадки, по сравнению с синтетическим газом, и/или обусловленных применением технологической (местной, технической) воды по сравнению с водопроводной (местной, питьевой) водой, а также по сравнению с закупленной дистиллированной водой.

Дополнительные задачи локального анализа газа, получаемого с предполагаемой промышленной площадки, представляют собой (1) получение сравнения характеристик работы биореактора с применением местного газа, с предварительной обработкой или без нее, и технологической воды по сравнению с применением синтетического газа, (2) оценку влияния примесей газа, включая следовые соединения, в агрегате на усвоение газа, рост микроорганизмов и селективность по метаболитам по сравнению с синтетическим газом без примесей, (3) оценку влияния местной технологической воды, аналогично, (4) оценку необходимости дополнительной очистки/предварительной обработки газа, (5) оценку пригодности местной технологической воды для поддержания бактериального роста при различных скоростях введения разбавителя (свежей среды), (6) проверку или обновление модели реактора на основании полученных данных и, соответственно, улучшение предполагаемых характеристик как основа для предоставления гарантий, (7) проведение после гибели культуры анализа примесей газа, десорбированных со слоя, использованного для предварительной обработки газа (слоя адсорбента), например, посредством сравнения с известными примесями.

Ключевые результаты, полученные на основании информации, собранной для установки для анализа газа, предположительно будут варьироваться и зависеть от потребностей проекта и предполагаемой промышленной площадки. Некоторые иллюстративные примеры результатов представляют собой проверку того, что (1) промышленная установка обеспечивает газообразный поток, который поддерживает процесс биологического превращения, (2) селективность по продукту (этанолу) и метаболиту является приемлемой с экономической точки зрения, (3) предложенная стратегия очистки газа (при ее использо-

вании) является эффективной, (4) технологическая вода или другой местный источник воды является приемлемым, (5) диапазон колебаний состава газа может быть допустимым, и их влияние является предсказуемым, (6) ГХ анализ и другая информация об установке для анализа газа является точной, (7) содержание примесей в газе (при их обнаружении) может быть приемлемым для микробиологической культуры.

В целом, аспекты настоящего изобретения относятся к транспортируемым установкам для анализа на месте производства реального газа, образующегося на предполагаемых мощностях, для применения в процессах биологического превращения и, в частности, для микробиологической ферментации субстратов, содержащих СО, для получения этанола. Установки для анализа газа и связанные способы и методики оценки пригодности исследуемого субстрата, содержащего СО, обеспечивают ряд преимуществ, описанных в настоящем документе, в частности, в отношении получения реалистичных и точных прогнозируемых результатов и требуемых характеристик, которые не могут быть получены иначе на основании попыток имитации состава промышленного газа за пределами промышленной площадки. Специалистам в данной области техники, черпающим новую информацию из представленного описания, понятно, что могут быть сделаны различные изменения в отношении устройств и способов, описанных в настоящем документе, без отклонения от сферы действия настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения пригодности исследуемого газообразного субстрата, содержащего С1, включающего по меньшей мере один источник углерода С1, выбранный из группы, состоящей из СО, СО₂ и СН₄, для поддержания процесса биологического превращения в установке для анализа газа, содержащей:

(i) первую ступень биореактора для оценки характеристик эталонного газообразного субстрата, содержащего С1, включающего по меньшей мере один источник углерода С1, выбранный из группы, состоящей из СО, СО₂ и СН₄;

(ii) вторую ступень биореактора для оценки характеристик исследуемого газообразного субстрата, содержащего С1, включающего по меньшей мере один источник углерода С1, выбранный из группы, состоящей из СО, СО₂ и СН₄;

причем каждая из первой и второй ступени биореактора содержит циркуляционный петлевой биореактор;

(iii) аналитическую секцию, содержащую газовый хроматографический (ГХ) анализатор, имеющий первую и вторую хроматографические колонки, выполненные с возможностью анализа газообразных и жидких продуктов первого и второго биореакторов;

при этом установка для анализа газа выполнена с возможностью размещения в контейнере, имеющем объем менее чем примерно 6 м³, и транспортировки на различные участки;

(a) раздельное размещение первой и второй культур, содержащих одинаковые карбоксидотрофные микроорганизмы, использующие эталонный газообразный субстрат, содержащий С1, в качестве питательной среды для выработки этанола и по меньшей мере одного дополнительного метаболита в первой и второй ступенях биореактора соответственно;

(b) замену эталонного газообразного субстрата, содержащего С1, в качестве питательной среды для второй культуры на исследуемый газообразный субстрат, содержащий С1;

(c) анализ характеристик первой культуры относительно характеристик второй культуры в таком же наборе требуемых рабочих условий, но с применением других эталонных и исследуемых газообразных субстратов, содержащих С1;

(d) в случае, если характеристики второй культуры на стадии (c) ниже порогового значения разницы между характеристиками первой и второй культуры, подтверждение того, что исследуемый газообразный субстрат, содержащий С1, поддерживает процесс биологического превращения;

(e) в случае, если характеристики второй культуры на стадии (c) выше порогового значения разницы между характеристиками первой и второй культуры, предварительную обработку или улучшенную предварительную обработку исследуемого газообразного субстрата, содержащего С1, для обеспечения исследуемого газообразного субстрата, содержащего С1, более высокого качества относительно исследуемого газообразного субстрата, содержащего С1, использованного для оценки характеристик на стадии (c).

2. Способ по п.1, дополнительно включающий:

(f) анализ характеристик первой культуры относительно характеристик третьей культуры в таком же наборе требуемых рабочих условий, но с применением других эталонных и более качественных исследуемых газообразных субстратов, содержащих С1; и

(g) в случае, если характеристики третьей культуры на стадии (f) ниже порогового значения разницы между характеристиками первой и третьей культуры, подтверждение того, что более качественный исследуемый газообразный субстрат, содержащий С1, поддерживает процесс биологического превращения.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что для получения первой и второй культур или для подпитки первой и второй культур используют различные источники воды.

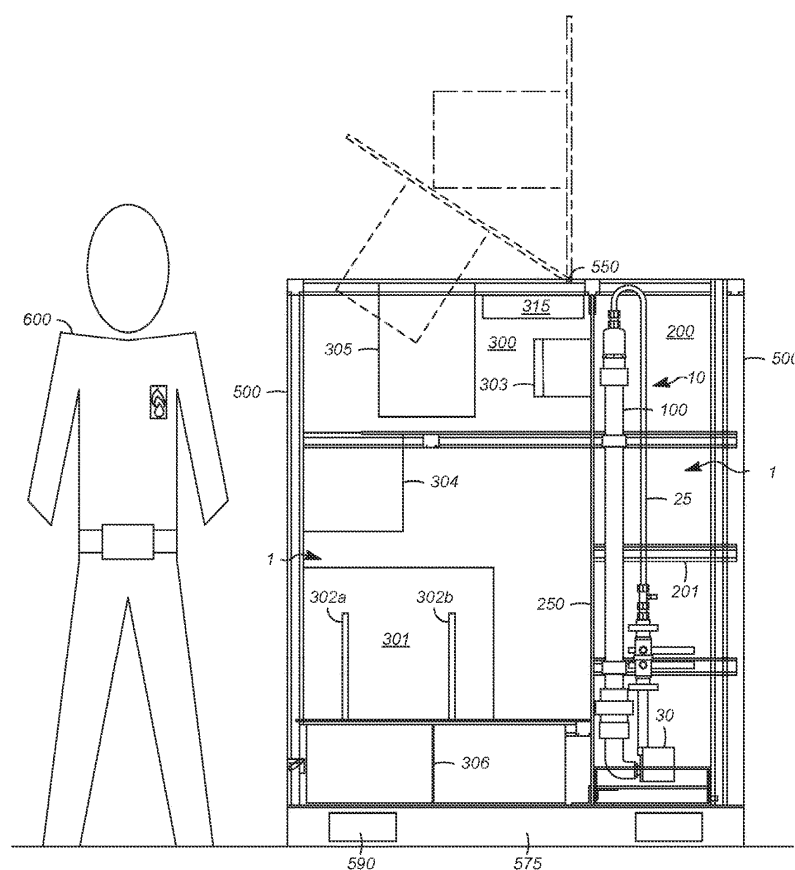
4. Способ по п.1, отличающийся тем, что на стадии (с) характеристики первой и второй культур анализируют одновременно в течение периода исследования по меньшей мере примерно 7 дней.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что микроорганизм, усваивающий C1, выбран из группы, состоящей из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei*.

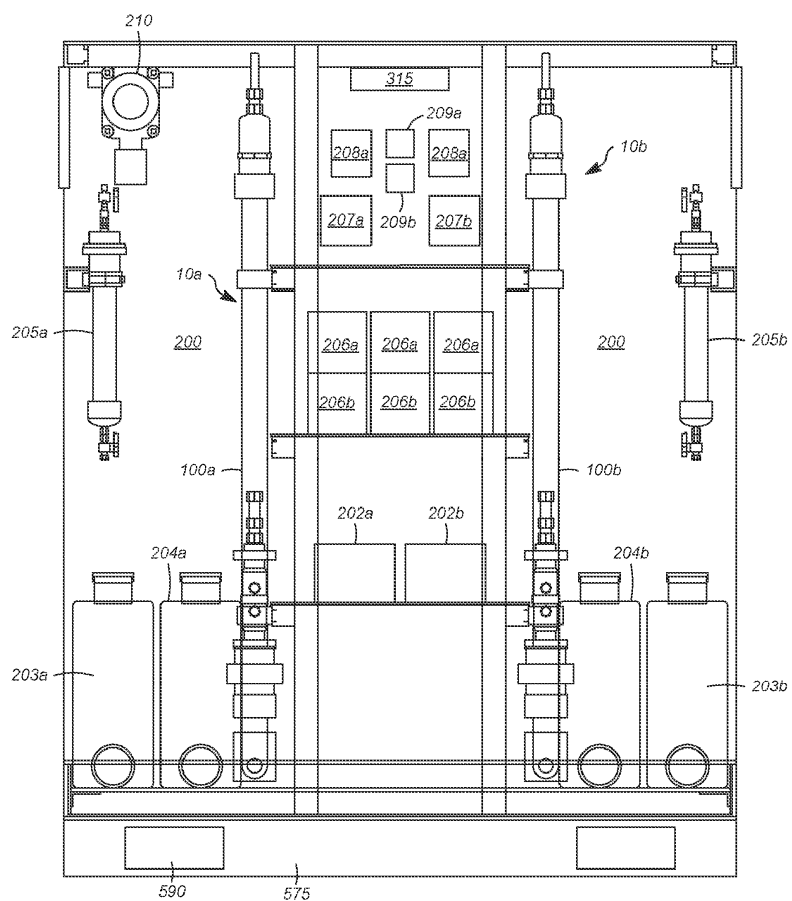
6. Способ по п.1, в котором установка для анализа газа дополнительно содержит систему оперативного управления для регулирования одного или более технологических параметров, выбранных из группы, состоящей из скорости добавления свежей культуральной среды, скорости подачи газообразного субстрата, содержащего C1, температуры реактора и pH в реакторе.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что один или более технологических параметров включают pH в реакторе, а система управления включает приборы для регулирования потока основного нейтрализующего агента в биореактор на основании измеренного pH в реакторе.

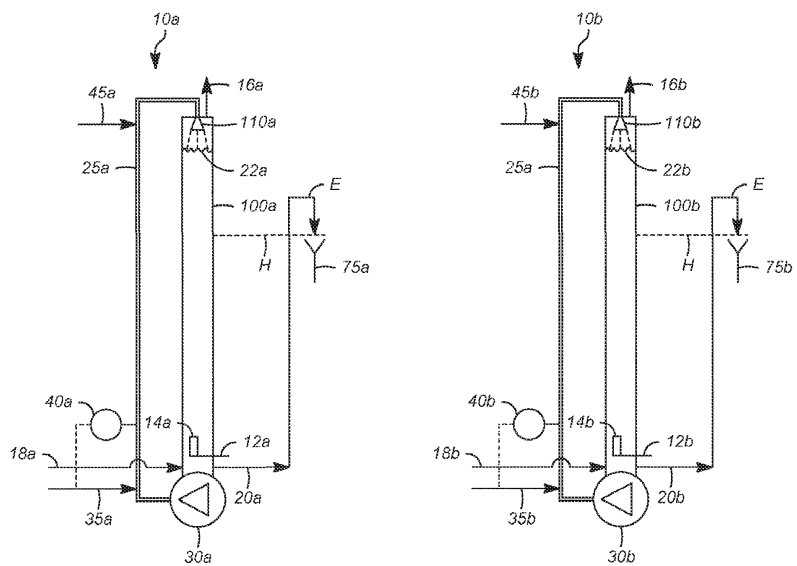
8. Способ по п.1, в котором установка для анализа газа дополнительно содержит систему обеспечения безопасности для приостановки потока по меньшей мере одного исследуемого газообразного субстрата, содержащего C1, или эталонного газообразного субстрата, содержащего C1, в ответ на измерение концентрации источника углерода C1 в условиях окружающей среды, превышающей пороговую концентрацию.



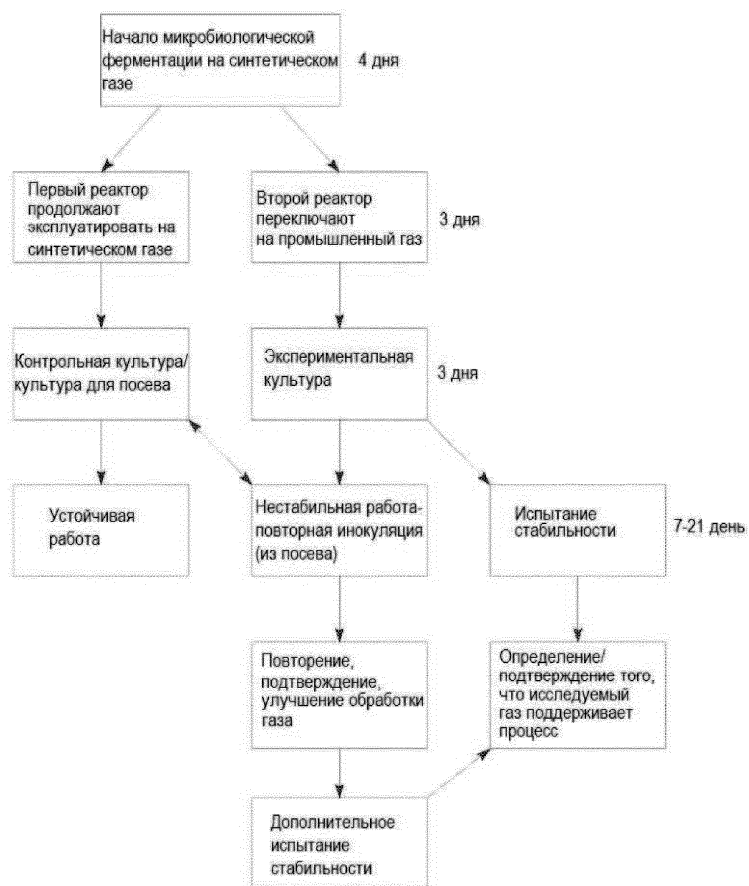
Фиг. 1А



Фиг. 1В



Фиг. 2



Фиг. 3



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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