

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201991813** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.01.29

(51) Int. Cl. *C12M 1/00* (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12P 13/00 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.02.04

(54) МИКРОБНАЯ КОНВЕРСИЯ CO₂ И ДРУГИХ СУБСТРАТОВ C1 В ВЕГАНСКИЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА, УДОБРЕНИЯ, БИОСТИМУЛЯТОРЫ И СИСТЕМЫ ДЛЯ УСКОРЕННОЙ СЕКВЕСТРАЦИИ ПОЧВЕННОГО УГЛЕРОДА

(31) 62/454,347

(72) Изобретатель:
Дайсон Лиза, Рид Джон, Геллер Джил,
Хенде Сонали (US)

(32) 2017.02.03

(33) US

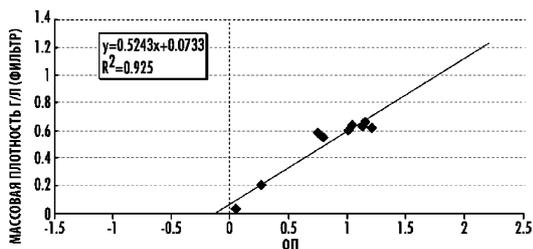
(86) PCT/US2018/016779

(74) Представитель:
Харин А.В., Стойко Г.В., Буре Н.Н.
(RU)

(87) WO 2018/144965 2018.08.09

(71) Заявитель:
КИВЕРДИ, ИНК. (US)

(57) Обеспечиваются микроорганизмы и биологические процессы, которые превращают газообразные субстраты, такие как возобновляемый H₂ и генераторный газ из отходов CO₂, или синтез-газ в биомассу с высоким содержанием белка, которая может использоваться непосредственно для питания человека или в качестве питательного вещества для растений, грибов или других микроорганизмов или в качестве источника почвенного углерода, азота и других минеральных питательных веществ. Возобновляемый H₂, используемый в описанных в данном документе процессах, может быть получен путем электролиза с использованием солнечной или ветровой энергии. Генераторный газ, используемый в описанных в данном документе процессах, может быть получен из источников, которые включают газификацию отходов сырья и/или остатков биомассы, отходящих газов промышленных процессов или природного газа, биогаза или свалочного газа.



A1

201991813

201991813

A1

**МИКРОБНАЯ КОНВЕРСИЯ CO₂ И ДРУГИХ СУБСТРАТОВ C1
В ВЕГАНСКИЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА, УДОБРЕНИЯ,
БИОСТИМУЛЯТОРЫ И СИСТЕМЫ ДЛЯ УСКОРЕННОЙ СЕКВЕСТРАЦИИ
ПОЧВЕННОГО УГЛЕРОДА**

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Данная заявка испрашивает преимущество по предварительной заявке США № 62/454347, поданной 3 февраля 2017 г., которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[2] Изобретение относится к области химии, применяемой в сельском хозяйстве, конкретнее к органическому питанию растений и грибов, кормлению животных и питанию человека. В частности, изобретение относится к способу получения питательных веществ и экстрактов из органического материала, полученного из субстратов C1 и других неорганических веществ, которые можно использовать в качестве биостимуляторов и/или биоудобрений в сельском хозяйстве, в частности в органическом земледелии, и/или в качестве белка и пищевых добавок в кормах для животных, и/или в качестве ингредиентов питания человека.

ИЗВЕСТНЫЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[3] Для удовлетворения растущих потребностей в продуктах питания необходимы устойчивые и возобновляемые источники аминокислот, белков, витаминов и других питательных веществ. Также необходимо уменьшить количество выбросов углекислого газа и других парниковых газов (ПГ) в атмосферу, а также сократить потребление воды и глобальное потребление энергии, получаемой с использованием угля, нефти и природного газа, в системах производства продуктов питания. Растущий спрос в мировой экономике оказывает все большее давление на земельные и водные ресурсы. Повышенное давление также оказывается на традиционные ископаемые углеводородные ресурсы для производства продуктов питания и других продуктов сельскохозяйственного происхождения. Многие отрасли промышленности, включая современное сельское хозяйство, в значительной степени зависят от наличия источников ископаемых углеводородов в качестве сырья для производства и переработки сельскохозяйственных культур. Экономически эффективные альтернативы существующим в настоящее время практикам могут помочь уменьшить повышенное давление на землепользование,

природные среды обитания, воду, спрос на ископаемые ресурсы, затраты на сырье и выбросы парниковых газов.

[4] Известны биологические системы, которые фиксируют газообразный углерод посредством естественных биохимических метаболических процессов. Современная сельскохозяйственная система, основанная на фотосинтезе культур высших растений, является одним из очевидных примеров. Также были разработаны системы водорослей для получения продуктов питания и других продуктов сельскохозяйственного происхождения из CO_2 посредством реакций фотосинтеза. Существуют также гетеротрофные реакции и процессы с использованием сырья с фиксированным углеродом, такого как сахар, которое, в свою очередь, продуцируют из CO_2 посредством фотосинтеза. Таким образом, эти гетеротрофные реакции и производство косвенно зависят от фотосинтеза. Однако, существует ряд проблем и ограничений, с которыми сталкиваются современные методы ведения сельского хозяйства, животноводства и аквакультуры, а также получаемые фотосинтезом питательные вещества и корма, используемые в настоящее время.

[5] Мировые сельскохозяйственные системы сталкиваются с проблемами удовлетворения двух противоречивых потребностей: (А) увеличение производства продуктов питания для удовлетворения спроса, возникающего с ростом численности населения планеты до прогнозируемых более чем 9,3 млрд. к 2050 году, и (В) уменьшение вредного воздействия сельского хозяйства на здоровье человека и окружающую среду [T. Searchinger, C. Hanson, J. Ranganathan, B. Lipinski, R. Waite, R. Winterbottom, A. Dinshaw, and R. Heimlich, "The great balancing act," World Resources Institute Working Paper, Washington, DC, 2013.]. Формирующийся мировой средний класс последние полвека подпитывал растущий спрос на рационы с повышенным содержанием белка. Есть опасения по поводу растущей нехватки пищевых белков, а также экологических проблем, которые влияют или являются результатом производства продуктов питания, таких как ограничения в землеспользовании, нехватка воды, изменение климата и долгосрочное повышение цен на корма и продукты питания на мировом рынке [S. Matassa, N. Boon, and W. Verstraete (2015) "Resource recovery from used water: the manufacturing abilities of hydrogen-oxidizing bacteria" *Water Research* 68:467-478(<http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25462753>)].

[6] Удобрения, используемые в настоящее время, состоят в основном из неорганических и/или синтетических соединений. Тем не менее, растет интерес к использованию органических удобрений и кондиционирующих добавок. Такие органические материалы могут быть добавлены в почву, при этом питательные вещества

для растений, такие как аммониевые, нитрат- и сульфат-ионы, высвобождаются под действием почвенной микрофлоры [Wainwright, M., W. Nevell, and U. Skiba (1985) "Fertilizer potential of some commercially available forms of keratin microbial biomass" *Enzyme Microb. Technol.* 7:108-110].

[7] Помимо обеспечения комплексного источника питательных веществ для растений и грибов, органические удобрения вносят органическое вещество в почву, что, например, для песчаных почв или малоактивных глинистых почв обеспечивает улучшение физических, химических и биологических свойств благодаря кондиционирующему эффекту. Удобрения, полезные для кондиционирования почвы, могут содержать микроэлементы и полезные микроорганизмы, такие как дрожжи, бактерии или грибы. В китайском патенте CN1911870 описывается питательное вещество для растений, которое усиливает почвенные микроорганизмы, способствует росту растений, увеличивает скорость усвоения удобрений и повышает устойчивость растений к болезням и стрессу. Это питательное вещество включает дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, бактерии *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus acidophilus* и другие компоненты, такие как продукты переработки картофеля или кофе, глюкоза, пептон, сульфат магния и марганца, вторичный кислый фосфат калия и хлорид натрия.

[8] В почве изобилуют многочисленные микроорганизмы, особенно в ризосфере растений. Хорошо известно, что значительное число бактериальных и грибковых видов имеет функциональные связи и составляет целостную систему с растениями. Они способны оказывать благотворное влияние на рост растений. Было обнаружено, что эффект азотфиксации, индуцируемый азотфиксаторами, является значительным не только для бобовых, но и для не-бобовых растений. Более того, некоторые штаммы обладают несколькими функциями, влияющими на рост растений. Благоприятное воздействие азоспирилл (*Azospirillum*) может быть обусловлено как их азотфиксацией, так и стимулирующим эффектом на развитие корней. Кроме того, сообщалось, что азотобактерии (*Azotobacter*) не только обеспечивают азот, но и продуцируют множество стимулирующих рост веществ, в том числе индолуксусную кислоту, гиббереллины и витамины В. Эти вещества стимулируют, по крайней мере, до некоторой степени, продуцирование корневых экссудатов. Сообщалось, что корневые экссудаты стимулируют выделение аммиака в ризосферу азотобактериями, увеличивая тем самым содержание азота в почве. Эффект, аналогичный создаваемому экссудатами растений, был приписан содержащемуся в органических удобрениях органическому углероду. Сообщалось, что использование пригодных сельскохозяйственных удобрений, зеленых удобрений и других органических удобрений (organic manures) и туков (fertilizers)

может усиливать фиксацию N₂ азотобактериями. Это может быть связано с тем, что для реакции фиксации азота требуется значительное количество энергии от доступного органического углерода для разрыва связей между атомами азота.

[9] Солюбилизирующие фосфат (P) и калий (K) бактерии могут усиливать поглощение минералов растениями путем солюбилизации нерастворимого P и выделения K из силиката в почве.

[10] Таким образом, почвенные микроорганизмы являются важными компонентами субэкосистемы естественной почвы, поскольку они не только могут вносить вклад в доступность питательных веществ в почве, но и помогают связывать частицы почвы в стабильные агрегаты, которые улучшают структуру почвы и снижают потенциал эрозии.

[11] Большинство растений, растущих в естественных условиях, связаны с грибковыми микоризами. Микоризный симбиоз, связывающий биотические и геохимические части экосистемы, также можно рассматривать как мостик, соединяющий корень с окружающими почвенными микросредами обитания. Ризобактерии могут действовать как "бактерии-помощники микоризации", которые улучшают способность микоризных грибов колонизировать корни растений.

[12] Недавно были предложены новые стратегии, направленные на улучшение устойчивости производства сельскохозяйственных культур и повышение производительности. Одним из многообещающих подходов является применение веществ и/или микроорганизмов, называемых также "биостимуляторы" и/или "биоудобрения" [P. Calvo, L. Nelson, and J. Kloepper (2014) "Agricultural uses of plant biostimulants," *Plant and Soil* 383(1-):3-41, 2014. (<http://dx.doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8>)].

[13] Применение микробных продуктов для растений имеет несколько преимуществ по сравнению с обычными химическими веществами для сельскохозяйственных целей, включая следующие: (i) микробные продукты считаются более безопасными, чем многие из используемых в настоящее время химических веществ; (ii) ни токсичные вещества, ни сами микробы не накапливаются в пищевой цепи.

[14] В последнее время, помимо внесения удобрений в почву, растущий интерес был сосредоточен на листовых удобрениях для растений. Внекорневая подкормка - это метод подкормки растений путем нанесения жидкого удобрения непосредственно на их листья. При применении листовых удобрений признается, что растениям требуются не только основные химические элементы, такие как азот, калий, фосфор, кальций и магний. Также признается, что сопутствующие соединения, которые могут повысить эффективность и приемлемость различных элементов, также имеют большое значение.

Такие усиливающие эффективность соединения включают аминокислоты, адгезивы и поверхностно-активные вещества, многие из которых входят в состав современных листовых удобрений ["Amino acid and soluble protein cocktail from waste keratin hydrolysed by a fungal keratinase of *Paecilomyces marquandii*"; Veselá, M., and Friedrich (2009) J., *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 14:84-90].

[15] Растительные "биостимуляторы" иногда относятся к компонентам, отличным от удобрений, которые влияют на рост и/или метаболизм растений при листовом внесении или внесении в почву. Некоторые биостимуляторы растений действуют путем повышения или понижения уровней растительных гормонов. Растительные биостимуляторы обычно подпадают под одну из трех категорий: смеси аминокислот, пептидов и белков; гормоны; и гуминовые вещества.

[16] Сообщалось, что биостимуляторы улучшают параметры качества сельскохозяйственных культур и эффективность питательных веществ, увеличивают темпы роста, скорость фотосинтеза, урожайность, рост корней и листьев растений, устойчивость к абиотическому стрессу и устойчивость к болезням, улучшают возделываемые почвы и противодействуют росту сорняков. Типичные растительные биостимуляторы включают композиции на основе экстракта морских водорослей, дрожжевого экстракта, гуминовых кислот, аминокислот, салициловой кислоты, твердых веществ биологического происхождения, гидролизованных белков, силикатов и/или синтетических соединений. Примерами стресс-факторов являются жара, холод, засуха, износ, избыточная влажность, засоленность, щелочность или другие неблагоприятные значения pH почвы, дефицит питательных веществ, окислительная активность, токсичность тяжелых металлов, болезни и другие.

[17] Существует повышенный интерес к биостимуляторам и биоудобрениям, полученным из микробов. Например, Kobayashi, et al. изучали влияние экстракта дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в сочетании с неорганическим удобрением на рост растений гороха ["Effect of yeast extracts on higher plants", Kobayashi et al, *Plant and Soil* (1980), 57 (1)4:1-7;]. Венгерский патент HU9902060 описывает водную композицию удобрений для листьев и корней растений, содержащую дрожжи *Saccharomyces* плюс микроэлементы, комплексообразующие агенты, буферные агенты и ряд других питательных веществ, таких как аминокислоты, гуминовые кислоты, ферменты, сахара и т.д.

[18] Белковые гидролизаты (БГ) являются важной категорией растительных биостимуляторов, включающих смесь полипептидов, олигопептидов и аминокислот, которые производятся из белкового сырья с использованием частичного гидролиза [G. Schaafsma (2009) "Safety of protein hydrolysates, fractions thereof and bioactive peptides in

human nutrition" *European journal of clinical nutrition* 63 (10):1161-1168 (<http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19623200>)]. БГ были предметом повышенного интереса из-за их благотворного влияния на продуктивность и качество плодовых культур, в том числе на фруктовые деревья, овощи, цветочные культуры и декоративные растения, особенно в условиях стресса под влиянием условий среды. Было обнаружено, что они увеличивают биомассу и продуктивность побегов и корней [K. Edward, G. Aneta, S. Agnieszka, and W. Renata, "The effect of cultivar type, time of cultivation, and biostimulant treatment on the yield of spinach (*spinacia oleracea* l.)," pp. 9+, 2013. [Online]. Доступно по адресу: <http://dx.doi.org/10.2478/fhort-2013-0153>; Lisiecka et al., 2011; N. Parađiković, T. Vinković, I. Vinković Vrček, I. Žuntar, M. Bojić, and Medić-Šarić, "Effect of natural biostimulants on yield and nutritional quality: an example of sweet yellow pepper (*capsicum annuum* l.) plants," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 91, no. 12, pp. 2146-2152, Sep. 2011. [Online]. Доступно по адресу: <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.4431>; G. Colla, Y. Rouphael, R. Canaguier, E. Svecova, and M. Cardarelli, "Biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis," *Frontiers in Plant Science*, vol. 5, p. 448, 2014. [Online]. Доступно по адресу: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00448>; A. Ertani, D. Pizzeghello, O. Francioso, P. Sambo, S. Sanchez-Cortes, and S. Nardi, "*Capsicum chinensis* l. growth and nutraceutical properties are enhanced by biostimulants in a long-term period: chemical and metabolomic approaches." *Frontiers in plant science*, vol. 5, 2014. [Online]. Доступно по адресу: <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25136346>). Они являются эффективными инструментами для повышения устойчивости плодового хозяйства, и во многих исследованиях были задокументированы преимущества применения рН для роста, урожайности, качества продукции, эффективности использования ресурсов и устойчивости к экологическим и химическим воздействиям почвы на некоторые плодовые культуры.

[19] Было продемонстрировано, что применение рН способствует вегетативному росту и усвоению макро- и микроэлементов у некоторых плодовых культур, что приводит к повышению продуктивности сельскохозяйственных культур. Покрытие семян БГ с целью повышения всхожести и раннего роста овощных и цветочных культур, листовых растений и газонных трав также является перспективным применением.

[20] Аминокислоты и малые пептиды поглощаются как корнями, так и листьями, а затем перемещаются в растение. Растения поглощают аминокислоты через устьица. Для некоторых растений аминокислоты являются основным источником азота [Chapin, F. S., L. Moilanen, and K. Kielland (1993) "Preferential use of organic nitrogen for growth by a non-mycorrhizal arctic sedge" *Nature* 361:150-153]. В природе внекорневая подкормка является

очень важным механизмом поглощения азота в бромелиях, особенно эпифитных [Endres, L. and H. Mercier (2003) "Amino acid uptake and profile in bromeliads with different habits cultivated in vitro" *Plant Physiol. Biochem.* 41:181-187]. Внекорневая подкормка в виде белкового гидролизата и листовенного спрея обеспечивает готовые строительные блоки для синтеза белка.

[21] После поглощения корнями/лиственной аминокислоты и пептиды транспортируются от клетки к клетке и на большие расстояния по сосудистой системе растения (ксилеме и флоэме) для поддержания метаболизма и развития растения. Несколько классов интегральных мембранных белков участвуют в транспорте аминокислот и пептидов через клеточные мембраны растений. Например, члены семейства лизин-гистидин-подобных транспортеров, семейства аминокислотных пермеаз и семейства пролиновых транспортеров принимают непосредственное участие в поглощении аминокислот через корни. Аминокислоты и амиды представляют в большинстве растений основную транспортную форму органического азота, и могут быть использованы непосредственно для синтеза белка и других существенных соединений азота или метаболизированы.

[22] Микроорганизмы, живущие в филлосфере и ризосфере, также могут влиять на реакцию растений на применение БГ не только потому, что они конкурируют с растениями за аминокислоты и пептиды, но и потому, что они секретируют ферменты, способные гидролизовать пептиды на небольшие фрагменты, которые могут действовать как сигнальные соединения, модулируя отзывчивость сельскохозяйственной культуры. Кроме того, недавние исследования показали, что применение БГ растительного происхождения на салате-латуке стимулировало желательные естественные микроорганизмы, такие как N_2 -фиксирующие, P-сольбилизирующие и продуцирующие индолуксусную кислоту бактерии. Приведенные выше результаты свидетельствуют о том, что БГ также могут действовать как биостимуляторы растений за счет опосредованного микроорганизмами усиления роста растений. Было обнаружено, что нанесение БГ на листья и корни растений улучшает метаболизм Fe и N и усвоение питательных веществ, снижает концентрацию нежелательных соединений, таких как нитраты, и повышает эффективность утилизации макро- и микроэлементов и воды [M. Cerdán, A. Sánchez-Sánchez, J. D. Jordá, M. Juárez, and J. Sánchez-Andreu (2013) "Effect of commercial amino acids on iron nutrition of tomato plants grown under lime-induced iron deficiency," *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 176(6):859-866 (<http://dx.doi.org/10.1002/jpln.201200525>); A. Ertani, L. Cavani, D. Pizzeghello, E. Brandellero, A. Altissimo, C. Ciavatta, and S. Nardi (2009) "Biostimulant activity of two protein hydrolyzates in the growth and nitrogen metabolism of

maize seedlings" *Z. Pflanzenernähr. Bodenk* 172(2):237-244 (<http://dx.doi.org/10.1002/jpln.200800174>); M. Halpern, A. Bar-Tal, M. Ofek, D. Minz, T. Muller, and U. Yermiyahu (2015), The Use of Biostimulants for Enhancing Nutrient Uptake. Elsevier, vol. 130, pp. 141-174 (<http://dx.doi.org/10.1016/bs.agron.2014.10.001>)]. Причины, связанные с повышенным поглощением питательных веществ растениями, получающими БГ, включают (А) увеличение ферментативной и микробной активности почвы, (В) улучшение подвижности и растворимости микроэлементов, особенно Cu, Fe, Mn и Zn, (С) изменения корневой архитектуры растений, такие как плотность корней, длина и количество боковых корней, и (D) повышение активности Fe(III)-хелатредуктазы, нитратредуктазы и глутаминсинтетазы [M. Cerdán, et al. (2013) выше; A. Ertani, et al. (2009) выше; A. M. García-Martínez, A. Díaz, M. Tejada, J. Bautista, B. Rodríguez, C. Santa María, E. Revilla, and J. Parrado (2010) "Enzymatic production of an organic soil biostimulant from wheat-condensed distiller solubles: Effects on soil biochemistry and biodiversity" *Process Biochemistry* 45(7):1127-1133 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2010.04.005>); G. Colla, Y. Rouphael, R. Canaguier, E. Svecova, and M. Cardarelli (2014) "Biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis" *Frontiers in Plant Science* 5:448 (<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00448>); L. Lucini, Y. Rouphael, M. Cardarelli, R. Canaguier, P. Kumar, and G. Colla (2015) "The effect of a plant-derived biostimulant on metabolic profiling and crop performance of lettuce grown under saline conditions" *Scientia Horticulturae* 182:124-133, Jan. 2015 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2014.11.022>)]. При применении аминокислот вместе с микроэлементами, поглощение и транспортировка микроэлементов внутри растения могут быть облегчены.

[23] Было продемонстрировано, что белковые гидролизаты стимулируют метаболизм и ассимиляцию азота. Возможным объяснением увеличения ассимиляции азота растениями может быть положительное влияние БГ на продуцирование углеродных скелетов и снабжение энергией, необходимой для биосинтеза аминокислот.

[24] Аминокислоты и пептиды могут играть важную роль в качестве сигнальных соединений. Специфические рецепторы на клеточных мембранах взаимодействуют с пептидами (элиситорами) для передачи сигнала, что приводит к морфофизиологическим и биохимическим изменениям в растениях. БГ могут влиять на фитогормональный баланс растения и влиять на развитие растения посредством действия специфических пептидов и предшественников биосинтеза фитогормонов, таких как триптофан [G. Colla, et al. (2014) выше]. Было обнаружено, что биоактивные пептиды, продуцируемые рядом различных растений, обладают гормоноподобной активностью [Y. Ito, I. Nakanomyo, H. Motose, K.

Iwamoto, S. Sawa, N. Dohmae, and H. Fukuda (2006) "Dodeca-CLE peptides as suppressors of plant stem cell differentiation" *Science* 313(5788):842-845, (<http://dx.doi.org/10.1126/science.1128436>); T. Kondo, S. Sawa, A. Kinoshita, S. Mizuno, T. Kakimoto, H. Fukuda, and Y. Sakagami (2006) "A plant peptide encoded by CLV3 identified by in situ MALDI-TOF MS analysis" *Science* 313(5788):845-848, Aug. 2006 (<http://dx.doi.org/10.1126/science.1128439>). Сообщалось, что полученные из растений БГ вызывают ауксин- и гиббереллин-подобную активность, которая улучшает производительность сельскохозяйственных культур [M. Schiavon, A. Ertani, and S. Nardi (2008) "Effects of an alfalfa protein hydrolysate on the gene expression and activity of enzymes of the tricarboxylic acid (TCA) cycle and nitrogen metabolism in zea mays l" *Journal of agricultural and food chemistry* 56(24):11 800-11 808 (<http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19053364>); A. Ertani, et al. (2009) выше; G. Colla, et al. (2014) выше].

[25] Сообщалось, что для виноградной лозы внекорневое применение БГ из казеина и соевых генов повышенной экспрессии, кодирующих фермент стильбенсинтазу, ответственный за биосинтез ресвератрола в листьях (т.е. ресвератролсинтазу). Оказалось, что оба гидролизата действуют как элиситоры повышения иммунитета виноградной лозы против *Plasmopara viticola*, возбудителя ложной мучнистой росы виноградной лозы. В китайском патенте CN1966663 ("Композиционный бактериальный агент для внекорневого удобрения и способ его получения и применение" (Composite Microorganism Foliage Fertilizer Bacteria Agent And Its Producing Method And Use)) описано антимикробное средство, состоящее из *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum*, *Mucor racemosus* и *Aspergillus oryzae*.

[26] Активация вторичного метаболизма растительными БГ, такая как повышенная экспрессия генов фермента фенилаланин (тирозин)-аммиак-лиазы, участвующего в фенилпропаноидном пути, может привести к полезным нутрицевтическим свойствам. Фитохимические соединения, содержащиеся в фруктах и овощах, вызвали значительный интерес среди ученых, специалистов по питанию и производителей пищевых продуктов из-за их полезных для здоровья свойств. Фитохимические вещества - это природные антиоксидантные соединения, способные уменьшать или предотвращать хронические заболевания, такие как сердечно-сосудистые проблемы, ишемический инсульт, артрит и воспаление кишечника, а также некоторые виды рака. Несколько исследований показали, что применение БГ позволяет модифицировать первичный и вторичный метаболизм, стимулируя выработку и

накопление антиоксидантных соединений (каротиноидов, полифенолов, флавоноидов и т.д.).

[27] БГ можно классифицировать на основе источника белка и метода гидролиза белка. В настоящее время источником БГ является в основном животное или растительное сырье и обычно их получают путем химического и/или ферментативного гидролиза. [P. Maini (2006) "The experience of the first biostimulant, based on amino acids and peptides: a short retrospective review on the laboratory researches and the practical results" *Fertilitas Agrorum* 1(1):29-43, 2006.; M. Schiavon, et al. (2008) *supra*; M. Halpern, A. Bar-Tal, M. Ofek, D. Minz, T. Muller, and U. Yermiyahu (2015) "The Use of Biostimulants for Enhancing Nutrient Uptake" *Elsevier* vol. 130, pp. 141-174 (<http://dx.doi.org/10.1016/bs.agron.2014.10.001>)]. Как источник белка, так и производственный процесс сильно влияют на химические характеристики БГ. [Cavani, L., C. Ciavatta, and C. Gessa (2003) "Determination of free L- and D- alanine in hydrolysed protein fertilizers by capillary electrophoresis" *J. Chromatogr. A* 985: 463-469]. Аминокислоты оказывают хелатирующий эффект на микроэлементы [Koksal, A. I., H. Dumanoglu, N. T. Gunes, and M. Aktas (1999) "The effects of different amino acid chelate foliar fertilizers on yield, fruit quality, shoot growth and Fe, Zn, Cu, Mn content of leaves in Williams pear cultivar (*Pyrus communis* L.)" *Turk. J. Agric. For.* 23: 651-658].

[28] БГ часто получают путем ферментативного гидролиза. В этом способе протеолитические ферменты, которые могут происходить из органов животных (например, панкреатин, пепсин), растений (например, бромелаин, фицин, папаин) или микроорганизмов (например, алкалаза, флаворзим (flavourzyme), кератиназы), катализируют гидролиз белка. Протеолитические ферменты часто нацелены на специфические пептидные связи (например, панкреатин разрезает аминокислотную цепь по связям, смежным с аргининовыми, лизиновыми, тирозиновыми, триптофановыми, фенилаланиновыми и лейциновыми связями; папаин - рядом с аргинином, лизином и фенилаланином; пепсин - по фенилаланиновой или лейциновой связи; кератиназы в основном представляют собой сериновые или металлопротеазы). В китайском патенте CN19191800 описано питательное вещество для растений и животных, которое получают путем разбавления дрожжевого осадка *Saccharomyces cerevisiae* в воде с получением эмульсии, смешения его с папаином, нейтральной протеиназой и хлоридом натрия, и затем гидролиза смеси, инактивации ферментов и, наконец, концентрирования или высушивания полученного продукта. Конечный продукт имеет высокое содержание быстро усваиваемых питательных веществ.

[29] Были разработаны комбинированные процессы химического и ферментативного гидролиза, которые могут помочь сохранить структуру аминокислот и сохранять энергию по сравнению с чисто химическим гидролизом.

[30] Помимо аминокислот и пептидов, БГ содержат другие соединения, которые могут способствовать биостимулирующему действию. Такие соединения включают жиры, углеводы, фенолы, минеральные элементы, фитогормоны и другие органические соединения (например, полиамины).

[31] Получение БГ из агропромышленных побочных продуктов является вариантом рационального удаления отходов, который представляет интерес как с экологической, так и с экономической точек зрения [V. Kasarkova, K. Kolomaznik, L. Burketova, V. Sasek, and L. Simek (2009) "Characterization of low-molecular weight collagen hydrolysates prepared by combination of enzymatic and acid hydrolysis" *The Journal of the American Leather Chemists Association* 104(2):46-51, 2009.; J. Pecha, T. Fürst, K. Kolomazník, V. Friebrová, and P. Svoboda (2012) "Protein biostimulant foliar uptake modeling: The impact of climatic conditions" *AIChE J.* 58(7):2010-2019 (<http://dx.doi.org/10.1002/aic.12739>); A. Baglieri, V. Cadili, C. Mozzetti Monterumici, M. Gennari, S. Tabasso, E. Montoneri, S. Nardi, and M. Negre (2014) "Fertilization of bean plants with tomato plants hydrolysates. effect on biomass production, chlorophyll content and n assimilation" *Scientia Horticulturae* 176:194-199 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2014.07.002>)]. Celus, et al. (2007) "Enzymatic Hydrolysis Of Brewer's Spent Grain Proteins And Technofunctional Properties Of The Resulting Hydrolysates" *J. Agric. Food Chem.* 55(21):8703-8710) описывают ферментативный гидролиз белков из пивной дробины или выжимок (BSG), которые представляют собой нерастворимый остаток от ячменного солода, образующийся в результате производства сусла до спиртового брожения, и которые являются основным побочным продуктом пивоваренной промышленности. Получаемые гидролизаты благодаря своим идеальным пенообразующим и эмульгирующим свойствам используются в пищевой промышленности и производстве напитков. Испанский патент ES2329750 A1 ("Способ получения продуктов удобрений из отходов пивоварения" (Procedure For Obtaining Fertilizer Products From Brewing Waste)) описывает многоступенчатый процесс получения удобрений из отходов пивоварения после спиртового брожения сусла. Этот процесс включает различные стадии, на которых отходы подщелачивают, отделяют для получения жидкой фазы, которую затем подвергают кислотной обработке и от которой, в свою очередь, отделяют твердую фазу, и которую, наконец, подвергают ферментативному гидролизу или кислотному гидролизу.

[32] Растет беспокойство по поводу последствий, связанных с ПГ животного происхождения, с точки зрения безопасности пищевых продуктов, о чем свидетельствует Европейский регламент № 354/2014, запрещающий применение этих продуктов на съедобных частях органических культур. Молекулярная масса пептидов БГ животного происхождения должна быть ниже 10 кДа, чтобы предотвратить любой риск передачи людям прионов губкообразных энцефалопатий крупного рогатого скота (BSE)/трансмиссивных губкообразных энцефалопатий (TSE).

[33] В дополнение к биостимулирующему действию на растения, БГ и в целом белковые материалы могут также оказывать питательное и биостимулирующее воздействие на шляпочные грибы и грибки и улучшать урожай грибов [Kurbanoglu, E. B. and O. F. Algur (2002) "The influence of ram horn hydrolyzate on the crop yield of the mushroom *Agaricus bisporus*" *Sci. Hortic.* 94: 351-357.]. Известно, что ряд основных культивируемых грибов - *Agaricus bisporus*, *Coprinus quadrifidus*, *Lepista nuda* и *Pleurotus ostreatus* - способны непосредственно лизировать и поглощать бактерии. *A. bisporus* (шампиньоны) (а именно молодые грибы с нераскрытой шляпкой, *crimini* (незрелые формы с нераскрытой шляпкой) и *portabella* (зрелые грибы с раскрытой шляпкой)) и *P. ostreatus* (вешенки) являются двумя наиболее широко культивируемыми для еды грибами. *A. bisporus* обычно выращивают на компосте, причем микробный компонент биомассы компоста служит источником азота, углерода и минеральных веществ, а также запасом воды. Было обнаружено, что обогащенные белком добавки повышают урожайность грибов (49–61%) при добавлении в грибной компост (т.е. субстрат для роста). Такие богатые белком добавки включают: гидролизованный соевый белок Pro-Fam[®] H200 FG, коммерческую добавку Remo, l-изолейцин (ile), протеин яичного белка, гидролизованную молочную сыворотку со смесью аминокислот HLA-198, муку из хлопковых семян, муку из соевых бобов, сухое обезжиренное молоко, рыбную муку, солодовые ростки, пивные дрожжевые продукты, казеин, зародыши пшеницы, семена подсолнечника, кукурузный глютен и арахисовый белок. [L. C. Schisler and J. W. Sinden (1962) в статьях "Nutrient Supplementation of Mushroom Compost at Spawning," *Mushroom Science* 5:150—164 и "Nutrient Supplementation of Mushroom Compost at Casing" *Mushroom Science* 5:267—280]. Увеличение выхода при использовании этих материалов объясняется относительно высокими концентрациями в них азота. Патент США № 3942969 описана питательную композицию для грибов с использованием денатурированного белкового материала (т.е. экстракта). Природные лигноцеллюлозы, используемые для выращивания многих грибов, имеют ограниченное содержание питательных веществ и обычно требуют использования подкормки в форме химических и биологических добавок. Введение добавок с базальным

субстратом было обычной практикой в выращивании грибов для повышения урожайности, питательной и лекарственной ценности. Вешенку (*P. ostreatus*) можно выращивать на различных лигноцеллюлозных субстратах, включая рисовую солому, кукурузные стебли/початки, остатки овощных растений, жмых и т.д. Однако было обнаружено, что идеальный субстрат должен содержать азот (в виде добавки) для быстрого роста грибов. Выращивание *P. ostreatus* в субстратах с азотными питательными добавками повышает продуктивность и пищевую ценность. В других исследованиях по добавкам для грибов также сообщалось, что помимо азотистых материалов, имеются преимущества в добавлении растительных липидов (жировых материалов) к грибному компосту [Schisler, L. C. and J. W. Sinden (1966) "Nutrient Supplementation of Mushroom Compost at Casing—Vegetable Oils" *Can. J. BOL* 44:1063—1069; Schisler, L. C. (1967) "Stimulation of Yield 15 in the Cultivated Mushroom by Vegetable Oils" *Appl Microbiol* 15:844-850; Schisler, L. C. and T. G. Patton, Jr. (1970) "Stimulation of Yield in the Cultivated Mushroom by Vegetable Oils: Effect of Sterols and Ethyl Linoleate" *Agric Food Chem* 18:1102-1103 20].

[34] Несмотря на то, что в продаже имеются многочисленные удобрения, биоудобрения и растительные биостимуляторы, сохраняется потребность в улучшенных продуктах, способных удовлетворить различные потребности. Существует потребность в биостимуляторах растений, которые повышают устойчивость растений к стресс-факторам. Необходимо повысить репродуктивную способность растений, представляющих экономический интерес. Существует потребность в биостимуляторах растений, которые будут эффективны при менее частом применении, чем коммерческие продукты, доступные в настоящее время, и в биостимуляторах растений, которые обеспечивают пониженный риск повреждения растений в случае превышения дозы применения. Также существует необходимость в повышении эффективности использования питательных веществ сельскохозяйственными культурами и уменьшении вымывания питательных веществ в окружающую среду.

[35] Сохраняется потребность в ускорителе роста грибков и/или шляпочных грибов, пригодном для использования в больших промышленных масштабах. Необходимы стимуляторы роста, которые способны добавлять питательные вещества в выращиваемой грибной культуре, не стимулируя рост конкурирующих микроорганизмов, включая бактерии и плесени. Существует потребность в питательных добавках, не повышающих температуру компоста до нежелательно высоких уровней, которые могут препятствовать росту грибницы и грибного мицелия.

[36] Существует необходимость в пополнении ассортимента существующих гидролизатов белков животного и растительного происхождения за счет БГ, не происходящих от животных или растений. Также существует необходимость в ускоренной секвестрации углерода в почве, и существует необходимость в переработке углеродных отходов, где большая часть или весь углерод улавливается, в отличие от компостирования, при котором, как правило, половина или более углерода теряется в виде выбросов CO₂ в процессе компостирования [S. M. Tiquia, T. L. Richard, and M. S. Honeyman (2002) "Carbon, nutrient, and mass loss during composting" *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 62(1):15-24].

[37] В дополнение к обеспечению микробного белка, витаминов и других биомолекул в качестве питательных веществ для растений и/или грибов, также возможно прямое потребление людьми этих питательных веществ, полученных из микробов. Однако, одной из возможных проблемных областей в отношении прямого потребления человеком является содержание нуклеиновых кислот в питательных веществах. Для питания человека может потребоваться снизить содержание нуклеиновых кислот микробиологического белка (SCP), например, полученного из дрожжей, до более низкого уровня, если SCP составляет значительную часть рациона. Рекомендованная суточная норма Совета по продовольствию и питанию Национального научно-исследовательского совета (Food and Nutrition Board, National Research Council) составляет для белка 65 г в день для взрослого мужчины весом 70 кг, а Консультативная группа по белку (Protein Advisory Group) системы Организации Объединенных Наций рекомендует, чтобы количество ежедневно потребляемых нуклеиновых кислот из микробного белка не превышало двух граммов в день. Таким образом, согласно этим критериям отношение содержания нуклеиновых кислот к белку должно составлять менее трех процентов, если SCP является единственным источником пищевого белка. Содержание нуклеиновых кислот в некоторых источниках SCP, таких как дрожжевые клетки видов *Candida utilis* и *Saccharomyces cerevisiae*, может составлять около от 12 до 15 г нуклеиновых кислот на 100 г неочищенного белка. Таким образом, чтобы обеспечить возможность использования значительных количеств этих источников SCP для питания человека, были разработаны способы снижения содержания нуклеиновых кислот в несколько раз.

[38] Бактерии, дрожжи и другие микробные клетки были применены для переработки сахарного сырья в полезные органические соединения, такие как белки и аминокислоты, в гетеротрофных системах ферментации. Однако у этих систем есть существенные недостатки. Гетеротрофные ферментации подвержены загрязнению, поскольку другие гетеротрофные микроорганизмы, которые могут расти на органических

углеродных питательных веществах и конкурировать с производственным штаммом, распространены повсеместно в окружающей среде. Гетеротрофные технологии также обычно страдают от ограничений в условиях конкуренции с современными способами производства продуктов питания. Во многих гетеротрофных системах по существу используется продукт питания для получения другого продукта питания. Это может приводить к многочисленным негативным воздействиям на окружающую среду и неэффективности.

[39] Автотрофные микробные системы для производства белков или аминокислот из CO₂ были первоначально предложены в программе полета человека в космос [G. L. Drake, C. D. King, W. A. Johnson, and E. A. Zuraw, "Study of life support systems for space missions exceeding one year in duration," NASA, Tech. Rep. SP-134, Apr. 1966].

[40] В настоящее время вновь появился интерес к разработке микробиологических технологий синтеза белка, а также синтеза других питательных веществ на различных газообразных и жидких субстратах, в частности на субстратах, представляющих собой отходы, и субстратах, получаемых устойчивым образом.

[41] Хемоавтотрофные микроорганизмы представляют собой малоизученную альтернативу фотосинтезирующим организмам при производстве белков, продуктов из белков и других питательных веществ из исходного сырья C1. Хемосинтетические реакции, осуществляемые хемоавтотрофами для фиксации CO₂ и других форм неорганического углерода в органических соединениях, приводятся в действие потенциальной энергией, запасенной в неорганических химикатах, а не лучистой энергией света [J. M. Shively, G. van Keulen, and W. G. Meijer (1998) "Something from almost nothing: carbon dioxide fixation in chemoautotrophs." *Annual review of microbiology* 52:191-230 (<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.52.1.191>); A. J. Smith, J. London, and R. Y. Stanier, "Biochemical basis of obligate autotrophy in Blue-Green algae and thiobacilli" (1967) *Journal of Bacteriology* 94(4):972-983 (<http://jb.asm.org/content/94/4/972.abstract>); M. Hügler, C. O. Wirsen, G. Fuchs, C. D. Taylor, and S. M. Sievert (2005) "Evidence for autotrophic CO₂ fixation via the reductive tricarboxylic acid cycle by members of the ϵ subdivision of proteobacteria" *Journal of Bacteriology* 187(9):3020-3027, (<http://dx.doi.org/10.1128/jb.187.9.3020-3027.2005>); K. M. Scott and C. M. Cavanaugh, "CO₂ uptake and fixation by endosymbiotic chemoautotrophs from the bivalve *solemya velum*" (2007) *Applied and Environmental Microbiology* 73(4):1174-1179 (<http://dx.doi.org/10.1128/aem.01817-06>)]. Биохимические пути фиксации углерода, которые происходят в хемоавтотрофах, включают восстановительный цикл

трикарбоновых кислот, цикл Кальвина-Бенсона-Бассама [Jessup Shively, Geertje van Kaulen, Wim Meijer (1998) *Annu. Rev. Microbiol.* 191-230], и путь Вуда-Льюнгдаля [L. G. Ljungdahl, "The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria," *Annual Review of Microbiology*, vol. 40, no. 1, pp. 415-450, 1986. [Online]. Доступно по адресу: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.40.100186.002215>].

[42] Хемоавтотрофные организмы особенно хорошо подходят для гибридных химических/биологических процессов превращения CO₂ в органические химические вещества, причем биологическая стадия ограничивается только фиксацией CO₂. Эта стадия фиксации CO₂ около соответствует темновой реакции, которая происходит при фотосинтезе. Такой гибридный химико-биологический подход привлек гораздо меньше внимания, чем более традиционные гетеротрофные или фотосинтетические биопроцессы для производства биопродуктов. Однако у такого гибридного подхода есть ряд потенциальных преимуществ, в том числе способность эффективно сочетать ферментативные возможности фиксации CO₂, достигнутые за миллиарды лет эволюции, с широким спектром технологий преобразования абиотической энергии, такой как солнечная фотоэлектрическая (PV), солнечная тепловая, энергия ветра, геотермальная, гидроэлектрическая или атомная энергия, для обеспечения эффективного и чистого питания всего биохимического процесса производства из CO₂ в качестве источника углерода.

[43] Аналогичный диапазон биопродуктов (микробиологический белок (SCP), полигидроксibuтират (ПГБ)) также может быть получен из сырья на основе метана и природного газа с использованием метанооксиляющих бактерий. Это относительно хорошо изученные микроорганизмы, которые в прошлом использовались в полномасштабных системах производства SCP и были испытаны в качестве богатой белком кормовой добавки для крупного рогатого скота и рыбы. Микроорганизмы могут применяться для утилизации биогаза, образующегося на очистных сооружениях для сточных вод и навоза. Метанооксиляющие бактерии могут обеспечить технологии для повышения ценности малоценного метана путем превращения в микробную биомассу, используемую в качестве источника биопродуктов.

[44] Известны некоторые применения хемоавтотрофных или метанотрофных микроорганизмов для улавливания и конверсии CO₂ или метансодержащих газов в продукты со связанным углеродом. Однако многие из ранее описанных подходов страдали недостатками, которые ограничивают их эффективность, экономическую целесообразность, практичность и коммерческое применение.

[45] Существует потребность в устранении ограничений, связанных со значительным увеличением устойчивости сельскохозяйственного производства в очень широком масштабе. Существует потребность в биологическом производстве с компактным вертикальным масштабированием, в отличие от традиционных сельскохозяйственных операций, которые масштабируются горизонтально и требуют значительных ресурсов земли и воды. Необходимо смягчать противоречие между продуктами питания и природой, а также конфликты из-за землепользования и разрушение естественных сред обитания.

[46] Существует потребность в биопроцессе, который превращает дешевый синтез-газ, CO_2 и/или метан в более ценные органические химические вещества, включая, без ограничений, аминокислоты, белки, витамины, удобрения, биостимуляторы и другие биологические питательные вещества.

[47] Существует необходимость в идентификации набора микроорганизмов, которые могут расти в обычных и масштабируемых реакционных сосудах и которые производят коммерчески жизнеспособные наборы органических углеродных цепей, в частности, длиной более четырех атомов углерода, коммерчески осуществимым способом. Существует необходимость в идентификации микроорганизмов, которые не ограничены метаболически типичными органическими углеродными ресурсами, такими как сахар. Существует потребность в микроорганизмах и системах, которые могут дополнительно утилизировать синтез-газ, генераторный газ, природный газ, биогаз или широкий спектр абиотических источников углерода и энергии, направляемых через промежуточную газовую смесь H_2/CO_2 для синтеза аминокислот, белков и других биологических питательных веществ. Это приведет к сырьевой гибкости, намного превосходящей сопоставимые гетеротрофные системы. Существует необходимость в идентификации и использовании для роста и фиксации углерода микроорганизмов, которые могут утилизировать доноры электронов, такие как водород, присутствующие в синтез-газе, генераторном газе, или легко генерируемые с помощью широкого спектра технологий, использующих абиотические возобновляемые источники энергии и/или источники энергии с низким уровнем выбросов CO_2 .

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[48] Предлагаются системы, способы и композиции для производства органических химических веществ, включая, без ограничений, аминокислоты, белки, витамины и другие биологические питательные вещества из недорогого и возобновляемого сырья. В некоторых вариантах реализации эффективное производство

этих высокоценных органических соединений сочетается с удалением отходов источников углерода и/или с улавливанием CO₂, что может генерировать дополнительный доход и/или социальную ценность.

[49] Встречающиеся в природе или сконструированные микроорганизмы используются для превращения газообразного CO₂, синтез-газа, генераторного газа и/или метана в более ценные молекулы с длиной углеродной цепи от средней до высокой, включая, без ограничений, аминокислоты, белки, витамины и другие биологические питательные вещества. Описанная в данном документе технология позволяет разрабатывать новые природные или классически выведенные и/или генетически улучшенные штаммы микроорганизмов, которые можно использовать для биообработки синтез-газа в биологических процессах превращения газа в химические вещества (GTC) для продуцирования и/или секреции различных органических соединений с относительно длинными углеродными цепями, несвойственных для данного организма (that are drop-in) и в настоящее время производятся только в общей массе сельскохозяйственными культурами высших растений или в веществах животного происхождения.

[50] Предложены способы селекции, разведения и/или конструирования микроорганизмов, включая, без ограничений, микроорганизмы, окисляющие водород, окись углерода, и водородоокисляющие (knallgas) микроорганизмы, обладающие естественной способностью к росту и синтезу биомассы на газообразных источниках углерода, таких как синтез-газ и/или CO₂, так что производственные микроорганизмы синтезируют целевые химические продукты при культивации в газе. Микроорганизмы и способы, описанные в данном документе, могут обеспечить низкокзатратный синтез биохимических веществ, которые могут конкурировать по цене с продуктами нефтехимии и/или аминокислотами, белками и другими биологическими питательными веществами, полученными из высших растений. В определенных вариантах реализации эти аминокислоты, белки, витамины и другие биологические питательные вещества, по прогнозам, имеют существенно более низкую цену, чем аминокислоты, белки, витамины и другие биологические питательные вещества, полученные путем гетеротрофного или микробного фототрофного синтеза.

[51] Предусматриваются микроорганизмы, которые превращают синтез-газ и/или газообразный CO₂, и/или смесь газообразного CO₂ и газообразного H₂, и/или метана, вместе с источником азота, включая, без ограничений, аммиак, аммоний и/или мочевины, в одну или несколько аминокислот, белков, витаминов и/или других биологических питательных веществ. В некоторых вариантах реализации микроорганизм является одним или несколькими из следующей группы: хемоавтотрофный микроорганизм, окисляющий

водород, микроорганизм, окисляющий окись углерода, водородоокисляющий (knallgas) микроорганизм и/или метанотрофный микроорганизм. Водородоокисляющие (knallgas) микробы, гидрогенотрофы, карбоксидотрофы и хемоавтотрофы в более широком смысле способны улавливать CO_2 или CO в качестве единственного источника углерода для поддержания биологического роста. Метанотрофы способны улавливать CH_4 как единственный источник углерода. В некоторых вариантах реализации такой микробный рост включает биосинтез аминокислот и белков. Водородоокисляющие микробы и другие гидрогенотрофы могут использовать H_2 в качестве источника восстанавливающих электронов для дыхания и биохимического синтеза. В некоторых вариантах реализации изобретения водородоокисляющие микроорганизмы, гидрогенотрофы, карбоксидотрофы, другие хемоавтотрофные микроорганизмы и/или метанотрофы выращивают в потоке газов, включая, без ограничений, один или большее количество из следующих: CO_2 ; CO ; H_2 ; CH_4 ; наряду с неорганическими минеральными веществами, растворенными в водном растворе. В некоторых вариантах реализации водородоокисляющие, гидрогенотрофные, карбоксидотрофные, хемоавтотрофные и/или метанотрофные микроорганизмы используются для превращения парниковых газов (ПГ) в биомолекулы, включая, без ограничений, одно или несколько из следующего: аминокислоты и белки и витамины.

[52] Также предусматриваются композиции, которые включают любые микроорганизмы, раскрытые в данном документе. Композиции могут включать микроорганизмы в питательной среде, которая содержит питательные вещества для роста и/или производства биопродуктов. Например, композиция может находиться в биореакторе, в который подаются газообразные субстраты, как описано в данном документе.

[53] В некоторых вариантах реализации микроорганизм выбран из родов *Rhodococcus* или *Gordonia*. В некоторых вариантах реализации микроорганизм представляет собой *Rhodococcus opacus*. В некоторых вариантах реализации микроорганизм представляет собой *Rhodococcus opacus* (DSM (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) 43205) или *Rhodococcus* sp. (DSM 3346). В некоторых вариантах реализации микроорганизм выбран из родов *Ralstonia* или *Cupriavidus*. В некоторых вариантах реализации микроорганизм представляет собой *Cupriavidus necator*. В некоторых неограничительных вариантах реализации штамм *Cupriavidus necator* представляет собой DSM 531 или DSM 541.

[54] В одном аспекте предусматривается природный или сконструированный микроорганизм, который способен превращать газообразный субстрат, такой как генераторный газ или синтез-газ, или другую газовую смесь, которая содержит H_2 и CO_2 ,

и/или CO, и/или CH₄, в аминокислоты, белки и другие биологические питательные вещества. Газообразный субстрат используется микроорганизмом в качестве источника углерода и/или энергии. В некоторых вариантах реализации микроорганизмы, способные расти на газообразном субстрате, трансформируются полинуклеотидом, который кодирует ген, необходимый для биосинтеза аминокислоты, белка или другого биологического питательного вещества. В некоторых вариантах реализации аминокислота, белок, другое биологическое питательное вещество или цельноклеточный продукт извлекают из микробных клеток или из микробной ростовой среды. Генераторный газ, который может быть использован в процессах выращивания микробов, описанных в данном документе, может поступать из источников, которые включают газификацию сырьевых отходов и/или сырьевых остатков биомассы, или отходящие газы промышленных процессов, или паровую конверсию природного газа или биогаза.

[55] В одном аспекте предусматривается не встречающийся в природе микроорганизм, способный расти на газообразном субстрате в качестве источника углерода и/или энергии, причем микроорганизм включает по меньшей мере одну экзогенную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах реализации микроорганизм представляет собой бактериальную клетку. Например, в некоторых вариантах реализации бактериальная клетка представляет собой *Cupriavidus* sp. или *Ralstonia* sp., например, без ограничений, *Cupriavidus necator*. В некоторых неограничительных вариантах реализации микроорганизм представляет собой *Cupriavidus necator* DSM 531 или DSM 541.

[56] В некоторых вариантах реализации газообразный субстрат включает CO₂ в качестве источника углерода. В некоторых вариантах реализации газообразный субстрат включает H₂ и/или O₂ в качестве источника энергии. В некоторых вариантах реализации газообразный субстрат включает генераторный газ, синтез-газ или пиролизный газ. В некоторых вариантах реализации газообразный субстрат включает смесь газов, содержащую H₂ и/или CO₂, и/или CO, и/или CH₄. В некоторых вариантах реализации микроорганизм продуцирует аминокислоты, белки и другие биологические питательные вещества при культивировании в присутствии газового субстрата в условиях, пригодных для роста микроорганизма и производства биопродуктов.

[57] В другом аспекте предложены способы получения аминокислот, белков и других биологических питательных веществ с использованием микроорганизма, как описано в данном документе, который способен расти на газообразном субстрате в качестве источника углерода и/или энергии. В некоторых вариантах реализации микроорганизм, как описано в данном документе, культивируют в биореакторе, который содержит газообразный субстрат и культуральную среду (например, жидкую питательную

среду), которая включает другие питательные вещества для роста и производства биопродуктов, в условиях, пригодных для роста микроорганизма, причем микроорганизм продуцирует аминокислоты, белки и другие биологические питательные вещества.

[58] В некоторых вариантах реализации газообразный субстрат в биореакторе включает H_2 и/или CO_2 . В некоторых вариантах реализации газообразный субстрат представляет собой генераторный газ, синтез-газ или пиролизный газ. В некоторых вариантах реализации газообразный субстрат представляет собой природный газ или биогаз. В некоторых вариантах реализации газообразный субстрат получают из твердых коммунально-бытовых отходов, черного щелока, сельскохозяйственных отходов, древесных отходов, трудноизвлекаемого природного газа, биогаза, высокосернистого газа, гидратов метана, шин, нефтяного кокса, сточных вод, навоза, соломы, лигноцеллюлозных энергетических культур, лигнина, растительных остатков, жмыха, древесной пыли, отходов лесного хозяйства, пищевых отходов, отходов коврового покрытия, пластмассовых отходов, свалочного газа и/или лигноцеллюлозной биомассы.

[59] В некоторых вариантах реализации аминокислоты, белки, витамины и/или другие биологические питательные вещества извлекают из культуральной среды.

[60] В другом аспекте предусматриваются микроорганизмы и способы получения аминокислот, белков, витаминов и/или других биологических питательных веществ. В некоторых вариантах реализации предусматривается природный или не встречающийся в природе микроорганизм, не содержащий или содержащий по меньшей мере одну экзогенную нуклеиновую кислоту, соответственно, и способный расти на газообразном субстрате в качестве источника углерода и/или энергии, причем указанный микроорганизм осуществляет биосинтез аминокислот, белков, витаминов и/или других биологических питательных веществ. В некоторых вариантах реализации природный или не встречающийся в природе микроорганизм представляет собой *Cupriavidus* sp. или *Ralstonia* sp. В некоторых вариантах реализации микроорганизм представляет собой *Cupriavidus necator* или *Cupriavidus metallidurans*. В некоторых вариантах реализации предложен способ получения аминокислот, белков, витаминов и/или других биологических питательных веществ с использованием природного или не встречающегося в природе микроорганизма, как описано в данном документе, не содержащего или содержащего по меньшей мере одну экзогенную нуклеиновую кислоту, соответственно, который способен расти на газообразном субстрате в качестве источника углерода и/или энергии, и осуществляющего биосинтез аминокислот, белков, витаминов и/или других биологических питательных веществ, включающий культивирование природного или не встречающегося в природе микроорганизма в биореакторе, который

включает газообразный субстрат и культуральную среду (например, жидкую питательную среду), которая также включает другие питательные вещества для роста и/или производства биопродуктов, в условиях, пригодных для роста микроорганизма и продуцирования аминокислот, белков, витаминов и/или других биологических питательных веществ, причем микроорганизм продуцирует аминокислоты, белки, витамины и/или другие биологические питательные вещества.

[61] В некоторых вариантах реализации микроорганизмы, описанные в данном документе, используются для улавливания CO₂ из промышленных дымовых газов и продуцирования богатой белком биомассы. В некоторых вариантах реализации такая богатая белком биомасса является товаром. В некоторых вариантах реализации изобретения богатая белком биомасса используется в качестве микробиологического белка (SCP). В некоторых вариантах реализации богатая белком биомасса используется в одном или нескольких из следующих применений: удобрение; биостимулятор; биоудобрения; усилитель или добавка для роста грибка; питательные вещества; ингредиент; корм для животных или в составе корма для животных; пища человека или в составе пищи человека. В некоторых вариантах реализации богатая белком биомасса используется в качестве высокобелкового заменителя рыбной муки и/или другого животного белка и/или используется в продуктах для удобрения растений и/или усилителях роста шляпочных грибов и грибков. В некоторых неограничительных вариантах реализации данное изобретение используется как для сокращения выбросов ПГ, так и для производства высокобелковых продуктов для применения, без ограничений, в качестве удобрений для растений и/или биостимуляторы, и/или грибковых удобрений, и/или пищевых добавок, и/или ингредиентов человеческой пищи.

[62] В некоторых вариантах реализации продукт с высоким содержанием белка подвергают гидролизу. В некоторых вариантах реализации выход гидролиза улучшают путем применения обработки паром обогащенной белком биомассы. Некоторые нерастворимые белки превращаются в менее стойкую форму при нагревании в присутствии влаги [Kida, K., S. Morimura, J. Noda, Y. Nishida, T. Imai, and M. Otagiri (1995) "Enzymatic hydrolysis of the horn and hoof of cow and buffalo" J. Ferment. Bioeng. 80:478-484.].

[63] Определенные варианты реализации данного изобретения относятся к изоляту микробного белка с пониженным содержанием нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации содержание нуклеиновой кислоты в изоляте составляет менее 9% мас. В некоторых неограничительных вариантах реализации величина соотношения белковых компонентов (PER) изолята превышает 1.

[64] В определенных вариантах реализации способы, аналогичные разработанным для снижения нуклеинового содержания SCP дрожжей, применяют к прокариотическим клеткам, как описано в данном документе. Нуклеиновая кислота дрожжей в основном представляет собой рибонуклеиновую кислоту или РНК. В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота клеток также является в основном РНК, и в данной заявке термины РНК и нуклеиновая кислота иногда будут использоваться взаимозаменяемо. В определенных вариантах реализации отношение содержания нуклеиновой кислоты к белку снижается до менее чем трех процентов. В некоторых вариантах реализации отношение нуклеиновой кислоты к белку снижается до уровня, который считается безопасным рядовыми специалистами и знаниями в данной области техники, для обеспечения значительной доли или всей потребности в белке в рационе человека.

[65] Некоторые варианты реализации данного изобретения относятся к микробным гидролизатам, используемым в качестве исходного сырья или источника питательных веществ в других промышленных ферментациях. Ummadi, M. and Curic-Bawden, M. (2010) "Use of Protein Hydrolysates in Industrial Starter Culture Fermentations." Protein Hydrolysates In Biotechnology 91-114, которая включена в данный документ в качестве ссылки в полном объеме.

[66] Некоторые варианты реализации данного изобретения относятся к изолятам и/или гидролизатам микробных белков, находящим применение в спортивной медицине и в частности, в некоторых неограничительных вариантах реализации, потребление указанного гидролизата обеспечивает более быстрое поглощение аминокислот организмом, чем интактных белков, тем самым максимизируя доставку питательных веществ в мышечные ткани. Manninen, Anssi H., "Protein Hydrolysates In Sports And Exercise: A Brief Review" (2004) Journal of Sports Science and Medicine, 3:60-63, (2004), которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

[67] В одном аспекте предложены способы получения растительных и грибковых биостимуляторов и питательных веществ. Также предусматриваются биостимуляторы и питательные вещества, производимые таким способом. В некоторых вариантах реализации предусматриваются способы получения растительных биостимуляторов и/или удобрений, включая гидролиз бактериальных клеток для получения гидролизата и составление композиции гидролизата в качестве биостимулятора растений и/или удобрения для внекорневого внесения, применения в качестве почвенного адъюванта и/или применения в качестве почвенного удобрения. Также предусматриваются растительные биостимуляторы и/или удобрения, полученные способами, описанными в

данном документе. Также предложены способы выращивания растений или грибов путем применения таких биостимуляторов и питательных веществ для растений или грибов. Также предусматриваются способы приготовления продуктов из таких растений или грибов. Также предложены способы выращивания гетеротрофных организмов путем подкормки таких растений или грибов. Также предложены способы получения продуктов из таких гетеротрофных организмов.

[68] В другом аспекте предложены усилители роста грибов, способные повысить урожайность и/или жизнеспособность коммерческих грибов. Также предусматриваются усилители роста грибов, которые являются менее доступными для конкурирующих чужеродных микроорганизмов в качестве источника пищи, в то же время способствуя размножению коммерческих грибов. Также предусматриваются усилители роста грибов, которые экономичны в производстве и использовании. Также предусматриваются усилители роста грибов, которые эффективны при низких уровнях концентрации. Также предусматриваются усилители роста грибов, которые изготавливаются из легкодоступных, недорогих материалов и/или отходов. Также предусматриваются усилители роста грибов, которые легко изготавливаются с использованием возобновляемых источников энергии.

[69] В одном аспекте предусматривается биологический и химический способ биологического превращения неорганических и/или органических молекул, содержащих один или большее количество атомов углерода, в органические молекулы, включающие аминокислоты, белки и/или витамины, полученные в результате реакции фиксации углерода или анаболического биосинтеза, включающий: введение неорганических и/или органических молекул, содержащих один или большее количество атомов углерода, в среду, включающую клетки микроорганизмов в культуральной среде, пригодной для поддержания клеток микроорганизмов; причем неорганические и/или органические молекулы, содержащие один или большее количество атомов углерода, используются клетками микроорганизмов в качестве источника углерода для роста и/или биосинтеза; превращение неорганических и/или органических молекул, содержащих один или большее количество атомов углерода, в продукты органических молекул, содержащие аминокислоты, белки и/или витамины в окружающей среде, посредством по меньшей мере одной реакции фиксации углерода или по меньшей мере одного пути анаболического биосинтеза, протекающих в клетках микроорганизмов; причем реакция фиксации углерода или путь анаболического биосинтеза, по меньшей мере, частично обусловлены химической и/или электрохимической энергией, обеспечиваемой донорами электронов и/или акцепторами электронов, которые генерируются химически и/или

электрохимически и/или термохимически и/или вводятся в среду из по меньшей мере одного источника, внешнего по отношению к среде, и клетки микроорганизмов содержат биомассу, которая содержит указанные аминокислоты, белки и/или витамины. В некоторых вариантах реализации продукты органических молекул содержат соединения с углеродными остовами, которые имеют пять атомов углерода или более. В некоторых вариантах реализации аминокислоты и/или белки и/или витамины и/или биомасса, продуцируемые в окружающей среде, извлекаются из культуральной среды.

[70] В некоторых вариантах реализации источник углерода содержит только один атом углерода, и указанные доноры электронов и/или молекулы, содержащие только один атом углерода, генерируются посредством термохимического процесса, воздействующего на органическое вещество, включающего по меньшей мере что-то одно из: газификации; пиролиза; парового риформинга; и авториформинга. В некоторых вариантах реализации источник углерода содержит только один атом углерода, и доноры электронов и/или органические молекулы, содержащие только один атом углерода, генерируются посредством парового риформинга метана. В некоторых вариантах реализации газообразный субстрат получают из газового потока, содержащего H_2 , CO и CO_2 , которые генерируются в результате газификации и/или пиролиза, и/или авториформинга, и/или парового риформинга, причем отношение водорода к окиси углерода в выходном газе газификации и/или пиролиза и/или авториформинга и/или парового риформинга регулируется с использованием реакции конверсии водяного газа перед подачей газового потока к микроорганизмам.

[71] В некоторых вариантах реализации источник углерода содержит молекулу C1, улавливаемую или направляемую из одного или нескольких источников, включающих: газификацию органического вещества; кальцинирование известняка $CaCO_3$ для получения негашеной извести CaO; паровой риформинг метана; горение, сжигание или сжигание в факеле; анаэробную или аэробную ферментацию сахара; метанотрофный биопроцесс; дыхание других организмов, очистку сточных вод; свалочный газ, производство фосфата натрия; геологически или геотермально продуцируемые или выделяемые газы; кислый газ, высокосернистый газ или природный газ; морскую воду или другие поверхностные или подземные водоемы; и атмосферу.

[72] В некоторых вариантах реализации один или большее количество доноров электронов выбирают из: аммиака; аммония; монооксида углерода; дитионита; элементарной серы; углеводов; водорода; метабисульфитов; оксида азота; нитритов; сульфатов, таких как тиосульфаты, включая, без ограничений, тиосульфат натрия ($Na_2S_2O_3$) или тиосульфат кальция (CaS_2O_3); сульфидов, таких как сероводород;

сульфитов; тионата; тионита; переходных металлов или их сульфидов, оксидов, халькогенидов, галогенидов, гидроксидов, гидроокисей, фосфатов, сульфатов или карбонатов, в растворенных или твердых фазах; и электронов проводящей или валентной зон в твердотельных электродных материалах. В некоторых вариантах реализации один или большее количество акцепторов электронов выбирают из: диоксида углерода; кислорода; нитритов; нитратов; ионов трехвалентного железа или других переходных металлов; сульфатов; и дырок валентной или проводящей зон в твердотельных электродных материалах.

[73] В некоторых вариантах реализации биологическому превращению предшествует одна или несколько стадий химической предварительной обработки, на которых доноры электронов и/или акцепторы электронов и/или источники углерода и/или минеральные питательные вещества, необходимые микроорганизмам, генерируются и/или очищаются по меньшей мере из одного вводимого химического вещества и/или рециркулируются из химических веществ, образующихся на стадии фиксации углерода, и/или генерируются из, или содержатся в потоках отходов других промышленных, горнодобывающих, сельскохозяйственных, водоочистных процессов или процессов, генерирующих отходы.

[74] В некоторых вариантах реализации доноры электронов и/или акцепторы электронов генерируют или рециркулируют с использованием возобновляемых, альтернативных или традиционных источников энергии, которые имеют низкий уровень выбросов парниковых газов, причем указанные источники энергии выбирают из по меньшей мере одного из фотоэлектрической энергии, солнечной тепловой энергии, энергии ветра, гидроэлектрической энергии, ядерной энергии, геотермальной энергии, усовершенствованных геотермальных систем, тепловой энергии океана, энергии океанских волн и энергии приливов. В некоторых вариантах реализации доноры электронов и/или акцепторы электронов генерируют с использованием сетевого электричества в периоды, когда электроснабжение превышает потребности в электрической сети, причем резервуары-хранилища буферизуют генерацию указанных доноров электронов и/или акцепторов электронов и их потребление в указанной реакции фиксации углерода.

[75] В некоторых вариантах реализации доноры электронов содержат H_2 и/или CO и/или метан, полученный из остаточного газа одного или нескольких из: парового реформинга метана; нефтепереработки; производства стали; производства алюминия; производства марганца; хлорщелочного процесса; производства технического углерода;

синтеза метанола; синтеза аммиака; металлургических процессов; химических процессов; и электрохимических процессов.

[76] В некоторых вариантах реализации молекулярный водород используется в качестве донора электронов, причем указанный водород получают способом, использующим по меньшей мере одно из следующего: электролиз воды; термохимическое расщепление воды; электролиз рассола; электролиз и/или термохимическое расщепление сероводорода. В некоторых вариантах реализации электролиз воды для производства водорода проводится с использованием одного или нескольких из: протонообменных мембран (PEM); жидких электролитов, таких как KOH; щелочного электролиза; электролиза с твердым полимерным электролитом; электролиза высокого давления; и высокотемпературного электролиза пара (HTES). В некоторых вариантах реализации термохимическое расщепление воды для производства водорода проводится с использованием одного или нескольких из: цикла оксида железа; цикла оксида церия(IV)-оксида церия(III); цикла цинка-оксида цинка; цикла серы-йода; цикла меди-хлора; цикла кальция-брома-железа; гибридного цикла серы.

[77] В одном варианте реализации клетка микроорганизма представляет собой бактериальную клетку. В некоторых вариантах реализации микроорганизм представляет собой *Cupriavidus sp.* или *Ralstonia sp.* В некоторых вариантах реализации микроорганизм представляет собой *Cupriavidus necator* или *Cupriavidus metallidurans*. В некоторых вариантах реализации клетки микроорганизмов включают микроорганизмы, выбранные из одного или нескольких из следующих родов: *Cupriavidus sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Hydrogenovibrio sp.*, *Rhodopseudomonas sp.*, *Hydrogenobacter sp.*, *Gordonia sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Streptomycetes sp.*, *Rhodobacter sp.* и/или *Xanthobacter*.

[78] В некоторых вариантах реализации клетки микроорганизмов продуцируют аминокислоты и/или белок и/или витамины и/или биомассу при культивировании в присутствии газообразного субстрата в условиях, пригодных для роста микроорганизма и производства биопродуктов. В некоторых вариантах реализации газообразный субстрат содержит CO₂ и/или CO и/или CH₄ в качестве источника углерода. В одном варианте реализации газообразный субстрат содержит H₂. В одном варианте реализации газообразный субстрат содержит H₂ и/или O₂ в качестве источника энергии. В некоторых вариантах реализации газообразный субстрат содержит доноры электронов, включая один или большее количество из H₂ и/или CO и/или CH₄. В некоторых вариантах реализации газообразный субстрат содержит пиролизный газ или генераторный газ или синтез-газ или природный газ или биогаз. В некоторых вариантах реализации газообразный субстрат содержит смесь газов, включающую H₂ и/или CO₂ и/или CO. В некоторых вариантах

реализации газообразный субстрат получают из твердых коммунально-бытовых отходов, черного щелока, сельскохозяйственных отходов, древесных отходов, трудноизвлекаемого природного газа, биогаза, высокосернистого газа, гидратов метана, шин, нефтяного кокса, сточных вод, навоза, соломы, лигноцеллюлозных энергетических культур, лигнина, растительных остатков, жмыха, древесной пыли, отходов лесного хозяйства, пищевых отходов, отходов коврового покрытия, пластмассовых отходов, свалочного газа, водорослей, морских водорослей и/или лигноцеллюлозной биомассы.

[79] В одном варианте реализации предложен способ получения аминокислот и/или белка и/или витаминов и/или биомассы, включающий культивирование микроорганизма, как описано в данном документе, в биореакторе, содержащем газообразный субстрат и культуральную среду, которая содержит другие питательные вещества для роста и продуцирования биопродуктов в условиях, пригодных для роста микроорганизма и продуцирования аминокислот и/или белка и/или витаминов и/или биомассы, причем указанный микроорганизм продуцирует аминокислоты и/или белок и/или витамины и/или биомассу.

[80] В некоторых вариантах реализации микроорганизмы являются водородокисляющими микроорганизмами. В одном варианте реализации газообразный субстрат содержит H_2 и/или CO_2 . В некоторых вариантах реализации газообразный субстрат представляет собой газ пиролиза или генераторный газ или синтез-газ.

[81] В одном варианте реализации клетки микроорганизмов продуцируют указанные аминокислоты, белки и/или витамины посредством хемосинтетической реакции, которая включает молекулярный водород в качестве донора электронов, причем указанный водород генерируется посредством электрохимических или термохимических процессов, которые, как известно, производят водород с низким или нулевым выбросом диоксида углерода, включающих что-то одно или несколько из: парового риформинга метана с помощью улавливания и секвестрации углерода (CCS); газификации угля с CCS; процесс Кварнера (Kværner) и другие процессы производства технического углерода; газификации или пиролиза биомассы с CCS; и пиролиза биомассы с образованием побочного продукта получения биоугля.

[82] В некоторых вариантах реализации по меньшей мере одна реакция фиксации углерода и по меньшей мере один путь анаболического биосинтеза приводят к образованию биопродуктов, включающих по меньшей мере один из: аминокислот; пептидов; белков; липидов; полисахаридов; и/или витаминов. В одном варианте реализации по меньшей мере одна реакция фиксации углерода и по меньшей мере один

путь анаболического биосинтеза включают цикл Кальвина и путь биосинтеза аминокислот.

[83] В некоторых вариантах реализации биомасса и/или органические молекулы, продуцируемые микроорганизмами способом, описанным в данном документе, используются для кормления или обеспечения питания одного или нескольких других организмов. В некоторых вариантах реализации аминокислоты и/или белки и/или витамины, полученные способом, описанным в данном документе, используют для получения биостимулятора растения или усилителя роста грибов.

[84] В другом аспекте предусматривается растительный биостимулятор, включающий биомассу, аминокислоты, белки и/или витамины, полученные в соответствии со способом, описанным в данном документе. В одном варианте реализации предложен способ обработки урожая, включающий нанесение биостимулятора растений, описанного в данном документе, на растение и/или на почву, в которой растение выращивают, и/или в жидкую среду, используемую для выращивания растения; и сбор урожая растений. В одном варианте реализации предложен способ, который включает нанесение биомассы, аминокислот, белков и/или витаминов, полученных в результате реакции фиксации углерода или анаболического биосинтеза, описанной в данном документе, на растения и/или почву, в которой растение выращивается, и/или в жидкую среду, используемую для выращивания растения; и сбор урожая растений. В некоторых вариантах реализации растение представляет собой сельскохозяйственную культуру.

[85] В другом аспекте клетки микроорганизмов, выращенные способом, описанным в данном документе, лизируют, тем самым продуцируя лизат. В некоторых вариантах реализации лизат используется для получения эмульсии или суспензии. В некоторых вариантах реализации лизат разделяют на нерастворимую и растворимую фракции, из которых любая или обе могут быть необязательно сконцентрированы или высушены. В некоторых вариантах реализации предусматривается растительный биостимулятор, содержащий лизат, эмульсию, суспензию или их фракцию, полученную, как описано в данном документе.

[86] В другом аспекте белки, полученные способом, описанным в данном документе, гидролизуют, получая при этом гидролизат. В одном варианте реализации гидролиз включает проведение кислотного гидролиза. В одном варианте реализации гидролиз включает по меньшей мере один фермент, способный гидролизовать белки до по меньшей мере одной из свободных аминокислот и олигопептидов. В одном варианте реализации гидролиз включает проведение щелочного гидролиза. В некоторых вариантах гидролизат используется для получения эмульсии или суспензии. В некоторых вариантах

реализации гидролизат разделяют на нерастворимую и растворимую фракции, из которых любая или обе могут быть необязательно сконцентрированы или высушены. В некоторых вариантах реализации гидролизат фильтруют, получая при этом фильтрат (пермеат) и остаток на фильтре (filtride) (рентентат; осадок). В некоторых вариантах реализации предусматривается растительный биостимулятор, включающий его гидролизат, эмульсию, суспензию, фракцию, фильтрат или остаток на фильтре, полученные, как описано в данном документе.

[87] В другом аспекте биомасса, полученная способом, описанным в данном документе, используется для получения биостимулятора растений, включающего: гидролиз указанной биомассы для получения гидролизата; и составление композиции гидролизата для использования в качестве биостимулятора растений для внекорневого внесения и/или применения в качестве почвенного адъюванта или добавки и/или для использования в жидкой среде для роста растений. В одном варианте реализации способ дополнительно включает нанесение биостимулятора растений на растение и/или на почву, в которой выращивается растение, и/или в жидкую среду, используемую для выращивания растения; и сбор урожая растений. В одном варианте реализации гидролиз включает по меньшей мере один фермент, способный гидролизовать белки до по меньшей мере одной из свободных аминокислот и олигопептидов. В одном варианте реализации гидролиз включает проведение кислотного гидролиза. В одном варианте реализации гидролиз включает проведение щелочного гидролиза. В некоторых вариантах реализации предусматривается растительный биостимулятор, включающий гидролизат биомассы, как описано в данном документе.

[88] В другом аспекте предусматривается способ получения лизата, включающий культивирование микроорганизма, как описано в данном документе, в биореакторе в условиях, пригодных для роста микроорганизма, причем биомассу, продуцируемую в указанном биореакторе, собирают и удаляют из биореактора, и указанную биомассу, удаляемую из биореактора, впоследствии лизируют, в результате чего получают лизат. В некоторых вариантах реализации клетки разрушают путем гомогенизации. В некоторых вариантах реализации лизат содержит белки, а способ дополнительно включает гидролиз белков в указанном лизате, в результате чего получают гидролизат.

[89] В другом аспекте предусматривается белковый концентрат, выделенный из микроорганизма, выращенного способом, описанным в данном документе. В одном варианте реализации концентрат белка содержит менее около 5% нуклеиновой кислоты. В одном варианте реализации белковый концентрат содержит менее около 3% нуклеиновой кислоты.

[90] В другом аспекте описанный в данном документе способ биологического превращения неорганических и/или органических молекул, содержащих один или большее количество атомов углерода, в органические молекулы, включающие аминокислоты, белки и/или витамины, полученные в результате реакции фиксации углерода или анаболического биосинтеза, дополнительно включает получение концентрированного белкового продукта, включающего стадии: а. разрушения указанных клеток микроорганизмов, причем указанные клетки содержат один или большее количество нуклеазных ферментов, с образованием при этом смеси, содержащей растворимую нуклеиновую кислоту, нуклеазу и белок, и содержащей нерастворимые остатки клеточной стенки; b. отделения растворимой нуклеиновой кислоты, нуклеазы и белка от нерастворимых остатков клеточной стенки в условиях, в которых нуклеиновая кислота гидролизуется нуклеазой с образованием гидролизованной нуклеиновой кислоты; d. перевода белка в нерастворимое состояние; и e. отделения нерастворимого белка от оставшихся растворимых материалов, которые составляют гидролизованную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах реализации клетки разрушают путем гомогенизации. В одном варианте реализации нерастворимый белок содержит менее около 5% нуклеиновой кислоты. В одном варианте реализации нерастворимый белок содержит менее около 3% нуклеиновой кислоты.

[91] В другом аспекте биомасса и/или органические молекулы, полученные, как описано в данном документе, находят применение в качестве по меньшей мере одного из: источника органического углерода и/или азота для ферментации; источника питательных веществ для роста других микробов или организмов; пребиотика; источника питательных веществ или пищевого ингредиента для человека; корма для животных; в качестве сырья или химических промежуточных соединений для производственных или химических процессов; источников фармацевтических, лекарственных или пищевых веществ; удобрения; почвенной добавки; стабилизатора почвы; почвенного адъюванта; биостимулятора растений; и/или усилителя роста грибов. В одном варианте реализации удобрение и/или почвенная добавка; и/или стабилизатор почвы; и/или почвенный адъювант; и/или биостимулятор растений; и/или усилитель роста грибов, вносят добавочный углерод и/или азот в почву, что приводит к увеличению содержания углерода и/или азота в почве, в которую они вносятся. В одном варианте реализации источником углерода является молекула газообразного C1, при этом углерод, добавляемый в почву, представляет собой секвестрированный углерод, а сквозной процесс от источника газообразного углерода C1 до углерода почвы представляет процесс секвестрации углерода. В одном варианте реализации удобрение и/или биостимулятор применяют к

сельскохозяйственной культуре, которую выращивают гидропонически, аэропонно, аквапонически или в вертикальной фермерской системе. В одном варианте реализации удобрение и/или биостимулятор используют при фертигации. В одном варианте реализации удобрение и/или биостимулятор применяют к сельскохозяйственной культуре, которую выращивают в теплице, в помещении и/или с использованием искусственного освещения. В одном варианте реализации предложен способ выращивания микробов и других организмов, в котором указанные микробы и организмы выращивают в почве на источнике питательных веществ, полученном, как описано в данном документе. В одном варианте реализации предложен способ ферментации с использованием указанных источников органического углерода и/или азота для получения одного или нескольких биопродуктов, содержащих: коммерческий фермент; антибиотик; аминокислоту; белок; растительный биостимулятор; усилитель роста грибов; пробиотик; пребиотик; биоудобрение; пищевой продукт; пищевой ингредиент; витамин; липид; биопластик; полисахарид; нутрицевтик (neutraceutical); и/или фармацевтический препарат.

[92] В другом аспекте предусматривается способ получения экстракта органического фермента из исходного сырья С1, включающий способ биологического превращения неорганических и/или органических молекул, содержащих один или большее количество атомов углерода, в органические молекулы, включающие аминокислоты, белки и/или витамины, полученные в результате реакции фиксации углерода или анаболического биосинтеза, как описано в данном документе, причем указанный источник углерода содержит только один атом углерода, при этом указанный способ дополнительно включает обработку указанных клеток микроорганизмов с помощью одного или нескольких из: механического лизиса; ферментативного лизиса; регулировки pH; увеличения или уменьшения давления; повышения или понижения температуры; электрических или электромагнитных полей; УЗИ; изменения осмолярности; и ферментативного гидролиза, в результате чего получают экстракт органического фермента.

[93] В другом аспекте предусматривается усилитель роста грибов, содержащий биомассу и/или белок, полученный способом, описанным в данном документе. В одном варианте реализации предложен способ усиления роста грибов, включающий объединение усилителя роста грибов с грибным компостом. В одном варианте реализации предложена композиция для роста грибов, содержащая комбинированные грибной компост и усилитель роста грибов.

[94] Различные объекты, признаки, аспекты и преимущества способов, систем, микроорганизмов и композиций, описанных в данном документе, станут более

очевидными из следующего подробного описания некоторых примерных вариантов реализации изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[95] Неограничивающие варианты реализации данного изобретения будут описаны в качестве примера со ссылкой на прилагаемые фигуры, некоторые из которых являются схематическими и не должны быть выполнены в масштабе. Для ясности, не каждый компонент обозначен на каждой фигуре, и не каждый компонент каждого варианта реализации изобретения продемонстрирован в случаях, не требующих иллюстрации для того, чтобы рядовые специалисты в данной области техники могли понять изобретение.

[96] На Фиг. 1 продемонстрирована корреляция между оптической плотностью (ОП) и плотностью биомассы.

[97] На Фиг. 2 изображена кривая роста *Cupriavidus necator* в сывороточных бутылках на газе.

[98] На Фиг. 3 продемонстрировано изменение давления в свободном пространстве с течением времени для выращивания *Cupriavidus necator* на газе в сывороточных бутылках.

[99] На Фиг. 4 продемонстрировано количество сухой биомассы, продуцируемой на моль H_2 , потребляемого *Cupriavidus necator* в сывороточных бутылках.

[100] На Фиг. 5 изображена кривая роста *Cupriavidus necator*, выращенного на $H_2/CO_2/O_2$ в биореакторе.

[101] На Фиг. 6 продемонстрирован рост хемотрофных и жиробразующих микроорганизмов на разных источниках углерода. Рост бактерий измеряли путем определения оптической плотности (ОП) при 650 нм через указанное число дней (в скобках). Среды и условия роста описаны в разделе "Примеры" ниже. ND, не проводилось.

[102] На Фиг. 7 изображена принципиальная схема биореакторов и вспомогательных систем, используемых для выращивания *C. necator* на газе.

[103] На Фиг. 8 продемонстрированы два 20-литровых биореактора для выращивания *C. necator* на газе в вытяжном шкафу.

[104] На Фиг. 9 продемонстрированы контроллеры Applikon и пульта управления, которые использовались для эксплуатации 20-литровых реакторов, вместе с системой детектирования взрывоопасных газов, массовыми расходомерами, регуляторами уровня,

уровнительными резервуарами (base control reservoirs), резервуаром для добавления среды и резервуаром для контроля пенообразования.

[105] На Фиг. 10 продемонстрирована суспензия биомассы *S. pescator* до обработки ультразвуком (слева) коричневого цвета и после обработки ультразвуком с полным разрушением клеток (справа), с изменением цвета биомассы от коричневого до кремового.

[106] На Фиг. 11 продемонстрирован штамм *Hydrogenovibrio marinus* DSM 11271, выращиваемый в биореакторе на смеси газообразных H_2 , CO_2 и O_2 .

[107] На Фиг. 12 продемонстрирована система подачи газа и культуральные сосуды, используемые для выращивания штамма *Rhodopseudomonas capsulata* DSM 1710, изображенные схематически.

[108] На Фиг. 13 приведена микрофотография *R. capsulata*.

[109] На Фиг. 14 продемонстрирован осадок биомассы *R. capsulata*, извлеченный после центрифугирования.

[110] На Фиг. 15 продемонстрирована принципиальная схема системы с двухлитровым стеклянным ферментером, используемой для выращивания штамма *Xanthobacter autotrophicus* DSM 432 на смеси газообразных H_2 , CO_2 и O_2 в качестве единственного источника энергии и углерода для роста.

[111] На Фиг. 16 изображена схематически торцевая крышка двухлитрового биореактора, использованного для выращивания *X. autotrophicus*.

[112] На Фиг. 17 продемонстрирована принципиальная схема реакторной системы для выращивания *Xanthobacter autotrophicus*, включающая: манометры; расходомеры газа; предохранительные и обратные клапаны; фильтры 0,2 мкм; сосуд биореактора, датчики, исполнительные механизмы и контроллеры; холодильник и пенную ловушку; и выпускное отверстие.

[113] На Фиг. 18 продемонстрирована принципиальная схема системы подачи газа, используемой для выращивания *X. autotrophicus*.

[114] На Фиг. 19 продемонстрирована корреляция между ОП600 (оптической плотностью при 600 нм) и сухой массой клеток (CDW) для *X. autotrophicus*.

[115] На Фиг. 20 продемонстрирована кривая роста *X. autotrophicus*, выращиваемого на $H_2/CO_2/O_2$.

[116] На Фиг. 21 продемонстрирована блок-схема варианта реализации способа, описанного в данном документе, с щелочной обработкой ферментационного бульона в форме водной клеточной суспензии с последующей физической обработкой и ферментативным гидролизом для получения экстракта органического фермента.

[117] На Фиг. 22 продемонстрирована блок-схема варианта реализации способа, описанного в данном документе, в соответствии с которым изолят с высоким содержанием белка и низким содержанием нуклеиновой кислоты получают из клеток, как описано в данном документе.

[118] На Фиг. 23 схематически продемонстрирована составная многоступенчатая система жизнеобеспечения или экологическая система с хемоавтотрофным первичным продуцентом.

[119] На Фиг. 24 схематично продемонстрировано использование CO_2 + возобновляемого H_2 для производства высокобелковой муки, которую можно использовать, например, в качестве биостимулятора, корма для животных или удобрения, или непосредственно для питания человека.

[120] На Фиг. 25 продемонстрирована принципиальная схема интегрированной системы, преобразующей отходы CO_2 и непииковую непостоянную возобновляемую энергию в высокобелковый биостимулятор, корм, удобрение и/или питательные вещества. В дополнение к улавливанию CO_2 и производству ценных питательных веществ, система снимает нагрузку на энергосистему от избыточной возобновляемой генерации в периоды низкой потребности.

ДЕТАЛЬНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[121] Приведенное в данном документе описание относится к биологическому продуцированию аминокислот и белков и других компонентов биомассы в микробной системе с использованием газообразного субстрата, такого как синтез-газ или генераторный газ или пиролизный газ или смеси газообразных H_2 и CO_2 , в качестве источника углерода и энергии. Данное изобретение также относится к использованию микробных аминокислот, белков и других компонентов биомассы для питания или обеспечения питательными веществами других организмов или людей. Аминокислоты, белки и другие составляющие биомассы, полученные в соответствии с раскрытыми способами, могут потребляться и использоваться в качестве питательных веществ другими организмами для производства продуктов питания и других продуктов на биологической основе.

[122] Это раскрытие также относится к композициям и способам получения аминокислот, белков и других компонентов биомассы путем культивирования бактерий или других микроорганизмов, которые растут на углеродсодержащих газах, таких как синтез-газ, генераторный газ, пиролизный газ, CO_2 , монооксид углерода и их смеси, содержащих газообразный водород. Оно также относится к газовым смесям, содержащим

метан, таким как биогаз или природный газ. Это раскрытие дополнительно относится к способам фиксации углерода из входящего потока газообразного вещества в полезные органические молекулы, такие как аминокислоты, белки, витамины и другие питательные вещества. Бактерии и/или микроорганизмы, раскрытые в данном документе, могут быть генетически модифицированы для использования в способах или других аспектах, описанных в данном документе. В некоторых других аспектах, описанных в данном документе, микроорганизмы не являются генетически модифицированными, т.е. принадлежат к дикому типу.

[123] Это раскрытие дополнительно относится к способам фиксации углерода из газа в полезные органические молекулы, такие как аминокислоты, белки, витамины и другие питательные вещества. Данное изобретение дополнительно описывает механизмы, придающие организму способность продуцировать и/или увеличивать продуцирование организмом продуктов на основе углерода путем преобразования диоксида углерода или других источников неорганического углерода и неорганической энергии, включая химическую энергию из неорганического химического вещества или непосредственно из источника электричества, в продукты на основе углерода, имеющие коммерческую ценность, в частности, аминокислоты, белки, витамины и другие питательные вещества, имеющие коммерческую ценность.

[124] Это раскрытие дополнительно относится к искусственной экологии, инженерным трофическим системам, закрытым экологическим системам, микрокосмам, системам непрерывной культуры, биорегенеративным и замкнутым системам жизнеобеспечения (Freda B. Taub (1974) *Closed Ecological Systems Annual Review of Ecology and Systematics* 5:139-160; и E.A. Zuraw (1966) "Study of life support systems for space missions exceeding one year in duration" NASA, Tech. Rep. SP-134, которые включены в данный документ посредством ссылок в полном объеме).

[125] Это раскрытие дополнительно относится к использованию газообразного водорода. Водород обычно считается экологически безопасной альтернативой ископаемому топливу или средством хранения электрической энергии. Однако его также можно использовать в качестве исходного сырья и первичного источника энергии для культивирования водородокисляющих микроорганизмов.

[126] Это раскрытие дополнительно относится к технологическому применению хемоавтотрофных микроорганизмов и, в частности, водородокисляющих бактерий. Они представляют собой особую группу бактерий, которые изучались в прошлом как потенциальные продуценты микробиологического белка (SCP) (G. L. Drake, C. D. King, W. A. Johnson, and E. A. Zuraw, "Study of life support systems for space missions exceeding one

year in duration," NASA, Tech. Rep. SP-134, Apr. 1966.; R. Repaske and R. Mayer, "Dense autotrophic cultures of *Alcaligenes eutrophus*" (1976) *Applied and environmental microbiology* 32(4):592-597 (<http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/32/4/592>)), and polyhydroxybutyrate (ПГБ).

[127] Это раскрытие дополнительно относится к микробным экстрактам и гидролизатам белка. (Патент США № 3887431; патент США № 9416062; заявка на патент США 2012/0129695; заявка на европейский патент EP 2752399; включены в данный документ посредством ссылок в полном объеме). Данное изобретение также направлено на получение экстрактов с высокой способностью выступать в качестве биостимулятора и/или биоудобрения и высокой способностью к биопоглощению гетеротрофными микроорганизмами, грибами, животными и растениями, поэтому они особенно полезны для органического земледелия, ферментации, кормления животных и непосредственного использования в питании человека.

[128] Это раскрытие дополнительно относится к биостимуляторам и биоудобрениям. Данное изобретение также относится к способам получения питательных веществ для растений и грибов, биостимуляторов, биоудобрений, и к получаемым таким образом биостимуляторам и/или биоудобрениям. Данное изобретение также относится к материалам, улучшающим рост грибов. Данное изобретение также относится к способам выращивания растений и грибов путем применения таких биостимуляторов, биоудобрений и/или улучшающих рост материалов. Данное изобретение дополнительно относится к способам приготовления продуктов из таких растений и грибов, разведения скота путем скармливания таких растений или грибов домашнему скоту и получения продуктов из такого домашнего скота. (Colla, G. et al. (2015) "Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture" *Scientia Horticulturae* 196:28-38 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.037>); заявка США № US20120129695; европейская заявка № EP2752399A1 и патент США № 4776872, которые включены в данный документ посредством ссылок в полном объеме).

[129] В данном документе предусматриваются способы и системы для биосинтетического производства аминокислот, белков, витаминов и других биологических питательных веществ. В определенных вариантах реализации предусматриваются природные или сконструированные микроорганизмы, которые продуцируют аминокислоты, белки и другие биологические питательные вещества на газообразном субстрате, включая, без ограничений, генераторный газ, синтез-газ, остаточный газ, пиролизный газ (pyrolysis), гремучий газ, природный газ, биогаз и газовые смеси, содержащие H_2 и CO_2 , и/или CO, и/или CH_4 . Газообразный субстрат может служить

источником углерода и/или энергии и/или источником доноров электронов и/или акцепторов электронов для роста микроорганизмов и биосинтеза биопродуктов. В некоторых вариантах реализации аминокислоты, пептиды, белки, витамины и/или другие питательные вещества синтезируются из простых C1 и неорганических предшественников, включая, без ограничений, что-то одно или несколько из следующих: синтез-газ, генераторный газ, H₂, CO₂, CO, H₂O, NH₃, CH₄, CH₃OH, HCOH, мочевины.

[130] Также предусматриваются микроорганизмы, такие как микроорганизм дикого типа или сконструированный микроорганизм, способный расти на синтез-газе или генераторном газе, и/или H₂, и/или CO₂, и/или CO, и/или CH₄, и/или другие отходящие газы, которые способны продуцировать аминокислоты, включая, без ограничений, лизин и/или метионин.

[131] В определенных вариантах реализации аминокислоты, и/или пептиды, и/или белки, и/или витамины синтезируют из простых C1 и неорганических прекурсоров, включая, без ограничений, одно или несколько из следующего: H₂, CO₂, CO, H₂O, NH₃, CH₄, CH₃OH, HCOH, мочевины. В других неограничительных вариантах реализации аминокислоты, и/или пептиды, и/или белки, и/или витамины продуцируют гетеротрофно из многоуглеродных органических молекул, таких как, без ограничений, сахара.

[132] В некоторых вариантах реализации данное изобретение относится к способу получения одной или нескольких аминокислот или белков или витаминов, включающему воздействие на бактериальную клетку синтез-газом и/или генераторным газом, и/или газообразным CO₂, и/или H₂, и/или CO, и/или CH₄, например, H₂ и CO₂, и/или CO, и/или CH₄; при этом бактериальная клетка способна связывать газообразный CO₂ и/или другие молекулы C1 в одну или несколько аминокислот или белки или витамины, и микроорганизм не содержит экзогенной нуклеиновой кислоты или содержит по меньшей мере первую экзогенную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах реализации клетка утилизирует газообразный субстрат(ы) в качестве источника восстанавливающих эквивалентов и/или метаболической энергии для синтеза одной или нескольких аминокислот, белков или витаминов. В некоторых вариантах реализации микроорганизм посредством своих нативных механизмов продуцирует аминокислоты и/или белки и/или витамины.

[133] В некоторых вариантах реализации данное изобретение относится к способу получения аминокислот и/или белков и/или белковой биомассы и/или витаминов, который включает культивирование штамма природного микроорганизма или сконструированного микроорганизма в биореакторе или растворе с сырьем, содержащим синтез-газ и/или генераторный газ и/или газообразные CO₂, и/или H₂, и/или CO, и/или CH₄, и/или биогаз,

и/или природный газ, например, H_2 и CO_2 , и/или CO , и/или CH_4 . В некоторых вариантах реализации данное изобретение относится к биореактору, содержащему композицию или бактериальные или микробные клетки, описанные в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретение относится к системе для продуцирования одной или нескольких аминокислот, белков или питательных веществ, включающей биореактор, который содержит: (а) популяцию микроорганизмов, содержащую клетку, описанную в данном документе; и (b) входное отверстие, соединенное с источником сырья, позволяющее подавать сырье, содержащее синтез-газ или генераторный газ и/или газообразные CO_2 и/или H_2 , и/или CO , и/или CH_4 , и/или метанол, например, H_2 и CO_2 , и/или CO , и/или CH_4 , и/или метанол.

[134] В некоторых вариантах реализации данное изобретение относится к способу получения аминокислот, или белков, или других питательных веществ в популяции микроорганизмов, содержащей клетку композиции, описанной в данном документе, который включает: культивирование популяции микроорганизмов, содержащей клетку или композицию, описанную в данном документе, в сырье, содержащем синтез-газ или генераторный газ и/или газообразные CO_2 и/или H_2 , и/или CO , и/или CH_4 , и/или метанол, например, H_2 и CO_2 , и/или CO , и/или CH_4 и/или метанол.

[135] В некоторых вариантах реализации данное изобретение относится к способу производства одной или нескольких аминокислот, или белков, или других питательных веществ, включающему (а) культивирование клетки, описанной в данном документе, в реакционном сосуде или биореакторе в присутствии синтез-газа или генераторного газа и/или газообразных CO_2 и/или H_2 , и/или CO , и/или CH_4 , например, H_2 и CO_2 , и/или CO , и/или CH_4 , причем клетка продуцирует и/или секретирует одну или несколько аминокислот, или белки, или другие питательные вещества в количестве, равном или превышающем, по меньшей мере, 10% от общей клеточной массы сухих клеток; и (b) выделение одной или нескольких аминокислот, или белков, или других питательных веществ, или цельного клеточного продукта из реакционного сосуда. В некоторых вариантах реализации способ дополнительно включает очистку одной или нескольких аминокислот, или белков, или других питательных веществ, или цельноклеточных продуктов после выделения из реакционного сосуда или биореактора. В некоторых вариантах реализации одна или несколько аминокислот, или белки, или другие питательные вещества, или цельные клеточные продукты являются компонентами, или прекурсорами, или входят в состав корма, или подаваемых питательных веществ, или удобрения, обеспечиваемого для другого организма. В некоторых вариантах реализации изобретение относится к способу получения одной или нескольких аминокислот,

включающему воздействию на бактериальную клетку, археобактериальную (archaeal) клетку и/или другую микробную клетку сингазом и/или газообразными CO_2 , и/или H_2 , и/или CO , и/или CH_4 , например, H_2 и CO_2 , и/или CO , и/или CH_4 ; при этом клетка способна связывать газообразный CO_2 и/или других источники C1 углерода в одну или несколько аминокислот, и/или белки, и/или витамины; причем соединения извлекают из биореактора и подают во второй или несколько дополнительных реакторов и/или технологических стадий, где соединения подвергают последующей обработке для получения продуктов, включая, без ограничений, одно или несколько из следующего: удобрение, биостимулятор, добавка для роста, питание человека или витамины.

[136] Предложены композиции и способы для улавливания диоксида углерода из газовых потоков, содержащих диоксид углерода, и/или атмосферного диоксида углерода, или диоксида углерода в растворенной, сжиженной или химически связанной форме посредством химического и биологического процесса, в котором используются облигатные или факультативные хемоавтотрофные микроорганизмы, в частности, хемолитоавтотрофные организмы, на одном или нескольких этапах процесса фиксации углерода. Данное изобретение также предусматривает композиции и способы для выделения, обработки и использования химических продуктов хемосинтетических реакций, осуществляемых хемоавтотрофами для связывания неорганического углерода в органические соединения, являющиеся промежуточными или конечными химическими веществами, включая, без ограничений, аминокислоты и/или белок и/или витамины и/или биомассу. Данное изобретение также предусматривает композиции и способы для генерирования, обработки и доставки химических питательных веществ, необходимых для хемосинтеза и поддержания хемоавтотрофных культур, включая, без ограничений, предоставление доноров электронов и акцепторов электронов, необходимых для хемосинтеза. Данное изобретение также предусматривает композиции и способы для поддержания среды, благоприятной для хемосинтеза и хемоавтотрофного роста, и для извлечения и рециркуляции неиспользованных химических питательных веществ и технологической воды.

[137] Одной из особенностей определенных вариантов реализации в данном документе является включение одной или нескольких стадий процесса, в которых хемотрофные микроорганизмы используются в качестве биокатализатора превращения химических веществ C1 в органические молекулы с более длинной углеродной цепью (т.е., молекулы с углеродными цепями C2 или больше, а в некоторых вариантах реализации - C5 или больше), в рамках общего процесса конверсии источников C1 углерода, включая, без ограничений, монооксид углерода, метан, метанол, формиат или

муравьиную кислоту и/или смеси, содержащие химические соединения C1, включая, без ограничений, различные композиции синтез-газа, генерируемого из различного газифицированного, пиролизованного или подвергнутого паровому риформингу сырья на основе связанного углерода и/или метанового сырья. В некоторых таких вариантах реализации содержащий C1 синтез-газ, или технологический газ, или химические вещества C1 в жидкой форме или растворенные в растворе, подают насосом или иначе добавляют в сосуд или емкость, содержащую питательную среду и хемотрофные микроорганизмы. В некоторых таких случаях хемотрофные микроорганизмы осуществляют биохимический синтез с превращением химических соединений C1 в более длинноцепочечные органические химические вещества с использованием углерода и электронов, имеющих в химических веществах C1, и/или электронов и водорода из молекулярного водорода, и/или валентных или проводящих электронов в твердофазных электродных материалах, и/или одного или нескольких из следующего списка доноров электронов, подаваемых насосом или иначе в питательные среды, включая, без ограничений: аммиак; аммоний; монооксид углерода; дитионит; элементную серу; углеводороды; метабисульфиты; оксид азота; нитриты; сульфаты, такие как тиосульфаты, включая, без ограничений, тиосульфат натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) или тиосульфат кальция (CaS_2O_3); сульфиды, такие как сероводород; сульфиты; тионат; тионит; переходные металлы или их сульфиды, оксиды, халькогениды, галогениды, гидроксиды, оксигидроксиды, сульфаты или карбонаты, в растворимой или твердой фазах. Доноры электронов могут быть окислены акцепторами электронов при хемосинтетической респираторной реакции. В некоторых вариантах реализации акцепторы электронов, которые используются для дыхания микроорганизмами, описанными в данном документе, включают, без ограничений, один или большее количество из следующих: кислород, диоксид углерода, ионы трехвалентного железа или других переходных металлов, нитраты, нитриты, кислород или дырки в твердофазных электродных материалах. В некоторых неограничительных вариантах реализации указанный хемотрофный микроорганизм представляет собой водородокисляющий (knallgas) или оксигородный микроорганизм.

[138] В определенных вариантах реализации данное изобретение относится к хемотрофным бактериальным штаммам, которые не содержат экзогенную нуклеиновую кислоту или которые содержат одну или несколько последовательностей экзогенной нуклеиновой кислоты. Данное изобретение частично вытекает из открытия того, что хемотрофные бактерии и конкретные родственные микроорганизмы обеспечивают непредвиденные преимущества при хозяйственном и крупномасштабном производстве

химикатов, белков, кормов, удобрений, мономеров, масел, топлива и других биологических веществ из газообразного сырья и углеродсодержащих отходов.

[139] Белки, липиды и другие биохимические вещества, синтезируемые микроорганизмами, описанными в данном документе, могут применяться в областях, включающих, без ограничений: сырье для производства биостимуляторов, биоудобрений или добавок для роста грибов; и в качестве ингредиентов биостимуляторов, биоудобрений, удобрений, кормов для животных, пищевых продуктов, средств личной гигиены и косметических продуктов. В некоторых вариантах реализации ферментативные и химические процессы могут быть использованы для получения витаминов, аминокислот и/или белков. Некоторые варианты реализации обеспечивают способы производства биостимуляторов и/или удобрений. Кроме того, в описании раскрыты способы культивирования и/или модификации хемотрофных бактерий для повышения выхода аминокислот и/или белка и/или снижения производственных затрат.

[140] Данное изобретение относится к способам и механизмам, обеспечивающим получение и/или секрецию представляющих интерес продуктов на основе углерода, включая, без ограничений, химические вещества, мономеры, полимеры, аминокислоты, белки, полисахариды, витамины и нутрицевтические или фармацевтические продукты или их промежуточные соединения. в облигатных или факультативных хемотрофных организмах таким образом, чтобы эти организмы превращали диоксид углерода и/или другие формы неорганического углерода и/или синтез-газ и/или другие соединения C1, такие как метанол, и/или жидкие, газообразные и твердые продукты пиролитических реакций, такие как как пиролизный газ, и/или масло, в представляющие интерес продукты на основе углерода и, в частности, использование таких организмов для коммерческого производства химикатов, мономеров, полимеров, аминокислот, белков, полисахаридов, витаминов, животных кормов, биостимуляторов, удобрений и нутрицевтических или фармацевтических продуктов или их промежуточных соединений. Однако это описание также относится к способам получения указанных продуктов гетеротрофно из многоуглеродистых органических источников молекулярного углерода, таких как, без ограничений, сахара.

[141] В некоторых вариантах реализации данное изобретение также предусматривает композиции и способы для стадий химического процесса, которые протекают последовательно и/или параллельно со стадиями реакции хемосинтеза, которые: превращают неочищенные исходные химические вещества в исходные вещества в более рафинированные химические вещества, пригодные для поддержания стадии фиксации углерода для химического синтеза; преобразуют потребляемую энергию в

химическую форму, которая может быть использована для проведения хемосинтеза и, в частности, в химическую энергию в форме доноров электронов и акцепторов электронов; направляют неорганический углерод, связываемый из промышленных или атмосферных или водных источников, на стадию фиксации углерода или стадии процесса в условиях, пригодных для поддержания фиксации хемосинтетического углерода; дополнительно, обрабатывают выходящие продукты стадий хемосинтетической фиксации углерода в форму, пригодную для хранения, доставки и продажи, причем указанные продукты включают, без ограничений, аминокислоты, и/или белки, и/или витамины, и/или биомассу. Стадии полностью химического абиотического процесса, объединенные со стадиями биологической хемосинтетической фиксации углерода, составляют общий процесс улавливания и конверсии углерода по данному изобретению. В данном изобретении используется уникальная простота интеграции хемоавтотрофных микроорганизмов в поток химического процесса в качестве биокатализатора по сравнению с другими формами жизни.

[142] Если не будет указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют значение, общеизвестное специалистам в области техники, к которой относится это изобретение. Общие значения многих терминов, используемых в данном изобретении, содержатся в Singleton, et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, second ed., John Wiley and Sons, New York (1994), и Hale & Markham, The Harper Collins Dictionary of Biology, Harper Perennial, NY (1991). Любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, могут использоваться при практическом применении или тестировании способов, систем и композиций, описанных в данном документе.

[143] В практике данного изобретения будут использоваться, если не указано иное, обычные методы молекулярной биологии (включая рекомбинантные методы), микробиологии, клеточной биологии и биохимии, известные специалистам в данной области техники. Такие методы полностью описаны в литературе, например, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook et al., 1989); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984; Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al., eds., 1994); PCR: The Polymerase Chain Reaction (Mullis et al., eds., 1994); и Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (Kriegler, 1990).

[144] Числовые диапазоны, приведенные в данном документе, включают числа, определяющие диапазон.

[145] Если не указано иное, нуклеиновые кислоты записываются слева направо в ориентации 5'-3'; аминокислотные последовательности записываются слева направо в ориентации от амино- к карбокси-концу, соответственно.

Определения

[146] Термины в единственном числе (в английском тексте - с артиклями "a", "an" и "the") включают ссылки на множественное число, если контекст явно не предписывает (unless the context clearly dictates), таким образом, термины в единственном числе (с неопределенными артиклями "a", "an", и "the"), используемые в данном документе в описании и в формуле изобретения, если четко не указано иное, следует понимать как означающее "по меньшей мере один".

[147] Фраза "и/или", в значении, используемом в данном документе в описании и в формуле изобретения, должна пониматься как означающая "любой один или оба" из элементов, связанных таким образом, т.е. элементов, которые в некоторых случаях присутствуют совместно, и в других случаях - присутствуют в качестве альтернативы. Необязательно, могут присутствовать другие элементы, отличные от элементов, конкретно обозначенных в формулировке "и/или", независимо от того, связаны они или нет с конкретно определенными элементами, если явно не указано иное. Таким образом, в качестве неограничивающего примера, ссылка на "А и/или В" при использовании в неограничительном контексте, таком как в сочетании с термином "содержащий", может относиться, в одном варианте реализации, к А без В (необязательно включая отличные от В элементы); в другом варианте реализации - к В без А (необязательно включая элементы, отличные от А); и в еще одном варианте реализации - к А и В (необязательно включая другие элементы); и т.д.

[148] Термин "около", используемый в данном документе по отношению к измеряемому значению, такому как количество, временная длительность и т.п., предназначен для охвата отклонений $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$ или $\pm 0,1\%$ от указанного значения, поскольку такие отклонения являются пригодными для осуществления раскрытых способов или в связи с раскрытой композицией.

[149] Термин "аминокислота" относится к молекуле, содержащей как аминогруппу, так и карбоксильную группу, связанные с атомом углерода, который обозначается как альфа-углерод. Пригодные аминокислоты включают, без ограничения, как D-, так и L-изомеры природных аминокислот, а также не встречающиеся в природе аминокислоты, полученные органическим синтезом или другими метаболическими путями. В некоторых вариантах реализации одна "аминокислота" может иметь несколько

фрагментов боковой цепи, присутствующих на протяженном каркасе алифатической или ароматической основной цепи. Если из контекста не следует иное, термин "аминокислота", в используемом в данном документе значении, будет включать аналоги аминокислот.

[150] "Анаболизм" относится к процессу, посредством которого живые организмы синтезируют сложные молекулы жизни из более простых. Анаболические процессы продуцируют пептиды, белки, полисахариды, липиды и нуклеиновые кислоты. Энергия, необходимая для анаболизма, поступает от внутриклеточных энергоносителей, таких как аденозинтрифосфат (АТФ).

[151] "Ауксины" представляют собой класс растительных гормонов (или ростовых веществ растений) с некоторыми морфогеноподобными характеристиками. Ауксины играют центральную роль в координации многих процессов роста и поведения в жизненном цикле растения и необходимы для развития организма растения.

[152] "Биопоглощение" относится к процессу, посредством которого вещества поглощаются тканями и органами организмов.

[153] "Биостимуляторы" или "биостимулятор" относятся к соединениям, способным стимулировать рост и развитие растений, например, сельскохозяйственных культур, а также увеличивать и усиливать микробиологическую активность почвы.

[154] Термин "биомасса" относится к материалу, полученному в результате роста и/или размножения клеток. Биомасса может содержать клетки и/или внутриклеточное содержимое, а также внеклеточный материал, включая, без ограничений, соединения, секретируемые клеткой.

[155] Термин "биореактор" или "ферментер" относится к закрытому или частично закрытому сосуду, в котором выращиваются и содержатся клетки. Клетки могут, но не обязательно, содержаться в жидкой суспензии. В некоторых вариантах реализации вместо содержания в жидкой суспензии, клетки могут альтернативно выращиваться и/или поддерживаться в контакте с другим нежидким субстратом, на нем или внутри него, включая, без ограничений, твердый материал для поддержки роста.

[156] Термин "углерод-фиксирующая" реакция или путь относится к ферментативным реакциям или метаболическим путям, которые преобразуют формы углерода, являющиеся газообразными в условиях окружающей среды, включая, без ограничений, CO_2 , CO и CH_4 , в биохимические вещества на основе углерода, являющимися жидкими или твердыми в условиях окружающей среды, или растворенные, или содержащиеся в суспензии, в водном растворе.

[157] "Источник углерода" относится к типам молекул, из которых микроорганизм получает углерод, необходимый для органического биосинтеза.

[158] "Карбоксидотрофными" называются микроорганизмы, толерантные к или способные окислять монооксид углерода. В предпочтительных вариантах реализации карбоксидотрофный микроорганизм может использовать CO в качестве источника углерода и/или в качестве источника восстанавливающих электронов для биосинтеза и/или дыхания.

[159] Термин "катализатор" относится к химическому действующему веществу, такому как молекула или макромолекулярная структура, увеличивающему скорость протекания химической реакции, в которой реагент или реагенты превращаются в продукт или продукты, в то время как сам катализатор не превращается в продукт, или изменяется иным образом, или расходуется после завершения химической реакции. После того, как катализатор примет участие в одной химической реакции, поскольку он не изменяется, он может участвовать в дальнейших химических реакциях, воздействуя на дополнительные реагенты для образования дополнительных продуктов. Чтобы ускорить химическую реакцию, катализатор снижает энергетический барьер активации на пути реакции, позволяя ей протекать при более низкой температуре или быстрее при данной температуре. Таким образом, система может быстрее достигать химического равновесия. Катализаторы включают ферменты, которые являются белковыми катализаторами.

[160] Термин "целлюлозный материал" относится к любому материалу с высоким содержанием целлюлозы, которая представляет собой полисахарид, имеющий формулу $(C_6H_{10}O_5)_n$, обычно состоящий из линейной цепи, содержащей от сотен до тысяч α (1 \rightarrow 4)-связанных мономеров D-глюкозы. Источники целлюлозного материала включают, без ограничений, картон, хлопок, кукурузную солому, бумагу, щепу, опилки, свекловичный жом, жом сахарного тростника и просо прутьевидное (switchgrass).

[161] "Хемоавтотрофный" относится к организмам, которые получают энергию путем окисления химических доноров электронов химическими акцепторами электронов и синтезируют все органические соединения, необходимые организму для жизни и роста, из диоксида углерода.

[162] Термин "КоА" или "кофермент А" относится к органическому кофактору конденсации ферментов, участвующих в синтезе и окислении жирных кислот, окислении пирувата, переносе ацетильной или другой ацильной группы и в других видах ацетилирования.

[163] Термин "кофактор" включает все молекулы, необходимые ферменту для проявления его каталитической активности. В некоторых вариантах реализации кофактором является любая молекула, кроме субстрата.

[164] В формуле изобретения, а также в описании, все переходные фразы, такие как "содержащий", "включающий", "несущий", "имеющий", "имеющий в составе", "связанный с", "удерживающий" и т.п. следует понимать как неограничительные, т.е. означающие "включающий, без ограничений". Только переходные фразы "состоящий из" и "состоящий по существу из" должны быть ограничительными или полуограничительными переходными фразами, соответственно.

[165] Термин "культивирование" относится к выращиванию популяции клеток, например, микробных клеток, в пригодных для роста условиях, в жидкой или твердой среде.

[166] Термин "полученный из" включает термины "происходящий из", "извлеченный из", "доступный из", "выделенный из" и "созданный из" и, как правило, указывает на то, что один указанный материал имеет в качестве источника происхождения другой указанный материал, или имеет характеристики, которые могут быть описаны со ссылкой на другой указанный материал.

[167] "Элиситоры" - это внешние или чужеродные молекулы, часто связанные с вредителями растений, болезнями или синергетическими организмами. Молекулы-элиситоры могут прикрепляться к специальным рецепторным белкам, расположенным на мембранах растительных клеток.

[168] "Источник энергии" относится либо к донору электронов, который окисляется кислородом при аэробном дыхании, либо к комбинации донора электронов, который окисляется, и акцептора электронов, который восстанавливается при анаэробном дыхании.

[169] "Эдафический" означает относящийся к или связанный с почвой, особенно по отношению к живым организмам и/или в связи с конкретным типом почвы.

[170] Термин "лигноцеллюлозный материал" означает любой материал, состоящий из целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина, причем углеводные полимеры (целлюлоза и гемицеллюлоза) тесно связаны с лигнином. К лигноцеллюлозным материалам относятся сельскохозяйственные отходы (в том числе кукурузная солома и жом сахарного тростника), большинство культур, выращиваемых в качестве биомассы для получения энергии, древесные отходы (включая отходы лесопилок и бумажных фабрик) и значительная часть муниципальных отходов.

[171] Термины "липиды" относятся к категории молекул, которые могут быть растворены в неполярных растворителях (таких как хлороформ и/или эфир) и которые также имеют низкую растворимость или нерастворимы в воде. Гидрофобный характер молекул липидов обычно обусловлен наличием в молекуле длинноцепочечных углеводородных участков. Липиды включают следующие типы молекул: углеводороды, жирные кислоты (насыщенные и ненасыщенные), жирные спирты, жирные альдегиды, оксикислоты, дикислоты, моноглицериды, диглицериды, триглицериды, фосфолипиды, сфинголипиды, стеролы, такие как холестерин и стероидные гормоны, жирорастворимые витамины (такие как витамины А, D, Е и К), поликетиды, терпеноиды и воски.

[172] Термин "лизат" относится к жидкости, содержащей смесь и/или раствор содержимого клеток, которая образуется в результате лизиса клеток. В некоторых вариантах реализации способы, описанные в данном документе, включают очистку химических веществ или смеси химических веществ в клеточном лизате. В некоторых вариантах реализации способы включают очистку аминокислот и/или белка в клеточном лизате.

[173] Термин "лизис" относится к разрыву плазматической мембраны и, в случае ее присутствия, клеточной стенки клетки, так что значительное количество внутриклеточного материала выходит во внеклеточное пространство. Лизис может быть проведен с использованием электрохимических, механических, осмотических, термических или вирусных средств. В некоторых вариантах реализации способы, описанные в данном документе, включают проведение лизиса клеток или микроорганизмов, как описано в данном документе, для отделения химического вещества или смеси химических веществ от содержимого биореактора. В некоторых вариантах реализации способы включают проведение лизиса клеток или микроорганизмов, описанных в данном документе, для отделения аминокислоты или смеси аминокислот и/или белков от содержимого биореактора или клеточной ростовой среды.

[174] При использовании в данном документе в описании и формуле изобретения, термин "или" следует понимать как имеющий такое же значение, как и "и/или", как было определено выше. Например, при разделении элементов списка "или" или "и/или" должны интерпретироваться как инклюзивные, т.е. включающие по меньшей мере один, а также включающие более одного из ряда или перечня элементов и, необязательно, дополнительные не включенные в перечень элементы. Только термины, для которых четко указано обратное значение, такие как "только один из" или "точно один из", или, при использовании в формуле изобретения, "состоящий из", будут относиться к включению ровно одного элемента из ряда или перечня элементов. В общем, термин

"или", используемый в данном документе, должен истолковываться только как указывающий на исключающие альтернативы (т.е. "один или другой, но не оба"), когда ему предшествуют термины, указывающие на эксклюзивность, такие как "либо", "один из", "только один из" или "точно один из". "По существу состоящий из", при использовании в формуле изобретения, должен иметь свое обычное значение, используемое в области патентного права.

[175] "Титр" относится к количеству вещества, продуцируемого микроорганизмом на единицу объема в процессе микробной ферментации. Например, титр биомассы может быть выражен в граммах биомассы, продуцируемой на литр раствора.

[176] "Выход" относится к количеству продукта, продуцируемого из исходного материала (например, сахара), от общего количества вещества, которое было бы продуцировано при превращении в продукт всего исходного вещества. Например, выход аминокислоты может быть выражен как% продуцированной аминокислоты от теоретического выхода, когда 100% исходного вещества превращается в аминокислоту.

[177] "Продуктивность" относится к количеству вещества, продуцируемого микроорганизмом на единицу объема в единицу времени в процессе микробной ферментации. Например, производительность биомассы может быть выражена в граммах биомассы, продуцируемой на литр раствора в час.

[178] "Дикий тип" относится к микроорганизму в том виде, в каком он встречается в природе.

[179] "Ген" относится к сегменту ДНК, который участвует в продуцировании полипептида и включает области, предшествующие и следующие за кодирующими областями, а также промежуточные последовательности (интроны) между отдельными кодирующими сегментами (экзонами).

[180] Термины "извлеченный", "выделенный", "очищенный" и "отделенный", используемые в данном документе, относятся к материалу (например, белку, нуклеиновой кислоте или клетке), который извлекают из по меньшей мере одного компонента, с которым он связан в природе. Например, эти термины могут относиться к материалу, который по существу или в значительной мере не содержит компонентов, обычно сопровождающих его в естественном состоянии, таких как, например, интактная биологическая система.

[181] "Литоавтотрофный" относится к определенному типу хемоавтотрофии, когда организм использует окисление неорганических химических доноров электронов неорганическими химическими электронными акцепторами в качестве источника энергии.

[182] Термин "гремучий газ" (knallgas) относится к смеси газообразных молекулярных водорода и кислорода. "Водородоокисляющие микроорганизмы" (knallgas microorganism) - это микробы, которые могут использовать водород в качестве донора электронов и кислород в качестве акцептора электронов при дыхании для генерации внутриклеточных носителей энергии, таких как аденозин-5'-трифосфат (АТФ). Термины "оксигород" и "оксигородный микроорганизм" могут использоваться как синонимы "гремучего газа" и "водородоокисляющего микроорганизма", соответственно. Водородоокисляющие микроорганизмы, как правило, используют молекулярный водород с помощью гидрогеназ, при этом часть электронов, донируемых H_2 , используется для восстановления NAD^+ (и/или других внутриклеточных восстановительных эквивалентов), и часть электронов H_2 используется для аэробного дыхания. Водородоокисляющие микроорганизмы, как правило, связывают CO_2 автотрофно, по путям, включающим, без ограничений, цикл Кальвина или обратный цикл лимонной кислоты ["Thermophilic bacteria", Jakob Kristjansson, Chapter 5, Section III, CRC Press, (1992)].

[183] "Гетеротрофный" относится к организмам, которые не могут синтезировать все органические соединения, необходимые организму для жизни и роста, из углекислого газа, и которые должны использовать органические соединения для роста. Гетеротрофные организмы не могут продуцировать свои собственные питательные вещества, и вместо этого получают питание и энергию путем потребления и метаболизирования органических веществ, таких как растительные или животные вещества, а не фиксации углерода из неорганических источников, таких как двуокись углерода.

[184] "Никотинамидадениндинуклеотид" представляет собой кофермент, присутствующий во всех живых клетках, который участвует в окислительно-восстановительных реакциях, перенося электроны от одной реакции к другой. Никотинамидадениндинуклеотид существует в двух формах: окисленной и восстановленной, сокращенно обозначаемых NAD^+ и $NADH$, соответственно.

[185] "Водородоокисляющий" относится к микроорганизму, который использует восстановленный H_2 в качестве донора электронов для производства внутриклеточных восстанавливающих эквивалентов и/или при дыхании.

[186] "Ацетоген" относится к микроорганизму, который генерирует ацетат и/или другие короткоцепочечные органические кислоты с длиной цепи до C_4 в качестве продукта анаэробного дыхания.

[187] "Метаноген" относится к микроорганизму, который генерирует метан как продукт анаэробного дыхания.

[188] "Метилотроф" относится к микроорганизму, который может использовать восстановленные одноуглеродные соединения, такие как, без ограничений, метанол или метан, в качестве источника углерода и/или в качестве донора электронов для своего роста.

[189] "Экстремофил" относится к микроорганизму, который процветает в физически или геохимически экстремальных условиях (например, при высокой или низкой температуре, pH или высокой минерализации) по сравнению с условиями на поверхности Земли или океана, обычно переносимыми большинством форм жизни, существующими на или вблизи поверхности земли.

[190] "Термофил" относится к типу экстремофилов, который процветает при относительно высоких для жизни температурах, обычно от около 45 °C до около 122 °C.

[191] "Гипертермофил" относится к типу экстремофилов, который процветает в чрезвычайно жарких для жизни условиях, обычно около 60 °C (140 °F) или выше.

[192] "Ацидофил" относится к типу экстремофилов, который процветает в условиях высокой кислотности (обычно при pH 2,0 или ниже).

[193] "Галофил" относится к типу экстремофилов, который процветает в средах с очень высокими концентрациями соли.

[194] "Психрофил" относится к типу экстремофилов, способных расти и размножаться при низких температурах, обычно около 10 °C и ниже.

[195] "Генераторный газ" относится к газовой смеси, содержащей различные пропорции H_2 , CO и CO_2 , и имеющей теплотворную способность, как правило, в диапазоне от половины до одной десятой теплотворной способности природного газа на единицу объема в стандартных условиях. Генераторный газ может быть получен различными способами из различных видов сырья, включая газификацию, паровой риформинг или авториформинг сырья на основе углерода. В дополнение к H_2 , CO и CO_2 , генераторные газы могут содержать другие компоненты, включая, без ограничений, метан, сероводород, конденсирующиеся газы, смолы и золу, в зависимости от процесса генерации и сырья. Доля N_2 в смеси может быть высокой или низкой в зависимости от того, используется ли воздух в качестве окислителя в реакторе или нет, и получают ли тепло для реакции прямым сгоранием или косвенным теплообменом.

[196] "Флавоноиды" (или биофлавоноиды) (от латинского слова flavus, означающего желтый, их цвет в природе) представляют собой класс вторичных метаболитов растений и грибов. Химически, флавоноиды имеют общую структуру 15-углеродного скелета, состоящего из двух фенильных колец (A и B) и гетероциклического кольца (C). Эта углеродная структура может быть сокращенно обозначена C6-C3-C6.

[197] "Удобрение" представляет собой органическое или неорганическое, природное или синтетическое вещество, которое используется для обогащения почвы и обеспечения растений одним или несколькими необходимыми питательными веществами для обычного вегетативного роста. В определенных вариантах реализации термин удобрение также относится к питательным веществам для грибов и производства шляпочных грибов.

[198] "Фертигация" обозначает внесение удобрений, почвенных добавок и других водорастворимых продуктов в систему орошения.

[199] Термин "газификация" относится к обычно высокотемпературному процессу, который превращает материалы на основе углерода в смесь газов, включающую водород, монооксид углерода и диоксид углерода, называемую синтез-газом, сингазом или генераторным газом. Процесс обычно включает частичное сжигание и/или применение тепла, генерируемого извне, наряду с контролируемым добавлением кислорода и/или пара, так чтобы присутствующего кислорода было недостаточно для полного сгорания материала на основе углерода.

[200] "Гиббереллины" (GA) - это растительные гормоны, которые регулируют рост и влияют на различные процессы развития, включая удлинение ствола, прорастание, покой, цветение, половую экспрессию, индукцию ферментов и старение листьев и плодов.

[201] "Глюкозинолаты" являются природными компонентами многих растений со жгучим вкусом, таких как горчица, капуста и хрен. Жгучий вкус этих растений обусловлен горчичными маслами, образующимися из глюкозинолатов, когда растительный материал разжевывается, разрезается или иным образом повреждается.

[202] Термины "микроорганизм" и "микроб" означают микроскопические одноклеточные формы жизни.

[203] Термин "молекула" означает любую отдельную или различимую структурную единицу вещества, содержащую один или большее количество атомов, и включает, например, углеводороды, липиды, полипептиды и полинуклеотиды.

[204] Термин "масличный" относится к чему-то, что имеет высокое содержание масла, или продуцирует нефть в больших количествах.

[205] "Олигопептид" относится к пептиду, который содержит относительно небольшое количество аминокислотных остатков, например, от около 2 до около 20 аминокислот.

[206] Термин "органическое соединение" относится к любому газообразному, жидкому или твердому химическому соединению, которое содержит атомы углерода, за следующими исключениями, которые считаются неорганическими: карбиды, карбонаты,

простые оксиды углерода, цианиды и аллотропные модификации чистого углерода, такие как алмаз и графит.

[207] "Папаин", также известный как протеиназа I папайи, представляет собой фермент цистеинпротеазу (ЕС 3.4.22.2), присутствующий в папайе (*Carica papaya*) и горной папайе (*Vasconcellea cundinamarcensis*).

[208] "Пепсин" представляет собой фермент, расщепляющий белки на более мелкие пептиды (т.е. протеазу). Он вырабатывается в желудке и является одним из основных пищеварительных ферментов в пищеварительной системе человека и многих других животных, где он помогает переваривать белки в пище.

[209] "Пептид" - соединение, состоящее из двух или более аминокислот, соединенных в цепь, причем карбоксильная группа каждой кислоты соединена с аминогруппой следующей посредством связи типа R-OC-NH-R', например, от около 2 до около 50 аминокислот.

[210] Термин "прекурсор" или "предшественник" относится к промежуточному соединению при получении одного или нескольких компонентов готового продукта.

[211] Термин "продуцирование" включает продуцирование соединений как внутриклеточно, так и внеклеточно, включая секрецию соединений клеткой.

[212] "Филлосфера" - это термин, используемый в микробиологии для обозначения в общем надземных частей растений как среды обитания для микроорганизмов.

[213] "Фитотоксичность" представляет собой токсическое воздействие соединения на рост растений. Такие повреждения могут быть вызваны широким спектром соединений, в том числе микроэлементами, засоленностью, пестицидами, фитотоксинами или аллелохимикатами.

[214] Используемый в данном документе термин "полипептид" относится к композиции, состоящей из аминокислот, которую специалисты в данной области считают белком. В данном документе для аминокислотных остатков используется обычный однобуквенный или трехбуквенный код. Термины "полипептид" и "белок" используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты, и он может содержать не-аминокислотные вставки. Указанные термины также охватывают аминокислотный полимер, который был модифицирован естественным путем или путем вмешательства; например, образованием дисульфидной связи, гликозилированием, липидированием, ацетилированием, фосфорилированием или любыми другими манипуляциями или модификациями, такими

как конъюгация с метящим компонентом. Также в указанное определение включены, например, полипептиды, содержащие один или большее количество аналогов аминокислоты (включая, например, неприродные аминокислоты и т.д.), а также другие модификации, известные специалистам в данной области.

[215] "Ризосфера" - это узкий участок почвы, на который непосредственно влияют корневые выделения, и связанные с ним почвенные микроорганизмы.

[216] "Сероокисляющий" относится к микроорганизмам, которые используют восстановленные серосодержащие соединения, включая, без ограничений, H_2S , в качестве доноров электронов для получения внутриклеточных восстанавливающих эквивалентов и/или при дыхании.

[217] "Сингаз" или "синтез-газ" относится к типу газовой смеси, которая, как и генераторный газ, содержит H_2 и CO , но которая была специально модифицирована по показателям содержания и соотношения H_2 и CO , а также уровней примесей, для синтеза химического продукта определенного типа, такого как, без ограничений, метанол или дизельное топливо, получаемое по реакции Фишера-Тропша. Как правило, синтез-газ содержит H_2 , CO и CO_2 в качестве основных компонентов, и его можно получать с помощью установленных методов, включая: паровую конверсию метана, сжиженного нефтяного газа или биогаза; или путем газификации любого органического горючего материала на основе углерода, включая, без ограничений, биомассу, органические отходы, различные полимеры, торф и уголь. Доля водородного компонента синтез-газа может быть увеличена посредством реакции CO с паром в реакции конверсии водяного газа с сопутствующим увеличением содержания CO_2 в смеси синтез-газа.

[218] "Трипсин" (ЕС 3.4.21.4) является сериновой протеазой из суперсемейства клана PA, обнаруженную в пищеварительной системе многих позвоночных, где она гидролизует белки. Трипсин образуется в тонкой кишке при активации его проферментной формы, трипсиногена, вырабатываемого поджелудочной железой. Трипсин расщепляет пептидные цепи в основном на карбоксильной стороне аминокислот лизина или аргинина, за исключением случаев, когда за любым из них следует пролин. Он используется в многочисленных биотехнологических процессах. Этот процесс обычно называют трипсиновым протеолизом или трипсинизацией, и белки, которые были гидролизованы/обработаны трипсином, называются трипсинизированными. В некоторых вариантах реализации данного изобретения используется трипсинизация белков, полученных, как описано в данном документе.

[219] Используемый в данном документе термин "полинуклеотид" относится к полимерной форме нуклеотидов любой длины и любой трехмерной структуры,

одноцепочечных или многоцепочечных (например, одноцепочечных, двухцепочечных, трехспиральных и т.д.) которые содержат дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды и/или аналоги или модифицированные формы дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидов, включая модифицированные нуклеотиды или основания или их аналоги. Поскольку генетический код является вырожденным, для кодирования конкретной аминокислоты может использоваться несколько кодонов, и данное изобретение охватывает полинуклеотиды, которые кодируют конкретную аминокислотную последовательность. Можно использовать любой тип модифицированного нуклеотида или аналога нуклеотида, при условии, что полинуклеотид сохраняет желаемую функциональность в условиях использования, включая модификации, увеличивающие устойчивость к нуклеазе (например, дезокси, 2'-O-Me, фосфоротиоаты и т.д.). Также могут быть включены метки для детектирования или захвата, например, радиоактивные или нерадиоактивные метки или якорные группы, например, биотин. Термин полинуклеотид включает также пептидные нуклеиновые кислоты (PNA). Полинуклеотиды могут быть природными или не встречающимися в природе. Термины "полинуклеотид", "нуклеиновая кислота" и "олигонуклеотид" используются в данном документе взаимозаменяемо. Полинуклеотиды могут содержать РНК, ДНК или обе, и/или их модифицированные формы, и/или их аналоги. Последовательность нуклеотидов может прерываться ненуклеотидными компонентами. Одна или несколько фосфодизэфирных связей могут быть заменены альтернативными связывающими группами. Такие альтернативные связующие группы включают, без ограничений, варианты, в которых фосфат заменен на P(O)S ("тиоат"), P(S)S ("дитиоат"), (O)NR₂ ("амидат"), P(O)R, P(O)OR', CO или CH₂ ("формацеталь"), где каждый R или R' независимо обозначает H или замещенный или незамещенный алкил (1-20 C), необязательно содержащий простую эфирную (--O--) связь, арил, алкенил, циклоалкил, циклоалкенил или аралдил. Не все связи в полинуклеотиде должны быть идентичными. Полинуклеотиды могут быть линейными или кольцевыми или содержать комбинацию линейных и кольцевых частей.

[220] Используемый в данном документе термин "клетка-хозяин" относится к клетке или клеточной линии, в которые для экспрессии полипептида может быть трансфицирован рекомбинантный экспрессионный вектор для продуцирования полипептида. Клетки-хозяева включают потомство одной клетки-хозяина, и потомство не должно обязательно быть полностью идентичным (по морфологии или по комплементу общей геномной ДНК) исходной родительской клетке вследствие естественной, случайной или преднамеренной мутации. Клетка-хозяин включает клетки, трансфицированные или трансформированные *in vivo* с помощью вектора экспрессии.

[221] Термин "рекомбинантный" относится к генетическому материалу (т.е. нуклеиновым кислотам, полипептидам, которые они кодируют, и векторам и клеткам, содержащим такие полинуклеотиды), который был модифицирован для изменения его последовательности или характеристик экспрессии, например, путем мутации кодирующей последовательности для получения измененного полипептида, слияния кодирующей последовательности с последовательностью другого гена, помещения гена под контроль другого промотора, экспрессии гена в гетерологичном организме, экспрессии гена с пониженными или повышенными уровнями, экспрессии гена условно или конститутивно способом, отличающимся от его естественного профиля экспрессии и т.п. Обычно рекомбинантные нуклеиновые кислоты, полипептиды и клетки на их основе подвергались манипуляциям человеком, поэтому они не идентичны родственным нуклеиновым кислотам, полипептидам и клеткам, встречающимся в природе. Рекомбинантная клетка может также называться "сконструированной".

[222] Используемый в данном документе термин "вектор" относится к полинуклеотидной последовательности, предназначенной для введения нуклеиновых кислот в один или большее количество типов клеток. Векторы включают клонирующие векторы, экспрессионные векторы, челночные векторы, плазмиды, фаговые частицы, кассеты и т.п.

[223] Используемый в данном документе термин "экспрессия" относится к процессу, с помощью которого полипептид продуцируется на основе последовательности нуклеиновой кислоты гена. Процесс включает как транскрипцию, так и трансляцию.

[224] Используемый в данном документе термин "экспрессионный вектор" относится к конструкту ДНК, содержащему кодирующую последовательность ДНК (например, последовательность гена), которая функционально связана с одной или несколькими пригодными контрольными последовательностями, способными влиять на экспрессию кодирующей последовательности в хозяине. Такие контрольные последовательности включают промотор для осуществления транскрипции, необязательную последовательность оператора для контроля такой транскрипции, последовательность, кодирующую пригодные сайты связывания мРНК рибосомы, и последовательности, которые контролируют терминацию транскрипции и трансляции. Вектор может представлять собой плазмиду, фаговую частицу или просто потенциальную геномную вставку. После трансформации в пригодного хозяина вектор может реплицироваться и функционировать независимо от генома хозяина, или может, в некоторых случаях, интегрироваться в сам геном. Плазида является наиболее часто используемой формой вектора экспрессии. Однако изобретение предусматривает

включение таких других форм векторов экспрессии, которые выполняют эквивалентные функции и которые известны или станут известными в данной области.

[225] "Промотор" относится к регуляторной последовательности, которая участвует в связывании РНК-полимеразы для инициации транскрипции гена. Промотор может быть индуцибельным промотором или конститутивным промотором. "Индучибельный промотор" представляет собой промотор, который активен в условиях окружающей среды или регуляции развития.

[226] Термин "функционально связанный" относится к сближению или расположению в определенном порядке определенных элементов, которое позволяет им выполнять совместные действия для достижения эффекта. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если он контролирует транскрипцию кодирующей последовательности.

[227] "Под транскрипционным контролем" представляет собой хорошо понятный в данной области термин, который указывает, что транскрипция полинуклеотидной последовательности зависит от ее функциональной связи с элементом, способствующим инициации или промотирующим транскрипцию.

[228] Термин "гетерологичный" или "экзогенный", применительно к полинуклеотиду или белку, относится к полинуклеотиду или белку, которые не встречаются в природе в указанной клетке, например, в клетке-хозяине. Предусматривается, что этот термин охватывает белки, которые кодируются природными генами, мутированными генами и/или синтетическими генами. Напротив, термин "гомологичный", применительно к полинуклеотиду или белку, относится к полинуклеотиду или белку, который в природных условиях присутствует в клетке.

[229] Если иное не определено в данном документе, то научные и технические термины, используемые в связи с данным изобретением, должны иметь значения, обычно используемые специалистами в данной области техники. Кроме того, если контекст не требует иного, термины в единственном числе включают множественное число, а термины во множественном числе включают единственное число. Способы и методики данного изобретения обычно осуществляются в соответствии с обычными способами, хорошо известными в данной области техники. Как правило, номенклатуры, используемые в связи с, и методы биохимии, энзимологии, молекулярной и клеточной биологии, микробиологии, генетики и химии белков и нуклеиновых кислот и гибридизации, описанные в данном документе, являются хорошо известными и широко используемыми в данной области техники. Способы и методики данного изобретения, как правило, осуществляются в соответствии с обычными способами, хорошо известными в

данной области техники, и как описано в различных общих и более узконаправленных ссылках, которые упоминаются и обсуждаются в данном описании, если не указано иное.

Продуцирование аминокислот, белков и других биологических питательных веществ с использованием энергии газообразных веществ и углеродных субстратов

[230] В некоторых вариантах реализации предусматриваются природные или сконструированные микроорганизмы, которые способны превращать генераторный газ или газовую смесь, содержащую H_2 и/или CO , и/или CO_2 , и/или CH_4 , например, H_2 и CO_2 , и/или CO и/или CH_4 , в аминокислоты, белки и другие биологические питательные вещества. В некоторых вариантах реализации предусматриваются природные или сконструированные микроорганизмы, которые способны превращать генераторный газ или газовую смесь, содержащую H_2 и/или CO , и/или CO_2 , и/или CH_4 , например, H_2 и CO_2 , и/или CO и/или CH_4 , в аминокислоты, белки, витамины и/или другие биологические питательные вещества. В некоторых вариантах реализации изобретения производится один или большее количество витаминов группы В, включая, без ограничений, один или большее количество из следующих: витамин В1, В2 и/или В12.

[231] В некоторых вариантах реализации предусматривается природный микроорганизм, способный расти на синтез-газе, и/или H_2 и CO_2 , и/или CO , и/или CH_4 , и/или на других отходящих газах, который способен продуцировать аминокислоты, белки, витамины, включая, без ограничений, витамины группы В и/или другие биологические питательные вещества с использованием указанных газов в качестве субстрата для роста.

[232] В некоторых вариантах реализации предусматривается способ получения аминокислот, белков и других биологических питательных веществ, включая, без ограничений, витамины, такие как, без ограничений, витамины группы В, путем объединения в биореакторе или растворе углеродсодержащего газа и природного или сконструированного штамма микроорганизма, который превращает углеродсодержащий газ, такой как синтез-газ, генераторный газ, CO_2 , монооксид углерода и их смеси, содержащие газообразный водород; H_2 и CO_2 , и/или CO , и/или CH_4 ; и/или соединения С1, газообразные или жидкие, включая, без ограничений, метанол или метан, в аминокислоты, белки и/или другие биологические питательные вещества, включая, без ограничений, витамины, такие как, без ограничений, витамины группы В.

[233] Генераторный газ, используемый в процессе, может поступать из источников, которые включают газификацию сырьевых отходов и/или сырья на основе остатков биомассы, или отработанные газы промышленных процессов, или реформинг

метансодержащих газов, включая, без ограничений, природный газ, биогаз, свалочный газ, трудноизвлекаемый природный газ и/или факельный природный газ.

[234] В некоторых вариантах реализации метан может быть конвертирован в аминокислоты, белки и/или другие биологические питательные вещества, включая, без ограничений, витамины, с использованием сконструированных или природных микроорганизмов и способов, описанных в данном документе.

Микроорганизмы

[235] В некоторых вариантах реализации микроорганизмы, используемые в описанных в данном документе способах, являются хемоавтотрофами. Хемоавтотрофы способны осуществлять хемосинтетические реакции, которые связывают CO₂ и/или другие формы неорганического углерода в органические соединения, используя для проведения реакции потенциальную энергию, хранящуюся в неорганических химических веществах, а не лучистую энергию света, как в микроорганизмах, осуществляющих фотосинтез [J. M. Shively, G. van Keulen, and W. G. Meijer, "Something from almost nothing: carbon dioxide fixation in chemoautotrophs" (1998) *Annual review of microbiology* 52:191-230 (<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.52.1.191>); A. J. Smith, J. London, and R. Y. Stanier" (1967) "Biochemical basis of obligate autotrophy in Blue-Green algae and thiobacilli" *Journal of Bacteriology* 94(4):972-983 (<http://jb.asm.org/content/94/4/972.abstract>); M. Hügler, C. O. Wirsen, G. Fuchs, C. D. Taylor, and S. M. Sievert (2005) "Evidence for autotrophic CO₂ fixation via the reductive tricarboxylic acid cycle by members of the ϵ subdivision of proteobacteria" *Journal of Bacteriology* 187(9):3020-3027 (<http://dx.doi.org/10.1128/jb.187.9.3020-3027.2005>); K. M. Scott and C. M. Cavanaugh (2007) "CO₂ uptake and fixation by endosymbiotic chemoautotrophs from the bivalve *solemya velum*" *Applied and Environmental Microbiology* 73(4):1174-1179 (<http://dx.doi.org/10.1128/aem.01817-06>)]. Биохимические пути фиксации углерода, которые протекают в хемоавтотрофах, включают восстановительный цикл трикарбоновых кислот и цикл Кальвина-Бенсона-Бассама [J. M. Shively, G., et al. (1998), выше] и путь Вуда-Льонгдаля [L. G. Ljungdahl (1986) "The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria" *Annual Review of Microbiology* 40(1):415-450 (<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.40.100186.002215>)].

[236] Также предусматриваются композиции, содержащие любой из микроорганизмов, описанных в данном документе (например, один или большее количество микроорганизмов, описанных в данном документе).

[237] В некоторых вариантах реализации указанный микроорганизм выбирают из рода *Hydrogenobacter*. В некоторых вариантах реализации указанный микроорганизм представляет собой *Hydrogenobacter thermophilus*. В некоторых вариантах реализации указанный микроорганизм содержит обратный цикл трикарбоновых кислот (rTCA), также известный как обратный цикл лимонной кислоты или обратный цикл Кребса. [Miura, A., Kameya, M., Arai, H., Ishii, M. & Igarashi, Y. (2008) "A soluble NADH-dependent fumarate reductase in the reductive tricarboxylic acid cycle of *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6" *J Bacteriol* 190, 7170-7177, doi:JB.00747-08 [pii] 10.1128/JB.00747-08; Shively, J. M., van Keulen, G. & Meijer, W. G. (1998) "Something from almost nothing: carbon dioxide fixation in chemoautotrophs" *Annu Rev Microbiol* 52:191-230, doi:10.1146/annurev.micro.52.1.191; включенные в данный документ посредством ссылок в полном объеме].

[238] В некоторых вариантах реализации микроорганизм представляет собой *Rhodococcus opacus* или *Rhodococcus jostii* или *Rhodococcus* sp. В некоторых неограничительных вариантах реализации микроорганизмом является *Rhodococcus opacus* DSM 43205, DSM 43206, DSM 44193, и/или *Rhodococcus* sp. DSM 3346.

[239] В некоторых вариантах реализации природный или сконструированный штамм включает, без ограничений, микроорганизмы, утилизирующие водород, включая, без ограничений, роды *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Ralstonia* или *Cupriavidus*. В некоторых вариантах реализации композиция содержит микроорганизм, который может в естественных условиях расти на H_2/CO_2 и/или синтез-газе, причем микроорганизм может естественным образом накапливать до 50% или более липидов от клеточной биомассы по массе. В некоторых вариантах реализации микроорганизмы обладают нативной способностью направлять высокий поток углерода по пути биосинтеза жирных кислот. В некоторых вариантах реализации микроорганизмом, проявляющим эти признаки, является *Rhodococcus opacus* (DSM 43205 или DSM 43206 или DSM 44193).

[240] В некоторых вариантах реализации микроорганизм относится к классу *Actinobacteria*, и не содержит экзогенных генов или одного или нескольких экзогенных генов. В некоторых вариантах реализации микроорганизм относится к классу *Actinobacteria* или семейству *Nocardiaceae*. В некоторых вариантах реализации микроорганизм представляет собой микроорганизм *Corynebacterium*, *Gordonia*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium* или *Tsukamurella*, не содержащий экзогенных генов или одного или нескольких экзогенных генов. В некоторых вариантах реализации микроорганизм семейства *Nocardiaceae* не содержит экзогенных генов или одного или нескольких экзогенных генов, причем микроорганизм не принадлежит к роду *Mycobacterium*. В некоторых вариантах реализации микроорганизм относится к роду

Rhodococcus и не содержит экзогенных генов или одного или нескольких экзогенных генов, а в некоторых вариантах реализации микроорганизм представляет собой штамм видов *Rhodococcus* sp., *Rhodococcus opacus*, *Rhodococcus aetherivorans*, *Rhodococcus aurantiacus*; *Rhodococcus baikonurensis*; *Rhodococcus boritolerans*; *Rhodococcus equi*; *Rhodococcus coprophilus*; *Rhodococcus corynebacterioides*; *Nocardia corynebacterioides* (синоним: *Nocardia corynebacterioides*); *Rhodococcus erythropolis*; *Rhodococcus fascians*; *Rhodococcus globerulus*; *Rhodococcus gordoniae*; *Rhodococcus jostii*; *Rhodococcus korensis*; *Rhodococcus kroppenstedtii*; *Rhodococcus maanshanensis*; *Rhodococcus marinonascens*; *Rhodococcus opacus*; *Rhodococcus percolatus*; *Rhodococcus phenolicus*; *Rhodococcus polyvorum*; *Rhodococcus pyridinivorans*; *Rhodococcus rhodochrous*; *Rhodococcus rhodnii*; (синоним: *Nocardia rhodnii*); *Rhodococcus ruber* (синоним: *Streptothrix rubra*); *Rhodococcus* sp. RHA1; *Rhodococcus triatoma*; *Rhodococcus tukisamuensis*; *Rhodococcus wratislaviensis* (синоним: *Tsukamurella wratislaviensis*); *Rhodococcus yunnanensis*; *Rhodococcus zopfii*. В некоторых вариантах реализации предусматривается микроорганизм *Rhodococcus*, который является неинфекционным или непатогенным для животных и/или растений и/или людей. В некоторых вариантах реализации микроорганизм представляет собой *Rhodococcus equi* или *Rhodococcus fascians*, который является неинфекционным для животных и/или растений. В некоторых вариантах реализации микроорганизм представляет собой штамм *Rhodococcus opacus* DSM № 43205 или 43206; или *Rhodococcus* sp. DSM № 3346. В некоторых вариантах реализации микроорганизм представляет собой *Rhodococcus*, который не является видом, выбранным из *Rhodococcus equi* и/или *Rhodococcus fascians*.

[241] В некоторых вариантах реализации микроорганизм относится к подотряду *Corynebacterineae* или семейству *Burkholderiaceae*. В некоторых вариантах реализации микроорганизм не является *E.coli*.

[242] В некоторых вариантах реализации микроорганизм, как описано в данном документе, не является патогенным для животных и/или растений и/или людей.

[243] В некоторых вариантах реализации микроорганизм, как описано в данном документе, может накапливать до более 60% белка от общей клеточной массы. В некоторых вариантах микроорганизм может накапливать белок до более 70% от общей клеточной массы. В некоторых вариантах микроорганизм может накапливать белок до более 80% от общей клеточной массы. В некоторых неограничительных вариантах реализации микроорганизм представляет собой *Cupriavidus necator* DSM № 531 или 541.

[244] В некоторых вариантах реализации микроорганизм, как описано в данном документе, может естественным образом расти на H_2/CO_2 и/или синтез-газе, и

микроорганизм может естественным образом накапливать полигидроксибутират (ПГБ) или полигидроксиалканоат (ПГА) до 50% или более от клеточной биомассы по массе. В некоторых вариантах реализации микроорганизм обладает нативной способностью направлять высокий поток углерода через метаболический промежуточный продукт ацетил-КоА, который может привести к биосинтезу жирных кислот, наряду с рядом других синтетических путей, включая синтез ПГА и ПГБ, а также аминокислот. В некоторых вариантах реализации микроорганизмом, проявляющим эти признаки, является *Cupriavidus necator* (DSM 531 или DSM 541).

[245] В некоторых неограничительных вариантах реализации природный или сконструированный штамм микроорганизма представляет собой *Corynebacterium autotrophicum*. В некоторых неограничительных вариантах реализации природный или сконструированный микроорганизм представляет собой *Corynebacterium autotrophicum* и/или *Corynebacterium glutamicum*. В некоторых вариантах реализации микроорганизм представляет собой *Hydrogenovibrio marinus*. В некоторых вариантах реализации микроорганизм представляет собой *Rhodopseudomonas capsulata*, *Rhodopseudomonas palustris* или *Rhodobacter sphaeroides*.

[246] В некоторых вариантах реализации микроорганизм представляет собой оксигенородный или водородокисляющий (knallgas) штамм. В некоторых вариантах реализации микроорганизмы или композиция, включающая микроорганизмы, содержит один или большее количество из следующих водородокисляющих микроорганизмов: *Aquifex pyrophilus*, *Aquifex aeolicus* или другие *Aquifex* sp.; *Cupriavidus necator* или *Cupriavidus metallidurans* или другие *Cupriavidus* sp.; *Corynebacterium autotrophicum* или другие *Corynebacterium* sp.; *Gordonia desulfuricans*, *Gordonia polyisoprenivorans*, *Gordonia rubripertincta*, *Gordonia hydrophobica*, *Gordonia westfalica* или другие *Gordonia* sp.; *Nocardia autotrophica*, *Nocardia opaca* или другие *Nocardia* sp.; пурпурные несерные фотосинтезирующие бактерии, включая, без ограничений, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodopseudomonas capsulata*, *Rhodopseudomonas viridis*, *Rhodopseudomonas sulfoviridis*, *Rhodopseudomonas blastica*, *Rhodopseudomonas spheroides*, *Rhodopseudomonas acidophila*, или другие *Rhodopseudomonas* sp.; *Rhodobacter* sp., *Rhodospirillum rubrum* или другие *Rhodospirillum* sp.; *Rhodococcus opacus* или другие *Rhodococcus* sp.; *Rhizobium japonicum* или другие *Rhizobium* sp.; *Thiocapsa roseopersicina* или другие *Thiocapsa* sp.; *Pseudomonas facilis*, *Pseudomonas flava*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas hydrogenovora*, *Pseudomonas hydrogenothermophila*, *Pseudomonas palleronii*, *Pseudomonas pseudoflava*, *Pseudomonas saccharophila*, *Pseudomonas thermophile* или другие *Pseudomonas* sp.; *Hydrogenomonas pantotropha*, *Hydrogenomonas eutropha*, *Hydrogenomonas*

facilis или другие *Hydrogenomonas* sp.; *Hydrogenobacter thermophiles*, *Hydrogenobacter halophilus*, *Hydrogenobacter hydrogenophilus* или другие *Hydrogenobacter* sp.; *Hydrogenophilus islandicus* или другие *Hydrogenophilus* sp.; *Hydrogenovibrio marinus* или другие *Hydrogenovibrio* sp.; *Hydrogenothermus marinus* или другие *Hydrogenothermus* sp.; *Helicobacter pylori* или другие *Helicobacter* sp.; *Xanthobacter autotrophicus*, *Xanthobacter flavus* или другие *Xanthobacter* sp.; *Hydrogenophaga flava*, *Hydrogenophaga palleronii*, *Hydrogenophaga pseudoflava* или другие *Hydrogenophaga* sp.; *Bradyrhizobium japonicum* или другие *Bradyrhizobium* sp.; *Ralstonia eutropha* или другие *Ralstonia* sp.; *Alcaligenes eutrophus*, *Alcaligenes facilis*, *Alcaligenes hydrophilus*, *Alcaligenes latus*, *Alcaligenes paradoxus*, *Alcaligenes ruhlandii* или другие *Alcaligenes* sp.; *Amycolata* sp.; *Aquaspirillum autotrophicum* или другие *Aquaspirillum* sp.; штамм *Arthrobacter* 11/X, *Arthrobacter methylotrophus* или другие *Arthrobacter* sp.; *Azospirillum lipoferum* или другие *Azospirillum* sp.; *Variovorax paradoxus* или другие *Variovorax* sp.; *Acidovorax facilis* или другие *Acidovorax* sp.; *Bacillus schlegelii*, *Bacillus tusciae*, другие *Bacillus* sp.; *Calderobacterium hydrogenophilum* или другие *Calderobacterium* sp.; *Derxia gummosa* или другие *Derxia* sp.; *Flavobacterium autothermophilum* или другие *Flavobacterium* sp.; *Microcyclus aquaticus* или другие *Microcyclus* sp.; *Mycobacterium gordoniae* или другие *Mycobacterium* sp.; *Paracoccus denitrificans* или другие *Paracoccus* sp.; *Persephonella marina*, *Persephonella guaymasensis* или другие *Persephonella* sp.; *Renobacter vacuolatum* или другие *Renobacter* sp.; *Seliberia carboxydohydrogena* или другие *Seliberia* sp.; *Streptomyces coelicoflavus*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces xanthochromogenes*, *Streptomyces thermocarboxydus* и другие *Streptomyces* sp.; *Thermocrinis ruber* или другие *Thermocrinis* sp.; *Wautersia* sp.; цианобактерии, включая, без ограничений, *Anabaena oscillarioides*, *Anabaena spiroides*, *Anabaena cylindrica* или другие *Anabaena* sp., и *Arthrospira platensis*, *Arthrospira maxima* или другие *Arthrospira* sp.; зеленые водоросли, включая, без ограничений, *Scenedesmus obliquus* или другие *Scenedesmus* sp., *Chlamydomonas reinhardtii* или другие *Chlamydomonas* sp., *Ankistrodesmus* sp., и *Rhaphidium polymorphium* или другие *Rhaphidium* sp.; а также консорциум микроорганизмов, который включает оксигенородные микроорганизмы.

[247] В некоторых неограничительных вариантах реализации предусматриваются композиции, включающие, и способы использования хемоавтотрофного метаболизма, для получения АТФ для поддержки АТФ-потребляющих биосинтетических реакций и поддержания клеток, без копродукции метана или короткоцепочечных органических кислот, таких как уксусная или масляная кислота, посредством энергозапасующих реакций для получения АТФ, в которых используются неорганические доноры электронов и акцепторы электронов, включая, без ограничений, оксигенородную реакцию.

[248] Был охарактеризован ряд различных микроорганизмов, способных расти на монооксиде углерода в качестве донора электронов и/или источника углерода (т.е. карбоксидотрофных микроорганизмов). В некоторых случаях карбоксидотрофные микроорганизмы могут также использовать H_2 в качестве донора электронов и/или расти миксотрофно. В некоторых случаях карбоксидотрофные микроорганизмы являются факультативными хемолитоавтотрофами [Biology of the Prokaryotes, edited by J Lengeler, G. Drews, H. Schlegel, John Wiley & Sons, Jul 10, 2009, включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме]. В некоторых вариантах реализации микроорганизмы или композиции, включающие микроорганизмы, содержат один или большее количество из следующих карбоксидотрофных микроорганизмов: *Acinetobacter* sp.; *Alcaligenes carboxydus* или другие *Alcaligenes* sp.; *Arthrobacter* sp.; *Azomonas* sp.; *Azotobacter* sp.; *Bacillus schlegelii* или другие *Bacillus* sp.; *Hydrogenophaga pseudoflava* или другие *Hydrogenophaga* sp.; *Pseudomonas carboxydohydrogena*, *Pseudomonas carboxydovorans*, *Pseudomonas compransoris*, *Pseudomonas gazotropha*, *Pseudomonas thermocarboxydovorans*, или другие *Pseudomonas* sp.; *Rhizobium japonicum* или другие *Rhizobium* sp.; и *Streptomyces* G26, *Streptomyces thermoautotrophicus* или другие *Streptomyces* sp. В определенных вариантах реализации используется карбоксидотрофный микроорганизм. В определенных вариантах реализации используется карбоксидотрофный микроорганизм, способный к хемолитоавтотрофии. В некоторых вариантах реализации используется карбоксидотрофный микроорганизм, способный использовать H_2 в качестве донора электронов при дыхании и/или биосинтезе.

[249] В некоторых вариантах реализации предусматриваются микроорганизмы, которые способны расти на синтез-газе в качестве единственного донора электронов, источника атомов водорода и источника углерода.

[250] В некоторых вариантах реализации микроорганизмы или композиции, содержащие микроорганизмы, включают облигатные и/или факультативные хемоавтотрофные микроорганизмы, включая один или большее количество из следующих: *Acetoanaerobium* sp.; *Acetobacterium* sp.; *Acetogenium* sp.; *Achromobacter* sp.; *Acidianus* sp.; *Acinetobacter* sp.; *Actinomadura* sp.; *Aeromonas* sp.; *Alcaligenes* sp.; *Alcaligenes* sp.; *Aquaspirillum* sp.; *Arcobacter* sp.; *Aureobacterium* sp.; *Bacillus* sp.; *Beggiatoa* sp.; *Butyribacterium* sp.; *Carboxydotherrmus* sp.; *Clostridium* sp.; *Comamonas* sp.; *Dehalobacter* sp.; *Dehalococcoide* sp.; *Dehalospirillum* sp.; *Desulfobacterium* sp.; *Desulfomonile* sp.; *Desulfotomaculum* sp. *Desulfovibrio* sp.; *Desulfurosarcina* sp.; *Ectothiorhodospira* sp.; *Enterobacter* sp.; *Eubacterium* sp.; *Ferropasma* sp.; *Halothibacillus* sp.; *Hydrogenobacter* sp.; *Hydrogenomonas* sp.; *Leptospirillum* sp.; *Metallosphaera* sp.; *Methanobacterium* sp.;

Methanobrevibacter sp.; Methanococcus sp.; Methanococcoides sp.; Methanogenium sp.; Methanolobus sp.; Methanomicrobium sp.; Methanoplanus sp.; Methanosarcina sp.; Methanospirillum sp.; Methanothermus sp.; Methanotherix sp.; Micrococcus sp.; Nitrobacter sp.; Nitrobacteraceae sp., Nitrococcus sp., Nitrosococcus sp.; Nitrospina sp., Nitrospira sp., Nitrosolobus sp.; Nitrosomonas sp.; Nitrosospira sp.; Nitrosovibrio sp.; Nitrospina sp.; Oleomonas sp.; Paracoccus sp.; Peptostreptococcus sp.; Planctomycetes sp.; Pseudomonas sp.; Ralstonia sp.; Rhodobacter sp.; Rhodococcus sp.; Rhodocyclus sp.; Rhodomicrobium sp.; Rhodopseudomonas sp.; Rhodospirillum sp.; Shewanella sp.; Siderococcus sp.; Streptomyces sp.; Sulfobacillus sp.; Sulfolobus sp.; Thermothrix sp., Thiobacillus sp.; Thiomicrospira sp.; Thioploca sp.; Thiosphaera sp.; Thiothrix sp.; Thiovulum sp.; сероокисляющих; водородокисляющих; железоокисляющих; ацетогенов; и метаногенов; консорциумов микроорганизмов, которые включают хемоавтотрофы; хемоавтотрофы, нативные для по меньшей мере одного из гидротермальных источников, геотермальных источников, горячих источников, выходов холодной воды, подземных водоносных горизонтов, соленых озер, соленосных формаций, шахт, дренажа кислых шахт, шахтных отходов, нефтяных скважин, сточных вод нефтеперерабатывающих заводов, угольных пластов глубокого залегания; очистных сооружений сточных вод и канализации; геотермальных электростанций, полей сольфатара (sulfatara) и почв; и экстремофилов, выбранных из одного или нескольких термофилов, гипертермофилов, ацидофилов, галофилов и психрофилов.

[251] В некоторых вариантах реализации предусматриваются микроорганизмы, которые представляют собой экстремофилы, способные выдерживать экстремальные значения различных параметров окружающей среды, таких как температура, радиация, давление, сила тяжести, вакуум, высыхание, соленость, pH, напряжение кислорода и химические вещества. Они включают гипертермофилы, такие как *Pyrolobus fumarii*; термофилы, такие как *Synechococcus lividis*; мезофилы и психрофилы, такие как *Psychrobacter*, и/или чрезвычайно термофильные метаболизаторы серы, такие как *Thermoproteus* sp., *Pyrodictium* sp., *Sulfolobus* sp. и *Acidianus* sp.; радиационно-устойчивые организмы, такие как *Deinococcus radiodurans*; устойчивые к давлению организмы, включая пьезофилы или барофилы; устойчивые к обезвоживанию и ангидробиотические организмы, включая ксерофилы, такие как *Artemia salina*; микробы и грибки; солеустойчивые организмы, включая галофилы, такие как *Halobacteriaceae* и *Dunaliella salina*; толерантные к pH организмы, включая алкалофилы, такие как *Natronobacterium*, *Bacillus firmus* OF4, *Spirulina* spp., и ацидофилы, такие как *Cyanidium caldarium* и *Ferroplasma* sp.; газоустойчивые организмы, которые переносят чистый CO₂, включая

Cyanidium caldarium; и толерантные к металлам организмы, включая металлотолеранты, такие как *Ferroplasma acidarmanus* и *Ralstonia* sp.

[252] В определенных вариантах реализации микроорганизмы, представленные в данном документе, включают клеточную линию, выбранную из эукариотических растений, водорослей, цианобактерий, зеленых серобактерий, зеленых несерных бактерий, пурпурных серобактерий, пурпурных несерных бактерий, экстремофилов, дрожжей, грибов, протеобактерий, их сконструированных организмов и синтетических организмов. В определенных вариантах реализации используется спирулина (*Spirulina*).

[253] В некоторых вариантах реализации используются зеленые несерные бактерии, которые включают, без ограничений, следующие роды: *Chloroflexus*, *Chloronema*, *Oscillochloris*, *Heliobacterium*, *Herpetosiphon*, *Roseiflexus* и *Thermomicrobium*.

[254] В некоторых вариантах реализации используются зеленые серобактерии, которые включают, без ограничений, следующие роды: *Chlorobium*, *Clathrochloris* и *Prosthecochloris*.

[255] В некоторых вариантах реализации используются пурпурные серобактерии, которые включают, без ограничений, следующие роды: *Allochrochromatium*, *CChromatium*, *Halochromatium*, *Isochromatium*, *Marichromatium*, *Rhodovulum*, *Thermochromatium*, *Thiocapsa*, *Thiorhodococcus* и *Thiocystis*.

[256] В некоторых вариантах реализации используются пурпурные несерные бактерии, которые включают, без ограничений, следующие роды: *haeospirillum*, *Rhodobaca*, *Rhodobacter*, *Rhodomicrobium*, *Rhodopila*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodothalassium*, *Rhodospirillum*, *Rhodovibrio* и *Roseospira*.

[257] В некоторых вариантах реализации микроорганизм представляет собой метанотроф и/или метилотроф. В некоторых вариантах реализации микроорганизм принадлежит к роду *Methylococcus*. В некоторых вариантах реализации микроорганизм представляет собой *Methylococcus capsulatus*. В некоторых вариантах реализации микроорганизм является метилотрофом. В некоторых вариантах реализации микроорганизм принадлежит к роду *Methylobacterium*. В некоторых вариантах реализации микроорганизм выбирают из одного или нескольких из следующих видов: *Methylobacterium zatmanii*; *Methylobacterium extorquens*; *Methylobacterium chloromethanicum*. В некоторых вариантах реализации предусматриваются композиции, в которых микроорганизм представляет собой водородокисляющий хемоавтотроф и/или карбоксидотроф, и/или метилотроф, и/или метанотроф.

[258] В определенных вариантах реализации микроорганизмы представляют собой встречающиеся в природе и/или генетически не модифицированные (не-ГМО)

микроорганизмы и/или являются непатогенными и/или зависят от определенных условий окружающей среды, обеспечиваемых биопроцессами, отсутствующими в окружающей среде.

[259] В определенных вариантах реализации микроорганизмы или консорциум микроорганизмов выделяют из образцов окружающей среды и обогащают желательными микроорганизмами, используя способы, известные в области микробиологии, посредством роста в присутствии целевых доноров электронов, включая, без ограничений, один или большее количество из водорода, CO, синтез-газа и/или метана, и акцепторы электронов, включая, без ограничений, один или большее количество из кислорода, нитрата, трехвалентного железа и/или CO₂, а также условия окружающей среды (например, температуру, pH, давление, растворенный кислород (DO), минерализацию, присутствие различных примесей и загрязнителей и т.д.).

[260] В некоторых вариантах реализации доноры электронов, используемые микроорганизмами в биосинтезе и/или дыхании, включают, без ограничений, один или большее количество следующих восстановителей: аммиак; аммоний; монооксид углерода; дитионит; элементную серу; водород; метабисульфиты; оксид азота; нитриты; сульфаты, такие как тиосульфаты, включая, без ограничений, тиосульфат натрия (Na₂S₂O₃) или тиосульфат кальция (CaS₂O₃); сульфиды, такие как сероводород; сульфиты; тионат; и тионит.

[261] В некоторых вариантах реализации микроорганизм способен продуцировать АТФ из неорганического донора электронов, такого как, без ограничений, H₂ и/или CO без синтеза метана или короткоцепочечных органических кислот, таких как, без ограничений, уксусная кислота и/или масляная кислота (короткоцепочечные органические кислоты, содержащие углеродные цепи длиной от двух до четырех атомов углерода). В некоторых неограничительных вариантах реализации микроорганизм продуцирует АТФ из неорганического донора электронов, такого как, без ограничений, H₂ и/или CO, связывающегося при дыхании с акцептором электронов, отличным от CO₂. В некоторых таких вариантах реализации акцептор электронов является более сильным акцептором электронов, чем CO₂, в том смысле, что он имеет более отрицательное значение свободной энергии Гиббса реакции с донором электронов, используемым при дыхании.

[262] В некоторых вариантах реализации микроорганизм способен превращать синтез-газ и/или газообразный CO₂, и/или смесь газообразного CO₂ и газообразного H₂, и/или CO, и/или CH₄, в одно или несколько органических соединений, при этом метан составляет менее 10% от массы органических соединений, продуцируемых микроорганизмом. В некоторых вариантах реализации микроорганизм способен

превращать синтез-газ и/или газообразный CO_2 , и/или смесь газообразного CO_2 и газообразного H_2 , и/или CO , и/или CH_4 , в одно или несколько органических соединений, при этом менее 10% от массы полученных органических соединений составляют свободные органические кислоты (т.е. не включенные в полимер) и/или соли свободных органических кислот, имеющие длину углеродной цепи четыре атома углерода или менее, за исключением аминокислот. В некоторых вариантах реализации микроорганизм способен превращать синтез-газ и/или газообразный CO_2 и/или смесь газообразного CO_2 и газообразного H_2 , и/или CO , и/или CH_4 , в одно или несколько органических соединений, при этом менее 10% от массы полученных органических соединений составляют свободные органические кислоты (т.е. не включенные в полимер) и/или соли свободных органических кислот, имеющие длину углеродной цепи четыре атома углерода или менее, за исключением одной или нескольких из следующих аминокислот: аланин; треонин; серин; глицин, аспарагин; аспарагиновая кислота; цистеин.

[263] В некоторых вариантах реализации используются водородокисляющие, и/или CO -окисляющие, и/или CH_4 -окисляющие микроорганизмы, которые используют более электроотрицательные акцепторы электронов в энергозапасующих реакциях получения АТФ, такие как, без ограничений, O_2 .

[264] В некоторых вариантах реализации микроорганизм способен расти на необработанном неочищенном глицерине, и/или глюкозе, и/или метаноле, и/или ацетате, в качестве единственного донора электронов и источника углерода. В некоторых вариантах реализации микроорганизм способен расти миксотрофно на органическом источнике углерода и использовать неорганический донор электронов или источник углерода.

[265] В определенных вариантах реализации микроорганизмы, представленные в данном документе, включают клеточную линию, выбранную из эукариотических растений, водорослей, цианобактерий, зеленых серобактерий, зеленых несерных бактерий, пурпурных серобактерий, пурпурных несерных бактерий, экстремофилов, дрожжей, грибов, протеобактерий, их сконструированных организмов и синтетических организмов.

[266] В некоторых неограничительных вариантах реализации микроорганизмов в данном документе отсутствует выявляемый ацидогенез, вызванный клеточным дыханием.

Микробные культуры

[267] Жидкие культуры, используемые для выращивания клеток микроорганизмов, описанных в данном документе, могут быть помещены в культуральные сосуды, известные и используемые в данной области. В некоторых вариантах реализации крупномасштабное производство в сосуде биореактора может

использоваться для производства больших количеств желаемой молекулы и/или биомассы.

[268] В определенных вариантах реализации сосуда биореактора используются для размещения, выделения и/или защиты культуральной среды. Например, культуральные сосуды могут использоваться в некоторых неограничительных вариантах реализации для получения органических соединений, включая, без ограничений, одно или несколько из следующих: аминокислоты; пептиды; белки; витамины, такие как, без ограничений, витамины B1, B2 и B12; и/или другие питательные вещества. Культуральные сосуды известны специалистам в области крупномасштабного микробного культивирования. Такие сосуды для культивирования включают, без ограничений, один или большее количество из следующих: аэролифтные реакторы; колонны биологических скрубберов; барботажные колонны; реакторы с механическим перемешиванием; реакторы с непрерывным перемешиванием; противоточные реакторы с восходящим потоком с расширяющимся слоем; реакторы для ферментативного разложения и, в частности, системы реакторов ферментативного разложения, такие как известные из предшествующего уровня техники для очистки канализационных и сточных вод или биоремедиации; фильтры, включая, без ограничений, капельные фильтры, вращающиеся фильтры для биологического осветления, вращающиеся диски, почвенные фильтры; реакторы с псевдооживленным слоем; газлифтные ферментеры; реакторы с иммобилизованными клетками; петлевые реакторы; мембранные биопленочные реакторы; баки с воздушным перемешиванием (*rachuca tanks*); реакторы со слоем носителя; реакторы с пульсирующим потоком; статические смесители; реакторы с орошаемым слоем; и/или вертикальные шахтные биореакторы.

[269] Микробное культивирование, предназначенное для промышленного продуцирование органических соединений и, в частности, аминокислот, пептидов, белков и других питательных веществ, обычно проводится в биореакторах в гораздо больших масштабах (например, с объемами биореакторов 500 л, 1000 л, 5000 л, 10000 л, 50000 л, 100000 л, 1000000 л и выше).

[270] В определенных вариантах реализации хемоавтотрофные и/или гетеротрофные, и/или карбоксидотрофные, и/или метанотрофные, и/или метилотрофные микроорганизмы выращивают в жидкой среде внутри биореактора с использованием способов, описанных в данном документе.

[271] В некоторых вариантах реализации биореактор, содержащий микроорганизмы, сконструирован из непрозрачных материалов, которые поддерживают культуру в почти или полной темноте. Биореакторы, изготовленные из непрозрачных

материалов, таких как сталь и/или другие металлические сплавы, и/или железобетон, и/или стекловолокно, и/или различные высокопрочные пластиковые материалы, могут быть спроектированы с большими рабочими объемами. В некоторых вариантах реализации используются ферментеры, изготовленные из стали или других металлических сплавов, имеющие объем 50000 литров и более. В некоторых вариантах реализации используются биореакторы, способные поддерживать избыточное давление в свободном пространстве по сравнению с окружающей средой. В некоторых вариантах реализации используются овалы или цилиндрические реакторы для ферментативного разложения или вертикальные шахтные биореакторы объемом 3000000 литров и более. В некоторых вариантах реализации биореактор, содержащий микроорганизм, не пропускает свет в часть или в большую часть находящегося в нем объема жидкости. В некоторых неограничительных вариантах реализации микроорганизм, используемый на стадии фиксации CO₂, не является фотосинтезирующим. В некоторых неограничительных вариантах реализации конструкция биореактора не ограничивает культуру тонкими слоями или имеет прозрачные стенки, чтобы обеспечить доступ света ко всем частям, что обычно необходимо для фотосинтеза. В некоторых вариантах реализации микроорганизм культивируют без значительного или какого-либо воздействия света. В некоторых таких вариантах реализации чистое потребление CO₂ все еще наблюдается в отсутствие света из-за хемоавтотрофного метаболизма и условий. В некоторых вариантах реализации преобразование электричества в искусственный свет не требуется в биологической системе для связывания и преобразования CO₂.

[272] В определенных вариантах реализации отсутствие зависимости от света способствует непрерывным операциям связывания CO₂, днем и ночью, круглогодично, при любых погодных условиях без необходимости какого-либо искусственного освещения.

[273] В некоторых вариантах реализации микроорганизмы выращивают и поддерживают для производства аминокислот, или белков, или других питательных веществ, или продуктов из цельных клеток в среде, содержащей газообразный источник углерода, такой как, без ограничений, синтез-газ, генераторный газ, остаточный газ, газ пиролиза или смеси газообразных H₂ и CO₂, в отсутствие света; такой рост называется хемоавтотрофным ростом.

[274] В некоторых вариантах реализации увеличение производительности системы достигается вертикальным масштабированием, а не только горизонтальным масштабированием. Это отличается от фототрофных подходов с использованием водорослей, цианобактерий или высших растений для улавливания CO₂. Хотя для

фотосинтетических систем были предложены различные вертикальные схемы выращивания, практически и экономически, фототрофные системы должны расширяться горизонтально, например, в мелких водоемах или фотобиореакторах в случае водорослей. Это приводит к большим географическим занимаемым площадям и большому количеству негативных воздействий на окружающую среду.

[275] Система водорослей или высших растений, выращиваемая с использованием искусственного освещения, сталкивается с проблемой неэффективного использования энергии света и неэффективного преобразования электрической энергии в световую. В некоторых вариантах реализации, сопоставимые культуры водорослей или высших растений, выращиваемые при искусственном освещении, будут требовать больше электрической энергии, чем системы связывания CO_2 и/или производства биомассы, описанные в данном документе, с точки зрения связывания CO_2 и/или производства биомассы. В некоторых вариантах реализации, сопоставимые культуры водорослей или высших растений, выращиваемые при искусственном освещении, будут требовать, по крайней мере, в десять раз больше электроэнергии, чем системы связывания CO_2 и/или производства биомассы, описанные в данном документе, по показателю мощности на единицу связанного CO_2 и/или произведенной биомассы. Для водорослей или высших растений, выращиваемых при искусственном освещении, требуется отвод тепла, почти прямо пропорциональный потребляемой электроэнергии. В определенных вариантах реализации способов, описанных в данном документе, требования к отводу тепла ниже, чем для сопоставимой системы водорослей или высших растений при выращивании на искусственном освещении, в пересчете на показатели связывания CO_2 и/или производства биомассы. В некоторых вариантах реализации требования по отводу тепла по меньшей мере в десять раз ниже, чем для сопоставимой системы водорослей или высших растений, в пересчете на показатели связывания CO_2 и/или производства биомассы при выращивании на искусственном освещении.

[276] В типичном, но не ограничивающем варианте реализации биореактор, содержащий питательную среду, инокулируют клетками-продуцентами. Как правило, перед тем, как клетки начинают удваиваться, наблюдается фаза задержки. После лаг-фазы время удвоения клеток уменьшается, и культура переходит в логарифмическую фазу. За логарифмической фазой в конечном итоге следует увеличение времени удвоения, которое, без намерения ограничиваться теорией, считают результатом либо ограничения массопереноса, истощения питательных веществ, включая источники азота или минеральных веществ, либо повышения концентрации ингибирующих химических веществ, или массовых коммуникационных взаимодействий (quorum sensing) микробов.

Рост замедляется, а затем прекращается, когда культура вступает в стационарную фазу. В некоторых вариантах реализации существует арифметическая фаза роста, предшествующая стационарной фазе. Для сбора клеточной массы, культуру в определенных вариантах реализации собирают в логарифмической фазе и/или в арифметической фазе и/или в стационарной фазе.

[277] Биореактор или ферментер используется для культивирования клеток на протяжении различных фаз их физиологического цикла. Биореактор используется для культивирования клеток, которые могут поддерживаться на определенных фазах их кривой роста. Использование биореакторов выгодно во многих отношениях при культивировании хемоавтотрофного роста. В некоторых вариантах реализации клеточную массу с высоким содержанием белка, которая используется для получения белков или гидролизатов белка, выращивают до высокой плотности в жидкой суспензии. Обычно, в биореакторе облегчен контроль условий роста, включая контроль растворенных диоксида углерода, кислорода и других газов, таких как водород, а также других растворенных питательных веществ, микроэлементов, температуры и рН. Для некоторых вариантов реализации богатую белком клеточную массу, которая используется для получения аминокислот, пептидов, белков, гидролизатов, экстрактов или цельноклеточных продуктов, выращивают до высоких плотностей и/или выращивают с высокой производительностью в жидкой суспензии в биореакторе.

[278] Питательные среды, а также газы могут добавляться в биореактор либо порционно, или периодически, либо в ответ на детектируемое истощение или запрограммированное заданное значение, либо непрерывно на протяжении периода выращивания и/или поддержания культуры. Для некоторых вариантов реализации биореактор при инокуляции наполняют начальной порцией питательной среды и/или одним или несколькими газами в начале роста, и после инокуляции никакие дополнительные питательные среды и/или один или большее количество газов не добавляются. В определенных вариантах реализации питательные среды и/или один или большее количество газов периодически добавляют после инокуляции. Для некоторых вариантов реализации питательную среду и/или один или большее количество газов добавляют после инокуляции в ответ на детектируемое истощение питательного вещества и/или газа. Для определенных вариантов реализации питательные среды и/или один или большее количество газов непрерывно добавляют после инокуляции.

[279] Для определенных вариантов реализации добавленная питательная среда не содержит никаких органических соединений.

[280] В определенных вариантах реализации небольшое количество клеток микроорганизмов (т.е. инокулят) добавляют к заданному объему культуральной среды; затем культуру инкубируют; и клеточная масса проходит через латентную, экспоненциальную, замедляющуюся и стационарную фазы роста.

[281] В системах периодического культивирования условия (например, концентрация питательных веществ, pH и т.д.), в которых проводится культивация микроорганизма, обычно непрерывно изменяются на протяжении периода роста. В некоторых неограничительных вариантах реализации, чтобы избежать колеблющихся условий, присущих периодическим культурам, и улучшить общую продуктивность системы культивирования, микроорганизмы, используемые для продуцирования белка и/или витаминов и/или других питательных веществ, выращивают в системе непрерывной культуры, называемой хеостатом. В таких системах, культура может поддерживаться в постоянной экспоненциальной фазе роста путем подпитки свежей средой с постоянной скоростью $[F]$, при поддержании в то же время постоянного объема $[V]$ культуры. В некоторых вариантах реализации система непрерывной культуры обеспечивает культивирование клеток в условиях окружающей среды, которые остаются около постоянными. В некоторых вариантах реализации клетки поддерживают в постоянной экспоненциальной фазе посредством использования системы хеостата. В таком случае скорость разбавления (D) культуры равна скорости роста микроорганизма и определяется как: $D = F/V$. Скорость роста микроорганизма в непрерывной культуре может быть изменена путем изменения скорости разбавления. В некоторых вариантах реализации скорость роста микроорганизма изменяют путем изменения скорости разбавления. В некоторых неограничительных вариантах реализации клетки выращивают в хеостате при скорости разбавления около $0,2 \text{ ч}^{-1}$.

[282] В некоторых вариантах реализации инокуляцию культуры в биореактор осуществляют способами, включающими, без ограничений, перенос культуры из существующей культуры, населяющей другой биореактор, или инкубацию посевного материала, выращенного в инкубаторе. В некоторых вариантах реализации посевной материал штамма может транспортироваться и храниться в формах, включающих, без ограничений, порошок, жидкую, замороженную или лиофилизированную форму, а также любую другую пригодную форму, которая может быть общеизвестной специалистам в данной области техники. В некоторых неограничительных вариантах реализации резервные бактериальные культуры содержатся в метаболически неактивном, лиофилизированном состоянии до тех пор, пока они не потребуются для повторного запуска. В некоторых вариантах реализации при закладке культуры в очень большом

реакторе культуры выращивают и поддерживают в постепенно увеличивающихся сосудах промежуточного размера до инокуляции полноразмерного сосуда.

[283] В некоторых вариантах реализации биореакторы имеют механизмы, позволяющие перемешивать питательные среды, которые включают, без ограничений, одно или несколько из следующего: стержни магнитных мешалок, лопасти, крыльчатки или турбины; вращающиеся, качающиеся или поворачивающиеся сосуды; газлифтные устройства, барботирование; рециркуляцию бульона со дна контейнера в верхнюю часть по рециркуляционному трубопроводу, пропускание бульона через циркуляционные (loop) и/или статические смесители. Культуральные среды могут перемешиваться непрерывно или периодически.

[284] В некоторых вариантах реализации питательная среда, содержащая микроорганизмы, может удаляться из биореактора частично или полностью, периодически или непрерывно, и в некоторых вариантах реализации ее заменяют свежей бесклеточной средой для поддержания культуры клеток в фазе экспоненциального роста и/или для пополнения истощенных питательных веществ в питательной среде и/или удаления ингибирующих продуктов жизнедеятельности.

[285] Порты, которые являются стандартными в биореакторах, могут использоваться для подачи или отвода газов, жидкостей, твердых веществ и/или взвесей, в и/или из сосуда биореактора, содержащего микробы. Многие биореакторы имеют несколько портов различного назначения (например, порты для добавления среды, добавления газа, зондов для pH и DO (растворенного кислорода) и отбора проб), и определенный порт может использоваться для различных целей в ходе процесса ферментации. В качестве примера, порт может использоваться в одно время для добавления питательных сред в биореактор, а в другое время - для отбора проб. Предпочтительно многократные случаи использования порта отбора проб могут осуществляться без внесения загрязнений или инвазивных видов в среду роста. В порте отбора проб может предусматриваться клапан или другой исполнительный механизм, позволяющий управлять потоком пробы или непрерывным отбором проб. В некоторых вариантах реализации биореакторы оснащены, по меньшей мере, одним портом, пригодным для инокуляции культуры, который может дополнительно использоваться для других целей, включая добавление среды или газа. Порты биореактора позволяют контролировать состав и скорость потока газа в культуральную среду. Например, порты могут использоваться в качестве впускных отверстий биореактора для газов, через которые осуществляется закачивание газов.

[286] Для некоторых вариантов реализации газы, которые могут закачиваться в биореактор, включают, без ограничений, один или большее количество из следующих: синтез-газ, генераторный газ, пиролизный газ, газообразный водород, CO, CO₂, O₂, воздух, смеси воздух/CO₂, природный газ, биогаз, метан, аммиак, азот, благородные газы, такие как аргон, а также другие газы. В некоторых вариантах реализации CO₂, закачиваемый в систему, может поступать из источников, включающих, без ограничений: CO₂ от газификации органического вещества; CO₂ от прокаливания известняка, CaCO₃, для получения негашеной извести, CaO; CO₂ парового риформинга метана, такой как CO₂, представляющий собой побочный продукт производства аммиака, метанола или водорода; CO₂ от горения, прокаливания или сжигания на факеле; CO₂, представляющий собой побочный продукт анаэробной или аэробной ферментации сахара; CO₂, представляющий собой побочный продукт метанотрофного биопроцесса; CO₂ от очистки сточных вод; CO₂, представляющий собой побочный продукт производства фосфата натрия; геологически или геотермально продуцируемый или выделяющийся CO₂; CO₂, удаляемый из кислого газа или природного газа. В некоторых неограничительных вариантах реализации CO₂ был удален из промышленного дымового газа или собран из геологического источника, который иначе естественным образом выбрасывает его в атмосферу. В определенных вариантах реализации источником углерода является CO₂ и/или бикарбонат и/или карбонат, растворенный в морской воде или других водоемах поверхностных или подземных вод. В некоторых таких вариантах реализации неорганический углерод может вводиться в биореактор растворенным в жидкой воде и/или в виде твердого вещества. В определенных вариантах реализации источником углерода является CO₂, улавливаемый из атмосферы. В некоторых неограничительных вариантах реализации CO₂ улавливается из закрытой кабины как часть системы жизнеобеспечения с замкнутым контуром, с использованием оборудования, такого как, без ограничений, узел удаления CO₂ (CDRA), используемый, например, на международной космической станции (МКС).

[287] В некоторых неограничительных вариантах реализации геологические особенности, такие как, без ограничений, геотермальные и/или гидротермальные источники, которые испускают высокие концентрации источников энергии (например, газообразные H₂, H₂S, CO) и/или источники углерода (например, CO₂, HCO₃⁻, CO₃²⁻) и/или другие растворенные минералы, могут быть использованы в качестве источников питательных веществ для микроорганизмов по данному изобретению.

[288] В определенных вариантах реализации один или большее количество газов в дополнение к диоксиду углерода, или вместо диоксида углерода в качестве альтернативного источника углерода, либо растворяют в растворе и подают в

культуральный бульон и/или растворяют непосредственно в культуральном бульоне, включая, без ограничений, газообразные доноры электронов и/или источники углерода (например, газообразные водород и/или СО и/или метан). В некоторых вариантах входящие газы могут включать другие доноры электронов и/или акцепторы электронов и/или источники углерода и/или минеральные питательные вещества, такие как, без ограничений, другие газовые составляющие и примеси синтез-газа (например, углеводороды); аммиак; сероводород; и/или другие кислые газы; и/или O_2 ; и/или минеральные частицы и золу.

[289] В определенных вариантах реализации один или большее количество газов растворяют в культуральном бульоне, включая, без ограничений, газообразные доноры электронов, такие как, без ограничений, один или большее количество из следующих: водород, монооксид углерода, метан, сероводород или другие кислые газы; источники газообразного углерода, такие как, без ограничений, один или большее количество из следующих: CO_2 , СО, CH_4 ; и акцепторы электронов, такие как, без ограничений, кислород, либо в составе воздуха (например, 20,9% кислорода), либо в виде чистого O_2 , либо в виде газа, обогащенного O_2 . В некоторых вариантах реализации растворение этих и других газов в растворе достигается с использованием системы компрессоров, расходомеров и клапанов подачи, известных специалисту в области инженерной ферментации, которые осуществляют подачу в одну из нескольких следующих широко используемых систем для диспергирования газа в растворе: барботажное оборудование; диффузоры, включая, без ограничений, куполообразную, трубчатую, дисковую или кольцевую геометрии; аэраторы с крупными или мелкими пузырьками; оборудование, использующее эффект Вентури. В определенных вариантах реализации поверхностная аэрация и/или массообмен могут также осуществляться с использованием лопастных аэраторов и т.п. В некоторых вариантах реализации растворение газа усиливается механическим перемешиванием лопастным колесом или турбиной, а также с помощью гидравлических устройств со сдвиговыми нагрузками для уменьшения размера пузырьков. После прохождения через реакторную систему, содержащую микроорганизмы, которые поглощают газы, в некоторых вариантах реализации остаточные газы могут быть либо рециркулированы обратно в биореактор, либо сжигаться для получения технологического тепла, либо сжигаться на факелах, либо закачиваться под землю, либо выбрасываться в атмосферу. В некоторых вариантах реализации данного изобретения, использующих H_2 в качестве донора электронов, H_2 может подаваться в сосуд для культивирования либо путем барботирования его через культуральную среду, либо путем диффузии через проницаемую для водорода и непроницаемую для воды

мембрану, известную в данной области техники, которая находится на поверхности раздела с жидкой культуральной средой.

[290] В определенных вариантах реализации микроорганизмы растут и размножаются на H_2 и CO_2 и других растворенных питательных веществах в микроаэробных условиях. В некоторых вариантах реализации химическое вещество C1, такое как, без ограничений, окись углерода, метан, метанол, формиат или муравьиная кислота и/или смеси, содержащие химические вещества C1, включая, без ограничений, различные композиции синтез-газа, полученные из различного газифицированного, пиролизованного или подвергнутого паровому риформингу сырья, содержащего связанный углерод, биохимически преобразуется в более длинноцепочечные органические химические вещества (т.е., молекулы с углеродной цепью C2 или длиннее и, в некоторых вариантах реализации, C5 или длиннее) в одних или нескольких из следующих условий: аэробные, микроаэробные, бескислородные, анаэробные и/или факультативные условия.

[291] В некоторых вариантах реализации в культуральном бульоне также может поддерживаться контролируемое количество кислорода, и в некоторых вариантах кислород будет активно растворяться в растворе, подаваемом в культуральный бульон, и/или непосредственно растворяться в культуральном бульоне. В определенных аэробных или микроаэробных вариантах реализации, которые требуют закачки воздуха или кислорода в культуральный бульон для поддержания заданных уровней растворенного кислорода (DO), в бульон могут вводиться пузырьки кислорода с диаметром, оптимальным для смешивания и переноса кислорода.

[292] В некоторых вариантах реализации микроорганизмы превращают топливный газ, включая, без ограничений, синтез-газ, генераторный газ, пиролизный газ, биогаз, хвостовой газ, дымовые газы, CO, CO_2 , H_2 , природный газ, метан и их смеси. В некоторых вариантах реализации теплосодержание топливного газа составляет, по меньшей мере, 100 БТЕ на стандартный кубический фут (scf) (3726 кДж/м^3). В некоторых вариантах реализации биореактор, который используется для содержания и выращивания микроорганизмов, снабжен мелкопузырьковыми диффузорами и/или лопастными колесами с высоким сдвиговым усилием для подачи газа.

[293] Введение и/или повышение скорости потока газа в биореактор может усиливать перемешивание культуры и вызывать турбулентность, если впускное отверстие газа расположено под поверхностью жидкой среды, так что газ пузырьками или барботируемыми пузырьками поднимается через среду. В некоторых вариантах реализации смешивание усиливается за счет турбулентности, создаваемой пузырьками газа и/или

барботированием и/или газовыми пробками (plugging up) при прохождении газа через жидкие среды. В некоторых вариантах реализации биореактор имеет выпускные отверстия для выхода газа и сброса давления. В некоторых вариантах реализации выпускные и выпускные отверстия для газа предпочтительно оснащены обратными клапанами для предотвращения обратного потока газа.

[294] В определенных вариантах реализации, где хемосинтетические реакции происходят внутри биореактора, один или большее количество типов доноров электронов и один или большее количество типов акцепторов электронов закачиваются насосами или иным образом добавляются либо в виде болюсного добавление, либо периодически, либо непрерывно в питательную среду, содержащую хемоавтотрофные организмы в реакционном сосуде. Хемосинтетическая реакция, вызываемая переносом электронов от донора электронов к акцептору электронов при клеточном дыхании, связывает неорганический диоксид углерода и/или другие растворенные карбонаты и/или другие оксиды углерода в органические соединения и биомассу.

[295] В некоторых вариантах реализации для роста и продуцирования культуры используют питательную среду, включающую водный раствор, содержащий пригодные минералы, соли, витамины, кофакторы, буферы и другие компоненты, необходимые для роста микроорганизмов, известные специалистам в данной области [Bailey and Ollis, Biochemical Engineering Fundamentals, 2nd ed; pp 383-384 and 620-622; McGraw-Hill: New York (1986)].

[296] В определенных вариантах реализации химические вещества, используемые для поддержания и роста микробных культур, известные в данной области, включены в состав питательных сред. В некоторых вариантах реализации эти химические вещества могут включать, без ограничений, одно или несколько из следующих: источники азота, такие как аммиак, аммоний (например, хлорид аммония (NH_4Cl), сульфат аммония ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)), нитрат (например, нитрат калия (KNO_3)), мочевины или источник органического азота; фосфат (например, динатрийфосфат (Na_2HPO_4), фосфат калия (KH_2PO_4), фосфорную кислоту (H_3PO_4), дитиофосфат калия ($\text{K}_3\text{PS}_2\text{O}_2$), ортофосфат калия (K_3PO_4)), дикалийфосфат (K_2HPO_4)); сульфат; дрожжевой экстракт; хелатное железо; калий (например, фосфат калия (KH_2PO_4), нитрат калия (KNO_3), йодид калия (KI), бромид калия (KBr)); и другие неорганические соли, минералы и микроэлементы (например, хлорид натрия (NaCl), сульфат магния ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) или хлорид магния (MgCl_2), хлорид кальция (CaCl_2) или карбонат кальция (CaCO_3), сульфат марганца ($\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) или хлорид марганца (MnCl_2), хлорид железа (FeCl_3), сульфат железа ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) или хлорид железа ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), бикарбонат натрия (NaHCO_3) или карбонат натрия (Na_2CO_3),

сульфат цинка ($ZnSO_4$) или хлорид цинка ($ZnCl_2$), молибдат аммония (NH_4MoO_4) или молибдат натрия ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$), сульфат меди ($CuSO_4$) или хлорида меди ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$), хлорид кобальта ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$), хлорид алюминия ($AlCl_3 \cdot 6H_2O$), хлорид лития ($LiCl$), борной кислоты (H_3BO_3), хлорид никеля ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$), хлорид олова ($SnCl_2 \cdot H_2O$), хлорид бария ($BaCl_2 \cdot 2H_2O$), селенат меди ($CuSeO_4 \cdot 5H_2O$) или селенит натрия (Na_2SeO_3), метаванадат натрия ($NaVO_3$), соли хрома). В некоторых вариантах реализации может быть использована среда с минеральными солями (MSM), разработанная Schlegel et al. ["Thermophilic bacteria", Jakob Kristjansson, Chapter 5, Section III, CRC Press, (1992)].

[297] Описанные в данном документе аспекты относятся к росту и/или экспрессии биопродуктов микроорганизмами (например, бактериальными клетками). Микроорганизмы (например, бактериальные клетки), описанные в данном документе, могут культивироваться в некоторых вариантах реализации в средах любого типа (богатых или минимальных), включая ферментационную среду и любого состава. Как будет понятно специалисту в данной области техники, рутинная оптимизация позволит использовать различные типы сред. Выбранная среда может быть дополнена различными дополнительными компонентами. Некоторые неограничительные примеры дополнительных компонентов включают глюкозу, антибиотики, IPTG (изопропилтиогалактозид) для индукции генов и добавку микроэлементов ATCC Trace Mineral Supplement. Аналогично, другие аспекты среды и условий роста микроорганизмов, описанные в данном документе, могут быть оптимизированы посредством рутинных экспериментов. Например, pH и температура являются неограничительными примерами факторов, которые можно оптимизировать. В некоторых вариантах реализации такие факторы, как выбор среды, добавок к среде и температуры, могут влиять на уровни продуцирования желаемой молекулы. В некоторых вариантах реализации концентрация и количество дополнительного компонента могут быть оптимизированы. В некоторых вариантах реализации оптимизируется частота пополнения среды одним или несколькими дополнительными компонентами и время, в течение которого среда культивируется до сбора желаемой молекулы.

[298] В некоторых вариантах реализации все патогенные микроорганизмы, присутствующие в исходном сырье, поступающем в процесс, уничтожаются посредством стадии или стадий газификации и/или пиролиза и/или сжигания, ведущих к одной или нескольким стадиям связывания и биоконверсии C1.

[299] В некоторых вариантах реализации концентрации питательных химических веществ (например, доноров электронов, акцепторов электронов, источников углерода и/или различных минеральных питательных веществ) поддерживаются в биореакторе

близкими к, или на соответствующих оптимальных уровнях, для оптимального поглощения и/или фиксации и/или конверсии углерода и/или продуцирования органических соединений, которые варьируются в зависимости от используемого микроорганизма, но является известным или может быть определено без чрезмерного экспериментирования специалистом в области культивирования микроорганизмов.

[300] В определенных вариантах реализации в биореакторе отслеживаются и/или контролируются один или большее количество из следующих параметров: уровни продуктов жизнедеятельности; pH; температура; минерализация; растворенный кислород; растворенный углекислый газ; скорости потока жидкости; скорость перемешивания; давление газа. В некоторых вариантах реализации рабочие параметры, влияющие на хемоавтотрофный рост, отслеживаются датчиками (например, датчиком растворенного кислорода или окислительно-восстановительным датчиком для измерения концентраций доноров/акцепторов электронов) и/или контролируются либо вручную, либо автоматически на основе сигналов обратной связи от датчиков путем использования оборудования, включая, без ограничений, приводные клапаны, насосы и мешалки. В некоторых вариантах реализации температура входящего бульона, а также поступающих газов регулируется такими системами, как, без ограничений, охладители, нагреватели и/или теплообменники.

[301] В некоторых вариантах реализации микробную культуру и биореакцию поддерживают с использованием непрерывного притока и удаления питательной среды и/или биомассы в установившемся режиме, причем популяцию клеток и параметры окружающей среды (например, плотность клеток, pH, растворенный кислород (DO), концентрации химических веществ) стремятся поддерживать на постоянном уровне с течением времени. В определенных вариантах реализации постоянный уровень является оптимальным уровнем для конверсии сырья и/или продуцирования целевых органических соединений. В некоторых вариантах реализации плотность клеток может контролироваться путем прямого отбора проб, корреляции оптической плотности с плотностью клеток и/или с помощью анализатора размера частиц. В некоторых вариантах реализации времена гидравлического удержания и удержания биомассы могут быть разделены, чтобы обеспечить возможность независимого контроля как химического состава бульона, так и плотности клеток. В некоторых вариантах реализации скорости разбавления могут поддерживаться достаточно высокими, так чтобы время гидравлического удержания было относительно низким по сравнению со временем удерживания биомассы, что приводит к получению сильно пополненного бульона для роста клеток и/или конверсии исходного сырья и/или продуцирования органических

соединений. В некоторых вариантах реализации скорости разбавления устанавливаются при оптимальном технико-экономическом компромиссе между пополнением культурального бульона и питательных веществ и/или удалением отходов, и повышенными технологическими затратами на перекачивание, повышенным расходом вводимых материалов и другими требованиями, которые возрастают с увеличением степени разбавления.

[302] В определенных вариантах реализации контролируется pH микробной культуры. В некоторых вариантах реализации pH регулируется в оптимальном диапазоне значений для поддержания и/или роста микробов и/или конверсии исходного сырья и/или продуцирования органических соединений и/или выживания. Чтобы решить проблему снижения pH, в некоторых вариантах реализации может осуществляться этап нейтрализации непосредственно в среде биореактора или перед рециркуляцией среды обратно в сосуд для культивирования через контур рециркуляции. Нейтрализация кислоты в бульоне в определенных вариантах реализации может быть достигнута путем добавления оснований, включая, без ограничений, одно или несколько из следующих: известняк, известь, гидроксид натрия, аммиак, гидроксид аммония, едкий калий, оксид магния, оксид железа, щелочная зола.

[303] В некоторых вариантах реализации водная суспензия хемоавтотрофных микроорганизмов превращает один или большее количество доноров электронов и CO_2 в протоплазму. В некоторых вариантах реализации водная суспензия водородокисляющих микроорганизмов может быть использована для превращения водорода и диоксида углерода в микробную протоплазму. В определенных вариантах реализации водную суспензию окисляющих окись углерода микроорганизмов можно использовать для превращения окиси углерода и водорода и/или воды в протоплазму. В определенных вариантах реализации водная суспензия метаноокисляющих микроорганизмов может быть использована для превращения метана в протоплазму. В определенных вариантах реализации микроорганизм в суспензии представляет собой бактерию или архебактерию (archaeon). В некоторых неограничительных вариантах реализации водная суспензия или биопленка H_2 -окисляющих хемоавтотрофных микроорганизмов превращает H_2 и CO_2 , вместе с некоторыми другими растворенными минеральными питательными веществами, в биохимические вещества и протоплазму. В определенных вариантах реализации другие растворенные минеральные питательные вещества включают, без ограничений, источник азота, источник фосфора и источник калия. В определенных вариантах реализации продуцируемая протоплазма имеет пищевую ценность для людей и/или других животных и/или других гетеротрофов. В определенных вариантах реализации из протоплазмы и/или

внеклеточного бульона могут быть извлечены определенные биохимические вещества, которые имеют питательную ценность и/или ценность в различных областях органической химии или для применения в качестве топлива. В некоторых вариантах реализации внутриклеточную энергию для осуществления продуцирования протоплазмы получают от окисления донора электронов акцептором электронов. В некоторых неограничительных вариантах реализации донор электронов включает, без ограничений, что-то одно или несколько из следующих: H_2 ; CO ; CH_4 . В некоторых неограничительных вариантах реализации акцептор электронов включает, без ограничений, O_2 и/или CO_2 . В некоторых неограничительных вариантах реализации продукт реакции генерации энергии или дыхания включает, без ограничений, воду. В некоторых вариантах реализации полученная от дыхания внутриклеточная энергия, используемая для осуществления такого синтеза биохимических веществ и протоплазмы из CO_2 , накапливается и переносится в биохимических молекулах, включая, без ограничений, АТФ. Для водородокисляющих (knallgas) микробов, используемых в некоторых вариантах реализации, акцептором электронов является O_2 , а продуктом дыхания является вода.

[304] В некоторых вариантах реализации продуцирование белка и распределение полученных аминокислотных молекул оптимизируют посредством одного или нескольких из следующего: контроль условий биореактора, контроль уровней питательных веществ и/или генетических модификаций клеток. В некоторых вариантах реализации пути к аминокислотам, или белкам, или другим питательным веществам, или цельноклеточным продуктам контролируются и оптимизируются для производства химических продуктов путем поддержания определенных условий роста (например, уровней азота, кислорода, фосфора, серы, питательных микроэлементов, таких как неорганические ионы и, в случае их присутствия, любых регуляторных молекул, которые обычно не считаются питательным веществом или источником энергии). В некоторых вариантах реализации растворенный кислород (DO) может быть оптимизирован путем поддержания бульона в аэробных, микроаэробных, аноксических, анаэробных или факультативных условиях, в зависимости от потребностей микроорганизмов. Факультативной средой считается такая, которая имеет аэробные верхние слои и анаэробные нижние слои, вызванные расслоением толщи воды. Биосинтез аминокислот, или белков, или других питательных веществ, или цельноклеточных продуктов микробами, раскрытый в данном документе, может происходить в логарифмической фазе или позже, во время стационарной фазы, когда удвоение клеток прекращается, при условии достаточного запаса источников углерода и энергии и других питательных веществ.

[305] Конкретные примеры биореакторов, условий культивирования, гетеротрофного и хемотрофного роста, поддержания, и аминокислот, или белков, или других питательных веществ, или способов получения цельноклеточных продуктов, описанных в данном документе, могут быть объединены любым пригодным способом для повышения эффективности роста микробов и продуцирования аминокислот, или белков, или других питательных веществ, или цельных клеток.

Доноры и акцепторы электронов

[306] В некоторых неограничительных вариантах реализации при биосинтетическом восстановлении CO_2 используются акцептор электронов O_2 и/или донор электронов H_2 , которые образуются при электролизе воды. В определенных неограничительных вариантах реализации часть O_2 , образующегося при электролизе воды, и весь H_2 подают в водную суспензию микроорганизмов, как описано в данном документе. В некоторых неограничительных вариантах реализации молярное отношение H_2 , подаваемого в водную суспензию микроорганизмов, к молям O_2 превышает 2:1. В некоторых неограничительных вариантах реализации, в которых акцептор электронов O_2 и донор электронов H_2 образуются при электролизе воды, остается избыток O_2 после удовлетворения всех метаболических потребностей в H_2 и O_2 микроорганизмов, описанных в данном документе. В некоторых таких вариантах реализации избыточный O_2 может подаваться людям и/или другим аэробным формам жизни и/или в гидропонные системы для аэрации корней и/или использоваться в процессах газификации или частичного окисления или сжигания и/или храниться и продаваться как химический побочный продукт.

[307] В некоторых вариантах реализации, которые используют молекулярный водород в качестве донора электронов, может образовываться химический побочный продукт при генерировании молекулярного водорода с использованием возобновляемой и/или не дающей выбросов CO_2 энергии. В некоторых вариантах реализации оксигородная реакция, используемая при дыхании, ферментативно связана с окислительным фосфорилированием. В определенных вариантах реализации АТФ и/или другие внутриклеточные энергоносители, полученные таким образом, используются в анаболическом синтезе аминокислот и/или белков. В некоторых вариантах реализации кислород, получаемый в результате расщепления воды сверх количества, требующегося для дыхания с целью поддержания оптимальных условий фиксации углерода и продуцирования органического соединения водородокисляющими микроорганизмами, может быть переработан в форму, пригодную для продажи, с использованием стадий

процесса, известных специалистам и ученым в области коммерческого производства газообразного кислорода.

[308] Продуцирование органических молекул с длиной углеродной цепи больше C4 чаще всего и эффективно осуществляется биологически через пути анаболического биосинтеза, такие как биосинтез жирных кислот [C. R. Fischer, D. Klein-Marcuschamer, and G. Stephanopoulos (2008) "Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production" *Metabolic Engineering* 10(6):295-304 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2008.06.009>)], и различные пути биосинтеза аминокислот. Некоторые варианты реализации применяют водородокисляющие и/или СО-окисляющие и/или СН₄-окисляющие микроорганизмы, которые используют более электроотрицательные, по сравнению с СО₂, акцепторы электронов в энергозапасующих реакциях производства АТФ (например, дыхания), такие как, без ограничений, О₂. Например, гидрогенотрофные оксигородные или водородокисляющие микробы, которые сочетают оксигородную реакцию $2\text{H}_2 + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$ с образованием АТФ, могут продуцировать большее количество АТФ из Н₂ и/или другого донора электронов, потребляемого для дыхания, чем ацетогены или метаногены, которые используют СО₂ в качестве акцептора электронов при дыхании. Например, водородокисляющие микроорганизмы могут продуцировать по меньшей мере два АТФ на Н₂, потребляемый при дыхании [L. Bongers (1970) "Energy generation and utilization in hydrogen bacteria" *Journal of bacteriology* 104(1):145-151 (<http://jb.asm.org/content/104/1/145.abstract>), которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме], что в восемь раз превышает количество АТФ, продуцируемого на потребляемый при дыхании Н₂, по сравнению возможным продуцированием у микроорганизмов, осуществляющих метаногенез или ацетогенез с использованием Н₂ в качестве донора электронов и СО₂ в качестве акцептора электронов при дыхании. По этой причине использование микроорганизмов, которые могут утилизировать более электроотрицательные акцепторы электронов в дыхании и в производстве АТФ, такие как, без ограничений, водородокисляющие микробы, для анаболического биосинтеза, такого как, без ограничений, биосинтез аминокислот или белков или жирных кислот из синтез-газа или Н₂, может быть более эффективным, чем использование ацетогенов или метаногенов, таких как используемые в настоящее время в биологических ГТС-технологиях (превращения газа в химические соединения) для производства короткоцепочечных кислот или спиртов (например, уксусной кислоты или этанола). В некоторых вариантах реализации оксигородная реакция, используемая при дыхании, ферментативно связана с окислительным фосфорилированием. В определенных вариантах реализации для

продуцирования АТФ клетками микроорганизмов, описанными в данном документе, используется аэробное дыхание. В определенных вариантах реализации АТФ и/или другие внутриклеточные энергоносители, полученные таким образом, используются в анаболическом биосинтезе аминокислот и/или белков. В некоторых вариантах реализации изобретения используются водородокисляющие и/или карбоксидотрофные, и/или метанотрофные, и/или гетеротрофные микроорганизмы, или композиции, содержащие эти микроорганизмы, при этом микроорганизм экспрессирует один или большее количество ферментов, которые обеспечивают возможность биосинтеза полезных представляющих интерес продуктов на основе углерода, включая, без ограничений, химические вещества, мономеры, полимеры, белки, полисахариды, витамины, нутрицевтики, антибиотики или фармацевтические продукты или их промежуточные продукты, из углеродсодержащего газового сырья, включая, без ограничений, синтез-газ или генераторный газ или природный газ или биогаз или отходящий CO_2 в сочетании с возобновляемыми H_2 или CO или метансодержащими газами. В некоторых вариантах реализации такие указанные представляющие интерес продукты на основе углерода могут быть биосинтезированы гетеротрофно из органического многоуглеродистого сырья, такого как, без ограничений, глюкоза, фруктоза и другие сахара. В некоторых неограничительных вариантах реализации используют микроорганизм или композицию, содержащую микроорганизм, причем микроорганизму требуется менее 4H_2 или NADH для продуцирования одного АТФ посредством дыхания. В других неограничительных вариантах реализации используют микроорганизм или композиции, содержащие микроорганизм, в которых микроорганизм продуцирует более одного АТФ на H_2 или NADH , потребляемые при дыхании. В других неограничительных вариантах реализации используют микроорганизм или композицию, содержащую микроорганизм, в которых микроорганизм продуцирует по меньшей мере два АТФ на H_2 или NADH , потребляемые при дыхании, или, по меньшей мере, 2,5 АТФ на H_2 или NADH , потребляемые при дыхании.

[309] Дополнительная особенность некоторых неограничительных вариантов реализации относится к источнику, продуцированию или рециркуляции доноров электронов, используемых хемоавтотрофными микроорганизмами для связывания диоксида углерода и/или другого исходного сырья C1 в органические соединения. Доноры электронов, используемые для улавливания углекислого газа и фиксации углерода, могут продуцироваться или рециркулироваться в некоторых вариантах реализации электрохимическим или термохимическим путем с использованием энергии из ряда различных технологий получения энергии, использующих возобновляемые источники и/или дающих низкие выбросы углерода, включая, без ограничений: фотоэлектрическую,

солнечную тепловую, ветровую, гидроэлектрическую, атомную, геотермальную, усовершенствованную геотермальную, тепловую энергию океана, энергию океанских волн, энергию приливов. Многие восстановленные неорганические химические вещества, на которых могут расти хемоавтотрофы (например, H_2 , CO , H_2S , двухвалентное железо, аммоний, Mn^{2+}), могут быть легко получены с использованием электрохимических и/или термохимических процессов, хорошо известных в данной области знаний и химической технологии, которые могут проводиться с использованием различных безэмиссионных или дающих низкие выбросы углерода и/или возобновляемых источников энергии, включая, без ограничений, фотоэлектрическую, солнечную тепловую, ветровую, гидроэлектрическую, атомную, геотермальную, усовершенствованную геотермальную, тепловую энергию океана, энергию океанских волн или приливную энергию.

[310] Производство водорода из возобновляемых источников энергии постепенно заменяет производство в системах ископаемого сырья, и технический прогресс в энергетическом секторе, как ожидается, снизит цены на производство экологически безопасного водорода в ближайшем будущем. Например, эффективность использования электрической энергии до 73% уже достигнута в коммерческих и промышленных электролизерах, а исследования новых материалов и конфигураций электролизеров показали возможную эффективность до 96%. В некоторых вариантах реализации используется коммерчески доступная технология электролиза с эффективностью электрической энергии более 70% для генерации донора электронов H_2 и/или акцептора электронов O_2 . Некоторые варианты реализации используют технологии электролиза с энергоэффективностью 73% или выше, и/или с энергоэффективностью до 96% или выше.

[311] В некоторых вариантах реализации, в которых в качестве донора электронов используется молекулярный водород, H_2 генерируется способами, хорошо известными в данной области знаний и химической технологии, включая, без ограничений, один или большее количество из следующих: путем электролиза воды, включая, без ограничений, подходы с использованием протонообменных мембран (PEM), жидких электролитов, таких как KOH, щелочного электролиза, электролиза с твердым полимерным электролитом, электролиза под высоким давлением, высокотемпературного электролиза пара (HTES); и/или путем термохимического расщепления воды способами, включающими, без ограничений, цикл оксида железа, цикл оксид церия(IV)-оксид церия(III), цикл цинк-оксид цинка, цикл сера-йод, цикл медь-хлор, цикл кальций-бром-железо, гибридный цикл серы; и/или электролиз сероводорода; и/или термохимическое расщепление сероводорода; и/или другие электрохимические или термохимические процессы, которые, как известно, дают водород с низкими или нулевыми выбросами

углекислого газа, включая, без ограничений: риформинг метана с помощью улавливания и секвестрации углерода (CCS); газификацию угля с помощью CCS; процесс Кварнера и другие процессы производства технического углерода; газификации или пиролиза биомассы с CCS. В определенных вариантах реализации подход к генерированию H_2 включает, без ограничений, электролиз, проводимый с использованием возобновляемой электрической энергией и/или электричества от источника с низкими выбросами парниковых газов. В некоторых вариантах реализации электролиз питается от одного или нескольких из следующих источников: солнечная энергия, включая, без ограничений, фотоэлектрическую и/или солнечную тепловую энергию; энергия ветра, гидроэлектроэнергия; ядерная; геотермальная; усовершенствованная геотермальная энергия; тепловая энергия океана; энергия океанских волн; приливная энергия.

[312] Во всем мире существуют огромные ресурсы энергии ветра, из которых используется лишь незначительная часть. Их низкое использование в настоящее время объясняется в основном непостоянным характером ветровых ресурсов, что приводит к изменению выработки электроэнергии со временем и недостаточному использованию мощностей для удовлетворения потребностей в энергии большую часть времени. Общее несоответствие между выработкой ветровой энергии и потребностями энергосистем проявляется в примерах со всего мира, например, в Шотландии, где ветровым электростанциям платят за остановку турбин из-за избыточной генерации [<http://www.mnn.com/earth-matters/energy/blogs/blown-away-wind-turbines-generate-enough-energy-to-power-every-home-in>], и в тех районах Техаса, где подача электричества бесплатна ночью, когда энергия ветра высока, а потребности энергосистемы низки [http://www.nytimes.com/2015/11/09/business/energy-environment/a-texas-utility-offers-a-nighttime-special-free-electricity.html?_r=2]. Эта проблема может быть решена путем использования энергии ветра, вырабатываемой в часы непииковой нагрузки, для производства сырьевого H_2 для процессов в соответствии с определенными вариантами реализации данного документа.

[313] В настоящее время водород все чаще рассматривается в качестве возможной системы накопления энергии в рамках так называемого подхода "энергия-газ" (power-to-gas). Нестабильность, присущая производству возобновляемой энергии (в частности, солнечной и ветровой энергии), и избыточное энергоснабжение (непииковая энергия) могут быть уменьшены за счет производства водорода посредством электролиза воды. В соответствии с большинством современных схем, полученный газообразный водород может быть затем преобразован обратно в электричество с помощью топливных элементов и/или газовых турбин в периоды пиковой нагрузки. Или, альтернативно, H_2

может подаваться в сеть газоснабжения или превращаться в метан посредством метанирования. Кроме того, водород может использоваться в качестве сырья в химической, нефтехимической, металлургической и пищевой промышленности. Некоторые варианты реализации предоставляют новые возможности в рамках схемы преобразования энергии в газ, позволяя использовать H_2 в более широком диапазоне продуктов, включая биохимические вещества и, в частности, белки, аминокислоты, удобрения и биостимуляторы. В некоторых вариантах реализации водород, полученный с использованием избыточного электричества в энергосистеме и/или непиковой энергии сети, используется в качестве донора электронов в одном или нескольких метаболических путях, протекающих в микроорганизмах, утилизирующих водород. В некоторых вариантах реализации водород и/или кислород, необходимый для микробного биосинтеза водородокисляющими бактериями и/или аэробными бактериями, генерируется путем электролиза воды с использованием возобновляемой энергии, в частности, непиковой электроэнергии, т.е. электрической энергии, доступной в то время, когда предложение энергии превышает спрос, и которая в текущей ситуации часто теряется.

[314] В некоторых вариантах реализации хранение газообразных H_2 и CO_2 на месте обеспечивает возможность отбора энергии из сети только в периоды, когда генерация возобновляемой энергии превышает потребность в электроэнергии. В некоторых вариантах реализации мощность может поступать в сеть как обычно в периоды более высокого спроса. В некоторых вариантах реализации способ не нарушает энергоснабжение от возобновляемых источников, а скорее обеспечивает более полное использование генерирующей мощности возобновляемых источников, таких как, без ограничений, ветер и солнечная энергия. Некоторые варианты реализации позволяют продолжать работу и генерацию возобновляемых источников даже в периоды, когда выработка электроэнергии превышает потребность в сети (например, непиковая ветровая или солнечная генерация).

[315] В определенных вариантах реализации водородные доноры электронов необязательно генерируются с низкими или нулевыми выбросами диоксида углерода. Однако в некоторых таких вариантах реализации водород генерируется из отходов, устойчивых или малоценных источников энергии и/или углерода с использованием способов, известных в области химической технологии. Такие способы включают, без ограничений, газификацию, пиролиз, паровой риформинг или автотермический риформинг исходного сырья, такого как, без ограничений, одного или нескольких из следующих: муниципальные твердые отходы, черный щелок, сельскохозяйственные отходы, древесные отходы, трудноизвлекаемый природный газ, биогаз, кислый газ,

гидраты метана, сжиженный нефтяной газ, нефтяной кокс, шины, сточные воды, навоз, солома, морские водоросли и бурные водоросли, а также вообще малоценная биомасса с высоким содержанием лигноцеллюлозы. В определенных вариантах реализации синтез-газ или генераторный газ, содержащий H_2 и/или CO и/или CO_2 , используется в качестве донора электронов и/или в качестве источника углерода. В некоторых вариантах реализации H_2 , и/или CO , и/или CO_2 , содержащиеся в синтез-газе или генераторном газе, дополняются H_2 , генерируемым с использованием возобновляемого источника энергии и/или источника энергии с низкими выбросами парниковых газов, и процессом конверсии, таким как один или большее количество из описанных в данном документе.

[316] В некоторых неограничительных вариантах реализации происходят уменьшение количества отходящего CO_2 и/или синтез клеточного материала, который может быть использован в качестве пищевого продукта или источника питания, и/или происходит удаление и утилизация отходов мочевины и/или других биологических отходов.

[317] В некоторых вариантах реализации отношение водорода к оксиду углерода в синтез-газе или генераторном газе можно регулировать с помощью реакции конверсии водяного газа и/или захвата углерода до подачи газа в микробную культуру. В некоторых вариантах реализации соединения $C1$ образуются в результате парового риформинга метана или природного газа, и в частности, трудноизвлекаемого природного газа, или природного газа, который в противном случае был бы сожжен на факеле или выпущен в атмосферу, или биогаза, или свалочного газа, и подаются в виде синтез-газа и/или генераторного газа или жидкого потока соединений $C1$ в культуру микроорганизмов, где в определенных вариантах реализации отношение водорода к монооксиду углерода в синтез-газе или генераторном газе можно регулировать с помощью реакции конверсии водяного газа и/или улавливания углерода до подачи газа в микробную культуру.

[318] Доноры электронов в определенных вариантах реализации также могут быть получены или очищены от загрязняющих веществ или отходов, включая, без ограничений, одно или несколько из следующих: технологический газ; хвостовой газ; отходящий газ добычи нефти вторичными методами; трудноизвлекаемый природный газ; биогаз; свалочный газ; и кислые газы. В определенных вариантах реализации хвостовой газ, содержащий H_2 , и/или CH_4 , и/или CO , используется в качестве источника донора электронов и/или углерода. В определенных вариантах реализации хвостовые газы нефтеперерабатывающего завода используются в качестве источника доноров электронов и/или углерода.

Продукты

[319] В некоторых вариантах реализации микроорганизмы, описанные в данном документе, продуцируют по меньшей мере 1 мг представляющего интерес продукта на основе углерода на литр жидкой культуральной суспензии. В некоторых примерах продукт секретируется микроорганизмом в культуральную среду. В других примерах продукт сохраняется в микроорганизме в процессе ферментации. В некоторых случаях продукт может быть извлечен путем лизиса клеток и выделения продукта. В других случаях продукт может иметь коммерческую ценность в интактном микроорганизме без значительной подготовки или очистки продукта от микроорганизма.

[320] В определенных вариантах реализации проводится отделение клеточной массы от жидкой суспензии. В некоторых вариантах реализации это разделение проводится способами, известными в области культивирования микроорганизмов. Примеры методов сбора клеточной массы приведены, например, в заявке PCT № WO08/00558; патенте США № 5807722; патенте США № 5593886; и патенте США № 5821111. Разделение может быть проведено одним или несколькими способами, включая, без ограничений: центрифугирование; флокуляцию; флотацию; фильтрацию с использованием мембранных систем, полых волокон, систем рулонного типа или керамических фильтров; вакуумную фильтрацию; фильтрацию тангенциального потока; осветление; осаждение; гидроциклон. В определенных вариантах реализации, где клеточная масса может быть иммобилизована на матрице, ее можно собирать способами, включающими, без ограничений, гравитационное осаждение или фильтрацию, и отделять от ростового субстрата путем соскабливания или приложения сдвиговых усилий в жидкости.

[321] В определенных вариантах реализации жидкость, оставшаяся после удаления клеточной массы, может быть закачана в систему для удаления и/или извлечения растворенных химических продуктов биопроцесса и/или непрореагировавших питательных веществ. В определенных вариантах реализации непрореагировавшие питательные вещества и/или вода извлекаются и рециркулируются, насколько это возможно, и/или в определенных вариантах реализации продаются в качестве сопутствующего продукта и/или утилизируются надлежащим образом. В определенных вариантах реализации удаление отходов производства и/или загрязняющих веществ и/или любых ингибирующих и/или вредных соединений с использованием способов и технологий, известных в данной области техники, проводится до возврата воды и/или непрореагировавших питательных веществ в биореактор(ы).

[322] В определенных вариантах реализации свободные и/или растворенные органические молекулы могут высвобождаться в раствор технологического потока из микроорганизмов способами, включающими, без ограничений, клеточную экскрецию или секрецию или лизис клеток.

[323] В определенных вариантах реализации выделение и/или рециркуляция химических продуктов и/или непрореагировавших питательных веществ из водного раствора могут быть проведены с использованием оборудования и методик, известных в области производственной технологии, и нацелены на химические продукты конкретных вариантов реализации, включая, без ограничений: экстракцию растворителем; экстракцию водой; дистилляцию; фракционную перегонку; цементацию; химическое осаждение; абсорбцию щелочным раствором; абсорбцию или адсорбцию на активированном угле, ионообменной смоле или молекулярном сите; изменение рН и/или окислительно-восстановительного потенциала раствора; испарители; фракционные кристаллизаторы; сепараторы твердых и жидких фаз; нанофильтрацию; обратный осмос; и все их комбинации.

[324] В определенных вариантах реализации химические продукты и/или непрореагировавшие питательные вещества поступают в среду, которая поддерживает рост других организмов. В некоторых вариантах реализации сточные воды и непрореагировавшие питательные вещества используются для орошения и удобрения высших растений и/или морских водорослей, и/или водорослей, и/или для питания гетеротрофных организмов, таких как грибки, дрожжи и/или бактерии. В некоторых вариантах реализации неорганические питательные вещества из сточных вод биореактора выполняют функцию неорганического удобрения, которое может увеличивать первичную продуктивность пруда и/или других оболочек, используемых в аквакультуре и/или гидропонике.

[325] Высокая скорость роста, достигаемая некоторыми хемоавтотрофными видами, может позволить им достичь или превзойти самые высокие показатели фиксации углерода и/или продуцирования биомассы на постоянную единицу (per standing unit) биомассы, которые могут быть достигнуты для фотосинтезирующих микробов. В определенных вариантах реализации может быть получена избыточная биомасса. В определенных вариантах реализации прирост избыточной клеточной массы может быть удален из системы для получения продукта биомассы. В некоторых вариантах реализации прирост избыточной клеточной массы может удаляться из системы для поддержания желаемой (например, оптимальной) микробной популяции и плотности клеток в

микробной культуре для сохранения высоких скоростей улавливания и фиксации углерода и/или скорости конверсии исходного сырья.

[326] Для облегчения переработки продукта биомассы в полезные продукты, собранные микробные клетки в некоторых вариантах реализации могут быть разрушены с использованием хорошо известных способов, включая, без ограничений, одно или несколько из следующего: измельчение в шаровой мельнице, давление кавитации, обработка ультразвуком, гомогенизация или механическая сдвиговая нагрузка.

[327] Собранная биомасса в некоторых вариантах может быть высушена на стадии или стадиях процесса. Сушка биомассы может проводиться в определенных вариантах реализации с использованием хорошо известных технологий, включая, без ограничений, одно или несколько из следующего: центрифугирование, сушка в барабане, испарение, лиофилизация, нагрев, распылительная сушка, вакуумная сушка и/или вакуумная фильтрация. В определенных вариантах реализации отработанное тепло может быть использовано при сушке биомассы. В определенных вариантах реализации тепловые отходы от промышленного источника дымового газа, используемого в качестве источника углерода, могут быть использованы при сушке биомассы. В определенных вариантах реализации, побочное тепло от генерации доноров электронов и/или источника углерода C1, как описано выше, может использоваться для сушки биомассы.

[328] В примерном, но не ограничивающем варианте реализации биореактор, содержащий питательную среду, инокулируют клетками-продуцентами; обычно затем следует лаг-фаза, после чего начинается удвоение клеток. После лаг-фазы время удвоения клеток уменьшается, и культура переходит в логарифмическую фазу. За логарифмической фазой в конечном итоге следует увеличение времени удвоения, которое, без намерения ограничиваться теорией, как полагают, является результатом либо истощения питательных веществ, включая растворенные газы, источники азота или источники минеральных веществ, либо увеличения концентрации ингибирующих химических веществ, либо бактериального чувства кворума (quorum sensing). В определенных случаях, и особенно в аэробных биопроцессах, длительная фаза линейного или арифметического роста может следовать за логарифмической фазой до начала стационарной фазы. Эта арифметическая фаза роста характерна для ограничения O₂. Для сбора клеточной массы, культуру в определенных вариантах реализации собирают в поздней логарифмической фазе, или в арифметической фазе, или в стационарной фазе. В некоторых вариантах реализации клетки собирают в логарифмической фазе. Накопление связанного углерода, такого как липиды или полигидроксibuтираты (PHB), как правило, может инициироваться истощением источника азота или другого ключевого питательного вещества, за

исключением углерода или источника электронов (например, водорода). Это дает клеткам сигнал к накоплению восстановленного углерода, продуцируемого из избыточных источников углерода и энергии.

[329] В примерном, но не ограничивающем варианте реализации используется закрытый сосуд для культивирования, и водород, кислород и CO_2 подаются под давлением в сосуд у основания рабочего объема жидкости; подача газов в камеру контролируется газовыми датчиками, чтобы поддерживать фиксированные концентрации H_2 , O_2 и CO_2 в свободном пространстве камеры; газы и культуральная среда смешиваются путем механического перемешивания в сосуде, чтобы максимизировать диффузию газа в жидкость; газообразные водород и кислород поступают из электролизера воды, а CO_2 улавливается из источника отходов, воздуха из кабины или из точечного источника, обычно выделяющегося в атмосферу; технологический поток перемещается из культурального сосуда в блок сбора белка и/или белковой биомассы; воздействие центробежных сил используется для отделения твердых веществ от жидкости; отделенная жидкость поступает в блок регенерации воды; любые нежелательные вещества, которые иначе могли бы накапливаться в системе, удаляются в блоке регенерации воды; регенерированная вода повторно используется в электролизере для воды; питательный состав подается в сосуд для культивирования для поддержания целевого состава питательной среды; в некоторых таких вариантах реализации в качестве одного из источников питательных веществ используется моча; извлеченная обезвоженная биомасса дополнительно перерабатывается в питательные вещества и/или удобрения, и/или ингредиенты, и/или продукты питания. В некоторых таких вариантах реализации неиспользованные газы, которые барботируют в свободное пространство биореактора, рециркулируют обратно к основанию рабочего объема жидкости и снова вводят в рабочий объем жидкости. В некоторых других вариантах реализации вновь вводимый H_2 и/или CO_2 подают непосредственно в свободное пространство биореактора вместо основания рабочего объема, а затем рециркулируется вместе с другими газами свободного пространства через систему рециркуляции к основанию рабочего объема жидкости, при этом газы растворяются и/или барботируются в рабочий объем жидкости.

[330] В некоторых вариантах реализации биомассу дополнительно обрабатывают после сушки или без предварительной стадии сушки для облегчения выделения и производства полезных биохимических веществ. В некоторых вариантах реализации такая дополнительная обработка включает выделение белкового или липидного содержимого, или витаминов, или других целевых биохимических веществ, из микробной биомассы. В некоторых вариантах реализации выделение липидов можно проводить с использованием

неполярных растворителей для экстракции липидов, таких как, без ограничений, один или большее количество из: гексана, циклогексана, этилового эфира, спирта (изопропанол, этанол и т.д.), трибутилфосфата, сверхкритического диоксида углерода, триоктилфосфиноксида, вторичных и третичных аминов или пропана. В определенных вариантах реализации другие полезные биохимические вещества могут быть экстрагированы с использованием растворителей, включая, без ограничений, один или большее количество из: хлороформа, ацетона, этилацетата и тетрахлорэтилена. В определенных вариантах реализации проводится лизис клеток.

[331] В некоторых вариантах реализации предусматриваются способы получения аминокислот и/или белков и/или витаминов путем объединения в биореакторе или растворе одного или нескольких путей биосинтеза, включая, без ограничений, путь биосинтеза аминокислот, путь биосинтеза витаминов, углеродсодержащий газ и сконструированный или природный микроорганизм, который превращает углеродсодержащий газ, такой как синтез-газ, генераторный газ, природный газ, биогаз, CO₂, монооксид углерода и их смеси, содержащие газообразный водород; и/или соединения C1, газообразные или жидкие, включая, без ограничений, метанол или метан, в аминокислоты и/или белки и/или витамины. В некоторых вариантах реализации аминокислоты и/или белки и/или витамины вводят в состав одного или нескольких удобрений, биостимуляторов, биоудобрений, питательных сред для микроорганизмов, усилителей роста грибов, композиций животных кормов и/или пищевых продуктов для человека с использованием процессов, известных в области химии, химического машиностроения, микробиологии, агрономии и/или науки о продуктах питания. В некоторых неограничительных вариантах реализации микроорганизм представляет собой *Cupriavidus necator* DSM 531 или DSM 541. В некоторых неограничительных вариантах реализации витамин представляет собой витамин группы B, и более конкретно витамины B1, B2 и/или B12.

[332] В некоторых вариантах реализации предусматриваются способы получения одной или нескольких аминокислот, включающие воздействие на бактериальную клетку и/или клетку археобактерии и/или другую микробную клетку сингаза и/или генераторного газа и/или газообразного CO₂ и/или природного газа и/или биогаза и/или смеси газообразного CO₂ и/или газообразного H₂ и/или CO и/или CH₄ (например, H₂ и CO₂ и/или CO и/или CH₄); при этом микробная клетка способна связывать газообразный CO₂ и/или другие источники атомов углерода C1 в одну или несколько аминокислот и/или белок и/или витамины; при этом соединения извлекают из биореактора и подают во второй или несколько дополнительных реакторов, где соединения подвергают последующей

обработке для получения продуктов, включая, без ограничений, одно или несколько из следующего: удобрение, биостимулятор, биоудобрение, усилитель роста грибов, корм для аквакультуры, животный корм, пищевые ингредиенты, питание для человека (например, пищевая или питательная добавка) или витамины. В некоторых вариантах реализации композиция содержит бактериальную клетку, при этом бактерии выбирают из рода *Rhodococcus*. В некоторых вариантах реализации бактериальная клетка представляет собой *Rhodococcus opacus* (DSM 43205 или 43206 или 44193) или *Rhodococcus* sp. (DSM 3346). В некоторых вариантах реализации бактериальную клетку выбирают из родов *Ralstonia* или *Cupriavidus*. В некоторых вариантах реализации бактериальная клетка представляет собой *Cupriavidus necator* или *Cupriavidus metallidurans*. В некоторых вариантах реализации бактериальная клетка относится к подотряду *Corynebacterineae* или семейству *Burkholderiaceae*.

[333] В одном варианте реализации используется микроорганизм дикого типа или сконструированный, который способен расти на синтез-газе и/или смеси H_2 и/или CO_2 , и/или CO , и/или CH_4 (например, H_2 и CO_2 , и/или CO , и/или CH_4), и/или других отходящих газах и способен продуцировать аминокислоты, включая, без ограничений, лизин.

[334] В некоторых вариантах реализации предусматриваются способы производства одной или нескольких аминокислот, пептидов, белков, витаминов или других питательных веществ, включающие (а) культивирование клетки, описанной в данном документе, в реакционном сосуде или биореакторе в присутствии синтез-газа и/или генераторного газа, и/или природного газа, и/или биогаза, и/или смеси газообразного CO_2 и/или газообразного H_2 , и/или CO , и/или CH_4 (например, H_2 и CO_2 , и/или CO , и/или CH_4), при этом клетка продуцирует и/или секретирует одну или несколько аминокислот, или белков, или других питательных веществ в количестве, составляющем по меньшей мере 10% или больше от общей сухой массы клеток; и (b) выделение одной или нескольких аминокислот, пептидов, белков, витаминов или других питательных веществ и/или цельноклеточного продукта из реакционного сосуда (например, выделение из культуральной среды в реакционном сосуде).

[335] В некоторых вариантах реализации одна или несколько аминокислот, или белки, или другие питательные вещества, или цельноклеточные продукты, полученные способом, описанным в данном документе, используются в качестве альтернативного или нетрадиционного источника белка и/или питательных веществ. В некоторых вариантах реализации одна или несколько аминокислот, или белки, или другие питательные вещества, или цельноклеточные продукты, полученные способом, описанным в данном документе, являются компонентами или предшественниками или входят в состав корма

или источника питательных веществ, предоставляемого другому организму. В некоторых неограничительных вариантах реализации такой другой тип организма, потребляющий указанные предоставляемые питательные вещества, представляет собой одно или несколько из следующего: бактерии, археи, дрожжи, микроводоросли, морские водоросли, бурые водоросли, зоопланктон, грибки, грибы, растения, моллюски или другие беспозвоночные, рыбы, птицы или млекопитающие.

[336] В определенных неограничительных вариантах реализации белковая биомасса, полученная, как описано в данном документе, используется в качестве альтернативного источника белка. В определенных вариантах реализации ее используют в качестве замены рыбной муки и/или казеина, и/или молочной сыворотки, и/или соевой муки. В некоторых неограничительных вариантах реализации белковые продукты не имеют дефицита лизина и/или метионина. В некоторых вариантах реализации аминокислоты, пептиды и/или белки, полученные, как описано в данном документе, используются в удобрениях, биостимуляторах, биоудобрениях, усилителях роста грибов, композициях кормов и/или ингредиентах питания человека вместо рыбной муки, казеина, молочной сыворотки и/или соевой муки и/или других растительных белков. В некоторых неограничительных вариантах реализации белковые продукты не имеют дефицита каких-либо незаменимых аминокислот. В некоторых неограничительных вариантах реализации белковые продукты не имеют дефицита лизина и/или метионина. В некоторых неограничительных вариантах реализации белковая биомасса не содержит значительных количеств антипитательных факторов. В некоторых вариантах реализации белковая биомасса не содержит значительных количеств одного или нескольких из следующего: госсипол, глюкозинолаты, сапонины или ингибиторы трипсина.

[337] Ряд имеющихся в настоящее время источников белка и питательных веществ, включая, без ограничений, рыбную муку, могут быть загрязнены тяжелыми металлами, такими как ртуть (Hg) и/или свинец (Pb), а также другими токсичными химическими и органическими веществами, поскольку, например, вода, из которой вылавливают рыбу, загрязнена. Некоторые варианты реализации относятся к белковым продуктам с особенно низкими уровнями токсичных загрязнений, таких как, без ограничений, тяжелые металлы и/или токсичные органические вещества, по сравнению с существующими источниками белка и других питательных веществ, включая, без ограничений, рыбную муку.

[338] Значительная часть высших растений несъедобна для множества разных животных, включая, без ограничений, людей и других нежвачных животных. Это может привести к многочисленным недостаткам, включая направление энергии и углерода в

нежелательные побочные продукты или отходы, снижение выхода желаемых продуктов и добавочная дополнительная нагрузка для переработки и утилизации отходов. В некоторых вариантах реализации на целевые продукты биомассы направляется больший поток углерода и/или энергии, чем для сопоставимой культуры высших растений, по показателям связывания CO₂, продуцирования биомассы и/или производства белка. В определенных вариантах реализации отношение несъедобной части (например, для человека) к съедобной части биомассы, полученной, как описано в данном документе, ниже, чем для сопоставимой культуры высших растений. В некоторых вариантах реализации количество пищевых отходов меньше, чем для сопоставимых культур высших растений.

Системы для производства биопродуктов и/или биомассы

[339] Определенные неограничительные варианты реализации относятся к производственным объектам, занимающим относительно небольшой участок земли, что позволяет размещать биопроцесс совместно с промышленными установками, продуцирующими CO₂ и/или другие углеродные отходы. В определенных неограничительных вариантах реализации такие промышленные объекты включают одно или несколько из следующих: электростанции, работающие на ископаемом топливе; нефтеперерабатывающие заводы; объекты по обогащению битуминозных песков; бурение скважин для добычи природного газа или нефти; заводы по производству этанола; цементные производства; алюминиевые производства, хлорщелочные производства, сталелитейные заводы; геотермальные электростанции. В некоторых вариантах реализации компактная вертикальная конструкция обеспечивает возможность удобного размещения рядом с промышленными источниками дымовых газов и связанных с ними отходящим теплом, которое может быть дополнительно использовано в производственном процессе, включая, без ограничений, сушку биомассы.

[340] Дополнительные практические преимущества реализуются в определенных вариантах реализации посредством относительно жестко контролируемой и изолированной системы по сравнению с некоторыми альтернативными системами для биологического улавливания и преобразования CO₂. В некоторых вариантах реализации используемые биореакторы являются непроницаемыми для газов и жидкостей, структурно устойчивыми, в высокой степени защищенными и изолированными от окружающей среды, с относительно жестко контролируруемыми внутренними параметрами (например, температурой, давлением и т.д.), входами и выходами. Эта относительно замкнутая система защищает культуру, которая в некоторых вариантах реализации содержит

водородокисляющие и/или гидрогенотрофные, и/или карбоксидотрофные, и/или хемоавтотрофные, и/или метанотрофные микроорганизмы, в гораздо большей степени, чем организмы в практических водорослевых или традиционных сельскохозяйственных системах. Практические водорослевые и традиционные сельскохозяйственные системы по необходимости являются чрезвычайно открытыми системами, в которых организмы напрямую подвергаются воздействию окружающей среды и экосистем. Относительно строго контролируемый и замкнутый характер процесса в определенных вариантах реализации значительно снижает риски загрязнения окружающей среды, болезни или риски вредителей и сорняков по сравнению с практическими водорослевыми или традиционными сельскохозяйственными системами. В определенных вариантах реализации процесс более изолирован от переменных погодных и климатических условий, чем практические водорослевые или традиционные сельскохозяйственные системы. В определенных вариантах реализации способ имеет уменьшенные потери в партиях и/или колебания производительности по сравнению с практическими водорослевыми или традиционными сельскохозяйственными системами.

[341] Из-за высокой степени герметичности, обеспечиваемой непроницаемыми для газов и жидкостей биореакторами в некоторых вариантах реализации, и строгого контроля над входами и выходами, в некоторых вариантах реализации значительно облегчается рециркуляция воды и питательных веществ. В некоторых вариантах реализации рециркуляция воды достигается путем добавления соответствующих блоков после выходов биореактора, включая, без ограничений, холодильники. Такие типы оборудования и способы хорошо известны в науке и практике регенерации и рециркуляции воды. В некоторых вариантах реализации потери в результате испарения и/или утечки воды и/или утечки питательных веществ и/или загрязнения окружающих грунтовых вод и водных путей предотвращаются в большей степени, чем в открытых водорослевых или традиционных сельскохозяйственных системах. Напротив, открытые водорослевые системы и традиционное сельское хозяйство имеют высокие потери воды в результате испарения и подвержены поверхностному стоку с сельскохозяйственных угодий, что приводит к потерям удобрений и воды; эвтрофикации озер и водных путей; и даже появлению "мертвых зон" (водоемов с сильно сниженным содержанием O_2). Высшие растения теряют воду при транспирации. В определенных вариантах реализации вода не теряется путем транспирации. Открытые водорослевые и традиционные сельскохозяйственные системы также подвержены высокому риску "бегства" не-нативных организмов в окружающую среду и генетического перекрестного загрязнения. В некоторых вариантах реализации существует более низкий риск "бегства" не-нативных

организмов в окружающую среду или генетического перекрестного загрязнения, чем для открытых водорослевых и традиционных сельскохозяйственных систем. В некоторых вариантах реализации в биопроцессе не применяются пестициды, гербициды или антибиотики. Некоторые варианты реализации представляют собой новый тип сельского хозяйства, где хемоавтотрофные организмы заменяют фотосинтезирующие растения, водоросли или микроорганизмы; или гетеротрофные грибки, бактерии или животных; в производстве биопродуктов. В некоторых вариантах реализации эти продукты на биологической основе дополняют, пополняют, заменяют или расширяют продукты традиционного сельского хозяйства и/или животноводства.

[342] Оптимизация производства белка и нацеливание на конкретные параметры распределения аминокислот могут быть достигнуты путем контроля условий биореактора и/или уровней питательных веществ и/или путем генетической модификации клеток. В некоторых вариантах реализации производство белка и распределение продуцируемых аминокислотных молекул оптимизируется посредством одного или нескольких из следующего: контроль условий биореактора, контроль уровней питательных веществ, генетические модификации клеток. В некоторых вариантах реализации пути к аминокислотам, белкам, витаминам и/или другим питательным веществам и/или, в более общем случае, пространственно разделяют области биореакторной системы, являющиеся аэробными и анаэробными. Раскрытый в данном документе биосинтез аминокислот, белков или других питательных веществ или цельноклеточных продуктов микробами может происходить в логарифмической фазе, линейной фазе или впоследствии в стационарной фазе, когда удвоение клеток прекращается, при условии достаточной подачи углерода и энергии и других источников питательных веществ.

[343] Использование хемоавтотрофных микроорганизмов для производства белков, аминокислот и других питательных веществ из газообразного сырья, содержащего H_2 , и/или CO_2 , и/или CO , и/или CH_4 , описано, например, в международной заявке на патент, поданной 18 марта 2017 г., под номером PCT/US17/23110, озаглавленный "Микроорганизмы и искусственные экосистемы для производства белка, пищевых продуктов и полезных побочных продуктов из субстратов C1" (MICROORGANISMS AND ARTIFICIAL ECOSYSTEMS FOR THE PRODUCTION OF PROTEIN, FOOD, AND USEFUL CO-PRODUCTS FROM C1 SUBSTRATES). Эта заявка включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме для всех целей.

[344] Разработка водородокисляющих микроорганизмов описана, например, в заявке на патент США № 13/623089, поданной 19 сентября 2012 г. и озаглавленной "Общая промышленная система жирной кислоты для модификации жирных кислот"

(INDUSTRIAL FATTY ACID ENGINEERING GENERAL SYSTEM FOR MODIFYING FATTY ACIDS). Эта заявка включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме для всех целей.

[345] Использование водородокисляющих микроорганизмов для превращения синтез-газа, генераторного газа или других газовых смесей, содержащих H_2 и CO_2 и/или CO , в молекулы с числом атомов углерода от среднего до высокого или анаболические молекулы описано, например, в патентной заявке, поданной в Управление по патентам и товарным знакам США 26 октября 2012 г. под номером 13/643872 и озаглавленной "Использование оксигородных микроорганизмов для не-фотосинтетического связывания углевода и конверсии неорганических и/или $C1$ источников углерода в полезные органические соединения" (USE OF OXYHYDROGEN MICROORGANISMS FOR NON-PHOTOSYNTHETIC CARBON CAPTURE AND CONVERSION OF INORGANIC AND/OR $C1$ CARBON SOURCES INTO USEFUL ORGANIC COMPOUNDS). Эта заявка включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме для всех целей.

[346] Использование хемотрофных микроорганизмов для превращения CO_2 в полезные органические химические вещества описано, например, в заявке PCT № PCT/US2010/001402, поданной 05/12/2010 и озаглавленной "Биологический и химический процесс, использующий хемоавтотрофные микроорганизмы для хемосинтетической фиксации диоксида углерода и/или других неорганических источников углерода в органические соединения, и получение дополнительных полезных продуктов" (BIOLOGICAL AND CHEMICAL PROCESS UTILIZING CHEMOAUTOTROPHIC MICROORGANISMS FOR THE CHEMOSYNTHETIC FIXATION OF CARBON DIOXIDE AND/OR OTHER INORGANIC CARBON SOURCES INTO ORGANIC COMPOUNDS, AND THE GENERATION OF ADDITIONAL USEFUL PRODUCTS). Эта заявка включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме для всех целей.

[347] Дополнительная особенность некоторых вариантов реализации включает модификацию микроорганизмов, описанных в данном документе, посредством искусственных процедур, включая, без ограничений, ускоренный мутагенез (например, с использованием ультрафиолетового света или химической обработки), генную инженерию или модификацию, гибридизацию, синтетическую биологию или традиционное селекционное разведение. Возможные модификации микроорганизмов включают, без ограничений, изменения, направленные на продуцирование повышенного количества и/или качество аминокислот, и/или белка, и/или ферментов, и/или витаминов.

[348] В определенных вариантах реализации используются хемотрофные бактериальные штаммы, которые содержат одну или несколько последовательностей экзогенной нуклеиновой кислоты. Биохимические вещества, синтезируемые микроорганизмами, описанными в данном документе, могут использоваться в применениях, включающих, без ограничений, заменители нефтехимических продуктов, мономеры, сырье для производства полимеров, смазывающие вещества, в качестве ингредиентов удобрений, кормов для животных, пищевых продуктов, средств личной гигиены и косметических продуктов. В некоторых вариантах реализации ферментативные и химические процессы могут быть использованы для получения витаминов, аминокислот и/или белков. Некоторые варианты реализации позволяют производить удобрения, биостимуляторы или животные корма. Кроме того, предусматриваются способы культивирования и/или модификации хемотрофных бактерий для повышения выхода аминокислот и/или белка и/или витаминов и/или снижения производственных затрат. В некоторых вариантах реализации генетически модифицированный микроорганизм (например, бактерия) продуцирует большее количество определенного типа или типов молекул витаминов или аминокислот, или белка, или фермента, по сравнению с тем же микроорганизмом, генетически не модифицированным.

[349] Конкретные примеры биореакторов, условий культивирования, гетеротрофного и хемотрофного роста, поддержания и способов производства аминокислот, белков, витаминов, других питательных веществ и/или цельноклеточных продуктов, описанные в данном документе, могут быть объединены любым пригодным способом для повышения эффективности роста микроорганизмов и производства аминокислот, белков, витаминов, других питательных веществ и/или цельных клеток.

Выделение продуктов после биопроцесса и приложения использования

[350] В определенных неограничительных вариантах реализации растительный биостимулятор и/или биоудобрение и/или органическое удобрение получают способом, описанным в данном документе. Некоторые варианты реализации включают добавление по меньшей мере одной из жидкости для ферментации аминокислот и/или микробных клеток в композицию биостимулятора для растений. В некоторых неограничительных вариантах реализации микробные клетки представляют собой грамотрицательные и/или грамположительные бактерии. В некоторых неограничительных вариантах реализации микробные клетки получают путем конверсии источника углерода C1, как описано в данном документе. Дополнительной целью некоторых вариантов реализации является

создание относительно недорогого способа приготовления биостимулятора и/или удобрения и/или питательных веществ из отходов и/или дешевого сырья. В определенных вариантах реализации аминокислоты и/или олигопептиды и/или низкомолекулярные пептиды получают из отходов и/или дешевого сырья, включая, без ограничений, источники углерода C1. В определенных вариантах реализации питательные вещества, полученные из отходов и/или дешевого сырья, включая, без ограничений, источники углерода C1, легко поглощаются и усваиваются растениями через листья и/или корни. В некоторых вариантах реализации поглощенные питательные вещества транспортируются в органы растений, такие как почки, цветки или плоды, например, (Gjalakshimi et al. (2004) *Bioresource Technology* (92):291-296; Parrado et al. (2008) *Bioresource Technology* 99:2312-2318). В определенных вариантах реализации растение может использовать аминокислоты и/или олигопептиды и/или низкомолекулярные пептиды для выработки собственных белков. В некоторых вариантах реализации это экономит метаболическую энергию, которая в противном случае расходовалась бы на один или большее количество энергоемких метаболических процессов в растении (Higgings, C.F., Payne, J.W. (1982) *Plant peptides*. In: Boulder, D., Parthier, B., (Eds). *Encyclopedia of Plant Physiology*, 14A. Springer. 438-458). В определенных вариантах реализации питательные вещества, полученные как описано в данном документе, могут использоваться микрофауной в эдафической среде, в том числе, без ограничений, в качестве источника углерода и/или азота. В некоторых вариантах реализации микрофауна превращает питательные вещества в формы, полезные для роста и активности растений. Аналогичным образом, аминокислоты, олигопептиды, низкомолекулярные пептиды и другие питательные вещества, получаемые, как описано в данном документе, также легко поглощаются и усваиваются животными при включении в их рацион.

[351] В определенных вариантах реализации микробные клетки получают как побочный продукт промышленного процесса, который генерирует микробную клеточную массу. Например, промышленный процесс может быть выбран из производства аминокислот, этанола, других спиртов, органических кислот, липидов и/или углеводов и/или очистки сточных вод. В некоторых неограниченных вариантах реализации предусматриваются клетки в отработанной среде производства по меньшей мере одной аминокислоты, например, выбранной из лизина, треонина, триптофана, глутаминовой кислоты, аргинина, гистидина, изолейцина, лейцина, метионина, фенилаланина, валина, глицина, серина, цистеина, тирозина, аланина, аспарагиновой кислоты, пролина, аспарагина и/или глутамина.

[352] В комплексной мультитрофической аквакультуре несколько видов выращиваются вместе таким образом, чтобы побочные продукты одного вида могли рециркулироваться в качестве корма для другого вида. В интегрированном сельском хозяйстве (особенно гидропонном) и аквакультуре пруды или рециркуляционные системы используются для разведения как морепродуктов, так и других организмов (например, рыбы и салата). В определенных вариантах реализации белок и/или другие питательные вещества, полученные, как описано в данном документе, используются в методах и технологиях выращивания салата и/или рыбы в одном или нескольких из следующего: рециркуляционные системы; комплексная мультитрофическая аквакультура; интегрированное сельское хозяйство и аквакультура.

[353] В некоторых вариантах реализации биореакторы содержат микроорганизм, который содержит по меньшей мере одну последовательность эндогенной или экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей фермент пути, приводящего к получению аминокислоты или белка, витамина или другого представляющего интерес питательного вещества. В некоторых вариантах реализации система включает два или более, три или более, или четыре или более биореакторов, по меньшей мере один из которых содержит микроорганизм, который включает, по меньшей мере, одну последовательность эндогенной или экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей фермент пути к аминокислоте или белку, или витамину, или другому питательному веществу, представляющему интерес. В некоторых вариантах реализации система биореакторов содержит, по меньшей мере, первый и второй биореактор, при этом первый биореактор содержит микроорганизм, который включает по меньшей мере одну эндогенную или экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей фермент пути к аминокислоте или белку, или витамину или другому представляющему интерес питательному веществу; и второй биореактор содержит микроорганизм, полученный от другого вида, при этом микроорганизм другого вида может содержать по меньшей мере одну последовательность экзогенной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации система биореакторов содержит первый биореактор, который содержит микроорганизм, как описано в данном документе, и второй биореактор, содержащий зоопланктон, грибки, микроводоросли, дрожжи или бактериальные клетки. В некоторых вариантах реализации система включает первый биореактор, который содержит микроорганизм, как описано в данном документе, и второй резервуар или сосуд, содержащий многоклеточное животное и/или аквакультуру и/или гидропонную систему.

[354] В некоторых неограниченных вариантах реализации микроорганизмы, описанные в данном документе, поддерживаются в симбиотических отношениях и/или

трофических отношениях с другими живыми организмами. Пример таких отношений проиллюстрирован на Фиг. 23.

[355] В некоторых вариантах реализации извлечение химических продуктов биосинтеза и/или отработанных питательных веществ из водного раствора бульона может быть проведено с использованием оборудования и методик, известных в области технологического проектирования, и нацеленных на химические продукты конкретных вариантов реализации, описанных в данном документе, включая, без ограничений: экстракцию растворителем; экстракцию водой; дистилляцию; фракционную перегонку; цементацию; химическое осаждение; абсорбцию щелочным раствором; абсорбцию или адсорбцию на активированном угле, ионообменной смоле или молекулярном сите; изменение pH раствора и/или окислительно-восстановительного потенциала, испарителей, фракционных кристаллизаторов, сепараторов твердой и жидкой фаз, нанофльтрацию и все их комбинации.

[356] В некоторых вариантах реализации биомасса, полученная, как описано в данном документе, превращается в продукт с высоким содержанием белка и/или с высоким содержанием витаминов и/или с высоким содержанием питательных веществ, предназначенный для применения в удобрениях, биостимуляторах, биоудобрениях, усилителях роста грибов, животных кормах и/или питании человека, с использованием способов и процессов, хорошо известных в области химии, химического машиностроения и/или науки о пищевых продуктах.

[357] В определенных вариантах реализации биомасса, полученная, как описано в данном документе, используется в качестве дополнительного питательного вещества. В определенных вариантах реализации биомасса используется в качестве материала органического удобрения для восстановления химических и микробных свойств почв и/или для повышения урожайности сельскохозяйственных культур.

[358] В некоторых вариантах реализации более 90% азота из аминокислот и/или пептидов и/или белка, продуцируемых микроорганизмами, впоследствии поглощается другими микроорганизмами, растениями, грибами, животными или людьми, которые потребляют аминокислоты, и/или пептиды и/или белки и/или белковую биомассу, полученные, как описано в данном документе. В некоторых вариантах реализации микробные клетки кипятят перед скармливанием другому организму. В других вариантах реализации клетки обрабатывают ультразвуком, или иным образом лизируют или разрушают перед скармливанием другому организму.

[359] В некоторых вариантах реализации готовят составы, комбинируя биомассу из одной или нескольких из следующих групп: штаммы с высоким содержанием белка;

штаммы с высоким содержанием масла/жира; штаммы с высоким содержанием углеводов/полисахаридов. В некоторых таких вариантах реализации полученная композиция имеет более пригодный баланс белков, масел и жиров и углеводов для рациона пищевых потребностей другого организма, чем любая подгруппа из коллекции штаммов, используемая отдельно.

[360] В некоторых вариантах реализации биомассу, извлеченную из биореактора, промывают водой, и в некоторых таких вариантах реализации разбавленная щелочь может быть включена в промывку для удаления связанных красящих и вкусовых веществ. В определенных вариантах реализации присутствует стадия пастеризации. В определенных вариантах пастеризация происходит при температуре около 105 °C (220 °F) в течение около пяти минут. В некоторых вариантах реализации микробные клетки кипятят перед использованием в качестве удобрения или скармливанием другому организму.

[361] Для облегчения переработки продукта биомассы в полезные продукты, собранные микробные клетки в некоторых вариантах реализации могут быть разрушены с использованием хорошо известных способов, включая, без ограничений, одно или несколько из следующего: измельчение в шаровой мельнице, давление кавитации, обработка ультразвуком, механическая сдвиговая нагрузка, гомогенизация под высоким давлением, песочная или коллоидная мельница, повторяющиеся циклы замораживания-оттаивания, литические ферменты. В некоторых вариантах реализации клетки подвергают одному или нескольким из следующих действий: измельчение в шаровой мельнице, давление кавитации, обработка ультразвуком, механическая сдвиговая нагрузка, гомогенизация под высоким давлением, песочная или коллоидная мельница, повторяющиеся циклы замораживания-оттаивания, литические ферменты, перед использованием в качестве удобрения или скармливанием другому организму.

[362] Большинство белков и других крупных биомолекул находятся внутри клетки, и в некоторых вариантах реализации эти биомолекулы извлекают из внутриклеточной среды [Doelle, H. W. *Microbial Process Development* (World Scientific, 1994). URL https://books.google.com/books?id=_qDabLa-0ukC]. Некоторые белки структурно связаны с нерастворимыми частями клетки, включая внутренние мембраны и/или ультраструктуры. Часто для выделения этих продуктов требуется сначала разрыв или разрушение клетки. В определенных вариантах реализации клетки разрываются или разрушаются. Существует много способов разрушения клеток, и конкретные типы клеток могут лучше всего подходить для одного или нескольких из них. Микроорганизмы (например, бактерии) варьируются от довольно хрупких до высокоэластичных. В определенных вариантах реализации способ разрушения клеток, известный специалисту в

данной области техники, который хорошо подходит для определенного типа клеток, используется для разрушения клеток, полученных, как описано в данном документе.

[363] Гомогенизаторы или прессы являются обычными устройствами, используемыми для лизиса микроорганизмов, таких как бактерии. Прессы лизируют клетки путем создания давления в клеточной суспензии и внезапного сброса давления. Это создает в жидкости сдвиговые нагрузки, способные лизировать клетки. В определенных вариантах реализации в процессе разрушения клеток используется гомогенизатор высокого давления. Пресс для давления на клетки Френча, или пресс Френча, представляет собой аппарат, используемый для разрушения плазматической мембраны клеток путем пропускания их через узкий клапан под высоким давлением. Гомогенизатор Гаулина (Gaulin) - это машина, используемая для создания стабильных эмульсий и дисперсий во многих отраслях промышленности, включая пищевую и молочную, фармацевтическую, нефтяную и химическую. Типичные рабочие давления для прессы Френча и гомогенизатора Мантона-Гаулина составляют 41,4-69 МПа (6000-10000 фунтов на квадратный дюйм). Многократные (например, около 2-3 раза) проходы обычно требуются для достижения достаточной степени лизиса. Однако высокое рабочее давление приводит к повышению рабочей температуры. Поэтому камеры под давлением часто охлаждают (например, ок. 4 °C) перед использованием. Пресс Хьюза продавливает замороженную суспензию клеток через небольшой зазор в приемной камере при давлении от 70 до 550 МПа (700-5500 бар). Можно использовать ширину зазора до 25 мкм. X-Press представляет собой модификацию прессы Хьюза в том смысле, что он также работает с замороженными клетками. В этом случае клетки пропускаются через цилиндрическое отверстие в диске. Двухплунжерная конструкция позволяет несколько раз пропускать клетки вперед-назад для увеличения степени повреждения клеток. X-прессы работают при давлении от 200 до 600 МПа (2000-6000 бар).

[364] В определенных вариантах реализации для разрушения клеток используются один или большее количество из следующих гомогенизаторов или прессов: Гаулина; Мантона-Гаулина; Френча; Chaikoff; Хьюза; X-Press; и/или фракционер Sorvall-Ribi. Фракционер Sorvall-Ribi представляет собой модификацию прессы Френча (or the French Press), в которой игольчатый клапан имеет устройство охлаждения охлажденным азотом. В некоторых вариантах реализации изобретения клетки подвергаются воздействию давления, превышающего 1000 бар (100 МПа), или превышающего 1700 бар (170 МПа), или превышающего 2400 бар (240 МПа) во фракционаторе Sorvall-Ribi. Некоторые более современные гомогенизаторы часто являются устройствами непрерывного действия и могут работать при более высоких давлениях, чем более старые модели. Сообщалось, что

аппарат Avestin Emulsiflex-C5 эффективно лизирует клетки E.coli за один проход при 15000 фунтов на квадратный дюйм (100 МПа). В некоторых неограничительных вариантах реализации Avestin Emulsiflex-C5 используется для лизиса клеток. В некоторых неограничительных вариантах реализации лизис клеток осуществляется за один проход через гомогенизатор. В определенных неограничительных вариантах реализации клетки в гомогенизаторе подвергаются воздействию давления около 103 МПа (15000 фунтов на квадратный дюйм) или выше. В некоторых неограничительных вариантах реализации гомогенизация происходит при следующих условиях: давление от 34,5 до 103,3 МПа (5000-15000 фунтов на кв. дюйм); от 1 до 5 проходов через гомогенизатор; температура от 0 до 50 °C (32-122 °F); pH 4,5-6,5.

[365] Было обнаружено, что ультразвук и обработка ультразвуком являются пригодной методикой разрушения почти для всех типов клеток, за исключением, возможно, грибов. Клетки лизируют путем создания сдвиговой нагрузки в жидкости и кавитации. Проблемой является контроль температуры. Эта задача решается путем удерживания суспензии на льду и использования нескольких коротких импульсов (5-10 секунд) с паузами (10-30 секунд) для восстановления низкой температуры. ДНК также разрывается при обработке ультразвуком. В некоторых вариантах реализации нет необходимости добавлять ДНКазу в клеточную суспензию для гидролиза ДНК. В определенных вариантах реализации ультразвук используется при разрушении бактериальных и/или архейных клеток.

[366] В определенных вариантах реализации разрушение клеток осуществляется путем помола материала клеток на твердых поверхностях. Эффективное разрушение большинства типов клеток было продемонстрировано для бисерных мельниц, включая растительные, дрожжевые и бактериальные клетки. Доступны системы объемом до 20 литров с указанным выходом более 90% для разрушения дрожжей при производительности 40-70 кг/ч, и до 80% при 200 кг/ч [Doelle, H. W. Microbial Process Development (World Scientific, 1994). URL https://books.google.com/books?id=_qDabLa-0ukC]. В определенных вариантах реализации для разрушения клеток используют один или большее количество способов измельчения, включая, без ограничений: пестик и ступку (с абразивными порошками или без них); гомогенизатор Поттера-Эльвейема (Potter-Elvehjem); гомогенизатор Braun; бисерные мельницы и/или коллоидные мельницы. В определенных вариантах реализации оптимизируют один или большее количество факторов для наиболее эффективного и/или экономически эффективного разрушения клеток, включая, без ограничений: время пребывания в системе; размер и

плотность бисера, а также его количество и состав; скорость вращения ротора; конструкцию лопастей и/или оси ротора; концентрацию клеток; вязкость; и температуру.

[367] В некоторых вариантах реализации немеханические способы могут использоваться для лизиса клеток в дополнение к механическим способам или без дополнительных механических способов, включая физический и/или химический и/или ферментативный лизис клеток.

[368] Осмотический шок возникает, когда клетки суспендируют в гипотоническом растворе; вода будет диффундировать в клетку, заставляя ее набухать и в конечном итоге лопаться. Эта методика является относительно нежной и контролируемой. Типичные растворы включают, например, 1М глицерин, 1М сахарозу, дистиллированную воду или просто разбавление супернатанта. В некоторых неограничительных вариантах реализации осмотический шок используется как часть процесса лизиса клеток.

[369] В некоторых неограничительных вариантах реализации сброс давления используется как часть процесса лизиса клеток. В определенных вариантах реализации суспензию клеток помещают под давление газа и оставляются для уравнивания. Напряжение газа в бульоне и клеточной цитоплазме увеличивается. При внезапном сбросе давления газ десорбируется из раствора, и расширение внутри клеток приводит к их взрыву. В некоторых таких вариантах реализации суспензию клеток помещают под давление до 60 бар (6 МПа). В некоторых неограничительных вариантах реализации суспензию клеток уравнивают под давлением закиси азота 35 бар (3,5 МПа) или выше в течение 3 минут или более. В других неограничительных вариантах реализации клеточную суспензию уравнивают при давлении азота 35 бар (3,5 МПа) или выше в течение 3 минут или более.

[370] В некоторых неограничительных вариантах реализации замораживание и оттаивание используют как часть процесса лизиса клеток. Замораживание клеток с последующим оттаиванием часто разрывает мембраны под действием кристаллов льда, которые пронзают клетку. В определенных вариантах реализации используется один или большее количество циклов замораживания-оттаивания.

[371] В определенных вариантах реализации комбинация замораживания и измельчения используется как часть процесса лизиса клеток. В некоторых вариантах реализации клетки замораживают, используя, например, без ограничений, жидкий азот, и затем замороженные клетки измельчают в порошок, используя один или большее количество сеансов измельчения и помола, описанных выше. В некоторых вариантах используют ступку и пестик, которые также охлаждают жидким азотом. В определенных

вариантах реализации клеточный лизат готовят путем добавления указанного замороженного измельченного порошка к 5 объемам буфера.

[372] Высушивание или обезвоживание обычно используются для разрушения микробных клеток, часто делая их чувствительными к воздействию буфера. В некоторых неограничительных вариантах реализации сушка или обезвоживание и/или действие буферов используется как часть процесса лизиса клеток. В некоторых вариантах реализации вакуум может применяться для ускорения процесса. В некоторых вариантах реализации может быть использована сублимационная сушка, а в других вариантах - медленная сушка на воздухе. В некоторых вариантах реализации может использоваться сушка с летучими химическими веществами. Реагенты, такие как ацетон, этанол и эфир, могут улучшить растворимость продукта в буфере. В некоторых неограничительных вариантах реализации ацетон, и/или этанол, и/или эфир используют как часть процесса лизиса клеток.

[373] В некоторых неограничительных вариантах реализации ферментативный лизис используется как часть процесса лизиса клеток. Один или несколько ферментов могут быть использованы для лизиса клеточных стенок путем атаки специфических связей. Ферментативный лизис может быть основан, например, на гидролизе пептидогликанового слоя бактериальной клетки. Фермент обычно теряется в каждой разрушаемой партии, хотя в некоторых ситуациях фермент можно конъюгировать с макромолекулой и извлекать его ультрафильтрацией. В некоторых неограничительных вариантах реализации литический фермент(ы) конъюгируют с макромолекулой и/или извлекают ультрафильтрацией. Обычно используемым ферментом является лизоцим, который получают из яичного белка. Он атакует пептиды мурамовой кислоты в клеточных стенках и продемонстрировал эффективность по отношению к грамположительным и грамотрицательным бактериям. Однако грамотрицательные бактерии имеют наружную мембрану, которая является внешней по отношению к клеточной стенке и должна быть пермеабелизована для воздействия на пептидогликановый слой. Трис, часто используемый в качестве буфера в методах лизиса, эффективно пермеабелизует внешние мембраны. Этот эффект может быть усилен добавлением этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) (например, ок. 1 мМ). ЭДТА хелатирует ионы магния, которые стабилизируют мембраны. В некоторых неограничительных вариантах реализации один или большее количество лизоцимов используются в качестве части процесса лизиса клеток. В некоторых неограничительных вариантах реализации трис используется в качестве буфера при лизисе. В некоторых неограничительных вариантах реализации ЭДТА используется в качестве хелатирующего агента при лизисе. В

некоторых неограничительных вариантах реализации ферментативный лизис проводится в сочетании с обработкой ультразвуком.

[374] В определенных неограничительных вариантах реализации детергенты и/или растворители и/или другие химические вещества используются как часть процесса лизиса клеток. Катионные и анионные детергенты, щелочи, кислоты и растворители, такие как хлороформ и толуол, эффективно повреждают липиды или липопротеины клеточной мембраны. В некоторых неограничительных вариантах реализации катионный и/или анионный детергент(ы) и/или щелочь(и) и/или кислота(ы) и/или растворитель(и), такие как, без ограничений, хлороформ или толуол, используются как часть процесса лизиса клеток. В некоторых таких вариантах реализации химический агент выбирают таким образом, чтобы не образовывались остатки, которые являются токсичными или вредными для растений и/или грибов, и/или животных, и/или окружающей среды в конечном продукте после процесса лизиса клеток. В некоторых таких вариантах реализации процесс удаления до безопасных уровней любых химических веществ, которые могут оказывать вредное воздействие на растения и/или грибки, и/или животных, и/или окружающую среду, такие как хорошо известные в данной области техники, осуществляются после процесса лизиса клеток.

[375] Антибиотики, такие как полимиксины, амфотерицин В и/или нистатин, увеличивают проницаемость бактериальных мембран и могут вызывать лизис. Антибиотики на основе пенициллина являются эффективными ингибиторами синтеза клеточной стенки бактерий, но имеют значение для разрушения клеток только пока клетки находятся на стадии активного роста. В некоторых неограничительных вариантах реализации изобретения антибиотики, включая, без ограничений, один или большее количество из полимиксинов, амфотерицина В, нистатина и/или пенициллина, используются как часть процесса лизиса клеток. В некоторых таких вариантах реализации антибиотик выбирают так, чтобы в конечном продукте после процесса лизиса клеток не было остатков, являющихся токсичными или вредными для растений и/или грибов, и/или животных, и/или окружающей среды, и/или может усугубить медицинскую проблему микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам.

[376] В некоторых неограничительных вариантах реализации бактериофаг используется как часть процесса лизиса клеток. Большинство групп бактерий чувствительны к бактериофагам. Фаги несут фермент, который гидролизует клеточные мембраны для проникновения нуклеиновых кислот. Тяжелая инфекция может привести к лизису. В таких вариантах реализации рециркуляция такого фагового загрязнения в ферментационный сосуд представляет большой риск, и для предотвращения такого

загрязнения осуществляются стадии предотвращения такого загрязнения, известные специалисту в данной области техники.

[377] При разрушении клеток любым способом обычно получают фракцию клеточного дебриса и фракцию растворимого цитоплазматического компонента. Эти фракции могут быть разделены такими способами, как, без ограничений, центрифугирование или фильтрация. К растворимым цитоплазматическим составляющим относятся нуклеиновая кислота и белок, как по отдельности, так и в сочетании. Значительные количества ДНК могут высвободиться при лизисе клеток, увеличивая вязкость. В некоторых неограничительных вариантах реализации ДНКазу (например, ок. 1 мг/мл) добавляют для снижения вязкости лизированного препарата. После лизиса клеток выделение белка изоэлектрическим осаждением может давать белковый продукт, содержащий нуклеиновые кислоты, что нежелательно в определенных вариантах реализации. В определенных вариантах реализации предпринимаются меры, хорошо известные в данной области, для уменьшения или устранения содержания нуклеиновых кислот в белковом материале.

[378] В определенных вариантах реализации получают экстракты клеточного материала. В некоторых таких вариантах реализации экстракты представляют собой органические экстракты. В некоторых таких вариантах реализации экстракты представляют собой ферментные экстракты. Предусматриваются клеточные экстракты, полученные или получаемые такими способами. В некоторых вариантах реализации клеточные экстракты (например, органические экстракты) используются в сельском хозяйстве, кормлении животных и/или непосредственно в питании человека.

[379] Как описано в данном документе, экспрессионная культура и/или бульон относится к клеточной суспензии, полученной с помощью раскрытых в данном документе биопроцессов, в которых могут использоваться источники углерода C1 и/или источники органического углерода для роста и продуцирования микробов. Более конкретно, культура и/или бульон включают клетки микроорганизмов и/или продукты их метаболизма и/или непоглощенные питательные вещества, которые могут включать, без ограничений, одно или несколько из следующего: белок, водорастворимый комплекс витаминов группы В, другие витамины, фосфаты, минералы, такие как, без ограничений, калий, сера, магний, кальций и/или натрий, насыщенные и/или ненасыщенные жирные кислоты, лецитин, цефалины, углеводы, такие как гликоген, трегалоза, глюкан и/или маннан, этиловый спирт, диоксид углерода, сложные эфиры, альдегиды, кетоны и высшие спирты и т.д. Эти остатки могут быть суспендированы и/или растворены в водном растворе в том виде, в каком они выходят из биореактора, без сушки или

концентрирования, или в концентрированной жидкой или твердой форме после удаления воды. Остаточная вода может быть отделена любым обычным способом, таким как, без ограничений, например, фильтрация, седиментация или центрифугирование.

[380] В патентной заявке США № 2003/022357 описано биологическое удобрение на основе дрожжевых клеток рода *Saccharomyces* и осадка из хранилищ сточных вод или очистных сооружений, для производства которых дрожжевые клетки активируют путем применения магнитного поля. В некоторых неограничительных вариантах реализации данного изобретения клетки микроорганизмов, выращенные на исходном сырье С1, активируются путем применения магнитного поля. В патентной заявке США № US2002/187900 описано биологическое удобрение, содержащее электромагнитно активированные дрожжевые клетки рода *Saccharomyces* в сочетании с навозом крупного рогатого скота, а в патентной заявке США № US2002/187552 раскрыто биологическое удобрение, которое также содержит электромагнитно активированные клетки *Saccharomyces* в сочетании с птичьим пометом. В некоторых неограничительных вариантах реализации данного изобретения клетки микроорганизмов, которые были выращены на газообразных субстратах, включая, без ограничений, один или большее количество из H_2 , CO_2 , CO и CH_4 , активируются электромагнитным способом. В определенных вариантах реализации клетки объединяют с одним или несколькими другими ингредиентами, включая, без ограничений, навоз крупного рогатого скота и/или птичий помет и/или другие навозы и/или экстракты из растений, морских водорослей и/или бурых водорослей, и/или животных отходов.

Гидролиз белков

[381] В некоторых неограничительных вариантах реализации органические экстракты из клеток микроорганизмов (микробов), как описано в данном документе, содержат почти все белковое содержимое в гидролизованном состоянии, включая одну или несколько свободных аминокислот, олигопептиды и/или другие пептиды с более высокой молекулярной массой, как а также практически все питательные вещества исходного цельноклеточного материала. В некоторых таких вариантах реализации экстракты обладают высокой биоудобряющей и/или биостимулирующей способностью, а также более высокой способностью к биопоглощению грибами и/или животными и/или растениями. В определенных вариантах реализации такие экстрагированные продукты полезны в органическом земледелии, и/или в кормах для животных, и/или в гидропонном земледелии, и/или в качестве добавок с высокой пищевой ценностью для скота и/или аквакультуры, и/или в качестве питательных веществ для роста гетеротрофных

микроорганизмов и/или макроорганизмов и/или питательных веществ для непосредственного потребления человеком.

[382] В некоторых неограничительных вариантах реализации микробные клетки, как описано в данном документе, гидролизуют для получения гидролизата. В различных примерных вариантах реализации способы получения биостимуляторов растений включают гидролиз микробных клеток для получения гидролизата и составление композиции гидролизата в качестве биостимулятора растений и/или питательного вещества для растений и/или удобрения для внекорневого внесения и/или применения в качестве адъюванта для почвы и/или применения в качестве удобрения почвы. В некоторых неограничительных вариантах реализации гидролизат используется в покрытиях семян для усиления прорастания и раннего роста овощных и цветочных культур, листовых растений и газонных трав. Некоторые неограничительные варианты реализации включают способ получения биостимулятора растений и/или удобрения, включающий: гидролиз микробных клеток, например, выращенных, как описано в данном документе, для получения гидролизата; и составление композиции гидролизата в качестве биостимулятора растений для внекорневого внесения или применения в качестве почвенного адъюванта или применения в покрытиях семян. В некоторых неограничительных вариантах реализации гидролиз микробных клеток включает гидролиз кремообразной клеточной массы (cell cream), имеющей содержание твердых веществ от около 1 до около 30 весовых процентов. В некоторых неограничительных вариантах реализации гидролиз микробных клеток включает гидролиз кремообразной клеточной массы, имеющего содержание азота от около 0,12 до около 4% мас. Микробные клетки могут быть обработаны гидролизом с получением соединений с более короткой цепью и значительно меньшей вязкостью по сравнению с интактными или частично лизированными клетками. Хотя можно использовать другие клетки, микробные клетки (предпочтительно, прокариотические клетки, и более предпочтительно, бактериальные или эубактериальные клетки) используют для приготовления растительных биостимуляторов и/или грибковых питательных веществ в соответствии с определенными вариантами осуществления, как описано в данном документе. Аминсодержащие соединения могут быть получены путем гидролиза растительных или животных клеток. Приведенные в данном документе примеры способов с гидролизом микробных клеток могут также давать биоактивные соединения, такие как пептидогликаны, липополисахариды, жиры, липиды, витамины, углеводы, фенолы, минеральные элементы, фитогормоны, аминсодержащие соединения и полиамины, которые могут выступать в роли биостимуляторов растений.

[383] Гидролиз микробных клеток можно проводить любым известным способом, который в значительной степени лизирует клеточные компоненты до короткоцепочечных или отдельных соединений (single compounds). Альтернативно, для получения из клеток биостимулятора растений и/или удобрения можно применять частичный гидролиз, используя менее энергоемкий и более короткий период гидролиза.

[384] Ферментативный гидролиз может использоваться в вариантах реализации, в которых микробные клетки поддаются такому ферментативному гидролизу. В некоторых неограничительных вариантах реализации гидролиз микробных клеток включают проведение ферментативного гидролиза. После окончательного ферментативного гидролиза получают продукт, который можно назвать "экстрактом органического фермента" (organic enzyme extract). Органический фермент может быть использован как таковой для целей сельского хозяйства, животноводства и/или питания человека. В некоторых вариантах реализации экстракт органического фермента, описанный в данном документе, используется в применениях, относящихся к сельскому хозяйству, кормлению животных и/или гетеротрофной ферментации. В некоторых вариантах реализации экстракт органического фермента может быть использован в качестве биостимулятора и/или в качестве биоудобрения в органическом сельском хозяйстве, учитывая его особый состав аминокислот, олигопептидов и пептидов, имеющих низкую молекулярную массу, что обеспечивает возможность поглощения этих молекул растениями и/или почвенными организмами. В некоторых вариантах реализации биостимуляторы, полученные в соответствии с описанными в данном документе способами и применяемые к сельскохозяйственным культурам, дают один или большее количество из следующих результатов: улучшенные показатели качества сельскохозяйственных культур и/или эффективности питательных веществ; увеличение скорости роста; повышение скорости фотосинтеза; увеличение урожайности; усиленный рост корней и листьев растений; повышение устойчивости к абиотическим стрессам; повышение переносимости заболеваний; улучшение качества почвы; меньший рост сорняков. В некоторых вариантах реализации биостимуляторы, полученные в соответствии с описанными в данном документе способами, повышают эффективность использования питательных веществ сельскохозяйственными культурами, к которым был применен указанный биостимулятор, и/или уменьшают выщелачивание в окружающую среду питательных веществ с полей, на которых выращиваются культуры. В некоторых неограничительных вариантах реализации биостимуляторы, полученные в соответствии со способами, описанными в данном документе, повышают устойчивость растений к стресс-факторам и/или увеличивают репродуктивную способность растений и/или имеют большую эффективность на дозу, чем

доступные в настоящее время коммерческие продукты, и/или создают пониженный риск травмирования растений в случае чрезмерного применения по сравнению с доступными в настоящее время коммерческими продуктами. В определенных вариантах реализации белковый гидролизат или органический экстракт, описанные в данном документе, стимулируют желательные природные почвенные микроорганизмы, такие как N₂-фиксирующие, фосфорсольбилизирующие и продуцирующие индолуксусную кислоту бактерии. В некоторых неограничительных вариантах реализации стимулированные микроорганизмы включают *Azospirillum* sp. и/или *Azotobacter* sp. В определенных вариантах реализации экстракт органического фермента можно использовать в качестве питательного вещества или добавки для грибов (например, шляпочных грибов). В определенных вариантах реализации экстракт органического фермента можно использовать как высокоценную пищевую добавку в качестве животного корма, в частности, корма для скота (крупного рогатого скота, овец, коз и т.д.) и/или для аквакультуры, и/или для насекомых (например, пчел) или других беспозвоночных (например, красных калифорнийских червей (red worms)) и/или для гетеротрофной ферментации, и/или для домашних животных или ручных животных, и/или для непосредственного потребления человеком.

[385] В некоторых вариантах реализации экстракт содержит по существу весь исходный белок в гидролизованной форме. В некоторых неограничительных вариантах реализации более 90% мас. исходного белка находится в гидролизованной форме, например, в форме свободных аминокислот, олигопептидов и других пептидов, имеющих более высокую молекулярную массу. В некоторых неограничительных вариантах реализации гидролизат содержит по существу все питательные вещества из клеток культуры, поступающей в процесс гидролиза. В определенных вариантах реализации внеклеточные питательные вещества из жидкого раствора или суспензии органического вещества также включены в продукт. В некоторых вариантах реализации предусматривается гидролизат и/или экстракт органического фермента, полученный или получаемый способом, описанным в данном документе. В некоторых вариантах реализации экстракт богат белками, например, в основном в форме пептидов (например, олигопептидов и пептидов, имеющих низкую молекулярную массу менее 10000 дальтон) и свободных аминокислот. В определенных вариантах реализации свободные аминокислоты имеют высокую способность к биоабсорбции. В определенных вариантах реализации экстракт содержит углеводы. Используя такие ферменты, как описано в данном документе, можно получить растительные биостимуляторы, используя альтернативы сильным кислотам или основаниям при гидролизе. В различных типичных

вариантах реализации ферментативный гидролиз клеток микроорганизмов (например, бактериальных) может быть осуществлен с использованием любого пригодного фермента или композиции ферментов.

[386] В определенных неограничительных вариантах реализации микроорганизмы гидролизуют, по меньшей мере, одним ферментом, который способен гидролизовать микробные (например, бактериальные) белки до свободных аминокислот и/или коротких пептидов. В некоторых вариантах реализации ферментативный гидролиз включает гидролиз очищенным ферментом. В некоторых вариантах реализации ферментативный гидролиз включает гидролиз смесью фермента и среды, в которой был приготовлен фермент. В определенных вариантах реализации ферментативный гидролиз включает гидролиз ферментом растительного, и/или животного, и/или бактериального, и/или архейного, и/или грибкового происхождения. В некоторых вариантах реализации ферментативный гидролиз включает гидролиз смесью одного или нескольких ферментов растительного, животного, бактериального, архейного и/или грибкового происхождения. В определенных вариантах реализации гидролитический фермент продуцируется штаммом микроорганизма, как описано в данном документе. В некоторых вариантах реализации гидролитический фермент получают из субстратов C1 и/или H₂ и/или сырьевого синтез-газа. В типичных вариантах реализации бактериальные клетки могут быть гидролизованы одной или несколькими протеазами, липазами и амилазами. В некоторых вариантах реализации ферментативный гидролиз включает один или большее количество протеолитических ферментов (микроорганизмов) микробного, растительного, грибкового и/или животного происхождения. В определенных вариантах реализации способ включает использование щелочной протеазы. В некоторых вариантах реализации ферментативный гидролиз включает гидролиз по меньшей мере одним ферментом, выбранным из панкреатина, папаина, бромелаина, фицина, бактериальной протеазы, грибковой протеазы, нейтральной протеазы, продуцируемой *Bacillus* sp. алкалаза 2.4L, *Bacillus licheniformis*, и/или субтилизин carlesberg, эспераза *B. lentus*, нутраза *B. amyloliquifacis*, протамекс *Bacillus* sp., теролизин/теролаза (Therolysin/therolase) *B. thermoproteolyticus*, флавозим (Flavouzyme) *Aspergillus oryzae*, протеаза *N. B. subtilis*, трипсин, химотрипсин, кератиназа, пепсин, субтилизин и/или ренин. Специалисту в данной области понятно, что панкреатин включает смесь пищеварительных ферментов, протеаз, липаз и амилаз.

[387] Ферментативный гидролиз микробных (например, бактериальных) клеток может включать объединение фермента и бактериальных клеток в любом пригодном количестве при любых пригодных условиях. Как правило, количества реагентов, условия

реакции и последовательности стадий реакции выбирают для достижения идеальной активности фермента. В определенных вариантах реализации значения давления, температуры, рН и времени ферментативного гидролиза являются такими, при которых достигается максимальный или пригодный уровень активности фермента. В некоторых вариантах реализации ферментативный гидролиз включает объединение фермента и бактериальных клеток в весовом соотношении от около 0,1 до около 10 г фермента на 100 г содержания азота в микробных (например, бактериальных) клетках. В другом конкретном варианте реализации ферментативный гидролиз проводят с использованием концентрации 0,05-0,5% об. маточного раствора фермента с активностью около 70000 единиц по результатам анализа с азоказеином. В различных примерных вариантах реализации может быть использован любой пригодный способ повышения эффективности ферментативного гидролиза микробных (например, бактериальных) клеток. В некоторых вариантах реализации ферментативный гидролиз включает объединение фермента и микробных клеток и перемешивание объединенных фермента и микробных клеток любым пригодным способом. Ферментативную обработку можно проводить в любом пригодном устройстве, известном специалисту в данной области, например, в реакторе с контролем температуры и перемешиванием.

[388] Как указано выше, гидролиз может проводиться в любых пригодных условиях, однако в различных типичных вариантах реализации гидролиз может проводиться при рН в диапазоне от 2 до около 10. В некоторых вариантах реализации ферментативный гидролиз проводят в условиях рН, находящегося в диапазоне рН от 4 до 12. В других вариантах реализации гидролиз проводят в диапазоне рН от 5 до 9,5 или при рН 6-8, или при рН 7. Следует понимать, что каждый тип фермента гидролизует при своем собственном оптимальном рН, и оптимальный рН может варьироваться в зависимости от желаемой скорости и степени гидролиза. В некоторых конкретных вариантах реализации значение рН во время ферментативного гидролиза поддерживается постоянным путем добавления основания, такого как, например, гидроксид аммония или гидроксид калия, а в других вариантах реализации рН поддерживают путем добавления кислоты. В различных примерных вариантах реализации гидролиз может проводиться при температуре от 15,5 до 55 °С и в течение периода времени от 2 до 120 часов. В некоторых вариантах реализации ферментативный гидролиз проводят в условиях температуры в диапазоне от 10 до 80 °С, и в других вариантах реализации - в диапазоне температур от 10 до 65 °С или от 10 до 55 °С.

[389] В некоторых вариантах реализации проведение ферментативного гидролиза включает взаимодействие фермента и микробных клеток в присутствии катализатора.

Может быть использован любой катализатор, который улучшает эффективность фермента или ферментов, такой как гетерогенные катализаторы, гомогенные катализаторы и/или электрокатализаторы. В некоторых таких вариантах реализации катализатор содержит, по меньшей мере, что-то одно из железа, меди, кобальта, никеля, бора, магния, кальция и редкоземельных металлов, таких как, без ограничений, лантан. В некоторых вариантах реализации ферментативный гидролиз включает взаимодействие фермента и микробных клеток при подаче электрического тока. В некоторых вариантах реализации ферментативный гидролиз включает обработку микробных клеток электрическим током до и/или во время ферментативного гидролиза микробных клеток. Электрический ток может быть приложен к клеткам любым пригодным способом и в любых пригодных условиях. Примерные способы и условия для подачи электрического тока описаны, например, в Tokuda, et al. (2006) "Effects of electrical pre-treatment on the hydrolysis of agricultural Wastes," J. Brewing Soc. Jap., 101(10): 769-775, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки. В различных примерных вариантах реализации электрический ток подается в количестве от 2 В до 120 В в течение периодов времени от 1 до 60 минут.

[390] Различные иллюстративные варианты реализации способов, описанных в данном документе, могут дополнительно включать предварительную обработку перед ферментативным гидролизом микробных (например, бактериальных) клеток. Эффективность гидролиза микробного белка с использованием ферментов может быть улучшена с помощью различных методов предварительной обработки. Такие способы предварительной обработки, как полагают, ухудшают структуру клеток и, таким образом, увеличивают скорость и степень гидролиза ферментом. Увеличивая эффективность гидролиза белка, можно проводить гидролиз с использованием меньшего количества фермента, или проводить гидролиз за меньшее время, чем обычно требуется для данного количества фермента. Особенно желательно проводить гидролиз с использованием меньшего количества фермента, поскольку уменьшение количества используемого фермента может существенно снизить производственные затраты.

[391] В некоторых вариантах реализации проведение ферментативного гидролиза включает обработку микробных (например, бактериальных) клеток слабой кислотой или слабым основанием перед ферментативным гидролизом микробных клеток. В различных иллюстративных вариантах реализации предварительную обработку слабой кислотой проводят путем регулирования рН бульона до значения в диапазоне от 3 до 5, с использованием такой кислоты, как, без ограничений, соляная кислота или серная кислота. В определенных вариантах реализации предварительная обработка слабой

кислотой может проводиться при температуре от 100 до 130 °С в течение периода времени от 0,25 до 10 часов. В различных иллюстративных вариантах реализации предварительную обработку слабым основанием проводят путем корректировки pH бактериальных клеток до 9-12 с использованием основания, такого как, без ограничений, гидроксид натрия, гидроксид калия или аммиак. В некоторых вариантах реализации предварительная обработка слабым основанием может проводиться при температуре от 100 до 130 °С в течение периода времени от 0,25 до 10 часов. В некоторых вариантах реализации ферментативный гидролиз включает обработку микробных клеток ультразвуковыми колебаниями до и/или во время ферментативного гидролиза микробных клеток. В некоторых вариантах реализации ферментативный гидролиз включает обработку микробных клеток сверхкритической водой и/или сверхкритическим диоксидом углерода перед ферментативным гидролизом микробных клеток.

[392] Определенные варианты реализации включают способ получения гидролизата или экстракта органического фермента посредством синтеза "в одном сосуде". В контексте изобретения выражение "в одном сосуде" означает, что процедура проводится без промежуточных стадий разделения. В некоторых вариантах реализации физическая обработка клеточного бульона происходит без разделения фаз при сверхатмосферном давлении и высокой температуре, причем клеточный бульон обрабатывают концентрированным основанием перед проведением ферментативного гидролиза. В некоторых вариантах реализации клеточный бульон подвергают синтезу "в одном сосуде", который в определенных неограничительных вариантах реализации включает стадии: (а) добавления концентрированного основания к бульону, содержащему клеточную суспензию, для регулирования его pH; (b) воздействия сверхатмосферного давления и высокой температуры на смесь, полученную на стадии (а); и (с) проведения ферментативного гидролиза смеси, полученной на стадии (b) для получения экстракта органического фермента. В некоторых вариантах реализации для щелочной обработки на стадии (а) используют пригодное основание, выбранное из одного или нескольких из гидроксида аммония, гидроксида калия и/или гидроксида кальция. В некоторых вариантах реализации основание используется в концентрированной форме, чтобы избежать избыточного увеличения реакционного объема, что будет увеличивать затраты энергии на нагрев, концентрирование и т.д., а также стоимость оборудования. В определенных вариантах реализации эту концентрацию выбирают в соответствии с желаемым диапазоном pH для последующего ферментативного гидролиза. В некоторых неограничительных вариантах реализации используется гидроксид аммония в количестве приблизительно 28% мас., а в других - приблизительно 10М гидроксид калия.

[393] В некоторых вариантах реализации после щелочной обработки бульона физическая обработка смеси проводится при сверхатмосферном давлении и/или высокой температуре. В одном конкретном неограничительном варианте реализации на стадии (b) прикладывают давление 102-141 кПа при повышенной температуре. В некоторых конкретных вариантах реализации при физической обработке используют температуру 90-140 °С. В некоторых конкретных вариантах реализации на стадии (b) прикладывают давление 102-141 кПа при температуре 90-140 °С. Такую физическую обработку проводят в любом пригодном устройстве, выбранном специалистом в данной области, например, в автоклаве.

[394] В определенных вариантах реализации ферментативную обработку проводят после физической обработки. В некоторых вариантах реализации после физической обработки и перед ферментативной обработкой добавляют концентрированное основание и/или кислоту, чтобы обрабатываемая смесь имела оптимальное значение pH для используемого фермента. В некоторых вариантах реализации один или большее количество ферментов, используемых в ферментативном гидролизе на стадии (c), представляют собой протеолитический фермент микробного, растительного, грибкового или животного происхождения. В конкретном варианте реализации ферментативный гидролиз на стадии (c) проводят при температуре 40-70 °С и pH 8-11 в течение периода времени 2-48 часов. В некоторых вариантах реализации синтез в одном сосуде упрощает процесс и/или уменьшает затраты и/или является менее загрязняющим, чем сопоставимые процессы в нескольких сосудах.

[395] Гидролиз микробных (например, бактериальных) клеток с использованием ферментов или без них может быть осуществлен путем применения кислотного или щелочного гидролиза в сочетании с условиями достаточного нагрева и давления. В некоторых неограничительных вариантах реализации гидролиз микробных клеток включает проведение кислотного гидролиза. В некоторых таких вариантах реализации кислотный гидролиз включает регулирование pH композиции, содержащей микробные клетки, с помощью по меньшей мере одного агента, выбранного из серной кислоты, соляной кислоты, фосфорной кислоты, угольной кислоты, борной кислоты, уксусной кислоты, пропионовой кислоты и лимонной кислоты. В различных иллюстративных вариантах реализации кислотный гидролиз проводят путем доведения pH кремообразной массы микробных клеток (microbial cell cream) до значения pH от около 0,5 до около 5. В некоторых таких вариантах реализации кислотный гидролиз включает регулирование pH композиции, содержащей микробные (например, бактериальные) клетки, и нагревание композиции с отрегулированным значением pH до температуры от 30 до 200 °С в течение

периодов времени от около 10 минут до около 48 часов. В некоторых таких вариантах реализации кислотный гидролиз включает регулирование рН композиции, содержащей микробные (например, бактериальные) клетки, и нагревание композиции с отрегулированным значением рН под давлением. В некоторых неограничительных вариантах реализации гидролиз микробных клеток включает проведение щелочного гидролиза. В некоторых таких вариантах реализации щелочной гидролиз включает доведение рН композиции, содержащей микробные клетки, до значения рН от около 8 до около 14. В некоторых таких вариантах реализации щелочной гидролиз включает регулирование рН композиции, содержащей клетки микроорганизмов, с помощью по меньшей мере одного агента, выбранного из гидроксида калия, гидроксида натрия, оксида кальция, оксида магния и аммиака. В некоторых таких вариантах реализации щелочной гидролиз включает регулирование рН композиции, содержащей микробные (например, бактериальные) клетки, и нагревание композиции с отрегулированным значением рН до температуры от 30 °С до 200 °С в течение периодов времени от около 10 минут до около 48 часов. В некоторых таких вариантах реализации щелочной гидролиз включает регулирование рН композиции, содержащей микробные (например, бактериальные) клетки, и нагревание композиции с отрегулированным значением рН под давлением. Такие методики кислотного или щелочного гидролиза, которые описаны в данном документе, обычно дают гидролизат, содержащий растворимые вещества и обломки клеточной стенки.

Изоляты белка из единичных клеток и микробных клеток

[396] Некоторые варианты реализации данного изобретения относятся к изоляту белка из единичных клеток (SCP – single cell protein) и/или микробного белка с пониженным содержанием нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах реализации предусматривается белковый продукт, относительно свободный от нуклеиновых кислот, но все же обеспечивающий хорошую питательную ценность и приемлемое качество питания (т.е. потребления). В определенных вариантах реализации содержание нуклеиновых кислот снижено до менее чем 9% мас. В некоторых вариантах реализации содержание РНК снижается в соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения [ВОЗ] для потребления человеком. В некоторых вариантах реализации содержание РНК в SCP составляет менее 2% сухой массы; в некоторых вариантах реализации оно составляет менее 1% сухой массы. Некоторые варианты реализации включают процесс снижения содержания нуклеиновой кислоты, который дает клеточный материал, содержащий от двух до трех граммов нуклеиновой кислоты или меньше на 100

граммов белка. В некоторых неограничительных вариантах реализации величина соотношения белковых компонентов (PER) клеточного изолята превышает 1. В некоторых неограничительных вариантах реализации в состав клеточного изолята, в пересчете на массовые проценты, входят 65-85% или больше белка; 0,5-9% нуклеиновой кислоты; 7-15% липидов; 1-5% золы; и 5-20% углеводов и/или других не содержащих N и не содержащих липидов органических веществ.

[397] В некоторых вариантах реализации клетки подвергают воздействию температуры, которая инактивирует протеазы и не дает им разрушать белки, но которая все же позволяет РНКазе (ферментам, расщепляющим РНК) разрушать рибосомальную РНК. В определенных таких вариантах эта температура составляет по меньшей мере около 64 °С. В некоторых таких вариантах реализации малые продукты такого расщепления РНК диффундируют через клеточные стенки в культуральный бульон и, таким образом, удаляются из конечного продукта SCP. В некоторых таких вариантах реализации эта стадия удаления РНК происходит в сосуде для снижения содержания РНК, соединенном по жидкости с биореактором. В некоторых таких вариантах реализации культуру непрерывно отбирают из биореактора. В некоторых таких вариантах реализации клеточную массу, после снижения содержания РНК, распределяют по большому движущемуся фильтру, через который большая часть жидкости отсасывается вакуумом. В некоторых таких вариантах реализации после этого остается тонкий лист материала с высоким содержанием белка, например, тонкий лист материала с высоким содержанием белка с низким содержанием нуклеиновой кислоты.

[398] Клеточный изолят некоторых вариантов реализации данного изобретения может быть получен способом, который включает разрыв клеток и удаление обломков клеточной стенки. В некоторых таких вариантах реализации такой разрыв клеток осуществляется в щелочной среде. В некоторых вариантах реализации уменьшение содержания нуклеиновой кислоты может быть достигнуто путем гидролиза нуклеиновой кислоты в клетке до фрагментов такого размера, чтобы фрагменты могли диффундировать из клетки прочь от белка.

[399] Известно, что нуклеазный фермент, который присутствует в ряде различных микроорганизмов, включая дрожжи, гидролизует или расщепляет молекулы нуклеиновой кислоты до более мелких фрагментов. Гидролиз нуклеиновых кислот ферментативными методами позволяет использовать гораздо более мягкие условия, по показателям pH и температуры, чем обычно необходимые для химических методов гидролиза, причем более мягким считается значение pH, более близкое к 7, и температура, более близкая к температуре окружающей среды, соответственно. В определенных вариантах реализации

мягкие условия устраняют необходимость в кислотостойком или щелочестойком оборудовании. В некоторых вариантах реализации используют ферментативный процесс и мягкие условия, что позволяет лучше сохранять питательные качества белков, чем сопоставимые химические способы гидролиза. Несколько источников нуклеазы были описаны в литературе. В некоторых вариантах реализации данного изобретения для гидролиза полимеров нуклеиновых кислот используют нуклеазу (нуклеазы), которые хорошо известны специалистам в данной области. В некоторых вариантах реализации такая нуклеаза (нуклеазы) не содержит вторичных ферментных систем, таких как протеаза, которые могут вызывать снижение выхода белка в результате совместной диффузии аминокислот и/или небольших пептидов из клетки вместе с гидролизованными нуклеиновыми кислотами. В некоторых вариантах реализации препарат нуклеазы не придает нежелательного вкуса продуктам, полученным в результате процесса снижения содержания нуклеиновой кислоты. В определенных вариантах реализации используемый препарат нуклеазы является коммерчески доступным. В определенных вариантах реализации нуклеаза является пищевой. В некоторых вариантах реализации нуклеазу из дрожжей используют для расщепления молекул нуклеиновой кислоты на мелкие фрагменты. В некоторых вариантах реализации эндогенная и/или экзогенная нуклеаза используется для расщепления молекул нуклеиновой кислоты на мелкие фрагменты.

[400] В некоторых вариантах реализации предложен способ получения белкового изолята, в котором эндогенную нуклеазу используют для гидролиза нуклеиновой кислоты, так чтобы фрагменты нуклеиновой кислоты могли быть отделены от белка, например, путем осаждения белка. В данной области техники также известно, что гидролиз нуклеиновых кислот в клетке может быть осуществлен путем многостадийного нагревания для активации собственной и/или эндогенной нуклеазы с целью превращения нерастворимого полимера нуклеиновой кислоты в растворимые нуклеиновые кислоты. В некоторых вариантах реализации процесс многостадийного нагревания используется для активации собственной и/или эндогенной нуклеазы для превращения нерастворимого полимера нуклеиновой кислоты в растворимые нуклеиновые кислоты. В некоторых вариантах реализации клеточный лизат инкубируют таким образом, чтобы эндогенная нуклеаза, содержащаяся в растворимой части, разлагала нуклеиновую кислоту, присутствующую в клетке, до растворимой формы.

[401] Нуклеиновую кислоту также можно гидролизовать, подвергая клетку воздействию внешней нуклеазы. В определенных вариантах реализации клетка и/или клеточный лизат подвергаются воздействию внешней (экзогенной) нуклеазы.

[402] Известно, что нуклеазы могут быть экстрагированы в растворимую фракцию выше определенного значения pH. В определенных вариантах реализации нуклеаза является растворимой при pH выше 4. В определенных вариантах реализации нуклеаза является растворимой при pH выше 5,5. В некоторых вариантах реализации pH для экстракции нуклеазы оптимизируют для минимального добавления щелочи и/или содержания соли при достаточном выходе растворимой нуклеазы. В некоторых вариантах реализации нуклеазу экстрагируют при значении pH, когда нуклеаза растворима, но неактивна, и поддерживается в неактивном состоянии до тех пор, пока не потребуются ее активность, после чего значение pH снижается для восстановления нуклеазной активности.

[403] В некоторых вариантах реализации клеточный штамм усовершенствован и/или модифицирован для повышения нуклеазной активности. В некоторых вариантах реализации содержание нуклеазы в клетках увеличивается путем генетических и/или связанных с окружающей средой манипуляций. В определенных вариантах реализации штаммы нуждаются в дополнительной нуклеазе помимо эндогенной нуклеазы для достаточного снижения содержания РНК. В некоторых вариантах реализации такая дополнительная нуклеаза обеспечивается из внешнего источника, и/или путем селективного выведения штаммов с повышенным содержанием внутренней нуклеазы.

[404] Известно, что нуклеазы, как правило, имеют pH и температуру, оптимальные для максимальной агрегационной активности (т.е. степени превращения на индивидуальный активный фермент, умноженной на число активных ферментов). Скорость реакции увеличивается с ростом температуры; однако доля инактивированных ферментов также обычно увеличивается с повышением температуры. Эти два противодействующих эффекта обычно приводят к тому, что фермент проявляет максимальную активность в определенном температурном диапазоне. В определенных вариантах реализации этот оптимум идентифицируют и используют в соответствии со стандартными экспериментальными методами, известными специалисту в данной области.

[405] В определенных вариантах реализации оптимизируют время инкубации для расщепления РНК нуклеазами.

[406] Известно, что полимеры нуклеиновой кислоты и белки совместно осаждаются ниже определенного pH, образуя смесь нуклеопротеинов. В некоторых вариантах реализации значения pH, воздействию которых подвергается лизат, поддерживают выше этого pH, чтобы избежать образования смеси нуклеопротеинов.

[407] В работе Chargaff, Vol. I, Nucleic Acids, утверждается, что рибонуклеиновая кислота (РНК) может быть гидролизована под действием 1N HCl в течение одного часа при 100 °С, или под действием 0,1N NaOH при 100 °С. В некоторых вариантах реализации применение кислотных или щелочных условий к микробным цитоплазматическим компонентам, высвобождающимся при разрыве клетки, приводит к гидролизу нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации HCl или NaOH используют для гидролиза РНК. В некоторых неограничительных вариантах реализации РНК гидролизуют с использованием около 1N HCl или около 0,1N NaOH при около 100 °С в течение около 1 часа.

[408] В некоторых вариантах реализации после гидролиза полимеров нуклеиновых кислот получают две фракции: одна фракция содержит твердые вещества с пониженным содержанием нуклеиновой кислоты; а другая фракция представляет собой окружающую среду, содержащую фрагменты растворенной нуклеиновой кислоты и другой диффундирующий материал. В определенных вариантах реализации белок сделан нерастворимым, чтобы отделить его от гидролизованной и растворенной нуклеиновой кислоты. В определенных вариантах реализации нерастворимую белковую фракцию отделяют от фракции, содержащей растворимую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах реализации условия реакции, включая, без ограничений, pH, время, температуру и/или концентрацию, оптимизируют для выделения белкового продукта, имеющего низкое содержание нуклеиновой кислоты и приемлемый выход белка, и/или оптимизируют для обеспечения максимального выхода белка при приемлемом содержании нуклеиновой кислоты. Некоторые варианты реализации также включают способ получения белка с низким содержанием нуклеиновой кислоты и не содержащего остатков клеточной стенки. В некоторых таких вариантах реализации для солубилизации нуклеиновой кислоты используют нуклеазу, включая, без ограничений, эндогенную нуклеазу. Чертеж, представленный на Фиг. 22, представляет собой блок-схему варианта реализации процесса в соответствии с этим конкретным аспектом.

Белковые гидролизаты и их применение

[409] Гидролизаты были использованы в биотехнологической промышленности в качестве добавки для клеточных культур [M. S. Ummadi and M. Curic-Bawden (2010) "Use of protein hydrolysates in industrial starter culture fermentations," в: Protein Hydrolysates in Biotechnology, V.K. Pasupuleti and A.L. Demain, Eds. Springer Netherlands, pp. 91-114 (http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-6674-0_6)]. Определенные варианты реализации данного изобретения относятся к микробным гидролизатам, полученным, как описано в

данном документе, используемым в качестве исходного сырья или источника питательных веществ в других промышленных ферментационных и биологических процессах. В определенных вариантах реализации гидролизаты, полученные, как описано в данном документе, используются в качестве добавки в клеточных культурах.

[410] Белковый гидролизат нашел особое применение в спортивной медицине, поскольку его потребление позволяет обеспечить более быстрое усвоение аминокислот организмом, чем интактных белков, тем самым максимизируя доставку питательных веществ в мышечные ткани [Manninen, Anssi H. (2004) "Protein Hydrolysates In Sports And Exercise: A Brief Review" *Journal of Sports Science and Medicine* 3:60-63]. Некоторые варианты реализации данного изобретения в данном документе относятся к изолятам и/или гидролизатам и/или экстрактам микробных белков, находящих применение в спортивной медицине и, в частности, в определенных неограничительных вариантах реализации, потребление указанного изолята и/или гидролизата и/или экстракта позволяет обеспечить более быстрое усвоение аминокислот организмом, чем интактных белков, тем самым максимизируя доставку питательных веществ в мышечные ткани. В определенных вариантах реализации гидролизат и/или изолят и/или экстракт имеют высокое содержание антиоксидантов и/или L-аспарагиновой кислоты, и/или марганца, и/или селена. Некоторые варианты реализации относятся к использованию изолятов микробных белков и/или гидролизатов и/или экстрактов в кормах для домашних животных, включая, без ограничений, корм для млекопитающих, таких как собаки или лошади.

[411] Описанный здесь способ внесения экстракта и/или гидролизата органического фермента в сельскохозяйственную культуру может быть выполнен любым обычным способом, таким как, например, прямое внесение в почву или через листья или путем фертигации. В определенных вариантах реализации применение биостимулятора на основе гидролизата, полученного в соответствии со способами, описанными в данном документе, приводит к модификации первичного и/или вторичного метаболизма растений, получающих указанный биостимулятор. В некоторых вариантах реализации применение биостимулятора на основе гидролизата, полученного в соответствии с описанными в данном документе способами, стимулирует продуцирование и накопление антиоксидантных соединений, таких как, без ограничений, каротиноиды, полифенолы и/или флавоноиды, в растениях, получающих указанный биостимулятор. В дополнение к аминокислотам и пептидам, гидролизаты, полученные в соответствии с определенными вариантами осуществления, описанными в данном документе, содержат другие соединения, которые могут способствовать биостимулирующему действию, включая

жиры, липиды, витамины, углеводы, фенолы, минеральные элементы, фитогормоны, полиамины и другие органические соединения.

[412] Кроме того, гидролизат, описанный в данном документе, может альтернативно подвергаться дополнительной стадии/стадиям концентрирования и/или разделения для стабилизации. В определенных вариантах реализации способ, описанный в данном документе, включает дополнительные стадии после гидролиза, в которых гидролизат подвергают концентрированию для получения концентрированного гидролизата. Концентрированный гидролизат в определенных вариантах реализации содержит, по меньшей мере, 40% мас. сухого вещества, в других вариантах реализации - по меньшей мере, 50% мас. сухого вещества, и в других вариантах реализации - 50-55% мас. сухого вещества или более. Такое концентрирование может быть достигнуто любым обычным способом, известным в данной области техники, таким как, например, нагревание и использование роторного испарителя с термостатической ванной или обратным осмосом или любого другого пригодного устройства.

[413] В другом конкретном варианте реализации способ включает дополнительную стадию (стадии) после гидролиза белка, на которой белковый гидролизат, полученный после гидролиза, подвергают разделению для получения: (i) фракции растворимого гидролизата и (ii) твердой фазы фракции нерастворимого гидролизата. Это разделение может быть осуществлено любым обычным способом разделения твердой и жидкой фаз, известным в данной области техники, таким как, например, фильтрация или центрифугирование с использованием декантатора или другого пригодного промышленного оборудования. В различных вариантах реализации способов, описанных в данном документе, составление композиции гидролизата включает сбор как жидких, так и твердых фракций гидролизата. В определенных вариантах реализации гидролизат может применяться "как есть", в качестве биостимулятора и/или удобрения. Например, составление композиции гидролизата может включать простой сбор всех фракций гидролизата и нанесение комбинированных жидких или твердых фракций гидролизата на сельскохозяйственные культуры в качестве биостимулятора растений и/или удобрения. В других вариантах реализации составление композиции гидролизата включает разделение жидкой и твердой фракций гидролизата и сохранение жидкой фракции и/или твердой фракции в качестве биостимулятора растений и/или удобрения. В других вариантах реализации гидролизат может быть разделен на растворимые и нерастворимые фракции для внекорневого и почвенного применения, соответственно. В определенных вариантах реализации фракция растворимого гидролизата содержит практически весь гидролизованный исходный белок, а в определенных вариантах

реализации - более 90% мас. В некоторых вариантах реализации нерастворимая фракция уменьшается путем нагревания в присутствии влаги или обработки паром.

[414] В некоторых вариантах реализации фракция растворимого гидролизата обеспечивает композицию, пригодную для целей сельского хозяйства и животноводства и, в частности, для использования в качестве биостимулятора и/или биоудобрения в органическом сельском хозяйстве, учитывая его особый состав свободных аминокислот, олигопептидов и низкомолекулярных пептидов.

[415] В определенных вариантах реализации гидролизат также можно использовать в качестве высокоценной пищевой добавки для животного корма, более конкретно, корма для скота (крупного рогатого скота, овец, коз и т.д.), или аквакультуры, или насекомых (например, пчел), или беспозвоночных (например, червей), или гетеротрофных микроорганизмов (например, дрожжей, *E. coli*), или для домашних животных или ручных животных, или для непосредственного потребления человеком.

[416] Необязательно, фракция растворимого гидролизата может подвергаться дополнительному концентрированию. В некоторых вариантах реализации после стадии разделения жидкой и твердой фаз, как описано выше, фракция растворимого гидролизата подвергается дополнительной стадии концентрирования для получения фракции концентрированного растворимого гидролизата. Фракция концентрированного растворимого гидролизата содержит, по меньшей мере, 40% мас. сухого вещества в некоторых вариантах реализации, и в других вариантах - по меньшей мере 50% мас. сухого вещества или 50-55% мас. сухого вещества или больше. Такое концентрирование может быть выполнено любым обычным способом, известным в данной области техники, таким как, например, нагревание и вакуумирование с использованием роторного испарителя с термостатической ванной, или обратный осмос, или любое другое пригодное устройство. Концентрированный растворимый гидролизат по некоторым вариантам реализации имеет состав, делающий его пригодным для использования в сельском хозяйстве и животноводстве; в частности, в некоторых вариантах реализации его можно использовать в качестве биостимулятора и/или биоудобрения в органическом сельском хозяйстве, учитывая его особый состав аминокислот, олигопептидов и пептидов с низкой молекулярной массой, которые обеспечивают поглощение этих молекул растениями и/или почвенными организмами. В некоторых вариантах реализации описанный в данном документе гидролизат белка или органический экстракт стимулирует желательные, встречающиеся в природе почвенные микроорганизмы, такие как N_2 -фиксирующие, P-сольбилизирующие и продуцирующие индолуксусную кислоту бактерии. В определенных вариантах реализации аминокислоты, полученные в соответствии с

описанными в данном документе способами, оказывают хелатообразующее действие на растительные микроэлементы. В определенных вариантах реализации концентрированный растворимый гидролизат можно использовать в качестве питательного вещества или добавки для выращивания грибов (например, шляпочных грибов). В определенных вариантах реализации его можно использовать в качестве пищевой добавки для животных кормов, более конкретно, кормов для скота (крупного рогатого скота, овец, коз и т.д.), или аквакультуры (например, рыбы, моллюсков), или насекомых (например, пчел), или беспозвоночных (например, красных калифорнийских червей), или для гетеротрофных микроорганизмов (например, дрожжей; *E. coli*), или для домашних животных или ручных животных, или непосредственно для питания человека.

Растительные биостимуляторы и удобрения

[417] Твердую фракцию гидролизата, полученную, как описано выше, можно применять для сельскохозяйственных культур в качестве биостимулятора растений и/или удобрения, либо в твердой форме, либо после повторного растворения в пригодном растворителе, таком как водная среда. В некоторых вариантах реализации нерастворимая фракция гидролизата может подвергаться процессу окончательной сушки для получения твердого вещества в форме пасты или порошка с содержанием влаги 10-15% мас. или ниже. Такой процесс сушки может быть выполнен любым обычным способом, таким как, например, с использованием печей с циркуляцией горячего воздуха или путем сублимационной сушки. Высушенный или невысушенный нерастворимый гидролизат может быть использован в качестве высокоценной пищевой добавки для животного корма, в частности, корма для скота (крупного рогатого скота, овец, коз и т.д.), или аквакультуры (например, настоящей рыбы (*fin fish*), моллюсков), или насекомых (например, пчел), или беспозвоночных (например, красных калифорнийских червей), или для гетеротрофных микроорганизмов (например, дрожжей; *E. coli*), или для домашних животных или ручных животных, или для непосредственного потребления человеком.

[418] В некоторых неограничительных вариантах реализации твердую фракцию гидролизата гранулируют, при этом гранулирование твердой фракции включает использование устройства, выбранного из грануляторов кормов, штифтовых смесителей, дисковых грануляторов, барабанных грануляторов и пресс-грануляторов (*compaction granulators*). В определенных вариантах реализации гранулирование твердой фракции включает получение гранул размером от около 0,25 мм до около 5 мм. В определенных вариантах реализации твердая фракция диспергируется или растворяется в водной среде.

[419] Гранулированный продукт может быть нанесен на сельскохозяйственные культуры "как есть", или может быть восстановлен в виде жидкости путем добавления растворителя, а затем нанесен на культуры. В определенных вариантах реализации составление композиции гидролизата включает сбор только одной из жидкой и твердой фракций гидролизата. Например, составление композиции гидролизата может включать разделение гидролизата на твердую и жидкую фракции и сохранение только одной из таких фракций. В таком случае жидкая или твердая фракция может применяться для сельскохозяйственных культур в качестве биостимулятора растений и/или удобрения. Составление композиции гидролизата может также включать сбор всего количества одной из твердой фракции и жидкой фракции гидролизата и только части другой фракции. Альтернативно, составление композиции гидролизата может включать сбор только части каждой из твердой фракции и жидкой фракции гидролизата.

[420] Биостимулятор растений, полученный описанным в данном документе способом, можно отнести к содержащему аминокислоты растительному биостимулятору и/или удобрению. Следует понимать, что органические удобрения или навоз традиционно состоят полностью из растительных и животных материалов, и что их ценность как удобрений (без учета аспектов биостимуляции или биоудобрений) в первую очередь зависит от их соответствующего содержания углерода (C), азота (N), фосфора (P) и калия (K). Обычные органические удобрения включают рыбную муку, птичий помет, коровий и свиной навоз, хлопковую муку, рисовую солому и другие сельскохозяйственные отходы. В некоторых вариантах реализации данного изобретения получают органическое удобрение не-растительного и не-животного происхождения нового типа. В определенных вариантах реализации органическое удобрение дополнительно представляет собой биостимулятор и/или биоудобрение. В определенных вариантах реализации питательные вещества, продуцируемые в микробном процессе, описанном в данном документе, используются для удобрения прудов, где применяется поликультура. В определенных вариантах реализации питательные вещества используются для удобрения сельскохозяйственных культур, включая, без ограничений, рис.

[421] В определенных вариантах реализации гидролизат, полученный, как описано в данном документе, готовят в виде композиции жидкого продукта для внекорневого применения и/или в виде сухого продукта для внесения в почву. В определенных неограничительных вариантах реализации составление композиции гидролизата включает составление композиции без хелатирования гидролизата и/или без выделения аминокислот из гидролизата. В некоторых неограничительных вариантах реализации растительный биостимулятор имеет общее содержание азота от около 0,5%

мас. до около 15% мас. в пересчете на сухое вещество, и/или общее содержание твердых веществ от около 2% мас. до около 100% мас. В определенных вариантах реализации рН биостимулятора растений имеет значение от около 2 до около 10.

[422] В некоторых вариантах реализации азот, содержащийся в биостимуляторе и/или биоудобрении и/или гидролизате, полученном, как описано в данном документе, используется растениями, к которым применяется материал, для продуцирования одного или нескольких из следующего: белки, нуклеиновые кислоты, хлорофиллы и т.д. В определенных вариантах реализации такой применяемый источник азота усиливает метаболическую активность растений и/или грибов и/или микроорганизмов.

[423] В определенных вариантах реализации углерод, содержащийся в биостимуляторе и/или биоудобрении и/или гидролизате, полученном, как описано в данном документе, используется почвенными микроорганизмами для производства клеточной массы, и/или для дыхания, и/или для фиксации N_2 , и/или для усиления сольюбилизации фосфата, и/или для стимуляции бактерий, продуцирующих индолуксусную кислоту. В определенных вариантах реализации углерод, содержащийся в биостимуляторе и/или биоудобрении и/или гидролизате, полученном, как описано в данном документе, секвестрируется в почве и/или увеличивает содержание углерода в почве. В тех вариантах реализации, где CO_2 улавливается из источника CO_2 , который в противном случае выбрасывался бы в атмосферу, или где CO_2 улавливается из атмосферы, способы, описанные в данном документе, могут рассматриваться как форма улавливания и секвестрации углерода, в которой углерод связывается в виде углерода почвы. Определенные варианты реализации в данном документе относятся к устойчивому превращению отходов углерода и других элементов в ценную биомассу или продукты на основе биологических веществ, такие как лизат, гидролизат, белки, пептиды, витамины и/или аминокислоты. В некоторых вариантах реализации готовое удобрение или биостимулирующий продукт содержат большую часть исходного углерода, чем при превращении органического углерода в компост. В некоторых вариантах реализации менее половины исходного углерода теряется в виде выбросов CO_2 при преобразовании в готовое удобрение или биостимулирующий продукт. В некоторых вариантах реализации менее 10% исходного углерода теряется в виде выбросов CO_2 при превращении в готовое удобрение или биостимулирующий продукт.

[424] В определенных вариантах реализации способы по данному документу включают смешивание дополнительных компонентов с полученными растительными биостимуляторами и/или удобрениями. Такие дополнительные компоненты могут быть добавлены во время гидролиза и/или во время приготовления композиции, и/или после

приготовления композиции. В некоторых вариантах реализации в растительный биостимулятор добавляют по меньшей мере один консервант, который содержит по меньшей мере один компонент, выбранный из лимонной кислоты, бензойной кислоты, пропиленгликоля, пропионовой кислоты, сорбиновой кислоты, сульфата цинка, сульфата железа, сульфата меди и хлорида серебра. Некоторые варианты реализации включают добавление, по меньшей мере, одного удобрения и/или питательного макроэлемента для растений к растительному биостимулятору, при этом удобрение или питательный макроэлемент для растений включают, по меньшей мере, один элемент, выбранный из азота, калия, фосфора, железа, меди, цинка, бора, марганца, кальция, молибдена и магния. Некоторые варианты реализации включают добавление по меньшей мере одной композиции, выбранной из гербицидов, пестицидов и фунгицидов, к растительному биостимулятору, причем по меньшей мере одну композицию выбирают из тиофанат-метила, хлороталонила, каптана, пипералина, фенаримола, металаксила, трифорина, этокси-тиалдиазола, пиретина, альгицида, оризалина, альдксилариполиэтоксиэтанола (aldxylaripolyethoxyethanol), глифосата и нафталина. Некоторые другие варианты реализации включают добавление в состав гербицидов, пестицидов, фунгицидов или синтетических удобрений, так чтобы композиция считалась органическим удобрением и/или органическим биостимулятором, и чтобы культуры, к которым применяется органическое удобрение и/или биостимулятор, считались органически выращенными соответствующими регулирующими органами.

[425] В некоторых вариантах реализации предусматриваются способы применения растительных биостимуляторов, описанных в данном документе, для сельскохозяйственных культур. Культуры, к которым могут применяться биостимуляторы и/или удобрения, описанные в данном документе, конкретно не ограничены; однако типичные примеры культур могут включать продовольственные и декоративные культуры. Типичные продовольственные культуры могут включать фрукты, овощи, клубневые и зерновые культуры. Типичные декоративные культуры могут включать газонную траву, деревья, кустарники и цветы. Определенные варианты реализации представляют собой способ обработки культуры, включающий нанесение на культуру биостимулятора растений, полученного, как описано в данном документе. Некоторые неограничительные варианты реализации включают способ, в котором растительный биостимулятор, полученный как описано в данном документе, применяют в количестве от около 0,001 до около 3,0 фунтов азота на 1000 кв. футов (0,005-14,65 г/м²). В определенных вариантах реализации растительный биостимулятор и/или удобрение, полученные, как описано в данном документе, применяют к культуре. В некоторых

вариантах реализации применение к культуре биостимулятора растений и/или удобрения включает внесение в культуру биостимулятора растений и/или удобрения и, по меньшей мере, одной композиции, выбранной из гербицидов, пестицидов и фунгицидов. В других вариантах реализации применение к культуре биостимулятора растений и/или удобрения включает внесение в культуру биостимулятора растений и/или удобрения без внесения каких-либо синтетических гербицидов, пестицидов и фунгицидов. В некоторых таких вариантах реализации применение к культуре биостимулятора растений и/или удобрения осуществляется в контексте выращивания сельскохозяйственных культур в соответствии с требованиями, необходимыми для их квалификации как органических продуктов питания соответствующими регулирующими органами.

[426] В некоторых вариантах реализации предусматривается способ изготовления сельскохозяйственного продукта и/или потребительского продукта и/или промышленного продукта, включающий: приготовление растительных биостимуляторов и/или удобрений и/или грибковых добавок способами, описанными в данном документе; внесение в культуру биостимулятора растений и/или удобрения и/или грибковой добавки, полученных, как описано в данном документе; и сбор урожая для получения сельскохозяйственного продукта; и в некоторых случаях дальнейшую переработку сельскохозяйственного продукта для получения потребительского или промышленного продукта. В определенных таких вариантах реализации культура представляет собой продовольственную культуру. В некоторых таких вариантах реализации продовольственная культура включает, по меньшей мере, что-то одно из фруктовых, овощных, клубневых и зерновых культур. Примеры сельскохозяйственных продуктов включают, без ограничений, такие овощи, как брокколи, цветная капуста, артишок, горох, бобы, капуста, листовая капуста, шпинат, руккола, зелень свеклы, китайская капуста (bok choy), мангольд, чой сум (choi sum), ботва молодой репы, цикорий салатный, салат, горчица, съедобная зелень, кресс-салат, побеги лука туберозного, кай-лан (gai lan), лук-порей, брюссельская капуста, каперсы, кольраби, сельдерей, ревень, кардон, сельдерей китайский, сорго лимонное, спаржа, побеги бамбука, галангал, имбирь, соя, фасоль золотистая, маш, морковь, пастернак, свекла, редис, брюква, репа, лопух, лук репчатый, лук-шалот, лук-порей, чеснок, зеленая фасоль, чечевица и стручковый горох; плоды, такие как помидоры, огурцы, кабачки, цуккини, тыквы, дыни, перец, баклажаны, мексиканский томат, чайот (christophene), окра, плоды хлебного дерева, авокадо, черная смородина, красная смородина, крыжовник, гуава, лукума, перец чили, гранат, киви, виноград, клюква, голубика, апельсин, лимон, лайм, грейпфрут, ежевика, малина, бойзенова ягода, ананас, инжир, шелковица, маклюра (hedge apple), яблоко, шиповник и клубника; орехи,

такие как миндаль, pekan, грецкие орехи, бразильские орехи, плоды свечного дерева, орехи кешью, авелланский орех, конские каштаны, орехи макадами, малабарские каштаны, монгонго, арахис, кедровые орехи и фисташки; клубневые культуры, такие как картофель, сладкий картофель, маниока, ямс и далии; и злаки или зерновые, такие как кукуруза, рис, пшеница, ячмень, сорго, просо, овес, рожь, тритикале, фонию, гречка и лебеда квиноа. В других вариантах культура представляет собой декоративную культуру. В некоторых таких вариантах реализации декоративная культура включает, по меньшей мере, что-то одно, выбранное из газонной травы, дерева, куста и цветка. В других вариантах реализации культура представляет собой шляпочный гриб или грибок. Примеры грибковых культур включают, без ограничений: *Agaricus bisporus* (с нераскрытой шляпкой, неполностью созревшие грибы и портобелло), *Coprinus quadrifidus*, *Lepista nuda* и *Pleurotus ostreatus* (вешенки). В определенных вариантах реализации белковый гидролизат, как описано в данном документе, применяют к шляпочному грибу или грибок. В определенных вариантах реализации цельноклеточную биомассу (т.е. нелизированные клетки), как описано в данном документе, вносят в качестве подкормки шляпочным грибам или грибок, которые обладают способностью лизировать и потреблять бактерии. В некоторых таких вариантах реализации шляпочные грибы, которые лизируют и потребляют бактериальные клетки, полученные, как описано в данном документе, включают один или большее количество из следующих: *Agaricus bisporus*, *Coprinus quadrifidus*, *Lepista nuda* и *Pleurotus ostreatus*.

[427] Известно, что воздействие ультрафиолетового света непосредственно перед сбором грибов может привести к содержанию витамина D₂, более чем в два раза превышающему суточную норму FDA (Управление по контролю за пищевыми продуктами и медикаментами США), т.е. диетическому источнику витамина D для строгих вегетарианцев. В некоторых вариантах реализации грибы, полученные как описано в данном документе, подвергают воздействию ультрафиолетового излучения, так чтобы получить высокое содержание витамина D₂.

[428] В определенных вариантах реализации предусматриваются способы увеличения выхода сельскохозяйственной продукции, сельскохозяйственных культур или других растений. В некоторых вариантах реализации выход сельскохозяйственной продукции, сельскохозяйственных культур или других растений увеличивается на по меньшей мере 5%, или на по меньшей мере 10%, или на по меньшей мере 40% в течение вегетационного периода у растений, получающих биостимулятор или удобрение, полученное как описано в данном документе, по сравнению с растением того же типа, выращенным в таких же условиях, но без применения биостимулятора. В определенных

вариантах реализации использование удобрений и/или биостимуляторов, полученных, как описано в данном документе, увеличивает урожайность на по меньшей мере около 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, или 55%, или больше, чем 55%, за вегетационный период.

[429] Определенные варианты реализации в данном документе позволяют уменьшить или исключить использование обычных химических азотных удобрений, таких как, без ограничений, нитрат мочевины, нитрат аммония, нитрат кальция-аммония и/или другие нитратные или аммонийные удобрения. В определенных неограничительных вариантах реализации использование таких обычных химических азотных удобрений может быть уменьшено или исключено, при сохранении такого же урожая сельскохозяйственной продукции, сельскохозяйственных культур или других растений, путем применения удобрения и/или биостимулятора, полученного, как описано в данном документе. В определенных вариантах реализации внесение удобрений и/или биостимуляторов, как описано в данном документе, может сопровождаться снижением количества обычных химических азотных удобрений на по меньшей мере около 5%, 10%, 20%, 30%, 40% или 50%. В некоторых таких вариантах реализации уменьшение содержания обычного химического азотного удобрения может составлять более 50% или до 100% (т.е. полностью исключается).

[430] В определенных вариантах реализации композиции, описанные в данном документе, могут более чем удвоить или еще сильнее увеличить содержание органического вещества в почве. В другом варианте реализации композиции, описанные в данном документе, могут увеличивать содержание органического вещества в почве до около 140% или до около 150% или более. В другом варианте реализации это может увеличить органические вещества почвы около на 40-150%, в зависимости от исходного уровня органического вещества почвы.

Пищевые продукты

[431] Примеры потребительских товаров включают, без ограничений, обработанные пищевые продукты, такие как картофельные чипсы, кукурузные чипсы, джемы, желе, блюда из зерновых продуктов для завтрака, хлеб, печенье, пирожные, крекеры, мука, белковые порошки, протеиновые батончики, спортивные и/или энергетические напитки, белковые коктейли и/или смузи, животный корм, корм для домашних животных и т.д. Возможность переработки сельскохозяйственных продуктов, описанных в данном документе, в такие потребительские продукты, вполне доступна специалистам в данной области.

[432] В некоторых вариантах реализации предусматриваются способы изготовления питательного продукта и/или пищевого ингредиента, и/или пищевого продукта. В определенных вариантах реализации ингредиент с высоким содержанием белков и/или витаминов получают из клеток микроорганизмов, описанных в данном документе. В определенных вариантах реализации продукт не содержит животного белка или жиров. В некоторых вариантах реализации ингредиент с высоким содержанием белка и/или с высоким содержанием витаминов представляет собой включают в пищевые продукты, включая, без ограничений, молочные продукты, заменители молочных продуктов, мясные продукты, заменители мясных продуктов и/или продукты, имитирующие мясо, хлебобулочные изделия, кондитерские изделия, продукты для здорового образа жизни и протеиновые батончики, белковые порошки, спортивные и/или энергетические напитки и/или протеиновые коктейли и/или смузи. В определенных вариантах реализации ингредиент с высоким содержанием белка и/или с высоким содержанием витаминов текстурирован для включения в мясные продукты и/или продукты, имитирующие мясо. В некоторых вариантах реализации ингредиент с высоким содержанием белка можно использовать в качестве добавки к мясу в мясных котлетах.

[433] В определенных вариантах реализации клетки микроорганизмов и/или органические вещества, как описано в данном документе, используются при производстве вегетарианского пищевого продукта или пищевого продукта для строгих вегетарианцев. В некоторых вариантах реализации они используются при производстве органического пищевого продукта и/или не содержащего пестицидов и/или не содержащего гербицидов, и/или не содержащего фунгицидов, и/или не содержащего антибиотиков, и/или не-генетически модифицированных (не ГМО) продуктов питания. В определенных вариантах реализации они используются в продуктах местного производства. В определенных вариантах реализации они используются в пробиотическом пищевом продукте или в пребиотическом пищевом продукте или в питательном продукте.

[434] В некоторых неограничительных вариантах реализации гидролиз белка не проводится. В этих неограничительных вариантах реализации комбинация пастеризации, относительно цельных белков и/или добавления консервирующего агента обеспечивает продукт для роста грибов, который демонстрирует замедленное высвобождение питательных веществ и/или способность препятствовать конкурентным микроорганизмам и/или способность предотвращать нежелательное повышение температуры в грибном субстрате при применении в качестве усилителя роста грибов.

[435] Данное изобретение не ограничивается в своем применении деталями конструкции и расположения компонентов, изложенными в описании или

проиллюстрированными на чертежах. Изобретение допускает другие варианты реализации и может использоваться на практике или осуществляться различными способами. Кроме того, фразеология и терминология, используемые в данном документе, предназначены для целей описания и не должны рассматриваться как ограничивающие. Использование терминов "включающий", "содержащий", или "имеющий", "вмещающий", "предусматривающий" и их варианты в данном документе подразумевает охват перечисленных далее элементов и их эквивалентов, а также дополнительных элементов.

[436] Данное изобретение дополнительно иллюстрируется следующими примерами, которые никоим образом не должны рассматриваться как дополнительное ограничение. Все ссылки в полном объеме (включая ссылки на литературу, выданные патенты, опубликованные патентные заявки и одновременно находящиеся на рассмотрении патентные заявки), упоминаемые в данной заявке, настоящим явным образом включены посредством ссылок, в частности, касательно описаний, на которые есть ссылки выше. Однако упоминание любого документа не является допущением того, что этот документ относится к предшествующему уровню техники.

[437] Другие признаки изобретения будут понятны из приведенных далее описаний примеров. Следующие примеры предназначены для иллюстрации, но не для ограничения изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

[438] Штамм *Cupriavidus necator* DSM 531 выращивали на смеси газообразных H_2 и CO_2 и O_2 в качестве единственного источника энергии и углерода для роста.

[439] Придерживались следующего протокола для экспериментов, проводимых с использованием смеси газов в газонепроницаемых флаконах для сыворотки.

[440] Экспериментальный инокулят: 5% по объему, взят из другой культуры, выращенной на H_2 во флаконе для сыворотки.

[441] Первоначальная культура флакона для сыворотки, выращенная на H_2 , в свою очередь, была инокулирована 5% инокулята *Cupriavidus necator*, выращенного на лизогенном бульоне (LB), и выращивалась ок. 72 часов на газовой смеси $H_2/CO_2/O_2$ после инокуляции исходной культурой, выращенной на LB. Исходный выращенный на LB инокулят извлекали из маточного раствора в глицерине, хранящегося при $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

[442] Выращивание на газе во флаконах для сыворотки проводили в 160-миллилитровых закупоренных и герметично закрытых стеклянных флаконах для сыворотки Wheaton (VWR продукт № 16171-385). Объем жидкой среды составлял 20 мл.

Бутылки закупоривали резиновой пробкой (VWR № 100483-774) и алюминиевым закупорочным колпачком (VWR № 89047-008), используя ручные кромкозагибочные щипцы Wheaton (VWR № 80078-996). Рабочий объем 20 мл включал 19 мл минимальной солевой среды (MSM), как описано в *Thermophilic Bacteria*, CRC Press, Boca Raton, FL, Jacob K. Kristjansson, ed., 1992, p. 87, Таблица 4 + 1 мл инокулята (т.е. 5% инокулята).

[443] MSM дозировали во флаконы и добавляли газообразные соединения следующим образом: стерильную MSM переносили во флаконы в стерильных условиях. 5% газовой культуры инокулята инокулировали во флаконы в стерильных условиях, и флаконы закупоривали резиновыми пробками и герметизировали. Добавляли во флаконы газовую смесь при 103 кПа (15 фунтов/кв.дюйм) через коллектор. После добавления газовой смеси уплотнение обжимали алюминиевым закупорочным колпачком для герметизации сывороточных флаконов. Затем флаконы помещали в инкубатор-встряхиватель для колб.

[444] Описанные далее экспериментальные результаты были получены для 16 флаконов для сывотки (14 экспериментальных повторов, 2 контроля), инкубируемых при 30 °C, 250 об/мин. Все 16 флаконов для сывотки продували одновременно газообразной смесью 67% H₂, 24% воздуха (4,8% O₂) и 9% CO₂ с помощью коллектора, как описано выше. Состав газа, проходящего через коллектор, проверяли методом газовой хроматографии (ГХ) перед подключением флаконов для сывотки. Флаконы использовали для проведения анализа в 7 временных точках. Два отрицательных контроля вскрывали в момент времени T₀ и в последней временной точке, соответственно. Флаконы с отрицательным контролем проходили такую же подготовку, что и экспериментальные флаконы, но без инокулята, и использовались для обнаружения каких-либо загрязнений и/или абиотической потери или утечки газа из свободного пространства флакона. Показания давления газа в свободном пространстве образцов отбирали из отрицательных контролей, для выявления абиотической сорбции CO₂ и H₂ жидкой средой и/или потери газа из-за утечки.

Отбор проб и аналитические процедуры

[445] Все образцы брали в стерильных условиях с использованием шприцев и игл для экспериментов во флаконах. Оптическую плотность (ОП) измеряли с помощью спектрофотометра Beckman Coulter DU720 UV/Vis при 650 нм, используя образцы объемом 100 микролитров.

[446] Для каждого момента времени использовали для анализа от одного до трех флаконов экспериментальных повторов. Расход газа внутри флаконов для сывотки

измеряли с помощью манометра, соединенного с иглой. Давление газа в свободном пространстве измеряли для каждого вскрываемого флакона, и образец газа из свободного пространства отбирали газонепроницаемым шприцем для анализа методом газовой хроматографии (ГХ). При анализе образцов газового пространства методом ГХ использовали пробу 100 мкл газа из свободного пространства, впрыскиваемую в ГХ с помощью газонепроницаемого шприца. Содержание H_2 , CO_2 , O_2 и N_2 в газовом пространстве флаконов для сыворотки определяли количественно в каждый момент времени. Для отбора пробы бульона мембрану флакона для сыворотки протирали EtOH, и все жидкое содержимое флакона извлекали в шприц на 30 мл, используя давление во флаконе. 100 мкл образца отбирали пипеткой для измерения оптической плотности при 650 нм. Образцы центрифугировали при 12000 G в течение 15 минут при 4 °C. Осадок повторно суспендировали в 10 мл стерильного PBS (фосфатно-солевой буфер), встряхивали и фильтровали под вакуумом через предварительно взвешенные 0,45 мкм фильтры. Фильтры высушивали и взвешивали фильтр + ретентат биомассы для определения сухого веса биомассы. Определяли сухую массу клеток, собранных на мембранных фильтрах (0,45 мкм) путем сушки при температуре 60 °C в течение 24 часов и охлаждения до комнатной температуры в эксикаторе и взвешивания. Этот цикл сушки и повторного взвешивания повторяли до тех пор, пока вес не становился постоянным. Была установлена корреляция между оптической плотностью (ОП) и плотностью биомассы (масса сухих клеток на единицу объема).

[447] Корреляция между оптической плотностью и плотностью биомассы продемонстрирована на Фиг. 1. Кривая роста для этого эксперимента продемонстрирована на Фиг. 2. ОП, измеренная для отдельных экспериментальных повторов, обозначена ромбиками, а средняя ОП представлена сплошной линией. Логарифмический рост происходил в период между 9 и 30 часами. Изменение давления газа в свободном пространстве со временем вследствие потребления газов растущей культурой продемонстрировано на Фиг. 3.

[448] Используя закон идеального газа ($PV = nRT$) для газов в свободном пространстве, были рассчитаны общее количество газов в молях с учетом колебаний температуры в точках выборки. Долю каждого соответствующего газа в свободном пространстве каждого баллона определяли методом ГХ. Используя результаты для газа в свободном пространстве и измеренные сухие веса, определили пропорциональную зависимость между весом клеток и числом молей потребляемого H_2 . На Фиг. 4 продемонстрированы результаты измерений сухой биомассы для каждого вскрытого флакона в виде графика зависимости от числа молей израсходованного H_2 , определенного

путем измерения давления в свободном пространстве и ГХ-анализом для каждого соответствующего флакона. Эти результаты показали, что было синтезировано от 6,7 до 7,2 г сухой массы клеток на моль потребляемого H_2 или 3,3-3,6 г клеточной массы на грамм H_2 .

Пример 2

[449] Штамм *Cupriavidus necator* DSM 531 выращивали до плотности сухих клеток 38 г на литр на смеси газообразных H_2 , CO_2 и O_2 в качестве единственного источника энергии и углерода для роста.

[450] Придерживались следующего протокола для экспериментов, проводимых с использованием смеси газов, включающей H_2 , CO_2 и O_2 , в биореакторе с мешалкой.

[451] Оборудование: Культуру выращивали периодически, используя изготовленный на заказ стеклянный ферментер емкостью 500 мл с торцевой крышкой из РЕЕК (полиэфирэфиркетон). Температуру и pH контролировали и регулировали с помощью коммерческого контроллера (Electrolab, Fermac 360, United Kingdom). Для перемешивания использовали комбинацию стержней для магнитных мешалок и непрерывной рециркуляции со скоростью 280 мл/мин. Рециркуляция может производиться либо путем отбора жидкости из нижней части реактора с возвратом в свободное пространство через распылители для контроля пенообразования, либо наоборот, с рециркуляцией газа и пены из свободного пространства в нижнюю часть бульона. Для подачи газа использовали сжатый H_2 , сжатый CO_2 и воздух помещения, все при давлении 138 кПа (20 psi). H_2 и воздух поступали в регулятор расхода (Matheson G2-4D151-E401/E401, 20 psi), который устанавливал относительное содержание газов. Газовая смесь H_2 /воздух затем подавалась в каждый ферментер через расходомер с переменной площадью проходного сечения; скорость потока в каждом ферментере с одинаковым составом H_2 /воздух может регулироваться игольчатым клапаном расходомера. Газообразный CO_2 разделялся и подавался на отдельные расходомеры с переменной площадью проходного сечения каждого ферментера. Линии CO_2 и H_2 /воздух соединяются в одну линию, входящую в ферментер. Для контроля давления подачи газа в ферментер использовали манометр. Газ смешивался с бульоном ферментера через четыре 2-микронных диффузионных камня (diffusion stone) (p/n KEG592, <http://morebeer.com/products/diffusion-stone-2-micron-oxygen.html>) и выходил из реактора через холодильник в расширительный бачок для пены, а затем в вытяжную систему.

[452] Среда: среда, используемая для этого эксперимента, описана в Примере 1. Контроль pH осуществляли с использованием 2N NH_4OH или 2N NaOH. 2N NH_4OH

готовили из 5M NH₄OH, Fluke 318612 (хранящийся при 4 °C) (120 мл) и автоклавированной milliQ-H₂O (180 мл).

[453] Автотрофно приготовленный инокулят: Инокулят *Cupriavidus necator* DSM 531 брали из культуры, выращенной на H₂/CO₂/O₂ во флаконе для сыворотки. Инокулят для флаконов для сыворотки, в свою очередь, готовили из законсервированных 0,5 мл маточных растворов в глицерине, хранящихся при -80 °C для штамма 531 DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур). Оживление культур начинали на газовой смеси H₂/CO₂/O₂ в соответствии с протоколом флакона для сыворотки, описанным в Примере 1, с добавлением 0,5 мл глицеринового маточного раствора к 20 мл минимальной солевой среды (MSM) в газонепроницаемом флаконе для сыворотки. Этот исходный флакон для сыворотки затем пересеивали, от 1 до 20 мл свежей MSM, в 2 флакона для сыворотки под стандартным газовым пространством H₂/CO₂/O₂. Эти сывороточные флаконы инкубировали при 30 °C, 250 об/мин. Первоначальное оживление из глицеринового маточного раствора на газе занимало 2 дня, а субкультуре потребовался еще один день для роста. Две культуры сывороточных флаконов были предоставлены в качестве инокулята для биореактора. Измеряли оптическую плотность (ОП) инокулята, а также брали образец для анализа ДНК. Выращенный на газе инокулят имел ОП ок. 1. Ферментер инокулировали с начальной ОП ок. 0,1. Другими словами, бульон из сывороточного флакона разводили в биореакторе в соотношении 1:10. Инокулят переносили из сывороточных флаконов в биореактор с помощью шприца на 60 мл. После инокуляции измеряли значение ОП для момента времени T₀. Как правило, все измерения оптической плотности выполняли с помощью спектрофотометра Beckman Coulter DU720 UV/Vis.

Работа ферментера:

[454] Добавление основания - pH контролировали с помощью 2N NH₄OH

[455] Контроль пенообразования - если пена заполняла более ½ свободного пространства и не уменьшалась при распылении в свободном пространстве или рециркуляции, то использовали антивспениватель. (A8011, пеногасящая эмульсия Sigma Antifoam C Emulsion, <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a8011?lang=en®ion=US>)

[456] Корректировка питательных веществ - В дополнение к азотному питательному веществу, обеспечиваемому добавлением основания NH₄OH, во время работы добавлялись другие минеральные питательные вещества, чтобы продлить рост и

предотвратить возникновение каких-либо ограничений минеральных питательных веществ.

[457] На Фиг. 5 приведен пример кривой роста для водородокисляющего (knallgas) микроорганизма *Cupriavidus necator*, выращенного на газовом субстрате $H_2/CO_2/O_2$ в соответствии с этим протоколом. По оси Y откладывается оптическая плотность (ОП), измеренная при 650 нм, а по оси X - время, измеряемое в днях. Конечная ОП, измеренная при 650 нм, составляла 132, а конечная плотность сухой биомассы составляла 38 г/л при росте на газовом субстрате $H_2/CO_2/O_2$. Логарифмический рост продолжался первые полтора дня, однако биомасса продолжала накапливаться с линейной скоростью на момент завершения цикла в день 5.

Пример 3

Условия инокуляции и роста

[458] Организмы из рода *Rhodococcus* и из рода *Cupriavidus* были протестированы на их способность расти на разных источниках углерода (Фиг. 6). Колонии из штаммов, выращенных на чашках с агаром LB при 30 °C, переносили в колбы, содержащие 10% (об./об.) указанных сред (т.е. гетеротрофных или хемоавтотрофных), на 3-20 дней при 30 °C и 250 об/мин. Штамм *R. oracus* DSM 44193 демонстрировал рост только в условиях гетеротрофного роста, измеряемый по оптической плотности (ОП) при 650 нм на среде MSM (1 л среды А: 9 г $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 1,5 г H_2PO_4 , 1,0 г NH_4Cl и 0,2 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ на 1 л, 10 мл среды В: 50 мг цитрата аммония-железа и 100 мг $CaCl_2$ на 100 мл, 10 мл среды С: 5 г $NaHCO_3$ на 100 мл; и 1 мл раствора микроэлементов: 100 мг $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 30 мг $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 300 мг H_3BO_3 , 200 мг $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 10 мг $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 20 мг $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ и 30 мг $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ на 1 л) с добавлением 40 г/л глюкозы. Штамм *R. oracus* DSM 43205 показал идентичные скорости роста в гетеротрофных условиях, достигая ОП = 9,0. Штамм DSM 43205 также способен расти в хемоавтотрофных условиях (среда MSM, дополненная 66,7% H_2 , 9,5% CO_2 , 5% O_2 и 18,8% N_2). *Rhodococcus* sp. (DSM 3346) демонстрировал рост в гетеротрофных условиях и хемоавтотрофных условиях (среда 81 DSMZ: 1 л минеральной среды для хемолитотрофного роста: 2,9 г $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 2,3 г KH_2PO_4 , 1,0 г NH_4Cl , 0,5 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 г $NaHCO_3$, 0,01 г $CaCl_2 \cdot H_2O$ и 0,05 г $Fe(NH_4)$ цитрат на 1 л; и 5 мл раствора микроэлементов, с добавлением 80% H_2 , 10% CO_2 и 10% O_2). *Cupriavidus necator* (DSM 531) был способен расти в гетеротрофных и хемоавтотрофных условиях (среда, описанная для штамма DSM 43205) (Фиг. 6).

Пример 4

[459] В одной группе экспериментов колонии из штаммов *Rhodococcus*, выращенных на чашках с агаром LB при 30 °С, переносили в газонепроницаемые флаконы для сыворотки, содержащие указанные питательные среды и газовые смеси. (Исходный выращенный LB инокулят предварительно восстанавливали из глицеринового маточного раствора, хранящегося при -80 °С). Выращивание на газе во флаконах для сыворотки проводили в 160-миллилитровых закупоренных и герметично закрытых стеклянных флаконах для сыворотки Wheaton (VWR продукт № 16171-385). Объем жидких сред составлял от 10 до 20 мл. Бутылки закупоривали резиновой пробкой (VWR № 100483-774) и алюминиевым укупорочным колпачком (VWR № 89047-008), используя ручные кромкозагибочные щипцы Wheaton (VWR № 80078-996). Стерильные среды роста переносили во флаконы в стерильных условиях. Инокулят вводили во флаконы в стерильных условиях, и флаконы закупоривали резиновыми пробками и герметизировали. Газовую смесь добавляли во флаконы. После добавления газовой смеси уплотнение обжимали алюминиевым укупорочным колпачком для герметизации сывороточных флаконов. Затем флаконы помещали в инкубатор-встряхиватель для колб. Флаконы инкубировали при 30 °С, 250 об/мин. Все образцы брали в стерильных условиях с использованием шприцев и игл. Рост оценивали путем измерения оптической плотности (ОП) в спектрофотометре при 650 нм.

[460] В соответствии с процедурой, описанной выше, штамм *Rhodococcus oracus* DSM 43205 демонстрировал рост в хемоавтотрофных условиях в следующих средах: среда MSM (1 л среды А: 9 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1,5 г H_2PO_4 , 1,0 г NH_4Cl и 0,2 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ на 1 л; 10 мл среды В: 50 мг цитрат железа-аммония и 100 мг CaCl_2 на 100 мл; 10 мл Среда С: 5 г NaHCO_3 в 100 мл; и 1 мл раствора микроэлементов: 100 мг $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30 мг $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 300 мг H_3BO_3 , 200 мг $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 мг $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 мг $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ и 30 мг $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ на 1 л), дополненная газовой смесью, которая содержит 66,7% H_2 , 9,5% CO_2 , 5% O_2 и 18,8% N_2 . Объем жидкости составлял 20 мл, а объем свободного пространства для газа - 140 мл.

[461] *Rhodococcus* sp. DSM 3346 продемонстрировал рост в хемоавтотрофных условиях в следующих средах: Среда 81 DSMZ (1 л минеральной среды для хемолитотрофного роста: 2,9 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,3 г KH_2PO_4 , 1,0 г NH_4Cl , 0,5 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 г NaHCO_3 , 0,01 г $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 0,05 г цитрата $\text{Fe}(\text{NH}_4)$ на 1 л; и 5 мл раствора микроэлементов), с добавлением газовой смеси, которая содержит 80% H_2 , 10% CO_2 и 10% O_2 . Объем жидкости составлял 10 мл, а объем свободного пространства для газа составлял 150 мл.

[462] Клетки собирали через 72 часа, и профили жирных кислот, содержащихся в нейтральных липидах, таких как триацилглицерин (TAG), продуцируемых каждым штаммом, определяли методами газовой хроматографии и масс-спектрометрии (ГХ/МС).

Пример 5

[463] В другом эксперименте штамм *R. opacus* DSM 43205 выращивали на смеси газообразных H_2 и CO_2 и O_2 в качестве единственных источников энергии и углерода для выращивания в литровой бутылке. Инокулят восстанавливали из аликвоты маточной смеси вода + MSM, хранившейся при $-80\text{ }^\circ\text{C}$. В качестве среды использовали MSM, как описано выше. Аликвоту из маточного раствора, хранящегося при $-80\text{ }^\circ\text{C}$, инокулировали в MSM (20 мл) в небольшом флаконе для сыворотки. Рост на газе во флаконе для сыворотки проводили, как описано выше, в закрытом и герметизованном стеклянном сывороточном флаконе Wheaton объемом 160 мл с газовой смесью, состоящей из 67% H_2 , 24% воздуха (4,8% O_2), 9% CO_2 . Бутылку помещали в инкубатор-встряхиватель для колб и инкубировали при $30\text{ }^\circ\text{C}$, 250 об/мин.

[464] После приблизительно 72 часов роста, инокулят культуры для пересева высокой плотности готовили из газовой культуры сывороточного флакона путем центрифугирования и ресуспендирования в свежей MSM. Инокулят высокой плотности инокулировали в 100 мл MSM в стеклянной бутылке объемом 1 л с газонепроницаемой крышкой, имеющей два клапана, которые допускают приток и отток газа. В свободное пространство бутылки объемом 1 л подавали газовую смесь со следующим соотношением: H_2 : 71%; O_2 : 4,2%; N_2 : 15,8%; CO_2 : 9,0%.

[465] После добавления газа герметично закрытую однолитровую бутылку помещали в инкубатор-встряхиватель для колб при $28\text{ }^\circ\text{C}$ и 200 об/мин. Газы обновляли один раз в день. Культура росла на газе до тех пор, пока не была достигнута конечная ОП при 650 нм, составляющая ОП = 1,27.

[466] Проводили секвенирование ДНК для конечных восстановленных клеток после выращивания на газе в бутылке объемом 1 л для подтверждения идентичности штамма конечной культуры. Последовательности 16S рРНК определяли с использованием праймеров 27F и 800R. Для обоих праймеров лучшие результаты по методу BLAST были идентифицированы как *Rhodococcus* sp., *Rhodococcus opacus*, *Rhodococcus wrastislaviensis*, номера GenBank EU127452.1, AB032565.1 и AY940038.1 соответственно.

Пример 6

[467] Многочисленные оксигенородные виды являются общедоступными или могут быть выделены с использованием методик, описанных в данном документе. Так, например, по меньшей мере, 238 различных штаммов *Rhodococcus*, и по меньшей мере 55 различных штаммов *Cupriavidus* являются доступными из публичных депозитариев штаммов DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)), также как штаммы многих других родов, которые включают оксигенородные микроорганизмы, включая *Hydrogenovibrio*, *Rhodopseudomonas*, *Hydrogenobacter*, *Xanthobacter* и *Hydrogenothermus*. Оксигенородные штаммы также могут быть получены обычными способами, такими как выделение из образцов почвы или образцов геотермальной жидкости с использованием методов обогащения. Тестирование штаммов на предмет оксигенородного роста и способности продуцировать органические соединения, в том числе с числом атомов углерода C5 или больше, включая, без ограничений, аминокислоты и белки в заявленных условиях хемосинтеза, является обычным в данной области. Например, способность штамма *Rhodococcus* расти в оксигенородных условиях с использованием CO₂ в качестве источника углерода может быть осуществлена, как описано выше в предыдущих Примерах. Другие методы выращивания в оксигенородных (водородокисляющих) условиях с использованием CO₂ в качестве источника углерода описаны в "Thermophilic bacteria," Jakob Kristjansson, Chapter 5, Section III, CRC Press, 1992, pp. 86-88, и были признаны хорошо работающими для широкого разнообразия штаммов, принадлежащих к широкому спектру родов. Оценка продуцирования органических соединений, таких как хемосинтетически продуцируемые оксигенородными видами, также является обычной в данной области. Например, могут быть использованы газовая хроматография и масс-спектрометрия (ГХ/МС), как описано в Примере 5. Другие способы включают экстракцию липидов, тонкослойную хроматографию (ТСХ), газовую хроматографию (ГХ), высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) и масс-спектрометрию (МС), как описано в Waltermann et al. (2000) "Rhodococcus opacus strain PD630 as a new source of high-value single-cell oil? Isolation and characterization of triacylglycerols and other storage lipids" *Microbiology* 146:1143–1149.

Пример 7

[468] Примерно пять килограммов биомассы (сухой вес) было выработано штаммом *Cupriavidus necator* DSM 531, выращиваемым на смеси газообразных H₂, CO₂ и O₂ в качестве единственного источника энергии и углерода для роста. Из этой биомассы было экстрагировано и проанализировано растворимое в гексане масло. Для производства

биомассы из сырья H_2 , CO_2 и O_2 в биореакторах с перемешиванием и последующей экстракции масла из биомассы был использован следующий протокол.

[469] Оборудование: культуры *S. pectoris* выращивали периодически с использованием двух 20-литровых реакторов фирмы Applikon Biotechnology (Applikon) (Фиг. 7 и Фиг. 8).

[470] Биореактор: Каждый биореактор состоял из стеклянного сосуда, установленного на подставке с торцевой крышкой из нержавеющей стали, имеющей эластомерное уплотнение. Торцевая крышка имела проходы для многочисленных сквозных отверстий, которые имели все эластомерные уплотнения для предотвращения просачивания газа в реактор или утечки из него. Эти проходные отверстия позволяют разместить на торцевой крышке измерительный карман для термодатчика, датчики рН, датчики растворенного кислорода, впускные отверстия для газа, впускные отверстия для жидкости, выпускные отверстия для газа, отверстия для отбора проб жидкости и многое другое.

[471] Датчики биореактора: датчик температуры, расположенный в кармане термодатчика, использовался для контроля температуры и обеспечения возможности управления нагревателем. Датчик рН использовали для контроля рН и, при необходимости, для контроля добавления в реактор буферных растворов с более высоким или более низким рН. Датчик пены был использован для контроля добавления антивспенивателя. Датчик растворенного кислорода использовался для измерения уровня кислорода в реакторной жидкости и мог использоваться для контроля перемешивания или открывания/закрывания потока газа в реактор. Все датчики получали питание от, управлялись с, и подавали входные сигналы на контроллер/пульт управления биореактора.

[472] Перемешивание: мешалка проходила через торцевую крышку с полным уплотнением и магнитной муфтой. Мешалка имела внешний двигатель, который представлял собой отдельный элемент, размещенный на наружной части вала мешалки. Скорость двигателя контролировалась внешним контроллером, позволяющим точно регулировать скорость вращения.

[473] Нагрев/охлаждение: реактор нагревали с помощью внешнего электронагревательного элемента, в котором использовался пропорционально-интегрально-дифференциальный контроллер (PID) с замкнутым контуром, управляемый датчиком температуры Pt 100 через контроллер системы биореактора. Для поддержания температуры был также установлен "охлаждающий палец" для предотвращения перегрева среды двигателем мешалки.

[474] Установка биореактора: системы биореактора были смонтированы на металлических держателях штатива. Зажимы или цепи использовались для крепления этого штатива к опорам стойки, расположенным внутри вытяжного шкафа, чтобы предотвратить опрокидывание реактора. Вся установка штатива и реактора была помещена в неглубокий пластиковый контейнер для обеспечения вторичной защитной оболочки.

[475] Принципиальная схема биореакторов и несущей конструкции продемонстрирована на Фиг. 7. Два 20-литровых биореактора были расположены в вытяжном шкафу, как продемонстрировано на Фиг. 8. Биореакторы были установлены внутри вытяжного шкафа для улавливания выбросов газообразного водорода. Все устройства управления и источники газа были расположены снаружи вытяжного шкафа, также как и газовые баллоны, контроллеры реакторов, массовые расходомеры, датчики водорода и газовые регулирующие клапаны. На Фиг. 8 продемонстрированы два 20-литровых реактора, используемых при выращивании *S. pectoris* на газообразных H_2 , CO_2 и O_2 в качестве единственного источника энергии и углерода.

[476] Контроллер/пульт управления: Контроллер/пульт управления биореакторной системы включает компоненты, которые контролируют и управляют биореакторной системой. Эти устройства обеспечивают питание, контроль температуры, управление перемешиванием, получают входные сигналы от датчиков, включают и выключают питательные насосы (кислоты, основания, антивспенивателя и дополнительных питательных веществ) на основе входных сигналов датчиков и использовались для включения/выключения газовых потоков с помощью электромагнитных клапанов и ротаметров. Из-за отсутствия компонентов, изготовленных полностью из нержавеющей стали, эти устройства не использовались для контроля водорода, чтобы минимизировать риск утечек водорода. Устройства контроллера/пульта управления были расположены вне вытяжки на расстоянии от биореакторов, чтобы минимизировать воздействие водорода в случае утечки и минимизировать время работы операторов в непосредственной близости от биореакторов. На Фиг. 9 продемонстрированы контроллеры и пульта управления Applikon, которые использовались для управления реакторами. На Фиг. 9 представлены контроллеры, пульта управления, органы управления мешалкой, система обнаружения взрывоопасных газов, массовые расходомеры, регуляторы уровня, запасные резервуары основания, резервуар для добавления среды и резервуар для контроля пенообразования. Все элементы управления реактора были расположены снаружи вытяжки.

[477] Подача газа: Газ подавали в нижнюю часть биореактора через барботер, проходящий через торцевую крышку. Клапан, расположенный в непосредственной близости от реактора, позволял вручную перекрывать поток газа на каждом реакторе отдельно. Линия подачи газа, подведенная к реактору, представляла собой гибкую линию из нержавеющей стали с 0,2-микронным фильтром, установленным в головке реактора для минимизации возможного загрязнения. Массовые расходомеры, расположенные снаружи вытяжки, использовались для контроля скоростей потоков в реакторах. Линии между баллонами и массовыми расходомерами имели как ручные, так и электромагнитные клапаны как для ручного, так и для автоматического отключения подачи газов. Электромагнитные клапаны были подключены к датчикам взрывоопасных газов, которые автоматически перекрывали газовые потоки при обнаружении водорода в лаборатории или в вытяжном шкафу.

[478] Хранение газа: для хранения водородных баллонов использовался газовый шкаф. Газовый шкаф был установлен в непосредственной близости и включал вентиляцию и разбрызгиватели. В шкафу было достаточно места для хранения нескольких баллонов, чтобы можно было легко переключаться между старым и новым баллонами.

[479] Контроль безопасности: Детекторы взрывоопасных газов использовались для определения присутствия водорода в лаборатории. Несколько датчиков были расположены в ответственных положениях в лаборатории и в вытяжном шкафу. Эти детекторы газа были настроены на отключение электромагнитных клапанов на линиях подачи газа в случае обнаружения водорода, что перекрывает подачу газа в реакторы.

[480] Перистальтический насос: дополнительный перистальтический насос был расположен в вытяжном шкафу. Этот насос использовался для подачи свежей среды в реакторы в начале рабочего цикла и использовался для удаления среды и биомассы в конце рабочего цикла.

[481] Хранение среды: Пластиковые бутылки или стеклянные бутылки использовались для хранения свежей среды и биомассы, извлеченной после рабочего цикла.

[482] Среда: Среда MSM, используемая для этого эксперимента, описана в *Thermophilic Bacteria*, CRC Press, Boca Raton, FL, Jacob K. Kristjansson, ed., 1992, p. 87, Table 4.

[483] Инокулят: Инокулят *Cupriavidus necator* готовили из консервированных 0,5 мл глицериновых маточных растворов штамма 531 DSMZ, хранящихся при -80 °C. Оживление культур начинали на газовой смеси $H_2/CO_2/O_2$ в соответствии с протоколом флакона для сыворотки, описанным в Примере 1, с добавлением 0,5 мл глицеринового

маточного раствора к 20 мл минимальной солевой среды (MSM) в газонепроницаемом флаконе для сыворотки. Инокулят получали в нескольких контейнерах, которые объединяли в шкафу биобезопасности в одной бутылке со стерильной средой, снабженной колпачком для стерильного переноса содержимого. Была определена ОП и взята штриховая культура инокулята. Затем инокулят перемещали в реактор, используя стерильную трубку для переноса и перистальтический насос. После инокуляции реактора определяли исходную ОП партии с помощью блока для образцов.

[484] Подготовка среды и добавление: Все среды были подготовлены с использованием рецептур, приведенных в *Thermophilic Bacteria*, CRC Press, Boca Raton, FL, Jacob K. Kristjansson, ed., 1992, p. 87, Таблица 4, за исключением больших количеств, необходимых для 20-литровых емкостей. Основной компонент среды (А) был приготовлен в 20-литровых бутылках Nalgene, снабженных крышкой для стерильной переноса жидкости и фильтровальными блоками. Среду автоклавировали в бутылках и переносили в автоклавированные реакторы с использованием стерильных трубок и перистальтических насосов, чтобы избежать загрязнения. Меньшие по количеству компоненты сред (В и D) готовили в больших резервуарах и стерилизовали путем введения растворов стерильным 0,2-микронным фильтр-шприцем одноразового использования непосредственно в реактор с использованием мембраны. Использование мембран минимизировало риск загрязнения, поскольку это позволяло не открывать реактор. С четвертым меньшим по количеству компонентом среды (С) обращались способом, аналогичным А, в котором готовили большой резервуар со средой, снабженный колпачком для стерильного переноса, автоклавировали, и среду переносили, используя стерильные трубки и перистальтический насос.

[485] Подготовка и запуск биореактора. Перед запуском свежих инокулированных партий биореактор готовили к автоклавированию. Устанавливали на место торцевую крышку реактора. Соединительные линии присоединяли, зажимали, а конец покрывали фольгой и обматывали автоклавной лентой. 0,2-микронный фильтр подключали к впускному отверстию барботера газа для стерилизации входящих газов. Вытяжная линия была зажата и герметизирована фольгой. Были установлены карман термпары, холодильник, датчик уровня пены, охлаждающий змеевик, устройство для отбора проб, регулируемая трубка для отбора жидкости и датчик растворенного кислорода. Порт рН-детектора был закрыт и запечатан фольгой. Затем реактор автоклавировали в течение 60 минут при 131 °С по сухому циклу. Датчик рН стерилизовали комбинацией кратковременного воздействия пламени, этанола и ультрафиолетового излучения. После того как биореактор был автоклавирован и охлажден до комнатной температуры, в

реактор вставляли датчик рН, причем как реактор, так и датчик находились внутри шкафа биобезопасности. Затем реактор был установлен в вытяжке; т.е. были подключены линии охлаждения, соединительные линии, средства электронного управления, нагреватель, двигатель мешалки и т.д. Компонент среды А переносили в реактор как можно быстрее, чтобы минимизировать время, в течение которого датчик рН оставался сухим. Включали контроль температуры и перемешивание, а также, при необходимости, подачу воды для охлаждения. Как только температура среды достигла желательного значения, компоненты среды В, С и D перемещали в реактор способами, описанными выше. После этого запускали контроль рН.

[486] Инокуляция биореактора: Свежую инокуляцию проводили, как описано выше. В ряде экспериментов среду и биомассу из предыдущей партии удаляли с помощью перистальтического насоса, за исключением остаточного объема, обычно менее одного литра, который использовался для инокуляции следующей партии. При инокуляции остаточным объемом из предыдущей партии после удаления основного объема культуры компонент А стерильной среды при комнатной температуре переносили в биореактор и включали нагрев. Остальные компоненты среды В, С и D затем переносили с помощью методов, описанных выше. Затем включали поток газа, включали перемешивание и включали контроль рН. Считалось, что с этого момента эксперимент начался, и измеряли исходную ОП. После достижения реактором рабочей температуры, включили охлаждение.

[487] Состав газа и скорости потока. Используемые составы газа были такими, как указано в разделе 5. Соотношения контролировали с помощью контроллеров массового расхода. Расход газа составлял от 0,05 до 0,3 VVM (объем газа на единицу объема жидкости в минуту) от общего расхода газа. Обычно, расход составлял 0,05 VVM в выходные дни и 0,2 VVM в течение недели, когда оба реактора работали и имели контроль пенообразования. В экспериментах без использования контроля пенообразования, обычно использовались значения от 0,05 до 0,075 VVM для снижения пенообразования до приемлемых уровней.

[488] Контроль рН: Для контроля рН среды в биореакторе использовали гидроксид аммония (2,0 M). Раствор гидроксида аммония готовили автоклавированием 1200 мл воды MilliQ в 2-литровом флаконе для среды, снабженном колпачком для стерильного переноса и фильтровальным блоком, и добавлением 800 мл стерилизованного фильтрованием 5,0 M гидроксида аммония в шкафу биобезопасности. Гидроксид аммония автоматически подавался в реактор через перистальтический насос, который управлялся контроллером биореактора с использованием сигнала детектора рН.

[489] Добавление/коррекция питательных веществ: Используемые растворы для коррекции питательных веществ были такими же, как и используемые для исходных сред, но с другими количествами. Минеральные питательные вещества были добавлены во время эксперимента, чтобы продлить рост и предотвратить возникновение каких-либо ограничений минеральных питательных веществ. Растворы для коррекции либо добавляли непосредственно в реактор с использованием шприца и стерилизации через 0,2-микронный фильтр, либо добавляли по стерильным трубопроводам, которые оставались подключенными к реактору, с помощью перистальтического насоса. Общий объем реактора также регулярно регулировали вручную (обычно ежедневно), удаляя небольшие порции реакторной среды и биомассы, чтобы поддерживать рабочий объем приблизительно 15,5 л. Это делалось для компенсации добавления воды в результате коррекции питательных веществ и образования воды при клеточном дыхании для поддержания стабильной кинетики перемешивания и предотвращения переполнения.

[490] Отбор проб: Небольшие аликвоты раствора среды регулярно отбирали из биореактора через блок отбора жидких образцов. Они использовались для проведения измерений ОП600 (OD600) на биофотометре Eppendorf Biophotometer Plus, а также для получения микрофугированных образцов для анализа ДНК. Микрофугированные образцы получали при 10000 об/мин в течение 10 минут, декантировали и хранили при -20 °C.

[491] Контроль пенообразования: после достижения ОП около 15 пена начинает заполнять свободное пространство, и если ее не контролировать, то пена в течение ночи легко может заполнить 2-литровый расширительный резервуар, когда расход газа составляет 0,2 VVM. Датчик пены использовали для определения наличия пены и включения насоса, подающего раствор пеногасящей силиконовой эмульсии. Расход газа и скорость мешалки регулировали по мере необходимости в партиях 11 и 12 для предотвращения чрезмерного образования пены. При величина расхода от 0,05 VVM до 0,075 VVM биореакторы могли работать без антивспенивателя. Однако пена будет заполнять свободное пространство, вызывая переливание небольшого количества в расширительный контейнер для пены через выпускное отверстие газа.

[492] Во время наработки партий температуру, pH и ОП контролировали и регистрировали. Чистоту клеток контролировали с помощью штриховых пластинок. Всего было наработано 9 партий в масштабе 20 литров с использованием *S. necator*. Конечные значения оптической плотности (ОП) партий обычно составляли от 30 до 50. Результаты для этих 20-литровых партий приведены в Таблице 1.

Таблица 1.

Результаты серии экспериментов с партиями *S. necator* в масштабе 3 и 20 литров.

№ партии	Масштаб	Реактор	Дата запуска	Дата завершения	Начальная ОП	Конечная ОП	Продолжительность (ч)	Диапазон значений общего газового потока	Диапазон значений скорости перемешивания (об./мин)	Инокулят
1	3 л		9/4	9/6	0,63	28	57,7	0,1-0,5	850	240 мл выращенного на газе <i>S. necator</i> из сывороточных флаконов
2	3 л		9/9	9/13	2,96	32,4	103	0,2-1	900	Ок. 200 мл партии 1
3	3 л		9/16	9/20	5	40	99,9	0,2-1	1000-2000	Ок. 200 мл партии 2
4	20 л	A	9/23	10/3	0,94	42	248	0,1-0,3	600-800	Ок. 600 мл партии 3
5	20 л	B	10/1	10/9	1,1	6,7	188	0,05-0,2	200	Ок. 650 мл партии 4
6	20 л	A	10/4	10/11	0,085	42	165	0,05-0,2	800-900	Ок. 400 мл выращенного на сахаре <i>S. necator</i> из колб
7	20 л	B	10/11	10/18	1,2	50	168	0,05-0,2	200-850	Ок. 500 мл партии 6
8	20 л	A	10/11	10/18	2,1	42,5	167	0,05-0,2	800-900	< 1 л партии 6
9	20 л	B	10/18	10/25	3,5	49,4	165	0,05-0,2	750-850	< 1 л партии 7
10	20 л	A	10/18	10/24	1,9	39,2	143	0,05-0,2	800-950	< 1 л партии 8
11 (S1)	20 л	A	11/1	11/7	2,34	29,2	143	0,04-0,2	800-850	Ок. 750 мл партии 12
12	20 л	B	10/25	11/5	0,56	37,3	264	0,05-0,1	500-750	< 500 мл партии 10

Восемь из партий достигли конечной оптической плотности выше 39, одна, которая была получена при более низком раходе газа (№ 11), достигла оптической плотности 30, и одна партия, которая была ограничена низкими скоростями перемешивания (№ 5), достигла оптической плотности, равной всего 6,7. Наивысшая достигнутая ОП составила 50 в партии № 7. Всю выращенную биомассу центрифугировали из культурального бульона.

[493] Центрифугирование и хранение биомассы. Центрифуга Beckman Coulter Allegra X-12R была использована для центрифугирования собранного бульона экспериментальной партии, для извлечения биомассы. Allegra-12R имеет охлаждение до -10 °C и оснащена качающимся ротором SX4750, способным развивать скорость 3750 об/мин, и имеющим объем 3 л. После завершения эксперимента, биомассу и среду перемещали из биореактора с использованием перистальтического насоса в 10-литровые полипропиленовые канистры. Канистры с биомассой и средой хранили в холодильнике до центрифугирования. Биомассу центрифугировали по 3 литра за раз, разделяя ее между четырьмя поликарбонатными центрифужными стаканами на 750 мл. Центрифуга работала на скорости 3750 об/мин при 4 °C в течение 30 минут. Супернатант декантировали и стерилизовали отбеливателем перед утилизацией. Обезвоженную биомассу для одной экспериментальной партии объединяли и хранили в полипропиленовых бутылках в холодильнике.

Пример 8

Разрушение клеток и экстракция масел из влажной биомассы штамма *Cupriavidus necator*

[494] Мы определили, что эффективная экстракция масла из образцов влажного клеточного материала может быть достигнута путм использования лизиса клеток с последующей процедурой экстракции масел изопропанолом/гексаном, описанной ниже. Используя эту процедуру, извлекали сырой гексановый экстракт биомассы *C. necator*, выращенной из CO₂ в качестве единственного источника углерода, из которого был получен микробный жир.

[495] Для оценки содержания влаги во влажной биомассе были помечены два пустых флакона и были определены их веса, и по 1 грамму влажной биомассы помещали в каждый из флаконов и высушивали в течение 12 часов при 60 °C с использованием вакуумной печи (вакуумная печь Binder Safety, модель VDL 115-9030-0040). Для получения статистически значимых величин, образцы тестировали в двух повторах.

[496] Для изучения параметров процесса и рабочих условий процесса экстракции липидов с использованием растворителей гексана и 2-пропанола, 10 г (A1) и 9,4 г (A2)

влажной биомассы смешивали с 33,5 мл и 31,5 мл 2-пропанола, соответственно. Суспензию клеток затем переносили в лабораторные стаканы на 250 мл, и стаканы хранили на ледяной бане и обрабатывали ультразвуком в периодическом режиме в течение 20 минут. Влажную биомассу обрабатывали ультразвуком с 2-пропаном для полного разрушения клеток, лизиса клеток и выделения масел из микробных клеток. Был использован соникатор QSonica Q700. Температурный зонд был погружен в стакан для регистрации изменения температуры во время обработки ультразвуком. Разрушение клеток с помощью соникатора или ультразвуковых волн является очень распространенным методом лизиса клеток; ультразвук - это циклическая волна звукового давления с частотами от 20 кГц до нескольких гигагерц. Во время цикла низкого давления ультразвуковые волны высокой интенсивности создают в жидкости небольшие пузырьки вакуума. Когда пузырьки достигают объема, при котором они больше не могут поглощать энергию, они резко коллапсируют во время цикла высокого давления, и результирующие сдвиговые силы разрушают оболочку клетки. Как продемонстрировано на Фиг. 10, после полного разрушения клеток цвет биомассы изменился с коричневого на кремовый. Суспензия биомассы до обработки ультразвуком продемонстрирована на Фиг. 10 слева, а после обработки ультразвуком - справа. Исходная суспензия биомассы была вязкой, но после обработки ультразвуком вязкость образца снизилась, возможно, из-за эффекта разрыва макромолекул сдвиговыми силами.

[497] После лизиса клеток путем обработки ультразвуком в 2-пропанол, добавляли в A1 и A2 33,5 мл и 31,5 мл гексана, соответственно, и инкубировали при 60 °C в течение часа. Смесь перемешивали при 100 об/мин. После часа протекания реакции образцы переносили в центрифужные пробирки и центрифугировали при 3200 g в течение 15 минут с помощью настольной центрифуги (центрифуга Eppendorf R). Супернатант, представляющий собой смесь гексана, 2-пропанола и растворенных масел, липидов и полимеров, переносили в колбу Rotavap и перегоняли при 60 °C с помощью роторного испарителя (Rotavap R-210/215). Гексан и 2-пропанол выпаривали при 60 °C и давлении вакуума менее 200 мбар. После выпаривания гексана и 2-пропанола было получено около 4 г желтого масла.

[498] Экстракция партий влажной биомассы размером от 200 до 250 г

[499] После того, как были подтверждены результаты экстракции в малых масштабах, начались работы по экстракции в более крупном масштабе. 4 кг влажной биомассы C. necator были разделены на 20 партий (0,2 кг на партию) для экстракции, и каждую партию переносили во встряхиваемую колбу. В каждую колбу добавляли 650 мл изопропанола. Использовали 5 мл растворителя 2-пропанола на 1,5 грамма влажной

биомассы. Биомассу хорошо смешивали с 2-пропанолом до получения однородной суспензии.

[500] После получения однородной суспензии использовали обработку ультразвуком для лизиса клеток. Соникатор QSonica Q700 использовали в непрерывном режиме для полного разрушения клеток. Проточная ячейка соникатора была присоединена к рупору, а трубки присоединены к впускному и выпускному отверстиям проточной ячейки. Впускная трубка проточной ячейки проходила через перистальтический насос и была погружена в колбу, содержащую суспензию биомассы, в то время как выпускная трубка из проточной ячейки была помещена в ту же колбу, чтобы обеспечить циркуляцию. Для проведения полного лизиса клеток рассеивали 1-1,2 кДж энергии на грамм влажной биомассы. Температурный зонд был погружен в химический стакан с образцом для регистрации изменения температуры во время обработки ультразвуком.

[501] Каждую из 20 порций, приготовленных из 4 килограммов исходного материала, обрабатывали ультразвуком в периодическом режиме с амплитудой 100% в течение 30 минут с интервалами 30 секунд после каждого 1-минутного ультразвукового импульса.

[502] После обработки ультразвуком 2-пропанолом добавляли 5 мл гексана на грамм влажной биомассы, затем образцы инкубировали с использованием встряхивателя Kuhner Shaker X при 60 °C в течение часа. Добавляли к каждой партии 650 мл гексана, а затем инкубировали в течение 60 минут при 60 °C.

[503] Образцы переносили в центрифужные пробирки и центрифугировали с использованием центрифуги Eppendorf R при 3200g в течение 15 минут. Каждую порцию биомассы распределяли в пробирки центрифуги Eppendorf R объемом 4×400 мл. Скорость вращения центрифуги была установлена на 4000 об/мин, что эквивалентно 3200g для ротора с радиусом 18 см.

[504] После отделения осадка клеток органические экстракты, т.е. супернатант, переносили в смесительную колбу роторного испарителя (Rotavap). Rotavap использовали для отделения масел и полимеров от гексана и 2-пропанола. Гексан и 2-пропанол выпаривали при 60 °C и 200-100 мбар и растворитель удаляли из масла (oil dried of solvent). Гексан и 2-пропанол нагревали с помощью нагревательной бани при 60 °C.

[505] Для экстракции в большем масштабе оптимальные условия перегонки были достигнуты при давлении вакуума 100 мбар и температуре водяной нагревательной бани 60 °C; однако после испарения гексана и 2-пропанола желтую смесь полимеров/масел

оставляли внутри смесительной колбы. Для отделения масел от желтых полимеров повторно применяли гексан и затем полимеры отделяли с помощью центрифуги.

[506] Смесь полимер/масло/гексан повторно нагревали до 60 °С в течение 10 минут, переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 3200 об/мин в течение 5 минут. После повторного нагревания и центрифугирования масло отделяли и выделяли и анализировали. Было обнаружено, что масляный экстракт содержит в основном насыщенные и мононенасыщенные жирные кислоты C16 и C18, включая пальмитиновую кислоту - основной компонент пальмового масла. Из 4 кг влажной биомассы *C. necator*, что соответствовало около 1 кг сухой биомассы, было извлечено 80 граммов сырого гексанового экстракта (т.е. растворимых в гексане масел).

[507] В общей сложности около 230 мл масла было извлечено из различных образцов *Cupriavidus necator*, полученных из H₂ и CO₂ в качестве единственного источника водорода, электронов и углерода, в соответствии со способами, описанными в этом разделе. Это соответствует около 210 граммам масла. Из этого общего количества около 160 мл (140 г) масла было извлечено из образцов, сгенерированных 20-литровыми партиями, описанными в этом разделе, а остальная часть была получена из других непрерывных и периодических экспериментов на субстратах H₂/CO₂.

[508] Было обнаружено, что остаточная биомасса, оставшаяся после экстракции масла, имеет высокое содержание ПГБ (полигидроксibuтират) и белка.

Пример 9

Производство аминокислот из сырья, состоящего из синтез-газа, или его компонентов.

[509] Штаммы *Cupriavidus necator* DSM 531 и DSM 541 культивировали с использованием газовой смеси H₂/CO₂/O₂ и среды для ферментации с минеральными солями. Культуру выращивали в течение 96 часов. в 20 мл среды MSM (1 л Среда А: 9 г Na₂HPO₄·12H₂O, 1,5 г H₂PO₄, 1,0 г NH₄Cl и 0,2 г MgSO₄·7H₂O на 1 л; 10 мл Среда В: 50 мг цитрата железа-аммония и 100 мг CaCl₂ на 100 мл; 10 мл Среда С: 5 г NaHCO₃ в 100 мл; и 1 мл раствора микроэлементов: 100 мг ZnSO₄·7H₂O, 30 мг MnCl₂·4H₂O, 300 мг H₃BO₃, 200 мг CoCl₂·6H₂O, 10 мг CuCl₂·2H₂O, 20 мг NiCl₂·6H₂O и 30 мг Na₂MoO₄·2H₂O на 1 л) в флаконе для сыворотки с добавлением 66,7% H₂, 9,5% CO₂, 5% O₂ и 18,8% N₂ при 30 °С и 200 об/мин.

[510] Для обнаружения лизина в ростовой среде 1 мл клеток (ОП = 0,1) отделяли центрифугированием (10000 об/мин, 5 минут при комнатной температуре) и супернатант (200 микролитров) дополнительно фильтровали (0,22 микрон). Образцы супернатантов

собирали и анализировали на секрецию аминокислотосодержащих соединений, таких как аминокислоты, включая лизин, тирозин и фенилаланин, как продемонстрировано в Таблице 2.

Таблица 2. Секретируемые *S. necator* аминокислотосодержащие соединения.

	Соединение	Холостой	DSMZ 531; <i>S. necator</i>	DSMZ 541; <i>S. necator</i>	
			мкмоль/л	мкмоль/л	Кратность разницы
Glu	Глутаминовая кислота	0,1952	11,556	40,614	3,5
Saar	Саркозин	1,7232	2,5708	36,4692	14,2
Ser	Серин	1,7688	7,9428	35,8164	4,5
Gly	Глицин	9,4757	10,3272	35,0351	3,4
Ala	Аланин	0,6504	5,996	32,3436	5,4
Thr	Треонин	0,216	5,4152	22,9456	4,2
Val	Валин	0,0984	4,182	21,5904	5,2
Ile	Изолейцин	0,0272	2,1476	14,0068	6,5
Orn	Орнитин	0,9324	10,4876	13,056	1,2
His	Гистидин	0,99	2,3816	12,0852	5,1
Arg	Аргинин	0,2988	0,4112	9,3428	22,7
Phe	Фенилаланин	0,1	3,4216	8,6652	2,5
Lys	Лизин	0,1012	0,063	7,9088	125,3
Tyr	Тирозин	0,386	2,9448	7,3972	2,5
Cit	Цитозин	0,3332	0,6572	6,8248	10,4
Asp	Аспарагиновая кислота	2,1964	3,2775	4,6132	1,4
Gln	Глутамин	0,1412	1,2548	4,2944	3,4
Pro	Пролин	0,0477	1,2567	4,1107	3,3
Leu	Лейцин	0,054	2,5558	3,7205	1,5
Trp	Триптофан	0,0352	0,9464	2,7072	2,9
Met	Метионин	0,0156	1,3944	1,614	1,2
Trp	Trp	0,034	0,5208	0,8052	1,5
B-Aala	Бета-аланин	0	2,0904	0,6688	0,3
SAM	S-аденозилметионин	0	0	0,5604	
SAH	S-аденозилгомоцистеин	1,194	2,3232	0,2812	0,1
MetSo	Метионинсульфоксид	0,0128	0,3696	0,2528	0,7

Hcy-PCA	Hcy-PCA	0,024	0,1944	0,2344	1,2
a-AAA	a-AAA	0,0096	0,2008	0,1492	0,7
APA	APA	0	0,0248	0,134	5,4
Put	Путрацин	0,1912	15,0568	0,128	0,0
Cys-PCA	Cys-PCA	0,0392	0,7148	0,1272	0,2
GSH-PCA	GSH-PCA	0,0056	0,0052	0,0468	9,0
Spd	Spd	0,0652	0,0728	0,0444	0,6
3-His	3-His	0,0264	0,0384	0,0276	0,7
Cy2	Cy2	0,0364	0,0628	0,0128	0,2
Cth	Cth	0,0072	0,0072	0,0124	1,7
CysGly-PCA	CysG;ly-PCA	0,002	0,01	0,0112	1,1
Erg	Erg	0,0076	0,0512	0,0084	0,2
Hcy2	Hcy2	0,0116	0,008	0,0048	0,6

[511] Лизин - это шестиуглеродная молекула, а тирозин и фенилаланин - это девятиуглеродные молекулы. Было отмечено, что штамм *C. necator* DSM541 секретировал в среду более высокие концентрации лизина, тирозина и фенилаланина по сравнению со штаммом *C. necator* DSM531. Анализы проводили на 200 мкл стерильно отфильтрованной ферментационной среды. Соединения выделяли и дериватизировали с использованием набора для очистки и дериватизации (например, EZ-FaaST (Phenomenex) с последующей жидкостной хроматографией-масс-спектрометрией для разделения и идентификации соединений, которые были секретированы бактериальными штаммами в среду (Таблица 2). Уровни лизина, обнаруженные в среде DSM 541, были в 125 раз выше, чем для DSM 531.

Пример 10

[512] Штамм *Hydrogenovibrio marinus* DSM 11271 выращивали до плотности более восьми грамм на литр сухих клеток на смеси газообразных H_2 , CO_2 и O_2 в качестве единственного источника энергии и углерода для роста (Фиг. 11). Придерживались следующего протокола для экспериментов, проводимых с использованием смеси газов, содержащей H_2 , CO_2 и O_2 , в биореакторе с мешалкой.

[513] Оборудование: Культуру выращивали периодически, используя изготовленный на заказ стеклянный ферментер на 500 мл с торцевой пластиной из PEEK; барботажную трубку с одной насадкой пористой стеклянной фритты, соединенную с

трубкой для подачи газа с фильтром 0,2 мкм; порт с мембраной для доставки корректирующих добавок; погружную трубку до дна с асептическим пробоотборником, холодильник, соединенный трубопроводом с расширительным сосудом с фильтром 0,2 мкм на выпускном отверстии газа; порт для подачи основания и трубопроводы подачи основания с фитингом с фиксатором Люэра к стерильному шприцу; заземляющий электрод (grounding probe); порт для подачи пеногасителя; датчик pH/температуры; окислительно-восстановительный электрод (ORP). Температуру устанавливали на 37 °C, а pH на 6,5 с помощью коммерческого контроллера (Electrolab, Fermac 360, United Kingdom). Заданная температура поддерживалась нагревательной пластиной на дне реактора и встроенной стеклянной рубашкой для воды охлаждения. pH поддерживали на уровне 6,5, используя 6N NH₄OH. Реактор был установлен на плите магнитной мешалки (VWR 12365-344), и для перемешивания использовался стержень магнитной мешалки (крестообразной формы, VWR 'spinplus' № 58947-828). Мешалка была установлена на 300-400 об/мин. Скорость подачи газа в биореактор составляла 1 VVM (объемов газа на единицу объема жидкости в минуту). Для подачи газа использовали сжатый H₂, сжатый CO₂ и воздух помещения, все при давлении 138 кПа (20 psi). H₂ и CO₂ поступали в дозатор расхода (Matheson G2-4D151-E401/E401, 20 psi), который устанавливает соотношение газов. Воздух подавался в расходомер с переменным сечением (Key Instruments 1G03_R5). Газовая смесь H₂/CO₂ из дозатора потока подавалась в поток воздуха и затем в ферментер через расходомер с переменным сечением. Манометр использовали для контроля давления подачи газа в ферментер. Входящий газ пропускали через фильтр 0,2 мкм (Pall, деталь № (p/n) 4251), а затем диспергировали в бульоне ферментера через фриттовую насадку из пористого пирексного стекла (40-60 мкм, Sigma-Aldrich CLS3953312-C) и выводили из реактора через холодильник (с рубашкой и охлаждением) в 2-литровую расширительную бутылку для пены, затем через еще один фильтр 0,2 мкм (Pall, деталь № 4251) и, наконец, в вытяжную систему. Поток CO₂ был установлен на минимальном уровне с.л. = 5 (с.л. = осевая линия поплавка), и другие газы были установлены для обеспечения целевого состава газа, рассчитанного в соответствии с таблицами расходомера, при измерении состава методом ГХ, с корректировкой и повторным измерением. Использовали с.л. H₂ = 25, с.л. воздуха = 45 для получения газовой смеси, имеющей соответствующие пропорции CO₂/O₂/H₂, равные 11/6,3/59. Постоянный мониторинг содержания O₂ во входных и выходных линиях проводился с использованием зонда Foxo. Время от времени отбирались пробы газа для анализа методом ГХ (в пакеты из фольги объемом 1 л, skcinc.com, деталь № 262-01).

[514] Среда: один литр базальной среды содержал 2,0 г K_2HPO_4 , 1,0 г KH_2PO_4 , 5,0 г $(NH_4)_2SO_4$, 29,3 г NaCl, 0,2 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 10,0 мг $CaCl_2$, 10,0 мг $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,6 мг $NiSO_4 \cdot 7H_2O$ и 2,0 мл раствора микроэлементов. Состав раствора микроэлементов был взят из Thermophilic Bacteria, CRC Press, Boca Raton, FL, Jacob K. Kristjansson, ed., 1992, p. 87, Table 4.

[515] Автотрофный инокулят. 10% инокулят, выращенный на газе из инокулята, готовили в двух флаконах по 500 мл с пробками, содержащими 50 мл жидкой среды. Инокулят объемом 61,5 мл, ОП600 0,75, вводили в биореактор через погружную трубку ниже уровня жидкости, чтобы предотвратить рассеивание в свободном пространстве. После инокуляции линию продували фильтрованным воздухом для удаления захваченного инокулята в погружной трубке.

[516] Работа ферментера: Добавление основания - pH контролировали с помощью 6N NH_4OH ; Пополнение питательных веществ - В дополнение к питательному азоту, обеспечиваемому добавлением основания NH_4OH , были добавлены 0,2 г $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, когда бульон достиг значения ОП = 3, и 2 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, при достижении бульоном ОП = 10. Было определено, что приток O_2 составляет около 5%, а отток O_2 составляет 3-4%. Образцы отбирали из трубки, доходящей до дна реактора, с использованием асептической системы отбора проб с бутылками на 25 мл. Результаты секвенирования ДНК подтвердили *N. marginus*, и рост загрязнений не наблюдался на чашках с агаром, которые ежедневно засеивали штрихами на протяжении всего эксперимента.

[517] В таблице 3 приведена плотность сухой клеточной массы (CDW), измеренная в различные моменты времени на протяжении эксперимента. Плотность CDW достигла более 8 г/л в день 5. Содержание растворимого в хлороформе/метаноле липида и растворимого в гексане липида, соответственно, в процентах от биомассы, отобранной в различные моменты времени, также приведено в Таблице 3. Липиды анализировали методом ГХ/МС с использованием методов, описанных выше, и было обнаружено, что они содержат жирные кислоты длиной от 14 до 20 атомов углерода.

Таблица 3

Образец №	Дней	Объем (мл)	Сухой вес (г/л)	Оп	n	Экстрагируемые хлороформом/метанолом (%)		Вещества, экстрагируемые гексаном (%)	
						Среднее	Ст. откл.		
T3	2,78	25	4,556	7,068	2	19,34	11,12	6,88	0,72
T4	3,79	25	6,776	11,824	3	18,42	2,83	8,12	0,43

T5	4,79	25	7,492	14,18	3	20,59	6,31	8,99	2,39
T6	5,79	25	8,296	13	3	24,13	6,07	8,26	1,53

Плотность сухой клеточной массы (CDW), измеренная в различные моменты времени во время роста *N. marginus* на газе. Также указано содержание растворимого в хлороформе/метаноле липида и растворимого в гексане липида, соответственно, в процентах от взятых образцов биомассы.

Пример 11

[518] Штамм *Rhodopseudomonas capsulata* DSM 1710 выращивали до ОП 4,5 на смеси газообразных H_2 , CO_2 и O_2 в качестве единственного источника энергии и углерода для роста. Придерживались следующих протоколов для экспериментов, проводимых с использованием смеси газов, включающей H_2 , CO_2 и O_2 , в герметично закрытой бутылке объемом 1 литр с непрерывной подачей потока газов.

[519] Оборудование: Культуру выращивали периодически с использованием изготовленной на заказ системы, включающей 1-литровые флаконы для подачи растворителя для жидкостной хроматографии высокого давления (ВЭЖХ), которые были приспособлены для использования в качестве флаконов для культивирования. В эти культуральные сосуды объемом 1 литр непрерывно подавали газы из системы газовых резервуаров; газовых смесителей; фильтров (0,2 мкм); расходомеров; и увлажнителей. Такая система подачи газа и культуральных сосудов схематически проиллюстрирована на Фиг. 12. Газы распределяли и смешивали с раствором с использованием пористой стеклянной фритты. Сосуды для культивирования содержали 200 мл жидкой среды и были завернуты в алюминиевую фольгу для предотвращения попадания света в среду. Температуру контролировали путем погружения сосудов с культурой в водяную баню. pH не контролировали, за исключением включения в среду химических буферов. Газ отводился из сосудов с культурой через фильтр 0,2 мкм, и вся система была установлена внутри вытяжного шкафа. Подача газа осуществлялась из сжатой газовой смеси H_2 и CO_2 , а также из отдельного резервуара со сжатым O_2 . Целевая газовая смесь для эксперимента состояла из 10% O_2 , 5% CO_2 и 85% H_2 . Расходомер газового резервуара смеси H_2/CO_2 был установлен на 25, а баллона с O_2 - на 34. Это давало газовую смесь с 10,5% O_2 , 5% CO_2 и 84,5% H_2 , по результатам измерений методом ГХ (Shimadzu GC-8A, детектор теплопроводности (TCD) и колонка Alltech CTR I), что считалось достаточно близким к целевой смеси для проведения эксперимента.

[520] Среда: 970 мл деионизированной воды; 20 мг Na₂ ЭДТА; 12 мг FeSO₄·7H₂O; 200 мг MgSO₄·7H₂O; 75 мг CaCl₂·2H₂O; 1 г NaCl; 1 г (NH₄)₂SO₄; 1 мг тиамина HCl; 15 мкг биотина; 1 мл раствора микроэлементов. Раствор микроэлементов: 250 мл деионизированной воды; 700 мг H₃BO₃; 398 мг MnSO₄·H₂O; 188 мг Na₂MoO₄·2H₂O; 60 мг ZnSO₄·7H₂O; 10 мг Cu(NO₃)₂. pH доводили до 7,2 перед автоклавированием. После автоклавирования добавляют 30 мл стерильного раствора с 1,2 г KH₂PO₄ и 1,8 г K₂HPO₄. pH снова доводят до pH = 7,2.

[521] Инокулят: 10% инокулята, полученного из культуры *R. capsulata*, выращенной фотогетеротрофно на свету при перемешивании 250 об/мин. Среда RCVB, описанная в: Wall, J.D., Johansson, B. C., Gest, H., 1977. A pleiotropic mutant of *Rhodospseudomonas capsulata* defective in nitrogen metabolism. Arch. Microbiol. 115:259-263; использовалась для фотогетеротрофного роста инокулята, который имел темно-зеленый цвет. Этот фотогетеротрофно выращенный инокулят был, в свою очередь, получен из глицеринового маточного раствора штамма, хранящегося при -80 °C.

[522] Экспериментальная процедура: 10% инокулят имел исходную ОП 0,15. После восьми дней роста на газе ОП достиг 4,5. ОП измеряли с помощью спектрофотометра Beckman Coulter DU720 UV/Vis при 650 нм. Цвет хемоавтотрофно выращенной культуры был темно-красным. Влажные препараты культуры наблюдали с использованием фазово-контрастной оптики с помощью исследовательского микроскопа Axioskop (Zeiss, Германия). Микрофотографии получали с помощью устройства MacroFIRE (Optronics; Galeta, CA) с использованием программного обеспечения PictureFrame (Optronics; Galeta, CA) для обработки изображений и хранения данных. Микрофотография *R. capsulata* продемонстрирована на Фиг. 13. После хемоавтотрофного роста культуру центрифугировали при 10000G в течение 15 минут при 4 °C. Супернатант затем выливали и осадок биомассы временно хранили при -20 °C и затем лиофилизировали. Фотография осадка биомассы *R. capsulata*, полученного после центрифугирования, продемонстрирована на Фиг. 14. Таким образом, в общей сложности 2,59 грамма влажной биомассы было получено из одной литровой бутылки *R. capsulata*, выращенной на H₂ и CO₂ в качестве единственного источника водорода, электронов и углерода для биосинтеза. Липиды экстрагировали и анализировали методом ГХ/МС с использованием способов, описанных выше, и было обнаружено, что они содержат жирные кислоты, которые в основном имеют длину 16 или 18 атомов углерода.

Пример 12

[523] *Hydrogenobacter thermophilus* DSM 6534 выращивали в однолитровом газонепроницаемом сосуде на смеси газообразных H_2 , CO_2 и O_2 в качестве единственного источника энергии и углерода для роста. Живая культура *H. thermophilus* DSM 6534 во флаконе для сыворотки под газовым пространством была получена от Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ). Известно, что *Hydrogenobacter thermophilus* DSM 6534 содержит цикл rTCA (обратный цикл трикарбоновых кислот) фиксации CO_2 . Эту живую культуру использовали в качестве 10%-ного инокулята для сывороточного флакона объемом 160 мл, содержащего среду MSM, приведенную в "Thermophilic bacteria," Jakob Kristjansson, Chapter 5, Section III, CRC Press, 1992, pp. 86-88, в атмосфере $H_2:CO_2:O_2$ 8:1:1. Начальная ОП при 600 нм после инокуляции составляла 0,03. Температуру флакона для сыворотки поддерживали при 70 °C путем погружения флакона для сыворотки в водяную баню с подогревом. Перемешивание не применялось. Было обнаружено, что среда мутнела, и через 65 часов измеренная оптическая плотность составляла 0,354 - увеличение более чем в десять раз. Затем этот флакон для сыворотки пересевали в качестве 10% инокулята в однолитровый газонепроницаемый сосуд, содержащий 120 мл среды MSM и атмосферу $H_2:CO_2:O_2$ в соотношении 8:1:1. Культуральный флакон выдерживали при 70 °C на водяной бане без перемешивания. В течение 64 часов газ в свободном пространстве обновляли один раз, и ОП увеличивалась до 0,25. В течение следующих 24 часов ОП увеличилась до 0,42. Газы в свободном пространстве снова обновляли, и через два дня измерение ОП дало 0,56. 1 мл культурального бульона отбирали для выделения и секвенирования ДНК. Была определена последовательность 16S рРНК, и наилучшее совпадение по методу BLAST было идентифицировано как штамм *Hydrogenobacter thermophilus* ТК-6. Культуральный бульон затем извлекали из однолитрового сосуда и центрифугировали при 10000 g в течение 15 минут при 4 °C. Полученный после центрифугирования осадок влажной биомассы весил 212 мг. Экстракцию влажной биомассы гексаном проводили, как описано в примере выше. Из влажной биомассы извлекли 15,2 мг растворимых в гексане липидов, или 7,2% от массы влажной биомассы составляли растворимые в гексане липиды. Липиды экстрагировали и анализировали методом ГХ/МС с использованием способов, описанных выше, и было обнаружено, что они имеют относительно высокую долю жирных кислот с длиной цепи 20 атомов углерода.

Пример 13

[524] Штамм *Xanthobacter autotrophicus* DSM 432 выращивали до плотности сухих клеток 14 г/л на смеси газообразных H_2 , CO_2 и O_2 в качестве единственного источника энергии и углерода для роста. Придерживались следующего протокола эксперимента, проводившегося с использованием смеси газов, включающей H_2 , CO_2 и O_2 , в биореакторе с мешалкой.

[525] Оборудование: Культура выращивалась периодически с использованием двухлитрового стеклянного ферментера, схематически показанного на Фиг. 15, с торцевой крышкой, схематично показанной на Фиг. 16. Температуру и pH регулировали и контролировали с помощью датчиков pH и температуры и коммерческого контроллера. pH корректировали путем автоматического добавления 2N NaOH. Биореактор имел порты для введения питательных добавок и антивспенивателя; введения инокулята; основания; свежих сред; и асептического отбора проб. Перемешивание обеспечивалось с помощью турбины, газы барботировали через стеклянную фритту. Система реактора схематически изображена на Фиг. 17. Она включала манометры, расходомеры газа; предохранительные и обратные клапаны; фильтры 0,2 мкм; сосуд биореактора, датчики, исполнительные механизмы и контроллеры; холодильник и пенную ловушку; и выпускное отверстие. Для подачи газа использовали сжатый H_2 , сжатый CO_2 и воздух помещения, все при давлении 138 кПа (20 psi). Схема системы подачи газа продемонстрирована на Фиг. 18. H_2 и CO_2 поступали в дозатор расхода (Matheson G2-4D151-E401/E401, 20 psi), который устанавливает соотношение газов. В дозаторе потока были заданы настройки с.l. (осевая линия поплавка) $H_2 = 35$; с.l. $CO_2 = 10$; и с.l. воздуха = 55. Это обеспечивало поступление в биореактор газовой смеси с 64% H_2 , 11% CO_2 , 5,4% O_2 , при измерении методом ГХ (Shimadzu GC-8A, детектор теплопроводности (TCD) и колонка Alltech CTR I).

[526] Среда: Среда MSM, используемая для этого эксперимента, описана в *Thermophilic Bacteria*, CRC Press, Boca Raton, FL, Jacob K. Kristjansson, ed., 1992, p. 87, Table 4.

[527] Инокулят: Инокулят штамма *Xanthobacter autotrophicus* DSM 432 инициировали из одного флакона с глицериновым маточным раствором, хранящимся при $-80\text{ }^\circ\text{C}$, который переносили в 200 мл MSM в однолитровом газонепроницаемом сосуде. Давление газа в свободном пространстве $H_2/CO_2/O_2$ составляло 69 кПа (10 psig). Культуральный сосуд перемешивали со скоростью 150 об/мин при $30\text{ }^\circ\text{C}$.

[528] Работа ферментера: перед инокуляцией в сосуд биореактора было перенесено 1,3 литра MSM. pH довели до 6,8 с помощью NaOH. Температура была установлена на $30\text{ }^\circ\text{C}$ и перемешивание - на 500 об/мин. Образцы отбирали два раза в день для определения оптической плотности и анализа липидов через асептический

пробоотборник. Все измерения оптической плотности были выполнены на спектрофотометре Beckman Coulter DU720 UV/Vis. Один раз в день образцы исследовали под микроскопом для проверки морфологии клеток. Все образцы культурального бульона центрифугировали при 12000g. 1 мл супернатанта хранили для анализа NH_4^+ при $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Влажный осадок биомассы временно хранили при $-80\text{ }^\circ\text{C}$, а затем лиофилизировали.

[529] Корреляция между OP_{600} и сухой клеточной массой (CDW) (мг/мл) продемонстрирована на Фиг. 19. Линейная аппроксимация корреляции имела вид $\text{CDW} = 0,9944 * (\text{OP}_{600}) + 0,4101$, с $R^2 = 0,957$. На Фиг. 20 продемонстрирована кривая роста водородокисляющего (Knallgas) микроорганизма *Xanthobacter autotrophicus*, выращенного на газовом субстрате $\text{H}_2/\text{CO}_2/\text{O}_2$ согласно этому протоколу. Конечная ОП, измеренная при 600 нм, составляла 14,8, а конечная CDW - 13,8 г/л для роста на газовом субстрате $\text{H}_2/\text{CO}_2/\text{O}_2$. После короткого периода логарифмического роста в начале эксперимента биомасса накапливалась около с линейной скоростью до окончания эксперимента на шестой день. Липиды экстрагировали и анализировали методом ГХ/МС с использованием способов, описанных выше, и было обнаружено, что они содержат относительно высокую долю жирных кислот, имеющих длину цепи 18 атомов углерода.

Пример 14

Скрининг хемоавтотрофных штаммов

[530] Штаммы сначала подвергали скринингу на хемоавтотрофию на чашках с использованием системы сосудов Vacu-Quick фирмы Almore. Перспективные штаммы были затем испытаны в жидкой культуре.

[531] Среду с минимальным содержанием солей (MSM) готовили, как описано выше, и объединяли и добавляли в чашки с агарозой (1,5%) в асептических условиях. Было протестировано 162 штамма-кандидата из следующих родов: *Cupriavidus*; *Xanthobacter*; *Dietzia*; *Gordonia*; *Mycobacterium*; *Nocardia*; *Pseudonocardia*; *Arthrobacter*; *Alcanivorax*; *Rhodococcus*; *Streptomyces*; *Rhodopseudomonas*; *Rhodobacter*; и *Acinetobacter*. Каждый штамм наносили на чашку с минимальной солевой средой (MSM) + агароза (1,5%). Все соответствующие чашки затем помещали в систему сосудов Vacu-Quick фирмы Almore. На дно каждой камеры было положено стерильное бумажное полотенце, смоченное стерильной водой для поддержания влажности в камере и предотвращения высыхания чашек во время инкубации. Газонепроницаемые камеры, заполненные чашками, затем откачивали, с последующей подачей газовой смеси $\text{H}_2:\text{CO}_2:\text{воздух}$ (70/10/20). Газы обеспечивали единственный источник энергии и углерода для роста. Газовые камеры инкубировали при $30\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 7-10 дней, каждый день продувая

свежую газовую смесь. С чашек, которые демонстрировали хемоавтотрофный рост/колонии, отбирали колонии и затем высевали штрихом на чашки с минимальной солевой средой (MSM) + агароза (1,5%) с последующей второй инкубацией в системе сосудов Vacu-Quick фирмы Almogre с подачей H_2 , CO_2 и воздуха (70/10/20). Штаммы, демонстрирующие сильный рост колоний при второй инкубации, затем подвергали тестированию на хемоавтотрофию в жидкой среде с минеральными солями (MSM). Эксперименты проводили в пробирках Hungate (Chemglass CLS-4209-10, анаэробные, 18 x 150 мм) с рабочим объемом 5 мл, закрытых сплошными пробками из неопренового каучука (Wheaton Science Products, № 244100331), обжатым алюминиевым колпачком. Пробирки продували газовой смесью $H_2:CO_2$:воздух (70/10/20), используя газовый коллектор, предназначенный для высокопроизводительного скрининга. Пробирки продували свежей газовой смесью каждый день. Пробирки инкубировали во встряхивателе Multitron Pro Infors HT под углом 45° , при 600 об/мин и $30^\circ C$ в течение 96 часов. Оптическую плотность при 600 нм измеряли каждые 24 часа спектрофотометром (спектрофотометр Genesys 10S, UV-Vis, Thermo Scientific). Следующие бактериальные штаммы были идентифицированы как хемоавтотрофные на смеси гремучего газа (knallgas): *Arthrobacter methylotrophus* DSM 14008; *Rhodococcus opacus* DSM 44304; *Rhodococcus opacus* DSM 44311; *Xanthobacter autotrophicus* DSM 431; *Rhodococcus opacus* DSM 44236; *Rhodococcus ruber* DSM 43338; *Rhodococcus opacus* DSM 44315; *Cupriavidus metallidurans* DSM 2839; *Rhodococcus aetherivorans* DSM 44752; *Gordonia desulfuricans* DSM 44462; *Gordonia polyisoprenivorans* DSM 44266; *Gordonia polyisoprenivorans* DSM 44439; *Gordonia rubripertincta* DSM 46039; *Rhodococcus percolatus* DSM 44240; *Rhodococcus opacus* DSM 43206; *Gordonia hydrophobica* DSM 44015; *Rhodococcus zopfii* DSM 44189; *Gordonia westfalica* DSM 44215; *Xanthobacter autotrophicus* DSM 1618; *Xanthobacter autotrophicus* DSM 2267; *Xanthobacter autotrophicus* DSM 3874; *Streptomyces coelicoflavus* DSM 41471; *Streptomyces griseus* DSM 40236; *Streptomyces* sp. DSM 40434; *Streptomyces xanthochromogenes* DSM 40111; *Streptomyces thermocarboxydus* DSM 44293; *Rhodobacter sphaeroides* DSM 158.

[532] Полный экспресс-анализ проводили для водородокисляющих штаммов, выращенных в жидкой среде MSM со смесью гремучего газа в качестве единственного источника углерода и энергии. Было обнаружено, что *C. necator* DSM 531 и DSM 541 накапливали более 70% и более 80% от веса общего белка во взятых образцах на арифметической фазе роста. Также было обнаружено, что *C. necator* DSM 531 и DSM 541 синтезируют витамины, включая витамин B1, витамин B2 и витамин B12.

Пример 15Приготовление лизата *C. necator* DSM 531

[533] Штамм *Cupriavidus necator* DSM 531 выращивали на стерильной среде MSMG (минимальная солевая среда + 40 г/л D-глюкозы) в качестве источника энергии и углерода для роста, и клетки лизировали.

[534] Для получения биомассы штамма *C. necator* DSM 531 и приготовления лизата использовали следующий протокол.

[535] Получение биомассы экспериментального штамма: 1% по объему для 72-часового посева, взятого из глицериновой маточной культуры штамма, а затем 10% по объему для 120-часовой культивации при продуцировании биомассы штамма.

[536] Для первоначального роста штамм *C. necator* высевали из 1,5 мл глицериновой маточной культуры в 160 мл среды MSMG в колбе Эрленмейера на 500 мл (VWR № 10536-926) в инкубаторе-встряхивателе (New Brunswick Scientific, инкубатор-встряхиватель серии 25, напольная модель) в течение 72 часов, 30 °C, 250 об/мин. Штамм проверяли на агаровой пластине с питательным бульоном (NB), определением оптической плотности при 600 нм на спектрофотометре SpectraMax M5, и проверкой морфологии на микроскопе Labomed iVu3100 при увеличении линзы 1000x.

[537] 20 мл посевного материала переносили в 2-литровую колбу Эрленмейера (VWR № 10545-844), содержащую 200 мл среды MSMG, получая в общей сложности 8 2-литровых колб из 160 мл посевного материала. Колбы объемом 2 л инкубировали в инкубаторе-встряхивателе при 30 °C, 250 об/мин в течение 120 часов. Штамм контролировали путем посева штрихом на агаровой пластине с питательным бульоном (NB), определения оптической плотности при 600 нм на спектрофотометре, измерения pH и проверки морфологии на микроскопе при увеличении линзы 1000x после сбора урожая.

[538] Культуральный бульон переносили в предварительно взвешенные стерильные стаканы для центрифуги объемом 250 мл (Fisher Scientific № 05 564 1) и осаждали в центрифуге (Sorvall Evolution RC) при 8000 об/мин, 4 °C, 20 минут. Бульон декантировали, а осадки переносили в предварительно взвешенную стерильную пробирку falcon на 50 мл (VWR № 89039-656). Осадки хранили при -80 °C.

[539] Измерение сухого веса клеток штамма *C. necator* DSM 531 также проводили во время сбора урожая. Перед сбором урожая из 2-литровых колб, по 10 мл культурального бульона из каждой колбы переносили в предварительно взвешенные стерильные пробирки falcon емкостью 50 мл. Пробирки помещали в центрифугу (Eppendorf) при 12000 об/мин, 4 °C, 5 минут. Бульон декантировали и влажный осадок

замораживали при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 2 часов. Замороженный осадок помещали в лиофилизатор (Virtis Benchtop, $-62,6\text{ }^{\circ}\text{C}$, 56 мТорр) на 18 часов.

[540] Через 75 часов после посева глицериновой маточной культуры в 160 мл среды MSMG измеренная ОП₆₀₀ составляла 0,792, pH = 7,34. Культурный бульон имел молочный вид. Неинокулированные среды MSMG также наносили штрихом на чашку с NB-агаром, служащую отрицательным контролем.

[541] Через 113 часов после пересева в колбы объемом 2 л из 20 мл посевного материала в 200 мл среды MSMG на колбу. Клетки из каждой колбы объемом 2 л высевали штрихом на чашку с агаром NB и наблюдали под микроскопом с 1000-кратным увеличением. Чистота штамма визуальным образом была определена на уровне около 99,9%.

[542] Культуру *S. necator* в колбах объемом 2 л собирали центрифугированием при 8000 об/мин, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 минут в стерильных центрифужных стаканах объемом 250 мл с герметизирующими крышками. Бульон декантировали и влажный осадок объединяли и хранили при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Во время сбора урожая средняя ОП₆₀₀ = 19,9 и pH = 6,2-6,3. Измеряли вес и концентрацию влажного осадка культурального бульона.

[543] Перед сбором урожая 10 мл культурального бульона из каждой 2-литровой колбы переносили в предварительно взвешенные пробирки falcon для измерения сухого веса клеток.

Приготовление экстракта лизированных клеток

[544] 30 г влажного клеточного осадка оттаивали при комнатной температуре в течение 15 минут. Добавляли 30 г стерильной воды MilliQ. Пробирку подвергали интенсивной обработке на вихревом смесителе до получения гомогенного раствора. Раствор клеток разделяли на 6 пробирок Falcon по 50 мл, содержащих по 10 г каждая, и подвергали ультразвуковой обработке на бане с ледяной водой, используя ультразвуковой дезинтегратор Branson Sonifier 250 с микрозондом конической формы 1/8 дюйма (3,2 мм) (№ 101-148-070). Зонд был опущен на расстояние до 1 см от дна пробирки. Мощность медленно увеличивали до 40-60% выхода при общем времени обработки ультразвуком 1 мин. И микрозонд, и раствор клеток оставляли охлаждаться около на 10 минут. Обработку ультразвуком повторяли с еще двумя циклами по 1 мин с 10-минутным временем охлаждения между ними.

Измерение белка в экстракте лизированных клеток

[545] Анализ Брэдфорда использовали для определения концентраций белка в цельном экстракте лизированных клеток, прозрачном лизате и пермеатах, которые проходили через фильтрующие мембраны с отсечением по молекулярной массе (MWCO).

[546] Образцы по 5 мкл и стандарты бычьего сывороточного альбумина (БСА) (BIO-RAD № 5000201) добавляли в прозрачный 96-луночный плоскодонный планшет. Концентрации БСА варьировались от 150 мкг/мл до 600 мкг/мл. Затем в каждую лунку планшета добавляли 250 мкл 1x реагента красителя (кумасси синий G250, BIO-RAD № 5000201). Планшет помещали на встряхиватель для планшетов на 30 минут при комнатной температуре, 300 об/мин, с последующим измерением оптической плотности при 595 нм на спектрофотометре SpectraMax M5.

Приготовление гидролизата

[547] Клеточный лизат, полученный в соответствии с этим протоколом, подвергают химическому и ферментативному гидролизу методами, хорошо известными в данной области.

Пример 16

Демонстрационный эксперимент с протеазой

[548] Микроорганизм (например, грибок *P. marquandii*), выращиваемый в пригодной среде в аэробных погруженных условиях, синтезирует протеазу (например, кератиназу).

[549] Внеклеточную жидкость концентрируют и частично очищают для получения ферментного порошка. Определяют среднюю активность порошка фермента.

[550] Для кератиназы, субстрат из копыт и рогов, используемый в качестве положительного контроля, измельчают и просеивают, затем проводят гидролиз кератинового порошка обработкой кератиназой в концентрациях от 0,75 до 3,00 г/л при 50 °С и рН 8,0 (отношение фермент/субстрат от 1:67 до 1:17). Это служит положительным контролем активности фермента кератиназы.

[551] Для эксперимента, лиофилизированный порошок микробной биомассы *Cupriavidus necator* или другого микроорганизма, выращенного на H_2/CO_2 , гидролизуют путем обработки кератиназой в концентрациях от 0,75 до 3,00 г/л при 50 °С и рН 8,0 (соотношение фермент/субстрат от 1:67 до 1:17).

[552] За ходом реакции гидролиза наблюдают в течение до 6 часов. Во время инкубации измеряют деградацию кератина или белка и выражают в виде доли растворенного азота. Кроме того, зарегистрировано увеличение количества растворимых

белков и увеличение общего количества свободных аминокислот в жидкой фазе. Также определяют состав свободных аминокислот гидролизата. Содержание азота в растворе, измеренное методом Кьельдаля, выражают в процентах от общего содержания азота в сухом порошке (кератиновом или микробном). Определяют долю солюбилизируемого N в исходной биомассе. Определяют увеличение солюбилизации белка по сравнению с холостым образцом (без фермента). Определяют влияние различных концентраций фермента протеазы на солюбилизацию белка. Измеряют увеличение содержания растворимого белка в зависимости от времени и определяют динамику ферментативной реакции.

[553] Измеряют аминокислоты, которые ранее были определены как оказывающие положительное влияние на растения. Сравнивают содержание аминокислот (в % от общего количества) в полученном гидролизате с составом гидролизатов белка, описанных в литературе.

[554] Для положительного контроля ожидается, что применение кератиназы *P. marquandii* к порошкообразному субстрату копыт и рогов даст от 4 до 5 г/л растворимого белка за 5 часов, в зависимости от концентрации фермента, и концентрацию свободных аминокислот в гидролизате более 4000 мг/л.

[555] В последующих экспериментах тестируют обработку богатой белком биомассы паром с последующим ферментативным гидролизом. Сравнивают солюбилизацию азота при предварительной обработке паром и без нее. Сравнивают динамику гидролиза протеазой предварительно обработанной паром богатой белком биомассы с необработанным паром материалом. Количества белка, пептидов и аминокислот, высвобождаемых из субстрата в раствор, сравнивают для случаев обработки паром и отсутствия такой обработки. Для положительного контроля ожидается солюбилизация 98% азота кератина при применении кератиназы *P. marquandii* к порошкообразному субстрату копыт и рогов, обработанному паром.

[556] Проводят вналогичные эксперименты по тестированию протеаз из описанных в данном документе штаммов, включая, без ограничений, *Streptomyces* sp. выращенные на субстратах, включая, без ограничений, источники углерода C1.

[557]

Пример 17

Ферментативный процесс получения белкового гидролизата (PH)

[558] На Фиг. 21 продемонстрирована блок-схема одного варианта реализации способа, описанного в данном документе, в котором культуральный бульон в форме водной клеточной суспензии подвергают щелочной обработке с последующей физической

обработкой и ферментативным гидролизом для непосредственного получения экстракта органического фермента. В некоторых случаях выполняются дополнительные стадии концентрирования и/или разделения и/или сушки с получением разнообразных продуктов экстрактов органических ферментов. В экспериментальных исследованиях этого подхода определяют пептидный профиль экстрактов, полученных способом по изобретению.

[559] Эксперимент проводится в соответствии с блок-схемой, показанной на Фиг. 21. Определяют процентное содержание сухого вещества в 500 мл культурального бульона, с целевыми значениями 10-11% мас./мас. и мас./об. Также определяют химический состав клеток в бульоне (например, % С, Н, О, N, Р, К, S). Культуральный бульон обрабатывают в открытом стеклянном реакторе с добавлением 28% NH_3 до рН 9,6 при перемешивании (60-80 об/мин).

[560] После щелочной обработки смесь подвергают воздействию давления 115 кПа и температуре 120 °С в течение 20 минут в автоклаве. Полученный таким образом раствор доводят до рН 9,2 с помощью 10М гидроксида калия. Этот раствор с рН 9,2 поддерживают при 55 °С в термостатированной бане при перемешивании (60-80 об/мин) и добавляют 0,3% об./об. субтилизина (из маточного раствора протеазы (70000 единиц активности на каждый анализ азоказеина). рН поддерживают с помощью 28% аммиака. Такие условия гидролиза поддерживают в течение 24 часов. Полученный гидролизат собирают через 24 часа и определяют химический состав (например, % С, Н, О, N, Р, К, S). Определяют выход азота и органических веществ в результате гидролиза.

[561] Измеряют объем гидролизата, а затем гидролизат 5-кратно концентрируют в роторном испарителе с термостатированной баней при 70 °С, получая таким образом концентрированный гидролизат. Массовую долю сухого вещества измеряют после концентрирования, при целевом значении, составляющем 50-55% мас. сухого вещества. В этом эксперименте проверяют, будет ли такой концентрированный гидролизат принимать форму стабильного сиропа.

[562] Другой объем гидролизата измеряют и центрифугируют при 4000 G в течение 30 минут. Определяют объем супернатанта, называемого растворимой фракцией гидролизата, и вес осадка, называемый нерастворимой фракцией гидролизата. Определяют содержание сухого вещества в каждой из них, а также химический состав сухого вещества в обеих фракциях (например, % С, Н, О, N, Р, К, S). Определяют выход органического вещества каждой фракции. Также определяют аминокислотный состав каждой фракции и ее пептидный профиль. Пептиды с размером менее 300 Да относятся к свободным аминокислотам и малым пептидам. Определяется содержание таких свободных аминокислот и малых пептидов.

[563] Определяют концентрацию растворимого гидролизата и измеряют объем и содержание органического вещества, % мас./мас. Определяют консистенцию растворимого гидролизата (например, сиропоподобная). Нерастворимую фракцию гидролизата сушат при 90 °С и измеряют конечную массу и содержание влаги.

Пример 18

Экстракт белка с пониженным содержанием нуклеиновых кислот

[564] Гомогенизация под высоким давлением применяется к клеткам, выращенным в соответствии с данным изобретением. Условия тестируют для определения оптимальных значений с точки зрения разрушения большинства клеток при сохранении активности эндогенной нуклеазы; сохранении белков, которые должны быть собраны, и без появления каких-либо неприятных запахов. Тестируются следующие параметры гомогенизации: давление от 84,5 до 103,5 МПа (5000-15000 psig); температура от 0 до 50 °С (32-122 °F) и pH от 4,5 до 6,5; при 1-5 проходах через гомогенизатор. Разрушенные клетки (гомогенат) могут быть разбавлены, нагреты или охлаждены, и pH может быть отрегулирован при необходимости для улучшения перерабатываемости и экстрагируемости нуклеазы и белка. Доводят гомогенат до pH выше 5,5, и особенно тестируют диапазон значений pH от 8 до 11; от 5 до 60 минут и при температуре от 4,5 до 60 °С (40-140 °F). Цель заключается в экстрагировании нуклеазы, белка и других растворимых в щелочных условиях материалов. Гомогенат разделяют центрифугированием и/или фильтрацией на нерастворимые остатки клеточных стенок и растворимый экстракт, называемый щелочным экстрактом. Факторы, влияющие на экстракцию и утилизацию эндогенной нуклеазы, включают: содержание нуклеазы, pH, температуру обработки, время реакции, концентрацию субстрата, активаторы и ингибиторы. Эти факторы могут взаимодействовать, влияя на состав и выход белка, и оптимизируются для максимизации выхода белка и/или минимизации загрязнения нуклеиновой кислотой. Предпринята попытка получения гликанового продукта из остатков клеточной стенки, аналогичного дрожжевому гликановому продукту, описанному в заявке на патент, озаглавленной "Дрожжевой гликан и способ его получения" (Yeast Glycan and Process of Making Same), № 310452, поданной 29 ноября 1972 г. Гликан пекарских дрожжей представляет собой измельченные, промытые, пастеризованные и высушенные клеточные стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Он состоит в основном из длинноцепочечных углеводов, не менее 85 процентов в пересчете на сухие вещества. Углевод состоит из гликана и маннана в соотношении приблизительно 2:1. Его можно использовать в качестве эмульгатора и соли эмульгатора и стабилизатора и

загустителя и текстуризатора в салатных заправках, аналогах замороженных десертов, аналогах сметаны, подливках со вкусами сыра и сметаны.

[565] После отделения остатков клеточной стенки растворимый остаток инкубируют, позволяя эндогенной нуклеазе расщеплять полимеры нуклеиновых кислот. Тестируемые условия инкубации будут варьироваться по температуре от 40 до 60 °С, рН от 5 до 8, и продолжительности от 15 до 120 минут. Белок отделяют центрифугированием. В конце стадии нуклеазной реакции систему обрабатывают различными способами, стараясь увеличить скорость центрифугирования белкового ила. Тестируют добавление от 0,1 до 1,0% мас. твердого CaCl_2 для ускорения выделения белка. Тестируемые условия центрифугирования варьируются по рН от 4 до 7 и температуре от 4 до 90 °С. Тестируют, будет ли добавление хлорида кальция после завершения реакции эндогенной нуклеазы и перед центрифугированием значительно повышать скорость центрифугирования или производительность. Блок-схема одного возможного варианта реализации представлена на Фиг. 22.

[566] Нуклеазную реакцию смесь разделяют центрифугированием на фракцию белкового шлама с низким содержанием РНК и фракцию растворимых цитоплазматических компонентов. Тестируют состав фракции растворимых цитоплазматических компонентов. Ожидается, что она содержит фрагменты нуклеиновой кислоты, некоторое количество белков и белковых фрагментов, гликоген и многие промежуточные продукты метаболизма, включая витамины. Предполагается, что растворимые цитоплазматические компоненты составляют ценную часть общей микробной фракции и, как ожидается, будут иметь применение, схожее с дрожжевым экстрактом или кислой сывороткой.

[567] Проверят влияние водной промывки нерастворимой белковой фракции на вкус. Испытывается дополнительная стадия вакуумного обезвоживания с последующей сушкой до порошка. Вакуумные условия тестируются в диапазоне значений от 0,67 до 0,94 атм (20-28 дюймов ртутного столба), при температуре от 49 до 93 °С (120-200 °F), в течение 10-60 минут. Содержание твердых веществ, поступающих на конечную стадию сушки, испытывают в диапазоне значений от 5 до 25% твердых веществ. Тестируемые способы сушки включают: распылительную сушку, сушку в барабане, лиофильную сушку и т.п.

[568] Тестируют состав порошка. Подтверждают бесклеточный состав и отсутствие жизнеспособных клеток. Проводят экспресс-анализ для определения состава по весу в пересчете на сухие вещества: белка; нуклеиновой кислоты (целевое значение менее

около 3%); липидов; золы; углеводов; волокон; другой биомассы. Также определяют содержание витаминов и минералов.

Пример 19

Приготовление белка из *Cupriavidus necator*

[569] Биомассу, выращенную на H_2 и CO_2 в соответствии со способами по данному изобретению, промывают три раза водой и, при необходимости, сгущают центрифугированием до 11% мас. твердых веществ.

[570] 227 литров (пятьдесят галлонов) этой суспензии, содержащей 24,5 кг (45 фунтов) сухого вещества *C. necator*, охлаждают до 7 °C (45 °F) и подвергают гомогенизации при давлении 55 МПа (8000 PSIG) и немедленно охлаждают до 7 °C (45 °F). Процедуру гомогенизации повторяют в общей сложности три раза. Гомогенат разбавляют водой до объема 682 л (150 галлонов) и добавляют щелочной реагент гидроксид натрия для пищевых продуктов до достижения pH 9,5. Материал перемешивают в течение 15 минут и затем центрифугируют. Нерастворимый остаток (остатки клеточной стенки) удаляют. Взвешивают начальное количество твердых веществ гомогената, а также выход после гомогенизации, экстракции и разделения, растворимой биомассы щелочного экстракта и нерастворимой биомассы. Доводят pH щелочного экстракта до 6,0 путем добавления однонормальной соляной кислоты и нагревают до 50 °C (122 °F). Экстракт осторожно перемешивают в течение одного часа при pH 6,0, чтобы позволить эндогенной нуклеазе гидролизовать нуклеиновую кислоту.

[571] Параллельный эксперимент для сравнения включает обработку щелочного экстракта экзогенной нуклеазой при pH 7; 50 °C; в течение 2 часов. Экзогенную нуклеазу извлекают из ростков солода и используется из расчета 4,1 кг (9 фунтов) сухого экстракта ростков солода на 8,2 кг (18 фунтов) сухого экстракта *C. necator*.

[572] Другие параллельные эксперименты для сравнения: 1) использование низкотемпературного высокощелочного процесса для снижения содержания РНК. В этом процессе щелочной экстракт гомогената доводят до pH 12 с помощью NaOH и нагревают в течение 2 часов при 60 °C. Белок выделяется после доведения системы до pH 4,5. 2) использование высокотемпературного процесса с низким содержанием щелочи для снижения содержания РНК. В этом процессе щелочной экстракт гомогената доводят до pH 10,5 и нагревают в течение 4 часов при 80 °C. Белок выделяется после доведения системы до pH 4,5.

[573] В конце инкубации добавляют 37,5 г хлорида кальция. Белковую суспензию нагревают до 80 °C (175 °F) и центрифугируют для получения белкового шлама и кислой

сыворотки. Измеряют вес сухих твердых веществ в каждой соответствующей фракции. Белковый шлам промывают, разбавляя двумя объемами воды, и снова центрифугируют, поддерживая температуру на уровне 80 °C (175 °F), а pH поддерживают на уровне 6,0. Измеряют количество отмытого белкового шлама в пересчете на сухие вещества, а также количество отмытых сухих веществ. Промытый белковый шлам концентрируют в вакууме (0,94 атм (28 дюймов рт.ст.)) при 80 °C (175 °F), pH 6, до 20% твердого вещества и сушат распылением. Определяют состав высушенного распылением продукта, включая: % влажности, % сырого белка (N X 6,25), % нуклеиновой кислоты, % липидов, % золы, % углеводов (по разности).

[574] Сравнивают питательную ценность нефракционированного *S. pecator* и выделенного белка *S. pecator*, в котором содержание нуклеиновых кислот было снижено различными способами, описанными выше. Нефракционированную биомассу трижды промывают водой и сушат распылением.

[575] Определяют содержание незаменимых аминокислот для всех образцов. Значения содержания сравнивают с данными, указанными Комитетом ФАО по потребностям в белке (1957b) “FAO Nutritional Studies No. 16”, и анализируют для определения того, насколько они могут соответствовать или превосходить потребность в аминокислотах для растущих подопытных крыс.

[576] Определяют отношение эквивалентности белка или PER относительно базового значения для казеина (PER = 2,5). Проводят испытания по кормлению крыс с использованием в рационе уровня 10% скорректированного белка. Придерживаются процедуры испытаний, опубликованной в Official Methods of Analysis of the A.O.A.C. p. 800, 11th Edition (1970). Некоторые испытания проводят с использованием нефракционированной биомассы *S. pecator* без попыток снижения содержания РНК.

[577] Сравнивают значения PER и содержание РНК в нефракционированной биомассе и белковом изоляте. Изолят, полученный с использованием исключительно эндогенной нуклеазы, также сравнивают с изолятом, полученным с использованием экзогенной нуклеазы, и с изолятами, полученными с использованием более сильнощелочных процессов.

Пример 20

Тест биостимулирующего эффекта белкового гидролизата (БГ)

[578] Влияние белкового гидролизата (РН) на транскрипционные характеристики генов, кодирующих ферменты, функционирующие в цикле трикарбоновых кислот, анализируют посредством полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.

Изучают накопление транскрипта генов, кодирующих исследуемые ферменты, чтобы определить, повышается ли их уровень при обработке белковым гидролизатом (PH). Также тестируют ферментативные активности. Этот же подход используется для проверки биостимулирующего действия контрольного продукта белкового гидролизата (PH), такого как продукт, полученный в результате гидролиза остатков дубления

Пример 21

Продуцирование и испытания биостимулятора

[579] Кремообразную массу бактериальных клеток, полученную из исходного С1 сырья, как описано в данном документе, выделяют мембранной фильтрацией. Измеряют общее содержание сухих веществ и общее содержание азота в кремообразной клеточной массе. Целевые количества составляют приблизительно 8% мас. и 0,8% мас., соответственно. Также измеряют вязкость. Добавляют серную кислоту к около 300 мл кремообразной клеточной массы, чтобы довести рН кремообразной клеточной массы до 3,5. Гидролиз осуществляют путем загрузки кремообразной клеточной массы с отрегулированным рН в колбу Эрленмейера на 500 мл, покрытую фольгой и помещенную в автоклав при 128 °С на 24 часа под давлением 7,25 кг (16 фунтов). После гидролиза снова измеряют вязкость кремообразной клеточной массы (гидролизата). Ожидается, что она будет значительно снижена, с четким разделением растворимых и нерастворимых веществ. После охлаждения гидролизат фильтруют через 20-микронный бумажный фильтр и растворимую фракцию собирают для последующего анализа. Измеряют общее содержание твердых веществ и общий азот растворимой фракции. Растворимую фракцию проверяют на ее способность вызывать реакцию фитогормона у газонной травы путем измерения изменения плотности побегов со временем по сравнению с контрольными обработками. Во время 70-дневных испытаний участки газонной травы в теплице обрабатывали внекорневым внесением раз в две недели либо водой, либо сульфатом аммония, либо растворимой фракцией. И сульфат аммония, и растворимую фракцию наносят в количестве 0,25 г/м² (0,05 фунта азота на 1000 кв. футов). Плотность побегов дерна измеряют в день 0, день 44 и день 70. Газонную траву, обработанную растворимой фракцией, проверяют на статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение плотности побегов с 0 до 70 дня по сравнению с контрольными обработками.

Пример 22

Влияние промышленной микробной клеточной массы и гидролизатов на рост редиса

[580] Испытания предназначены для измерения влияния внесения различных удобрений на рост и урожайность красного редиса (*Raphanus sativus*) сорта Чемпион (Champion). Семена проращивают на стеллаже с мелкокапельным поливом и пересаживают в горшки диаметром 6 дюймов, содержащие торфяной мох, перлит и вермикулит в соотношении 20:5:5, соответственно. Горшки поливают 200 мл воды три дня в неделю. В период прорастания удобрения не вносятся. Исследуемые удобрения вносят в день пересадки. Эксперименты включают отрицательный контроль без использования удобрений, положительные контроли - один с сульфатом аммония, и другой с коммерческим удобрением 9-3-6, и гидролизаты, полученные в результате гидролиза протеазой и папаином. Гидролизаты вносят в высоких и малых количествах (например, 110 кг N/га и 28 кг N/га). Положительный контроль вносят в соответствующих больших количествах (например, 110 кг N/га). Ожидается, что высокая норма азота, например, 110 кг/га, будет обеспечивать потребности производства редиса. Ожидается, что низкая норма азота, например, 28 кг/га, будет ниже потребности в N. Каждый вариант обработки применяется с четырьмя повторами по схеме полностью рандомизированных блоков.

[581] Гидролизат получают из культурального бульона SCP (микробиологического белка) (ок. 10% общего содержания твердых веществ), полученного из исходного сырья C1 в соответствии с данным изобретением. Белковый бульон гидролизуют путем доведения pH до 7 или 9 с помощью 30%-ного гидроксида калия перед добавлением папаина (Liquipanol® T-100, Enzyme Development Corporation, New York, N.Y.) и бактериальной протеазы (Enzeco® Alkaline Protease L660, Enzyme Development Corporation, New York, N.Y.), соответственно. Кремообразные клеточные массы гидролизуются в общей сложности в течение 24 часов при постоянном перемешивании, обеспечиваемом мешалкой, и поддерживают температуру 60 °C на водяной бане. Ферменты денатурируют путем автоклавирования гидролизатов в течение 5 минут при 120 °C.

[582] Вес редиса для всех вариантов внесения удобрений сравнивают с экспериментом с отсутствием удобрений. Сравнение экспериментов с сульфатом аммония и контрольным 9-3-6 позволяет выявить наличие каких-либо неудовлетворенных потребностей в фосфоре или калии. Отсутствие различий подтверждает, что уровни P и K являются достаточными. Вариант обработки гидролизатом протеазы и папаина с низким содержанием N сравнивают с обработкой с высоким содержанием N. Эксперименты с низким содержанием N проводят для проверки, возможны ли высокие урожаи при меньшем количестве азота, и является ли эффективность использования азота при производстве редиса статистически более высокой. Повышенная эффективность отражает

биостимулирующее действие и подтверждает, что гидролизованная кремообразная клеточная масса имеет потенциал увеличения производства корнеплодов при меньшем внесении питательных веществ.

Пример 23

Испытания гидролизата в системе гидропоники

[583] Цель этого эксперимента состоит в том, чтобы определить, может ли использование белкового гидролизата (БГ), полученного из микроорганизмов, улучшить рост и поглощение N салатом, выращиваемым в гидропонной системе с плавающей платформой.

[584] Система с плавающей платформой или DWC (глубоководная культура) пригодна для массового производства определенных видов овощей, в частности салата. Рассадку салата помещают на плавающий плот, обычно сделанный из большого листа полистирола, в котором вырезан ряд отверстий для размещения корней растений.

[585] Необходима чистая насыщенная кислородом вода. Корни растений сильно насыщены кислородом. Сами корни все время погружены в воду. Частицы грязи должны быть удалены, поскольку грязь будет прилипать к белым корням растения и блокировать поглощение корнями растений жизненно необходимого кислорода и минеральных веществ, которые позволяют растению вызревать и расти.

[586] В системе плавающей платформы используется несколько воздушных камней, размещенных на равных расстояниях друг от друга для интенсивного насыщения кислородом корней растений. Из воды, поступающей в эту область, должны быть к этому времени удалены большинство твердых веществ. Корни растений должны быть чистыми и белыми на вид. Салат здесь должен быстро расти, а сбор урожая проводится легко.

[587] Используя полную и пониженную концентрацию гидропонного питательного раствора, тестируют влияние еженедельного внекорневого внесения белкового гидролизата (БГ) на свежую биомассу, индекс SPAD и поглощение N. Также тестируют введение белкового гидролизата (БГ) в воду.

[588] Индекс SPAD определяется с помощью прибора, измеряющего пропускание света через лист на двух длинах волн, чтобы определить зеленость и толщину листьев. Пропускание в инфракрасном диапазоне обеспечивает измерения, связанные с толщиной листа, а длина волны в красной области спектра используется для определения зелености. Отношение пропускания на двух длинах волн дает индекс содержания хлорофилла, который называется индексом CCI или, альтернативно, индексом SPAD. CCI определяется по линейной шкале, а SPAD - по логарифмической шкале. Было продемонстрировано, что

эти приборы и шкалы коррелируют с химическими тестами на содержание хлорофилла, за исключением очень высоких уровней. Приборы для измерения содержания хлорофилла обычно используются для измерения стресса растений от нехватки питательных веществ, включая стресс, вызванный недостатком азота, и стресс, вызванный недостатком серы.

Пример 24

Композиция для усиления роста грибов

[589] Усилитель роста грибов производится клетками с высоким содержанием белка, как описано в данном документе, такими как, без ограничений, *S. necator*, в соответствии со способами, описанными выше. После выращивания и сбора клеточную массу обезвоживают и сушат, чтобы ее водосодержание составляло не более 13% мас. влаги.

[590] Размер частиц высушенной биомассы стандартизируют с использованием способов, известных специалисту среднего уровня в данной области. Генерируют фокусное распределение частиц по размерам при оптимизированном среднем размере. Оптимальный средний размер определяется таким образом, чтобы обеспечить адекватное распределение в грибном компосте и доступность питательных веществ, при этом не делая питательные вещества слишком легкодоступными, что может привести к быстрой утилизации частиц конкурирующими микроорганизмами, такими как бактерии или инородные плесени. На этой стадии производственного процесса сухой дисперсный продукт анализируют для подтверждения того, что продукт в основном содержит частицы, не выходящие за пределы $-10(-10)/+30$ меш по американской шкале (плюс или минус 5%). Продукт также тестируется на наличие любых жизнеспособных загрязняющих организмов.

[591] Проверяют экспериментально содержание углеводов в продукте. Целевым является продукт с низким содержанием углеводов, поскольку углеводы, как правило, являются ключевым стимулятором роста нежелательных чужеродных микроорганизмов. Поэтому низкий уровень углеводов ограничивает распространение таких организмов. В некоторых неограничительных вариантах реализации углеводы удаляются, чтобы дополнительно увеличить содержание белка и результирующую эффективность продукта на единицу веса.

[592] Если продукт соответствует указанным выше стандартам, его переносят в смеситель (Forberg Model C200-SS-2D или эквивалентный). В смесителе продукт смешивают с консервантом. Предпочтительные консерванты включают медьсодержащие,

карбаматные, фенольные и антибиотические соединения, конкретными примерами которых являются:

1. Содержащие медь материалы - медный купорос, отдельно или в комбинации с известью.

2. Карбаматные материалы - метил-1-(бутилкарбамоил)-2-бензимидазолкарбамат; этиленбисдитиокарбамат цинка.

3. Фенольные материалы - о-фенилфенол; о-бензил-п-хлорфенол (o-Benzylpara-chlorophenol) и его соли.

4. Антибиотические материалы - стрептомицин; тетрацилин.

[593] Выбранные агенты добавляют в количестве, эффективном для предотвращения активности чужеродных микробов в продукте во время нахождения в компосте, но не настолько, чтобы препятствовать его утилизации грибным мицелием.

[594] Остальные этапы процесса выполняются предпочтительно в непрерывном режиме. Следующим этапом является пастеризация продукта. Для осуществления пастеризации продукт нагревают в сушильном аппарате (лопастная сушилка Nara, модель 1.6W (Nara Paddle Dryer Model 1.6W) или аналогичная). Сушилка используется для повышения температуры продукта от уровня окружающей среды до 104,4 °C (220 °F) в течение около 5 минут. При использовании лопастной сушилки Nara, модель 1.6W, это происходит путем инъекции пара под давлением 655 кПа (95 psi) при температуре около 163 °C (325 °F). Пастеризация направлена на достижение следующих целей: (1) уменьшение количества вегетативных бактерий и плесени при определении чашечным методом по меньшей мере на три порядка величины; (2) инактивация мезофильных бактериальных спор; и (3) инактивация липоксигеназы. Однако вышеописанное количество тепла должно быть недостаточным для того, чтобы существенно денатурировать продукт. Пастеризация предназначена для уменьшения вероятности преждевременного и нежелательного выделения тепла посторонними микроорганизмами во время произрастания и разрастания мицелия (spawn run). Определяют уровни живых микроорганизмов до и после пастеризации.

[595] После завершения пастеризации продукт переносят в холодильную/испарительную установку, состоящую из конвейера с вибрирующим псевдооживленным слоем (Jeffrey Dresser Industries, модель IXIO TMV или эквивалентная). В холодильной/испарительной установке используется фильтрованный окружающий воздух с расходом 71 м³/мин (2500 CFM) для снижения температуры продукта со 104,4 до 37,8 °C (с 220 °F до 100 °F) около за одну-две минуты. После такого охлаждения измеряются уровень влажности продукта. Целевой уровень влажности на

этой стадии составляет около 7,5%. Во время вышеописанных процессов измеряют и отслеживают содержание влаги в продукте, а также температурный профиль продукта во время фаз пастеризации/охлаждения.

[596] Испарение воды из продукта, как описано выше, предназначено для предотвращения порчи микроорганизмами, не уничтоженными во время пастеризации, включая бактериальные споры. Быстрое охлаждение до 37,8 °C (100 °F) в течение 1–2 минут предназначено для предотвращения денатурации белка - степень денатурации белка пропорциональна времени, в течение которого продукт выдерживается при высокой температуре.

[597] Получаемый конечный продукт, улучшающий рост грибов, должен состоять из практически неденатурированных белковых материалов. Денатурация включает модификацию третичной или четвертичной структуры белка, приводящую к изменению физических и биологических свойств белка. Термин "практически неденатурированный", как он используется в данном документе, описывается индексом, называемым "PDI" или "индекс диспергируемости белка". Проведение измерений PDI включает экстракцию клеточного продукта водой и анализ экстрагированной части по Кьельдалю. При проведении анализа по Кьельдалю продукт расщепляют концентрированной H₂SO₄, которая превращает связанный азот в продукте в сульфат аммония. Полученный раствор затем обрабатывают щелочными материалами, вызывая высвобождение аммиака. Количество выделяющегося аммиака определяется титрованием стандартной кислотой. Результаты титрования могут затем использоваться для расчета количества азота в продукте. Для расчета PDI используется формула, приведенная в методе Ва 10-65 AOCS (Ассоциация американских химиков-специалистов по жирам). В данной заявке "практически неденатурированный" белок характеризуется значением PDI не менее 50. Проводят анализ продукта для определения PDI и сравнивают с коммерчески доступным продуктом, в котором используется денатурированный формальдегидом соевый материал; сообщалось, что он имеет значение PDI, равное приблизительно (or approximately) 11,4. Проводится экспресс-анализ усилителя роста грибов, включая определение содержания белка, влаги, жира, золы, сырой клетчатки, углеводов. Также определяют калорийность.

[598] Усилитель роста грибов используется сразу после приготовления или упаковывается в мешки и хранится в сухом, прохладном месте для последующего использования. При использовании продукт равномерно перемешивают с компостом, предпочтительно в фазе разрастания мицелия при выращивании грибов. Комбинированный компост/продукт усилителя роста поддерживается в диапазоне температур 24-29,5 °C (75-85 °F) в течение 14-дневного периода разрастания мицелия.

Температуры за пределами этого диапазона, особенно выше 32 °C (90 °F), могут привести к значительным потерям урожайности и качества. Весовой процент усилителя роста грибов, добавляемого в компост для получения оптимальных результатов, определяют путем испытаний. Целевое значение оптимального веса усилителя роста составляет 3,5% от сухого веса компоста или, в более широком смысле, находится в диапазоне значений от 2 до 5% (от сухого веса) компоста.

Пример 25

Испытания усилителя роста грибов

[599] Компост, используемый в испытаниях, готовят из пшеничной соломы (21183 кг (46700 фунтов)) в сочетании с куриным пометом (9072 кг (20000 фунтов)), шелухой хлопковых семян (6804 кг (15000 фунтов)), сульфатом калия (318 кг (700 фунтов (1b))), мочевиной (136 кг (300 фунтов)), дробленой соей (1588 кг (3500 фунтов)) и хлопковой мукой (3175 кг (7000 фунтов)). Готовый компост помещают в лотки глубиной 20 см (8 дюймов) с 1,8 кг (4 фунта) хлопкового масла на лоток и пастеризуют. После пастеризации в компост добавляют 1,9 кг (4,2 фунта) на лоток мицелия шампиньона двуспорового (*A. bisporus*) вместе с добавочными материалами, приготовленными, как указано выше, из белковой клеточной массы, выращенной на субстрате С1, в количестве от 2 до 6% по массе. Положительным контролем является коммерческий состав на основе соевого белка. Отрицательный контроль не имеет добавок к компосту. Процент добавок определяют в расчете на 31,7 кг/м² (6,5 фунта на квадратный фут) сухого вещества компоста. Проверяют, чтобы все добавки имели близкий размер частиц, с использованием стандартных сит.

[600] После введения добавок в лотки добавляют воду, чтобы повысить уровень влажности содержимого около до 70%. Затем лотки помещают в помещение с контролируемой средой, имеющее относительную влажность 90-95%. Температуру компоста поддерживают в пределах 25,5-27,8 °C (78-82 °F). После 13 дней роста мицелия на поверхность компоста наносят 4,5 см (1,75 дюйма) переходного слоя почвы (*easing soil*) и поливают до предела. Лотки затем выдерживают в помещениях с контролируемой средой 18,3-22,8 °C (65-73 °F); 10000 млн⁻¹ CO₂) в течение 13 дней с последующим резким изменением температуры воздуха и содержания CO₂ до 15,5 °C (60 °F) и 800 млн⁻¹ CO₂, чтобы вызвать плодоношение грибов. Затем лотки помещают в производственные помещения и собирают урожай на протяжении четырех еженедельных волн плодоношения. Соответствующие периоды времени имеют следующую продолжительность: (а) фаза I компостирования - 56 дней; (b) фаза II компостирования - 6

дней; (с) произрастание и разрастание мицелия - 13 (13) дней; (d) инкубация (case holding) - 13 дней; и (е) сбор урожая - 32 дня. Определяют средний общий урожай грибов в кг/м² для экспериментов и контроля.

Пример 26

Переработка пищевых продуктов для заменителя мяса

[601] Высокобелковый продукт (НРР) с пониженным содержанием нуклеиновой кислоты, полученный, как описано выше, используется в качестве ингредиента пищевых продуктов.

[602] Приготовление:

1. Взвешивают необходимое количество НРР и помещают в бачок смесителя Hobart.

2. Отмеряют воду в соотношении около 3:2 к НРР и добавляют в воду карамельный краситель (caramel coloring) в соотношении около 1:60. Устанавливают смеситель на скорость I.

3. Включают смеситель Hobart и очень медленно добавляют окрашенную карамелью воду к НРР в бачке Hobart при перемешивании. Хорошо перемешивают материал.

4. Экструдировывают перемешанный материал через мясорубку (например, насадку Хобарта) и собирают экструдированный НРР в лоток или поддон сушилки. Экструдированный НРР может быть нарезан до желаемой длины на выходе из экструдера, или он может быть собран в виде длинных прядей и уменьшен до желаемого размера после сушки.

5. Высушивают экструдированный материал в конвекционной печи до влажности около 10%. Высушенный текстурированный НРР регидратируют для дальнейшего использования в пищевых продуктах путем: а) регидратации в воде (избыток) при комнатной температуре в течение 1-2 часов или путем б) регидратации в избытке теплой воды (38-60 °C (100-140 °F)) в течение часа. Определяют соотношение водопоглощения к текстурированному НРР.

Пример 27

Испытания в качестве усилителя роста для производства темпе (Tempeh) и экспериментальных составов с окарой (Okara)

[603] Окара является побочным продуктом на основе соевых бобов, получаемым после производства соевого молока/тофу. Она имеет относительно высокое содержание

белка. Окара может быть преобразована в темпе путем ферментации с грибом *Rhizopus oligosporus* с использованием закваски темпе, или преобразована в прессованный темпе с использованием таких ингредиентов, как коричневый рис, пшеница булгур, соя и другие комбинации бобовых и зерновых.

[604] В этом эксперименте тестируют, могут ли клетки, и/или их экстракты, и/или гидролизаты по данному изобретению использоваться в качестве усилителя роста для *R. oligosporus* в комбинации с субстратом окары. Также проверяют, обладает ли полученный темпе, полученный с помощью усилителя роста, более высокими характеристиками, такими как, без ограничений, пищевая ценность по сравнению с отрицательным контролем.

[605] Этот эксперимент также проверяет, могут ли клетки, экстракты и/или гидролизаты использоваться только с окарой или в комбинации с другими ингредиентами, такими как коричневый рис, пшеница булгур, соя и другие комбинации бобовых и зерновых, при производстве прессованного темпе.

Пример 28

[606] Некоторые варианты реализации, описанные в данном документе, используют периодически работоспособные возобновляемые источники энергии, такие как солнечная энергия и ветер, для получения H_2 , необходимого для фиксации углерода. Источником CO_2 является промышленный источник, такой как электростанция. Электролизеры, как правило, потребляют электроэнергию в периоды низкой потребности в электроэнергии и высокой возобновляемой мощности. В такие периоды низкого спроса и высокой возобновляемой генерации доля возобновляемых, без выбросов CO_2 , источников электроэнергии может достигать 95% в таких регионах, как Техас, Шотландия и Германия. Таким образом, в действительности электролизер использует энергию, полученную без выбросов CO_2 , для производства H_2 из воды, и будет использовать незначительную часть, если вообще будет, энергии из источников с высокими выбросами CO_2 . В таких регионах периоды высокого возобновляемого энергоснабжения и низкого энергопотребления составляют около 50% времени и, таким образом, ожидается, что электролизер будет работать около 50% времени. Резервуар для хранения H_2 и CO_2 на месте эксплуатации буферизует разницу во времени между производством CO_2 из промышленного источника и производством H_2 из электролизера, обеспечивая непрерывный поток обоих этих газов в биопроцесс с фиксацией CO_2 . Хемоавтотрофные водородокисляющие (knallgas) микробы превращают CO_2 , H_2 и минеральные питательные вещества (т.е. NPK (азот, фосфор, калий)) в биомассу с высоким содержанием белка. Эта

богатая белком биомасса может быть преобразована в биостимуляторы для растений или добавки для роста грибов, или животный корм, или питание непосредственно для человека (Фиг. 23 и Фиг. 24). Количество O_2 из электролизера будет превышать потребности микроаэробного водородокисляющего биопроцесса. Этот избыток O_2 может быть продан в качестве сопутствующего продукта в виде чистого газа (Фиг. 25) или же возвращен для сжигания ископаемого топлива или в энергоблок, чтобы повысить тепловую эффективность установки и повысить концентрацию CO_2 в потоке дымового газа, выходящего из установки. Повышенная концентрация CO_2 облегчает этап улавливания углерода.

[607] Для достижения углеродной нейтральности систему предпочтительно размещают в регионах с высокой генерацией периодически возобновляемой энергии. Электролизерный блок потребляет энергию только в периоды низкой потребности в электроэнергии и переизбытка возобновляемой энергии. Это уменьшит нагрузку на электросети, вызываемую периодически возобновляемой энергией (Фиг. 25). В дополнение к улавливанию CO_2 , производству ценных питательных веществ и уменьшению нагрузки на энергосистему от избыточного производства возобновляемой энергии в периоды низкого спроса, система также позволяет более полно использовать возобновляемую мощность, позволяя возобновляемым источникам продолжать генерацию даже в периоды низкого спроса. Основным на сегодня применением электролизерной технологии является преобразование H_2 , продуцируемого в периоды избыточного снабжения возобновляемой энергией, обратно в энергию сети в периоды высокого спроса на электроэнергию и низкого возобновляемого энергоснабжения - фактически, возвращаясь обратно по цепочке создания стоимости от H_2 к электричеству. H_2 и CO_2 превращаются в белок, а затем в питательные вещества для растений, грибов, животных и человека - фактически продолжая подъем по цепочке создания стоимости от H_2 .

[608] Конкретные предпочтительные варианты реализации данного изобретения были описаны в данном документе достаточно подробно, чтобы дать возможность специалистам в данной области техники реализовать изобретение в полном объеме. Однако следует понимать, что эти варианты реализации являются иллюстративными, и что многие возможные варианты данного изобретения, которые не были конкретно описаны, все равно входят в объем данного изобретения и прилагаемой формулы изобретения.

[609] Хотя вышеизложенное изобретение было описано более подробно с помощью иллюстраций и примеров для ясности понимания, специалистам в данной

области техники должно быть очевидно, что определенные изменения и модификации могут быть осуществлены на практике, не выходя за пределы сущности и объема изобретения, которые описаны в прилагаемой формуле изобретения. Таким образом, описание не должно рассматриваться как ограничение объема изобретения.

[610] Описания, приведенные в данном документе, добавлены только в качестве примера и не предназначены для ограничения каким-либо образом объема данного изобретения. В целом, специалисты в данной области техники легко поймут, что все параметры, размеры, материалы и конфигурации, описанные в данном документе, предназначены для использования в качестве примера, и что фактические параметры, размеры, материалы и/или конфигурации будут зависеть от конкретного применения или применений, в которых используются идеи данного изобретения. Если в данном документе указан числовой предел или диапазон значений, то он включает конечные точки. Кроме того, все значения и поддиапазоны в рамках числового предела или диапазона специально включены, как если бы это было явно указано. Специалисты в данной области техники представят себе, или смогут установить с использованием не более чем обычных экспериментов, множество эквивалентов конкретных вариантов реализации изобретения, описанных в данном документе. Возможны многие варианты, модификации, добавления и изъятия. Кроме того, многие этапы, описанные в данном документе, могут быть переставлены по порядку, и многие этапы могут быть добавлены или удалены. Таким образом, следует понимать, что вышеизложенные варианты реализации представлены только в качестве примера и что, в пределах объема прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов, изобретение может быть осуществлено на практике иначе, чем было конкретно описано и заявлено.

[611] Данное изобретение направлено на каждый отдельный признак, систему, изделие, материал, набор и/или способ, описанные в данном документе. Кроме того, любая комбинация двух или более таких признаков, систем, изделий, материалов, комплектов и/или способов, если такие признаки, системы, изделия, материалы, комплекты и/или способы не являются взаимно несовместимыми, включена в объем данного изобретения.

[612] Все публикации, патенты и патентные заявки, упоминаемые в данном документе, настоящим включены посредством ссылок в полном объеме для всех целей и в той же степени, как если бы для каждой отдельной публикации, патента или патентной заявки специально и отдельно указывалось про их включение посредством ссылок.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биологический и химический способ биологического превращения неорганических и/или органических молекул, содержащих один или большее количество атомов углерода, в органические молекулы, включающие аминокислоты, белки и/или витамины, полученные в результате реакции фиксации углерода или анаболического биосинтеза, включающий:

введение неорганических и/или органических молекул, содержащих один или большее количество атомов углерода, в среду, которая включает клетки микроорганизмов в культуральной среде, пригодной для поддержания клеток микроорганизмов;

при этом неорганические и/или органические молекулы, содержащие один или большее количество атомов углерода, используются клетками микроорганизмов в качестве источника углерода для роста и/или биосинтеза;

превращение неорганических и/или органических молекул, содержащих один или большее количество атомов углерода, в продукты органических молекул, содержащие аминокислоты, белки и/или витамины в среде, посредством по меньшей мере одной реакции фиксации углерода или по меньшей мере одного пути анаболического биосинтеза, содержащегося в клетках микроорганизмов;

причем реакция фиксации углерода или путь анаболического биосинтеза по меньшей мере частично обусловлены химической и/или электрохимической энергией, обеспечиваемой донорами электронов и/или акцепторами электронов, которые генерируются химически и/или электрохимически, и/или термодинамически, и/или вводятся в среду, по меньшей мере, из одного источника, внешнего по отношению к среде, и

при этом клетки микроорганизма составляют биомассу, которая содержит указанные аминокислоты, белки и/или витамины.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная клетка микроорганизма представляет собой бактериальную клетку.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанные клетки микроорганизма продуцируют аминокислоты и/или белок, и/или витамины, и/или биомассу при культивировании в присутствии газообразного субстрата в условиях, пригодных для роста микроорганизма и продуцирования биопродуктов.

4. Способ по п. 3, отличающийся тем, что указанный газообразный субстрат содержит CO_2 и/или CO и/или CH_4 в качестве источника углерода.

5. Способ по п. 3, отличающийся тем, что указанный газообразный субстрат содержит H_2 .

6. Способ по п. 3, отличающийся тем, что указанный газообразный субстрат содержит H_2 и/или O_2 в качестве источника энергии.

7. Способ по п. 3, отличающийся тем, что указанный газообразный субстрат содержит доноры электронов, включая один или большее количество из H_2 и/или CO , и/или CH_4 .

8. Способ по п. 3, отличающийся тем, что указанный газообразный субстрат содержит пиролизный газ или генераторный газ или синтез-газ или природный газ или биогаз.

9. Способ по п. 3, отличающийся тем, что указанный газообразный субстрат содержит смесь газов, включающую H_2 , и/или CO_2 , и/или CO.

10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный микроорганизм представляет собой *Cupriavidus sp.* или *Ralstonia sp.*

11. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный микроорганизм представляет собой *Cupriavidus necator* или *Cupriavidus metallidurans*.

12. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная биомасса и/или органические молекулы, продуцируемые указанными микроорганизмами, используются для кормления или обеспечения питания одного или нескольких других организмов.

13. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанные аминокислоты и/или белки и/или витамины используются для получения биостимулятора растений или усилителя роста грибов.

14. Биостимулятор растений, включающий биомассу, аминокислоты, белки и/или витамины, полученные по п. 1.

15. Способ обработки сельскохозяйственной культуры, включающий нанесение биостимулятора растений по п. 14 на растение, и/или на почву, в которой растение выращивают, и/или в жидкую среду, используемую для выращивания растения; и сбор урожая растений.

16. Способ по п. 1, дополнительно включающий нанесение биомассы, аминокислот, белков и/или витаминов, продуцируемых в окружающей среде, на растение и/или на почву, в которой растение выращивают, и/или в жидкую среду, используемую для выращивания растений; и сбор урожая растений.

17. Способ по п. 15 или 16, отличающийся тем, что растение представляет собой сельскохозяйственную культуру.

18. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанные клетки микроорганизма лизируются, в результате чего образуется лизат.

19. Способ по п. 18, в котором указанный лизат используется для получения эмульсии или суспензии.

20. Способ по п. 18, в котором указанный лизат разделяется на нерастворимые и растворимые фракции.

21. Способ по п. 20, в котором указанная нерастворимая и/или растворимая фракция концентрируется или высушивается.

22. Биостимулятор растений, содержащий лизат, эмульсию, суспензию или их фракцию по любому из пп.18-21.

23. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанные белки гидролизуются, тем самым образуя гидролизат.

24. Способ по п. 23, в котором указанный гидролизат используется для получения эмульсии или суспензии.

25. Способ по п. 23, в котором указанный гидролизат разделяется на нерастворимые и растворимые фракции.

26. Способ по п. 25, в котором указанная нерастворимая и/или растворимая фракция концентрируется или высушивается.

27. Способ по п. 22, в котором указанный гидролизат фильтруют, получая таким образом фильтрат и остаток на фильтре.

28. Биостимулятор растений, включающий гидролизат, эмульсию, суспензию, фракцию, фильтрат или их остаток на фильтре по любому из пп.23-27.

29. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная биомасса используется для производства биостимулятора растений, включающего: гидролиз указанной биомассы для получения гидролизата; и составление композиции гидролизата в качестве биостимулятора растений для внекорневого внесения и/или применения в качестве почвенного адьюванта или добавки и/или для использования в жидкой среде для роста растений.

30. Биостимулятор растений, полученный способом по п. 29.

31. Способ по п. 29, дополнительно включающий нанесение биостимулятора растений на растение и/или на почву, в которой растение выращивают, и/или на жидкую среду, используемую для выращивания растения; и сбор урожая.

32. Способ по п. 29, в котором указанный гидролиз включает, по меньшей мере, один фермент, способный гидролизовать белки, по меньшей мере, до одной из свободных аминокислот и олигопептидов.

33. Способ по п. 29, в котором указанный гидролиз включает проведение кислотного гидролиза.

34. Способ по п. 29, в котором указанный гидролиз включает проведение щелочного гидролиза.

35. Способ по п. 3, отличающийся тем, что указанные микроорганизмы являются водородокисляющими (*knallgas*) микроорганизмами.

36. Способ по п. 35, в котором указанный газообразный субстрат содержит H_2 и/или CO_2 .

37. Способ по п. 36, в котором указанный газообразный субстрат представляет собой газ пиролиза или генераторный газ или синтез-газ.

38. Способ по п. 3, отличающийся тем, что указанный газообразный субстрат получают из твердых коммунально-бытовых отходов, черного щелока, сельскохозяйственных отходов, древесных отходов, трудноизвлекаемого природного газа, биогаза, кислого газа, гидратов метана, шин, нефтяного кокса, сточных вод, навоза, соломы, лигноцеллюлозных энергетических культур, лигнина, растительных остатков багасса, опилки, отходы лесного хозяйства, пищевые отходы, отходы ковровых покрытий, отходы пластика, свалочный газ, водоросли, морские водоросли и/или лигноцеллюлозная биомасса.

39. Способ по п. 1, отличающийся тем, что аминокислоты и/или белок и/или витамины и/или биомасса, вырабатываемые в окружающей среде, извлекаются из культуральной среды.

40. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный источник углерода содержит только один атом углерода, и при этом указанные доноры электронов и/или молекулы, содержащие только один атом углерода, генерируются посредством термохимического процесса, воздействующего на органическое вещество, включающего по меньшей мере одно из: газификации; пиролиз; паровой риформинг; и автореформирование.

41. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный источник углерода содержит только один атом углерода, и при этом указанные доноры электронов и/или органические молекулы, содержащие только один атом углерода, образуются в результате паровой конверсии метана.

42. Способ по пп.40 и 41, в котором газообразный субстрат получен из газового потока, содержащего H_2 , CO и CO_2 , которые генерируются в результате газификации и/или пиролиза, и/или авториформинга, и/или парового риформинга, при этом отношение водорода к монооксиду углерода в выходе газа из газификации и/или пиролиза, и/или авториформинга, и/или реформинга с водяным паром регулируется с помощью реакции конверсии водяного газа перед подачей газового потока в микроорганизмы.

43. Способ по п. 1, отличающийся тем, что клетки микроорганизмов включают микроорганизмы, выбранные из одного или нескольких следующих родов: *Cupriavidus sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Hydrogenovibrio sp.*, *Rhodopseudomonas sp.*, *Hydrogenobacter sp.*, *Gordonia sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Streptomyces sp.*, *Rhodobacter sp.* И/или *Xanthobacter*.

44. Способ по п. 1, включающий один или большее количество доноров электронов, выбранных из: аммиака; аммония; монооксида углерода; дитионита; элементной серы; углеводородов; водорода; метабисульфитов; оксида азота; нитритов; сульфатов, таких как тиосульфаты, включая, без ограничений, тиосульфат натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) или тиосульфат кальция (CaS_2O_3); сульфидов, таких как сероводород; сульфитов; тионатов; тионитов; переходных металлов или их сульфидов, оксидов, халькогенидов, галогенидов, гидроксидов, оксигидроксидов, фосфатов, сульфатов или карбонатов в растворенных или твердых фазах; и электронов проводимости или валентной зоны в твердотельных электродных материалах.

45. Способ по п. 1, включающий один или большее количество акцепторов электронов, выбранных из: диоксида углерода; кислорода; нитритов; нитратов; ионов трехвалентного железа или других переходных металлов; сульфатов; и отверстий валентной или проводящей зоны в твердотельных электродных материалах.

46. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанной биологической конверсии предшествует одна или несколько стадий химической предварительной обработки, на которых доноры электронов и/или акцепторы электронов и/или источники углерода и/или минеральные питательные вещества, необходимые микроорганизму, генерируются и/или очищаются по меньшей мере из одного исходного химического вещества и/или рециркулируются из химических веществ, возникающих на стадии фиксации углерода, и/или генерируются или содержатся в потоках отходов других промышленных, горнодобывающих, сельскохозяйственных, сточных вод или процессов образования отходов.

47. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанные доноры электронов и/или акцепторы электронов генерируются или рециркулируются с использованием возобновляемых, альтернативных или традиционных источников энергии с низким уровнем выбросов парниковых газов, и при этом указанные источники энергии выбираются из по меньшей мере одного из фотоэлектрических, солнечных тепловых источников и энергии ветра, гидроэнергетика, атомная энергия, геотермальная энергия, усовершенствованная геотермальная энергия, тепловая энергия океана, мощность океанских волн и сила приливов.

48. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанные доноры электронов и/или акцепторы электронов генерируются с использованием электросетевого электричества в периоды, когда поставки электричества превышают спрос на электричество, и в которых резервуары-хранилища буферизуют генерацию указанных доноров электронов и/или акцепторов электронов и их потребление в указанной углерод-фиксирующей реакции.

49. Способ по п. 7, в котором указанные доноры электронов содержат H_2 , и/или CO , и/или метан, полученный из остаточного газа в результате одного или нескольких из следующих действий: риформинг с использованием пара метана; нефтепереработка; производство стали; производство алюминия; производство марганца; хлоралкалический процесс; производство технического углерода; синтез метанола; синтез аммиака; металлургические процессы; химические процессы; и электрохимические процессы.

50. Способ по п. 1, в котором указанный источник углерода содержит молекулу C1, улавливаемую или направленную из одного или нескольких источников, включающую: газификацию органического вещества; кальцинирование известняка CaCO₃ для получения негашеной извести CaO; паровую конверсию метана; горение, сжигание или сжигание на факеле; анаэробную или аэробную ферментацию сахара; метанотрофный биопроцесс; дыхание других организмов, очистку сточных вод; свалочный газ, производство фосфата натрия; геологически или геотермально производимые или выделяемые газы; кислотный газ, кислый газ или природный газ; морскую воду или другие объекты поверхностных или подземных вод; и атмосферу.

51. Способ по п. 1, отличающийся тем, что продукты органических молекул включают соединения с углеродными остовами, которые имеют пять атомов углерода или более.

52. Способ по п. 1, отличающийся тем, что в качестве донора электронов используют молекулярный водород, причем указанный водород получают способом, использующим, по меньшей мере, одно из следующего: электролиз воды; термохимическое расщепление воды; электролиз рассола; электролиз и/или термохимическое расщепление сероводорода.

53. Способ по п. 52, в котором электролиз воды для производства водорода проводится с использованием одной или нескольких из: протонообменных мембран (PEM); жидкие электролиты, такие как KOH; щелочной электролиз; Электролиз твердого полимера; электролиз высокого давления; и высокотемпературный электролиз пара (HTES).

54. Способ по п. 52, в котором термохимическое расщепление воды для производства водорода осуществляется с использованием одного или нескольких из: цикла оксида железа; цикла церия(IV) оксида-церия(III) оксида; цинк-цинк-оксидного цикла; серно-йодного цикла; медно-хлорного цикла; кальций-бром-железного цикла; гибридного цикла серы.

55. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанные клетки микроорганизмов продуцируют указанные аминокислоты, белки и/или витамины посредством хемосинтетической реакции, которая включает молекулярный водород в качестве донора электронов, причем указанный водород генерируется посредством электрохимических или термохимических процессов, о которых известно, что они производят водород с низким или нулевым выбросом диоксида углерода, включающих один или несколько из: паровой конверсии метана с помощью улавливания и поглощения углерода (CCS – carbon capture and sequestration); газификацию угля с помощью CCS; Kvaerner-процесс и другие процессы, производящие сажу; газификацию или пиролиз биомассы с помощью CCS; и пиролиз биомассы с образованием биоугольного сопродукта.

56. Способ получения аминокислот и/или белка и/или витаминов и/или биомассы, включающий культивирование микроорганизма по п. 1 в биореакторе, который содержит газообразный субстрат и культуральную среду, которая содержит другие питательные вещества для роста и производства биопродуктов. условия, пригодные для роста микроорганизма и продуцирования аминокислот и/или белка и/или витаминов и/или биомассы, где указанный микроорганизм продуцирует аминокислоты и/или белок и/или витамины и/или биомассу.

57. Способ получения лизата, включающий культивирование микроорганизма по п. 1 в биореакторе в условиях, пригодных для роста микроорганизма, где биомассу, произведенную в указанном биореакторе, собирают и удаляют из биореактора, причем указанная биомасса удаленная из биореактора впоследствии лизируется, в результате чего образуется лизат.

58. Способ по п. 57, в котором указанный лизат содержит белки, причем указанный способ дополнительно включает гидролиз белков в указанном лизате, в результате чего образуется гидролизат.

59. Белковый концентрат, выделенный из клеток микроорганизмов по п. 1.

60. Белковый концентрат по п. 59, содержащий менее чем около 5% нуклеиновой кислоты.

61. Белковый концентрат по п. 60, содержащий менее чем около 3% нуклеиновой кислоты.

62. Способ по п. 1, дополнительно включающий получение концентрированного белкового продукта, включающий стадии: а. разрушения указанных клеток микроорганизмов, где указанные клетки содержат один или большее количество нуклеазных ферментов, в результате чего образуется смесь, содержащая растворимую нуклеиновую кислоту, нуклеазу и белок, и содержащая нерастворимые остатки клеточной стенки; б. отделение растворимой нуклеиновой кислоты, нуклеазы и белка от нерастворимых остатков клеточной стенки в условиях, в которых нуклеиновая кислота гидролизуется нуклеазой, в результате чего образуется гидролизованная нуклеиновая кислота; d. перевод белка в нерастворимую форму; и е. отделение нерастворимого белка от оставшихся растворимых материалов, которые содержат гидролизованную нуклеиновую кислоту.

63. Способ по п. 62, в котором нерастворимый белок содержит менее чем около 5% нуклеиновой кислоты.

64. Способ по п. 62, в котором нерастворимый белок содержит менее чем около 3% нуклеиновой кислоты.

65. Способ по п. 57 или 62, в котором клетки разрушаются гомогенизацией.

66. Способ по п. 1, отличающийся тем, что по меньшей мере одна реакция фиксации углерода и по меньшей мере один путь анаболического биосинтеза приводят к образованию биопродуктов, включающих по меньшей мере одно из: аминокислоты; пептиды; белки; липиды; полисахариды; и/или витамины.

67. Способ по п. 66, в котором по меньшей мере одна углерод-фиксирующая реакция и по меньшей мере один путь анаболического биосинтеза включают цикл Кальвина и путь биосинтеза аминокислот.

68. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная биомасса и/или органические молекулы находят применение в качестве, по меньшей мере, одного из: источника органического углерода и/или азота

для ферментации; источника питательных веществ для роста других микробов или организмов; пребиотика; источника питательных веществ или пищевого ингредиента для человека; корма для животных; в качестве сырья или химического промежуточного звена для производства или химических процессов; источника фармацевтических, лекарственных или пищевых веществ; удобрения; почвенной добавки; стабилизатора почвы; почвенного адъюванта; растительного биостимулятора; и/или усилителя роста грибов.

69. Способ по п. 68, в котором указанное удобрение и/или почвенная добавка; и/или стабилизатор почвы; и/или почвенный адъювант; и/или биостимулятор растений; и/или усилитель роста грибов, добавляет углерод и/или азот в почву, что приводит к увеличению содержания углерода и/или азота в почве, к которой он применяется.

70. Способ по п. 68, в котором указанный источник углерода представляет собой газообразную молекулу C1, причем углерод, добавленный в почву, представляет собой секвестрированный углерод, а сквозной (end-to-end) процесс от источника газообразного углерода C1 до углерода в почве представляет собой процесс секвестрации углерода.

71. Способ по п. 68, в котором указанное удобрение и/или биостимулятор применяют к сельскохозяйственной культуре, которую выращивают гидропонически, аэропонно, аквапонически или в вертикальной фермерской системе.

72. Способ по п. 68, в котором указанное удобрение и/или биостимулятор используется при фертигации.

73. Способ по п. 68, в котором указанное удобрение и/или биостимулятор применяют к сельскохозяйственной культуре, которую выращивают в теплице, в помещении и/или с использованием искусственного освещения.

74. Способ получения экстракта органического фермента из исходного сырья C1, включающий способ по п. 1, в котором указанный источник углерода содержит только один атом углерода, причем указанный способ дополнительно включает подвергание указанных клеток микроорганизмов одному или нескольким из: механического лизиса; ферментативного лизиса; регулировки pH; увеличения или уменьшения давления; повышения или понижения температуры; электрических или электромагнитных полей; УЗИ; изменения осмолярности; и ферментативного гидролиза, в результате чего получается экстракт органического фермента.

75. Усилитель роста грибов, содержащий указанную биомассу и/или белок, полученный способом по п. 1.

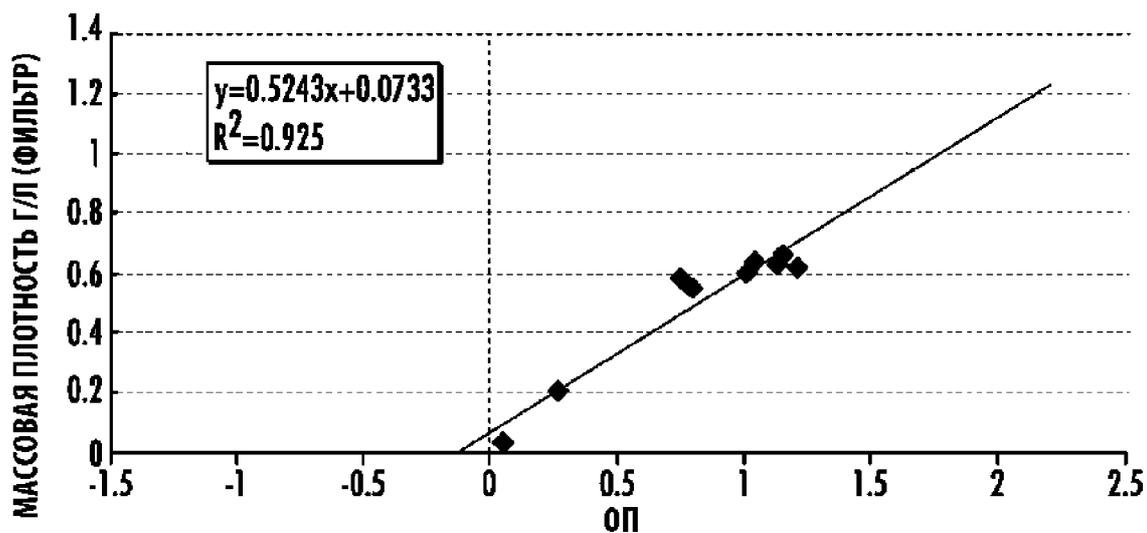
76. Способ усиления роста грибов, включающий объединение указанного усилителя роста грибов по п. 75 с грибным компостом.

77. Композиция для выращивания грибов, содержащая указанный комбинированный грибной компост и усилитель роста грибов по п. 76.

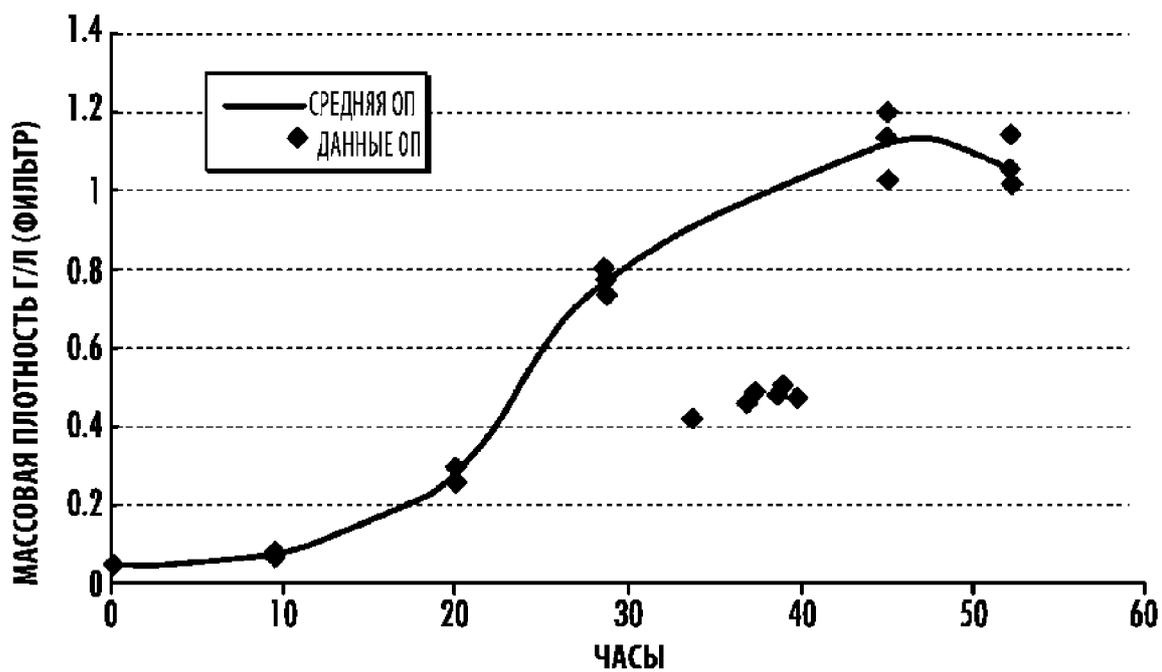
78. Способ выращивания микробов и других организмов, в котором указанные микробы и организмы выращивают в почве на указанном источнике питательных веществ по п. 68.

79. Способ по п. 68, в котором указанные ферментации с использованием указанных источников органического углерода и/или азота дают один или большее количество биопродуктов, содержащих: коммерческий фермент; антибиотик; аминокислоту; белок; растительный биостимулятор; усилитель роста грибов; пробиотик; пребиотик; биоудобрение; пищу; пищевой ингредиент; витамин; липид; биопластик; полисахарид; нутрицевтик; и/или фармацевтический препарат.

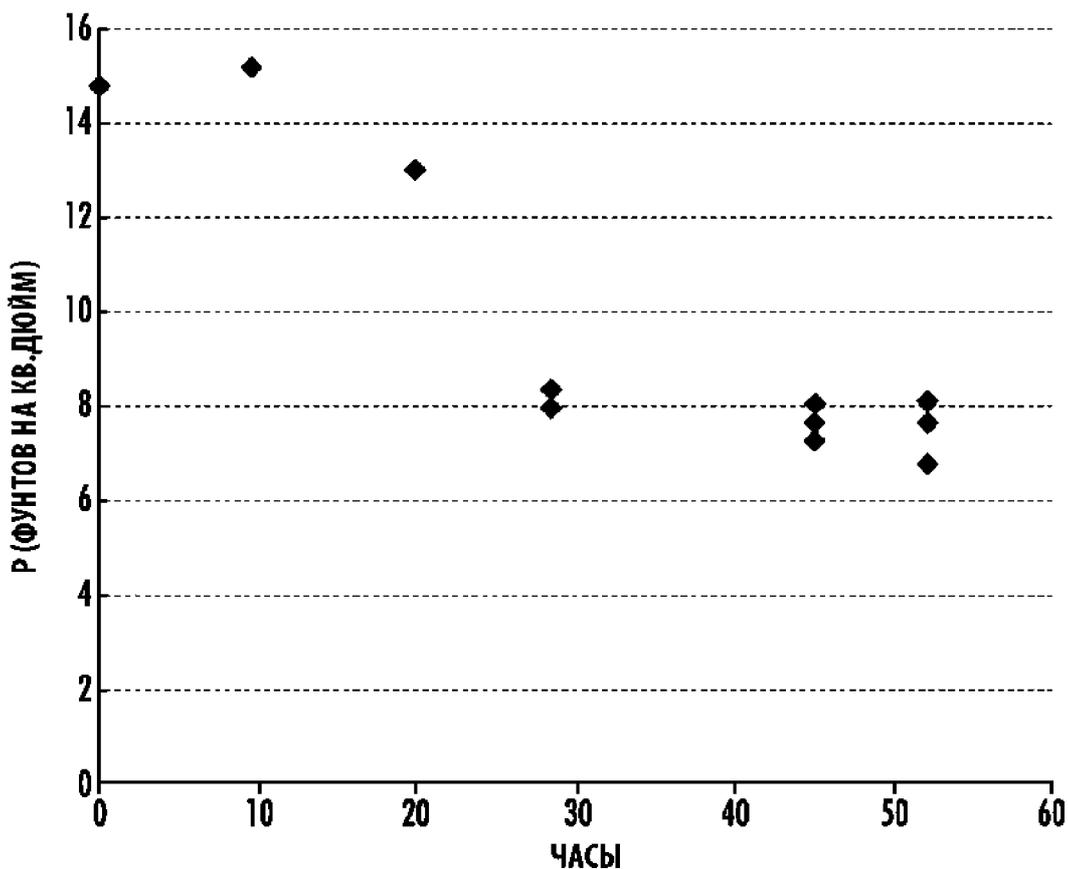
МИКРОБНАЯ КОНВЕРСИЯ CO₂ И ДРУГИХ СУБСТРАТОВ C1
В ВЕГАНСКИЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА, УДОБРЕНИЯ,
БИОСТИМУЛЯТОРЫ И СИСТЕМЫ ДЛЯ УСКОРЕННОЙ
СЕКВЕСТРАЦИИ ПОЧВЕННОГО УГЛЕРОДА



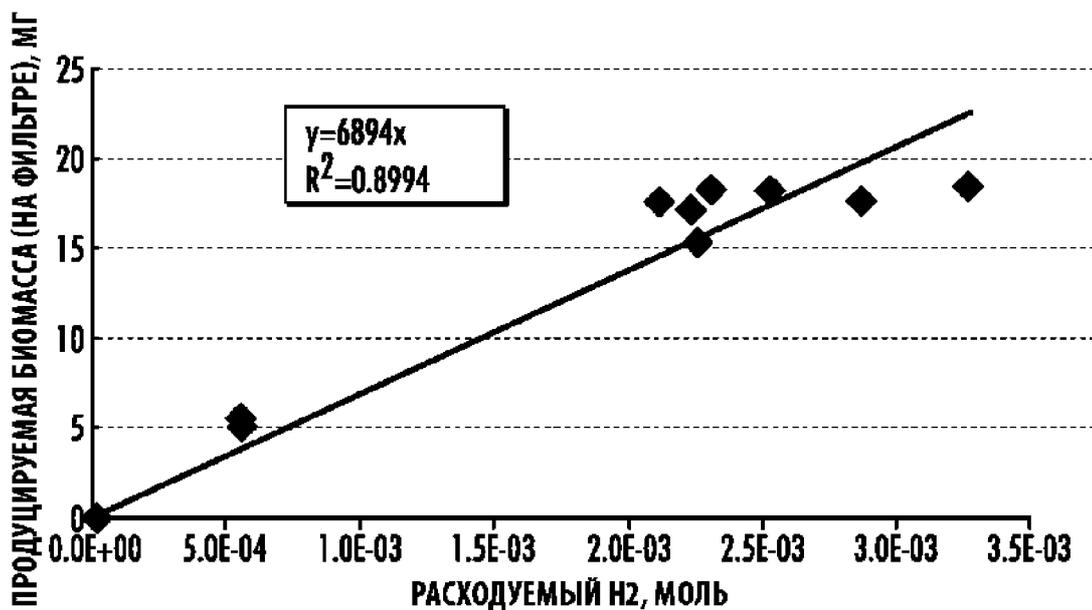
Фиг. 1



Фиг. 2

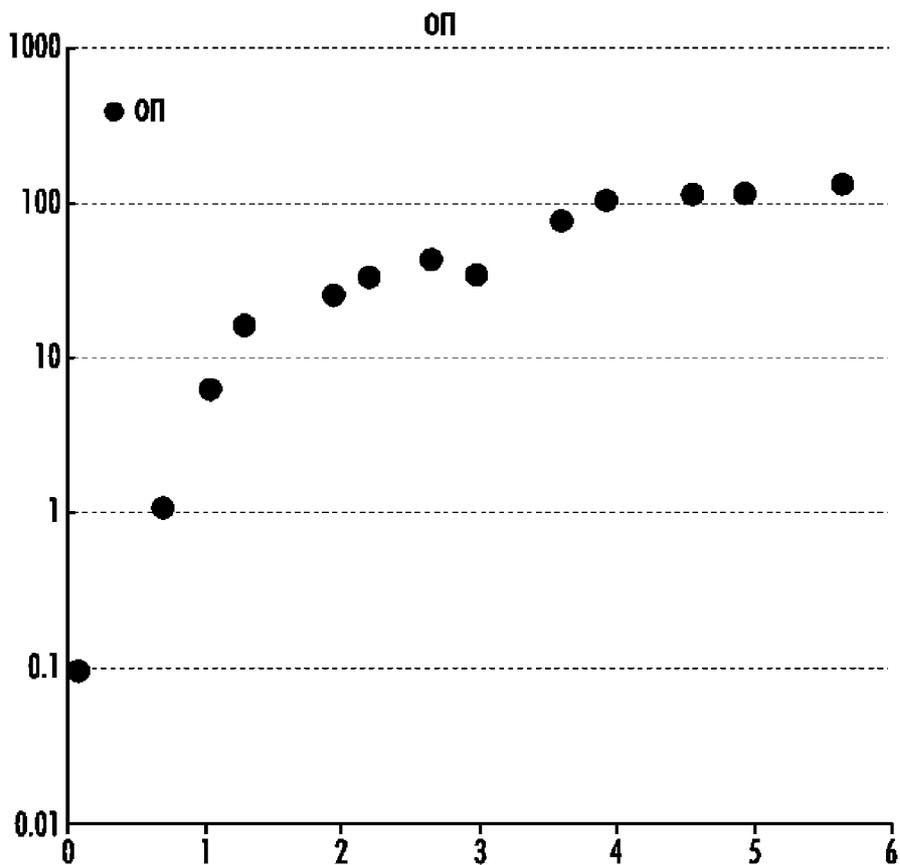


Фиг. 3



Фиг. 4

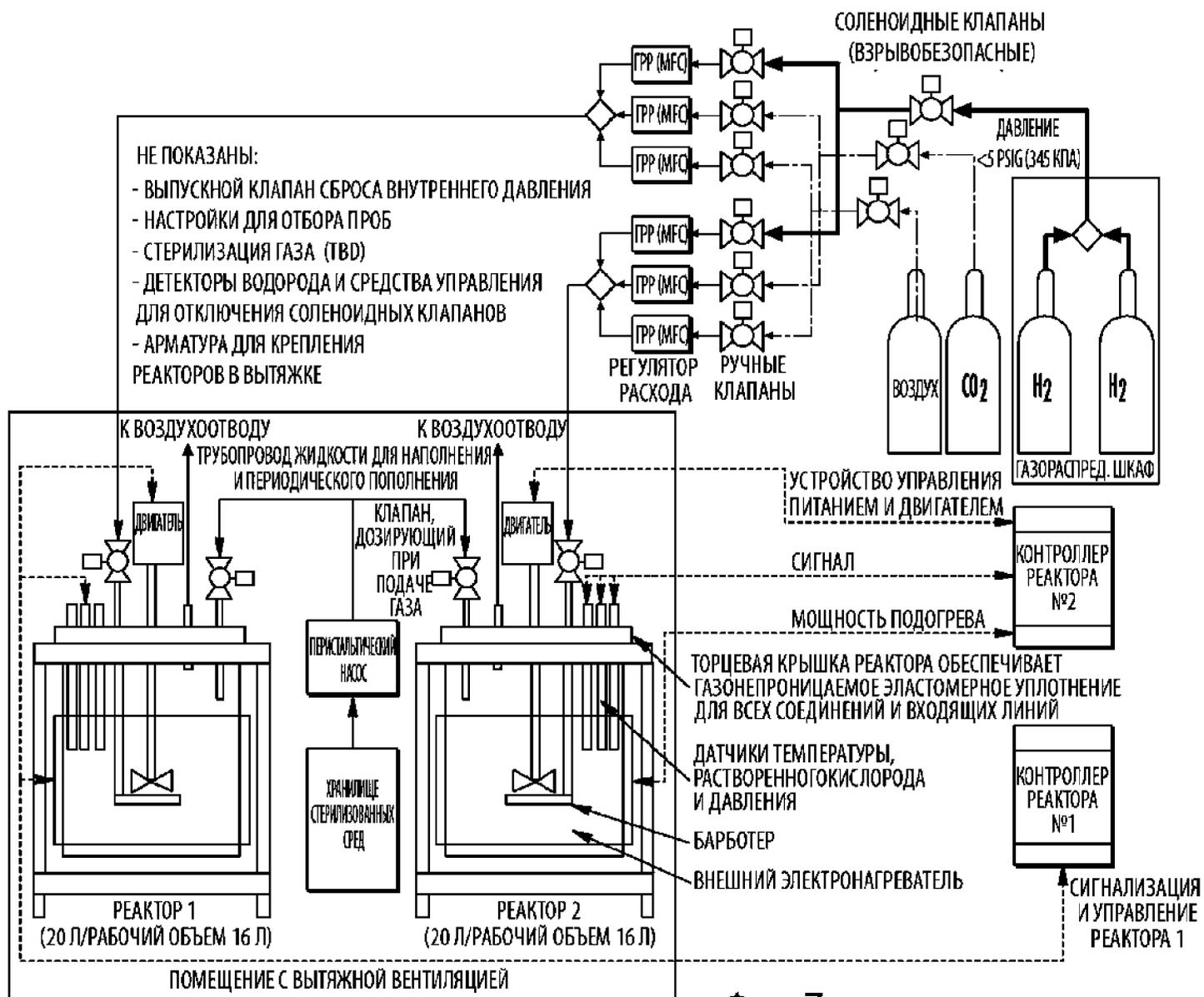
МИКРОБНАЯ КОНВЕРСИЯ CO₂ И ДРУГИХ СУБСТРАТОВ C1
В ВЕГАНСКИЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА, УДОБРЕНИЯ,
БИОСТИМУЛЯТОРЫ И СИСТЕМЫ ДЛЯ УСКОРЕННОЙ
СЕКВЕСТРАЦИИ ПОЧВЕННОГО УГЛЕРОДА



Фиг. 5

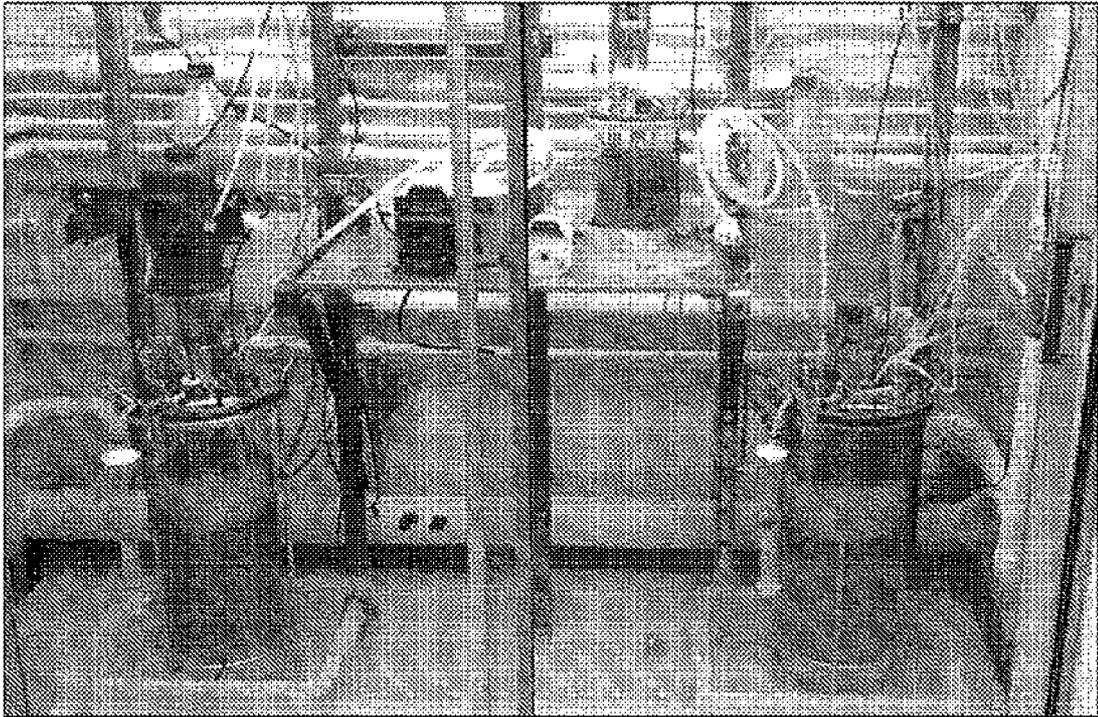
ОРГАНИЗМ	УСЛОВИЯ РОСТА	
	ХЕМОАВТОТРОФНЫЙ	ГЕТЕРОТРОФНЫЙ
<i>R. OPACUS</i> (DSM 44193)	9.00 (6д)	0.00
<i>R. OPACUS</i> (DSM 43205)	9.00 (6д)	1.00 (5д)
<i>RHODOCOCCUS SP.</i> (DSM 3346)	2.40 (3д)	0.51 (5д)
<i>CUPRIAVIDUS</i> <i>NECATOR</i> (DSM 531)	2.20 (3д)	0.23 (3д)

Фиг. 6

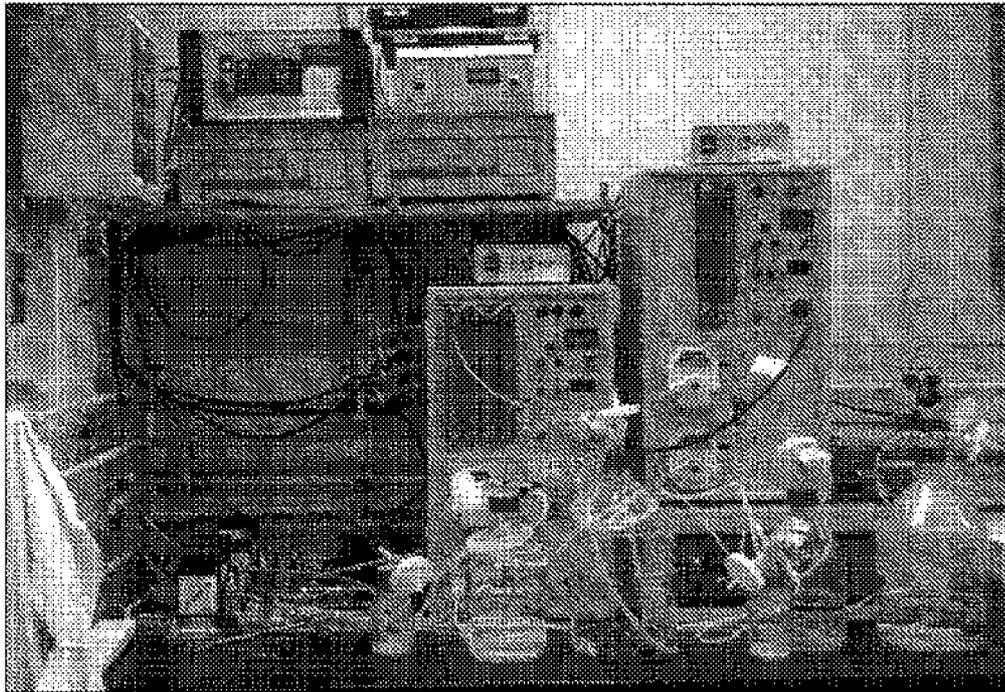


Фиг. 7

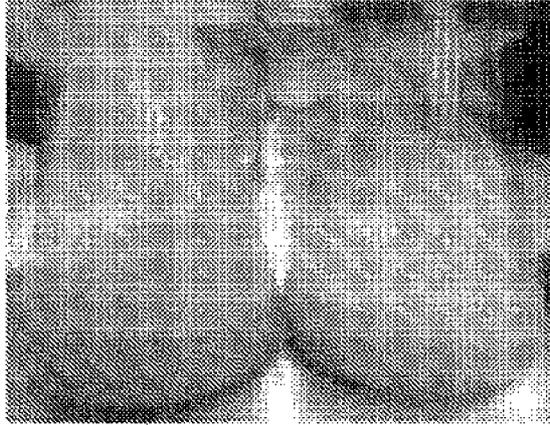
МИКРОБНАЯ КОНВЕРСИЯ CO₂ И ДРУГИХ СУБСТРАТОВ C1
В ВЕГАНСКИЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА, УДОБРЕНИЯ,
БИОСТИМУЛЯТОРЫ И СИСТЕМЫ ДЛЯ УСКОРЕННОЙ
СЕКВЕСТРАЦИИ ПОЧВЕННОГО УГЛЕРОДА



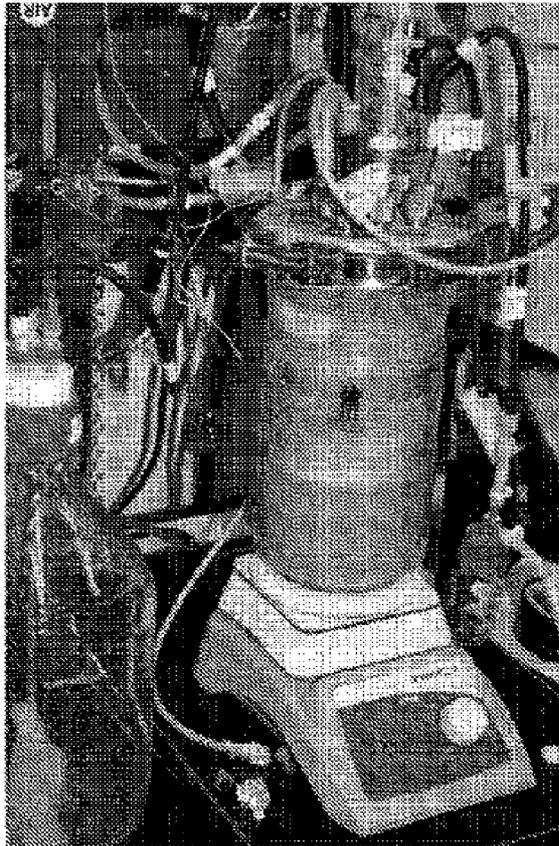
Фиг. 8



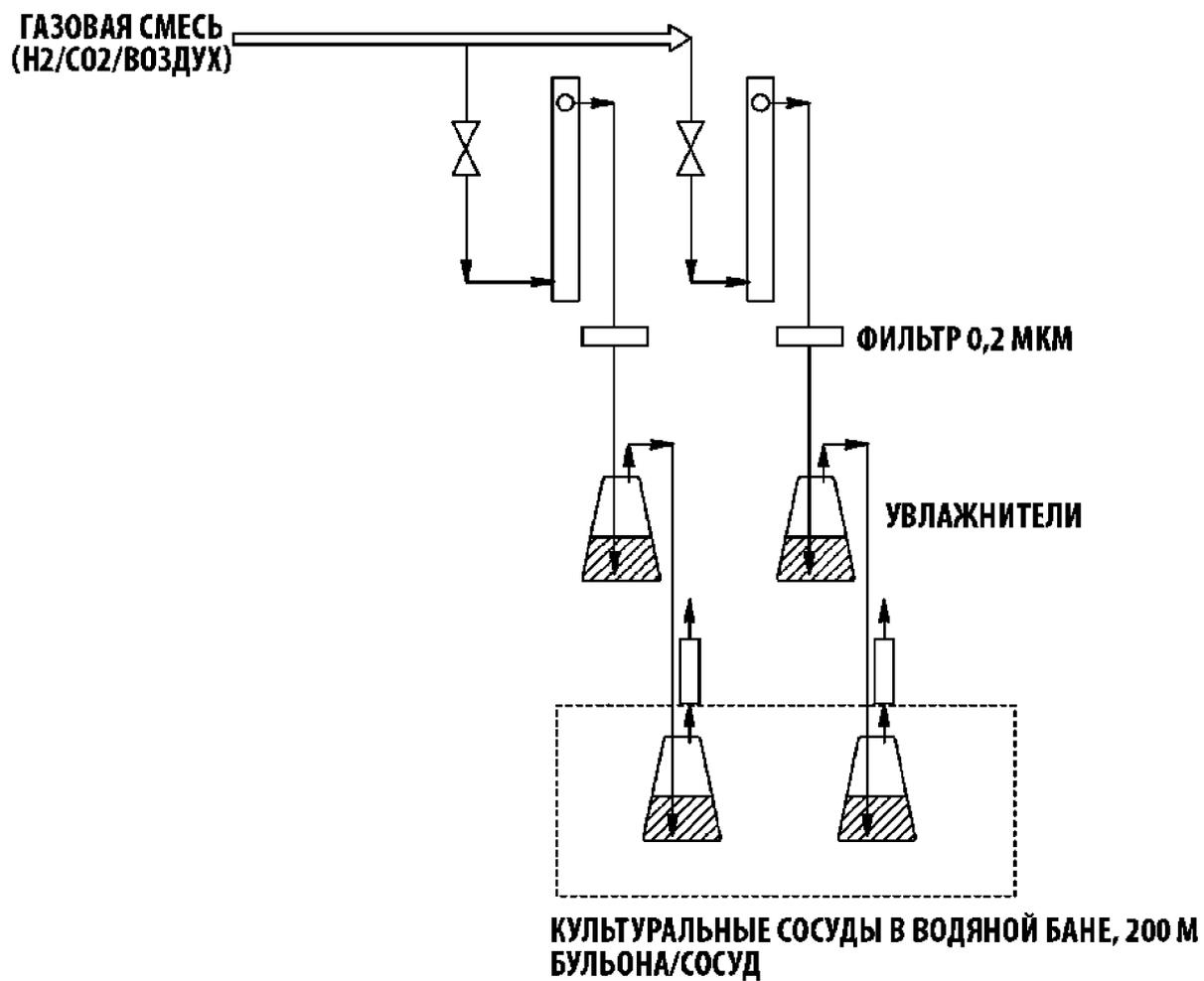
Фиг. 9



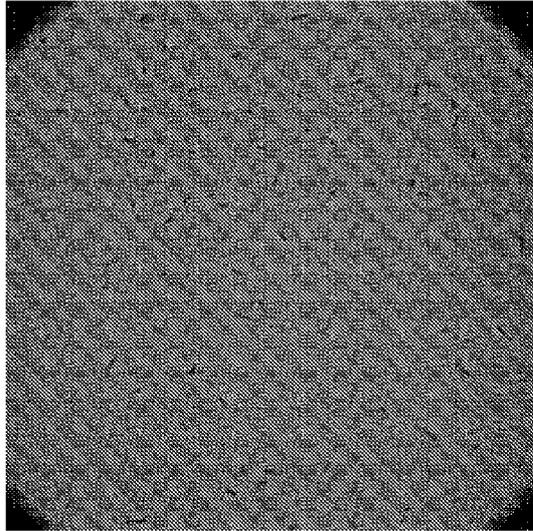
Фиг. 10



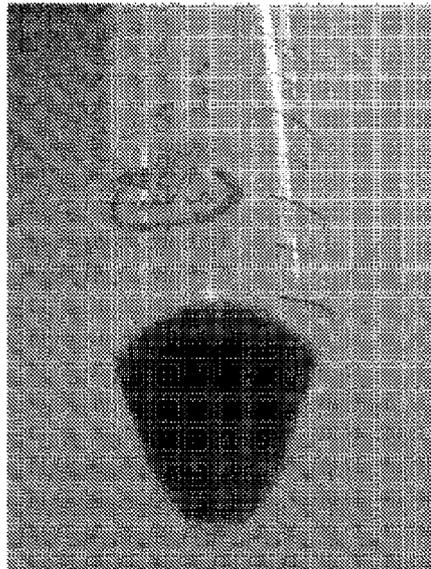
Фиг. 11



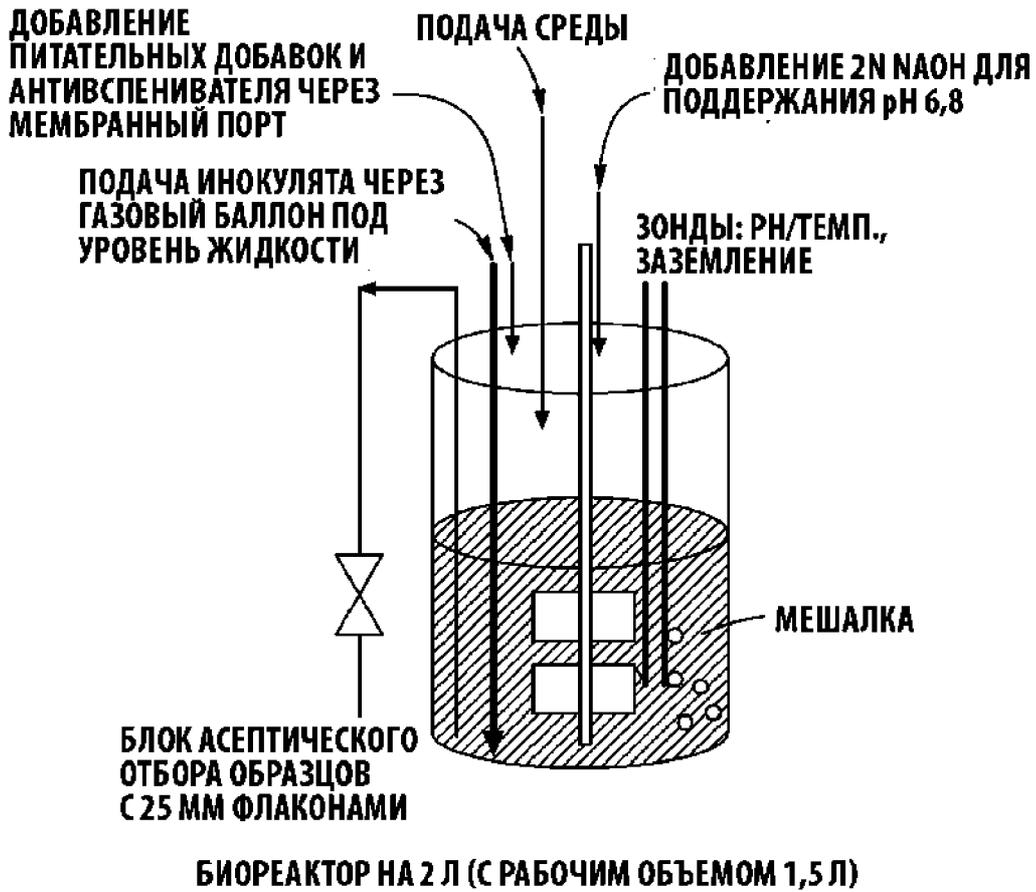
Фиг. 12



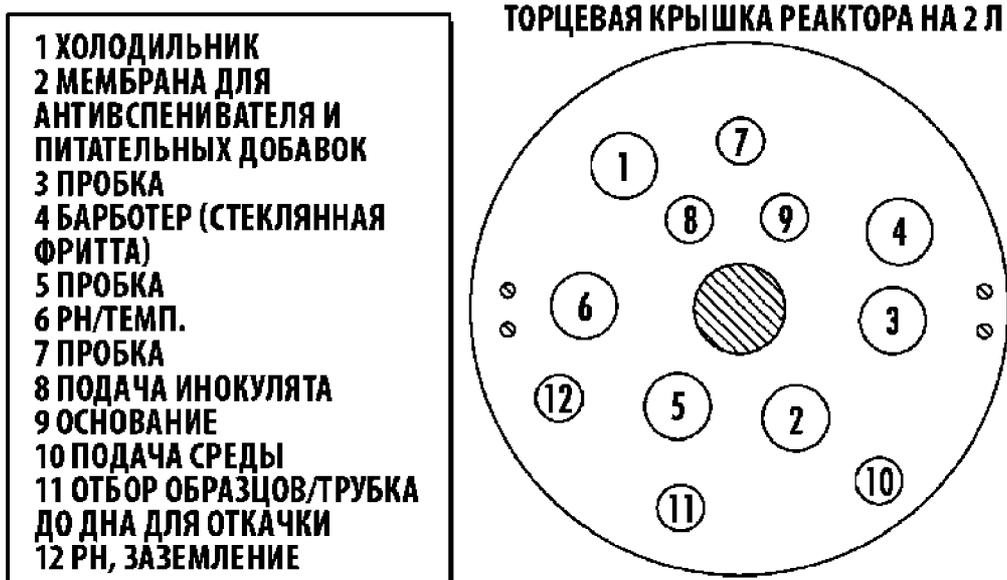
Фиг. 13



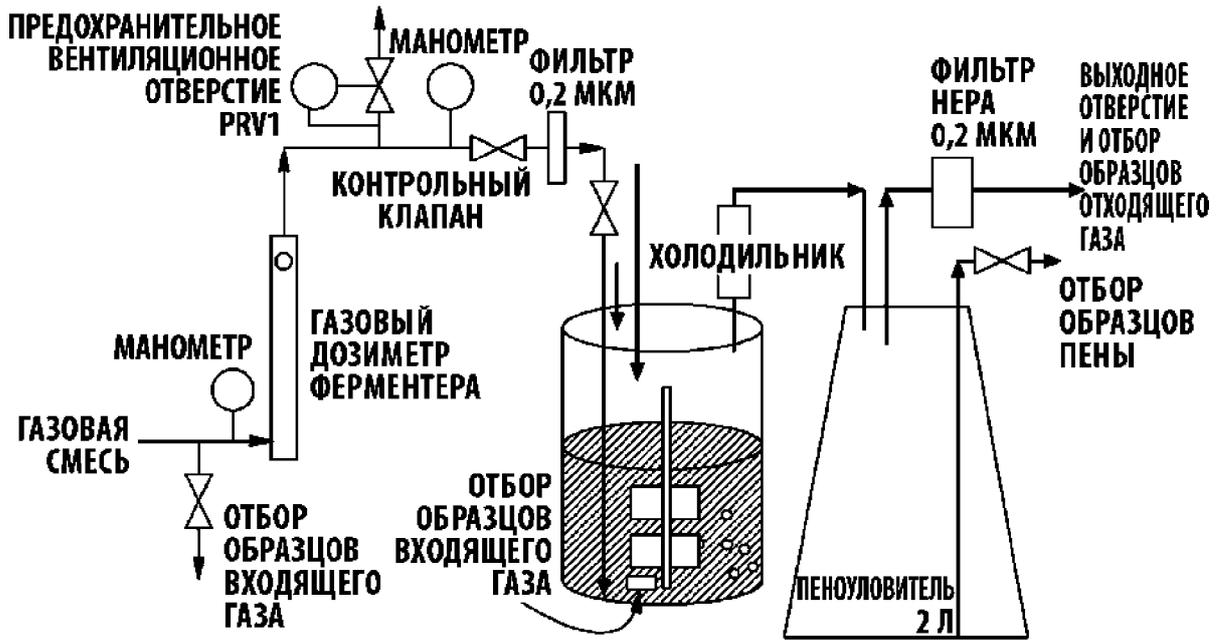
Фиг. 14



Фиг. 15

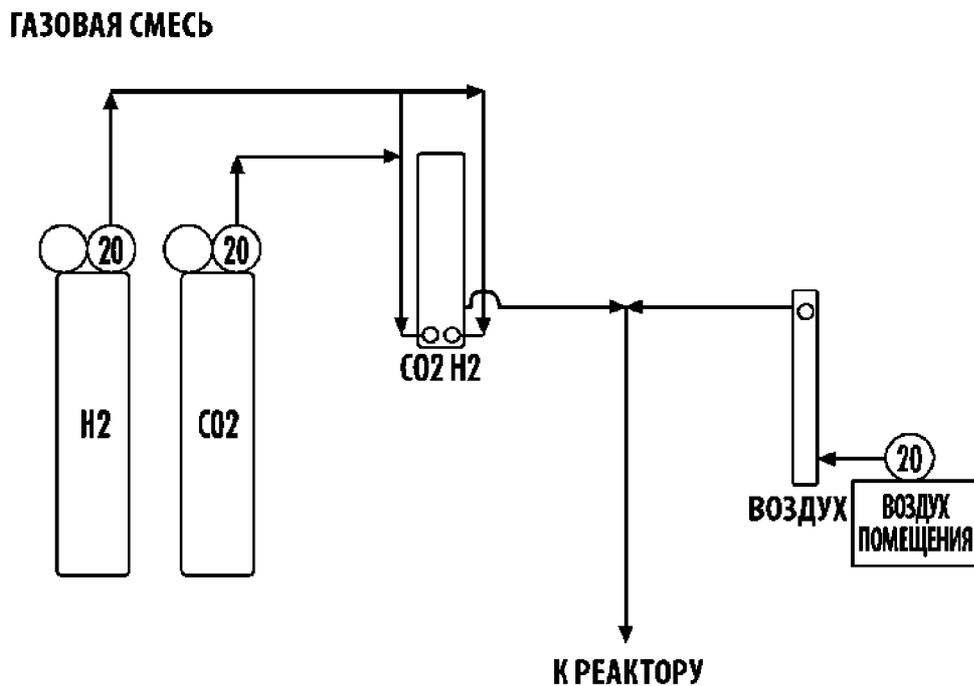


Фиг. 16

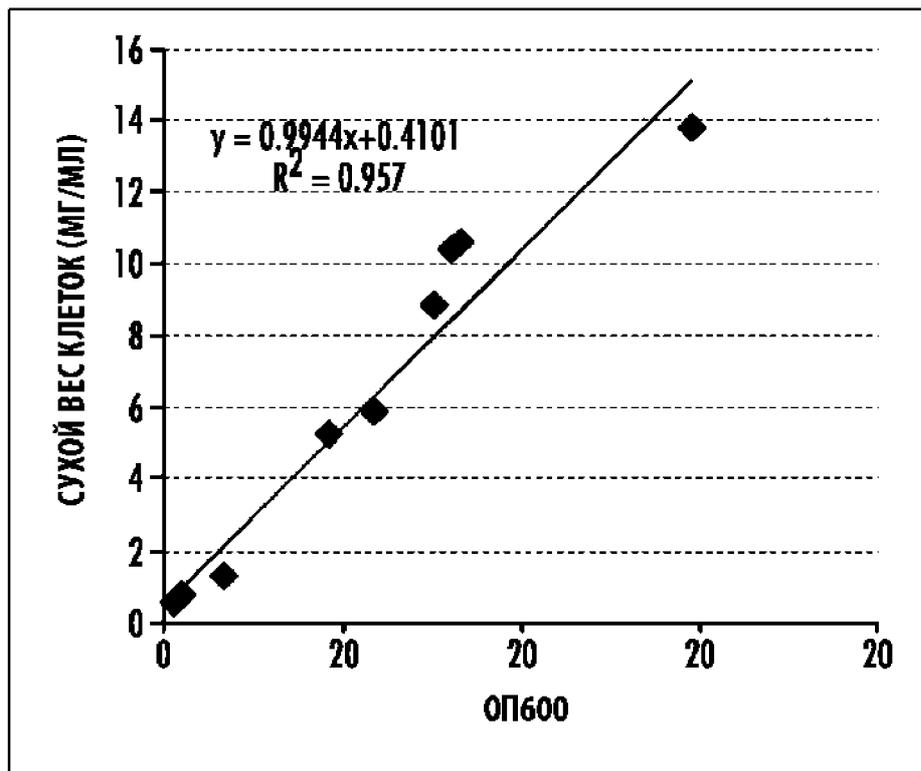


КОНФИГУРАЦИЯ РЕАКТОРА НА 2 Л, ГАЗОПРОВОДЫ

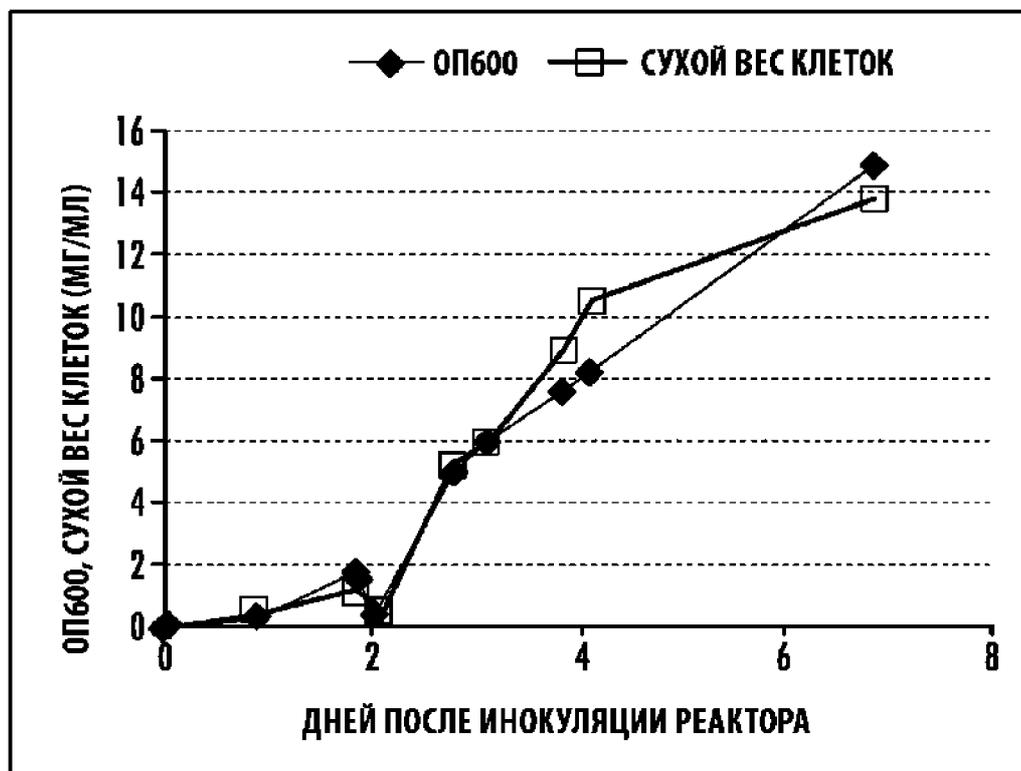
Фиг. 17



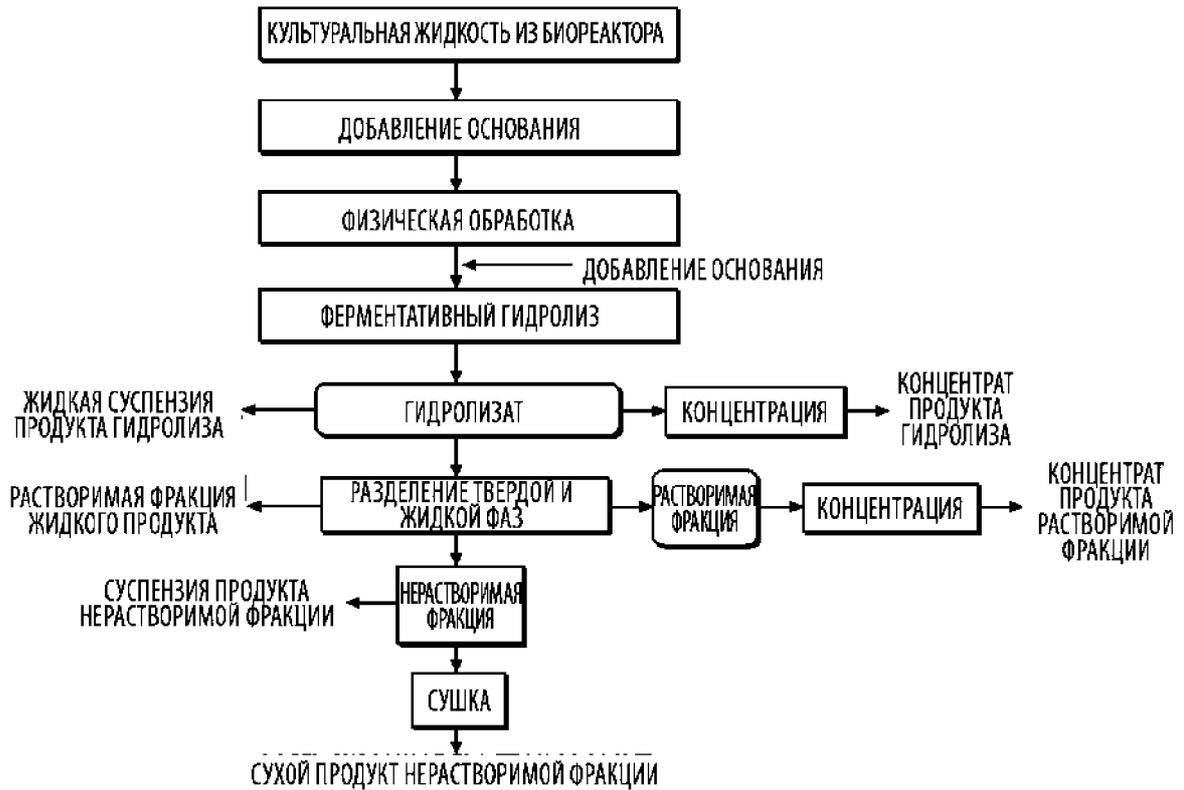
Фиг. 18



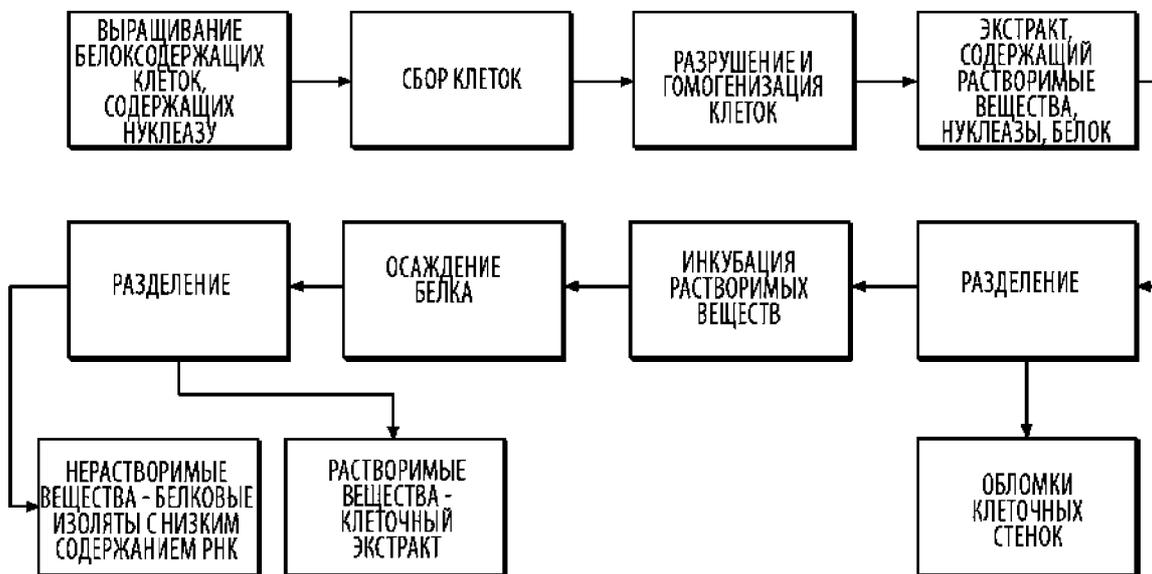
Фиг. 19



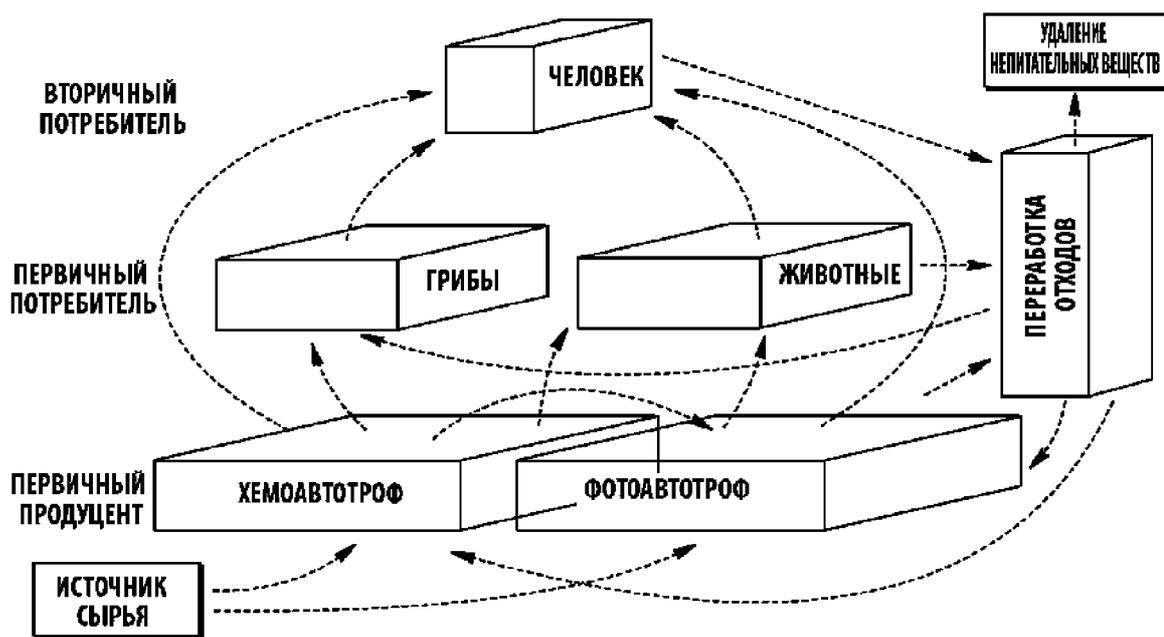
Фиг. 20



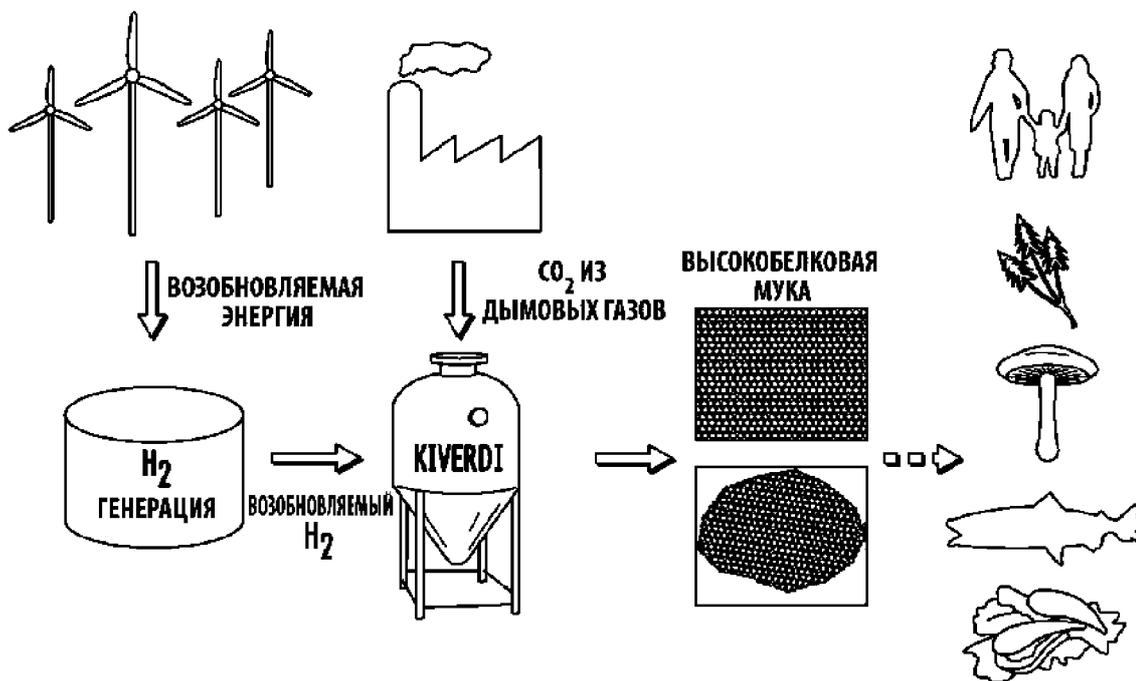
Фиг. 21



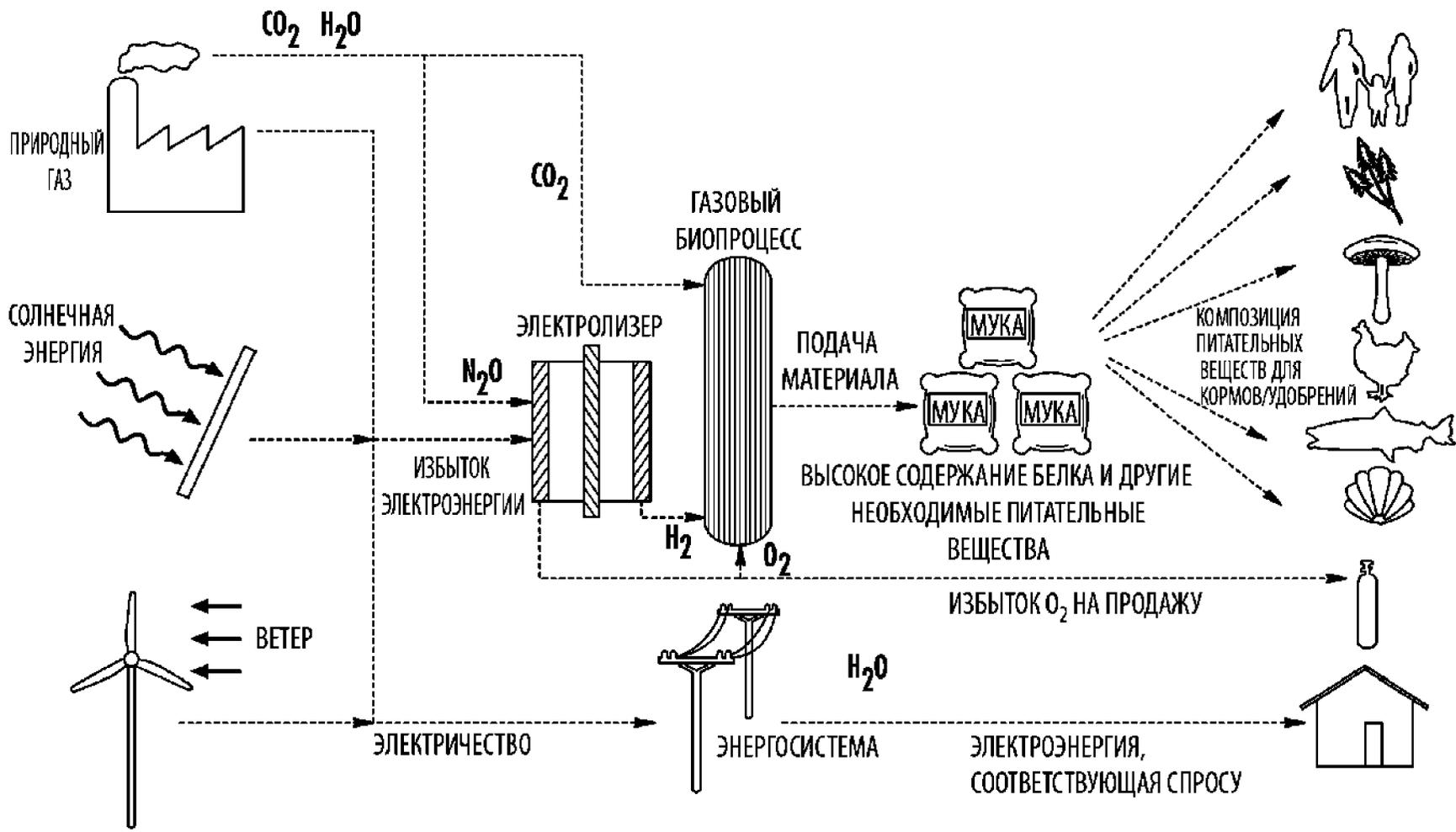
Фиг. 22



Фиг. 23



Фиг. 24



Фиг. 25