

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039754**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.03.10

(21) Номер заявки
201992811

(22) Дата подачи заявки
2018.06.13

(51) Int. Cl. **C12P 7/04** (2006.01)
C12P 7/06 (2006.01)
C12P 7/16 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ УЛУЧШЕНИЯ ПРОЦЕССОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕВРАЩЕНИЯ И ИЗВЛЕЧЕНИЯ ПРОДУКТА

(31) **62/518,895**

(32) **2017.06.13**

(33) **US**

(43) **2020.03.31**

(86) **PCT/US2018/037283**

(87) **WO 2018/231948 2018.12.20**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЛАНЦАТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Модсли Майкл Джеймс Генри,
Мартин Майкл Эмерсон, Смарт
Кэтлин Фрэнсис, Бренк Рейчел Джейн
(US)**

(74) Представитель:
Хмара М.В. (RU)

(56) **US-B2-8574879**

DIENDER, MARTIJN et al., "Production of medium-chain fatty acids and higher alcohols by a synthetic co-culture grown on carbon monoxide or syngas", Biotechnology for Biofuels, 2016, vol. 9, pages 1-11 See page 7.

US-A1-20070144886

WO-A1-2007117157

LIEW, FUNGMIN et al., "Metabolic engineering of Clostridium autoethanogenum for selective alcohol production", Metabolic Engineering, 2017 March, vol. 40, pages 104-114 See abstract; and pages 105, 112.

ABUBACKAR, HARIS NALAKATH et al., "Carbon monoxide fermentation to ethanol by Clostridium autoethanogenum in a bioreactor with no accumulation of acetic acid", 2015, vol. 186, pages 122-127 See abstract; and pages 122, 126.

US-B2-8026290

(57) В изобретении предложен способ снижения уровня биокаталитического окисления продукта в потоке, полученном после продуцирования. Более конкретно, настоящее изобретение обеспечивает способ снижения уровня биокаталитического окисления спирта в потоке продукта, содержащем спиртовой продукт, растворенный диоксид углерода и по меньшей мере один фермент, способный окислять спирт. Настоящее изобретение находит применение в процессах ферментации, в которых C1-фиксирующий микроорганизм использует C1-содержащий субстрат для продуцирования продукта ферментации.

B1

039754

039754

B1

Уровень техники

На диоксид углерода (CO_2) приходится примерно 76% глобальных выбросов парниковых газов, выделяющихся в результате деятельности человека, при этом остаток составляют метан (16%), закись азота (6%) и фторированные газы (2%) (Управление по охране окружающей среды США). Большая часть CO_2 образуется в процессе сжигания ископаемого топлива для производства энергии, хотя CO_2 выделяется в атмосферу также в результате промышленной и лесохозяйственной деятельности. Сокращение выбросов парниковых газов, в частности CO_2 , имеет решающее значение для прекращения распространения глобального потепления и сопутствующих изменений климата и погоды.

Уже давно обнаружено, что каталитические процессы, такие как процесс Фишера-Тропша, можно использовать для превращения газов, содержащих диоксид углерода (CO_2), монооксид углерода (CO) и/или водород (H_2), таких как промышленный отработавший газ или синтез-газ, в разнообразные топлива и химические вещества. Однако в последнее время ферментация газа стала альтернативной платформой для биологической фиксации углерода в таких газах. В частности, было продемонстрировано, что C1-фиксирующие микроорганизмы превращают газы, содержащие CO_2 , CO и/или H_2 , в такие продукты, как этанол и 2,3-бутандиол.

Экологические проблемы, связанные с выбросами парниковых газов (GHG) при сжигании ископаемого топлива, привели к повышенному вниманию к возобновляемым источникам энергии. В результате во всем мире этанол быстро становится основным жидким транспортным топливом, богатым водородом. В обозримом будущем ожидается непрерывный рост мирового рынка топливной промышленности на основе этанола, основанный на повышенном внимании к производству этанола в Европе, Японии и Соединенных Штатах, а также в нескольких развивающихся странах. Например, в Соединенных Штатах этанол используют для производства E10, 10% смеси этанола в бензине. В смесях E10 этанольный компонент действует как оксигенат, улучшающий эффективность сгорания и уменьшающий образование загрязнителей воздуха. В Бразилии этанол удовлетворяет приблизительно 30% от потребности в транспортном топливе как в качестве оксигената, смешанного с бензином, так и в качестве чистого топлива самого по себе. Кроме того, Европейский союз (ЕС) установил для каждой из своих стран-участниц целевые показатели по потреблению экологически безопасных транспортных топлив, таких как этанол, полученный из биомассы.

подавляющее большинство топливного этанола получают с помощью традиционных способов ферментации на основе дрожжей, в которых в качестве основного источника углерода используют углеводы растительного происхождения, такие как сахароза, извлеченная из сахарного тростника, или крахмал, извлеченный из зерновых культур. Однако на стоимость таких сырьевых углеводных материалов влияет их цена на бирже для конкурирующих способов применения, а именно в качестве источников пищи как для людей, так и животных. Кроме того, разведение сельскохозяйственных культур, продуцирующих крахмал или сахарозу, для производства этанола не является экономически рациональным во всех географических регионах, поскольку оно зависит как от стоимости местной земли, так и от климата. Поэтому особый интерес представляет разработка технологий для превращения более дешевых и/или более многочисленных углеродных ресурсов в топливный этанол. В этом отношении монооксид углерода (CO) является важнейшим, богатым энергией побочным продуктом неполного сгорания органических материалов, таких как уголь, нефть и нефтепродукты. Богатые CO отработавшие газы образуются в результате различных промышленных процессов. Например, сталелитейная промышленность в Австралии, как сообщается, ежегодно производит и выбрасывает в атмосферу более 500000 метрических тонн CO.

В последнее время основанные на применении микроорганизмов (бактерий) альтернативные способы получения этанола из CO в промышленном масштабе стали предметом коммерческого интереса и инвестиций. Способность культур микроорганизмов расти, когда CO является единственным источником углерода, была впервые обнаружена в 1903 году. Позднее было установлено, что такое свойство заключается в использовании организмом ацетил-коэнзим А (ацетил-CoA) биохимического пути автотрофного роста (также известного как путь Вуда-Лjungдала и путь монооксид углерод-дегидрогеназы/ацетил-CoA-синтазы (CODH/ACS)). С тех пор было показано, что большое количество анаэробных организмов, в том числе карбоксидотрофных, фотосинтетических, метаногенных и ацетогенных организмов, метаболизируют CO. Известно, что анаэробные бактерии, такие как бактерии из рода *Clostridium*, продуцируют этанол из CO, CO_2 и H_2 посредством ацетил-CoA биохимического пути. Например, различные штаммы *Clostridium ljungdahlii*, продуцирующие этанол из газов, описаны в WO 00/68407; EP 1117309 A1; US 5173429; US 5593886; US 6368819; WO 98/00558; и WO 02/08438. Также известно, что бактерия *Clostridium autoethanogenum* sp продуцирует этанол из газов (Abrini et al., Archives of Microbiology 161: 345-351 (1994)).

Вследствие ферментативной специфичности организма селективность по отношению к определенному продукту может быть очень высокой (100%), что позволяет путям микробного синтеза обеспечить более высокие выходы, чем катализ Фишера-Тропша (FT). Другие преимущества по сравнению с катализом FT включают работу при температуре, близкой к температуре окружающей среды, и при давлении, близком к атмосферному давлению; а также возможность использовать изменяющиеся соотношения CO, H_2 и CO_2 . Кроме того, уменьшаются опасения по поводу отравления катализаторов из-за примесей в ре-

акционной среде. Несмотря на указанные очевидные преимущества, связанные с микробным синтезом этанола из CO , такие процессы все же должны конкурировать с другими технологиями с точки зрения обеспечения конкурентоспособности скорости продуцирования. При применении CO в качестве источника углерода и энергии описанные выше анаэробные бактерии продуцируют этанол путем ферментации, но они также образуют по меньшей мере один другой метаболит, например CO_2 , метан, n -бутанол и/или уксусную кислоту. Образование любого из таких метаболитов имеет возможность существенно влиять на продуктивность и общую экономическую жизнеспособность данного процесса, поскольку доступный углерод поглощается метаболитом(ами) и эффективность продуцирования требуемого конечного продукта снижается. Кроме того, если метаболит (например, уксусная кислота) сам по себе не имеет ценности в это время и в этом месте, где проводят процесс микробной ферментации, он может представлять собой проблему с точки зрения утилизации отходов. Различные предложения по решению проблемы образования продуктов, отличных от требуемого конечного продукта, при анаэробной ферментации CO -содержащих газов, применяемой для получения этанола, обсуждаются в WO 2007/117157, WO 2008/115080 и WO 2009/022925.

Скорость продуцирования этанола, которая представляет собой ключевой фактор, определяющий, является ли данный процесс ферментации экономически перспективным, сильно зависит от управления соответствующими условиями, применяемыми для бактериального роста. Например, из WO 2010/093262 известно, что CO -содержащий субстрат необходимо подавать в микробную культуру со скоростью, приводящей к оптимальному микробному росту и/или образованию требуемого метаболита. При применении недостаточного количества субстрата микробный рост замедляется и выходы продуктов ферментации смещаются в сторону уксусной кислоты в ущерб этанолу. При применении чрезмерного количества субстрата может происходить слабый микробный рост и/или гибель клеток. Дополнительную информацию относительно взаимосвязи между рабочими параметрами в таких процессах можно найти в WO 2011/002318.

В области техники, связанной с биологическими способами производства этанола из CO , и, в частности, из CO -содержащих потоков отходов, таких как газообразные выбросы, выделяющиеся в промышленных процессах, идет постоянный поиск решений, которые позволят улучшить экономику процесса и, следовательно, конкурентоспособность отрасли. Одна из представляющих интерес областей связана с сохранением выхода требуемого продукта в ферментативном бульоне на выходе из биореактора до стадии извлечения продукта. Многие C1 -фиксирующие микроорганизмы, способные продуцировать этанол, также способны при определенных условиях окислять этанол с образованием других продуктов. Условия, обеспечивающие окисление этанола, можно обнаружить на предприятиях по производству этанола. Микробное окисление этанола до извлечения этанольного продукта приводит к потере требуемого этанольного продукта.

Краткое описание изобретения

Аспекты настоящего изобретения относятся к улучшению способов биологического превращения и извлечения продукта.

Согласно одному из аспектов в настоящем изобретении предложен способ снижения уровня биокаталитического окисления этанола в потоке продукта. Согласно одному из вариантов реализации поток продукта содержит спирт, растворенный диоксид углерода (CO_2) и по меньшей мере один фермент, способный окислять спирт. Согласно некоторым вариантам реализации поток продукта вытекает из биореактора в зону извлечения предварительного продукта и подвергается обработке для уменьшения степени превращения спирта в его соответствующую карбоновую кислоту.

Согласно одному из вариантов реализации поток продукта содержит (i) этанол, (ii) растворенный диоксид углерода и (iii) микробную культуру, содержащую по меньшей мере один микроорганизм, способный окислять этанол. Согласно одному из вариантов реализации микроорганизм представляет собой C1 -фиксирующий микроорганизм, содержащий один или более ферментов, способных превращать этанол в ацетат.

Согласно одному из вариантов реализации обработка потока продукта (т.е. стадия обработки) включает барботирование потока продукта инертным газом. Инертный газ, барботируемый в поток продукта, вытесняет из потока продукта по меньшей мере часть растворенного CO_2 . Согласно некоторым вариантам реализации инертный газ вытесняет из потока продукта по существу весь растворенный CO_2 . Примеры подходящих инертных газов включают, но не ограничиваются ими, азот и метан. Согласно предпочтительным вариантам реализации инертный газ представляет собой азот. Согласно альтернативным вариантам реализации водород используют для вытеснения растворенного CO_2 из потока продукта.

Согласно одному из вариантов реализации стадия обработки включает повышение температуры потока продукта. Согласно некоторым вариантам реализации температуру потока продукта увеличивают до температуры, при которой инактивируется фермент, способный окислять этанол. Согласно одному из вариантов реализации температуру потока продукта увеличивают до по меньшей мере 50°C , или по меньшей мере 60°C , или по меньшей мере 70°C , или по меньшей мере 75°C , или по меньшей мере 78°C . Согласно одному из вариантов реализации температуру потока продукта поддерживают на уровне выше определенной температуры в течение по меньшей мере 10 с, или по меньшей мере 20 с, или по меньшей

мере 30 с, или по меньшей мере 1 мин, или по меньшей мере 2 мин, или по меньшей мере 3 мин, или по меньшей мере 5 мин, или по меньшей мере 10 мин. Температуру потока продукта предпочтительно поддерживают на уровне выше определенной температуры в течение от 10 до 30 с, или от 10 с до одной минуты, или от 10 с до двух минут. Согласно одному из вариантов реализации температуру потока продукта увеличивают до по меньшей мере 60°C и поддерживают при такой температуре в течение по меньшей мере 1 мин. Согласно одному из вариантов реализации температуру потока продукта увеличивают до по меньшей мере 75°C и поддерживают при такой температуре в течение по меньшей мере 5 мин.

Согласно одному из вариантов реализации стадия обработки включает декомпрессию потока продукта. Согласно одному или более варианту реализации биореактор работает под давлением, что, тем самым, приводит к появлению потока продукта под давлением. Согласно одному или более варианту реализации при работе биореактора под давлением поток продукта обрабатывают путем декомпрессии. Согласно одному или более варианту реализации декомпрессия потока продукта происходит в отдельном сосуде. Согласно одному из вариантов реализации декомпрессия происходит при атмосферном давлении в накопительном резервуаре. Согласно некоторым вариантам реализации декомпрессия обеспечивает мгновенное испарение растворенного CO₂ из потока продукта, что приводит к вытеснению растворенного CO₂ из потока продукта. Согласно одному из вариантов реализации перед декомпрессией давление потока продукта составляет по меньшей мере 0,25 бар изб., или по меньшей мере 0,5 бар изб., или по меньшей мере 1,0 бар изб., или по меньшей мере 1,5 бар изб., или по меньшей мере 2,0 бар изб., или по меньшей мере 2,5 бар изб., или по меньшей мере 3,0 бар изб. Согласно одному из вариантов реализации перед декомпрессией давление потока продукта поддерживают выше атмосферного давления в течение по меньшей мере 1 с, или по меньшей мере 10 с, или по меньшей мере 15 с, или по меньшей мере 20 с, или по меньшей мере 25 с, или по меньшей мере 30 с. Перед декомпрессией давление потока продукта предпочтительно поддерживают на уровне выше атмосферного давления в течение от 1 до 30 с, или от 1 до 15 с, или от 15 до 30 с. Согласно одному из вариантов реализации перед декомпрессией давление потока продукта составляет по меньшей мере 2,0 бар изб., при этом указанный поток поддерживают при таком давлении в течение по меньшей мере 1 секунды. Согласно одному из вариантов реализации перед декомпрессией давление потока продукта составляет по меньшей мере 0,25 бар изб., при этом указанный поток поддерживают при таком давлении в течение по меньшей мере 30 с.

Согласно одному из вариантов реализации биомасса содержит по меньшей мере один C1-фиксирующий микроорганизм. Согласно одному из вариантов реализации C1-фиксирующий микроорганизм содержит по меньшей мере один фермент, выбранный из группы, состоящей из алкогольдегидрогеназы, альдегиддегидрогеназы, ацетаткиназы и фосфотрансацетилазы.

Согласно одному из вариантов реализации биомасса содержит по меньшей мере один микроорганизм, не фиксирующий C1. Согласно одному из вариантов реализации микроорганизм, не фиксирующий C1, содержит по меньшей мере один фермент, выбранный из группы, состоящей из алкогольдегидрогеназы, альдегиддегидрогеназы, ацетаткиназы и фосфотрансацетилазы. Согласно одному или более варианту реализации микроорганизм, не фиксирующий C1, представляет собой *Acetobacter*.

Согласно одному из вариантов реализации настоящее изобретение включает подачу C1-содержащего субстрата в биореакторную систему, включающую по меньшей мере первый биореактор, содержащий культуральную среду и C1-фиксирующую бактерию, для метаболизирования источника углерода в C1-содержащем субстрате и продуцирования по меньшей мере одного продукта ферментации; отведение из биореакторной системы вытекающего потока, содержащего бактерию, барботирование вытекающего потока азотом для вытеснения в вытекающем потоке компонента CO₂ и направление потока, обедненного CO₂, в зону извлечения продукта для извлечения по меньшей мере одного продукта ферментации.

Согласно альтернативному варианту реализации настоящее изобретение включает подачу C1-содержащего субстрата в биореакторную систему, включающую по меньшей мере первый биореактор, содержащий культуральную среду и бактерию, для метаболизирования источника углерода в субстрате и продуцирования по меньшей мере одного продукта ферментации; отведение из биореакторной системы вытекающего потока, содержащего бактерию, нагревание вытекающего потока для денатурации одного или более ферментов, содержащихся в вытекающем потоке, и получения обработанного потока, и направление обработанного потока в зону извлечения продукта для извлечения по меньшей мере одного продукта ферментации.

Согласно альтернативному варианту реализации настоящее изобретение включает подачу C1-содержащего субстрата в биореактор под давлением, включающий по меньшей мере первый биореактор, содержащий культуральную среду и бактерию, для метаболизирования источника углерода в субстрате и продуцирования по меньшей мере одного продукта ферментации; отведение из биореакторной системы под давлением вытекающего потока, содержащего бактерию, декомпрессию вытекающего потока для вытеснения компонента CO₂ в вытекающем потоке путем мгновенного испарения и направление потока, обедненного CO₂, в зону извлечения продукта для извлечения по меньшей мере одного продукта ферментации.

Согласно одному из вариантов реализации C1-фиксирующую бактерию выбирают из группы, со-

стоящей из *Clostridium*, *Moorella* и *Acetobacterium*. Согласно одному из вариантов реализации C1-фиксирующую бактерию выбирают из группы, состоящей из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei*.

Согласно одному из вариантов реализации зона извлечения предварительного продукта включает один или более сосудов и/или трубопроводов, расположенных после зоны продуцирования и перед зоной извлечения продукта. Согласно одному из вариантов реализации зона продуцирования представляет собой биореактор, а зона извлечения продукта представляет собой зону перегонки. Согласно одному из вариантов реализации зона извлечения предварительного продукта представляет собой сосуд для хранения. Согласно одному из вариантов реализации сосуд для хранения представляет собой накопительный резервуар. Зона извлечения предварительного продукта дополнительно содержит один или более трубопроводов для жидкости, предназначенных для подачи вытекающего потока из биореактора в накопительный резервуар и из накопительного резервуара в модуль извлечения продукта. Согласно одному из вариантов реализации вытекающий поток направляют из биореактора через трубопроводы непосредственно в зону извлечения продукта. Согласно некоторым вариантам реализации первую часть вытекающего потока подают непосредственно в зону извлечения продукта, а вторую часть вытекающего потока направляют в накопительный резервуар.

Согласно второму аспекту в настоящем изобретении предложен способ снижения уровня биокаталитического окисления этанола в потоке продукта, при этом указанный поток продукта содержит этанол, CO_2 и по меньшей мере один фермент, способный окислять этанол, при этом указанный способ включает (i) протекание потока продукта из биореактора в зону извлечения предварительного продукта; и (ii) обработку потока продукта для уменьшения степени превращения этанола в ацетат. Согласно одному из вариантов реализации поток продукта получают в бесклеточной системе.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 изображена типичная биореакторная система, в которой используют два биореактора.

На фиг. 2 изображена типичная система, содержащая зону хранения, в которую поступают поток пермеата и вытекающий поток из биореакторной системы, показанной на фиг. 1, и которая направляет указанные потоки в модуль извлечения продукта.

На фиг. 3а, фиг. 3b, фиг. 3с и фиг. 3d изображены различные компоновки накопительного резервуара согласно различным вариантам реализации для вытеснения CO_2 из вытекающего потока.

Фиг. 4 - концентрации метаболитов в зависимости от времени, когда клетки, в трех параллельных испытаниях, отбирают из биореактора и помещают в свободное пространство CO_2

Фиг. 5 - концентрации метаболитов в зависимости от времени, когда клетки, в трех параллельных испытаниях, отбирают из биореактора и помещают в свободное пространство N_2 .

На фиг. 6 показано изменение титров ацетата и этанола в зависимости от времени, коррелирующее с увеличением содержания ацетата/потерей этанола и влияние термической обработки на потерю этанола.

Подробное описание изобретения

В производственных операциях промышленного масштаба поток продукта перед отправкой в зону извлечения продукта обычно направляют в хранилище. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что при задержке обработки потока продукта могут протекать нежелательные реакции, которые могут привести к превращению требуемого конечного продукта в нежелательный продукт. Путем предотвращения таких реакций можно сохранить выход требуемого продукта.

Авторы настоящего изобретения разработали способы существенного уменьшения или предотвращения нежелательных реакций в потоке, полученном после продуцирования, которые могут привести к превращению требуемого конечного продукта в нежелательный продукт. Настоящее изобретение можно применять к технологиям ферментации, в частности, к процессам ферментации газа, в которых используют ацетогенные бактерии. Кроме того, настоящее изобретение можно применять к способам бесклеточной технологии для предотвращения обратных реакций одного или более ферментов в процессе бесклеточного продуцирования.

Хотя последующее описание относится к способам ферментации этанола, считается, что такие принципы в равной степени применимы к другим процессам ферментации и очистки первичных спиртов. Кроме того, хотя приведенные варианты реализации относятся к способам ферментации газа, считается, что настоящее изобретение будет применимо к любому процессу ферментации, в котором образуется ферментативный бульон, содержащий продукт(ы) ферментации и один или более ферментов, способных окислять продукт(ы) ферментации. Согласно одному из вариантов реализации продукт ферментации представляет собой первичный спирт и один или более ферментов представляет собой фермент, способный превращать первичный спирт в его соответствующую карбоновую кислоту. Типичные первичные спирты включают, но не ограничиваются ими, бутанол, 1-пропанол и 1-октанол. Кроме того, хотя настоящее изобретение применимо к продуктам ферментации, продуцируемым производственным штаммом, настоящее изобретение также относится к продуктам, выделяемым любым загрязняющим микроорганизмом, который может присутствовать в биореакторе.

Термин "поток пермеата" представляет собой поток жидкости, отводимый из биореактора, который

был обработан для удаления компонента биомассы. Как правило, биомассу удаляют посредством фильтрации и возвращают в биореактор.

Термин "вытекающий поток" относится к потоку жидкости, отводимому из биореактора. Как правило, вытекающий поток является неотфильтрованным и содержит биомассу, жидкие продукты и растворенные и увлеченные газы.

Термин "поток продукта" относится к потоку жидкости, содержащему по меньшей мере один продукт, например, этанол. Поток продукта предпочтительно представляет собой поток, вышедший из процесса продуцирования. Например, поток продукта может представлять собой поток жидкости, выходящий из биореактора, до того, как он поступит в средство извлечения продукта. Поток продукта может представлять собой поток пермеата или вытекающий поток. Поток продукта может представлять собой объединенный вытекающий поток и поток пермеата.

Термин "биокаталитическое окисление" относится к процессу, посредством которого первичный спирт (то есть этанол) окисляется до его соответствующей кислоты (то есть ацетата) вследствие присутствия одного или более ферментов, способных к такой реакции. Один или более ферментов могут быть обеспечены в бесклеточной системе или могут содержаться в бактериальной культуре.

Термин "зона извлечения предварительного продукта" относится к зоне, расположенной после биореактора и перед модулем извлечения продукта. В зону извлечения предварительного продукта поступает по меньшей мере один поток, выбранный из вытекающего потока и/или потока пермеата, который выходит из биореактора через по меньшей мере одно выходное отверстие, при этом указанная зона извлечения предварительного продукта подает указанный поток продукта в средство извлечения продукта, такое как средство перегонки. Средство извлечения предварительного продукта включает по меньшей мере один трубопровод для прохождения потока продукта из биореакторной системы в модуль извлечения продукта и может дополнительно содержать сосуд для хранения, такой как накопительный резервуар, который функционирует для хранения части потока продукта перед направлением его в модуль извлечения продукта.

Термин "растворенный CO_2 " относится к CO_2 , присутствующему в потоке жидкости в форме растворенного газа. Растворенный CO_2 может содержаться в нескольких потоках жидкости, в том числе, но не ограничиваясь ими, в ферментативном бульоне, жидкой питательной среде, вытекающем потоке, потоке пермеата или потоке продукта.

Термин "увлеченный CO_2 " относится к улавливанию пузырьков газообразного CO_2 в потоке жидкости. Увлеченный CO_2 может содержаться в нескольких потоках жидкости, в том числе, но не ограничиваясь ими, в ферментативном бульоне, жидкой питательной среде, вытекающем потоке, потоке пермеата или потоке продукта.

Как правило, ферментацию проводят в биореакторе. Термин "биореактор" включает устройство для культивирования/ферментации, состоящее из одного или более сосудов, колонн или разводов трубопроводов, такое как реактор непрерывного действия с перемешиванием (CSTR), реактор с иммобилизованными клетками (ICR), реактор с орошаемым слоем (TBR), барботажная колонна, газлифтный ферментер, статический смеситель или другой сосуд или другое устройство, подходящее для контакта газ-жидкость. Согласно некоторым вариантам реализации биореактор может содержать первый реактор для выращивания и второй реактор для культивирования/ферментации. Один или оба из таких реакторов могут быть обеспечены субстратом. В настоящем документе термины "культивирование" и "ферментация" используют взаимозаменяемо. Указанные термины включают как фазу роста, так и фазу биосинтеза продукта в процессе культивирования/ферментации.

Культивирование обычно поддерживают в водной культуральной среде, содержащей питательные вещества, витамины и/или минералы, достаточные для обеспечения роста микроорганизма. Водная культуральная среда предпочтительно представляет собой среду для анаэробного микробного роста, такую как минимальная среда для анаэробного микробного роста. Подходящие среды хорошо известны в данной области.

Для получения целевого продукта культивирование/ферментацию желательно проводить в соответствующих условиях. Как правило, культивирование/ферментацию проводят в анаэробных условиях. Условия реакции, которые следует учитывать, включают давление (или парциальное давление), температуру, скорость потока газа, скорость потока жидкости, pH среды, окислительно-восстановительный потенциал среды, скорость перемешивания (при применении реактора непрерывного действия с перемешиванием), уровень инокулята, максимальные концентрации газового субстрата, которые гарантирует, что газ в жидкой фазе не станет ограничивающим фактором, и максимальные концентрации продукта для избежания ингибирования продукта. В частности, можно контролировать скорость введения субстрата для обеспечения того, что концентрация газа в жидкой фазе не станет ограничивающим фактором, поскольку в условиях ограниченного количества газа продукты могут потребляться культурой.

Работа биореактора при повышенных давлениях позволяет увеличить скорость переноса газ-жидкость. Соответственно, в общем случае предпочтительно осуществлять культивирование/ферментацию при давлениях выше атмосферного давления. Кроме того, поскольку заданная скорость превращения газа частично зависит от времени удерживания субстрата, при этом время удержива-

ния диктует необходимый объем биореактора, применение систем под давлением может значительно уменьшить требуемый объем биореактора и, следовательно, капитальные затраты на оборудование для культивирования/ферментация. Это, в свою очередь, означает, что при поддержании биореакторов при повышенном давлении, а не при атмосферном давлении, можно уменьшить время удерживания, определяемое как объем жидкости в биореакторе, деленный на скорость потока нагнетаемого газа. Оптимальные условия реакции будут частично зависеть от конкретного используемого микроорганизма. Однако в общем случае предпочтительно проводить ферментацию при давлении выше атмосферного давления.

Согласно некоторым вариантам реализации ферментацию проводят в отсутствие света или в присутствии некоторого количества света, недостаточного для удовлетворения энергетических потребностей фотосинтетических микроорганизмов. Согласно определенным вариантам реализации микроорганизм, применяемый в настоящем изобретении, представляет собой нефотосинтетический микроорганизм.

Во время нормальной работы биореакторной системы нетто-генерация жидких продуктов требует, чтобы такие продукты удалялись, предпочтительно на постоянной основе, для предотвращения их накопления в каждом биореакторе и, тем самым, поддержания стационарных условий. Если вся отведенная жидкость имеет тот же объемный состав, что и жидкость, находящаяся в биореакторе (включая те же концентрации бактерий и компонентов культуральной среды), то биореактор, хотя и функционирует в стационарном состоянии в отношении концентрации этанола и уксусной кислоты, будет неуклонно становиться обедненным в отношении концентрации бактерий. В таких условиях более высокая продуктивность по этанолу относительно продуктивности (роста) бактерий будет направленно приводить к более быстрой скорости истощения бактерий в данном биореакторе. Для поддержания концентрации бактерий путем обеспечения дополнительной эксплуатационной степени свободы жидкие продукты можно отводить из данного биореактора в виде либо неотфильтрованного потока (то есть вытекающего потока), либо отфильтрованного потока (то есть потока пермеата). Вытекающий поток представляет собой неотфильтрованный поток, имеющий по существу тот же объемный состав, что и ферментативный бульон, находящийся в биореакторе, или по меньшей мере по существу такую же концентрацию бактерий. Отфильтрованный поток представляет собой поток, удаленный из биореактора и направленный в средство фильтрации, где указанный поток подвергают фильтрации с получением ретентата, обогащенного бактериями, который возвращают в биореактор для поддержания в нем концентрации бактерий, и пермеата. Поток пермеата, по существу не содержащий биомассы, не рециркулируют в биореактор. Далее такой пермеат можно направить в последующий биореактор или можно направить в зону извлечения продукта.

Отведение как вытекающего потока, так и потока пермеата обеспечивает значительно улучшенную степень общего технологического контроля, в частности, с точки зрения управления концентрацией бактерий в биореакторе при изменяющихся уровнях продуктивности. При увеличении скорости образования этанола расход потока пермеата относительно расхода вытекающего потока может увеличиться, что позволяет отводить большее количество отфильтрованной реакторной жидкости при большем удержании бактерий. Поскольку этанол присутствует в обоих из таких отводимых потоков, вытекающий поток и поток пермеата, которые в конечном счете отводят из биореакторной системы, например, из биореактора последней ступени (например, из второго биореактора биореакторной системы, содержащей первый и второй биореакторы, работающие последовательно в отношении потока жидкости), как правило, оба подвергают дальнейшей обработке для очистки этанола. Вытекающий поток и поток пермеата направляют в зоны хранения, при этом выходящие потоки из таких резервуаров далее направляют в последующие установки для извлечения.

Целевые продукты можно отделить или очистить от выходящих потоков из резервуаров для хранения, используя любой метод или комбинацию методов, известных в данной области техники, в том числе, например, фракционную перегонку, испарение, диффузионное испарение, отгонку газом, разделение фаз и экстрактивную ферментацию, включая, например, жидкость-жидкостную экстракцию. Согласно некоторым вариантам реализации целевые продукты извлекают из ферментативного бульона путем непрерывного удаления из биореактора части бульона, отделения от бульона микробных клеток (обычно путем фильтрации) и извлечения из бульона одного или более целевых продуктов. Спирты и/или ацетон можно извлечь, например, путем перегонки. Кислоты можно извлечь, например, путем адсорбции на активированном угле. Отделенные микробные клетки предпочтительно возвращают в биореактор. Бесклеточный пермеат, оставшийся после удаления целевых продуктов, также предпочтительно возвращают в биореактор. Для восполнения среды перед ее возвратом в биореактор к бесклеточному пермеату можно добавить дополнительные питательные вещества (например, витамины группы B).

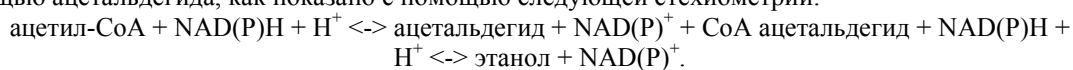
В типичных производственных установках условия, обеспечивающие окисление этанола, можно обнаружить после биореактора и перед средством извлечения продукта (то есть в зоне хранения). В частности, было обнаружено, что на целевой этанольный продукт может оказывать влияние присутствие в вытекающем потоке жизнеспособных бактерий. При наличии в вытекающем потоке CO_2 вместе с жизнеспособными бактериями, способными окислять этанол, этанольный продукт может окисляться бактериями с образованием ацетата. Поскольку вытекающий поток и поток пермеата непрерывно удаляют из биореакторов и направляют в зону хранения перед извлечением продукта, это приводит к потере целевых продуктов (например, этанола) и/или образованию нецелевых продуктов (например, ацетата), кото-

рые могут потребовать отделения и/или обработки. Авторы настоящего изобретения установили способы уменьшения уровня превращения этанола в ацетат, что, тем самым, позволяет сохранить выход этанола.

Реакция окисления этанола

Как правило, в C1-фиксирующем микроорганизме, использующем путь Вуда-Люнгалла, утилизация и образование этанола происходит посредством ацетил-CoA, ацетата и ацетальдегида с помощью NAD(P)⁺-зависимых ацетальдегиддегидрогеназы и этанолдегидрогеназы и альдегид:ферредоксин-оксидоредуктазы (AOR), зависимой от восстановленного ферредоксина (Kopke et al.). Производство этанола стимулируют посредством избытка восстановительных эквивалентов, которые образуются в результате окисления CO и H₂. Микроорганизм уравнивает избыток восстановительных эквивалентов путем образования восстановленных продуктов (например, этанола). Восстановительные эквиваленты включают восстановленный ферредоксин (Fd_{red}), NADPH и NADH.

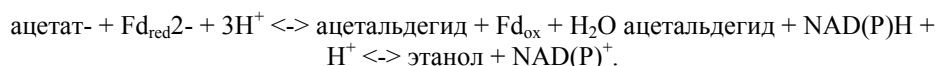
Восстановительные эквиваленты преимущественно образуются в реакции окисления CO под действием монооксид углерод-дегидрогеназы (CODH) (Fd_{red}) или гидрогеназы ((Fd_{red}), NADH, NAD(P)H или их смесей). Восстановительные эквиваленты, образованные в результате реакции окисления CO, могут расходоваться за счет образования этанола. Существует два пути получения этанола. Первый путь основан на NADPH- или NADH-зависимой реакции, в которой ацетил-CoA восстанавливают до этанола с помощью ацетальдегида, как показано с помощью следующей стехиометрии:



Второй путь протекает посредством ацетата. Получение ацетата из ацетил-CoA включает перенос фосфата в сочетании со стадией образования АТФ (АТФ), как показано с помощью следующей стехиометрии:



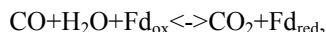
Затем ацетат восстанавливается до ацетальдегида и далее восстанавливается до этанола. Образование ацетальдегида стимулируют с помощью восстановленного ферредоксина, при этом образование этанола из ацетальдегида является NAD(P)H-зависимым, как показано с помощью следующей стехиометрии:



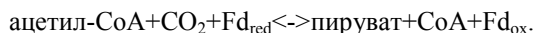
В ситуациях, когда избыток восстановительных эквивалентов отсутствует (т.е. существует недостаток окисления CO, поскольку имеется меньше доступного субстрата), действует меньшая движущая сила, направленная на образование этанола, и микроорганизм может потреблять этанол в качестве субстрата, окисляя его с образованием дополнительного количества ацетил-CoA и ацетата, пополняя, тем самым, NAD, NADP и Fd_{ox}. В потоке жидкости после ферментации, таком как вытекающий поток, когда количество субстрата для ферментации ограничено или указанный субстрат больше не доступен, микроорганизм может использовать этанол и продуцировать ацетат.

Каждая из приведенных реакций работает в обоих направлениях. Несколько факторов определяют направление, в котором протекают реакции, в том числе, но не ограничиваясь ими, кинетика, доступность субстрата, уровни кофактора и pH.

CO₂ представляет собой кофактор как монооксид углерод-дегидрогеназы (CODH), фермента, ответственного за следующую реакцию:



так и пируват:ферредоксин-оксидоредуктазы (PFOR), фермента, ответственного за следующую реакцию:



Повышенные уровни CO₂ сдвигают баланс реакции CODH в направлении от окисления CO, баланс реакции PFOR в направлении образования пирувата. Оба таких сдвига приводят к более низкому уровню восстановительных эквивалентов Fd_{red}, что обеспечивает условия, которые делают окисление этанола выгодным. Этому можно противодействовать путем уменьшения количества CO₂ или удаления CO₂ из вытекающего потока.

Не желая быть связанными теорией, авторы настоящего изобретения считают, что реакция окисления этанола происходит во время процесса ферментации, однако в условиях ферментации реакция с образованием этанола протекает с гораздо большей скоростью, чем окисление этанола, при этом такая реакция оказывает незначительное влияние на титры продукта. Когда из биореактора удаляют ферментативный бульон и микроорганизмы больше не продуцируют этанольный продукт, реакция окисления этанола становится проблематичной.

Авторы настоящего изобретения разработали способы существенного уменьшения или предотвращения таких нежелательных реакций в вытекающем потоке после стадии ферментации рассматриваемого процесса, что, тем самым, позволяет сохранить концентрацию требуемого конечного продукта в вытекающем потоке с того момента, когда вытекающий поток выходит из процесса ферментации до того момента, когда он поступает в процессы извлечения продукта.

Согласно одному из вариантов реализации предложенный способ относится к удалению из выте-

кающего потока растворенного, увлеченного или суспендированного CO_2 . Это достигается путем барботирования вытекающего потока газообразным азотом, который вытесняет CO_2 из раствора. Поскольку CO_2 необходим для реакции превращения этанола в ацетат, удаление CO_2 из вытекающего потока препятствует протеканию окисления этанола посредством такого механизма.

Для обеспечения эффективности указанного процесса инертный газ, такой как азот, необходимо барботировать таким образом, чтобы большая часть CO_2 , содержащегося в вытекающем потоке, была вытеснена. Предпочтительно, чтобы по существу весь CO_2 в вытекающем потоке был вытеснен. В идеале, большая часть CO_2 в вытекающем потоке должна вытесняться менее чем за 5 мин, или менее чем за 10 мин, или менее чем за 15 мин, или менее чем за 20 мин, или менее чем за 30 мин.

Азот можно барботировать в вытекающий поток для вытеснения CO_2 либо в накопительном резервуаре, либо в трубопроводе для подачи вытекающего потока из биореактора в накопительный резервуар. Согласно одному из вариантов реализации азот непрерывно подают в свободное пространство в накопительном резервуаре, при этом газ постоянно удаляют из свободного пространства. Обеспечение азота в свободном пространстве накопительного резервуара позволяет вытеснять CO_2 из жидкости, находящейся в контакте с газом, содержащемся в свободном пространстве. В накопительном резервуаре можно создать слой азота, способ, при котором в реактор подают меньшие количества азота, что приводит к вытеснению некоторого количества CO_2 . Альтернативно, в накопительном резервуаре можно осуществлять продувку азотом, при этом в накопительный резервуар подают большие количества азота, что приводит к большим уровням вытеснения CO_2 . Согласно альтернативному варианту реализации азот барботируют в вытекающий поток через трубопровод, установленный в нижней части накопительного резервуара. Барботирование газообразного азота в нижней части накопительного резервуара или в направлении к нижней части способствует активному вытеснению CO_2 из вытекающего потока.

Согласно одному из вариантов реализации азот подают в свободное пространство накопительного резервуара, и вытекающий поток распыляют через свободное пространство накопительного резервуара с помощью одного или более сопел. При распылении вытекающего потока в свободное пространство, богатое азотом, большая часть CO_2 в вытекающем потоке вытесняется по мере увеличения площади поверхности вытекающего потока. Для изменения размера капель струи можно регулировать размер сопла. Предпочтительно, если энергию, необходимую для распыления вытекающего потока в свободное пространство, обеспечивает биореактор. Давление жидкости, выходящей из биореактора, обычно составляет по меньшей мере 3 бар изб. или более, что достаточно для достижения накопительного сосуда и преодоления перепада давления на стандартных распылительных соплах.

Согласно одному из вариантов реализации азот барботируют в вытекающий поток через встроенный барботер, установленный в трубопроводе для подачи вытекающего потока из биореактора в накопительный резервуар. Встроенный трубопровод предпочтительно расположен рядом с накопительным резервуаром.

Предпочтительно, чтобы азот (или другой инертный газ) барботировали в вытекающий поток, когда вытекающий поток находится под давлением окружающей среды или вблизи такого давления. CO_2 является более растворимым при более высоких давлениях, поэтому вытеснение компонента CO_2 будет менее эффективным при барботировании азота в вытекающий поток при более высоких давлениях.

Инертный газ, подаваемый в вытекающий поток, предпочтительно представляет собой азот. Альтернативно, инертный газ представляет собой водород или метан. Согласно одному из вариантов реализации вытекающий поток барботируют воздухом. Согласно одному из вариантов реализации перед направлением в модуль извлечения продукта барботируемый воздухом вытекающий поток подвергают одной или более дополнительным стадиям обработки.

Согласно одному из вариантов реализации предложен способ нагревания вытекающего потока. Согласно одному из вариантов реализации предложенный способ включает нагревание вытекающего потока, содержащего живые клетки, таким образом, чтобы происходил по меньшей мере один из следующих процессов: (i) белки, необходимые для окисления этанола, денатурировали, (ii) бактериальные клетки подвергались лизированию и (iii) клеточный метаболизм нарушался.

Вытекающий поток предпочтительно нагревают до температуры, достаточной для денатурации одного или более ферментов, способных превращать этанол в ацетат. Согласно одному из вариантов реализации один или более ферментов выбирают из группы, состоящей из NADH-зависимой алкогольдегидрогеназы (EC 1.1.1.1), NADPH-зависимой алкогольдегидрогеназы (EC 1.1.1.2), альдегида:ферредоксин-оксидоредуктазы (AOR, EC1.2.7). 5) ацетаткиназы (EC2.1.2.1) и фосфотрансацилазы (EC 2.3.1.8).

В идеале, вытекающий поток после выхода из биореактора нагревают до требуемой температуры в течение короткого периода времени. Например, вытекающий поток нагревают до требуемой температуры в течение 30 мин после выхода из биореактора, или в течение 20 мин после выхода из биореактора, или в течение 10 мин после выхода из биореактора, или в течение 5 мин после выхода из биореактора, или в течение 1 мин после выхода из биореактора.

Требуемую температуру потока продукта увеличивают до по меньшей мере 50°C, или по меньшей мере 60°C, или по меньшей мере 70°C, или по меньшей мере 75°C, или по меньшей мере 78°C. Согласно одному из вариантов реализации температуру потока продукта поддерживают на уровне выше опреде-

ленной температуры в течение по меньшей мере 10 с, или по меньшей мере 20 с, или по меньшей мере 30 с, или по меньшей мере 1 мин, или по меньшей мере 2 мин, или по меньшей мере 3 мин, или по меньшей мере 5 мин, или по меньшей мере 10 мин.

Вытекающий поток можно нагревать с применением обычных средств, известных в данной области техники, в том числе, но не ограничиваясь ими, с помощью пластинчатых и стержневых теплообменников и кожухотрубных теплообменников. Предпочтительно нагревать вытекающий поток косвенно с помощью потока нагретой воды, потока низкого давления (например, 1,5 бар или менее) или альтернативного низкотемпературного источника умеренного тепла. По меньшей мере часть требуемого тепла предпочтительно поступает из интегрированного компонента установки. Например, тепло можно получить из модуля перегонки или из промышленного процесса, поставляющего C1-содержащий субстрат в биореакторы.

Тепло, подводимое к вытекающему потоку, предпочтительно не является нагретым паром высокого давления. Применение высокого давления или других агрессивных форм нагревания может вызвать денатурацию микроорганизма, что приводит к скоплению биомассы. Скопление биомассы может привести к образованию осадка внутри трубопроводов или накопительного резервуара и нарушить работу систем. Поток продукта необходимо нагревать для извлечения продукта (т. е. процесса перегонки), при этом для минимизации затрат на термическую обработку можно использовать инженерные решения. Вытекающий поток предпочтительно нагревают до температуры, достаточной для денатурации фермента, ответственного за окисление этанола до ацетата, но ниже температуры, которая может привести к скоплению биомассы.

Согласно одному из вариантов реализации предложен способ декомпрессии вытекающего потока. Согласно одному из вариантов реализации растворенный, увлеченный или суспендированный CO₂ в вытекающем потоке удаляют путем декомпрессии вытекающего потока. Вследствие потребности в CO₂ для превращения этанола в ацетат удаление CO₂ из вытекающего потока препятствует протеканию окисления этанола посредством такого механизма.

Для обеспечения эффективности указанного процесса вытекающий поток необходимо отводить из биореактора, работающего при достаточном давлении, а затем подвергнут декомпрессии таким образом, чтобы большая часть CO₂, содержащегося в вытекающем потоке, испарилась. Предпочтительно, чтобы по существу весь CO₂ в вытекающем потоке испарился. В идеале, большая часть CO₂ в вытекающем потоке должна испариться менее чем за 30 с, или менее чем за 20 с, или менее чем за 10 с, или менее чем за 5 с, или менее чем за 3 с, или менее чем за 2 с или менее чем за 1 с.

В идеале перед декомпрессией вытекающий поток подвергают воздействию давления выше атмосферного давления в течение по меньшей мере 1 с, или по меньшей мере 3 с, или по меньшей мере 5 с, или по меньшей мере 10 с, или по меньшей мере 15 с, или по меньшей мере 20 с, или по меньшей мере 25 с, или по меньшей мере 30 с. Перед декомпрессией давление вытекающего потока предпочтительно поддерживают при давлении выше атмосферного давления в течение от 1 до 30 с, или от 1 до 15 с, или от 15 до 30 с. Согласно одному из вариантов реализации перед декомпрессией вытекающий поток подвергают воздействию давления, составляющего по меньшей мере 2,0 бар изб., и поддерживают при таком давлении в течение по меньшей мере 1 секунды. Согласно одному из вариантов реализации перед декомпрессией давление потока продукта увеличивают по меньшей мере до 0,25 бар изб., при этом указанный поток поддерживают при таком давлении в течение по меньшей мере 30 с.

Согласно конкретным вариантам реализации в случае, когда ферментация происходит при давлении выше атмосферного, прохождение вытекающего потока из сосуда под давлением в сосуд при атмосферном давлении может создать достаточный перепад давления для обеспечения надлежащего мгновенного испарения CO₂. Согласно конкретным вариантам реализации жидкость, выходящая из биореактора, находится под давлением, составляющим по меньшей мере 0,25 бар изб. или выше, и направляется в сосуд при атмосферном давлении, при этом такой перепад давления является достаточным для удаления из указанной жидкости по меньшей мере части растворенного CO₂.

Согласно одному из вариантов реализации микроорганизм, содержащийся в вытекающем потоке, представляет собой C1-фиксирующий микроорганизм. Согласно конкретным вариантам реализации C1-фиксирующий микроорганизм представляет собой ацетоген, использующий путь Вуда-Лjungдала. Согласно одному из вариантов реализации C1-фиксирующий микроорганизм выбирают из группы, состоящей из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei*.

Согласно одному из вариантов реализации микроорганизм связывает источник C1-углерода с образованием нативно полученного продукта. Согласно одному из вариантов реализации нативно полученный продукт представляет собой этанол. Согласно альтернативным вариантам реализации микроорганизм представляет собой (i) рекомбинантный микроорганизм, содержащий один или более экзогенных ферментов, который продуцирует один или более ненативно полученных продуктов; или (ii) рекомбинантный микроорганизм, в котором один или более эндогенных ферментов подвергаются сверхэкспрессии; или (iii) рекомбинантный микроорганизм, содержащий по меньшей мере одну генетическую модификацию, нарушающую экспрессию и/или активность одного или более ферментов. Например, микроорганизм согласно настоящему изобретению может продуцировать или может быть генетически сконст-

руирован для продуцирования этанола (WO 2007/117157), ацетата (WO 2007/117157), бутанола (WO 2008/115080 и WO 2012/053905), бутирата (WO 2008/115080), 2,3-бутандиола (WO 2009/151342), лактата (WO 2011/112103), бутена (WO 2012/024522), бутадиена (WO 2012/024522), метилэтилкетона (2-бутанона) (WO 2012/024522 и WO 2013/185123), этилена (WO 2012/026833), ацетона (WO 2012/115527), изопропанола (WO 2012/115527), липидов (WO 2013/036147), 3-гидроксипропионата (3-HP) (WO 2013/180581), изопрена (WO 2013/180584), жирных кислот (WO 2013/191567), 2-бутанола (WO 2013/185123), 1,2-пропандиола (WO 2014/0369152) и 1-пропанола (WO 2014/0369152).

Метаболическая инженерия представляет собой дорогостоящую и трудоемкую технологию (Keasling, Science, 330: 1355-1358, 2012). Ограничения в отношении клеточных мембран, требующие полного уравнивания потоков в клетку и из клетки, затрудняют экспрессию биосинтетических путей без учета всей метаболической сети. Хотя существует много технологий, позволяющих инженеру лучше манипулировать клетками, таких как анализ потоков метаболитов, инженерия генома и т.д., сложность клеток остается ограничением (Lee, Nat Chem Biol, 8: 536-546, 2012; Yadav, Metabol Eng, 14: 233-241, 2012). Кроме того, инструменты, которые исследователи действительно имеют для регулирования транскрипции, трансляции и генома, требуют много циклов разработки-сборки-испытания (DBT), что увеличивает время и усилия, необходимые для оптимизации представляющего интерес биосинтеза (Boyle, Metabol Eng, 14: 223-232, 2012). Хотя текущие циклы DBT являются чрезвычайно дорогостоящими, системы *in vitro* обещают ускорение циклов DBT, поскольку они позволяют обойти многие ограничения *in vivo* за счет возможности прямого доступа к содержимому клетки (Sun, ACS Synth Biol, 3: 387-397, 2014; You, Adv Biochem Eng Biotechnol, 131: 89-119, 2013; Siegal-Gaskins, ACS Synth Biol, 3: 416-425, 2014). Такие системы *in vitro* могут включать, например, бесклеточную метаболическую инженерию с применением неочищенных клеточных экстрактов (Kay, Metabol Eng, 20: 84-91, 2015) или бесклеточный синтез белка для экспрессии *in vitro* ферментов (US 2006/0362708). В настоящем документе системы такого типа называют "бесклеточными системами". Согласно определенным вариантам реализации настоящее изобретение можно применять к бесклеточным системам для предотвращения нежелательной обратной реакции продукта с образованием предшественника.

Подразумевают, что термин "не встречающийся в природе" при применении в отношении микроорганизма означает, что указанный микроорганизм имеет по меньшей мере одну генетическую модификацию, обычно не встречающуюся в природном штамме перечисленных видов, в том числе в штаммах дикого типа перечисленных видов.

Термины "генетическая модификация", "генетическое изменение" или "генная инженерия" в широком смысле относятся к манипулированию геномом или нуклеиновыми кислотами микроорганизма. Аналогично, термин "генно-инженерный" относится к микроорганизму, содержащему регулируемый геном или нуклеиновые кислоты. Способы генетической модификации включают, например, экспрессию гетерологичного гена, вставку или делецию гена или промотора, мутацию нуклеиновой кислоты, экспрессию или инактивацию измененного гена, ферментную инженерию, направленное развитие, конструирование на основе знаний, способы случайного мутагенеза, генную перетасовку и оптимизацию кодонов.

"Рекомбинантный" означает, что нуклеиновая кислота, белок или микроорганизм является продуктом генетической модификации, инженерии или рекомбинации. В общем случае термин "рекомбинантный" относится к нуклеиновой кислоте, белку или микроорганизму, который содержит или кодируется генетическим материалом, полученным из нескольких источников, таких как два или более разных штаммов или видов микроорганизмов. В настоящем документе термин "рекомбинантный" также может использоваться для описания микроорганизма, содержащего мутантную нуклеиновую кислоту или белок, в том числе мутантную форму эндогенной нуклеиновой кислоты или белка.

"Дикий тип" относится к типичной форме организма, штамма, гена или характеристики, как они встречаются в природе, в отличие от мутантных или вариантных форм.

"Эндогенный" относится к нуклеиновой кислоте или белку, который присутствует или подвергается экспрессии в микроорганизме дикого типа или родительском микроорганизме, из которого получают микроорганизм согласно настоящему изобретению. Например, эндогенный ген представляет собой ген, который нативно присутствует в микроорганизме дикого типа или родительском микроорганизме, из которого получают микроорганизм согласно настоящему изобретению. Согласно одному из вариантов реализации экспрессию эндогенного гена можно регулировать с помощью экзогенного регуляторного элемента, такого как экзогенный промотор.

"Экзогенный" относится к нуклеиновой кислоте или белку, который отсутствует в микроорганизме дикого типа или родительском микроорганизме, из которого получают микроорганизм согласно настоящему изобретению. Согласно одному из вариантов реализации экзогенный ген или фермент можно получить из гетерологичного (то есть, другого) штамма или вида и ввести или экспрессировать в микроорганизме согласно настоящему изобретению. Согласно другому варианту реализации экзогенный ген или фермент можно создать искусственно или рекомбинантно и ввести или экспрессировать в микроорганизме согласно настоящему изобретению. Экзогенные нуклеиновые кислоты можно адаптировать таким образом, чтобы интегрировать их в геном микроорганизма согласно настоящему изобретению или оста-

вить их во внехромосомном состоянии в микроорганизме согласно настоящему изобретению, например, в плазмиде.

"Ферментативная активность" или просто "активность" в широком смысле относится к ферментативной активности, в том числе, но не ограничиваясь ими, к активности фермента, количеству фермента или доступности фермента, необходимого для катализирования реакции. Соответственно, "увеличение" ферментной активности включает увеличение активности фермента, увеличение количества фермента или повышение доступности фермента, необходимого для катализирования реакции. Аналогичным образом, "уменьшение" ферментной активности включает уменьшение активности фермента, уменьшение количества фермента или уменьшение доступности фермента, необходимого для катализирования реакции.

"Микроорганизм" представляет собой микроскопический организм, в частности, бактерию, архею, вирус или грибок. Микроорганизм согласно настоящему изобретению обычно представляет собой бактерию. В настоящем документе следует считать, что термин "микроорганизм" включает "бактерию".

Микроорганизм согласно настоящему изобретению можно дополнительно классифицировать на основе функциональных характеристик. Например, микроорганизм согласно настоящему изобретению может представлять собой или может быть получен из C1-фиксирующего микроорганизма, анаэроба, ацетогена, этанологена, карбоксидотрофа и/или метанотрофа. В табл. 1 приведен типичный перечень микроорганизмов и указаны их функциональные характеристики.

Таблица 1

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

¹ *Acetobacterium woodii* может продуцировать этанол из фруктозы, но не из газа.

² Не было исследовано, можно ли *Clostridium magnum* выращивать на CO.

³ Сообщалось, что один штамм из *Moorella thermoacetica*, *Moorella* sp. HUC22-1 продуцирует этанол из газа.

⁴ Не было исследовано, можно ли *Sporomusa ovata* выращивать на CO.

⁵ Не было исследовано, можно ли *Sporomusa silvacetica* выращивать на CO.

⁶ Не было исследовано, можно ли *Sporomusa sphaeroides* может выращивать на CO.

"C1" относится к одноуглеродной молекуле, например, CO, CO₂, CH₄ или CH₃OH. "C 1-оксигенат" относится к одноуглеродной молекуле, которая также содержит по меньшей мере один атом кислорода, например, CO, CO₂ или CH₃OH. "Источник C1-углерода" относится к одноуглеродной молекуле, которая служит частичным или единственным источником углерода для микроорганизма согласно настоящему изобретению. Например, источник C1-углерода может содержать одно или более соединений, выбранных из CO, CO₂, CH₄, CH₃OH или CH₂O₂. Источник C1-углерода предпочтительно содержит одно или более соединений, выбранных из CO и CO₂. "C1-фиксирующий микроорганизм" представляет собой микроорганизм, способный продуцировать один или более продуктов из источника C1-углерода. Как правило, микроорганизм согласно настоящему изобретению представляет собой C1-фиксирующую бактерию. Согласно предпочтительному варианту реализации микроорганизм, предложенный в настоящем изобретении, получают из C1-фиксирующего микроорганизма, приведенного в табл. 1.

"Анаэроб" представляет собой микроорганизм, не требующий кислорода для роста. Анаэроб может реагировать негативно или даже умереть при наличии кислорода выше определенного порога. Как правило, микроорганизм согласно настоящему изобретению представляет собой анаэроб. Согласно предпочтительному варианту реализации микроорганизм, предложенный в настоящем изобретении, получают из анаэроба, приведенного в табл. 1.

"Ацетоген" представляет собой микроорганизм, который продуцирует или способен продуцировать ацетат (или уксусную кислоту) в качестве продукта анаэробного дыхания. Как правило, ацетогены представляют собой облигатно-анаэробные бактерии, использующие путь Вуда-Льюнга в качестве их основного механизма для сохранения энергии и синтеза ацетил-CoA и продуктов, полученных из ацетил-CoA, таких как ацетат (Ragsdale, Biochim Biophys Acta, 1784: 1873- 1898, 2008). Ацетогены используют ацетил-CoA путь в качестве (1) механизма для восстановительного синтеза ацетил-CoA из CO₂, (2) терминального электроноакцепторного, энергосберегающего процесса, (3) механизма для фиксации (ассимиляции) CO₂ при синтезе клеточного углерода (Drake, Acetogenic Prokaryotes, In: The Prokaryotes, 3rd edition, p. 354, New York, NY, 2006). Все встречающиеся в природе ацетогены являются C1-фиксирующими, анаэробными, автотрофными и неметанотрофными организмами. Как правило, микроорганизм согласно настоящему изобретению представляет собой ацетоген. Согласно предпочтительному варианту реализации микроорганизм, предложенный в настоящем изобретении, получают из ацетогена, приведенного в табл. 1.

"Этанологен" представляет собой микроорганизм, который продуцирует или способен продуцировать этанол. Как правило, микроорганизм согласно настоящему изобретению представляет собой этанологен. Согласно предпочтительному варианту реализации микроорганизм, предложенный в настоящем изобретении, получают из этанологена, приведенного в табл. 1.

"Автотроф" представляет собой микроорганизм, способный расти в отсутствие органического углерода. Вместо этого автотрофы используют неорганические источники углерода, такие как CO и/или CO₂. Как правило, микроорганизм согласно настоящему изобретению представляет собой автотроф. Согласно предпочтительному варианту реализации микроорганизм, предложенный в настоящем изобретении, получают из автотрофа, приведенного в табл. 1.

"Карбоксидотроф" представляет собой микроорганизм, способный использовать CO в качестве единственного источника углерода. Как правило, микроорганизм согласно настоящему изобретению представляет собой карбоксидотроф. Согласно предпочтительному варианту реализации микроорганизм, предложенный в настоящем изобретении, получают из карбоксидотрофа, приведенного в табл. 1.

"Метанотроф" представляет собой микроорганизм, способный использовать метан в качестве единственного источника углерода и энергии. Согласно определенным вариантам реализации микроорганизм, предложенный в настоящем изобретении, представляет собой метанотроф или получен из метанотрофа. Согласно другим вариантам реализации микроорганизм, предложенный в настоящем изобретении, не является метанотрофом или не получен из метанотрофа.

В более широком смысле, микроорганизм согласно настоящему изобретению можно получить из организмов любого рода или вида, приведенных в табл. 1.

Согласно предпочтительному варианту реализации микроорганизм, предложенный в настоящем изобретении, получают из кластера Clostridia, включающего виды Clostridium autoethanogenum, Clostridium Ijungdahlii и Clostridium ragsdalei. Такие виды были впервые описаны и исследованы Abrini, Arch Microbiol, 161: 345-351, 1994 (Clostridium autoethanogenum), Tanner, Int J System Bacteriol, 43: 232-236, 1993 (Clostridium Ijungdahlii) и Huhnke, WO 2008/028055 (Clostridium ragsdalei).

Перечисленные три вида имеют много похожих свойств. В частности, все такие виды являются C1-фиксирующими, анаэробными, ацетогенными, этанологичными и карбоксидотрофными членами рода Clostridium. Такие виды имеют сходные генотипы и фенотипы и способы сохранения энергии и ферментативного метаболизма. Кроме того, указанные виды объединены в кластеры в группе I гомологии клостридиальной рРНК с 16S рРНК ДНК, идентичной более чем на 99%, имеют содержание ДНК G+ C примерно от 22 до 30 мол.%, являются грамположительными, имеют аналогичную морфологию и размер (экспоненциально растущие клетки от 0,5 - 0,7×т 3 - 5 мкм), являются мезофильными (оптимально растут при температуре от 30 до 37°C), имеют аналогичные диапазоны pH примерно от 4 до 7,5 (при оптималь-

ном значении pH примерно от 5,5 до 6), не содержат цитохромов и сохраняют энергию с помощью комплекса Rnf. Кроме того, как было показано, в перечисленных видах происходит восстановление карбоновых кислот с образованием их соответствующих спиртов (Perez, Biotechnol Bioeng, 110: 1066-1077, 2012). Важно отметить, что все такие виды также демонстрируют сильный автотрофный рост на СО-содержащих газах, продуцируют этанол и ацетат (или уксусную кислоту) в качестве основных продуктов ферментации и при определенных условиях образуют небольшие количества 2,3-бутандиола и молочной кислоты.

Однако такие три вида также имеют целый ряд различий. Указанные виды были выделены из разных источников: *Clostridium autoethanogenum* из кишечника кролика, *Clostridium ljungdahlii* из отходов курятников и *Clostridium ragsdalei* из пресноводных осадков. Такие виды отличаются по утилизации различных Сахаров (например, рамнозы, арабинозы), кислот (например, глюконата, цитрата), аминокислот (например, аргинина, гистидина) и других субстратов (например, бетаина, бутанола). Кроме того, перечисленные виды отличаются по ауксотрофии к определенным витаминам (например, тиамину, биотину). Указанные виды отличаются в последовательностях нуклеиновых кислот и аминокислот генов и белков, использующих путь Вуда-Люнгандала, хотя, как было обнаружено, общая организация и количество таких генов и белков одинаковы у всех видов (Kopke, Curr Opin Biotechnol, 22: 320 -325, 2011).

Таким образом, в заключении, многие из характеристик *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei* не являются специфическими для этого вида, но представляют собой достаточно общие характеристики для такого кластера С1-фиксирующих, анаэробных, ацетогенных, этанологичных и карбоксидотрофных членов рода *Clostridium*. Однако поскольку в действительности указанные виды отличаются, генетическая модификация или манипулирование одним из таких видов может не иметь идентичного эффекта в другом из таких видов. Например, могут наблюдаться различия в росте, производительности или продуцировании продукта.

Микроорганизм согласно настоящему изобретению также можно получить из изолята или мутанта *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. Изоляты и мутанты *Clostridium autoethanogenum* включают JA1-1 (DSM10061) (Abrini, Arch Microbiol, 161: 345-351, 1994), LBS1560 (DSM19630) (WO 2009/064200) и LZ1561 (DSM23693). Изоляты и мутанты *Clostridium ljungdahlii* включают ATCC 49587 (Tanner, Int J Syst Bacteriol, 43: 232-236, 1993), PETCT (DSM13528, ATCC 55383), ERI- 2 (ATCC 55380) (US 5,593,886), C- 01 (ATCC 55988) (US 6,368,819), O- 52 (ATCC 55989) (US 6,368,819) и OTA- 1 (Tirado- Acevedo, Production of bioethanol from synthesis gas using *Clostridium ljungdahlii*, PhD thesis, North Carolina State University, 2010). Изоляты и мутанты *Clostridium ragsdalei* включают PI 1 (ATCC BAA-622, ATCC PTA-7826) (WO 2008/028055).

"Субстрат" относится к источнику углерода и/или энергии для микроорганизма согласно настоящему изобретению. Обычно субстрат является газообразным и содержит источник С1-углерода, например, СО, СО₂ и/или СН₄. Субстрат предпочтительно содержит источник С1-углерода в виде СО или СО + СО₂. Субстрат может дополнительно содержать другие неуглеродные компоненты, такие как Н₂, N₂ или электроны.

В общем случае субстрат содержит по меньшей мере некоторое количество СО, например, примерно 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мол.% СО. Субстрат может содержать СО в диапазоне, например, примерно от 20 до 80, от 30 до 70 или от 40 до 60 мол.% СО. Субстрат предпочтительно содержит примерно от 40 до 70 мол. % СО (например, газ сталелитейных заводов или доменный газ), примерно от 20 до 30 мол.% СО (например, газ конвертерной печи) или примерно от 15 до 45 мол.% СО (например, синтез-газ). Согласно некоторым вариантам реализации субстрат может содержать относительно низкое количество СО, например, примерно от 1 до 10 или от 1 до 20 мол.% СО. Микроорганизм согласно настоящему изобретению обычно превращает по меньшей мере часть СО в субстрате в продукт. Согласно некоторым вариантам реализации субстрат не содержит или по существу не содержит (<1 моль%) СО.

Субстрат может содержать некоторое количество Н₂. Например, субстрат может содержать примерно 1, 2, 5, 10, 15, 20 или 30 мол.% Н₂. Согласно некоторым вариантам реализации субстрат может содержать относительно высокое количество Н₂, например, примерно 60, 70, 80 или 90 мол.% Н₂. Согласно другим вариантам реализации субстрат не содержит или по существу не содержит (<1 мол. %) Н₂.

Субстрат может содержать некоторое количество СО₂. Например, субстрат может содержать примерно от 1 до 80 или от 1 до 30 мол.% СО₂. Согласно некоторым вариантам реализации субстрат может содержать менее примерно 20, 15, 10 или 5 мол.% СО₂.

Согласно другому варианту реализации субстрат не содержит или практически не содержит (<1 мол.%) СО₂.

Хотя обычно субстрат является газообразным, его также можно обеспечить в альтернативных формах. Например, субстрат можно растворить в жидкости, насыщенной СО-содержащим газом, с помощью дисперсионного генератора микропузырьков. В качестве дополнительного примера, субстрат может быть адсорбирован на твердой подложке.

Субстрат и/или источник С1-углерода может представлять собой отработавший газ, полученный в виде побочного продукта промышленного процесса или из какого-либо другого источника, такого как

выхлопные газы автомобилей или газификация биомассы. Согласно определенным вариантам реализации промышленный процесс выбирают из группы, состоящей из производства продуктов черных металлов, таких как сталелитейное производство, производства продуктов из цветных металлов, переработки нефти, газификации угля, производства электроэнергии, производства технического углерода, производства аммиака, производства метанола и производства кокса. Согласно таким вариантам реализации субстрат и/или источник C1-углерода можно извлечь из промышленного процесса перед его выбросом в атмосферу с применением любого удобного способа.

Субстрат и/или источник C1-углерода может представлять собой синтез-газ, такой как синтез-газ, полученный при газификации угля или остатков нефтеперерабатывающих заводов, газификации биомассы или лигноцеллюлозного материала или риформинге природного газа. Согласно другому варианту реализации синтез-газ можно получить в результате газификации твердых бытовых отходов или твердых промышленных отходов.

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

Согласно определенным вариантам реализации ферментацию проводят в отсутствие углеводных субстратов, таких как сахар, крахмал, лигнин, целлюлоза или гемицеллюлоза.

Наряду с одним или более целевыми продуктами микроорганизм согласно настоящему изобретению также может продуцировать один или более сопутствующий продукт. Например, наряду с целевым продуктом с помощью настоящего изобретения можно получить ацетат, 2,3-бутандиол, бутанол, бутират, лактат, бутен, бутadiен, метилэтилкетон, этилен, ацетон, изопропанол, липиды, 3-гидроксипропионат, изопрен, жирные кислоты, 2-бутанол, 1,2-пропандиол и/или 1-пропанол. Согласно некоторым вариантам реализации саму микробную биомассу можно рассматривать как продукт или сопутствующий продукт.

"Нативный продукт" представляет собой продукт, продуцируемый генетически немодифицированным микроорганизмом. Например, этанол, ацетат и 2,3-бутандиол являются нативными продуктами *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei*. "Ненативный продукт" представляет собой продукт, продуцируемый генетически модифицированным микроорганизмом, но не продуцируемый генетически немодифицированным микроорганизмом, из которого получают генетически модифицированный микроорганизм.

"Повышение эффективности", "повышенная эффективность" и тому подобное включают, но не ограничиваются ими, увеличение скорости роста, скорости или объема продуцирования продукта, объема продукта на объем потребляемого субстрата или селективности продукта. Эффективность можно измерить относительно производительности родительского микроорганизма, из которого получают микроорганизм согласно настоящему изобретению.

На фиг. 1 изображена типичная биореакторная система, содержащая первый биореактор 10 и второй биореактор 20. В указанную биореакторную систему поступает C1-содержащий субстрат 12. C1-содержащий субстрат разделяют на входящий газовый поток 14 первого биореактора и входящий газовый поток 14' второго биореактора, которые подают, соответственно, в первый и второй биореакторы 10, 20 через их соответствующие впускные отверстия 16, 16' для газа.

Концентрацию бактерий в зонах 18, 18' жидкой фазы биореакторов 10, 20 можно поддерживать при изменяющихся уровнях продуктивности по этанолу путем обеспечения средства, с помощью которого можно отводить отфильтрованную и неотфильтрованную части жидкости. Жидкость отводят из первого биореактора 10 посредством потока 28 пермеата, который фильтруют с применением фильтровальной системы 25 для удаления бактерий, и вытекающего потока 26, который неотфильтрован и содержит C1-фиксирующие бактерии (биомассу) по существу в той же концентрации, что и в ферментативном бульоне в зоне 18 непрерывной жидкой фазы первого биореактора 10. Отфильтрованные бактерии возвращают в первые биореакторы 10 через трубопровод 36. Соответственно, жидкие продукты, удаленные из первого биореактора 10, могут содержать как поток 28 пермеата, так и вытекающий поток 26. Аналогичным образом, вторая фильтровальная система 25' выполнена с возможностью сообщения с зоной 18' непрерывной жидкой фазы и позволяет отводить вытекающий поток 40 и поток 50 пермеата из конечного биореактора биореакторной системы, при этом отфильтрованные бактерии 36' возвращают в зону 18' непрерывной жидкой фазы второго биореактора 20.

Жидкую культуральную среду можно загружать через впускное отверстие 34 для культуральной среды в биореакторную систему и, в частности, в первый биореактор 10, для восполнения питательных веществ, необходимых для поддержания бактериального роста, и замены объема жидкости, потерянного при удалении промежуточного жидкого продукта 32 из первого биореактора 10, весь или часть которого можно направить во второй биореактор 20. Необязательно, жидкую культуральную среду можно подавать во второй биореактор 20 через впускное отверстие 34' для среды. Необязательно, части вытекающего потока 26 и/или потока 28 пермеата можно удалить из биореакторной системы (например, для контроля и анализа процесса) без направления во второй биореактор 20.

Выходящие газовые потоки 38, 38' можно отводить из трубопроводов, сообщающихся по текучей среде со свободным пространством 22, 22' биореактора. Выходящие газовые потоки 38, 38' можно отводить из биореакторной системы по отдельности или объединить и затем отвести в виде выходного потока 24 газообразного продукта.

Соответственно, на фиг. 1 изображена биореакторная система, в которой газообразный C1-содержащий субстрат 12 можно подавать параллельно в первый и второй биореакторы 10, 20, тогда как жидкие продукты, которые могут содержать C1-фиксирующие бактерии (биомассу), можно последовательно направлять из первого биореактора 10 во второй биореактор 20. Согласно варианту реализации, показанному на фиг. 1, последний биореактор, из которого вытекающий поток 40 и поток 50 пермеата отводят из биореакторной системы 100, представляет собой именно второй биореактор 20. В альтернативных вариантах реализации, содержащих биореакторные системы с дополнительными биореакторами (например, с тремя или четырьмя биореакторами) и, в частности, содержащих один или более промежуточных биореакторов, расположенных после первого биореактора и перед конечным биореактором, газообразное и жидкое исходное сырье можно ввести в такие промежуточные биореакторы аналогичным способом, при этом газообразные и жидкие продукты могут быть отведены из таких промежуточных биореакторов аналогичным способом. Потоки жидких продуктов, в том числе вытекающий поток и поток пермеата, можно направить в последующие биореакторы и из последующих биореакторов аналогичным способом.

В общем случае один или более продуктов-метаболитов (например, этанол) биореакторной системы 100 извлекают из вытекающего потока и потока пермеата или их частей, удаленных из конечного биореактора, например, из вытекающего потока 40 и потока пермеата 50, удаленных из второго биореактора 20 согласно варианту реализации, показанному на фиг. 1. Необязательно, такие продукты-метаболиты также можно извлечь из вытекающего потока и/или потока пермеата или их частей, удаленных из одного или более биореакторов, отличных от конечного биореактора.

Как показано на фиг. 2, поток 50 пермеата и вытекающий поток 40 из биореактора подают в зону хранения. Поток пермеата подают в накопительный резервуар 62 для пермеата. Пермеат можно подвергнуть одной или более стадиям обработки, таким как стадия осветления, перед тем, как направить в модуль 66 извлечения из пермеата продукта через трубопровод 64. Вытекающий поток подают в накопительный резервуар 72 для вытекающего потока, в котором вытекающий поток подвергают одной или более стадиям обработки для предотвращения превращения этанола в ацетат в вытекающем потоке. Стадия обработки может включать нагревание вытекающего потока, декомпрессию вытекающего потока или вытеснение CO₂ из вытекающего потока. Нагревание обработанного потока можно осуществить либо в накопительном резервуаре, либо в трубопроводе, расположенном между биореактором и накопительным резервуаром. Энергия для нагревания вытекающего потока предпочтительно поступает из промышленного процесса, расположенного рядом с биореакторной системой. Затем обработанный поток 42 подают в модуль 90 извлечения продукта из вытекающего потока, и извлекают из обработанного потока этанол. Необязательно, поток 50 пермеата и вытекающий поток 40 объединяют, и в зону хранения поступает объединенный поток, подаваемый в один накопительный резервуар (не показано).

На фиг. 3а изображен накопительный резервуар 72 для вытекающего потока согласно одному аспекту настоящего изобретения. Вытекающий поток 40 подают в накопительный резервуар 72 для вытекающего потока. Согласно одному из вариантов реализации инертный газ 80, такой как азот, можно непрерывно барботировать в свободное пространство 76 накопительного резервуара 72 для вытекающего потока, при этом часть свободного пространства непрерывно выпускают через вентиляционное отверстие (не показано).

На фиг. 3b показана альтернативная система, в которой азот 80 подают в вытекающий поток через впускное отверстие 82, расположенное в жидкостной части 78 накопительного резервуара 78 для вытекающего потока.

На фиг. 3c показан вариант реализации, в котором вытекающий поток 40 распыляют в азотсодержащее свободное пространство 76 накопительного резервуара 72 для вытекающего потока через одно или более сопел 84.

На фиг. 3d показан вариант реализации, в котором азот 80 барботируют в вытекающий поток в встроенном барботере 86, расположенном перед накопительным резервуаром 72.

Примеры

Следующие примеры дополнительно иллюстрируют настоящее изобретение, но, конечно, не должны рассматриваться как ограничивающие его объем каким-либо образом.

C. autoethanogenum DSM23693 (производное DSM10061) получали из DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур, Inhoffenstraße 7B, 38124, Брауншвейг, Германия). Выращивание осуществляли при температуре 37°C, используя строго анаэробные условия и методы (Hungate, Meth Microbiol, 3B: 117-132, 1969; Wolfe, Adv Microb Physiol, 6: 107-146, 1971). Использовали химически определенную среду PETC без дрожжевого экстракта. CO-содержащая газовая смесь с давлением 30 psi (примерно 207 кПа) (44% CO, 32% N₂, 22% CO₂, 2% H₂) служила единственным источником углерода и энергии.

Среда РЕТС	На 1,0 л среды
NH_4Cl	1 г
KCl	0,1 г
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 г
NaCl	0,8 г
KH_2PO_4	0,1 г
CaCl_2	0,02 г
Раствор, содержащий микропримеси металлов	10 мл
Витаминный раствор Вольфа	10 мл
Резазурин (2 г/л материала)	0,5 мл
NaHCO_3	2 г
Раствор восстанавливающего агента	0,006-0,008 % (об./об.)
Дистиллированная вода	До 1,0 л рН 5,5 (доведено с помощью HCl)
Витаминный раствор Вольфа	На 1,0 л раствора
Биотин	2 мг
Фолиевая кислота	2 мг
Пиридоксина гидрохлорид	10 мг
Рибофлавин	5 мг
Никотиновая кислота	5 мг
Кальций D - (+) - пантотенат	5 мг
Витамин B12	0,1 мг
<i>l</i> -Аминобензойная кислота	5 мг
Липоевая кислота	5 мг
Тиамин	5 мг
Дистиллированная вода	До 1,0 л

Раствор, содержащий микропримеси металлов	На 1,0 л раствора
Нитрилтрехуксусная кислота	2 г
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1 г
$\text{Fe}(\text{SO}_4)_2(\text{NH}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,8 г
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,2 г
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 мг
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,02 г
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,02 г
Na_2SeO_3	0,02 г
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,02 г
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,02 г
Дистиллированная вода	До 1,0 л
Раствор восстанавливающего агента	На 100 мл раствора
NaOH	0,9 г
Цистеин $\cdot \text{HCl}$	4 г
Na_2S	4 г
Дистиллированная вода	До 100 мл

Пример 1. Вытеснение CO_2 для предотвращения окисления этанола.

Ферментацию с применением *C. autoethanogenum* DSM23693 проводили в 1,5 л биореакторах при температуре 37°C. Для обеспечения анаэробных условий сосуд реактора барботировали азотом. Перед инокуляцией подачу газа переключали на подачу чистых газов, непрерывно загружаемых в реактор. (42% CO , 1,5% CO_2 , 11% N_2 , 42% H_2), pH доводили до 5,0 с помощью гидроксида аммония (5M). Первоначально расход газа устанавливали на уровне 59 мл/мин/л, увеличивая до 118 мл/мин/л во время средней экспоненциальной фазы, при этом скорость перемешивания увеличивали с 200 об/мин до 800 об/мин. В биореактор дозировали Na_2S (0,5M) со скоростью 0,2 мл/ч. После достижения OD600 1,1, биореактор переключали в непрерывный режим при скорости разбавления 1,95 d-1 и скорости разбавления бактерий 1,0 d-1. Во время непрерывного режима скорость газа и перемешивания доводили до 267 мл/мин/л и 950 об/мин, соответственно, при этом скорость разбавления бактерий доводили до 0,35 d-1. Увеличивали скорость подачи Na_2S до 0,5 мл/ч. Для измерения биомассы и метаболитов отбирали образцы среды и проводили анализ входящего и выходящего газа в свободном пространстве на регулярной основе. На день 16,0 метаболиты ферментации и биомасса были стабильны, при этом концентрация этанола и ацетата составляла 26,5 г/л и 4,75 г/л, поглощение CO составляло 5,9 моль/л/сут и поглощение H_2 составляло 3,45 моль/л/сут.

На день 16,95 в трех параллельных испытаниях отбирали образцы бульона (25 мл), используемого для ферментации, и помещали в имитирующий накопительный резервуар (анаэробную колбу с сывороткой), при этом свободное пространство колбы с сывороткой заменяли на CO_2 или N_2 и повышали давление с помощью CO_2 или N_2 . Были предприняты меры, гарантирующие отсутствие введения O_2 во время такого процесса. Затем в течение 3 часов отбирали образцы метаболитов и измеряли с помощью ВЭЖХ.

На фиг. 4 и 5 показано изменение концентрации этанола и ацетата при двух условиях. В примере, в котором использовали свободное пространство, содержащее CO_2 (фиг. 4), концентрация ацетата возрастала с 5,5 г/л до 10,67 г/л, а концентрация этанола уменьшалась с 26,4 г/л до 23,8 г/л. Это свидетельствует о значительном окислении этанола.

На фиг. 5 показано, что при размещении этих же клеток в свободное пространство, содержащее N_2 , отсутствовало значительное изменение концентрации метаболитов и не происходило окисление этанола. Концентрации метаболитов остаются такими же, как концентрации, измеренные при ферментации.

Пример 2. Термическая обработка для предотвращения окисления этанола.

Из эксперимента с применением CSTR, работающего в условиях, аналогичных условиям в экспериментах, описанных в примере 1, был отобран один образец и разделен на подобразцы. Такие подобразцы хранили в условиях, характерных для условий, применяемых для потоков продуктов, содержащих биомассу, после ферментации и до извлечения продукта. Предполагалось, в таких условиях происходит превращение этанола в ацетат.

Указанные подобразцы независимо подвергали термической обработке через варьирующие интервалы времени, составляющие от 0 до 240 мин. Термическая обработка включала выдерживание образцов при 80°C в течение 5 мин.

После термической обработки с помощью ВЭЖХ измеряли титры ацетата и этанола и сравнивали с соответствующим образцом, термически обработанным в нулевой момент времени.

На фиг. 6 показано сравнение подобразцов, термически обработанных в разные моменты времени. Сплошная линия на графике показывает соответствующую потерю этанола в зависимости от времени, если подобразец сразу же не подвергался термической обработке. Разница между любыми двумя экспериментальными точками указывает на степень превращения, происходящего в течение такого периода времени. Разница между нулевым моментом времени и временем, составляющим 240 мин, позволяет оценить абсолютное преимущество термической обработки. Как видно, в промежутке между 60 мин и 240 мин дальнейшее превращение почти отсутствует, соответственно, после 240 мин, скорее всего, будет происходить незначительное дальнейшее превращение.

Все ссылки, в том числе публикации, заявки на патенты и патенты, приведенные в настоящем документе, включены, тем самым, посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая ссылка была отдельно и конкретно указана для включения посредством ссылки и изложена в настоящем документе в полном объеме. В настоящем описании ссылка на любой известный уровень техники не является и не должна рассматриваться как признание того, что такой известный уровень техники является частью общедоступных известных знаний в области деятельности в любой стране.

Следует считать, что применение терминов в единственном числе и аналогичных ссылок в контексте описания настоящего изобретения (особенно в контексте следующей формулы изобретения) включает как единственное, так и множественное число, если только в настоящем документе не указано иное или явно не противоречит контексту. Термины "состоящий из", "имеющий", "включающий" и "содержащий" следует рассматривать как неограничивающие термины (то есть означающие "в том числе, но не ограничиваясь ими"), если не указано иное. Перечисление в данном документе диапазонов значений просто предназначено для того, чтобы служить сокращенным способом ссылки по отдельности на каждое отдельное значение, попадающее в такой диапазон, если в настоящем документе не указано иное, при этом каждое отдельное значение включено в данное описание, как если бы оно было отдельно приведено

в настоящем документе. Все способы, описанные в данном документе, могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если в настоящем документе не указано иное или иное явно не противоречит контексту. Применение любых примеров или типичных формулировок (например, "такой как"), приведенных в настоящем документе, предназначено просто для лучшего освещения настоящего изобретения и не налагает ограничения на объем настоящего изобретения, если не заявлено иное. Ни одно выражение, приведенное в данном описании, не следует понимать как указание на какой-либо незаявленный элемент как необходимый для практической реализации настоящего изобретения.

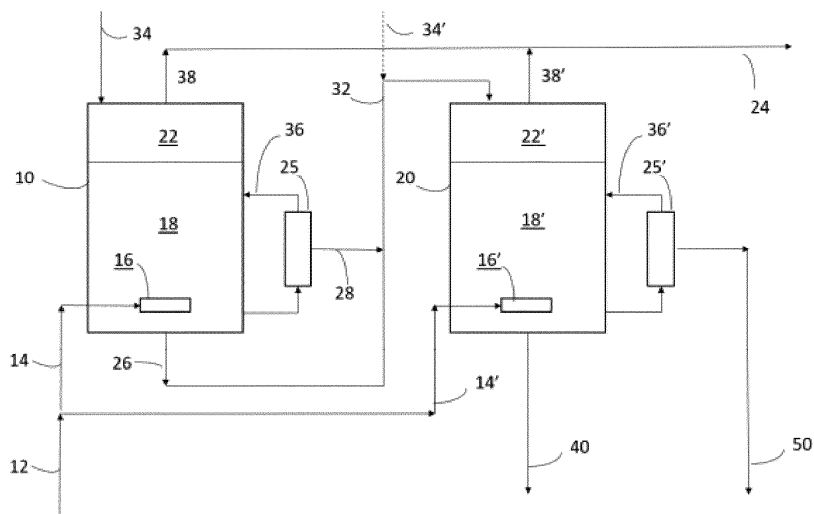
В данном документе описаны предпочтительные варианты реализации настоящего изобретения. Вариации таких предпочтительных вариантов реализации могут стать очевидными для специалистов в данной области техники после прочтения приведенного выше описания. Авторы настоящего изобретения ожидают, что квалифицированные специалисты будут использовать такие варианты, исходя из конкретных условий, при этом авторы настоящего изобретения предполагают, что оно будет реализовано на практике иначе, чем конкретно описано в данном документе. Соответственно, настоящее изобретение включает все модификации и эквиваленты предмета изобретения, приведенные в прилагаемой формуле изобретения, как это установлено действующим законодательством. Кроме того, любая комбинация описанных выше элементов во всех возможных их вариациях включена в настоящее изобретение, если в настоящем документе не указано иное или иное явно не противоречит контексту.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

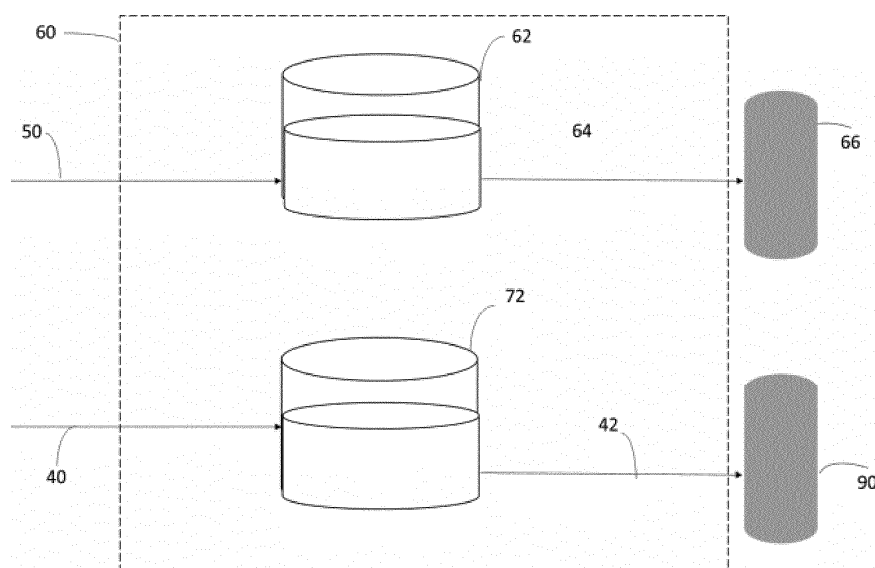
1. Способ снижения уровня биокаталитического окисления спирта, включающий:
 - а) отведение из биореактора вытекающего потока, содержащего CO_2 , спирт и по меньшей мере один фермент, способный окислять спирт, и
 - б) обработку вытекающего потока для снижения уровня окисления спирта ферментом, где обработка включает по меньшей мере один процесс, выбранный из следующих:
 - (i) барботирование вытекающего потока газообразным азотом;
 - (ii) повышение температуры вытекающего потока; и
 - (iii) декомпрессия вытекающего потока.
2. Способ по п.1, согласно которому спирт представляет собой этанол.
3. Способ по п.1, согласно которому по меньшей мере один фермент, способный окислять спирт, выбран из группы, состоящей из NADH-зависимой алкогольдегидрогеназы (EC1.1.1.1), NADPH-зависимой алкогольдегидрогеназы (EC1.1.1.2), альдегид:ферредоксин-оксидоредуктазы (EC1.2.7.5), ацетаткиназы (EC2.1.2.1) и фосфотрансацетилазы (EC2.3.1.8).
4. Способ по п.1, согласно которому указанный фермент продуцирует C1-фиксирующая бактерия.
5. Способ по п.1, согласно которому указанный фермент продуцирует бактерия, не фиксирующая C1.
6. Способ по п.1, согласно которому указанный фермент присутствует в C1-фиксирующей бактерии.
7. Способ по п.1, согласно которому указанный фермент присутствует в бактерии, не фиксирующей C1.
8. Способ по п.4, согласно которому C1-фиксирующая бактерия присутствует в вытекающем потоке.
9. Способ по п.5, согласно которому бактерия, не фиксирующая C1, присутствует в вытекающем потоке.
10. Способ по п.1, согласно которому температуру вытекающего потока повышают до температуры, при которой фермент денатурирует.
11. Способ по п.10, согласно которому температуру вытекающего потока повышают по меньшей мере до 60°C .
12. Способ по п.10, согласно которому вытекающий поток поддерживают при температуре по меньшей мере 60°C в течение по меньшей мере 5 с.
13. Способ по п.1, согласно которому стадия обработки включает барботирование вытекающего потока газообразным азотом и при этом указанный газообразный азот вытесняет из вытекающего потока по меньшей мере часть CO_2 .
14. Способ по п.13, согласно которому газообразный азот вытесняет из вытекающего потока по существу весь CO_2 .
15. Способ по п.1, согласно которому стадия обработки включает декомпрессию вытекающего потока, при этом из вытекающего потока испаряется по меньшей мере часть CO_2 .
16. Способ снижения уровня биокаталитического окисления этанола в потоке продукта, согласно которому указанный поток продукта содержит первичный спирт, растворенный CO_2 и по меньшей мере один фермент, способный окислять спирт, при этом указанный способ включает:
 - а) удаление потока продукта из реактора; и
 - б) обработку потока продукта для снижения уровня окисления спирта.

17. Способ по п.4 или 6, согласно которому C1-фиксирующая бактерия выбрана из группы, состоящей из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei*.

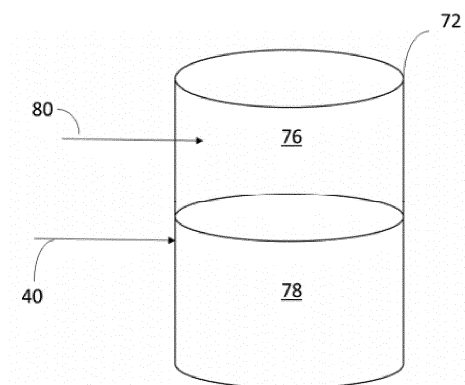
18. Способ по п.16, согласно которому спирт выбран из группы, состоящей из этанола, бутанола, 1-пропанола и 1-октанола.



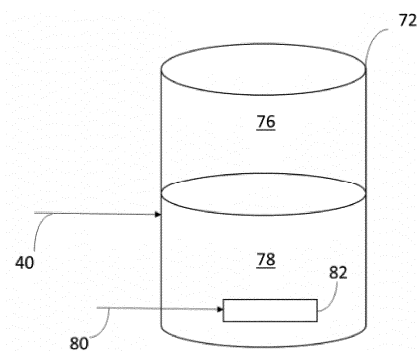
Фиг. 1



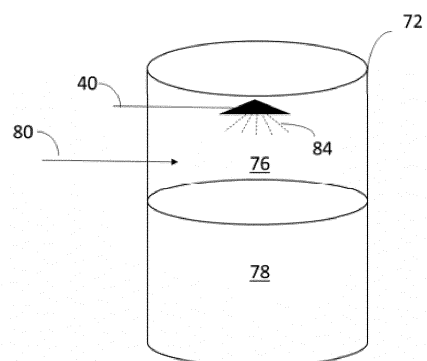
Фиг. 2



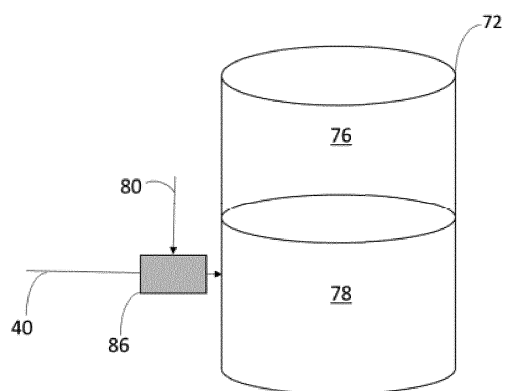
Фиг. 3а



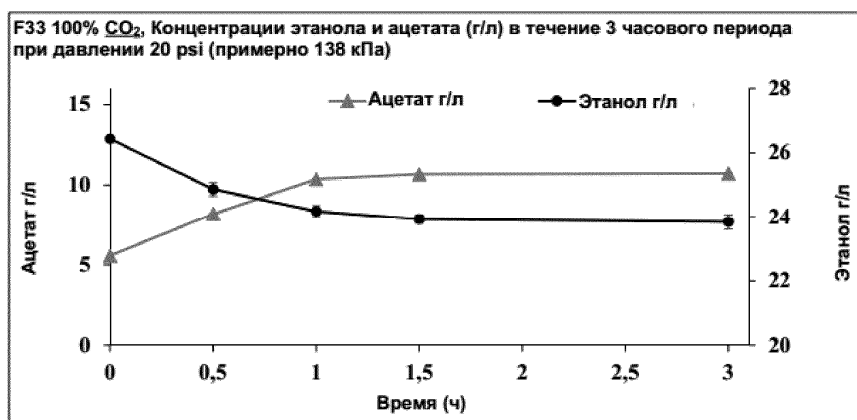
Фиг. 3b



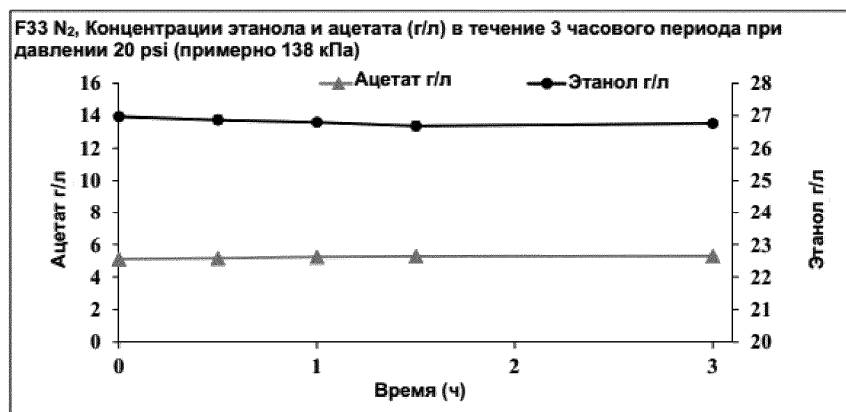
Фиг. 3с



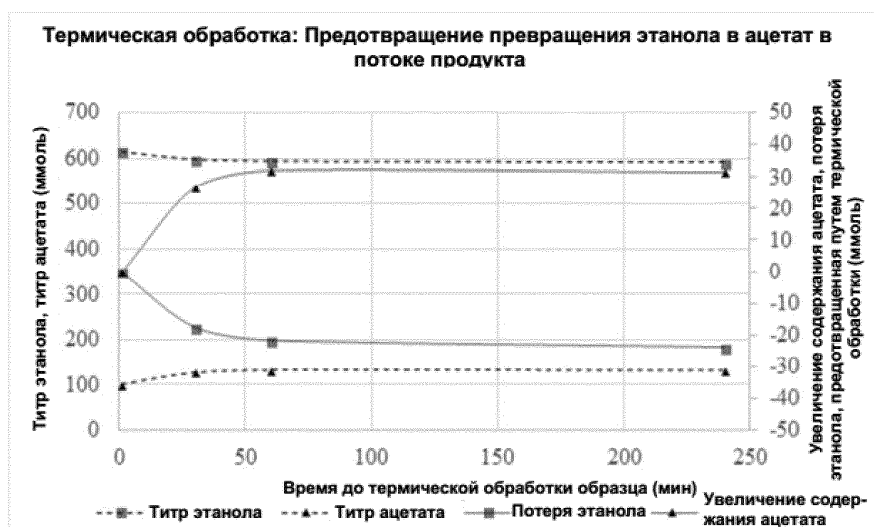
Фиг. 3d



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

