

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290531** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.08.04

(22) Дата подачи заявки
2020.10.21

(51) Int. Cl. **C12M 1/00** (2006.01)
C12P 7/54 (2006.01)
C12P 7/56 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

(54) ОТДЕЛЕНИЕ АЦЕТАТА ОТ ФЕРМЕНТАЦИОННОГО БУЛЬОНА

(31) **62/924,666; 17/074,342**

(32) **2019.10.22; 2020.10.19**

(33) **US**

(86) **PCT/US2020/056573**

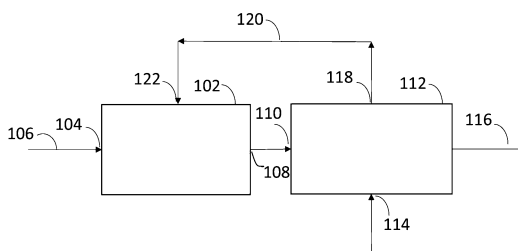
(87) **WO 2021/081031 2021.04.29**

(71) Заявитель:
ЛАНЦАТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Розин Ричард Р. (US)

(74) Представитель:
Хмара М.В. (RU)

(57) Способ по данному изобретению включает ферментацию газового субстрата и микроорганизма с образованием ферментационного бульона, содержащего указанный микроорганизм и целевой компонент; передачу ферментационного бульона в блок сепарации, содержащий ионообменную смолу в имитируемом движущемся слое непрерывного ионного обмена; избирательное удерживание целевого компонента за счет ионного обмена с указанной смолой во время передачи указанного микроорганизма через указанный слой; регенерацию ионообменной смолы и извлечение целевого компонента. В качестве альтернативы ферментационный бульон передают в первую зону сепарации для отделения первой части ферментационного бульона, содержащего микроорганизм, и его рециркуляции в биореактор, а затем вторую часть ферментационного бульона передают во вторую зону сепарации, содержащую ионообменную смолу, которая выполняет избирательное удерживание целевого компонента за счет ионного обмена с указанной смолой. Остаток пропускают через вторую зону сепарации. Выполняют регенерацию ионообменной смолы и извлечение целевого компонента.



A1

202290531

202290531

A1

ОТДЕЛЕНИЕ АЦЕТАТА ОТ ФЕРМЕНТАЦИОННОГО БУЛЬОНА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА

[1] По данной заявке испрашивается приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 62/924,666, поданной 22 октября 2019 г.,
5 и заявке на патент США № 17/074,342, поданной 19 октября 2020 г. Содержание обеих заявок явным образом включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[2] Данная заявка относится к отделению целевых компонентов от
10 ферментационного бульона, получаемого в результате культивирования микроорганизма в присутствии газового субстрата, отделению с использованием непрерывного ионного обмена, работающего в режиме имитируемого движущегося слоя.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[3] Смягчение последствий надвигающегося изменения климата требует
15 резкого сокращения выбросов парниковых газов (ПГ), например тех, которые образуются при сжигании горючих полезных ископаемых, таких как уголь и нефть. Хотя экологически безопасных источников химических веществ и транспортного топлива в настоящее время недостаточно для существенного замещения нашей
20 зависимости от ископаемого углерода, ферментация газов с недавних пор возникла в качестве альтернативной платформы для биологической фиксации таких газов, как диоксид углерода (CO_2), монооксид углерода (CO) и/или водород (H_2) с превращением их в экологически безопасное топливо и химические вещества. В частности, в технологии ферментации газов может использоваться широкий спектр
25 исходного сырья, в том числе газифицированные органические вещества (например, твердые коммунально-бытовые отходы или отходы сельскохозяйственного производства) или промышленные газообразные отходы (например, от сталелитейных заводов или нефтеперерабатывающих заводов) для получения этанола, горючего для реактивных двигателей и большого количества
30 других продуктов. Сама по себе ферментация газов может заменить 30 % использования сырой нефти и сократить глобальные выбросы CO_2 на 10 %, но, как и в случае любой инновационной технологии, необходимо решить множество

технических первоочередных задач, прежде чем этот потенциал будет полностью реализован.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[4] Раскрывается способ отделения целевого компонента от ферментационного бульона. Способ включает ферментацию газового субстрата и микроорганизма с образованием ферментационного бульона, содержащего указанный микроорганизм и целевой компонент; передачу ферментационного бульона в блок сепарации, содержащий ионообменную смолу в имитируемом движущемся слое непрерывного ионного обмена; избирательное удерживание целевого компонента за счет ионного обмена с указанной смолой и передачу указанного микроорганизма через имитируемый движущийся слой непрерывного ионного обмена; регенерацию ионообменной смолы; и извлечение целевого компонента. Целевой компонент может представлять собой основание, сопряженное с любой низкомолекулярной органической кислотой, такое как формиат, ацетат, лактат или же то и другое одновременно. Целевой компонент может быть подвергнут химическому превращению с образованием одного или нескольких продуктов. Микроорганизм может быть получен из родительского микроорганизма, выбранного из группы, состоящей из *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia producta*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium coskatii*, *Clostridium drakei*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium magnum*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium scatologenes*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermautotrophica*, *Moorella thermoacetica*, *Oxobacter pfennigii*, *Sporomusa ovata*, *Sporomusa silvacetica*, *Sporomusa sphaeroides* и *Thermoanaerobacter kivui*. Например, микроорганизм может являться представителем рода *Clostridium*. Микроорганизм может быть получен из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei* или *Clostridium coskatii*. Газовый субстрат может представлять собой промышленные газообразные отходы, промышленный дымовой газ, синтез-газ, газифицированные отходы или газифицированную биомассу. Целевое соединение может представлять собой ацетат, а один или несколько продуктов могут представлять собой винилацетат. Винилацетат может быть также подвергнут химическому превращению с образованием поливинилацетата или поливинилового спирта.

[5] Раскрывается композиция, содержащая компонент, получаемый из винилацетата, который путем химического превращения был образован из ацетата, извлекаемого с помощью данного способа. Композиция может представлять собой полимер, сополимер, клей, покрытие, краску, пленку, текстильное изделие, пену, изоляцию для проводов или изоляцию для кабелей.

[6] Раскрывается еще один способ отделения целевого компонента от ферментационного бульона. Способ включает ферментацию газового субстрата и микроорганизма с образованием ферментационного бульона, содержащего указанный микроорганизм и целевой компонент; передачу ферментационного бульона в первую зону сепарации для отделения первой части ферментационного бульона, содержащего микроорганизм, и его рециркуляции в биореактор; передачу второй части ферментационного бульона во вторую зону сепарации, содержащую ионообменную смолу; избирательное удерживание целевого компонента за счет ионного обмена с указанной смолой и передачу остатка через вторую зону сепарации; и регенерацию ионообменной смолы с помощью регенерата и извлечение целевого компонента. Регенерат может содержать по меньшей мере часть указанного остатка или может быть получен из указанного остатка. Целевой компонент может представлять собой основание, сопряженное с низкомолекулярной органической кислотой. Целевой компонент может представлять собой ацетат, лактат или же то и другое одновременно. Ионообменная смола может представлять собой сильноосновную анионообменную смолу. Газовый субстрат может представлять собой промышленные газообразные отходы, промышленный дымовой газ, полученный из газифицированных отходов синтез-газ, полученный из газифицированной биомассы синтез-газ или любое их сочетание. Целевой компонент может быть подвергнут химическому превращению с образованием одного или нескольких продуктов. Целевое соединение может представлять собой ацетат, а один или несколько продуктов могут представлять собой винилацетат. Винилацетат может быть подвергнут химическому превращению с образованием поливинилацетата или поливинилового спирта. Поливинилацетат или поливиниловый спирт может быть использован для изготовления полимера, сополимера, клея, покрытия, краски, пленки, текстильного изделия, пены, изоляции для проводов или изоляции для кабелей.

[7] Раскрывается устройство для биологической конверсии, причем устройство для биологической конверсии содержит: систему биореактора, содержащую вход в биореактор для размещения в нем культуральной среды и

микроорганизма для метаболической трансформации источника углерода в субстрате и получения продукта, и выход из биореактора; зону сепарации, содержащую первый вход, сообщающийся по текучей среде с выходом биореактора, расширяющийся слой ионообменной смолы в конфигурации имитируемого движущегося слоя, второй вход, сообщающийся по текучей среде с источником регенерата, выход, сообщающийся по текучей среде с системой биореактора, и выход для продукта.

[8] Раскрывается еще одно устройство для биологической конверсии. Указанное устройство содержит систему биореактора, содержащую вход в биореактор, в котором размещена культуральная среда и микроорганизмы для метаболической трансформации источника углерода в субстрате и получения продукта, и выход из биореактора; первую зону сепарации, содержащую вход, сообщающийся по текучей среде с выходом биореактора, мембрану для отделения микробной биомассы, выход для ретентата, сообщающийся по текучей среде с биореактором, и выход для пермеата; и вторую зону сепарации, содержащую первый вход, сообщающийся по текучей среде с выходом для пермеата из первой зоны сепарации, по меньшей мере один слой ионообменной смолы, второй вход, сообщающийся по текучей среде с источником регенерата, выход, сообщающийся по текучей среде с источником регенерата, и выход для продукта.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[9] На фиг. 1 представлено устройство для биологической конверсии, содержащее систему биореактора и зону сепарации, в соответствии с одним вариантом реализации изобретения по данному описанию.

[10] На фиг. 2 представлено устройство для биологической конверсии, содержащее систему биореактора, первую зону сепарации и вторую зону сепарации, в соответствии с одним вариантом реализации изобретения по данному описанию.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[11] В данном изобретении решается задача по отделению продуктов ферментации от ферментационного бульона. В частности, данное изобретение относится к отделению низкомолекулярных кислот и/или сопряженных с ними оснований, которые могут присутствовать в ферментационном бульоне. Низкомолекулярные кислоты могут быть отделены от ферментационного бульона с

применением таких методов, как ионный обмен, дистилляция, этерификация с последующей дистилляцией или жидкостно-жидкостная экстракция. Другой пригодный метод, обозначаемый термином «высаливание», представляет собой метод очистки, в котором используется пониженная растворимость определенных молекул в растворах с очень высокой ионной силой. В то время как подробные данные по данному изобретению рассматриваются по отношению к методу ионного обмена, для отделения низкомолекулярных кислот и/или сопряженных с ними оснований могут применяться любые из вышеперечисленных методов сепарации.

[12] Один типовой продукт, также именуемый целевым компонентом, подлежащий отделению от ферментационного бульона, представляет собой ацетат, который является продуктом частичной диссоциации уксусной кислоты в воде. Другой типовой продукт, также именуемый целевым компонентом, подлежащий отделению от ферментационного бульона, представляет собой лактат, который является продуктом частичной диссоциации молочной кислоты в воде. Один типовой продукт, подлежащий отделению от ферментационного бульона, представляет собой формиат, который является продуктом частичной диссоциации муравьиной кислоты в воде. Ацетат, извлекаемый из ферментационного бульона, может быть легко преобразован в уксусную кислоту, которая является основным реагентом в процессе образования винилацетата, который также именуют винилацетатным мономером (VAM). VAM является важным промышленно выпускаемым продуктом, поскольку VAM может быть полимеризован с образованием поливинилацетата. Вследствие этого VAM играет важную роль в промышленном производстве полимеров и смол, которые используются для изготовления клеев, покрытий, красок, пленок, текстильных изделий, пены, изоляции для проводов и изоляции для кабелей. Уксусная кислота также может использоваться в пищевых продуктах и в химических реакциях в области химии кремнезема. Аналогичным образом лактат, извлекаемый из ферментационного бульона, может быть легко преобразован в молочную кислоту, которая является ингредиентом многих средств по уходу за кожей. Молочная кислота добавляется в средства по уходу за кожей для усиления эффекта осветления кожи, улучшения синтеза коллагена и эластина, а также для ускорения десквамации и обновления клеток. Ожидается, что растущий спрос на противоугревые и противовозрастные средства подстегнет спрос на молочную кислоту.

[13] Если не указано иное, следующие термины, используемые в данном описании, определены следующим образом:

[14] Термины «повышение эффективности», «повышенная эффективность» и тому подобные в тех случаях, когда они используются в отношении процесса ферментации, означают среди прочего увеличение одной или нескольких величин из скорости роста микроорганизмов, катализирующих ферментацию, показателя прироста и/или скорости получения продукта при повышенных концентрациях указанного продукта, увеличение объема требуемого продукта, получаемого на единицу объема потребляемого субстрата, увеличение скорости получения или объемов получения требуемого продукта, увеличение относительного содержания требуемого продукта, получаемого по сравнению с другими сопутствующими продуктами ферментации, снижение количества воды, потребляемой в технологическом процессе и снижение количества энергии, используемой в технологическом процессе.

[15] Термин «ферментация» следует понимать как метаболический процесс, приводящий к химическим изменениям в субстрате. Например, в процесс ферментации вводят один или несколько субстратов и получают один или несколько продуктов посредством применения одного или нескольких микроорганизмов. Термины «ферментация», «ферментация газов» и т. п. следует понимать как процесс, в который вводят один или несколько субстратов, таких как синтез-газ, получаемый посредством газификации, и получают один или несколько продуктов в результате использования одного или нескольких C1-фиксирующих микроорганизмов. Предпочтительно процесс ферментации включает применение одного или нескольких биореакторов. Процесс ферментации может описываться либо термином «периодический», либо термином «непрерывный». Термин «периодическая ферментация» используется для описания процесса ферментации, при котором биореактор заполняют исходным сырьем, например источником углерода, вместе с микроорганизмами, при этом продукты остаются в биореакторе до завершения ферментации. В «периодическом» процессе после завершения ферментации продукты извлекают, а биореактор очищают перед запуском следующего «периода». Термин «непрерывная ферментация» используется для описания процесса ферментации, в котором указанный процесс ферментации протекает в течение более длительных интервалов времени, а продукт и/или метаболит извлекают во время ферментации. Предпочтительно процесс ферментации является непрерывным.

[16] Подразумевается, что термин «не встречающийся в природе», применяемый в отношении микроорганизма, означает, что указанный

микроорганизм содержит по меньшей мере одну генетическую модификацию, не обнаруживаемую в природном штамме указанного вида, в том числе в штаммах дикого типа указанного вида. Микроорганизмы, не встречающиеся в природе, как правило, созданы в лаборатории или исследовательском центре.

5 **[17]** Термины «генетическая модификация», «генетическая альтерация» или «генная инженерия» в широком смысле обозначают воздействие на геном или нуклеиновые кислоты микроорганизма руками человека. Аналогичным образом термины «генетически модифицированный», «генетически альтерированный» или «генно-инженерный» обозначают микроорганизм, содержащий такие генетические
10 модификации, генетические альтерации или генно-инженерные элементы. Эти термины можно использовать для дифференциации созданного в лаборатории микроорганизма от микроорганизма, встречающегося в природе. К методам генетической модификации относится, например, экспрессия гетерологичного гена, инсерция или делеция гена или промотора, мутация нуклеиновой кислоты,
15 измененная экспрессия гена или инактивация, ферментная инженерия, направленная эволюция, конструирование на основе существующих знаний, способы случайного мутагенеза, генная перестановка и оптимизация кодонов.

[18] Метаболическая инженерия микроорганизмов, таких как *Clostridia*, может значительно расширять их способность к воспроизводству многих важных
20 горючих веществ и молекул химических соединений, отличающихся от естественных метаболитов, таких как этанол. Однако до недавнего времени *Clostridia* считались генетически неподатливыми и поэтому в целом закрытыми для интенсивных исследований в области метаболической инженерии. В последние годы было разработано несколько различных методов геномной инженерии для
25 *Clostridia*, в том числе методы на основе интронов (ClosTron) (Kuehne, *Strain Eng: Methods and Protocols*, 389-407, 2011), методы аллельного обмена (ACE) (Heap, *Nucl Acids Res*, 40: e59, 2012; Ng, *PLoS One*, 8: e56051, 2013), методы тройного скрещивания (Liew, *Frontiers Microbiol*, 7: 694, 2016), методы, опосредованные через I-SceI (Zhang, *Journal Microbiol Methods*, 108: 49-60, 2015), MazF (Al-Hinai, *Appl Environ Microbiol*, 78: 8112-8121, 2012) или другие (Argyros, *Appl Environ Microbiol*, 77: 8288-8294, 2011), Cre-Lox (Ueki, *mBio*, 5: e01636-01614, 2014) и CRISPR/Cas9 (Nagaraju, *Biotechnol Biofuels*, 9: 219, 2016). Однако по-прежнему особенно важной
30 задачей остается возможность итеративного внесения более чем нескольких генетических изменений по причине медленной и трудоемкой реализации цикла и
35 ограничений на возможность перенесения таких генетических методов на другие

виды. Кроме того, метаболизм C1 у *Clostridia* еще не настолько достаточно изучен, чтобы можно было надежно прогнозировать модификации, которые будут увеличивать до максимальных величин поглощение и конверсию C1, и изменения углерода/энергии/редокс-потенциала при синтезе продукта. Вследствие этого

5 введение целевых сигнальных путей в *Clostridia* остается кропотливым и трудоемким процессом.

[19] Термин «рекомбинантный» указывает на то, что нуклеиновая кислота, белок или микроорганизм является продуктом генетической модификации, инженерии или рекомбинации. В общем случае термин «рекомбинантный»

10 обозначает нуклеиновую кислоту, белок или микроорганизм, который содержит или кодирован генетическим материалом, полученным из различных источников, например, из двух или нескольких различных штаммов или видов микроорганизмов.

[20] Термин «дикий тип» обозначает типовую форму организма, штамма, гена или характеристики в том виде, в каком они встречаются в природе, в отличие

15 от мутантных или вариантных форм.

[21] Термин «эндогенный» обозначает нуклеиновую кислоту или белок, который присутствует или экспрессируется в микроорганизме дикого типа или родительском микроорганизме, из которого получен микроорганизм по данному изобретению. Например, эндогенный ген представляет собой ген, который нативно

20 присутствует в микроорганизме дикого типа или родительском микроорганизме, из которого получен микроорганизм по данному изобретению. В одном варианте реализации изобретения экспрессией эндогенного гена можно управлять с помощью экзогенного регуляторного элемента, например, экзогенного промотора.

[22] Термин «экзогенный» обозначает нуклеиновую кислоту или белок, который берет начало вне микроорганизма по данному изобретению. Например, экзогенный ген или фермент может быть создан искусственно или рекомбинантно и введен в микроорганизм по данному изобретению или экспрессирован в нем. Экзогенный ген или фермент также может быть выделен из гетерологичного

25 микроорганизма и введен в микроорганизм по данному изобретению или экспрессирован в нем. Экзогенные нуклеиновые кислоты могут быть адаптированы с возможностью интеграции в геном микроорганизма по данному изобретению, или сохранения во внехромосомном состоянии в микроорганизме по данному изобретению, например, в плазмиде.

30

[23] Термин «гетерологичный» обозначает нуклеиновую кислоту или белок, который не присутствует в микроорганизме дикого типа или родительском микроорганизме, из которого получен микроорганизм по данному изобретению. Например, гетерологичный ген или фермент может быть получен из другого штамма или видов и введен в микроорганизм по данному изобретению или экспрессирован в нем. Гетерологичный ген или фермент может быть введен в микроорганизм по данному изобретению или экспрессирован в нем в той форме, в которой он встречается в указанных других штаммах или видах. В альтернативном варианте реализации изобретения гетерологичный ген или фермент может быть модифицирован определенным образом, например, посредством оптимизации его кодонов для экспрессии в микроорганизме по данному изобретению или посредством инженерии с изменением его функции, например с изменением направления активности фермента или изменением субстратной специфичности.

[24] Термины «полинуклеотид», «нуклеотид», «нуклеотидная последовательность», «нуклеиновая кислота» и «олигонуклеотид» используются взаимозаменяемо. Они обозначают полимерную форму нуклеотидов любой длины, как дезоксирибонуклеотидов, так и рибонуклеотидов, либо их аналогов. Полинуклеотиды могут обладать любой трехмерной структурой и могут выполнять любую функцию, известную или неизвестную. Ниже приведены неограничивающие примеры полинуклеотидов: кодирующие или не кодирующие области гена или фрагмента гена, локусы (локус), определяемые при анализе сцепления, экзоны, интроны, матричная РНК (мРНК), транспортная РНК, рибосомальная РНК, короткая интерферирующая РНК (киРНК), короткая шпилечная РНК (кшРНК), микроРНК (миРНК), рибозимы, кДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенная ДНК с любой последовательностью, выделенная РНК с любой последовательностью, нуклеотидные зонды и праймеры. Полинуклеотид может содержать один или несколько модифицированных нуклеотидов, например, метилированных нуклеотидов или аналогов нуклеотидов. Модификации нуклеотидной структуры, при их наличии, могут быть внедрены до или после сборки полимера. Нуклеотидная последовательность может быть прервана ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид может быть дополнительно модифицирован после полимеризации, например, посредством конъюгации с метящим компонентом.

[25] В контексте данного документа термин «экспрессия» обозначает процесс, посредством которого полинуклеотид транскрибируется с ДНК-матрицы

(например, в мРНК или другой РНК-транскрипт) и/или процесс, посредством которого транскрибированная мРНК последовательно транслируется в пептиды, полипептиды, или белки. Транскрипты и закодированные полипептиды могут совместно именоваться «генными продуктами».

5 **[26]** Термины «полипептид», «пептид» и «белок» в данном документе используются взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может являться линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты и он может прерываться соединениями, не являющимися аминокислотами. Эти термины также охватывают

10 аминокислотный полимер, который был модифицирован; например, образованием дисульфидной связи, гликозилированием, липидированием, ацетилированием, фосфорилированием или с помощью любого иного воздействия, например, посредством конъюгации с метящим компонентом. В данном документе к термину «аминокислота» относятся природные и/или не встречающиеся в природе или

15 синтетические аминокислоты, в том числе глицин и D- или L-оптические изомеры, а также аналоги аминокислот и пептидомиметики.

[27] Термин «ферментативная активность» или просто «активность» в широком смысле обозначает ферментную активность, среди прочего активность фермента, количество фермента или доступность фермента для катализирования

20 химической реакции. Вследствие этого к термину «увеличение» ферментативной активности относится увеличение активности фермента, увеличение количества фермента или повышение доступности фермента для катализирования химической реакции. Аналогичным образом к термину «уменьшение» ферментативной активности относится уменьшение активности фермента, уменьшение количества

25 фермента или уменьшение доступности фермента для катализирования химической реакции.

[28] Термин «мутированный» обозначает нуклеиновую кислоту или белок, который был модифицирован в микроорганизме по данному изобретению по сравнению с микроорганизмом дикого типа или родительском микроорганизмом, из

30 которого получен микроорганизм по данному изобретению. В одном варианте реализации изобретения мутация может представлять собой делецию, инсерцию или замену в гене, кодирующем фермент. В другом варианте реализации изобретения, мутация может представлять собой делецию, инсерцию или замену одной или нескольких аминокислот в ферменте.

[29] В частности, термин «прерывающая мутация» обозначает мутацию, которая уменьшает или устраняет (то есть «прерывает») экспрессию или активность гена или фермента. Прерывающая мутация может частично деактивировать, полностью деактивировать, или удалять ген или фермент. Прерывающая мутация может представлять собой любую мутацию, которая уменьшает, предотвращает или блокирует биосинтез продукта, получаемого с помощью фермента. Прерывающая мутация может представлять собой нокаутную (KO) мутацию. Прерывание также может представлять собой нокадаунную (KD) мутацию, снижающую, но не полностью устраняющую экспрессию или активность гена, белка или фермента. Хотя KO-мутации в целом эффективны для увеличения выхода продукта, иногда они приводят к ухудшениям в виде дефектов роста или генетической нестабильности, которые преобладают над преимуществами, в особенности для продуктов, не связанных с ростом. К прерывающей мутации может относиться, например, мутация в гене, кодирующем фермент, мутация в генетическом регуляторном элементе, вовлеченном в экспрессию гена, кодирующего фермент, введение нуклеиновой кислоты, которая продуцирует белок, уменьшающий или ингибирующий активность фермента, или введение нуклеиновой кислоты (например, антисмысловой РНК, миРНК, CRISPR) или белка, который ингибирует экспрессию фермента. Прерывающая мутация может быть внесена с применением любого способа, известного в данной области техники.

[30] Внесение прерывающей мутации приводит в результате к получению микроорганизма по данному изобретению, который продуцирует нецелевой продукт или по сути нецелевой продукт, или уменьшенное количество целевого продукта по сравнению с родительским микроорганизмом, из которого получен микроорганизм по данному изобретению. Например, микроорганизм по данному изобретению может не продуцировать нецелевой продукт или продуцировать по меньшей мере на около 1 %, 3 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % или 95 % менее целевого продукта, чем родительский микроорганизм. Например, микроорганизм по данному изобретению может продуцировать менее чем около 0,001, 0,01, 0,10, 0,30, 0,50 или 1,0 г/л целевого продукта.

[31] Термин «оптимизация кодонов» обозначает мутацию нуклеиновой кислоты, например гена, для оптимизированной или улучшенной трансляции нуклеиновой кислоты в конкретном штамме или виде микроорганизма. Оптимизация кодонов может приводить к увеличенным значениям скорости трансляции или к более высокой точности трансляции. В предпочтительном варианте реализации

гены по данному изобретению содержат оптимизацию кодонов для экспрессии в *Clostridium*, в частности в *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. В другом предпочтительном варианте реализации изобретения гены по данному изобретению содержат оптимизацию кодонов для экспрессии в *Clostridium autoethanogenum* LZ1561, который был депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур DSMZ под регистрационным номером DSM23693.

[32] Термин «сверхэкспрессируемый» обозначает увеличение экспрессии нуклеиновой кислоты или белка в микроорганизме по данному изобретению по сравнению с микроорганизмом дикого типа или родительском микроорганизмом, из которого получен микроорганизм по данному изобретению. Сверхэкспрессия может достигаться с помощью любых средств, известных в данной области техники, в том числе с помощью изменения количества копий гена, скорости транскрипции гена, скорости трансляции гена или скорости разрушения фермента.

[33] К термину «варианты» относятся нуклеиновые кислоты и белки, в которых последовательность отличается от последовательности исходной нуклеиновой кислоты и белка, например, последовательности исходной нуклеиновой кислоты и белка, раскрытой в предшествующем уровне техники или приведенной в качестве примера в данном документе. Данное изобретение может быть реализовано на практике с применением вариантов нуклеиновых кислот или белков, которые выполняют по сути ту же функцию, что и исходная нуклеиновая кислота или белок. Например, вариант белка может выполнять по сути ту же функцию или катализировать по сути ту же реакцию, что и исходный белок. Вариант гена может кодировать тот же или по сути тот же белок, что и исходный ген. Вариант промотора может обладать по сути такой же способностью стимулировать экспрессию одного или нескольких генов, что и исходный промотор.

[34] Такие нуклеиновые кислоты или белки в данном документе могут именоваться «функционально эквивалентными вариантами». Например, функционально эквивалентные варианты нуклеиновой кислоты могут содержать аллельные варианты, фрагменты гена, мутированные гены, полиморфизмы и тому подобное. Гомологичные гены из других микроорганизмов также являются примерами функционально эквивалентных вариантов. К ним относятся гомологичные гены у таких видов, как *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii* или *Clostridium ljungdahlii*, подробная информация о которых находится в

свободном доступе на таких веб-сайтах, как Genbank или NCBI. К функционально эквивалентным вариантам также относятся нуклеиновые кислоты, последовательность которых изменяется в результате оптимизации кодонов для конкретного микроорганизма. Функционально эквивалентный вариант нуклеиновой кислоты предпочтительно содержит по меньшей мере около 70 %, около 80 %, около 85 %, около 90 %, около 95 %, около 98 % или более идентичности последовательности нуклеиновой кислоты (процент гомологии) с исходной нуклеиновой кислотой. Функционально эквивалентный вариант белка предпочтительно содержит по меньшей мере около 70 %, около 80 %, около 85 %, около 90 %, около 95 %, около 98 % или более аминокислотной идентичности (процент гомологии) с исходным белком. Функциональная эквивалентность варианта нуклеиновой кислоты или белка может быть оценена с использованием любого способа, известного в данной области техники.

[35] Термин «комплементарность» обозначает способность нуклеиновой кислоты образовывать водородные связи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты по традиционному типу Уотсона-Крика либо по другим нетрадиционным типам. Процент комплементарности указывает на процент остатков в молекуле нуклеиновой кислоты, которые могут образовывать водородные связи (например, спаривание оснований по Уотсону-Крику) со второй последовательностью нуклеиновой кислоты (например, 5, 6, 7, 8, 9, 10 из 10 означает 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % и 100 % комплементарности). Термин «совершенно комплементарный» означает, что все смежные остатки нуклеотидной последовательности образуют водородную связь с таким же количеством смежных остатков во второй нуклеотидной последовательности. В контексте данного документа термин «по сути комплементарный» означает степень комплементарности, составляющую по меньшей мере 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % для области из 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более нуклеотидов, или обозначает две нуклеиновые кислоты, которые гибридизуются в жестких условиях.

[36] В контексте данного документа термин «жесткие условия» для гибридизации обозначает условия, при которых нуклеиновая кислота, обладающая комплементарностью к целевой последовательности, преимущественно гибридизуется с целевой последовательностью и по сути не гибридизуется с последовательностями, не являющимися целевыми. Жесткие условия в общем случае зависят от последовательности и изменяются в зависимости от ряда

факторов. В общем случае чем длиннее последовательность, тем выше температура, при которой последовательность специфически гибридизуется со своей целевой последовательностью. Неограничивающие примеры жестких условий хорошо известны в данной области техники (например, из работы (Tijssen, Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology-hybridization with nucleic acid probes, Second Chapter "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assay," Elsevier, N.Y, 1993)).

[37] Термин «гибридизация» обозначает химическую реакцию, при которой происходит химическое превращение одного или нескольких полинуклеотидов с образованием комплекса, который стабилизируется посредством водородных связей между основаниями нуклеотидных остатков. Водородная связь может образовываться посредством спаривания оснований по Уотсону-Крику, хугстиновского связывания или любым другим способом, специфичным по отношению к последовательности. Указанный комплекс может содержать две нити, образующие двуцепочечную структуру, три или более нитей, образующих многоцепочечный комплекс, одну самогибридизирующуюся нить или любое их сочетание. Реакция гибридизации может представлять собой этап в более обширном процессе, например, при инициации ПЦР или расщеплении полинуклеотида посредством фермента. Последовательность, способная гибридизоваться с заданной последовательностью, именуется «комплементарной цепью» заданной последовательности.

[38] Нуклеиновые кислоты могут быть доставлены в микроорганизм по данному изобретению с применением любого способа, известного в данной области техники. Например, нуклеиновые кислоты могут быть доставлены в виде чистых нуклеиновых кислот, или могут составлять смеси с одной или несколькими добавками, например, липосомами. Нуклеиновые кислоты могут представлять собой ДНК, РНК, кДНК или их сочетания, по необходимости. В определенных вариантах реализации изобретения, могут применяться ингибиторы ограничения. Дополнительные векторы могут содержать плазмиды, вирусы, бактериофаги, космиды и искусственные хромосомы. В предпочтительном варианте реализации изобретения нуклеиновые кислоты доставляют в микроорганизм по данному изобретению с использованием плазмиды. Например, преобразование (в том числе трансдукция или трансфекция) может быть достигнуто посредством электропорации, ультразвуфикации, опосредованной полиэтиленгликолем трансформации, химической или естественной компетенции, трансформации

протопластов, профаговой индукции или конъюгации. В некоторых вариантах реализации изобретения с активными системами рестрикционных ферментов, может существовать необходимость метилирования нуклеиновой кислоты перед введением нуклеиновой кислоты в микроорганизм.

- 5 **[39]** Кроме того, нуклеиновые кислоты могут быть сконструированы с возможностью содержания регуляторного элемента, например промотора, для увеличения или управления экспрессией конкретной нуклеиновой кислоты. Промотор может являться конститутивным промотором или индуцируемым промотором. В идеальном случае промотор представляет собой промотор пути
- 10 Вуда-Льюнгаля, промотор ферредоксина, промотор пируват:ферредоксин-оксидоредуктазы, промотор оперона комплекса Rnf, промотор оперона АТФ-синтазы или промотор оперона фосфотрансацетилазы/ацетаткиназы.

- [40]** Термин «микроорганизм» обозначает микроскопический организм, в частности, бактерию, архею, вирус или грибок. Микроорганизм по данному
- 15 изобретению представляет собой, как правило, бактерию. В контексте данного документа следует понимать, что термин «микроорганизм» охватывает значение термина «бактерия».

- [41]** Термин «родительский микроорганизм» обозначает микроорганизм, используемый для создания микроорганизма по данному изобретению.
- 20 Родительский микроорганизм может представлять собой микроорганизм, встречающийся в природе (то есть микроорганизм дикого типа) или микроорганизм, который был ранее модифицирован (то есть мутантный или рекомбинантный микроорганизм). Микроорганизм по данному изобретению может быть модифицирован с возможностью экспрессии или сверхэкспрессии одного или
- 25 нескольких ферментов, которые не были экспрессированы или сверхэкспрессированы в родительском микроорганизме. Аналогичным образом микроорганизм по данному изобретению может быть модифицирован с возможностью содержания одного или нескольких генов, которые не содержались в родительском микроорганизме. Микроорганизм по данному изобретению может
- 30 также быть модифицирован с возможностью не экспрессировать или экспрессировать меньшие количества одного или нескольких ферментов, которые были экспрессированы в родительском микроорганизме. В одном варианте реализации изобретения родительский микроорганизм представляет собой *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. В одном

варианте реализации изобретения родительский микроорганизм представляет собой *Clostridium autoethanogenum* LZ1561, который 7 июня 2010 г. в соответствии с условиями Будапештского договора был депонирован под регистрационным номером DSM23693 в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ), расположенной по адресу: Инхоффенштрассе 7В, D-38124 Брауншвейг, Германия. Этот штамм описан в международной заявке на патент № PCT/NZ2011/000144, опубликованной как WO 2012/015317.

[42] Термин «получен из» указывает на то, что нуклеиновая кислота, белок или микроорганизм были модифицированы или адаптированы из другой (например, родительской или дикого типа) нуклеиновой кислоты, белка или микроорганизма с тем, чтобы получить новую нуклеиновую кислоту, белка или микроорганизм. К таким модификациям или адаптациям, как правило, относится инсерция, делеция, мутация или замена нуклеиновых кислот или генов. Как правило, микроорганизм по данному изобретению получен из родительского микроорганизма. В одном варианте реализации изобретения микроорганизм по данному изобретению получен из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. В одном варианте реализации изобретения микроорганизм по данному изобретению получен из *Clostridium autoethanogenum* LZ1561, который был депонирован под регистрационным номером DSMZ DSM23693.

[43] Микроорганизм по данному изобретению можно также классифицировать на основании функциональных характеристик. Например, микроорганизм по данному изобретению может представлять собой C1-фиксирующий микроорганизм, анаэроб, ацетоген, этанологен, карбоксидотроф и/или метанотроф или может быть получен из них. В Таблице 1 приведен иллюстративный перечень микроорганизмов и указаны их функциональные характеристики.

Таблица 1

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

¹ *Acetobacterium woodi* может продуцировать этанол из фруктозы, а не из газа.

² Не было исследовано, может ли быть выращен *Clostridium magnum* на CO.

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

⁴ Не было исследовано, может ли быть выращен *Sporomusa ovata* на CO.

⁵ Не было исследовано, может ли быть выращен *Sporomusa silvacetica* на CO.

⁶ Не было исследовано, может ли быть выращен *Sporomusa sphaeroides* на CO.

[44] Термин «Вуд-Льюнгдаль» обозначает путь фиксации углерода Вуда-Льюнгдаля, описанный, например, в работе (Ragsdale, *Biochim Biophys Acta*, 1784: 1873-1898, 2008). Термин «микроорганизмы Вуда-Льюнгдаля» ожидаемо обозначает микроорганизмы, содержащие путь Вуда-Льюнгдаля. В общем случае микроорганизм по данному изобретению содержит нативный путь Вуда-Льюнгдаля. В данном документе путь Вуда-Льюнгдаля может являться нативным немодифицированным путем Вуда-Льюнгдаля или может являться путем Вуда-Льюнгдаля с некоторой степенью генетической модификации (например, сверхэкспрессией, гетерологичной экспрессией, нокаутом и т.п.) при условии, что он продолжает использоваться для конверсии CO, CO₂ и/или H₂ в ацетил-КоА.

[45] Термин «C1» обозначает молекулу, содержащую один атом углерода, например, CO, CO₂, CH₄ или CH₃OH. Термин «C1-оксигенат» обозначает одноуглеродную молекулу, которая также содержит по меньшей мере один атом кислорода, например, CO, CO₂ или CH₃OH. Термин «источник C1-углерода» обозначает одноуглеродную молекулу, которая служит частичным или единственным источником углерода для микроорганизма по данному изобретению. Например, источник C1-углерода может содержать одно или несколько соединений, выбранных из CO, CO₂, CH₄, CH₃OH или CH₂O₂. Источник C1-углерода предпочтительно содержит одно или оба соединения CO и CO₂. Термин «C1-фиксирующий микроорганизм» обозначает микроорганизм, способный продуцировать один или несколько продуктов из источника C1-углерода. Как правило, микроорганизм по данному изобретению представляет собой C1-фиксирующую бактерию. В одном варианте реализации изобретения микроорганизм по данному изобретению получен из C1-фиксирующего микроорганизма, приведенного в Таблице 1.

[46] Термин «анаэроб» обозначает микроорганизм, не требующий кислорода для роста. Анаэроб может реагировать отрицательно или даже погибнуть в присутствии кислорода выше определенного порогового значения. Однако некоторые анаэробы способны переносить низкие уровни кислорода (например, 0,000001 % - 5 % кислорода). Как правило, микроорганизм по данному изобретению является анаэробом. В одном варианте реализации изобретения микроорганизм по данному изобретению получен из анаэроба, приведенного в Таблице 1.

[47] Термин «ацетогены» обозначает облигатно-анаэробные бактерии, которые используют путь Вуда-Льюнгдаля в качестве основного механизма для

сохранения энергии и синтеза ацетил-CoA продуктов и производных от ацетил-CoA продуктов, например, ацетата (Ragsdale, *Biochim Biophys Acta*, 1784: 1873-1898, 2008). В частности, ацетогены используют путь Вуда-Льюнгдала в качестве (1) механизма для восстановительного синтеза ацетил-KoA 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 ацетогены, встречающиеся в природе, являются C1-фиксирующими анаэробными автотрофными и неметанотрофными. Как правило, микроорганизм по данному изобретению представляет собой ацетоген. В одном варианте реализации изобретения микроорганизм по данному изобретению получен из ацетогена, приведенного в Таблице 1.

[48] Термин «этанологен» обозначает микроорганизм, который продуцирует или способен продуцировать этанол. Как правило, микроорганизм по данному изобретению представляет собой этанологен. В одном варианте реализации изобретения микроорганизм по данному изобретению получен из этанологена, приведенного в Таблице 1.

[49] Термин «автотроф» обозначает микроорганизм, способный расти в отсутствие органического углерода. Вместо этого автотрофы используют источники неорганического углерода, например, CO и/или CO₂. Как правило, микроорганизм по данному изобретению представляет собой автотроф. В одном варианте реализации изобретения микроорганизм по данному изобретению получен из автотрофа, приведенного в Таблице 1.

[50] Термин «карбоксидотроф» обозначает микроорганизм, способный использовать CO в качестве единственного источника углерода и энергии. Как правило, микроорганизм по данному изобретению представляет собой карбоксидотроф. В одном варианте реализации изобретения микроорганизм по данному изобретению получен из карбоксидотрофа, приведенного в Таблице 1.

[51] Термин «метанотроф» обозначает микроорганизм, способный использовать метан в качестве единственного источника углерода и энергии. В определенных вариантах реализации изобретения микроорганизм по данному изобретению представляет собой метанотроф или получен из метанотрофа. В других вариантах реализации изобретения микроорганизм по данному изобретению не является метанотрофом или не является производным от метанотрофа.

[52] В более широком смысле микроорганизм по данному изобретению может быть получен из микроорганизма любого рода или вида, приведенного в таблице 1. Например, микроорганизм может быть представителем рода, выбранного из группы, состоящей из *Acetobacterium*, *Alkalibaculum*, *Blautia*, *Butyribacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Moorella*, *Oxobacter*, *Sporomusa* и *Thermoanaerobacter*. В частности, микроорганизм может быть получен из родительской бактерии, выбранной из группы, состоящей из *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia producta*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium coskatii*, *Clostridium drakei*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium magnum*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium scatologenes*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermoautotrophica*, *Moorella thermoacetica*, *Oxobacter pfennigii*, *Sporomusa ovata*, *Sporomusa silvacetica*, *Sporomusa sphaeroides* и *Thermoanaerobacter kivui*.

[53] В одном варианте реализации изобретения микроорганизм по данному изобретению получен из кластера *Clostridia*, содержащего виды *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei*. Этих виды впервые описаны и исследованы в работах (Abrini, *Arch Microbiol*, 161: 345-351, 1994 (*Clostridium autoethanogenum*)), (Tanner, *Int J System Bacteriol*, 43: 232-236, 1993 (*Clostridium ljungdahlii*)) и (Huhnke, WO 2008/028055 (*Clostridium ragsdalei*)).

[54] Указанные три вида характеризуются значительным сходством. В частности, все эти виды являются C1-фиксирующими анаэробными ацетогенными, этанологенными и карбоксидотрофными представителями рода *Clostridium*. Эти виды обладают аналогичными генотипами и фенотипами, способами сохранения энергии и ферментативным метаболизмом. Кроме того, эти виды объединены в кластер гомологичной группы I клостридиальной рРНК, содержащий 16S рРНК ДНК, которая идентична более чем на 99 %, содержание G + C в ДНК составляет около 22 мол. % -30 мол. %, они грамположительны, характеризуются подобной морфологией и размером (размер логарифмически растущих клеток находится в интервале между 0,5- 0,7 x 3- 5 мкм), являются мезофильными (оптимальный рост при температуре 30 °C - 37 °C), характеризуются подобными диапазонами pH около 4-7,5 (при оптимальном значении pH около 5,5-6), не содержат цитохромов и сохраняют энергию посредством комплекса Rnf. Кроме того, как было показано, у этих видов происходит восстановление карбоновых кислот с образованием их соответствующих спиртов (Perez, *Biotechnol Bioeng*, 110: 1066-1077, 2012). Важно отметить, что все эти виды также демонстрируют сильный автотрофный рост на CO-

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.

[55] Однако эти три вида также обладают целым рядом различий. Эти виды были выделены из разных источников: *Clostridium autoethanogenum* выделен из кишечника кролика, *Clostridium ljungdahlii* выделен из отходов птицеферм и *Clostridium ragsdalei* выделен из осадочных отложений пресных водоемов. Эти 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, эти виды отличаются по ауксотрофии к определенным витаминам (например, тиамину, биотину). Указанные виды отличаются по нуклеотидным и аминокислотным последовательностям генов и белков пути Вуда-Льюнгаля, хотя было обнаружено, что общая организация и количество таких генов и белков одинаковы у всех видов (Köpke, *Curr Opin Biotechnol*, 22: 320-325, 2011).

[56] Поэтому в заключение можно отметить, что 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 C1-фиксирующих, анаэробных ацетогенных, этанологенных и карбоксидотрофных представителей рода *Clostridium*. Однако, поскольку в действительности эти виды отличаются, генетическая модификация или воздействие в одном из этих видов может не иметь идентичного эффекта в другом из этих видов. Например, могут наблюдаться различия в росте, производительности или продуцировании продукта.

[57] Микроорганизм по данному изобретению также может быть получен из изолята или мутанта *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. К изолятам и мутантам *Clostridium autoethanogenum* относится JA1-1 (DSM10061) (Abrini, *Arch Microbiol*, 161: 345-351, 1994), LZ1560 (DSM19630) (WO 2009/064200) и LZ1561 (DSM23693) (WO 2012/015317). К изолятам и мутантам *Clostridium ljungdahlii* относится 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). К изолятам и мутантам

Clostridium ragsdalei относится PI 1 (ATCC BAA-622, ATCC PTA-7826) (WO 2008/028055).

[58] Термин «субстрат» обозначает источник углерода и/или источник энергии для микроорганизма по данному изобретению. Как правило, субстрат является газообразным и содержит источник C1-углерода, например CO, CO₂ и/или CH₄. Субстрат предпочтительно содержит источник C1-углерода в виде CO или CO + CO₂. Субстрат может также содержать другие неуглеродные компоненты, например, H₂, N₂ или электроны.

[59] В целом, субстрат содержит по меньшей мере некоторое количество CO, например, около 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мол. % CO. Субстрат может содержать CO в диапазоне, например, около 20-80, 30-70 или 40-60 мол. % CO. Предпочтительно субстрат содержит около 40-70 мол. % CO (например, газ сталелитейных заводов или доменный газ), около 20-30 мол. % CO (например, газ кислородного конвертера) или около 15-45 мол. % CO (например, синтез-газ). В некоторых вариантах реализации субстрат может содержать относительно низкое количество CO, например, около 1-10 мол. % или 1-20 мол. % CO. Микроорганизм по данному изобретению, как правило, преобразует по меньшей мере часть CO в субстрате в продукт. В некоторых вариантах реализации изобретения субстрат не содержит или по сути не содержит (<1 мол. %) CO.

[60] Субстрат может содержать некоторое количество H₂. Например, субстрат может содержать около 1, 2, 5, 10, 15, 20 или 30 мол. % H₂. В некоторых вариантах реализации изобретения субстрат может содержать относительно высокое количество H₂, например, около 60, 70, 80 или 90 мол. % H₂. В других вариантах реализации субстрат не содержит или по сути не содержит (<1 мол. %) H₂.

[61] Субстрат может содержать некоторое количество CO₂. Например, субстрат может содержать около 1-80 мол. % или 1-30 мол. % CO₂. В некоторых вариантах реализации изобретения субстрат может содержать менее чем около 20, 15, 10 или 5 мол. % CO₂. В другом варианте реализации изобретения субстрат не содержит или по сути не содержит (<1 мол. %) CO₂.

[62] Хотя, как правило, субстрат является газообразным, он также может быть представлен в альтернативных формах. Например, субстрат может быть растворен в жидкости, насыщенной CO-содержащим газом, с использованием

генератора микропузырьковой дисперсии. В качестве еще одного примера субстрат может быть адсорбирован на твердой подложке.

[63] Субстрат и/или источник C1-углерода может представлять собой отработанный газ, полученный в виде побочного продукта промышленного процесса или из какого-либо другого источника, например, из выхлопных газов автомобилей или при газификации биомассы. В определенных вариантах реализации изобретения промышленный процесс выбран из группы, состоящей из: черной металлургии, например, сталелитейного производства, цветной металлургии, нефтепереработки, газификации угля, производства электроэнергии, производства чистого углерода, производства аммиака, производства метанола и производства кокса. В таких вариантах реализации изобретения субстрат и/или источник C1-углерода может быть захвачен в ходе промышленного процесса перед его выбросом в атмосферу с применением любого удобного способа.

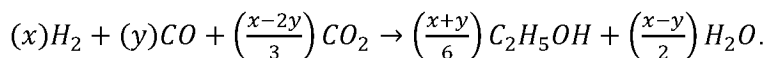
[64] Субстрат и/или источник C1-углерода может представлять собой синтез-газ, например, синтез-газ, полученный при газификации угля или из остатков нефтепереработки, газификации биомассы или лигноцеллюлозного материала или при риформинге природного газа. В другом варианте реализации изобретения синтез-газ может быть получен в результате газификации твердых бытовых отходов или твердых промышленных отходов.

[65] Состав субстрата может оказывать значительное влияние на эффективность и/или стоимость реакции. Так, например, присутствие кислорода (O_2) может понижать эффективность процесса анаэробной ферментации. В зависимости от состава субстрата может потребоваться очистка, промывка или фильтрация субстрата для удаления нежелательных примесей, например, токсинов, нежелательных компонентов или частиц пыли, и/или для увеличения концентрации требуемых компонентов.

[66] В отдельных вариантах реализации изобретения наличие водорода приводит к повышению общей эффективности процесса ферментации.

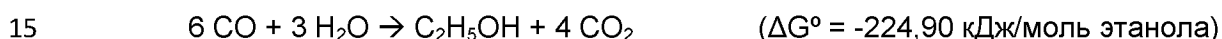
[67] Состав синтез-газа может быть улучшен для получения требуемого или оптимального соотношения $H_2:CO:CO_2$. Состав синтез-газа можно улучшать за счет регулирования исходного сырья, подаваемого в процесс газификации. Требуемое соотношение $H_2:CO:CO_2$ зависит от требуемого продукта ферментации в процессе ферментации. Для этанола оптимальное соотношение $H_2:CO:CO_2$

является следующим: $(x):(y):(\frac{x-2y}{3})$, где $x > 2y$, для соответствия стехиометрии при получении этанола



[68] Осуществление процесса ферментации в присутствии водорода обеспечивает дополнительное преимущество, которое заключается в уменьшении количества CO_2 , получаемого в процессе ферментации. Например, газообразный субстрат, содержащий минимальное количество H_2 , как правило, превращается в этанол и CO_2 в следующем стехиометрическом соотношении [$6 CO + 3 H_2O \rightarrow C_2H_5OH + 4 CO_2$]. По мере увеличения количества водорода, используемого C1-фиксирующими бактериями, количество получаемого CO_2 уменьшается [например, $2 CO + 4 H_2 \rightarrow C_2H_5OH + H_2O$].

[69] Когда CO является единственным источником углерода и энергии для получения этанола, часть углерода теряется на образование CO_2 согласно уравнению:



[70] При увеличении количества H_2 , доступного в субстрате, количество получаемого CO_2 уменьшается. При стехиометрическом соотношении 2:1 ($H_2:CO$), образование CO_2 полностью исключено.



[71] Термин «поток» обозначает любой субстрат, который можно направлять, например, из одного процесса в другой, из одного модуля в другой и/или из одного процесса в средство улавливания углерода.

25 **[72]** В контексте данного документа термин «реагенты» обозначает вещества, которые принимают участие и подвергается изменению в процессе химической реакции. В конкретных вариантах реализации изобретения к реагентам относится среди прочего CO и/или H_2 .

[73] В контексте данного документа термин «ингибиторы микроорганизмов» обозначает одно или несколько компонентов, которые замедляют или препятствуют конкретной химической реакции или иному процессу с участием микроорганизмов. В определенных вариантах реализации изобретения ингибиторы микроорганизмов содержат среди прочего кислород (O_2), цианистый водород (HCN), ацетилен (C_2H_2) и БТЭК (бензол, толуол, этилбензол, ксилол).

[74] В контексте данного документа термины «ингибитор катализатора», «ингибитор адсорбента» и т. п. обозначают одно или несколько веществ, которые снижают скорость или препятствуют химической реакции. В определенных вариантах реализации изобретения ингибиторы катализаторов и/или адсорбентов могут содержать среди прочего сероводород (H_2S) и карбонилсульфид (COS).

[75] Термины «процесс удаления», «модуль удаления», «модуль очистки» и тому подобное указывают на технологии, которые способны преобразовывать и/или удалять ингибиторы микроорганизмов и/или ингибиторы катализатора из газового потока. В определенных вариантах реализации изобретения ингибиторы катализатора должны удаляться с помощью входного модуля удаления, с тем чтобы предотвращать ингибирование одного или нескольких катализаторов в выходном модуле удаления.

[76] В контексте данного документа термины «компоненты», «примеси» и тому подобное обозначают ингибиторы микроорганизмов и/или ингибиторы катализаторов, которые могут находиться в газовом потоке. В определенных вариантах реализации изобретения компоненты содержат среди прочего соединения серы, ароматические соединения, алкины, алкены, алканы, олефины, соединения азота, фосфорсодержащие соединения, мелкие частицы, твердые примеси, твердые частицы, кислород, галогенированные соединения, кремнийсодержащие соединения, карбонилы, металлы, спирты, сложные эфиры, кетоны, пероксиды, альдегиды, эфиры и смолы.

[77] Термины «очищенный газ», «очищенный поток» и тому подобные обозначают поток газа, который пропускают через по меньшей мере один модуль удаления, и из которого удаляют один или несколько компонентов и/или их выполняют их конверсию.

[78] Термин «требуемая композиция» использован для обозначения требуемого уровня и типов компонентов в веществе, в том числе, например,

газовом потоке, содержащем синтез-газ. Конкретнее говоря, считается, что газ имеет «требуемую композицию», если он содержит определенный компонент (например, CO , H_2 и/или CO_2) и/или содержит определенный компонент в определенной пропорции, и/или не содержит определенный компонент (например, компонент, вредный для микроорганизмов), и/или не содержит определенный компонент в определенной пропорции. Могут рассматриваться более одного компонента при определении того, содержит ли газовый поток требуемую композицию.

[79] Композиция субстрата может оказывать значительное влияние на эффективность и/или стоимость химической реакции. Так, например, присутствие кислорода (O_2) может понижать эффективность процесса анаэробной ферментации. В зависимости от состава субстрата может потребоваться очистка, промывка или фильтрация субстрата для удаления нежелательных примесей, например, токсинов, нежелательных компонентов или частиц пыли, и/или для увеличения концентрации требуемых компонентов.

[80] В контексте данного документа термин «улавливание углерода» обозначает процесс удаления соединений углерода, в том числе CO_2 и/или CO из потока, содержащего CO_2 и/или CO , и либо:

превращения CO_2 и/или CO в продукты; либо

превращения CO_2 и/или CO в вещества, пригодные для долгосрочного хранения; или

связывания CO_2 и/или CO в веществах, пригодных для долгосрочного хранения;

либо сочетания этих процессов.

[81] В некоторых вариантах реализации изобретения ферментацию проводят при отсутствии углеводных субстратов, таких как сахар, крахмал, лигнин, целлюлоза или гемицеллюлоза.

[82] Микроорганизм по данному изобретению может быть культивирован потоком газа с получением одного или нескольких продуктов. Например, микроорганизм по данному изобретению может продуцировать или может быть генетически сконструирован с возможностью продуцирования этанола (WO 2007/117157), ацетата (WO 2007/117157), 1-бутанола (WO 2008/115080, WO

2012/053905 и WO 2017/066498), бутирата (WO 2008/115080), 2,3-бутандиола (WO 2009/151342 и WO 2016/094334), 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), терпенов, в том числе изопрена (WO 2013/180584), жирных кислот (WO 2013/191567), 2-бутанола (WO 2013/185123), 1,2-пропандиола (WO 2014/036152), 1-пропанола (WO 2014/036152 и WO 2017/066498), 1-гексанола (WO 2017/066498), 1-октанола (WO 2017/066498), продуктов, полученных из хоризмата (WO 2016/191625), 3-гидроксibuтирата (WO 2017/066498), 1,3-бутандиола (WO 2017/066498), 2-гидроксиизобутирата или 2-гидроксиизомасляной кислоты (WO 2017/066498), изобутилена (WO 2017/066498), адипиновой кислоты (WO 2017/066498), 1,3-гександиола (WO 2017/066498), 3-метил-2-бутанола (WO 2017/066498), 2-бутен-1-ола (WO 2017/066498), изовалерата (WO 2017/066498), изоамилового спирта (WO 2017/066498) и моноэтиленгликоля (WO 2019/126400). В определенных вариантах реализации изобретения сама микробная биомасса может рассматриваться в качестве продукта. Такие продукты могут далее подвергаться конверсии с получением по меньшей мере одного компонента из дизельного топлива, авиационного горючего и/или бензина. Кроме того, микробную биомассу можно подвергать последующей переработке с получением белка одноклеточных (SCP).

[83] Термин «белок одноклеточных» (SCP) обозначает микробную биомассу, которая может быть использована в богатых белками пищевых продуктах для людей и/или животных, во многих случаях заменяя традиционные источники белковых добавок, такие как соевая мука или рыбная мука. Для получения белка одноклеточных или другого продукта способ может включать дополнительные этапы выделения, переработки или очистки. Так, например, способ может включать стерилизацию микробной биомассы, центрифугирование микробной биомассы и/или сушку микробной биомассы. В некоторых вариантах реализации изобретения микробную биомассу сушат с использованием распылительной сушки или лопастной сушки. Способ также может включать уменьшение содержания нуклеиновой кислоты в микробной биомассе с использованием любого способа, известного в данной области техники, поскольку потребление рациона с высоким содержанием нуклеиновой кислоты может приводить к накоплению продуктов распада нуклеиновой кислоты и/или желудочно-кишечному расстройству. Белок

одноклеточных может быть пригодным для кормления животных, таких как домашний скот или домашние животные. В частности, корм для животных может быть пригодным для кормления одного или нескольких мясных животных, молочного скота, свиней, овец, коз, лошадей, мулов, ослов, оленей, буйволов/бизонов, лам, альпак, северных оленей, верблюдов, бантенгов, гаялов, яки, курей, индюков, уток, гусей, перепелов, цесарок, сквобов/голубей, рыбы, креветок, ракообразных, котов, собак и грызунов. Композиция корма для животных может быть адаптирована к потребностям в питании различных животных. Кроме того, способ может включать смешивание или комбинирование микробной биомассы с одним или несколькими наполнителями.

[84] Термин «наполнитель» может обозначать любое вещество, которое может быть добавлено в микробную биомассу для улучшения или изменения формы, свойств или питательной ценности корма для животных. Так, например, наполнитель может содержать одно или несколько из углеводов, клетчатки, жиров, белков, витаминов, минералов, воды, вкусовых добавок, подсластителей, антиоксидантов, ферментов, консервантов, пробиотиков или антибиотиков. В некоторых вариантах реализации изобретения наполнитель может представлять собой сено, солому, силос, злаки, масла или жиры или другой растительный материал. Наполнителем может являться любой кормовой ингредиент, указанный в публикации (Chiba, Section 18: Diet Formulation and Common Feed Ingredients, Animal Nutrition Handbook, 3rd revision, pages 575-633, 2014).

[85] Термин «нативный продукт» обозначает продукт, продуцируемый генетически немодифицированным микроорганизмом. Например, этанол, ацетат и 2,3-бутандиол являются нативными продуктами *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, и *Clostridium ragsdalei*. Термин «ненативный продукт» обозначает продукт, который продуцируется генетически модифицированным микроорганизмом, но не продуцируется генетически немодифицированным микроорганизмом, из которого получен генетически модифицированный микроорганизм.

[86] Термин «селективность» обозначает отношение объемов продуцирования целевого продукта к продуцированию всех продуктов ферментации, продуцируемых микроорганизмом. Микроорганизм по данному изобретению может быть сконструирован с возможностью продуцирования продуктов с определенной селективностью или с минимальной селективностью. В

одном варианте реализации изобретения целевой продукт составляет по меньшей мере около 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 50 % или 75 % от всех продуктов ферментации, продуцируемых микроорганизмом по данному изобретению. В одном варианте реализации изобретения целевой продукт составляет по меньшей мере 10 % от всех продуктов ферментации, продуцируемых микроорганизмом по данному изобретению, в результате чего микроорганизм по данному изобретению характеризуется селективностью по целевому продукту, составляющей по меньшей мере 10 %. В другом варианте реализации изобретения целевой продукт составляет по меньшей мере 30 % от всех продуктов ферментации, продуцируемых микроорганизмом по данному изобретению, так что микроорганизм по данному изобретению характеризуется селективностью по целевому продукту, составляющей по меньшей мере 30 %.

[87] Термины «повышение эффективности», «повышенная эффективность» и тому подобные означают среди прочего увеличение скорости роста микроорганизмов, скорости получения продукта или его объема, объема продукта на единицу объема потребляемого субстрата или селективности продукта. Эффективность может определяться по отношению к производительности родительского микроорганизма, из которого получен микроорганизм по данному изобретению.

[88] Как правило, культивирование проводят в биореакторе. Термин «биореактор» обозначает устройство для культивирования/ферментации, состоящее из одного или нескольких сосудов, конструкций башенного типа или трубопроводов, таких как реактор непрерывного действия с механическим перемешиванием (РНДМП), реактор с иммобилизованными клетками (РИК), реактор с орошаемым слоем (РОС), барботажная колонна, газлифтный ферментёр, статический смеситель или другой сосуд или другое устройство, пригодное для контакта газ-жидкость. В некоторых вариантах реализации изобретения биореактор может содержать первый реактор для выращивания и второй реактор для культивирования/ферментации. Субстрат можно подавать в один или оба таких реактора. В контексте данного документа термины «культивирование» и «ферментация» используются взаимозаменяемо. Указанные термины охватывают как фазу роста, так и фазу биосинтеза продукта в процессе культивирования/ферментации.

[89] Культивирование, как правило, проводят 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. Пригодные среды хорошо известны в данной области техники.

[90] Требуется, чтобы культивирование/ферментация проводились в соответствующих условиях для продуцирования целевого продукта. Как правило, культивирование/ферментация проводятся в анаэробных условиях. К условиям химической реакции, которые следует учитывать, относится давление (или парциальное давление), температура, скорость потока газа, скорость потока жидкости, pH среды, редокс потенциал среды, скорость перемешивания (при использовании реактора непрерывного действия с перемешиванием), уровень посевного материала, максимальные концентрации газового субстрата, с тем чтобы гарантировать, что газ в жидкой фазе не станет ограничивающим, а также максимальные концентрации продукта во избежание ингибирования продукта. В частности, скорость введения субстрата может быть управляемой, с тем чтобы гарантировать, что концентрация газа в жидкой фазе не станет ограничивающим фактором, поскольку продукты могут потребляться культурой в условиях ограниченного количества газа.

[91] Эксплуатация биореактора при повышенных давлениях позволяет повышать скорость массопереноса газа из газовой фазы в жидкую фазу. Вследствие этого в общем случае предпочтительно осуществлять культивирование/ферментацию при давлениях выше атмосферного давления. Кроме того, поскольку заданная скорость конверсии газа частично зависит от времени удерживания субстрата, а время удерживания определяет необходимый объем биореактора, то применение систем под давлением может значительно уменьшить требуемый объем биореактора и, следовательно, капитальные затраты на оборудование для культивирования/ферментации. 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 химической реакции частично зависят от конкретного используемого микроорганизма. Вместе с тем в общем случае предпочтительно проводить ферментацию при давлении выше атмосферного давления. Также,

поскольку данная скорость конверсии газа отчасти зависит от времени удерживания субстрата, а достижение требуемого времени удерживания, в свою очередь, определяет требуемый объем биореактора, то применение систем под давлением может значительно уменьшить требуемый объем биореактора и, следовательно, капитальные затраты на оборудование для ферментации.

[92] В некоторых вариантах реализации изобретения ферментацию проводят в отсутствие света или в присутствии некоторого количества света, недостаточного для удовлетворения энергетических потребностей фотосинтетических микроорганизмов. В некоторых вариантах реализации изобретения микроорганизм по данному изобретению представляет собой нефотосинтезирующий микроорганизм.

[93] В контексте данного документа термины «ферментативный бульон» или «бульон» обозначают смесь компонентов в биореакторе, которая содержит клетки и питательные среды, а также продукты ферментации и сопутствующие продукты. В контексте данного документа термин «сепаратор» обозначает модуль, выполненный с возможностью приема ферментационного бульона из биореактора и пропускающего бульона через фильтр с получением «ретентата» и «пермеата». Фильтр может представлять собой мембрану, например мембрану с поперечным потоком или мембрану из полых волокон. Термин «пермеат» используется для обозначения по сути растворимых компонентов бульона, которые проходят через сепаратор. Пермеат, как правило, содержит растворимые продукты ферментации, сопутствующие продукты и питательные вещества. Ретентат, как правило, содержит клетки. В контексте данного документа термин «отвод бульона» используется для обозначения части ферментационного бульона, которая удаляется из биореактора и не проходит в сепаратор.

[94] Целевые продукты можно отделять или очищать от ферментативного бульона, используя любой способ или сочетание способов, известных в данной области техники, в том числе, например, фракционную перегонку, выпаривание, испарение через полупроницаемую перегородку, отдувку газом, разделение фаз и экстрактивную ферментацию, в том числе, например, жидкостно-жидкостную экстракцию. В некоторых вариантах реализации изобретения целевые продукты выводят из ферментационного бульона посредством непрерывного удаления из биореактора части бульона, отделения микробных клеток от бульона (как правило, посредством фильтрации) и выделения из бульона одного или нескольких целевых

продуктов. Спирты и/или ацетон можно выделять, например, с помощью перегонки. Кислоты можно выделять, например, с помощью адсорбции на активированном угле. Отделенные микробные клетки предпочтительно рециклируют в биореактор. Бесклеточный пермеат, оставшийся после удаления целевых продуктов, также
 5 предпочтительно возвращают в биореактор. Для восполнения среды перед ее возвратом в биореактор к бесклеточному пермеату могут быть добавлены дополнительные питательные вещества.

[95] Например, основной микроорганизм может являться представителем рода, выбранного из группы, состоящей из *Acetobacterium*, *Alkalibaculum*, *Blautia*,
 10 *Butyribacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Moorella*, *Oxobacter*, *Sporomusa* и *Thermoanaerobacter*. В частности, основной микроорганизм может быть получен из родительской бактерии, выбранной из группы, состоящей из *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia producta*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium coskatii*,
 15 *Clostridium drakei*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium magnum*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium scatologenes*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermoautotrophica*, *Moorella thermoacetica*, *Oxobacter pfennigii*, *Sporomusa ovata*, *Sporomusa silvacetica*, *Sporomusa sphaeroides* и *Thermoanaerobacter kivui*. Указанный основной микроорганизм также может быть
 20 выбран из группы, состоящей из *Acetitomaculum ruminis*, *Acetoanaerobium noterae*, *Acetobacterium bakii*, *Acetobacterium carbinolicum*, *Acetobacterium dehalogenans*, *Acetobacterium fimetarium*, *Acetobacterium malicum*, *Acetobacterium paludosum*, *Acetobacterium tundrae*, *Acetobacterium wieringae*, *Acetobacterium woodii*, *Acetohalobium arabicum*, *Acetonema longum*, *Blautia coccoides*, *Blautia hydrogenotrophica*, *Blautia producta*, *Blautia schinkii*, *Butyribacterium methylotrophicum*,
 25 *Clostridium aceticum*, *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium drakei*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium glycolicum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium magnum*, *Clostridium mayombei*, *Clostridium methoxybenzovorans*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium scatologenes*, *Eubacterium aggregans*, *Eubacterium limosum*, *Morella mulderi*, *Morella thermoacetica*, *Morella thermoautotrophica*, *Oxobacter pfennigii*, *Sporomusa acidovorans*, *Sporomusa aerivorans*, *Sporomusa malonica*, *Sporomusa ovata*, *Sporomusa paucivorans*, *Sporomusa rhizae*, *Sporomusa silvacetica*, *Sporomusa sphaeroides*, *Sporomusa termitida*, *Thermoacetogenium phaeum*, *Thermoanaerobacter kivui*, *Acetobacterium*, *Moorella*,
 30 *Moorella sp HUC22-1*, *Moorella thermoacetica*, *Clostridium*, *Clostridium carboxidivorans*,

Clostridium drakei, *Clostridium acidurici*, *Pyrococcus*, *Pyrococcus furiosus*, *Eubacterium*, *Eubacterium limosum*, *Desulfobacterium*, *Carboxydotherrmus*, *Acetogenium*, *Acetoanaerobium*, *Butyribaceterium*, *Butyribacterium methylotropicum*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Oxobacter*, *Oxobacter pfennigii*, *Methanosarcina*, *Carboxydotherrmus*, *Eubacterium limosum*, *Desulfotomaculum orientis*, *Peptococcus glycinophilus*, *Peptococcus magnus*, *Ignicoccus hospitalis*, *Thermoanaerobacter kivui* и *Thermoacetogenium phaeum*. Микроорганизм также может быть выбран из Таблицы 1 из работы (Schiel-Bengelsdorf, FEBS Letters 586: 2191-2198, 2012). В одном варианте реализации изобретения основной микроорганизм представляет собой *Acetobacterium woodii*. В другом варианте реализации изобретения основной микроорганизм представляет собой микроорганизм Вуда-Льюнгаля. Термин «Вуд-Льюнгаль» обозначает путь фиксации углерода Вуда-Льюнгаля, описанный, например, в работе (Ragsdale, *Biochim Biophys Acta*, 1784: 1873-1898, 2008). Термин «микроорганизмы Вуда-Льюнгаля» ожидаемо обозначает микроорганизмы, содержащие путь Вуда-Льюнгаля. Основной микроорганизм во многих случаях содержит нативный путь Вуда-Льюнгаля.

[96] В другом варианте реализации изобретения основной микроорганизм является ацетогеном. Термин «ацетогены» обозначает облигатно-анаэробные бактерии, которые используют путь Вуда-Льюнгаля в качестве основного механизма для сохранения энергии и синтеза ацетил-CoA продуктов и производных от ацетил-CoA продуктов, например, ацетата (Ragsdale, *Biochim Biophys Acta*, 1784: 1873-1898, 2008). В частности, ацетогены используют путь Вуда-Льюнгаля 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 ацетогены, встречающиеся в природе, являются C1-фиксирующими анаэробными автотрофными и неметанотрофными.

[97] Указанный основной микроорганизм способен потреблять субстрат («основной субстрат»), который предоставляет углерод и/или энергию. Как правило, основной субстрат является газообразным и содержит источник C1-углерода, например CO, CO₂ и/или CH₄. Основной субстрат предпочтительно содержит источник C1-углерода в виде CO или CO + CO₂. Основной субстрат может также содержать другие неуглеродные компоненты, например, H₂, N₂ или электроны.

[98] В варианте реализации изобретения основной субстрат содержит CO_2 и H_2 . В варианте реализации изобретения H_2 представляет собой возобновляемый H_2 . Например, основной субстрат может содержать около 1-80 мол. % или 1-30 мол. % CO_2 . В некоторых вариантах реализации изобретения основной субстрат может содержать менее чем около 20, 15, 10 или 5 мол. % CO_2 . Основной субстрат может содержать около 1, 2, 5, 10, 15, 20 или 30 мол. % H_2 . В некоторых вариантах реализации изобретения основной субстрат может содержать относительно высокое количество H_2 , например, около 60, 70, 80 или 90 мол. % H_2 . Основной субстрат может также содержать некоторое количество CO и/или некоторое количество инертных газов, таких как N_2 .

[99] Основной субстрат может представлять собой газообразные отходы, полученные в виде побочного продукта промышленного процесса или из какого-либо другого источника, например, из выхлопных газов автомобилей или при газификации биомассы. В определенных вариантах реализации изобретения промышленный процесс выбран из группы, состоящей из: черной металлургии, например, сталелитейного производства, цветной металлургии, нефтепереработки, газификации угля, производства электроэнергии, производства чистого углерода, производства аммиака, производства метанола и производства кокса. В таких вариантах реализации изобретения субстрат и/или источник C1 -углерода может быть захвачен в ходе промышленного процесса перед его выбросом в атмосферу с применением любого удобного способа.

[100] Основной субстрат может представлять собой также синтез-газ, например, синтез-газ, полученный при газификации угля или из остатков нефтепереработки, газификации биомассы или лигноцеллюлозного материала или при риформинге природного газа. В другом варианте реализации изобретения синтез-газ может быть получен в результате газификации твердых бытовых отходов или твердых промышленных отходов.

[101] Композиция субстрата может оказывать значительное влияние на эффективность и/или стоимость химической реакции. Так, например, присутствие кислорода (O_2) может понижать эффективность процесса анаэробной ферментации, а во многих случаях ферментация является анаэробной. В зависимости от состава субстрата может потребоваться очистка, промывка или фильтрация субстрата для удаления нежелательных примесей, например, токсинов, нежелательных

компонентов или частиц пыли, и/или для увеличения концентрации требуемых компонентов.

5 **[102]** В некоторых вариантах реализации изобретения ферментацию проводят при отсутствии углеводных субстратов, таких как сахар, крахмал, лигнин, целлюлоза или гемицеллюлоза.

10 **[103]** При ферментации продуцируется по меньшей мере один продукт («продукт»). Как правило, этим продуктом является ацетат, хотя при ферментации могут также образовываться дополнительные продукты, такие как этанол и лактат. Микробная биомасса также может считаться продуктом, поскольку для нее
10 существует потенциальное применение в кормах для животных и удобрениях. Важно отметить, что термины «ацетат» и «уксусная кислота» могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо, и «лактат» и «молочная кислота» могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо. Затем продукт или продукты необходимо отделить и вывести из ферментационного бульона.

15 **[104]** Термин «ферментация» следует понимать как метаболический процесс, приводящий к химическим изменениям в субстрате. Например, в процесс ферментации вводят один или несколько субстратов и получают один или несколько продуктов посредством применения одного или нескольких микроорганизмов. Значение термина «ферментация» следует понимать как процесс, в который вводят
20 один или несколько субстратов и получают один или несколько продуктов в результате использования одного или нескольких микроорганизмов. Предпочтительно процесс ферментации включает применение одного или нескольких биореакторов. Процесс ферментации может описываться либо термином «периодический», либо термином «непрерывный». Термин
25 «периодическая ферментация» используется для описания процесса ферментации, при котором биореактор заполняют исходным сырьем, например источником углерода, вместе с микроорганизмами, при этом продукты остаются в биореакторе до завершения ферментации. В «периодическом» процессе после завершения ферментации продукты извлекают, а биореактор очищают перед запуском
30 следующего «периода». Термин «непрерывная ферментация» используется для описания процесса ферментации, в котором указанный процесс ферментации протекает в течение более длительных интервалов времени, а продукт и/или метаболит извлекают во время ферментации. Предпочтительно процесс ферментации является непрерывным. Как правило, культивирование проводят в

биореакторе. Термин «биореактор» обозначает устройство для культивирования/ферментации, состоящее из одного или нескольких сосудов, конструкций башенного типа или трубопроводов, таких как реактор непрерывного действия с механическим перемешиванием (РНДМП), реактор с 5 иммобилизованными клетками (РИК), реактор с орошаемым слоем (РОС), барботажная колонна, газлифтный ферментёр, статический смеситель или другой сосуд или другое устройство, пригодное для контакта газ-жидкость. В некоторых вариантах реализации изобретения биореактор может содержать первый реактор для выращивания и второй реактор для культивирования/ферментации. Субстрат 10 можно подавать в один или оба таких реактора. В контексте данного документа термины «культивирование» и «ферментация» используются взаимозаменяемо. Указанные термины охватывают как фазу роста, так и фазу биосинтеза продукта в процессе культивирования/ферментации.

[105] Культивирование, как правило, проводят в водной культуральной 15 среде, содержащей питательные вещества, витамины и/или минералы, достаточные для обеспечения роста микроорганизма. В одном варианте реализации изобретения водная культуральная среда представляет собой анаэробную среду для роста микроорганизмов, например, минимальную анаэробную среду для роста микроорганизмов. Пригодные среды хорошо известны 20 в данной области техники.

[106] Требуется, чтобы культивирование/ферментация проводились в соответствующих условиях для продуцирования целевого продукта. Как правило, культивирование/ферментация проводятся в анаэробных условиях. К условиям химической реакции, которые следует учитывать, относится давление (или 25 парциальное давление), температура, скорость потока газа, скорость потока жидкости, pH среды, редокс потенциал среды, скорость перемешивания (при использовании реактора непрерывного действия с перемешиванием), уровень посевного материала, максимальные концентрации газового субстрата, с тем чтобы гарантировать, что газ в жидкой фазе не станет ограничивающим, а также 30 максимальные концентрации продукта во избежание ингибирования продукта. В частности, скорость введения субстрата может быть управляемой, с тем чтобы гарантировать, что концентрация газа в жидкой фазе не станет ограничивающим фактором, поскольку продукты могут потребляться культурой в условиях ограниченного количества газа.

[107] Целевые продукты можно отделять или очищать от ферментативного бульона, используя любой способ или сочетание способов, известных в данной области техники, в том числе, например, фракционную перегонку, выпаривание, испарение через полупроницаемую перегородку, отдувку газом, разделение фаз и экстрактивную ферментацию, в том числе, например, жидкостно-жидкостную экстракцию. В некоторых вариантах реализации изобретения целевые продукты выводят из ферментационного бульона посредством непрерывного удаления из биореактора части бульона, отделения микробных клеток от бульона (как правило, посредством фильтрации) и выделения из бульона одного или нескольких целевых продуктов. Спирты и/или ацетон можно выделять, например, с помощью перегонки. Отделенные микробные клетки предпочтительно рециклируют 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 могут быть добавлены дополнительные питательные вещества.

[108] В одном варианте реализации изобретения ацетат и/или лактат выводят из ферментационного бульона с использованием метода разделения ионообменной адсорбции. Способ, описываемый в данном документе, обеспечивает преимущество, которое заключается в том, что он позволяет отделять сопряженное основание кислоты от ферментационного бульона без необходимости существенного изменения pH бульона, которое может воздействовать на микроорганизмы. В результате ацетат и/или лактат или другое сопряженное основание низкомолекулярной органической кислоты могут быть отделены от живого бульона, и живой бульон, содержащий живые микроорганизмы, может быть возвращен в биореактор. В частности, отделение осуществляется с помощью адсорбции в интегрированном расширяющемся слое и технологии имитируемого движущегося слоя.

[109] Адсорбционная технология заключается во взаимодействии подвижного жидкостного потока, содержащего одно или несколько целевых соединений, с неподвижной фазой. Одним из механизмов адсорбции является ионный обмен, в котором используется ионообменная смола. Процесс ионного обмена может осуществляться непрерывно. В технологиях с расширяющимся слоем слой смолы псевдооживается восходящим питающим потоком, и образующиеся пустоты в слое позволяют частицам биомассы проходить через слой, не забивая слой и не оставаясь захваченными в слое ионообменной смолы. В результате

неочищенный или сырой живой бульон может пропускаться через расширяющийся слой без физического захвата биомассы. Выбор смолы также важен, поскольку некоторые микроорганизмы обладают сродством к определенным смолам. Следовательно, может быть выбрана смола для ионного обмена с целевой молекулой для разделения, и при этом она также должна быть совместима с конкретным микроорганизмом ферментационного бульона. Наконец, в одном варианте реализации изобретения расширяющийся слой работает в режиме имитируемого движущегося слоя (SMB). SMB хорошо известен и применяется для достижения оптимального использования смолы и наиболее высокого разрешения. В SMB скорость потока смолы моделируется путем периодического смещения различных входных и выходных портов в направлении потока текучей среды. Адсорбция в расширяющемся слое в сочетании с технологией имитируемого движущегося слоя, описывается в публикации (Chem. Eng. Technol. 2018, 41, No. 12, 2393-2401).

[110] Очищенный или неочищенный ферментационный бульон по данному изобретению частично или полностью пропускают через блок сепарации, содержащий ионообменную смолу и работающий в качестве расширяющегося адсорбционного слоя в режиме имитируемого движущегося слоя. Ионообменная смола выбрана с возможностью ионного обмена с ацетатом или лактатом или с обоими из них в ферментационном бульоне. Ионообменную смолу также выбирают так, чтобы она была совместима с микроорганизмом ферментационного бульона. Совместимость основана по меньшей мере частично на природе микроорганизма и его естественной склонности прилипать или приклеиваться к смоле. Требуются такие ионообменные смолы, в которых микроорганизмы не прилипают и не приклеиваются к смоле. Смолы могут относиться к любому пригодному типу, в том числе к гелевым или пористым смолам, таким как макропористые полистирольные смолы. Ионообменные смолы могут относиться к типу сильноосновных анионообменных смол. К пригодным примерам класса сильноосновных анионообменных смол относятся смолы в хлоридной форме, продаваемые под торговыми названиями AG 1-X8 и AG 1-X2, доступные на рынке от компании Bio Rad, Amberlite HPR9200 Cl, доступные на рынке от компании Dow, Amberlite IRA900 Cl, доступные на рынке от компании DuPont, и Diaion PA408 Cl, доступный на рынке от компании Mitsubishi Chemical.

[111] К конкретному примеру относится отделение ацетата от ферментационного бульона, полученного в результате культивирования

микроорганизма рода *Clostridium* в присутствии газового субстрата, причем в процесс отделения используется ионообменная смола в расширяющемся адсорбционном слое, работающем в режиме имитируемого движущегося слоя. К другому конкретному примеру относится отделение лактата от ферментационного

5 бульона, полученного в результате культивирования микроорганизма рода *Clostridium* в присутствии газового субстрата, причем в процесс отделения используется ионообменная смола в расширяющемся адсорбционном слое, работающем в режиме имитируемого движущегося слоя. К еще одному конкретному

10 примеру относится отделение как ацетата, так и лактата от ферментационного бульона, полученного в результате культивирования микроорганизма рода *Clostridium* в присутствии газового субстрата, причем в процесс отделения используется ионообменная смола в расширяющемся адсорбционном слое, работающем в режиме имитируемого движущегося слоя. Ацетат, лактат или оба из

15 них могут быть выведены, а ионообменная смола регенерирована, как это обычно происходит для выбранной ионообменной смолы. Например, ацетат, лактат или оба из них могут быть выведены с использованием растворов, содержащих нитраты или хлориды.

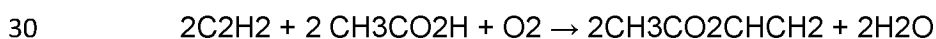
[112] Поскольку ферментационный бульон является водным, уксусная и молочная кислоты диссоциируют лишь частично. В результате после удаления

20 ацетата и лактата с помощью ионного обмена оставшаяся уксусная и/или молочная кислота рециркулирует с ферментационным бульоном и может дополнительно диссоциировать с образованием дополнительного количества ацетата и лактата, которые могут быть отделены и выведены при дополнительных проходах через этап ионообменного разделения. В зависимости от особенности применения может

25 потребоваться регулировка pH.

[113] При отделении и выведении ацетата из ферментационного бульона ацетат может быть преобразован в уксусную кислоту. Уксусная кислота может вступать в каталитическое взаимодействие с этиленом и кислородом с образованием

винилацетата. Катализатор может представлять собой палладиевый катализатор.



[114] В одном варианте реализации изобретения этилен, используемый в химической реакции образования винилацетата, может быть по меньшей мере частично получен из этанола, получаемого в результате ферментации газа,

содержащего оксид углерода. Газ, содержащий оксид углерода, может являться описанным выше.

[115] Винацетат также известен как винацетатный мономер (ВАМ) и может быть полимеризован с образованием поливинацетата (ПВС) или полимеризован и подвергнут химическому превращению с образованием поливинилового спирта. Винацетат также может быть полимеризован с другими мономерами с получением различных сополимеров, в том числе как этилен-винацетат, винацетат-акриловая кислота, поливинилхлоридацетат и поливинилпирролидон. Винацетат также может вступать во взаимодействие с бромом с образованием дибромида, вступать во взаимодействие с галогеноводородами с образованием 1-галогенэтилацетатов, вступать во взаимодействие с уксусной кислотой в присутствии платиновых катализаторов с образованием этилидендицетата. Винацетат может подвергаться перэтерификации с получением виниловых эфиров.

[116] В данном документе также раскрывается устройство для биологической конверсии, которое содержит систему биореактора и зону сепарации, описываемую выше. Как показано на фиг. 1, газовый субстрат проводится через вход 104 по питающей линии 106 в биореактор 102. Биореактор 102 содержит культуральную среду и микроорганизмы для метаболической трансформации источника углерода в субстрате и получения продукта. Выход 108 позволяет ферментационному бульону, содержащему культуральную среду, микроорганизмы, продукты быть переданным из биореактора. Вход 110 зоны 112 сепарации сообщается по текучей среде с выходом 108. Зона 112 сепарации содержит расширяющийся слой ионообменной смолы в конфигурации имитируемого движущегося слоя. В зоне 112 сепарации продукты подвергается ионному обмену со смолой и в результате остаются в указанном слое. Оставшаяся часть ферментационного бульона, содержащая микроорганизмы, пропускается через ионообменную смолу к выходу 118 и может быть рециркулирована в биореактор 102 по линии 120 на вход 122 рециркуляции биореактора 102. Зона сепарации содержит вход 114, сообщающийся по текучей среде с источником регенерата для регенерации ионообменной смолы и выпуска продукта. Зона 112 сепарации также имеет выход 116 для продукта для вывода выпускаемого продукта. Необязательно, противоион, высвобождаемый из ионообменной смолы во время процесса ионного обмена, может быть удален из ферментационного бульона перед рециркуляцией в биореактор. Подробности

работы имитируемого движущегося слоя известны и в данном документе не рассматриваются.

[117] В другом варианте реализации изобретения устройство для биологической конверсии содержит систему биореактора и зону сепарации, описываемую выше, а также зону сепарации для микробной биомассы, расположенную между системой биореактора и указанной зоной сепарации. В таком варианте реализации изобретения только часть ферментационного бульона из биореактора передается в зону сепарации, содержащую ионообменную смолу. В зоне сепарации микробной биомассы может использоваться такой метод, как мембранное разделение для отделения части ферментационного бульона, содержащей микробную биомассу, которая затем может быть возвращена в биореактор. Затем оставшаяся часть ферментационного бульона может быть передана в зону сепарации, содержащую ионообменную смолу. Зона сепарации, содержащая ионообменную смолу, может работать в различных режимах, таких как режим с неподвижным слоем, режим с качающимся слоем с использованием двух или более неподвижных слоев, режим с имитируемым движущимся слоем, режим с подвижным слоем или другие режимы.

[118] Одно из преимуществ удаления микробной биомассы перед передачей ферментационного бульона в зону сепарации, содержащую ионообменную смолу, заключается в том, что размер зоны сепарации может быть уменьшен за счет уменьшения объема материала, пропускаемого через зону сепарации. Еще одно преимущество заключается в возможности легко и просто контролировать воздействие на микробную биомассу противоиона, высвобождаемого из ионообменной смолы во время процесса ионного обмена.

[119] Как показано на фиг. 2, газовый субстрат проводится через вход 204 по питающей линии 206 в биореактор 202. Биореактор 202 содержит культуральную среду и микроорганизмы для метаболической трансформации источника углерода в субстрате и получения продукта. Выход 208 позволяет ферментационному бульону из биореактора, содержащему культуральную среду, микроорганизмы, продукты быть переданным из биореактора 202 через трубопровод 222 в зону 224 сепарации микробной биомассы. Зона 224 сепарации микробной биомассы показана на фиг. 2 как зона мембранного разделения, в которой часть ретентата ферментационного бульона содержит микробную биомассу, а пермеатная часть ферментационного бульона содержит целевой компонент, такой как ацетат или лактат, подлежащий

отделению. Часть ретентата ферментационного бульона, содержащего микробную биомассу, рециркулируют по линии 228 в биореактор 202. Пермеатная часть ферментационного бульона, содержащая продукты, подлежащие отделению, такие как ацетат, передается из зоны 224 сепарации микробной биомассы в зону 230 сепарации по линии 226. Могут быть использованы другие методы разделения микробной биомассы, а показанный метод мембранного разделения является только иллюстративным.

[120] Зона 230 сепарации содержит по меньшей мере один неподвижный слой ионообменной смолы. Для зоны 230 сепарации, содержащей по меньшей мере два неподвижных слоя ионообменной смолы, может обеспечиваться преимущество, которое заключается в том, что один неподвижный слой может находиться в рабочем состоянии и работать, в то время как другой слой регенерируется. Продукты подвергается ионному обмену со смолой и в результате остаются в указанном слое. Часть ферментационного бульона, передаваемая по линии 226, поступает в зону 230 сепарации и вступает в контакт с ионообменной смолой, при этом продукты подвергается ионному обмену со смолой и в результате остаются в указанном слое. Неудерживаемая часть ферментационного бульона, которая теперь дополнительно содержит противоион из смолы, пропускается через слой ионообменной смолы и удаляется из зоны 230 сепарации в потоке 232 эффлюента, и направляется в блок 234 обработки для проведения обработки с последующим применением в качестве регенеранта для ионообменной смолы. Обработка может включать замену определенного противоиона на другой противоион посредством добавления раствора по линии 236 и удаления продукта реакции, содержащего менее предпочтительный противоион, по линии 242. Регенерат передается в зону 230 сепарации по линии 238 для контакта с ионообменной смолой и регенерации ионообменной смолы, и получения требуемого продукта. Только-что отделенный целевой продукт удаляется из зоны 230 сепарации в линию 240 вывода продукта.

[121] Все ссылки на литературные источники, в том числе публикации, патентные заявки и патенты, упоминаемые в данном документе, тем самым включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая ссылка была отдельно и конкретно указана для включения в данный документ посредством ссылки и изложена в полном объеме. Упоминание какого-либо предшествующего уровня техники в данном описании не является и не должно восприниматься как подтверждение того, что такой предшествующий уровень

техники составляет часть общедоступных сведений в данной области науки в любой стране.

[122] Использование определений в единственном числе в контексте описания изобретения (особенно в контексте приведенной ниже формулы изобретения) должно толковаться как охватывающее как единственное, так и множественное число, если в данном документе не указано иное или это явно не противоречит контексту. Термины «содержащий», «имеющий», «включающий» и «вмещающий» следует рассматривать как неограничивающие термины (то есть имеющие значение «среди прочего»), если не указано иное. Термин «по сути состоящий из» ограничивает объем композиции, процесса или способа указанными материалами или этапами, или тем, что не оказывает существенного влияния на основные и новые характеристики композиции, процесса или способа. Использование альтернативы (например, «или») следует понимать как означающее одну, обе, или любую комбинацию из вышеуказанных альтернатив. В контексте данного документа термин «около» означает $\pm 20\%$ от указанного диапазона, значения или структуры, если не указано иное.

[123] Перечисление в данном документе диапазонов значений предназначено только для того, чтобы служить сокращенным способом ссылки по отдельности на каждое отдельное значение, попадающее в указанный диапазон, если в данном документе не указано иное, при этом каждое отдельное значение включено в данное описание, как если бы оно было отдельно приведено в данном документе. Например, любой диапазон концентраций, диапазон процентов, диапазон соотношений, диапазон целых чисел, диапазон размеров или диапазон толщины следует понимать как содержащий значение любого целого числа в указанном диапазоне и, если это уместно, его долей (например, одной десятой и одной сотой целого числа), если не указано иное.

[124] Все способы, описываемые в данном документе, могут быть выполнены в любом пригодном порядке, если в данном документе не указано иное или это явно не противоречит контексту. Использование любого или всех примеров, или вводного слова перед примером (такого как «например») в данном документе предназначено только для лучшего освещения изобретения и не накладывает ограничения на объем 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 данного изобретения.

[125] Варианты реализации изобретения по данному описанию описываются в данном документе. Видоизменения таких вариантов реализации изобретения могут стать очевидными для специалистов в данной области техники после прочтения предшествующего описания. Авторы изобретения ожидают, что квалифицированные специалисты будут использовать такие видоизменения в случае целесообразности, а также авторы изобретения предполагают, что изобретение будет применяться на практике иначе, чем конкретно описывается в данном документе. Вследствие этого в данном изобретении содержатся все модификации и эквиваленты предмета изобретения, изложенные в прилагаемой формуле изобретения, в пределах применимых правовых норм. Более того, в данном изобретении охватывается любое сочетание вышеописанных элементов во всех их возможных видоизменениях, если иное не указано в данном документе или если это явно не противоречит контексту.

[126] Первый вариант реализации изобретения представляет собой способ отделения целевого компонента от ферментационного бульона, включающий:

- a. ферментацию газового субстрата и микроорганизма с образованием ферментационного бульона, содержащего указанный микроорганизм и целевой компонент;
- b. передачу ферментационного бульона в блок сепарации, содержащий ионообменную смолу в имитируемом движущемся слое непрерывного ионного обмена;
- c. избирательное удерживание целевого компонента за счет ионного обмена с указанной смолой и передачу указанного микроорганизма через имитируемый движущийся слой непрерывного ионного обмена; и
- d. регенерацию ионообменной смолы; и извлечение целевого компонента.

[127] Способ по первому варианту реализации изобретения, отличающийся тем, что целевой компонент представляет собой сопряженное основание низкомолекулярной органической кислоты.

[128] Способ по первому варианту реализации изобретения, отличающийся тем, что целевой компонент представляет собой ацетат, лактат или же то и другое одновременно.

5 [129] Способ по первому варианту реализации изобретения, отличающийся тем, что имитируемый движущийся слой непрерывного ионного обмена представляет собой расширяющийся слой.

[130] Способ по первому варианту реализации изобретения, отличающийся тем, что ионообменная смола представляет собой сильноосновную анионообменную смолу.

10 [131] Способ по первому варианту реализации изобретения, отличающийся тем, что микроорганизм получен из родительского микроорганизма, выбранного из группы, состоящей из *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia producta*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium coskatii*, *Clostridium drakei*, *Clostridium*
15 *formicoaceticum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium magnum*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium scatologenes*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermautotrophica*, *Moorella thermoacetica*, *Oxobacter pfennigii*, *Sporomusa ovata*, *Sporomusa silvacetica*, *Sporomusa sphaeroides* и *Thermoanaerobacter kivui*.

20 [132] Способ по первому варианту реализации изобретения, отличающийся тем, что микроорганизм является представителем рода *Clostridium*.

[133] Способ по первому варианту реализации изобретения, отличающийся тем, что микроорганизм получен из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei* или *Clostridium coskatii*.

25 [134] Способ по первому варианту реализации изобретения, отличающийся тем, что газовый субстрат представляет собой промышленные газообразные отходы, промышленный дымовой газ, полученный из газифицированных отходов синтез-газ, полученный из газифицированной биомассы синтез-газ или любое их сочетание.

30 [135] Способ по первому варианту реализации изобретения, отличающийся тем, что целевой компонент подвергают химическому превращению с образованием одного или нескольких продуктов.

[136] Способ по предшествующему варианту реализации изобретения, отличающийся тем, что целевое соединение представляет собой ацетат, а один или несколько продуктов представляют собой винилацетат.

5 **[137]** Способ по предшествующему варианту реализации изобретения, дополнительно включающий проведение химического превращения винилацетата с образованием поливинилацетата или поливинилового спирта.

10 **[138]** Способ по предыдущему варианту реализации изобретения, дополнительно включающий проведение химического превращения поливинилацетата или поливинилового спирта с образованием полимера, сополимера, клея, покрытия, краски, пленки, текстильного изделия, пены, изоляции для проводов или изоляции для кабелей.

[139] Второй вариант реализации изобретения представляет собой способ отделения целевого компонента от ферментационного бульона, включающий:

- 15 a. ферментацию газового субстрата и микроорганизма с образованием ферментационного бульона, содержащего указанный микроорганизм и целевой компонент;
- b. передачу ферментационного бульона в первую зону сепарации для отделения первой части ферментационного бульона, содержащего микроорганизм, и его рециркуляции в биореактор;
- 20 c. передачу второй части ферментационного бульона во вторую зону сепарации, содержащую ионообменную смолу;
- d. избирательное удерживание целевого компонента за счет ионного обмена с указанной смолой и передачу остатка через вторую зону сепарации; и
- 25 e. регенерацию ионообменной смолы с помощью регенерата и извлечение целевого компонента

[140] Способ по второму варианту реализации изобретения, отличающийся тем, что регенерат содержит по меньшей мере часть указанного остатка или получен из указанного остатка.

30 **[141]** Способ по второму варианту реализации изобретения, отличающийся тем, что целевой компонент представляет собой сопряженное основание низкомолекулярной органической кислоты.

[142] Способ по второму варианту реализации изобретения, отличающийся тем, что целевой компонент представляет собой ацетат, лактат или же то и другое одновременно.

5 **[143]** Способ по второму варианту реализации изобретения, отличающийся тем, что ионообменная смола представляет собой сильноосновную анионообменную смолу.

10 **[144]** Способ по второму варианту реализации изобретения, отличающийся тем, что газовый субстрат представляет собой промышленные газообразные отходы, промышленный дымовой газ, полученный из газифицированных отходов синтез-газ, полученный из газифицированной биомассы синтез-газ или любое их сочетание.

[145] Способ по второму варианту реализации изобретения, отличающийся тем, что целевой компонент подвергают химическому превращению с образованием одного или нескольких продуктов.

15 **[146]** Способ по предшествующему варианту реализации изобретения, отличающийся тем, что целевое соединение представляет собой ацетат, а один или несколько продуктов представляют собой винилацетат.

20 **[147]** Способ по предшествующему варианту реализации изобретения, дополнительно включающий проведение химического превращения винилацетата с образованием поливинилацетата или поливинилового спирта.

25 **[148]** Способ по предшествующему варианту реализации изобретения, дополнительно включающий проведение химического превращения поливинилацетата или поливинилового спирта с образованием полимера, сополимера, клея, покрытия, краски, пленки, текстильного изделия, пены, изоляции для проводов или изоляции для кабелей.

[149] Третий вариант реализации изобретения представляет собой устройство для биологической конверсии, содержащее:

30 а. систему биореактора, содержащую вход в биореактор, содержащий культуральную среду и микроорганизмы для метаболической трансформации источника углерода в субстрате и получения продукта, и выход из биореактора; и

- b. зону сепарации, содержащую первый вход, сообщающийся по текучей среде с выходом указанного биореактора, слой ионообменной смолы в конфигурации имитируемого движущегося слоя, второй вход, сообщающийся по текучей среде с источником регенерата, выход, сообщающийся по текучей среде с системой биореактора, и выход для продукта.

[150] Устройство для биологической конверсии по третьему варианту реализации изобретения, отличающееся тем, что слой ионообменной смолы представляет собой расширяющийся слой ионообменной смолы.

[151] Четвертый вариант реализации изобретения представляет собой устройство для биологической конверсии, содержащее:

- a. систему биореактора, содержащую вход в биореактор, содержащий культуральную среду и микроорганизмы для метаболической трансформации источника углерода в субстрате и получения продукта, и выход из биореактора;

- b. первую зону сепарации, содержащую вход, сообщающийся по текучей среде с выходом биореактора, мембрану для отделения микробной биомассы, выход для ретентата, сообщающийся по текучей среде с биореактором, и выход для пермеата; и

- c. вторую зону сепарации, содержащую первый вход, сообщающийся по текучей среде с выходом для пермеата из первой зоны сепарации, по меньшей мере один слой ионообменной смолы, второй вход, сообщающийся по текучей среде с источником регенерата, выход, сообщающийся по текучей среде с источником регенерата, и выход для продукта.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ отделения целевого компонента от ферментационного бульона, включающий:

- a. ферментацию газового субстрата и микроорганизма с образованием ферментационного бульона, содержащего указанный микроорганизм и целевой компонент;
- b. передачу ферментационного бульона в блок сепарации, содержащий ионообменную смолу в имитируемом движущемся слое непрерывного ионного обмена;
- c. избирательное удерживание целевого компонента за счет ионного обмена с указанной смолой и передачу указанного микроорганизма через имитируемый движущийся слой непрерывного ионного обмена; и
- d. регенерацию ионообменной смолы; и извлечение целевого компонента.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что целевой компонент представляет собой сопряженное основание низкомолекулярной органической кислоты.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что целевой компонент представляет собой ацетат, лактат или же то и другое одновременно.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что имитируемый движущийся слой непрерывного ионного обмена представляет собой расширяющийся слой.

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что ионообменная смола представляет собой сильноосновную анионообменную смолу.

6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что микроорганизм получен из родительского микроорганизма, выбранного из группы, состоящей из *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia producta*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium coskatii*, *Clostridium drakei*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium magnum*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium scatologenes*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermautotrophica*, *Moorella thermoacetica*, *Oxobacter*

pfennigii, *Sporomusa ovata*, *Sporomusa silvacetica*, *Sporomusa sphaeroides* и *Thermoanaerobacter kivui*.

7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что микроорганизм является представителем рода *Clostridium*.

8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что микроорганизм получен из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei* или *Clostridium coskatii*.

9. Способ по п. 1, отличающийся тем, что газовый субстрат представляет собой промышленные газообразные отходы, промышленный дымовой газ, полученный из газифицированных отходов синтез-газ, полученный из газифицированной биомассы синтез-газ или любое их сочетание.

10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что целевой компонент подвергают химическому превращению с образованием одного или нескольких продуктов.

11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что целевое соединение представляет собой ацетат, а один или несколько продуктов представляют собой винилацетат.

12. Способ по п. 11, дополнительно включающий проведение химического превращения винилацетата с образованием поливинилацетата или поливинилового спирта.

13. Способ по п. 12, дополнительно включающий проведение химического превращения поливинилацетата или поливинилового спирта с образованием полимера, сополимера, клея, покрытия, краски, пленки, текстильного изделия, пены, изоляции для проводов или изоляции для кабелей.

14. Способ отделения целевого компонента от ферментационного бульона, включающий:

- а. ферментацию газового субстрата и микроорганизма с образованием ферментационного бульона, содержащего указанный микроорганизм и целевой компонент;

- b. передачу ферментационного бульона в первую зону сепарации для отделения первой части ферментационного бульона, содержащего микроорганизм, и его рециркуляции в биореактор;
- c. передачу второй части ферментационного бульона во вторую зону сепарации, содержащую ионообменную смолу;
- d. избирательное удерживание целевого компонента за счет ионного обмена с указанной смолой и передачу остатка через вторую зону сепарации; и
- e. регенерацию ионообменной смолы с помощью регенерата и извлечение целевого компонента

15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что регенерат содержит по меньшей мере часть указанного остатка или получен из указанного остатка.

16. Способ по п. 14, отличающийся тем, что целевой компонент представляет собой сопряженное основание низкомолекулярной органической кислоты.

17. Способ по п. 14, отличающийся тем, что целевой компонент представляет собой ацетат, лактат или же то и другое одновременно.

18. Способ по п. 14, отличающийся тем, что ионообменная смола представляет собой сильноосновную анионообменную смолу.

19. Способ по п. 14, отличающийся тем, что газовый субстрат представляет собой промышленные газообразные отходы, промышленный дымовой газ, полученный из газифицированных отходов синтез-газ, полученный из газифицированной биомассы синтез-газ или любое их сочетание.

20. Способ по п. 14, отличающийся тем, что целевой компонент подвергают химическому превращению с образованием одного или нескольких продуктов.

21. Способ по п. 20, отличающийся тем, что целевое соединение представляет собой ацетат, а один или несколько продуктов представляют собой винилацетат.

22. Способ по п. 21, дополнительно включающий проведение химического превращения винилацетата с образованием поливинилацетата или поливинилового спирта.

23. Способ по п. 22, дополнительно включающий проведение химического превращения поливинилацетата или поливинилового спирта с образованием полимера, сополимера, клея, покрытия, краски, пленки, текстильного изделия, пены, изоляции для проводов или изоляции для кабелей.

24. Устройство для биологической конверсии, содержащее:

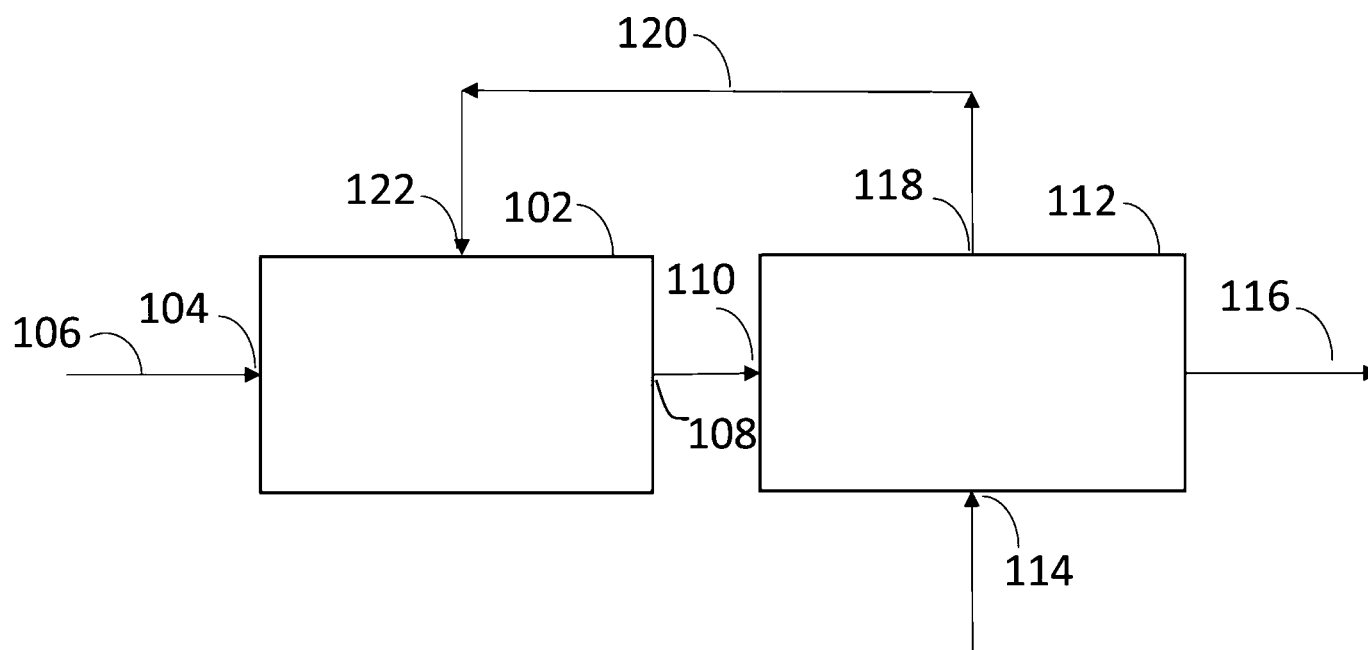
- a. систему биореактора, содержащую вход в биореактор, содержащий культуральную среду и микроорганизмы для метаболической трансформации источника углерода в субстрате и получения продукта, и выход из биореактора; и
- b. зону сепарации, содержащую первый вход, сообщающийся по текучей среде с выходом указанного биореактора, слой ионообменной смолы в конфигурации имитируемого движущегося слоя, второй вход, сообщающийся по текучей среде с источником регенерата, выход, сообщающийся по текучей среде с системой биореактора, и выход для продукта.

25. Устройство для биологической конверсии по п. 24, отличающееся тем, что слой ионообменной смолы представляет собой расширяющийся слой ионообменной смолы.

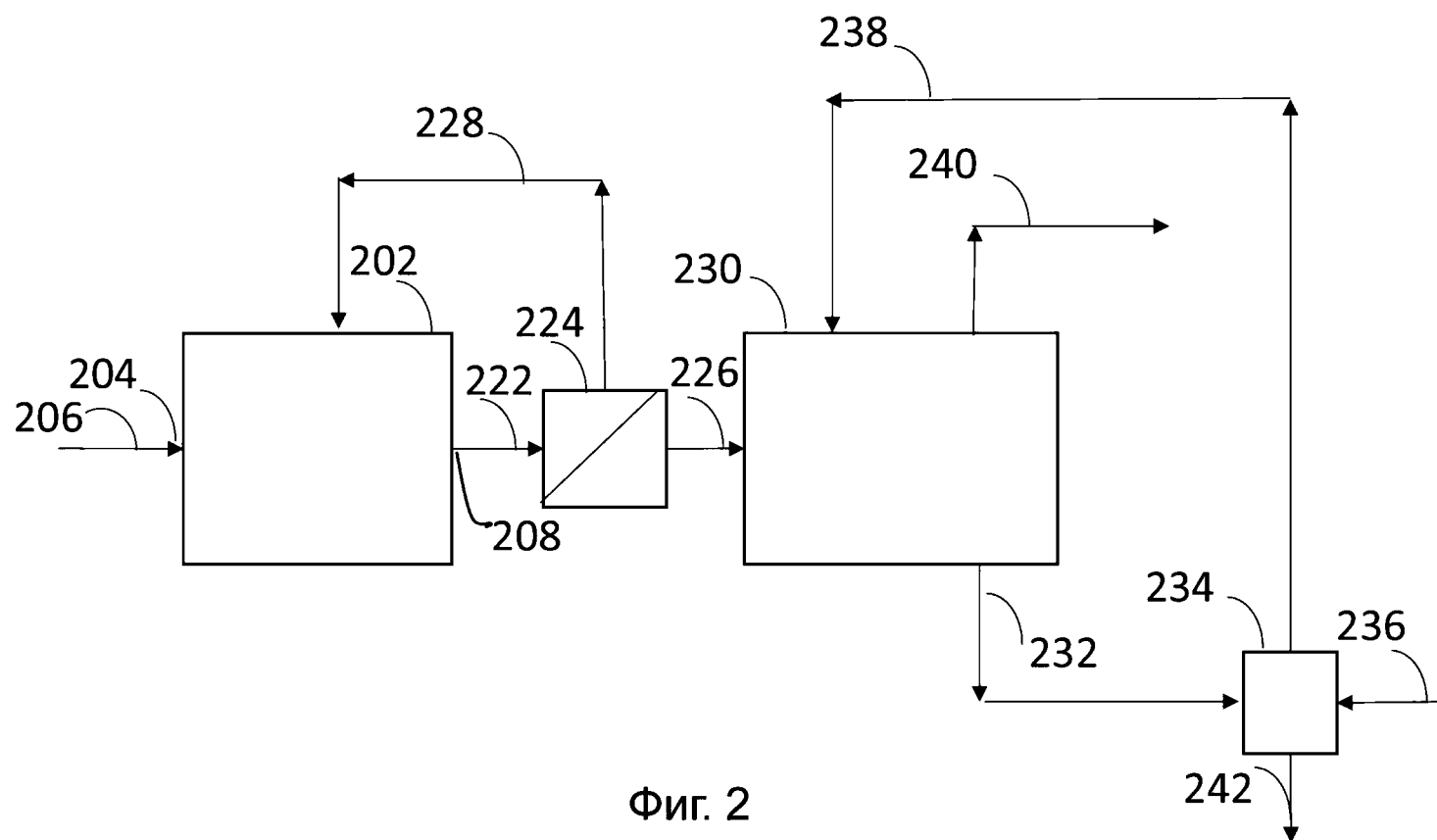
26. Устройство для биологической конверсии, содержащее:

- a. систему биореактора, содержащую вход в биореактор, содержащий культуральную среду и микроорганизмы для метаболической трансформации источника углерода в субстрате и получения продукта, и выход из биореактора;
- b. первую зону сепарации, содержащую вход, сообщающийся по текучей среде с выходом биореактора, мембрану для отделения микробной биомассы, выход для ретентата, сообщающийся по текучей среде с биореактором, и выход для пермеата; и
- c. вторую зону сепарации, содержащую первый вход, сообщающийся по текучей среде с выходом для пермеата из первой зоны сепарации, по меньшей мере один слой ионообменной смолы, второй вход, сообщающийся по текучей среде

с источником регенерата, выход, сообщающийся по текучей среде с источником регенерата, и выход для продукта.



Фиг. 1



Фиг. 2