



(51) МПК  
*C12P 7/02* (2006.01)  
*C12P 7/06* (2006.01)  
*C12P 7/08* (2006.01)  
*C12P 7/16* (2006.01)  
*C12N 1/20* (2006.01)  
*C12R 1/02* (2006.01)  
*C12R 1/145* (2006.01)

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(52) СПК

*C12P 7/02* (2006.01); *C12P 7/065* (2006.01); *C12P 7/08* (2006.01); *C12P 7/16* (2006.01); *C12N 1/20* (2006.01);  
*C12R 1/02* (2006.01); *C12R 1/145* (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2015151914, 05.06.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
05.06.2014

Дата регистрации:  
17.04.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
10.06.2013 US 61/833,240;  
02.06.2014 US 14/293,111

(43) Дата публикации заявки: 14.07.2017 Бюл. № 20

(45) Опубликовано: 17.04.2018 Бюл. № 11

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 11.01.2016(86) Заявка РСТ:  
US 2014/041115 (05.06.2014)(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2014/200810 (18.12.2014)

Адрес для переписки:  
119019, Москва, Гоголевский б-р, 11, этаж 3,  
"Гоулингз Интернэшнл Инк.", Лыгу Татьяна  
Нгоковна

(72) Автор(ы):

**СЕНАРАТНЕ Райан Х. (US),  
 БЕЛЛИ Питер Симпсон (GB),  
 ЛЮ Сун (US),  
 СКОТТ Сирона Р. (US)**

(73) Патентообладатель(и):  
**ИНЕОС БИО СА (CH)**

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: WO 2012/026833 A1, 01.03.2012. WO  
2010/064933 A1, 10.06.2010. RU 2010121637 A,  
10.12.2011.

**(54) СПОСОБ ФЕРМЕНТАЦИИ СОДЕРЖАЩИХ СО ГАЗООБРАЗНЫХ СУБСТРАТОВ В СРЕДЕ С НИЗКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ФОСФАТА, ЭФФЕКТИВНЫЙ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ПОТРЕБЛЕНИЯ ВОДЫ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Предложен способ получения этанола, предусматривающий ферментацию содержащих СО газообразных субстратов с помощью ацетогенных бактерий. Способ включает получение среды ферментации путем смешивания жидких сред, содержащих переходный металл, выбранный из группы, состоящей из W, Zn, Co,

Ni, со второй жидкой средой, содержащей переходный металл, выбранный из группы, состоящей из W, Zn, Co, Ni, и необязательно элемент - неметалл Se. Изобретение обеспечивает ферментацию содержащих СО газообразных субстратов с пониженным количеством воды и предотвращение осаждения элементов в среде. 11 з.п. ф-лы, 1 ил., 2 пр.



(51) Int. Cl.  
*C12P 7/02* (2006.01)  
*C12P 7/06* (2006.01)  
*C12P 7/08* (2006.01)  
*C12P 7/16* (2006.01)  
*C12N 1/20* (2006.01)  
*C12R 1/02* (2006.01)  
*C12R 1/145* (2006.01)

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*C12P 7/02* (2006.01); *C12P 7/065* (2006.01); *C12P 7/08* (2006.01); *C12P 7/16* (2006.01); *C12N 1/20* (2006.01);  
*C12R 1/02* (2006.01); *C12R 1/145* (2006.01)

(21)(22) Application: **2015151914, 05.06.2014**(24) Effective date for property rights:  
**05.06.2014**Registration date:  
**17.04.2018**

Priority:

(30) Convention priority:  
**10.06.2013 US 61/833,240;**  
**02.06.2014 US 14/293,111**(43) Application published: **14.07.2017** Bull. № 20(45) Date of publication: **17.04.2018** Bull. № 11(85) Commencement of national phase: **11.01.2016**(86) PCT application:  
**US 2014/041115 (05.06.2014)**(87) PCT publication:  
**WO 2014/200810 (18.12.2014)**

Mail address:

**119019, Moskva, Gogolevskij b-r, 11, etazh 3,**  
**"Goulingz Interneshnl Ink.", Lyu Tatyana Ngokovna**

(72) Inventor(s):

**SENARATNE Ryan H. (US),**  
**BELL Peter Simpson (GB),**  
**LIU Song (US),**  
**SCOTT Syrona R. (US)**

(73) Proprietor(s):

**INEOS BIO SA (CH)****(54) PROCESS FOR FERMENTING CO-CONTAINING GASEOUS SUBSTRATES IN A LOW PHOSPHATE MEDIUM EFFECTIVE FOR REDUCING WATER USAGE**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology. Method for producing ethanol is provided, which involves the fermentation of CO-containing gaseous substrates by means of acetogenous bacteria. Method includes obtaining a fermentation medium by mixing liquid media containing a transition metal selected from the group consisting of W, Zn, Co, Ni, with a second

liquid medium comprising a transition metal selected from the group consisting of W, Zn, Co, Ni, and optionally a non-metal element Se.

EFFECT: invention provides for the fermentation of CO-containing gaseous substrates with a reduced amount of water and prevention of the deposition of elements in the medium.

12 cl, 1 dwg, 2 ex

Ссылка на родственную заявку

Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США №61/833240, которая подана 10 июня 2013 г. и полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

5 Область техники

Предусмотрен способ ферментации содержащих СО газообразных субстратов в среде с низким содержанием фосфата. Более конкретно способ предусматривает ферментацию содержащего СО газообразного субстрата в среде, полученной путем, который требует сниженных количеств воды.

10 Уровень техники

Ацетогенные микроорганизмы могут производить этанол из монооксида углерода (СО) посредством ферментации газообразных субстратов. В ферментациях с использованием анаэробных микроорганизмов из рода Clostridium получают этанол и другие применимые продукты. Например, в патенте США №5173429 описан Clostridium 15 ljungdahlii ATCC №49587, анаэробный микроорганизм, который производит этанол и ацетат из синтез-газа. В патенте США №5807722 описан способ и устройство для превращения отходящих газов в органические кислоты и спирты с использованием Clostridium ljungdahlii ATCC №55380. В патенте США №6136577 описан способ и устройство для превращения отходящих газов в этанол с использованием Clostridium 20 ljungdahlii ATCC №№55988 и 55989.

В способах ферментации зачастую требуются большие количества воды и питательных веществ. Снижение потребления воды, устранение определенных компонентов и снижение требуемых уровней концентраций других компонентов при 25 сохранении продуктивности по спирту может обеспечить существенное снижение производственных затрат, особенно при ферментации в промышленном масштабе.

Сущность изобретения

Предусмотрен способ ферментации содержащих СО газообразных субстратов с использованием пониженных количеств воды. Используемую в способе среду ферментации получают путем, который требует существенно уменьшенных количеств 30 воды и сниженного содержания фосфата.

Способ ферментации предусматривает смешивание жидкой среды, которая содержит по меньшей мере один элемент - переходный металл, с жидкой средой, которая содержит по меньшей мере по меньшей мере один другой элемент - переходный металл и один элемент - неметалл для получения среды ферментации. Способ предусматривает 35 приведение в контакт содержащего СО субстрата со средой ферментации и ферментацию содержащего СО субстрата для обеспечения кислого значения рН. Способ является эффективным для предотвращения осаждения одного или нескольких элементов - переходных металлов одним или несколькими элементами - неметаллами и эффективным для использования приблизительно 2 американских галлонов (7,57 л) воды или меньше, 40 доставленных в среду ферментации, на полученный американский галлон (3,79 л) этанола.

Способ ферментации содержащего СО субстрата предусматривает доставку содержащего СО субстрата в биореактор и приведение в контакт содержащего СО субстрата со средой ферментации. Способ предусматривает получение среды 45 ферментации с помощью способа, который предусматривает смешивание первого раствора, который содержит один или несколько элементов, выбранных из группы, состоящей из Zn, Co и Ni, со вторым раствором, который содержит один или несколько элементов из группы, состоящей из W и Se, в количествах, эффективных для получения

среды ферментации, характеризующейся электропроводностью составляющей приблизительно 30 мСм/см или меньше и содержащей приблизительно 3 мМ фосфата или меньше. Ферментация содержащего СО субстрата является эффективной для обеспечения STY (выхода продукта за один проход в единицу времени на единицу объема контактного пространства) 10 г общего спирта/(л·день) или больше и является эффективной для использования

приблизительно 2 американских галлонов (7,57 л) воды или меньше, доставленных в среду ферментации, на полученный американский галлон (3,79 л) этанола.

Согласно другому аспекту способ снижения потребления воды в получении среды ферментации предусматривает смешивание раствора, который содержит элемент, выбранный из группы, состоящей из одного или нескольких из Zn, Co, Ni, с раствором, который содержит элемент из группы, состоящей из одного или нескольких из W, Se, в количествах, эффективных для получения среды ферментации, характеризующейся электропроводностью, составляющей приблизительно 30 мСм/см или меньше. Среда ферментации требует приблизительно на 10% - приблизительно на 40% меньше воды, чем среда ферментации, содержащая больше чем приблизительно 3 мМ фосфата.

#### Краткое описание фигур

Приведенные выше и другие аспекты, признаки и преимущества некоторых аспектов способа станут более очевидными из следующей фигуры.

На фигуре 1 проиллюстрирована производительность стационарной культуры *Clostridium ljungdahlii* на среде с низким содержанием фосфата и применение NH<sub>4</sub>OH в качестве основания для контроля pH и который функционирует в качестве источника азота.

#### Подробное описание изобретения

Следующее описание не следует рассматривать в ограничивающем смысле, оно приведено исключительно с целью описания общих принципов иллюстративных вариантов осуществления. Объем настоящего изобретения должен определяться со ссылкой на формулу изобретения.

Согласно одному аспекту содержания питательных веществ в подаче питательных веществ в биореактор оптимизируют так, чтобы % потребление каждого питательного вещества ацетогенными бактериями в биореакторе являлось по существу одинаковым. Неожиданным оказалось то, что нарушения равновесия в количествах потребленных питательных веществ и полученных остаточных количеств питательных веществ в среде приводят к увеличенной проводимости и снижению производительности ферментации. Для того чтобы уменьшить повышенную электропроводность требовались большие

количества воды. Точное уравнивание доставленных и потребляемых питательных веществ приводит к снижению потреблению воды и снижению использованию питательных веществ. Согласно настоящему аспекту питательная среда и способ ферментации оптимизирует использование питательных веществ так, что используются 90% или больше питательных веществ, и согласно другому аспекту используются по меньшей мере приблизительно 95% или больше питательных веществ.

Ферментации синтез-газа, проведенные в биореакторах с помощью среды и ацетогенных бактерий, описанных в настоящем документе, являются эффективными для обеспечения превращений СО в синтез-газе в спирты и другие продукты. Согласно настоящему аспекту продуктивность может быть выражена как STY (выход продукта за один проход в единицу времени на единицу объема контактного пространства, выраженный как г общего спирта/(л·день)). Согласно настоящему аспекту способ

эффективен для обеспечения STY (выхода продукта за один проход в единицу времени на единицу объема контактного пространства), составляющего по меньшей мере приблизительно 10 г или больше общего спирта/(л·день). Возможные значения STY включают в себя приблизительно 10 г общего спирта/(л·день) - приблизительно 200 г общего спирта/(л·день), согласно другому аспекту приблизительно 10 г, общего спирта/(л·день) - приблизительно 160 г общего спирта/(л·день), согласно другому аспекту приблизительно 10 г общего спирта/(л·день) - приблизительно 120 г общего спирта/(л·день), согласно другому аспекту приблизительно 10 г общего спирта/(л·день) - приблизительно 80 г общего спирта/(л·день), согласно другому аспекту приблизительно 20 г общего спирта/(л·день) - приблизительно 140 г общего спирта/(л·день), согласно другому аспекту приблизительно 20 г общего спирта/(л·день) - приблизительно 100 г общего спирта/(л·день), согласно другому аспекту приблизительно 40 г общего спирта/(л·день) - приблизительно 140 г общего спирта/(л·день) и согласно другому аспекту приблизительно 40 г общего спирта/(л·день) - приблизительно 100 г общего спирта/(л·день).

#### Определения

Если не определено иное, следующие термины, используемые в описании изобретения для настоящего раскрытия, определены следующим образом и могут предусматривать приведенные ниже определения либо в форме единственного числа, либо в форме множественного числа:

Термин "приблизительно", модифицирующий любое количество, относится к отклонению этого количества, которое встречается в реальных условиях, например, в лаборатории, экспериментальной установке или производственном объекте. Например, количество ингредиента или параметра, используемого в смеси или количестве при модификации с помощью "приблизительно", включает в себя отклонение и степень точности, как правило, используемые в измерении в экспериментальных условиях в производственной установке или лаборатории. Например, количество компонента продукта, модифицированное с помощью термина "приблизительно", включает в себя отклонение между партиями в множественных экспериментах в установке или лаборатории и отклонение, свойственное аналитическому способу. Независимо от того, модифицированы ли количества термином "приблизительно" или нет, они включают в себя эквиваленты указанных количеств. Любое количество, указанное в настоящем документе и модифицированное с помощью термина "приблизительно", также может использоваться в настоящем раскрытии как количество, не модифицированное с помощью термина "приблизительно".

Термин "газообразный субстрат" используется в неограничивающем смысле для обозначения субстратов, содержащих или полученных из одного или нескольких газов.

Термин "синтез-газ" или "сингаз" означает синтез-газ, который представляет собой название, присвоенное смеси газов, которая содержит изменяющиеся количества монооксида углерода и водорода. Примеры способов получения включают в себя паровой риформинг природного газа или углеводородов с получением водорода, газификацию угля и некоторые виды производств по газификации отходящих газов с получением энергии. Название происходит от его применения в качестве промежуточных соединений в получении синтетического природного газа (SNG) и для получения аммиака или метанола. Синтез-газ является горючим и часто используется в качестве источника топлива или в качестве промежуточного соединения для получения других химических соединений.

Термин "биореактор" включает в себя устройство для ферментации, состоящее из

одного или нескольких сосудов и/или колонн или трубопроводов, которое включает в себя проточный реактор с перемешиванием (CSTR), реактор с иммобилизованными клетками (ICR), реактор с орошаемым слоем (TBR), реактор с биопленочным подвижным слоем (MBBR), барботажную колонну, газлифтный ферментер, мембранный реактор, такой как биореактор с системой полых волокон (HFMBR), статический смеситель, или другой сосуд или другое устройство, подходящее для газожидкостного контакта.

Предусмотрено, что термины "ферментация", "способ ферментации" или "реакция ферментации" и подобное охватывают как фазу роста, так и фазу биосинтеза продукта согласно способу. Согласно одному аспекту ферментация относится к превращению СО в спирт.

Термин "плотность клеток" означает массу клеток микроорганизма на единицу объема ферментативного бульона, например, г/л.

Термин "увеличение эффективности", "увеличенная эффективность" и подобное в отношении способа ферментации предусматривает увеличение одного или нескольких из скорости роста микроорганизмов при ферментации, объема или массы требуемого продукта (такого как спирты), производимого на объем или массу потребленного субстрата (такого как монооксид углерода), скорости продукции или уровень продукции требуемого продукта и относительной доли произведенного требуемого продукта по сравнению с другими побочными продуктами ферментации.

Используемый в настоящем документе термин "общий спирт" включает в себя этанол, бутанол, пропанол и метанол. Согласно одному аспекту общий спирт может включать в себя по меньшей мере приблизительно 75 масс. % этанола или больше, согласно другому аспекту приблизительно 80 масс. % этанола или больше, согласно другому аспекту приблизительно 85 масс. % этанола или больше, согласно другому аспекту приблизительно 90 масс. % этанола или больше и согласно другому аспекту приблизительно 95 масс. % или больше этанола. Согласно другому аспекту общий спирт может включать в себя приблизительно 25 масс. % бутанола или меньше.

Термин "специфическое поглощение СО" означает количество СО в ммоль, потребленное единицей массы клеток микроорганизма (г) за единицу времени в минутах, т.е. ммоль/г/мин.

Содержащий СО субстрат

Содержащий СО субстрат может включать в себя любой газ, который включает в себя СО. Согласно настоящему аспекту содержащий СО газ может включать в себя синтез-газ, промышленные газы и их смеси.

Синтез-газ может быть получен из любого известного источника. Согласно одному аспекту источником синтез-газа может являться газификация углеродистых материалов. Газификация предусматривает неполное сгорание биомассы в ограниченной подаче кислорода. Полученный газ в основном включает в себя СО и Н<sub>2</sub>. Согласно настоящему аспекту синтез-газ будет содержать по меньшей мере приблизительно 10 моль % СО, согласно одному аспекту по меньшей мере приблизительно 20 моль %, согласно одному аспекту приблизительно 10 - приблизительно 100 моль %, согласно другому аспекту приблизительно 20 - приблизительно 100 моль % СО, согласно другому аспекту приблизительно 30 - приблизительно 90 моль % СО, согласно другому аспекту приблизительно 40 - приблизительно 80 моль % СО, и согласно другому аспекту приблизительно 50 - приблизительно 70 моль % СО. Некоторые примеры подходящих способов и устройства для газификации предусмотрены в патентных заявках США с серийными №№61/516667, 61/516704 и 61/516646, все из которых поданы 6 апреля 2011 г., и в патентных заявках США с серийными №№13/427144, 13/427193 и 13/427247, все

из которых поданы 22 марта 2012 г. и все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно другому аспекту способ характеризуется применимостью для поддержания производства спирта из газообразных субстратов, таких как содержащие высокие объемы СО промышленные дымовые газы. Согласно некоторым аспектам газ, который содержит СО, получают из углеродсодержащих отходов производства, например, промышленных отработанных газов или путем газификации других отходов производства. В связи с этим, способы представляют эффективные способы улавливания СО<sub>2</sub>, который в противном случае выделялся бы в окружающую среду. Примеры промышленных дымовых газов включают в себя газы, произведенные во время промышленного производства продуктов черной металлургии, промышленного производства продуктов цветной металлургии, способов перегонки нефти, газификации угля, газификации биомассы, производства электроэнергии, производства углеродной сажи, производства аммиака, производства метанола и промышленного производства кокса.

В зависимости от состава содержащего СО субстрата он может быть доставлен напрямую в способ ферментации или может быть дополнительно модифицирован.; чтобы включать в себя соответствующее молярное отношение Н<sub>2</sub> к СО. Согласно одному аспекту содержащий СО субстрат, доставленный в биореактор, характеризуется молярным отношением Н<sub>2</sub> к СО, составляющим приблизительно 0,2 или больше, согласно другому аспекту приблизительно 0,25 или больше и согласно другому аспекту приблизительно 0,5 или больше. Согласно другому аспекту содержащий СО субстрат, доставленный в биореактор, может содержать приблизительно 40 мольных процентов или больше СО вместе с Н<sub>2</sub> и приблизительно 30 мольных процентов или меньше СО, согласно другому аспекту приблизительно 50 мольных процентов или больше СО вместе с Н<sub>2</sub> и приблизительно 35 мольных процентов или меньше СО, и согласно другому аспекту приблизительно 80 мольных процентов или больше СО вместе с Н<sub>2</sub> и приблизительно 20 мольных процентов или меньше СО.

Согласно одному аспекту содержащий СО субстрат в основном включает в себя СО и Н<sub>2</sub>. Согласно настоящему аспекту содержащий СО субстрат будет содержать по меньшей мере приблизительно 10 моль % СО, согласно одному аспекту по меньшей мере приблизительно 20 моль %, согласно одному аспекту приблизительно 10 - приблизительно 100 моль %, согласно другому аспекту приблизительно 20 - приблизительно 100 моль % СО, согласно другому аспекту приблизительно 30 - приблизительно 90 моль % СО, согласно другому аспекту приблизительно 40 - приблизительно 80 моль % СО и согласно другому аспекту приблизительно 50 - приблизительно 70 моль % СО. содержащий СО субстрат будет характеризоваться отношением СО/СО<sub>2</sub>, составляющим по меньшей мере приблизительно 0,75, согласно другому аспекту по меньшей мере приблизительно 1,0 и согласно другому аспекту по меньшей мере приблизительно 1,5.

Согласно одному аспекту газоотделитель сконфигурирован так, чтобы по существу отделять по меньшей мере одну часть газового потока, причем часть включает в себя один или несколько компонентов. Например, газоотделитель может отделять СО<sub>2</sub> от газового потока, содержащего следующие компоненты: СО, СО<sub>2</sub>, Н<sub>2</sub>, причем СО<sub>2</sub> может поступать в устройство для удаления СО<sub>2</sub>, а остаток газового потока (содержащий СО и Н<sub>2</sub>) может поступать в биореактор. Можно использовать любой известный в настоящей

области техники газоотделитель. Согласно настоящему аспекту синтез-газ, доставленный в биореактор, будет содержать приблизительно 10 моль % или меньше  $\text{CO}_2$ , согласно другому аспекту приблизительно 1 моль % или меньше  $\text{CO}_2$  и согласно другому аспекту приблизительно 0,1 моль % или меньше  $\text{CO}_2$ .

5 Определенные газовые потоки могут включать в себя высокую концентрацию  $\text{CO}$  и низкие концентрации  $\text{H}_2$ . Согласно одному аспекту может быть необходимо оптимизировать состав потока субстрата для достижения повышенной эффективности производства спирта и/или общего улавливания  $\text{CO}_2$ . Например, концентрация  $\text{H}_2$  в

10 потоке субстрата можно увеличить до поступления потока в биореактор. Согласно конкретным аспектам настоящего изобретения потоки из двух или нескольких источников можно комбинировать и/или смешивать для получения требуемого и/или оптимизированного потока субстрата. Например, поток, содержащий высокую концентрацию  $\text{CO}$ , такой как выхлопные газы из конвертера

15 металлургического комбината, можно комбинировать с потоком, содержащим высокие концентрации  $\text{H}_2$ , таким как отходящий газ из коксовой печи металлургического комбината. В зависимости от состава газообразного содержащего  $\text{CO}$  субстрата также может потребоваться его обработка для удаления каких-либо нежелательных примесей, таких

20 как частицы пыли, до введения его в устройство для ферментации. Например, газообразный субстрат можно подвергнуть фильтрации или скрубберной очистке с применением известных способов.

Конструкция и функционирование биореактора  
25 Описания конструкций биореактора представлены в патентных заявках США с серийными №№ 13/471827 и 13/471858, обе из которых поданы 15 мая 2012 г., и в патентной заявке США с серийным № 13/473167, поданной 16 мая 2012 г., все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

30 Согласно одному аспекту способ ферментации начинается с добавления среды в бак реактора. Некоторые примеры композиций среды описаны в патентных заявках США с серийными №№ 61/650098 и 61/650093, поданных 22 мая 2012 г., и в патенте США № 7285402, поданном 23 июля 2001 г., все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки. Среду можно стерилизовать для удаления нежелательных микроорганизмов и реактор инокулировать требуемыми микроорганизмами. Стерилизация требуется не всегда.

35 Согласно одному аспекту используемые микроорганизмы включают в себя ацетогенные бактерии. Примеры применимых ацетогенных бактерий включают в себя бактерии рода *Clostridium*, такие как штаммы *Clostridium ljungdahlii*, включая в себя штаммы, описанные в международной патентной публикации WO 2000/68407, европейском патенте EP 117309, патентах США №№ 5173429, 5593886 и 6368819,



патента США №2007/0276447. Другие подходящие микроорганизмы включает в себя микроорганизмы рода *Moorella*, включая в себя *Moorella* sp. HUC22-1, и микроорганизмы рода *Carboxydothermus*. Каждая из приведенных ссылок включена в настоящий документ посредством ссылки. Можно использовать смешанные культуры двух или нескольких

5

Некоторые примеры применимых бактерий включают в себя *Acetogenium kivui*, *Acetoanaerobium noterae*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchi* CP11 (ATCC BAA-1772), *Blautia producta*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Caldanaerobacter subterraneus*, *Caldanaerobacter subterraneus pacificus*, *Carboxydothermus hydrogenoformans*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium acetobutylicum* P262 (DSM 19630 в DSMZ, Германия), *Clostridium autoethanogenum* (DSM 19630 в DSMZ, Германия), *Clostridium autoethanogenum* (DSM 10061 в DSMZ, Германия), *Clostridium autoethanogenum* (DSM 23693 в DSMZ, Германия), *Clostridium autoethanogenum* (DSM 24138 в DSMZ, Германия), *Clostridium carboxidivorans* P7 (ATCC PTA-7827), *Clostridium coskatii* (ATCC PTA-10522),

10 *Clostridium drakei*, *Clostridium ljungdahlii* PETC (ATCC 49587), *Clostridium ljungdahlii* ERI2 (ATCC 55380), *Clostridium ljungdahlii* C-01 (ATCC 55988), *Clostridium ljungdahlii* O-52 (ATCC 55889), *Clostridium magnum*, *Clostridium pasteurianum* (DSM 525 в DSMZ, Германия), *Clostridium ragsdali* P11 (ATCC BAA-622), *Clostridium scatologenes*, *Clostridium thermoaceticum*, *Clostridium ultunense*, *Desulfotomaculum kuznetsovii*, *Eubacterium limosum*,

15 *Geobacter sulfurreducens*, *Methanosarcina acetivorans*, *Methanosarcina barkeri*, *Morrella thermoacetica*, *Morrella thermoautotrophica*, *Oxobacter pfennigii*, *Peptostreptococcus productus*, *Ruminococcus productus*, *Thermoanaerobacter kivui* и их смеси.

10

15

20

Ферментация предпочтительно должна проводиться при соответствующих условиях для того, чтобы произошла требуемая ферментация (например, CO до этанола). Условия

25 реакции, которые необходимо учитывать, включают в себя давление, температуру, расход газа, расход жидкости, pH среды, окислительно-восстановительный потенциал среды, скорость перемешивания (при использовании проточного реактора с мешалкой), содержание инокулята, максимальные концентрации газообразного субстрата, чтобы удостовериться в том, что CO в жидкой фазе не станет ограничивающим, и

30 максимальные концентрации продукта, чтобы избежать ингибирования продукта.

25

30

Способы согласно настоящему изобретению можно использовать для поддержания жизнеспособности в микробиологической культуре, причем микробиологическая культура ограничена в отношении CO так, чтобы скорость переноса CO в раствор была меньше, чем скорость поглощения культуры. Такие ситуации могут возникать,

35 когда содержащий CO субстрат не непрерывно поставляется в микробиологическую культуру скорость массопереноса является низкой или в потоке субстрата недостаточно CO для поддержания жизнеспособности культуры при оптимальной температуре. Согласно таким вариантам осуществления микробиологическая культура будет быстро истощать CO, растворенный в жидкой питательной среде, и становиться ограниченной

40 в отношении субстрата, поскольку дополнительный субстрат не может быть доставлен достаточно быстро.

35

40

Запуск: При инокуляции начальную скорость подачи исходного газа устанавливают так, чтобы она была эффективной для обеспечения исходной популяции микроорганизмов. Выходящий газ анализируют для определения содержания

45 выходящего газа. Результаты анализа газа используют для контроля скоростей подачи исходного газа. Согласно настоящему аспекту способ предусматривает отношение расчетной концентрации CO к исходной плотности клеток, составляющее приблизительно 0,5 - приблизительно 0,9, согласно другому аспекту приблизительно

0,6 - приблизительно 0,8, согласно другому аспекту приблизительно 0,5 - приблизительно 0,7, и согласно другому аспекту приблизительно 0,5 - приблизительно 0,6.

Согласно другому аспекту способ ферментации предусматривает доставку синтез-газ в среду ферментации в количестве, эффективном для обеспечения начальной расчетной концентрации CO в среде ферментации, составляющей приблизительно 0,15 мМ - приблизительно 0,70 мМ, согласно другому аспекту приблизительно 0,15 мМ - приблизительно 0,50 мМ, согласно другому аспекту приблизительно 0,15 мМ - приблизительно 0,35 мМ, согласно другому аспекту приблизительно 0,20 мМ - приблизительно 0,30 мМ и согласно другому аспекту приблизительно 0,23 мМ - приблизительно 0,27 мМ. Способ является эффективным для увеличения плотности клеток по сравнению с начальной плотностью клеток.

После запуска: По достижению требуемых содержаний жидкую фазу и клеточный материал извлекают из реактора и наполняют средой. Способ является эффективным для увеличения плотности клеток до приблизительно на 2,0 г/л или больше, согласно другому аспекту приблизительно 2 - приблизительно 30 г/л, согласно другому аспекту приблизительно 2 - приблизительно 25 г/л, согласно другому аспекту приблизительно 2 - приблизительно 20 г/л, согласно другому аспекту приблизительно 2 - приблизительно 10 г/л, согласно другому аспекту приблизительно 2 - приблизительно 8 г/л, согласно другому аспекту приблизительно 3 - приблизительно 30 г/л, согласно другому аспекту приблизительно 3 - приблизительно 6 г/л и согласно другому аспекту приблизительно 4 - приблизительно 5 г/л.

Согласно одному аспекту способ предусматривает среду ферментации, полученную с помощью способа, который предусматривает смешивание первого раствора, который содержит элемент, выбранный из группы, состоящей из одного или нескольких из Zn (также имеющего название бедная среда), Co, Ni, со вторым раствором, который содержит элемент из группы, состоящей из одного или нескольких из W и Se в количествах, эффективных для получения среды ферментации, характеризующейся электропроводностью, составляющей приблизительно 30 мСм/см или меньше. Согласно другому аспекту среда ферментации характеризуется электропроводностью, составляющей приблизительно 1 - приблизительно 30 мСм/см, согласно другому аспекту приблизительно 1 - приблизительно 25 мСм/см, согласно другому аспекту приблизительно 1 - приблизительно 20 мСм/см, согласно другому аспекту приблизительно 1 - приблизительно 15 мСм/см, согласно другому аспекту приблизительно 1 - приблизительно 10 мСм/см, согласно другому аспекту приблизительно 1 - приблизительно 5 мСм/см, согласно другому аспекту приблизительно 1 - приблизительно 4 мСм/см, согласно другому аспекту приблизительно 1 - приблизительно 3 мСм/см, согласно другому аспекту приблизительно 1 - приблизительно 2 мСм/см, согласно другому аспекту приблизительно 2 - приблизительно 30 мСм/см, согласно другому аспекту приблизительно 2 - приблизительно 25 мСм/см, согласно другому аспекту приблизительно 2 - приблизительно 20 мСм/см, согласно другому аспекту приблизительно 2 - приблизительно 15 мСм/см, согласно другому аспекту приблизительно 2 - приблизительно 10 мСм/см, согласно другому аспекту приблизительно 2 - приблизительно 5 мСм/см, приблизительно 2 - приблизительно 4 мСм/см, согласно другому аспекту приблизительно 2 - приблизительно 3 мСм/см, согласно другому аспекту приблизительно 3 - приблизительно 30 мСм/см, согласно другому аспекту приблизительно 3 - приблизительно 25 мСм/см, согласно другому аспекту приблизительно 3 - приблизительно 20 мСм/см, согласно другому аспекту приблизительно 3 - приблизительно 15 мСм/см, согласно другому аспекту

приблизительно 3 - приблизительно 10 мСм/см, согласно другому аспекту  
 приблизительно 3 - приблизительно 5 мСм/см, согласно другому аспекту приблизительно  
 4 - приблизительно 30 мСм/см, согласно другому аспекту приблизительно 4 -  
 5 приблизительно 25 мСм/см, согласно другому аспекту приблизительно 4 -  
 приблизительно 20 мСм/см, согласно другому аспекту приблизительно 4 -  
 приблизительно 15 мСм/см, согласно другому аспекту приблизительно 4 -  
 приблизительно 10 мСм/см и согласно другому аспекту приблизительно 4 -  
 приблизительно 5 мСм/см.

Согласно другому аспекту смесь элементов характеризуется оптической плотностью,  
 10 составляющей приблизительно 0,70 или меньше при 580 нм. Согласно другому аспекту  
 смесь характеризуется оптической плотностью, составляющей приблизительно 0 -  
 приблизительно 0,70, согласно другому аспекту приблизительно 0,001 - приблизительно  
 0,65, согласно другому аспекту приблизительно 0,01 - приблизительно 0,65, согласно  
 другому аспекту приблизительно 0,01 - приблизительно 0,50 и согласно другому аспекту  
 15 приблизительно 0,01 - приблизительно 0,45. Согласно настоящему аспекту мутность  
 можно определить любыми известными способами. Некоторые примеры измерений  
 оптической плотностью описаны в EPA Guidance Manual, Turbidity Processes, April 1999,  
 которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно другому аспекту среда ферментации содержит меньше чем приблизительно  
 20 14 мМ фосфата. Согласно родственному аспекту среда ферментации содержит  
 приблизительно 2 - приблизительно 14 мМ фосфата, согласно другому аспекту  
 приблизительно 3 - приблизительно 12 мМ фосфата, согласно другому аспекту  
 приблизительно 3 - приблизительно 6 мМ фосфата, согласно другому аспекту  
 приблизительно 1 - приблизительно 3 мМ фосфата, согласно другому аспекту  
 25 приблизительно 1 - приблизительно 2 мМ фосфата и согласно другому аспекту  
 приблизительно 2 - приблизительно 3 мМ фосфата.

Согласно одному аспекту способ является эффективным в использования  
 приблизительно 2 американских галлонов (7,57 л) воды или меньше, доставленных в  
 среду ферментации, на 1 американский галлон (3,79 л) этанола. Согласно другому  
 30 аспекту способ является эффективным для использования приблизительно 0,5 -  
 приблизительно 2 галлонов (1,89-7,57 л) воды на галлон (3,79 л) этанола, согласно  
 другому аспекту приблизительно 0,5 - приблизительно 1,8 галлонов (1,89-6,81 л) воды  
 на галлон (3,79 л) этанола, согласно другому аспекту приблизительно 0,5 -  
 приблизительно 1,5 галлонов (1,89-5,68 л) воды на галлон (3,79 л) этанола, согласно  
 35 другому аспекту приблизительно 0,5 - приблизительно 1,35 галлонов (1,89-5,11 л) воды  
 на галлон (3,79 л) этанола, согласно другому аспекту приблизительно 0,5 -  
 приблизительно 1,2 галлонов (1,89-4,54 л) воды на галлон (3,79 л) этанола, согласно  
 другому аспекту приблизительно 0,5 - приблизительно 1 галлон (1,89-3,79 л) воды на  
 галлон (3,79 л) этанола, согласно другому аспекту приблизительно 0,5 - приблизительно  
 40 0,9 галлонов (1,89-3,41 л) воды на галлон (3,79 л) этанола, согласно другому аспекту  
 приблизительно 0,75 - приблизительно 2 галлонов (2,84-7,57 л) воды на галлон (3,79 л)  
 этанола, согласно другому аспекту приблизительно 0,75 - приблизительно 1,75 галлонов  
 (2,84-6,62 л) воды на галлон (3,79 л) этанола, согласно другому аспекту приблизительно  
 0,75 - приблизительно 1,5 галлонов (2,84-5,68 л) воды на галлон (3,79 л) этанола, согласно  
 45 другому аспекту приблизительно 0,75 - приблизительно 1,35 галлонов (2,84-5,11 л) воды  
 на галлон (3,79 л) этанола, согласно другому аспекту приблизительно 0,75 -  
 приблизительно 1,2 галлонов (2,84-4,54 л) воды на галлон (3,79 л)

этаноло, согласно другому аспекту приблизительно 0,75 - приблизительно 1 галлон

(2,84-3,79 л) воды на галлон (3,79 л) этанола, согласно другому аспекту приблизительно 1 - приблизительно 2 галлонов (3,79-7,57 л) воды на галлон (3,79 л) этанола, согласно другому аспекту приблизительно 1 - приблизительно 1,75 галлонов (3,79-6,62 л) воды на галлон (3,79 л) этанола, согласно другому аспекту приблизительно 1 - приблизительно 1,5 галлонов (3,79-5,68 л) воды на галлон (3,79 л) этанола, согласно другому аспекту приблизительно 1 - приблизительно 1,35 галлонов (3,79-5,11 л) воды на галлон (3,79 л) этанола, согласно другому аспекту приблизительно 1 - приблизительно 1,2 галлонов (3,79-4,54 л) воды на галлон (3,79 л) этанола, согласно другому аспекту приблизительно 1,5 - приблизительно 2 галлонов (5,68-7,57 л) воды на галлон (3,79 л) этанола, согласно другому аспекту приблизительно 1,5 - приблизительно 1,75 галлонов (5,68-6,62 л) воды на галлон (3,79 л) этанола и согласно другому аспекту приблизительно 1,75 - приблизительно 2 галлонов (6,62-7,57 л) воды на галлон (3,79 л) этанола.

Согласно другому аспекту среда ферментации требует приблизительно на 10% - приблизительно на 40% меньше воды, чем среда ферментации, содержащая приблизительно 3 мМ фосфата или больше. Согласно другому аспекту среда ферментации требует приблизительно на 10% - приблизительно на 30% меньше воды, согласно другому аспекту приблизительно на 10% - приблизительно на 20% меньше воды, согласно другому аспекту приблизительно на 15% - приблизительно на 40% меньше воды, согласно другому аспекту приблизительно на 15% - приблизительно на 30% меньше воды, согласно другому аспекту приблизительно на 15% - приблизительно на 20% меньше воды, согласно другому аспекту приблизительно на 20% - приблизительно на 40% меньше воды, согласно другому аспекту приблизительно на 20% - приблизительно на 30% меньше воды, и согласно другому аспекту приблизительно на 25% - приблизительно на 30% меньше воды, чем среда ферментации, содержащая приблизительно 3 мМ фосфата или больше. Согласно другому аспекту концентрации фосфата могут составлять приблизительно 2 - приблизительно 2,5 мМ и согласно другому аспекту приблизительно 2,5 мМ - приблизительно 3,0 мМ, и могут являться эффективными для достижения снижения потребления воды в указанных диапазонах.

Согласно другому аспекту в среду ферментации подают приблизительно 0,005 мкг Zn или больше в минуту на г клеток, приблизительно 0,0002 мкг Co или больше в минуту на г клеток, приблизительно 0,003 мкг Ni или больше в минуту на г клеток, приблизительно 0,039 мкг W или больше в минуту на г клеток, и приблизительно 0,001 мкг Se или больше в минуту на г клеток. Согласно настоящему аспекту среда ферментации может содержать следующие количества одного или нескольких из следующего:

Zn: согласно одному аспекту приблизительно 0,005 - приблизительно 0,11 мкг в минуту на г клеток, согласно другому аспекту приблизительно 0,005 - приблизительно 0,09 мкг в минуту на г клеток, согласно другому аспекту приблизительно 0,005 - приблизительно 0,065 мкг в минуту на г клеток, согласно другому аспекту приблизительно 0,005 - приблизительно 0,04 мкг в минуту на г клеток, согласно другому аспекту приблизительно 0,01 - приблизительно 0,075 мкг в минуту на г клеток, согласно другому аспекту приблизительно 0,01 - приблизительно 0,055 мкг в минуту на г клеток, согласно другому аспекту приблизительно 0,02 - приблизительно 0,075 мкг в минуту на г клеток, и согласно другому аспекту приблизительно 0,02 - приблизительно 0,055 мкг в минуту на г клеток; в качестве одного примера для конкретной продуктивности по этанолу, составляющей 3 г/л/день/г клеток, требуется скорость подачи Zn, составляющая приблизительно 0,04 мкг в минуту на г клеток;

Co: согласно одному аспекту приблизительно 0,002 - приблизительно 0,05 мкг в



Согласно другому аспекту в среду ферментации подают приблизительно 0,006 мкг N или больше в минуту на г клеток, приблизительно 0,025 мкг P или больше в минуту на г клеток, и приблизительно 0,001 мкг K или больше в минуту на г клеток. Согласно настоящему аспекту среда ферментации может содержать следующие количества одного или нескольких из следующего:

N: согласно одному аспекту приблизительно 0,006 - приблизительно 0,12 мкг в минуту на г клеток, согласно другому аспекту приблизительно 0,006 - приблизительно 0,095 мкг в минуту на г клеток, согласно другому аспекту приблизительно 0,006 - приблизительно 0,07 мкг в минуту на г клеток, согласно другому аспекту приблизительно 0,006 - приблизительно 0,045 мкг в минуту на г клеток, согласно другому аспекту приблизительно 0,01 - приблизительно 0,085 мкг в минуту на г клеток, согласно другому аспекту приблизительно 0,01 - приблизительно 0,06 мкг в минуту на г клеток, согласно другому аспекту приблизительно 0,02 - приблизительно 0,085 мкг в минуту на г клеток, и согласно другому аспекту приблизительно 0,02 - приблизительно 0,06 мкг в минуту на г клеток; в качестве одного примера для конкретной продуктивности по этанолу, составляющей 3 г/л/день/г клеток, требуется скорость подачи N, составляющая приблизительно 0,044 мкг в минуту на г клеток;

P: согласно одному аспекту приблизительно 0,025 - приблизительно 0,55 мкг в минуту на г клеток, согласно другому аспекту приблизительно 0,025 - приблизительно 0,45 мкг в минуту на г клеток, согласно другому аспекту приблизительно 0,025 - приблизительно 0,35 мкг в минуту на г клеток, согласно другому аспекту приблизительно 0,025 - приблизительно 0,20 мкг в минуту на г

клеток, согласно другому аспекту приблизительно 0,05 - приблизительно 0,38 мкг в минуту на г клеток, согласно другому аспекту приблизительно 0,05 - приблизительно 0,27 мкг в минуту на г клеток, согласно другому аспекту приблизительно 0,1 - приблизительно 0,38 мкг в минуту на г клеток, и согласно другому аспекту приблизительно 0,1 - приблизительно 0,3 мкг в минуту на г клеток; в качестве одного примера для конкретной продуктивности по этанолу, составляющей 3 г/л/день/г клеток, требуется скорость подачи P, составляющая приблизительно 0,2 мкг в минуту на г клеток;

K: согласно одному аспекту приблизительно 0,001 - приблизительно 25 мкг в минуту на г клеток, согласно другому аспекту приблизительно 0,001 - приблизительно 0,03 мкг в минуту на г клеток, согласно другому аспекту приблизительно 0,001 - приблизительно 0,025 мкг в минуту на г клеток, согласно другому аспекту приблизительно 0,001 - приблизительно 0,02 мкг в минуту на г клеток, согласно другому аспекту приблизительно 0,001 - приблизительно 0,01 мкг в минуту на г клеток, согласно другому аспекту приблизительно 0,003 - приблизительно 0,02 мкг в минуту на г клеток, согласно другому аспекту приблизительно 0,003 - приблизительно 0,015 мкг в минуту на г клеток, согласно другому аспекту приблизительно 0,005 - приблизительно 0,02 мкг в минуту на г клеток, и согласно другому аспекту приблизительно 0,005 - приблизительно 0,015 мкг в минуту на г клеток; в качестве одного примера для конкретной продуктивности по этанолу, составляющей 3 г/л/день/г клеток, требуется скорость подачи K, составляющая приблизительно 0,01 мкг в минуту на г клеток; Согласно другому аспекту среда ферментации содержит меньше чем приблизительно 0,02 масс. %  $\text{NaHCO}_3$ , согласно другому аспекту меньше чем приблизительно 0,01 масс. %  $\text{NaHCO}_3$  и согласно другому аспекту меньше чем приблизительно 0,005 масс. %  $\text{NaHCO}_3$ .  $\text{NH}_4\text{OH}$  можно использовать для доведения pH вместо  $\text{NaHCO}_3$ . Низкие содержания фосфата отдельно или в

комбинации со сниженным использованием  $\text{NaHCO}_3$  приводят к пониженной электропроводности среды. Пониженная электропроводность среды требует меньшего разведения и сниженной водопотребности в соответствии с описанным. Согласно родственному аспекту среда ферментации характеризуется значением pH, составляющим

5 приблизительно 4,2 - приблизительно 4,8.

Скорости подачи CO можно выразить в стандартных кубических футах в минуту (SCFM) или в стандартных кубических футах в час на литр. Согласно настоящему аспекту величина стандартных кубических футов в час на литр может находиться в

10 диапазоне, составляющем приблизительно 0,9 - приблизительно 2,0 и согласно другому аспекту приблизительно 1,25 - приблизительно 1,75 SCFM. Согласно другому аспекту средняя скорость подачи CO представляет собой скорость подачи CO, эффективную для поддержания отношения скорости подачи CO к объему биореактор, составляющего

15 приблизительно 0,016:1 - приблизительно 0,04:1, согласно другому аспекту приблизительно 0,02:1 - приблизительно 0,04:1, согласно другому аспекту приблизительно 0,02:1 - приблизительно 0,035:1, согласно другому аспекту приблизительно 0,025:1 - приблизительно 0,035:1 и согласно другому аспекту приблизительно 0,025:1 - приблизительно 0,03:1.

Согласно другому аспекту способ предусматривает мониторинг конверсии  $\text{H}_2$  и поддержание конверсии  $\text{H}_2$ , составляющей приблизительно 25% или больше, согласно

20 другому аспекту приблизительно 25% - приблизительно 95%, согласно другому аспекту приблизительно 30% - приблизительно 90%, согласно другому аспекту приблизительно 35% - приблизительно 85%, согласно другому аспекту приблизительно 40% -

25 приблизительно 80%, согласно другому аспекту приблизительно 40% - приблизительно 70%, согласно другому аспекту приблизительно 40% - приблизительно 60% и согласно другому аспекту приблизительно 40% - приблизительно 50%. Способ может дополнительно предусматривать мониторинг поглощения CO и поддержание

30 поглощения CO, составляющего приблизительно 0,001 - приблизительно 10 ммоль/мин/г сухих клеток, согласно другому аспекту приблизительно 0,001 - приблизительно 5 ммоль/мин/г сухих клеток, согласно другому аспекту приблизительно 0,001 -

35 приблизительно 4 ммоль/мин/г сухих клеток, согласно другому аспекту приблизительно 0,001 - приблизительно 3 ммоль/мин/г сухих клеток, согласно другому аспекту приблизительно 0,001 - приблизительно 2 ммоль/мин/г сухих клеток, согласно другому аспекту приблизительно 0,001 - приблизительно 1 ммоль/мин/г сухих клеток, согласно

40 другому аспекту приблизительно 0,05 - приблизительно 9 ммоль/мин/г сухих клеток, согласно другому аспекту приблизительно 0,05 - приблизительно 5 ммоль/мин/г сухих клеток, согласно другому аспекту приблизительно 0,05 - приблизительно 4 ммоль/мин/г сухих клеток,

согласно другому аспекту приблизительно 0,05 - приблизительно 3 ммоль/мин/г сухих клеток, согласно другому аспекту приблизительно 0,05 - приблизительно 2 ммоль/мин/г сухих клеток, согласно другому аспекту приблизительно 0,05 - приблизительно 1 ммоль/мин/г сухих клеток, согласно другому аспекту приблизительно 1 -

45 приблизительно 8 ммоль/мин/г сухих клеток, согласно другому аспекту приблизительно 1 - приблизительно 5 ммоль/мин/г сухих клеток, согласно другому аспекту приблизительно 1 - приблизительно 4 ммоль/мин/г сухих клеток, согласно другому аспекту приблизительно 1 - приблизительно 3 ммоль/мин/г сухих клеток и согласно другому аспекту приблизительно 1 - приблизительно 2 ммоль/мин/г сухих клеток.

## ПРИМЕРЫ

## Пример 1: Испытание на совместимость

Используемый ранее раствор металлических микроэлементов содержал следующие компоненты (все выраженные в г/л).

Маточный раствор    Испытание на совместимость

5	1) ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,5222	2,35
	2) COCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	1,6	7,196
	3) NiCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0,4944	2,222
10	4) Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,16	0,72
	5) Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	3,2	14,404
	6) H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (85%)	10%	N/A

15 Необходимо, чтобы кислая матрица содержала все вышеперечисленные 5 металлических микроэлементов в одном растворе. Тем не менее, указанные металлы сами по себе являются хорошо растворимыми в воде. Следовательно, испытание на совместимость проводили, как описано ниже. Получали отдельные растворы каждого металлического микроэлемента. Концентрация каждого раствора была равна концентрации каждого металлического микроэлемента в маточном растворе. Каждый 20 раствор смешивали с каждым из остальных и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре. Следующие утренние растворы визуально осматривали в отношении

мутности и оптическую плотность (перемешанных вихревым способом) растворов измеряли на спектрофотометре. Результаты показаны ниже.

25	1	2	3	4	5
		<b>C</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>T</b>
	1	0,007	0,016	0,001	0,487
			<b>C</b>	<b>ST</b>	<b>T</b>
	2		0,004	0,025	0,736
30				<b>ST</b>	<b>C</b>
	3			0,051	0,001
				<b>C</b>	
	4				0,002
	<b>C</b> – прозрачный <b>ST</b> –				
	слегка мутный				
35	<b>T</b> - мутный				
				1,2,3 - <b>C</b>	
				0,002	

40 Приведенные выше данные указывают на то, что кислая матрица необходима для сохранения Se и W протонированными для того, чтобы они не образовывали осадок с Zn, Co и Ni. На основании приведенных выше данных вместо маточного раствора одного металлического микроэлемента получали два маточных раствора металлических 45 микроэлементов. Первый маточный раствор содержал Zn, Co и Ni, а второй маточный раствор содержал W и Se. Указанный способ получения снижает использование H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Для того чтобы компенсировать полное устранение ортофосфорной кислоты в лабораторном маточном растворе, количество ортофосфорной кислоты, добавленной к первому маточному раствору увеличивали от 0,075 мл/л до 0,2 мл/л. Следовательно, общее абсолютное снижение H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> в среде составило 76%.

## Пример 2: Применение среды со сниженным содержанием фосфата

Вышеупомянутую среду (содержащую на 76% меньше ортофосфорной кислоты)



исследовали на стационарной культуре в течение 4 стадий следующим образом.

1. Модифицированную среду заменяли существующей средой на стационарной культуре ( $T=0$  ч).

2.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  в ростовой среде заменяли на  $\text{NH}_4\text{OH}$ . В качестве профилактической меры  $\text{H}_2\text{SO}_4$  добавляли к ростовой среде для поддержания рН реактора при 4,5 ( $T=108,74$  ч).

3.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  удаляли из среды и  $\text{NaHCO}_3$  заменяли на  $\text{NH}_4\text{OH}$  в качестве основания для контроля рН реактора ( $T=158,42$  ч).

4. Компоненты в первом маточном растворе добавляли напрямую к среде ферментации ( $T=489,07$  ч).

На фигуре 1 показана производительность стационарной культуры *Clostridium ljungdahlii* на среде с низким содержанием фосфата и применение  $\text{NH}_4\text{OH}$  в качестве основания для контроля рН и в качестве источника азота. События во время ферментации были следующими.

№ события	Время (ч)	Действие
1	0	Среда, замененная на среду с низким содержанием фосфата (2,92 мМ $\text{H}_3\text{PO}_4$ )
2	59,82	Среда, замененная на среду с низким содержанием фосфата (4,38 мМ $\text{H}_3\text{PO}_4$ )
3	108,74	Среда, замененная на среду с низким содержанием фосфата (2,93 мМ $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), содержащая $\text{H}_2\text{SO}_4$ , начиная с 182 мМ $\text{NH}_4\text{OH}$ , нагнетаемого со скоростью 0,4 мл/мин.
4	135,32	Основной раствор, замененный с 7,7% $\text{NaHCO}_3$ на 182 мМ $\text{NH}_4\text{OH}$ . Нагнетаемый раствор $\text{NH}_4\text{OH}$ , замененный с 182 мМ на 92 мМ
5	135,41	Повышенная скорость нагнетания $\text{NH}_4\text{OH}$ от 0,3 мл/мин до 0,5 мл/мин
6	158,42	Среда, замененная на среду с низким содержанием фосфата (2,92 мМ $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), отсутствие $\text{NH}_4\text{Cl}$ , отсутствие $\text{H}_2\text{SO}_4$
7	158,47	Пониженное нагнетание $\text{NH}_4$ до 0,5 с 0,6 мл/мин
8	181,49	Пониженное нагнетание $\text{NH}_4$ до 0,4 с 0,5 мл/мин
9	224,74	Пониженное нагнетание $\text{NH}_4$ до 0,2 с 0,4 мл/мин
10	250,09	Основной раствор, замененный на 364 мМ с 182 мМ
11	255,86	Остановленное нагнетание $\text{NH}_4$
12	261,61	Добавленные 5 мл 0,5 М раствора $\text{NH}_4$
13	264,74	Возобновленное нагнетание $\text{NH}_4$ со скоростью 0,2 мл/мин
14	270,57	Остановленное нагнетание $\text{NH}_4$

15	279,32	Повышенная концентрация витаминов до 1 мл/л с 0,5 мл/л
16	280,66	Замененный основной раствор на 0,5 М с 364 мМ
17	392,22	Пониженный поток фильтрата для снижения плотности клеток. Целевое значение 3 г/л
18	441,82	Повышенная концентрация витаминов до 1,6 мл/л с 1,0 мл/л
19	489,07	Среда, замененная на среду с низким содержанием фосфата с помощью компонентов первого маточного раствора, добавленных в виде сухого порошка, и второго маточного раствора, добавленного в водной форме

В 108,74 ч среду, содержащую 0,35 мл/л  $H_2SO_4$  (75%) добавляли в реактор.  $NH_4Cl$  удаляли из среды и начинали нагнетание  $NH_4OH$ . Это выполняли для того, чтобы удостовериться, что дополнительное основание, подлежащее нагнетанию в реактор, не будет выходить за пределы установленного значения pH. Добавленное количество рассчитывали на основании количества протонов, удаленных в виде  $H_3PO_4$ , принимая во внимание то, что  $H_3PO_4$  являлась одноосновной при данном значении pH, и  $H_2SO_4$  являлась двухосновной. Позже подтвердилось, что культура все еще использовала основание и  $H_2SO_4$  удалялась.

Начиная с 135,32 часов, основной раствор  $NaHCO_3$  заменяли на  $NH_4OH$ .

Концентрацию основания регулировали вместе со скоростью потока нагнетания  $NH_4OH$ , пока конечный раствор не достигал значения 0,5 М. Используя указанную концентрацию, отсутствовала необходимость добавлять дополнительный  $NH_4OH$  для обеспечения культуры азотом.

В интервале между 279,32 ч и 441,82 ч концентрацию витаминов в среде увеличивали до 1,6 мл/л.

В 392,22 ч плотность клеток уменьшали до 3 г/л.

Изменение конечного состава среды проводили в 489,07 ч, что осуществляли путем добавления компонентов первого маточного раствора непосредственно к среде в их твердой форме (что выполняли со всеми другими компонентами). Компоненты второго маточного раствора добавляли в виде водного раствора.

Наряду с тем, что раскрытое в настоящем документе настоящее изобретения было описано посредством конкретных вариантов осуществления, примеров и их применений, в отношении него специалистами в настоящей области техники может быть осуществлен ряд модификаций и вариантов, не отклоняясь от объема настоящего изобретения, изложенного в формуле изобретения.

#### (57) Формула изобретения

1. Способ ферментации для получения этанола, включающий:

смешивание жидкой среды, которая содержит по меньшей мере один элемент - переходный металл, выбранный из группы, состоящей из одного или нескольких из W, Zn, Co и Ni, со второй жидкой средой, которая содержит по меньшей мере один другой элемент - переходный металл, выбранный из группы, состоящей из одного или нескольких из W, Zn, Co и Ni, и необязательно элемент - неметалл, причем элемент -

неметалл представляет собой Se, для получения среды ферментации, причем осаждение одного или нескольких элементов - переходных металлов одним или несколькими элементами - неметаллами предотвращено и обеспечена электропроводность 30 мСм/см или меньше;

5     приведение в контакт содержащего СО субстрата со средой ферментации; и ферментацию содержащего СО субстрата с помощью ацетогенных бактерий для обеспечения кислого значения рН, причем среда ферментации содержит 3 мМ фосфата или меньше, причем в способе ферментации используется 2 американских галлона (7,57 л) воды  
10 или меньше, доставленных в среду ферментации, на полученный американский галлон (3,79 л) этанола.

2. Способ ферментации по п. 1, в котором ферментация является эффективной для обеспечения значения рН, составляющего от 4,2 до 4,8.

3. Способ ферментации по п. 1, в котором смесь по меньшей мере одного элемента  
15 - переходного металла и по меньшей мере одного элемента - неметалла характеризуется оптической плотностью, составляющей 0,7 или меньше при 580 нм.

4. Способ по п. 1, в котором содержащий СО субстрат, доставленный в биореактор, характеризуется молярным отношением СО/СО<sub>2</sub>, составляющим по меньшей мере 0,75.

5. Способ по п. 1, в котором среда ферментации характеризуется  
20 электропроводностью, составляющей 30 мСм/см или меньше.

6. Способ по п. 1, где способ является эффективным для обеспечения STY, составляющего 10 г общего спирта/(л·день) или больше.

7. Способ по п. 1, где способ включает ферментацию содержащего СО субстрата с помощью ацетогенных бактерий, выбранных из группы, состоящей из *Acetogenium*  
25 *kivui*, *Acetoanaerobium noterae*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchi* CP11 (ATCC BAA-1772), *Blautia producta*, *Butyrifacterium methylotrophicum*, *Caldanaerobacter subterraneus*, *Caldanaerobacter subterraneus pacificus*, *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium acetobutylicum* P262, *Clostridium autoethanogenum* (DSM 19630 в DSMZ, Германия), *Clostridium autoethanogenum* (DSM 10061  
30 в DSMZ, Германия), *Clostridium autoethanogenum* (DSM 23693 в DSMZ, Германия), *Clostridium autoethanogenum* (DSM 24138 в DSMZ, Германия), *Clostridium carboxidivorans* P7 (ATCC РТА-7827), *Clostridium coskatii* (ATCC РТА-10522), *Clostridium drakei*, *Clostridium Ijungdahlii* PETC (ATCC 49587), *Clostridium Ijungdahlii* ERI2 (ATCC 55380), *Clostridium Ijungdahlii* C-01 (ATCC 55988), *Clostridium Ijungdahlii* 0-52 (ATCC 55889), *Clostridium magnum*, *Clostridium pasteurianum* (DSM 525 в DSMZ, Германия), *Clostridium ragsdali* P11 (ATCC BAA-622), *Clostridium scatologenes*, *Clostridium thermoaceticum*, *Clostridium ultunense*, *Desulfotomaculum kuznetsovii*, *Eubacterium limosum*, *Geobacter sulfurreducens*, *Methanosarcina acetivorans*, *Methanosarcina barkeri*, *Morrella thermoacetica*, *Morrella thermoautotrophica*, *Oxobacter pfennigii*, *Peptostreptococcus productus*, *Ruminococcus productus*, *Thermoanaerobacter*  
40 *kivui* и их смесей.

8. Способ ферментации по п. 1, в котором в среду ферментации подают по меньшей мере один или несколько из следующего:

- 0,04-0,11 мкг Zn в минуту на г клеток,
- 0,018-0,05 мкг Со в минуту на г клеток,
- 45 0,02-0,055 мкг Ni в минуту на г клеток,
- 0,29-0,80 мкг W в минуту на г клеток и
- 0,01-25 мкг Se в минуту на г клеток.

9. Способ ферментации по п. 1, в котором среда ферментации содержит меньше чем

0,02 мас.%  $\text{NaHCO}_3$ .

10. Способ ферментации по п. 1, в котором в среду ферментации подают по меньшей мере один или несколько из следующего:

0,044-0,12 мкг азота на г клеток,

5 0,2-0,55 мкг фосфора на г клеток или

0,01-25 мкг калия на г клеток.

11. Способ по п. 1, в котором общий спирт содержит 75 мас.% этанола или больше.

12. Способ по п. 1, в котором общий спирт содержит 25 мас.% бутанола или меньше.

10

15

20

25

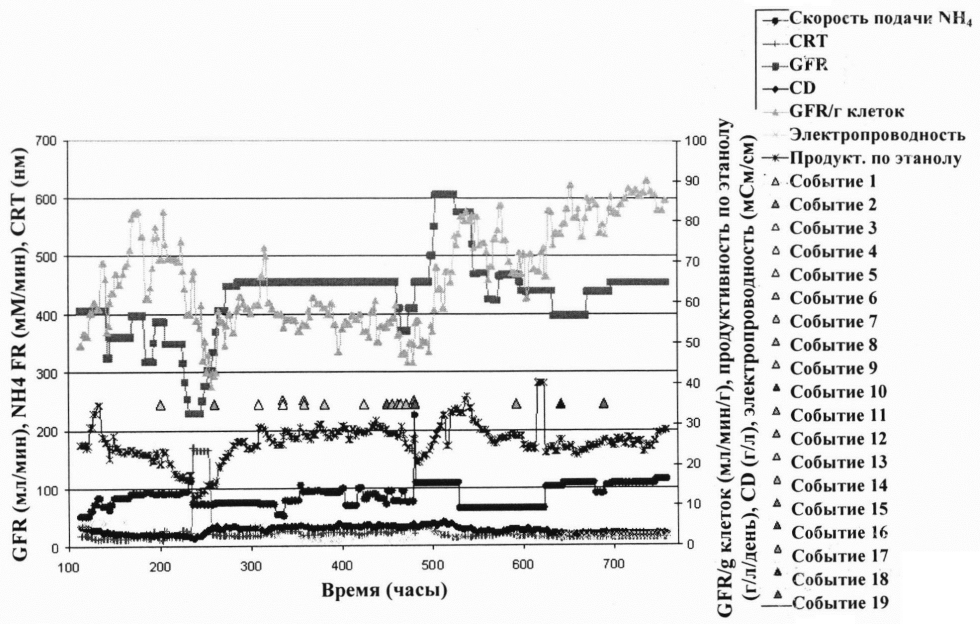
30

35

40

45

1/1



ФИГ. 1