



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21), (22) Заявка: **2009105443/10, 18.02.2009**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
18.02.2009(43) Дата публикации заявки: **27.08.2010**(45) Опубликовано: **10.12.2010** Бюл. № 34(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: **US 2005089979 A1, 28.04.2005. US 5753474
A, 19.05.1998. QURESHI N. et al. Butanol
production from wheat straw hydrolysate using
Clostridium beijerinckii. Bioprocess Biosyst.
Eng. (2007), 30, pp.419-427.**Адрес для переписки:
**125502, Москва, ул. Лавочкина, 50, к.1, кв.24,
Н.Л. Цетович**

(72) Автор(ы):

**Давидов Евгений Рубенович (RU),
Каньгин Петр Сергеевич (RU),
Фракин Олег Анатольевич (RU),
Черемнов Игорь Владимирович (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

ДЭВОН ИНВЕСТМЕНТ ЛИМИТЕД (VG)**(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к
микробиологической промышленности.
Способ предусматривает подготовку
углеводсодержащего сырья, сбраживание его в
ферментере на питательной среде с помощью
бактерий, продуцирующих бутанол, ацетон и
этанол. Осуществляют отгонку органических
растворителей, образующихся в процессе
сбраживания, и подпитку растворами

углеводов и минеральных солей. При этом
часть культуральной жидкости, содержащей
суспензию клеток продуцирующей бактерии,
отводят из ферментера в дополнительную
емкость, подвергают вакуумированию и
возвращают в процесс. Способ обеспечивает
усиление биосинтеза органических
растворителей и повышение выхода бутанола.
Выход бутанола составляет 6,5%. 6 з.п. ф-лы.

RU 2 405 830 C2

RU 2 405 830 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: **2009105443/10, 18.02.2009**

(24) Effective date for property rights:
18.02.2009

(43) Application published: **27.08.2010**

(45) Date of publication: **10.12.2010 Bull. 34**

Mail address:
**125502, Moskva, ul. Lavochkina, 50, k.1, kv.24,
N.L. Tsetovich**

(72) Inventor(s):

**Davidov Evgenij Rubenovich (RU),
Kanygin Petr Sergeevich (RU),
Frakin Oleg Anatol'evich (RU),
Cheremnov Igor' Vladimirovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

DEhVON INVESTMENT LIMITED (VG)

(54) METHOD OF PREPARING ORGANIC SOLVENTS

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: method involves preparation of carbohydrate-containing material, its fermentation in a fermenter on culturing medium using bacteria which produce butanol, acetone and ethanol. Organic solvents formed during the fermentation process are distilled and feeding is carried out with solutions of carbohydrates and mineral salts. A portion of the

culturing medium containing a suspension of bacteria-producing cells is taken out of the fermenter into another vessel, undergoes evacuation and then returned to the process. Output of butanol is equal to 6.5%.

EFFECT: improved biosynthesis of organic solvents and high output of butanol.

7 cl, 3 ex

R U 2 4 0 5 8 3 0 C 2

R U 2 4 0 5 8 3 0 C 2

Изобретение относится к микробиологической промышленности и касается получения органических растворителей - бутанола, ацетона и этанола путем биосинтеза углеводовсодержащих материалов.

Наиболее ценным из перечисленных растворителей является бутанол.

5 Бутанол - это дорогостоящий органический растворитель, широко применяется при изготовлении нитролаков и масляных лаков, в производстве сложных растворителей, синтетической резины и шелка, при экстрагировании фармацевтических препаратов, служит сырьем для производства практически всех пластмасс и их растворителей, 10 поэтому на рынке химических реактивов и веществ имеет постоянно большой спрос.

Органические растворители могут быть использованы также и в качестве биотоплива.

В настоящее время в связи с появлением новых экономичных технологий производства резко возрос интерес к получаемому микробиологическим путем 15 бутанолу и его использованию в качестве биотоплива. При этом бутанол обладает целым рядом преимуществ перед этанолом. По сравнению с этанолом бутанол может быть смешан в более высоких пропорциях с бензином и может использоваться в существующих двигателях автомобилей без модификации системы формирования 20 воздушно-топливной смеси. Бутанол выделяет чистой энергии на рабочий цикл больше, чем этанол или метанол, и примерно на 10% больше, чем бензин.

Бутиловый спирт (бутанол) C_4H_9OH - бесцветная жидкость с характерным запахом сивушного масла. Известны нормальный первичный бутиловый спирт $CH_3(CH_2)_3OH$, 25 нормальный вторичный бутиловый спирт $CH_3CH_2CH_2(OH)CH_3$, изобутиловый спирт $(CH_3)_2CHCH_2OH$, триметилкарбинол $(CH_3)_3COH$.

В промышленности бутанол получают оксосинтезом из пропилена с использованием никель-кобальтовых катализаторов при 130-150°C и давлении 20-35 МПа.

30 Бутанол начал производиться в 10-х годах XX века микробиологическим путем с использованием бактерии вида *Clostridium acetobutylicum*. Сырьем для производства была глюкоза сахарного тростника, свеклы, кукурузы, пшеницы, маниоки.

Так, при культивировании на мучных средах различные штаммы *Clostridium acetobutylicum* синтезируют общее количество растворителей, составляющее 18-19 г/л, в 35 том числе 11-12 г/л и 4-5 г/л ацетона. Кроме того, на средах из муки синтезируется 1,5-2,5 г/л этанола (Корнеева О.С. Жеребцов Н.А. и др. Роль амилолитических ферментов *Clostridium acetobutylicum* в биосинтезе растворителей. Биотехнология, 1986 г., №3, стр.133-136).

40 Вышеописанный способ обладает всеми недостатками периодических процессов.

Известен отъемно-доливной способ получения бутанола, используемый в промышленных масштабах, который позволил частично компенсировать недостатки периодического процесса биосинтеза бутанола. При таком способе из ферментера постоянно удаляется часть объема культуральной среды и добавляется равный объем 45 среды. Отобранная порция культуральной среды направляется на ректификацию. Очевидно, что при этом безвозвратно теряются сахара, содержащиеся в отобранной порции. Кроме того, в классическом варианте ацетонобутилового брожения с 4%-ным уровнем доступной глюкозы в культуральной среде ферментация прекращается 50 через 72 часа по причине «выедания» микроорганизмами доступной глюкозы (в случае, когда не вносилось дополнительных питательных веществ, кроме изначальных). Более того, внесение дополнительного питания не приводит к увеличению продолжительности ферментации за счет того, что к 72 часу в

культуральной среде достигается концентрация растворителей, токсическая для продуцирующего микроорганизма. Известным фактом является то, что в процессе биосинтеза спиртов по мере накопления бутанола, этанола и ацетона, происходит снижение активности биосинтезирующих микроорганизмов, т.к. спирты являются ингибиторами самого процесса спиртового брожения. С целью исключения подобного бутанол и другие органические соединения постоянно выводят из процесса.

Известен ферментационный способ получения бутанола и других органических растворителей с использованием двух различных штаммов бактерий, с постоянным отводом образующихся органических соединений. Изобретение описывает процесс получения растворителей, преимущественно бутанола, из сахара, протекающий в две стадии, за каждую из которых ответственны разные микроорганизмы (US №5753474, 1988 г.).

Известен способ сбраживания углеводсодержащих сред с помощью бактерий, продуцирующих бутанол, ацетон, этанол и/или изопропанол, состоящий, по меньшей мере, из двух стадий, причем на первой стадии в основном происходит непрерывное размножение бактерий, а на второй, проводимой непрерывно или периодически, образуется целевой продукт. Образующиеся на второй стадии продукты отводят из среды (предпочтительно непрерывно) путем диффузионного испарения, используя для этой цели перфузионную мембрану, в частности из силиконового каучука (RU 2044773, 1989 г.).

Основные недостатки описанных способов связаны со сложностями выделения органических растворителей из культуральной среды, поскольку это наиболее энергоемкое и дорогостоящее звено в технологии их получения.

Недостатками всех известных способов выделения является высокая энергоемкость и необходимость относительно частой замены или восстановления исходных свойств функциональных элементов - мембран или твердых сорбентов.

Наиболее близким к предложенному является непрерывный способ получения органических растворителей, в частности ацетон-бутанол-этанола (АВЕ), включающий подготовку углеводсодержащего сырья, сбраживание его в ферментере на питательной среде с помощью бактерий, продуцирующих бутанол, ацетон и этанол, отгонку органических растворителей и газов, образующихся в процессе сбраживания, и подпитку растворами углеводов и минеральных солей (US 2005089979, 2005-04-28).

Все вышеописанные способы и последний в том числе обладают недостатками, присущими известным процессам выделения целевых продуктов - высокой энергоемкостью и необходимостью восстановления исходных свойств - мембран или твердых сорбентов, а кроме того, характеризуются невысоким выходом целевых продуктов, в частности бутанола.

Ни в одном из известных авторам источников не описана возможность неспецифического воздействия на продуцирующую культуру с целью усиления процесса биосинтеза.

Многочисленные исследования, проводимые авторами, показали, что если в процессе биосинтеза органических растворителей осуществлять периодическое понижение давления в ферментере и отводить при этом газы, образующиеся в процессе сбраживания, то в период понижения давления синтез растворителей резко усиливается. Возможным объяснением этого является действие переменного давления на биологические системы, что влечет за собой изменение микроокружения клеточных мембран, приводящее к нарушению процессов переноса веществ через мембраны, изменению скоростей ферментативных процессов в клетке, возникновению и развитию

репаративных реакций, сопровождаемых новыми синтезами (Акопян В.Б., Коржевенко Г.Н., Шангин-Березовский Г.Н. Скрытый резерв роста и развития живых систем. Вестник сельскохозяйственной науки, 1988, №4, (380), с.96-105).

5 Исследования также показали, что концентрация сахаров в процессе понижения давления практически не меняется, а в промежутках снижается. Можно предположить, что в промежутках между понижениями давления происходит накопление в культуре кислот-предшественников (масляной и уксусной). Затем, в процессе понижения давления, происходит усиленная переработка кислот-предшественников в
10 растворители. Это может быть связано в первую очередь с перераспределением части культуры из кислотопродуцирующей морфологии в продуценты растворителей. Важно отметить, что соотношение образующихся растворителей, зафиксированное во время понижения давления, сохраняется таковым и в течение последующих 20 часов после предыдущего понижения давления, а это значит, что усиление процесса
15 биосинтеза растворителей во время понижения давления не прекращается и после его нормализации.

Чтобы обеспечить протекание процесса вышеописанным способом, при повышении в культуральной среде концентрации органических растворителей (в частности,
20 бутанола) до величин, приближающихся к токсическим для продуцирующей культуры, давление в ферментере над поверхностью жидкости понижают до уровня, обеспечивающего испарение органических растворителей из жидкой среды, удаление и конденсирование их паров. При создании отрицательного, относительно атмосферного, давления над поверхностью жидкой среды в ферментере, давление
25 паров растворителей над поверхностью падает, а скорость испарения с поверхности жидкой среды ускоряется пропорционально степени понижения давления. Следовательно, удаление паров растворителей и газообразных метаболитов из пространства над поверхностью жидкой среды приводит к ускорению их эвакуации из
30 объема.

Однако при реализации данного решения в заводских условиях авторы столкнулись со сложностями технического характера, и в частности, с тем, что сложно обеспечить периодическое понижение давления до необходимых величин в громоздких
35 тонкостенных ферментерах.

Дальнейшие исследования авторов показали, что, если в процессе биосинтеза отводить часть культуральной жидкости с клетками продуцирующей культуры из ферментера в отдельную емкость и там подвергать ее вакуумированию с целью
40 усиления синтеза растворителей, то неожиданным оказался тот факт, что клетки продуцирующей культуры, подвергнутые вакуумированию и возвращенные в ферментер, сохраняют активность и обеспечивают интенсивное протекание процесса биосинтеза с преимущественным образованием бутанола и в ферментере. Обеспечивая циркуляцию части культуральной жидкости, можно добиться того, что через какое-то время вся культура в ферментере будет продуцировать растворители с уровнем
45 синтеза, зафиксированным при понижении давления в отдельной емкости.

Технической задачей настоящего изобретения является повышение выхода органических растворителей, преимущественно бутанола, за счет неспецифического воздействия на продуцирующую культуру понижением давления и резкого усиления за
50 счет этого процесса биосинтеза при одновременном снижении энергопотребления в процессе.

Для решения этой задачи предложен способ получения органических растворителей, включающий подготовку углеводсодержащего сырья, сбраживание его

в ферментере на питательной среде с помощью бактерий, продуцирующих бутанол, ацетон и этанол, отгонку органических растворителей, образующихся в процессе сбраживания, и подпитку растворами углеводов и минеральных солей, в котором часть культуральной жидкости, содержащей суспензию клеток продуцирующей

5 бактерии, отводят из ферментера в дополнительную емкость, подвергают вакуумированию и возвращают обратно, осуществляя, таким образом, ее циркуляцию.

Как показывают исследования авторов, необходимо отводить из ферментера 8-15% культуральной жидкости, при этом отвод культуральной жидкости, содержащей

10 суспензию клеток продуцирующей бактерии, начинают при достижении уровня концентрации бутанола в ферментере, оказывающего ингибирующее действие на продуцирующую культуру. В зависимости от используемого штамма и т.п. понижать давление начинают при достижении уровня концентрации бутанола в ферментере - 6-12 г/л.

15 При этом отгонку органических растворителей осуществляют одновременно с вакуумированием из отдельной емкости, а давление во время отгонки поддерживают - 0,90-0,94 кг/см².

Как показали исследования авторов, в качестве бактерии, продуцирующей бутанол, ацетон и этанол, целесообразно использовать бактерию вида *Clostridium acetobutylicum*.

20

Предлагаемый способ получения бутанола осуществляют следующим образом.

В предварительно стерилизованный ферментер вносят подготовленную стандартным образом углеводо-минеральную смесь (раствор минеральных солей, необходимый набор витаминов и один из следующих источников углерода: глюкозу, маннозу, ксилозу, ферментолитат не пищевых полисахаридов растений, содержащий

25 глюкозу, маннозу, ксилозу, арабинозу, отделенных от остатков древесины (лигнина), в концентрации 2-4%; затем вносят инокулят бактерий, продуцирующих бутанол, ацетон и этанол, например, *Clostridium acetobutylicum*, штамм ВКМ В-2531D, с плотностью

30 клеток 1-2 млрд/мл. Через 30 мин после засева начинается интенсивное выделение газов брожения, через 5-6 часов - синтез органических кислот и на 10-12 часах - интенсивный синтез органических растворителей, скорость которого достигает максимума к 28-36 часу.

При повышении в культуральной среде концентрации органических растворителей до величин, приближающихся к токсическим для продуцирующей культуры, часть культуральной жидкости (8-15%) начинают отводить из ферментера в отдельную

35 емкость. В указанной емкости давление над поверхностью жидкости понижают до уровня, обеспечивающего испарение органических растворителей из жидкой среды, удаление и конденсацию их паров. При создании отрицательного, относительно

40 атмосферного, давления (-0,90-0,94 кг/см²) над поверхностью жидкой среды, давление паров растворителей над поверхностью падает, а скорость испарения с поверхности жидкой среды ускоряется пропорционально степени понижения давления. Дальнейшее

45 понижение давления не является целесообразным, поскольку влияет на жизнеспособность культуры.

При этом, как показали исследования авторов, в период понижения давления синтез растворителей резко усиливается. После эвакуации растворителей, обедненную органическими растворителями культуральную жидкость перекачивают обратно в

50 ферментер, заменяя ее в емкости новой порцией культуральной жидкости из ферментера. Отобранный целевой продукт направляется в холодильное устройство, где растворители конденсируются и перетекают в накопительный объем. При отводе части культуральной жидкости в отдельную емкость, в ферментер вводят питательные

вещества в количестве, компенсирующем их убыль. Процесс биосинтеза продолжается, содержание органических растворителей, в частности бутанола, в среде возрастает и цикл повторяется. Необходимо отметить, что приблизительно через 28-35 часов весь объем культуральной жидкости из ферментера будет перекачен, и вся культура в ферментере будет продуцировать растворители с повышенным уровнем синтеза.

Изобретение поясняется примерами, которые не носят ограничивающего характера.

Пример 1

В предварительно стерилизованный ферментер с рабочим объемом 3 л вводят 2,5 л 4% раствора глюкозы, 120 г муки, 300 мл инокулята, состоящего из муки (40 г/л), воды и бактерий *Clostridium acetobutylicum* ВКМ В-2531D с плотностью 1-2 млрд/мл. Осуществляют ацетон-бутанол-этаноловое брожение при температуре 37°C. Ферментацию продолжают в течение 72 часов. После 72 часов процесс ферментации прекращают и конденсацией отогнанных паров получают в среднем 250 мл раствора (органические растворители 17,5 мл), содержащего 5% бутанола, 1,5% ацетона и 0,5% этанола с соотношением растворителей 60:30:10. После удаления бутанола и сопутствующих газов вводят в ферментер питательную среду, с содержанием 50 г глюкозы. Раз в три дня в питательную среду добавляют 28 г дрожжевого автолизата.

Пример 2

В предварительно стерилизованный ферментер с рабочим объемом 3 л вводят 2,5 л 4-х % раствора глюкозы, добавляют 120 г муки, 300 мл инокулята, состоящего из муки (40 г/л), воды и бактерий *Clostridium beijerinckii*, регистрационный номер КМ МГУ №101 с плотностью 1-2 млрд/мл. Осуществляют ацетон-бутанол-этаноловое брожение при температуре 37°C. Продолжительность процесса не менее недели. При концентрации бутанола в среде 9 г/л осуществляют отвод 0,5 литра культуральной жидкости в отдельную емкость. Давление в отдельной емкости снижают до -0,94 кг/см. Конденсацией отогнанных паров получают 50 мл раствора (органические растворители 4,2 мл), который содержит 3,75 мл бутанола, 0,35 мл ацетона и 0,125 мл этанола, соотношение растворителей бутанол:ацетон:этанол равно 89:8:3. Обедненную культуральную жидкость из отдельной емкости (концентрация бутанола 2 г/л) возвращают обратно в ферментер. В ферментер вводят питательную среду, содержащую 50 г глюкозы, процесс брожения продолжается. При концентрации бутанола в среде 9 г/л вновь осуществляют отвод 0,5 литра культуральной жидкости в отдельную емкость. Давление в отдельной емкости снижают до 0,94 кг/см². Конденсацией отогнанных паров получают 60 мл раствора (органические растворители 5,1 мл), который содержит 4,62 мл бутанола, 0,42 мл ацетона и 0,15 мл этанола, соотношение растворителей бутанол:ацетон:этанол равно 91:6:3. Обедненную культуральную жидкость из отдельной емкости возвращают обратно в ферментер. Затем цикл повторяют вновь.

Конденсацией отогнанных паров во время всей ферментации получают в среднем 250 мл раствора (органические растворители 19,9 мл), содержащего 6,5% бутанола, 1,2% ацетона и 0,25% этанола (соотношение растворителей 81:16:3). Раз в три дня в питательную среду добавляют 28 г дрожжевого автолизата. Продуктивность процесса в среднем 10 г/л/день.

Пример 3

В предварительно стерилизованный ферментер с рабочим объемом 3 л вводят 2,5 л 4-х % раствора глюкозы, добавляют 120 г муки, 300 мл инокулята, состоящего из муки (40 г/л), воды и бактерий *Clostridium acetobutylicum* ВКМ В-2531D с плотностью 1-2 млрд/мл. Осуществляют ацетон-бутанол-этаноловое брожение при температуре

37°C. Продолжительность процесса не менее недели. При концентрации бутанола в среде 8 г/л осуществляют отвод 0,5 литра культуральной жидкости в отдельную емкость. Давление в отдельной емкости снижают до $-0,90 \text{ кг/см}^2$. Конденсацией отогнанных паров получают 50 мл раствора (органические растворители 5 мл), который содержит 4,5 мл бутанола, 0,35 мл ацетона и 0,15 мл этанола, соотношение растворителей бутанол:ацетон:этанол равно 90:7:3. Обедненную культуральную жидкость из отдельной емкости (концентрация бутанола 2 г/л) возвращают обратно в ферментер. В ферментер вводят питательную среду, содержащую 50 г глюкозы, процесс брожения продолжается. При концентрации бутанола в среде 10 г/л вновь осуществляют отвод 0,5 литра культуральной жидкости в отдельную емкость. Давление в отдельной емкости снижают до $-0,92 \text{ кг/см}^2$. Конденсацией отогнанных паров получают 70 мл раствора (органические растворители 6,2 мл), который содержит 5,2 мл бутанола, 0,75 мл ацетона и 0,25 мл этанола, соотношение растворителей бутанол:ацетон:этанол равно 84:12:4. Обедненную культуральную жидкость из отдельной емкости возвращают обратно в ферментер. Затем цикл повторяют вновь.

Конденсацией отогнанных паров во время всей ферментации получают в среднем 250 мл раствора (органические растворители 20 мл), содержащего 6,5% бутанола, 1,2% ацетона и 0,25% этанола (соотношение растворителей 81:16:3). Раз в три дня в питательную среду добавляют 28 г дрожжевого автолизата. Продуктивность процесса в среднем 9 г/л/день.

Таким образом, предлагаемый процесс биосинтеза позволяет проводить вакуумную отгонку органических растворителей, не подвергая воздействию весь объем ферментера, благодаря чему удается снизить расход энергии для понижения давления (создания вакуума), а также обеспечить неспецифическое стимулирующее воздействие пониженного давления на культуру микроорганизмов в ферментационной жидкости.

Преимуществом предложенного технического решения является повышение выхода бутанола за счет усиления процесса биосинтеза, при одновременном снижении энергопотребления на стадии выделения.

Формула изобретения

1. Способ получения органических растворителей, включающий подготовку углеводсодержащего сырья, сбраживание его в ферментере на питательной среде с помощью бактерий, продуцирующих бутанол, ацетон и этанол, отгонку органических растворителей, образующихся в процессе сбраживания, и подпитку растворами углеводов и минеральных солей, отличающийся тем, что часть культуральной жидкости, содержащей суспензию клеток продуцирующей бактерии, отводят из ферментера в дополнительную емкость, подвергают вакуумированию и возвращают обратно.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что из ферментера отводят 8-15% культуральной жидкости.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что отвод культуральной жидкости, содержащей суспензию клеток продуцирующей бактерии, начинают при достижении уровня концентрации бутанола в ферментере, оказывающего ингибирующее действие на продуцирующую культуру.

4. Способ по п.2, отличающийся тем, что отвод культуральной жидкости, содержащей суспензию клеток продуцирующей бактерии, начинают при достижении уровня концентрации бутанола в ферментере - 6-12 г/л.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что отгонку органических растворителей осуществляют одновременно с вакуумированием.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что давление во время отгонки составляет 0,90-0,94 кг/см².

7. Способ по п.1, характеризующийся тем, что бактерией, продуцирующей бутанол, ацетон и этанол, является бактерия вида *Clostridium acetobutylicum*.

10

15

20

25

30

35

40

45

50