

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045854**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

2024.01.11

(21) Номер заявки

202192231

(22) Дата подачи заявки

2020.03.13(51) Int. Cl. **C08H 1/00** (2006.01)**C12P 1/04** (2006.01)**C08K 5/00** (2006.01)**C08K 5/053** (2006.01)**C08L 89/00** (2006.01)**(54) ГАЗОВАЯ ФЕРМЕНТАЦИЯ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОПЛАСТИКОВ НА БЕЛКОВОЙ ОСНОВЕ**(31) **62/818,579**(32) **2019.03.14**(33) **US**(43) **2021.12.01**(86) **PCT/US2020/022659**(87) **WO 2020/186173 2020.09.17**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

ЛАНЦАТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

**Аллен Уайатт, Карнейро Сьюзан Эйм
Виэйра (US)**

(74) Представитель:

Хмара М.В. (RU)(56) **US-A1-20160289449****US-A1-20160338380**

FERNANDEZ-ESPADA, LUCIA et al., "Protein/glycerol blends and injection-molded bioplastic matrices: soybean versus egg albumen", Journal of Applied Polymer Science, 21 October 2015 (Publication date), Vol. 133, No. 6, Article No. 42980, Internal pages 1-9, See abstract; and internal pages 2, 8

JEREZ, ABEL et al., "Protein-based bioplastics: effect of thermo-mechanical processing", Rheologica Acta, 16 February 2007 (Online publication date), Vol. 46, No. 5, pages 711-720, See abstract; pages 712-719; and table 1

GOZAN, MISRI et al., "The effect of glycerol addition as plasticizer in Spirulina platensis based bioplastic", E3S Web of Conferences, 26 November 2018 (Online publication date), Vol. 67, Article No. 03048, Internal pages 1-4, See abstract; and internal page 2

US-A1-20130206034

(57) В изобретении предложены способы получения биопластиков на белковой основе и биопленок на белковой основе путем выращивания микроорганизмов для получения микробной биомассы. В частности, изобретение относится к биопластикам на белковой основе и биопленкам на белковой основе, полученным путем ферментации газообразного субстрата, содержащего один или несколько из CO, CO₂ и H₂, особенно грамположительными, анаэробными и/или Clostridium микроорганизмами.

045854**B1****045854****B1**

Уровень техники Область техники

Изобретение обеспечивает способы производства биопластиков на белковой основе или биопленок на белковой основе с использованием микробной биомассы.

Описание уровня техники

Полимерные материалы, получаемые из нефти, стали жизненно необходимыми в современной жизни, преимущественно благодаря их легкости, прочности, долговечности и устойчивости к разложению. Однако зависимость от полимерных материалов, получаемых из нефти, привела к множеству серьезных проблем, включая истощение запасов сырой нефти, загрязнение и накопление на свалках. Для уменьшения воздействия полимерных материалов на окружающую среду предпринимаются шаги по замене обычных полимерных материалов, получаемых из нефти, на биополимеры, например полилактид, полисахариды, алифатические полиэфиры и полигидроксиалканоаты, которые имеют физико-химические свойства, аналогичные свойствам обычных пластмасс (Anjum, Int. J. Biol. Macromol., 89:161-174, 2016).

Существует насущная необходимость значительно сократить выбросы, связанные с глобальным потреблением ископаемого топлива, чтобы уменьшить влияние на изменение климата. Однако материалы на основе углерода, химические вещества и транспортное топливо в основном производятся из ископаемых источников, и в настоящее время альтернативного источника для адекватной их замены нет.

Ферментирующие газ микроорганизмы, связывающие диоксид углерода (CO₂) и монооксид углерода (CO), могут уменьшить эту зависимость, поскольку они могут преобразовывать газообразный углерод в полезные продукты. Ферментирующие газ микроорганизмы могут использовать широкий спектр сырья, включая газифицированные органические вещества любого вида (например, твердые бытовые отходы, промышленные отходы, биомассу и остатки сельскохозяйственных отходов) или промышленные отходящие газы (например, от сталелитейных заводов или других перерабатывающих предприятий). Кроме того, эти микроорганизмы имеют высокие темпы роста, могут быть генетически модифицированы для адаптации аминокислотного состава и имеют высокое содержание белка.

Биопластики на белковой основе обладают преимуществами в том, что они являются возобновляемыми, биоразлагаемыми и функциональными. Однако способы производства биопластиков на белковой основе все еще в значительной степени не разработаны. Остается необходимость в разработке способов производства биопластиков на белковой основе с использованием микроорганизмов в качестве источника белка.

Сущность изобретения

В противопоставление вышеизложенному обоснованию данное изобретение предлагает определенные преимущества и достижения по сравнению с известным уровнем техники.

Хотя раскрытое в данном документе изобретение не ограничивается конкретными преимуществами или функциональными возможностями, изобретение обеспечивает способы производства биопластиков или биопленок на белковой основе с использованием микробной биомассы.

В некоторых аспектах раскрытого в данном документе способа микробная биомасса включает микроорганизм, выращенный на газообразном субстрате, таком как газовый субстрат, содержащий один или несколько из CO, CO₂ и H₂. Газообразный субстрат может быть или может быть получен из газообразных промышленных отходов, промышленного отходящего газа или синтез-газа.

В некоторых аспектах раскрытого в данном документе способа микроорганизм может быть грамположительным, ацетогенным, карбоксидотрофным и/или анаэробным. Как правило, микроорганизм является членом рода *Clostridium*, например микроорганизмом, который представляет собой или получен из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei* или *Clostridium coskatii*.

В некоторых вариантах реализации способа, раскрытого в данном документе, способ включает стадию обработки микробной биомассы. Стадия обработки может включать одно или несколько из стерилизации микробной биомассы, центрифугирования микробной биомассы и сушки микробной биомассы. Стадия обработки может дополнительно включать денатурацию микробной биомассы. Стадия обработки может также включать экстракцию микробной биомассы, например, для удаления ДНК.

В некоторых вариантах реализации способа, раскрытого в данном документе, способ включает смешивание микробной биомассы с пластификатором. Пластификатор может быть одним или несколькими из следующих: вода, глицерин, этиленглицерин, пропиленглицерин, пальмитиновая кислота, диэтилтарtrate, дибутилтарtrate, 1,2-бутандиол, 1,3-бутандиол, полиэтиленгликоль (ПЭГ), сорбит, диметиланилин, дифениламин и 2,3-бутандиол.

В некоторых вариантах реализации способа, раскрытого в данном документе, способ включает добавление добавки к микробной биомассе. Добавка может быть сшивающим агентом, восстановителем, усилителем, проводником, агентом, обеспечивающим совместимость, или агентом водостойкости.

Подробное описание сущности изобретения

Авторы изобретения обнаружили, что микробная биомасса, полученная в результате ферментации газообразных субстратов, в частности газовых субстратов, содержащих один или несколько из CO, CO₂ и H₂, является подходящим источником для производства биопластиков на белковой основе и биопленок на белковой основе.

"Микроорганизм" или "микроб" - это микроскопический организм, в частности бактерия, архея, вирус или грибок. Микроорганизм обычно представляет собой бактерию. В контексте данного документа выражение "микроорганизм" следует понимать как "бактерия".

"Микробная биомасса" относится к биологическому материалу, содержащему клетки микроорганизмов. Например, микробная биомасса может включать или состоять из чистой или практически чистой культуры бактерии, археи, вируса или грибка. При первоначальном отделении от ферментационного бульона микробная биомасса обычно содержит большое количество воды. Эта вода может быть удалена или уменьшена путем сушки или обработки микробной биомассы.

Микробная биомасса может включать любой из компонентов, перечисленных в первом столбце таблицы в Примере 1. Примечательно, что микробная биомасса из Примера 1 содержит 15 мас.% влаги (воды). Соответственно, значения, перечисленные в Примере 1, относятся к количеству каждого компонента на количество влажной (т.е. не высушенной) микробной биомассы. В данном документе состав микробной биомассы описывается в терминах масса компонента на массу влажной (т.е. не высушенной) микробной биомассы. Конечно, также можно рассчитать состав микробной биомассы с точки зрения массы компонента на массу сухой микробной биомассы.

Микробная биомасса обычно содержит большую долю белка, например более 50 мас.% (50 г белка/100 г биомассы), более 60 мас.% (60 г белка/100 г биомассы), более 70 мас.% (70 г белка/100 г биомассы) или более 80 мас.% (80 г белка/100 г биомассы) белка. В предпочтительном варианте реализации микробная биомасса содержит по меньшей мере 72 мас.% (72 г белка/100 г биомассы) белка. Белковая фракция включает аминокислоты, включая аспарагиновую кислоту, аланин, аргинин, цистеин, глутаминовую кислоту, глицин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, пролин, серин, треонин, тирозин и/или валин.

Микробная биомасса может содержать ряд витаминов, включая витамины А (ретинол), С, В1 (тиамин), В2 (рибофлавин), В3 (ниацин), В5 (пантотеновая кислота) и/или В6 (пиридоксин).

Микробная биомасса может содержать относительно небольшое количество углеводов и жиров. Например, микробная биомасса может содержать менее 15 мас.% (15 г углеводов/100 г биомассы), менее 10 мас.% (10 г углеводов/100 г биомассы) или менее 5 мас.% (5 г углеводов/100 г биомассы) углевода. Например, микробная биомасса может содержать менее 10 мас.% (10 г жира/100 г биомассы) или менее 5 мас.% (5 г жира/100 г биомассы), менее 2 мас.% (2 г жира/100 г биомассы) или менее 1 мас.% (1 г жира/100 г биомассы) жира.

Способ изобретения может включать стадии переработки или обработки микробной биомассы перед использованием микробной биомассы для производства биопластика на белковой основе или биопленки на белковой основе. 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 может также включать снижение содержания нуклеиновой кислоты и/или неорганического содержания микробной биомассы с использованием любого способа, известного в данной области. Например, обработка микробной биомассы может включать использование промывки растворителем.

В контексте настоящего описания термины "биопластик на белковой основе", "пластик на основе белка" и "белковый биокомпозит" могут использоваться как взаимозаменяемые. "Биопластики на белковой основе" и "биопленки на белковой основе" относятся к биоразлагаемым полимерам природного происхождения. Биопластики на белковой основе и биопленки на белковой основе в значительной степени состоят из белков. "Материал на белковой основе" относится к трехмерной макромолекулярной сети, содержащей водородные связи, гидрофобные взаимодействия и дисульфидные связи. См., например, Martinez, *Journal of Food Engineering*, 17:247-254, 2013 и Pommet, *Polymer*, 44:115-122, 2003. В предпочтительных вариантах реализации белковый компонент биопластика на белковой основе или биопленки на белковой основе представляет собой микробную биомассу. Производство биопластиков на белковой основе и биопленок на белковой основе может потребовать стадии денатурации белка химическими, термическими методами или методами, индуцированными давлением. См., например, Mekonnen, *Biocomposites: Design and Mechanical Performance*, 2015. Производство биопластиков на белковой основе и биопленок на белковой основе может дополнительно потребовать стадии выделения или фракционирования микробной биомассы для получения очищенного белкового материала.

Биопластик на белковой основе или биопленка на белковой основе может представлять собой смесь белка, такого как микробная биомасса, с пластификатором. Используемый в данном документе термин "пластификатор" относится к молекуле, имеющей низкую молекулярную массу и летучесть. Пластификатор используется для модификации структуры белка за счет уменьшения межмолекулярных сил, присутствующих в белке, и увеличения подвижности полимерной цепи. См., например, Martinez, *Journal of Food Engineering*, 17: 247-254, 2013 и Gennadios, CRC Press, New York, 66-115, 2002. Неограничивающие примеры пластификаторов включают воду, глицерин, этиленглицерин, пропиленглицерин, пальмитиновую кислоту, диэтилтарtrat, дибутилтарtrat, 1,2-бутандиол, 1,3-бутандиол, полиэтиленгликоль (ПЭГ), сорбит, диметиланилин, дифениламин и 2,3-бутандиол. См., например, Mekonnen, *Biocomposites: Design*

and Mechanical Performance, 2015. В некоторых вариантах реализации в качестве пластификатора используется глицерин. В некоторых вариантах реализации в качестве пластификатора используется 30% глицерин. В некоторых вариантах реализации 2,3-бутандиол, который является природным продуктом *Clostridium autoethanogenum*, используется в качестве пластификатора.

В некоторых вариантах реализации пластификатор вводят в белковую матрицу физико-химическими способами, такими как метод "литья". В этом способе вводится химический реагент для разрыва дисульфидных связей. См., например, Martinez, *Journal of Food Engineering*, 17:247-254, 2013 и Gontard, *J. Food Sci.*, 57:190-196, 1993.

В некоторых вариантах реализации пластификатор вводят в белковую матрицу путем термопластической обработки. В этом способе белок и пластификатор смешиваются путем сочетания нагрева и сдвига. Этот способ может дополнительно потребовать термомеханической обработки, такой как прессование, термоформование и экструзия. См., например, Martinez, *Journal of Food Engineering*, 17:247-254, 2013 и Felix, *Industrial Crops and Products*, 79:152-159, 2016.

В некоторых вариантах реализации смеси белок/пластификатор получают с помощью термомеханической процедуры, например, путем смешивания с получением тестообразного материала соответствующей консистенции и однородности. Затем тестообразный материал обрабатывают литьем под давлением с получением биопластика на белковой основе или биопленки на белковой основе. См., например, Felix, *Industrial Crops and Products*, 79:152-159, 2016.

В некоторых вариантах реализации требуется добавка для получения биопластика на белковой основе или биопленки на белковой основе. Например, добавка может быть восстановителем, сшивающим агентом, усилителем, проводником, агентом, повышающим совместимость, или агентом водостойкости. Неограничивающим примером восстановителя является бисульфит натрия. Неограничивающие примеры сшивающих агентов включают глиоксаль, L-цистеин и формальдегид. Неограничивающие примеры усилителей включают нановолокна бактериальной целлюлозы, волокна листьев ананаса, лигнин, лен, джут, коноплю и сизаль. Неограничивающим примером проводника является материал углеродных нанотрубок. Неограничивающие примеры агентов, повышающих совместимость, включают яблочный ангидрид и толуолдиизоцианат. Неограничивающий пример агента водостойкости - это полифосфатный материал. В некоторых вариантах реализации используются химические модификации для улучшения водостойкости. Химическая модификация может представлять собой этерификацию низкомолекулярными спиртами. См., например, Felix, *Industrial Crops and Products*, 79:152-159, 2016 и Mekonnen, *Biocomposites: Design and Mechanical Performance*, 2015.

В некоторых вариантах реализации биопластик на белковой основе или биопленку на белковой основе получают экструзией, при которой микробная биомасса нагревается и проталкивается через экструзионную головку.

В некоторых вариантах реализации биопластик на белковой основе может быть смешан с пластмассой, полученной из ископаемых углеводов, но это необязательная стадия.

Описанные в данном документе биопластики на белковой основе могут использоваться в упаковке, пакетах, бутылках, контейнерах, одноразовой посуде, столовых приборах, горшках для растений, почвопокровном покрове, тюковом сене, пуговицах или пряжках.

Преимущество настоящего изобретения заключается в растворимости микробной биомассы в воде. Хотя были проведены некоторые исследования, связанные с использованием растительных белков в биопластиках на белковой основе, некоторые растительные белки растворимы в обычных растворителях, а использование растворителей или щелочных растворов увеличивает стоимость и может быть экологически вредным. Perez, *Food and Byproducts Processing*, 97:100-108, 2016.

Микроорганизм можно классифицировать по функциональным характеристикам. Например, микроорганизм может представлять собой или может быть получен из C1-фиксирующего микроорганизма, анаэроба, ацетогена, этанологена и/или карбоксидотрофа. В табл. 1 приведен типичный перечень микроорганизмов и указаны их функциональные характеристики.

Таблица 1

	C1- фиксирующий микроорганизм	Анаэроб	Ацетоген	Этанолген	Автотроф	Карбоксидотро ф	Метанотроф
<i>Acetobacterium woodii</i>	+	+	+	+/- ¹	-	+/- ²	-
<i>Alkalibaculum bacchii</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Blautia producta</i>	+	+	+	-	+	+	-
<i>Butyrivacterium methylotrophicum</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Clostridium acetivum</i>	+	+	+	-	+	+	-
<i>Clostridium autoethanogenum</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Clostridium carboxidivorans</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Clostridium coskatii</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Clostridium drakei</i>	+	+	+	-	+	+	-
<i>Clostridium formicoaceticum</i>	+	+	+	-	+	+	-
<i>Clostridium ljungdahlii</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Clostridium magnum</i>	+	+	+	-	+	+/- ³	-
<i>Clostridium ragsdalei</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Clostridium scatologenes</i>	+	+	+	-	+	+	-
<i>Eubacterium limosum</i>	+	+	+	-	+	+	-
<i>Moorella thermoautotrophica</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Moorella thermoacetica</i> (ранее <i>Clostridium thermoaceticum</i>)	+	+	+	- ⁴	+	+	-
<i>Oxobacter pfennigii</i>	+	+	+	-	+	+	-
<i>Sporomusa ovata</i>	+	+	+	-	+	+/- ⁵	-
<i>Sporomusa silvacetica</i>	+	+	+	-	+	+/- ⁶	-
<i>Sporomusa sphaeroides</i>	+	+	+	-	+	+/- ⁷	-
<i>Thermoanaerobacter kiuvi</i>	+	+	+	-	+	-	-

¹ *Acetobacterium woodii* может производить этанол из фруктозы, а не из газа.

² Сообщалось, что *Acetobacterium woodii* может расти на CO, но методология сомнительна.

³ Не было исследовано, можно ли выращивать *Clostridium magnum* на CO.

⁴ Согласно сообщениям, один штамм *Moorella thermoacetica*, *Moorella* sp. HUC22-1, продуцирует этанол из газа.

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

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

⁷ Не было исследовано, можно ли выращивать *Sporomusa sphaeroides* на CO.

"C1" относится к молекуле с одним атомом углерода, например CO или CO₂. "C1-оксигенат" относится к одноуглеродной молекуле, которая также содержит по меньшей мере один атом кислорода, например CO или CO₂. "Источник C1-углерода" относится к одноуглеродной молекуле, которая служит частичным или единственным источником углерода для микроорганизма. Например, источник C1-углерода может включать одно или большее количество соединений, выбранных из CO, CO₂ или CH₂O₂. Источник C1-углерода предпочтительно содержит одно или оба соединения CO и CO₂. "C1-связывающий микроорганизм" представляет собой микроорганизм, который имеет возможность продуцировать один или более продуктов из источника C1-углерода. Обычно микроорганизм представляет собой C1-фиксирующую бактерию. Согласно предпочтительному варианту реализации, микроорганизм представляет собой или получают из C1-фиксирующего микроорганизма, приведенного в табл. 1.

"Анаэроб" представляет собой микроорганизм, не требующий кислорода для роста. Анаэроб может отреагировать отрицательно или даже умереть, если содержание кислорода превышает определенный порог. Обычно микроорганизм является анаэробом (т.е. является анаэробным). В предпочтительном варианте реализации, микроорганизм представляет собой или получают из анаэроба, приведенного в табл. 1.

"Ацетоген" представляет собой микроорганизм, продуцирующий или способный продуцировать ацетат (или уксусную кислоту) в качестве продукта анаэробного дыхания. Как правило, ацетогены представляют собой облигатно-анаэробные бактерии, использующие путь Вуда-Льюнгаля в качестве основного механизма сохранения энергии и синтеза ацетил-КоА и продуктов, полученных из ацетил-КоА, на-

пример ацетата (Ragsdale, *Biochim/ Biophys/ Acta*, 1784:1873-1898, 2008). Ацетогены используют путь ацетил-КоА в качестве (1) механизма для восстановительного синтеза ацетил-КоА из CO₂, (2) терминального электрон-акцепторного энергосберегающего процесса, (3) механизма фиксации (ассимиляции) CO₂ при синтезе клеточного углерода (Drake, *Acetogenic Prokaryotes*, In: *The Prokaryotes*, 3rd edition, p. 354, New York, NY, 2006). Все ацетогены природного происхождения являются C1-связывающими, анаэробными, автотрофными и неметанотрофными. В предпочтительном варианте реализации микроорганизм представляет собой ацетоген. В предпочтительном варианте реализации, микроорганизм представляет собой или получают из ацетогена, приведенного в табл. 1.

"Этанологен" представляет собой микроорганизм, продуцирующий или способный продуцировать этанол. В предпочтительном варианте реализации микроорганизм представляет собой этанологен. В предпочтительном варианте реализации, микроорганизм представляет собой или получают из этанологена, приведенного в табл. 1.

"Автотроф" представляет собой микроорганизм, способный расти в отсутствие органического углерода. Вместо этого автотрофы используют источники неорганического углерода, например, СО и/или СО₂. В предпочтительном варианте реализации микроорганизм является автотрофом. В предпочтительном варианте реализации, микроорганизм представляет собой или получают из автотрофа, приведенного в табл. 1.

"Карбоксидотроф" представляет собой микроорганизм, способный использовать СО в качестве единственного источника углерода. В предпочтительном варианте реализации микроорганизм представляет собой карбоксидотроф. Согласно предпочтительному варианту реализации, микроорганизм представляет собой или получают из карбоксидотрофа, приведенного в табл. 1.

В некоторых вариантах реализации микроорганизм не потребляет определенные субстраты, такие как метан или метанол. В одном из вариантов реализации микроорганизм не является метанотрофом и/или не является метилотрофом.

Предпочтительно, микроорганизм является грамположительным. В более широком смысле микроорганизм может представлять собой или может быть получен из микроорганизма любого рода или вида, приведенного в табл. 1. Например, микроорганизм может быть членом рода *Clostridium*.

Согласно предпочтительному варианту реализации, микроорганизм представляет собой или получен из кластера *Clostridia*, включающего виды *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei*. Такие виды были 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*).

Указанные три вида характеризуются значительным сходством. В частности, все эти виды являются C1-фиксирующими, анаэробными, ацетогенными, этанологенными и карбоксидотрофными представителями рода *Clostridium*. Такие виды обладают аналогичными генотипами и фенотипами, способами сохранения энергии и ферментативным метаболизмом. Кроме того, эти виды объединены в кластер в I группе гомологии кластридиальной рРНК, причем их ДНК 16S рРНК идентична более чем на 99%, содержание G + C в ДНК составляет около 22-30 мол.%, они являются грамположительными, характеризуются аналогичной морфологией и размером (размер логарифмически растущих клеток находится в интервале между 0,5-0,7 × 3-5 мкм), являются мезофильными (оптимальный рост наблюдается при температуре 30-37°C), характеризуются аналогичными 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 такие виды также демонстрируют сильный автотрофный рост на СО-содержащих газах, продуцируют этанол и ацетат (или уксусную кислоту) в качестве основных продуктов ферментации и при определенных условиях образуют небольшие количества 2,3-бутандиола и молочной кислоты.

Однако, указанные три вида также обладают целым рядом различий. Эти виды были выделены из разных источников: *Clostridium autoethanogenum* - из кишечника кролика, *Clostridium ljungdahlii* - из отходов птицеферм и *Clostridium ragsdalei* - из осадочных отложений пресных водоемов. Эти виды отличаются по утилизации различных углеводов (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-Льонгдала, хотя обнаружено, что общая организация и количество таких генов и белков одинаковы у всех видов (Körpe, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 22:320-325, 2011).

Таким образом, 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 манипулирова-

ние одним из этих видов может не иметь идентичного эффекта в другом из этих видов. Например, могут наблюдаться различия в росте, производительности или продуцировании продукта.

Микроорганизм также может быть или получен из изолята или мутанта *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. Изоляты и мутанты *Clostridium autoethanogenum* включают JA1-1 (DSM10061) (Abrini, Arch Microbiol, 161: 345-351, 1994), LBS1560 (DSM19630) (WO 2009/064200) и LZ1561 (DSM23693). Изоляты и мутанты *Clostridium ljungdahlii* включают ATCC 49587 (Tanner, Int. J. Syst. Bacteriol., 43:232-236, 1993), PETCT (DSM13528, ATCC 55383), ERI-2 (ATCC 55380) (US 5593886), C-01 (ATCC 55988) (US 6368819), 0-52 (ATCC 55989) (US 6368819) и OTA-1 (Tirado-Acevedo, Production of bioethanol from synthesis gas using *Clostridium ljungdahlii*, PhD thesis, North Carolina State University, 2010). Изоляты и мутанты *Clostridium ragsdalei* включают PI 1 (ATCC BAA-622, ATCC PTA-7826) (WO 2008/028055).

Термин "полученный из" относится к микроорганизму, модифицированному или адаптированному из другого (например, родительского или дикого типа) микроорганизма, с тем, чтобы продуцировать новый микроорганизм. Такие модификации или адаптации обычно включают вставку, делецию, мутацию или замену нуклеиновых кислот или генов.

"Субстрат" относится к источнику углерода и/или источнику энергии для микроорганизма. Как правило, субстрат является газообразным и содержит источник C1-углерода, например CO и/или CO₂. Субстрат предпочтительно содержит источник C1-углерода в виде CO или CO + CO₂. Субстрат может дополнительно содержать другие неуглеродные компоненты, например, H₂, N₂ или электроны.

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 конвертер-ной печи) или около 15-45 мол.% CO (например, синтез-газ). В некоторых вариантах реализации субстрат может содержать относительно низкое количество CO, например около 1-10 или 1-20 мол.% CO. Микроорганизм обычно преобразует по меньшей мере часть CO и/или в субстрате в продукт. В некоторых вариантах реализации субстрат не содержит или по существу не содержит CO.

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 субстрат может содержать относительно высокое количество H₂, например около 60, 70, 80 или 90 мол.% H₂. В дополнительных вариантах реализации субстрат не содержит или по существу не содержит H₂.

Субстрат может содержать некоторое количество CO₂. Например, субстрат может содержать около 1-80 или 1-30 мол.% CO₂. В некоторых вариантах реализации субстрат может содержать менее около 20, 15, 10 или 5 мол.% CO₂. В дополнительных вариантах реализации субстрат не содержит или по существу не содержит CO₂.

В некоторых вариантах реализации субстрат не содержит метан или метанол.

Хотя субстрат, как правило, является газообразным, субстрат 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 дополнительного примера, субстрат может быть адсорбирован на твердом носителе.

Субстрат и/или источник C1-углерода может быть отработанным или отходящим газом или может быть получен из отработанного или отходящего газа, полученного в виде побочного продукта промышленного процесса или из какого-либо другого источника, например из выхлопных газов автомобилей или при газификации биомассы. Согласно определенным вариантам реализации промышленный процесс выбран из группы, состоящей из производства продуктов черных металлов, таких как сталелитейное производство, производства продуктов из цветных металлов, переработки нефти, газификации угля, производства электроэнергии, производства технического углерода, производства аммиака, производства метанола и производства кокса. В этих вариантах реализации субстрат и/или источник C1-углерода может быть получен от промышленного процесса до того, как он будет выпущен в атмосферу, с использованием любого удобного способа.

Субстрат и/или источник C1-углерода может быть синтез-газом или может быть получен из синтез-газа, например, синтеза-газа, полученного при газификации угля или остатков нефтепереработки, газификации биомассы или лигноцеллюлозного материала или при риформинге природного газа. В другом варианте реализации, синтез-газ может быть получен в результате газификации твердых бытовых отходов или твердых промышленных отходов.

В отношении субстратов и/или источников C1-углерода термин "полученный из" относится к субстрату и/или источнику C1-углерода, который каким-либо образом модифицирован или смешан. Например, субстрат и/или источник C1-углерода можно обработать для добавления или удаления определенных компонентов или можно смешать с потоками других субстратов и/или источников C1-углерода.

Состав субстрата может оказывать значительное влияние на эффективность и/или стоимость реакции. Так, например, присутствие кислорода (O₂) может понизить эффективность процесса анаэробной ферментации. В зависимости от состава субстрата может быть желательной обработка, очистка или

филтрация субстрата для удаления нежелательных примесей, например токсинов, нежелательных компонентов или частиц пыли, и/или для увеличения концентрации желаемых компонентов.

Как правило, выращивание проводят в биореакторе. Термин "биореактор" включает устройство для выращивания/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 аппарат или другое устройство, подходящее для контакта газ-жидкость. В некоторых вариантах реализации биореактор может содержать первый реактор для выращивания и второй реактор для выращивания/ферментации. Субстрат можно подавать в один или оба таких реактора. Используемые в данном документе термины "выращивание" и "ферментация" являются взаимозаменяемыми. Указанные термины охватывают как фазу роста, так и фазу биосинтеза продукта в процессе выращивания/ферментации.

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

Желательно, чтобы выращивание/ферментация проводились в соответствующих условиях для продуцирования целевого продукта. Условия реакции, которые следует учитывать, включают давление (или парциальное давление), температуру, скорость потока газа, скорость потока жидкости, pH среды, окислительно-восстановительный потенциал среды, скорость перемешивания (при использовании реактора непрерывного действия с перемешиванием), уровень посевного материала, максимальные концентрации газового субстрата, 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, чтобы гарантировать, что концентрация газа в жидкой фазе не станет ограничивающей, поскольку продукты могут потребляться культурой в условиях ограниченного количества газа.

При этом сама микробная биомасса считается целевым продуктом. Однако микроорганизмы также производят один или несколько других ценных продуктов. Например, *Clostridium autoethanogenum* продуцирует или может быть генетически сконструирован для продуцирования этанола (WO 2007/117157), ацетата (WO 2007/117157), бутанола (WO 2008/115080 и WO 2012/053905), бутирата (WO 2008/115080), 2,3-бутандиола (WO 2009/151342), лактата (WO 2011/112103), бутена (WO 2012/024522), бутадиена (WO 2012/024522), метилэтилкетона (2-бутанола) (WO 2012/024522 и WO 2013/185123), этилена (WO 2012/026833), ацетона (WO 2012/115527), изопропанола (WO 2012/115527), липидов (WO 2013/036147), 3-гидроксипропионата (3-HP) (WO 2013/180581), изопрена (WO 2013/180584), жирных кислот (WO 2013/191567), 2-бутанола (WO 2013/185123), 1,2-пропандиола (WO 2014/0369152) и 1-пропанола (WO 2014/0369152).

Работа биореактора при повышенном давлении позволяет увеличить скорость массопереноса газа из газовой фазы в жидкую. Соответственно, в общем случае предпочтительно осуществлять выращивание/ферментацию при давлениях выше атмосферного давления. Кроме того, поскольку заданная скорость превращения 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 выращивания/ферментации. Это, в свою очередь, означает, что время удерживания, определяемое как объем жидкости в биореакторе, деленный на расход входящего газа, может быть уменьшено, если в биореакторах поддерживается повышенное, а не атмосферное давление. Оптимальные условия реакции будут частично зависеть от конкретного используемого микроорганизма. Кроме того, поскольку заданная скорость превращения газа частично зависит от времени удерживания субстрата, а достижение желаемого времени удерживания, в свою очередь, определяет необходимый объем биореактора, то применение систем под давлением может значительно уменьшить требуемый объем биореактора и, следовательно, капитальные затраты на оборудование для ферментации.

Выращивание микроорганизма можно проводить в условиях ферментации, которые максимизируют производство микробной биомассы. Способ может также включать выращивание микроорганизма в условиях ферментации, которые максимизируют продукцию или селективность в отношении микробной биомассы. Для достижения максимальной селективности по биомассе требуется работа при максимальной удельной скорости роста или максимальной степени разбавления микроорганизмов. Однако работа при высоких степенях разведения микроорганизмов также снижает концентрацию клеток в культуре, что затрудняет разделение. Кроме того, концентрация клеток является ключевым требованием для высокой производительности реактора. Следует ориентироваться на конкретную скорость роста или скорость разведения микроорганизмов $>1/\text{день}$, при этом скорость $2/\text{день}$ будет ближе к оптимальной.

В системе с двумя реакторами производительность биомассы максимизируется за счет высокой производительности биомассы как в первом, так и во втором реакторе. Это может быть достигнуто за

счет (1) низкой жизнеспособности клеток или (2) высоких удельных скоростей роста во втором реакторе. Низкая жизнеспособность клеток может быть достигнута из-за токсичности высоких титров продукта и может быть нежелательной. Быстрые удельные скорости роста могут быть достигнуты при работе с еще более высокими значениями скорости разбавления микроорганизмов во втором реакторе по сравнению с первым реактором.

Это соотношение фиксируется следующим уравнением:

$$\mu_2 = D_{w2} - D_{w1} * (X_1/X_2) * (V_1/V_2),$$

где μ_2 - удельная скорость роста во втором реакторе двухреакторной системы, которую необходимо будет максимизировать для повышения селективности по биомассе;

D_{w2} и D_{w1} - скорости разбавления микроорганизмов во втором и первом реакторах в двухреакторной системе соответственно;

X_2 и X_1 - титры биомассы во втором и первом реакторах в двухреакторной системе соответственно;

V_2 и V_1 - это объемы реакторов во втором и первом реакторах в двухреакторной системе соответственно.

Согласно этому уравнению, чтобы максимизировать селективность по биомассе во втором реакторе, скорость разбавления микроорганизмов во втором реакторе, D_{w2} , должна быть увеличена для достижения удельной скорости роста, μ_2 , во втором реакторе $>0,5/\text{день}$, в идеале - 1-2/день.

Целевые продукты можно отделять или очищать от ферментативного бульона, используя любой способ или комбинацию способов, известных в данной области техники, включая, например, фракционную перегонку, выпаривание, испарение через полупроницаемую перегородку, отдувку газом, разделение фаз и экстрактивную ферментацию, включая, например, экстракцию жидкости жидкостью. В некоторых вариантах реализации целевые продукты выделяют из ферментационного бульона путем непрерывного удаления из биореактора части бульона, отделения микробных клеток от бульона (обычно путем фильтрации) и выделения из бульона одного или нескольких целевых продуктов. Спирты и/или ацетон можно выделять, например, перегонкой. Кислоты можно выделять, например, адсорбцией на активированном угле. Бесклеточный пермеат, оставшийся после удаления целевых продуктов, также предпочтительно возвращают в биореактор. Для восполнения среды перед ее возвратом в биореактор к бесклеточному пермеату можно добавлять дополнительные питательные вещества (такие как витамины группы B).

Примеры

Следующие примеры дополнительно иллюстрируют данное изобретение, но, разумеется, никоим образом не должны рассматриваться как ограничивающие его сущность.

Пример 1.

В этом примере описывается состав микробной биомассы *C. autoethanogenum* DSM23693 (табл. 2).

Таблица 2

Компонент	Результат	Единица измерения	Метод тестирования
Калории (расчет)	329	ккал/100 г	21 CFR Часть 101
Калории из жира (расчет)	ND	ккал/100 г	21 CFR Часть 101
Всего углеводов (расчет)	10	г/100 г	21 CFR Часть 101
Витамин А (ретинол)	ND	МЕ/100 г	АОАС 2001.13
Кальций	42	мг/100 г	АОАС 2011.14
Железо	29	мг/100 г	АОАС 2011.14
Натрий	170	мг/100 г	АОАС 2011.14
Медь	0,525	мг/кг	SW6010C/SW3061
Магний	193	мг/кг	SW6010C/SW3065
Марганец	<4,7	мг/кг	SW6010C/SW3066
Фосфор	6720	мг/кг	SW6010C/SW3066
Калий	6520	мг/кг	SW6010C/SW3066
Селен	14,3	мг/кг	SW6010C/SW3066
Натрий	1960	мг/кг	SW6010C/SW3066
Цинк	53	мг/кг	SW6010C/SW3066
Пепел	2,6	г/100 г	АОАС 923.03
Влага	15	г/100 г	АОАС 927.05/950.46
Общий сахар	ND	г/100 г	АОАС 982.14
Общее количество пищевых волокон	9,1	г/100 г	АОАС 2011.25 mod
Протеин	72	г/100 г	АОАС 992.15/992.23
Холестерин	ND	мг/100 г	АОАС 994.1
Мононенасыщенный жир	ND	г/100 г	АОАС 996.06

Полиненасыщенный жир	ND	г/100 г	АОАС 996.06
Насыщенный жир	ND	г/100 г	АОАС 996.06
Всего жиров	ND	г/100 г	АОАС 996.06
Транс-жиры	ND	г/100 г	АОАС 996.06
Витамин С	ND	мг/100 г	JAFC (2003)
В1 (тиамин)	0,07	мг/100 г	Витамин ¹
В2 (рибофлавин)	3,53	мг/100 г	Витамин ¹
В3 (ниацин)	7,44	мг/100 г	Витамин ¹
В5 (пантотеновая кислота)	0,12	мг/100 г	Витамин ¹
В6 (пиридоксин)	0,532	мг/100 г	Витамин ¹
Всего аминокислот			
Аспарагиновая кислота	78,5	мг/г	Общая аминокислота ²
Аланин	44	мг/г	Общая аминокислота ²
Аргинин	27,9	мг/г	Общая аминокислота ²
Цистин	6,35	мг/г	Общая аминокислота ²
Глутаминовая кислота	73,4	мг/г	Общая аминокислота ²
Глицин	31,2	мг/г	Общая аминокислота ²
Гистидин	10,2	мг/г	Общая аминокислота ²
Изолейцин	43,9	мг/г	Общая аминокислота ²
Лейцин	48,7	мг/г	Общая аминокислота ²
Лизин	66,2	мг/г	Общая аминокислота ²
Метионин	17,6	мг/г	Общая аминокислота ²
Фенилаланин	25,8	мг/г	Общая аминокислота ²
Пролин	21,7	мг/г	Общая аминокислота ²
Серин	27,8	мг/г	Общая аминокислота ²
Треонин	34,7	мг/г	Общая аминокислота ²
Тирозин	29,4	мг/г	Общая аминокислота ²
Валин	41,9	мг/г	Общая аминокислота ²
¹ АОАС 944.13, АОАС 960.46, АОАС 945.74, АОАС 961.15, АОАС 940.33, АОАС 942.23, АОАС 953.17, АОАС 957.17			
² Используемые методы: АОАС 944.13, АОАС 960.46, АОАС 945.74, АОАС 961.15, АОАС 940.33, АОАС 942.23, АОАС 953.17, АОАС 957.17, АОАС 988.15, P. R. Schuster, "Determination of Amino Acids in Biological, Pharmaceutical, Plant and Food Samples by Automated Precolumn Derivatization and HPLC", Journal of Chromatography, 1988, 431, 271-284. Henderson, J.W., Brooks, A., "Improved Amino Acid Methods using Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 Columns for a Variety of Agilent LC Instrumentation and Separation Goals," Agilent Application Note 5990-4547 (2010)., Henderson, J.W., Ricker, R.D. Bidlingmeyer, B.A., Woodward, C., "Rapid, Accurate, Sensitive, and Reproducible HPLC Analysis of Amino Acids, Amino Acid Analysis Using Zorbax Eclipse-AAA columns and the Agilent 1100 HPLC," Agilent Publication, 2000.			
nt = не тестировали			
ND = не обнаружено (ниже предела обнаружения метода)			
<= элемент не обнаружен; Показанное значение является пределом обнаружения метода			

Пример 2.

В этом примере описаны общие методы выращивания *C. Autoethanogenum* и *C. ljungdahlii*. Такие методы также хорошо известны в данной области техники.

C. Autoethanogenum DSM10061 и DSM23693 (производное DSM10061) и *C. Ljungdahlii* DSM13528 получали из DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур, Инхоффенштрассе 7 В, 38124 Брауншвейг, Германия).

Штаммы выращивали при 37°C в среде PETC при pH 5,6 с использованием стандартных анаэробных методов. (Hungate, Methods Microbiol, 3B:117-132,1969; Wolfe, Adv Microbiol Physiol, 6:107-146, 1971). Фруктоза (гетеротрофный рост) или 30 фунтов/кв. дюйм CO-содержащего сталеплавильного газа

(собранныго на заводе New Zealand Steel в Гленбруке, Новая Зеландия; состав: 44% CO, 32% N₂, 22% CO₂, 2% H₂) в свободном пространстве (автотрофный рост) использовали в качестве субстрата. Для твердых сред добавляли 1,2% бактоагар (BD, Franklin Lakes, NJ 07417, USA).

Все ссылки, включая публикации, патентные заявки и патенты, упомянутые в данном документе, тем самым включены 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. В данном описании ссылка на любой известный уровень техники не является и не должна рассматриваться как подтверждение того, что этот известный уровень техники является частью общедоступных знаний в области деятельности в любой стране.

Следует считать, что использование терминов в единственном числе и аналогичных ссылок в контексте описания настоящего изобретения (особенно в контексте приведенной ниже формулы изобретения) охватывает как единственное, так и множественное число, если только в данном документе не указано иное или иное явно не противоречит контексту. Термины "состоящий из", "имеющий", "включающий" и "содержащий" следует рассматривать как неограничивающие термины (т.е. означающие "в том числе, но не ограничиваясь ими"), если не указано иное. Перечисление в данном документе диапазонов значений просто предназначено для того, чтобы служить сокращенным способом ссылки по отдельности на каждое отдельное значение, попадающее в такой диапазон, если в настоящем документе не указано иное, при этом каждое отдельное значение включено в данное описание, как если бы оно было отдельно приведено в настоящем документе. Все способы, описанные в данном документе, могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если в настоящем документе не указано иное или иное явно не противоречит контексту. Использование любых возможных примеров или вводных слов перед примером (например, "такой как"), приведенных в данном документе, предназначено просто для лучшего освещения данного изобретения и не налагает ограничение на объем данного 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 практического осуществления данного изобретения.

В данном документе описаны предпочтительные варианты реализации изобретения. Вариации этих предпочтительных вариантов реализации изобретения станут очевидными для специалистов в данной области при прочтении представленного выше описания. Авторы изобретения ожидают, что квалифицированные специалисты будут использовать такие вариации при необходимости, и авторы изобретения предполагают, что настоящее изобретение будет осуществляться на практике иначе, чем конкретно описано в данном документе. Соответственно, настоящее изобретение включает в себя все модификации и эквиваленты объекта изобретения, приведенные ниже в формуле изобретения, как это установлено действующим законодательством. Кроме того, любая комбинация описанных выше элементов во всех возможных их вариациях охватывается данным изобретением до тех пор, пока в данном документе не указано иное, или иное явно не противоречит контексту.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения биопластика на белковой основе, включающий:
 - а) стадию выращивания микроорганизма в питательной среде в присутствии газообразного субстрата с получением микробной биомассы и
 - б) стадию обработки микробной биомассы с получением биопластика на белковой основе, где стадия обработки включает смешивание микробной биомассы с пластификатором и где газообразный субстрат содержит CO, CO₂ и/или H₂.
2. Способ по п.1, отличающийся тем, что стадия обработки включает одну или несколько из: стерилизация микробной биомассы, центрифугирование микробной биомассы, сушка микробной биомассы, денатураирование микробной биомассы и экстракция микробной биомассы.
3. Способ по п.1, отличающийся тем, что пластификатор представляет собой один или несколько из следующих компонентов: вода, глицерин, этиленглицерин, пропиленглицерин, пальмитиновая кислота, диэтилтарtrat, дибутилтарtrat, 1,2-бутандиол, 1,3-бутандиол, полиэтиленгликоль (ПЭГ), сорбит, диметиланилин, дифениламин и 2,3-бутандиол.
4. Способ по п.1, отличающийся тем, что пластификатор представляет собой глицерин.
5. Способ по п.1, отличающийся тем, что смешивание микробной биомассы с пластификатором происходит с использованием физико-химических методов.
6. Способ по п.1, отличающийся тем, что смешивание микробной биомассы с пластификатором происходит с использованием термомеханических методов.
7. Способ по п.1, отличающийся тем, что стадия обработки включает добавление к микробной биомассе добавки.
8. Способ по п.7, отличающийся тем, что добавка представляет собой сшивающий агент.
9. Способ по п.7, отличающийся тем, что добавка представляет собой восстановитель.
10. Способ по п.7, отличающийся тем, что добавка представляет собой усилитель, выбранный из нановолокон бактериальной целлюлозы, волокон листьев ананаса, лигнина, льна, джута, конопли и

сизаля.

11. Способ по п.7, отличающийся тем, что добавка представляет собой проводник, выбранный из материала углеродных нанотрубок.

12. Способ по п.7, отличающийся тем, что добавка представляет собой агент, повышающий совместимость, выбранный из яблочного ангидрида и толуолдиизоцианата.

13. Способ по п.7, отличающийся тем, что добавка представляет собой агент водостойкости.

14. Способ по п.1, отличающийся тем, что микроорганизм является грамположительным.

15. Способ по п.1, отличающийся тем, что микроорганизм является ацетогеном и/или карбоксидотрофом.

16. Способ по п.1, отличающийся тем, что микроорганизм является анаэробом.

17. Способ по п.1, отличающийся тем, что микроорганизм является членом рода *Clostridium*.

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

19. Способ по п.1, отличающийся тем, что микроорганизм не является метанотрофом.

20. Способ по п.1, отличающийся тем, что газообразный субстрат не содержит метан.

21. Способ по п.1, отличающийся тем, что газообразный субстрат представляет собой или получен из газообразных промышленных отходов, отходящего промышленного газа или синтез-газа.

