

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **033645**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.11.12

(21) Номер заявки
201590010

(22) Дата подачи заявки
2013.06.12

(51) Int. Cl. **C12P 5/02** (2006.01)
B09B 3/00 (2006.01)
C02F 11/04 (2006.01)

(54) СПОСОБ ПЕРЕРАБОТКИ ТВЕРДЫХ БЫТОВЫХ ОТХОДОВ И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИОМЕТАНА

(31) **61/658,419**

(32) **2012.06.12**

(33) **US**

(43) **2015.08.31**

(86) **PCT/DK2013/050194**

(87) **WO 2013/185778 2013.12.19**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
РЕНЕСАНС А/С (DK)

(72) Изобретатель:
**Йенсен Якоб Вагнер, Рёнш Георг
Эрнсков, Антонсен Себастиан Бух
(DK)**

(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(56) **WO-A2-2006029971
DE-A1-102009009985**

JACOB WAGNER JENSEN ET AL.:
"Cellulase Hydrolysis of Unsorted MSW", APPLIED
BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY;
PART A: ENZYME ENGINEERING AND
BIOTECHNOLOGY, HUMANA PRESS INC, NEW
YORK, vol. 165, no. 7-8, 12 October 2011
(2011-10-12), pages 1799-1811, XP019979853, ISSN:
1559-0291, DOI: 10.1007/S12010-011-9396-7, page
1799, paragraph 3, page 1801, paragraph 4, page 1802,
paragraph 3 - page 1803, paragraph 1; table 2 page
1808, paragraph 3

JENSEN J.W. ET AL.: "Enzymatic processing
of municipal solid waste", WASTE MANAGEMENT,
ELSEVIER, NEW YORK, NY, US, vol. 30, no. 12,
1 December 2010 (2010-12-01), pages 2497-2503,
XP027427879, ISSN: 0956-053X, DOI: 10.1016/
J.WASMAN.2010.07.009 [retrieved on 2010-08-19]
page 22497, column 1, paragraph 1 - column 2, line
2, page 2498, column 1, paragraph 6 - column 2,
paragraph 2, page 2500, column 2, paragraph 1, page
2499, column 1, paragraph 5, page 2503, paragraph 2

(57) Предлагаются способы переработки твердых бытовых отходов (MSW), где совмещенный ферментативный гидролиз и микробиологическая ферментация отходов в результате приводят к оживлению биологически разлагаемых компонентов, а также накоплению микробных метаболитов. Ожиженные биологически разлагаемые компоненты далее отделяются от биологически неразлагаемых твердых веществ с получением биожидкости, отличающейся большим процентным содержанием растворенных твердых веществ, основная фракция которых содержит любую комбинацию из ацетата, этанола, бутирата, лактата, формиата или пропионата. Способы получения биометана дополнительно предлагают применение данной биожидкости и применение композиций-субстратов биометана, получаемых путем параллельного ферментативного гидролиза и микробиологической ферментации органических материалов.

B1**033645****033645****B1**

Твердые бытовые отходы (MSW), в частности включающие бытовые отходы, отходы из ресторанов и предприятий по производству пищевых продуктов, а также отходы из административных зданий, содержат значительное количество компонентов органического материала, которые далее могут быть переработаны с получением энергии, топливных материалов и других полезных продуктов. На сегодняшний день лишь малую часть доступных MSW подвергают рециркуляции, при этом подавляющее большинство выбрасывают на свалки.

Возник значительный интерес к разработке эффективных и экологически безопасных способов переработки твердых отходов для максимального извлечения характерного для них энергетического потенциала, а также рециркуляции перерабатываемых материалов. Одной из существенных проблем в переработке "отходов в энергию" являлся неоднородный характер MSW. Твердые отходы, как правило, содержат значительное количество компонентов органического разлагаемого материала, смешанного с пластмассой, стеклом, металлами и другими неразлагаемыми материалами. Несортированные отходы могут непосредственно быть использованы в мусоросжигании, как это широко практикуется в таких странах как Дания и Швеция, где используются в системах централизованного отопления (Strehlik 2009). Вместе с тем способы мусоросжигания связывают с отрицательными последствиями для окружающей среды и с их помощью не достигают эффективной рециркуляции сырья. Чистое и эффективное использование разлагаемого компонента MSW, объединенное с переработкой, как правило, требует любого способа сортировки для отделения разлагаемого от неразлагаемого материала.

Разлагаемый компонент MSW можно использовать в переработке "отходов в энергию", используя как термохимические, так и биологические способы. MSW можно подвергать пиролизу или другим режимам термохимической газификации. Органические отходы, термически разлагающиеся при чрезвычайно высоких температурах, продуцируют летучие компоненты, такие как смола и метан, а также твердый остаток или "кокс", который можно сжигать с меньшими токсическими последствиями по сравнению с таковыми, которые ассоциируются с непосредственным мусоросжиганием. В качестве альтернативы органические отходы можно термически превращать в "сингаз", содержащий монооксид углерода, диоксид углерода и водород, которые далее можно превращать в синтетические топлива. См., например, для обзора Malkow 2004.

Биологические способы конверсии разлагаемых компонентов MSW включают ферментацию с получением специфических полезных конечных продуктов, таких как этанол. См., например, WO 2009/150455; WO 2009/095693; WO 2007/036795; Ballesteros et al., 2010; Li et al., 2007.

В качестве альтернативы биологическая конверсия может быть достигнута путем анаэробного сбраживания с получением биометана или "биогаза". См., например, для обзора Hartmann and Ahling 2006. Предварительно сортированный органический компонент MSW может быть превращен непосредственно в биометан, см., например, US 2004/0191755, или после сравнительно простого способа "размалывания", включающего измельчение в присутствии добавленной воды, см., например, US 2008/0020456.

Однако предварительная сортировка MSW для получения органического компонента является, как правило, дорогостоящей, неэффективной или нецелесообразной. Первичная сортировка требует крупной инфраструктуры и эксплуатационных затрат, а также активного участия и поддержки населения, от которого принимают отходы - деятельность, которой трудно достичь в современных городских обществах. Механическая сортировка является, как правило, капиталоемкой и дополнительно ассоциируется с большой потерей органического материала, порядка по меньшей мере 30%, а часто значительно выше. См., например, Connsonni 2005.

Некоторые из данных проблем с системами сортировки были успешно устранены посредством использования оживления органических разлагаемых компонентов в несортированных отходах. Оживленный органический материал может быть с легкостью отделен от неразлагаемых материалов. После оживления в пульпу органический компонент можно с легкостью использовать в способах термохимической или биологической конверсии. Неоднократно сообщалось об оживлении разлагаемых компонентов с использованием способов при высоком давлении, высокотемпературного "автоклавирования", см., например, US 2013/0029394; US 2012/006089; US 20110008865; WO2009/150455; WO 2009/108761; WO 2008/081028; US 2005/0166812; US 2004/0041301; US 5427650; US 5190226.

Принципиально другой подход к оживлению разлагаемых органических соединений состоит в том, что это может быть достигнуто с использованием биологического процесса, в частности посредством ферментативного гидролиза, см. Jensen et al., 2010; Jensen et al., 2011; Tonini and Astrup 2012; WO 2007/036795; WO 2010/032557.

Ферментативный гидролиз предлагает специфические преимущества над способами "автоклавирования" для оживления разлагаемых органических компонентов. Используя ферментативное оживление, переработку MSW можно выполнять непрерывным способом с использованием сравнительно недорогого оборудования и реакций не под давлением, проходящих при сравнительно низких температурах. Напротив, способы "автоклавирования" могут быть выполнены в пакетном режиме и, как правило, подразумевают более высокие капиталовложения.

Осознанная необходимость в "стерилизации" для уменьшения таким образом возможных рисков для здоровья, создаваемых MSW-переносимыми патогенными микроорганизмами, являлась преоблада-

дающей темой в подтверждение превосходства способов охижения "автоклавируванием". См., например, WO 2009/150455; WO 2000/072987; Li et al., 2012; Ballesteros et al., 2010; Li et al., 2007. Аналогичным образом ранее полагали, что ферментативное охижение требует тепловой предварительной обработки до сравнительно высокой температуры, по меньшей мере 90-95°C. Данная высокая температура считалась необходимой, в частности, для осуществления "стерилизации" несортированных MSW, и чтобы таким образом, разлагаемые органические компоненты можно было размягчить и бумажные изделия "переработать в бумажную массу". См. Jensen et al., 2010; Jensen et al., 2011; Tonini and Astrup 2012.

Было обнаружено, что безопасное ферментативное охижение несортированных MSW может быть достигнуто без высокотемпературной предварительной обработки. Действительно, вопреки ожиданиям, высокотемпературная предварительная обработка является не только нецелесообразной, но может активным образом причинять вред, поскольку уничтожает микроорганизмы окружающей среды, которые размножаются в отходах. Стимулирование микробиологической ферментации совместно с ферментативным гидролизом в термофильных условиях >45°C улучшает "поглощение органических веществ" либо с использованием "окружающей среды" микроорганизмов, либо с использованием избирательно "инокулированных" организмов. Таким образом, параллельная термофильная микробиологическая ферментация надежно повышает органический выход "биожидакости", которая является термином в данном документе для охиженных разлагаемых компонентов, полученных путем ферментативного гидролиза. При данных условиях патогенные микроорганизмы, обычно обнаруживаемые в MSW, не размножаются. См., например, Hartmann and Ahring 2006; Déportes et al., 1998; Carrington et al., 1998; Bendixen et al., 1994; Kubler et al., 1994; Six and De Baerre et al., 1992. При данных условиях типичные MSW-переносимые патогены с легкостью вытесняются повсеместно распространенными молочнокислыми бактериями и другими безопасными организмами.

Дополнительно к улучшению "поглощения органических веществ" за счет ферментативного гидролиза, параллельной микробиологической ферментации с использованием любой комбинации из молочнокислых бактерий или ацетат-, этанол-, формиат-, бутират-, лактат-, пентаноат- или гексаноат-продуцирующих микроорганизмов "предварительные условия" для биожидакости являются таковыми, чтобы сделать ее более эффективной в качестве субстрата для получения биометана. При микробиологической ферментации продуцируется биожидакость, характеризующаяся в целом повышенным процентным содержанием растворенных твердых веществ в сравнении со взвешенными твердыми веществами по отношению к биожидакости, полученной отдельно путем ферментативного охижения. Высокомолекулярные полисахариды в целом более полно разлагаются в результате микробиологической "предварительной подготовки". Параллельная микробиологическая ферментация и ферментативный гидролиз расщепляет биополимеры в легко используемые субстраты, и дополнительно достигается метаболическая конверсия исходных субстратов в короткоцепочечные карбоновые кислоты и/или этанол. Полученная в результате биожидакость, содержащая высокий процент микробных метаболитов, обеспечивает субстрат биометана, который эффективно устраняет ограничивающий скорость этап "гидролиза", см., например, Delgenes et al., 2000; Angelidaki et al., 2006; Cysneiros et al., 2011, и который предлагает дополнительные преимущества для получения метана, в частности с использованием очень быстрых систем анаэробного сбраживания на основе "фильтров с неподвижной загрузкой".

Краткое описание фигур

Фиг. 1. Конверсия сухого вещества, выраженного в виде сухого вещества, полученного в надосадочной жидкости, в виде общего содержания сухого вещества в процентах при параллельном ферментативном гидролизе и микробиологической ферментации, стимулированных путем инокуляции биожидакости EC12B из примера 5.

Фиг. 2. Бактериальные метаболиты, полученные в надосадочной жидкости, после параллельного ферментативного гидролиза и ферментации, индуцированных путем добавления биожидакости из примера 5.

Фиг. 3. Графическое представление испытательного реактора REnescience.

Фиг. 4. Схематическое изображение демонстрационной установки.

Фиг. 5. Поглощение органических веществ в биожидакости в различные периоды времени, выраженное в кг VS на кг переработанных MSW.

Фиг. 6. Бактериальные метаболиты, выраженные в виде процента растворенных VS в биожидакости, а также в виде числа аэробных бактерий в различные временные точки в эксперименте.

Фиг. 7. Распределение видов бактерий, выявленных в биожидакости из примера 3.

Фиг. 8. Распределение 13 преобладающих бактерий в EC12B, полученной при испытании, описанном в примере 5.

Фиг. 9. Выход на рабочий режим и снижение выработки биометана при использовании биожидакости из примера 5.

Фиг. 10. Характеристика "выхода на рабочий режим" и "снижения" выработки биометана из биожидакости "с высоким содержанием лактата" из примера 2.

Фиг. 11. Характеристика "выхода на рабочий режим" и "снижения" выработки биометана из биожидакости "с низким содержанием лактата" из примера 2.

Фиг. 12 показывает характеристику "выхода на рабочий режим" выработки биометана из биожида-

кости из гидролизованной пшеничной соломы.

Подробное описание вариантов осуществления

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ переработки твердых бытовых отходов (MSW), включающий этапы

(i) обеспечения MSW при содержании безводных веществ от 5 до 40% и при температуре от 45 до 75°C,

(ii) ферментативного гидролиза биологически разлагаемых частей MSW, параллельного с микробиологической ферментацией при температуре от 45 до 75°C, результатом которых является оживление биологически разлагаемых частей отходов и накопление микробных метаболитов с последующим

(iii) отделением оживленных биологически разлагаемых частей отходов от биологически неразлагаемых твердых веществ для получения биожидкости, отличающейся содержанием растворенных летучих твердых веществ, при этом по меньшей мере 25 мас.% содержат любую комбинацию из ацетата, бутирата, этанола, формиата, лактата и/или пропионата, с последующим

(iv) анаэробным сбраживанием биожидкости для получения биометана.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает способ получения биогаза, включающий этапы

(i) обеспечения органического жидкого субстрата биогаза, предварительно подготовленного путем микробиологической ферментации таким образом, что по меньшей мере 40% по массе от содержания безводных веществ присутствуют в виде растворенных летучих твердых веществ, при этом растворенные летучие твердые вещества составляют по меньшей мере 25 мас.% в виде любой комбинации из ацетата, бутирата, этанола, формиата, лактата и/или пропионата,

(ii) переноса жидкого субстрата в систему анаэробного сбраживания с последующим

(iii) осуществлением анаэробного сбраживания жидкого субстрата для получения биометана.

Динамические характеристики метаболизма микробных сообществ, вовлеченных в анаэробное сбраживание, являются сложными. См. Supaphol et al. 2010; Morita and Sasaki 2012; Chandra et al. 2012. При типичном анаэробном сбраживании (AD) для получения биогаза-метана биологические процессы, опосредованные микроорганизмами, достигают четырех начальных этапов - гидролиз биологических макромолекул в составные мономеры или другие метаболиты; кислотогенез, в результате чего образуются короткоцепочечные углеводородные кислоты и спирты; ацетогенез, в результате чего усваиваемые питательные вещества катаболизируются в уксусную кислоту, водород и диоксид углерода; и метаногенез, в результате чего уксусная кислота и водород катаболизируются определенными археями в метан и диоксид углерода. Этап гидролиза, как правило, является ограничивающим скорость реакции. См., например, Delgenes et al. 2000; Angelidaki et al. 2006; Cysneiros et al. 2011.

Соответственно предпочтительным в получении субстратов для получения биометана является их предварительный гидролиз посредством некоторых видов предварительной обработки. В некоторых вариантах осуществления в способах по настоящему изобретению объединяют микробиологическую ферментацию с ферментативным гидролизом MSW, оба из которых представляют собой быструю биологическую предварительную обработку для последующего получения биометана, а также способ отделения разлагаемых органических компонентов от других несортированных MSW.

Сообщали о биологических предварительных обработках с использованием твердых субстратов биометана, в том числе первично сортированных органических компонентов MSW. См., например, Fdez-Guelfo et al., 2012; Fdez-Guelfo et al. 2011 A; Fdez-Guelfo et al., 2011 B; Ge et al., 2010; Lv et al., 2010; Borghi et al., 1999. Улучшения в последующих выходах метана в результате анаэробного сбраживания были представлены как результат повышенного разложения сложных биополимеров и повышенной растворимости летучих твердых веществ. Тем не менее, уровень растворимости летучих твердых веществ и уровень конверсии в летучие жирные кислоты, достигнутые с помощью способов, о которых ранее сообщали, даже не приблизились к уровням, достигнутым с помощью способов по настоящему изобретению. Например, Fdez-Guelfo et al., 2011 сообщают о 10-50% относительном улучшении растворимости летучих твердых веществ, достигнутом посредством различных биологических предварительных обработок первично сортированных органических фракций из MSW - это соответствует конечным абсолютным уровням растворимости от приблизительно 7 до 10% летучих твердых веществ. Для сравнения, с помощью способов по настоящему изобретению получают жидкие субстраты биометана, содержащие по меньшей мере 40% растворенных летучих твердых веществ.

Также сообщали о системах двухэтапного анаэробного сбраживания, в которых в способе первого этапа гидролизуются субстраты биометана, в том числе первично сортированный органический компонент из MSW и другие определенные биогенные субстраты. Во время первого анаэробного этапа, являющегося, как правило, термофильным, разлагаются высокомолекулярные полимеры и образуются летучие жирные кислоты. После чего следует второй анаэробный этап, который осуществляют в совершенно ином реакторе, в котором преобладают метаногенез и ацетогенез. Сообщали о системах двухэтапного анаэробного сбраживания, в которых, как правило, используют первично сортированные определенные биогенные субстраты с общим содержанием твердых веществ менее 7%. См., например, Supaphol et al., 2011; Kim et al., 2011; Lv et al., 2010; Riau et al., 2010; Kim et al., 2004; Schmit and Ellis 2000; Lafitte-

Trouque and Forster, 2000; Dugba and Zhang, 1999; Kaiser et al., 1995; Harris and Dague, 1993. Недавно сообщали о нескольких двухэтапных системах AD, в которых используют первично сортированные определенные биогенные субстраты при уровнях общего содержания твердых веществ вплоть до 10%. См., например, Yu et al. 2012; Lee et al. 2010; Zhang et al. 2007. Разумеется, ни в одной из описанных систем двухэтапного анаэробного сбраживания никогда не предполагалось применение несортированных MSW в качестве субстрата, не говоря уже о получении жидкого субстрата биометана с высоким содержанием твердых веществ. Двухэтапное анаэробное сбраживание стремится к конверсии твердых субстратов с непрерывной подачей дополнительных твердых веществ в реактор первого этапа и непрерывным удалением летучих жирных кислот из реактора первого этапа.

Для осуществления на практике способов по настоящему изобретению можно использовать любые твердые отходы. Как будет понятно специалисту в данной области техники, термин "твердые бытовые отходы" (MSW) относится к фракциям отходов, которые, как правило, доступны в городе, но не должны поступать из любого района как таковые. MSW могут представлять собой любую комбинацию из отходов целлюлозы, растительных отходов, отходов животноводства, пластмассовых отходов, отходов металла или отходов стекла, включая без ограничения любой один или несколько из следующих: мусор, собранный в стандартных городских системах сбора отходов, необязательно переработанный в ряде центральных сортирующих, измельчающих или размалывающих устройств, таких как Dewaster® или reCulture®; твердые отходы, отделенные от бытовых отходов, в том числе как органические фракции, так и фракции, богатые бумагой; фракции отходов промышленности, такой как ресторанная индустрия, пищевая промышленность, промышленность в целом; фракции отходов целлюлозно-бумажной промышленности; фракции отходов предприятий рециркуляции отходов; фракции отходов пищевой или кормовой промышленности; фракции отходов медицинской промышленности; фракции отходов, полученные от сельскохозяйственного сектора или сектора, связанного с фермерством; фракции отходов, полученные при переработке продуктов, богатых сахаром или крахмалом; загрязненные или любым образом испорченные сельскохозяйственные продукты, такие как зерновые, виды картофеля и виды свеклы, не пригодные к использованию для пищевых или кормовых целей; садовые отходы.

MSW по своей природе, как правило, неоднородны. Статистические данные о составе отходов, обеспечивающие устойчивую базу для сравнения между странами, не получили широкого распространения. Стандарты и операционные процедуры для правильного отбора образцов и определения характеристик остаются нестандартизованными. Фактически, в литературе описано лишь несколько стандартизированных способов отбора образцов. См., например, Riber et al., 2007. По меньшей мере, в случае с бытовыми отходами состав проявляет сезонные и географические колебания. См., например, Dahlen et al., 2007; Eurostat, 2008; Hansen et al., 2007b; Muhle et al., 2010; Riber et al., 2009; Simmons et al., 2006; The Danish Environmental Protection agency, 2010. Также в литературе описаны географические колебания в составе бытовых отходов, даже на небольших расстояниях 200-300 км между районами (Hansen et al., 2007b).

В некоторых вариантах осуществления MSW могут быть переработаны в виде "несортированных" отходов. Используемый в данном документе термин "несортированный" относится к способу, в котором MSW, по сути, не разделяют на отдельные фракции, в результате чего биогенный материал, по сути, не отделяют от пластика и/или другого неорганического материала. Как используется в данном документе, отходы могут быть "несортированными", несмотря на удаление ряда крупных объектов или металлических объектов и несмотря на частичное отделение пластикового и/или неорганического материала. "Несортированные" отходы, как используется в данном документе, относятся к отходам, которые, по сути, не разделяли для обеспечения таким образом биогенной фракции, в которой менее 15% по сухой массе представляют собой небиогенный материал. Как используется в данном документе, отходы, содержащие смесь биогенного и небиогенного материала, в которых более 15% по сухой массе представляют собой небиогенный материал, являются "несортированными". Как правило, несортированные MSW включают биогенные отходы, а именно отходы, которые могут разлагаться в биологически превращаемые вещества, включая пищевые и кухонные отходы, материалы, содержащие бумагу и/или картон, пищевые отходы и им подобные; перерабатываемые материалы, включая стекло, бутылки, консервные банки, металлы и определенные виды пластика; другие поддающиеся сжиганию материалы, которые, несмотря на то, что практически не поддаются переработке как таковые, могут быть источником теплотворной способности в форме видов топлива, полученных из отходов; а также инертные материалы, включая керамические материалы, горные породы и различные формы мусора.

В некоторых вариантах осуществления MSW может быть переработан в виде "сортированных" отходов. Используемый в данном документе термин "сортированный" относится к способу, в котором MSW, по сути, разделяют на отдельные фракции, в результате чего биогенный материал, по сути, отделяют от пластика и/или другого неорганического материала. Как используется в данном документе, отходы, содержащие смесь биогенного и небиогенного материала, в которых менее 15% по сухой массе представляют собой небиогенный материал, являются "сортированными".

В некоторых вариантах осуществления MSW могут представлять собой первично отделенные органические отходы, включающие преимущественно плодово-ягодные отходы, отходы при производстве овощей и/или отходы животноводства. В некоторых вариантах осуществления может быть использован

ряд различных систем сортировки, в том числе первичная сортировка, где население утилизирует различные отходы раздельно. В настоящее время системы первичной сортировки действуют в некоторых районах в Австрии, Германии, Люксембурге, Швеции, Бельгии, Нидерландах, Испании и Дании. В качестве альтернативы могут быть использованы промышленные системы сортировки. Средства механического сортирования и разделения могут включать любые способы, известные из уровня техники, но не ограничиваться системами, описанными в US 2012/0305688; WO 2004/101183; WO 2004/101098; WO 2001/052993; WO 2000/0024531; WO 1997/020643; WO 1995/0003139; CA 2563845; US 5465847. В некоторых вариантах осуществления отходы могут быть слабо сортированы, образуя по-прежнему фракцию отходов, которая является "несортированной", как используется в данном документе. В некоторых вариантах осуществления используют несортированные MSW, в которых более 15% по сухой массе представляют собой небиогенный материал, или более 18%, или более 20, или более 21, или более 22, или более 23, или более 24, или более 25%.

В практических способах по настоящему изобретению необходимо обеспечивать MSW с содержанием безводных веществ от 10 до 45%, или в некоторых вариантах осуществления от 12 до 40%, или от 13 до 35%, или от 14 до 30%, или от 15 до 25%. MSW, как правило, имеет в составе значительное количество воды. Как используется в данном документе, все другие твердые вещества, входящие в состав MSW, называют "безводные вещества". Уровень содержания воды, используемый в практических способах по настоящему изобретению, относится к нескольким взаимосвязанным переменным. С помощью способов по настоящему изобретению получают концентрированную биогенную суспензию. Как будет легко понятно специалисту в данной области техники, способность переводить твердые компоненты в состояние концентрированной суспензии повышается с повышением содержания воды. Эффективное измельчение бумаги и картона, которые представляют собой значительную долю типичных MSW, как правило, улучшается, если содержание воды повышено. Кроме того, как хорошо известно из уровня техники, вещества с ферментативной активностью могут проявлять пониженную активность, если гидролиз проводят при условиях с низким содержанием воды. Например, целлюлазы, как правило, проявляют пониженную активность в гидролитических смесях с содержанием безводных веществ выше приблизительно 10%. В случае с целлюлазами, вызывающими разложение бумаги и картона, сообщали об практически линейной обратно пропорциональной зависимости между концентрацией субстрата и выходом в результате ферментативной реакции на грамм субстрата. См. Kristensen et al., 2009. Используя коммерчески доступные препараты на основе выделенных ферментов, оптимизированные для конверсии лигно-целлюлозной биомассы, в исследованиях полупромышленного масштаба наблюдали, что содержание безводных веществ может составлять вплоть до 15% без явных неблагоприятных воздействий.

В некоторых вариантах осуществления некоторый объем воды обычно должен быть добавлен к отходам для достижения соответствующего содержания безводных веществ. Например, при рассмотрении фракции несортированных бытовых отходов из Дании в табл. 1, в которой описан характерный состав несортированных MSW по данным Riber et al., (2009), "Chemical composition of material fractions in Danish household waste," Waste Management 29:1251. В Riber et al. охарактеризованы фракции компонентов бытовых отходов, полученных от 2220 домов в Дании за один день в 2001 году. Специалист в данной области техники легко поймет, что данный опубликованный состав является просто иллюстративным примером, применимым в поясняющих способах по настоящему изобретению. В примере, показанном в табл. 1, без какого-либо добавления объема воды перед умеренным нагреванием ожидают, что органическая разлагаемая фракция, содержащая отходы при производстве овощей, бумагу и отходы животноводства, будет иметь в среднем приблизительно 47% содержание безводных веществ, (абсолютный % безводных веществ)/(% по сырой массе) = $(7,15 + 18,76 + 4,23) / (31,08 + 23,18 + 9,88) = 47\%$ содержание безводных веществ. Добавление объема воды, соответствующее одному массовому эквиваленту фракции отходов, подвергающейся переработке, будет уменьшать содержание безводных веществ самих отходов до 29,1% $(58,2\% / 2)$, одновременно снижая содержание безводных веществ разлагаемого компонента до приблизительно 23,5% $(47\% / 2)$. Добавление объема воды, соответствующее двум массовым эквивалентам фракции отходов, подвергающейся переработке, будет уменьшать содержание безводных веществ самих отходов до 19,4% $(58,2\% / 3)$, одновременно снижая содержание безводных веществ разлагаемого компонента до приблизительно 15,7% $(47\% / 3)$.

Таблица 1. Итоговое распределение по массам фракций
отходов из Дании, 2001 год

Отходы по фракциям, 2004 год			Часть количества выраженная в виде абсолютного общему безводных 58,2%	общего отходов, вклад к содержанию веществ
Фракция отходов	Часть отходов в %	общего количества по сырой массе		
Отходы при производстве овощей (а)	31,08		7,15	
Бумажные отходы (b)	23,18		18,76	
Отходы животноводства (а)	9,88		4,23	
Пластмассовые отходы (с)	9,17		8,43	
Подгузники (а)	6,59		3,59	
Негорючие вещества (d)	4,05		3,45	
Металл (е)	3,26		2,9	
Стекло (f)	2,91		2,71	
Другое (g)	9,88		6,98	
Всего	100,00%		58,20%	

(а) Чистая фракция.

(b) Смесь из газет, журналов, рекламной печатной продукции, книг, конторской и чистой/использованной бумаги, бумажной и картонной тары, картона, картона с пластиком, картона с алюминиевой фольгой, использованного картона и кухонных салфеток.

(с) Смесь из мягкого пластика, пластиковых бутылок, другого жесткого пластика и не поддающегося рециркуляции пластика.

(d) Смесь из почвы, горных пород и т.д., золы, разновидностей керамики, наполнителя для кошачьих туалетов и других негорючих веществ.

(е) Смесь из алюминиевой тары, алюминиевой фольги, металлоподобной "бумаги", металлической тары и других металлических изделий.

(f) Смесь из бесцветного, зеленого, коричневого и другого стекла.

(g) Смесь из фракций 13 оставшихся материалов.

Специалист в данной области техники способен легко определить соответствующее количество содержания воды и при необходимости добавить воду к отходам в практических способах по настоящему изобретению. На практике, как правило, несмотря на некоторые различия в составе MSW, подвергающихся переработке, уместным является добавление воды исходя из сравнительного постоянного соотношения, в некоторых вариантах осуществления от 0,8 до 1,8 кг воды/кг MSW, или от 0,5 до 2,5 кг воды/кг MSW, или от 1,0 до 3,0 кг воды/кг MSW. В результате фактическое содержание безводных веществ в MSW при переработке может варьировать в подходящем диапазоне. В зависимости от способов, используемых для достижения ферментативного гидролиза, подходящий уровень содержания безводных веществ может варьировать.

Ферментативный гидролиз может достигаться при использовании ряда различных способов. В не-

которых вариантах осуществления ферментативный гидролиз может достигаться при использовании препаратов на основе выделенных ферментов. Используемый в данном документе термин "препарат на основе выделенных ферментов" относится к препарату, содержащему вещества с ферментативной активностью, которые были экстрагированы, выделены или иным способом получены из биологического источника и необязательно частично или высокоочищены.

Ряд различных веществ с ферментативной активностью может быть с успехом использован в практических способах по настоящему изобретению. С учетом, например, состава MSW, показанного в табл. 1, будет очевидно, что бумагосодержащие отходы составляют наибольший однородный компонент по сухой массе биогенного материала. Соответственно специалисту в данной области техники будет очевидно, что целлюлозоразлагающая активность в отношении типичных бытовых отходов будет особенно предпочтительной. В случае бумагосодержащих отходов целлюлозу предварительно перерабатывали и отделяли от ее естественного окружения в виде компонента лигноцеллюлозной биомассы в смеси с лигнином и гемицеллюлозой. Соответственно бумагосодержащие отходы можно преимущественно подвергать разложению при использовании сравнительно "простого" препарата на основе целлюлазы.

"Целлюлазная активность" относится к ферментативному гидролизу 1,4-В-D-гликозидных связей в целлюлозе. В препаратах на основе выделенных ферментов целлюлазы, полученных из бактериальных, грибных или других источников, вещество с целлюлазной активностью, как правило, содержит смесь из различных веществ с ферментативной активностью, включая эндоглюканызы и экзоглюканызы (также называемые целлобиогидролазами), которые, соответственно, катализируют эндо- и экзо-гидролиз 1,4-В-D-гликозидных связей наряду с В-глюкозидазами, которые гидролизуют олигосахаридные продукты, полученные в результате экзоглюканызного гидролиза, до моносахаридов. Полный гидролиз нерастворимой целлюлозы, как правило, требует синергического действия веществ с различными активностями.

На практике в некоторых вариантах осуществления может быть предпочтительным просто использование коммерчески доступных препаратов на основе выделенных целлюлаз, оптимизированных для конверсии лигноцеллюлозной биомассы, поскольку они легко доступны при сравнительно невысокой стоимости. Данные препараты особенно пригодны для практических способов по настоящему изобретению. Термин "оптимизированный для конверсии лигноцеллюлозной биомассы" относится к способу разработки продукта, в котором смеси ферментов выбирали и модифицировали с конкретной целью улучшения выходов при гидролизе и/или снижения расхода фермента при гидролизе предварительно обработанной лигноцеллюлозной биомассы до сбраживаемых сахаров.

Однако коммерческие смеси целлюлаз, оптимизированные для гидролиза лигноцеллюлозной биомассы, как правило, содержат высокие уровни дополнительных и специфических веществ с ферментативной активностью. Например, определяли содержание веществ с ферментативной активностью, присутствующих в коммерчески доступных препаратах на основе целлюлаз, оптимизированных для конверсии лигноцеллюлозной биомассы, предоставляемых NOVOZYMETM под торговыми марками CELLIC STEC2TM и CELLIC STEC3TM, а также в подобных препаратах, поставляемых GENENCORTM под торговой маркой ACCELLERASE 1500TM, и обнаружили, что каждый из данных препаратов содержал вещество с эндоксилазной активностью выше 200 ед./г, ксилозидазной активностью при уровнях выше 85 ед./г, В-L-арабинофуранозидазной активностью при уровнях выше 9 ед./г, аминоксидооксидазной активностью при уровнях выше 15 ед./г и а-амилазной активностью при уровнях выше 2 ед./г.

Более простые препараты на основе выделенных целлюлаз могут также эффективно быть использованы в практических способах по настоящему изобретению. Подходящие препараты на основе целлюлаз можно получить при помощи способов, хорошо известных из уровня техники, из ряда микроорганизмов, включая аэробные и анаэробные бактерии, грибы белой гнили, грибы мягкой гнили и анаэробные грибы. Как описано в ссылке 13, R. Singhanian et al., "Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases," *Enzyme and Microbial Technology* (2010) 46:541-549, которая явным образом включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, организмы, продуцирующие целлюлазы, как правило, продуцируют смесь различных ферментов в соответствующих пропорциях, что, таким образом, делает их подходящими для гидролиза лигноцеллюлозных субстратов. Предпочтительные источники препаратов на основе целлюлаз, применимых для конверсии лигноцеллюлозной биомассы, включают грибы таких видов, как *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Aspergillus* и *Phanerochaete*.

Дополнительно к веществам с целлюлазной активностью некоторые дополнительные вещества с ферментативной активностью, которые могут оказаться предпочтительными в практических способах по настоящему изобретению, включают ферменты, которые воздействуют на пищевые отходы, такие как протеазы, глюкоамилазы, эндоамилазы, протеазы, пектин-эстеразы, пектин-лиазы и липазы, а также ферменты, которые воздействуют на отходы растениеводства, такие как ксиланазы и ксилозидазы. В некоторых вариантах осуществления может быть преимущественным включение в состав других веществ с ферментативной активностью, таких как ламинаразы, кататиназы или лакказы.

В некоторых вариантах осуществления выбранные микроорганизмы, которые проявляют внеклеточную целлюлазную активность, можно непосредственно инокулировать при проведении параллельного ферментативного гидролиза и микробиологической ферментации, включая без ограничения любой

один или несколько следующих термофильных, целлюлолитических организмов, которые могут быть инокулированы отдельно или в комбинации с другими организмами, *Paenibacillus barcinonensis*, см. Asha et al., 2012, *Clostridium thermocellum*, см. Blume et al. 2013 and Lv and Yu 2013, выбранные виды *Streptomyces*, *Microbispora* и *Paenibacillus*, см. Eida et al., 2012, *Clostridium straminisolvans*, см. Kato et al., 2004, виды *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* и *Bacteroidetes*, см. Maki et al., 2012, *Clostridium clariflavum*, см. Sasaki et al., 2012, новые виды *Clostridiales*, филогенетически и физиологически родственные *Clostridium thermocellum* и *Clostridium straminisolvans*, см. Shiratori et al., 2006, *Clostridium clariflavum* sp. nov. и *Clostridium Caenicola*, см. Shiratori et al., 2009, *Geobacillus Thermoleovorans*, см. Tai et al., 2004, *Clostridium stercoarium*, см. Zverlov et al., 2010, или любой один или несколько из термофильных грибов *Sporotrichum thermophile*, *Scytalidium thermophilum*, *Clostridium straminisolvans* и *Thermonospora curvata*, Kumar et al., 2008 для обзора. В некоторых вариантах осуществления организмы, проявляющие другие полезные внеклеточные ферментативные активности, могут быть инокулированы для содействия параллельному ферментативному гидролизу и микробиологической ферментации, например протеолитическими и кератинолитическими грибами, см. Kowalska et al., 2010, или молочнокислые бактерии, проявляющие внеклеточную липазную активность, см. Meyers et al., 1996.

Ферментативный гидролиз может быть осуществлен при помощи способов, хорошо известных из уровня техники, с использованием одного или нескольких препаратов на основе выделенных ферментов, включая любой один или несколько из ряда препаратов на основе ферментов, в том числе любой из таких, которые были упомянуты ранее или, в качестве альтернативы, путем инокулирования процесса переработки MSW одним или несколькими выбранными организмами, способными оказывать влияние на требуемый ферментативный гидролиз. В некоторых вариантах осуществления ферментативный гидролиз может быть осуществлен с использованием эффективного количества одного или нескольких препаратов на основе выделенных ферментов, содержащих вещества с целлюлазной, В-глюкозидазной, амилазной и ксиланазной активностями. Количество представляет собой "эффективное количество" в том случае, если при использовании в совокупности препарата на основе ферментов достигается растворимость по меньшей мере 40% по сухой массе разлагаемого биогенного материала, присутствующего в MSW, в течение времени реакции гидролиза 18 ч при используемых условиях. В некоторых вариантах осуществления используют один или несколько препаратов на основе выделенных ферментов, в которых в совокупности относительные пропорции веществ с ферментативной активностью являются следующими: смесь веществ с ферментативной активностью используют так, чтобы 1 FPU целлюлазной активности ассоциировалась с по меньшей мере 31 СМС ед. эндоглюканазной активности, и так, чтобы 1 FPU целлюлазной активности ассоциировалась по меньшей мере с 7 pNPG ед. бета-глюкозидазной активности. Специалисту в данной области техники будет понятно, что СМС ед. относится к единицам карбоксиметилцеллюлозы. Одна СМС ед. активности высвобождает 1 мкмоль редуцирующих сахаров (выраженных в эквивалентах глюкозы) за одну минуту в специфических условиях анализа 50°C и pH 4,8. Специалисту в данной области техники будет понятно, что pNPG ед. относится к pNPG единицам. Одна pNPG ед. активности высвобождает 1 мкмоль нитрофенола в минуту из пара-нитрофенил-В-D-глюкопиранозиды при 50°C и pH 4,8. Далее специалисту в данной области техники будет понятно, что FPU "единиц фильтровальной бумаги" представляет показатель целлюлазной активности. Как используется в данном документе, FPU относится к единицам фильтровальной бумаги, определяемым при помощи способа по Adney B. and Baker J., Laboratory Analytical Procedure #006, "Measurement of cellulase activity", August 12, 1996, the USA National Renewable Energy Laboratory (NREL), который включен в данный документ в качестве ссылки во всей своей полноте.

В практических вариантах осуществления по настоящему изобретению предпочтительным может быть регулирование температуры MSW перед запуском ферментативного гидролиза. Как хорошо известно из уровня техники, целлюлазы и другие ферменты, как правило, проявляют активность в оптимальном температурном диапазоне. Несмотря на то, что достоверно известны примеры ферментов с оптимальными температурами порядка 60 или даже 70°C, выделенных из экстремально термофильных организмов, оптимальные для ферментов температурные диапазоны, как правило, находятся в диапазоне от 35 до 55°C. В некоторых вариантах осуществления ферментативный гидролиз осуществляют в пределах температурного диапазона от 30 до 35°C, или от 35 до 40°C, или от 40 до 45°C, или от 45 до 50°C, или от 50 до 55°C, или от 55 до 60°C, или от 60 до 65°C, или от 65 до 70°C, или от 70 до 75°C. В некоторых вариантах осуществления является предпочтительным осуществление ферментативного гидролиза и параллельной микробиологической ферментации при температуре по меньшей мере 45°C, поскольку это является предпочтительным в ограничении роста MSW-переносимых патогенов. См., например, Hartmann and Ahring 2006; Déportes et al., 1998; Carrington et al., 1998; Bendixen et al., 1994; Kubler et al., 1994; Six and De Baerre et al., 1992.

При ферментативном гидролизе с использованием целлюлазной активности целлюлозный материал, как правило, будет осахариваться. Соответственно при ферментативном гидролизе твердые отходы как осахариваются, так и оживаются, преобразовываясь таким образом из твердой формы в концентрированную суспензию.

Ранее способы переработки MSW с использованием ферментативного гидролиза для достижения

ожижения биогенных компонентов предусматривали необходимость нагревания MSW до значительно более высокой температуры, чем та, которая требуется для ферментативного гидролиза, в частности для достижения "стерилизации" отходов с последующим обязательным этапом охлаждения с приведением нагретых отходов к температуре, приемлемой для ферментативного гидролиза. В практических способах по настоящему изобретению достаточно того, чтобы MSW были просто приведены к температуре, приемлемой для ферментативного гидролиза. В некоторых вариантах осуществления может быть предпочтительным просто регулирование MSW до приемлемого содержания безводных веществ с использованием нагретой воды, подаваемой для приведения MSW к температуре, приемлемой для ферментативного гидролиза. В некоторых вариантах осуществления MSW нагревают либо путем добавления количества нагретой воды, либо пара, либо при помощи других способов нагревания в баке реактора. В некоторых вариантах осуществления MSW нагревают в баке реактора до температуры более 30°C, но менее 85°C, или до температуры 84°C или менее, или до температуры 80°C или менее, или до температуры 75°C или менее, или до температуры 70°C или менее, или до температуры 65°C или менее, или до температуры 60°C или менее, или до температуры 59°C или менее, или до температуры 58°C или менее, или до температуры 57°C или менее, или до температуры 56°C или менее, или до температуры 55°C или менее, или до температуры 54°C или менее, или до температуры 53°C или менее, или до температуры 52°C или менее, или до температуры 51°C или менее, или до температуры 50°C или менее, или до температуры 49°C или менее, или до температуры 48°C или менее, или до температуры 47°C или менее, или до температуры 46°C или менее, или до температуры 45°C или менее. В некоторых вариантах осуществления MSW нагревают до температуры не более чем на 10°C больше наивысшей температуры, при которой выполняют ферментативный гидролиз.

Используемые в данном документе MSW являются "нагретыми до температуры", при этом средняя температура MSW повышается в реакторе до данной температуры. Как используется в данном документе, температура, до которой нагревают MSW, представляет собой наивысшую среднюю температуру MSW, которой достигают в реакторе. В некоторых вариантах осуществления наивысшая средняя температура может не поддерживаться в течение всего периода. В некоторых вариантах осуществления тепловой реактор может содержать разные зоны, в результате чего нагревание происходит в этапах при различных температурах. В некоторых вариантах осуществления нагревание могут достичь с использованием того же реактора, в котором осуществляют ферментативный гидролиз. Целью нагревания является просто приведение большей части целлюлозосодержащих отходов и значительной части растительных отходов в состояние, оптимальное для ферментативного гидролиза. Для того, чтобы находиться в состоянии, оптимальном для ферментативного гидролиза, отходы в идеале должны иметь температуру и содержание воды, подходящие для веществ с ферментативной активностью, используемых для ферментативного гидролиза.

В некоторых вариантах осуществления может быть предпочтительным взбалтывание при нагревании для достижения равномерного нагревания отходов. В некоторых вариантах осуществления взбалтывание может включать смешивание свободным падением, такое как смешивание в реакторе с камерой, вращающейся в сущности по горизонтальной оси, или в смесителе с поворотной осью, поднимающей MSW, или в смесителе с горизонтальными валами или лопастями, поднимающими MSW. В некоторых вариантах осуществления взбалтывание может включать встряхивание, перемешивание или перемещение посредством шнекового транспортера. В некоторых вариантах осуществления взбалтывание продолжают после нагревания MSW до требуемой температуры. В некоторых вариантах осуществления взбалтывание осуществляют в течение от 1 до 5 мин, или от 5 до 10, или от 10 до 15, или от 15 до 20, или от 20 до 25, или от 25 до 30, или от 30 до 35, или от 35 до 40, или от 40 до 45, или от 45 до 50, или от 50 до 55, или от 55 до 60, или от 60 до 120 мин.

Ферментативный гидролиз запускают на этапе добавления препаратов на основе выделенных ферментов. В качестве альтернативы в том случае, если не добавляют препараты на основе выделенных ферментов, а вместо этого используют микроорганизмы, которые проявляют требуемые внеклеточные ферментативные активности, ферментативный гидролиз запускают на этапе добавления требуемых микроорганизмов.

В практических способах по настоящему изобретению ферментативный гидролиз осуществляют совместно с микробиологической ферментацией. Совместная микробиологическая ферментация может достигаться с использованием ряда различных способов. В некоторых вариантах осуществления микроорганизмам, присутствующим в естественных условиях в MSW, буквально позволяют развиваться в условиях реакции, если переработанные MSW ранее не нагревали до температуры, достаточной для эффекта "стерилизации". Как правило, микроорганизмы, присутствующие в MSW, будут включать организмы, адаптированные к местной окружающей среде. Основным благоприятным эффектом параллельной микробиологической ферментации является относительная надежность, означая, что очень широкий ряд различных организмов может в отдельности или в совокупности способствовать поглощению органических веществ посредством ферментативного гидролиза MSW. Не желая быть связанными теорией, полагают, что коферментирующие микроорганизмы в отдельности могут оказывать некоторое непосредственное воздействие на разложение пищевых отходов, которые необязательно гидролизуются ферментами цел-

люлазами. Вместе с тем мономеры и олигомеры углеводов, высвобождаемые при помощи гидролиза целлюлазой, в частности, с легкостью усваиваются фактически любыми видами микроорганизмов. Это создает полезный синергизм с ферментами целлюлазами, возможно, посредством высвобождения продукта, ингибирующего вещества с ферментативной активностью, а также, возможно, по другим причинам, которые не сразу становятся очевидными. Конечные продукты микробного метаболизма в любом случае являются, как правило, пригодными для получения субстратов биометана. Таким образом, обогащение микробными метаболитами ферментативно гидролизированных MSW уже само по себе представляет собой улучшение качества полученного в результате субстрата биометана. В частности, молочнокислые бактерии являются повсеместно распространенными в природе, и продуцирование молочной кислоты, как правило, наблюдается в том случае, если MSW ферментативно гидролизуются при содержании безводных веществ от 10 до 45% в пределах температурного диапазона 45-50. При более высоких температурах, возможно, могут доминировать другие виды микроорганизмов, встречающихся в естественных условиях, и могут стать более преобладающими другие микробные метаболиты, отличные от молочной кислоты.

В некоторых вариантах осуществления микробиологическая ферментация может быть выполнена путем прямой инокуляции с использованием одного или нескольких видов микроорганизмов. Специалисту в данной области техники будет понятно, что один или несколько видов бактерий, используемых для инокуляции, для обеспечения таким образом одновременного ферментативного гидролиза и ферментации MSW, могут быть предпочтительно выбраны в том случае, если вид бактерий способен размножаться при температуре, равной или близкой оптимальной для используемых веществ с ферментативной активностью.

Инокуляция гидролитической смеси для индуцирования микробиологической ферментации может быть выполнена при помощи ряда различных способов.

В некоторых вариантах осуществления может быть предпочтительным инокулирование MSW либо до, либо после, либо совместно с добавлением веществ с ферментативной активностью, или с добавлением микроорганизмов, которые проявляют внеклеточную целлюлазную активность. В некоторых вариантах осуществления может быть предпочтительным инокулирование с использованием одного или нескольких видов LAB, включая без ограничения любой один или несколько из следующих или их генетически модифицированных вариантов:

Lactobacillus plantarum, *Streptococcus lactis*,
Lactobacillus casei, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sake*,
Lactobacillus helveticus, *Lactobacillus jugurti*, *Lactobacillus fermentum*,
Lactobacillus carnis, *Lactobacillus piscicola*, *Lactobacillus coryniformis*,
Lactobacillus rhamnosus, *Lactobacillus maltaromicus*, *Lactobacillus pseudoplantarum*,
Lactobacillus agilis, *Lactobacillus bavaricus*, *Lactobacillus alimentarius*,
Lactobacillus uamanashiensis, *Lactobacillus amylophilus*, *Lactobacillus farciminis*,
Lactobacillus sharpeae, *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus alactosus*,
Lactobacillus paracasei, *Lactobacillus homohiochii*, *Lactobacillus sanfrancisco*,
Lactobacillus fructivorans, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus ponti*, *Lactobacillus reuteri*,
Lactobacillus buchneri, *Lactobacillus viridescens*, *Lactobacillus confusus*,
Lactobacillus minor, *Lactobacillus kandleri*, *Lactobacillus halotolerans*, *Lactobacillus hilgardii*,
Lactobacillus kefir, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus vaccinostrictus*,
Lactobacillus delbrueckii, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus leichmanni*,
Lactobacillus acidophilus, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus salicinus*,
Lactobacillus gasseri, *Lactobacillus suebicus*, *Lactobacillus oris*, *Lactobacillus brevis*,
Lactobacillus vaginalis, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus panis*, *Lactococcus cremoris*,
Lactococcus dextranicum, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus hordniae*,
Lactococcus raffinolactis, *Streptococcus diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides*,
Leuconostoc dextranicum, *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc oenos*, *Leuconostoc paramesenteroides*,
Leuconostoc pseudoesenteroides, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc gelidum*,
Leuconostoc carnosum, *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus acidilactici*,
Pediococcus cerevisiae, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus halophilus*,
Pediococcus pentosaceus, *Pediococcus intermedius*, *Bifidobacterium longum*,
Streptococcus thermophilus, *Oenococcus oeni*, *Bifidobacterium breve* и
Propionibacterium freudenreichii,

которые характеризуются полезной интенсивностью в отношении метаболических процессов, при которых продуцируется молочная кислота.

Специалисту в данной области техники будет без труда понятно, что бактериальный препарат, используемый для инокуляции, может содержать сообщество различных организмов. В некоторых вариантах осуществления могут быть использованы встречающиеся в естественных условиях бактерии, которые существуют в любом определенном географическом регионе и которые адаптированы к размножению в MSW из этого региона. Как хорошо известно из уровня техники, LAB распространены повсеместно и будут, как правило, составлять основной компонент любого встречающегося в естественных условиях бактериального сообщества в пределах MSW.

В некоторых вариантах осуществления MSW может быть инокулирован встречающимися в естественных условиях бактериями путем непрерывной рециркуляции промывных вод или технологических растворов, используемых для извлечения остаточного органического материала из неразлагаемых твердых веществ. Поскольку промывные воды или технологические растворы подвергаются рециркуляции, постепенно в них достигаются более высокие уровни микроорганизмов. В некоторых вариантах осуществления микробиологическая ферментация характеризуется эффектом понижения pH, в особенности, если метаболиты включают короткоцепочечные карбоновые кислоты/жирные кислоты, такие как формат, ацетат, бутират, пропионат или лактат. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления может быть предпочтительным осуществлять контроль и регулирование pH смеси при параллельном ферментативном гидролизе и микробиологической ферментации. Если промывные воды или технологические растворы используют для повышения содержания воды в поступающих MSW до ферментативного гидролиза, то инокуляцию предпочтительно осуществляют перед добавлением веществ с ферментативной активностью либо в виде препаратов на основе выделенных ферментов, либо микроорганизмов, проявляющих внеклеточную целлюлазную активность. В некоторых вариантах осуществления встречающиеся в естественных условиях бактерии, адаптированные к размножению в MSW из определенного региона, можно культивировать в MSW или в оживленном органическом компоненте, полученном путем ферментативного гидролиза MSW. В некоторых вариантах осуществления культивируемые встречающиеся в естественных условиях бактерии далее могут быть добавлены в виде инокулята либо отдельно, либо в виде добавки для инокуляции с использованием рециркулированных промывных вод или технологических растворов. В некоторых вариантах осуществления бактериальные препараты могут быть добавлены до или вместе с добавлением препаратов на основе выделенных ферментов или после некоторого начального периода предварительного гидролиза.

В некоторых вариантах осуществления специфические штаммы можно культивировать для инокуляции, в том числе штаммы, которые модифицировали или "тренировали" для размножения в условиях реакции ферментативного гидролиза и/или усиления или ослабления конкретных метаболических процессов. В некоторых вариантах осуществления может быть предпочтительным инокулирование MSW, используя штаммы бактерий, которые были идентифицированы как способные к выживанию на фталатах в качестве источника одиночного углерода. Такие штаммы включают без ограничений любой один или несколько из следующих или их генетически модифицированных вариантов: *Chryseomicrobium intestinale* MW10T, *Lysinibacillus fusiformis* NBRC 157175, *Tropicibacter phthalicus*, *Gordonia* JDC-2, *Arthrobacter* JDC-32, *Bacillus subtilis* 3C3, *Comamonas testosteroni*, *Comamonas* sp E6, *Delftia tsuruhatensis*, *Rhodococcus jostii*, *Burkholderia cepacia*, *Mycobacterium vanbaalenii*, *Arthrobacter keyseri*, *Bacillus* sb 007, *Arthrobacter* sp. PNPX-4-2, *Gordonia* namibiensis, *Rhodococcus phenolicus*, *Pseudomonas* sp. PGB2, *Pseudomonas* sp. Q3, *Pseudomonas* sp. 1131, *Pseudomonas* sp. CAT1-8, *Pseudomonas* sp. Nitroreducens, *Arthrobacter* sp AD38, *Gordonia* sp CNJ863, *Gordonia rubripertinctus*, *Arthrobacter oxydans*, *Acinetobacter genomosp* и *Acinetobacter calcoaceticus*. См., например, Fukuhura et al., 2012; Iwaki et al., 2012A; Iwaki et al., 2012B; Latorre et al., 2012; Liang et al., 2010; Liang et al., 2008; Navacharoen et al., 2011; Park et al., 2009; Wu et al., 2010; Wu et al., 2011. Фталаты, используемые в качестве пластификаторов во многих коммерческих препаратах на основе поливинилхлорида, являются выщелачиваемыми продуктами и, как показывает практика, часто присутствуют в оживленном органическом компоненте на уровнях, которые являются нежелательными. В некоторых вариантах осуществления предпочтительно могут быть использованы штаммы, которые были генетически модифицированы при помощи способов, хорошо известных из уровня техники, таким образом, чтобы усилить метаболические процессы и/или ослабить другие метаболические процессы, включая без ограничения процессы, в результате которых происходит усвоение глюкозы, ксилоты или арабинозы.

В некоторых вариантах осуществления может быть предпочтительным инокулирование MSW с использованием бактериальных штаммов, которые идентифицировали как способные к расщеплению лигнина. Такие штаммы включают без ограничений любой один или несколько из следующих или их генетически модифицированных вариантов: *Comamonas* sp B-9, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter* sp FJ581023, *Pandorea norimbergensis*, *Amicolatopsis* sp ATCC 39116, *Streptomyces viridosporous*, *Rhodococcus jostii* и *Sphingobium* sp. SYK-6. См., например, Bandonas et al., 2011; Bugg et al., 2011; Chandra et al., 2011; Chen et al., 2012; Davis et al. 2012. Как показывает практика, MSW, как правило, содержит значительное количество лигнина, которое, как правило, выделяют в виде несброженного остатка после AD.

В некоторых вариантах осуществления может быть предпочтительным инокулирование MSW штаммами ацетат-продуцирующих бактерий, включая без ограничения любой один или несколько из следующих или их генетически модифицированных вариантов:

Acetitomaculum ruminis, *Anaerostipes caccae*,
Acetoanaerobium noterae, *Acetobacterium carbinolicum*, *Acetobacterium wieringae*,
Acetobacterium woodii, *Acetogenium kivui*, *Acidaminococcus fermentans*,
Anaerovibrio lipolytica, *Bacteroides coprosuis*, *Bacteroides propionificiens*,
Bacteroides cellulosolvens, *Bacteroides xylanolyticus*, *Bifidobacterium catenulatum*,
Bifidobacterium bifidum, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium angulatum*,
Bifidobacterium breve, *Bifidobacterium gallicum*, *Bifidobacterium infantis*,
Bifidobacterium longum, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Butyrivibrio fibrisolvens*,
Clostridium aceticum, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium acidurici*, *Clostridium*
bifermens, *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium*
cellobioparum, *Clostridium formicaceticum*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium*
lochheadii, *Clostridium methylpentosum*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium*
perfringens, *Clostridium propionicum*, *Clostridium putrefaciens*, *Clostridium*
sporogenes, *Clostridium tetani*, *Clostridium tetanomorphum*, *Clostridium*
thermocellum, *Desulfotomaculum orientis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*,
Eubacterium limosum, *Eubacterium ruminantium*, *Fibrobacter succinogenes*,
Lachnospira multiparus, *Megasphaera elsdenii*, *Moorella thermoacetica*, *Pelobacter*
acetylenicus, *Pelobacter acidigallici*, *Pelobacter massiliensis*, *Prevotella ruminicola*,
Propionibacterium freudenreichii, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminobacter*
amylophilus, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus bromii*, *Ruminococcus*
champanellensis, *Selenomonas ruminantium*, *Sporomusa paucivorans*, *Succinimonas*
amylolytica, *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Syntrophomonas wolfei*, *Syntrophus*
aciditrophicus, *Syntrophus gentianae*, *Treponema bryantii* и *Treponema primitia*.

В некоторых вариантах осуществления может быть предпочтительным инокулирование MSW с использованием штаммов бутират-продуцирующих бактерий, включая без ограничения любой один или несколько из следующих или их генетически модифицированных вариантов:

Acidaminococcus fermentans,
Anaerostipes caccae, *Bifidobacterium adolescentis*, *Butyrivibrio crossotus*,
Butyrivibrio fibrisolvens, *Butyrivibrio hungatei*, *Clostridium acetobutylicum*,
Clostridium aurantibutyricum, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium butyricum*,
Clostridium cellobioparum, *Clostridium difficile*, *Clostridium innocuum*, *Clostridium*
kluveri, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium*
proteoclasticum, *Clostridium sporosphaeroides*, *Clostridium symbiosum*, *Clostridium*
tertium, *Clostridium tyrobutyricum*, *Coprococcus eutactus*, *Coprococcus comes*,
Escherichia coli, *Eubacterium barkeri*, *Eubacterium bifforme*, *Eubacterium*
cellulosolvens, *Eubacterium cylindroides*, *Eubacterium dolichum*, *Eubacterium*
hadrum, *Eubacterium halii*, *Eubacterium limosum*, *Eubacterium moniliforme*,
Eubacterium oxidoreducens, *Eubacterium ramulus*, *Eubacterium rectale*, *Eubacterium*
saburreum, *Eubacterium tortuosum*, *Eubacterium ventriosum*, *Faecalibacterium*
prausnitzii, *Fusobacterium prausnitzii*, *Peptostreptococcus vaginalis*,
Peptostreptococcus tetradius, *Pseudobutyrvibrio ruminis*, *Pseudobutyrvibrio*
xylanivorans, *Roseburia cecicola*, *Roseburia intestinalis*, *Roseburia hominis* и
Ruminococcus bromii.

В некоторых вариантах осуществления может быть предпочтительным инокулирование MSW, используя штаммы пропионат-продуцирующих бактерий, включая без ограничения любой один или не-

сколько из следующих или их генетически модифицированных вариантов:

Anaerovibrio lipolytica,
Bacteroides coprosuis, *Bacteroides propionificiens*, *Bifidobacterium adolescentis*,
Clostridium acetobutylicum, *Clostridium butyricum*, *Clostridium methylpentosum*,
Clostridium pasteurianum, *Clostridium perfringens*, *Clostridium propionicum*,
Escherichia coli, *Fusobacterium nucleatum*, *Megasphaera elsdenii*, *Prevotella*
ruminocola, *Propionibacterium freudenreichii*, *Ruminococcus bromii*, *Ruminococcus*
champanellensis, *Selenomonas ruminantium* и *Syntrophomonas wolfei*.

В некоторых вариантах осуществления может быть предпочтительным инокулирование MSW, используя штаммы этанол-продуцирующих бактерий, включая без ограничения любой один или несколько из следующих или их генетически модифицированных вариантов:

Acetobacterium carbinolicum,
Acetobacterium wieringae, *Acetobacterium woodii*, *Bacteroides cellulosolvens*,
Bacteroides xyloxyticus, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*,
Clostridium butyricum, *Clostridium cellobioparum*, *Clostridium lochheadii*,
Clostridium pasteurianum, *Clostridium perfringens*, *Clostridium thermocellum*,
Clostridium thermohydrosulfuricum, *Clostridium thermosaccharolyticum*,
Enterobacter aerogenes, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumonia*,
Lachnospira multiparus, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides*,
Paenibacillus macerans, *Pelobacter acetylenicus*, *Ruminococcus albus*,
Thermoanaerobacter mathranii, *Treponema bryantii* и *Zymomonas mobilis*.

В некоторых вариантах осуществления консорциум различных микроорганизмов, необязательно включающий различные виды бактерий и/или грибов, можно использовать для выполнения параллельной микробиологической ферментации. В некоторых вариантах осуществления подходящие микроорганизмы можно выбирать для обеспечения таким образом желаемого метаболического результата при запланированных условиях реакции, а затем инокулировать с высоким уровнем дозы для вытеснения таким образом встречающихся в природе штаммов. Например, в некоторых вариантах осуществления может быть предпочтительным инокулирование с помощью гомоферментативного продуцента лактата, поскольку это обеспечивает более высокий ожидаемый метановый потенциал полученного в результате субстрата биометана, чем такой, который может быть обеспечен гетероферментативным продуцентом лактата.

В некоторых вариантах осуществления ферментативный гидролиз и параллельную микробиологическую ферментацию осуществляют с помощью реактора для гидролиза, который обеспечивает взбалтывание смешиванием свободным падением, как описано в WO 2006/056838 и в WO 2011/032557.

После определенного периода ферментативного гидролиза и параллельной микробиологической ферментации MSW, при условии содержания безводных веществ от 10 до 45%, изменяются таким образом, что биогенные или "ферментируемые" компоненты становятся оживленными и в водной фазе происходит накопление микробных метаболитов. После определенного периода ферментативного гидролиза и параллельной микробиологической ферментации оживленные ферментируемые части отходов отделяют от неферментируемых твердых веществ. Сразу после отделения от неферментируемых твердых веществ оживленный материал представляет собой то, что называют "биожидкость". В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 40% безводных веществ данной биожидкости содержат растворенные летучие твердые вещества, или по меньшей мере 35%, или по меньшей мере 30%, или по меньшей мере 25%. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 25% по массе растворенных летучих твердых веществ в биожидкости содержат любую комбинацию из ацетата, бутирата, этанола, формиата, лактата и/или пропионата. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 70% по массе растворенных летучих твердых веществ содержат лактат, или по меньшей мере 60%, или по меньшей мере 50%, или по меньшей мере 40%, или по меньшей мере 30%, или по меньшей мере 25%.

В некоторых вариантах осуществления отделение неферментируемых твердых веществ от оживляемых ферментируемых частей MSW для получения таким образом биожидкости, отличающейся содержанием растворенных летучих твердых веществ, из которых по меньшей мере 25 мас.% содержат любую комбинацию из ацетата, бутирата, этанола, формиата, лактата и/или пропионата, осуществляют в течение менее 16 ч после запуска ферментативного гидролиза, или в течение менее 18 ч, или в течение менее 20 ч, или в течение менее 22 ч, или в течение менее 24 ч, или в течение менее 30 ч, или в течение менее 34 ч, или в течение менее 36 ч.

Отделение оживенных ферментируемых частей отходов от неферментируемых твердых веществ может достигаться при помощи ряда способов. В некоторых вариантах осуществления это может достигаться путем использования любой комбинации по меньшей мере из двух различных технологических операций разделения, включая без ограничений технологические операции с использованием шнекового пресса, технологические операции с использованием баллистического сепаратора, технологические операции с использованием вибрационного сита или другие технологические операции разделения, известные из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления неферментируемые твердые вещества, отделенные от ферментируемых частей отходов, содержат по меньшей мере приблизительно 20% по сухой массе MSW, или по меньшей мере 25%, или по меньшей мере 30%. В некоторых вариантах осуществления неферментируемые твердые вещества, отделенные от ферментируемых частей отходов, содержат по меньшей мере 20% по сухой массе рециркулируемых материалов, или по меньшей мере 25%, или по меньшей мере 30%, или по меньшей мере 35%. В некоторых вариантах осуществления при разделении с использованием по меньшей мере двух технологических операций разделения получают биожидкость, которая содержит по меньшей мере 0,15 кг летучих твердых веществ на кг переработанных MSW, или по меньшей мере 0,10. Специалисту в данной области техники будет без труда понятно, что характерный биогенный состав MSW является варьируемым. При этом количественный показатель 0,15 кг летучих твердых веществ на кг переработанных MSW выражает общее улавливание биогенного материала в типичных несортированных MSW в по меньшей мере 80%. Показатель кг летучих твердых веществ, уловленных в биожидкости на кг переработанных MSW, можно рассчитать в период времени, за который определяют общий выход и общее количество переработанных MSW.

В некоторых вариантах осуществления после отделения неферментируемых твердых веществ от оживенных ферментируемых частей MSW с получением биожидкости данная биожидкость может подвергаться вторичной ферментации при различных условиях, включая различную температуру или pH.

Используемый в данном документе термин "растворенные летучие твердые вещества" относится к простому значению измерения, которое рассчитывают следующим образом: образец биожидкости центрифугируют при 6900 g в течение 10 мин в 50 мл пробирке типа Falcon с получением осадка и надосадочной жидкости. Надосадочную жидкость сливают и сырую массу осадка выражают в виде доли в процентах от общей исходной массы образца жидкости. Образец надосадочной жидкости высушивают при 60° в течение 48 ч для определения содержания сухого вещества. Содержание летучих твердых веществ в образце надосадочной жидкости определяют путем вычитания из значения измерения содержания сухого вещества золы, оставшейся после сжигания в печи при 550°C, и выражают как процентное содержание по массе в виде растворенных летучих твердых веществ в %. Независимое значение измерения растворенных летучих твердых веществ определяют путем расчета, основанного на содержании летучих твердых веществ осадка. Долю осадка в виде сырой массы используют в качестве оценки в виде доли объемного соотношения нерастворенных твердых веществ от общего исходного объема. Содержание сухого вещества в осадке определяют путем высушивания при 60°C в течение 48 ч. Содержание летучих твердых веществ в осадке определяют путем вычитания из значения измерения содержания сухого вещества золы, оставшейся после сжигания в печи при 550°C. Содержание летучих твердых веществ в осадке корректируют с учетом поправки на оценочный вклад надосадочной жидкости, полученный путем $(1 \text{ доля осадка во влажном виде}) \times (\text{измеренный \% летучих твердых веществ в надосадочной жидкости})$. Из % общего содержания летучих твердых веществ, измеренного в исходных образцах жидкости, вычитают $(\% \text{ летучих твердых веществ осадка с поправкой}) \times (\text{оценка в виде доли объемного соотношения нерастворенных твердых веществ от общего исходного объема})$ с получением независимой оценки растворенных летучих твердых веществ в виде %. Большая из двух оценок используется для того, чтобы не завязать процентное содержание нерастворенных твердых летучих веществ, представленных бактериальными метаболитами.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает композиции и способы для получения биометана. Предшествующее подробное обсуждение в отношении вариантов осуществления способов переработки MSW можно необязательно использовать в отношении вариантов осуществления, предлагающих способы и композиции для получения биометана. В некоторых вариантах осуществления способ получения биометана включает этапы

(i) обеспечения органического жидкого субстрата биометана, предварительно подготовленного путем микробиологической ферментации таким образом, что по меньшей мере 40% по массе от содержания безводных веществ присутствуют в виде растворенных летучих твердых веществ, при этом растворенные летучие твердые вещества составляют по меньшей мере 25% по массе в виде любой комбинации из ацетата, бутирата, этанола, формиата, лактата и/или пропионата,

(ii) переноса жидкого субстрата в систему анаэробного сбраживания с последующим

(iii) осуществлением анаэробного сбраживания жидкого субстрата для получения биометана.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает органический жидкий субстрат биометана, который получают путем ферментативного гидролиза и микробиологической ферментации твердых бытовых отходов (MSW) или предварительно обработанной лигноцеллюлозной биомассы, в качестве альтернативы содержащий ферментативно гидролизованные и микробиологически

ферментированные MSW или содержащий ферментативно гидролизованную и микробиологически ферментированную предварительно обработанную лигноцеллюлозную биомассу, отличающийся тем, что по меньшей мере 40% по массе от содержания безводных веществ присутствуют в виде растворенных летучих твердых веществ, при этом растворенные летучие твердые вещества составляют по меньшей мере 25% по массе в виде любой комбинации из ацетата, бутирата, этанола, формиата, лактата и/или пропионата.

Используемый в данном документе термин "система анаэробного сбраживания" относится к ферментационной системе, содержащей один или несколько реакторов, работающих при контролируемых условиях аэрации, при этом в каждом из реакторов, входящих в систему, продуцируется газ метан. Газ метан продуцируется в таком объеме, что концентрация растворенного метана, образующегося метаболическим путем, в водной фазе ферментационной смеси в "системе анаэробного сбраживания" повышается при используемых условиях и газ метан выпускается из системы.

В некоторых вариантах осуществления "система анаэробного сбраживания" представляет собой систему на основе фильтров с неподвижной загрузкой. "Система анаэробного сбраживания на основе фильтров с неподвижной загрузкой" относится к системе, в которой консорциум для анаэробного сбраживания является иммобилизованным, необязательно в пределах биопленки или на физической матрице-подложке.

В некоторых вариантах осуществления жидкий субстрат биометана содержит по меньшей мере общее содержание твердых веществ 8%, или по меньшей мере общее содержание твердых веществ 9%, или по меньшей мере общее содержание твердых веществ 10%, или по меньшей мере общее содержание твердых веществ 11%, или по меньшей мере общее содержание твердых веществ 12%, или по меньшей мере общее содержание твердых веществ 13%. "Общее содержание твердых веществ", как используется в данном документе, относится как к растворимым, так и к нерастворимым твердым веществам и фактически означает "содержание безводных веществ". Общее содержание твердых веществ определяют путем высушивания при 60°C до получения постоянной массы.

В некоторых вариантах осуществления микробиологическую ферментацию осуществляют при условиях, которые препятствуют продуцированию метана метан-продуцирующими бактериями, например при pH менее 6,0, или при pH менее 5,8, или при pH менее 5,6, или при pH менее 5,5. В некоторых вариантах осуществления жидкий субстрат биометана содержит растворенный метан в меньших насыщающих концентрациях. В некоторых вариантах осуществления жидкий субстрат биометана содержит менее 15 мг/л растворенного метана, или менее 10 мг/л, или менее 5 мг/л.

В некоторых вариантах осуществления до анаэробного сбраживания с получением биометана один или несколько компонентов растворенных летучих твердых веществ могут быть удалены из жидкого субстрата биометана при помощи перегонки, фильтрации, электродиализа, специфического связывания, осаждения и других способов, хорошо известных из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления этанол или лактат могут быть удалены из жидкого субстрата биометана до анаэробного сбраживания с получением биометана.

В некоторых вариантах осуществления твердый субстрат, такой как MSW или волокнистая фракция из предварительно обработанной лигноцеллюлозной биомассы, подвергают ферментативному гидролизу одновременно с микробиологической ферментацией для получения таким образом жидкого субстрата биометана, предварительно подготовленного путем микробиологической ферментации таким образом, что по меньшей мере 40% по массе от содержания безводных веществ присутствуют в виде растворенных летучих твердых веществ, при этом растворенные летучие твердые вещества составляют по меньшей мере 25% по массе в виде любой комбинации из ацетата, бутирата, этанола, формиата, лактата и/или пропионата. В некоторых вариантах осуществления жидкий субстрат биометана с упомянутыми выше свойствами получают путем параллельного ферментативного гидролиза и микробиологической ферментации оживленного органического материала, полученного из несортированных MSW при помощи способа автоклавирования. В некоторых вариантах осуществления предварительно обработанная лигноцеллюлозная биомасса может быть смешана с ферментативно гидролизованными и микробиологически ферментированными MSW необязательно таким способом, чтобы вещество с ферментативной активностью из биожиidкости, полученной из MSW, обеспечивало ферментативную активность для гидролиза лигноцеллюлозного субстрата с получением состава на основе жидкого субстрата биометана, полученного как из MSW, так и из предварительно обработанной лигноцеллюлозной биомассы.

"Мягкая лигноцеллюлозная биомасса" относится к растительной биомассе, за исключением древесины, содержащей целлюлозу, гемицеллюлозу и лигнин. Можно использовать любую подходящую мягкую лигноцеллюлозную биомассу, в том числе такие виды биомассы, как по меньшей мере пшеничная солома, кукурузная солома, стержни кукурузных початков, пустые пучки плодов, рисовая солома, овсяная солома, ячменная солома, солома канолы, ржаная солома, сорго, сорго сахарное, соевая солома, просо, свинорой пальчатый и другие травы, багасса, жом сахарной свеклы, волокна кукурузы или их любые комбинации. Лигноцеллюлозная биомасса может включать другие лигноцеллюлозные материалы, такие как бумага, газетная бумага, картон или другие бытовые или канцелярские отходы. Лигноцеллюлозную биомассу можно использовать в виде смеси материалов, источником которых являются различные исходное сырье, она может быть свежей, частично высушенной, полностью высушенной или их любой

комбинацией. В некоторых вариантах осуществления в способах по настоящему изобретению на практике используют по меньшей мере приблизительно 10 кг сырья из биомассы, или по меньшей мере 100, или по меньшей мере 500 кг.

Лигноцеллюлозную биомассу в целом необходимо подвергнуть предварительной обработке при помощи способов, известных из уровня техники, до проведения ферментативного гидролиза и микробиологической подготовки. В некоторых вариантах осуществления биомассу подвергают предварительной обработке при помощи гидротермической предварительной обработки. "Гидротермическая предварительная обработка" относится к применению воды или в виде горячей жидкости, водяного пара или пара под давлением, включая жидкость либо пар при высокой температуре либо и то и другое для "приготовления" биомассы при температурах 120°C или выше либо с добавлением кислот или других химических веществ, либо без добавления. В некоторых вариантах осуществления сырье из лигноцеллюлозной биомассы предварительно обрабатывают при помощи автогидролиза. "Автогидролиз" относится к способу предварительной обработки, в котором уксусная кислота, высвобождаемая путем гидролиза гемицеллюлозы во время предварительной обработки, дополнительно катализирует гидролиз гемицеллюлозы и применяется в любой гидротермической предварительной обработке лигноцеллюлозной биомассы, осуществляемой при pH от 3,5 до 9,0.

В некоторых вариантах осуществления лигноцеллюлозная биомасса, предварительно обработанная гидротермальным способом, может быть разделена на жидкую фракцию и твердую фракцию. "Твердая фракция" и "жидкая фракция" относятся к фракционированию предварительно обработанной биомассы при разделении на жидкую/твердую фазу. Отделенная жидкость в общем смысле называется "жидкой фракцией". Остаточная фракция, имеющая в составе значительное количество нерастворимых твердых веществ, называется "твердая фракция". Как твердая фракция, так и жидкая фракция или обе вместе могут быть использованы для практических способов по настоящему изобретению или для получения композиций по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления твердая фракция может быть промыта.

Пример 1. Параллельная микробиологическая ферментация улучшает поглощение органических веществ с помощью ферментативного гидролиза несортированных MSW.

Реакции лабораторного масштаба проводили с образцом биожидкости, полученным в результате испытания, описанного в примере 5.

Экспериментальный субстрат на основе MSW для реакций лабораторного масштаба получали, используя свежие продукты, включающие органическую фракцию (определенную как целлюлозная фракция, фракции животного и растительного происхождения) твердых бытовых отходов (полученных, как описано у Jensen et al., 2010 основываясь на Riber et al., 2009).

Экспериментальный субстрат на основе MSW хранили в аликвотах при -20°C и подвергали оттаиванию в течение ночи при 4°C. Реакции выполняли в 50 мл пробирках для центрифугирования, и общий объем для реакции составлял 20 г. Добавляли экспериментальный субстрат на основе MSW до 5% сухого вещества (DM) (измеренного в виде содержания сухого вещества, оставшегося после 2 дней при 60°C).

Для гидролиза применяли целлюлазу Cellic CTec3 (VDNI0003, Novozymes A/S, Багсверд, Дания) (СТec3). Для установления и поддержания pH на уровне pH5 использовали цитратный буфер (0,05M), доводя до общего объема 20 г.

Реакционные смеси инкубировали в течение 24 ч на ротаторе Stuart SB3 (вращение при 4 об/мин), помещенном в печь (Binder GmbH, Туттлинген, Германия). Параллельно проводили реакцию с негативными контролями для оценки фонового высвобождения сухого вещества из субстрата при инкубации. После инкубации пробирки центрифугировали при 1350 g в течение 10 мин при 4°C. Затем сливали надосадочную жидкость, отбирали 1 мл для HPLC-анализа и оставшиеся надосадочную жидкость и осадок высушивали в течение 2 дней при 60°C. Массу высушенного материала регистрировали и использовали для расчета распределения сухого вещества. Конверсию DM в экспериментальном субстрате на основе MSW рассчитывали, исходя из данных чисел.

Концентрации органических кислот и этанола измеряли с помощью UltiMate 3000 HPLC (Thermo Scientific Dionex), оснащенного рефрактометрическим детектором (Shodex® RI-101) и ультрафиолетовым детектором, при 250 нм. Разделение проводили на колонке для разделения моносахаридов Rezex RHM (Phenomenex) при 80°C с 5 mM H₂SO₄ в качестве элюента и скоростью потока 0,6 мл/мин. Данные результаты анализировали с помощью программного обеспечения Chromeleon (Dionex).

Для оценки влияния параллельной ферментации и гидролиза 2 мл/20 г биожидкости, полученной в результате испытания, описанного в примере 5 (образцы отбирали 15 и 16 декабря), добавляли к реакционным смесям с или без СТec3 (24 мг/г DM).

Конверсия DM в MSW

Конверсию твердых веществ измеряли в виде содержания твердых веществ, определяемых в надосадочной жидкости в виде общего содержания сухого вещества в процентах. На фиг. 1 показана конверсия для контрольных MSW, препарата на основе выделенных ферментов, отдельно микробиологического инокулята и комбинации микробиологического инокулята и фермента. Данные результаты показывали, что результатом добавления EC12B из примера 5 являлась значительно более высокая степень конверсии

сухого вещества по сравнению с фоновым высвобождением сухого вещества в контрольной реакционной смеси (контрольные MSW Blank) (t-тест Стьюдента $p < 0,0001$). Параллельная микробиологическая ферментация, индуцированная путем добавления образца EC12B, и ферментативный гидролиз с помощью СТес3 в результате приводили к значительно более высокой степени конверсии сухого вещества в сравнении с реакционной смесью, гидролизованной только с помощью СТес3, и реакционными смесями, в которые добавляли только EC12B ($p < 0,003$).

HPLC-анализ глюкозы, лактата, ацетата и EtOH

Концентрации глюкозы и микробных метаболитов (лактат, ацетат и этанол), измеренные в надосадочной жидкости, показаны на фиг. 2. Как показано, поскольку материал, использованный для получения субстрата, никоим образом не являлся стерильным или его не нагревали для уничтожения бактерий, низкая фоновая концентрация данных веществ в экспериментальном контрольном образце MSW и содержание молочной кислоты предположительно являлись результатом жизнедеятельности бактерий, характерных для экспериментальных MSW. Влияние добавления СТес3 в результате приводило к повышению концентрации глюкозы и молочной кислоты в надосадочной жидкости. Наиболее высокие концентрации глюкозы и бактериальных метаболитов определяли в тех реакционных смесях, где биожидкость EC12B из примера 5 добавляли совместно с СТес3. Параллельная ферментация и гидролиз, таким образом, улучшают конверсию сухого вещества в экспериментальных MSW и повышают концентрацию бактериальных метаболитов в жидкостях.

Ссылочные материалы: Jacob Wagner Jensen, Claus Felby, Henning Jorgensen, Georg Ornskov Ronsch, Nanna Dreyer Norholm. Enzymatic processing of municipal solid waste. Waste Management. 12/2010; 30(12):2497-503.

Riber, C., Petersen, C., Christensen, T.H., 2009. Chemical composition of material fractions in Danish household waste. Waste Management 29, 1251-1257.

Пример 2. Параллельная микробиологическая ферментация улучшает поглощение органических веществ путем ферментативного гидролиза несортированных MSW.

Испытания проводили в специально сконструированном реакторе периодического действия, показанном на фиг. 3, с использованием несортированных MSW с целью подтверждения результатов, полученных в экспериментах лабораторного масштаба. В экспериментах проверяли влияние добавления инокулята микроорганизмов, содержащего биожидкость, полученную из бактерий в примере 3, для достижения параллельной микробиологической ферментации и ферментативного гидролиза. Испытания проводили с использованием несортированных MSW.

MSW, использованные для испытаний малого масштаба, являлись основной темой исследований и разработок в REnescience. Для того чтобы результаты испытаний имели ценность, отходы должны быть репрезентативными и воспроизводимыми.

Отходы собирали в Nomi I/S, Хольстебро в марте 2012 года. Отходы представляли собой несортированные твердые бытовые отходы (MSW) из соответствующей области. Отходы измельчали до размера 30×30 мм для использования в исследованиях малого масштаба и для сбора типичных образцов для исследований. План отбора образцов применяли в отношении измельченных отходов путем отбора части образцов измельченных отходов в 22-литровые ведра. Ведра хранили в морозильной камере при -18°C до использования. "Фактические отходы" состояли из восьми ведер собранных отходов. Содержимое этих ведер перемешивали и повторно отбирали образцы для того, чтобы удостовериться, что различие между повторностями являлось низким настолько, насколько это возможно.

Все образцы подвергали обработке в аналогичных условиях в отношении воды, температуры, вращения и механического воздействия. Использовали шесть камер, три с инокуляцией и три без инокуляции. Установленное содержание безводных веществ при исследовании доводили до содержания безводных веществ 15% путем добавления воды. Учитывали сухое вещество в материале для инокуляции для того, чтобы добавление свежей воды в камеры с инокулятом было меньшим. В каждую камеру добавляли 6 кг MSW, что соответствовало 84 г СТес3, коммерческого препарата целлюлазы, 2 л инокулята добавляли в камеру для инокуляции с соответствующим уменьшением добавленной воды.

В камере с инокулятом поддерживали pH на уровне 5,0, а в камере без инокулята - pH 4,2 путем соответственно добавления 20% NaOH для повышения pH и 72% H₂SO₄ для понижения pH. Более низкий уровень pH в камере без инокулята гарантировал, что собственные бактерии не будут расти. Ранее показывали, что при использовании применительно к гидролизу MSW препарата на основе ферментов СТес3 Тm разница в активности между pH 4,2 и 5,0 обнаружена не была. Реакция продолжалась при 50°C в течение 3 дней в экспериментальном реакторе, обеспечивающем постоянное перемешивание вращением.

По завершении реакции камеры опустошали, пропуская через сито, и получали биожидкость, содержащую оживленный материал, полученный путем параллельного ферментативного гидролиза и микробиологической ферментации MSW.

Определяли содержание сухого вещества (TS) и летучих твердых веществ (VS) с помощью способа определения сухого вещества (DM). Образцы сушили при 60°C в течение 48 ч. Использовали массу образца до и после высушивания для расчета DM, выраженного в процентах:

$$\text{DM (\%)} \text{ в образце } \frac{\text{Сухая масса образца}}{\text{Сырая масса (г)}} \times 100$$

Способ определения содержания летучих твердых веществ

Летучие твердые вещества рассчитывали и представляли в виде содержания DM в процентах, из которого вычитали содержание золы. Содержание золы в образце находили путем сжигания предварительно высушенного образца при 550°C в печи в течение минимум 4 ч. Затем содержание золы рассчитывали следующим образом (содержание золы в образце в процентах от сухого вещества):

$$\frac{\text{Масса золы в образце (г)}}{\text{Сухая масса образца (г)}} \times 100$$

содержание летучих твердых веществ в процентах:

(1-содержание золы в образце в процентах) × содержание DM в образце в процентах.

Полученные результаты показаны ниже. Как показано, более высокое общее содержание твердых веществ было получено в биожидкости, полученной в камерах с инокулятом, указывая на то, что параллельная микробиологическая ферментация и ферментативный гидролиз превосходили один лишь ферментативный гидролиз.

	Биожидкость			
	TS (кг)	VS (кг)		
Станд., с низким содержанием лактата	1,098	0,853		
Инокул., с высоким содержанием лактата	1,376	1,041		
Добавленный инокул., TS + VS	TS	VS		
Кг	0,228	0,17		
Получено				
	Биожидкость			
	TS (кг)	Ст. отклон.	VS (кг)	Ст. отклон.
Станд., с низким содержанием лактата	1,098	0,1553	0,853	0,116
Инокул., с высоким содержанием лактата	1,148	0,0799	0,869	0,0799
содержанием лактата				
	Более, %		Более, %	
Станд., с низким содержанием лактата				
Инокул., с высоким содержанием лактата	4,5579		1,8429	

Суммарное количество полученных метаболитов (лактат, ацетат и этанол)			Более, %
Станд., сред.	92,20903	г/л	
Инокулят, сред.	342,6085	г/л	271,5564
Суммарное количество метаболитов (лактат, ацетат и этанол), "поглощенных"			Более, %
Станд., сред. (с низким содержанием лактата)	189,6075	г/л	
Инокулят, сред. (с высоким содержанием лактата)	461,6697	г/л	143,4871

Пример 3. Параллельная микробиологическая ферментация улучшает поглощение органических веществ путем ферментативного гидролиза несортированных MSW.

Эксперименты проводили на демонстрационной установке REnescience, размещенной в Центре переработки Амагер (ARC), Копенгаген, Дания. На схематическом изображении показаны основные элементы установки, как показано на фиг. 4. Основным направлением ARC REnescience Waste Refinery является сортировка MSW по четырем продуктам, биожидкость для получения биогаза, инертные отходы (стекло и песок) для рециркуляции, и фракции 2D и 3D из неорганических материалов, пригодные для получения RDF или для рециркуляции металлов, пластика и древесины.

MSW собирали из больших городов в пластиковых пакетах. MSW транспортировали в REnescience Waste Refinery, где его хранили в бункере до переработки. В зависимости от характера MSW этап сортирования может быть предусмотрен до системы REnescience для отбора частиц больше допустимого размера (более 600 мм).

Технология REnescience, которую испытывали в данном примере, включала три этапа.

Первый этап представляет собой умеренное нагревание (предварительную обработку, как показано на фиг. 4) MSW с помощью горячей воды до температур в диапазоне 40-75°C в течение 20-60 мин. Во время данного периода нагревания и смешивания раскрываются пластиковые пакеты и обеспечивается приемлемое измельчение разлагаемых компонентов с получением более однородной органической фазы перед добавлением ферментов. В период нагревания температуру и pH доводят до оптимальных для препаратов на основе выделенных ферментов, которые применяют для ферментативного гидролиза. Горячую воду можно добавлять в виде чистой водопроводной воды или в виде промывочной воды, используемой вначале в промывочных барабанах, а затем повторно поданной в реактор с умеренным нагреванием, как указано на фиг. 4.

Второй этап представляет собой ферментативный гидролиз и ферментацию (ожижение, как показано на фиг. 4). На втором этапе процесса REnescience добавляют ферменты и необязательно выбранные микроорганизмы. Ферментативное ожижение и ферментацию проводят непрерывно продолжительностью приблизительно 16 ч при оптимальных температуре и pH для эффективной работы фермента. С помощью данного гидролиза и ферментации происходит ожижение биогенной части MSW в биожидкость с высоким содержанием сухого вещества в окружении неразлагаемых материалов, pH контролируют путем добавления CaCO_3 .

Третий этап технологии REnescience, как осуществляется в данном примере, представляет собой этап разделения, в котором биожидкость отделяют от неразлагаемых фракций. Разделение осуществляют в баллистическом сепараторе, промывочных барабанах и гидравлических прессах. В баллистическом сепараторе происходит разделение MSW, обработанных ферментами, на биожидкость, 2D-фракцию из неразлагаемых материалов и 3D-фракцию из неразлагаемых материалов. 3D-фракция (физические трехмерные объекты, такие как консервные банки и пластиковые бутылки) не связывают значительные количества биожидкости, следовательно, однократного этапа промывки достаточно для очистки 3D-фракции. 2D-фракция (текстильные материалы и разновидности пленки в качестве примеров) связывают значительное количество биожидкости. Следовательно, 2D-фракцию отжимают с использованием шнекового пресса, промывают и снова отжимают для оптимального извлечения биожидкости и для получения "чистой" и сухой 2D-фракции. Инертный материал, который представляет собой песок и стекло, отсеивают от биожидкости. Воду, используемую во всех промывочных барабанах, можно повторно подавать, нагревать, а затем использовать как горячую воду на первом этапе для нагревания.

Эксперимент, подробно рассмотренный в данном примере, разделили на три секции, как показано в табл. 2.

Таблица 2

**Время (часы) Rodalon Водопроводная вода/промывочная вода
для умеренного нагревания**

27-68	+	водопроводная вода
86-124	-	водопроводная вода
142-187	-	промывочная вода

В 7-дневном исследовании несортированные MSW, полученные из Копенгагена, Дания, непрерывно загружали в количестве 335 кг/ч в демонстрационную установку REnescience. В реактор с умеренным нагреванием добавляли 536 кг/ч воды (водопроводная вода или промывочная вода), нагретой приблизительно до 75°C перед подачей в реактор с умеренным нагреванием. Тем самым температуру доводили приблизительно до 50°C в MSW, а pH доводили приблизительно до 4,5 путем добавления CaCO_3 .

В первой секции поверхностно-активное антибактериальное средство Rodalon™ (бензилалкиламмония хлорид) вносили в добавленную воду в количестве 3 г активного ингредиента на кг MSW.

В реактор для ожижения добавляли приблизительно 14 кг Cellic Ctec3 (коммерчески доступный препарат на основе целлюлазы от Novozymes) на тонну влажных MSW. Температуру сохраняли в диапазоне 45-50°C и регулировали pH в диапазоне 4,2-4,5 путем добавления CaCO_3 . Время удерживания фермента в реакторе составляло приблизительно 16 ч.

В системе разделения, состоящей из баллистического сепаратора, прессов и промывочных барабанов, данную биожидкость (ожиженный разлагаемый материал) отделяли от неразлагаемых материалов.

Промывочную воду избирательно либо сливали, регистрируя содержание органических веществ,

либо повторно подавали и повторно использовали для увлажнения поступающих MSW при умеренном нагревании. Повторная подача промывочной воды характеризовалась эффектом достижения бактериальной инокуляции при помощи организмов, размножающихся при условиях реакции 50°C, более высоких уровней, чем те, которые исходно присутствовали. В схеме используемого процесса повторно подаваемую промывочную воду сперва нагревали до приблизительно 70°C для того, чтобы привести поступающие MSW к температуре, подходящей для ферментативного гидролиза, в данном случае приблизительно 50°C. В частности, в случае молочнокислых бактерий было показано, что нагревание до 70°C обеспечивало отбор и "стимулирование" экспрессии генов тепловой устойчивости.

Образцы отбирали в определенные временные точки в следующих местах:

биожидкость, проходящая частое сито, которую назвали "EC12B";

биожидкость в резервуаре для хранения;

промывочная вода после сита для отделения сыворотки;

2D-фракция;

3D-фракция;

остаточная фракция инертных материалов из обеих устройств для промывки.

Выработку биожидкости измеряли с помощью тензометрических датчиков на резервуаре для хранения. Входящий поток свежей воды измеряли с помощью расходомеров, рециркулированные или слитые промытые отходы измеряли с помощью тензометрических датчиков.

Количество бактерий проверяли следующим образом: отобранные образцы биожидкости разбавляли 10-кратно в SPO (пептонно-солевом растворе) и 1 мл разбавленных образцов высевали методом глубинного посева на мясо-пептонном агаре (3,0 г/л мясного экстракта (Fluka, номер по каталогу B4888), 10,0 г/л триптона (Sigma, номер по каталогу T9410), 5,0 г/л NaCl (Merck, номер по каталогу 7647-14-5), 15,0 г/л агара (Sigma, номер по каталогу 9002-18-0). Чашки инкубировали при 50°C соответственно в аэробной и анаэробной среде. Анаэробное культивирование проходило в соответствующих контейнерах, где анаэробную среду сохраняли путем насыщения газом с помощью Anoxumat и помещения саше, создающих анаэробные условия (AnaeroGen от Oxoid, номер по каталогу AN0025A). Аэробные колонии подсчитывали через 16 ч и еще раз через 24 ч. Бактерии, растущие в анаэробных условиях, количественно оценивали через 64-72 ч.

На фиг. 5 показано общее содержание летучих твердых веществ в образцах биожидкости, полученных после EC12B, в виде кг на кг переработанных MSW. Точечные оценки получали в различных временных точках во время эксперимента с учетом каждого из трех отдельных периодов проведения эксперимента в виде отдельного периода времени. Таким образом, точечная оценка за период 1 (Rodalon) выражает соотношение балансов масс и потоков материалов за период 1. На фиг. 5 показано, что за период 1, который запускали после продолжительной остановки из-за трудностей на установке, общее содержание твердых веществ, поглощенных в биожидкости, неуклонно падало, указывая на слабый антибактериальный эффект Rodalon™. За период 2 общее содержание поглощенных твердых веществ возвращалось к незначительно более высоким уровням. За период 3 повторная подача воды обеспечивала эффективную "инокуляцию" поступающих MSW, при этом поглощение органических веществ в биожидкости, выраженное в кг VS/кг отходов, повышалось до значительно более высоких уровней, приблизительно 12%.

Для каждой из 10 временных точек, показанных на фиг. 5, отбирали образцы биожидкости (EC12B) и определяли с помощью HPLC общее содержание твердых веществ, общее содержание летучих твердых веществ, общее содержание растворенных летучих твердых веществ, а также концентрации предполагаемых бактериальных метаболитов, таких как ацетат, бутират, этанол, формиат и пропионат. Данные результаты, включая концентрации глицерина, показаны в табл. 3 ниже.

Таблица 3. Анализ образцов биожидкости

Время	Общее содержание твердых веществ	VS	Растворенные VS	Лактат	Муравьиная кислота	Ацетат	Пропионат	Этанол	Глицерин
часы	%	%	%	%	%	%	%	%	%
45	10,30	8,69	7,00	3,22	0,00	0,35	0,00	0,12	0,4165
53	9,77	8,22	6,62	3,00	0,00	0,42	0,00	0,17	0
63	9,31	7,74	6,07	2,74	0,09	0,41	0,03	0,17	0,415
67	8,66	7,15	5,54	2,82	0,00	0,39	0,03	0,20	0,475
88	9,57	7,97	6,02	3,24	0,00	0,31	0,04	0,13	0,554
116	10,57	8,90	6,77	3,27	0,01	0,25	0,00	0,11	0,5635
130	9,93	8,33	6,43	3,39	0,00	0,25	0,00	0,11	0
141	12,07	9,08	6,76	4,16	0,00	0,28	0,00	0,14	0,6205
159	11,30	8,68	6,33	4,63	0,00	0,31	0,00	0,11	0
166	11,04	8,17	5,72	4,50	0,00	0,32	0,03	0,12	0 646
181	11,76	8,75	6,11	5,48	0,12	0,37	0,00	0,11	1,38
188	11,20	8,05	6,20	5,40	0,00	0,40	0,00	0,11	0

В отношении образцов биожидкости, которые отбирали в каждой из десяти временных точек, на фиг. 6 показаны оба числа живых бактерий, определенные для бактерий, выращенных в аэробных условиях, а также процент массы "бактериальных метаболитов" (а именно сумма ацетата, бутирата, этанола, формиата и пропионата), в пересчете на процентное содержание растворенных летучих твердых веществ. Показано, что процент массы бактериальных метаболитов отчетливо возрастает с повышением бактериальной активности и ассоциируется с повышенным поглощением твердых веществ в биожидкости.

Пример 4. Идентификация микроорганизмов, принимающих участие в параллельной ферментации в примере 3.

Образцы биожидкости, полученные в примере 3, анализировали в отношении состава микроорганизмов.

Виды микроорганизмов, присутствующие в образце, идентифицировали путем сравнения последовательностей их генов, кодирующих 16S рРНК с последовательностями генов, кодирующих 16S рРНК, у хорошо изученных видов (референтные виды). Нормальная пороговая величина для идентификации видов составляет 97% подобие последовательности генов, кодирующих 16S рРНК, с референтным видом. Если подобие составляет менее 97%, то наиболее вероятно, это отличающийся вид.

Полученные в результате последовательности сравнивали с гомологичными последовательностями с использованием сервиса BlastN в базе данных NCBI. База данных содержит высококачественные последовательности длиной по меньшей мере 1200 п.о. и таксономически связанные с базой данных NCBI. Учитывали только BLAST-хиты с идентичностью $\geq 95\%$.

Полученные образцы биожидкости направляли непосредственно для анализа без замораживания перед экстракцией ДНК.

Всего идентифицировали 7 видов бактерий (фиг. 7) и 7 видов архей. В ряде случаев для видов бактерий не смогли установить подвид (*L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. sobrius*, *L. reuteri*, *L. frumenti*, *L. fer-*

mentum, L. fabifermentans, L. plantarum, L. pentosus).

Пример 5. Подробный анализ поглощения органических веществ при использовании параллельной микробиологической ферментации и ферментативного гидролиза несортированных MSW.

Демонстрационную установку REnescience, описанную в примере 1, использовали для проведения подробного изучения общего поглощения органических веществ при использовании параллельной бактериальной ферментации и ферментативного гидролиза несортированных MSW.

Мусор из Копенгагена характеризовали с помощью Esonet для определения его содержания.

Анализ отходов проводили для определения содержания и изменения. Крупный образец MSW доставляли в Esonet A/S, где проводили анализы отходов. Первичный образец уменьшали до подобразца приблизительно 50-200 кг. Данный подобразец сортировал специально обученный персонал на 15 различных фракций отходов. Устанавливали массу каждой фракции и рассчитывали распределение.

Таблица X. Общий состав отходов в (%), полученный в анализе, проведенном с помощью Esonet, при испытании в течение 300 ч

Образец:	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	Среднее значение	Среднеквадратичное отклонение
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
Полимерная упаковка	5,1	6,7	8,0	4,9	6,2	2,5	6,2	7,5	6,4	5,9	1,64
Полимерная пленка	10,8	8,6	10,7	7,9	10,1	7,8	8,8	8,5	9,5	9,2	1,13
Другой пластик	0,7	0,8	0,5	0,7	1,0	0,7	1,6	0,4	0,9	0,8	0,33
Металл	2,5	3,6	2,7	2,0	2,5	2,1	3,6	2,1	3,6	2,7	0,68
Стекло	0,2	0,0	0,5	0,6	0,6	0,0	0,6	0,4	0,0	0,3	0,27
Дворовые отходы	0,7	3,5	1,9	1,8	0,9	2,7	0,6	4,5	2,8	2,1	1,33
WEEE (элементы питания и т.д.)	0,7	0,1	0,6	0,4	0,7	0,8	1,1	0,1	0,5	0,6	0,33
Бумага	14,8	8,3	13,3	8,8	10,5	5,6	10,2	12,6	12,4	10,7	2,86
Полимерная и картонная упаковка	10,4	21,4	11,9	8,6	11,0	6,7	10,7	11,8	13,9	11,8	4,13
Пищевые отходы	19,8	15,6	25,9	27,6	26,3	24,5	24,5	23,3	18,0	22,8	4,09

Подгузники	8,0	10,3	6,9	18, 8	8,1	25,1	15,2	10, 1	14,0	12,9	6,00
Использованная бумага	8,5	6,7	7,3	7,4	8,5	8,6	7,9	5,7	6,3	7,4	1,03
Отсев	9,7	2,5	4,2	2,1	4,5	4,7	2,7	7,0	4,9	4,7	2,40
Другие горючие вещества	2,0	0,9	0,8	1,2	1,8	0,7	0,7	2,2	0,8	1,2	0,61
Другие негорючие вещества	6,2	11,1	5,0	7,3	7,2	7,6	5,6	3,7	6,2	6,7	2,07
Всего	100	100	100	10 0	100	100	100	10 0	100	100,0	

Состав отходов, изменяющийся время от времени и представленный в табл. 2, является результатом анализа отходов, полученных с различными образцами, отобранными за 300 ч. Наибольшее изменение наблюдали в следующих фракциях: подгузники, полимерная и картонная упаковка, а также пищевые отходы, которые все являются фракциями, влияющими на содержание органического материала, который может быть поглощен.

За весь процесс "испытания 300 ч" среднее значение "поглощенного" биологически разлагаемого материала, выраженное в кг VS на кг переработанных MSW, составляло 0,156 кг VS/кг поступивших MSW.

Репрезентативные образцы биожидкости отбирали в различные временные точки в процессе эксперимента, если установка пребывала в устойчивом режиме работы. Образцы анализировали с помощью HPLC и определяли содержание летучих твердых веществ, содержание твердых веществ и содержание растворенных твердых веществ, как описано в примере 3. Результаты показаны в табл. 4 ниже.

Таблица 4. Анализ образцов биожидкости

Время	Общее содержание твердых веществ	VS	Растворенные VS	Муравьиная кислота	Лактат	Ацетат	Пропионат	Этанол	Глицерин
часы	%	%	%	%	%	%	%	%	%
212	10,45	8,36	5,95	0,00	5,36	0,46	0,03	0,46	0,82
239	10,91	8,64	5,85	0,00	6,08	0,33	0,00	0,33	0,77
264,5	11,35	8,82	6,25	0,00	4,97	0,49	0,00	0,49	1,06
294	10,66	8,48	5,60	0,08	3,37	0,39	0,00	0,39	0,55

Пример 6. Идентификация микроорганизмов, принимающих участие в параллельной ферментации в примере 5.

Образец биожидкости "EC12B" отбирали во время испытания, описанного в примере 5, 15 и 16 декабря 2012 года, и хранили при -20°C для проведения анализа 16S рДНК для идентификации микроорганизмов в образце. Анализ 16S рДНК широко используется для идентификации и филогенетического анализа прокариот на основе компонента 16S малой рибосомальной субъединицы. Замороженные образцы направляли в сухом льду в GATC Biotech AB, Солна, Швеция, где проводили анализ 16S рДНК (GATC Biotech). Анализ включал следующие этапы: экстрагирование геномной ДНК, приготовление библиотеки ампликонов путем использования пары универсальных праймеров, перекрывающих гипервариабельные участки V1-V3 27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG/534R: ATTACCGCGGCTGCTGG; длиной 507 п.о.,

ПЦР-мечение адаптерами GS FLX, секвенирование в устройстве Genome Sequencer FLX с получением числа чтений на образец 104000-160000. Полученные в результате последовательности затем сравнивали с гомологичными последовательностями с использованием сервиса BlastN в базе данных rDNA из Ribosomal Database Project (Cole et al., 2009). База данных содержит высококачественные последовательности длиной по меньшей мере 1200 п.о. и таксономически связанные с базой данных NCBI. Текущая версия (RDP выпуск 10, обновлена 19 сентября 2012 года) содержит последовательности 9162 бактерий и 375 архей. Результаты, полученные при помощи BLAST, фильтровали для удаления коротких и низкокачественных хитов (идентичность последовательности $\geq 90\%$, покрытие при выравнивании $\geq 90\%$).

Всего было идентифицировано 226 различных бактерий.

Преобладающей бактерией в образце EC12B являлась *Paludibacter propionigenes* WB4, пропионат-продуцирующая бактерия (Ueki et al. 2006), которая составляла 13% от общего числа идентифицированных бактерий. Распределение 13 идентифицированных преобладающих бактерий (*Paludibacter propionigenes* WB4, *Proteiniphilum acetatigenes*, *Actinomyces europaeus*, *Levilinea saccharolytica*, *Cryptanaerobacter phenolicus*, *Sedimentibacter hydroxybenzoicus*, *Clostridium phytofermentans* ISDg, *Petrimonas sulfuriphila*, *Clostridium lactatifermentans*, *Clostridium caenicola*, *Garciaella nitratreducens*, *Dehalobacter restrictus* DSM 9455, *Marinobacter lutaoensis*) показано на фиг. 8.

Сравнение бактерий, идентифицированных на уровне рода, показало, что *Clostridium*, *Paludibacter*, *Proteiniphilum*, *Actinomyces* и *Levilinea* (все являются анаэробами) представляют приблизительно половину идентифицированного рода. Род *Lactobacillus* составляет 2% от идентифицированных бактерий. Преобладающая бактерия вида *P. propionigenes* WB4 принадлежит ко второму, наиболее преобладающему роду (*Paludibacter*) в образце EC12B.

Преобладающей патогенной бактерией в образце EC12B являлась *Streptococcus* spp., которая составляла 0,028% от общего числа идентифицированных бактерий. В биожидкости не выявляли каких-либо спорообразующих патогенных бактерий.

Streptococcus spp. представлял собой единственную патогенную бактерию, присутствующую в биожидкости из примера 5. *Streptococcus* spp. представляет собой бактерию с наивысшей устойчивостью к температурам (среди неспорообразующих) и D-значением, которое означает количество времени, необходимое для уменьшения количества живых клеток *Streptococcus* spp. при данной температуре в десять раз, при этом оно выше, чем у любых других патогенных бактерий по данным Déportes et al. (1998) в MSW. Данные результаты показывают, что условия, использованные в примере 5, пригодны для санирования MSW при разделении в процессе REnescience до уровня, на котором присутствовал лишь *Streptococcus* spp.

Соперничество между бактериями за питательные вещества и повышение температуры во время процесса будут значительно уменьшать число патогенных организмов и, как показано выше, устранять патогенные микроорганизмы, присутствующие в MSW, подвергнутых сортировке в процессе REnescience. Другие факторы, такие как pH, a_w , устойчивость к кислороду, CO₂, NaCl и NaNO₂, также оказывают влияние на рост патогенных бактерий в биожидкости. Взаимодействие между упомянутыми выше факторами может снизить время и температуру, необходимые для уменьшения количества живых клеток во время процесса.

Пример 7. Подробный анализ поглощения органических веществ при использовании параллельной микробиологической ферментации и ферментативного гидролиза несортированных MSW, полученных из отдаленных географических объектов.

Демонстрационную установку REnescience, описанную в примере 3, использовали для переработки MSW, ввезенных из Нидерландов. Установили, что MSW имели следующий состав.

Таблица Y. Общий состав отходов (5), подвергнутый анализу Econet во время теста van Gansewinkel

	%
Полимерная упаковка	5
Полимерная пленка	7
Другой пластик	2
Металл	4
Стекло	4
Дворовые отходы	4
WEEE (элементы питания и т.д)	1
Бумага	12
Картон	12
Подгузники	4
Использованная бумага	2
Другие горючие вещества	15
Другие негорючие вещества	5
Пищевые отходы	13
Отсев	9
Всего	100

Данный материал подвергали параллельному ферментативному гидролизу и микробиологической ферментации, как описано в примерах 3 и 5, и испытывали на установке в течение 3 дней. Отбирали и характеризовали образцы биожидкости, полученной в различные временные точки. Результаты показаны в табл. 5.

Таблица 5. Анализ биожидкости

Время	Общее содержание твердых веществ	VS	Растворенные VS	Лактат	Муравьиная кислота	Ацетат	Пропионат	Этанол	Глицерин
Часы	%	%	%	%	%	%	%	%	%
76	7,96	6,08	3,07	4,132	0,08	0,189	0	0,298	0,4205
95	9,19	6,99	6,66	6,943	0	0,352	0,034	0,069	0,6465

В отношении растворенных VS вносили поправку 9%, исходя из потери лактата при высушивании.

Пример 8. Получение биометана с использованием биожидкости, полученной в результате параллельной микробиологической ферментации и ферментативного гидролиза несортированных MSW.

Биожидкость, полученную в эксперименте, описанном в примере 5, замораживали в 20 л ведрах и хранили при -18°C для последующего использования. Данный материал испытывали в отношении получения биометана с использованием двух идентичных, хорошо подготовленных систем анаэробного сбраживания на основе фильтра с неподвижной загрузкой, содержащих консорциум микроорганизмов для анаэробного сбраживания в биопленке, иммобилизированной на фильтре-подложке.

Исходные образцы отбирали как из подаваемой жидкости, так и из жидкости внутри реактора. Концентрации летучих жирных кислот (VFA), полной химической потребности в кислороде (tCOD), химической потребности в кислороде (sCOD) и аммиака определяли с помощью кюветных тестов HACH LANGE в спектрофотометре DR 2800, а точную концентрацию VFA ежедневно определяли с помощью HPLC. Показатели TSVS также определяли с помощью гравиметрического способа.

Образцы газа для анализа GC отбирали ежедневно. Контроль скорости подачи проводили путем измерения объема свободного пространства над продуктом в питающем резервуаре, а также количества сточных вод, выходящих из реактора. Отбор образцов во время процесса проводили путем забора жидкости или сточных вод с помощью шприца.

Устойчивое получение биогаза наблюдали при использовании как одной, так и другой системы анаэробного сбраживания в течение 10 недель, что составляло от 0,27 до 0,32 л/г COD, или от R до Z л/г VS.

Затем прекращали подачу биожидкости в одну из двух систем и отслеживали возвращение к исходному уровню, как показано на фиг. 9. Устойчивый уровень получения газа показан горизонтальной линией, обозначенной цифрой 2. Временная точка, в которой прекращали подачу, показана в виде вертикальных линий, обозначенных цифрой 3. Показано, что после месяцев устойчивой работы оставался остаточный упругий материал, который превращался в течение периода, обозначенного между вертикальными линиями, обозначенными как цифры 3 и 4. Возвращение к исходному уровню или "снижение" показано в периоде после вертикальной линии, обозначенной цифрой 4. После периода на исходном уровне возобновляли подачу в точке, обозначенной вертикальной линией под цифрой 1. Возрастание до устойчивого состояния получения газа или "выход на рабочий режим" показано в периоде после вертикальной линии, обозначенной цифрой 1.

Параметры получения газа из биожидкости, в том числе "выход на рабочий режим" и "снижение" измеряли, как описано ниже.

Параметр	Единица измерения	Название образца
		300 часов, отходы из Амагер

Скорость подачи	л/день	1,85
Суммарная подача	Литр	3,7

Время выхода на рабочий режим*	Часы	15
Время снижения**	Часы	4
Время полного истощения***	Дни	4
Выработка газа в устойчивой фазе****	л/день	122
Общий объем полученного газа	л	244
CH ₄ , %	%	60
Общий выход	л газа/л поданной жидкости	66
Газ из легко перерабатываемых органических веществ	%	53
COD в подаваемой биожидкости	г/л	124
Полное COD в подаваемой биожидкости	г	459
Выход на единицу COD	л газа/г COD	0,53
Удельный выход на единицу COD	л CH ₄ /г COD	0,32
Массовый баланс COD	% COD в поданной биожидкости	96
COD/газ	г	418
COD/газ	%	91

*Время выхода на рабочий режим представляет собой время от первой подачи до того момента, когда прекращается повышение выработки газа и происходит стабилизация. Время выхода на рабочий режим указывает на уровень легко перерабатываемых органических веществ в подаваемой жидкости.

**Время снижения представляет собой время от последней подачи до того момента, когда прекращается резкое падение выработки газа. Время снижения показывает выработку газа из легко перерабатываемых органических веществ.

***Полное истощение представляет собой время после времени снижения до того момента, когда выработка газа полностью прекращается и происходит возвращение к исходному уровню. Время полного истощения показывает выработку газа из медленно перерабатываемых органических веществ.

****Внесена поправка для выработки газа на исходном уровне в 2 л/день.

Пример 9. Сравнительное получение биометана с использованием биожидкости, полученной в результате ферментативного гидролиза несортированных MSW с и без параллельной микробиологической ферментации.

Биожидкости с "высоким содержанием лактата" и "низким содержанием лактата", полученные в примере 2, сравнивали в отношении получения биометана с использованием системы анаэробного сбраживания на основе фильтра с неподвижной загрузкой, описанной в примере 8. Получали показатели и определяли время "выхода на рабочий режим" и "снижения", как описано в примере 8.

На фиг. 10 показаны характеристики "выхода на рабочий режим" и "снижения" при использовании биожидкости "с высоким содержанием лактата". Устойчивый уровень выработки газа показан горизонтальной линией, обозначенной цифрой 2. Временная точка, в которой начиналась подача газа, показана в виде вертикальных линий, обозначенных цифрой 1. Возрастание до устойчивого состояния выработки газа или "выход на рабочий режим" показано в периоде после вертикальной линии, обозначенной цифрой 1. Временная точка, в которой прекращали подачу, показана в виде вертикальной линии, обозначенной цифрой 3. Возвращение к исходному уровню или "снижение" показано в периоде после вертикальной линии, обозначенной цифрой 3, до периода с вертикальной линией, обозначенной цифрой 4.

На фиг. 11 показаны те же показатели для биожидкости с "низким содержанием лактата" с указанными точками, соответствующими описанным для фиг. 11.

Сравнительные параметры выработки газа из биожидкости "с высоким содержанием лактата" и

"низким содержанием лактата", включающие "выход на рабочий режим" и "снижение", измеренные, как описано, показаны ниже.

Разница во времени "выхода на рабочий режим"/"снижения" показывает разности в легкости биологического разложения. Биомассы, способные к наиболее быстрой биоконверсии, в итоге будут характеризоваться наиболее высокой общей скоростью конверсии органических веществ при использовании в получении биогаза. Более того, "более быстрые" субстраты биометана являются наиболее идеально подходящими для конверсии с помощью очень быстрых систем анаэробного сбраживания, таких как анаэробные реакторы на основе фильтра с неподвижной загрузкой.

Показано, что биожидкость с "высоким содержанием лактата" проявляет более быстрое время "выхода на рабочий режим" и "снижения" в получении биометана.

Параметр	Единица измерения	Название образца	
		Отходы с высоким содержанием лактата из Хольстебро	Контрольный образец отходов с низким содержанием лактата из Хольстебро
Скорость подачи	Л/день	1,0	1,0
Суммарная подача	Литр	2,83	3,95
Время выхода на рабочий режим*	Часы	16	48
Время снижения**	Часы	6	14
Время полного истощения***	Дни	2	2
Выработка газа в устойчивой фазе****	Л/день	59	40
Общий объем полученного газа	Л	115	140
CH ₄ , %	%	60	60
Общий выход	Л газа/Л поданной жидкости	41	35
Газ из легко перерабатываемых органических веществ	%	86	82
COD в подаваемой биожидкости	г/л	106	90
Полное COD в подаваемой биожидкости	г	300	356
Выход на единицу COD	л газа/г COD	0,38	0,39
Удельный выход на единицу COD	л CH ₄ /г COD	0,23	0,24
Массовый баланс COD	% COD в поданной биожидкости	91	95
COD/газ	г	197	240
COD/газ	%	66	68

*Время выхода на рабочий режим представляет собой время от первой подачи до того момента, когда прекращается повышение выработки газа и происходит стабилизация. Время выхода на рабочий режим указывает на уровень легко перерабатываемых органических веществ в подаваемой жидкости.

**Время снижения представляет собой время от последней подачи до того момента, когда прекращается резкое падение выработки газа. Время снижения показывает выработку газа из легко перерабаты-

ваемых органических веществ.

***Полное истощение представляет собой время после времени снижения до того момента, когда выработка газа полностью прекращается и происходит возвращение к исходному уровню. Время полного истощения показывает выработку газа из медленно перерабатываемых органических веществ.

***Внесена поправка для выработки газа на исходном уровне в 2 л/день.

Пример 11. Получение биометана с использованием биожидкости, полученной в результате параллельной микробиологической ферментации и ферментативного гидролиза пшеничной соломы, предварительно обработанной гидротермическим способом.

Пшеничную солому предварительно обрабатывали, разделяли на волоконную фракцию и жидкую фракцию, а затем волоконную фракцию отдельно промывали; 5 кг промытых волокон затем инкубировали в реакторе барабанного типа с горизонтальной осью вращения с дозой Cellic CTES3 и инокулятом ферментирующих микроорганизмов, входящих в состав биожидкости, полученной в примере 3. Пшеничную солому подвергали одновременному гидролизу и микробиологической ферментации в течение 3 дней при 50°C.

Затем данную биожидкость тестировали в отношении получения биометана с использованием системы анаэробного сбраживания на основе фильтра с неподвижной загрузкой, описанной в примере 8. Показатели были получены для времени "выхода на рабочий режим", как описано в примере 8.

На фиг. 12 показана характеристика "выхода на рабочий режим" для биожидкости из гидролизованной пшеничной соломы. Устойчивый уровень выработки газа показан горизонтальной линией, обозначенной цифрой 2. Временная точка, в которой запускали подачу, показана в виде вертикальных линий, обозначенных цифрой 1. Возрастание до устойчивого состояния выработки газа или "выход на рабочий режим" показано в периоде после вертикальной линии, обозначенной цифрой 1.

Параметры выработки газа из биожидкости из гидролизованной пшеничной соломы показаны ниже.

Показано, что предварительно обработанную лигноцеллюлозную биомассу можно с легкостью использовать для практических способов получения биогаза и для получения новых субстратов биометана по настоящему изобретению.

Параметр	Единица измерения	Название образца
		Гидролизат пшеничной соломы + биожидкость

Скорость подачи	Л/день	1
Суммарная подача	Литр	1,2

Время выхода на рабочий режим*	Часы	29
Время снижения**	Часы	Данные отсутствуют
Время полного истощения***	Дни	Данные отсутствуют
Выработка газа в устойчивой фазе****	л/день	56
Общий объем полученного газа	л	Данные отсутствуют
CH ₄ , %	%	60
Общий выход	л газа/л поданной жидкости	Данные отсутствуют
Газ из легко перерабатываемых органических веществ	%	Данные отсутствуют
COD в подаваемой биожидкости	г/л	144
Полное COD в подаваемой биожидкости	г	173
Выход на единицу COD	л газа/г COD	Данные отсутствуют
Удельный выход на единицу COD	л CH ₄ /г COD	Данные отсутствуют
Массовый баланс COD	% COD в поданной биожидкости	Данные отсутствуют
COD/газ	г	Данные отсутствуют
COD/газ	%	Данные отсутствуют

*Время выхода на рабочий режим представляет собой время от первой подачи до того момента, когда прекращается повышение выработки газа и происходит стабилизация. Время выхода на рабочий режим указывает на уровень легко перерабатываемых органических веществ в подаваемой жидкости.

**Время снижения представляет собой время от последней подачи до того момента, когда прекращается резкое падение выработки газа. Время полного истощения показывает выработку газа из легко перерабатываемых органических веществ.

***Полное истощение представляет собой время после времени снижения до того момента, когда выработка газа полностью прекращается и происходит возвращение к исходному уровню. Время полного истощения показывает выработку газа из медленно перерабатываемых органических веществ.

****Внесена поправка для выработки газа на исходном уровне в 2 л/день.

Пример 12. Параллельная микробиологическая ферментация и ферментативный гидролиз MSW с использованием выбранных организмов.

Параллельные реакции микробиологической ферментации и ферментативного гидролиза с использованием специфической монокультуры бактерий осуществляли в лабораторном масштабе с использованием экспериментальных MSW (описано в примере 1) и следуя процедуре, описанной в примере 1. Условия реакции и дозировка фермента указаны в табл. 4.

Живые бактериальные штаммы *Lactobacillus amylophilus* (DSMZ № 20533) и *Propionibacterium acidipropionici* (DSMZ № 20272) (DSMZ, Брауншвейг, Германия, хранили при 4°C в течение 16 часов до использования) использовали как инокулянт для определения их влияния на конверсию сухого вещества в экспериментальных MSW с или без добавления СТесЗ. Основными метаболитами, которые они продуцировали, являлись молочная кислота и пропионовая кислота соответственно. Концентрацию данных метаболитов определяли с помощью процедуры HPLC (описанной в примере 1).

Поскольку *Propionibacterium acidipropionici* является анаэробом, то буфер, применяемый в реакциях, где использовали данный штамм, продували газообразным азотом и живую культуру инокулировали в реакционные пробирки внутри переносной анаэробной камеры (Atmos Bag, Sigma Chemical CO, Сент-Луис, Миссури, США), которую также продували газообразным азотом. Реакционные пробирки с *P. propionici* закрывали перед переносом в термостат. Реакционные смеси инокулировали 1 мл либо *P. propionici*, либо *L. amylophilus*.

Результаты, представленные в табл. 6, четко показывают, что образовывались ожидаемые метаболиты; пропионовую кислоту определяли в реакционных смесях, инокулированных *P. acidipropionici*, тогда как в контрольных образцах, содержащих экспериментальные MSW с или без СТес3, пропионовую кислоту не определяли. Концентрация молочной кислоты в контрольной реакционной смеси, в которую добавляли только экспериментальные MSW, была почти такой же, как и в реакционных смесях, в которые добавляли только *L. amylophilus*. Образование молочной кислоты в данной контрольной реакции приписывали бактериям, населяющим экспериментальные MSW. Ожидали некоторые бактерии из окружения, поскольку отдельные компоненты экспериментальных отходов являлись свежеполученными продуктами, замороженными, но без дополнительной стерилизации, с помощью какого-либо способа перед подготовкой экспериментальных MSW. Если *L. amylophilus* добавляли вместе с СТес3, то концентрация молочной кислоты фактически удваивалась (табл. 6).

Положительное влияние в отношении высвобождения DM в надосадочной жидкости после гидролиза было продемонстрировано в виде более высокой степени конверсии DM в реакционных смесях после добавления либо *L. amylophilus*, либо *P. propionici* в сочетании с СТес3 (30-33% повышение в сравнении с реакционными смесями, в которые добавляли только СТес3).

Таблица 6

Температура	pH	Организм	СТес3	Конверсия DM	Пропионовая кислота (г/л)	Молочная кислота (г/л)
30°C	7	<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	96 мг/г DM	17,0±1,0	6,2±1,8	
				40,8±2,2	3,7±0,09	
		Контрольные MSW	96 мг/г DM	21	Nd.	
				30,6	Nd.	
	6,2	<i>Lactobacillus amylophilus</i>	96 мг/г DM	19,7±2,2		8,4±0,8
				41,7±6,5		21,2±0,7
		Контрольные MSW	96 мг/г DM	21		10,3
				32		16,9

Культуры бактерий, которые испытывали в лабораторном масштабе отдельно или совместно с ферментативным гидролизом. Показаны температура, pH и доза СТес3 96 мг/г. Контрольные реакции с MSW в буфере с или без СТес3 выполняли в параллелях для оценки фона бактериальных метаболитов в реакции. (Показаны среднее значение и среднеквадратичное отклонение для 4 реакций, за исключением контрольных MSW, реакции с которыми были проведены отдельно).

Nd. Не определено, ниже предела детектирования.

Пример 13. Идентификация микроорганизмов, принимающих участие в параллельной ферментации в примере 7.

Образцы биожидкости "EC12B" и оборотной воды "EA02" отбирали при проведении испытания, описанного в примере 7 (образцы отбирали 21 и 22 марта). Образцы жидкости замораживали в 10% глицерине и хранили при -20°C с целью проведения анализа 16S рДНК для идентификации микроорганизмов, при этом данный анализ широко используют для идентификации и филогенетического анализа прокариот на основе компонента 16S малой рибосомальной субъединицы. Замороженные образцы направляли в сухом льду в GATC Biotech AB, Солна, Швеция, где проводили анализ 16S рДНК (GATC_Biotech). Анализ включал следующие этапы: экстрагирование геномной ДНК, приготовление библиотеки ампликонов путем использования пары универсальных праймеров, перекрывающих гипер-вариабельные участки V1-V3 27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG/534R: ATTACCGCGGCTGCTGG; длиной 507 п.о.), ПЦР-мечение адаптерами GS FLX, секвенирование в устройстве Genome Sequencer

FLX с получением числа чтений на образец 104000-160000. Полученные в результате последовательности далее сравнивали с гомологичными последовательностями с использованием сервиса BlastN в базе данных rDNA из Ribosomal Database Project (Cole et al., 2009). База данных содержит высококачественные последовательности длиной по меньшей мере 1200 п.о. и таксономически связанные с базой данных NCBI. Текущая версия (RDP выпуск 10, обновлена 19 сентября 2012 года) содержит последовательности 9162 бактерий и 375 архей. Результаты, полученные при помощи BLAST, фильтровали для удаления коротких и низкокачественных хитов (идентичность последовательности $\geq 90\%$, покрытие при выравнивании $\geq 90\%$).

В образцах EC12B-21/3, EC12B-22/3 и EA02B-21/3, EA02-22/3 всего было идентифицировано 452, 310, 785, 594 различных бактерий.

Данный анализ четко показал на уровне вида, что *Lactobacillus amylolyticus*, безусловно, являлась наиболее доминирующей бактерией, на долю которой приходилось от 26 до 48% всей детектированной микробиоты. Микробиота в образце EC12B являлась подобной; при сравнении данных от двух различных образцов распределение 13 преобладающих бактерий (*Lactobacillus amylolyticus* DSM 11664, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *indicus*, *Lactobacillus similis* JCM 2765, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* DSM 20072, *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus hamsteri*, *Lactobacillus parabuchneri*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus buchneri*) было практически таким же.

Образцы EA02 были подобны EC12B, несмотря на то, что *L. amylolyticus* являлась менее доминирующей. Распределение 13 преобладающих бактерий (*Lactobacillus amylolyticus* DSM 11664, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* DSM 20072, *Lactobacillus similis* JCM 2765, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *indicus*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Weissella ghanensis*, *Lactobacillus oligofermentans* LMG 22743, *Weissella beninensis*, *Leuconostoc gasicomitatum* LMG 18811, *Weissella soli*, *Lactobacillus paraplantarum*) было также подобно, за исключением присутствия или за исключением наличия *Pseudomonas extremaustralis* 14-3 среди 13 преобладающих видов бактерий. Данную *Pseudomonas*, обнаруженную в EA02 (21/3), ранее выделили из пруда временной передержки в Антарктике, и она способна продуцировать полигидроксиалканоат (ПГА) как из октаноата, так и из глюкозы (Lopez et al. 2009; Tribelli et al., 2012).

Сравнение результатов на уровне рода показало, что *Lactobacillus* составляла 56-94% бактерий, идентифицированных в образце. Кроме того, распределение бактерий рода являлось в высокой степени подобным между данными, полученными от двух образцов EC12B и EA02. Примечательно то, что в образцах EA02 рода *Weissella*, *Leuconostoc* и *Pseudomonas* присутствовали в значительной степени (1,7-22%), хотя в образце EC12B ($>0,1\%$) они были выявлены лишь в виде меньшей составляющей. *Weissella* и *Leuconostoc* принадлежат к порядку *Lactobacillales*, как и *Lactobacillus*.

Преобладающие патогенные бактерии в образцах EC12B и EA02, отобранных при проведении испытания, описанного в примере 7, составляли 0,281-0,539% и 0,522-0,592% соответственно от общего числа идентифицированных бактерий. Преобладающими патогенными бактериями в образцах EC12B были *Aeromonas* spp., *Bacillus cereus*, *Brucella* sp., *Citrobacter* spp., *Clostridium perfringens*, *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *Providencia* sp., *Salmonella* spp., *Serratia* sp., *Shigella* spp. и *Staphylococcus aureus*. В EC12B и EA02, описанных в примере 7, спорообразующие патогенные бактерии не выявляли. Общее число патогенных бактерий, идентифицированных как в EC12B, так и в EA02, со временем снижалось, фактически уменьшаясь в количестве от общего числа бактерий в EC12B за один день.

В Déportes et al. (1998) был сделан обзор известных патогенных микроорганизмов, присутствующих в MSW. Патогенные микроорганизмы, присутствующие в MSW, описанных в примерах 3, 5 и 7, показаны в табл. 5 (Déportes et al. (1998) и анализ 16S рДНК). Помимо патогенных микроорганизмов, описанных в Déportes et al. (1998), как *Proteus* sp., так и *Providencia* sp. были обнаружены в образцах EC12B и в EA02, отобранных при испытании, описанном в примере 7. В то время как *Streptococcus* spp. являлись единственными патогенными бактериями, присутствующими в биожидкости в примере 5, в данном примере они не присутствовали. Это указывает на то, что в EC12B и EA02 из примера 7 присутствует другое сообщество бактерий, которое может быть результатом соперничества между бактериями за питательные вещества, и незначительного понижения температуры во время процесса, которое будет способствовать росту другого сообщества бактерий.

Таблица 7. Обзор патогенных микроорганизмов, присутствующих в примерах 3, 5 и 7

Организм [□] Бактерия [□]	Температура [□]					Диапазон pH [□]		Минимальный уровень активности воды (aw·Min) [□]	Уровень биобезопасности [□]	Источники [□] Встречающиеся в MSW [□]	Ссылка на документ, где приведены условия роста [□]
	Оптимальная [□]	Максимальная (для роста) [□]	Бактерицидная [□]	Необходимое время (мин) [□]	Дозирование (мин) [□]	Мин. [□]	Макс. [□]				
<i>Aeromonas</i> sp. [□]	37 [□]	55 [□]	55 [□]	□	0,25 [□]	□	□	0,94 [□]	1-2 [□]	(Deportes, et al. 1998) [□]	Rouf and Rigney 1971, Spinks et al., 2006, Santos et al., 1994 [□]
<i>Bacillus cereus</i> [□]	37 [□]	50 [□]	95 [□]	10 [□]	□	4,8 [□]	9,3 [□]	0,951 [□]	2 [□]	(Deportes, et al. 1998) [□]	Lanciotti et al., 2001 [□]
<i>Brucella</i> sp. [□]	□	□	□	□	□	□	□	□	3 [□]	(Deportes, et al. 1998) [□]	□
<i>Citrobacter</i> sp. [□]	□	□	52,5 [□]	7 [□]	□	4-5 [□]	□	0,94 [□]	1-2 [□]	(Deportes, et al. 1998) [□]	Verrips and Kwaps, 1977, Smith and Bhagwat, 2013, Colavita et al., 2003 [□]
<i>Clostridium perfringens</i> [□]	37 [□]	50 [□]	61 [□]	23 [□]	□	5 [□]	8,5 [□]	0,95 [□]	2 [□]	(Deportes, et al. 1998) [□]	Jay, J.M., 1991 [□]
<i>Klebsiella</i> sp. [□]	□	□	55 [□]	□	0,5 [□]	<3 [□]	□	□	1-2 [□]	(Deportes, et al. 1998) [□]	□
<i>Salmonell</i> sp. [□]	37 [□]	45 [□]	55 [□]	2,5 [□]	□	3,7 [□]	9,5 [□]	0,94 [□]	2-3 [□]	(Deportes, et al. 1998) [□]	Jay, J.M., 1991, Spinks et al., 2006 [□]
<i>Serratia</i> sp. [□]	□	□	55 [□]	□	1,5 [□]	□	□	□	2 [□]	(Deportes, et al. 1998) [□]	Spinks et al., 2006 [□]
<i>Shigellae</i> spp. [□]	37 [□]	48 [□]	60 [□]	□	1 [□]	5 [□]	8 [□]	□	2-3 [□]	(Deportes, et al. 1998) [□]	Spinks et al., 2006 [□]
<i>Staphylococcus aureus</i> [□]	□	47,8 [□]	□	□	□	4 [□]	9 [□]	0,86 [□]	2 [□]	(Deportes, et al. 1998) [□]	Jay, J.M., 1991 [□]
<i>Streptococcus</i> spp. [□]	□	□	65 [□]	20 [□]	□	□	□	□	2 [□]	(Deportes, et al. 1998) [□]	Francis-A.E., 1959 [□]

Идентификация штаммов и депонирование в DSMZ

Образцы EA02 от 21 и 22 марта, полученные в результате испытания, описанного в примере 7, направляли для посева в Центр изучения биологической устойчивости Ново Нордиск (центр НН, Хорсхольм, Дания) с целью идентификации и получения монокультур выделенных бактерий. После поступления в центр NN образцы инкубировали в течение ночи при 50°C, затем высевали на различные чашки (GM17, триптиказо-соевый бульон и мясной экстракт (агар GM17: 48,25 г/л агара ml7), после 20 мин автоклавирования добавляли глюкозу до конечной концентрации 0,5%, триптиказо-соевый агар: 30 г/л триптиказо-соевый бульон, 15 г/л агара, мясной бульон (Statens Serum Institute, Копенгаген, Дания), добавляли 15 г/л агарозы и выращивали в аэробных условиях при 50°C.

Через один день чашки проверяли визуально и выбранные колонии пересевали штрихом на соответствующие чашки, а затем направляли в DSMZ для идентификации.

Следующие штаммы, выделенные из оборотной воды из EA02, были депонированы в депозитории для патентных процедур DMSZ, DSMZ, Брауншвейг, Германия.

Идентифицированные образцы

Идентификационный номер образца: 13-349 (*Bacillus safensis*), получен из (EA02-21/3), DSM 27312.

Идентификационный номер образца: 13-352 (*Brevibacillus brevis*), получен из (EA02-22/3), DSM 27314.

Идентификационный номер образца: 13-353 (*Bacillus subtilis* sp. *subtilis*), получен из (EA02-22/3), DSM 27315.

Идентификационный номер образца: 13-355 (*Bacillus licheniformis*), получен из (EA02-21/3), DSM 27316.

Идентификационный номер образца: 13-357 (*Actinomyces bovis*), получен из (EA02-22/3), DSM 27317.

Неидентифицированные образцы

Идентификационный номер образца: 13-351, получен из (EA02-22/3), DSM 27313.

Идентификационный номер образца: 13-362A, получен из (EA02-22/3), DSM 27318.

Идентификационный номер образца: 13-365, получен из (EA02-22/3), DSM 27319.

Идентификационный номер образца: 13-367, получен из (EA02-22/3), DSM 27320.

Ссылочные материалы:

Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., & Tiedje, J. M. (2009). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic acids research*, 37 (suppl 1), (D141-D145).

GATC_Biotech supporting material. Defining the Microbial Composition of Environmental Samples Using Next Generation Sequencing. Version 1.

Tribelli, P. M., Iustman, L. J. R., Catone, M. V., Di Martino, C., Reyale, S., Méndez, B. S., López, N. I. (2012). Genome Sequence of the Polyhydroxybutyrate Producer *Pseudomonas extremaustralis*, a Highly Stress-Resistant Antarctic Bacterium. *J. Bacteriol.* 194(9):2381.

Nancy I. López, N. I., Pettinari, J. M., Stackebrandt, E., Paula M. Tribelli, P. M., Pötter, M., Steinbüchel, A., Méndez, B. S. (2009). *Pseudomonas extremaustralis* sp. nov., a Poly(3-hydroxybutyrate) Producer Isolated from an Antarctic Environment. *Cur. Microbiol.* 59(5):514-519.

Варианты осуществления и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения объема формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ переработки твердых бытовых отходов (MSW) или несортированных MSW, включающий этапы

- (i) обеспечения MSW,
- (ii) ферментативного гидролиза биологически разлагаемых частей MSW с применением вещества с целлюлазной активностью параллельно с микробиологической ферментацией при температуре от 30 до 75°C, что в результате приводит к ожижению биологически разлагаемых частей отходов и накоплению микробных метаболитов с последующим
- (iii) отделением ожиженных, биологически разлагаемых частей отходов от биологически неразлагаемых твердых веществ в течение менее 36 ч после начала ферментативного гидролиза для получения биожидкости, в которой по меньшей мере 25% по массе от содержания безводных веществ присутствуют в виде растворенных летучих твердых веществ в виде любой комбинации из ацетата, бутирата, этанола, формиата, лактата и/или пропионата; при этом параллельную микробиологическую ферментацию осуществляют путем инокуляции MSW с применением одного или нескольких видов из группы, включающей молочнокислые бактерии, ацетат-продуцирующие бактерии, этанол-продуцирующие бактерии, пропионат-продуцирующие бактерии, бутират-продуцирующие бактерии или бактерии, присутствующие в MSW в естественных условиях.

2. Способ по п.1, где биожидкость на этапе (iii) подвергают анаэробному сбраживанию для получения биометана.

3. Способ по п.1 или 2, где отделения ожиженных, биологически разлагаемых частей отходов от биологически неразлагаемых твердых веществ достигают путем применения по меньшей мере двух технологических операций разделения, что является достаточным для получения биожидкости.

4. Способ по любому из предыдущих пунктов, где инокуляцию обеспечивают путем рециркуляции промывных вод или технологических растворов, применяемых для выделения остаточного органического материала из неразлагаемых твердых веществ.

5. Способ получения биометана, включающий следующие этапы:

- (i) обеспечение жидкого субстрата биометана, полученного путем параллельного ферментативного гидролиза с применением вещества с целлюлазной активностью и микробиологической ферментации твердых бытовых отходов (MSW) и/или несортированных MSW при температуре от 30 до 75°C, при этом параллельную микробиологическую ферментацию осуществляют путем инокуляции с применением одного или нескольких видов из группы, включающей молочнокислые бактерии, ацетат-продуцирующие бактерии, этанол-продуцирующие бактерии, пропионат-продуцирующие бактерии и бутират-продуцирующие бактерии, при котором по меньшей мере 25% по массе субстрата биометана от содержания безводных веществ присутствуют в виде растворенных летучих твердых веществ в виде любой комбинации из ацетата, бутирата, этанола, формиата, лактата и/или пропионата,
- (ii) подача жидкого субстрата в систему анаэробного сбраживания с последующим
- (iii) проведением анаэробного сбраживания жидкого субстрата для получения биометана.

6. Способ по любому из предыдущих пунктов, где содержание безводных веществ в твердых бытовых отходах составляет от 10 до 45%.

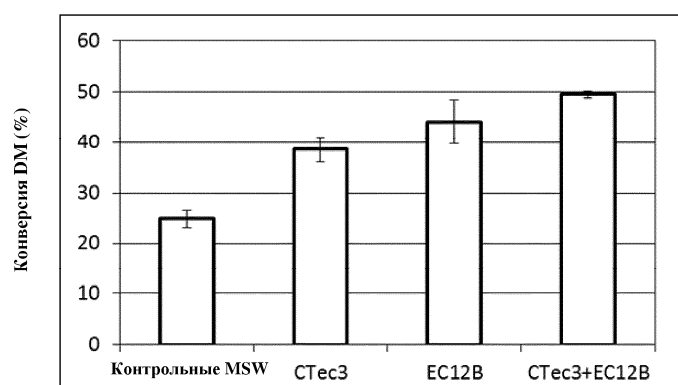
7. Способ по любому из предыдущих пунктов, где инокуляцию осуществляют до или параллельно с добавлением веществ с ферментативной активностью или с добавлением микроорганизмов, которые проявляют внеклеточную целлюлазную активность.

8. Способ по любому из предыдущих пунктов, где вещество с целлюлазной активностью добавляют (i) путем инокуляции с помощью выбранного микроорганизма, который проявляет внеклеточную целлюлазную активность, и/или (ii) в виде препарата на основе выделенных целлюлаз.

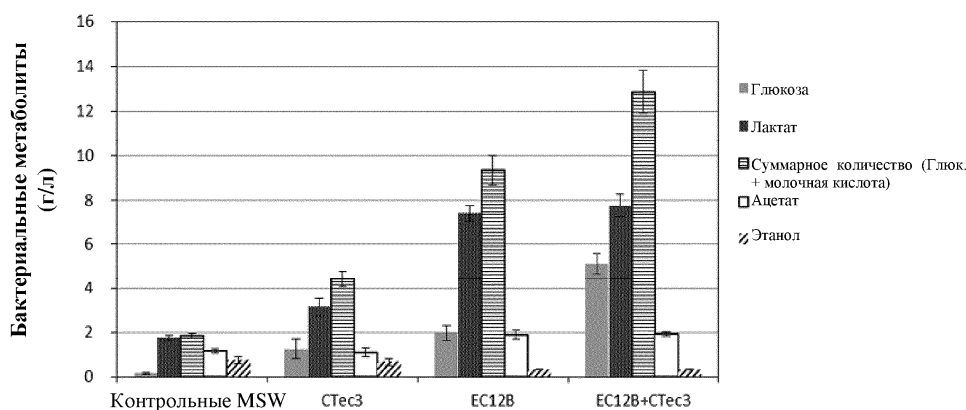
9. Способ по любому из предыдущих пунктов, где микробиологическую ферментацию осуществляют путем инокуляции с применением одного или нескольких видов молочнокислых бактерий.

10. Способ по любому из предыдущих пунктов, где ферментативный гидролиз и микробиологическая ферментация осуществляется в пределах температурного диапазона 45-50°C.

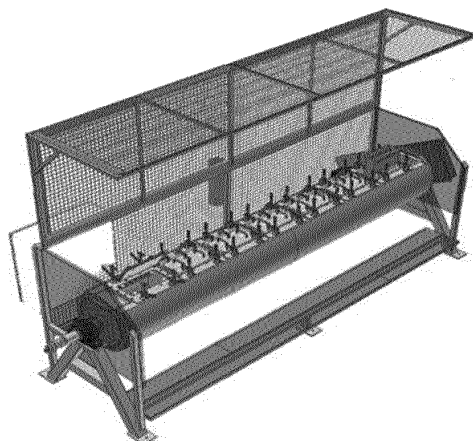
11. Способ по любому из предыдущих пунктов, где параллельные ферментативный гидролиз и микробиологическая ферментация осуществляются при pH менее 6,0.



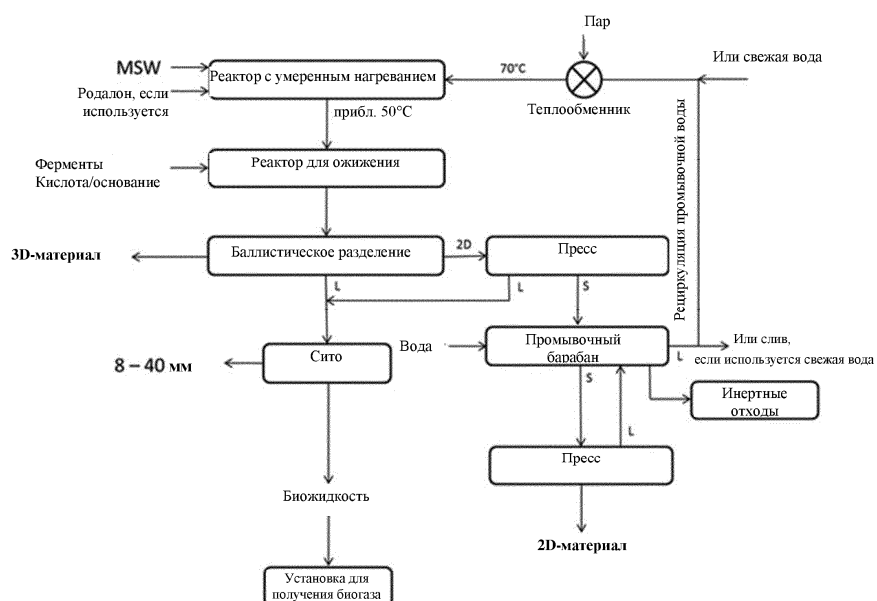
Фиг. 1. Конверсия сухого вещества, выраженного в виде сухого вещества, полученного в надосадочной жидкости, в виде общего содержания сухого вещества в процентах при параллельном ферментативном гидролизе и микробиологической ферментации, стимулируемых путем инокуляции биожидкости ЕС12В из примера 5



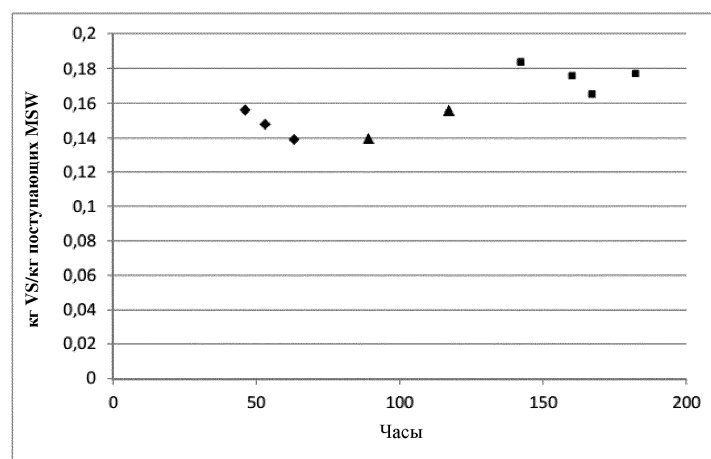
Фиг. 2. Бактериальные метаболиты, полученные в надосадочной жидкости, после параллельного ферментативного гидролиза и ферментации, индуцируемых путем добавления биожидкости из примера 5



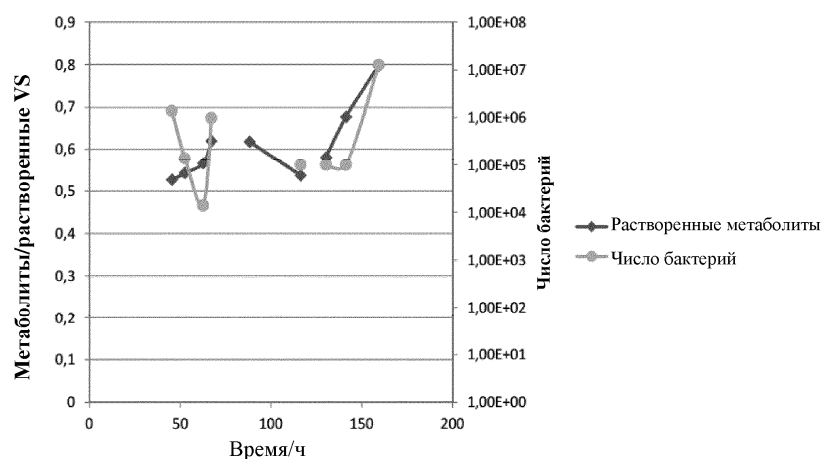
Фиг. 3. Графическое представление испытательного реактора REnescience



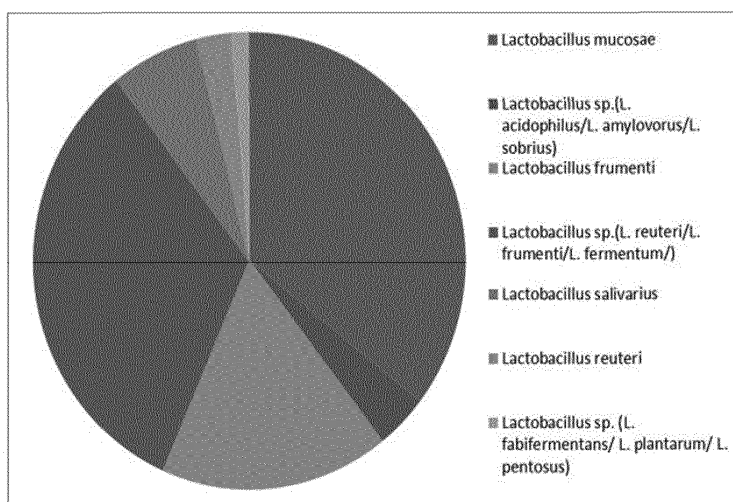
Фиг. 4. Схематическое изображение демонстрационной установки



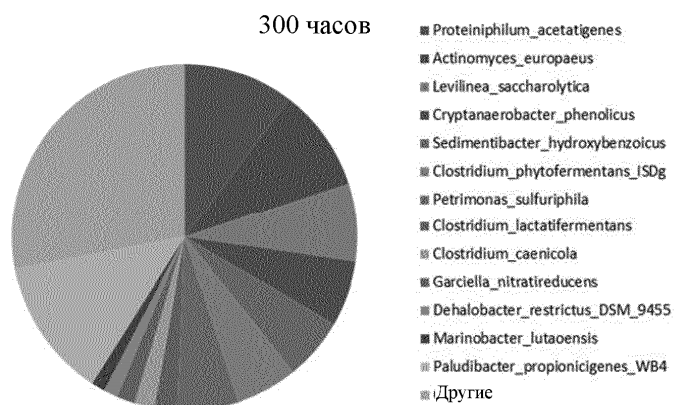
Фиг. 5. Поглощение органических веществ в биожидкости в различные периоды времени, выраженное в кг VS на кг переработанных MSW



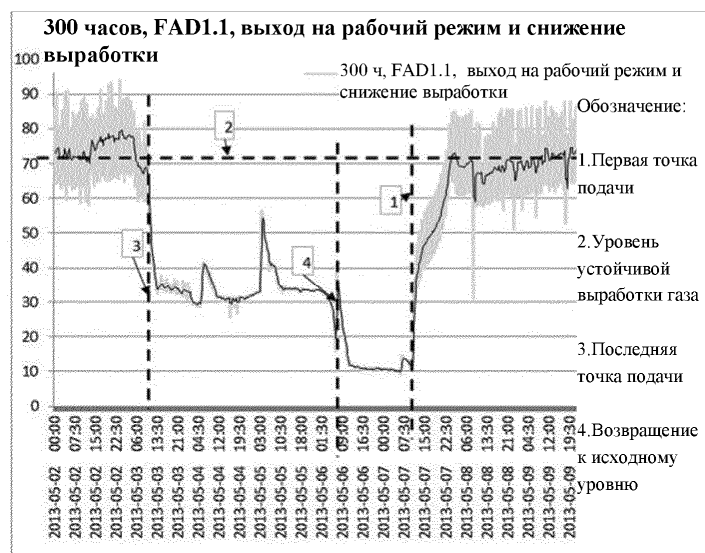
Фиг. 6. Бактериальные метаболиты, выраженные в виде процента растворенных VS в биожидкости, а также в виде числа аэробных бактерий в различные временные точки в эксперименте



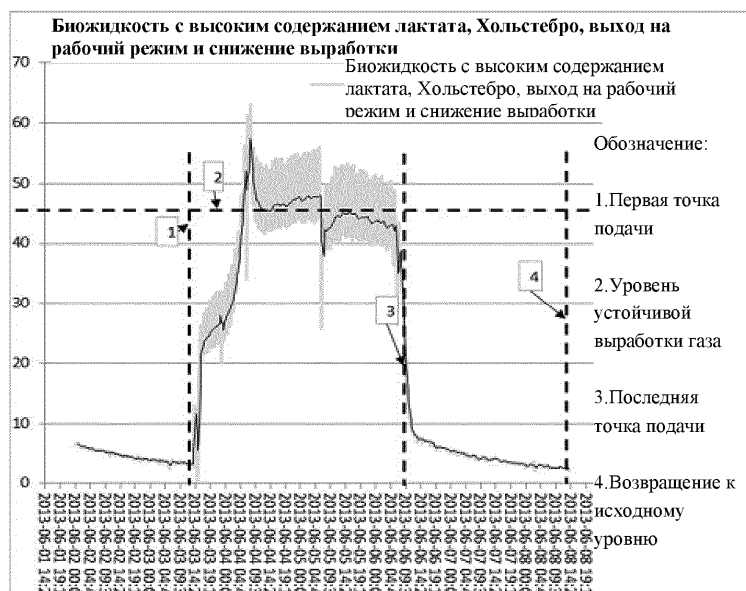
Фиг. 7. Распределение видов бактерий, идентифицированных в биожидкости из примера 3



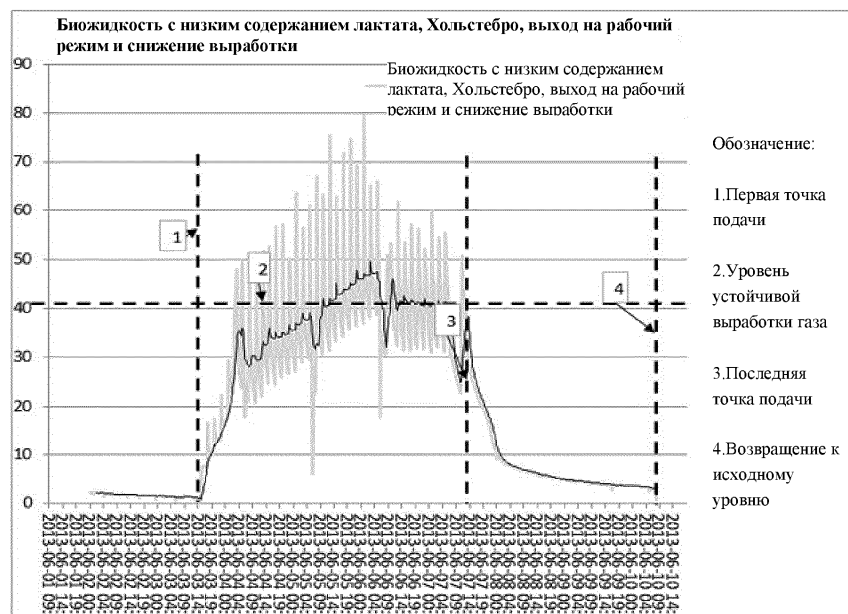
Фиг. 8. Распределение 13 преобладающих бактерий в EC12B, полученной при испытании, описанном в примере 5



Фиг. 9. Выход на рабочий режим и снижение выработки биометана при использовании биожиidкости из примера 5



Фиг. 10. Характеристика "выхода на рабочий режим" и "снижения" выработки биометана из биожиidкости "с высоким содержанием лактата" из примера 2



Фиг. 11. Характеристика "выхода на рабочий режим" и "снижения" выработки биометана из биожидкости "с низким содержанием лактата" из примера 2



Фиг. 12. Показывает характеристику "выхода на рабочий режим" выработки биометана из биожидкости из гидролизованной пшеничной соломы



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2