

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 040936

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2022.08.19

(21) Номер заявки  
201992758

(22) Дата подачи заявки  
2018.05.18

(51) Int. Cl. C12N 1/00 (2006.01)  
C12Q 1/00 (2006.01)  
C12P 7/00 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ ФЕРМЕНТАЦИИ МЕТАНА С ВЫСОКОЙ ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТЬЮ

(31) 62/603,181

(32) 2017.05.19

(33) US

(43) 2020.04.30

(86) PCT/US2018/033423

(87) WO 2018/213724 2018.11.22

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
МАНГО МАТИРИАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:  
Хайки Роберт Ф., Моурз Маргарет  
Кэтрин, Пьежа Эллисон Дж. (US)

(74) Представитель:  
Фелицына С.Б. (RU)

(56) US-A1-20130052681  
US-A1-20120077238  
US-A1-20150111265  
US-A1-20090317879  
US-A1-20140024872  
US-A1-20150140621

(57) Разработаны способы повышения производительности ферментеров в течение метаболического превращения метансодержащих газов в продукты, содержащие полигидроксиалканат, причем указанные продукты могут быть использованы, например, для получения корма для животных или биоразлагаемых полимерных изделий. Способы изобретения включают один или оба приема - уменьшение выделения тепла при росте популяции микроорганизмов и отведение тепла в ходе ферментации путем удаления диоксида углерода.

040936 B1

040936 B1

040936

B1

### **Ссылка на родственную заявку и приоритетный документ**

В этой заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/603181, поданной 19 мая, 2017.

### **Область техники, к которой относится изобретение**

Настоящее изобретение относится к высокопроизводительным способам ферментации метана под действием метанотрофов.

### **Уровень техники**

Ферментация метана метанотрофами хорошо известна. Существуют предположения для роста микроорганизмов на газе, содержащем метан, с образованием полигидроксиалканоатов (РНА) или с образованием белка с регулируемым содержанием РНА, например, для использования в качестве корма для животных или его компонента. Метан легко доступен из ископаемых источников, а также из биологических источников. Часто стоимость углерода метановых источников значительно меньше, чем углерода из других источников, таких как сахара. Способность метанотрофов превращать метан в полезные продукты путем ферментации открывает перспективы для экономических преимуществ. Кроме того, поскольку источники метаносодержащих газов могут быть возобновляемыми источниками, такими как биогаз и газ из органических отходов, появляются преимущества получения продуктов из быстро возобновляемых источников.

Полигидроксиалканоаты могут легко разлагаться под действием бактерий, и они практически нетоксичны. Таким образом, РНА предложены в качестве замены для экологически устойчивых пластиков. Некоторые исследования продемонстрировали, что присутствие РНА может быть оказывать полезный эффект на корм для рыб. Кроме того, РНА также может быть полезным компонентом, например, для экстрадированных или прессованных кормовых брикетов, изготовленных по рецептуре.

Продукты, содержащие полигидроксиалканоаты, получают путем метаболических процессов с использованием сахаров в качестве сырья (в том числе, сахара как таковые и крахмалы и целлюлозные материалы, которые могут превращаться в сахара за счет ферментативной активности). Сырьевые сахара обычно являются значительно более дорогими, чем газы, содержащие метан, и поэтому внимание привлекает такое сырье, как метан. Однако существуют проблемы при получении РНА-содержащих продуктов из газов, содержащих метан, так как метан имеет низкую растворимость в водных средах и во время биоконверсии метана метанотрофы выделяют много тепла. Таким образом, в традиционных биологических процессах получения РНА из метана поддерживается низкая плотность метанотрофов в водном бульоне, и в свою очередь, указанная малая плотность приводит к низкой производительности РНА на единицу объема биореактора. Следовательно, промышленно доступные полимеры РНА оказались гораздо более дорогими, чем традиционные полимеры на основе нефти, и поэтому не встретили широко распространённого промышленного одобрения.

Обычно биологические процессы получения РНА-содержащих продуктов из метаносодержащих газов включают в себя стадии роста популяции метанотрофов ("сбалансированный рост клеток") и затем метанотрофы подвергаются воздействию условий окружающей среды, которые не поддерживают рост популяции микроорганизмов, но стимулируют производство РНА метанотрофами ("несбалансированный рост клеток"). Если РНА является желательным продуктом, то в последующем РНА собирают из микроорганизмов. Для роста популяции метанотрофов и производства РНА, в водный бульон, включающий микроорганизмы, подают газ, содержащий метан и кислородсодержащий газ.

Следовательно, существует потребность в способе получения РНА-содержащих продуктов из метаносодержащих газов с повышенной производительностью на единицу объема биореактора. Преимущественно, в предпочтительных способах повышенная производительность могут быть достигнута экономически привлекательным образом.

### **Сущность изобретения**

В настоящем изобретении разработаны биологические процессы для получения РНА-содержащих продуктов с высокой производительностью из газов, содержащих метан. Согласно настоящему изобретению, может быть достигнута высокая плотность метанотрофов на единицу объема биореактора, без чрезмерных затрат на охлаждение, связанных со значительным экзотермическим эффектом при биоконверсии метана. В способе настоящего изобретения достигается желательная высокая скорость массопереноса метана из газовой фазы в водный бульон или жидкую среду. Указанная высокая скорость массопереноса поддерживает высокую плотность метанотрофов. Однако высокая скорость массопереноса и высокая плотность метанотрофов приводят к увеличению генерации тепла и повышенному выделению диоксида углерода. В способах настоящего изобретения объединяется способность к достижению высокой интенсивности массопереноса метана с отводом тепла для того, чтобы поддерживать температуру водной среды подходящей для биологического процесса.

В способах настоящего изобретения часть водной среды, содержащей диоксид углерода, который генерируется метанотрофами, выводится из реакционной зоны и контактирует с десорбирующим газом с целью удаления растворенного диоксида углерода из извлеченной водной среды (с образованием "жидкой среды или бульона, обеднённого диоксидом углерода"). По меньшей мере часть, и предпочтительно практически вся обеднённая диоксидом углерода среда поступает в реакционную зону, где становится

частью водной среды в реакционной зоне. Удаление диоксида углерода из водной среды приводит к высокой интенсивности массопереноса метана, а также кислорода в водной среде реакционной зоны.

Кроме того, во время контакта с десорбирующим газом, испарение диоксида углерода и воды из извлеченной водной среды приводит к охлаждению водной среды. Поскольку популяция метанотрофов увеличивается, также возрастает генерация диоксида углерода. Следовательно, тепло, удаленное путем охлаждения за счет испарения диоксида углерода, в некоторой степени контролирует рост популяции метанотрофов. Конечно, степень теплоотвода, благодаря испарению воды, будет связана с относительной влажностью десорбирующего газа. Поскольку вода также образуется в процессе метаболического окисления метана в диоксид углерода, испарение воды может быть выгодным с точки зрения поддержания постоянного объема водной среды во время процесса.

В рамках настоящего изобретения, термин "ограничивающий субстрат" означает или метан, или кислород, который является более недостаточным субстратом для соответствующего массопереноса, обеспечивающего сбалансированный рост клеток и/или несбалансированный рост клеток в любой заданный момент процесса. Следует понимать, что во время работы, возможно, что один субстрат является ограничивающим в течение некоторого периода времени, а затем другой субстрат является ограничивающим. В большинстве операций скорость массопереноса метана ограничивает сбалансированный рост клеток и несбалансированный рост клеток при высокой плотности метанотрофов. Однако в настоящем изобретении рассматриваются режимы эксплуатации, в которых массоперенос кислорода является ограничивающим фактором. Например, как будет обсуждаться более подробно в дальнейшем, в водную среду может быть добавлен один или несколько реагентов - метанол, муравьиная кислота или ее соль, растворимая в воде, и в этом случае массоперенос кислорода может стать ограничивающим фактором.

В широком смысле настоящее изобретение относится к высокопроизводительным способам биоконверсии метана в продукт, содержащий полигидроксикарбоксилат, например, РНА или белок, имеющий регулируемое содержание РНА, которые включают:

(а) подачу газа, содержащего метан и кислородсодержащий газ, в реакционную зону для контакта в условиях ферментации с водной средой, в которой имеется популяция метанотрофов, причем указанная среда содержит питательные вещества для роста популяции метанотрофов, чтобы получить водную среду, обогащенную метанотрофами, указанный рост популяции метанотрофов также приводит к выделению диоксида углерода, воды и тепла, и удалению непрореагировавшего газа из указанной реакционной зоны;

(b) подачу газа, содержащего метан и кислородсодержащий газ, в реакционную зону для контакта в условиях ферментации, по меньшей мере, с частью водной среды, обогащенной метанотрофами, причем в указанной среде имеется ограничение, например, значительный недостаток, для создания условий лимитирования питательными веществами (по меньшей мере одного питательного вещества, необходимого для роста популяции метанотрофов), чтобы вызвать производство полигидроксикарбоксилата метанотрофами с выделением диоксида углерода, воды и тепла, и удаление непрореагировавшего газа из указанной реакционной зоны; и

(с) выделение метанотрофов, содержащих полигидроксикарбоксилат, из водной среды со стадии (b), где по меньшей мере в части периода времени каждой из стадий (а) и (b):

i) скорость подачи по меньшей мере одного ограничивающего газа-субстрата в реакционную зону каждой из стадий (а) и (b) представляет собой (А) условия диффузии субстрата, и необязательно и предпочтительно, (В) регулируется с целью обеспечить практически стабильную молярную концентрацию метана в непрореагировавших газах;

ii) по меньшей мере на одной из стадий (а) и (b) часть водной среды непрерывно выводится из реакционной зоны и контактирует с десорбирующим газом для того, чтобы удалить диоксид углерода и получить обедненную диоксидом углерода водную среду; и

iii) по меньшей мере часть обедненной диоксидом углерода водной среды рециркулирует из реакционной зоны, по меньшей мере, одной из стадий (а) и (b).

Предпочтительно подэтап (ii) проводится, по меньшей мере, в течение времени, когда популяция метанотрофов, составляет по меньшей мере приблизительно 8, предпочтительно по меньшей мере около 10 грамм на литр (измеряется как сухая клеточная масса), и часто по меньшей мере в течение периода времени, когда популяция метанотрофов находится в диапазоне приблизительно от 8 до 80, и предпочтительно приблизительно от 10 до 60 грамм на литр (измеряется как сухая клеточная масса).

В другом широком аспекте настоящего изобретения один или оба реагента из метанола и муравьиной кислоты, или ее водорастворимой соли ("кислородсодержащее соединение С1"), добавляют в водный бульон в течение одной или обеих фаз роста метанотрофов или продуцирования РНА. Кислородсодержащее соединение С1 служит для обеспечения метанотрофов дополнительным углеродным субстратом и, таким образом, поддерживается рост популяции метанотрофов и продуцирование РНА со скоростью, превышающей технические условия, которая может поддерживаться путем скорости массопереноса метана из газовой фазы в водную среду при заданном комплексе условий. Кроме того, метаболическое превращение кислородсодержащего соединения С1 менее экзотермично, чем превращение метана в расчете на атом углерода. Таким образом, этот аспект имеет отношение к высокопроизводительным способам

биооконверсии метана в продукт, содержащий полигидроксиалканоеат, включающим (а) подачу метаносодержащего газа и кислородсодержащего газа в реакционную зону для контакта в условиях ферментации с водной средой, содержащей популяцию метанотрофов, причем указанная среда содержит питательные вещества для роста популяции метанотрофов, чтобы получить водную среду, обогащенную метанотрофами, указанный рост популяции микроорганизмов также приводит к выделению диоксида углерода, воды и тепла, и удаление непрореагировавшего газа из указанной реакционной зоны; (b) подачу газа, содержащего метан и кислородсодержащий газ, в реакционную зону для контакта в условиях ферментации, по меньшей мере, с частью водной среды, обогащенной метанотрофами, причем в указанной среде отсутствует, по меньшей мере, одно питательное вещество, необходимое для роста популяции метанотрофов, чтобы вызвать продуцирование полигидроксиалканоеата и выделение диоксида углерода, воды и тепла, и удалить непрореагировавший газ из указанной реакционной зоны; и (с) выделение метанотрофов, содержащих полигидроксиалканоеаты, из водной среды со стадии (b), где кислородсодержащее соединение С1, по меньшей мере, одно из метанола и муравьиной кислоты или ее водорастворимой соли, подают в водную среду, по меньшей мере, на одну из стадий (а) и (b). Предпочтительно кислородсодержащее соединение С1 подают, по меньшей мере, в условиях ограниченной диффузии метана.

Еще один широкий аспект настоящего изобретения относится к высокопроизводительным способам биооконверсии метана в продукт, содержащий полигидроксиалканоеат, включающим (а) подачу метаносодержащего газа и кислородсодержащего газа в реакционную зону для контакта в условиях ферментации с водной средой, содержащей популяцию метанотрофов, причем указанная среда содержит питательные вещества для роста популяции метанотрофов, чтобы получить водную среду, обогащенную метанотрофами, указанный рост популяции метанотрофов также приводит к выделению диоксида углерода, воды и тепла, и удаление непрореагировавшего газа из указанной реакционной зоны; (b) подачу метаносодержащего газа и кислородсодержащего газа в реакционную зону для контакта в условиях ферментации по меньшей мере части водной среды, обогащенной метанотрофами, причем в указанной среде отсутствует по меньшей мере одно питательное вещество, необходимое для роста популяции метанотрофов, чтобы вызвать продуцирование полигидроксиалканоеата и выделение диоксида углерода, воды и тепла, и удалить непрореагировавший газ из указанной реакционной зоны; и (с) выделение метанотрофов, содержащих полигидроксиалканоеаты, из водной среды со стадии (b), причем по меньшей мере в части продолжительности каждой из стадий (а) и (b):

i) скорость подачи по меньшей мере одного ограниченного газообразного субстрата в реакционную зону на каждую из стадий (а) и (b) соответствует (А) условиям диффузии субстрата, и необязательно и предпочтительно, (В) регулируется для того, чтобы обеспечить практически стабильную молярную концентрацию метана в непрореагировавших газах;

ii) по меньшей мере на одной из стадий (а) и (b) часть водной среды непрерывно выводится из реакционной зоны и контактирует с полупроницаемой мембраной, чтобы удалить диоксид углерода и получить водную среду, обедненную диоксидом углерода; и

iii) рециркуляция по меньшей мере части обедненной диоксидом углерода водной среды в реакционную зону по меньшей мере на одной из стадий (а) и (b).

Полупроницаемая мембрана, используемая для удаления диоксида углерода из водной среды по меньшей мере на одной из стадий (а) и (b), предпочтительно является обезгаживающей, или перфузионной мембраной, проницаемой для диоксида углерода, и более предпочтительно, эта мембрана также проницаема для воды. Указанная мембрана, которая может быть органической или неорганической, служит барьером между жидкой фазой и паровой фазой проникающего вещества. Движущая сила для проникновения диоксида углерода и воды обычно характеризуется как дифференциал парциального давления. По меньшей мере, частично дифференциал парциального давления может поддерживаться как дифференциал абсолютного давления поперек мембраны, например, на стороне проникающего вещества поддерживается вакуум, и/или очищающий газ на стороне проникающего вещества мембраны. Очищающий газ может быть такого же типа, как газ, используемый для десорбции. Выпаривание проникающего вещества, которое представляет собой диоксид углерода и обычно воду, происходит на стороне проникающего вещества мембраны и обеспечивает охлаждение за счет скрытой теплоты парообразования.

#### **Краткое описание чертежа**

На чертеже показано схематическое изображение устройства, используемого в способах настоящего изобретения.

#### **Подробное описание изобретения**

Все патенты, опубликованные заявки на патенты и статьи, упомянутые в этом подробном описании, полностью введены в изобретение со ссылкой.

Используемые в изобретении следующие термины имеют значение, приведенное ниже, если не утверждается иное, или ясно из контекста их применения.

Артикли единственного числа "a" и "an" предназначены для включения одного или нескольких из описанных элементов. Перечень примерных элементов предназначен для включения комбинаций из одного или нескольких описанных элементов. Глагол "может," используемый в изобретении означает, что применение указанного элемента является необязательным, и не предназначен для обеспечения любого

условия относительно работоспособности.

Биогаз означает газ, полученный из возобновляемого источника углерода и предпочтительно содержащий по меньшей мере приблизительно 20 мол.% диоксида углерода. Анаэробно полученный газ означает биогаз, полученный путем анаэробного расщепления или ферментации органического вещества в отсутствие кислорода, который, главным образом, содержит метан и диоксид углерода. Газ анаэробного расщепления обычно имеет состав: приблизительно от 25 до 50 об.% диоксида углерода и приблизительно от 40 до 70 об.% метана с небольшим количеством водорода, сероводорода, аммиака и азота.

Прерывисто или прерывистый означает время от времени, причем это может происходить с регулярными или нерегулярными временными интервалами.

Газ из органических отходов обычно имеет состав приблизительно от 25 до 60 об.% диоксида углерода и приблизительно от 35 до 70 об.% метана с небольшим количеством монооксида углерода, водорода, сероводорода, кислорода и азота.

Выражение "условия, ограничивающие питательное вещество, или условия лимитирования питательных веществ" означает, что одно или несколько питательных веществ или питательных микроэлементов, необходимых для роста, необходимых для роста популяции микроорганизмов, отсутствует в такой степени, что имеется недостаток по меньшей мере одного питательного вещества, необходимого для роста популяции метанотрофов, что замедляет рост популяции метанотрофов в реакционной зоне и повышает уровень полигидроксиалкановых соединений в метанотрофах, относительно реакционной зоны, в которую поступает, по меньшей мере, одно питательное вещество в соответствующем количестве, которое необходимо для роста. Выражение "практически отсутствует" относительно условий, ограничивающих питательное вещество, означает, что одно или несколько питательных веществ, необходимых для роста, присутствует только в остаточном или следовом количестве, или как примесь в другом компоненте, введенном в бульон.

Метанотроф представляет собой прокариотический организм, который усваивает метан в качестве источника углерода и энергии, и может быть немутантного типа или генетически модифицированным организмом. Термин метанотрофы предназначен для обозначения генетически модифицированных микроорганизмов, которые не могли быть метанотрофами без генетической модификации.

Микропузырьки представляют собой пузырьки, имеющие диаметр 500 мкм или меньше.

Природный газ означает горючую смесь газообразных углеводородов из осадочных пород, обычно содержащую свыше 75% метана с небольшим количеством алканов с 2-4 атомами углерода, или из угольных пластов, в которых метан часто присутствует вместе с азотом. Природный газ может содержать компоненты, такие как (но без ограничения указанным) диоксид углерода, сероводород, пары воды и азот.

Питательные вещества и микроэлементы представляют собой пищу или любое питательное вещество, которое усваивается микроорганизмом и необходимо для роста, восстановления и нормального обмена веществ. Микроэлементы являются питательными веществами, которые необходимы в небольшом количестве, такими как витамины и минералы, например, по сравнению с источниками углерода, азота и фосфора.

Полигидроксиалканаты могут быть охарактеризованы как повторяющиеся звенья формулы



в которой R представляет собой водород или низший алкил, имеющий от 1 до 6, предпочтительно 1-4 атомов углерода; m и n означают целые числа, причем m равно 1 или 2; молекулярная масса (средне-взвешенная величина) составляет приблизительно от 10000 до 5 миллионов или больше ед. дальтона. Примеры полигидроксиалканатов включают (но без ограничения указанным) полигидроксibuтират и полигидроксиалканоат.

Продукт, содержащий полигидроксиалканат, относится к жизнеспособным или нежизнеспособным метанотрофам, или к остаткам клеток метанотрофов, которые содержат внутри и/или снаружи полигидроксиалканаты, полученные путем обмена веществ метанотрофов.

Термин популяции микроорганизмов относится к ряду микроорганизмов в заданном объеме и включает практически чистые культуры и смешанные культуры.

Белки представляют собой макромолекулы, содержащие один или несколько аминокислотных остатков с длинными цепями, и включают в себя (но без ограничения указанным) пептиды, олигопептиды и полипептиды, и могут содержать серу, кроме атомов углерода, азота и кислорода.

Белки генетически однородных клеток являются съедобными, одноклеточными микроорганизмами.

Термин "существенная однородность в жидкой фазе" означает, что состав жидкой фазы является практически одинаковым в любой точке биореактора. Обычно концентрация компонента отличается приблизительно на 5% от средней концентрации в однородной жидкой фазе, то есть, если средняя концентрация компонента составляет 55,3 мол.%, то существенная однородность будет означать, что концентрация компонента может изменяться, например, приблизительно от 52,5 до 58,0 мол.%.

Существенная неоднородность в газовой фазе означает, что масса (в газовых пузырьках, а также в растворенных газах) по меньшей мере одного компонента, обеспечиваемая путем изменений концентрации газообразного субстрата, изменяется по меньшей мере на 50 мас.% между местом поступления газа в

биореактор и местом, откуда газ выходит из бульона.

Условия диффузии субстрата означают, что для условий сбалансированного роста клеток (стадия (а)), скорости массопереноса метана, а также кислорода не согласованы и сами по себе, по сути вредно влияют на скорость роста популяции метанотрофов; и для условий несбалансированного роста клеток (стадия (b)), скорости массопереноса метана, а также кислорода не согласованы и сами по себе, по сути вредно влияют на популяцию метанотрофов. Выражение "по сути" означает, что вредное влияние для (1) условий сбалансированного роста клеток состоит в том, что популяция метанотрофов продолжает расти, и для (2) условий несбалансированного роста клеток состоит в том, что массоперенос метана, а также кислорода является достаточным, чтобы, по меньшей мере, поддерживать популяцию метанотрофов, то есть, популяция метанотрофов уменьшается не больше, чем на 20%, предпочтительно не больше, чем на 10 мас.%. В некоторых случаях, в условиях сбалансированного роста клеток популяция метанотрофов продолжает расти, меньше чем на 20%, предпочтительно меньше чем на 10 мас.% от расчётной скорости экспоненциального роста при заданной плотности клеток.

Выражение "условия, ограничивающие диффузию субстрата" означает, что скорость диффузии по меньшей мере одного из метана и кислорода в бульон, содержащий метанотрофы, отличается от условий диффузии субстрата. Следует понимать, что на условия диффузии субстрата и условия, ограничивающие диффузию субстрата влияют движущая сила массопереноса, а также физические ограничения, такие как размер пузырьков и длительность пребывания пузырьков в бульоне.

Все ссылки на массу клеток рассчитываются на основе сухой массы клеток. Сухую массу определяют путем фильтрации микроорганизмов из бульона, с последующей промывкой деионизированной водой и сушкой при температуре приблизительно от 103 до 105°C в печи и охлаждение в эксикаторе. Операции сушки и охлаждения в эксикаторе данного образца необходимо повторять до тех пор, пока масса образца не станет постоянной.

Предполагается, что ссылки в изобретении на органические кислоты будут включать соответствующие соли и сложные эфиры.

Полигидроксикарбоксилаты продуцируются метанотрофами для сохранения энергии. Как хорошо известно из уровня техники, скорость получения РНА возрастает, когда метанотрофы находятся в условиях стресса. Этот стресс может быть вызван путем использования условий ограничения питательных веществ, однако некоторое количество кислорода и метана или кислородсодержащего соединения С1 все же необходимо обеспечить для того, чтобы поддерживать метанотрофы. Способы настоящего изобретения можно широко применять для целого ряда метанотрофов, которые способны продуцировать РНА. Как изложено в определении, метанотрофы включают генетически модифицированные микроорганизмы, которые способны потреблять метан, хотя обычно не характеризуются как метанотрофы.

Метанотрофы могут быть получены из самых различных источников. Метанотрофы обнаружены в окружающей среде, в которой присутствуют кислород, а также метан, часто на поверхности раздела между аэробной и анаэробной зонами. Обычно они находятся в рисовых затопленных полях, болотах и топях, поверхностных осадках в прудах и озерах, активном шламe и лугах, и в почвах листопадного леса, в том числе в пресной воде, солончаках и в солевой окружающей среде, пустынях, в газе из органических отходов, угольных карьерах и в океанах. Предпочтительные источники включают те окружающие среды, которые периодически подвергаются стрессу, такому как ограничение питательных веществ, углерода или кислорода. Применение смешанных бактериальных культур снижает затраты процесса по сравнению с процессом, где используются чистые культуры, путем исключения потребности в техническом обслуживании специальной культуры. В рамках настоящего изобретения, термин "смешанные культуры" по определению включает смешанные бактериальные сообщества, содержащие разнообразные индивидуальные культуры или виды, независимо от того, являются ли эти виды хорошо структурированными. Термин "смешанные культуры" также включает обогащенные сообщества. Эти сообщества организмов подвергаются избирательному давлению, что способствует росту организмов, которое положительно влияет на продуцирование РНА, и неблагоприятно для роста организмов, которые отрицательно влияют на продуцирование РНА. Приемы селекции могут быть использованы для обогащения популяции метанотрофов в смешанной культуре, которые обеспечивают желательную РНА.

Примеры метанотрофов включают (но без ограничения указанным) *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylocella*, *Methylocapsa*, *Methyloferula*, *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylomicrobium*, *Methylosphaera*, *Methylocaldum*, *Methylosarcina*, *Methylothermus*, *Methylohalobius*, *Methylogaea*, *Methylosoma*, *Methylomarinum*, *Methylovulum*, *Methyloacidiphilum*, *Creonothrix* и *Clonothrix*. Различные метанотрофы могут отличаться по скорости накопления РНА, причем различные метанотрофы, вероятно, могут продуцировать РНА с различными полимерами или с различными распределениями молекулярной массы. Таким образом, селекция метанотрофов обычно направлена на особенно желательные РНА. Смотри-те, например, патент США 8,030,021, который полностью введен в изобретение как ссылка.

Метанотрофы содержат белки и они обычно съедобны, особенно после денатурирования, и, таким образом, являются подходящими в качестве источников одноклеточных белков. Белки, содержащиеся в метанотрофах, включают, но не ограничиваются приведенными ниже.

| Белок                 | Диапазон мас.% в<br>высушенных метанотрофах | Обычный диапазон мас.% в<br>высушенных метанотрофах |
|-----------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| аланин                | от 1 до 10                                  | от 2 до 7                                           |
| аргинин               | от 1 до 5                                   | от 2 до 5                                           |
| аспарагиновая кислота | от 2 до 10                                  | от 3 до 7                                           |
| глутаминовая кислота  | от 3 до 10                                  | от 3 до 8                                           |
| глицин                | от 1 до 7                                   | от 2 до 5                                           |
| гистидин              | от 0,5 до 5                                 | от 0,5 до 2                                         |
| изолейцин             | от 1 до 5                                   | от 1 до 4                                           |
| лейцин                | от 2 до 10                                  | от 3 до 7                                           |
| лизин                 | от 1 до 5                                   | от 2 до 5                                           |
| метионин              | от 0,01 до 1                                | от 0,05 до 0,5                                      |
| фенилаланин           | от 1 до 5                                   | от 2 до 5                                           |
| пролин                | от 1 до 5                                   | от 2 до 5                                           |
| серин                 | от 1 до 5                                   | от 1 до 4                                           |
| треонин               | от 1 до 5                                   | от 1 до 4                                           |
| тирозин               | от 0,5 до 5                                 | от 1 до 3                                           |
| валин                 | от 1 до 7                                   | от 2 до 5                                           |

Часто белок составляет приблизительно от 30 до 80 мас.% процентов сухих клеток, причем остальное приходится на жиры (часто приблизительно от 2 до 15, например, от 3 до 12, мас.%), РНА (часто приблизительно от 5 до 50 мас.% для животных кормов и приблизительно от 10 до 50 мас.%, где РНА является желательным конечным продуктом) и другие компоненты (приблизительно от 5 до 20 мас.%). Хотя в некоторых случаях клетки могут экспрессировать белок, для практических целей белок содержится в клетках и/или на поверхности клеток. Таким образом, рост популяции метанотрофов в некоторой степени пропорционален скорости продуцирования белка.

Способы изобретения также применимы для большого разнообразия метаносодержащих газов (включая, но без ограничения указанным) природный газ, газообразный метан из угля и биогаз (в том числе, но без ограничения, газ анаэробного расщепления и газ из органических отходов), остаточный газ из других процессов, например, остаточный газ, произведенный непосредственно или косвенно в другом процессе ферментации, и их смеси. Обычно концентрация метана в метаносодержащем газе, поступающем в реакционную зону, составляет по меньшей мере около 10 мол.% и часто находится в диапазоне приблизительно от 15 до 99 и практически до 100 мол.%. Газ, содержащий метан, может содержать другие компоненты, такие как (но без ограничения указанным) высшие алканы, азот, диоксид углерода, сероводород, силоксаны и водные пары. Другие компоненты в газе, содержащем метан, которые могут быть токсичными для метанотрофов или ухудшают их функционирование, предпочтительно удаляют, или снижают концентрацию этих компонентов до уровня, приемлемого для метанотрофов.

Газ, содержащий метан, и кислородсодержащий газ подают в водную среду (бульон), содержащую метанотрофы. Предпочтительно метаносодержащий газ и кислородсодержащий газ вводят в биореактор в виде микропузырьков. Часто микропузырьки имеют диаметр в диапазоне от 0,01 до 0,5, предпочтительно от 0,02 до 0,3 мм. Предпочтительно метаносодержащий газ и кислородсодержащий газ разделяют в бульон с использованием стимулирующей жидкости. Вариации скорости потока стимулирующей жидкости могут быть использованы для модификации размера микропузырьков и, таким образом, регулирования скорости переноса метана и кислорода в бульон. По желанию, могут быть использованы поверхностно-активные вещества, чтобы способствовать уменьшению размера пузырьков.

Скорость поступления каждого газа, содержащего метан, и кислородсодержащего газа в бульон может значительно изменяться, но обычно зависит от обеспечения соответствующих количеств растворенного метана и кислорода, доступных для метанотрофов. Во время роста популяции метанотрофов потребности в метане и кислороде на единицу объема реакционной зоны будут пропорционально изменяться с увеличением плотности метанотрофов. Поэтому скорости поступления указанных газов предпочтительно регулируют с учетом плотности метанотрофов и желательной скорости роста популяции и/или накопления РНА. До настоящего изобретения значительные затраты производства одноклеточного белка были связаны с выделением, обезвоживанием и сушкой метанотрофов, чтобы получить корм для животных. Аналогично, повышенная плотность метанотрофов в бульоне будет облегчать извлечение РНА из метанотрофов, когда желательным конечным продуктом является РНА. Легко можно признать, что способы настоящего изобретения обеспечивают достижение повышенной плотности метанотрофов в бульоне, благодаря возросшей способности переноса метана и кислорода в водный бульон и способности отводить тепло из биореактора.

Путем регулирования подачи метана, можно минимизировать потери метана в непрореагировавших газах, выходящих из бульона. Скорость поступления метаносодержащего газа в реакционную зону, по меньшей мере в течение части процесса, является такой, что в непрореагировавших газах имеется практически стабильная молярная концентрация метана (предпочтительно молярная концентрация метана не изменяется больше чем на 20%, более предпочтительно больше чем на 10% от средней молярной кон-

центрации метана). Если непрореагировавшие газы будут направляться в отходы производства, например, сжигаться на факеле или в установке термического окисления, то экономика производства улучшится с уменьшением концентрации метана в непрореагировавших газах, хотя природный газ может быть востребован для поддержания термического окисления. Как правило, другие устройства, которые генерируют газ, содержащий метан, такие как анаэробные автоклавы, имеют факельные горелки или другие устройства термического окисления, которые могут быть использованы при продуцировании РНА. Предпочтительно в случае направления непрореагировавших газов в отходы производства по меньшей мере около 70% и предпочтительно по меньшей мере приблизительно 80%, а иногда приблизительно от 85 до 99, вплоть до 100% метана в метансодержащем газе усваиваются в реакционной зоне. Предпочтительно, скорость поступления газа, содержащего метан, в реакционную зону регулируется, чтобы обеспечить содержание метана в удаляемом непрореагировавшем газе меньше, чем 10 мол. %.

С другой стороны, если непрореагировавшие газы будут использоваться как источник энергии, то молярная концентрация метана должен быть достаточно высокой, чтобы обеспечить желательное тепло-содержание. Поэтому в некоторых вариантах осуществления непрореагировавшие газы могут содержать 25 или больше объемных процентов метана. Кроме того, непрореагировавшие газы могут содержать диоксид углерода, образующийся за счет метаболической активности, который может быть удален или в этом нет необходимости. В любом случае скорость поступления метансодержащего газа в реакционную зону регулируется, чтобы обеспечить практически стабильную молярную концентрацию метана в непрореагировавшем газе. Следует признать, что непрореагировавшие газы могут быть использованы для теплоотвода из реакционной зоны, и могут применяться для удаления нежелательных газов, которые могут растворяться в водной среде. По желанию, скорость поступления газа, содержащего метан, можно регулировать на основе желательного теплоотвода или десорбции нежелательных, растворенных газов.

Кроме того, водная среда может быть использована для удаления из метансодержащего газа других газообразных компонентов, находящихся в нем, особенно в случае, когда поток непрореагировавшего газа будет использоваться для других целей, таких как генерация энергии или как сырье для другого биологического или химического процесса. Удаление нежелательных компонентов может приводить поток непрореагировавшего газа в состояние, подходящее для непосредственного дальнейшего использования, или к уменьшению степени предварительной обработки. Затем удаленные компоненты могут быть извлечены из водной среды. Компоненты, которые могут быть удалены из водной среды включают (но без ограничения указанным) сероводород и диметилсилоксан, который оба могут быть вредными в сырье для сжигания и для многих химических каталитических процессов. Например, метансодержащее сырье содержит сероводород, и водная среда поглощает по меньшей мере часть сероводорода, чтобы получить поток непрореагировавшего газа, содержащий пониженную концентрацию сероводорода.

Скорости массопереноса метана и кислорода из газовой фазы в бульон будут зависеть от движущей силы - парциального давления каждого газа. Как метан, так и кислород обладают ограниченной растворимостью в воде, причем уменьшение массы диоксида углерода в бульоне выгодно для увеличения движущей силы массопереноса метана и кислорода в бульон. Согласно изобретению по меньшей мере в течение части продолжительности процесса, часть бульона непрерывно извлекается из реакционной зоны и контактирует с десорбирующим газом, чтобы удалить растворенный диоксид углерода и получить водную среду (или бульон), обедненную диоксидом углерода, для рециркуляции в реакционную зону. В некоторых случаях это непрерывное извлечение и десорбция происходит в течение всей продолжительности процесса, и в других случаях это происходит по меньшей мере тогда, когда плотность метанотрофов в бульоне составляет по меньшей мере около 2 г/л, например, по меньшей мере около 5 и часто по меньшей мере приблизительно 10 г/л. Метанотрофы могут уноситься с извлекаемым бульоном, или могут удаляться из бульона до операции пропускания в десорбирующее устройство.

Скорость извлечения бульона часто является достаточной для того, чтобы удалить количество диоксида углерода, эквивалентное по меньшей мере приблизительно 35, предпочтительно по меньшей мере около 40, и в некоторых случаях приблизительно от 50 до 75% диоксида углерода, полученного путем метаболической активности в реакционной зоне. Следует понимать, что метансодержащее сырье, в некоторых случаях, таких, когда метансодержащее сырье является биогазом, может содержать диоксид углерода.

Расчет части диоксида углерода, удаляемой во время десорбции, проводится на основе материального баланса, с учетом диоксида углерода, полученного путем метаболической активности, и диоксида углерода, поступающего в реакционную зону вместе с субстратом и другими питательными веществами. С целью расчета, массу диоксида углерода, полученного путем метаболической активности, определяют на основе допущения, что метан, а также кислородсодержащее соединение С1 могут приводить к генерации диоксида углерода. Часть метана и кислородсодержащего соединения С1 может расходоваться на образование клеток, продуцирование РНА и других компонентов, генерируемых при обмене веществ.

В предпочтительном аспекте настоящего изобретения, метан в извлекаемом бульоне подвергается в достаточной степени активному обмену веществ до десорбции, таким образом газы, включающие диоксид углерода, после десорбции содержат меньше чем 20, предпочтительно меньше чем 10 частей на миллион по объему метана. В указанном предпочтительном аспекте изобретения подача кислорода должна

быть достаточной для того, чтобы извлекаемый бульон содержал достаточно растворенного кислорода, чтобы поддержать метаболическую активность.

В способах настоящего изобретения может быть использован любой подходящий десорбирующий газ. Для осуществления десорбции легко доступным газом является воздух. Десорбирующий газ, который может быть использован для десорбции, когда содержится в бульоне, подвергающемся десорбции, может иметь любую подходящую температуру, которая не оказывает отрицательного воздействия на метанотрофы, например, приблизительно от 10 до 50°C, например от 20 до 45°C. Во многих случаях, предпочтительно поддерживать относительную влажность десорбирующего газа меньше, чем 50, более предпочтительно меньше, чем приблизительно 25%, чтобы получить выгодное охлаждение за счет испарения воды.

Предпочтительно десорбцию проводят в таких условиях, когда десорбируются по меньшей мере 50, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 65 и часто по меньшей мере около 75% диоксида углерода в извлеченном бульоне. Хотя могут быть использованы повышенные или пониженные температуры, обычно десорбцию проводят при температуре извлеченного бульона. В течение десорбции температура бульона снижается, главным образом, благодаря испарению диоксида углерода, а также паров воды. Часто в течение по меньшей мере части процесса, особенно во время пиковой потребности в охлаждении, обеднённый диоксидом углерода бульон за счет десорбции имеет температуру по меньшей мере приблизительно на 0,25°C, а иногда по меньшей мере приблизительно на 0,75°C ниже, чем температура бульона в реакционной зоне.

В одном режиме, весь или часть извлеченного бульона поступает из нижней части реакционной зоны, где имеется повышенная концентрация растворенного диоксида углерода. По желанию, извлеченный бульон, который находится под давлением, которое по меньшей мере частично определяется верхним слоем водной среды в точке извлечения, может подвергаться условиям вскипания, включающим пониженное давление, например, давление окружающей среды, чтобы удалить часть диоксида углерода до того, как подвергнется десорбции.

Как установлено выше, по желанию, десорбция необязательно применяется, пока популяция метанотрофов не достигнет такой плотности в бульоне, что массоперенос метана из газовой фазы в бульон станет несоответствующим для поддержания роста популяции или продуцирования РНА, или другие операции охлаждения станут недостаточными для предотвращения повышения температуры в реакционной зоне. В качестве альтернативы, скорость извлечения бульона для десорбции может изменяться с ростом популяции. Когда популяция метанотрофов приближается к желательному максимуму плотности, степень извлечения бульона для десорбции диоксида углерода часто находится в диапазоне приблизительно от 0,5 до 10, например от 1 до 5 объема бульона в реакционной зоне в час.

Бульон содержит питательные вещества для метанотрофов. Сначала процесс протекает с увеличением популяции метанотрофов, эту фазу иногда называют "сбалансированный рост клеток", когда сырье и все питательные вещества присутствуют в соотношениях, необходимых для синтеза высокомолекулярных компонентов клеток. Другими словами, отсутствуют ограничения на сырье или питательные вещества для синтеза белков, сложных углеводных полимеров, жиров, или нуклеиновых кислот. Затем метанотрофы подвергаются условиям ограничения питательных веществ, то есть наступает фаза несбалансированного роста клеток, на которой кислород или по меньшей мере одно питательное вещество (отличающееся от метана или кислородсодержащего соединения С1), которые необходимы для синтеза одной или нескольких макромолекул для роста клеток, не присутствуют в требуемых соотношениях. В этих условиях происходит ускоренное накопление полимеров. Указанные полимеры включают внутриклеточные продукты хранения, такие как один или несколько РНА, или продукты секреции, такие как внеклеточные полисахариды. Обычно условия ограничения питательных веществ достигаются путем предоставления недостаточного количества соединений азота, поддерживающих сбалансированный рост клеток. Другие питательные вещества, которые можно ограничивать или регулировать с целью достижения фазы несбалансированного роста клеток, включают (но без ограничения указанным) кальций, фосфор, натрий, магний, железо, медь, бор, цинк, алюминий, никель, серу, молибден, марганец и калий.

Бульон поддерживается в подходящих условиях для быстрого роста популяции микроорганизмов в течение фазы сбалансированного роста клеток и для продуцирования РНА во время фазы несбалансированного роста клеток. Эти условия включают температуру, подходящую для метанотрофов, которая обычно является мезофильной, например, приблизительно от 25 до 45°C, и наиболее часто приблизительно от 28 до 42°C.

Условия сбалансированного роста клеток поддерживаются в течение времени, достаточного для достижения желательной плотности метанотрофов в бульоне. В большинстве случаев, метанотрофы достигают плотности в бульоне по меньшей мере около 8, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 10 грамм на литр (в расчете на сухие клетки). Хотя желательна высокая плотность, существуют практические ограничения. Например, популяция микроорганизмов в бульоне может возрастать до уровня, при котором недостаточное количество метана и кислорода может доставляться в бульон в течение фазы сбалансированного роста клеток для достижения дополнительного роста популяции (условия, ограничивающие диффузию субстрата). Кроме того, метаболические процессы являются экзотермическими, и,

таким образом, способность отвода тепла из реакционной зоны может стать ограничением. Поэтому плотность метанотрофов в конце фазы сбалансированного роста клеток обычно составляет по меньшей мере приблизительно 8 г/л, например, по меньшей мере около 10 г/л бульона, и может достигать величины 60, или 80, или больше грамм на литр бульона.

Преимущество способов настоящего изобретения заключается в гибкости, которой обладает оператор для того, чтобы получить высокую плотность метанотрофов в результате условий сбалансированного роста клеток, благодаря возможности достижения высокой скорости массопереноса метана и кислорода из газовой фазы в бульон и, таким образом, поддержания условий диффузии субстрата при высокой плотности метанотрофов в бульоне. Следовательно, в предпочтительных вариантах осуществления условия сбалансированного роста клеток поддерживаются по меньшей мере до тех пор, пока практически достигнуты условия ограничения диффузии субстрата, которые уже невозможно больше поддерживать. Поэтому плотность метанотрофов в бульоне временами находится в диапазоне приблизительно от 20 до 80 г/л или больше, часто в диапазоне от 20 до 60 г/л (в расчете на сухие клетки).

В одном аспекте настоящего изобретения, кислородсодержащее соединение С1 вводят в бульон дополнительно к метановому сырью. Предпочтительно кислородсодержащее соединение С1 производится из возобновляемого источника. Кислородсодержащие соединения С1 растворимы в водной среде бульона и, таким образом, отсутствуют ограничения массопереноса между газовой фазой и водной средой, влияющие на скорость, с которой кислородсодержащее соединение С1 можно вводить в бульон. При использовании кислородсодержащего соединения С1 можно получить дополнительный рост популяции микроорганизмов в условиях ограничения диффузии метана. Кислородсодержащее соединение С1 можно добавлять в любое время в течение или фазы сбалансированного роста клеток, или фазы несбалансированного роста клеток, или на обеих фазах. Кислородсодержащее соединение С1 можно добавлять непрерывно или прерывисто, причем можно начать это добавление, когда процесс приближается к переходу от условий диффузии метана к условиям ограничения диффузии метана. Поскольку обычно кислородсодержащее соединение С1 быстро потребляется метанотрофами при обмене веществ, предпочтительным является достижение хорошего диспергирования во всем объеме биореактора, а также добавление кислородсодержащего соединения С1 прерывисто или непрерывно в течение всего процесса ферментации или его части. Предпочтительно кислородсодержащее соединение С1 используется в течение фазы несбалансированного роста клеток.

Количество кислородсодержащего соединения С1, подаваемого в бульон, может изменяться значительно, при условии получения желательного увеличения клеточного роста и конверсии метана в РНА. Обычно кислородсодержащее соединение С1 предоставляется в количестве приблизительно от 10 до 200, например от 30 до 150 и иногда приблизительно от 50 до 110 г на 1 кг желательной клеточной массы процесса ферментации. Концентрацию кислородсодержащего соединения С1 в бульоне необходимо поддерживать ниже того уровня, который отрицательно влияет на метанотрофы. Следовательно, является предпочтительным непрерывное или прерывистое добавление кислородсодержащего соединения С1 в бульон с соответствующей скоростью, чтобы обеспечить желательное количество кислородсодержащего соединения С1, тем не менее поддерживают его концентрацию ниже уровня, который отрицательно влияет на метанотрофы.

С целью примера, но не ограничения настоящего изобретения, были проведены сравнительные эксперименты для иллюстрации влияния кислородсодержащего соединения С1 на рост популяции метанотрофов и продуцирование РНА. Для экспериментов использовали два биореактора, которые работали одновременно с попыткой поддержания одинаковых условий в течение ферментации, за исключением содержания кислородсодержащего соединения С1 (метанола). В биореакторах лабораторного масштаба (4 литра) с перемешиванием не использовался замысел настоящего изобретения, включающий десорбцию диоксида углерода из бульона. Скорее, эксперименты были направлены на иллюстрацию влияния метанола на ферментацию. Процессы ферментации проводили приблизительно при 30°C и pH около 7 (поддерживали путем добавления основания - гидроксида аммония, в течение фазы роста, и гидроксида калия в течение фазы продуцирования РНА) при продолжительности приблизительно 50 часов. Метанотрофы представляли собой смесь, содержащую *M. parvus* OBVP. Применялась обычная водная среда, содержащая питательные вещества (среда нитратных солей W1, описанная в работе Peija, и др., "Метаболизм поли-3-гидроксibuтирата в метанотрофах *Methylocystis parvus* OBVP, Type II". Appl. Environ. Microbiol. 77 (17), 6012-6019). В течение фазы несбалансированного роста клеток удаленным питательным веществом был азот.

Эти примеры дали следующие результаты. В отсутствии метанового сырья, РНА (поли-3-гидроксibuтират) практически не образуется, при наличии метанола. Добавление метанола увеличивает скорость роста популяции метанотрофов по сравнению с контролем, где метанол отсутствует в бульоне. В опытах с метанолом потребляется меньше кислорода, чтобы обеспечить заданную популяцию клеток и концентрацию РНА. Повышение концентрации метанола увеличивает концентрацию РНА и популяцию клеток. Во всех опытах метанол потребляется полностью, смотрите табл. I.

Таблица I

| Пример         | Реактор 1       |                |                                               | Реактор 2       |                |                                               |
|----------------|-----------------|----------------|-----------------------------------------------|-----------------|----------------|-----------------------------------------------|
|                | OD 600 максимум | РНА % максимум | Всего добавлено метанола, грамма <sup>b</sup> | OD 600 максимум | РНА % максимум | Всего добавлено метанола, грамма <sup>b</sup> |
| 1              | 42              | 37             | 0                                             | 55              | 49             | 101                                           |
| 2 <sup>a</sup> | 42              | Нет данных     | 0                                             | 22 <sup>b</sup> | 15             | 27                                            |
| 3              | 37              | 41             | 0                                             | 52              | 50             | 74                                            |
| 4              | 33              | 34             | 0                                             | 56              | 55             | 76                                            |
| 5 <sup>c</sup> | 79              | 54             | 0                                             | 81              | 51             | 141                                           |
| 6              | 47              | 39             | 84                                            | 52              | 52             | 209                                           |

а. Реакторы инокулировали при OD 600, приблизительно 22. Метан не добавляли после инокулирования.

б. В примерах 1 и 2 приблизительно первоначально добавлены 4 г метанола, и затем оставшийся метанол практически равномерно добавляли в течение продолжительности опыта. В примерах 3-6 весь метанол непрерывно добавляли в течение продолжительности опыта.

с. Скорость роста клеток с метанолом больше, чем скорость роста без метанола; однако в течение всей продолжительности эксперимента, в контрольном реакторе достигается такая же популяция клеток и концентрация РНА, как в реакторе с метанолом.

Продолжительность фазы сбалансированного роста клеток будет зависеть от концентрации инокулята в бульоне, заданной плотности метанотрофов при завершении фазы сбалансированного роста клеток и скорости размножения метанотрофов. Обычно фаза несбалансированного роста клеток длится по меньшей мере около 1 ч, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 5 ч, и иногда по меньшей мере около 8 ч, например, приблизительно от 5 до 48 ч, и в некоторых случаях, приблизительно от 5 до 24 ч.

По окончании фазы несбалансированного роста клеток можно собрать урожай метанотрофов для извлечения РНА. Может быть использован любой подходящий способ извлечения РНА метанотрофов. Если желательным конечным продуктом является одноклеточный белок, то по окончании фазы несбалансированного роста клеток собирают урожай метанотрофов. Обычно твердое вещество, содержащее клетки, отделяют и обезвоживают. Сушку твердого вещества обычно проводят с целью стабилизации содержания белка в одноклеточном белковом продукте.

Процессы настоящего изобретения могут быть непрерывными, полунепрерывными или периодическими. В непрерывных процессах предпочтительно используют по меньшей мере два биореактора в последовательной схеме, причем в первом реакторе происходит рост популяции метанотрофов, а во втором - протекает фаза несбалансированного роста клеток, для продуцирования РНА. В периодическом процессе может быть использован один или несколько биореакторов, причем в каждом из них могут происходить циклы условий сбалансированного роста клеток и несбалансированного роста клеток, или в качестве альтернативы, один или несколько биореакторов могут быть предназначены для сбалансированного роста клеток, причем бульон, содержащий метанотрофы, поступает в отдельный биореактор, предназначенный для несбалансированного роста клеток. Эта система реакторов обычно называется "исходный" и "дочерний" биореакторы. В предпочтительном полунепрерывном процессе, в одном или нескольких исходных биореакторах непрерывно выращивается популяция метанотрофов. Часть бульона периодически выводится из исходного биореактора и поступает в ряд дочерних биореакторов. Предпочтительно часть извлеченного из исходного биореактора бульона является такой, что в исходном реакторе остается достаточно бульона, чтобы популяция метанотрофов быстро достигла желательного уровня плотности для осуществления несбалансированного роста клеток. Например, после извлечения части бульона в исходном биореакторе может оставаться приблизительно 25% объема бульона, что может привести к достижению желательной плотности при несбалансированном росте клеток приблизительно через два удвоения популяции. Часто объем бульона, остающегося в исходном биореакторе, составляет по меньшей мере приблизительно 10 объемных процентов, например, приблизительно от 20 до 50 об.%. Количество дочерних биореакторов на один исходный биореактор для полунепрерывного процесса обычно составляет приблизительно от 2 до 10. Таким образом, в комбинации дочерних биореакторов можно обеспечить относительно непрерывное поступление клеток для извлечения продукта, содержащего РНА.

Каждый биореактор может иметь любую подходящую конфигурацию, включая (без ограничения указанным) биореакторы с погруженными баками (например, биореакторы с погруженными баками и барботажной колонной); биореакторы со струевым контуром; перемешиваемые биореакторы; биореакторы с фильтрующим слоем; биореакторы с биопленкой; биореакторы с движущимся слоем; мембранные биореакторы и статические перемешиваемые биореакторы, включая (без ограничения) трубчатые биореакторы. По желанию, для сбалансированного роста клеток и для несбалансированного роста клеток могут быть использованы два или больше биореакторов, причем указанные биореакторы могут иметь одинаковую или различную конструкцию. Например, после перемешиваемого биореактора может следовать биореактор с погруженными баками. Если желательна высокая конверсия метана в метаносодержащих

газах, то предпочтительно используются биореакторы с погруженными баками. Эти биореакторы с погруженными баками характеризуются глубиной погружения по меньшей мере приблизительно 5 м, и предпочтительно по меньшей мере около 10 м, и могут эксплуатироваться с целью получения существенно неоднородного состава газа по всей глубине бульона, содержащегося в биореакторе и практически однородного состава бульона по всему биореактору. Биореакторы с погруженными баками и барботажной колонной представляют собой биореакторы с погруженными баками, где газ, содержащий метан, и кислородсодержащий вводятся как небольшие пузырьки в нижней части колонны, обеспечивая перемешивание. Предпочтительно каждый компонент сырья -метансодержащий газ и кислородсодержащий газ - вводятся в виде микропузырьков, имеющих диаметр в диапазоне от 0,01 до 0,5, предпочтительно от 0,02 до 0,3 мм. Применение аэраторов или инжекторов с использованием стимулирующих жидкостей является предпочтительным для формирования микропузырьков. Во многих случаях метанотрофы подвергаются небольшому повреждению при пропускании через аэраторы или инжекторы, и поэтому в этих случаях метанотрофы можно не удалять до повторного введения в биореактор бульона, обеднённого диоксидом углерода.

Может быть использовано любое подходящее оборудование для десорбции диоксида углерода из извлеченного бульона. Примеры указанного оборудования включают распыляющие колонны, барботажные колонны, колонны с насадкой или структурированные колонны или обезгаживающие мембраны. Благодаря низкому перепаду давления, предпочтительными являются колонны с насадкой или структурированные колонны.

Хотя при десорбции диоксида углерода из извлеченного бульона происходит удаление тепла за счет экзотермической метаболической активности, обычно требуется дополнительное охлаждающее устройство для того, чтобы предотвратить чрезмерное выделение тепла в ходе фазы сбалансированного роста клеток и фазы несбалансированного роста клеток. Часто, когда плотность клеток в биореакторе приближается к желательной максимальной концентрации, при охлаждении извлеченного бульона во время десорбции диоксида углерода происходит удаление приблизительно от 10 до 50%, например, приблизительно от 15 до 40% тепла, что необходимо для поддержания в биореакторе изотермических условий. Вспомогательные технологические устройства для теплопереноса, необходимые для поддержания изотермических условий, могут представлять собой один или несколько аппаратов прямого и косвенного теплообмена. Например, прямой теплообмен в непрерывном процессе можно обеспечить путем непрерывного добавления холодной свежей воды, чтобы заменить бульон, непрерывно удаленный из биореактора.

Для облегчения общего понимания изобретения и его применения можно рассмотреть чертеж. Указанный чертеж не является ограничением широких замыслов изобретения. Чертеж представляет собой схематическое изображение устройства, в целом обозначенного позицией 100, применяемого для практического осуществления способов настоящего изобретения. На чертеже не включено второстепенное оборудование, такое как насосы, компрессоры, клапаны, измерительные приборы и другие устройства, расположение и работа которых хорошо известны специалистам в области химической технологии. Кроме того, на чертеже исключены вспомогательные технологические устройства. Способ и эксплуатация устройства на чертеже описаны в контексте применения биогаза из анаэробного автоклава и воздуха для производства полигидроксibuтирата и воздуха для десорбции диоксида углерода. Способ можно легко приспособить для использования других метансодержащих газов, кислородсодержащих газов и десорбирующих газов, а также для производства других полимеров РНА и продуктов одноклеточного белка.

Биореактор 102 представляет собой реактор с погруженным баком и барботажной колонной и содержит бульон 104. В изображенном устройстве, биореактор 102 используется для сбалансированного роста клеток, а также несбалансированного роста клеток. Выше бульона 104 находится свободное пространство 106 и линия вывода 108 для удаления непрореагировавших газов из биореактора. Указанные непрореагировавшие газы могут быть использованы для генерации тепла или направляются в отходы.

Часть бульона в биореакторе 102 проходит по линии 110 в десорбер 112. В линии 110 метан, растворенный в извлеченном бульоне, продолжает усваиваться метанотрофами, так что извлеченный бульон, поступающий в десорбер 112 содержит немного растворенного метана (если он вообще есть). Как показано, десорбер 112 содержит структурированную насадку 114. Линия 110 распределяет бульон наверху структурированной насадки 114 для контакта с десорбирующим газом, который, в рамках настоящего рассмотрения, представляет собой воздух, подаваемый по линии 118 снизу структурированной насадки. Десорбирующий газ, обогащенный диоксидом углерода, выходит из десорбера 112 по линии 116. Часть бульона, обедненного диоксидом углерода, собирается внизу десорбера 112 для прохода по линии 120 в теплообменник 122 косвенного нагрева. Бульон по линии 124 выходит из теплообменника 122 косвенного нагрева. Другая часть бульона, обедненного диоксидом углерода, выводится по линии 126. Относительное количество части бульона, обедненного диоксидом углерода, поступающего в теплообменник 122, и части бульона, обедненного диоксидом углерода, проходящего по линии 126, будет зависеть от желательной температуры в массе этих частей. Например, в течение начального этапа сбалансированного роста клеток, для охлаждения, осуществляемого в десорбере 112, может потребоваться, чтобы не вся масса бульона, обедненного диоксидом углерода, подвергалась дополнительному охлаждению в теп-

лообменнике 122. Перепуск части бульона, обедненного диоксидом углерода, приводит к комбинированной температуре массы бульона, который возвращается в биореактор 102, соответствующей для поддержания постоянной температуры бульона в биореакторе 102. Позднее при сбалансированном росте клеток, практически весь бульон, обедненный диоксидом углерода, проходит в теплообменник 122 для того, чтобы поддержать изотермические условия в биореакторе 102. В качестве альтернативы, в течение раннего периода процесса, часть десорбирующего газа, обогащенного диоксидом углерода, из линии 116 смешивается с десорбирующим газом, поступающим по линии 118, чтобы снизить движущую силу испарения диоксида углерода в бульоне. Поскольку испарение диоксида углерода будет происходить в меньшей степени, охлаждение уменьшается.

Теплообменник 122 может иметь любую подходящую конструкцию. В настоящем изобретении рассматривается комбинация теплообменника с тепловым насосом, где тепловой насос обеспечивает повышенную температуру флюида для использования в способе изобретения или в другом способе. В некоторых случаях, подогретый флюид из теплового насоса может быть использован для косвенного теплообмена с десорбирующим газом, например, воздухом, с целью снижения его влажности и обеспечить повышенное испарение воды во время десорбции и, таким образом, большую степень охлаждения путем испарения. В качестве альтернативы, подогретый флюид может быть использован для уменьшения тепловой энергии, необходимой для извлечения РНА из клеток.

Как будет описано ниже, рециркулирующий бульон используется в качестве стимулирующей жидкости для введения метаносодержащих газов и кислородсодержащих газов в биореактор 102. Линия 128 служит для балансирования скорости потока рециркулирующего бульона в каждой из линий 126 и 124, который требуется в качестве стимулирующей жидкости.

Бульон, рециркулирующий в линии 124 поступает в насос 130 и затем по линии 132 возвращается в биореактор 102. Бульон в линии 128 поступает в насос 136 и затем по линии 138 возвращается в биореактор 102. Газ, содержащий метан, и кислородсодержащий газ можно вводить в биореактор 102 любым удобным способом. Особенно привлекательным является использование инжекторов (газожидкостных аэраторов), в которых могут образоваться очень мелкие пузырьки при относительно низком потреблении энергии. Инжекторы могут быть струйными смесителями/аэраторами или инжекторами с плоской струей. Инжекторы с плоской струей являются предпочтительными, одна из их форм раскрыта в патенте США № 4,162,970. Указанные инжекторы работают с использованием стимулирующей жидкости. Инжекторы, особенно инжекторы с плоской струей, способны работать с самыми разнообразными скоростями потоков жидкостей и газов и, таким образом, способны значительно снижать способность переноса в газовой фазе. Инжекторы характеризуются соплом, которое имеет размер поперечного сечения по меньшей мере приблизительно 1 см, часто от 1,5 до 5 см, например, от 2 до 4 см в случае струйных инжекторов, или имеет меньший размер поперечного сечения в случае инжекторов с плоской струей. На размер пузырьков, образующихся с помощью инжекторов будут влиять, среди других факторов, скорость потока жидкости через инжектор и отношение газовой фазы к жидкой фазе, проходящих через инжектор, а также собственные характеристики бульона, включающие (без ограничения) статическую глубину жидкости. В некоторых случаях микропузырьки, которые образуют менее плотную газожидкостную дисперсию и любую стимулирующую жидкость, используемую для образования микропузырьков, могут способствовать перемешиванию жидкости в биореакторе. Большой размер поперечного сечения инжекторов обеспечивает некоторые преимущества, кроме способности к образованию микропузырьков. Во-первых, они не способны загрязняться, поскольку бульон используется в качестве стимулирующей жидкости, как было бы в случае барботёра, предназначенного для образования микропузырьков. Во-вторых, энергия, необходимая для образования микропузырьков заданного размера, часто меньше энергии, необходимой для образования микропузырьков такого же размера с использованием барботёра. В третьих, может быть достигнута высокая степень уменьшения скорости. И в четвертых, размер микропузырьков можно легко варьировать в широком диапазоне. Кислородсодержащий газ поступает в инжекторы по линии 134, и метан поступает в инжекторы по линии 140.

Питательные вещества и свежая вода подаются в бульон 104 в биореакторе 102 по линии 142.

С целью иллюстрации эксплуатации (но без ограничения указанным), биореактор 102 представляет собой реактор объемом 60000 л, заполненный бульоном приблизительно на глубину 10 м и инокулированный метанотрофами. Стерилизация биореактора 102 до инокулирования не является существенной. Биогаз со скоростью 1850 л/мин, содержащий приблизительно 23 мол.% метана, поступает в биореактор 102. При увеличении популяции метанотрофов (если не до полного объема) можно вводить дополнительно воду и/или питательные вещества и другие добавки по линии 142 или непрерывно, или прерывисто для того, чтобы увеличить объем бульона относительно пропорционально росту популяции метанотрофов. Поток метаносодержащих газов и кислородсодержащих газов запускается в момент инокулирования бульона или сразу после инокулирования. В случае введения газов с использованием инжектора, обычно предпочитают выводить часть бульона из биореактора 102, которая прямо или косвенно поступает в каждый из насосов 130 и 136 для подачи стимулирующей жидкости (не показано).

Когда популяция метанотрофов увеличивается в такой степени, что желательно удалить диоксид углерода из бульона с целью усиления массопереноса метана и кислорода в жидкую фазу, бульон, при-

близительно 4500 л/мин, пропускают по линии 110 в десорбер 112. Приблизительно 135000 литров (при стандартной температуре и давлении) воздуха пропускают в десорбер 112 по линии 118, при этом удаляют приблизительно 99 процентов диоксида углерода, растворенного в бульоне. Как указано выше, в зависимости от температуры в биореакторе, бульон, обедненный диоксидом углерода, удаляют по одной из линий 120 и 126 (или обеим) для рециркуляции в биореактор 102. По сравнению со способом, осуществляемым без десорбции диоксида углерода из бульона, согласно изобретению требование на охлаждение испарением снижается приблизительно на 47% (в момент потребности в экстренном охлаждении), и движущая сила для массопереноса метана в бульон увеличивается приблизительно на 35%.

Когда плотность метанотрофов в бульоне в биореакторе 102 достигает желательного уровня, режим эксплуатации биореактора 102 переключается на несбалансированный рост клеток путем изменения состава питательных веществ, поступающих в биореактор 102 по линии 142. По окончании фазы несбалансированного роста клеток, собирают урожай метанотрофов и извлекают РНА.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Высокопроизводительный способ биоконверсии метана в продукт, содержащий полигидроксиалканат, включающий:

(a) пропускание газообразного субстрата, включающего метансодержащий газ и кислородсодержащий газ, в реакционную зону для контакта в условиях ферментации с водной средой, в которой имеется популяция метанотрофов, причём указанная среда содержит питательные вещества для роста популяции метанотрофов, чтобы получить водную среду, обогащенную метанотрофами, указанный рост популяции метанотрофов также приводит к выделению диоксида углерода, воды и тепла, и удаление непрореагировавшего газа из указанной реакционной зоны;

(b) пропускание метансодержащего газа и кислородсодержащего газа в реакционную зону для контакта в условиях ферментации по меньшей мере с частью водной среды, обогащенной метанотрофами, причём в указанной среде имеется ограничение по меньшей мере одного питательного вещества, необходимого для роста популяции метанотрофов, для создания условий лимитирования питательных веществ, в которых ингибируется рост популяции метанотрофов и стимулируется продуцирование полигидроксиалканата метанотрофами с одновременным выделением диоксида углерода, воды и тепла, и удаление непрореагировавшего газа из указанной реакционной зоны; и

(c) выделение метанотрофов, содержащих полигидроксиалканат, из водной среды на стадии (b), где по меньшей мере в части продолжительности каждой из стадий (a) и (b):

i) скорость пропускания по меньшей мере одного газообразного субстрата, включающего газ, в реакционную зону на каждой из стадий (a) и (b) контролируется условиями диффузии субстрата;

ii) по меньшей мере на одной из стадий (a) и (b) часть водной среды непрерывно выводится из реакционной зоны и контактирует с десорбирующим газом, чтобы удалить диоксид углерода и получить водную среду, обедненную диоксидом углерода; и

iii) пропускание по меньшей мере части обедненной диоксидом углерода водной среды в реакционную зону по меньшей мере на одной из стадий (a) и (b).

2. Способ по п.1, в котором скорость пропускания метансодержащего газа в реакционную зону по меньшей мере на одной из стадий (a) и (b) регулируется, чтобы получить практически стабильную молярную концентрацию метана в непрореагировавших газах.

3. Способ по п.1, в котором метансодержащее сырье содержит сероводород, и при этом водная среда поглощает по меньшей мере часть сероводорода, чтобы получить поток непрореагировавшего газа, содержащий пониженную концентрацию сероводорода.

4. Способ по п.1, в котором реакционная зона по меньшей мере на одной из стадий (a) и (b) представляет собой погруженный бак с барботажной колонной, причем реакционная зона характеризуется существенно однородным составом жидкости и практически неоднородным составом газа по всей высоте реакционной зоны, и по меньшей мере часть указанного субстрата, включающего газ, вводится в нижнюю часть реакционной зоны.

5. Способ по п.1, в котором скорость выведения водной среды на стадии (ii) является достаточной, чтобы удалить количество диоксида углерода, эквивалентное по меньшей мере приблизительно 40% диоксида углерода, образовавшегося за счет метаболической активности в реакционной зоне.

6. Способ по п.5, в котором скорость выведения водной среды на стадии (ii) является достаточной, чтобы удалить от 50 до 75% диоксида углерода, образовавшегося за счет метаболической активности в реакционной зоне.

7. Способ по п.1, в котором по меньшей мере одно кислородсодержащее соединение  $Cl$  добавляют в реакционную зону на стадии (a), когда скорость подачи метансодержащего газа в реакционную зону уже не контролируется условиями диффузии метана.

8. Способ по п.1, в котором охлаждается часть обедненной диоксидом углерода водной среды, поступающей в реакционную зону по меньшей мере на одной из стадий (a) и (b).

9. Способ по п.1, в котором стадии (a) и (b) проводятся последовательно, в сосудах реактора.

10. Способ по п.1, в котором каждая из стадий (а) и (b) проводится в отдельном сосуде реактора.
11. Способ по п.10, в котором часть водной среды в реакционной зоне стадии (а) поступает в реакционную зону стадии (b).
12. Способ по п.10, в котором предусмотрены по меньшей мере две реакционные зоны стадии (b) для каждой реакционной зоны стадии (а), и часть водной среды со стадии (а) поступает по меньшей мере на одну из стадий (b) реакционной зоны в данный момент времени, чтобы получить полупериодический способ.
13. Способ по п.12, в котором часть, поступающая на одну из стадий (b) реакционной зоны в данный момент времени, составляет от 25 до 95% от объема водной среды в реакционной зоне стадии (а), причем предусмотрено дополнительное количество водной среды для реакционной зоны на стадии (а) с целью роста популяции метанотрофов.
14. Способ по п.1, в котором метансодержащий газ включает в себя биогаз.
15. Способ по п.14, в котором метансодержащий газ включает в себя анаэробный биогаз.
16. Способ по п.14, в котором метансодержащий газ включает в себя по меньшей мере один газ из органических отходов и остаточный газ, произведенный непосредственно или косвенно в другом способе ферментации.
17. Способ по п.1, в котором обеднённую диоксидом углерода водную среду подвергают косвенному теплообмену с охлаждающим флюидом для дополнительного охлаждения обеднённой диоксидом углерода водной среды и нагревания охлаждающего флюида.
18. Способ по п.17, в котором нагретый охлаждающий флюид из косвенного теплообменника поступает в тепловой насос, чтобы получить перегретый флюид.
19. Способ по п.18, в котором перегретый флюид используется для нагревания десорбирующего газа.
20. Способ по п.18, в котором перегретый флюид используется при извлечении полигидроксиканоата из метанотрофов.
21. Способ по п.1, в котором водную среду выводят из нижней части реакционной зоны по меньшей мере на одной из стадий (а) и (b), которая подвергается условиям вскипания с целью удаления из нее части диоксида углерода, и затем подвергается контакту с десорбирующим газом.
22. Высокопроизводительный способ биоконверсии метана в продукт, содержащий полигидроксиканоат, включающий:
  - (а) пропускание газообразного субстрата, включающего метансодержащий газ и кислородсодержащий газ, в реакционную зону для контакта в условиях ферментации с водной средой, в которой имеется популяция метанотрофов, причем указанная среда содержит питательные вещества для роста популяции метанотрофов, чтобы получить водную среду, обогащенную метанотрофами, указанный рост популяции метанотрофов также приводит к выделению диоксида углерода, воды и тепла, и удаление непрореагировавшего газа из указанной реакционной зоны;
  - (b) пропускание метансодержащего газа и кислородсодержащего газа в реакционную зону для контакта в условиях ферментации по меньшей мере с частью водной среды, обогащенной метанотрофами, причём в указанной среде имеется существенное отсутствие по меньшей мере одного питательного вещества, необходимого для роста популяции метанотрофов, чтобы стимулировать продуцирование полигидроксиканоата с одновременным выделением диоксида углерода, воды и тепла, и удаление непрореагировавшего газа из указанной реакционной зоны; и
  - (с) выделение метанотрофов, содержащих полигидроксиканоат, из водной среды на стадии (b), где по меньшей мере в части продолжительности каждой из стадий (а) и (b):
    - i) скорость пропускания по меньшей мере одного газообразного субстрата, включающего газ, в реакционную зону на каждой из стадий (а) и (b) контролируется условиями диффузии субстрата;
    - ii) по меньшей мере на одной из стадий (а) и (b) часть водной среды непрерывно выводится из реакционной зоны и контактирует с полупроницаемой мембраной, чтобы удалить диоксид углерода и получить водную среду, обеднённую диоксидом углерода; и
    - iii) пропускание по меньшей мере части обеднённой диоксидом углерода водной среды в реакционную зону по меньшей мере на одной из стадий (а) и (b).

