

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202193209 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2022.05.31(51) Int. Cl. C12N 1/30 (2006.01)  
C12M 1/04 (2006.01)  
C12M 1/34 (2006.01)(22) Дата подачи заявки  
2020.06.11

## (54) СПОСОБ РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССА ФЕРМЕНТАЦИИ

(31) PA 2019 00714

(72) Изобретатель:

(32) 2019.06.13

Нанди Субир Кумар (DK), Петерсен  
Леандер (US)

(33) DK

(86) PCT/EP2020/066198

(74) Представитель:

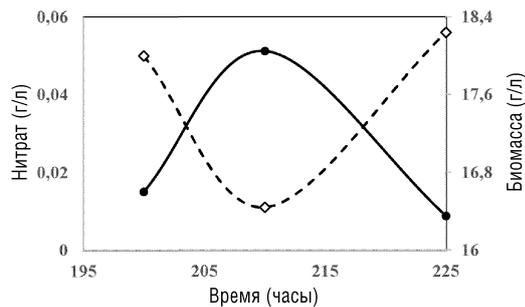
(87) WO 2020/249670 2020.12.17

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

УНИБИО А/С (DK)

(57) Изобретение относится к способу ферментации для сбраживания по меньшей мере одного микроорганизма, где способ ферментации включает стадии (а) подачи ферментационного бульона, содержащего по меньшей мере один микроорганизм, в реактор для ферментации; (b) подачи углеродного субстрата в реактор для ферментации, позволяющей газообразному углеродному субстрату растворяться или частично растворяться в ферментационном бульоне; (с) подачи азотного субстрата в реактор для ферментации, позволяющей газообразному азотному субстрату растворяться или частично растворяться в ферментационном бульоне; и (d) поддержания концентрации нитрата в ферментационном бульоне ниже 0,035 г/л и/или поддержания концентрации нитрата в ферментационном бульоне ниже 0,01 г нитрата/г биомассы, где по меньшей мере один метанотрофный организм содержит по меньшей мере один метанотрофный микроорганизм.



A1

202193209

202193209

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-572094EA/019

### СПОСОБ РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССА ФЕРМЕНТАЦИИ

#### Область техники

Настоящее изобретение относится к способу ферментации и к реактору для ферментации, применяемым в целях улучшения производства биомассы. В частности, настоящее изобретение относится к способу и к реактору для ферментации для сбраживания метанотрофных микроорганизмов, где концентрация нитрата строго регулируется для оптимизации процесса ферментации.

#### Предпосылки создания изобретения

Источник азота вместе с источником углерода необходимы для роста микроорганизмов во время ферментации. Источник азота необходим микроорганизмам для синтеза белков, нуклеиновых кислот и других клеточных компонентов.

В зависимости от ферментативных способностей микроорганизма, азот может продуцироваться в виде основного белка, такого как соевая мука; в виде предварительно расщепленных полипептидов, таких как пептон или триптон; или в виде аммиачных или нитратных солей. Выбор источника азота может иметь важное значение и зависеть от производимого продукта, поскольку стоимость источника азота является важным фактором.

Даже сам источник азота является важным компонентом для роста микроорганизмов, и специалистам в данной области также известно, что метанотрофные микроорганизмы очень чувствительны к нагрузке азота, на которую могут влиять форма и количество источника азота.

Ранее предполагалось, что различие в толерантности к аммиаку и нитриту может быть связано с различными аффинностями ферментов метанмонооксигеназы, например, к аммиаку, или с токсическим действием нитрита.

Метанмонооксигеназные Ферменты ответственны за обеспечение метанотрофии у метанотрофных микроорганизмов, и в то же время, они осуществляют окисление доступных источников азота, что приводит к образованию многочисленных побочных продуктов совместного метаболизма. При выращивании метанотрофных микроорганизмов, таких как *M. capsulatus*, источники азота, такие как аммиак, легко окисляются метанмонооксигеназами *Methylococcus capsulatus* даже при низких внеклеточных концентрациях, если метан не присутствует в избыточном количестве.

Чтобы получить конкурентноспособный по цене продукт моноклеточного белка (SCP) путем ферментации *Methylococcus capsulatus*, в качестве источника азота для ферментации часто используется аммиак. Растворимость аммиака в водном ферментационном бульоне на много порядков выше растворимости метана, который может быть использован в качестве источника углерода, что делает окисление аммиака реальной проблемой, даже если очевидная насущная проблема массопереноса газа в жидкость может быть решена с использованием реактора соответствующей конструкции.

Следовательно, были бы предпочтительно разработать усовершенствованный способ ферментации и/или реактор для ферментации, а в частности, было бы предпочтительно разработать более эффективный и/или регулируемый способ ферментации и/или реактор для ферментации, где источник азота будет регулироваться для улучшения производства метанотрофной биомассы.

### **Сущность изобретения**

Таким образом, целью настоящего изобретения является разработка усовершенствованного способа ферментации для сбраживания метанотрофных микроорганизмов, таких как *Methylococcus capsulatus*.

В частности, целью настоящего изобретения является разработка более эффективного и/или регулируемого процесса ферментации и/или реактора для ферментации, так, чтобы можно было регулировать источник азота для улучшения производства метанотрофной биомассы, а также разработка способа ферментации и/или реактора для ферментации, которые позволили бы решить вышеупомянутые уже существующие проблемы, связанные с регуляцией уровня источника азота, подаваемого во время ферментации, для обеспечения питательного вещества для роста микроорганизмов, таких как метанотрофные микроорганизмы, но в то же время, в отсутствие каких-либо уровней образования конкурентного ингибитора утилизации метана.

Таким образом, в одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу ферментации для сбраживания ферментационного бульона, содержащего по меньшей мере один микроорганизм, в реакторе для ферментации, где способ ферментации включает стадии:

а) подачи углеродного субстрата в реактор для ферментации, позволяющей углеродному субстрату растворяться или частично растворяться в ферментационном бульоне;

б) подачи азотного субстрата в реактор для ферментации, позволяющей азотному субстрату растворяться или частично растворяться в ферментационном бульоне; и

с) поддержания концентрации нитрата в ферментационном бульоне ниже 0,035 г/л и/или поддержания концентрации нитрата в ферментационном бульоне ниже 0,01 г нитрата/г биомассы;

где по меньшей мере один микроорганизм включает по меньшей мере один метанотрофный микроорганизм.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к реактору для ферментации, содержащему часть контура и верхний резервуар, где указанная часть контура включает нисходящую часть, соединенную с восходящей частью посредством U-образной части, где верхний резервуар включает:

(i) первое выпускное отверстие, соединяющее верхний резервуар с нисходящей частью контура и позволяющее ферментационной жидкости, присутствующей в верхнем резервуаре, вытекать из верхнего резервуара в часть контура;

(ii) первое впускное отверстие, соединяющее верхний резервуар с восходящей частью контура, и позволяющее ферментационной жидкости, присутствующей в части контура, вытекать из части контура в верхний резервуар;

(iii) вентиляционную трубку для отвода отработанных газов, выходящих из верхнего резервуара; и

(iv) средства визуального наблюдения.

где реактор для ферментации дополнительно включает:

(v) по меньшей мере одно впускное отверстие для подачи субстрата, содержащего соединение аммония; и

(vi) по меньшей мере датчик для определения концентрации нитрата в ферментационном бульоне.

### **Краткое описание чертежей**

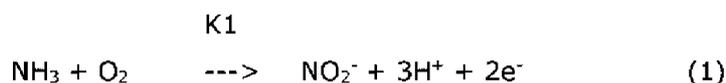
На фигуре 1 показано, что производство биомассы на опытной установке (сплошная линия) со временем снижается, так как продуцирование нитратов (пунктирная линия) со временем увеличивается, и наоборот. Эта тенденция была обнаружена в лабораторных испытаниях, на опытной установке, а также на предприятии-изготовителе.

Настоящее изобретение будет более подробно описано ниже.

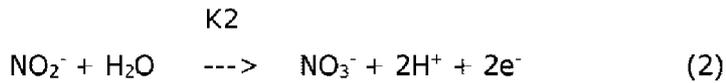
### **Подробное описание изобретения**

Соответственно, авторами настоящего изобретения было обнаружено, что, поскольку источник азота, используемый в процессе ферментации, может действовать как питательное вещество для роста микроорганизмов, таких как метанотрофные микроорганизмы, а также в качестве конкурентного ингибитора утилизации метана, например, посредством ингибирования метанмонооксигеназных ферментов, то следует регулировать и/или контролировать концентрацию источника азота так, чтобы оптимизировать продуцирование биомассы метанотрофными микроорганизмами, такими как *Methylococcus capsulatus*.

*Methylococcus capsulatus* окисляет аммиак ( $\text{NH}_3$ ) или аммоний ( $\text{NH}_4^+$ ) до нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ), где необходимые ферменты, участвующие в этом процессе, представляют собой метанмонооксигеназу (ММО), которая способна окислять аммиак и метан, а также гидроксиламиноксидоредуктазу (НАО) посредством нижеследующей реакции. Эта реакция требует присутствия кислорода.



Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы настоящего изобретения лишь отмечают, что нитрит, продуцируемый метанотрофным микроорганизмом, таким как *Methylococcus capsulatus*, на первой стадии (K1) аутоτροφной нитрификации окисляется до нитрата нитрит-оксидоредуктазой (NXR) посредством нижеследующей реакции:



Считается, что скорость вышеуказанных реакций (K1 и K2) и обратимых реакций, если они проводятся в комбинации, является достаточной для образования нитрата, по существу, непосредственно из аммиака с очень низкими следовыми количествами нитрита, если такие реакции проводят с использованием метанотрофных микроорганизмов, таких как *M. capsulatus*.

В ходе экспериментов, авторами настоящего изобретения было неожиданно обнаружено, что подача источника азота, такого как аммиак, для ферментации метанотрофных микроорганизмов, таких как *M. capsulatus*, должна контролироваться и регулироваться так, чтобы концентрация нитрата была ниже определенного уровня во избежание снижения выработки биомассы и/или обеспечения ее продуцирования на высоком уровне.

В контексте настоящего изобретения, термин «продуцирование биомассы на высоком уровне» относится к концентрации биомассы выше 1 г/л; например, выше 5 г/л; например, выше 10 г/л; например, выше 15 г/л; например, выше 20 г/л; например, выше 25 г/л; например, выше 30 г/л; например выше 50 г/л; например, выше 70 г/л; например, в пределах 1-100 г/л; например, в пределах 5-90 г/л; например, в пределах 10-80 г/л; например, в пределах 20-70 г/л; например, в пределах 30-65 г/л; например, в пределах 40-60 г/л; например, в пределах 45-55 г/л.

Следовательно, нитрат, образованный метанотрофными микроорганизмами, такими как *M. capsulatus*, при культивировании, например, с использованием аммиака в качестве источника азота, может быть использован в качестве надежного индикатора стресса при ферментации, и, следовательно, процесс ферментации можно контролировать путем регуляции концентрации нитрата, например, путем уменьшения потока источника азота в реакторе для ферментации или даже остановки потока до 0 л/мин.

Авторами настоящего изобретения было обнаружено, что этот способ контроля или регуляции процесса ферментации может иметь важное значение для обеспечения высокой продуктивности метанотрофной биомассы, такой как биомасса *M. capsulatus*, независимо от того, выполняется ли процесс ферментации в периодическом режиме, в периодическом режиме с подпиткой или в непрерывном режиме.

Этот эффект и важная роль контроля и/или регуляции были продемонстрированы в приведенном ниже эксперименте в лабораторных испытаниях, в экспериментальном масштабе, и на производстве/в промышленности.

Соответственно, авторами настоящего изобретения было неожиданно обнаружено, что в процессе ферментации и в реакторе для ферментации, источник азота можно контролировать и/или регулировать для улучшения продуцирования метанотрофной биомассы.

В своем предпочтительном варианте, настоящее изобретение относится к способу

ферментации для сбраживания ферментационного бульона, содержащего по меньшей мере один микроорганизм, в реакторе для ферментации, где способ ферментации включает стадии:

d) подачи углеродного субстрата в реактор для ферментации, позволяющей углеродному субстрату раствориться или частично растворяться в ферментационном бульоне;

e) подачи азотного субстрата в реактор для ферментации, позволяющей азотному субстрату растворяться или частично растворяться в ферментационном бульоне; и

f) поддержания концентрации нитрата в ферментационном бульоне ниже 0,035 г/л и/или поддержания концентрации нитрата в ферментационном бульоне ниже 0,01 г нитрата/г биомассы;

где по меньшей мере один микроорганизм включает по меньшей мере один метанотрофный микроорганизм.

Концентрация нитрата в ферментационном бульоне во время ферментации может поддерживаться ниже 0,035 г/л; например, ниже 0,033 г/л; например, ниже 0,03 г/л; например, ниже 0,028 г/л; например, ниже 0,025 г/л; например, ниже 0,022 г/л; например, ниже 0,02 г/л; например, ниже 0,018 г/л; например, ниже 0,015 г/л; например, ниже 0,01 г/л; например, ниже 0,005 г/л; например, ниже 0,01 г/л; например, 0 г/л.

В одном из вариантов осуществления изобретения, концентрация нитрата в ферментационном бульоне во время ферментации составляет в пределах 0-0,035 г/л; например, в пределах 0,001-0,033 г/л; например, в пределах 0,002-0,03 г/л; например, в пределах 0,003-0,025 г/л; например, в пределах 0,004-0,02 г/л; например, в пределах 0,005-0,015 г/л; например, в пределах 0,007-0,01 г/л.

Источник азота может представлять собой газообразный азотный субстрат или водный азотный субстрат.

Предпочтительно, источник азота может быть выбран из аммиака, соединений аммония и/или молекулярного азота. Еще более предпочтительным источником азота является аммиак.

Соединение аммония может быть выбрано из карбоната аммония; хлорида аммония; сульфата аммония; гидроксида аммония; и/или нитрата аммония. Предпочтительно, соединение аммония представляет собой гидроксид аммония.

В одном из вариантов осуществления изобретения, источник азота может подаваться в ферментационный бульон в концентрации ниже 0,1 г/л; например, ниже 0,09 г/л; например, ниже 0,08 г/л; например, ниже 0,07 г/л; например, ниже 0,06 г/л; например, ниже 0,05 г/л; например, 0,04 г/л; например, ниже 0,03 г/л; например, 0,02 г/л; например, ниже 0,01 г/л; например, 0,005 г/л; например, ниже 0,001 г/л.

В другом варианте осуществления изобретения, источник азота может подаваться в ферментационный бульон в концентрации в пределах 0,001-0,1 г/л; например, в пределах 0,005-0,09 г/л; например, в пределах 0,01-0,08 г/л; например, в пределах 0,02-0,075 г/л; например, в пределах 0,04-0,07 г/л; например в пределах 0,05-0,06 г/л.

В еще одном варианте осуществления изобретения, источник азота, подаваемый в реактор для ферментации, может не быть нитратом.

Концентрация нитрата в ферментационном бульоне может зависеть от концентрации биомассы. Следовательно, в предпочтительном варианте осуществления изобретения, концентрация нитрата в ферментационном бульоне может поддерживаться ниже 0,01 г нитрата/г биомассы; например, ниже 0,008 г нитрата/г биомассы; например, ниже 0,006 г нитрата/г биомассы; например, ниже 0,004 г нитрата/г биомассы; например, ниже 0,002 г нитрата/г биомассы; например, ниже 0,001 г нитрата/г биомассы; например, ниже 0,0005 г нитратов/г биомассы; например, 0 г нитрата/г биомассы. Это вычисление концентрации нитрата проводят в ферментационном бульоне, содержащем жизнеспособные метанотрофные микроорганизмы.

Углеродный субстрат предпочтительно может представлять собой газообразный углеродный субстрат.

Предпочтительно, углеродный субстрат может быть выбран из алкана, где алкан предпочтительно представляет собой соединение C1. Еще более предпочтительно, углеродный субстрат может представлять собой метан, метанол, природный газ, биогаз, синтез-газ или любые их комбинации. Еще более предпочтительно, углеродный субстрат может представлять собой метан.

Как упоминалось выше, источник углерода и/или источник азота (а также другие ингредиенты, добавляемые в ферментационный бульон) могут быть добавлены в виде газа, а поэтому необходимо, чтобы эти газы растворялись в ферментационном бульоне, который может представлять собой водный ферментационный бульон, доступный для микроорганизмов и доступный для продуцирования биомассы.

Обычно, в промышленности существует проблема с массопереносом субстратов (например, источника углерода и источника кислорода), и в настоящее время, массоперенос представляет особый интерес, а поэтому были предприняты усилия по его улучшению. Описание одного из способов улучшения ферментации в ферментере с U-образным контуром можно найти в WO 2010/069313 и/или WO 2003/016460, которые включены в настоящее описание посредством ссылки.

Таким образом, в настоящем изобретении, термин «растворенный или частично растворенный в ферментационном бульоне» относится к проблемам, известным специалистам в данной области, а именно, к проблемам, связанным с превращением газообразных субстратов из газовой фазы в водную фазу, которая может быть использована по меньшей мере для одного микроорганизма.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения, определяемая концентрация нитрата может представлять собой концентрацию растворенного нитрата.

В другом варианте осуществления изобретения, концентрация нитрата в ферментационном бульоне может быть определена с помощью поточного анализа; анализа в режиме онлайн, либо с помощью анализа в режиме офлайн, либо анализа в оперативном режиме. Предпочтительно, концентрация нитрата в ферментационном

бульоне может быть определена с помощью поточного анализа или анализа в режиме онлайн.

В еще одном дополнительном варианте осуществления изобретения, концентрацию нитрата в ферментационном бульоне можно непрерывно определять с помощью поточного анализа или анализа в режиме онлайн.

В контексте настоящего изобретения, термин «поточный анализ» относится к датчику, который может быть помещен в технологический резервуар или в поток текущего материала для проведения анализа одного или более выбранных компонентов.

В контексте настоящего изобретения, термин «анализ в режиме онлайн» относится к датчику, который может быть подключен к этому процессу и позволяет проводить автоматический отбор проб. Онлайн-анализаторы также могут называться поточными анализаторами.

Онлайн-анализаторы и поточные анализаторы позволяют осуществлять непрерывный контроль за процессом.

В контексте настоящего изобретения, термины «анализ в режиме офлайн» или «анализ в оперативном режиме» являются синонимами и относятся к датчику для ручного отбора образцов с последующей периодической подготовкой образца, его измерением и оценкой. Свойства материала могут изменяться в течение периода времени между отбором образцов и получением результатов, а поэтому прямой контроль процесса может оказаться невозможным.

В одном из вариантов осуществления изобретения, кислородный субстрат может подаваться в реактор для ферментации. Предпочтительно, кислородный субстрат может быть растворен или частично растворен в ферментационном бульоне.

В другом варианте осуществления изобретения, в реактор для ферментации могут подаваться одно или более питательных веществ, один или более компонентов, регулирующих pH, и/или вода. Одно или более питательных веществ, один или более компонентов, регулирующих pH, и/или вода предпочтительно могут быть растворены или частично растворены в ферментационном бульоне.

Ферментация может представлять собой периодическую ферментацию, периодическую ферментацию с подпиткой или непрерывную ферментацию. Предпочтительно, процесс ферментации может представлять собой непрерывный процесс ферментации.

Метанотрофные микроорганизмы предпочтительно могут представлять собой метанотрофные бактерии, такие как *Methylococcus capsulatus* (далее они могут сокращенно называться *M. capsulatus*).

Метанотрофные бактерии могут быть получены при совместной ферментации вместе с одной или более гетеротрофными бактериями.

Особенно полезными для коферментации с *M. capsulatus* могут быть следующие гетеротрофные бактерии: *Ralstonia* sp.; *Bacillus brevis*; *Brevibacillus agri*; *Alcaligenes acidovorans*; *Aneurinibacillus danicus* и *Bacillus firmus*. Подходящие дрожжи могут быть

выбраны из видов *Saccharomyces* и/или *Candida*.

Предпочтительные гетеротрофные бактерии выбраны из *Alcaligenes acidovorans* (NCIMB 13287), *Aneurinibacillus danicus* (NCIMB 13288) и *Bacillus firmus* (NCIMB 13289) и их комбинаций.

В одном из вариантов осуществления изобретения, метанотрофный микроорганизм может представлять собой генетически модифицированный метанотрофный микроорганизм, и/или гетеротрофный микроорганизм может представлять собой генетически модифицированный гетеротрофный микроорганизм.

Реактор для ферментации и/или процесс ферментации в соответствии с настоящим изобретением могут иметь особое значение для продуцирования моноклеточного белка (SCP) путем ферментации культуры в непрерывном режиме, например, с использованием *Methylococcus capsulatus*.

Предпочтительными метанотрофными бактериями являются виды семейства *Methylococcus*, а особенно *Methylococcus capsulatus*, которые используют метан или метанол в качестве источника углерода, и аммиак, нитрат или молекулярный азот в качестве источника азота для синтеза белка.

Предпочтительный вариант осуществления изобретения относится к реактору для ферментации, содержащему часть контура и верхний резервуар, где указанная часть контура содержит нисходящую часть, соединенную с восходящей частью посредством U-образной части, где верхний резервуар содержит:

(i) первое выпускное отверстие, соединяющее верхний резервуар с нисходящей частью контура и позволяющее ферментационной жидкости, присутствующей в верхнем резервуаре, вытекать из верхнего резервуара в часть контура;

(ii) первое впускное отверстие, соединяющее верхний резервуар с восходящей частью контура, и позволяющее ферментационной жидкости, присутствующей в части контура, вытекать из части контура в верхний резервуар;

(iii) вентиляционную трубку для отвода отработанных газов, выходящих из верхнего резервуара; и

(iv) средства визуального наблюдения,

где реактор для ферментации дополнительно включает:

(v) по меньшей мере одно впускное отверстие для подачи субстрата, содержащего соединение аммония; и

(vi) по меньшей мере датчик для определения концентрации нитрата в ферментационном бульоне.

Реактор для ферментации может предпочтительно включать по меньшей мере один подающий насос, сконструированный и/или отрегулированный таким образом, чтобы он мог автоматически регулировать концентрацию нитрата в ферментационном бульоне.

В контексте настоящего изобретения, термин «регулировать концентрацию нитрата» относится либо к снижению концентрации нитрата в ферментационном бульоне, либо к увеличению концентрации нитрата в ферментационном бульоне. Предпочтительно,

термин «регулировать концентрацию нитрата» относится к снижению концентрации нитрата.

В одном из вариантов осуществления изобретения, концентрация нитрата в ферментационном бульоне может быть отрегулирована путем регуляции потока источника азота в ферментер; регуляции потока источника углерода в ферментер; регуляции потока кислорода; регуляции поступления питательных веществ; или их комбинации.

U-образная часть циркуляционного реактора может соединять нижнюю часть части с нисходящим потоком с нижней частью части с восходящим потоком. Кроме того, верхняя часть части с восходящим потоком может быть соединена с первым впускным отверстием, соединяющим верхний резервуар с верхней частью части с восходящим потоком. Первое выпускное отверстие может соединять верхний резервуар с верхней частью части с нисходящим потоком.

В данном контексте, термин «реактор для ферментации» относится к реактору, содержащему верхний резервуар, соединенный с верхними концами части с нисходящим потоком и части с восходящим потоком. Часть с нисходящим потоком и часть с восходящим потоком соединены на нижних концах посредством U-образной части.

В контексте настоящего изобретения, термин «циркуляционный реактор» относится к конкретному примеру реактора для ферментации.

Часть контура согласно изобретению означает часть с нисходящим потоком, часть с восходящим потоком, а также соединительную часть на нижних концах части с восходящим потоком и части с нисходящим потоком, образованную U-образной частью. Следовательно, «часть контура» относится к реактору для ферментации без верхнего резервуара.

В данном контексте, термин «U-образная часть» относится к изгибу, расположенному в нижней части реактора для ферментации или циркуляционного реактора, соединяющему нижние концы части с восходящим потоком и части с нисходящим потоком. Предпочтительно, чтобы часть с восходящим потоком и часть с нисходящим потоком были вертикальными или по существу вертикальными.

В данном контексте, термин «верхний резервуар» относится к контейнеру, расположенному в верхней части реактора для ферментации и ответственному за удаление газа, выходящего из ферментационной жидкости. Предпочтительно, верхний резервуар во время работы/ферментации только частично заполнен ферментационной жидкостью. В одном из вариантов осуществления изобретения, термин «частично заполненный ферментационной жидкостью» относится к отношению между ферментационной жидкостью и газом 90:10, такому как отношение 80:20, например, отношение 70:30, такое как отношение 60:40, например, 50:50, например, 40:60; например, отношение 30:70, например, отношение 20:80, например, отношение 10:90.

В контексте настоящего изобретения, термин «средство визуального наблюдения» относится к одному или нескольким средствам, позволяющим квалифицированному

специалисту получить непосредственную информацию о характеристиках пенообразования в верхнем резервуаре.

В одном из вариантов осуществления изобретения, непосредственная информация может представлять собой информацию в реальном времени о характеристиках пенообразования в верхнем резервуаре.

В другом варианте осуществления изобретения, характеристики пенообразования в верхнем резервуаре могут включать плотность пенообразования, высоту пенообразования и уровень турбулентности, обеспечиваемые в верхнем резервуаре.

Турбулентность в верхнем резервуаре может быть обеспечена в ферментационной жидкости, присутствующей в верхнем резервуаре, если ферментационная жидкость вытесняется из части с восходящим потоком через первое впускное отверстие в верхний резервуар.

Плотность пенообразования может быть определена по размеру пузырьков в пене. Чем больше пузырьков в пене, тем меньше плотность пены, то есть, меньше кг пены/м<sup>3</sup>. Чем меньше пузырьков в пене, тем больше плотность пены, то есть, больше кг пены/м<sup>3</sup>.

В одном из вариантов осуществления изобретения, средство визуального наблюдения может быть размещено с возможностью горизонтального или практически горизонтального обзора.

В другом варианте осуществления изобретения, средство визуального наблюдения может быть размещено на стороне верхнего резервуара, что будет обеспечивать общий вид над поверхностью ферментационной жидкости и под поверхностью ферментационной жидкости.

Предпочтительно, средство визуального наблюдения может быть размещено на конце верхнего резервуара.

Еще более предпочтительно, средство визуального наблюдения может быть размещено на конце верхнего резервуара, что будет обеспечивать вид от первого впускного отверстия (или части с восходящим потоком) к первому выпускному отверстию (или части с нисходящим потоком).

В одном из вариантов осуществления изобретения, средством визуального наблюдения может быть смотровое отверстие, камера или комбинация смотрового отверстия и камеры.

Предпочтительно, смотровое отверстие может представлять собой смотровое стекло.

Камера может представлять собой встроенную камеру.

В одном из вариантов осуществления изобретения, верхний резервуар может быть снабжен источником света для улучшения визуального наблюдения внутри верхнего резервуара. Источник света может быть выполнен в виде окна, позволяющего окружающему свету проникать в верхний резервуар, и/или в виде источника искусственного света, встроенного в верхний резервуар.

В другом варианте осуществления изобретения, источник света может быть

выполнен как отдельный элемент (например, как отдельный источник искусственного света) или как элемент (например, как интегрированный источник искусственного света), встроенный в смотровое стекло.

Помимо средств визуального наблюдения, верхний резервуар может быть снабжен по меньшей мере одним датчиком пены внутри верхнего резервуара.

Во избежание чрезмерного образования пены, в ферментационную жидкость может быть добавлен пеногаситель. Таким образом, верхний резервуар может быть снабжен входным отверстием для пеногасителя.

В одном из вариантов осуществления изобретения, реактор для ферментации, а предпочтительно часть его контура, включает датчик или анализатор ионов для определения содержания одного или нескольких видов ионов в ферментационной жидкости, где предпочтительно один или несколько видов ионов выбраны из фосфата, кальция, водорода, нитрата, нитрита и/или аммония, а предпочтительно, нитрата и/или нитрита.

В другом варианте осуществления изобретения, циркуляционный реактор может быть снабжен циркуляционным насосом.

Предпочтительно, циркуляционный насос может быть размещен в верхней половине части с нисходящим потоком.

В одном из вариантов осуществления изобретения, реактор для ферментации может содержать устройство для уменьшения потока. Предпочтительно, устройство для уменьшения потока может быть встроено перед первым впускным отверстием и в верхней половине части с восходящим потоком.

В дополнительном варианте осуществления изобретения, часть контура реактора для ферментации может предпочтительно содержать одно или несколько впускных отверстий для газа; одно или несколько впускных отверстий для воды; и/или одно или несколько впускных отверстий для ферментационной среды.

Одно или более впускных отверстий для газа, одно или более впускных отверстий для воды и/или одно или более впускных отверстий для ферментационной среды могут управляться компьютером. Предпочтительно, одно или более впускных отверстий для газа, одно или более впускных отверстий для воды и/или одно или более впускных отверстий для ферментационной среды могут управляться компьютером на основе данных, полученных от одного или нескольких датчиков или анализаторов.

Для улучшения условий ферментации, важную роль может играть распределение газообразных субстратов, таких как метан, в ферментационной жидкости. Таким образом, часть контура реактора для ферментации может содержать одно или более активных устройств для распределения газа в ферментационной жидкости.

В одном из вариантов осуществления изобретения, одно или более активных устройств для распределения газа в ферментационной жидкости представляют собой микро- или нанобарботер для введения и/или распределения газа в ферментационной жидкости; и/или устройство для динамического движения, размещенное в части контура

реактора, такое как динамический смеситель.

В дополнение к динамическим смесителям или в качестве альтернативы им, часть контура может содержать один или несколько неактивных элементов смесителя. В одном из вариантов осуществления изобретения, один или несколько неактивных смесительных элементов могут представлять собой статический смеситель.

Помимо важной роли, которую играет надлежащая дегазация в верхнем резервуаре, важную роль может также играть улучшение массопереноса газообразных субстратов в жидкую фазу, где газ становится доступным для биокатализаторов (например, метанотрофных микроорганизмов) с точки зрения энергоэффективности.

Кроме того, как уже упоминалось, важным фактором может быть также повышение эффективности удаления отработанного газа за счет улучшения переноса отработанного газа из жидкой фазы в газовую фазу для удаления газа из ферментера, предпочтительно, в верхнем резервуаре.

Предпочтительно, эта повышенная эффективность удаления отработанного газа может быть обеспечена за счет эксплуатации U-образной части контура при повышенном давлении.

Этот улучшенный массоперенос в сочетании с улучшенным удалением газа в верхнем резервуаре может быть достигнут с помощью реактора для ферментации, циркуляционного реактора согласно изобретению, который содержит часть контура, имеющую по существу вертикальную часть с нисходящим потоком, по существу вертикальную часть с восходящим потоком и U-образную часть, имеющую по существу горизонтальную соединительную часть, которая соединяет нижний конец части с нисходящим потоком с нижним концом части с восходящим потоком, верхний резервуар, который может быть расположен над частью контура, и соединяет верхний конец части с нисходящим потоком и верхний конец части с восходящим потоком.

В одном из вариантов осуществления изобретения, верхний резервуар может иметь диаметр, который существенно больше диаметра части контура, части с нисходящим потоком и/или части с восходящим потоком.

В одном из вариантов осуществления изобретения, U-образная часть ферментера может включать выпускное отверстие, предпочтительно расположенное в верхнем резервуаре или в U-образной части контура реактора для ферментации, для удаления ферментационной жидкости.

Реактор для ферментации может содержать одну или более точек для подачи газа, которые, в соответствии с желаниями и требованиями, размещаются в части с нисходящим потоком, в U-образной части и/или в части с восходящим потоком. Предпочтительно, одна или несколько точек для подачи газа размещаются в части с нисходящим потоком.

Непосредственно после одной или более точек для подачи газа, в ферментационную жидкость встраивают по меньшей мере один активный смесительный элемент и/или по меньшей мере один неактивный смесительный элемент для

диспергирования газа (или газов).

Путем увеличивая давления в U-образном циркуляционном реакторе можно повысить массоперенос из газовой фазы в жидкую фазу. Таким образом, первое устройство для регуляции давления может быть встроено в U-образную часть ферментера для повышения давления по меньшей мере в первой зоне U-образной части ферментера по сравнению с давлением во второй зоне ферментера.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения, первое устройство для регуляции давления может быть встроено в верхний конец части с нисходящим потоком, а второе устройство для регуляции давления может быть встроено в U-образную часть ферментера и ниже по потоку от первого устройства для регуляции давления, если смотреть в направлении потока ферментационной жидкости.

Первое устройство для регуляции давления может представлять собой клапан (например, коммерчески доступный клапан), насос, например, пропеллерный насос, лопастной насос или турбинный насос, или давление может быть увеличено путем впрыска сжатого воздуха или другого газа, например, инертного газа. Первое устройство для регуляции давления предпочтительно представляет собой пропеллерный насос, который также создает циркуляцию жидкости в ферментере.

Второе и, необязательно, третье устройство для регуляции давления может быть размещено в части с нисходящим потоком, в части с восходящим потоком или в U-образной части, но предпочтительно, второе устройство для регуляции давления находится в верхней половине части с восходящим потоком. Третье необязательное устройство для регуляции давления предпочтительно размещается в верхней половине части с восходящим потоком и перед вторым устройством для регуляции давления, если смотреть в направлении потока ферментационной жидкости. Второе и/или третье устройства для регуляции давления выбраны из группы устройств, включающих клапан (например, коммерчески доступные клапаны), статический смеситель, гидроциклон, насос (например, пропеллерный насос, лопастной насос или турбинный насос), клапан с регулируемым давлением, пластину с отверстиями, сопла или форсунки, или устройство для уменьшения диаметра или поперечного сечения части ферментера, в которую он помещен.

В другом варианте осуществления изобретения, улучшенный массоперенос газообразного субстрата может быть достигнут в U-образной части реактора для ферментации в соответствии с настоящим изобретением.

В другом варианте осуществления изобретения, удаление отработанного газа может быть обеспечено в верхнем резервуаре реактора для ферментации согласно изобретению.

В одном из вариантов осуществления изобретения, используются средства для обеспечения возможности продувки зоны «хэдспейса» для улучшения удаления отработанного газа и снижения риска образования взрывоопасных газовых смесей в зоне «хэдспейса» ферментера.

Эта продувка может быть достигнута путем помещения средств для продувки газа в верхний резервуар, таких как устройства для добавления и/или удаления газа в зоне «хэдспейса». Средство для продувки газа предпочтительно может быть размещено над поверхностью жидкости для создания потока газа для продувки, идущего параллельно, одновременно или поперечно потоку жидкости в верхней части ферментера. Средство для подачи газа может быть также помещено ниже поверхности жидкости в верхней части. Альтернативно или дополнительно, удаление отработанного газа может быть улучшено за счет снижения давления в зоне «хэдспейса», за счет всасывания или подачи вакуума, что, таким образом, будет снижать давление в зоне «хэдспейса», и/или путем установки средств модификации потока в верхней части. Настоящее изобретение также позволяет подавать энергию, применяемую для повышения давления, в целях повторного использования. Это может быть достигнуто путем подсоединения второго и, возможно, третьего устройства для регуляции давления к тормозу или к генератору для снижения давления с помощью пропеллерного насоса. Если генератор подключен ко второму и/или третьему устройству для регуляции давления, то часть энергии, подаваемой в систему, может быть собрана, что позволяет также снижать общее энергопотребление системы.

В данном контексте, термин «продувка» используется в отношении процесса, выполняемого в верхнем резервуаре, для удаления или стимуляции удаления отработанного газа из зоны «хэдспейса» верхнего резервуара и/или из ферментационной жидкости в верхнем резервуаре.

Верхний резервуар согласно изобретению может быть спроектирован так, чтобы он содержал от 1% до 99% от общего объема ферментера, но предпочтительно, от 10% до 60% от общего объема ферментера, а еще более предпочтительно от 40 до 50% от общего объема ферментации. В одном из вариантов осуществления изобретения, объем верхнего резервуара может быть меньше, чем объем U-образной части.

Верхний резервуар может быть снабжен средствами для модификации потока жидкости или газа для облегчения перемешивания в реакторе для ферментации или для облегчения высвобождения пузырьков газа из ферментационной жидкости. Средствами для модификации потока газа или жидкости могут быть динамические смесители, перегородки или статические смесители.

Размер, то есть, диаметр и высота ферментера, могут варьироваться в зависимости от общего объема ферментера.

В одном из вариантов осуществления изобретения, реактор для ферментации согласно изобретению может быть снабжен впускным отверстием для подачи газа, где подаваемый газ может быть введен для перемещения диоксида углерода из жидкой фазы в отделяемую фазу отработанного газа. Устройство для впуска газа предпочтительно может быть расположено перед верхним резервуаром и/или перед первым впускным отверстием.

Подаваемый газ, то есть газ, используемый для вытеснения диоксида углерода из растворенной фазы (обычно азот, но, возможно, и другой инертный негорючий газ), может быть введен, например, в одной или нескольких точках от начала по существу

вертикальной зоны с восходящим потоком до входа в зону удаления отработанного газа, однако, особенно предпочтительно, если он будет введен в одну или несколько точек между верхней частью (например, в верхние 20%, а более предпочтительно, в верхние 10%) вертикальной части зоны с восходящим потоком и началом наиболее плоской (то есть, наиболее горизонтальной) части зоны оттока.

В контексте настоящего изобретения, термин «подаваемый газ» используется в описании процесса, осуществляемого в части контура, предпочтительно в верхнем конце части восходящего потока, и способствующего переносу отработанного газа из ферментационной жидкости в газообразную фазу.

В одном из вариантов осуществления изобретения, реактор для ферментации включает впускное отверстие в верхнем резервуаре для ввода продувочного газа в верхний резервуар, и впускное отверстие в верхнем конце восходящей части контура для ввода подаваемого газа для перемещения отработанного газа из ферментационной жидкости в газовую фазу.

Одно из преимуществ настоящего изобретения заключается в том, что оно позволяет обеспечить улучшенную утилизацию газообразных веществ, добавляемых в реактор для ферментации.

Производительность реактора для ферментации и/или процесса ферментации согласно изобретению может быть дополнительно оптимизирована так, чтобы циркулирующая ферментационная жидкость обеспечивала переменное давление во время циркуляции в ферментере и повышенный массоперенос и растворимость газовых субстратов в жидкой фазе в зоне, имеющей повышенное давление. Продуктивность может быть также улучшена за счет высвобождения газов, таких как отработанные газы, из циркулирующей ферментационной жидкости, где такое высвобождение увеличивается в зонах с пониженным давлением.

В одном из вариантов осуществления изобретения, повышенное давление в части контура реактора для ферментации, в первой зоне и/или между первым устройством для регуляции давления и вторым устройством для регуляции давления может быть обеспечено путем приложения давления, которое на 0,5 бар выше атмосферного давления; такого как давление, которое на 1 бар выше атмосферного давления; например, давление, которое на 1,5 бара выше атмосферного давления; например, давление, которое на 2 бара выше атмосферного давления; например, давление, которое на 2,5 бара выше атмосферного давления; например, давление, которое на 3 бара выше атмосферного давления; например, давление, которое на 3,5 бара выше атмосферного давления; например, давление, которое на 4 бара выше атмосферного давления; например, давление, которое на 4,5 бара выше атмосферного давления; например, давление, которое на 5 бар выше атмосферного давления; например, давление, которое на 5,5 бара выше атмосферного давления, такое как давление, которое на 6 бар выше атмосферного давления; например, давление, которое на 7 бар выше атмосферного давления.

В другом варианте осуществления изобретения, повышенное давление в части

контура реактора для ферментации, в первой зоне и/или между первым устройством для регуляции давления и вторым устройством для регуляции давления может быть обеспечено путем приложения давления в пределах 0,5-10 бар выше атмосферного давления; такого как давление в пределах 1-9 бар выше атмосферного давления; например, давление, которое на 1,5-8 бар выше атмосферного давления; давление, которое составляет в пределах 2-7 бар выше атмосферного давления; например, давление, которое на 3-6 бар выше атмосферного давления; например, давление, которое составляет в пределах 4-5 бар выше атмосферного давления.

В еще одном варианте осуществления изобретения, давление в верхнем резервуаре баке может быть менее, чем на 0,5 бара выше атмосферного давления; например, на 0,25 бара выше атмосферного давления; например, на 0,1 бара выше атмосферного давления; например, приблизительно на уровне атмосферного давления; например, на 0,75 бара ниже атмосферного давления; например, на 0,5 бара ниже атмосферного давления; например, на 0,25 бара ниже атмосферного давления; например, на 0,1 бара ниже атмосферного давления.

Дополнительные подробные описания подходящих модификаций циркуляционного реактора и особенности работы такого циркуляционного реактора, а также обработки полученной биомассы можно найти в заявках WO 2010/069313; WO 2000/70014; WO 2003/016460; WO 2018/158319; WO 2018/158322; WO 2018/115042 и WO 2017/080987, каждая из которых включена в настоящее описание посредством ссылки.

Пример последующей обработки, подходящей для биомассы, полученной в целях продуцирования различных фракций, можно найти в WO 2018/115042.

Датчики могут включать биосенсоры, электрохимические датчики, например, ионно-чувствительные электроды или датчики, основанные на FIA (анализе впрыска потока) и оптических измерениях, например, спектрофотометрические устройства. Зонд, излучающий в ближнем инфракрасном диапазоне (NIR), может быть также использован для оценки нескольких различных компонентов в бульоне или в клетках в ферментере, например, концентрации клеток, аминокислот, метанола, этанола и/или различных ионов. Реактор для ферментации может быть также снабжен масс-спектрометрическим (МС) датчиком или электронным датчиком для определения концентрации газообразных и летучих компонентов (например, CO<sub>2</sub> и/или CH<sub>4</sub>) в зоне «хэдспейса». МС-датчик или электронный датчик может регулировать давление, подаваемое на ферментер, и/или добавление газообразных компонентов, например, метана и/или воздуха/кислорода, и/или добавление газообразного аммиака или аммиака/аммония в растворе. В U-образной части реактора для ферментации может быть установлена высокоскоростная камера, предпочтительно, подсоединенная к устройству для подачи газа и предназначенная для определения размера пузырьков газа в бульоне. Размер пузырьков может быть определен путем обработки изображения данных, полученных с помощью высокоскоростной камеры.

Реактор для ферментации согласно изобретению обычно может работать в

непрерывном режиме, после процедуры очистки, стерилизации и последующего начального периода, в котором в реактор для ферментации добавляют воду, необходимые питательные соли и микроорганизмы. Ферментационная жидкость может циркулировать в реакторе ферментации, в основном, под действием первого устройства для регуляции давления. Затем могут быть добавлены газообразные субстраты и может быть запущена ферментация. Когда плотность микроорганизмов достигает концентрации приблизительно 0,5-10%, а предпочтительно, 1-5% (по сухой массе), то ферментационная жидкость может быть непрерывно выведена из реактора для ферментации, например, из верхнего резервуара или из U-образной части, и подвергнута последующей обработке, например, как описано в заявке WO 2018/115042.

Удаление ферментационной жидкости может быть начато одновременно с добавлением подпиточной воды, водного субстрата и/или рециркуляционного супернатанта со степенью разведения, зависящей от микроорганизмов, используемых при ферментации. Добавление компонентов субстрата в жидкий раствор, дополнительной воды, рециркуляция супернатанта в качестве подпитки для отбираемого бульона и газообразных субстратов может регулироваться компьютером, на который поступают данные от датчиков газа, а затем могут быть проведены подходящие расчеты для вычисления необходимых количеств каждого компонента, используемого для оптимизации роста микроорганизмов.

В одном из вариантов осуществления изобретения, процесс ферментации и реактор для ферментации могут быть разработаны в лаборатории, на опытной установке и/или на предприятии или на промышленном предприятии. Предпочтительно, процесс ферментации и реактор для ферментации могут быть разработаны на предприятии или на промышленном предприятии.

Следует отметить, что варианты осуществления изобретения и признаки, описанные в одном из аспектов настоящего изобретения, могут быть также применимы и к другим аспектам изобретения.

Все патентные и непатентные документы, цитируемые в настоящей заявке, в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки.

Настоящее изобретение будет более подробно описано в нижеследующих неограничивающих примерах.

## **Примеры**

### **Пример 1**

В этом примере продемонстрирована корреляция между концентрацией нитрата в ферментационном бульоне и продуцированием биомассы.

Образование нитратов определяли во время культивирования *M. capsulatus* в биореакторах BIOSAT® B-plus объемом 1 л (Sartorius, DK), где температуру поддерживали на уровне 42°C, перемешивание осуществляли со скоростью 10 RPS<sup>-1</sup> (оборотов в секунду), а pH составлял 6,7 ± 0,05 и был скорректирован с использованием внутренних регуляторных контуров, регулирующих расход воды в рубашке охлаждения,

частоту двигателя и дозирование 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> или 2M NaOH. Мониторинг содержания растворенного кислорода (DO) проводили с помощью оптического DO-электрода VisiFerm DO ECS 120 H<sub>2</sub> (Hamilton, USA).

Биореакторы непрерывно продували 96,81 г/ч. стерильного воздуха и 4,95 г/ч. стерильного метана (Instrument methane 3.5, AGA, DK).

Культивирование *M. capsulatus* было инициировано в качестве периодической фазы в среде 2NMS (в среде с нитратными минеральными солями) и продолжено в стационарном режиме (при ферментации в непрерывной фазе) на среде AMS (на среде с минеральными солями аммония) после истощения нитрата. Подача питательной среды с подпиткой во время непрерывного культивирования составляла  $48,95 \times 10^{-3}$  л/ч. Культуры были доведены до стационарного состояния, прежде чем была предпринята любая попытка индуцировать совместный метаболизм.

Различные эксперименты по импульсной подаче аммиака в стационарном состоянии были проведены в ферментерах объемом 1 л в фиксированных условиях, где была определена биомасса до и после воздействия импульса вместе с определением концентрацией нитратов.

#### Результаты

В Таблицах 1 и 2, представленных ниже, показано, что образование нитрата увеличивается с увеличением концентрации аммиака в результате импульсного впрыска. Тот же эксперимент проводили в течение 24 часов, где при более высокой концентрации аммиака, биомасса внезапно уменьшалась, и она была почти близка к фазе вымывания, в то время как нитрат все еще находился внутри реактора.

Таблицы 1 и 2: Различные концентрации аммиака, подаваемого в реактор объемом 1 л в стационарном режиме, и измерение концентрации аммиака, нитрата и биомассы перед впрыском аммиака, и в двух разных временных точках (через 2 часа после подачи импульса (Таблица 1) и через 24 часа после подачи импульса (Таблица 2)).

<b>Таблица 1 - Через 2 часа</b>			
Подача импульса аммиака (г/л)	Биомасса до подачи (г/л)	Биомасса после подачи (г/л)	Нитрат (г/л)
0,01	4,6	4,6	0
0,03	4,6	4,6	0,01
0,1	4,6	4,25	0,035
<b>Таблица 2 - Через 24 часа</b>			
Подача импульса аммиака (г/л)	Биомасса до подачи (г/л)	Биомасса после подачи (г/л)	Нитрат (г/л)
0,01	4,6	4,6	0
0,03	4,6	4,6	0
0,1	4,6	2,02	0,029

Регуляция этой высокой концентрации источника азота в ферментационном бульоне может быть осуществлена путем коррекции скорости потока субстрата для управления процессом так, чтобы не образовывались нитраты, а также не накапливались нитриты и/или нитраты. В этих регулируемых условиях, любой избыток нитратов может утилизироваться *M. capsulatus*, и концентрация азота в ферментационном бульоне может быть снижена.

Та же тенденция (чрезмерное продуцирование нитратов, приводящее к снижению биомассы) наблюдалась на опытной установке, как показано на фигуре 1. На фигуре 1 показано, что продуцирование биомассы снижается по мере увеличения продуцирования нитратов на опытной установке и наоборот. Аналогичная тенденция наблюдалась на заводе-изготовителе, а также в лаборатории, как показано в Таблицах 1 и 2.

#### Используемая литература

WO 2010/069313

WO 2000/70014

WO 2003/016460

WO 2018/158319

WO 2018/158322

WO 2018/115042

WO 2017/080987

WO 2018/115042

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ ферментации для сбраживания ферментационного бульона, содержащего по меньшей мере один микроорганизм, в реакторе для ферментации, где способ ферментации включает стадии:

а) подачи углеродного субстрата в реактор для ферментации, позволяющей углеродному субстрату растворяться или частично растворяться в ферментационном бульоне;

б) подачи азотного субстрата в реактор для ферментации, позволяющей азотному субстрату растворяться или частично растворяться в ферментационном бульоне; и

с) поддержания концентрации нитрата в ферментационном бульоне ниже 0,035 г/л и/или поддержания концентрации нитрата в ферментационном бульоне ниже 0,01 г нитрата/г биомассы;

где по меньшей мере один микроорганизм включает по меньшей мере один метанотрофный микроорганизм.

2. Способ ферментации по п. 1, где концентрация нитрата в ферментационном бульоне во время ферментации составляет в пределах 0-0,035 г/л; например, в пределах 0,001-0,033 г/л; например, в пределах 0,002-0,03 г/л; например, в пределах 0,003-0,025 г/л; например, в пределах 0,004-0,02 г/л; например, в пределах 0,005-0,015 г/л; например, в пределах 0,007-0,01 г/л.

3. Способ ферментации по любому из предшествующих пунктов, где источник азота выбран из аммиака, соединений аммония и/или молекулярного азота. Предпочтительным источником азота является аммиак.

4. Способ ферментации по любому из предшествующих пунктов, где ферментация представляет собой периодическую ферментацию, периодическую ферментацию с подпиткой или непрерывную ферментацию. Предпочтительным способом ферментации является непрерывная ферментация.

5. Реактор для ферментации, содержащий часть контура и верхний резервуар, где указанная часть контура включает часть с нисходящим потоком, соединенную с частью с восходящим потоком посредством U-образной части, где верхний резервуар включает:

(i) первое выпускное отверстие, соединяющее верхний резервуар с нисходящей частью контура и позволяющее ферментационной жидкости, присутствующей в верхнем резервуаре, вытекать из верхнего резервуара в часть контура;

(ii) первое впускное отверстие, соединяющее верхний резервуар с восходящей частью контура и позволяющее ферментационной жидкости, присутствующей в части контура, вытекать из части контура в верхний резервуар;

(iii) вентиляционную трубку для отвода отработанных газов, выходящих из верхнего резервуара; и

(iv) средства визуального наблюдения,

где реактор для ферментации дополнительно включает:

(v) по меньшей мере одно впускное отверстие для подачи субстрата, содержащего

соединение аммония; и

(vi) по меньшей мере датчик для определения концентрации нитрата в ферментационном бульоне.

6. Реактор для ферментации по п. 5, где реактор для ферментации содержит по меньшей мере один подающий насос, сконструированный и/или отрегулированный так, чтобы он мог автоматически регулировать концентрацию нитрата в ферментационном бульоне.

7. Реактор для ферментации по любому из пп. 5-6, где реактор для ферментации предназначен для ферментации метанотрофных микроорганизмов.

8. Реактор для ферментации по любому из пп. 5-7, где реактор для ферментации содержит датчик или анализатор ионов для определения содержания одного или нескольких видов ионов в ферментационной жидкости, где предпочтительно, один или несколько видов ионов выбраны из фосфата, кальция, водорода, нитрита и/или аммония.

9. Реактор для ферментации по любому из пп. 5-8, где часть контура реактора для ферментации содержит одно или несколько впускных отверстий для газа; одно или несколько впускных отверстий для воды; и/или одно или несколько впускных отверстий для ферментационной среды.

10. Реактор для ферментации по п. 9, где одно или несколько впускных отверстий для газа; одно или несколько впускных отверстий для воды; и/или одно или несколько впускных отверстий для ферментационной среды отрегулированы с помощью компьютера на основе данных, полученных от одного или нескольких датчиков или анализаторов.

По доверенности

ФИГ.1

