

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390262 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.14(22) Дата подачи заявки
2021.07.06(51) Int. Cl. C12M 1/00 (2006.01)
C12P 5/02 (2006.01)
C12P 7/04 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКА ОДНОКЛЕТОЧНЫХ

(31) PA 2020 00816

(32) 2020.07.07

(33) DK

(86) PCT/EP2021/068582

(87) WO 2022/008478 2022.01.13

(71) Заявитель:
УНИБИО А/С (DK)

(72) Изобретатель:

Нанди Субир Кумар, Кристенсен Иб
(DK)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к способу получения первого продукта реакции посредством первого процесса ферментации, проводимого в первом петлевом реакторе, причем способ включает стадии (i) добавления инокулята, содержащего один или более метаногенных микроорганизмов, в первый петлевой реактор с получением первой инокулированной ферментационной среды; (ii) добавления газообразного водорода (H₂) в первую инокулированную ферментационную среду; (iii) добавления первого источника углерода в первую инокулированную ферментационную среду; (iv) обеспечения возможности ферментации первой ферментационной среды с получением первого продукта реакции и (v) выделения первого продукта реакции, полученного на стадии (iv).

202390262

A1

A1

202390262

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576993EA/025

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКА ОДНОКЛЕТОЧНЫХ

Область техники

Настоящее изобретение относится к усовершенствованному способу получения белка одноклеточных (SCP). В частности, настоящее изобретение относится к созданию усовершенствованного способа получения белка одноклеточных, который делает расположение процесса ферментации (и ферментационного реактора) независимым от извлечения природного газа; который не зависит от колебаний стоимости ископаемого топлива; оказывает меньшее воздействие на окружающую среду и/или атмосферу; повышенной простоты; повышенной производительности; и/или повышенной эффективности.

Уровень техники

Из-за увеличения населения в мире у людей растет потребность в диете, богатой белком, а животные (домашние или сельскохозяйственные животные) и рыбы получают больше корма, богатого белком, для ускорения их роста и развития, а также для улучшения их состояния здоровья.

Однако в связи с ростом населения в мире и ростом спроса на белки для сельскохозяйственных и домашних животных есть убедительные доказательства того, что сельское хозяйство не сможет удовлетворить этот спрос, и что существует серьезный риск нехватки продовольствия.

Промышленное сельское хозяйство характеризуется большим водным следом, высоким уровнем землепользования, разрушением биоразнообразия, общей деградацией окружающей среды и способствует изменению климата за счет выбросов около трети всех парниковых газов.

Для удовлетворения растущего спроса на белок и, по меньшей мере, некоторых из упомянутых недостатков промышленного сельского хозяйства, производство белка одноклеточных (SCP) оказалось очень интересным вариантом.

Белок одноклеточных (SCP) можно выращивать путем ферментации биомассы за счет роста микроорганизмов на углеводородных, азотных и других субстратах. Производство SCP представляет собой варианты безотказного массового производства продуктов питания, которое может надежно производить продукты питания по всему миру и даже в суровых климатических условиях.

Продукт SCP может использоваться непосредственно в продуктах питания или кормах, например в виде жидкого продукта или в виде порошкового продукта. В качестве альтернативы SCP или биомасса могут быть дополнительно обработаны, т. е. путем гидролиза и/или разделения для получения специальных фракций, удаления примесей или концентрирования компонентов перед использованием в пищевых продуктах или кормах.

Микроорганизмы, традиционно используемые для получения SCP, представляют собой метилотрофные микроорганизмы или метанотрофные микроорганизмы. Эти

микроорганизмы перерабатывают метан, поступающий в виде природного газа (в качестве источника углерода) и в присутствии соединения кислорода и соединения азота, и превращают его в биомассу, которая в конечном итоге становится продуктом SCP.

Метан является основным компонентом природного газа и составляет примерно 87% по объему. Основным источником метана является добыча из геологических месторождений. Он связан с другим углеводородным топливом. Как правило, отложения, образующие природный газ, залегают глубже и при более высоких температурах, чем отложения, содержащие нефть, что может затруднить их извлечение. Метан, как правило, транспортируется навалом по трубопроводу в виде природного газа, или танкерами для СПГ в сжиженном виде, а некоторые страны перевозят метан грузовиками.

Следовательно, некоторые из проблем предлагаемых в настоящее время способов получения SCP заключаются в том, что место осуществления способа может быть ограничено областями, где доступен метан или природный газ. В качестве альтернативы метан или природный газ следует транспортировать в ферментер SCP, что увеличивает затраты на производство. Кроме того, как упоминалось выше, используемый метан традиционно получают из ископаемого топлива, что может быть ограничивающим фактором и подвержено большим колебаниям затрат и вредному воздействию на окружающую среду и атмосферу.

Кроме того, процессы ферментации на основе переработки природного газа, предполагают совместную ферментацию различных типов микроорганизмов, поскольку природный газ содержит незначительные количества различных углеводов, кроме метана, который необходимо перерабатывать, чтобы не накапливаться в ферментационной среде и не вызывать снижения эффективности процесса ферментации или, возможно, даже остановки процесса ферментации, который впоследствии может быть возобновлен.

Следовательно, в промышленности существует потребность в усовершенствованном способе получения белка одноклеточных, и было бы выгодно иметь усовершенствованный способ, решающий проблемы предшествующего уровня техники.

В частности, необходим усовершенствованный способ, который не будет зависеть от места добычи природного газа, а значит, и наличия дешевого метана, причем на этот способ не будут влиять колебания цен на ископаемое топливо; он будет более экологичным для окружающей среды и/или атмосферы, и было бы выгодно иметь такой способ, который проще, эффективнее и/или надежнее.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Таким образом, цель настоящего изобретения относится к усовершенствованному способу получения белка одноклеточных, который решает проблемы предшествующего уровня техники и является выгодным.

В частности, целью настоящего изобретения является создание усовершенствованного способа получения белка одноклеточных, который решает вышеупомянутые проблемы предшествующего уровня техники, связанные с

расположением процесса ферментации (и реактора ферментации); с колебаниями цен на ископаемое топливо; экологические и/или атмосферные проблемы, простота, производительность и эффективность.

Таким образом, один аспект изобретения относится к способу получения первого продукта реакции посредством первого процесса ферментации, проводимого в первом петлевом реакторе, причем способ включает стадии:

(i) добавление инокулята, содержащего один или более метаногенных микроорганизмов, в первый петлевой реактор с получением первой инокулированной ферментационной среды;

(ii) добавление газообразного водорода (H_2) в первую инокулированную ферментационную среду;

(iii) добавление первого газообразного источника углерода, такого как газообразный монооксид углерода (CO); газообразный диоксид углерода (CO_2) или их комбинация в первую инокулированную ферментационную среду;

(iv) обеспечение возможности ферментации первой ферментационной среды с получением первого продукта реакции; и

(v) выделение первого продукта реакции, полученного на стадии (iv).

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу получения второго белка одноклеточных, включающему следующие стадии:

(a) получение газообразного водорода (H_2);

(b) смешивание газообразного водорода со стадии (a) с первым газообразным источником углерода, таким как монооксид углерода (CO); диоксид углерода (CO_2) или их комбинация с получением C1-соединения;

(c) добавление C1-соединения, полученного на стадии (b), во второй петлевой реактор, содержащий один или более микроорганизмов, способных метаболизировать C1-соединение, с получением второй инокулированной ферментационной среды;

(d) обеспечение возможности ферментации второй инокулированной ферментационной среды во втором процессе ферментации и превращения C1-соединения в материал биомассы, и

(e) выделение материала биомассы, полученного на стадии (c), и получение второго белка одноклеточных.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к петлевому реактору, содержащему петлевую часть и верхний резервуар, при этом указанная петлевая часть содержит нисходящую часть, соединенную с восходящей частью через U-образную часть, при этом петлевая часть содержит по меньшей мере одно впускное отверстие для подачи газообразного водорода (H_2)

Еще один аспект настоящего изобретения относится к композиции белка одноклеточных, содержащей первый белок одноклеточных по настоящему изобретению и второй белок одноклеточных по настоящему изобретению.

Кроме того, аспект настоящего изобретения относится к применению композиции

белка одноклеточных по настоящему изобретению в качестве ингредиента кормового продукта для животных.

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно.

Подробное описание изобретения

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что доступные в настоящее время способы получения белка одноклеточных (SCP) имеют несколько нежелательных ограничений, нежелательных недостатков и проблем, которые отрицательно сказываются на использовании технологии и производительности процесса получения белка одноклеточных (SCP). Следовательно, авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили способ отсоединения процесса от места, имеющего доступный источник углерода (например, метан), и который также оказался более экологичным для окружающей среды и/или атмосферы, и этот способ проще и/или более эффективен.

Предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения относится к способу получения первого продукта реакции посредством первого процесса ферментации, проводимого в первом петлевом реакторе, причем способ включает стадии:

(i) добавление инокулята, содержащего один или более метаногенных микроорганизмов, в первый петлевой реактор с получением первой инокулированной ферментационной среды;

(ii) добавление газообразного водорода (H_2) в первую инокулированную ферментационную среду;

(iii) добавление первого газообразного источника углерода, такого как газообразный монооксид углерода (CO); газообразный диоксид углерода (CO_2) или их комбинация в первую инокулированную ферментационную среду;

(iv) обеспечение возможности ферментации первой ферментационной среды с получением первого продукта реакции; и

(v) выделение первого продукта реакции, полученного на стадии (iv).

В контексте настоящего изобретения термин «петля» относится к петлевому реактору, содержащему петлевую часть и верхний резервуар (резервуар для разделения газа/жидкости). Верхний резервуар может содержать вентиляционную трубу для выхода отходящих газов из верхнего резервуара. Петлевая часть может содержать по существу вертикальную нисходящую часть, соединенную с по существу вертикальной восходящей частью через горизонтальную часть или U-образную часть.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения петлевая часть содержит циркуляционный насос для циркуляции ферментационной среды, если она присутствует в ферментере.

Еще в одном варианте осуществления настоящего изобретения петлевая часть имеет длину, которая может быть больше, предпочтительно существенно больше, чем длина и/или высота верхнего резервуара.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения верхний резервуар имеет объем, превышающий объем петлевой части. Предпочтительно ферментационный

реактор содержит петлевую часть, длина которой может быть больше, предпочтительно существенно больше, чем длина и/или высота верхнего резервуара, причем верхний резервуар имеет объем, превышающий объем петлевой части.

В варианте осуществления настоящего изобретения петлевая часть настоящего изобретения может относиться по меньшей мере к одной нисходящей части, по меньшей мере к одной восходящей части, а также по меньшей мере к одной соединительной части.

В данном контексте термин «U-образная часть» относится к изгибу, предусмотренному в нижней части ферментационного реактора или петлевого реактора, соединяющего нижние концы восходящей части и нисходящей части.

Предпочтительно, чтобы одна или более восходящих частей и одна или более нисходящих частей были вертикальными или по существу вертикальными.

Петлевой реактор согласно настоящему изобретению может быть спроектирован как вертикальный петлевой реактор или горизонтальный петлевой реактор.

В варианте осуществления настоящего изобретения ферментационный реактор может быть вертикальным петлевым реактором. Вертикальный петлевой реактор может относиться к петлевому реактору, имеющему основную часть U-образной части в вертикальном или по существу вертикальном положении относительно горизонтального положения. В варианте осуществления настоящего изобретения ферментационный реактор содержит основную часть U-образной части в вертикальном или по существу вертикальном положении.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения ферментационный реактор может быть горизонтальным петлевым реактором. Горизонтальный петлевой реактор может относиться к петлевому реактору, имеющему основную часть U-образной части в горизонтальном или по существу горизонтальном положении относительно вертикального положения. В варианте осуществления настоящего изобретения ферментационный реактор содержит основную часть U-образной части в горизонтальном или по существу горизонтальном положении.

Предпочтительно ферментационный реактор может быть выполнен в виде вертикального петлевого реактора.

В контексте настоящего изобретения термин «основная часть» относится к по меньшей мере 51% (об./об.) U-образной части, имеющей желаемое положение; например, по меньшей мере 55% (об./об.); например по меньшей мере 60% (об./об.); например, по меньшей мере 65% (об./об.); например по меньшей мере 70% (об./об.); например, по меньшей мере 75% (об./об.); например по меньшей мере 80% (об./об.); например, по меньшей мере 85% (об./об.); например по меньшей мере 90% (об./об.); например, по меньшей мере 95% (об./об.); например по меньшей мере 98% (об./об.).

В данном контексте термин «верхний резервуар» относится к контейнеру, расположенному в верхней части ферментационного реактора и отвечающему за удаление отходящих газов из ферментационной жидкости. Предпочтительно, чтобы верхний резервуар во время работы/ферментации был только частично заполнен жидкостью для

ферментации. В варианте осуществления настоящего изобретения термин «частично заполненный жидкостью для ферментации» относится к соотношению 90:10 между жидкостью для ферментации и газом; например, к соотношению 80:20; например к соотношению 70:30; например, к соотношению 60:40; например, к соотношению 50:50, например, к соотношению 40:60; например, к соотношению 30:70; например, к соотношению 20:80; например, к соотношению 10:90.

В контексте настоящего изобретения «средство визуального контроля» относится к одному или более средствам, позволяющим специалисту в данной области техники получать непосредственную информацию, т. е. по текучести и/или по характеристикам пенообразования, в верхнем резервуаре и/или в петлевой части.

В варианте осуществления настоящего изобретения прямая информация может представлять собой информацию в режиме реального времени о характеристиках пенообразования в верхнем резервуаре.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения первый источник углерода может представлять собой первый газообразный источник углерода; или первый жидкий источник углерода. Предпочтительно первый источник углерода представляет собой первый газообразный источник углерода.

Первый газообразный источник углерода может представлять собой газообразный монооксид углерода (CO); газообразный диоксид углерода (CO₂); или их комбинацию.

Добавление или поток:

- газообразного водорода (H₂) и/или
- первого газообразного источника углерода, т. е. газообразного монооксида углерода (CO); газообразного диоксида углерода (CO₂); или их комбинации,

в первую инокулированную ферментационную среду, присутствующую в первом петлевом реакторе, может регулироваться потребностью в водороде (H₂), необходимом для оптимизированного производства, и/или потреблением водорода (H₂) одним или более метаногенными микроорганизмами.

Культивирование и ферментация метаногенных микроорганизмов в целом известны специалистам в данной области техники.

В варианте осуществления настоящего изобретения газообразный водород (H₂) и/или первый газообразный источник углерода, такой как газообразный монооксид углерода (CO); газообразный диоксид углерода (CO₂); или их комбинацию можно непрерывно добавлять в первую инокулированную ферментационную среду во время процесса ферментации.

В контексте настоящего изобретения термин «водород» относится к химическому соединению водород (H₂). Водород (H₂) может быть предоставлен в газообразной форме.

В варианте осуществления настоящего изобретения газообразный водород может быть получен электролизом воды; получен из природных источников, таких как запасы земли; имеет микробное происхождение; или получен химически.

Электролиз воды приводит к разложению молекул воды на кислород и

газообразный водород в следствие прохождения электрического тока. Источник постоянного тока, подключенный к двум электродам или двум пластинам (обычно сделанным из какого-либо инертного металла, такого как платина или иридий), можно поместить в воду, и газообразный водород можно легко собрать с катода.

В варианте осуществления настоящего изобретения первый газообразный источник углерода, такой как газообразный монооксид углерода (CO) и/или газообразный диоксид углерода (CO₂), может быть получен в процессе улавливания углерода или в результате химического процесса, ферментативного процесса или микробного процесса.

Метаногенный микроорганизм может представлять собой метаногенную архебактерию, метаногенную бактерию, метаногенные дрожжи, метаногенный грибок или их комбинацию.

В варианте осуществления настоящего изобретения метаногенный микроорганизм может представлять собой прокариотический организм. Предпочтительно метаногенный микроорганизм может представлять собой метаногенную архебактерию.

Метаногенные архебактерии предпочтительно могут быть выбраны из группы, состоящей из *Methanobacterium bryantii*; *Methanobacterium formicicum*; *Methanobacterium thermoalcaliphium*; *Methanothermobacter wolfeii*; *Methanobrevibacter smithii*; *Methanobrevibacter ruminantium*; *Methanococcus voltae*; *Methanomicrobium mobile*; *Methanolacinia paynteri*; *Methanospirillum hungatei*; *Methanosarcina acetivorans*; *Methanosarcina barkeri*; *Methanosarcina mazei*; *Methanosarcina thermophile*; *Methanococcoides methylutens*; *Methanosaeta concilii* (*soehngenii*); и *Methanosaeta thermophila*.

В варианте осуществления настоящего изобретения процесс ферментации может представлять собой периодическую ферментацию, периодическую ферментацию с подпиткой или непрерывную ферментацию. Предпочтительно процесс ферментации может быть непрерывным.

Для коммерческого производства, например, SCP процесс ферментации может включать 3 стадии ферментации:

- Периодическая ферментация; которая представляет собой начальное размножение организмов, при котором все материалы, кроме необходимых организмов, предварительно обеззараживаются автоклавированием, загружаются в реактор вместе с организмами и начинается процесс. Используемый организм проходит через все фазы роста (лаг-фазу, логарифмическую или экспоненциальную фазу и стационарную фазу. В этом режиме работы условия непрерывно изменяются со временем в нестационарной системе и требуют большой работы и участия.

- периодическая ферментация с подпиткой; биотехнологический операционный процесс, при котором одно или более питательных веществ подаются в биореактор во время культивирования и при котором продукт(ы) остается в биореакторе до конца цикла. Периодическая ферментация с подпиткой может традиционно следовать за периодической ферментацией и может быть предусмотрена для достижения очень высоких концентраций

клеток организма перед превращением процесса в непрерывную ферментацию, поскольку периодическая ферментация потребует ингибирующих высоких концентраций питательных веществ и, следовательно, будет очень трудной или даже невозможной. Периодическую ферментацию с подпиткой можно использовать для подготовки клеточной культуры к непрерывной ферментации.

- Непрерывная ферментация; представляет собой производственную модель процесса ферментации, с питанием микроорганизма стерильной ферментационной средой, которая используется для культивирования организма, и в то же время с удалением части ферментационной среды, включая биомассу, из системы. Это делает уникальной особенностью непрерывную подачу биомассы, которую можно использовать в виде белка одноклеточных или фракционировать на различные фракции.

Производственный режим способа согласно настоящему изобретению может предпочтительно осуществляться как непрерывный процесс ферментации. Предпочтительно непрерывный процесс ферментации следует за периодической ферментацией и/или периодической ферментацией с подпиткой, начиная с добавления воды, необходимых питательных солей и микроорганизмов в ферментационный реактор, создавая первую инокулированную ферментационную среду, и может быть запущен процесс периодической ферментации и/или периодической ферментации с подпиткой. Когда будет достигнуто достаточное содержание биомассы, можно начинать непрерывный процесс ферментации.

По финансовым причинам в отрасли может быть заинтересованность и стремление как можно быстрее начать непрерывную ферментацию в устойчивом состоянии, чтобы сэкономить время и затраты и быстрее и выгоднее обеспечить рынок продуктом SCP, а также дать возможность определить отношения между условиями окружающей среды и микробным поведением, включая как генетическую, так и фенотипическую экспрессию.

Первая инокулированная ферментационная среда может ферментироваться во время периодической ферментации и/или периодической ферментации с подпиткой в течение периода в диапазоне от 6 часов до 6 дней; например, в течение периода от 12 часов до 5 дней; например в течение 1-4 дней, например в течение 2-3 дней.

Первая инокулированная ферментационная среда может циркулировать в первом ферментационном реакторе, предпочтительно с помощью первого устройства регуляции давления, и может быть инициировано добавление субстратов, таких как газообразный водород (H_2) и источник углерода, и может быть начат первый процесс ферментации. Когда плотность микроорганизмов достигает концентрации приблизительно 0,5-10%, а предпочтительно 1-5% (в пересчете на сухую массу), первый процесс ферментации может быть переведен на непрерывный процесс ферментации, при котором первая инокулированная ферментационная среда может непрерывно отбираться из первого ферментационного реактора, т. е. из верхнего резервуара и/или из U-образной части и подвергаться последующей обработке с получением желаемых первых продуктов реакции. Одновременно с непрерывным отбором первой инокулированной

ферментационной среды из первого ферментационного реактора может быть добавлен субстрат, содержащий воду, соли и питательные вещества.

В варианте осуществления настоящего изобретения у первой инокулированной ферментационной среды во время непрерывной ферментации может быть возможность ферментироваться в течение по меньшей мере 3 дней, например, в течение по меньшей мере 6 дней, например в течение по меньшей мере 2 недель, например, в течение по меньшей мере 4 недель, например в течение по меньшей мере 1½ месяцев, например, в течение по меньшей мере 2 месяцев, например, в течение по меньшей мере 3 месяцев.

Первая инокулированная ферментационная среда может во время непрерывной ферментации ферментироваться до тех пор, пока культивирование не будет остановлено принудительно или вручную из-за необходимости поддержания; микробного загрязнения; химического загрязнения; проблем с субстратами и т. п.

В варианте осуществления настоящего изобретения первая инокулированная ферментационная среда может подвергаться ферментации при температуре в диапазоне 25-60°C; например, в диапазоне 30-50°C; например в диапазоне 35-45°C; например, в диапазоне 40-43°C.

Первый процесс ферментации относится к ферментации метаногенного микроорганизма и дает первый продукт реакции.

В контексте настоящего изобретения термин «первый продукт реакции» относится к одному или более продуктам, полученным в результате первого процесса ферментации под действием метаногенного микроорганизма.

В варианте осуществления настоящего изобретения первый продукт реакции, полученный на стадии (v), может представлять собой первый материал биомассы; первый белок одноклеточных; C1-соединение; или их комбинацию.

Еще в одном варианте осуществления настоящего изобретения первый продукт реакции содержит белок одноклеточных.

Первый материал биомассы и/или первый белок одноклеточных может содержать один или более метаногенных микроорганизмов.

В варианте осуществления настоящего изобретения C1-соединение может представлять собой метан, метанол или их производные. Предпочтительно C1-соединение может представлять собой метан.

Предпочтительно, что в ходе первого процесса ферментации можно получить несколько первых продуктов реакции.

В варианте осуществления настоящего изобретения первый продукт реакции, полученный на стадии (v), может содержать комбинацию первого белка одноклеточных и C1-соединения.

Первый продукт реакции может содержать C1-соединение, и C1-соединение может быть добавлено во второй петлевой реактор, причем второй петлевой реактор содержит вторую инокулированную ферментационную среду, вторая инокулированная среда

ферментации содержит один или более микроорганизмов, способных метаболизировать C1-соединение и превращать C1-соединение во второй продукт реакции посредством второго процесса ферментации.

В контексте настоящего изобретения термин «второй продукт реакции» относится к одному или более продуктам, полученным в результате второго процесса ферментации под действием одного или более микроорганизмов, способных метаболизировать C1-соединение.

Второй продукт реакции может представлять собой второй белок одноклеточных, второй материал биомассы, CO₂ или их комбинацию.

Второй продукт реакции может представлять собой второй белок одноклеточных, второй материал биомассы или его фракцию.

В варианте осуществления настоящего изобретения второй продукт реакции может представлять собой комбинацию CO₂, белка одноклеточных или фракции белка одноклеточных.

Фракция белка одноклеточных или фракция продукта биомассы может быть получена способом, описанным в WO 2018/115042, а также последующей обработкой первого и/или второго продуктов реакции, которая может быть осуществлена в соответствии со способом, описанным в WO 2018/115042.

Один или более микроорганизмов, способных метаболизировать C1-соединение, могут представлять собой один или более аэробных микроорганизмов.

В варианте осуществления настоящего изобретения один или более аэробных микроорганизмов могут представлять собой один или более аэробных метанотрофных микроорганизмов и/или один или более аэробных метилотрофных микроорганизмов. Предпочтительно один или более аэробных метанотрофных микроорганизмов или один или более аэробных метилотрофных микроорганизмов могут представлять собой одну или более аэробных метанотрофных бактерий и/или одну или более аэробных метилотрофных бактерий, соответственно.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения один или более микроорганизмов, способных метаболизировать C1-соединение, могут не являться рекомбинантными микроорганизмами.

В контексте настоящего изобретения термин «рекомбинантный микроорганизм» относится к генетически модифицированному организму (ГМО), чей генетический материал был изменен с использованием методов геной инженерии. Рекомбинантный микроорганизм можно рассматривать в отличие от генетических изменений, которые происходят в естественной среде в микроорганизме, например при спаривании и/или естественной мутации.

Предпочтительно один или более микроорганизмов, способных метаболизировать C1-соединение, могут представлять собой один или более встречающихся в природе микроорганизмов.

В варианте осуществления настоящего изобретения один или более

микроорганизмов, способных метаболизировать C1-соединение, могут представлять собой бактерии, такие как метанотрофные или метилотрофные бактерии; дрожжи, такие как метанотрофные или метилотрофные дрожжи; грибок, такой как метанотрофный или метилотрофный грибок; или их комбинацию.

В контексте настоящего изобретения термин «встречающийся в природе микроорганизм» относится к микроорганизму, чей генетический материал не был изменен с использованием методов геной инженерии. Естественные модификации или изменения в генетическом материале микроорганизма могут быть охвачены термином «встречающийся в природе микроорганизм».

В варианте осуществления настоящего изобретения одна или более аэробных метанотрофных бактерий могут представлять собой *Methylococcus*. Предпочтительно *Methylococcus* представляет собой *M. capsulatus*, более предпочтительно *M. capsulatus* может представлять собой *M. capsulatus* (Bath); еще более предпочтительно *M. capsulatus* (Bath), идентифицированный под номером NCIMB 11132.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения один или более микроорганизмов, способных метаболизировать C1-соединение, могут быть обеспечены в комбинации с другим микроорганизмом (как при совместной ферментации).

Другой микроорганизм, участвующий в совместной ферментации, может быть выбран в соответствии с возможными примесями, такими как соединения углерода, отличные от C1, которые не метаболизуются или не перерабатываются одним или более микроорганизмами, способными метаболизировать C1 согласно настоящему изобретению, и, таким образом, могут накапливаться во второй инокулированной ферментационной среде во время второго процесса ферментации.

В варианте осуществления настоящего изобретения совместная ферментация может быть обеспечена в виде комбинации одного или более микроорганизмов, способных метаболизировать C1, предпочтительно *M. capsulatus*, в комбинации с одним или более микроорганизмами, выбранными из *Ralstonia* sp.; *Bacillus brevis*; *Brevibacillus agri*; *Alcaligenes acidovorans*; *Aneurinibacillus danicus* и *Bacillus firmus*.

В частности, совместная ферментация по настоящему изобретению может относиться к совместной ферментации, включающей комбинацию *M. capsulatus* (предпочтительно, NCIMB 11132); *A. acidovorans* (предпочтительно NCIMB 13287); *B. firmus* (предпочтительно NCIMB 13289); и *A. danicus* (предпочтительно NCIMB 13288).]

В варианте осуществления настоящего изобретения дрожжи могут быть метанотрофными или метилотрофными дрожжами. Предпочтительно дрожжи могут быть выбраны из *Pichia pastoris*; *Komagataella phaffii*; *Komagataella pastoris*; и/или *Komagataella pseudopastoris*.

В варианте осуществления настоящего изобретения второй материал биомассы и/или второй белок одноклеточных может содержать один или более метанотрофных микроорганизмов и/или один или более метилотрофных микроорганизмов.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения первый белок

одноклеточных и второй белок одноклеточных могут быть смешаны с получением комбинированного белка одноклеточных.

В варианте осуществления настоящего изобретения вторая инокулированная ферментационная среда может иметь возможность ферментироваться во время периодической ферментации в течение периода в диапазоне от 6 часов до 6 дней; например, в течение периода от 12 часов до 5 дней; например в течение 1-4 дней, например в течение 2-3 дней.

В производственном режиме второй процесс ферментации по настоящему изобретению может предпочтительно осуществляться как непрерывный процесс ферментации. Предпочтительно непрерывный процесс ферментации второй инокулированной ферментационной среды следует за периодической ферментацией и/или периодической ферментацией с подпиткой, начиная с добавления воды, необходимых питательных солей и микроорганизмов (включая один или более микроорганизмов, способных метаболизировать C1) во второй ферментационный реактор, создавая вторую инокулированную ферментационную среду, и может быть начат процесс периодической ферментации и/или периодической ферментации с подпиткой.

Вторая инокулированная ферментационная среда может циркулировать в ферментационном реакторе, предпочтительно с помощью первого устройства регуляции давления, и можно инициировать добавление субстратов, таких как газообразное C1-соединение, и может быть начат процесс ферментации. Когда плотность микроорганизмов во втором ферментационном реакторе достигает концентрации приблизительно 0,5-10%, а предпочтительно 1-5% (в пересчете на сухую массу), второй процесс ферментации может быть переведен на непрерывный процесс ферментации, при котором вторая инокулированная среда ферментации может непрерывно выводиться из второго ферментационного реактора, т. е. из верхнего резервуара и/или из U-образной части и подвергаться последующей обработке с получением желаемого второго продукта реакции. Одновременно с непрерывным отбором второй инокулированной ферментационной среды из ферментационного реактора можно добавлять субстрат, содержащий воду, соли и питательные вещества.

В варианте осуществления настоящего изобретения вторая инокулированная ферментационная среда может ферментироваться во время непрерывной ферментации в течение по меньшей мере 3 дней, например, по меньшей мере в течение 6 дней, например, в течение по меньшей мере 2 недель, например, в течение по меньшей мере 4 недель, например, в течение по меньшей мере 1½ месяцев, например, в течение по меньшей мере 2 месяцев, например, в течение по меньшей мере 3 месяцев.

Вторая инокулированная ферментационная среда может во время непрерывной ферментации ферментироваться до тех пор, пока культивирование не будет остановлено принудительно или вручную из-за необходимости поддержания; микробного загрязнения; химического загрязнения; проблем с субстратами и т. п.

В варианте осуществления настоящего изобретения вторая инокулированная

ферментационная среда может подвергаться ферментации при температуре в диапазоне 25-60°C; например, в диапазоне 30-50°C; например в диапазоне 35-45°C; например, в диапазоне 40-43°C.

Еще в одном варианте осуществления настоящего изобретения второй процесс ферментации может включать добавление диоксида углерода (CO_2) во вторую инокулированную ферментационную среду.

В варианте осуществления настоящего изобретения один или более метанотрофных микроорганизмов и/или один или более метилотрофных микроорганизмов по настоящему изобретению могут быть добавлены к первой инокулированной ферментационной среде, обеспечивая совместную ферментацию между одним или более метаногенными микроорганизмами; и одним или более метанотрофными микроорганизмами и/или одним или более метилотрофными микроорганизмами. Затем один или более метанотрофных микроорганизмов и/или один или более метилотрофных микроорганизмов могут объединять C1-соединение, полученное в результате первого процесса ферментации, непосредственно из первой инокулированной ферментационной среды перед стадией выделения (v).

Еще в одном варианте осуществления настоящего изобретения газообразный кислород (O_2) может быть добавлен ко второй инокулированной ферментационной среде.

Как упоминалось ранее в отношении первого процесса ферментации, водород (H_2) добавляется в первый реактор ферментации, и водород (H_2) может быть получен в результате электролиза воды, которая разлагается на газообразный кислород (O_2) и газообразный водород (H_2) за счет прохождения электрического тока.

В варианте осуществления настоящего изобретения газообразный кислород (O_2) получают из гидролизуемой воды, в результате чего образуется газообразный водород (H_2), причем газообразный водород (H_2) может быть добавлен к первой инокулированной ферментационной среде, а газообразный кислород (O_2) может быть добавлен ко второй инокулированной ферментационной среде.

Когда газообразный водород получают в результате электролиза воды, также получают кислород. Полученный кислород можно использовать во втором процессе ферментации для получения второго продукта реакции, например, второй белок одноклеточных, содержащий метанотрофный микроорганизм или метилотрофный микроорганизм.

В варианте осуществления настоящего изобретения CO_2 , полученный во втором процессе ферментации, может быть рециркулирован в первую инокулированную ферментационную среду и/или во вторую инокулированную ферментационную среду.

Предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения относится к способу получения второго белка одноклеточных, включающему следующие стадии:

(a) получение газообразного водорода (H_2);

(b) смешивание газообразного водорода со стадии (a) с первым источником углерода, например с первым газообразным источником углерода, таким как монооксид

углерода (CO); диоксид углерода (CO₂) или их комбинация, с получением C1-соединения;

(с) добавление C1-соединения, полученного на стадии (b), во второй петлевой реактор, содержащий один или более микроорганизмов, способных метаболизировать C1-соединение, с получением второй инокулированной ферментационной среды;

(d) обеспечение возможности ферментации второй инокулированной ферментационной среды во втором процессе ферментации и превращения C1-соединения во второй материал биомассы; и

(е) выделение второго материала биомассы, полученного на стадии (с), и получение второго белка одноклеточных.

В варианте осуществления настоящего изобретения C1-соединение, полученное на стадии (b), может быть получено в соответствии с первым процессом ферментации, описанным выше.

Еще в одном варианте осуществления настоящего изобретения газообразный водород (H₂), полученный на стадии (a), может быть получен путем обработки воды для ее разложения, приводящей к расщеплению молекул воды (H₂O) на фракцию газообразного водорода (H₂) и фракция газообразного кислорода (O₂).

Предпочтительно обработка для разложения воды может быть электролизом.

Электролиз представляет собой процесс, при котором источник электроэнергии подключается к двум электродам или двум пластинам (обычно сделанным из какого-либо инертного металла, такого как платина или иридий), которые помещаются в воду. При активации источника электроэнергии на катоде (где электроны входят в воду) появится водород (H₂), а на аноде появится кислород. Предполагая идеальную фарадеевскую эффективность, количество генерируемого водорода в два раза превышает количество кислорода, и оба они пропорциональны общему электрическому заряду, проводимому раствором.

При электролизе воды на аноде появляется кислород, который может быть выделен и добавлен во вторую инокулированную ферментационную среду.

Углекислый газ (CO₂), который может быть получен в результате второго процесса ферментации, может быть подвергнут рециркуляции.

Предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения относится к петлевому реактору, содержащему петлевую часть и верхний резервуар, при этом указанная петлевая часть содержит нисходящую часть, соединенную с восходящей частью через горизонтальную часть, по существу горизонтальную часть или U-образную часть, где петлевая часть содержит по меньшей мере одно впускное отверстие для подачи газообразного водорода (H₂).

В варианте осуществления настоящего изобретения петлевая часть может дополнительно содержать по меньшей мере одно впускное отверстие для подачи газообразного монооксида углерода (CO); газообразного диоксида углерода (CO₂) или их комбинации.

Предпочтительно петлевой реактор содержит циркуляционный насос.

В варианте осуществления настоящего изобретения первое устройство регуляции давления может быть предусмотрено в петлевой части петлевого реактора. Циркуляционный насос предпочтительно может действовать как первое устройство регуляции давления.

Первое устройство регуляции давления может быть предусмотрено в верхней части нисходящей части петлевой части петлевого реактора.

После первого устройства регуляции давления может быть предусмотрено второе устройство регуляции давления. Предпочтительно второе устройство регуляции давления предусмотрено в верхней части восходящей части.

Второе устройство регуляции давления может быть выбрано из группы, состоящей из сужения диаметра/поперечного сечения секции верхней части восходящей части; пластины с отверстиями; струи; насадок; клапана; гидроциклона; или насоса (такого как пропеллерный насос, лопастной насос или турбинный насос).

Первое устройство регуляции давления может перекачивать ферментационную среду ко второму устройству регуляции давления, которое создает повышенное давление на ферментационную среду между первым устройством регуляции давления и вторым устройством регуляции давления. Это повышенное давление может увеличить массоперенос газа из нерастворенного состояния в растворенное состояние, что делает его доступным для потребления микробами.

В варианте осуществления настоящего изобретения петлевой реактор может содержать по меньшей мере один неактивный смеситель и/или по меньшей мере один активный смеситель.

Верхний резервуар петлевого реактора может содержать:

- (i) первое выпускное отверстие, соединяющее верхний резервуар с нисходящей частью петлевой части и позволяющее ферментационной жидкости, находящейся в верхнем резервуаре, течь из верхнего резервуара в петлевую часть;
- (ii) первое впускное отверстие, соединяющее верхний резервуар с восходящей частью петлевой части, позволяя ферментационной жидкости, находящейся в петлевой части, течь из петлевой части в верхний резервуар; и

Верхний резервуар может дополнительно содержать вентиляционную трубу для выхода отходящих газов из верхнего резервуара.

В варианте осуществления настоящего изобретения верхний резервуар дополнительно содержит средство визуального контроля.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения петлевая часть содержит средство визуального контроля.

В петлевой части могут быть предусмотрены средства визуального контроля для контроля потока ферментационной среды и/или турбулентности ферментационной среды в лопастной части для обеспечения оптимизированной ферментации и повышения производительности процесса ферментации.

Средства визуального контроля могут быть предусмотрены в верхнем резервуаре

для контроля пенообразования и/или турбулентности ферментационной жидкости в верхнем резервуаре для обеспечения оптимизированной дегазации отходящих газов и, следовательно, повышения производительности процесса ферментации.

Предпочтительно средство визуального контроля может быть размещено с горизонтальным или по существу горизонтальным обзором в верхнем резервуаре.

Средство визуального контроля может быть размещено сбоку от верхнего резервуара, что обеспечивает комбинированный вид над поверхностью жидкости для ферментации и под поверхностью жидкости для ферментации.

Предпочтительно средство визуального контроля может быть размещено в конце верхнего резервуара.

Предпочтительно средство визуального контроля может быть размещено на конце верхнего резервуара, обеспечивая обзор от первого впускного отверстия (или восходящей части) к первому выпускному отверстию (или нисходящей части).

В варианте осуществления настоящего изобретения средство визуального контроля в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой смотровое отверстие, камеру или комбинацию смотрового отверстия и камеры, например встроенную камеру.

Еще в одном варианте осуществления настоящего изобретения смотровое отверстие может быть смотровым стеклом.

Петлевой реактор может содержать по меньшей мере один датчик водорода (H_2). Датчик водорода может предоставлять информацию о количестве растворенного и/или нерастворенного водорода (H_2) в первой инокулированной ферментационной среде. Таким образом, можно оптимизировать первый процесс ферментации в соответствии с настоящим изобретением.

Дальнейшие подробности о подходящих модификациях петлевого реактора и особенности работы такого петлевого реактора и обработки полученной биомассы могут быть описаны в WO 2010/069313; WO 2000/70014; WO 2003/016460; WO 2018/158319; WO 2018/158322; WO 2018/115042 и WO 2017/080987, которые включены в качестве ссылки.

Предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения относится к комбинированной композиции белка одноклеточных, содержащей первый белок одноклеточных по настоящему изобретению и второй белок одноклеточных по настоящему изобретению.

Предпочтительно первый белок одноклеточных содержит один или более метаногенных микроорганизмов.

Предпочтительно второй белок одноклеточных содержит один или более метанотрофных микроорганизмов или метилотрофных микроорганизмов.

В варианте осуществления настоящего изобретения комбинированный белок одноклеточных содержит комбинацию

- одного или более метаногенных микроорганизмов; и

- одного или более метанотрофных микроорганизмов или одного или более метилотрофных микроорганизмов.

Предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения относится к применению комбинированной композиции белка одноклеточных по настоящему изобретению в качестве ингредиента кормового продукта для животных или пищевого продукта для человека.

Кормовой продукт может представлять собой кормовой продукт для жвачных животных, кормовой продукт для рыб, кормовой продукт для свиней или кормовой продукт для домашней птицы.

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

Все патентные и непатентные ссылки, цитируемые в настоящей заявке, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

Ссылки

WO 2010/069313

WO 2000/70014

WO 2003/016460

WO 2018/158319

WO 2018/158322

WO 2018/115042

WO 2017/080987

WO2018/132379

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения первого продукта реакции посредством первого процесса ферментации, проводимого в первом петлевом реакторе, включающий стадии:

(i) добавление инокулята, содержащего один или более метаногенных микроорганизмов, в первый петлевой реактор с получением первой инокулированной ферментационной среды;

(ii) добавление газообразного водорода (H_2) в первую инокулированную ферментационную среду;

(iii) добавление первого источника углерода в первую инокулированную ферментационную среду;

(iv) обеспечение возможности ферментации первой ферментационной среды с получением первого продукта реакции; и

(v) выделение первого продукта реакции, полученного на стадии (iv).

2. Способ по п. 1, где первый источник углерода представляет собой первый газообразный источник углерода, и где первый газообразный источник углерода представляет собой газообразный монооксид углерода (CO); газообразный диоксид углерода (CO_2); или их комбинацию.

3. Способ по любому из предыдущих пп., где первый продукт реакции, полученный на стадии (v), представляет собой первый материал биомассы; первый белок одноклеточных; C1-соединение; или их комбинацию, и где C1-соединение может представлять собой метан, метанол или их производные.

4. Способ по любому из предыдущих пп., где первый продукт реакции содержит C1-соединение, и где C1-соединение добавляют во второй петлевой реактор, который содержит вторую инокулированную ферментационную среду, которая содержит один или более микроорганизмов, способных метаболизировать C1-соединение и превращать C1-соединение во второй продукт реакции посредством второго процесса ферментации.

5. Способ получения второго белка одноклеточных, включающий стадии:

(a) получение газообразного водорода (H_2);

(b) смешивание газообразного водорода из стадии (a) с первым источником углерода, например первым газообразным источником углерода, таким как монооксид углерода (CO); диоксид углерода (CO_2) или их комбинация, с получением C1-соединения;

(c) добавление C1-соединения, полученного на стадии (b), во второй петлевой реактор, содержащий один или более микроорганизмов, способных метаболизировать C1-соединение, с получением второй инокулированной ферментационной среды;

(d) обеспечение возможности ферментации второй инокулированной ферментационной среды во втором процессе ферментации и превращение C1-соединения во второй материал биомассы; и

(e) выделение второго материала биомассы, полученного на стадии (c), и получение второго белка одноклеточных.

6. Петлевой реактор, содержащий петлевую часть и верхний резервуар, причем

указанная петлевая часть содержит нисходящую часть, соединенную с восходящей частью через U-образную часть, где петлевая часть содержит по меньшей мере одно впускное отверстие для подачи газообразного водорода (H_2)

7. Петлевой реактор по п. 6, где верхний резервуар дополнительно содержит средство визуального контроля, и/или где петлевая часть содержит средство визуального контроля.

8. Композиция белка одноклеточных, содержащая первый белок одноклеточных по настоящему изобретению и второй белок одноклеточных по настоящему изобретению.

9. Композиция белка одноклеточных по п. 8, где композиция одноклеточных содержит:

- один или более метаногенных микроорганизмов; и
- один или более метанотрофных микроорганизмов, или один или более метилотрофных микроорганизмов.

10. Применение композиции белка одноклеточных по любому из пп. 8-9 в качестве ингредиента кормового продукта для животного.

По доверенности

**ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ,
ПРЕДЛОЖЕННАЯ ЗАЯВИТЕЛЕМ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ**

1. Способ получения конечного продукта реакции посредством первого и второго процесса ферментации, проводимого в первом и втором петлевом реакторе, включающий стадии:

(i) добавление инокулята, содержащего один или более метаногенных микроорганизмов, в первый петлевой реактор с получением первой инокулированной ферментационной среды;

(ii) добавление газообразного водорода (H_2) в первую инокулированную ферментационную среду;

(iii) добавление первого источника углерода в первую инокулированную ферментационную среду;

(iv) обеспечение возможности ферментации первой ферментационной среды с получением первого продукта реакции; и

(v) выделение первого продукта реакции, полученного на стадии (iv)

где первый продукт реакции содержит C1-соединение, и где C1-соединение добавляют во второй петлевой реактор, содержащий вторую инокулированную ферментационную среду, содержащую один или более микроорганизмов, способных метаболизировать C1-соединение и превращать его в конечный продукт реакции посредством второго процесса ферментации, где конечный продукт реакции представляет собой белок одноклеточных.

2. Способ по п.1, где первый источник углерода представляет собой первый газообразный источник углерода, и где первый газообразный источник углерода представляет собой газообразный монооксид углерода (CO); газообразный диоксид углерода (CO_2); или их комбинацию.

3. Способ по п. 2, где газообразный источник углерода получают посредством процесса улавливания углерода, химического процесса, ферментного процесса или микробного процесса.

4. Способ по любому из предыдущих пп., где C1-соединение представляет собой метан или метанол.

5. Способ по любому из предыдущих пп., где H_2 получают посредством электролиза воды, получают из природных источников, или получают с использованием микробов или химически.

6. Способ по п. 5, где H_2 получают посредством электролиза воды, и где полученный таким образом O_2 добавляют во вторую инокулированную ферментационную среду или используют во втором процессе ферментации.

7. Способ по любому из предыдущих пп., где CO_2 , полученный посредством второго процесса ферментации, подвергают рециркуляции.

8. Способ по п. 8, где CO_2 подвергают рециркуляции в первую инокулированную ферментационную среду и/или во вторую инокулированную ферментационную среду.

9. Способ получения белка одноклеточных, включающий стадии:

(а) получение газообразного водорода (H_2);

(b) смешивание газообразного водорода со стадии (а) с источником углерода, например с газообразным источником углерода, таким как монооксид углерода (CO); диоксид углерода (CO_2) или их комбинация, с получением C1-соединения;

(с) добавление C1-соединения, полученного на стадии (b), во второй петлевой реактор, содержащий один или более микроорганизмов, способных метаболизировать C1-соединение, с получением инокулированной ферментационной среды;

(d) обеспечение возможности ферментации инокулированной ферментационной среды в процессе ферментации и превращение C1-соединения в материал биомассы; и

(е) выделение материала биомассы, полученного на стадии (с), и получение белка одноклеточных.

10. Способ по п. 9, где H_2 получают посредством электролиза воды, получают из природных источников, или получают с использования микробов или химически.

11. Способ по п. 10, где H_2 получают посредством электролиза воды, и где полученный таким образом O_2 добавляют в инокулированную ферментационную среду или используют в процессе ферментации.

12. Способ по любому из пп. 9-11, где газообразный источник углерода получают посредством процесса улавливания углерода, химического процесса, ферментного процесса или микробного процесса.

13. Способ по любому из пп. 9-13, где CO_2 , полученный процессом ферментации, подвергают рециркуляции.