



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119635** (13) **C2**  
(51) МПК (2019.01)

**B09B 3/00**

**C12P 5/02** (2006.01)

**C12P 7/56** (2006.01)

**C12P 7/40** (2006.01)

**C12P 7/52** (2006.01)

**C12P 7/54** (2006.01)

**C12P 7/10** (2006.01)

**C02F 11/04** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	<b>а 2015 00139</b>	(72) Винахідник(и):	<b>Йєнсен Якоб Вагнер (DK), Рьонш Георг Ернсков (DK), Антонсен Себастьян Бух (DK)</b>
(22) Дата подання заявки:	<b>12.06.2013</b>	(73) Власник(и):	<b>РЕНЕСАЄНС А/С, Kraftværksvej 53, DK-7000 Fredericia, Denmark (DK)</b>
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	<b>25.07.2019</b>	(74) Представник:	<b>Михайлюк Ганна Валентинівна, реєстр. №184</b>
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>61/658,419</b>	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	<b>WO 2009/003167 A1, 31.12.2008 He R. Biological degradation of MSW in a methanogenic reactor using treated leachate recirculation / R. He, D. S. Shen, J. Q. Wang, Y. H. He, Y. M. Zhu // Process Biochemistry. – 2005. – Vol. 40. – № 12. – P. 3660-3666 CN 101544990 A, 30.09.2009 DE 102009009985 A1, 26.08.2010 WO 2006/029971 A2, 23.03.2006 Jensen J. W. Cellulase hydrolysis of unsorted MSW / J. W. Jensen, C. Felby, H. Jørgensen // Applied biochemistry and biotechnology. – 2011. – V. 165. – № 7-8. – P. 1799-1811. Jensen J. W. Enzymatic processing of municipal solid waste / J. W. Jensen, C. Felby, H. Jørgensen, G. Ø. Rønsch, N. D. Nørholm // Waste management. – 2010. – V. 30. – № 12. – P. 2497-2503.</b>
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>12.06.2012</b>		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	<b>US</b>		
(41) Публікація відомостей про заявку:	<b>25.02.2015, Бюл.№ 4</b>		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	<b>25.07.2019, Бюл.№ 14</b>		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	<b>PCT/DK2013/050194, 12.06.2013</b>		

## (54) СПОСІБ ПЕРЕРОБКИ ТВЕРДИХ ПОБУТОВИХ ВІДХОДІВ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ БІОМЕТАНУ

### (57) Реферат:

Винахід стосується способу переробки твердих побутових відходів (MSW) або несортованих MSW, згідно з яким здійснюють ферментативний гідроліз частин сортованих MSW або несортованих MSW, які біологічно розкладаються, із застосуванням речовини з целюлазною активністю паралельно з мікробіологічною ферментацією у температурному діапазоні 35-75 °С, що приводить до зрідження частин відходів, які біологічно розкладаються, і накопичення

UA 119635 C2

мікробних метаболітів, відокремлення зріджених частин відходів, які біологічно розкладаються, від твердих речовин, які біологічно не розкладаються, з отриманням біорідини, у якій щонайменше 40 % за масою від вмісту безводних речовин знаходяться у вигляді розчинених летких речовин, які при цьому складають щонайменше 25 % за масою у вигляді будь-якої комбінації з ацетату, бутирату, етанолу, форміату, лактату та/або пропіонату. Після чого біорідину зброджують для одержання біометану. При цьому лактат присутній у більш високій концентрації за масою у порівнянні з будь-якою іншою окремою розчиною леткою речовиною, вибраною з групи, що складається з ацетату, бутирату, етанолу, форміату та/або пропіонату, а паралельна мікробіологічна ферментація включає інокуляцію MSW із застосуванням одного або декількох видів з групи, що включає молочнокислі бактерії, бактерії, що продукують ацетат, бактерії, що продукують пропіонат, бактерії, що продукують бутират, або бактерії, що зустрічаються в MSW в природних умовах, причому один або декілька видів бактерій, що використовують для інокуляції MSW, не продукують етанол як первинний продукт зазначеної паралельної ферментації.

## СПОСОБИ ТА КОМПОЗИЦІЇ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ БІОМЕТАНУ

Тверді побутові відходи (MSW), зокрема, у тому числі побутові відходи, відходи з ресторанів і підприємств з виробництва харчових продуктів, а також відходи з адміністративних будівель містять значну кількість компонентів органічного матеріалу, які далі можуть бути перероблені з одержанням енергії, паливних матеріалів та інших корисних продуктів. На сьогоднішній день лише малу частину доступних MSW піддають рециркуляції, при цьому переважну більшість викидають на смітники.

Значний інтерес виник до розробки ефективних і екологічно безпечних способів переробки твердих відходів для максимального вилучення притаманного їм енергетичного потенціалу, а також рециркуляції матеріалів, що переробляються. Однією з істотних проблем при переробці "відходів в енергію" був неоднорідний характер MSW. Тверді відходи, як правило, містять значну кількість компонентів органічного матеріалу, що розкладається, змішаного з пластмасою, склом, металами та іншими матеріалами, що не розкладаються. Несортовані відходи можуть безпосередньо бути використані в сміттєспалюванні, як це широко практикується в таких країнах, як Данія та Швеція, де використовуються в системах централізованого опалення (Strehlik 2009). Разом з тим, способи сміттєспалювання пов'язують із негативними наслідками для навколишнього середовища, і з їхньою допомогою не досягають ефективної рециркуляції сировини. Чисте та ефективне застосування компонента MSW, що розкладається, об'єднане з переробкою, як правило, потребує будь-якого способу сортування для відокремлення матеріалу, що розкладається, від того, що не розкладається.

Компонент MSW, що розкладається, можна використовувати при переробці "відходів в енергію" із застосуванням як термохімічних, так і біологічних способів. MSW можна піддавати піролізу або іншим режимам термохімічної газифікації. Органічні відходи, що термічно розкладаються при надзвичайно високих температурах, продукують леткі компоненти, такі як смола та метан, а також твердий залишок або "кокс", який можна спалювати з меншими токсичними наслідками в порівнянні з такими, які асоціюються з безпосереднім сміттєспалюванням. У якості альтернативи, органічні відходи можна термічно перетворювати на "сингаз", що містить монооксид вуглецю, діоксид вуглецю та водень, які далі можна перетворювати на синтетичні палива. Див., наприклад, для огляду Malkow 2004.

Біологічні способи конверсії компонентів MSW, що розкладаються, включають ферментацію з одержанням специфічних корисних кінцевих продуктів, таких як етанол. Див., наприклад, WO2009/150455; WO2009/095693; WO2007/036795; Ballesteros et al. 2010; Li et al 2007.

У якості альтернативи, біологічної конверсії можна досягти шляхом анаеробного зброджування з одержанням біометану або "біогазу". Див., наприклад, для огляду Hartmann and Ahring 2006. Попередньо сортований органічний компонент MSW може бути безпосередньо перетворений на біометан, див., наприклад, US2004/0191755, або після порівняно простого способу "розмелювання", що включає здрібнювання в присутності доданої води, див., наприклад, US2008/0020456.

Однак, попереднє сортування MSW для одержання органічного компонента є, як правило, дорогим, неефективним або недоцільним. Первинне сортування потребує великої інфраструктури та експлуатаційних витрат, а також активної участі та підтримки населенням, від якого одержують відходи, – діяльність, якої важко досягти в сучасних міських суспільствах. Механічне сортування є, як правило, капіталомістким та додатково асоціюється з великою втратою органічного матеріалу, порядку щонайменше 30 %, а часто значно вище. Див., наприклад, Connsonni 2005.

Деякі з цих проблем із системами сортування були успішно усунуті за допомогою здійснення зрідження органічних компонентів, що розкладаються, у несортованих відходах. Зріджений органічний матеріал може бути з легкістю відокремлений від матеріалів, що не розкладаються. Після зрідження в пульпу, органічний компонент можна з легкістю використовувати в способах термохімічної або біологічної конверсії. Неодноразово повідомлялося про зрідження компонентів, що розкладаються, з використанням способів "автоклавування" при високому тиску та високій температурі, див., наприклад, US2013/0029394; US2012/006089; US20110008865; WO2009/150455; WO2009/108761; WO2008/081028; US2005/0166812; US2004/0041301; US 5427650; US 5190226.

Принципово інший підхід до зрідження органічних сполук, що розкладаються, полягає в тому, що цього можна досягти з використанням біологічного процесу, зокрема, за допомогою ферментативного гідролізу, див. Jensen et al. 2010; Jensen et al. 2011; Tonini and Astrup 2012; WO2007/036795; WO2010/032557.

Ферментативний гідроліз пропонує специфічні переваги над способами "автоклавування" для зрідження органічних компонентів, що розкладаються. Використовуючи ферментативне

зрідження, переробку MSW можна здійснювати безперервним способом з використанням порівняно недорогого устаткування та реакцій не під тиском, що проходять при порівняно низьких температурах. Напроти, способи "автоклавування" можуть бути здійснені в пакетному режимі та, як правило, передбачають більш високі капіталовкладення.

Усвідомлена необхідність в "стерилізації" для зменшення таким чином можливих ризиків для здоров'я, викликаних патогенними мікроорганізмами, що переносяться MSW, була переважною темою, що стосується підтвердження переваги способів зрідження "автоклавуванням". Див., наприклад, WO2009/150455; WO2000/072987; Li et al. 2012; Ballesteros et al. 2010; Li et al. 2007. Аналогічним чином, раніше вважали, що ферментативне зрідження вимагає теплової попередньої обробки з досягненням порівняно високої температури щонайменше 90-95 °C. Ця висока температура вважалася необхідною, зокрема, для здійснення "стерилізації" несортованих MSW, і щоб таким чином органічні компоненти, що розкладаються, можна було розм'якшити та паперові вироби "переробити в паперову масу". Див. Jensen et al. 2010; Jensen et al. 2011; Tonini and Astrup 2012.

Було виявлено, що безпечного ферментативного зрідження несортованих MSW можна досягти без високотемпературної попередньої обробки. Дійсно, всупереч очікуванням, високотемпературна попередня обробка є не тільки недоцільною, але може активним чином нашкодити, оскільки знищує мікроорганізми навколишнього середовища, які розмножуються у відходах. Стимулювання мікробіологічної ферментації разом з ферментативним гідролізом у термофільних умовах >45 °C поліпшує "поглинання органічних речовин" або з використанням мікроорганізмів "навколишнього середовища", або з використанням вибірково "інокульованих" організмів. Таким чином, паралельна термофільна мікробіологічна ферментація надійно підвищує органічний вихід "біорідини", яка є терміном у даному документі для зріджених компонентів, що розкладаються, одержаних шляхом ферментативного гідролізу. За цих умов патогенні мікроорганізми, що звичайно виявляються в MSW, не розмножуються. Див., наприклад, Hartmann and Ahring 2006; Deportes et al. 1998; Carrington et al. 1998; Bendixen et al. 1994; Kubler et al. 1994; Six and De Baerre et al. 1992. За цих умов типові патогени, що переносяться MSW, з легкістю витісняються повсюдно розповсюдженими молочнокислими бактеріями та іншими безпечними організмами.

Додатково до поліпшення "поглинання органічних речовин" за рахунок ферментативного гідролізу, паралельної мікробіологічної ферментації з використанням будь-якої комбінації з молочнокислих бактерій або мікроорганізмів, що продукують ацетат, етанол, форміат, бутират, лактат, пентаноат або гексаноат, "попередні умови" для біорідини є такими, щоб зробити її більш ефективною в якості субстрату для одержання біометану. При мікробіологічній ферментації продукується біорідина, що характеризується в цілому підвищеним відсотковим вмістом розчинених твердих речовин у порівнянні зі зваженими твердими речовинами, порівняно з біорідиною, одержаною окремо шляхом ферментативного зрідження. Високомолекулярні полісахариди в цілому більш повно розкладаються у результаті мікробіологічної "попередньої підготовки". Паралельна мікробіологічна ферментація та ферментативний гідроліз розщеплює біополімери до легко застосовуваних субстратів та, додатково, досягається метаболічна конверсія вихідних субстратів до коротколанцюгових карбонових кислот та/або етанолу. Одержана в результаті біорідина, що містить високий відсоток мікробних метаболітів, забезпечує субстрат біометану, за допомогою якого ефективно усувається обмежуючий швидкість етап "гідролізу", див., наприклад, Delgenes et al. 2000; Angelidaki et al. 2006; Cysneiros et al. 2011, і застосування якого пропонує додаткові переваги для одержання метану, зокрема, із використанням дуже швидких систем анаеробного зброджування на основі "фільтрів з нерухомим завантаженням".

Короткий опис

Короткий опис фігур

Фігура 1. Конверсія сухої речовини, вираженої у вигляді сухої речовини, одержаної в надосадовій рідині, у вигляді загального вмісту сухої речовини у відсотках, при паралельному ферментативному гідролізі та мікробіологічній ферментації, стимульованих шляхом інокуляції біорідини EC12B із прикладу 5.

Фігура 2. Бактеріальні метаболіти, одержані в надосадовій рідині після паралельного ферментативного гідролізу та ферментації, індукованих шляхом додавання біорідини із прикладу 5.

Фігура 3. Графічне представлення випробувального реактора REnescience.

Фігура 4. Схематичне зображення демонстраційної установки.

Фігура 5. Поглинання органічних речовин у біорідині в різні періоди часу, виражене в кг VS на кг перероблених MSW.

Фігура 6. Бактеріальні метаболіти, виражені у вигляді відсотка розчинених VS у біорідині, а також у вигляді числа аеробних бактерій у різні моменти часу в експерименті.

Фігура 7. Розподіл видів бактерій, ідентифікованих у біорідині із прикладу 3.

Фігура 8. Розподіл 13 переважних бактерій в EC12B, зразки якої відбирали під час випробування, описаного в прикладі 5.

Фігура 9. Вихід на робочий режим та зниження вироблення біометану з використанням біорідини із прикладу 5.

Фігура 10. Характеристика "виходу на робочий режим" і "зниження" вироблення біометану з біорідини "з високим вмістом лактату" із прикладу 2.

Фігура 11. Характеристика "виходу на робочий режим" і "зниження" вироблення біометану з біорідини "з низьким вмістом лактату" із прикладу 2.

Фігура 12 демонструє характеристику "виходу на робочий режим" вироблення біометану з біорідини із гідролізованої пшеничної соломи.

Докладний опис варіантів здійснення

У деяких варіантах здійснення даний винахід забезпечує спосіб переробки твердих побутових відходів (MSW), що включає етапи

(i) забезпечення MSW при вмісті безводних речовин від 5 до 40 % і при температурі від 45 до 75 градусів С,

(ii) ферментативного гідролізу частин MSW, що біологічно розкладаються, паралельного з мікробіологічною ферментацією при температурі від 45 до 75 градусів С, результатом яких є зрідження частин відходів, що біологічно розкладаються, і накопичення мікробних метаболітів з наступним

(iii) відокремленням зріджених частин відходів, що біологічно розкладаються, від твердих речовин, що біологічно не розкладаються, для одержання біорідини, яка відрізняється вмістом розчинених летких твердих речовин, з яких щонайменше 25 % за масою містять будь-яку комбінацію з ацетату, бутирату, етанолу, форміату, лактату та/або пропіонату, з наступним

(iv) анаеробним зброджуванням біорідини для одержання біометану.

У деяких варіантах здійснення даний винахід забезпечує органічний рідкий субстрат біогазу, який одержують шляхом ферментативного гідролізу та мікробіологічної ферментації твердих побутових відходів (MSW), який відрізняється тим, що

щонайменше 40 % за масою від вмісту безводних речовин знаходяться у вигляді розчинених летких твердих речовин, при цьому розчинені леткі тверді речовини складають щонайменше 25 % за масою у вигляді будь-якої комбінації з ацетату, бутирату, етанолу, форміату, лактату та/або пропіонату.

У деяких варіантах здійснення даний винахід пропонує спосіб одержання біогазу, що включає етапи

(i) забезпечення органічного рідкого субстрату біогазу, попередньо підготовленого шляхом мікробіологічної ферментації таким чином, що щонайменше 40 % за масою від вмісту безводних речовин знаходяться у вигляді розчинених летких твердих речовин, при цьому розчинені леткі тверді речовини складають щонайменше 25 % за масою у вигляді будь-якої комбінації з ацетату, бутирату, етанолу, форміату, лактату та/або пропіонату,

(ii) перенесення рідкого субстрату в систему анаеробного зброджування з наступним

(iii) здійсненням анаеробного зброджування рідкого субстрату для одержання біометану.

Динамічні характеристики метаболізму мікробних угруповань, що беруть участь в анаеробному зброджуванні, є складними. Див. Supaphol et al. 2010; Morita and Sasaki 2012; Chandra et al. 2012. При типовому анаеробному зброджуванні (AD) для одержання біогазу-метану біологічні процеси, опосередковані мікроорганізмами, досягають чотирьох початкових етапів – гідроліз біологічних макромолекул до складених мономерів або інші метаболітів; кислотогенез, у результаті чого утворюються коротколанцюгові вуглеводневі кислоти та спирти; ацетогенез, у результаті чого засвоювані живильні речовини катаболізуються в оцтову кислоту, водень і діоксид вуглецю; і метаногенез, у результаті чого оцтова кислота та водень катаболізуються певними археями до метану і діоксиду вуглецю. Етап гідролізу, як правило, є обмежуючим швидкість реакції. Див., наприклад, Delgenes et al. 2000; Angelidaki et al. 2006; Cysneiros et al. 2011.

Відповідно, переважним при одержанні субстратів для одержання біометану є їхній попередній гідроліз за допомогою деяких видів попередньої обробки. У деяких варіантах здійснення в способах за даним винаходом поєднують мікробіологічну ферментацію з ферментативним гідролізом MSW, обидва з яких являють собою швидку біологічну попередню обробку для наступного одержання біометану, а також способом відокремлення органічних компонентів, що розкладаються, від інших несортованих MSW.

Повідомляли про біологічні попередні обробки з використанням твердих субстратів біометану, у тому числі первинно сортованих органічних компонентів MSW. Див., наприклад, Fdez-Guelfo et al. 2012; Fdez-Guelfo et al. 2011 A; Fdez-Guelfo et al. 2011 B; Ge et al. 2010; Lv et al. 2010; Borghi et al. 1999. Поліпшення в наступних виходах метану в результаті анаеробного зброджування були представлені як результат підвищеного розкладання складних біополімерів і підвищеної розчинності летких твердих речовин. Однак рівень розчинності летких твердих речовин і рівень конверсії в леткі жирні кислоти, досягнуті за допомогою способів, про які раніше повідомляли, навіть не наблизилися до рівнів, досягнутих за допомогою способів за даним винаходом. Наприклад, Fdez-Guelfo et al. 2011 повідомляють про 10-50 % відносно поліпшення розчинності летких твердих речовин, досягнуте за допомогою різних біологічних попередніх обробок первинно сортованих органічних фракцій з MSW - це відповідає кінцевим абсолютним рівням розчинності від приблизно 7 до 10 % летких твердих речовин. Для порівняння, за допомогою способів за даним винаходом одержують рідкі субстрати біометану, що містять щонайменше 40 % розчинених летких твердих речовин.

Також повідомляли про системи двоетапного анаеробного зброджування, у яких у способі першого етапу гідролізуються субстрати біометану, у тому числі первинно сортований органічний компонент із MSW і інші певні біогенні субстрати. Під час першого анаеробного етапу, що є, як правило, термофільним, розкладаються високомолекулярні полімери та утворюються леткі жирні кислоти. Після чого йде другий анаеробний етап, який здійснюють у зовсім іншому реакторі, у якому переважають метаногенез і ацетогенез. Повідомляли про системи двоетапного анаеробного зброджування, у яких, як правило, використовують первинно сортовані, певні біогенні субстрати із загальним вмістом твердих речовин менше 7 %. Див., наприклад, Supaphol et al. 2011; Kim et al. 2011; Lv et al. 2010; Riau et al. 2010; Kim et al. 2004; Schmit and Ellis 2000; Lafitte-Trouque and Forster 2000; Dugba and Zhang 1999; Kaiser et al. 1995; Harris and Dague 1993. Нещодавно повідомляли про декілька двоетапних систем AD, у яких використовують первинно сортовані певні біогенні субстрати при рівнях загального вмісту твердих речовин аж до 10 %. Див., наприклад, Yu et al. 2012; Lee et al. 2010; Zhang et al. 2007. Зрозуміло, у жодній з описаних систем двоетапного анаеробного зброджування ніколи не передбачалося застосування несорттованих MSW у якості субстрату, не говорячи вже про одержання рідкого субстрату біометану з високим вмістом твердих речовин. Двоетапне анаеробне зброджування спрямоване на конверсію твердих субстратів з безперервною подачею додаткових твердих речовин у реактор першого етапу та безперервним видаленням летких жирних кислот з реактора першого етапу.

Для здійснення на практиці способів за даним винаходом можна використовувати будь-які тверді відходи. Як буде зрозуміло фахівцям в даній галузі техніки, термін "тверді побутові відходи" (MSW) відноситься до фракцій відходів, які, як правило, наявні в місті, але не повинні надходити з будь-якого району як такі. MSW можуть являти собою будь-яку комбінацію з відходів целюлози, рослинних відходів, відходів тваринництва, пластмасових відходів, відходів металу або відходів скла, включаючи без обмеження будь-який один або декілька з наступних: сміття, зібране у стандартних міських системах збору відходів, необов'язково перероблене у декількох центральних пристроях, що сортують, подрібнюють або розмелюють, таких як Dewaster® або reCulture®; тверді відходи, відокремлені від побутових відходів, у тому числі як органічні фракції, так і фракції, багаті на папір; фракції відходів промисловості, такої як ресторанна індустрія, харчова промисловість, промисловість у цілому; фракції відходів целюлозно-паперової промисловості; фракції відходів підприємств рециркуляції відходів; фракції відходів харчової або кормової промисловості; фракції відходів медичної промисловості; фракції відходів, одержані від сільськогосподарського сектору або сектору, пов'язаного з фермерством; фракції відходів, одержані при переробці продуктів, багатих на цукор або крохмаль; забруднені або будь-яким чином зіпсовані сільськогосподарські продукти, такі як зернові, різновиди картоплі та різновиди буряка, не придатні до використання для харчових або кормових цілей; садові відходи.

MSW за своєю природою, як правило, неоднорідні. Статистичні дані про склад відходів, що забезпечують стійку базу для порівняння між країнами, не одержали широкого поширення. Стандарти та операційні методики для правильного відбору зразків і визначення характеристик залишаються нестандартизованими. Фактично, у літературі описані лише декілька стандартизованих способів відбору зразків. Див., наприклад, Riber et al., 2007. Щонайменше у випадку з побутовими відходами, склад характеризується сезонними та географічними коливаннями. Див., наприклад, Dahlen et al., 2007; Eurostat, 2008; Hansen et al., 2007b; Muhle et al., 2010; Riber et al., 2009; Simmons et al., 2006; The Danish Environmental Protection agency,

2010. Також у літературі описані географічні коливання в складі побутових відходів, навіть на невеликих відстанях 200-300 км між районами (Hansen et al., 2007b).

У деяких варіантах здійснення MSW можуть бути перероблені у вигляді "несорттованих" відходів. Використовуваний у даному документі термін "несорттований" відноситься до способу, у якому MSW по суті не розділяють на окремі фракції, у результаті чого біогенний матеріал по суті не відокремлюють від пластику та/або іншого неорганічного матеріалу. Як використовується в даному документі, відходи можуть бути "несорттованими", незважаючи на видалення ряду великих об'єктів або металевих об'єктів і незважаючи на часткове відокремлення пластикового та/або неорганічного матеріалу. "Несорттовані" відходи, як використовується в даному документі, відносяться до відходів, які по суті не розділяли для забезпечення біогенної фракції, у якій менше 15 % за сухою масою являють собою небіогенний матеріал. Як використовується в даному документі, відходи, що містять суміш біогенного та небіогенного матеріалу, у яких більше 15 % за сухою масою являють собою небіогенний матеріал, є "несорттованими". Як правило, несорттовані MSW включають біогенні відходи, а саме відходи, які можуть розкладатися в біологічно перетворювані речовини, включаючи харчові та кухонні відходи, матеріали, що містять папір і/або картон, харчові відходи і їм подібні; матеріали, що переробляються, включаючи скло, пляшки, консервні банки, метали та певні види пластику; інші матеріали, що піддаються спалюванню, які, незважаючи на те, що практично не піддаються переробці як такі, можуть бути джерелом теплотворної здатності у формі видів палива, одержаних з відходів; а також інертні матеріали, включаючи керамічні матеріали, гірські породи та різні форми сміття.

У деяких варіантах здійснення MSW може бути перероблений у вигляді "сорттованих" відходів. Використовуваний у даному документі термін "сорттований" відноситься до способу, у якому MSW по суті розділяють на окремі фракції, у результаті чого біогенний матеріал по суті відокремлюють від пластику та/або іншого неорганічного матеріалу. Як використовується в даному документі, відходи, що містять суміш біогенного та небіогенного матеріалу, у яких менше 15 % за сухою масою являють собою небіогенний матеріал, є "сорттованими".

У деяких варіантах здійснення MSW можуть являти собою первинно відокремлені органічні відходи, що включають переважно плодово-ягідні відходи, відходи при виробництві овочів і/або відходи тваринництва. У деяких варіантах здійснення може бути використаний ряд різних систем сортування, у тому числі первинне сортування, де населення утилізує різні відходи роздільно. Нині системи первинного сортування діють у деяких районах в Австрії, Німеччині, Люксембурзі, Швеції, Бельгії, Нідерландах, Іспанії та Данії. У якості альтернативи, можуть бути використані промислові системи сортування. Засоби механічного сортування та розділення можуть включати будь-які способи, відомі з рівня техніки, але не обмежуватися системами, описаними в US2012/0305688; WO2004/101183; WO2004/101098; WO2001/052993; WO2000/0024531; WO1997/020643; WO1995/0003139; CA2563845; US5465847. У деяких варіантах здійснення відходи можуть бути слабко сорттовані, утворюючи ще фракцію відходів, яка є "несорттованою", як використовується в даному документі. У деяких варіантах здійснення використовують несорттовані MSW, у яких більше 15 % за сухою масою являють собою небіогенний матеріал, або більше 18 %, або більше 20 %, або більше 21 %, або більше 22 %, або більше 23 %, або більше 24 %, або більше 25 %.

При здійсненні способів за даним винаходом необхідно забезпечувати MSW із вмістом безводних речовин від 10 до 45 %, або в деяких варіантах здійснення від 12 до 40 %, або від 13 до 35 %, або від 14 до 30 %, або від 15 до 25 %. MSW, як правило, містить значну кількість води. Як використовується в даному документі, усі інші тверді речовини, що входять до складу MSW, називають "безводні речовини". Рівень вмісту води, використовуваний при здійсненні способів за даним винаходом, відноситься до декількох взаємозалежних змінних. За допомогою способів за даним винаходом одержують концентровану біогенну суспензію. Як буде легко зрозуміло фахівцеві в даній галузі техніки, здатність переводити тверді компоненти в стан концентрованої суспензії підвищується з підвищенням вмісту води. Ефективне здрібнювання паперу та картону, які являють собою значну частку типових MSW, як правило, поліпшується, якщо вміст води підвищений. Крім того, як добре відомо з рівня техніки, речовини з ферментативною активністю можуть проявляти знижену активність, якщо гідроліз проводять за умов з низьким вмістом води. Наприклад, целюлази, як правило, проявляють знижену активність у гідролітичних сумішах з вмістом безводних речовин вище приблизно 10 %. У випадку з целюлазами, що викликають розкладання паперу та картону, повідомляли про практично лінійну обернено пропорційну залежність між концентрацією субстрату та виходом у результаті ферментативної реакції на грам субстрату. Див. Kristensen et al. 2009. Використовуючи комерційно доступні препарати на основі виділених ферментів, оптимізовані для конверсії лігноцелюлозної біомаси, у

дослідженнях напівпромислового масштабу спостерігали, що вміст безводних речовин може становити аж до 15 % без явних несприятливих впливів.

У деяких варіантах здійснення деякий об'єм води звичайно повинен бути доданий до відходів для досягнення відповідного вмісту безводних речовин. Наприклад, можна розглянути фракцію несорттованих побутових відходів з Данії. У таблиці 1, у якій описаний характерний склад несорттованих MSW за даними Riber et al. (2009), "Chemical composition of material fractions in Danish household waste, " Waste Management 29:1251. В Riber et al. охарактеризовані фракції компонентів побутових відходів, одержаних від 2220 будинків у Данії за один день в 2001 році. Фахівець у даній галузі техніки легко зрозуміє, що даний опублікований склад є просто ілюстративним прикладом, застосовуваним при поясненні способів за даним винаходом. У прикладі, показаному в таблиці 1, без будь-якого додавання об'єму води перед помірним нагріванням, очікують, що органічна фракція, що розкладається та містить відходи виробництва овочів, паперу і відходи тваринництва, буде мати в середньому приблизно 47 % вміст безводних речовин. 
$$[(\text{абсолютний \% безводних речовин})/(\% \text{ за сировою масою})] = (7,15 + 18,76 + 4,23) / (31,08 + 23,18 + 9,88) = 47 \% \text{ вміст безводних речовин}.$$
 Додавання об'єму води, що відповідає одному масовому еквіваленту фракції відходів, що зазнає переробки, буде зменшувати вміст безводних речовин самих відходів до 29,1 % (58,2 % /2), одночасно знижуючи вміст безводних речовин компонента, що розкладається, до приблизно 23,5 % (47 % /2). Додавання об'єму води, що відповідає двом масовим еквівалентам фракції відходів, що зазнає переробки, буде зменшувати вміст безводних речовин самих відходів до 19,4 % (58,2 % /3), одночасно знижуючи вміст безводних речовин компонента, що розкладається, до приблизно 15,7 % (47 % /3).

Таблиця 1. Підсумковий розподіл за масою фракцій відходів з Данії, 2001 рік

(a) Чиста фракція

(b) Суміш із газет, журналів, рекламної друкованої продукції, книг, офісного та чистого/використаного паперу, паперової та картонної тари, картону, картону із пластиком, картону з алюмінієвою фольгою, використаного картону та кухонних серветок.

(c) Суміш із м'якого пластику, пластикових пляшок, іншого твердого пластику, та пластику, що не піддається рециркуляції.

(d) Суміш із ґрунту, гірських порід тощо, золи, різновидів кераміки, наповнювача для котятих туалетів і інших негорючих речовин.

(e) Суміш із алюмінієвої тари, алюмінієвої фольги, металоподібного "паперу", металевої тари та інших металевих виробів.

(f) Суміш із безбарвного, зеленого, коричневого та іншого скла.

(g) Суміш із фракцій 13 матеріалів, що залишилися.

Фракція відходів	Частина загальної кількості відходів у % за сировою масою	Частина загальної кількості відходів, виражена у вигляді абсолютного внеску до загального вмісту безводних речовин 58,2 %
Відходи при виробництві овочів (a)	31,08	7,15
Паперові відходи (b)	23,18	18,76
Відходи тваринництва (a)	9,88	4,23
Пластмасові відходи (c)	9,17	8,43
Підгузки (a)	6,59	3,59
Негорючі речовини (d)	4,05	3,45
Метал (e)	3,26	2,9
Скло (f)	2,91	2,71
Інше (g)	9,88	6,98
Усього	100,00 %	58,20 %

Фахівець у даній галузі техніки здатний легко визначити відповідну кількість вмісту води та, при необхідності, додати воду до відходів при здійсненні способів за даним винаходом. На практиці, як правило, незважаючи на деякі відмінності в складі MSW, що зазнають переробки, доречним є додавання води, виходячи з порівняльного постійного співвідношення, у деяких варіантах здійснення від 0,8 до 1,8 кг води на кг MSW, або від 0,5 до 2,5 кг води на кг MSW, або від 1,0 до 3,0 кг води на кг MSW. У результаті, фактичний вміст безводних речовин в MSW при переробці може варіювати в придатному діапазоні. Залежно від способів, використовуваних для



досягнення ферментативного гідролізу, придатний рівень вмісту безводних речовин може варіювати.

Ферментативного гідролізу можна досягти при використанні ряду різних способів. У деяких варіантах здійснення ферментативного гідролізу можна досягти при використанні препаратів на основі виділених ферментів. Використовуваний у даному документі термін "препарат на основі виділених ферментів" відноситься до препарату, що містить речовини з ферментативною активністю, які були екстраговані, виділені або іншим способом одержані з біологічного джерела та необов'язково частково або високоочищені.

Ряд різних речовин з ферментативною активністю може бути з успіхом використаний при здійсненні способів за даним винаходом. Враховуючи, наприклад, склад MSW, показаний в таблиці 1, буде очевидно, що відходи, які містять папір, становлять найбільший однорідний компонент за сухою масою біогенного матеріалу. Відповідно, фахівцям в даній галузі техніки буде очевидно, що активність, яка розкладає целюлозу, щодо типових побутових відходів буде особливо переважною. У випадку відходів, що містили папір, целюлозу попередньо переробляли та відокремлювали від її природного оточення у вигляді компонента лігноцелюлозної біомаси в суміші з лігніном і геміцелюлозою. Відповідно, відходи, що містять папір, можна переважно піддавати розкладанню при використанні порівняно "простого" препарату на основі целюлази.

"Целюлазна активність" відноситься до ферментативного гідролізу 1,4-B-D-глікозидних зв'язків у целюлозі. У препаратах на основі виділених ферментів целюлази, одержаних з бактеріальних, грибових або інших джерел, речовина з целюлазною активністю, як правило, містить суміш із різних речовин з ферментативною активністю, включаючи ендоглюканази та екzogлюканази (також звані целобіогідролазами), які, відповідно, каталізують ендо- і екзо-гідроліз 1,4-B-D-глікозидних зв'язків поряд з B-глюкозидазами, які гідролізують олігосахаридні продукти, одержані в результаті екzogлюканазного гідролізу, до моносахаридів. Повний гідроліз нерозчинної целюлози, як правило, вимагає синергічної дії речовин з різними активностями.

На практиці в деяких варіантах здійснення може бути переважним просте використання комерційно доступних препаратів на основі виділених целюлаз, оптимізованих для конверсії лігноцелюлозної біомаси, оскільки вони легко доступні при порівняно невисокій вартості. Ці препарати особливо придатні для практичних способів за даним винаходом. Термін "оптимізований для конверсії лігноцелюлозної біомаси" відноситься до способу розробки продукту, при якому суміші ферментів вибирали та модифікували з конкретною метою поліпшення виходів при гідролізі та/або зниження витрат ферменту при гідролізі попередньо обробленої лігноцелюлозної біомаси до зброджуваних цукрів.

Однак, комерційні суміші целюлаз, оптимізовані для гідролізу лігноцелюлозної біомаси, як правило, містять високі рівні додаткових і специфічних речовин з ферментативною активністю. Наприклад, визначали вміст речовин з ферментативною активністю, присутніх у комерційно доступних препаратах на основі целюлаз, оптимізованих для конверсії лігноцелюлозної біомаси, представлених NOVOZYME<sup>TM</sup> під торговельними марками CELLIC STEC2<sup>TM</sup> і CELLIC STEC3<sup>TM</sup>, а також у подібних препаратах, представлених GENENCOR<sup>TM</sup> під торговельною маркою ACCELLERASE 1500<sup>TM</sup>, і виявили, що кожний з даних препаратів містив речовину з ендоксиланазною активністю вище 200 од./г, ксилозидазною активністю при рівнях вище 85 од./г, B-L-арабінофуранозидазною активністю при рівнях вище 9 од./г, аміноглюкозидазною активністю при рівнях вище 15 од./г і α-амілазною активністю при рівнях вище 2 од./г.

Більш прості препарати на основі виділених целюлаз можуть також бути ефективно використані при здійсненні способів за даним винаходом. Придатні препарати на основі целюлаз можна одержати за допомогою способів, добре відомих з рівня техніки, з ряду мікроорганізмів, включаючи аеробні та анаеробні бактерії, гриби білої гнилизни, гриби м'якої гнилизни та анаеробні гриби. Як описано в пос. 13, R. Singhania et al., "Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases," Enzyme and Microbial Technology (2010) 46:541-549, яке явно включено в даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті, організми, які продукують целюлази, як правило, продукують суміш різних ферментів у відповідних пропорціях, що в такий спосіб робить їх придатними для гідролізу лігноцелюлозних субстратів. Переважні джерела препаратів на основі целюлаз, застосовувані для конверсії лігноцелюлозної біомаси, включають гриби таких видів, як Trichoderma, Penicillium, Fusarium, Humicola, Aspergillus і Phanerochaete.

Додатково до речовин із целюлазною активністю деякі додаткові речовини з ферментативною активністю, які можуть виявитися переважними при здійсненні способів за даним винаходом, включають ферменти, які впливають на харчові відходи, такі як протеази, глюкоамілази, ендомілази, протеази, пектин-естерази, пектин-ліази та ліпази, а також

ферменти, які впливають на відходи рослинництва, такі як ксиланази та ксилозидази. У деяких варіантах здійснення може бути переважним включення до складу інших речовин з ферментативною активністю, таких як ламінарази, кетатинази або лакази.

У деяких варіантах здійснення вибрані мікроорганізми, які проявляють позаклітинну целюлазну активність, можна безпосередньо інокулювати при проведенні паралельного ферментативного гідролізу та мікробіологічної ферментації, включаючи без обмеження будь-який один або декілька з наступних термофільних, целюлолітичних організмів, які можуть бути інокульовані окремо або в комбінації з іншими організмами, *Paenibacillus barcinonensis*, див. Asha et al 2012, *Clostridium thermocellum*, див. Blume et al 2013 and Lv and Yu 2013, вибрані види *Streptomyces*, *Microbispora* і *Paenibacillus*, див. Eida et al 2012, *Clostridium straminisolvans*, див. Kato et al 2004, види *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* і *Bacteroidetes*, див. Maki et al 2012, *Clostridium clariflavum*, див. Sasaki et al 2012, нові види *Clostridiales*, філогенетично та фізіологічно споріднені *Clostridium thermocellum* і *Clostridium straminisolvans*, див. Shiratori et al 2006, *Clostridium clariflavum* sp. nov. і *Clostridium Caenicola*, див. Shiratori et al 2009, *Geobacillus Thermoleovorans*, див. Tai et al 2004, *Clostridium stercorarium*, див. Zverlov et al 2010, або будь-який один або декілька з термофільних грибів *Sporotrichum thermophile*, *Scytalidium thermophilum*, *Clostridium straminisolvans* і *Thermonospora curvata*, Kumar et al. 2008 для огляду. У деяких варіантах здійснення організми, що проявляють інші корисні позаклітинні ферментативні активності, можуть бути інокульовані для сприяння паралельному ферментативному гідролізу та мікробіологічній ферментації, наприклад, протеолітичними та кератинолітичними грибами, див. Kowalska et al. 2010, або молочнокислі бактерії, що проявляють позаклітинну ліпазну активність, див. Meyers et al. 1996.

Ферментативний гідроліз може бути здійснений за допомогою способів, добре відомих з рівня техніки, з використанням одного або декількох препаратів на основі виділених ферментів, включаючи будь-який один або декілька з ряду препаратів на основі ферментів, у тому числі будь-який з таких, які були згадані раніше або, у якості альтернативи, шляхом інокулювання у процесі переробки MSW одним або декількома вибраними організмами, здатними впливати на необхідний ферментативний гідроліз. У деяких варіантах здійснення ферментативний гідроліз може бути здійснений з використанням ефективної кількості одного або декількох препаратів на основі виділених ферментів, що містять речовини із целюлазною, В-глюкозидазною, амілазною і ксиланазною активностями. Кількість являє собою "ефективну кількість" у тому випадку, якщо при використанні в сукупності препарату на основі ферментів досягається розчинність щонайменше 40 % за сухою масою біогенного матеріалу, що розкладається, присутнього в MSW, протягом часу реакції гідролізу 18 годин при використовуваних умовах. У деяких варіантах здійснення використовують один або декілька препаратів на основі виділених ферментів, у яких у сукупності відносні пропорції речовин з ферментативною активністю є наступними: суміш речовин з ферментативною активністю використовують так, щоб 1 FPU целюлазної активності асоціювалася із щонайменше 31 СМС од. ендоглюканазної активності, і так, щоб 1 FPU целюлазної активності асоціювалася із щонайменше 7 рNPG од. бета-глюкозидазної активності. Фахівцеві в даній галузі техніки буде зрозуміло, що СМС од. відноситься до одиниць карбоксиметилцелюлози. Одна СМС од. активності вивільняє 1 мкмоль цукрів, що редукують (виражених в еквівалентах глюкози) за одну хвилину в специфічних умовах аналізу 50 °C і pH 4,8. Фахівцеві в даній галузі техніки буде зрозуміло, що рNPG од. відноситься до рNPG одиниць. Одна рNPG од. активності вивільняє 1 мкмоль нітрофенолу у хвилину з пара-нітрофеніл-В-D-глюкопіранозиду при 50 °C і pH 4,8. Далі фахівцеві в даній галузі техніки буде зрозуміло, що FPU "одиниць фільтрувального паперу" представляє показник целюлазної активності. Як використовується в даному документі, FPU відноситься до одиниць фільтрувального паперу, визначених за допомогою способу за Adney, B. and Baker, J., Laboratory Analytical Procedure #006, "Measurement of cellulase activity", August 12, 1996, the USA National Renewable Energy Laboratory (NREL), який включений у даний документ як посилання у всій своїй повноті.

При здійсненні варіантів здійснення за даним винаходом переважним може бути регулювання температури MSW перед запуском ферментативного гідролізу. Як добре відомо з рівня техніки, целюлази та інші ферменти, як правило, проявляють активність в оптимальному температурному діапазоні. Незважаючи на те, що достовірно відомі приклади ферментів з оптимальними температурами порядку 60 або навіть 70 градусів С, виділених з екстремально термофільних організмів, оптимальні для ферментів температурні діапазони, як правило, знаходяться у діапазоні від 35 до 55 градусів. У деяких варіантах здійснення ферментативний гідроліз здійснюють у межах температурного діапазону від 30 до 35 градусів С, або від 35 до 40 градусів С, або від 40 до 45 градусів С, або від 45 до 50 градусів С, або від 50 до 55 градусів С,

або від 55 до 60 градусів С, або від 60 до 65 градусів С, або від 65 до 70 градусів С, або від 70 до 75 градусів С. У деяких варіантах здійснення переважним є здійснення ферментативного гідролізу та паралельної мікробіологічної ферментації при температурі щонайменше 45 градусів С, оскільки це є переважним для обмеження росту патогенів, що переносяться MSW. Див.,  
 5 наприклад, Hartmann and Ahring 2006; Deportes et al. 1998; Carrington et al. 1998; Bendixen et al. 1994; Kubler et al. 1994; Six and De Baerre et al. 1992.

При ферментативному гідролізі з використанням целюлазної активності целюлозний матеріал, як правило, буде оцукрюватися. Відповідно, при ферментативному гідролізі тверді відходи як оцукрюються, так і зріджуються, перетворюючись у такий спосіб із твердої форми в  
 10 концентровану суспензію.

Раніше способи переробки MSW з використанням ферментативного гідролізу для досягнення зрідження біогенних компонентів передбачали необхідність нагрівання MSW до значно більш високої температури, ніж та, яка потрібна для ферментативного гідролізу, зокрема, для досягнення "стерилізації" відходів, з наступним обов'язковим етапом охолодження  
 15 із доведенням нагрітих відходів до температури, прийнятної для ферментативного гідролізу. При здійсненні способів за даним винаходом достатньо того, щоб MSW були просто доведені до температури, прийнятної для ферментативного гідролізу. У деяких варіантах здійснення може бути переважним просте регулювання до прийнятного вмісту безводних речовин у MSW з використанням нагрітої води, що подається, для доведення MSW до температури, прийнятної  
 20 для ферментативного гідролізу. У деяких варіантах здійснення MSW нагрівають або шляхом додавання кількості нагрітої води, або пари, або за допомогою інших способів нагрівання в баку реактора. У деяких варіантах здійснення MSW нагрівають у баку реактора до температури більше 30 °С, але менше 85 °С, або до температури 84 °С або менше, або до температури 80 °С або менше, або до температури 75 °С або менше, або температури 70 °С або менше, або  
 25 температури 65 °С або менше, або до температури 60 °С або менше, або до температури 59 °С або менше, або до температури 58 °С або менше, або до температури 57 °С або менше, або до температури 56 °С або менше, або до температури 55 °С або менше, або до температури 54 °С або менше, або до температури 53 °С або менше, або до температури 52 °С або менше, або до температури 51 °С або менше, або до температури 50 °С або менше, або до температури 49 °С  
 30 або менше, або до температури 48 °С або менше, або до температури 47 °С або менше, або до температури 46 °С або менше, або до температури 45 °С або менше. У деяких варіантах здійснення MSW нагрівають до температури не більше, ніж на 10 °С вище найвищої температури, при якій здійснюють ферментативний гідроліз.

Використовувані в даному документі MSW є "нагрітими до температури", при цьому середня температура MSW підвищується в реакторі до даної температури. Як використовується в даному документі, температура, до якої нагрівають MSW, являє собою найвищу середню температуру MSW, якої досягають у реакторі. У деяких варіантах здійснення найвища середня температура може не підтримуватися протягом усього періоду. У деяких варіантах здійснення тепловий реактор може містити різні зони, у результаті чого нагрівання відбувається в ході  
 40 етапів при різних температурах. У деяких варіантах здійснення нагрівання можна досягти з використанням того ж реактора, у якому здійснюють ферментативний гідроліз. Метою нагрівання є просте доведення більшої частини відходів, що містять целюлозу, і значної частини рослинних відходів до стану, оптимального для ферментативного гідролізу. Для того, щоб знаходитися у стані, оптимальному для ферментативного гідролізу, відходи в ідеалі повинні мати температуру та вміст води, прийнятні для речовин з ферментативною активністю, використовуваних для ферментативного гідролізу.  
 45

У деяких варіантах здійснення переважним може бути збовтування при нагріванні для досягнення рівномірного нагрівання відходів. У деяких варіантах здійснення збовтування може включати змішування за допомогою вільного падіння, наприклад, змішування в реакторі з камерою, що обертається по суті навколо горизонтальної осі, або в змішувачі з поворотною віссю, що піднімає MSW, або в змішувачі з горизонтальними валами або лопатями, що піднімають MSW. У деяких варіантах здійснення збовтування може включати струшування, перемішування або переміщення за допомогою шнекового транспортера. У деяких варіантах здійснення збовтування продовжують після нагрівання MSW до необхідної температури. У  
 50 деяких варіантах здійснення збовтування здійснюють протягом від 1 до 5 хвилин, або від 5 до 10 хвилин, або від 10 до 15 хвилин, або від 15 до 20 хвилин, або від 20 до 25 хвилин, або від 25 до 30 хвилин, або від 30 до 35 хвилин, або від 35 до 40 хвилин, або від 40 до 45 хвилин, або від 45 до 50 хвилин, або від 50 до 55 хвилин, або від 55 до 60 хвилин, або від 60 до 120 хвилин.

Ферментативний гідроліз запускають на етапі додавання препаратів на основі виділених ферментів. У якості альтернативи, у тому випадку, якщо не додають препарати на основі  
 60

виділених ферментів, а замість цього використовують мікроорганізми, які проявляють бажані позаклітинні ферментативні активності, ферментативний гідроліз запускають на етапі додавання необхідних мікроорганізмів.

При здійсненні способів за даним винаходом ферментативний гідроліз здійснюють разом з мікробіологічною ферментацією. Паралельної мікробіологічної ферментації можна досягти з використанням ряду різних способів. У деяких варіантах здійснення мікроорганізмам, присутнім у природних умовах в MSW, просто дозволяють розмножуватися в умовах реакції, якщо перероблені MSW раніше не нагрівали до температури, достатньої для ефекту "стерилізації". Як правило, мікроорганізми, присутні в MSW, будуть включати організми, адаптовані до місцевого навколишнього середовища. Основним сприятливим ефектом паралельної мікробіологічної ферментації є відносна надійність, при цьому мається на увазі, що дуже широкий ряд різних організмів може окремо або в сукупності сприяти поглинанню органічних речовин за допомогою ферментативного гідролізу MSW. Не бажаючи бути зв'язаними теорією, вважають, що мікроорганізми, які здійснюють паралельну ферментацію, окремо можуть виявляти деякий безпосередній вплив на розкладання харчових відходів, які необов'язково гідролізуються ферментами целюлазами. Разом з тим мономери та олігомери вуглеводів, що вивільняються за допомогою гідролізу целюлазою, зокрема, з легкістю засвоюються фактично будь-якими видами мікроорганізмів. Це створює сприятливий синергізм із ферментами целюлазами, можливо, за допомогою вивільнення продукту, що інгібує речовини з ферментативною активністю, а також, можливо, з інших причин, які не відразу стають очевидними. Кінцеві продукти мікробного метаболізму в будь-якому разі є, як правило, придатними для одержання субстратів біометану. Таким чином, збагачення мікробними метаболітами ферментативно гідролізованих MSW уже саме по собі являє собою поліпшення якості одержаного в результаті субстрату біометану. Зокрема, молочнокислі бактерії є повсюдно розповсюдженими в природі, і продукування молочної кислоти, як правило, спостерігається в тому випадку, якщо MSW ферментативно гідролізується при вмісті безводних речовин від 10 до 45 % у межах температурного діапазону 45-50. При більш високих температурах, можливо, можуть домінувати інші види мікроорганізмів, що зустрічаються в природних умовах, і можуть стати більш переважними інші мікробні метаболіти, відмінні від молочної кислоти.

У деяких варіантах здійснення мікробіологічна ферментація може бути здійснена шляхом прямої інокуляції з використанням одного або декількох видів мікроорганізмів. Фахівцям в даній галузі техніки буде зрозуміло, що один або декілька видів бактерій, використовуваних для інокуляції, для забезпечення таким чином одночасного ферментативного гідролізу та ферментації MSW, можуть бути переважно вибрані в тому випадку, якщо вид бактерій здатний розмножуватися при температурі, рівній або близькій до оптимальної для використовуваних речовин з ферментативною активністю.

Інокуляція гідролітичної суміші для індукування мікробіологічної ферментації може бути здійснена за допомогою ряду різних способів.

У деяких варіантах здійснення переважним може бути інокулювання MSW або до, або після, або разом з додаванням речовин з ферментативною активністю, або з додаванням мікроорганізмів, які проявляють позаклітинну целюлазну активність. У деяких варіантах здійснення може бути переважним інокулювання з використанням одного або декількох видів LAB, включаючи без обмеження будь-який один або декілька з наступних або їх генетично модифікованих варіантів: *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus jugurti*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus carnis*, *Lactobacillus piscicola*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus maltaromicus*, *Lactobacillus pseudopiantarum*, *Lactobacillus agilis*, *Lactobacillus bavaricus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus uamanashiensis*, *Lactobacillus amylophilus*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus sharpeae*, *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus alactosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus homohiochii*, *Lactobacillus sanfrancisco*, *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus ponti*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus viridescens*, *Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus minor*, *Lactobacillus kandleri*, *Lactobacillus halotolerans*, *Lactobacillus hilgardi*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus vaccinostrictus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus leichmanni*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus salicinus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus suebicus*, *Lactobacillus oris*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus vaginalis*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus panis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus dextranicum*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus hordniae*, *Lactococcus raffinolactis*, *Streptococcus diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc dextranicum*, *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc oenos*, *Leuconostoc paramesenteroides*, *Leuconostoc pseudoesenteroides*,

*Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc gelidum*, *Leuconostoc carnosum*, *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus cervisiae*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus halophilus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus intermedius*, *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus thermophilus*, *Oenococcus oeni*, *Bifidobacterium breve* і *Propionibacterium freudenreichii*, або деякими згодом виявленими видами LAB, або іншими видами роду *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* або *Carnobacterium*, які характеризуються сприятливою інтенсивністю щодо метаболічних процесів, при яких продукується молочна кислота.

Фахівцеві в даній галузі техніки буде легко зрозуміло, що бактеріальний препарат, використовуваний для інокуляції, може містити угруповання різних організмів. У деяких варіантах здійснення можуть бути використані бактерії, що зустрічаються в природних умовах, які існують у будь-якому певному географічному регіоні і які адаптовані до розмноження в MSW із цього регіону. Як добре відомо з рівня техніки, LAB поширені повсюдно та будуть, як правило, становити основний компонент будь-якого бактеріального угруповання, що зустрічається в MSW у природних умовах.

У деяких варіантах здійснення MSW може бути інокульований бактеріями, що зустрічаються у природних умовах, шляхом безперервної рециркуляції промивних вод або технологічних розчинів, використовуваних для вилучення залишкового органічного матеріалу з твердих речовин, що не розкладаються. Оскільки промивні води або технологічні розчини піддають рециркуляції, поступово в них досягаються більш високі рівні мікроорганізмів. У деяких варіантах здійснення мікробіологічна ферментація характеризується ефектом зниження pH, особливо, якщо метаболіти включають коротколанцюгові карбонові кислоти/жирні кислоти, такі як форміат, ацетат, бутират, пропіонат або лактат. Відповідно, у деяких варіантах здійснення може бути переважним здійснювати контроль і регулювання pH суміші при паралельному ферментативному гідролізі та мікробіологічній ферментації. Якщо промивні води або технологічні розчини використовують для підвищення вмісту води у MSW, що надходять, перед ферментативним гідролізом, то інокуляцію переважно здійснюють перед додаванням речовин з ферментативною активністю або у вигляді препаратів на основі виділених ферментів, або мікроорганізмів, що проявляють позаклітинну целюлазну активність. У деяких варіантах здійснення бактерії, що зустрічаються в природних умовах, адаптовані до розмноження в MSW з певного регіону, можна культивувати в MSW або в зрідженому органічному компоненті, одержаному шляхом ферментативного гідролізу MSW. У деяких варіантах здійснення культивовані бактерії, що зустрічаються в природних умовах, далі можуть бути додані у вигляді інокулята або окремо, або у вигляді добавки для інокуляції з використанням рециркульованих промивних вод або технологічних розчинів. У деяких варіантах здійснення бактеріальні препарати можуть бути додані до або разом з додаванням препаратів на основі виділених ферментів, або після деякого початкового періоду попереднього гідролізу.

У деяких варіантах здійснення специфічні штами можна культивувати для інокуляції, у тому числі штами, які модифікували або "тренували" для розмноження в умовах реакції ферментативного гідролізу та/або посилення або ослаблення конкретних метаболічних процесів. У деяких варіантах здійснення може бути переважним інокулювання MSW із використанням штамів бактерій, які були ідентифіковані як здатні до виживання на фталатах у якості єдиного джерела вуглецю. Такі штами включають без обмежень будь-який один або декілька з наступних або їх генетично модифікованих варіантів: *Chryseomicrobium intechense* MW10T, *Lysinibacillus fusiformis* NBRC 157175, *Tropicibacter phthalicus*, *Gordonia* JDC-2, *Arthrobacter* JDC-32, *Bacillus subtilis* 3C3, *Comamonas testosteronii*, *Comamonas* sp E6, *Delftia tsuruhatensis*, *Rhodococcus jostii*, *Burkholderia cepacia*, *Mycobacterium vanbaalenii*, *Arthrobacter keyseri*, *Bacillus* sb 007, *Arthrobacter* sp. PNPX-4-2, *Gordonia namibiensis*, *Rhodococcus phenolicus*, *Pseudomonas* sp. PGB2, *Pseudomonas* sp. Q3, *Pseudomonas* sp. 1131, *Pseudomonas* sp. CAT1-8, *Pseudomonas* sp. Nitroreducens, *Arthrobacter* sp AD38, *Gordonia* sp CNJ863, *Gordonia rubripertinctus*, *Arthrobacter oxydans*, *Acinetobacter genomosp* і *Acinetobacter calcoaceticus*. Див., наприклад, Fukuhura et al 2012; Iwaki et al. 2012A; Iwaki et al. 2012B; Latorre et al. 2012; Liang et al. 2010; Liang et al. 2008; Navacharoen et al. 2011; Park et al. 2009; Wu et al. 2010; Wu et al. 2011. Фталати, використовувані в якості пластифікаторів у багатьох комерційних препаратах на основі полівінілхлориду, є продуктами, що зазнають вилуговування, і як показує практика, часто присутні в зрідженому органічному компоненті при рівнях, які є небажаними. У деяких варіантах здійснення переважно можуть бути використані штами, які були генетично модифіковані за допомогою способів, добре відомих з рівня техніки, таким чином, щоб підсилити метаболічні процеси та/або послабити інші метаболічні процеси, включаючи без обмеження процеси, у результаті яких відбувається засвоєння глюкози, ксилози або арабінози.

У деяких варіантах здійснення переважним може бути інокулювання MSW з використанням бактеріальних штамів, які ідентифікували як здатні до розщеплення лігніну. Такі штами включають без обмежень будь-який один або декілька з наступних або їх генетично модифікованих варіантів: *Comamonas* sp B-9, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter* sp FJ581023, *Pandorea norimbergensis*, *Amycolatopsis* sp ATCC 39116, *Streptomyces viridosporous*, *Rhodococcus jostii* і *Sphingobium* sp. SYK-6. Див., наприклад, Bandounas et al. 2011; Bugg et al. 2011; Chandra et al. 2011; Chen et al. 2012; Davis et al. 2012. Як показує практика, MSW, як правило, містить значну кількість лігніну, яку, як правило, виділяють у вигляді незбродженого залишку після AD.

У деяких варіантах здійснення переважним може бути інокулювання MSW з використанням штаму бактерій, що продукують ацетат, включаючи без обмеження будь-який один або декілька з наступних або їх генетично модифікованих варіантів: *Acetitomaculum ruminis*, *Anaerostipes cacciae*, *Acetoanaerobium noterae*, *Acetobacterium carbinolicum*, *Acetobacterium wieringae*, *Acetobacterium woodii*, *Acetogenium kivui*, *Acidaminococcus fermentans*, *Anaerovibrio lipolytica*, *Bacteroides coprosuis*, *Bacteroides propionificiens*, *Bacteroides cellulosolvens*, *Bacteroides xylanolyticus*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium gallicum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium acidurici*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium cellobioparum*, *Clostridium formicaceticum*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium lochheadii*, *Clostridium methylpentosum*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium propionicum*, *Clostridium putrefaciens*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tetani*, *Clostridium tetanomorphum*, *Clostridium thermocellum*, *Desulfotomaculum orientis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Eubacterium limosum*, *Eubacterium ruminantium*, *Fibrobacter succinogenes*, *Lachnospira multiparus*, *Megasphaera elsdenii*, *Moorella thermoacetica*, *Pelobacter acetylenicus*, *Pelobacter acidigallici*, *Pelobacter massiliensis*, *Prevotella ruminicola*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminobacter amylophilus*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus bromii*, *Ruminococcus champanellensis*, *Selenomonas ruminantium*, *Sporomusa paucivorans*, *Succinimonas amylolytica*, *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Syntrophomonas wolfei*, *Syntrophus aciditrophicus*, *Syntrophus gentianae*, *Treponema bryantii* і *Treponema primitia*.

У деяких варіантах здійснення переважним може бути інокулювання MSW з використанням штаму бактерій, що продукують бутират, включаючи без обмеження будь-який один або декілька з наступних або їх генетично модифікованих варіантів: *Acidaminococcus fermentans*, *Anaerostipes cacciae*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Butyrivibrio crossotus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Butyrivibrio hungatei*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium aurantibutyricum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium cellobioparum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium innocuum*, *Clostridium kluyveri*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium proteoclasticum*, *Clostridium sporosphaeroides*, *Clostridium symbiosum*, *Clostridium tertium*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Coprococcus eutactus*, *Coprococcus comes*, *Escherichia coli*, *Eubacterium barkeri*, *Eubacterium bifforme*, *Eubacterium cellulosolvens*, *Eubacterium cylindroides*, *Eubacterium dolichum*, *Eubacterium hadrum*, *Eubacterium hali*, *Eubacterium limosum*, *Eubacterium moniliforme*, *Eubacterium oxidoreducens*, *Eubacterium ramulus*, *Eubacterium rectale*, *Eubacterium saburreum*, *Eubacterium tortuosum*, *Eubacterium ventriosum*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Fusobacterium prausnitzii*, *Peptostreptococcus vaginalis*, *Peptostreptococcus tetradius*, *Pseudobutyrvibrio ruminis*, *Pseudobutyrvibrio xylanivorans*, *Roseburia cecicola*, *Roseburia intestinalis*, *Roseburia hominis* і *Ruminococcus bromii*.

У деяких варіантах здійснення переважним може бути інокулювання MSW з використанням штаму бактерій, що продукують пропіонат, включаючи без обмеження будь-який один або декілька з наступних або їх генетично модифікованих варіантів: *Anaerovibrio lipolytica*, *Bacteroides coprosuis*, *Bacteroides propionificiens*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium methylpentosum*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium propionicum*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium nucleatum*, *Megasphaera elsdenii*, *Prevotella ruminicola*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Ruminococcus bromii*, *Ruminococcus champanellensis*, *Selenomonas ruminantium* і *Syntrophomonas wolfei*.

У деяких варіантах здійснення переважним може бути інокулювання MSW з використанням штаму бактерій, що продукують етанол, включаючи без обмеження будь-який один або декілька з наступних або їх генетично модифікованих варіантів: *Acetobacterium carbinolicum*, *Acetobacterium wieringae*, *Acetobacterium woodii*, *Bacteroides cellulosolvens*, *Bacteroides xylanolyticus*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium*

cellobioparum, Clostridium lochheadii, Clostridium pasteurianum, Clostridium perfringens, Clostridium thermocellum, Clostridium thermohydrosulfuricum, Clostridium thermosaccharolyticum, Enterobacter aerogenes, Escherichia coli, Klebsiella oxytoca, Klebsiella pneumonia, Lachnospira multiparus, Lactobacillus brevis, Leuconostoc mesenteroides, Paenibacillus macerans, Pelobacter acetylenicus, Ruminococcus albus, Thermoanaerobacter mathranii, Treponema bryantii i Zymomonas mobilis.

У деяких варіантах здійснення консорціум різних мікроорганізмів, що необов'язково включає різні види бактерій і/або грибів, можна використовувати для здійснення паралельної мікробіологічної ферментації. У деяких варіантах здійснення придатні мікроорганізми можна вибирати для забезпечення в такий спосіб бажаного метаболічного результату при запланованих умовах реакції, а потім інокулювати з високим рівнем дози для витіснення в такий спосіб штамів, що зустрічаються в природі. Наприклад, у деяких варіантах здійснення може бути переважним інокулювання за допомогою гомоферментативного продуцента лактату, оскільки це забезпечує більш високий очікуваний метановий потенціал одержаного в результаті субстрату біометану, ніж такий, який може бути забезпечений гетероферментативним продуцентом лактату.

У деяких варіантах здійснення ферментативний гідроліз і паралельну мікробіологічну ферментацію здійснюють за допомогою реактора для гідролізу, який забезпечує збовтування із змішуванням за допомогою вільного падіння, як описано в WO2006/056838 і в WO2011/032557.

Після певного періоду ферментативного гідролізу та паралельної мікробіологічної ферментації, MSW, за умови вмісту безводних речовин від 10 до 45 %, змінюються таким чином, що біогенні або "ферментовані" компоненти стають зрідженими та у водній фазі відбувається накопичення мікробних метаболітів. Після певного періоду ферментативного гідролізу та паралельної мікробіологічної ферментації зріджені ферментовані частини відходів відокремлюють від неферментованих твердих речовин. Відразу після відокремлення від неферментованих твердих речовин зріджений матеріал являє собою те, що називають "біорідина". У деяких варіантах здійснення щонайменше 40 % безводних речовин цієї біорідини містять розчинені леткі тверді речовини, або щонайменше 35 %, або щонайменше 30 %, або щонайменше 25 %. У деяких варіантах здійснення щонайменше 25 % за масою розчинених летких твердих речовин у біорідині містять будь-яку комбінацію з ацетату, бутирату, етанолу, форміату, лактату та/або пропіонату. У деяких варіантах здійснення щонайменше 70 % за масою розчинених летких твердих речовин містять лактат, або щонайменше 60 %, або щонайменше 50 %, або щонайменше 40 %, або щонайменше 30 %, або щонайменше 25 %.

У деяких варіантах здійснення відокремлення неферментованих твердих речовин від зріджених ферментованих частин MSW для одержання в такий спосіб біорідини, яка характеризується вмістом розчинених летких твердих речовин, з яких щонайменше 25 % за масою містять будь-яку комбінацію з ацетату, бутирату, етанолу, форміату, лактату та/або пропіонату, здійснюють протягом менше 16 годин після запуску ферментативного гідролізу, або протягом менше 18 годин, або протягом менше 20 годин, або протягом менше 22 годин, або протягом менше 24 годин, або протягом менше 30 годин, або протягом менше 34 годин, або протягом менше 36 годин.

Відокремлення зріджених ферментованих частин відходів від неферментованих твердих речовин можна досягти за допомогою ряду способів. У деяких варіантах здійснення цього можна досягти шляхом використання будь-якої комбінації із щонайменше двох різних технологічних операцій розділення, включаючи без обмежень технологічні операції з використанням шнекового преса, технологічні операції з використанням балістичного сепаратора, технологічні операції з використанням вібраційного сита або інші технологічні операції розділення, відомі з рівня техніки. У деяких варіантах здійснення неферментовані тверді речовини, відокремлені від ферментованих частин відходів, містять щонайменше приблизно 20 % за сухою масою MSW, або щонайменше 25 %, або щонайменше 30 %. У деяких варіантах здійснення неферментовані тверді речовини, відокремлені від ферментованих частин відходів, містять щонайменше 20 % за сухою масою матеріалів, що рециркулюють, або щонайменше 25 %, або щонайменше 30 %, або щонайменше 35 %. У деяких варіантах здійснення при розділенні з використанням щонайменше двох технологічних операцій розділення одержують біорідину, яка містить щонайменше 0,15 кг летких твердих речовин на кг перероблених MSW, або щонайменше 0,10. Фахівцям в даній галузі техніки буде легко зрозуміло, що характерний біогенний склад MSW може варіювати. При цьому, кількісний показник 0,15 кг летких твердих речовин на кг перероблених MSW виражає загальне уловлювання біогенного матеріалу в типових несорттованих MSW у щонайменше 80 %. Показник кг летких твердих речовин, уловлених у біорідині на кг перероблених MSW, можна розраховувати в період часу, за який визначають загальний вихід і загальну кількість перероблених MSW.

У деяких варіантах здійснення після відокремлення неферментованих твердих речовин від зріджених ферментованих частин MSW з одержанням біорідини, ця біорідина може зазнати вторинної ферментації за різних умов, включаючи різну температуру або pH.

Використовуваний у даному документі термін "розчинені леткі тверді речовини" відноситься до простого значення вимірювання, яке розраховують у такий спосіб: зразок біорідини центрифугують при 6900 g протягом 10 хвилин в 50 мл пробірці типу Falcon з одержанням осаду та надосадової рідини. Надосадову рідину зливають і сиру масу осаду виражають у вигляді частки у відсотках від загальної вихідної маси зразка рідини. Зразок надосадової рідини висушують при 60 градусах протягом 48 годин для визначення вмісту сухої речовини. Вміст летких твердих речовин у зразку надосадової рідини визначають шляхом вирахування зі значення вимірювання вмісту сухої речовини золи, що залишилася після спалювання в печі при 550 °C, і виражають як відсотковий вміст за масою у вигляді розчинених летких твердих речовин в %. Незалежне значення вимірювання розчинених летких твердих речовин визначають шляхом розрахунків, заснованих на вмісті летких твердих речовин в осаді. Частку осаду у вигляді сирової маси використовують як оцінку у вигляді частки об'ємного співвідношення нерозчинених твердих речовин від загального вихідного об'єму. Вміст сухої речовини в осаді визначають шляхом висушування при 60 градусах C протягом 48 годин. Вміст летких твердих речовин в осаді визначають шляхом вирахування зі значення вимірювання вмісту сухої речовини золи, що залишилася після спалювання в печі при 550 °C. Вміст летких твердих речовин в осаді коригують із урахуванням виправлення на розрахований внесок надосадової рідини, одержаний шляхом  $(1 - \text{частка осаду у вологому вигляді}) \times (\text{вимірюваний \% летких твердих речовин у надосадовій рідині})$ . Від % загального вмісту летких твердих речовин, вимірюваного у вихідних зразках рідини, віднімають  $(\text{відкоригований \% летких твердих речовин в осаді}) \times (\text{оцінка у вигляді частки об'ємного співвідношення нерозчинених твердих речовин від загального вихідного об'єму})$  з одержанням незалежної оцінки розчинених летких твердих речовин у вигляді %. Більша із двох оцінок використовується для того, щоб не завищити відсотковий вміст нерозчинених летких твердих речовин, представлених бактеріальними метаболітами.

У деяких варіантах здійснення даний винахід пропонує композиції та способи для одержання біометану. Попереднє детальне обговорення, що стосується варіантів здійснення способів переробки MSW можна необов'язково використовувати застосовно до варіантів здійснення, що пропонують способи та композиції для одержання біометану. У деяких варіантах здійснення спосіб одержання біометану включає етапи

(i) забезпечення органічного рідкого субстрату біометану, попередньо підготовленого шляхом мікробіологічної ферментації таким чином, що щонайменше 40 % за масою від вмісту безводних речовин знаходяться у вигляді розчинених летких твердих речовин, при цьому розчинені леткі тверді речовини складають щонайменше 25 % за масою у вигляді будь-якої комбінації з ацетату, бутирату, етанолу, форміату, лактату та/або пропіонату,

(ii) перенесення рідкого субстрату в систему анаеробного зброджування з наступним

(iii) здійсненням анаеробного зброджування рідкого субстрату для одержання біометану.

У деяких варіантах здійснення даний винахід пропонує органічний рідкий субстрат біометану, одержуваний шляхом ферментативного гідролізу та мікробіологічної ферментації твердих побутових відходів (MSW) або попередньо обробленої лігноцелюлозної біомаси, у якості альтернативи, що містить ферментативно гідролізовані та мікробіологічно ферментовані MSW, або що містить ферментативно гідролізовану та мікробіологічно ферментовану попередньо оброблену лігноцелюлозну біомасу, яка характеризується тим, що щонайменше 40 % за масою від вмісту безводних речовин знаходяться у вигляді розчинених летких твердих речовин, при цьому розчинені леткі тверді речовини складають щонайменше 25 % за масою у вигляді будь-якої комбінації з ацетату, бутирату, етанолу, форміату, лактату та/або пропіонату.

Використовуваний у даному документі термін "система анаеробного зброджування" відноситься до ферментаційної системи, що містить один або декілька реакторів, що працюють при контрольованих умовах аерації, при цьому в кожному з реакторів, що входять у систему, продукується газ метан. Газ метан продукується у такому об'ємі, що концентрація розчиненого метану, що утворюється метаболічним шляхом, у водній фазі ферментаційної суміші в "системі анаеробного зброджування" підвищується при використуваних умовах, і газ метан випускається із системи.

У деяких варіантах здійснення "система анаеробного зброджування" являє собою систему на основі фільтрів з нерухомим завантаженням. "Система анаеробного зброджування на основі фільтрів з нерухомим завантаженням" відноситься до системи, у якій консорціум для



анаеробного зброджування є іміобілізованим, необов'язково в межах біоплівки або на фізичній матриці-підкладці.

У деяких варіантах здійснення рідкий субстрат біометану містить щонайменше загальний вміст твердих речовин 8 %, або щонайменше загальний вміст твердих речовин 9 %, або щонайменше загальний вміст твердих речовин 10 %, або щонайменше загальний вміст твердих речовин 11 %, або щонайменше загальний вміст твердих речовин 12 %, або щонайменше загальний вміст твердих речовин 13 %. "Загальний вміст твердих речовин", як використовується в даному документі, відноситься як до розчинних, так і до нерозчинних твердих речовин і фактично означає "вміст безводних речовин". Загальний вміст твердих речовин визначають шляхом висушування при 60 °C до одержання постійної маси.

У деяких варіантах здійснення мікробіологічну ферментацію здійснюють за умов, які перешкоджають продукуванню метану бактеріями, що продукують метан, наприклад, при pH менше 6,0, або при pH менше 5,8, або при pH менше 5,6, або при pH менше 5,5. У деяких варіантах здійснення рідкий субстрат біометану містить розчинений метан у менш насичених концентраціях. У деяких варіантах здійснення рідкий субстрат біометану містить менше 15 мг/л розчиненого метану, або менше 10 мг/л, або менше 5 мг/л.

У деяких варіантах здійснення до анаеробного зброджування з одержанням біометану один або декілька компонентів розчинених летких твердих речовин можуть бути вилучені з рідкого субстрату біометану за допомогою перегонки, фільтрації, електродіалізу, специфічного зв'язування, осадження та інших способів, добре відомих з рівня техніки. У деяких варіантах здійснення етанол або лактат можуть бути вилучені з рідкого субстрату біометану до анаеробного зброджування з одержанням біометану.

У деяких варіантах здійснення твердий субстрат, такий як MSW або волоконна фракція з попередньо обробленої лігноцелюлозної біомаси, піддають ферментативному гідролізу одночасно з мікробіологічною ферментацією для одержання в такий спосіб рідкого субстрату біометану, попередньо підготовленого шляхом мікробіологічної ферментації таким чином, що щонайменше 40 % за масою від вмісту безводних речовин знаходяться у вигляді розчинених летких твердих речовин, при цьому розчинені леткі тверді речовини складають щонайменше 25 % за масою у вигляді будь-якої комбінації з ацетату, бутирату, етанолу, форміату, лактату та/або пропіонату. У деяких варіантах здійснення рідкий субстрат біометану зі згаданими вище властивостями одержують шляхом паралельного ферментативного гідролізу та мікробіологічної ферментації зрізженого органічного матеріалу, одержаного з несортованих MSW за допомогою способу автоклавування. У деяких варіантах здійснення попередньо оброблена лігноцелюлозна біомаса може бути змішана з ферментативно гідролізованими та мікробіологічно ферментованими MSW необов'язково таким способом, щоб речовина з ферментативною активністю з біорідини, одержаної з MSW, забезпечувала ферментативну активність для гідролізу лігноцелюлозного субстрату з одержанням складу на основі рідкого субстрату біометану, одержаного як з MSW, так і з попередньо обробленої лігноцелюлозної біомаси.

"М'яка лігноцелюлозна біомаса" відноситься до рослинної біомаси, за винятком деревини, що містить целюлозу, геміцелюлозу та лігнін. Можна використовувати будь-яку придатну м'яку лігноцелюлозну біомасу, у тому числі такі види біомаси, як щонайменше пшенична солома, кукурудзяна солома, стрижні кукурудзяних качанів, плодоніжки без плодів, рисова солома, вівсяна солома, ячмінна солома, солома каноли, житня солома, сорго, сорго цукрове, соєва солома, просо, свинорий пальчастий і інші трави, багаса, жом цукрового буряка, волокна кукурудзи або їх будь-які комбінації. Лігноцелюлозна біомаса може включати інші лігноцелюлозні матеріали, такі як папір, газетний папір, картон або інші побутові або канцелярські відходи. Лігноцелюлозну біомасу можна використовувати у вигляді суміші матеріалів, джерелом яких є різні вихідні сировини, причому вона може бути свіжою, частково висушеною, повністю висушеною, або їх будь-якої комбінації. У деяких варіантах здійснення в способах за даним винаходом на практиці використовують щонайменше приблизно 10 кг сировини з біомаси, або щонайменше 100 кг, або щонайменше 500 кг.

Лігноцелюлозну біомасу в цілому необхідно піддати попередній обробці за допомогою способів, відомих з рівня техніки, до проведення ферментативного гідролізу та мікробіологічної попередньої підготовки. У деяких варіантах здійснення біомасу піддають попередній обробці за допомогою гідротермічної попередньої обробки. "Гідротермічна попередня обробка" відноситься до застосування води або у вигляді гарячої рідини, водяної пари або пари під тиском, включаючи рідину або пар при високій температурі, або і те, і інше, для "готування" біомаси при температурах 120 °C або вище, або з додаванням кислот або інших хімічних речовин, або без додавання. У деяких варіантах здійснення сировину з лігноцелюлозної біомаси попередньо обробляють шляхом автогідролізу. "Автогідроліз" відноситься до способу

попередньої обробки, при якому оцтова кислота, що вивільняється шляхом гідролізу геміцелюлози під час попередньої обробки, додатково каталізує гідроліз геміцелюлози і застосовується в будь-якій гідротермічній попередній обробці лігноцелюлозної біомаси, здійснюваній при pH від 3,5 до 9,0.

У деяких варіантах здійснення лігноцелюлозна біомаса, попередньо оброблена гідротермальним способом, може бути розділена на рідку фракцію та тверду фракцію. "Тверда фракція" і "рідка фракція" відносяться до фракціонування попередньо обробленої біомаси при розділенні на рідку/тверду фазу. Відділена рідина в загальному значенні називається "рідкою фракцією". Залишкова фракція, що має в складі значну кількість нерозчинних твердих речовин, називається "тверда фракція". Як тверда фракція, так і рідка фракція або обидві разом можуть бути використані при здійсненні способів за даним винаходом або для одержання композицій за даним винаходом. У деяких варіантах здійснення тверда фракція може бути промита.

Приклад 1. Паралельна мікробіологічна ферментація поліпшує поглинання органічних речовин за допомогою ферментативного гідролізу несортованих MSW

Реакції лабораторного масштабу проводили зі зразком біорідини, одержаним в результаті випробування, описаного в прикладі 5.

Експериментальний субстрат на основі MSW для реакцій лабораторного масштабу одержували із використанням свіжих продуктів, що включали органічну фракцію (визначену як целюлозна фракція, фракції тваринного та рослинного походження) твердих побутових відходів (одержаних, як описано в Jensen et al., 2010, ґрунтуючись на Riber et al. 2009).

Експериментальний субстрат на основі MSW зберігали в аліквотах при -20 °C і піддавали відтаванню протягом ночі при 4 °C. Реакції виконували в 50 мл пробірках для центрифугування та загальний об'єм для реакції становив 20 г. Додавали експериментальний субстрат на основі MSW до 5 % сухої речовини (DM) (виміряної у вигляді вмісту сухої речовини, що залишився після 2 днів при 60 °C).

Для гідролізу застосовували целюлазу Cellic CTec3 (VDNI0003, Novozymes A/S, Бургсверд, Данія) (CTec3). Для регулювання та підтримання pH на рівні pH5 використовували цитратний буфер (0,05M), доводячи до загального об'єму 20 г.

Реакційні суміші інкубували протягом 24 годин на ротаторі Stuart SB3 (обертання при 4 об./хв.), поміщеному в піч (Binder GmbH, Тутлінген, Німеччина). Паралельно проводили реакцію з негативними контролями для оцінки фонових вивільнень сухої речовини із субстрату при інкубації. Після інкубації пробірки центрифугували при 1350 g протягом 10 хвилин при 4 °C. Потім зливали надосадову рідину, відбирали 1 мл для HPLC-аналізу, та надосадову рідину та осад, що залишилися, висушували протягом 2 днів при 60 °C. Масу висушеного матеріалу реєстрували та використовували для розрахунків розподілу сухої речовини. Конверсію DM в експериментальному субстраті на основі MSW розраховували, виходячи з цих чисел.

Концентрації органічних кислот і етанолу вимірювали за допомогою UltiMate 3000 HPLC (Thermo Scientific Dionex), оснащеного рефрактометричним детектором (Shodex® RI-101) і ультрафіолетовим детектором, при 250 нм. Розділення проводили на колонці для розділення моносахаридів Rezex RHM (Phenomenex) при 80 °C з 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> у якості елюенту та швидкістю потоку 0,6 мл/хв. Ці результати аналізували за допомогою програмного забезпечення Chromeleon (Dionex).

Для оцінки впливу паралельної ферментації та гідролізу 2 мл/20 г біорідини, одержаної в результаті випробування, описаного в прикладі 5 (зразки відбирали 15 і 16 грудня), додавали до реакційних сумішей з або без CTec3 (24 мг/г DM).

Конверсія DM в MSW

Конверсію твердих речовин вимірювали як вміст твердих речовин, визначених у надосадовій рідині як загальний вміст сухої речовини у відсотках. На фігурі 1 показана конверсія для контрольних MSW, препарату на основі виділених ферментів, окремо мікробіологічного інокуляту та комбінації мікробіологічного інокуляту та ферменту. Ці результати показували, що результатом додавання EC12B із прикладу 5 був значно більш високий ступінь конверсії сухої речовини в порівнянні з фоновим вивільненням сухої речовини в контрольній реакційній суміші (контрольні MSW Blank) (t-тест Ст'юдента  $p < 0,0001$ ). Паралельна мікробіологічна ферментація, індукована шляхом додавання зразка EC12B, і ферментативний гідроліз за допомогою CTec3 у результаті приводили до значно більш високого ступеня конверсії сухої речовини в порівнянні з реакційною сумішшю, гідролізованою тільки за допомогою CTec3, і реакційними сумішами, у які додавали тільки EC12B ( $p < 0,003$ ).

HPLC-аналіз глюкози, лактату, ацетату та EtOH

Концентрації глюкози та мікробних метаболітів (лактат, ацетат і етанол), вимірювані в надосадовій рідині, показані на фігурі 2. Як показано, оскільки матеріал, використаний для

одержання субстрату, зовсім не був стерильним або його не нагрівали для знищення бактерій, низька фонові концентрація цих речовин в експериментальному контрольному зразку MSW і вміст молочної кислоти, імовірно, були результатом життєдіяльності бактерій, характерних для експериментальних субстратів на основі MSW. Вплив додавання СТес3 у результаті приводив до підвищення концентрації глюкози та молочної кислоти в надосадовій рідині. Найбільш високі концентрації глюкози та бактеріальних метаболітів визначали в тих реакційних сумішах, де біорідину EC12B із прикладу 5 додавали разом з СТес3. Паралельна ферментація та гідроліз, таким чином, поліпшували конверсію сухої речовини в експериментальних субстратах на основі MSW і підвищували концентрацію бактеріальних метаболітів у рідині.

Посилання: Jacob Wagner Jensen, Claus Felby, Henning Jørgensen, Georg Ørnskov Rønsch, Nanna Dreyer Nørholm. Enzymatic processing of municipal solid waste. Waste Management. 12/2010; 30(12):2497-503.

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

Приклад 2. Паралельна мікробіологічна ферментація поліпшує поглинання органічних речовин шляхом ферментативного гідролізу несортованих MSW

Випробування проводили в спеціально сконструйованому реакторі періодичної дії, показаному на фігурі 3, з використанням несортованих MSW з метою підтвердження результатів, одержаних в експериментах лабораторного масштабу. В експериментах перевіряли вплив додавання інокуляту мікроорганізмів, що містив біорідину, одержану з бактерій у прикладі 3, для досягнення паралельної мікробіологічної ферментації та ферментативного гідролізу. Випробування проводили з використанням несортованих MSW.

MSW, використані для випробувань малого масштабу, були основною темою досліджень і розробок в REnescience. Для того, щоб результати випробувань мали цінність, відходи повинні бути репрезентативними та такими, які можна відтворити.

Відходи збирали в Nomi I/S, Хольстебро в березні 2012 року. Відходи являли собою несортовані тверді побутові відходи (MSW) з відповідної області. Відходи подрібнювали до розміру 30×30 мм для використання в дослідженнях малого масштабу та для збору типових зразків для досліджень. План відбору зразків застосовували відносно здрібнених відходів шляхом відбору частини зразків здрібнених відходів в 22-літрові відра. Відра зберігали в морозильній камері при -18°C до використання. "Фактичні відходи" складалися з восьми відер зібраних відходів. Вміст цих відер перемішували та повторно відбирали зразки для того, щоб упевнитися, що відмінність між повторностями була низькою настільки, наскільки це можливо.

Усі зразки піддавали обробці в аналогічних умовах щодо води, температури, обертання та механічного впливу. Використовували шість камер, три з інокуляцією та три без інокуляції. Визначений вміст безводних речовин при дослідженні доводили до вмісту безводних речовин 15 % шляхом додавання води. Враховували суху речовину в матеріалі для інокуляції для того, щоб додавання свіжої води в камери з інокулятом було меншим. В кожну камеру додавали 6 кг MSW, що відповідало 84 г СТЕС3, комерційного препарату целюлази. 2 літра інокуляту додавали в камери для інокуляції з відповідним зменшенням додавання води.

У камері з інокулятом підтримували pH на рівні 5,0, а в камері без інокуляту – pH 4,2 шляхом, відповідно, додавання 20 % NaOH для підвищення pH і 72 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> для зниження pH. Більш низький рівень pH у камері без інокуляту забезпечував те, що власні бактерії не будуть рости. Раніше було показано, що при використанні застосовно до гідролізу MSW препарату на основі ферментів СТЕС3 Тm різниця активності при pH 4,2 і pH 5,0 не була виявлена. Реакція тривала при 50 градусах С протягом 3 днів в експериментальному реакторі, що забезпечував постійне перемішування шляхом обертання.

По завершенню реакції камери спорожняли шляхом пропускання вмісту через сито і одержували біорідину, що містила зріджений матеріал, одержаний шляхом паралельного ферментативного гідролізу та мікробіологічної ферментації MSW.

Суша маса зразка

Визначали вміст сухої речовини (TS) і летких твердих речовин (VS) за допомогою способу визначення сухої речовини (DM). Зразки сушили при 60 °C протягом 48 годин. Використовували масу зразка до та після висушування для розрахунків DM, вираженого у відсотках.

Сира маса (г)

$$\frac{\text{Sample dry weight}}{\text{Сира маса (г)}} \times 100.$$

DM (%) у зразку

Спосіб визначення вмісту летких твердих речовин

Леткі тверді речовини розраховували та представляли у вигляді вмісту DM у відсотках, від якого віднімали вміст золи. Вміст золи в зразку знаходили шляхом спалювання попередньо

висушеного зразка при 550 °C у печі протягом мінімум 4 годин. Потім вміст золи розраховували в такий спосіб.

Вміст золи у зразку у відсотках від сухої речовини:

$$\frac{\text{Маса золи у зразку (г)}}{\text{Суха маса зразка (г)}} \times 100.$$

5

Вміст летких твердих речовин у відсотках:

(1 - вміст золи в зразку у відсотках) x вміст DM у зразку у відсотках.

10 Одержані результати показані нижче. Як показано, більш високий загальний вміст твердих речовин був одержаний у біорідині, одержаний в камерах з інокулятом, що вказує на те, що паралельна мікробіологічна ферментація та ферментативний гідроліз перевершували тільки ферментативний гідроліз.

	Біорідина			
	TS (кг)	VS (кг)		
Станд., з низьким вмістом лактату	1,098	0,853		
Інокул., з високим вмістом лактату	1,376	1,041		
Доданий інокул., TS+VS	TS	VS		
Кг	0,228	0,17		
Одержано				
	Біорідина			
	TS (кг)	Ст. відхил.	VS (кг)	Ст. відхил.
Станд., з низьким вмістом лактату	1,098	0,1553	0,853	0,116
Інокул., з високим вмістом лактату	1,148	0,0799	0,869	0,0799
	Більше, %		Більше, %	
Станд., з низьким вмістом лактату				
Інокул., з високим вмістом лактату	4,5579		1,8429	

Сумарна кількість одержаних метаболітів (лактат, ацетат та етанол)			Більше, %
Станд., серед.	92,20903	г/л	
Інокулят, серед.	342,6085	г/л	271,5564
Сумарна кількість метаболітів (лактат, ацетат та етанол), "поглинених"			Більше, %
Станд., серед. (з низьким вмістом лактату)	189,6075	г/л	
Інокулят, серед. (з високим вмістом лактату)	461,6697	г/л	143,4871

15

Приклад 3. Паралельна мікробіологічна ферментація поліпшує поглинання органічних речовин шляхом ферментативного гідролізу несортованих MSW

20 Експерименти проводили на демонстраційній установці REnescience, розміщеній в Центрі переробки Амагер (ARC), Копенгаген, Данія. На схематичному зображенні показані основні елементи установки, як показано на фігурі 4. Основним напрямком ARC REnescience Waste Refinery є сортування MSW на чотири види продуктів. Біорідина для одержання біогазу, інертні відходи (скло та пісок) для рециркуляції, та 2D і 3D фракції з неорганічних матеріалів, придатні для одержання RDF або для рециркуляції металів, пластику та деревини.

25 MSW збирали з великих міст у пластикових пакетах. MSW транспортували в REnescience Waste Refinery, де їх зберігали в бункері до переробки. Залежно від характеру MSW етап сортування може бути передбачений у системі REnescience для відбору частинок більше припустимого розміру (більше 600 мм).

Технологія REnescience, яку випробовували в даному прикладі, включала три етапи.

30 Перший етап являв собою помірне нагрівання (попередню обробку, як показано на фігурі 4) MSW за допомогою гарячої води до температур у діапазоні 40-75 °C протягом 20-60 хвилин. Під час цього періоду нагрівання та змішування розкривали пластикові пакети та забезпечували прийнятне здрібнювання компонентів, що розкладаються, з одержанням більш однорідної органічної фази перед додаванням ферментів. У період нагрівання температуру та pH доводили до оптимальних для препаратів на основі виділених ферментів, які застосовують для ферментативного гідролізу. Гарячу воду можна додавати у вигляді чистої водопровідної води

35

або у вигляді промивної води, використовуваної спочатку в промивних барабанах, а потім повторно поданої в реактор з помірним нагріванням, як показано на фігурі 4.

Другий етап являв собою ферментативний гідроліз і ферментацію (зрідження, як показано на фігурі 4). На другому етапі процесу REnescience додавали ферменти та необов'язково вибрані мікроорганізми. Ферментативне зрідження та ферментацію проводили безперервно із тривалістю прибіл. 16 годин при оптимальних температурі та рН для ефективної роботи ферменту. За допомогою цього гідролізу та ферментації відбувалося зрідження біогенної частини MSW до біорідини з високим вмістом сухої речовини у оточенні матеріалів, що не розкладаються. рН регулювали шляхом додавання  $\text{CaCO}_3$ .

Третій етап технології REnescience, як здійснювали у даному прикладі, являв собою етап розділення, на якому біорідину відокремлювали від фракцій, що не розкладаються. Розділення здійснювали у балістичному сепараторі, промивних барабанах і гідравлічних пресах. У балістичному сепараторі відбувалося розділення MSW, оброблених ферментами, на біорідину, 2D-фракцію з матеріалів, що не розкладаються, і 3D-фракцію з матеріалів, що не розкладаються. 3D-фракція (фізичні 3-мірні об'єкти, такі як консервні банки та пластикові пляшки) не зв'язували значні кількості біорідини, отже, однократного етапу промивання було достатньо для очищення 3D-фракції. 2D-фракція (текстильні матеріали та різновиди плівки як приклади) зв'язували значну кількість біорідини. Отже, 2D-фракцію віджимали із використанням шнекового преса, промивали і знову віджимали для оптимального вилучення біорідини та для одержання "чистої" і сухої 2D-фракції. Інертний матеріал, який являв собою пісок і скло, відсівали від біорідини. Воду, використовувану у всіх промивних барабанах, можна повторно подавати, нагрівати, а потім використовувати як гарячу воду на першому етапі для нагрівання.

Експеримент, докладно розглянутий у даному прикладі, розділили на три секції, як показано в таблиці 1.

Таблиця 1

Час (години)	Rodalon	Водопровідна вода/промивна вода для помірного нагрівання
27-68	+	водопровідна вода
86-124	-	водопровідна вода
142-187	-	промивна вода

У 7-денному дослідженні несортвані MSW, одержані з Копенгагена, Данія, безперервно завантажували в кількості 335 кг/год. у демонстраційну установку REnescience. У реактор з помірним нагріванням додавали 536 кг/год. води (водопровідної води або промивної води), нагрітої до прибіл. 75 °C перед подачею в реактор з помірним нагріванням. Тим самим температуру доводили до прибіл. 50 °C в MSW, а рН доводили до прибіл. 4,5 шляхом додавання  $\text{CaCO}_3$ .

У першій секції поверхнево-активний антибактеріальний засіб Rodalon™ (бензилалкіламонію хлорид) вносили в додану воду в кількості 3 г активного інгредієнта на кг MSW.

У реактор для зрідження додавали прибіл. 14 кг Cellic Ctec3 (комерційно доступний препарат на основі целюлази від Novozymes) на тонну вологих MSW. Температуру підтримували в діапазоні 45-50 °C і регулювали рН у діапазоні 4,2-4,5 шляхом додавання  $\text{CaCO}_3$ . Час утримання ферменту в реакторі становив прибіл. 16 годин.

У системі розділення, що містила балістичний сепаратор, преси та промивні барабани, дану біорідину (зріджений матеріал, що розкладається) відокремлювали від матеріалів, що не розкладаються.

Промивну воду вибірково або зливали, при цьому реєструючи вміст органічних речовин, або повторно подавали та повторно використовували для зволоження MSW, що надходять, при помірному нагріванні. Повторна подача промивної води характеризувалася ефектом досягнення більш високих рівнів бактеріальної інокуляції за допомогою організмів, що розмножуються за умов реакції 50 °C, ніж тих, які спочатку були присутні. В схемі використовуваного процесу повторно подану промивну воду спершу нагрівали до прибіл. 70 °C для того, щоб привести MSW, що надходять, до температури, придатної для ферментативного гідролізу, у цьому випадку прибіл. 50 °C. Зокрема, у випадку молочнокислих бактерій було показано, що нагрівання до 70 °C забезпечувало відбір і "стимулювання" експресії генів теплової стійкості.

Зразки відбирали у вибрані моменти часу в наступних місцях:

- біорідина, що проходить часте сито, яку називали "EC12B";

- біорідина у резервуарі для зберігання;
- промивна вода після сита для відокремлення сироватки;
- 2D-фракція;
- 3D-фракція;

5 - залишкова фракція інертних матеріалів з обох пристроїв для промивання.

Вироблення біорідини вимірювали за допомогою тензометричних датчиків на резервуарі для зберігання. Потік свіжої води, що надходить, вимірювали за допомогою витратомірів, рециркульовані або злиті промиті відходи вимірювали за допомогою тензометричних датчиків.

10 Кількість бактерій перевіряли в такий спосіб: відібрані зразки біорідини розбавляли 10-кратно в SPO (пептонно-сольовому розчині) і 1 мл розведених зразків висівали згідно з методикою глибинного посіву на м'ясо-пептонний агар (3,0 г/л м'ясного екстракту (Fluka, номер за каталогом B4888), 10,0 г/л триптон (Sigma, номер за каталогом T9410), 5,0 г/л NaCl (Merck, номер за каталогом 7647-14-5), 15,0 г/л агару (Sigma, номер за каталогом 9002-18-0)). Чашки інкубували при 50 градусах, відповідно, в аеробному та анаеробному середовищі. Анаеробне

15 культивування проходило у відповідних контейнерах, де анаеробне середовище зберігали шляхом насичення газом за допомогою Anoxumat і додавання саше, що створюють анаеробні умови (AnaeroGen від Oxoid, номер за каталогом AN0025A). Аеробні колонії підраховували через 16 годин і ще раз через 24 години. Бактерії, що росли в анаеробних умовах, кількісно оцінювали через 64-72 години.

20 На фігурі 5 показаний загальний вміст летких твердих речовин у зразках біорідини, одержаних після EC12B, у вигляді кг на кг перероблених MSW. Точкові оцінки одержували в різні моменти часу під час експерименту з урахуванням кожного із трьох окремих періодів проведення експерименту у вигляді окремого періоду часу. Таким чином, точкова оцінка за період 1 (Rodalon) виражала співвідношення балансів мас і потоків матеріалів за період 1. На

25 фігурі 5 показано, що за період 1, який починався після тривалої зупинки через труднощі на установці, загальний вміст твердих речовин, поглинених у біорідині, неухильно падав, вказуючи на слабкий антибактеріальний ефект Rodalon™. За період 2 загальний вміст поглинених твердих речовин повертався до незначно більш високих рівнів. За період 3 повторна подача води забезпечувала ефективну "інокуляцію" MSW, що надходять, при цьому поглинання

30 органічних речовин у біорідині, виражене в кг VS/кг відходів, підвищувалося до значно більш високих рівнів приблизно 12 %.

Для кожного з 10 моментів часу, показаних на фігурі 5, відбирали зразки біорідини (EC12B) і визначали за допомогою HPLC загальний вміст твердих речовин, загальний вміст летких

35 твердих речовин, загальний вміст розчинених летких твердих речовин, а також концентрації передбачуваних бактеріальних метаболітів, таких як ацетат, бутират, етанол, форміат і пропіонат. Ці результати, включаючи концентрації гліцерину, показані в таблиці 1 нижче.

Таблиця 1

## Аналіз зразків біорідини

Час	Загальний вміст твердих речовин	VS	Розчинені VS	Лактат	Мурашина кислота	Ацетат	Пропіонат	Етанол	Гліцерин
години	%	%	%	%	%	%	%	%	%
45	10,30	8,69	7,00	3,22	0,00	0,35	0,00	0,12	0,4165
53	9,77	8,22	6,62	3,00	0,00	0,42	0,00	0,17	0
63	9,31	7,74	6,07	2,74	0,09	0,41	0,03	0,17	0,415
67	8,66	7,15	5,54	2,82	0,00	0,39	0,03	0,20	0,475
88	9,57	7,97	6,02	3,24	0,00	0,31	0,04	0,13	0,554
116	10,57	8,90	6,77	3,27	0,01	0,25	0,00	0,11	0,5635
130	9,93	8,33	6,43	3,39	0,00	0,25	0,00	0,11	0
141	12,07	9,08	6,76	4,16	0,00	0,28	0,00	0,14	0,6205
159	11,30	8,68	6,33	4,63	0,00	0,31	0,00	0,11	0
166	11,04	8,17	5,72	4,50	0,00	0,32	0,03	0,12	0 646
181	11,76	8,75	6,11	5,48	0,12	0,37	0,00	0,11	1,38
188	11,20	8,05	6,20	5,40	0,00	0,40	0,00	0,11	0

Що стосується зразків біорідини, які відбирали у кожний з десяти моментів часу, на фігурі 6 показані обидва числа живих бактерій, визначені для бактерій, вирощених в аеробних умовах, а також відсоток маси "бактеріальних метаболітів" (а саме сума ацетату, бутирату, етанолу, формиату та пропіонату), у перерахуванні на відсотковий вміст розчинених летких твердих речовин. Показано, що відсоток маси бактеріальних метаболітів чітко зростає з підвищенням бактеріальної активності і асоціюється з підвищенням поглинанням твердих речовин у біорідині.

Приклад 4. Ідентифікація мікроорганізмів, що беруть участь у паралельній ферментації у прикладі 3

Зразки біорідини, одержані в прикладі 3, аналізували щодо складу мікроорганізмів.

Види мікроорганізмів, присутні в зразку, ідентифікували шляхом порівняння послідовностей їх генів, що кодують 16S рРНК, із послідовностями генів, що кодують 16S рРНК, у добре вивчених видів (референтні види). Нормальна гранична величина для ідентифікації видів становить 97 % подібність послідовності генів, що кодують 16S рРНК, у порівнянні з референтним видом. Якщо подібність становить менше 97 %, то найбільш ймовірно це вид, що відрізняється.

Одержані в результаті послідовності порівнювали з гомологічними послідовностями з використанням сервісу BlastN у базі даних NCBI. База даних містить високоякісні послідовності довжиною щонайменше 1200 п.о. і таксономічно пов'язані з базою даних NCBI. Ураховували тільки BLAST-хіти з ідентичністю  $\geq 95\%$ .

Одержані зразки біорідини безпосередньо спрямовували для проведення аналізу без заморожування перед екстракцією ДНК.

Усього ідентифікували 7 видів бактерій (фігура 7) і 7 видів архей. У ряді випадків для видів бактерій не змогли встановити підвид (*L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. sobrius*, *L. reuteri*, *L. frumenti*, *L. fermentum*, *L. fabifermentans*, *L. plantarum*, *L. pentosus*).

Приклад 5. Докладний аналіз поглинання органічних речовин при використанні паралельної мікробіологічної ферментації та ферментативного гідролізу несорттованих MSW

Демонстраційну установку REnescience, описану в прикладі 1, використовували для проведення докладного вивчення загального поглинання органічних речовин при використанні паралельної бактеріальної ферментації та ферментативного гідролізу несорттованих MSW.

Сміття з Копенгагена характеризували за допомогою Esonet для визначення його вмісту.

Аналіз відходів проводили для визначення вмісту та варіації. Великий зразок MSW доставляли в Esonet A/S, де проводили аналізи відходів. Первинний зразок зменшували до підзразка приблизно 50-200 кг. Цей підзразок сортував спеціально навчений персонал на 15 різних фракцій відходів. Встановлювали масу кожної фракції та розраховували розподіл.

Таблиця х

Загальний склад відходів в (%), одержаний в аналізі, проведеному за допомогою Esonet, при випробуванні протягом 300 годин

Зразок	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	Середнє значення	Стандартне відхилення
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
Полімерні упаковки	5,1	6,7	8,0	4,9	6,2	2,5	6,2	7,5	6,4	5,9	1,64
Полімерна плівка	10,8	8,6	10,7	7,9	10,1	7,8	8,8	8,5	9,5	9,2	1,13
Інший пластик	0,7	0,8	0,5	0,7	1,0	0,7	1,6	0,4	0,9	0,8	0,33
Метал	2,5	3,6	2,7	2,0	2,5	2,1	3,6	2,1	3,6	2,7	0,68
Скло	0,2	0,0	0,5	0,6	0,6	0,0	0,6	0,4	0,0	0,3	0,27
Відходи з подвір'я	0,7	3,5	1,9	1,8	0,9	2,7	0,6	4,5	2,8	2,1	1,33
WEEE (елементи живлення і т.ін.)	0,7	0,1	0,6	0,4	0,7	0,8	1,1	0,1	0,5	0,6	0,33
Папір	14,8	8,3	13,3	8,8	10,5	5,6	10,2	12,6	12,4	10,7	2,86
Полімерні та картонні упаковки	10,4	21,4	11,9	8,6	11,0	6,7	10,7	11,8	13,9	11,8	4,13
Харчові відходи	19,8	15,6	25,9	27,6	26,3	24,5	24,5	23,3	18,0	22,8	4,09
Підгузки	8,0	10,3	6,9	18,8	8,1	25,1	15,2	10,1	14,0	12,9	6,00
Використаний папір	8,5	6,7	7,3	7,4	8,5	8,6	7,9	5,7	6,3	7,4	1,03
Дріб'язок	9,7	2,5	4,2	2,1	4,5	4,7	2,7	7,0	4,9	4,7	2,40
Інші горючі речовини	2,0	0,9	0,8	1,2	1,8	0,7	0,7	2,2	0,8	1,2	0,61
Інші негорючі речовини	6,2	11,1	5,0	7,3	7,2	7,6	5,6	3,7	6,2	6,7	2,07
Усього	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100,0	

Склад відходів, що змінюється час від часу і представлений у таблиці 2, є результатом аналізу відходів, одержаний з різними зразками, відібраними за 300 годин. Найбільшу варіацію спостерігали в наступних фракціях: підгузки, полімерні та картонні упаковки, а також харчові відходи, які всі є фракціями, що впливають на вміст органічного матеріалу, який може бути поглинений.

За весь процес "випробування протягом 300 годин" середнє значення "поглиненого" матеріалу, що біологічно розкладається, виражене в кг VS на кг перероблених MSW, становило 0,156 кг VS/кг MSW, що надходять.

Репрезентативні зразки біорідності відбирали в різні моменти часу в процесі експерименту, якщо установка знаходилась в стабільному режимі роботи. Зразки аналізували за допомогою HPLC і визначали вміст летких твердих речовин, вміст твердих речовин і вміст розчинених твердих речовин, як описано в прикладі 3. Результати показані в таблиці 2 нижче.



Таблиця 2

## Аналіз зразків біорідини

Час	Загальний вміст твердих речовин	VS	Розчинені VS	Мурашина кислота	Лактат	Ацетат	Пропіонат	Етанол	Гліцерин
години	%	%	%	%	%	%	%	%	%
212	10,45	8,36	5,95	0,00	5,36	0,46	0,03	0,46	0,82
239	10,91	8,64	5,85	0,00	6,08	0,33	0,00	0,33	0,77
264,5	11,35	8,82	6,25	0,00	4,97	0,49	0,00	0,49	1,06
294	10,66	8,48	5,60	0,08	3,37	0,39	0,00	0,39	0,55

Приклад 6. Ідентифікація мікроорганізмів, що беруть участь у паралельній ферментації в прикладі 5

- 5 Зразок біорідини "EC12B" відбирали під час випробування, описаного в прикладі 5, 15 і 16 грудня 2012 року, і зберігали при -20 °C для проведення аналізу 16S рДНК для ідентифікації мікроорганізмів у зразку. Аналіз 16S рДНК широко використовується для ідентифікації та філогенетичного аналізу прокариот на основі компонента 16S малої рибосомальної субодиниці. Заморожені зразки направляли в сухому льоді в GATC Biotech AB, Солна, Швеція, де
- 10 проводили аналіз 16S рДНК (GATC\_Biotech). Аналіз включав наступні етапи: екстрагування геномної ДНК, одержання бібліотеки ампліконів шляхом використання пари універсальних праймерів, що перекривали гіперваріабельні ділянки V1-V3 27F: AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG/534R: ATTACCGCGGCTGCTGG; довжиною 507 п.о.), ПЛП-мічення адаптерами GS FLX, секвенування за допомогою пристрою Genome Sequencer FLX з одержанням числа читань на зразок 104000-160000. Одержані в результаті послідовності потім порівнювали з гомологічними послідовностями з використанням сервісу BlastN у базі даних rDNA з Ribosomal Database Project (Cole et al., 2009). База даних містить високоякісні послідовності довжиною щонайменше 1200 п.о. і таксономічно пов'язані з базою даних NCBI. Поточна версія (RDP випуск 10, оновлено 19 вересня 2012 року) містить послідовності 9162
- 15 бактерій і 375 архей. Результати, одержані за допомогою BLAST, фільтрували для видалення коротких і низькоякісних хітів (ідентичність послідовності  $\geq 90\%$ , покриття при вирівнюванні  $\geq 90\%$ ).

Усього було ідентифіковано 226 різних бактерій.

- 25 Переважною бактерією в зразку EC12B була *Paludibacter propionigenes* WB4, бактерія, що продукує пропіонат (Ueki et al. 2006), яка становила 13 % від загального числа ідентифікованих бактерій. Розподіл 13 ідентифікованих переважних бактерій (*Paludibacter propionigenes* WB4, *Proteiniphilum acetatigenes*, *Actinomyces europaeus*, *Levilinea saccharolytica*, *Cryptanaerobacter phenolicus*, *Sedimentibacter hydroxybenzoicus*, *Clostridium phytofermentans* ISDg, *Petrimonas sulfuriphila*, *Clostridium lactatifermentans*, *Clostridium caenicola*, *Garciaella nitratireducens*, *Dehalobacter restrictus* DSM 9455, *Marinobacter lutaoensis*) показаний на фігурі 8.

- 30 Порівняння бактерій, ідентифікованих на рівні роду, показало, що *Clostridium*, *Paludibacter*, *Proteiniphilum*, *Actinomyces* і *Levilinea* (всі є анаеробами) представляють приблизно половину ідентифікованого роду. Під *Lactobacillus* становить 2 % від ідентифікованих бактерій. Переважна бактерія виду *P. propionigenes* WB4 належить до другого найбільш переважного роду (*Paludibacter*) у зразку EC12B.

Переважною патогенною бактерією в зразку EC12B була *Streptococcus* spp., яка становила 0,028 % від загального числа ідентифікованих бактерій. У біорідині не виявили будь-яких патогенних бактерій, що утворюють спори.

- 40 *Streptococcus* spp. являв собою єдину патогенну бактерію, присутню в біорідині із прикладу 5. *Streptococcus* spp. являв собою бактерію з найвищою стійкістю до температур (серед таких, що не утворюють спори) і D-значенням, яке означає кількість часу, необхідного для зменшення кількості живих клітин *Streptococcus* spp. при цій температурі у десять разів, при цьому таким, що є вище, ніж у будь-яких інших патогенних бактерій за даними Déportes et al. (1998) в MSW. Ці результати показують, що умови, використані в прикладі 5, придатні для санірування MSW при розділенні в процесі REnescience до рівня, при якому був присутній лише *Streptococcus* spp.

45 Конкуренція між бактеріями за живильні речовини та підвищення температури під час процесу будуть значно зменшувати число патогенних організмів і, як показано вище, усувати

патогенні мікроорганізми, присутні в MSW, підданих сортуванню в процесі REnescience. Інші фактори, такі як pH,  $a_w$ , витривалість до кисню,  $CO_2$ , NaCl і  $NaNO_2$ , також впливають на ріст патогенних бактерій у біорідині. Взаємодія між згаданими вище факторами може зменшити час і температуру, необхідні для зменшення кількості живих клітин під час процесу.

5      Приклад 7. Детальний аналіз поглинання органічних речовин при використанні паралельної мікробіологічної ферментації та ферментативного гідролізу несорттованих MSW, одержаних з віддалених географічних об'єктів

Демонстраційну установку REnescience, описану в прикладі 3, використовували для переробки MSW, завезених з Нідерландів. Установили, що MSW мали наступний склад.

10

Таблиця Y

Загальний склад відходів (5), підданий аналізу Esonet під час тесту van Gansewinkel

	%
Полімерні упаковки	5
Полімерна плівка	7
Інший пластик	2
Метал	4
Скло	4
Відходи з подвір'я	4
WEEE (елементи живлення та т.ін.)	1
Папір	12
Картон	12
Підгузки	4
Використаний папір	2
Інші горючі речовини	15
Інші негорючі речовини	5
Харчові відходи	13
Дріб'язок	9
Усього	100

Цей матеріал зазнавав паралельного ферментативного гідролізу та мікробіологічної ферментації, як описано в прикладах 3 і 5, і здійснювали випробовування із використанням установки протягом 3 днів. Відбирали та характеризували зразки біорідини, одержані в різні моменти часу. Результати показані в таблиці 3.

15

Таблиця 3

Аналіз біорідини

Час	Загальний вміст твердих речовин	VS	Розчинені VS	Лактат	Мурашина кислота	Ацетат	Пропіонат	Етанол	Гліцерин
Години	%	%	%	%	%	%	%	%	%
76	7,96	6,08	3,07	4,132	0,08	0,189	0	0,298	0,4205
95	9,19	6,99	6,66	6,943	0	0,352	0,034	0,069	0,6465

Що стосується розчинених VS, вносили виправлення 9 %, виходячи із втрати лактату при висушуванні.

20

Приклад 8. Одержання біометану з використанням біорідини, одержаної в результаті паралельної мікробіологічної ферментації та ферментативного гідролізу несорттованих MSW

Біорідину, одержану в експерименті, описаному в прикладі 5, заморожували в 20 літрових відрах і зберігали при  $-18^{\circ}C$  для подальшого використання. Цей матеріал випробовували щодо одержання біометану з використанням двох ідентичних, добре підготовлених систем анаеробного зброджування на основі фільтрів з нерухомим завантаженням, що містили

25

консорціум мікроорганізмів для анаеробного зброджування в біоплівці, іммобілізований на фільтрі-підкладці.

5 Вихідні зразки відбирали як з поданої рідини, так і з рідини усередині реактора. Концентрацію летких жирних кислот (VFA), повну хімічну потребу в кисні (tCOD), хімічну потребу в кисні (sCOD) і концентрацію аміаку визначали за допомогою кюветних тестів HACH LANGE на спектрофотометрі DR 2800, а точну концентрацію VFA щодня визначали за допомогою HPLC. Показники TSVS також визначали за допомогою гравіметричного способу.

10 Зразки газу для аналізу GC відбирали щодня. Контроль швидкості подачі проводили шляхом вимірювання об'єму вільного простору над продуктом у живильному резервуарі, а також кількості стічних вод, що виходять із реактора. Відбір зразків під час процесу проводили шляхом збору рідини або стічних вод за допомогою шприца.

Стійке одержання біогазу спостерігали при використанні як однієї, так і іншої системи анаеробного зброджування протягом 10 тижнів, що становило від 0,27 до 0,32 л/г COD, або від R до Z л/г VS.

15 Потім припиняли подачу біорідини в одну із двох систем, і відслідковували повернення до вихідного рівня, як показано на фігурі 9. Стійкий рівень одержання газу показаний горизонтальною лінією, позначеною цифрою 2. Момент часу, у який припиняли подачу, показаний у вигляді вертикальних ліній, позначених цифрою 3. Показано, що після місяців стійкої роботи залишався залишковий пружний матеріал, який перетворювався протягом 20 періоду, позначеного між вертикальними лініями, що позначені цифрами 3 і 4. Повернення до вихідного рівня або "зниження" показане в періоді після вертикальної лінії, що позначена цифрою 4. Після періоду на вихідному рівні поновлювали подачу в момент, позначений вертикальною лінією, що позначена цифрою 1. Зростання до стійкого стану одержання газу або "вихід на робочий режим" показаний в періоді після вертикальної лінії, що позначена цифрою 1.

25 Параметри одержання газу з біорідини, у тому числі "вихід на робочий режим" і "зниження" вимірювали як описано нижче.

Параметр	Одиниця вимірювання	Назва зразка 300 годин, відходи з Амагер
Швидкість подачі	л/день	1,85
Сумарна подача	Літри	3,7
Час виходу на робочий режим*	Години	15
Час зниження**	Години	4
Час повного виснаження***	Дні	4
Вироблення газу в стабільній фазі****	л/день	122
Загальний об'єм одержаного газу	л	244
CH <sub>4</sub> , %	%	60
Загальний вихід	л газу/л поданої рідини	66
Газ із органічних речовин, що легко переробляються	%	53
COD у поданій біорідині	г/л	124
Повна COD у поданій біорідині	г	459
Вихід на одиницю COD	л газу/г COD	0,53
Питомий вихід на одиницю COD	л CH <sub>4</sub> /г COD	0,32
Масовий баланс COD	% COD у поданій біорідині	96
COD/газ	г	418
COD/газ	%	91

\*Час виходу на робочий режим являє собою час від першої подачі до того моменту, коли припиняється підвищення вироблення газу та відбувається стабілізація. Час виходу на робочий режим вказує на рівень органічних речовин, що легко переробляються, у поданій рідині.

\*\*Час зниження являє собою час від останньої подачі до того моменту, коли припиняється різке падіння вироблення газу. Час зниження показує вироблення газу з органічних речовин, що легко переробляються.

\*\*\*Повне виснаження являє собою час після часу зниження до того моменту, коли вироблення газу повністю припиняється та відбувається повернення до вихідного рівня. Час повного виснаження показує вироблення газу з органічних речовин, що повільно переробляються.

\*\*\*\*Внесена поправка для вироблення газу на вихідному рівні 2 л/день.

Приклад 9. Порівняльне одержання біометану з використанням біорідини, одержаної в результаті ферментативного гідролізу несорттованих MSW з і без паралельної мікробіологічної ферментації

Біорідини з "високим вмістом лактату" і "низьким вмістом лактату", одержані в прикладі 2, порівнювали щодо одержання біометану з використанням системи анаеробного зброджування на основі фільтра з нерухомим завантаженням, описаної в прикладі 8. Одержували показники та визначали час "виходу на робочий режим" і "зниження", як описано в прикладі 8.

На фігурі 10 показані характеристики "виходу на робочий режим" і "зниження" при використанні біорідини "з високим вмістом лактату". Стійкий рівень вироблення газу показаний горизонтальною лінією, позначеною цифрою 2. Момент часу, у якій починалася подача газу, показаний у вигляді вертикальних ліній, позначених цифрою 1. Зростання до стійкого стану вироблення газу або "вихід на робочий режим" показане в періоді після вертикальної лінії, позначеної цифрою 1. Момент часу, у якій припиняли подачу, показаний у вигляді вертикальної лінії, позначеної цифрою 3. Повернення до вихідного рівня або "зниження" показане в періоді після вертикальної лінії, позначеної цифрою 3, до періоду з вертикальною лінією, позначеною цифрою 4.

На фігурі 11 показані ті ж показники для біорідини з "низьким вмістом лактату" із зазначеними моментами, що відповідають описаним для фігури 11.

Нижче показані порівняльні параметри вироблення газу з біорідини "з високим вмістом лактату" і "низьким вмістом лактату", що включають "вихід на робочий режим" і "зниження", вимірювані як описано.

- Різниця часу "виходу на робочий режим"/«зниження» демонструє різницю щодо легкості біологічного розкладання. Біомаси, здатні до найбільш швидкої біоконверсії, у підсумку будуть характеризуватися найбільш високою загальною швидкістю конверсії органічних речовин при використанні для одержання біогазу. Більше того, "більш швидкі" субстрати біометану є найбільш ідеально прийнятними для конверсії за допомогою дуже швидких систем анаеробного зброджування, таких як анаеробні реактори на основі фільтра з нерухомим завантаженням.

Показано, що біорідина із "високим зміст лактату" демонструє більш швидкий час "виходу на робочий режим" і "зниження" при одержанні біометану.

Параметр	Одиниця вимірювання	Назва зразка	
		Відходи з високим вмістом лактату з Хольстебро	Контрольний зразок відходів з низьким вмістом лактату з Хольстебро
Швидкість подачі	л/день	1,0	1,0
Сумарна подача	Літри	2,83	3,95
Час виходу на робочий режим*	Години	16	48
Час зниження**	Години	6	14
Час повного виснаження***	Дні	2	2
Вироблення газу в стабільній фазі****	л/день	59	40
Загальний об'єм одержаного газу	л	115	140
CH <sub>4</sub> , %	%	60	60
Загальний вихід	л газу/л поданої рідини	41	35
Газ із органічних речовин, що легко переробляються	%	86	82
COD у поданій біорідині	г/л	106	90
Повна COD у поданій біорідині	г	300	356
Вихід на одиницю COD	л газу/г COD	0,38	0,39
Питомий вихід на одиницю COD	л CH <sub>4</sub> /г COD	0,23	0,24
Масовий баланс COD	% COD у поданій біорідині	91	95
COD/газ	г	197	240
COD/газ	%	66	68

\*Час виходу на робочий режим являє собою час від першої подачі до того моменту, коли припиняється підвищення вироблення газу та відбувається стабілізація. Час виходу на робочий режим вказує на рівень органічних речовин, що легко переробляються, у поданій рідині.

\*\*Час зниження являє собою час від останньої подачі до того моменту, коли припиняється різке падіння вироблення газу. Час зниження показує вироблення газу з органічних речовин, що легко переробляються.

\*\*\*Повне виснаження являє собою час після часу зниження до того моменту, коли вироблення газу повністю припиняється та відбувається повернення до вихідного рівня. Час повного виснаження показує вироблення газу з органічних речовин, що повільно переробляються.

\*\*\*\*Внесена поправка для вироблення газу на вихідному рівні 2 л/день.

10

Приклад 11. Одержання біометану з використанням біорідини, одержаної в результаті паралельної мікробіологічної ферментації та ферментативного гідролізу пшеничної соломи, попередньо обробленої гідротермічним способом

- Пшеничну солому попередньо обробляли, розділяли на волоконну фракцію та рідку фракцію, а потім волоконну фракцію окремо промивали. 5 кг промитих волокон потім інкубували в реакторі барабанного типу з горизонтальною віссю обертання з дозою Cellic STEC3 і інокулятом ферментуючих мікроорганізмів, що входять до складу біорідини, одержаної в прикладі 3. Пшеничну солому піддавали одночасному гідролізу та мікробіологічній ферментації протягом 3 днів при 50 градусах.

Потім цю біорідину тестували щодо одержання біометану з використанням системи анаеробного зброджування на основі фільтра з нерухомим завантаженням, описаної в прикладі 8. Показники були одержані для часу "виходу на робочий режим", як описано в прикладі 8.

На фігурі 12 показана характеристика "виходу на робочий режим" для біорідини з гідролізованої пшеничної соломи. Стійкий рівень вироблення газу показаний горизонтальною лінією, позначеною цифрою 2. Момент часу, у який запускали подачу, показаний у вигляді вертикальних ліній, позначених цифрою 1. Зростання до стійкого стану вироблення газу або "вихід на робочий режим" показаний в періоді після вертикальної лінії, позначеної цифрою 1.

Параметри вироблення газу з біорідини з гідролізованої пшеничної соломи показані нижче.

Показано, що попередньо оброблену лігноцелюлозну біомасу можна з легкістю використовувати для практичних способів одержання біогазу та для одержання нових субстратів біометану за даним винаходом.

Параметр	Одиниця вимірювання	Назва зразка Гідролізат пшеничної соломи + біорідина
Швидкість подачі	Л/день	1
Сумарна подача	Літр	1,2
Час виходу на робочий режим*	Години	29
Час зниження**	Години	Дані відсутні
Час повного виснаження***	Дні	Дані відсутні
Вироблення газу в стійкій фазі****	Л/день	56
Загальний об'єм одержаного газу	Л	Дані відсутні
CH <sub>4</sub> , %	%	60
Загальний вихід	Л газу/л поданої рідини	Дані відсутні
Газ із органічних речовин, що легко переробляються	%	Дані відсутні
COD у поданій біорідині	Г/л	144
Повна COD у поданій біорідині	Г	173
Вихід на одиницю COD	Л газу/г COD	Дані відсутні
Питомий вихід на одиницю COD	Л CH <sub>4</sub> /г COD	Дані відсутні
Масовий баланс COD	% COD у поданій біорідині	Дані відсутні
COD/газ	Г	Дані відсутні
COD/газ	%	Дані відсутні

\*Час виходу на робочий режим являє собою час від першої подачі до того моменту, коли припиняється підвищення вироблення газу та відбувається стабілізація. Час виходу на робочий режим вказує на рівень органічних речовин, що легко переробляються, у поданій рідині.

\*\*Час зниження являє собою час від останньої подачі до того моменту, коли припиняється різке падіння вироблення газу. Час зниження показує вироблення газу з органічних речовин, що легко переробляються.

\*\*\*Повне виснаження являє собою час після часу зниження до того моменту, коли вироблення газу повністю припиняється та відбувається повернення до вихідного рівня. Час повного виснаження показує вироблення газу з органічних речовин, що повільно переробляються.

\*\*\*\*Внесена поправка для вироблення газу на вихідному рівні 2 л/день.

Приклад 12. Паралельна мікробіологічна ферментація та ферментативний гідроліз MSW з використанням вибраних організмів

Паралельні реакції мікробіологічної ферментації та ферментативного гідролізу з використанням специфічної монокультури бактерій здійснювали в лабораторному масштабі з використанням експериментальних MSW (описані в прикладі 1) і згідно з методикою, описаною у прикладі 1. Умови реакції та дозування ферменту зазначені в таблиці 4.

Живі бактеріальні штами *Lactobacillus amylophilus* (DSMZ № 20533) і *Propionibacterium acidipropionici* (DSMZ № 20272) (DSMZ, Брауншвейг, Німеччина) (збирали при 4 °C протягом 16 годин до використання) використовували як інокулят для визначення їх впливу на конверсію сухої речовини в експериментальних MSW з або без додавання СТес3. Основними

метаболітами, які вони продукували, були молочна кислота та пропіонова кислота, відповідно. Концентрацію цих метаболітів визначали за допомогою процедури HPLC (описаної в прикладі 1).

Оскільки *Propionibacterium acidipropionici* є анаеробом, то буфер, застосовуваний в реакціях, де використовували цей штам, продували газоподібним азотом і живу культуру інокулювали в реакційні пробірки усередині переносної анаеробної камери (Atmos Bag, Sigma Chemical CO, Сент-Луїс, Міссурі, США), яку також продували газоподібним азотом. Реакційні пробірки з *P. propionici* закривали перед перенесенням у термостат. Реакційні суміші інокулювали 1 мл або *P. propionici*, або *L. amylophilus*.

Результати, представлені в таблиці 4, чітко показують, що утворювалися очікувані метаболіти; при цьому пропіонову кислоту визначали в реакційних сумішах, інокульованих *P. acidipropionici*, тоді як у контрольних зразках, що містили експериментальні MSW з або без СТес3, пропіонову кислоту не визначали. Концентрація молочної кислоти в контрольній реакційній суміші, у яку додавали тільки експериментальні MSW, була майже такою ж, як і в реакційних сумішах, у які додавали тільки *L. amylophilus*. Утворення молочної кислоти в цій контрольній реакції приписували бактеріям, що населяли експериментальні MSW. Очікували, що будуть присутні деякі бактерії з оточення, оскільки окремі компоненти експериментальних відходів були тільки-но одержаними продуктами, замороженими, але без додаткової стерилізації за допомогою будь-якого способу перед підготовкою експериментальних MSW. Якщо *L. amylophilus* додавали разом з СТес3, то концентрація молочної кислоти фактично подвоювалася (Таблиця 4).

Позитивний вплив щодо вивільнення DM у надосадовій рідині після гідролізу було продемонстровано у вигляді більш високого ступеня конверсії DM у реакційних сумішах після додавання або *L. amylophilus*, або *P. propionici* у комбінації з СТес3 (30-33 % підвищення в порівнянні з реакційними сумішами, у які додавали тільки СТес3).

Таблиця 4

Культури бактерій, які випробовували в лабораторному масштабі окремо або разом з ферментативним гідролізом Показані температура, pH і доза СТес3 96 мг/г Контрольні реакції з MSW у буфері з або без СТес3 виконували в паралелях для оцінки фону бактеріальних метаболітів у реакції (Показані середнє значення та стандартне відхилення для 4 реакцій, за винятком контрольних MSW, реакції з якими були проведені окремо).

Nd Не визначено, нижче межі детектування.

Таблиця 4

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

Приклад 13. Ідентифікація мікроорганізмів, що беруть участь у паралельній ферментації в прикладі 7

Зразки біорідини "ЕС12В" і оборотної води "ЕА02" відбирали при проведенні випробування, описаного в прикладі 7 (зразки відбирали 21 березня та 22 березня). Зразки рідини заморожували в 10 % гліцерині та зберігали при -20 °C з метою проведення аналізу 16S рДНК для ідентифікації мікроорганізмів, причому даний аналіз широко використовують для ідентифікації та філогенетичного аналізу прокариот на основі компонента 16S малої рибосомальної субодиниці. Заморожені зразки направляли в сухому льоді в GATC Biotech AB, Солна, Швеція, де проводили аналіз 16S рДНК (GATC Biotech). Аналіз включав наступні етапи:

екстрагування геномної ДНК, одержання бібліотеки ампліконів шляхом використання пари універсальних праймерів, що перекривають гіперваріабельні ділянки V1-V3 27F: AGAGTTTGTATCTGGCTCAG/534R: ATTACCGCGGCTGCTGG; довжиною 507 п.о.), ПЛР-мічення адаптерами GS FLX, секвенування за допомогою пристрою Genome Sequencer FLX з одержанням числа читань на зразок 104000-160000. Одержані в результаті послідовності далі порівнювали з гомологічними послідовностями з використанням сервісу BlastN у базі даних rDNA з Ribosomal Database Project (Cole et al., 2009). База даних містить високоякісні послідовності довжиною щонайменше 1200 п.о. і таксономічно пов'язані з базою даних NCBI. Поточна версія (RDP випуск 10, оновлена 19 вересня 2012 року) містить послідовності 9162 бактерій і 375 архей. Результати, одержані за допомогою BLAST, фільтрували для видалення коротких і низькоякісних хітів (ідентичність послідовності  $\geq 90\%$ , покриття при вирівнюванні  $\geq 90\%$ ).

У зразках EC12B-21/3, EC12B-22/3 і EA02B 21/3, EA02-22/3 усього було ідентифіковано 452, 310, 785, 594 різних бактерій.

На рівні виду цей аналіз чітко показав, що *Lactobacillus amylolyticus*, безумовно, була найбільш домінуючою бактерією, на частку якої припадало від 26 % до 48 % усієї детектованої мікробіоти. Мікробіота в зразку EC12B була подібною; причому при порівнянні даних від двох різних зразків розподіл 13 переважних бактерій (*Lactobacillus amylolyticus* DSM 11664, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *indicus*, *Lactobacillus similis* JCM 2765, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* DSM 20072, *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus hamsteri*, *Lactobacillus parabuchneri*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus buchneri*) був практично однаковим.

Зразки EA02 були подібні EC12B, незважаючи на те, що *L. amylolyticus* була менш домінуючою. Розподіл 13 переважних бактерій (*Lactobacillus amylolyticus* DSM 11664, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* DSM 20072, *Lactobacillus similis* JCM 2765, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *indicus*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Weissella ghanensis*, *Lactobacillus oligofermentans* LMG 22743, *Weissella beninensis*, *Leuconostoc gasicomitatum* LMG 18811, *Weissella soli*, *Lactobacillus paraplantarum*) був також подібним, за винятком присутності або за винятком наявності *Pseudomonas extremaustralis* 14-3 серед 13 переважних видів бактерій. Цю *Pseudomonas*, виявлену в EA02 (21/3), раніше виділили зі ставка тимчасового перетримування в Антарктиці, і вона здатна продукувати полігідроксіалканоат (ПНА) як з октаноату, так і із глюкози (Lopez et al. 2009; Tribelli et al., 2012).

Порівняння результатів на рівні роду показало, що *Lactobacillus* становила 56-94 % бактерій, ідентифікованих у зразку. Крім того, розподіл бактерій роду був у високому ступені подібним між даними, одержаними від двох зразків EC12B і EA02. Примітно те, що в зразках EA02 роди *Weissella*, *Leuconostoc* і *Pseudomonas* були присутні в значній мірі (1,7-22 %), хоча в зразку EC12B ( $>0,1\%$ ) вони були виявлені лише у вигляді меншої складової. Обидва з *Weissella* і *Leuconostoc* належать до порядку *Lactobacillales*, так само як і *Lactobacillus*.

Переважають патогенні бактерії в зразках EC12B і EA02, відібраних при проведенні випробування, описаного в прикладі 7, становили 0,281-0,539 % і 0,522-0,592 %, відповідно, від загального числа ідентифікованих бактерій. Переважними патогенними бактеріями в зразках EC12B були *Aeromonas* spp., *Bacillus cereus*, *Brucella* sp., *Citrobacter* spp., *Clostridium perfringens*, *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *Providencia* sp., *Salmonella* spp., *Serratia* sp., *Shigella* spp. і *Staphylococcus aureus*. В EC12B і EA02, описаних у прикладі 7, не виявляли патогенні бактерії, що утворюють спори. Загальне число патогенних бактерій, ідентифікованих як в EC12B, так і в EA02, згодом знижувалося, фактично зменшуючись у кількості від загального числа бактерій в EC12B за один день.

В Déportes et al. (1998) був зроблений огляд відомих патогенних мікроорганізмів, присутніх в MSW. Патогенні мікроорганізми, присутні в MSW, описаних у прикладах 3, 5 і 7, показані в таблиці 5 (Déportes et al. (1998) і аналіз 16S рДНК). Крім патогенних мікроорганізмів, описаних в Déportes et al. (1998), як *Proteus* sp., так і *Providencia* sp. були виявлені в зразках EC12B і в EA02, відібраних при випробуванні, описаному в прикладі 7. У той час як *Streptococcus* spp. були єдиними патогенними бактеріями, присутніми в біорідині в прикладі 5, у даному прикладі вони не були присутні. Це вказує на те, що в EC12B і EA02 із прикладу 7 присутнім є інше угруповання бактерій, яке може бути результатом конкуренції між бактеріями за живильні речовини і незначного зниження температури під час процесу, що буде сприяти росту іншого угруповання бактерій.

Таблиця 5. Огляд патогенних мікроорганізмів, присутніх у прикладах 3, 5 і 7



Організм <sup>□</sup> Бактерія <sup>¶</sup> <sup>□</sup>	Температура <sup>□</sup>					Діапазон рН <sup>□</sup>		Мінімальний рівень активності води (aw-Min) <sup>□</sup>	Рівень біобезпеки <sup>□</sup>	Джерела <sup>¶</sup> Зустрічаються в MSW <sup>□</sup>	Посилання на документ, де наведені умови росту <sup>□</sup>
	Оптимальна <sup>□</sup>	Максимальна (для росту) <sup>□</sup>	Бактерицидна <sup>□</sup>	Необхідний час (мін) <sup>□</sup>	D-значення (мін) <sup>□</sup>	Мін. <sup>□</sup>	Макс. <sup>□</sup>				
<i>Aeromonas</i> -sp. <sup>□</sup>	37 <sup>□</sup>	55 <sup>□</sup>	55 <sup>□</sup>	□	0,25 <sup>□</sup>	□	□	0,94 <sup>□</sup>	1-2 <sup>□</sup>	(Deportes, et.al.1998) <sup>□</sup>	Rouf and Rigney,1971, Spinks et.al., 2006, Santos et.al.,1994 <sup>□</sup>
<i>Bacillus cereus</i> <sup>□</sup>	37 <sup>□</sup>	50 <sup>□</sup>	95 <sup>□</sup>	10 <sup>□</sup>	□	4,8 <sup>□</sup>	9,3 <sup>□</sup>	0,951 <sup>□</sup>	2 <sup>□</sup>	(Deportes, et.al.1998) <sup>□</sup>	Lanciotti et.al., 2001 <sup>□</sup>
<i>Brucella</i> -sp. <sup>□</sup>	□	□	□	□	□	□	□	□	3 <sup>□</sup>	(Deportes, et.al.1998) <sup>□</sup>	□
<i>Citrobacter</i> -sp. <sup>□</sup>	□	□	52,5 <sup>□</sup>	7 <sup>□</sup>	□	4-5 <sup>□</sup>	□	0,94 <sup>□</sup>	1-2 <sup>□</sup>	(Deportes, et.al.1998) <sup>□</sup>	Verrips and Kwaps,1977, Smith and Bhagwat, 2013, Colavita et.al., 2003 <sup>□</sup>
<i>Clostridium perfringens</i> <sup>□</sup>	37 <sup>□</sup>	50 <sup>□</sup>	61 <sup>□</sup>	23 <sup>□</sup>	□	5 <sup>□</sup>	8,5 <sup>□</sup>	0,95 <sup>□</sup>	2 <sup>□</sup>	(Deportes, et.al.1998) <sup>□</sup>	Jay, J.M.,1991 <sup>□</sup>
<i>Klebsiella</i> -sp. <sup>□</sup>	□	□	55 <sup>□</sup>	□	0,5 <sup>□</sup>	<3 <sup>□</sup>	□	□	1-2 <sup>□</sup>	(Deportes, et.al.1998) <sup>□</sup>	□
<i>Salmonell</i> -sp. <sup>□</sup>	37 <sup>□</sup>	45 <sup>□</sup>	55 <sup>□</sup>	2,5 <sup>□</sup>	□	3,7 <sup>□</sup>	9,5 <sup>□</sup>	0,94 <sup>□</sup>	2-3 <sup>□</sup>	(Deportes, et.al.1998) <sup>□</sup>	Jay, J.M.,1991, Spinks et.al., 2006 <sup>□</sup>
<i>Serratia</i> -sp. <sup>□</sup>	□	□	55 <sup>□</sup>	□	1,5 <sup>□</sup>	□	□	□	2 <sup>□</sup>	(Deportes, et.al.1998) <sup>□</sup>	Spinks et.al., 2006 <sup>□</sup>
<i>Shigellae</i> -spp. <sup>□</sup>	37 <sup>□</sup>	48 <sup>□</sup>	60 <sup>□</sup>	□	1 <sup>□</sup>	5 <sup>□</sup>	8 <sup>□</sup>	- <sup>□</sup>	2-3 <sup>□</sup>	(Deportes, et.al.1998) <sup>□</sup>	Spinks et.al., 2006 <sup>□</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> <sup>□</sup>	□	47,8 <sup>□</sup>	□	□	□	4 <sup>□</sup>	9 <sup>□</sup>	0,86 <sup>□</sup>	2 <sup>□</sup>	(Deportes, et.al.1998) <sup>□</sup>	Jay, J.M.,1991 <sup>□</sup>
<i>Streptococcus</i> -spp. <sup>□</sup>	□	□	65 <sup>□</sup>	20 <sup>□</sup>	□	□	□	□	2 <sup>□</sup>	(Deportes, et.al.1998) <sup>□</sup>	Francis-A.E., 1959 <sup>□</sup>

#### Ідентифікація штамів і депонування в DSMZ

- Зразки EA02 від 21 березня та 22 березня, одержані в результаті випробування, описаного в прикладі 7, направляли для посіву в Центр вивчення біологічної стійкості Ново Нордиск (центр НН) (Хорсхольм, Данія) з метою ідентифікації та одержання монокультур виділених бактерій. Після доставки в центр NN зразки інкубували протягом ночі при 50 °C, потім висівали на різні чашки (GM17, триптиказо-соевий бульйон і м'ясний екстракт (агар GM17:48,25 г/л агару m17, після 20 хв. автоклавування додавали глюкозу до кінцевої концентрації 0,5 %, триптиказо-соевий агар: 30 г/л триптиказо-соевий бульйон, 15 г/л агару, м'ясний бульйон (Statens Serum Institute, Копенгаген, Данія) додавали 15 г/л агарози) і вирощували в аеробних умовах при 50 °C. Через один день чашки перевіряли візуально та вибрані колонії пересівали штрихом на відповідні чашки, а потім направляли в DSMZ для ідентифікації.

- Наступні штами, виділені з оборотної води з EA02, були депоновані в депозитарії для патентних процедур DMSZ, DSMZ, Брауншвейг, Німеччина.

#### Ідентифіковані зразки

- Ідентифікаційний номер зразка: 13-349 (*Bacillus safensis*), одержаний з (EA02-21/3), DSM 27312.
- Ідентифікаційний номер зразка: 13-352 (*Brevibacillus brevis*), одержаний з (EA02-22/3), DSM 27314.
- Ідентифікаційний номер зразка: 13-353 (*Bacillus subtilis* sp. *subtilis*), одержаний з (EA02-22/3), DSM 27315.
- Ідентифікаційний номер зразка: 13-355 (*Bacillus licheniformis*), одержаний з (EA02-21/3), DSM 27316.
- Ідентифікаційний номер зразка: 13-357 (*Actinomyces bovis*), одержаний з (EA02-22/3), DSM 27317.

#### Неідентифіковані зразки

- Ідентифікаційний номер зразка: 13-351, одержаний з (EA02-22/3), DSM 27313.
- Ідентифікаційний номер зразка: 13-362A, одержаний з (EA02-22/3), DSM 27318.
- Ідентифікаційний номер зразка: 13-365, одержаний з (EA02-22/3), DSM 27319.
- Ідентифікаційний номер зразка: 13-367, одержаний з (EA02-22/3), DSM 27320.
- Посилання

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

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

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

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

Варіанти здійснення та приклади є тільки ілюстративними та не призначені для обмеження об'єму формули винаходу.

#### ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Ренесаєнс A/S

<120> Способи та композиції для одержання біометану

<130> 49906PC02

<160> 2

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<222> 1...20

<223> /мол\_тип="нетипована ДНК"

/примітка="праймер 27F для гіперваріабельної ділянки v1 16S рДНК"

/організм="Штучна послідовність"

<400> 1

agagtttgat cctggctcag 20

<210> 2

<211> 17

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<222> 1...17

<223> /мол\_тип="нетипована ДНК"

/примітка="праймер 534R для гіперваріабельної ділянки v3 16S рДНК"

/організм="Штучна послідовність"

<400> 2

attaccgcgg ctgctgg 17

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

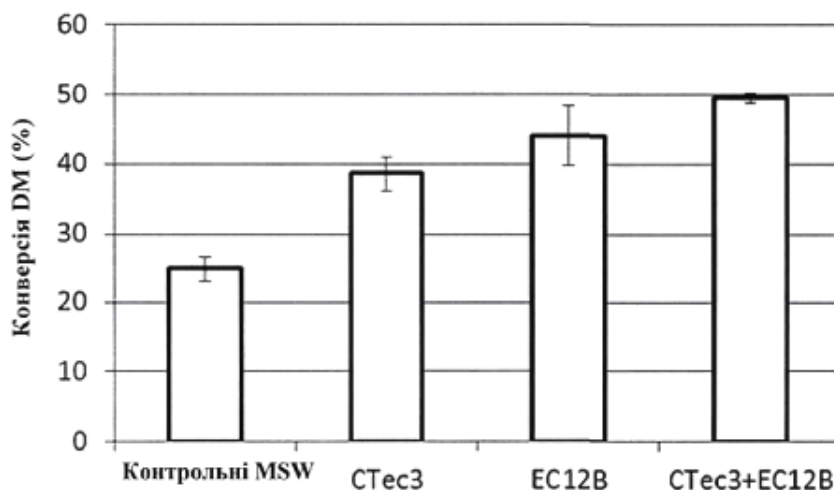
1. Спосіб переробки сортованих твердих побутових відходів (MSW) або несорттованих MSW, який включає етапи:

(i) ферментативного гідролізу частин сортованих MSW або несорттованих MSW, які біологічно розкладаються, із застосуванням речовини з целюлазною активністю паралельно з мікробіологічною ферментацією у температурному діапазоні 35-75 °С, причому зазначений ферментативний гідроліз приводить у результаті до зрідження частин відходів, які біологічно розкладаються, і накопичення мікробних метаболітів; з наступним

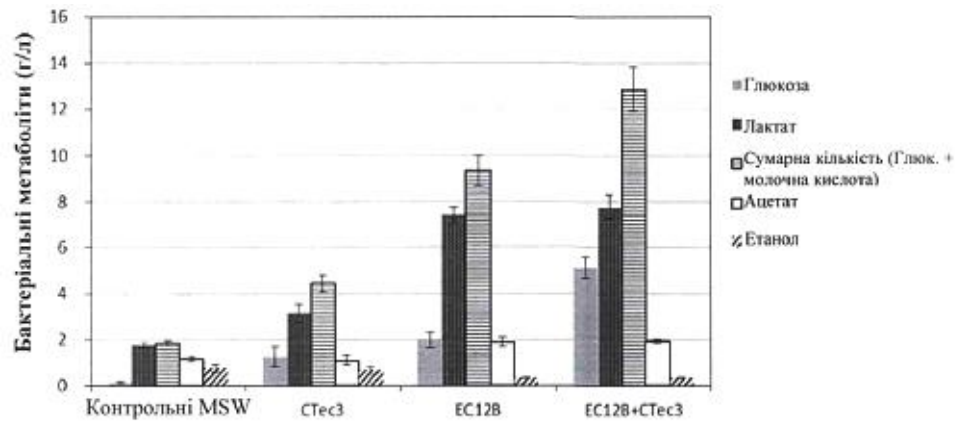
(ii) відокремленням зріджених частин відходів, які біологічно розкладаються, від твердих речовин, які біологічно не розкладаються, з отриманням біорідини, у якій щонайменше 40 % за масою від вмісту безводних речовин знаходяться у вигляді розчинених летких речовин, при цьому розчинені леткі речовини складають щонайменше 25 % за масою у вигляді будь-якої комбінації з ацетату, бутирату, етанолу, форміату, лактату та/або пропіонату; з наступним

(iii) анаеробним зброджуванням біорідини для одержання біометану, причому лактат присутній у більш високій концентрації за масою у порівнянні з будь-якою іншою окремою розчиною легкою речовиною, вибраною з групи, що складається з: ацетату, бутирату, етанолу, форміату та/або пропіонату;

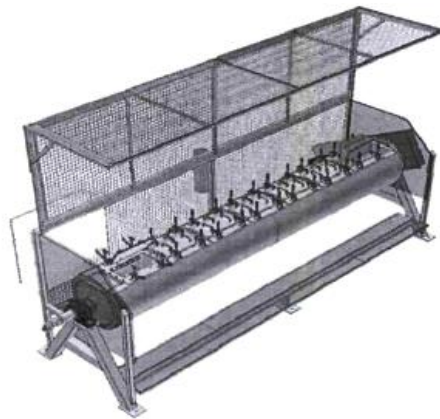
- 5 при цьому паралельна мікробіологічна ферментація включає інокуляцію MSW із застосуванням одного або декількох видів з групи, що включає молочнокислі бактерії, бактерії, що продукують ацетат, бактерії, що продукують пропіонат, бактерії, що продукують бутират, або бактерії, що зустрічаються в MSW в природних умовах, причому один або декілька видів бактерій, що використовують для інокуляції MSW, не продукують етанол як первинний продукт зазначеної паралельної ферментації.
- 10 2. Спосіб за п. 1, де відокремлення зріджених частин відходів, які біологічно розкладаються, від твердих речовин, які біологічно не розкладаються, забезпечують за допомогою щонайменше двох технологічних операцій розділення, достатніх для одержання біорідини, яка містить щонайменше 0,10 кг летких речовин на кг перероблених MSW.
- 15 3. Спосіб за п. 1 або за п. 2, де інокуляцію здійснюють шляхом рециркуляції промивних вод або технологічних розчинів, використовуваних для вилучення залишкового органічного матеріалу з твердих речовин, які не розкладаються.
4. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, де вміст безводних речовин в твердих побутових відходах становить від 10 до 45%.
- 20 5. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, де інокуляцію здійснюють перед або паралельно з додаванням речовин з ферментативною активністю або з додаванням мікроорганізмів, що проявляють позаклітинну целюлазну активність.
6. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, де речовину з целюлазною активністю додають (i) шляхом інокуляції вибраним мікроорганізмом, що проявляє позаклітинну целюлазну активність, та/або (ii) у вигляді препарату на основі виділених целюлаз.
- 25 7. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, де мікробіологічну ферментацію здійснюють шляхом інокуляції із застосуванням одного або декількох видів молочнокислих бактерій.
8. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, де ферментативний гідроліз і мікробіологічну ферментацію здійснюють у температурному діапазоні 45-50 °C.
- 30 9. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, де паралельні ферментативний гідроліз та мікробіологічну ферментацію здійснюють при рН менше 6,0.
10. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, де щонайменше 40 % за масою розчинених летких речовин біорідини містять лактат та/або біорідина має вміст розчиненого метану при 25 °C менше 15 мг/л.



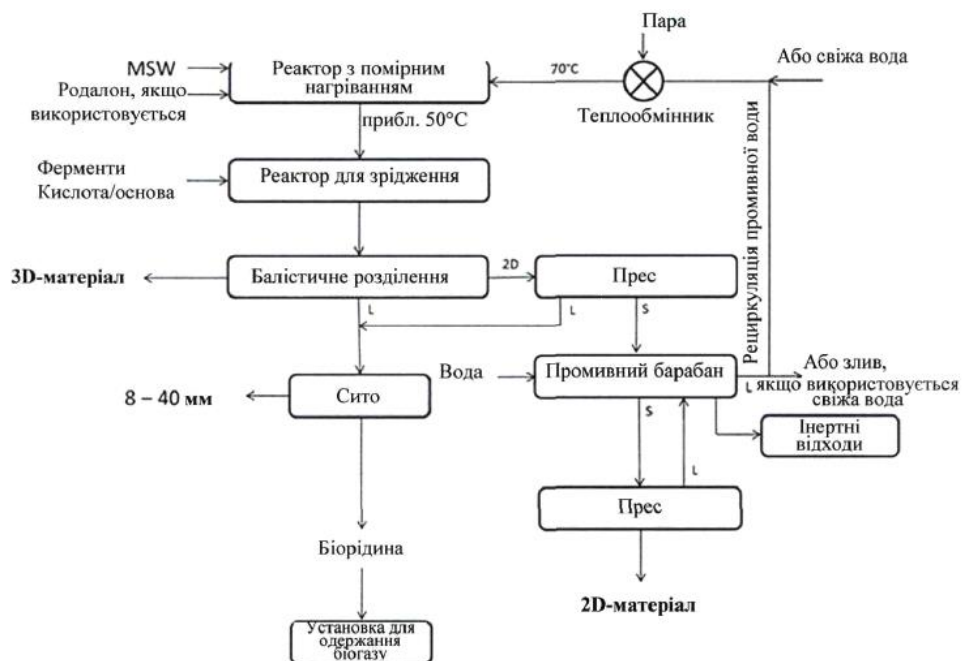
Фігура 1. Конверсія сухої речовини, вираженої у вигляді сухої речовини, одержаної в надосадовій рідині, у вигляді загального вмісту сухої речовини у відсотках при паралельному ферментативному гідролізі та мікробіологічній ферментації, стимульованих шляхом інокуляції біорідини EC12B із прикладу 5



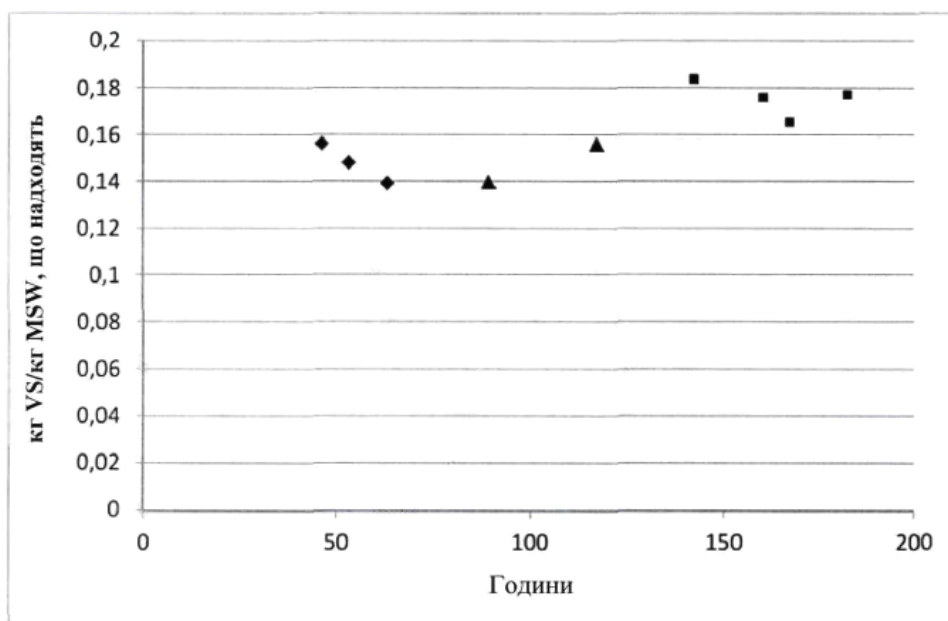
Фігура 2. Бактеріальні метаболіти, одержані в надосадовій рідині після паралельного ферментативного гідролізу та ферментації, індукованих шляхом додавання біорідини із прикладу 5



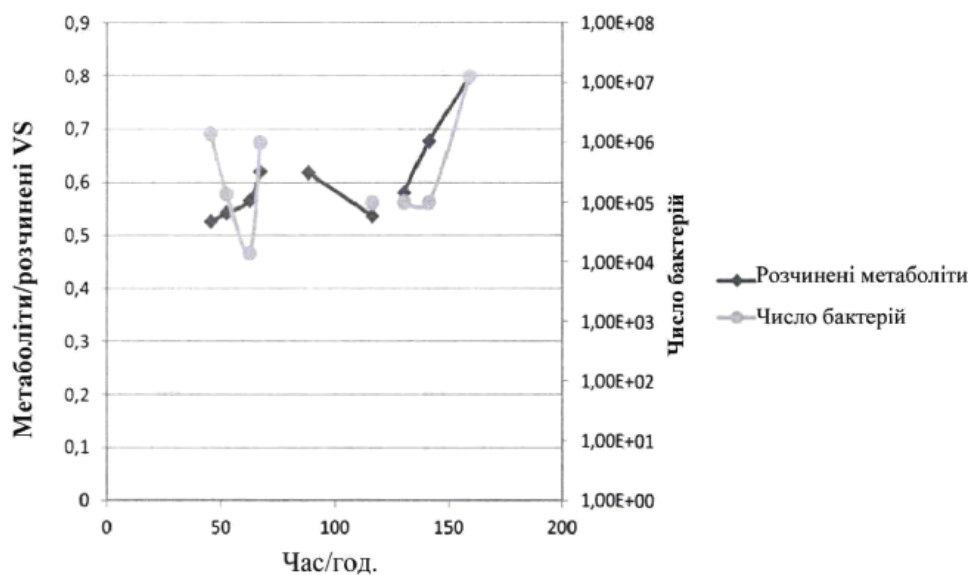
Фігура 3. Графічне представлення випробувального реактора REnaissance



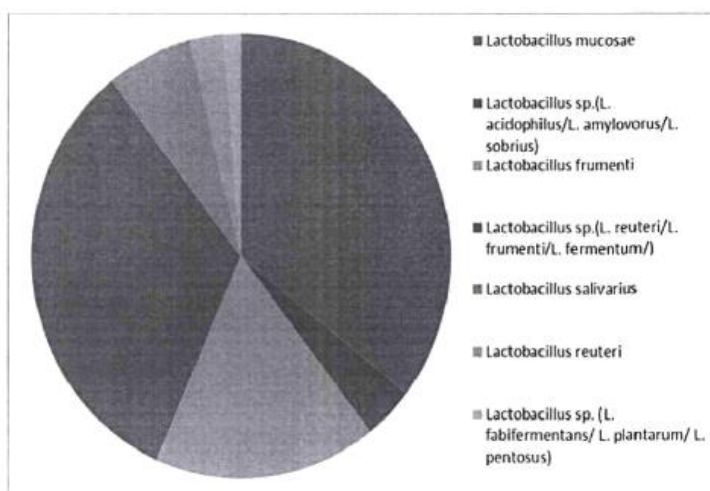
Фігура 4. Схематичне зображення демонстраційної установки



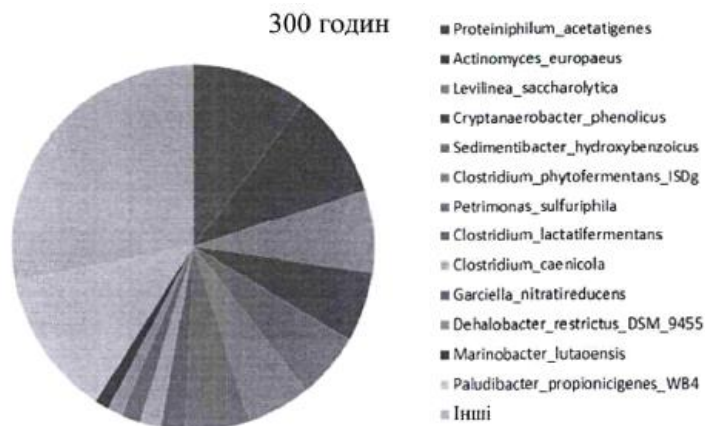
Фігура 5. Поглинання органічних речовин у біорідині в різні періоди часу, виражене в кг VS на кг перероблених MSW



Фігура 6. Бактеріальні метаболіти, виражені у вигляді відсотка розчинених VS у біорідині, а також у вигляді числа аеробних бактерій у різні моменти часу в експерименті



Фігура 7. Розподіл видів бактерій, ідентифікованих у біорідині із прикладу 3



Фігура 8. Розподіл 13 переважних бактерій в EC12B, зразки якої відбирали під час випробування, описаного в прикладі 5

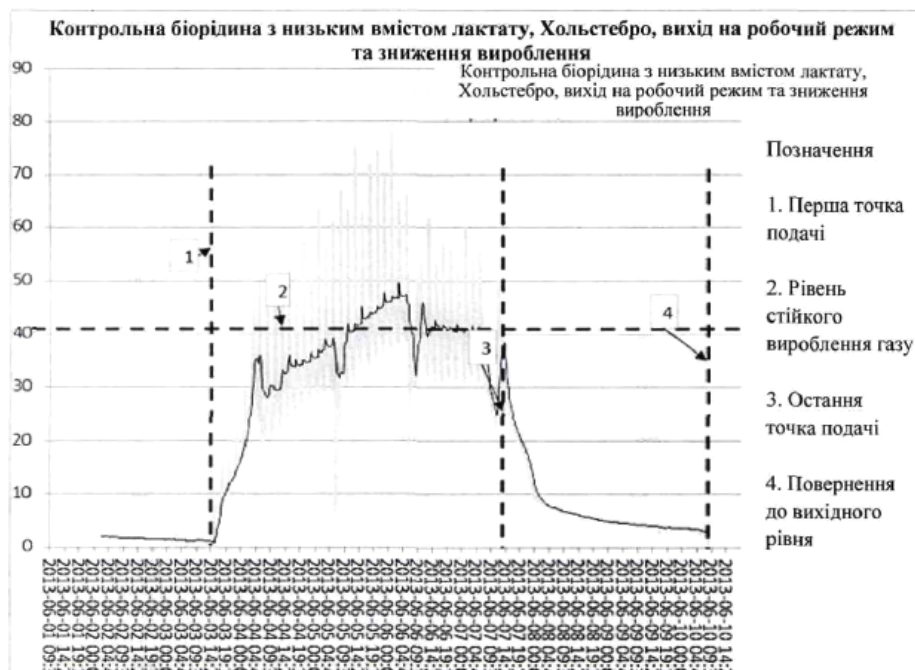


Фігура 9. Вихід на робочий режим та зниження вироблення біометану з використанням біорідини із прикладу 5



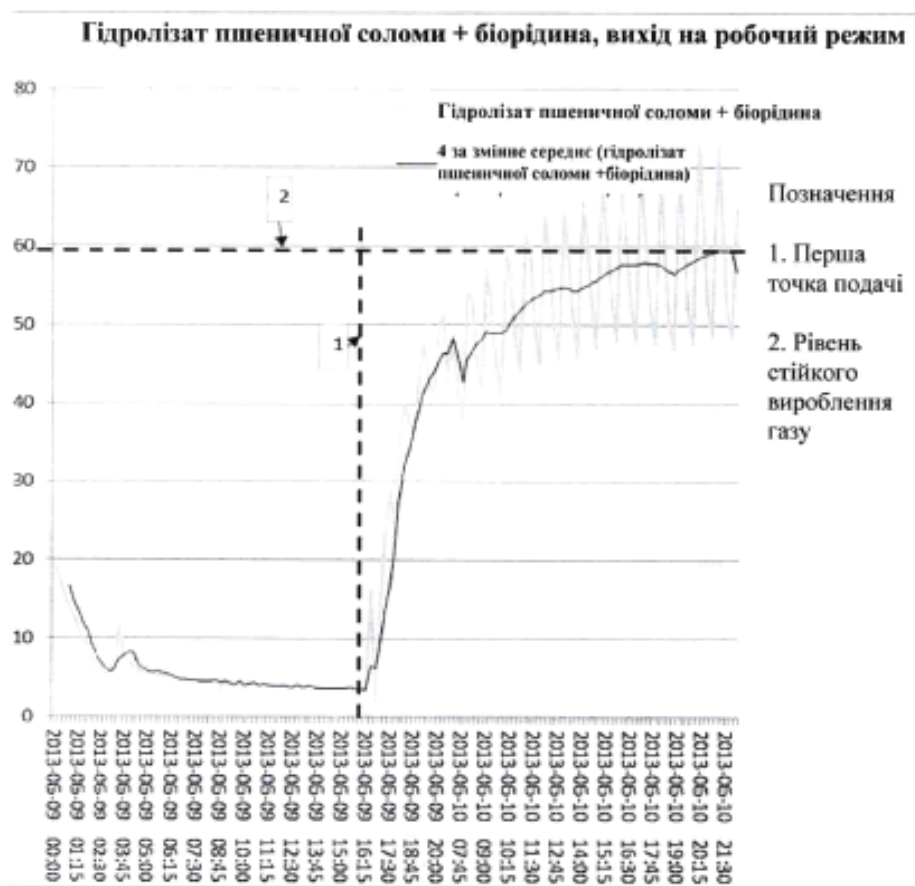


Фігура 10. Характеристика «виходу на робочий режим» і «зниження» вироблення біометану з біорідини «з високим вмістом лактату» із прикладу 2



Фігура 11. Характеристика «виходу на робочий режим» і «зниження» вироблення біометану з біорідини «з низьким вмістом лактату» із прикладу 2





Фігура 12 – показана характеристика «виходу на робочий режим» вироблення біометану з біорідина з гідролізованої пшеничної соломи

Комп'ютерна верстка С. Чулій

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601