



УКРАЇНА

(19) UA (11) 76117 (13) C2

(51) МПК (2006)

C12P 7/06 (2006.01)

C12M 1/04

C12N 1/18

C12R 1/145 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

C12R 1/02 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ СТАБІЛЬНОГО БЕЗПЕРЕРВНОГО ВИРОБЛЕННЯ ЕТАНОЛУ

1

(21) 2003021486

(22) 23.07.2001

(24) 17.07.2006

(86) PCT/US01/23149, 23.07.2001

(31) 60/220,794

(32) 25.07.2000

(33) US

(46) 17.07.2006, Бюл. № 7, 2006 р.

(72) Гадді Джеймз Л., US, Арора Дінеш К., US, Ко Чінг-Ван, US, Філліпс Джон Рандалл, US, Базу Рахул, US, Уїкстром Карл В., US, Клосен Едгар К., US

(73) ЕММАУС ФАУНДЕЙШН, ІНК., US

(56) US 5807722 A, 15.09.1998

WO 0068407 A, 16.11.2000

(57) 1. Спосіб стабільного безперервного вироблення етанолу шляхом анаеробної бактеріальної ферментації газоподібного субстрату, що включає: культивування в ферментаційному біореакторі бактерій *Clostridium ljungdahlii*, які здатні виробляти етанол, в рідкому поживному середовищі при рН близько 5,5 або менше; подачу в згаданий біореактор газоподібного субстрату, що містить монооксид вуглецю; подачу в згаданий біореактор пантотенату кальцію у кількості від близько 0,5 до 50 мг/г ваги сухих клітин бактерій, утворених в згаданому біореакторі; та підтримування питомої швидкості поглинання CO в згаданому біореакторі, щонайменш, 0,5 ммоль CO/г ваги сухих клітин бактерій за хвилину; при цьому вільна оцтова кислота утворюється в згаданому біореакторі при концентрації менше 5 г/л вільної кислоти, а етанол утворюється в згаданому біореакторі з продуктивністю більше 10г/л на день, причому етанол і ацетат виробляються в згаданому ферментаційному бульйоні в згаданому ферментаційному біореакторі в співвідношенні від 1:1 до 20:1 етанолу до ацетату.

2. Спосіб за п.1, в якому згаданий ферментаційний біореактор включає реактор росту, з якого згаданий ферментаційний бульйон подають у другий

2

ферментаційний біореактор, в якому виробляється основна частина згаданого етанолу.

3. Спосіб за п.1, який додатково включає етапи видалення згаданого ферментаційного бульйону зі згаданого біореактора, дистиляції етанолу зі згаданого бульйону і відведення згаданого етанолу.

4. Спосіб за п.3, який додатково включає етап рециркуляції води, що містить ацетат, відокремлюваної на згаданому етапі дистиляції, назад в згаданий ферментаційний біореактор.

5. Спосіб за п.1, в якому згадані *Clostridium ljungdahlii* вибирають зі штамів, що включають PETC, ERI2, O-52 та C-01.

6. Спосіб за п.1, в якому згаданий газоподібний субстрат вибирають з групи, що включає (а) монооксид вуглецю, (b) монооксид вуглецю і водень, та (с) монооксид вуглецю, діоксид вуглецю і водень.

7. Спосіб за п.1, в якому згаданий газоподібний субстрат додатково включає азот або метан.

8. Спосіб за п.1, що додатково включає зміну щонайменше одного з параметрів, вибраних з групи, що включає склад поживного середовища, швидкість подачі поживних речовин, швидкість подачі води, робочий тиск, робочу рН, склад газоподібного субстрату, швидкість подачі газу, швидкість перемішування ферментаційного бульйону, інгібування продуктом, щільність клітин, інгібування субстратом та їх комбінації.

9. Спосіб за п.8, що включає підвищення рН вище 4,5.

10. Спосіб за п.8, що включає періодичне очищення згаданого біореактора від згаданих бактеріальних клітин до отримання концентрації клітин нижче стабільної концентрації, при якій в згаданому біореакторі використовується весь газоподібний субстрат або поживне середовище.

11. Спосіб за п.8, який включає збільшення швидкості подачі води при перевищенні в згаданому ферментаційному бульйоні концентрації вільної оцтової кислоти, що міститься в ацетаті, значення 2 г/л для зменшення небажаного збільшення концентрації згаданої вільної оцтової кислоти.

(11) 76117 (13) C2
(19) UA

12. Спосіб за п.8, який включає зниження швидкості подачі згаданого газоподібного субстрату для ослаблення інгібування субстратом і підтримання згаданої продуктивності.

13. Спосіб за п.8, який включає зниження згаданої швидкості перемішування для ослаблення інгібування субстратом і підтримання згаданої продуктивності.

14. Спосіб за п.8, що включає подачу в згаданий біореактор згаданого газоподібного субстрату при швидкості від 0,3 до 2 ммоль СО/г сухих клітин бактерій в згаданому біореакторі за хвилину.

15. Спосіб за п.14, в якому кількість СО, присутня в згаданому біореакторі, перевищує кількість, що потрібна для підтримання стабільної концентрації згаданих бактерій, при якій буде повністю використаний присутній СО.

16. Спосіб за п.14, в якому згадана кількість СО, присутня в згаданому біореакторі, підтримує переважне вироблення етанолу в порівнянні з ацетатом.

17. Спосіб за п.14, в якому згадана швидкість складає від 0,5 до 1,5 ммоль СО/г сухих клітин бактерій в згаданому біореакторі за хвилину.

18. Спосіб за п.6, в якому згаданий газоподібний субстрат містить монооксид вуглецю, діоксид вуглецю та водень, причому присутній надлишок водню по відношенню до зазначених монооксиду вуглецю та діоксиду вуглецю, і де зазначений надлишок водню викликає вироблення згаданими бактеріями в згаданому ферментаційному бульйоні високого відношення етанолу до ацетату.

19. Спосіб за п.1, в якому згадана кількість пантотенату кальцію є меншою, ніж це потрібно для підтримання стабільної концентрації згаданих бактерій, при якій буде повністю використаний присутній пантотенат кальцію.

20. Спосіб за п.1, в якому при згаданій кількості пантотенату кальцію підтримується переважне вироблення етанолу відносно вироблення ацетату.

21. Спосіб за п.1, в якому згадана кількість пантотенату кальцію складає від 1 до 25 мкг пантотенату кальцію/г сухих клітин вироблених бактерій.

22. Спосіб за п.1, в якому згадана кількість пантотенату кальцію складає від 2 до 25 мкг пантотенату кальцію/г сухих клітин вироблених бактерій.

23. Спосіб за п.1, який додатково включає етап запобігання акліматизації згаданих бактерій в згаданому біореакторі до згаданої кількості пантотенату кальцію шляхом регулювання параметрів, вибраних з групи, що включає швидкість газу, швидкість рідини та швидкість перемішування.

24. Спосіб за п.8, в якому згадане поживне середовище додатково містить кобальт в кількості від 5 до 100 мкг/г сухих клітин бактерій, вироблених в згаданому біореакторі.

25. Спосіб за п.24, в якому згадана кількість кобальту менше, ніж потрібно для підтримання стабільної концентрації згаданих бактерій, при якій буде повністю використаний присутній кобальт.

26. Спосіб за п.24, в якому при згаданій кількості кобальту підтримується переважне вироблення етанолу в порівнянні з ацетатом.

27. Спосіб за п.24, в якому згадана кількість кобальту складає від 20 до 50 мкг кобальту/г сухих клітин вироблених бактерій.

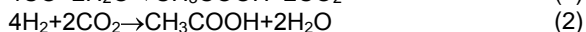
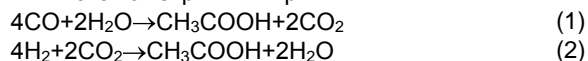
28. Спосіб за п.24, який додатково включає етап запобігання акліматизації згаданих бактерій в згаданому біореакторі до згаданої кількості кобальту шляхом підтримання постійної концентрації кобальту і регулювання параметрів, вибраних з групи, що включає швидкість газу, швидкість рідини, швидкість перемішування і парціальний тиск газоподібного водню.

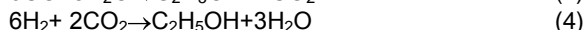
Даний винахід стосується вдосконалених способів мікробної ферментації для отримання етанолу з газоподібного субстрату, що містить щонайменше один відновний газ, з використанням анаеробних (або факультативних) ацетогенних бактерій.

Авторами цього винаходу попередньо були описані способи виробництва етанолу, в числі інших органічних кислот, спиртів, водню і солей органічних кислот, шляхом мікробної ферментації газоподібних субстратів у середовищі, яке містить поживні речовини і мікроелементи, з використанням певних анаеробних бактерій. Наприклад, автори описували введення розбавлених газових сумішей у біореактор, що містить один або декілька штамів анаеробних бактерій, які прямим шляхом використовують компоненти відпрацьованого газу з отриманням бажаної сполуки. Цю сполуку виділяють з водної фази в окремому резервуарі або резервуарах відповідним способом виділення цільового продукту. До способів виділення відно-

сяться, наприклад, екстракція, дистиляція або їх комбінації, а також інші ефективні способи виділення. Бактерії можна видаляти з водної фази і повертати в біореактор для підтримання високих концентрацій клітин і максимально високої продуктивності. Клітини відділяють, якщо це бажано, центрифугуванням, шляхом мембранної фільтрації або іншими способами. [Див., наприклад, міжнародну патентну заявку №WO98/00558, публ. 8 січня 1988; патент США №5,807,722; патент США №5,593,886 і патент США №5,821,111].

Крім основного продукту, яким є оцтова кислота, штамми анаеробної бактерії *Clostridium ljungdahlii* здатні також виробляти етанол у якості продукту перетворення монооксиду вуглецю (СО), водню (H₂) і діоксиду вуглецю (СО₂). Вироблення оцтової кислоти (CH₃COOH) і етанолу (C₂H₅OH) з СО, СО₂ і H₂ відбувається згідно з такими загальними стехіометричними рівняннями:





До штамів *C. ljungdahliae* відносяться, наприклад, штам PETC [патент США №5,173,429], штам ER12 [патент США №5,593,886] і штами C-01 і 0-52 [патент США №6,136,577]. Все ці штами депоновані в American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 під інвентарними номерами 55383 (раніше ATCC №49587), 55380, 55988 і 55989, відповідно. Кожний з штамів *C. ljungdahliae* є анаеробною грам-позитивною бактерією з гуаніновим і цитозиновим (G+C) нуклеотидним вмістом близько 22мольних%. Для росту ці бактерії використовують різноманітні субстрати, за винятком метанолу або лактату. Ці штами відрізняються один від одного СО-толерантністю, питомими швидкостями поглинання газу і питомою продуктивністю. У "диких" штамів, що зустрічаються в природі, відмічений надто низький рівень вироблення етанолу. Штами *C. ljungdahliae* в "дикому" стані відмінно функціонують при 37°C і звичайно виробляють етанол і ацетил (що включає і вільну, або молекулярну, оцтову кислоту, і її солі) у співвідношенні близько 1:20 (1 частина етанолу на 20 частин ацетилю). Концентрації етанолу звичайно становлять лише 1-2г/л. Хоча ця здатність виробляти етанол і представляє інтерес, однак через низьку продуктивність "дикі" бактерії не можуть бути використані для економічного виробництва етанолу в промисловому масштабі.

При невеликих удосконаленнях живильного середовища вищезазначені штами *C. ljungdahliae* були використані для виробництва етанолу і ацетилю зі співвідношенням продуктів 1:1 (рівні частини етанолу і ацетилю), однак концентрація етанолу складала менш 10г/л, внаслідок чого продуктивність не перевищувала 10г/л в день. Крім того, існують проблеми зі стабільністю культури, головним чином через відносно високу (8-10г/л) концентрацію ацетилю (2,5-3г/л молекулярної оцтової кислоти) в присутності етанолу. Більш того, оскільки для збільшення вироблення етанолу збільшується вміст газу, то відбувається інгібування культури, спочатку молекулярною оцтовою кислотою, а потім СО. В результаті культура стає нестабільною, втрачає здатність поглинати газ і виробляти додатковий продукт. Далі, в попередній роботі авторів показана складність вироблення етанолу і ацетилю в співвідношенні більше 2:1 при роботі бактерій в сталому стані. [Див., наприклад, Klasson et al., 1990 Applied Biochemistry and Biotechnology, Proceedings of the 11th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 24/25: 857; Phillips et al., 1993 Applied Biochemistry and Biotechnology, Proceedings of the 14th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 39/40: 559, та ін].

У багатьох джерелах описана ферментація цукру анаеробними бактеріями, які відрізняються від *C. ljungdahliae* і не споживають СО, СО₂ і Н₂ для вироблення розчинників. Були зроблені спроби отримати високий вихід етанолу шляхом зміни таких різноманітних параметрів, як типи поживних речовин, мікроорганізми, специфічне додання відновних агентів, варіювання рН і додання екзогенних газів. [Див., наприклад, Rothstein et al., 1986 J.Bacteriol., 165(1):319-320; Lovitt et al., 1988

J.Bacteriol., 770(6):2809; Taherzadeh et al., 1996 Appl. Microbiol. Biotechnol., 46:176].

Таким чином, в даній області техніки залишається актуальною задача вирішення проблеми використання промислових газоподібних субстратів, можливості отримання істотної вигоди від використання таких газів, зокрема, таких відпрацьованих газів, як Н₂, СО і СО₂. Існує також задача збільшення вироблення і етанолу відносно вироблення інших продуктів, які звичайно отримуються ферментацією таких газів ацетогенними бактеріями.

Відповідно до вказаної вище задачі, цей винахід стосується нових способів безперервної дії, які є стійкими і забезпечують отримання етанолу з концентрацією більше 10г/л при концентрації ацетату менше ~8-10г/л, з одночасним підтриманням росту культури і її доброї стабільності.

У першому аспекті винахід стосується стабільного способу безперервного вироблення етанолу шляхом анаеробної бактеріальної ферментації газоподібного субстрату. Спосіб включає етапи культивування в ферментаційному біореакторі анаеробних, ацетогенних бактерій в рідкому живильному середовищі і подачу в біореактор газоподібного субстрату, який містить щонайменше один відновний газ, вибраний з групи, що включає СО і Н₂. Бактерії в біореакторі піддаються впливу шляхом зниження окисно-відновного потенціалу або збільшення відношення NAD(P)H до NAD(P) в ферментаційному бульйоні після досягнення бактеріями сталого стану, наприклад, стабільної концентрації клітин в біореакторі. Концентрацію вільної оцтової кислоти в біореакторі підтримують на рівні менше 5г/л. Етапи культивування і впливу забезпечують вироблення бактеріями в біореакторі етанолу в ферментаційному бульйоні з продуктивністю більше 10г/л на день. Етанол і ацетат виробляються в ферментаційному бульйоні в співвідношенні від 1:1 до 20:1.

У одному з варіантів здійснення цього способу вплив включає один або декілька наступних етапів: зміна щонайменше одного параметра, вибраного з групи, що включає склад живильного середовища, швидкість подачі поживних речовин, швидкість подачі води, робочий тиск, робоча рН, склад газоподібного субстрату, швидкість подачі газу, швидкість перемішування ферментаційного бульйону, інгібування продуктом, щільність клітин і інгібування субстратом.

У іншому варіанті здійснення цього способу вплив включає подачу в згаданий біореактор згаданого газоподібного субстрату, що містить відновний газ СО, при заданій швидкості поглинання. Ця швидкість переважно складає від 0,3 до 2ммоль СО/грам сухих клітин бактерій в згаданому біореакторі за хвилину.

У наступному варіанті здійснення цього способу вплив включає подачу в згаданий ферментаційний біореактор згаданого живильного середовища, що містить обмежену кількість пантотенату кальцію. Пантотенат кальцію переважно міститься в кількості від 0,5 до 50мкг/г сухих клітин бактерій, що виробляються в біореакторі.

У наступному варіанті здійснення способу використовують подачу надлишку відновного газу Н₂

в згаданий біореактор до подачі обмеженої кількості пантотенату кальцію.

У наступному аспекті винахід стосується способу, в якому етап впливу включає подачу в згаданий ферментаційний біореактор згаданого живильного середовища, що містить обмежену кількість кобальту. Кобальт переважно міститься в кількості від 5 до 100мкг/г сухих клітин бактерій, що виробляються в згаданому біореакторі.

У наступному варіанті здійснення спосіб за винаходом включає запобігання акліматизації згаданих бактерій в згаданому біореакторі до згаданої кількості кобальту шляхом підтримання постійної концентрації кобальту і регулювання одного або декількох параметрів, таких як швидкість газу, швидкість рідини, швидкість перемішування і парціальний тиск газоподібного H_2 .

Додаткові необов'язкові етапи цих способів включають центрифугування зразка бульйону для видалення клітин і контролю підтримання співвідношення і/або продуктивності методом газової хроматографії.

У наступному варіанті здійснення спосіб включає подачу у якості газоподібного субстрату деякої кількості H_2 при невеликому перевищенні стехіометричної кількості, що потрібна для вироблення етанолу.

У наступному варіанті здійснення газоподібний субстрат додатково містить CO при невеликому перевищенні кількості, потрібної бактеріям, при цьому поглинання бактеріями водню інгібується, і відношення $NAD(P)H$ до $NAD(P)$ в бульйоні збільшується.

У наступному варіанті здійснення способу передбачено етап, на якому інгібування молекулярною оцтовою кислотою знижують шляхом збільшення швидкості подачі води, коли молекулярна оцтова кислота, присутня в ферментаційному бульйоні, досягає або перевищує концентрацію 2г/л.

У наступному варіанті здійснення способу етап впливу може включати перемішування середовища, бактерій і газоподібного субстрату в біореакторі із заданою швидкістю перемішування. Наприклад, зниження швидкості перемішування знижує кількість CO , що переноситься в ферментаційний бульйон. При такій зниженій швидкості перенесення CO відбувається збільшення перетворення H_2 , внаслідок чого кількість відновного газу H_2 в біореакторі перевищує кількість, потрібну для росту бактерій. Подібним чином, також може бути знижена швидкість газу для зменшення кількості CO , що переноситься, за рахунок чого збільшується перетворення H_2 , внаслідок чого відновний газ H_2 присутній в ферментаційному біореакторі в надлишку порівняно з необхідною для росту бактерій кількістю.

У наступному варіанті здійснення способу концентрація клітин бактеріальної культури в біореакторі на початковій стадії може бути доведена до бажаної перед тим, як обмежують концентрацію пантотенату кальцію або кобальту в живильному середовищі.

У наступному варіанті здійснення способу за винаходом використовують двоступеневий біореактор CSTR, який включає реактор росту, з якого ферментаційний бульйон подають в реактор ви-

робництва, в якому виробляється основна частина етанолу.

У наступному аспекті винаходу спосіб, описаний вище, включає необов'язкові етапи виділення етанолу шляхом видалення ферментаційного бульйону з біореактора, дистиляції етанолу з бульйону і відбір етанолу. Додатково або переважно, зразок бульйону піддають центрифугуванню для видалення клітин і за допомогою газової хроматографії контролюють підтримання співвідношення.

У наступному аспекті спосіб за винаходом може додатково включати етап рециркуляції води (що містить до 5г/л ацетилю) з реактора дистиляції етанолу назад в реактор для того, щоб в реакторі встановилася рівновага між етанолом і ацетилом. Внаслідок цього для вироблення етанолу використовується більша кількість CO , CO_2 і H_2 , що подаються в реактор і перетворюються в продукти.

Інші аспекти і переваги цього винаходу описані нижче в докладному описі переважних варіантів його здійснення.

На Фіг.1 представлена принципова схема способу безперервної ферментації з виділенням продукту за винаходом. Газоподібний субстрат 1 і рідку живильне середовище 2 подають в біореактор 3, в якому міститься відповідна бактеріальна культура. Перетворення газоподібного субстрату в етанол і оцтову кислоту здійснюється в біореакторі 3. Відхідний газ 4, що містить такі гази, як неперетворені CO , CO_2 і H_2 та інші гази, виводиться з біореактора 3, і його використовують у якості палива або спалюють в факелі. Якщо застосовується Рециркуляція клітин, тоді рідкий ефлюент 5 направляють у сепаратор клітин 6, де клітини 7 відділяють від пермеату 8. Клітини 7 направляють назад в біореактор 3, а пермеат 8 направляють на виділення продукту. Етанол може бути виділений з пермеату 8 (або, в альтернативі, з ефлюенту 5, якщо сепарація клітин не використовується). Пермеат 8 розділяють в дистиляційній колоні 9 з отриманням дистилятного 95%-го етанолу 10 і кубової води 11, яку направляють назад в біореактор 3. Дистилятний 95%-ний етанол 10 пропускають через молекулярне сито 12, де цільовий кінцевий продукт у вигляді безводного етанолу 13 відокремлюють від розбавленого етанолу 14, який направляють назад в дистиляційну колону 9.

На Фіг.2 представлена принципова схема двоступеневої системи реакторів CSTR з безперервним перемішуванням (CSTR - Continuous Stirred Tank Reactor) для більш високої стабільності культури. На стадію росту CSTR 1 подають рідке середовище 2. Неперетворений газ 3 зі стадії виробництва CSTR 4 подають на стадію росту CSTR 1. На стадію виробництва CSTR 4 веде лінія подачі свіжого газу 5, лінія подачі свіжого середовища 6, а також лінія подачі культури 7 зі стадії росту CSTR 1. Рециркуляція клітин 8 використовується для отримання максимального вироблення від клітин 9, що направляються на стадію виробництва CSTR 4. Клітини 9 не повертаються на стадію росту CSTR 1. Рідкий продукт 10, який складається з розчину етанолу в ферментаційному бульйоні, направляють на дистиляцію, де з нього виділяють цільовий продукт у вигляді безводного етанолу, як це показано на Фіг.1.

Даний винахід включає способи анаеробної ферментації газоподібних субстратів, що містять щонайменше один відновний газ, зокрема, газоподібні компоненти промислових відходів і синтез-гази (наприклад, CO, CO₂ і H₂), в етанол. Ці способи забезпечують отримання етанолу з продуктивністю більше 10г/л в день шляхом впливу з використанням біологічних процесів відповідних бактерій. Один зі способів за винаходом спричиняє утворення надлишку NAD(P)H над NAD(P). Окиснення NAD(P)H в NAD(P) приводить до відновлення оцтової кислоти, що виробляється культурою, в етанол. В альтернативі, один зі способів вироблення високих концентрацій етанолу шляхом анаеробної ферментації за винаходом включає зниження окисно-відновного потенціалу ферментаційного бульйону і, таким чином, відновлення оцтової кислоти в етанол. Способи за винаходом забезпечують високі концентрації етанолу (більше ~10г/л, переважно більше ~15г/л) і низькі концентрації ацетату (менше ~5г/л вільної оцтової кислоти в біореакторі). У цих способах також здійснюється ефективне управління параметрами технологічного процесу, які потрібні для безперервного вироблення етанолу і оцтової кислоти, і забезпечується швидке відновлення системи при збоях технологічного процесу. Крім того, способи за винаходом допомагають запобігти акліматизації культури до низької концентрації поживних речовин, згубної для продуктивності культури. Даним винаходом забезпечується надійний промисловий спосіб виробництва етанолу.

І. Визначення

Якщо не вказано інше, то перелічені нижче терміни, що використовуються в даному описі, мають такі визначення.

Вираз "спосіб безперервної дії" стосується способу ферментації, який включає безперервні процеси подачі живильного середовища, подачі субстрату, продукування клітин в біореакторі, видалення клітин (або очищення) з біореактора і видалення продукту. Ці безперервні процеси подачі, видалення або продукування клітин можуть здійснюватися в одному або в різних потоках. Безперервний процес забезпечує досягнення сталого стану всередині біореактора. Під "сталим станом" слід розуміти, що всі ці змінні величини, які можуть бути виміряні (швидкості подачі, концентрації субстрату і живильного середовища, що підтримуються в біореакторі, концентрація клітин в біореакторі і швидкість видалення клітин з біореактора, швидкість видалення продукту з біореактора, а також параметри середовища типу температури і тиску) залишаються постійними у часі.

Вираз "газоподібний субстрат" означає тільки CO, або суміш CO і H₂, або суміш CO₂ і H₂, або суміш CO, CO₂ і H₂, можливо, змішані з іншими елементами або сполуками, включаючи азот і метан в газоподібному стані. Такі газоподібні субстрати містять гази або потоки, які звичайно випускають або викидають безпосередньо в атмосферу або спалюють. У деяких варіантах здійснення цього способу газоподібний субстрат містить CO. У інших варіантах здійснення цього способу газоподібний субстрат містить CO₂ і H₂. У деяких варіантах здійснення газоподібний суб-

страт містить CO і H₂. У найбільш переважному варіанті здійснення газоподібний субстрат містить CO, CO₂ і H₂. Інші субстрати за винаходом можуть включати згадані вище компоненти і, щонайменше, один такий газ, як азот, CO₂, етан або метан. Таким чином, ці субстрати містять те, що звичайно називають "синтез-газ", який утворюється при газифікації вуглецевих продуктів (включаючи метан), а також відпрацьовані гази різних промислових виробництв.

Вираз "відновний газ" стосується CO або H₂, або обох цих газів. Вираз "кількість відновного газу" більша, ніж потрібно для росту бактерій" означає таку кількість відновного газу, яка перевищує кількість, яку бактерії можуть використати для росту або метаболізму при даних інгредієнтах живильного середовища. Ця кількість може бути досягнута шляхом збільшення загальної кількості відновного газу, або шляхом зниження концентрації ключових поживних речовин, внаслідок чого надлишкова кількість газу досягається без збільшення подачі газу, або шляхом збільшення швидкості доставки газу до бактерій. Коли бактерії зазнають впливу більшої кількості відновного газу, ніж потрібно для росту, вони реагують збільшенням вироблення етанолу.

Вираз "відповідні бактерії" означає ацетогенні анаеробні (або факультативні) бактерії, які здатні перетворювати CO і воду або H₂ і CO₂ в етанол і оцтову кислоту. Корисні бактерії за винаходом включають, але не обмежені, штамми *Acetogenium kivui*, *Acetobacterium woodii*, *Acetoanaerobium noterae*, *Clostridium acetium*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *C. acetobutylicum*, *C. thermoaceticum*, *Eubacterium limosum*, *C. ljungdahlii* PETC, *C. ljungdahlii* ERI2, *C. ljungdahlii* C-01, *C. ljungdahlii* O-52 і *Peptostreptococcus productus*. Фахівцями в цій області можуть бути вибрані інші ацетогенні анаеробні бактерії для використання в цих способах.

Під "змішаними штамми" слід розуміти змішану культуру з двох або більш відповідних бактерій. Такі "змішані штамми" перелічених вище бактерій можуть бути використані в способах за винаходом.

Терміни "біореактор", "реактор" або "ферментаційний біореактор" означають ферментаційний пристрій, який складається з одного або більше резервуарів і/або колон або системи трубопроводів, який включає бак-реактор з безперервним перемішуванням CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor), реактор для іммобілізованих клітин ICR (Immobilized Cell Reactor), реактор з шаром струйної течії рідини TBR (Trickle Bed Reactor), барботажну колону, газліфтний ферментер, статичну мішалку або інший пристрій, придатний для створення газорідного контакту. У способі за винаходом переважно, щоб ферментаційний біореактор містив реактор росту, з якого ферментаційний бульйон поступає у другий ферментаційний біореактор, в якому виробляється основна частина продукту - етанолу.

Вираз "живильне середовище" тут використовується загалом для позначення звичайного середовища для бактеріального росту, яке містить вітаміни і мінерали в достатній для росту вибраних

відповідних бактерій кількості. Цукор в це середовище не входить. Компоненти різноманітних живильних середовищ, придатні для використання в цьому винаході, відомі і описані в попередніх публікаціях, включаючи публікації авторів цього винаходу. Див., наприклад, склади живильних середовищ, описані [в міжнародній патентній заявці №WO98/00558, патенті США №5,807,722, патенті США №5,593,886 і патенті США №5,821,111], а також в перелічених вище публікаціях. Типове лабораторне живильне середовище для виробництва ацетату з CO, CO₂ і H₂ за винаходом містить 0,9мг/л пантотенату кальцію, тоді як відоме типове лабораторне живильне середовище для виробництва етанолу з CO, CO₂ і H₂ містить 0,02мг/л пантотенату кальцію.

Вираз "обмежувачий субстрат" або "обмежуюча поживна речовина" означає речовину живильного середовища або газоподібного субстрату, яка під час росту бактеріальної культури в біореакторі вичерпується культурою до рівня, при якому вже не підтримується сталий стан або стабільний бактеріальний ріст в біореакторі. Таким чином, всі інші речовини в живильному середовищі або газоподібному субстраті присутні в надлишку і є "необмежуваними". Ознака обмеження полягає в тому, що збільшення швидкості додавання в культуру обмежувачого субстрату, тобто, швидкості подачі поживної речовини або швидкості подачі газу, спричиняє відповідне збільшення швидкості поглинання газу (ммоль газу в хвилину) внаслідок збільшення щільності клітин.

Якщо не вказано інше, то вираз "ацетат" використовується для позначення суміші молекулярної або вільної оцтової кислоти і її солей, присутньої в ферментаційному бульйоні. Співвідношення молекулярної оцтової кислоти і ацетату залежить від рН системи: що нижче рН при постійній концентрації "ацетату", то вище концентрація молекулярної оцтової кислоти відносно її солей.

Вираз "концентрація клітин" в даному описі означає кількість бактерій в сухій вазі на літр зразка. Концентрація клітин вимірюється прямим вимірюванням або шляхом обчислення з вимірювань оптичної густини.

Вираз "природний стан" означає будь-яку сполуку, елемент або середовище, де не містяться додаткові електрони або протони до присутніх звичайно. І навпаки, вираз "відновлений стан" означає будь-яку сполуку, елемент або середовище, де є один або декілька електронів у надлишку. "Відновлений стан" досягається шляхом додавання одного або більше електронів до "природного стану" і зниження окисно-відновного потенціалу ферментаційного бульйону.

"Продуктивність вироблення етанолу" означає об'ємну продуктивність, розраховану як відношення концентрації етанолу в сталому стані до тривалості утримання рідини (LRT) в системах безперервної дії, або відношення концентрації етанолу до часу, потрібного для отримання цієї концентрації в системах періодичної дії. Вираз "висока продуктивність вироблення етанолу" означає об'ємну продуктивність понад 10г/л в день.

Вираз "висока концентрація етанолу" означає більше ~10г/л, переважно більше 15г/л етанолу в

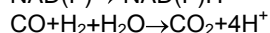
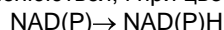
ферментаційному бульйоні, або співвідношення етанолу і ацетату 5:1 або більше.

"Надлишок H₂" присутній в стадії виробництва етанолу, коли відношення молей H₂ в газі, що подається, до суми подвоєної кількості молей перетвореного CO і потроєної кількості молей перетвореного CO₂ перевищує 1,0. Якщо це відношення менше 1,0, то надлишок H₂ відсутній, і етанол може бути вироблений тільки за допомогою іншого регулюючого механізму.

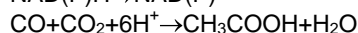
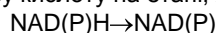
II. Біологічні процеси, що використовуються в способі за винаходом

Не претендуючи на створення теорії, автори зробили припущення, що способи збільшення анаеробного вироблення етанолу в технологічних процесах, описаних тут, засновані на біологічних процесах, що включають перетворення NAD(P)H в NAD(P) в основних циклах ацетогенного процесу автотрофного росту. Винахід включає такий вплив на ці процеси, який забезпечує можливість безперервного виробництва і підтримання високих концентрацій етанолу при низьких концентраціях ацетату в стабільних робочих умовах, що дозволяє реалізувати ефективно в промислових масштабах виробництво етанолу з промислових газів.

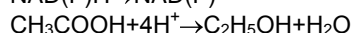
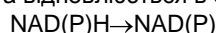
Суть перетворення NAD(P)H в NAD(P) в біологічних процесах описується таким чином. Вироблення етанолу з газоподібних компонентів, таких як CO, CO₂ і H₂, здійснюється біологічним шляхом в три етапи. На першому етапі субстрати CO і H₂ окиснюються, і при цьому вивільняється NAD(P)H:



Продукти етапу 1 потім перетворюються в оцтову кислоту на етапі, який потребує NAD(P)H:



Нарешті, якщо реакція етапу 1 здійснюється зі швидкістю більшою, ніж швидкість реакції етапу 2, і утворюється надлишок NAD(P)H, то оцтова кислота відновлюється в етанол:



Таким чином, наявність надлишку NAD(P)H внаслідок окиснення субстрату приводить до вироблення етанолу з оцтової кислоти.

Відомі два основні цикли в ацетогенному процесі: (1) цикл ацетил-CoA і (2) цикл THF, в якому CO₂ відновлюється в метильну групу. Послідовність подальшого вироблення етанолу і оцтової кислоти показана у J. R. Phillips et al, 1994 Applied Biochemistry and Biotechnology, 45/46:145. Цикл ацетил-CoA має внутрішній цикл, що називається тут СО-циклом. Оскільки СО-цикл звичайно відбувається за годинниковою стрілкою, то ферредоксин відновлюється. Ферредоксин, по мірі того як він окиснюється в реакції, що каталізується ферментом гідрогеназою, також може відновлюватися за допомогою H₂. У результаті цикл ацетил-CoA також відбувається за годинниковою стрілкою, і відбувається окиснення ферредоксину. Якщо внутрішній СО-цикл і цикл ацетил-CoA здійснюються з однаковою швидкістю, ферредоксин знаходиться в окисно-відновній рівновазі. Однак, якщо ці два цикли здійснюються з різними швидкостями, тобто, якщо СО-цикл відбувається з більшою швидкістю,

ніж цикл ацетил-СоА, то накопичується відновлений ферредоксин. Крім того, при надлишку H_2 відновлений ферредоксин також може вироблятися в надлишку. Цей надлишок відновленого ферредоксину викликає регенерацію (відновлення) $NAD(P)$ в $NAD(P)H$, надлишок якого, який накопичується, повинен бути знижений до рівноваги, в процесі чого оцтова кислота відновлюється в етанол.

Цикл THF має певне значення для клітинного росту і потрібний для процесу безперервного культивування, тому він не може бути повністю зупинений. Зниження швидкості циклу THF також підвищує відношення $NAD(P)H$ до $NAD(P)$. $NAD(P)H$ окиснюється в двох місцях. Шляхом обмеження цього окиснення, яке буде підтримувати загальне клітинне відношення $NAD(P)H$ до $NAD(P)$ в рівновазі, $NAD(P)H$ використовується для відновлення оцтової кислоти в етанол.

Другий основний спосіб відновлення оцтової кислоти в етанол складається в прямому зниженні окисно-відновного потенціалу ферментаційного бульйону. Відновлений стан, коли окисно-відновний потенціал істотно нижче, ніж в природному стані культури, зумовлює надлишок $NAD(P)H$ і сприяє відновленню оцтової кислоти в етанол.

III. Способи за винаходом

Основні етапи способу викладені далі. Спосіб безперервної ферментації з виділенням продукту описаний з посиланням на Фіг.1 і на основі приведеного нижче Прикладу 1. Безперервний потік газоподібного субстрату 1, що містить щонайменше один відновний газ, наприклад, CO або H_2 , із заданою швидкістю і безперервний потік рідкого живильного середовища 2 із заданою швидкістю подаються в ферментаційний біореактор 3, що містить відповідні бактерії. У біореакторі 3 середовище і газоподібний субстрат ферментуються бактеріями з утворенням етанолу і оцтової кислоти. Коли досягається стабільна концентрація клітин в умовах сталого стану, компоненти безперервного процесу піддають впливу, який знижує окисно-відновний потенціал або підвищує відношення $NAD(P)H$ до $NAD(P)$ в ферментаційному бульйоні. При цьому концентрація вільної оцтової кислоти в біореакторі підтримується на рівні менше 5г/л. Способи за винаходом забезпечують і підтримують вироблення етанолу і ацетату в ферментаційному бульйоні таким чином, щоб продуктивність вироблення етанолу складала більше 10г/л в день при співвідношенні етанолу і ацетату від 1:1 до 20:1. В одному з варіантів здійснення це співвідношення складає більше 3:1. У іншому варіанті здійснення це співвідношення складає більше 5:1. У третьому варіанті здійснення це співвідношення складає більше 10:1. У наступному варіанті здійснення це співвідношення складає більше 15:1. Спосіб за винаходом ефективний для забезпечення стабільного безперервного (здійснюваного в сталому стані) отримання з CO , CO_2 і H_2 високих концентрацій етанолу (15-35г/л етанолу) і низьких концентрацій ацетату (0-5г/л ацетату), а саме, при співвідношенні етанолу і ацетату 3:1 або більше, при добрій стабільності технологічного процесу.

Періодично в ході технологічного процесу за винаходом відбирають зразки бульйону для визначення співвідношення звичайним аналітичним

методом. Наприклад, клітини виділяють із зразка, зокрема, шляхом центрифугування, і потім аналізують вільний від клітин зразок, переважно методом газової хроматографії. Проте досвідченими фахівцями в цій області можуть бути вибрані і інші аналітичні методики. Додаткові необов'язкові етапи способу можуть бути введені для досягнення і/або підтримання потрібного співвідношення. У Прикладі 2 показаний такий метод аналізу.

Процес впливу на компоненти системи і підтримання і/або досягнення заданої продуктивності вироблення етанолу або співвідношення етанолу і ацетату включає щонайменше один, а переважно - комбінацію таких етапів: зміна складу живильного середовища, швидкості подачі живильного середовища, швидкості подачі води, робочого тиску, робочої рН, складу газоподібного субстрату, швидкості подачі газу, швидкості перемішування ферментаційного бульйону, етап запобігання інгібуванню продуктом, зниження щільності клітин в біореакторі або запобігання інгібуванню субстратом. Деякі переважні впливи включають подачу в біореактор рідкофазної обмежуючої поживної речовини (пантотенату або кобальту), створення невеликого надлишку CO і H_2 в газі, що подається, мінімізацію концентрації ацетату, запобігання акліматизації культури до низьких концентрацій поживних речовин в рідкій фазі, доведення культури до потрібної концентрації клітин з відносно високою швидкістю, підйом рН культури вище 4,5, очищення біореактора від бактеріальних клітин до отримання концентрації клітин нижче концентрації сталого стану, при якій використовується весь відновний газ або поживні субстрати в біореакторі, і збільшення швидкості подачі води в той момент, коли частина вільної оцтової кислоти в ацетаті, присутньому в ферментаційному бульйоні, перевищує 2г/л, за рахунок чого відвертається небажане збільшення концентрації вільної оцтової кислоти. Всі ці етапи детально описані нижче.

Відхідний газ 4, що містить не перероблені в реакторі CO , CO_2 і H_2 і інші гази, відводять з реактора через вентиляційні канали і використовують відповідно до їх теплотворної здатності. Якщо у якості контрольного показника використовують надлишок H_2 , то параметрами контролю співвідношення етанолу і ацетату на цьому етапі є парціальний тиск H_2 у відхідному газі і відношення парціального тиску H_2 до парціального тиску CO_2 у відхідному газі. Для збільшення концентрації клітин всередині біореактора і, таким чином, посилення біокаталізатора для перетворення CO , CO_2 і H_2 , може бути використана (але не обов'язково) рециркуляція клітин. У цьому випадку рідкий ефлюент з реактора 5 направляють у сепаратор клітин 6, де відбувається його розділення на клітини 7 і пермеат (рідину, що не містить клітин) 8. Клітини 7 направляють назад в біореактор 3, а пермеат 8 направляють на виділення продукту.

Клітини відокремлюють за допомогою центрифуги безперервної дії, фільтраційної системи на основі порожнистих волокон або спіральних фільтруючих елементів, керамічної фільтрувальної системи або іншого сепаратора рідин/твердих речовин. Етанол може бути виділений з пермеату (або, в альтернативі, ефлюенту з

реактора 5, якщо сепарація клітин не використовується) різними способами, включаючи дистиляцію і адсорбцію. Пермеат 8 розділяють в дистиляційній колоні з отриманням дистилятного 95%-го етанолу 10 і води 11, яку направляють назад в біореактор 3. Оборотно вода 11 містить поживні речовини, які не були використані при ферментації. Вітаміни, якщо вони були присутні після ферментації або клітинного лізису, в процесі термічної дистиляції руйнуються. Дистилятний 95%-й етанол 10 пропускають через молекулярне сито 12, де безводний етанол 13 - цільовий кінцевий продукт - відокремлюють від розбавленого етанолу 14, який направляють назад в дистиляційну колонію 9.

Безперервні і одночасні процеси росту, загибелі і видалення клітин забезпечують підтримання постійної концентрації клітин, внаслідок чого спосіб безперервної дії, що використовується у виробництві етанолу (і малих кількостей оцтової кислоти), може здійснюватися протягом багатьох місяців при подачі CO , CO_2 і H_2 і поживних речовин без поповнення культури. У способах за винаходом підтримуються і контролюються умови для безперервного виробництва етанолу і оцтової кислоти і відвертаються або швидко усуваються збої технологічного процесу. У способах за винаходом також відвертається згубна для продуктивності акліматизація культури до низької концентрації поживних речовин. У приведеному нижче описі і в прикладах, якщо не вказано інше, тиск дорівнює 1 атмосфері, а значення температури становить 36-41°C. Температури і тиски можуть бути задані досвідченим фахівцем в цій області в залежності від мікроорганізму, вибраного для використання в біореакторі.

Різноманітні впливи, детально описані нижче, які здійснюються в доповнення до основних етапів за винаходом, дозволяють збільшити вироблення етанолу. Переважно, обмеження рідкофазної поживної речовини (пантотенату або кобальту) або використання надлишку H_2 або CO є етапами способу за винаходом, які детально описані і які використовуються для досягнення і підтримання заданої продуктивності вироблення етанолу і забезпечення стабільних концентрацій і співвідношень етанолу і ацетату в ферментаційному бульйоні. У переважному варіанті здійснення відношення продуктів етанолу і ацетату, що виробляються в ферментаційному бульйоні, складає більше 10:1, а концентрація етанолу - більше 15г/л.

А. Обмеження пантотенатом кальцію

В одному з окремих варіантів здійснення даного винаходу вплив на біологічні процеси, який сприяє виробленню етанолу і обмежує вироблення оцтової кислоти, включає обмеження кількості пантотенату кальцію в поживному середовищі до величини, яка є меншою, ніж це потрібно для підтримання стабільної і сталої концентрації бактерій, при якій може бути повністю використаний присутній пантотенат кальцію. Пантотенат є компонентом циклу ацетил- CoA , і тому за рахунок дефіциту пантотенату кальцію в поживному середовищі швидкість циклу ацетил- CoA знижується відносно швидкості циклу CO . Це спричиняє накопичення відновленого ферредоксина і відновлення NAD(P) в

NAD(P)H , а отже, збільшує вироблення етанолу у якості кінцевого продукту.

Дефіцит пантотенату існує тоді, коли кількість пантотенату кальцію вміст, яка подається в реактор на 1г клітин (суха вага), що виробляються в реакторі, знаходиться в діапазоні від 0,5 до 100. Більш переважна дефіцитна кількість пантотенату лежить в діапазоні від 2 до 75мкг пантотенату кальцію на грам сухих клітин, що виробляються в реакторі. У іншому варіанті ця кількість складає близько 1-25мкг пантотенату кальцію на грам клітин, що виробляються в реакторі. У наступному варіанті ця кількість складає близько 10-30мкг пантотенату кальцію на грам клітин, що виробляються в реакторі. При такій кількості поживної речовини підтримується переважне вироблення етанолу в порівнянні з ацетатом. Один з варіантів цього способу показаний в Прикладі 4.

У іншому аспекті даного способу відвертається акліматизація бактерій в ферментаційному біореакторі до низької обмежуючої концентрації пантотенату кальцію за рахунок регулювання параметрів ферментації таким чином, що концентрація пантотенату кальцію залишається постійною, в той час як щонайменше один, а іноді декілька параметрів, таких як швидкість подачі газу, швидкість подачі рідини, швидкість перемішування або парціальний тиск H_2 , регулюється. Істотних змін концентрацій поживних речовин не відбувається, навпаки, зберігається відносно постійна концентрація живильного середовища. Якщо дозволити культурі акліматизуватися до низького вмісту рідкофазних обмежуючих поживних речовин, то утворюються несприятливі значення співвідношення продуктів - 1,0г етанолу/г ацетату або менше, і технологічний процес стає необоротним. У цьому випадку реактор припиняє роботу і потрібна реінукуляція. Переважно, біологічний процес контролюють з метою збільшення вироблення етанолу і обмеження вироблення оцтової кислоти так, щоб спочатку газ, що подається в біореактор, містив надлишок H_2 , а потім обмежують вміст пантотенату кальцію в живильному середовищі, як описано вище.

Фактично, при запуску системи обмежуюча рідкофазна поживна речовина пантотенат кальцію звичайно міститься в надлишку, що запобігає акліматизації до його низьких концентрацій, яка може привести до дуже низької продуктивності культури і втрати культури здатності забезпечувати високу продуктивність вироблення етанолу на рівні більше 10г/л в день, якщо надлишок H_2 не використовується. Приклад такого регулювання параметрів ферментації для конкретної бактеріальної культури показаний в Прикладі 17.

В. Обмеження кобальтом

У іншому варіанті здійснення цього винаходу вплив на біологічні процеси, який сприяє виробленню етанолу і обмежує вироблення оцтової кислоти, полягає в обмеженні кількості кобальту в живильному середовищі до величини, яка є меншою, ніж це потрібно для підтримання стабільної і сталої концентрації бактерій, при якій може бути повністю використаний присутній кобальт. Дефіцит кобальту існує тоді, коли кількість кобальту, що подається в реактор в мкг, на 1 грам клітин (суха вага), що виробляються в реакторі, знаходиться в

діапазоні від 5 до 100. Переважно, кількість кобальту обмежують значеннями від -20 до 50мкг кобальту в реакторі на грам клітин, що виробляються в реакторі. При цій кількості кобальту підтримується переважне вироблення етанолу в порівнянні з ацетатом. У Прикладі 18 показаний варіант способу обмеження кобальтом в реакторі відповідно до винаходу.

Дефіцит кобальту в ферментаційному бульйоні також може знижувати швидкість циклу ацетил-CoA. Оскільки кобальт використовується для перенесення метильної групи з циклу THF в цикл ацетил-CoA, то дефіцит кобальту в ферментаційному бульйоні також знижує функціонування циклу THF за рахунок обмеження перенесення. Дефіцит кобальту знижує швидкість циклу THF, що також спричиняє збільшення відношення NAD(P)H до NAD(P)⁺ і, отже, збільшення вироблення етанолу.

Спосіб додатково включає вплив, що запобігає акліматизації до низької обмежуючої концентрації кобальту. Найчастіше таким же чином, як у разі запобігання акліматизації до низької концентрації пантотенату кальцію, підтримується постійна концентрація кобальту при регулюванні одного або декількох параметрів ферментації (швидкості газу, швидкості рідини, швидкості перемішування, вмісту CO₂ і парціального тиску газоподібного H₂). Істотних змін концентрацій поживних речовин не відбувається, навпаки, підтримується відносно постійна концентрація живильного середовища. Приклад такого регулювання параметрів ферментації для конкретної бактеріальної культури показаний в Прикладі 19.

Переважає, для збільшення вироблення етанолу і обмеження вироблення оцтової кислоти, в біореактор спочатку подають надлишок H₂, а потім обмежують кобальт в живильному середовищі, як описано вище. При запуску системи обмежуючу рідкофазну поживну речовину кобальт підтримують в надлишку для запобігання акліматизації до його низьких концентрацій, яка може привести до дуже низької продуктивності культури і втрати здатності культури забезпечувати співвідношення продуктів вище, ніж 1:1.

С. Надлишкова подача водню

У іншому варіанті здійснення винаходу вплив на біологічні процеси, що сприяє виробленню етанолу і обмежує вироблення оцтової кислоти, полягає в надлишковому вмісті H₂ в газі, що подається, або обмеження газоподібного вуглецю, що приводить до надлишку H₂, який потім використовується в біологічному процесі. Переважно, відновний газ H₂ міститься в надлишку відносно CO, і цей надлишок зумовлює вироблення бактеріями продуктів з високим відношенням етанолу до ацетату в ферментаційному бульйоні. Якщо відношення H₂ (в молях газу, що подається) до суми подвоєної кількості перетвореного CO (в молях газу) і потроєної кількості молей перетвореного CO₂ більше 1, то ферментація буде обмежуватися вуглицем. Парціальний тиск H₂ у відхідному газі переважно складає більше 0,4атм. У кінцевому рахунку відношення парціального тиску H₂ до парціального тиску CO₂ повинно бути більше 3,0 для того, щоб кількість H₂ була гарантовано достатньою для використання всього CO₂. Якщо парціальний тиск

CO₂ перевищує 0,1атм., то, швидше за все, ріст був обмежений іншим впливом. Див. Приклад 20, що ілюструє цей етап способу.

Під час запуску використання надлишку H₂ є більш сприятливим, ніж обмеження поживними речовинами, головним чином тому, що його легше контролювати. Переваги використання надлишку H₂ полягають у тому, що це дозволяє запобігти надлишковому виробленню оцтової кислоти, що може привести до небажаних співвідношень продуктів і потенційного інгібування оцтовою кислотою, а також до акліматизації до низьких концентрацій поживних речовин.

Д. Надлишкова подача монооксиду вуглецю

Інший спосіб впливу на компоненти способу полягає в надлишковій подачі відновного газу CO в складі газоподібного субстрату з метою використання в процесі, який служить для прямого зниження окисно-відновного потенціалу ферментаційного бульйону. Відповідно до цього варіанту в біореактор подають газоподібний субстрат, що містить CO, при цьому кількість CO, присутнього в біореакторі, перевищує кількість, потрібну для підтримання сталої, стабільної концентрації бактерій, при якій може бути повністю використаний присутній CO. Пдача CO є надлишковою і служить для збільшення вироблення етанолу в порівнянні з виробленням оцтової кислоти тоді, коли питома швидкість поглинання CO (мілімолей CO на грам сухих клітин в реакторі за хвилину, або ммоль/г клітин·хв.) складає більше 0,3. Більш переважною є питома швидкість поглинання CO більше 0,5. Це означає, що в середньому кожна клітина використовує CO в своєму метаболізмі зі швидкістю щонайменше 0,3ммоль/г клітин·хв., бажано зі швидкістю щонайменше 0,5ммоль/г клітин·хв. Переважно, CO вводять зі швидкістю, при якій поглинання CO складає від 0,3 до 2ммоль CO/г сухих клітин бактерій за хвилину. Приклад 24 показує один з варіантів здійснення цього етапу способу.

Така швидкість поглинання CO підтримує переважне вироблення етанолу в порівнянні з оцтовою кислотою. Якщо CO подається таким чином, що кількість розчиненого CO в ферментаційному бульйоні буде значним за рахунок тиску газу або дуже доброго масопереносу, то ферментаційний бульйон буде відновлюватися сильніше. Надлишкова подача CO забезпечує дві додаткові переваги. Надлишок CO може обумовити функціонування CO-циклу в прискореному режимі, і, якщо цикл ацетил-CoA обмежений іншим способом і не може бути втриманий в рівновазі з циклом CO, то буде накопичуватися відновлений ферредоксин. CO може також сповільнювати етап 2 (вироблення проміжної оцтової кислоти) в загальному триступеневому процесі за рахунок інгібування субстратом. Ця знижена швидкість етапу 2 відносно етапу 1 обумовлює утворення надлишку NAD(P)H, що приводить до переважного вироблення етанолу порівняно з виробленням оцтової кислоти.

Хоч надлишок CO може привести до підвищеного вироблення етанолу за рахунок прямого зниження окисно-відновного потенціалу ферментаційного бульйону, однак присутність надлишку CO також інгібує ріст культури шляхом інгібування СО-дегідрогенази і, отже, поглинання H₂. Присутність

надлишку CO, на жаль, також приводить до погіршення перетворення H_2 , що може бути економічно несприятливим чинником. Наслідком тривалої роботи в умовах інгібування субстратом є погіршення поглинання H_2 . Зрештою це викликає лізис клітин і необхідність перезапуску реактора. Якщо відбувається ненавмисне інгібування субстратом (присутність дуже великої для клітин, що є кількості CO) під час первинного росту культури або після нього, то знижують швидкість подачі газу і/або перемішування, доки інгібування субстратом не ослабляється. Ілюстрація того, як регулюється швидкість газу або швидкість перемішування для здійснення цього ефекту, дана в Прикладі 21.

Е. Додаткові етапи впливу

На додаток до основних етапів поліпшення способу, описаних вище, спосіб виробництва етанолу містить ще декілька додаткових прийомів.

1. Збільшення масопереносу

Один з додаткових варіантів здійснення включає забезпечення більш швидкого масопереносу CO або H_2 з лінії подачі газу в рідкий ферментаційний бульйон у порівнянні зі здатністю бактерій використовувати розчинений газ. Наприклад, якщо в біореактор, що містить *C. ljungdahlii*, подається CO, CO_2 і H_2 , і біореактор працює без обмежень поживними речовинами (такими як пантотенат і кобальт) або без надлишку H_2 , ріст клітин обмежений кількістю газу, що переноситься в рідку фазу, і система виробляє у якості продукту оцтову кислоту. Якщо в культуру подається незначний надлишок CO або H_2 у порівнянні з необхідною для росту культури кількістю, то вона виробляє етанол. Проте, якщо в рідку фазу переноситься набагато більше газу, ніж може використати культура, відбувається інгібування субстратом, яке може привести до пошкодження культури і до загибелі клітин. Таким чином, існує дуже вузький діапазон, в якому можлива робота з надлишковим масопереносом. Приклад 22 ілюструє цей варіант.

Розглянемо знову цикл ацетил-CoA. Для того, щоб вироблявся надлишковий відновлений фередоксин, CO-цикл або відновлення фередоксина гідрогеназою повинно здійснюватися з більшою швидкістю, ніж цикл ацетил-CoA. В описаних тут способах обмежують швидкість, з якою мікроорганізми можуть використовувати розчинені гази, шляхом обмеження швидкості, з якою незамінні поживні речовини, наприклад, пантотенат кальцію або кобальт, або інші субстрати, такі як газоподібний CO_2 , подаються до бактерій, або шляхом подачі в культуру надлишку субстрату, H_2 або CO.

Може бути обчислена теоретична швидкість масопереносу, більша, ніж швидкість використання субстрату бактеріями, навіть без інших обмежень. Коли ця швидкість досягається, вона обмежується природною швидкістю росту організму. Тому найбільш продуктивним буде такий варіант здійснення, в якому масоперенос (швидкість течії газу або швидкість перемішування) перевищує швидкість, з якою максимально можлива концентрація клітин може використовувати субстрат без обмежень. Робочий діапазон буде дуже вузьким, оскільки інгібування субстратом може швидко викликати загибель клітин і утворення токсичної для культури концентрації побічного продукту.

2. Надлишкова подача CO і H_2

У іншому варіанті здійснення даного винаходу стабільно висока концентрація етанолу і обмежене вироблення оцтової кислоти досягається тоді, коли обмежені кобальт або пантотенат кальцію або забезпечений надлишок H_2 або CO. Відповідно до цього, оскільки культура використовує субстрат CO, H_2 і CO_2 у якості джерела вуглецю і енергії, CO і H_2 подають з невеликим надлишком. Невеликий надлишок CO і H_2 створюють шляхом встановлення сталого стану, а потім поступово підвищують швидкість подачі газу і/або швидкість перемішування (з 10% або меншими приростами), доки перетворення CO і H_2 не почне падати. Це дозволяє уникнути обмеження масопереносу, яке сприяє виробленню оцтової кислоти, і забезпечити надлишок відновленого фередоксина для відновлення NAD(P) в NAD(P)H і вироблення етанолу. Якщо CO і H_2 не подаються з невеликим надлишком, відбувається обмеження масопереносу, і біологічний процес урівноважується. Це приводить до небажаних співвідношень етанолу і ацетату (високих концентрацій ацетату). Високі концентрації ацетату можуть у кінцевому рахунку привести до інгібування оцтовою кислотою, яке обмежує здатність бактерії поглинати H_2 і зрештою приводить до загибелі культури.

Запобігання обмеженню масопереносу складається в збільшенні швидкості перемішування або швидкості газу для перенесення більшої кількості CO і H_2 в рідку фазу і, таким чином, знов виникає невеликий надлишок CO і H_2 . Якщо виникає інгібування продуктом внаслідок обмеження масопереносу, необхідно збільшити швидкість подачі рідини, щоб припинити інгібування оцтовою кислотою за рахунок розбавлення до більш низької концентрації ацетату. Оскільки при збільшенні швидкості подачі середовища буде збільшуватися кількістьмкг пантотенату або кобальту на 1 г клітин, що виробляються, це треба робити короткочасно або потрібно видалити надлишок пантотенату або кобальту за рахунок регулювання концентрації середовища або збільшення швидкості подачі води.

3. Контроль інгібування оцтовою кислотою, що виробляється

У описаних вище способах, якщо в біореакторі накопичується надто багато молекулярної оцтової кислоти (>2г/л), яка перешкоджає подальшому зростанню клітин і виробленню етанолу, то може статися інгібування оцтовою кислотою, що виробляється. Для запобігання пошкодженню культури використовують ще один вид впливу. Одна з модифікацій включає короткочасне збільшення швидкості подачі рідини або води для того, щоб знизити концентрацію інгібуючої оцтової кислоти в рідкій фазі до величини менше 2г/л. Опис цих варіантів для конкретної культури в реакторі приведений в Прикладі 23.

4. Рециркуляція води

Наступний необов'язковий прийом підтримання стабільної культури, яка виробляє етанол у якості єдиного продукту, без кінцевого вироблення оцтової кислоти, способи за винаходом включають додання оборотної води з процесу дистиляції назад в ферментаційний реактор (див., зокрема,

Приклад 5). Як зазначалося вище, рециркуляція води (що містить до 5г/л ацетату) забезпечує ту перевагу, що утворений ацетат повертається назад в реактор, і оцтова кислота у якості кінцевого продукту не виробляється. Таким чином, в реакторі встановлюється рівновага між етанолом і ацетатом. У результаті весь газ CO , CO_2 і H_2 , який подається в реактор і який перетворюється в продукти, використовується для вироблення етанолу, крім тієї частини, яка використовується для підтримання культури.

5. Зменшення щільності клітин

Наступний метод впливу, корисний в даному способі, складається в здійсненні періодичного або безперервного очищення біореактора від бактеріальних клітин для зниження концентрації клітин в біореакторі. Цей вплив спрямований на зменшення концентрації клітин до величини, меншої, ніж концентрація сталого стану, при якій використовується весь відновний газ або поживні субстрати в біореакторі. Таким чином, при зміні щільності клітин вироблення етанолу переважає над виробленням ацетату в біореакторі. Див., зокрема, Приклад 25.

6. Двоступенева система CSTR

Одна з проблем, пов'язаних з виробленням етанолу за допомогою обмеження середовища, полягає в здатності або схильності культури зрештою пристосовуватися до обмежуючих умов і припиняти вироблення етанолу через кілька місяців роботи. Замість етанолу домінуючим продуктом стає ацетат. Така акліматизація до низьких обмежуючих концентрацій поживної речовини приводить до розвитку культури, яка виробляє більше оцтової кислоти, ніж етанолу (співвідношення етанолу і ацетату 1,0 або менше) і в результаті дає низькі концентрації етанолу (іноді всього лише 1г/л). Адаптація, найвірогідніше, відбувається у випадку, коли культура не отримує достатньої кількості поживних речовин під час запуску, при якому швидкість росту має важливіше значення, ніж швидкість вироблення етанолу. Крім того, існує небезпека, що культура може акліматизуватися до низьких обмежуючих концентрацій при роботі в сталому стані, зокрема, коли концентрації обмежуючої поживної речовини знижуються для видалення ацетату з реакційної системи.

Для запобігання такій адаптації при використанні обмеження пантотенатом або кобальтом, описаного вище, може бути застосована інша модифікація способу. Двоступенева система CSTR, в якій на першій стадії здійснюється активний первинний ріст культури при невеликому надлишку обмежуючих поживних речовин (який, можливо, супроводжується виробленням оцтової кислоти), а на наступній стадії виробництва культура з першої стадії обмежується обмежуючою поживною речовиною і використовується для вироблення високих концентрацій етанолу, являє собою таку модифікацію способу. Ця модифікація дає можливість підтримувати стабільність культури, яка не акліматизується до знижених концентрацій пантотенату або кобальту. Така модифікація включає роботу двоступеневої системи CSTR, в якій реактор росту (стадія 1) живить реактор виробництва (стадія 2), де відбувається основне вироблення етанолу. У

реакторі росту не застосовуються обмеження поживних речовин, описані вище, внаслідок чого культура не схильна до акліматизації до обмеженого стану.

Принципова схема такої двоступеневої системи CSTR показана на Фіг.2, і далі опис містить посилання на цю фігуру. Відповідно до цього варіанту здійснення стадія росту відбувається при тривалості утримання рідини (LRT) близько 24 годин. Стадія росту CSTR 1 забезпечується достатньою кількістю пантотенату або кобальту в середовищі 2 з отриманням здорової культури (а також з можливим утворенням оцтової кислоти). Таким чином, в реакторі виробляється надлишок оцтової кислоти, але підвищується стабільність. Ця концентрація пантотенату або кобальту перевищує концентрацію, яка подавалася б в одиночний CSTR для виробництва етанолу. Газ, що подається в цей реактор, являє собою неперетворений газ 3 зі стадії виробництва 4, а рідина, що подається, являє собою свіже середовище 2. Стадія росту CSTR 1 працює без рециркуляції клітин. У реакторі стадії росту вирішується задача отримання свіжої культури для наступного виробництва етанолу, яка не акліматизується до низьких концентрацій пантотенату.

Реактор стадії виробництва 4 працює при номінальній LRT менше 20 годин. Цей CSTR з рециркуляцією клітин отримує живлення через лінію подачі свіжого газу 5 і може мати низькі ступені перетворення. Він також отримує живлення через лінію подачі свіжого середовища 6 і лінію подачі культури 7 зі стадії росту. У цей реактор подається мінімум пантотенату або кобальту, оскільки є надлишок зі стадії росту. Рециркуляція клітин 8 використовується в цьому реакторі для отримання максимального вироблення від клітин, що направляються назад в реактор 4. Кінцева концентрація етанолу в рідкому продукті 10 повинна перевищувати 20г/л. Особливості двоступеневих систем CSTR складаються в невеликих змінах, що стосуються акліматизації до низьких концентрацій пантотенату або кобальту, загальної LRT 30 годин, очікуваної підвищеної продуктивності вироблення етанолу і підвищеної концентрації етанолу в порівнянні з одиночним CSTR того ж розміру.

7. Модифікації при запуску

Інші етапи способу, які переважно використовуються при практичному застосуванні даного винаходу, включають продукування клітин під час первинного запуску ферментаційної культури. Запуск біореактора, що живиться CO , CO_2 і H_2 для вироблення етанолу і оцтової кислоти, виконують шляхом періодичної інокуляції з маточної культури (Приклад 11) або шляхом безперервної подачі посівного матеріалу з існуючого реактору у вигляді лінії подачі культури (Приклад 12). Як було зазначено вище в описі запобігання акліматизації культури до низьких концентрацій пантотенату або кобальту, найбільш переважно культуру доводять до високої концентрації клітин перед обмеженням поживних речовин і подачею в культуру надлишку H_2 . Такий швидкий запуск запобігає акліматизації культури і забезпечує добрі співвідношення продуктів (високі концентрації етанолу і низькі концентрації оцтової кислоти). Якщо швидкий запуск не

застосовується, то можуть виникати небажані співвідношення продуктів, і культура може акліматизуватися до низьких концентрацій рідкофазної поживної речовини, що приведе до необхідності реінюкації реактора.

Реактор запускають шляхом завантаження порції рідкої фази (рідке середовище спочатку не подається в реактор безперервно) при низьких швидкостях перемішування (можливо, 400-600об/хв в лабораторному реакторі New Brunswick Scientific Bioflo®) і при заданій pH. Таким чином, рідка фаза в реакторі містить порцію живильного середовища з вітамінами і солями, при номінальній концентрації обмежуючої поживної речовини, пантотенату кальцію або кобальту (наприклад, 20мкг/л пантотенату або 75млн⁻¹ кобальту). При використанні безперервної інокуляції з існуючого реактора завантаження порції рідкої фази може бути необов'язковим. В цьому випадку газ безперервно подають в реактор при первинному запуску з низькою швидкістю. В ідеалі газова фаза при запуску не повинна містити CO₂, повинна містити надлишок H₂, а швидкість газу і швидкість перемішування повинні бути невеликими для запобігання інгібуванню субстратом CO.

Типовий загальний протокол вироблення і підтримання ефективних в промисловому масштабі концентрацій етанолу з CO, CO₂ і H₂ складається з трьох окремих фаз: (а) первинний запуск, при якому найважливішим чинником є продукування клітин; (б) запуск, при якому найважливішим чинником стає швидкість вироблення; і (с) робота в сталому стані. Первинний запуск по суті відрізняється інокуляцією порції рідини, що містить номінальну кількість обмежуючої поживної речовини, вибраної з кобальту (75 млн⁻¹) або пантотенату кальцію (20мкг/л), при заданій pH (звичайно 4,5-5,5). Для полегшення запуску швидкість подачі газу і швидкість перемішування переважно підтримують низькими, а H₂ подають в надлишку. Чинником вироблення етанолу під час запуску є надлишок H₂; поживну речовину обмежують пізніше. Таким чином, під час запуску фактично присутній надлишок рідких поживних речовин, що запобігає небажаній акліматизації культури до низького вмісту поживних речовин. По мірі продовження ферментації протягом декількох годин після інокуляції, відбувається вироблення CO₂ і споживання H₂. Зміни в цих швидкостях означають, що швидкість перемішування слід повільно підвищувати до номінальної (можливо, на 200-300об./хв. в лабораторному реакторі протягом 2-3 днів) для запобігання обмеженню масопереносу.

Початок вироблення CO₂ відбувається набагато швидше в системах, в яких використана безперервна інокуляція, в протилежність від однократної інокуляції з маточної культури. Проте, якщо швидкість перемішування збільшується дуже швидко, відбувається інгібування субстратом CO. Швидкість перемішування збільшують відносно швидко під контролем перетворення H₂ (або вироблення CO₂) доти, доки не буде досягнута цільова швидкість перемішування. Протягом цього часу збільшення швидкості перемішування в порції рідкої культури найважливіше значення має процес продукування клітин, а не вироблення продукту.

Після досягнення цільової швидкості перемішування (800-1000об./хв. в лабораторному реакторі New Brunswick Scientific Bioflo®) культуру залишають рости до сталого стану для того, щоб збільшити поглинання H₂. Запуск переходить в режим, в якому важливою стає швидкість вироблення. Бажано отримати перетворення CO більше 80% і високий парціальний тиск H₂ у відхідному газі що-найменше 0,55атм. для того, щоб забезпечити вироблення етанолу при обмеженій концентрації ацетату і вільної молекулярної оцтової кислоти. Потім включають подачу рідкого середовища (для систем з однократною інокуляцією з маточної культури) для ініціювання безперервної подачі рідини, а швидкість подачі газу збільшують з 10%-ми приростами до досягнення цільової швидкості течії. H₂ залишається в надлишку для запобігання надлишковому виробленню оцтової кислоти. По мірі збільшення швидкості газу рідкофазні поживні речовини обмежують (пантотенат кальцію або кобальт), внаслідок чого відбувається невеликий спад в перетворенні H₂ при цільовій продуктивності.

При роботі в сталому стані досягається вироблення 15-35г/л етанолу і 0-5г/л ацетату. На цьому етапі необхідні невеликі коректування стосовно обмежуючих поживних речовин, швидкостей подачі рідини і швидкостей подачі газу, які вибираються досвідченим фахівцем на основі теоретичних досягнень в цій області і принципів цього винаходу. Якщо спосіб виробництва етанолу повинен бути доповнений рециркуляцією клітин, то вона вводиться на цьому етапі одночасно з регулюванням швидкості газу (збільшенням) і концентрації поживної речовини (зменшенням).

Описані вище способи безперервного вироблення і підтримання високих концентрацій етанолу при низьких концентраціях побічного ацетату в стабільних робочих умовах покращують використання відповідних бактерій для промислового виробництва етанолу з CO, CO₂ і H₂. У способі переважним є використання біореактора безперервної дії, хоч періодична ферментація і ферментація з підживленням також придатні, але навряд чи будуть економічно ефективними для великомасштабного виробництва етанолу.

Наступні приклади ілюструють різні аспекти, способи і етапи способів за винаходом. Ці приклади не обмежують винахід, область якого викладена в формулі винаходу, що додається.

ПРИКЛАД 1. ІЛЮСТРАТИВНИЙ СПОСІБ ЗАДАНИМ ВИНАХОДОМ

Синтез-газ або відпрацьований газ, що містить CO і/або CO₂/H₂, безперервно вводять в бак-реактор з безперервним перемішуванням, що містить штам *C. ljungdahlii*, разом із звичайним рідким середовищем, що містить вітаміни, мікроелементи і солі. Склад одного з переважних живильних середовищ приведений нижче в Таблиці 1.

При запуску з використанням інокуляту культури 10% або менше реактор працює при завантаженні порції рідкої фази, тобто, рідке середовище не подають в реактор безперервно. Таким чином, рідка фаза в реакторі складається з порції поживної середовища з номінальною концентрацією обмежуючої поживної речовини, пантотенату

кальцію або кобальту. У альтернативі також може бути використане збагачене середовище, що містить дріжджовий екстракт, триптиказу або інші комплексні поживні речовини.

В ідеалі, газова фаза під час запуску не містить CO_2 і містить надлишок H_2 . Швидкість газу і швидкість перемішування підтримують на низькому рівні (нижче 500 об./хв. в ферментаційному біореакторі New Brunswick Scientific Bioflo®) з отриманням CO і H_2 з невеликим надлишком, але, в той же час, із запобіганням інгібуванню CO -субстратом. В однолітровому лабораторному ферментаційному біореакторі New Brunswick Scientific Bioflo®, наприклад, в якому до складу газу, що подається, входить 63% H_2 , 32% CO і 5% CH_4 , швидкість перемішування для первинного запуску становить 400 об./хв., а швидкість газу 20 мл/хв. Чинником вироблення етанолу під час запуску є надлишок H_2 ; обмеження поживної речовини здійснюється пізніше. Таким чином, під час запуску фактично присутній надлишок рідких поживних речовин (пантотенату, кобальту), що запобігає небажаній акліматизації культури до низького вмісту поживних речовин.

По мірі продовження ферментації протягом кількох годин після інокуляції, CO_2 виробляється шляхом перетворення CO , а H_2 споживається разом з CO_2 , що є сигналом до підвищення швидкості перемішування до номінальної величини, щоб уникнути обмеження масопереносу. У CSTR New Brunswick Scientific Bioflo® відхідний газ включає 25% CO , 67% H_2 , 2% CO_2 і 6% CH_4 . Якщо швидкість перемішування збільшується дуже швидко, відбувається інгібування субстратом CO , що відзначається зниженням концентрації метану після прискорення перемішування. Таким чином, швидкість перемішування, як правило, підвищується на 200 об./хв. за 24 години. Ця операція підвищення швидкості перемішування під контролем вироблення CO_2 (або перетворення H_2) здійснюється доти, доки не буде досягнута цільова швидкість перемішування. Типова цільова швидкість перемішування в ферментаційному біореакторі New Brunswick Scientific Bioflo® становить 900 об./хв. Під час цього підвищення швидкості перемішування в порції рідкої культури найважливіше значення має продукування клітин, а не вироблення продукту. Таким чином, досягається концентрація клітин близько 1,5 г/л, при цьому типові концентрації продуктів становлять 10 г/л етанолу і 2 г/л ацетату з порції культури.

Після досягнення цільової швидкості перемішування культуру залишають рости доти, доки поглинання H_2 не досягне максимального значення. Бажано отримати дуже високі концентрації H_2 в відхідному газі (звичайно >60%), щоб забезпечити вироблення етанолу при обмеженому виробленні оцтової кислоти. Потім включають подачу рідкого середовища (для систем з однократною інокуляцією з маточної культури) для ініціювання безперервної подачі рідини, а швидкість газу підвищують до цільової. У лабораторному ферментаційному біореакторі New Brunswick Scientific Bioflo® швидкість подачі рідини звичайно становить 0,5 мл/хв., а швидкість течії газу збільшують на 10-15% кожні 24 години до досягнення цільової швидкості в

125 мл/хв.

Важливо забезпечити надлишок H_2 в газі, що подається, для запобігання надлишковому виробленню оцтової кислоти. По мірі збільшення швидкості газу збільшується продукування клітин, поки не виникне обмеження в рідкофазних поживних речовинах (пантотенат кальцію або кобальт), що буде помітно через невелике падіння перетворення H_2 при цільовій продуктивності. У CSTR New Brunswick Scientific Bioflo® це можна помітити через 10%-не падіння перетворення H_2 при цільовій продуктивності 20 г/л в день.

Потім технологічний процес і систему реакторів підтримують в сталому стані при виробленні 15-35 г/л етанолу і 0-5 г/л ацетату у якості продуктів, лише з невеликими коректуваннями в обмежуючих поживних речовинах, швидкостях рідини і газу. Типові умови сталого стану в лабораторному ферментаційному біореакторі New Brunswick Scientific Bioflo® без рециркуляції клітин включають тривалість утримання газу (рідинний об'єм реактора/швидкість течії газу) 20 хвилин, тривалість утримання рідини (рідинний об'єм реактора/швидкість течії рідини) 30 годин і швидкість перемішування 900 об./хв., з перетворенням CO 92% і перетворенням H_2 60% при обмеженні пантотенатом.

В одному з варіантів здійснення цього способу система реакторів доповнена рециркуляцією клітин, і рециркуляцію вводять на цьому етапі одночасно з регулюванням швидкості газу (збільшенням) і концентрації поживної речовини (зменшенням). При рециркуляції клітин в CSTR New Brunswick Scientific Bioflo® тривалість утримання газу звичайно становить 8 хвилин, тривалість утримання рідини 40 годин, а швидкість перемішування 900 об./хв. Ці умови звичайно забезпечують перетворення 92% CO і 50% H_2 при обмеженні пантотенатом.

ПРИКЛАД 2. АНАЛІЗ ЗРАЗКІВ ШЛЯХОМ ГАЗОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Для досягнення і/або підтримання потрібної продуктивності і співвідношення, періодично повинні відбиратися зразки ферментаційного бульйону з ферментаційного біореактора. Зразок більше, ніж 1,5 мл культури відбирають з культури в біореакторі. Зразок вміщують в мікроцентрифужну пробірку, а пробірку вміщують в центрифугу Fisher Scientific Micro 14 з необхідним балансом для рівноваги. Зразок центрифугують при 8000 об./хв. протягом 1,5 хв. 0,500-мл зразок супернатанта вміщують в 1,5-мл ампулу, призначену для використання в автодозаторі газового хроматографа. 0,500-мл зразок внутрішнього еталонного розчину містить 5 г/л n-пропанолу і 5% (об./об.) 85%-ної фосфорної кислоти в деіонізованій воді. Наявність фосфорної кислоти гарантує, що весь ацетат перетвориться на оцтову кислоту і буде виявлений газовою хроматографією.

1 мл підготовленого зразка вводять за допомогою автодозатора в Hewlett-Packard 5890 Series II Gas Chromatograph, оснащений капілярною колонкою 007 FFA Quadrex 25 м × 0,53 мм (внутрішній діаметр) з плавним кварцом. Аналіз проводять з використанням гелію у якості газу-носія у двопоточному режимі зі швидкістю 66 мл/хв. розділеного

потоків і 7,93мл/хв. інжекторної продувки. Тиск на виході з колонки встановлюють на 27кПа (4 psig), що забезпечує швидкість течії носія в колонці 7мл/хв. Температурна програма включає витримку при 75°C протягом 2 хвилин, підйом до 190°C зі швидкістю 30°C/хв. і витримку при 190°C протягом 5,17 хвилин. Загальний час прогону становить 8 хвилин. Прилад калібрують для етанолу (0-25г/л), оцтової кислоти (0-25г/л), n-бутанолу (0-5г/л) і масляної кислоти (0-5г/л). П'ять еталонів, приготованих з матеріалів з різним вмістом реагенту, використовують для калібрування. Якщо зразок не попадає в калібрувальний діапазон концентрацій (наприклад, >25г/л етанолу), 0,250мл зразка і 0,250мл деіонізованої води вміщують в ампулу з 0,500мл внутрішнього еталона і факт розбавлення враховують при аналізі.

ПРИКЛАД 3: ВИРОБЛЕННЯ КИСЛОТИ В ЛАБОРАТОРНОМУ CSTR З РЕЦИРКУЛЯЦІЄЮ КЛІТИН

У лабораторному ферментаційному біореакторі New Brunswick Scientific Bioflo®, працюючому з рециркуляцією клітин, використовували *C. ljungdahlii*, штам ERI2, ATCC 55380, для вироблення оцтової кислоти з CO, CO₂ і H₂. Газ, що подавався, містив 40% H₂, 50% CO і 10% N₂, а тривалість утримання газу в однопоточному реакторі становила 7,7-8,6 хвилин. Рідке середовище, що містить вітаміни, солі і мікроелементи, подавали при тривалості утримання рідини від 2,6 до 2,9 годин. pH становила 5,1-5,2, швидкість перемішування 1000об./хв., а тривалість утримання клітин - близько 40 годин. У цих умовах обмеження масопереносу (але не обмеження поживної речовини) перетворення CO складало 94-98%, а перетворення H₂ - 80-97%. Концентрація клітин складала 4-8г/л, а ацетат вироблявся з концентрацією 10-13г/л. Етанол не вироблявся. Хоча реактор працював в умовах обмеження масопереносу (обмеження можливості перенесення газу в культуру) і, таким чином, виробляв у якості продукту тільки оцтову кислоту, контролювалися параметри, важливі для вироблення етанолу шляхом обмеження пантотенатом, обмеження кобальтом або при надлишку H₂ або CO, які служили порівнянням для визначення моменту, коли етанол починає вироблятися як домінуючий продукт.

Як показано в Таблиці. 2, кількість Са-d-пантотенату, яка подавалася на одиницю клітин, що виробляються, становила 1575-3150мкг/г вироблених клітин. Подібним чином, кількість кобальту на грам вироблених клітин становила 1734-3468мкг/г вироблених клітин. Питома швидкість поглинання CO складала 0,35-0,61ммоль/г клітин·хв. Відношення молей H₂, що подається, до суми подвоєної кількості молей перетвореного CO і потроєної кількості молей перетвореного CO₂ складало менше 0,46. Таким чином, жоден з параметрів не попадав в бажаний робочий діапазон для вироблення етанолу культурою.

Зрозуміло, що пантотенат і кобальт подавалися у вказаний реактор у великому надлишку під час вироблення оцтової кислоти у якості продукту в умовах обмеження масопереносу. Тобто, рівні пантотенату і/або кобальту могли бути істотно знижені, і все одно залишалися б вище обмежую-

чих рівнів пантотенату або кобальту. Щоб показати це, однопоточний лабораторний ферментаційний біореактор New Brunswick Scientific Bioflo® модифікували таким чином, щоб істотно знизити подачу кобальту до рівня трохи вище концентрації обмеження кобальтом. Реактор знову містив *C. ljungdahlii*, штам ERI2, для вироблення оцтової кислоти з CO, CO₂ і H₂. Газ, що подавався, містив 55% H₂, 25% CO і 5% CH₄, а тривалість утримання газу становила 7,5-8,0 хвилин. Рідке середовище, що містить вітаміни, солі і мікроелементи, подавали при тривалості утримання рідини від 3,0 до 3,5 годин, а тривалість утримання клітин становила 40 годин. pH становила 5,0-5,3, а швидкість перемішування 900-1000об./хв. У цих умовах перетворення CO складало 95-99%, а перетворення H₂ - 94-98%. Концентрація клітин складала 2,5-4г/л, а ацетат був єдиним продуктом, що вироблявся з концентрацією 10-14г/л.

Кількість Са-d-пантотенату, яка подавалася на грам клітин, що виробляються, становила 2250-3600мкг пантотенату/г вироблених клітин. Кількість кобальту, що подавалася на одиницю клітин, що виробляються, була знижена до діапазону 62,0-99,2мкг кобальту/г вироблених клітин. Питома швидкість поглинання CO складала 0,325-0,4ммоль/г клітин·хв. Відношення молей H₂, що подається, до суми подвоєної кількості молей перетвореного CO і потроєної кількості молей перетвореного CO₂ складало 0,875.

ПРИКЛАД 4. ВИРОБЛЕННЯ ЕТАНОЛУ В ЛАБОРАТОРНИХ CSTRS З ОБМЕЖЕННЯМ ПАНТОТЕНАТУ

Лабораторний ферментаційний біореактор New Brunswick Scientific Bioflo® II працював як прямоточний CSTR (без рециркуляції клітин) з використанням *C. ljungdahlii*, штам C-01, ATCC 55988, для вироблення етанолу з CO, CO₂ і H₂ при обмеженні пантотенатом. Газ, що подавався, містив 63,3% H₂, 31,4% CO і 5,3% C₂H₆ (газ порівняння); тривалість утримання газу при подачі становила 27 хвилин. Рідке середовище, що містить надлишок солей і мікроелементів і обмежену кількість пантотенату, подавали в 1,55-літровий реактор при тривалості утримання рідини 31,4 години. pH становила 4,6-4,7, а швидкість перемішування 650об./хв. В цих умовах перетворення CO складало 98%, перетворення H₂ - 83%, а концентрація клітин 1,5-2,0г/л. Етанол вироблявся з концентрацією 15-19г/л, ацетат - з концентрацією 1,5г/л. Продуктивність вироблення етанолу знаходилася в діапазоні від 11,5 до 14,5г/л·день.

При аналізі параметрів вироблення етанолу обмеження пантотенатом спостерігалось при подачі пантотенату до клітин, що виробляються, у кількості 17,7-23,6мкг пантотенату/г вироблених клітин. Порівняйте цей коефіцієнт з 2250-3600мкг пантотенату/г вироблених клітин, і 1575-3150мкг пантотенату/г вироблених клітин у Прикладі 3, де вироблялася оцтова кислота. Кількість кобальту, що подається на одиницю вироблених клітин, складала 5000-6000мкг кобальту/г вироблених клітин, значно більш високий рівень, ніж в Прикладі 3, в якому було гарантовано відсутнє обмеження кобальтом. Питома швидкість поглинання CO складала 0,23-0,30ммоль/г клітин·хв. Відношення H₂,

що подається, до суми подвоєної кількості перетвореного CO і потроєної кількості перетвореного CO₂ склало 1,03, а парціальний тиск H₂ у відхідному газі склав 0,55-0,64атм. Певно, або надлишок H₂, або обмежена кількість пантотенату зумовила вироблення етанолу.

Обмеження пантотенату для вироблення етанолу було також продемонстроване в іншому лабораторному реакторі New Brunswick Scientific Bioflo® II, працюючому з рециркуляцією клітин при використанні *C. ljungdahlii*, штам C-01 ATCC 55988. У цей реактор подавали газ, що містить 61,7% H₂, 30,6% CO і 5,2% C₂H₆ (газ порівняння) при тривалості утримання газу 12,3 хвилини. Рідке середовище, що містить обмежену кількість пантотенату і надлишок солей і мікроелементів, подавали в 2,4-літровий реактор при тривалості утримання рідини 24,8 години. Рециркуляцію клітин проводили з використанням мембрани з порожнистих волокон, і тривалість утримання клітин становила 69 годин. рН становила 4,6, а швидкість перемішування 650 об/хв. У цих умовах перетворення CO склало 90%, перетворення H₂ - 53%, а концентрація клітин 2,5г/л. Етанол вироблявся з концентрацією 18г/л, ацетат - з концентрацією 3г/л. Продуктивність вироблення етанолу склала 17,4г/л-день.

При аналізі параметрів вироблення етанолу (Таблиця 2) подача пантотенату на одиницю клітин, що виробляються, становила 8,08мкг пантотенату/г вироблених клітин. Знов-таки, обмеження пантотенату було забезпечене шляхом роботи системи при рівні пантотенату набагато меншому, ніж це потрібно для вироблення ацетату. Кількість кобальту, що подається на одиницю клітин, що виробляються, склала 3960мкг кобальту/г вироблених клітин. Питома швидкість поглинання CO склала 0,33ммоль/г клітин-хв. Відношення H₂, що подається, до суми подвоєної кількості перетвореного CO і потроєної кількості перетвореного CO₂ склало 1,14, а парціальний тиск H₂ у відхідному газі склав 0,60-0,65атм. Надлишок H₂ міг би бути причиною вироблення етанолу, проте високий вміст CO₂ у відхідному газі (0,14атм.) показує, що ріст був обмежений пантотенатом.

В іншому досліді в культуру *C. ljungdahlii*, штам ERI2, подавали 1500-3600мкг пантотенату/г вироблених клітин під час вироблення оцтової кислоти з CO, CO₂ і H₂, що являє собою умову, при якій система не обмежена пантотенатом (або будь-яким іншим обмежуючим чинником, крім можливості перенесення газу в культуру), і етанол не був виявлений в потоку продукту.

Під час обмеження пантотенатом для вироблення етанолу з CO, CO₂ і H₂ в *C. ljungdahlii*, штам C-01 подавали 8-24мкг пантотенату/г вироблених клітин, при підтриманні всіх інших поживних речовин у надлишку. В цих умовах штам C-01 виробляв 15-19г/л етанолу і 1,5-3,0г/л ацетату.

ПРИКЛАД 5. ВИРОБЛЕННЯ ЕТАНОЛУ В ЛАБОРАТОРНИХ CSTRS З ОБМЕЖЕННЯМ КОБАЛЬТОМ

Лабораторний ферментаційний біореактор New Brunswick Scientific Bioflo® II працював як прямоточний CSTR (без рециркуляції клітин) з використанням *C. ljungdahlii*, штам C-01, ATCC 55988, для вироблення етанолу з CO, CO₂ і H₂ при

обмеженні кобальтом. Газ, що подавався, містив 60% H₂, 35% CO і 5% CH₄ (газ порівняння); тривалість утримання газу при подачі становила 14 хвилин. Рідке середовище, що містить надлишок солей, вітамінів і мікроелементів і обмежуючу кількість кобальту, подавали в 2,5-літровий реактор при тривалості утримання рідини 40 годин. рН становила 4,9, а швидкість перемішування 650 об/хв. В цих умовах перетворення CO становило 91%, перетворення H₂ змінювалося від 20 до 80%, але номінально становило 55%. Етанол вироблявся з концентрацією 26г/л, ацетат - з концентрацією 4г/л, а концентрація клітин становила 2,5г/л. Продуктивність вироблення етанолу склала 15,6г/л-день.

При аналізі параметрів вироблення етанолу подача пантотенату до клітин, що виробляються, становила 15,2мкг пантотенату/г вироблених клітин. Цей рівень настільки низький, що обмеження кобальтом може не мати переваги перед обмеженням пантотенатом. Обмеження кобальтом спостерігалось при роботі з кількістю кобальту 33,3мкг кобальту/г вироблених клітин, тобто, при рівні, який в 100 раз менше, ніж використовується в реакторах без обмеження кобальтом. Відношення H₂, що подається, до суми подвоєної кількості перетвореного CO і потроєної кількості перетвореного CO₂ склало 0,94. Питома швидкість поглинання CO склала 0,37ммоль/г клітин-хв.

Обмеження кобальтом для вироблення етанолу було також продемонстровано в CSTR з рециркуляцією клітин, що використовував *C. ljungdahlii*, штам C-01 ATCC 55988. Цей дослід був проведений для демонстрації обмеження кобальтом в присутності надлишку пантотенату, в протилежність попередньому досліді в цьому прикладі. У лабораторний ферментаційний біореактор New Brunswick Scientific Bioflo® 2000 з 0,2-мкм мембраною з порожнистих волокон для рециркуляції клітин подавався газ, що містить 60% H₂, 35% CO і 5% CH₄ (газ порівняння) при тривалості утримання газу 5 хвилин. Рідке середовище, що містить надлишок солей, вітамінів і мікроелементів і, знов-таки, обмежуючу кількість кобальту, подавали в 1,2-літровий реактор при тривалості утримання рідини 16 годин. рН становила 5,1, а швидкість перемішування 825об./хв. Тривалість утримання клітин в цьому CSTR з порожнистими волокнами для рециркуляції клітин становила 40 годин. У цих умовах перетворення CO склало 83%, перетворення H₂ - 50%, а концентрація клітин 4,2г/л. Етанол вироблявся з концентрацією 18г/л, ацетат - з концентрацією 4г/л. Продуктивність вироблення етанолу склала 27г/л-день.

При аналізі параметрів вироблення етанолу в цьому реакторі (Таблиця 2) подача пантотенату на одиницю клітин, що виробляються, становила 85,7мкг пантотенату/г вироблених клітин, тобто, в 5,5 разів більше, ніж в попередньому досліді в цьому прикладі. Обмеження кобальтом спостерігалось при роботі з 47,6мкг кобальту/г вироблених клітин. Відношення H₂, що подається, до суми подвоєної кількості перетвореного CO і потроєної кількості перетвореного CO₂ склало 1,03, а парціальний тиск H₂ у відхідному газі склав 0,60атм. Знов-таки, надлишок H₂ міг би бути причиною ви-

роблення етанолу, проте високий вміст CO_2 у відхідному газі (0,1-0,15атм.) показує, що ріст був обмежений кобальтом. Питоме поглинання CO склало 0,50ммоль/г клітин·хв.

ПРИКЛАД 6. ВИРОБЛЕННЯ ЕТАНОЛУ В ЛАБОРАТОРНИХ CSTRS ПРИ РОБОТІ З НАДЛИШКОМ CO

Реактор високого тиску AUTOCLAV™ (Buchi) працював як CSTR з циркуляцією культури і рециркуляцією клітин при використанні *C. ljungdahlii*, штам C-01, для вироблення етанолу з CO , CO_2 і H_2 в присутності надлишку CO протягом періоду 50 годин. Реактор працював при 170кПа (25 psig), а газ, що подавався, містив 57% H_2 , 36% CO і 6% C_2H_6 . Тривалість утримання газу була змінною, але номінально становила 3,0хв. Рідке середовище, що містить надлишок солей, вітамінів (включаючи пантотенат) і мікроелементів, подавали в 600-мл реактор при тривалості утримання рідини 8,2 години. Тривалість утримання клітин, отримана шляхом пропускання ефлюента з реактора через керамічний фільтр з порожнистими волокнами, становила 18,5 годин. рН становила 4,5, швидкість перемішування 450об./хв., а швидкість рециркуляції рідини 0,4-0,5gpm (галонів на хвилину). У цих умовах перетворення газів було змінним, але перетворення CO номінально склало 72%, а перетворення H_2 номінально склало 12%. Концентрація клітин була 2,7г/л. Етанол вироблявся з концентрацією 9,9г/л, а ацетат - з концентрацією 2,6г/л. Продуктивність вироблення етанолу склала 29,0г/л·день.

При аналізі параметрів вироблення етанолу подача пантотенату на одиницю клітин, що виробляються, становила 978мкг пантотенату/г вироблених клітин. Цей рівень досить високий для гарантії того, щоб концентрація пантотенату не була обмежуючою. Кількість кобальту, що подається на одиницю клітин, що виробляються - 836мкг кобальту/г вироблених клітин - також показує, що концентрація кобальту не була обмежуючою. Відношення H_2 , що подається, до суми подвоєної кількості перетвореного CO і потроєної кількості перетвореного CO_2 склало 1,09, а парціальний тиск H_2 склав 1,6атм. Високий вміст CO_2 у відхідному газі (0,5атм.) показує, що надлишок H_2 не викликав вироблення етанолу. Питоме швидкість поглинання CO становила 1,34ммоль/г клітин·хв., тобто, рівень, який забезпечує надлишок CO як спосіб вироблення етанолу.

Технологія використання надлишку CO для вироблення етанолу також була продемонстрована в іншому досліді з *C. ljungdahlii*, штам C-01, в реакторі AUTOCLAV™ (Buchi), також з рециркуляцією клітин і з циркуляцією культури, протягом періоду 24 годин. У цьому досліді в 600-мл реактор подавався газ, що містить 15,8% H_2 , 36,5% CO , 38,4% N_2 і 9,3% CO_2 при тривалості утримання газу 1,4хв. Тиск в реакторі підтримувався при 275кПа (40psig). Рідке середовище, що містить надлишок солей, вітамінів і мікроелементів, подавали при тривалості утримання рідини 4,8 години, а тривалість утримання клітин, отримана шляхом пропускання ефлюенту з реактора через керамічний фільтр з порожнистими волокнами, становила 19,2 години. рН становила 4,5, швидкість перемі-

шування 1000об./хв., а швидкість рециркуляції рідини 0,4-0,5 галонів на хвилину. У цих умовах перетворення CO склало 71,6%, а перетворення H_2 склало 11,8%. Концентрація клітин була 7,1г/л, етанол вироблявся з концентрацією 12,0г/л, а ацетат - з концентрацією 2,7г/л. Продуктивність вироблення етанолу склала 60г/л·день.

При аналізі параметрів вироблення етанолу (Таблиця 2) подача пантотенату на одиницю клітин, що виробляються, становила 294мкг пантотенату/г вироблених клітин. Цей рівень набагато вище мінімального рівня, який викликає вироблення етанолу внаслідок обмеження пантотенатом. Кількість кобальту, яка подається на одиницю клітин, що виробляються, становила 735мкг кобальту/г вироблених клітин, також на рівні, який забезпечує надлишок кобальту. Відношення H_2 , що подається, до суми подвоєної кількості перетвореного CO і потроєної кількості перетвореного CO_2 склало 0,3. Швидкість поглинання CO склала 0,67ммоль/г клітин·хв., тобто, рівень, який знову забезпечує надлишок CO як чинник вироблення етанолу.

ПРИКЛАД 7. ВИРОБЛЕННЯ ЕТАНОЛУ В ПРИСУТНОСТІ НАДЛИШКУ H_2

Лабораторний ферментаційний біореактор New Brunswick Scientific Bioflo працював як прямоточний CSTR (без рециркуляції клітин) з використанням *C. ljungdahlii*, штам C-01, ATCC 55988, для вироблення етанолу з CO , CO_2 і H_2 в присутності надлишку H_2 . Газ, що подавався в реактор, містив 77% H_2 , 19% CO і 4% CH_4 (газ порівняння); тривалість утримання газу при подачі становила 30 хвилин. Рідке середовище, що містить надлишок солей, вітамінів і мікроелементів, подавали в реактор при тривалості утримання рідини 36 годин. рН становила 5,0, а швидкість перемішування 1000об./хв. У цих робочих умовах перетворення CO склало 97-99%, перетворення H_2 60-80%. Концентрація клітин склала 0,8-1,0г/л, етанол вироблявся з концентрацією 10г/л, а ацетат - з концентрацією 3,3г/л. Продуктивність вироблення етанолу склала 6,7г/л·день.

При аналізі параметрів вироблення етанолу подача пантотенату на одиницю клітин, що виробляються, становила 900-1125мкг пантотенату/г вироблених клітин, що гарантує надлишок пантотенату. Подібним чином, кількість кобальту, яка подається на одиницю клітин, що виробляються, становила 991-1239мкг кобальту/г вироблених клітин, що також гарантує надлишок кобальту. Питоме швидкість поглинання CO склала 0,28-0,35ммоль/г клітин·хв., тобто, такий рівень CO , який не викликає вироблення етанолу. Відношення молей H_2 , що подається, до суми подвоєної кількості молей перетвореного CO і потроєної кількості молей перетвореного CO_2 склало 1,96, тобто, коефіцієнт вище 1,0, що означає присутність надлишку H_2 , який може контролювати вироблення етанолу. Парціальний тиск H_2 у відхідному газі склав 0,70-0,87атм., а відношення парціального тиску H_2 до парціального тиску CO_2 у відхідному газі склало 65. Таким чином, реактор виробляв етанол завдяки присутності надлишку H_2 .

У другому досліді реактор високого тиску AUTOCLAV™ (Buchi) працював як CSTR з цирку-

ляцією культури і рециркуляцією клітин при використанні *C. ljungdahlii*, штам C-01, для вироблення етанолу з CO, CO₂ і H₂ в присутності надлишку H₂. Газ, що подавався в реактор, містив 81% H₂, 16% CO і 3% CH₄ (газ порівняння); тривалість утримання газу при подачі становила 2,21 хвилин. Рідке середовище, що містить надлишок солей, вітамінів і мікроелементів, подавали в реактор при тривалості утримання рідини 8,97 годин. Тривалість утримання клітин становила 22,7 годин, pH 4,5 і швидкість перемішування 800 об./хв. У цих робочих умовах перетворення CO склало 91,5%, а перетворення H₂ 43,4%. Концентрація клітин складала 5,5 г/л, а концентрація ацетату 2,85 г/л. Продуктивність вироблення етанолу в реакторі складала 215-240 г/л-день.

При аналізі параметрів вироблення етанолу подача пантотенату на одиницю вироблення клітин становила 46 мкг пантотенату/г вироблених клітин, що може означати обмеження пантотенатом. Кількість кобальту, яка подавалася на одиницю клітин, що виробляються, становила 460 мкг кобальту/г вироблених клітин, що гарантує надлишок кобальту. Питома швидкість поглинання CO становила 1,68 ммоль/г клітин-хв., тобто, рівень, який міг би означати присутність надлишку CO, якби не висока швидкість поглинання H₂ 4,14 ммоль/г клітин-хв., яка означає, що інгібування субстратом, яке впливає на поглинання H₂, не відбувалося. Відношення молей H₂, що подається, до суми подвоєної кількості молей перетвореного CO і потроєної кількості молей перетвореного CO₂ становило 5,67, тобто, набагато вище за коефіцієнт 1,0, що означає присутність надлишку H₂. Парціальний тиск H₂ у відхідному газі склав 2,61 атм., а відношення парціального тиску H₂ до парціального тиску CO₂ у відхідному газі склало 10,9. Таким чином, реактор виробляв етанол завдяки присутності надлишку H₂.

Сумарне порівняння параметрів способу і результати Прикладів 3-7 показані в Таблиці 2, приведені нижче.

ПРИКЛАД 8. ЗСУВ У СПІВВІДНОШЕННІ ПРОДУКТІВ У ШТАМАХ *C. LJUNGDAHLII* ERI2, C-01 І PETC ПРИ ВИКОРИСТАННІ РІЗНИХ СКЛАДІВ СЕРЕДОВИЩА

Способи за винаходом можуть бути використані для будь-якого з штамів *C. ljungdahlii*. Результати дослідів стосовно зміни середовища, в яких використовувалися штами ERI2, C-01 і PETC, показані в Таблиці 3, приведені нижче. Метою цих дослідів була демонстрація того, що кожний з штамів може бути підданий впливу, який забезпечує зсув від вироблення оцтової кислоти до вироблення етанолу лише за рахунок зміни середовища. Так, в культуру подавали надлишок поживних речовин (включаючи пантотенат і кобальт) для вироблення оцтової кислоти у якості домінуючого продукту, а потім обмежували пантотенат або кобальт для вироблення етанолу у якості домінуючого продукту. Слід підкреслити, що єдиною метою цих дослідів було показати, що зміна середовища може привести до зсуву в співвідношенні продуктів для кожного з штамів. Таким чином, досягнення високих концентрацій продуктів і продуктивності не було метою цих дослідів.

Реактор працював як проточний CSTR (без рециркуляції клітин) в кожному досліді для різних культур. Тривалість утримання газу була номінально встановлена на 50 хвилин, тривалість утримання рідини була номінально встановлена на 40 годин, а швидкість перемішування була номінально встановлена на 1000 об./хв. Ці умови були вибрані для можливості порівняння штамів, а не для досягнення високої продуктивності.

Як зазначено в Таблиці 3, штам ERI2 був підданий п'яти змінам в середовищі, які зсували співвідношення продуктів вперед і назад від оцтової кислоти у якості домінуючого продукту до етанолу у якості домінуючого продукту. Було продемонстроване обмеження пантотенату і обмеження кобальту для вироблення етанолу цим штамом. Вироблення штаму C-01 зсували тричі, використовуючи зміни середовища, також продемонструвавши обмеження пантотенату і обмеження кобальту у якості механізму для вироблення етанолу. Вироблення штаму PETC зсували тільки один раз, у вигляді вироблення етанолу за рахунок обмеження кобальтом. Кожний з штамів показав більш високе перетворення H₂ при виробленні оцтової кислоти, ніж при виробленні етанолу у якості домінуючого продукту. Це зумовлене тим, що оцтова кислота виробляється в умовах обмеження масопереносу (обмеження кількості газу, що подається в культуру), в той час як етанол виробляється при обмеженні поживних речовин і, отже, надлишку газу, що може негативно вплинути на перетворення газу. Малі кількості ацетату завжди присутні в потоку продукту, коли домінуючим продуктом є етанол. Однак, коли домінуючим продуктом є оцтова кислота, етанол звичайно не присутній у концентраціях, що вимірюються. При зсуві домінуючих продуктів від етанолу до оцтової кислоти шляхом зміни поживних речовин було показано, що дуже важко усунути всі сліди етанолу. Повне усунення етанолу відбувається лише через кілька тижнів безперервної роботи в середовищі, яке покращує вироблення оцтової кислоти.

ПРИКЛАД 9. РОБОТА В СТАЛОМУ СТАНІ З/БЕЗ РЕЦИРКУЛЯЦІЇ КЛІТИН

Кінцевою метою промислового вироблення етанолу з CO, CO₂ і H₂ є досягнення високих сталих концентрацій етанолу і одночасно - отримання високих співвідношень етанолу і ацетату в кінцевому продукті і високої продуктивності. Дані сталого стану для вироблення етанолу з CO-збагаченого газу, що містить 20% H₂, 65% CO, 10% CO₂ і 5% CH₄, з використанням штаму *C. ljungdahlii* C-01 в проточному (без рециркуляції клітин) CSTR приведені в Таблиці 4. У цій таблиці GRT означає тривалість утримання газу (рідинний об'єм/швидкість течії вхідного газу), LRT означає тривалість утримання рідини (рідинний об'єм/швидкість течії рідини) і XRT означає тривалість утримання клітин (середній час, який клітини проводять в реакторі). Як зазначено в Таблиці 4, були отримані концентрації етанолу від 17,5 до 33 г/л і продуктивність вироблення етанолу в діапазоні від 14,4 до 21,1 г/л-день.

Подібні результати показані для вироблення етанолу з газу, не настільки збагаченого CO. Газ, що використовується в досліді з *C. ljungdahlii* C-01

без рециркуляції, результати якого представлені в Таблиці 5, містить 16% H_2 , 27% CO , 6% CO_2 і 51% N_2 . За допомогою цього газу були отримані концентрації етанолу в діапазоні від 11 до 26 г/л, з 2,0-5,0 г/л ацетату у якості вторинного продукту. Продуктивність вироблення етанолу складала від 11,1 до 20,1 г/л-день. "Концентрація клітин приведена в Таблиці 5 на основі сухої ваги клітин.

Нарешті, дані сталого стану для перетворення газу, що містить 50% H_2 , 45% CO і 5% CH_4 , в CSTR з рециркуляцією клітин при використанні *C. ljungdahlii* O-52 (інвентарний номер ATCC 55989) показані в Таблиці 6. Були отримані концентрації етанолу 18-23,5 г/л і концентрації ацетату 3,0-5,7 г/л. Продуктивність вироблення етанолу складала від 21,1 до 39,0 г/л-день.

ПРИКЛАД 10. ВИСОКА ПРОДУКТИВНІСТЬ ВИРОБЛЕННЯ ЕТАНОЛУ В CSTR З РЕЦИРКУЛЯЦІЄЮ КЛІТИН І ПІД ТИСКОМ

Реактор високого тиску AUTOCLAV™ (Buchi) працював як CSTR з циркуляцією культури і рециркуляцією клітин при використанні *C. ljungdahlii*, штам C-01, для вироблення етанолу з CO , CO_2 і H_2 . Реактор працював при 207 кПа (30 psig), а газ, що подавався, містив 62% H_2 , 31% CO і 2% C_2H_6 . Тривалість утримання газу становила 1,14 хв. (на основі атмосферного тиску), при дійсній тривалості утримання газу 3,5 хв. Рідке середовище, що містить надлишок солей, вітамінів і мікроелементів, подавали в 600-мл реактор при тривалості утримання рідини 3,6 години. pH становила 4,5, а швидкість перемішування 825 об./хв. У цих умовах концентрація клітин складала 8 г/л, перетворення CO 90%, а перетворення H_2 40%. Потік продукту містив 20 г/л етанолу і 2,75 г/л ацетату. Продуктивність вироблення етанолу складала 150 г/л-день.

Інший реактор високого тиску AUTOCLAV™ (Buchi), працюючий як CSTR з циркуляцією культури і рециркуляцією клітин при використанні *C. ljungdahlii*, штам C-01, працював при 6 атм. (75 psig), а синтез-газ, що подавався в нього, містив 55% H_2 , 30% CO , 5% CH_4 і 10% CO_2 . Тривалість утримання газу становила 1 хв. (на основі атмосферного тиску), при дійсній тривалості утримання газу 6,0 хв. Рідке середовище, що містить надлишок солей, вітамінів і мікроелементів, подавали в 600-мл реактор при тривалості утримання рідини 1,62 години. Тривалість утримання клітин становила 24 години, pH 4,5, а швидкість перемішування 800 об./хв. У цих умовах концентрація клітин складала 2,0 г/л, перетворення CO 95%, а перетворення H_2 60%. Потік продукту містив 25 г/л етанолу і 3 г/л ацетату. Продуктивність вироблення етанолу становила 369 г/л-день.

ПРИКЛАД 11. ЗАПУСК З МАТОЧНОЇ КУЛЬТУРИ ПРИ НАДЛИШКУ H_2

Запуск з використанням однократної інокуляції з маточної культури забезпечує здоровий інокулят, що не містить домішок, але не завжди буває успішною сама процедура інокуляції через досить низьку щільність клітин, що використовується, особливо, якщо параметри технологічного процесу, такі як швидкість газу і швидкість перемішування, підвищуються дуже швидко відразу після інокуляції.

Запуск з використанням однократної інокуляції з маточної культури описаний в цьому прикладі.

Для отримання маточних культур для інокуляції реактора вирощували культури *C. ljungdahlii*, штам C-01 (інвентарний номер ATCC 55988) в 150-мл сироваткових колбах на CO , CO_2 і H_2 в збагаченому середовищі, що містить 1 г/л дріжджового екстракту і 1 г/л триптикази, солі і вітаміни. Концентрація вітамінів становила 0,4 мл/л середовища водного розчину, що містить 50,5 мг/л пантотенату кальцію, 20,6 мг/л d-біотину і 50,6 мг/л тіаміну-HCl. Колби інкубували при 37°C у вібраційному інкубаторі. Культури вирощували до експонентної фази росту, що визначається візуально. При кожній інокуляції близько 90 мл маточної культури перенесли з сироваткових колб в 1 літр середовища, отримуючи 9%-ну інокуляцію (за об'ємом). Успішна інокуляція описана нижче. Вказана процедура може повторюватися декілька разів до отримання успішної інокуляції.

Для отримання успішної інокуляції 90 мл/л інокуляту додавали в 1-літрову порцію основного живильного середовища (показаного в Таблиці 1), що містило 0,4 мл/л вітамінів і солей ($t=0$). Швидкість перемішування становила 240 об./хв., pH 5,3, температура 38,5°C і тривалість утримання газу (при постійному потоку газу) 110 хвилин. Газ, що подавався, містив 62% H_2 , 31% CO і 7% C_2H_6 . Через 13 годин ($t=13$ год.) було відзначено деяке перетворення CO , а при $t=23$ год. швидкість перемішування збільшили від 240 об./хв. до 300 об./хв. Тривалість утримання газу знижували до 100 хвилин при $t=27$ год., а подальше зниження тривалості утримання газу виконали при $t=46$ год. Швидкість перемішування також підвищували з пристроями 100 об./хв. при $t=28$ год., 59 год., 72 год. і 85 год.

При $t=110$ год. система працювала при тривалості утримання газу 80 хвилин і швидкості перемішування 600 об./хв. Концентрація клітин складала 0,5 г/л, а перетворення CO - 35%. Перетворення H_2 все ще не відбувалося, але малі кількості етанолу і ацетату (~1 г/л кожного) накопилися в цій порції культурального бульйону. Всі зусилля до цього часу були направлені на ріст культури в реакторі.

Течію середовища з використанням тих же концентрацій, що і в основному живильному середовищі, почали зі швидкістю 0,4 мл/хв. при $t=120$ год. Потім запустили програму номінальних приростів швидкості газу, швидкості перемішування і швидкості середовища при обережному підтриманні надлишку H_2 в системі. При $t=210$ год. концентрація етанолу складала 17 г/л, концентрація ацетату 1 г/л, концентрація клітин 1,6 г/л, перетворення CO - близько 100%, і перетворення H_2 складало 90%. Продуктивність вироблення етанолу досягла 11,4 г/л-день.

Програма поступового збільшення швидкості газу була знов запущена. Були спільно збільшені кількості вітамінів (див. Таблиці 1) з доведенням швидкості введення вітамінів до 0,7 мл/л середовища. При $t=610$ год. реактор виробляв 20 г/л етанолу і близько 2 г/л ацетату. Перетворення CO складало близько 100%, а перетворення H_2 - 85%. Продуктивність вироблення етанолу досягла 14 г/л-день.

ПРИКЛАД 12. ЗАПУСК З ВИКОРИСТАННЯМ ІНОКУЛЯТУ З ІСНУЮЧОГО CSTR

Запуск CSTR з використанням безперервної

подачі інокуляту з існуючого CSTR більш швидкий і надійний, чим запуск з порційних колб маточної культури. CSTR, що містить ізолят *C. ljungdahliae*, штам C-01 (інвентарний номер ATCC 55988), який майже припинив вироблення етанолу і продукував 2-3г/л етанолу, 7-8г/л ацетату і близько 0,3г/л бутанолу у вигляді рідкофазних продуктів, заново запустили з використанням безперервної подачі інокуляту з існуючого CSTR.

CSTR, з якого отримували інокулят, виробляв близько 17г/л етанолу і 1-2г/л ацетату, працюючи при тривалості утримання газу 25 хвилин, тривалості утримання рідини 32 години, швидкості перемішування 650об./хв., температурі 38,5°C і pH4,66. Концентрація клітин становила 1,7г/л, перетворення CO складало по суті 100%, а перетворення H₂ 85%.

Коли почали безперервну подачу інокуляту (t=0), в цей же час знизили швидкість перемішування до 500об./хв., а тривалість утримання газу встановили на 38 хвилин. Ефлюент з реактора виробництва (0,5мл/хв.) служив у якості інокуляту для CSTR, що інокулюється, при безперервній інокуляції протягом декількох годин. Через t=5год. (5 годин після початку безперервної інокуляції) було відзначене перетворення газу, і швидкість перемішування збільшили до 700об./хв. Безперервну подачу інокуляту припинили через t=28год. Перетворення газів рівномірно покращувалося, дозволяючи здійснювати рівномірні підвищення швидкості газу (знижуючи тривалість утримання газу) і підвищити швидкість перемішування до 750об./хв. Через t=30год. перетворення CO складало 95%, а перетворення H₂ 80%. Концентрація етанолу складала 13г/л, концентрація ацетату 1,5г/л, і ці кількості були сталими значно довше 100 годин. За цей час продуктивність вироблення етанолу складала 10-15г/л-день.

ПРИКЛАД 13. ВІДНОВЛЕННЯ ПРИ СЕРЙОЗНОМУ ПОРУШЕННІ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

У CSTR з рециркуляцією клітин, що містить *C. ljungdahliae*, штам C-01, в який безперервно подавали газ і рідкі поживні речовини і який виробляв 15-35г/л етанолу і 0-5г/л ацетату в сталому стані (див., зокрема, Приклад 1), стався збій через непередбачені зміни в умовах технологічного процесу, наприклад, механічні пошкодження в реакторі. Збій в реакторній системі може бути незначним, таким як короткочасне збільшення швидкості газу, яке викликає короткочасне інгібування субстратом, або значним, таким як тривале збільшення швидкості газу, яке зрештою приводить до підвищеного вироблення оцтової кислоти і серйознішого інгібування молекулярною оцтовою кислотою, що виробляється.

Короткочасні збої легко виправляються шляхом простого регулювання порушених параметрів (наприклад, зниження швидкості газу до початкового рівня) і спостереження за прогресом реактора, щоб пересвідчитися, що збій не привів до довготривалих проблем.

Однак інгібування молекулярною оцтовою кислотою, що виробляється, являє собою серйознішу проблему. Якщо культурою виробляється надлишок молекулярної оцтової кислоти в результаті

тривалого інгібування субстратом, надлишкової подачі поживних речовин, накопичення CO₂ або механічних пошкоджень різного характеру, насамперед повинна бути усунена проблема, яка привела до надлишкового вироблення оцтової кислоти. Потім надлишок оцтової кислоти, який швидко приводить до інгібування продуктом, видаляють з системи шляхом збільшення швидкості рідини для вимивання оцтової кислоти (але, на жаль, і етанолу) з системи. Коли рівень ацетату становитиме 3-5г/л, швидкість рідини відновлюють і повертають реактор в умови надлишкової подачі H₂ або обмеження вітамінами або кобальтом (з рециркуляцією або без рециркуляції клітин). Повернення реактора в попередній стан включає зниження швидкості газу для запобігання інгібуванню субстратом і/або швидкості перемішування до того, як почнеться вимивання клітин і лізис. Потім збільшують швидкість перемішування або швидкість газу, як описано в Прикладі 1.

У даному прикладі CSTR з рециркуляцією клітин, що містить *C. ljungdahliae*, штам C-01, який виробляв етанол і оцтову кислоту з CO, CO₂ і H₂, почав виробляти оцтову кислоту у відповідь на механічну несправність. У 2100-мл реактор подавали газ, що містить 62% H₂, 31% CO і 7% C₂H₆, при тривалості утримання газу 15 хвилин. Реактор працював при швидкості перемішування 600об./хв. і pH4,86. Тривалість утримання рідини становила 23 години, а тривалість утримання клітин 68 годин. Розчин вітаміну B (водна суміш 50,5мг/л пантотенату кальцію, 20,6мг/л d-біотину і 50,6мг/л тіаміну-HCl) був присутнім в рідкому живильному середовищі, що містить солі і вітаміни, при концентрації 0,4мл вітамінного розчину на літр середовища (див. Таблицю 2). Концентрація етанолу впала до 7г/л, в той час як концентрація ацетату виросла до 7г/л, створивши умови, які не є ні стабільними для роботи реактора, ні економічними для виробництва етанолу. Концентрація клітин становила 2,4г/л, перетворення CO 85% і перетворення H₂ 25%.

Стратегія, що використовується для відновлення реактора, включала спочатку різке зниження швидкості подачі газу в реактор, а потім поступове відновлення реактора в присутності надлишку H₂. Швидкість подачі рідини в реактор для запобігання інгібуванню продуктом в даному прикладі не знижували, оскільки концентрація ацетату не була дуже великою. Замість цього концентрації ацетату дозволили поступово знижуватися до неінгібуючого рівня при зниженні швидкості течії газу і подальшій роботі в присутності надлишку H₂. Докладна процедура відновлення реактора описана нижче.

Рециркуляцію клітин припинили і різко знизили швидкість газу на 70% до тривалості утримання газу 62 хвилини, при цьому лише трохи змінивши тривалість утримання рідини з 23 до 30 годин (t=0). Концентрацію вітамінів в середовищі не змінювали. При цій зміні в швидкості газу перетворення CO збільшилося до 98%, а перетворення H₂ до 80%. Більш важливе те, що в системі з'явився надлишок H₂, про що свідчило зниження вмісту CO₂ у відхідному газі з 19 до 5%. При появі надлишку H₂ концентрація ацетату впала, а концентрація етанолу збільшилася.

Наприклад, через $t=66$ год. (66 годин після припинення рециркуляції клітин) концентрація ацетату впала до 4г/л, а концентрація етанолу дещо піднялася до 7,5г/л.

Присутність надлишку H_2 (і зниження концентрації ацетату) дозволила здійснити подальше збільшення швидкості газу, спочатку повільно, а потім швидше. Через $t=215$ год. тривалість утримання газу становила 29хв., концентрація етанолу 12г/л і концентрація ацетату 3г/л. Продуктивність вироблення етанолу становила 8г/л·день. CO_2 був присутнім у відхідному газі з концентрацією 6%, перетворення CO становило 98% і перетворення H_2 80%. Через $t=315$ год. концентрація етанолу становила 16г/л, а концентрація ацетату 4г/л, також при задовільному ступеню перетворення газу і тривалості утримання газу 20 хвилин. Продуктивність вироблення етанолу становила 11г/л·день. Через $t=315$ год. концентрація етанолу досягла 20г/л, при вмісті ацетату 3,5-4г/л. Продуктивність вироблення етанолу становила 16г/л·день. Тривалість утримання газу впала до 16 хвилин, а перетворення CO і H_2 становило 95% і 73%, відповідно. Ці умови підтримувалися майже 200 годин безперервної роботи, що показало відновлення здатності реакторної системи виробляти етанол і, по суті, утримання колишніх робочих умов.

ПРИКЛАД 14. СПОСІБ ВИРОБНИЦТВА ЕТАНОЛУ З НАДЛИШКОВОЮ ПОДАЧЕЮ CO

Простий дослід був проведений в реакторі-баку високого тиску, безперервної дії, з перемішуванням, використовуючим рециркуляцію клітин, для демонстрації зсуву від вироблення оцтової кислоти до вироблення етанолу завдяки присутності високих концентрацій CO . Перед проведенням дослідів реактор, що містить *C. ljungdahlii*, штам C-01, працював під тиском 140-170кПа (20-25 psig), де газ, що подавався, містив 57% H_2 , 36% CO і 7% C_2H_6 . Тривалість утримання газу становила менше 2 хвилин, тривалість утримання рідини 38 годин, тривалість утримання клітин 28 годин, швидкість перемішування 600об./хв. і температура 38°C. У цих умовах перетворення CO було змінним і в середньому становило 85%; перетворення H_2 було змінним і в середньому становило 20%. Концентрація клітин складала близько 2,5г/л, а потік продукту містив 9г/л етанолу і 3г/л ацетату.

На першому етапі для підготовки дослідів збільшили тривалість утримання газу для забезпечення відсутності надлишку CO . Тиск підтримували при 158-165кПа (23-24 psig). pH контролювали досить довго, щоб пересвідчитися в її стабільності в нормальному робочому діапазоні 4,5-4,6. Потім з газом, що регулярно подавався, змішали чистий CO для отримання складу газу 47% H_2 , 47% CO і 6% C_2H_6 , при тривалості утримання газу 2,3хв. Потім pH в реакторі, склад відхідного газу і потік продуктів спостерігали у часі.

Таблиця 7 показує зміни pH і склад продуктів у часі після додання надлишку CO в систему. Через 30 хвилин після додання CO pH в реакторі піднявся до 5,25 і співвідношення в культурі здвинулося до 1,54г/ (0,0257моль/л) ацетату до 1,12г/л (0,0243моль/л) етанолу. Підвищення pH сталося внаслідок перетворення вільної оцтової кислоти в етанол. Ця зміна супроводжувалася зниженням

перетворення CO з 91% до 71%. При зменшенні швидкості циркуляції культури з 0,4gpm до 0,15gpm pH в реакторі впала, але концентрації етанолу і ацетату зберігалися.

Через 50 хвилин після введення CO концентрація етанолу становила 11,29г/л, а концентрація ацетату 1,75г/л. В цей час подачу надлишкового CO припинили, і концентрація етанолу і pH почали падати, а концентрація ацетату - рости. Зниження pH було зумовлене перетворенням етанолу в молекулярну оцтову кислоту. Таким чином, зсув етанол-оцтова кислота за рахунок подачі CO є оборотним.

ПРИКЛАД 15. РЕЦИРКУЛЯЦІЯ ВОДИ ДЛЯ МІНІМІЗАЦІЇ ВИРОБЛЕННЯ АЦЕТАТУ

Рециркуляція води, що використовується, назад в ферментаційний біореактор після дистиляції з метою виділення етанолу важлива для мінімізації вироблення ефлюента і для максимізації виходу етанолу, що утворюється в реакторі, а також для обмеження вироблення оцтової кислоти. Дистиляція виявилася найбільш економічним способом для концентрування 15-35г/л етанолу, отриманого з реактора, до 95%-го етанолу. Потім використовується адсорбція за допомогою молекулярних сит для подальшого концентрування етанолу до бажаної концентрації. При проведенні дистиляції 95%-й етанол у воді утворюється у вигляді дистиляту. Вода під час дистиляції виробляється у якості кубового продукту. Кубовий продукт містить оцтову кислоту з реактора, вироблену під час ферментації (3-5г/л ацетату), і поживні речовини, невикористані під час ферментації або зруйновані впливом тепла при дистиляції, такі як мікроелементи та інші мінерали. Рециркуляція поживних речовин мінімізує кількість ефлюента, що повинен бути оброблений, а також кількість поживних речовин, яка згодом повинна додаватися в ферментаційний біореактор. Рециркуляція ацетату запобігає утворенню додаткової оцтової кислоти шляхом встановлення рівноваги між етанолом і оцтовою кислотою. Таким чином, при використанні рециркуляції води оцтова кислота на виході не утворюється. Рециркуляція більше ніж 3-5г/л ацетату може привести до інгібування реактора оцтовою кислотою. Таким чином, внаслідок рециркуляції води разом з ацетатом субстрат CO , CO_2 і H_2 може перетворюватися на етанол у вигляді єдиного продукту.

Таблиця 8 показує результати ферментації газу, що містить 50% CO , 45% H_2 і 5% CH_4 при використанні *C. ljungdahlii*, штам O-52, з рециркуляцією води. У цих дослідів пермеат після фільтрації через порожнисті волокна, яка використовується для рециркуляції клітин, направляли на дистиляцію. Після видалення етанолу воду фільтрували через 0,2-мкм фільтр для видалення осаджених побічних продуктів. Фракція оборотної води в загальній кількості води (у якості середовища), що подається в реактор, в цих дослідів складала від 25 до 100%. Дослід зі 100% оборотної води тривав майже 500 годин або близько 20 тривалостей утримання рідини. З результатів зі 100% оборотної води видно, що оцтова кислота на виході не виробляється. Фактично, у кінцевому рахунку була витрачена невелика кількість оцтової кислоти. Про-

дуктивність вироблення етанолу склала від 12 до 27г/л·день.

ПРИКЛАД 16. ДВОСТУПЕНЕВА СИСТЕМА CSTR З ПОДАЧЕЮ ПАНТОТЕНАТУ НА СТАДІЮ РОСТУ

Правильна подача пантотенату на стадію росту являє собою змінну величину, яка повинна оптимізуватися. Типові результати для реактора стадії росту з використанням *C. ljungdahlii*, штам C-01, були описані в Прикладах 11 і 12, за винятком того, що в цьому реакторі буде вироблятися дещо більше оцтової кислоти, оскільки на стадію росту подається додаткова кількість пантотенату або кобальту для забезпечення вироблення здорової і стабільної культури. Концентрація вітамінів, що використовуються, становила 0,7-0,8мг/л середовища у вигляді водного розчину, що містить 50,5мг/л пантотенату кальцію, 20,6мг/л d-біотину і 50,6мг/л тіаміну-HCl. CSTR стадії виробництва з рециркуляцією клітин отримує ефлюент з реактора стадії росту і виробляє етанол у якості домінуючого продукту. Концентрація пантотенату, що подається в цей реактор, набагато нижче, ніж на стадії росту, всього 0,1-0,2мг всіх вітамінів/л середовища у вигляді водного розчину, що містить 50,5мг/л пантотенату кальцію, 20,6мг/л d-біотину і 50,6мг/л тіаміну-HCl. Тривалість утримання газу на стадії виробництва становила 11-30 хвилин, тривалість утримання рідини складала близько 20 годин, тривалість утримання клітин 30-50 годин, а швидкість перемішування 800-900об./хв. pH становила 5,0, а температура 38°C. Після досягнення реактором сталого стану тривалість утримання газу підтримувалася постійною при 11хв., тривалість утримання рідини була встановлена на 19 годин, тривалість утримання клітин була постійною - 37 годин, а швидкість перемішування становила 900об./хв. Перетворення CO в середньому становило 96%, а перетворення H₂ - в середньому 60%. Концентрація етанолу встановилася на 25-30г/л, при цьому також було присутньо 3г/л ацетату. Продуктивність вироблення етанолу становила 31,6-37,9г/л·день.

ПРИКЛАД 17. РЕГУЛЮВАННЯ ПАРАМЕТРІВ ФЕРМЕНТАЦІЇ ДЛЯ ЗАПОБІГАННЯ АКЛІМАТИЗАЦІЇ ДО НИЗЬКОЇ ОБМЕЖУЮЧОЇ КОНЦЕНТРАЦІЇ ПАНТОТЕНАТУ КАЛЬЦІЮ

Акліматизації культури в ферментаційному бульйоні до низької обмежуючої концентрації пантотенату кальцію запобігають шляхом регулювання параметрів ферментації (швидкість газу, швидкість рідини, швидкість перемішування, парціальний тиск H₂), уникаючи істотних змін в поживних речовинах, замість цього підтримуючи порівняно постійну концентрацію поживних речовин, що подаються. Це здійснюють таким чином.

Під час запуску лабораторний CSTR New Brunswick Scientific Bioflo® з *C. ljungdahlii*, штам C-01, отримувал потік рідкого середовища, що містить вітаміни, мікроелементи і солі, необхідні для живлення культури. Концентрація пантотенату в живильному середовищі становила 20мг/л. Це концентрація, яка в поєднанні з повільною швидкістю подачі середовища забезпечує подачу більше 100мг пантотенату кальцію на грам клітин, що виробляються (надлишок пантотенату), через ни-

зьке вироблення клітин в біореакторі. Подібним чином, концентрація кобальту в середовищі становила 1млн⁻¹, яка також забезпечує надлишок кобальту. Однак парціальний тиск H₂ у відхідному газі підтримувався у надлишку величиною 0,55атм. шляхом подачі газу, який не містить CO₂ і містить 63,3% H₂, 31,4% CO і 5,3% C₂H₆, що забезпечило відношення $\frac{H_2, \text{що подається}}{(2CO_{\text{перетв.}} + 3CO_{2\text{перетв.}})}$ більше 1, і шляхом обережного регулювання швидкості подачі газу і швидкостей перемішування, для досягнення ступеня перетворення CO більше ніж 95% і перетворення H₂ більше ніж 80%. По мірі досягнення цих високих ступенів перетворення концентрація клітин збільшується від початкового рівня близько 0г/л до ~1,5г/л.

Оскільки концентрація пантотенату під час запуску підтримується постійною, кількість мкг пантотенату на грам клітин, що виробляються, поступово знижується до концентрації менше 15мкг пантотенату/г вироблених клітин, що є умовою обмеження пантотенатом. Таким чином, в процесі росту система переходить в умови обмеження пантотенатом. Високі співвідношення етанолу і ацетату досягаються шляхом запуску з надлишком H₂. В альтернативі, на ранніх стадіях запуску реактору дають можливість виробляти оцтову кислоту, а потім регулюють співвідношення продуктів шляхом обмеження пантотенату.

ПРИКЛАД 18. ОБМЕЖЕННЯ КОБАЛЬТУ В РЕАКТОРІ

Культура *C. ljungdahlii*, штам ER12, отримувала 62-3500мкг кобальту/г клітин, що виробляються, під час вироблення оцтової кислоти з CO, CO₂ і H₂, тобто, реактор не був обмежений кобальтом (або будь-яким іншим обмежуючим чинником, крім можливості перенесення газу в культуру), і етанол не був виявлений в потоку продукту. Під час обмеження кобальтом для вироблення етанолу з CO, CO₂ і H₂ в *C. ljungdahlii*, штам C-01 подавали 33-48мкг кобальту/г вироблених клітин, при підтриманні всіх інших поживних речовин в надлишку. У цих умовах штам C-01 виробляв 18-26г/л етанолу і близько 4г/л ацетату.

ПРИКЛАД 19. ЗАПОБІГАННЯ АКЛІМАТИЗАЦІЇ ДО НИЗЬКОЇ ОБМЕЖУЮЧОЇ КОНЦЕНТРАЦІЇ КОБАЛЬТУ

Акліматизації до низької обмежуючої концентрації кобальту запобігають шляхом регулювання параметрів ферментації (швидкість газу, швидкість рідини, швидкість перемішування, вміст CO₂), уникаючи істотних змін в поживних речовинах, замість цього підтримуючи порівняно постійну концентрацію поживних речовин, що подаються. Це здійснюють таким чином.

Під час запуску лабораторний CSTR New Brunswick Scientific Bioflo® з *C. ljungdahlii*, штам C-01, отримувал потік рідкого середовища, що містить вітаміни, мікроелементи і солі, необхідні для живлення культури. Концентрація кобальту в живильному середовищі становила 75 млн⁻¹. Це концентрація, яка в поєднанні з повільною швидкістю подачі середовища забезпечує подачу більше 50мкг кобальту на грам клітин, що виробляються (надлишок кобальту), через низьке вироблення клітин в біореакторі. Подібним чином, концентрація пантотенату в середовищі становила 20мг/л,

яка також забезпечує надлишок пантотенату. Однак парціальний тиск H_2 у відхідному газі підтримувався у надлишку величиною 0,55атм. шляхом подачі газу, що містить великі кількості H_2 і не містить CO_2 , і шляхом обережного регулювання швидкості подачі газу і швидкостей перемішування, для досягнення ступеня перетворення CO більше ніж 95% і ступеня перетворення H_2 більше ніж 80%. По мірі досягнення цих високих ступенів перетворення концентрація клітин збільшується від початкового рівня близько 0г/л до ~1,5г/л. Оскільки концентрація кобальту під час запуску підтримується постійною, кількість мкг кобальту на грам клітин, що виробляються, поступово знижується до концентрації менше 50мкг кобальту/г вироблених клітин, що є умовою обмеження кобальтом. Таким чином, в процесі росту система переходить в умови обмеження кобальтом. Високий вихід етанолу досягається шляхом запуску з надлишком H_2 в газі, що подається. В альтернативі, на ранніх стадіях запуску реактору дають можливість виробляти оцтову кислоту, а потім регулюють співвідношення продуктів шляхом обмеження кобальтом.

ПРИКЛАД 20. ПОДАЧА НАДЛИШКУ ВОДНЮ

Під час роботи лабораторного реактора AUTOCLAV™ (Buchi), працюючого як CSTR з рециркуляцією рідини і рециркуляцією клітин, культура *C. ljungdahlii* отримувала надлишок вітамінів, мікроелементів і солей, необхідних для живлення культури. Реактор працював з надлишком H_2 в газі, що подається, таким чином, що відношення молей H_2 в газі, що подається, до суми подвоєної кількості молей перетвореного CO і потроєної кількості молей перетвореного CO_2 становило 5,67. Якщо це відношення не більше 1,0, надлишок H_2 не може бути присутнім в реакторі, і вироблення етанолу не може відбуватися. Крім того, парціальний тиск H_2 у відхідному газі становив 2,61атм., тобто, рівень, що перевищує необхідну умову 0,4атм. для вироблення етанолу за рахунок надлишку H_2 . Нарешті, співвідношення парціального тиску H_2 і парціального тиску CO_2 у відхідному газі становило 10,88, тобто, рівень, який перевищує 3,0 і який забезпечує присутність достатньої кількості H_2 для використання усього присутнього вуглецю. У цих умовах реактор виробляв майже 26г/л етанолу і менше 3г/л ацетату. Продуктивність вироблення етанолу склала більше ніж 200г/л-день. Якщо будь-який з вищезазначених критеріїв не виконується, реактор не може виробляти етанол за рахунок надлишку H_2 . Другий аспект надлишкової подачі H_2 полягає в тому, що вона приводить до додаткового відновлення фередоксина, що окиснюється гідрогеназою.

ПРИКЛАД 21. ОСЛАБЛЕННЯ ІНГІБУВАННЯ СУБСТРАТОМ

Лабораторний CSTR New Brunswick Scientific Bioflo®, працюючий при швидкості перемішування 800об./хв., показав на виході концентрацію CO 10%, хоч до цього він працював лише з 5% CO у відхідному газі. Шляхом зниження швидкості перемішування до 600об./хв. інгібування CO було усунуто, і концентрація CO на виході повернулася до 5%. Це привело до підвищення поглинання H_2 , необхідної умови ефективного використання всього газу, що подається в реактор.

ПРИКЛАД 22. МАСОПЕРЕНОС

Приклад надлишкового масопереносу, ведучого до вироблення етанолу, представляє лабораторний CSTR з рециркуляцією клітин, що містить *C. ljungdahlii*, штам ER12, і працює без обмеження поживними речовинами або надлишку H_2 або CO в газі, що подається. Тобто, пантотенат подається зі швидкістю більше ніж 100мкг пантотенату кальцію на г клітин, що виробляються, і кобальт подається з швидкістю більше за 100мкг на г клітин, що виробляються. H_2 присутній у відхідному газі при 0,2атм., а питома швидкість поглинання CO складає менше 0,3ммоль CO /г клітин-хв. Швидкість перемішування складає 800об./хв. У цих умовах культура виробляє тільки оцтову кислоту (в потоку продукту етанол відсутній). Якщо швидко збільшити швидкість перемішування до 900об./хв. або збільшити швидкість газу приблизно на 10%, тоді етанол виявляється в потоку продукту, доти, доки концентрація клітин не збільшиться, поглинаючи газ, або доти, доки культура не загине через інгібування субстратом.

ПРИКЛАД 23. КОНТРОЛЬ ІНГІБУВАННЯ ОЦТОВОЮ КИСЛОТОЮ, що ВИРОБЛЯЄТЬСЯ

У лабораторному CSTR, що виробляє 8г/л оцтової кислоти і 10г/л етанолу, тривалість утримання рідини знизили з 24 годин до 12 годин на період 36 годин у спробі вимити з реактора оцтову кислоту, яка обмежує здатність культури виробляти більше етанолу. Всі інші робочі умови реактора і живильне середовище залишилися незмінними. По закінченні цього періоду тривалість утримання рідини повернули до 24год. і отримали потік продукту, що містив 3г/л ацетату і 15-25г/л етанолу. Для усунення інгібування продуктом було потрібно декілька спроб. В альтернативі можна додати H_2 в газ, що подається, для регулювання надлишком H_2 , оскільки надлишок CO_2 також може привести до переважання вироблення оцтової кислоти над виробленням етанолу. Ці модифікації запобігають надлишковому виробленню оцтової кислоти і, отже, запобігають небажаному співвідношенню продуктів і низькій продуктивності вироблення етанолу. Потім поновлюють використання надлишку H_2 в газі, що подається, або обмежуючої концентрації рідкофазної поживної речовини.

ПРИКЛАД 24. НАДЛИШКОВА ПОДАЧА МОНООКСИДУ ВУГЛЕЦЮ

Культура *C. ljungdahlii*, штам ER12, що одержувала надлишок поживних речовин (надлишок пантотенату і кобальту) і не одержувала надлишку H_2 в газі, що подається, мала питому швидкість поглинання CO 0,23-0,48ммоль/г-хв., і етанол не був виявлений в потоку продукту. Проте коли культура *C. ljungdahlii*, штам C-01 подібним чином отримувала надлишок поживних речовин і не отримувала надлишку H_2 в газі, що подається, але знаходилася в умовах, коли надлишкова подача CO викликала вироблення етанолу, питома швидкість поглинання CO становила 0,67-1,34ммоль/г-хв. У цих умовах культура виробляла 9,9-12,0г/л етанолу і 2,6-2,7г/л ацетату.

ПРИКЛАД 25. КОНТРОЛЬ СПІВВІДНОШЕНЬ ПРОДУКТІВ ШЛЯХОМ ВИДАЛЕННЯ КЛІТИН

Ферментація газоподібного субстрату (30% CO , 15 H_2 , 10% CO_2 , 45% N_2) здійснюється в CSTR

(рН 5,0, температура 38°C, тиск 138кПа (20 psig)) з використанням *C. ljungdahlii*, штам С-01, з рециркуляцією клітин (тривалість утримання клітин 40 годин і тривалість утримання рідини 6 годин); ріст культури не обмежувався кобальтом, пантотенатом кальцію або будь-якою іншою поживною речовиною. В процесі росту культури досягається така щільність клітин, що питома поглинання (ммоль СО на грам сухих клітин за хвилину) становить 0,5, і вироблення оцтової кислоти переважає над виробленням етанолу. Щоб запобігти такій можливості, збільшують швидкість видалення клітин, щоб запобігти збільшенню щільності клітин, так, щоб стала концентрація клітин зберігалася досить низькою для підтримання питомого поглинання вище 0,5ммоль СО на грам сухих клітин за хвилину. За рахунок цього тривалість утримання клітин знижується до 6-25 годин.

Середовище для вироблення етанолу

Компонент	Кількість на літр
2г/л FeCl ₂ ·4H ₂ O	10мл
85% H ₃ PO ₄	0,05мл
Мікроелементи MPFN ^a	20мл
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,60г
NH ₄ Cl	2,00г
NaCl	0,20г
KCl	0,15г
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,50г
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,20г
Цистеїн-HCl·H ₂ O	0,25г
Розчин вітамінів ^b	Змінна ^c

^a Мікроелементи MPFN містять (на літр розчину): 10мл 85% H₃PO₄, 0,10г ZnSO₄·7H₂O, 0,03г MnCl₂·4H₂O, 0,3г H₃BO₃, 0,20г CoCl₂·6H₂O, 0,02г CuCl₂·H₂O, 0,04г NiCl₂·6H₂O, 0,03г NaMoO₄·2H₂O, 2,00г FeCl₂·4H₂O, 0,01г Na₂SeO₃ і 0,10г Na₂WO₄·2H₂O. ^b Розчин вітамінів містить 20,6мг/л d-біотину, 50,6мг/л тіаміну-HCl і 50,5мг/л кальцієвої солі d-пантотенової кислоти. ^c Істотно змінюється від 0,3-0,5мл під час інокуляції до 0,7-0,8мл при високих швидкостях газу

Таблиця 1

Таблиця 2

Сумарне порівняння параметрів технологічного процесу і результати прикладів контролюючих механізмів

Приклад №	Контроль механізм	Концентрації продукту		Продуктивність вироблення етанолу (г/л·день)	Подача пантотенату (мкг пантотенату/г вироблених клітин)	Подача кобальту (мкг кобальту/г вироблених клітин)	H ₂ , що подається (2COперетв + 3CO ₂ перетв)	Парціальний тиск H ₂ у відхідному газі (атм.)	Питома поглинання СО (ммоль/г клітин·хв.)
		Етанол (г/л)	Ацетат (г/л)						
3	Масоперенос	0	10-13	0	1575-3150	1734-3468	0,46	0,06-0,07	0,275-0,48
3	Масоперенос	0	10-14	0	2250-3600	62-99	0,875	0,11-0,20	0,33-0,40
4	Пантотенат	15-19	1,5	11,5-14,5	18-24	5000-6660	1,03	0,55-0,64	0,23-0,30
4	Пантотенат	18	3	17,4	8,1	3960	1,14	0,60-0,65	0,33
5	Кобальт	26	4	15,6	15,2	33	0,94	0,63	0,37
5	Кобальт	18	4	27,0	85,7	47,6	1,03	0,60	0,50
6	Надлишок СО	9,9	2,6	29,0	97	83,6	1,09	1,6	1,34
6	Надлишок СО	12,0	2,7	60,0	294	735	0,30	0,6	0,67
7	Надлишок H ₂	10,0	3,3	6,7	900-1125	991-1239	1,96	0,7-0,87	0,28-0,35
7	Надлишок H ₂	25,96	2,85	215-240	46	460	5,67	2,61	1,68

Таблиця 3

Результати зсуву співвідношення продуктів штамів *Clostridium ljungdahlii*

С. ljungdahlii Штам	Середовище	Конц. клітин* (г/л)	Перетворення газу		Концентрація продукту	
			СО	H ₂	Етанол	Ацетат
ER12	Збільшення оцтової кислоти	1,1	90	80	0	10
ER12	Обмеження пантотенату	0,3	88	20	2,5	0
ER12	Збільшення оцтової кислоти	0,55	90	85	1,0	5,5
ER12	Обмеження пантотенату	0,5	90	20	10	1,0
ER12	Збільшення оцтової кислоти	0,8	100	93	1	7
ER12	Обмеження кобальту	1,3	80	20	9	3
С-01	Збільшення оцтової кислоти	1,2	96	90	1	8
С-01	Обмеження пантотенату	0,8	60	30	4	0
С-01	Збільшення оцтової кислоти	1,2	96	90	<1	9
С-01	Обмеження кобальту	2,5	80	20	17	2
PETC	Збільшення оцтової кислоти	0,8	65	55	2	10
PETC	Обмеження кобальту	1,0	95	55	8	1

* На основі сухої ваги клітин

Таблиця 4

Дані сталого стану для перетворення СО-збагаченого газу в етанол з використанням *C. ljungdahlii*, штам С-01

GRT	LRT	Швидкість переміш.	Конц. клітин*	Перетворення газу (%)		Продукти (г/л)		Продуктивність вироблення етанолу
(хв.)	(год.)	(об/хв.)	(г/л)	СО	H ₂	Етанол	Ацетат	(г/л·день)
13	32,4	700	2,44	91	57	21,6	3,9	16,0
11,93	25,7	750	2,51	92	54	20,6	3,6	19,2
12,67	25,6	750	2,60	93	61	18,7	4,7	17,6
10	24,5	750	2,75	92	43	20,4	6,1	20,0

Продовження таблиці 4

11,54	23,8	750	2,65	92	40	20,4	5,3	20,6
12,10	23,8	750	2,77	88	18	21	3,1	21,1
13,8	23,8	750	2,70	90	25	18	2,5	18,2
12,7	23,8	750	2,70	92	35	20	3,8	20,2
13,3	24,0	800	2,70	85	10	17,5	5,0	17,5
14,81	31	750	2,50	92	30	25	2,5	19,4
16,9	31	750	3,60	90	18	23	3,0	17,8
18,5	33	750	2,60	94	50	24	3,5	17,5
17,2	34	750	2,50	91	40	24	3,5	16,9
18,5	34	750	2,30	95	63	23	4,0	16,2
19,2	40,6	750	2,70	94	50	28,5	4,0	17,4
19,0	55	750	2,70	94	20	33	4,0	14,4

* На основі сухої ваги клітин

Таблиця 5

Дані сталого стану для перетворення газу, що містить
27% CO, 16% H₂, 51% N₂, в етанол з використанням *C. ljungdahlii*, штам C-01. Без рециркуляції клітин

GRT	LRT	Швидкість пере- міш.	Конц. клітин*	Перетворення газу (%)		Продукти (г/л)		Продуктивність вироблення етанолу
(хв.)	(год.)	(об./хв.)	(г/л)	CO	H ₂	Етанол	Ацетат	(г/л-день)
8,89	23,8	750	2,3	84	57	11	2,5	11,1
8,3	23,8	900	2,6	89	55	12	2,0	12,1
8,3	27,7	900	2,7	89	47	15	3,0	13,0
7,1	33,3	900	3,0	86	37	19	3,0	13,7
7,4	33,3	900	3,0	87	40	19,5	3,0	14,1
6,34	33,3	900	3,0	86	37	21	3,5	15,1
6,18	33,3	900	3,0	86	41	20,9	3,1	15,1
5,72	34,3	900	3,0	85	40	22,1	3,8	15,5
5,12	33	900	3,7	85	40	25,0	4,0	18,2
4,59	33	900	4,1	83	33	25	3,5	18,2
4,59	29	900	4,0	80	35	23	4,0	19,0
4,76	29	900	3,9	90	35	19	5,0	15,7
4,25	28	900	4,2	80	30	23	3,0	19,7
5,5	37	900	3,4	84	40	23	3,0	14,9
5,26	31	900	3,8	84	50	23	3,0	17,8
5,71	31	900	3,7	80	28	26	3,5	20,1
6,25	31	900	3,75	82	30	25,5	3,0	19,7
6,66	31	900	3,6	86	64	22	4,0	17,0

* На основі сухої ваги клітин

Таблиця 6

Дані сталого стану для перетворення газу, що містить
50% H₂, 45% CO і 5% CH₄, в етанол з використанням ізоляту O-52 в CSTR з рециркуляцією клітин

GRT	XRT	LRT	Конц. клітин*	Перетворення газу (%)		Продукти (г/л)		Продуктивність вироблення етанолу
(хв.)	(год.)	(год.)	(г/л)	CO	H ₂	Етанол	Ацетат	(г/л-день)
12,5	46,4	23,2	3,8	96,3	81,2	20,4	4,4	21,1
9,7	43,2	17,3	4,9	86,7	49,9	21,1	3,5	29,3
9,2	43,2	17,3	4,6	89,4	64,5	20,5	5,1	28,4
7,5	43,2	17,3	5,0	81,8	42,1	22,2	3,7	30,8
9,2	49,4	17,3	4,6	85,3	52,1	21,1	4,4	29,3
8,4	46,0	16,1	4,5	85,2	61,4	20,8	5,1	31,0
6,8	54,3	16,3	4,7	84,7	57,7	23,4	5,7	34,5
7,2	54,3	16,3	4,0	83,1	55,2	19,0	4,4	28,0
7,4	54,3	16,3	5,0	86,6	66,7	21,9	5,5	32,2
6,4	55,6	16,7	5,6	83,3	53,1	23,5	4,9	33,8
6,2	41,6	14,5	5,7	82,5	55,0	20,1	5,0	33,3
6,0	41,6	14,5	6,0	82,5	50,0	21,5	3,0	35,6
6,0	34,2	12,0	5,7	84,0	56,0	19,5	4,5	39,0
5,7	34,2	12,0	5,7	81,0	45,0	18,0	4,5	36,0

* На основі сухої ваги клітин

Таблиця 7

pH і склад рідких зразків при зсуві
співвідношення ацетату і етанолу в присутності надлишку CO

Час	pH	Конц. клітин * (г/л)	Етанол (г/л)	Ацетат (г/л)	Бутанол (г/л)
0	4,69	2,4	10,3	3,1	0,3
30	5,28		11,4	1,5	0,3
35	5,28	2,4	11,6	1,6	0,3
50	4,98		11,3	1,8	0,3
80	4,73	2,4	10,9	2,9	0,3

* На основі сухої ваги клітин

Таблиця 8

Дані ферментації газу ізолятом 0-52 з рециркуляцією клітин і води

Час (год.)	% оборот- ної води	Конц. клітин * (г/л)	Перетворення газу		Продукти			Продуктивність вироб- лення етанолу г/л-день
			CO (%)	H ₂ (%)	Етанол (г/л)	Ацетат (г/л)	Чистий ацетат (г/л)	
0-75	25	2,1	95	68	12	4	4	12
75-193	50	2,1	95	75	15	6	5	15
193-462	75	2,1	92	60	17	5	4	17
462-554	50	1,6	85	30	17 13	5	3	12-16
554-669	75	2,6	92	75	13 19	5	3	12-18
669-943	100	3,0	92	70	23	6	3	23
943-1087	100	3,0	92	60	23	6	0	23
1087-1232	100	2,7	92	60	23	6	-0	23
1232-1375	100	3,0	91	60	27	6	-1	27
1375-1534	100	3,5	88	35	23	5	0	23

* На основі сухої ваги клітин

Всі опубліковані документи приводяться тут у вигляді посилань. Різноманітні модифікації і варіації даного винаходу включаються у вищевикладений опис і повинні бути очевидні досвідченому

фахівцеві в цій області. Такі модифікації і перероблення композицій і способів за винаходом входять в область винаходу, викладену в приведеній нижче формулі винаходу.

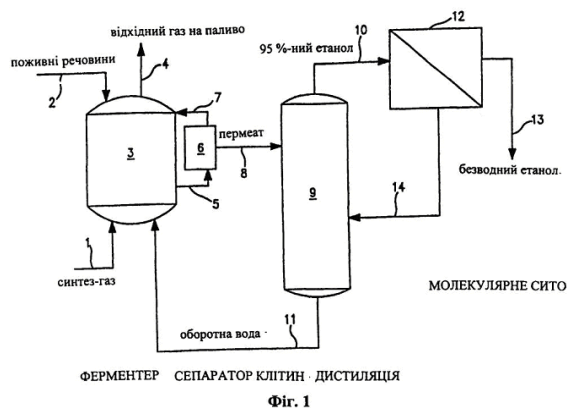


Fig. 1

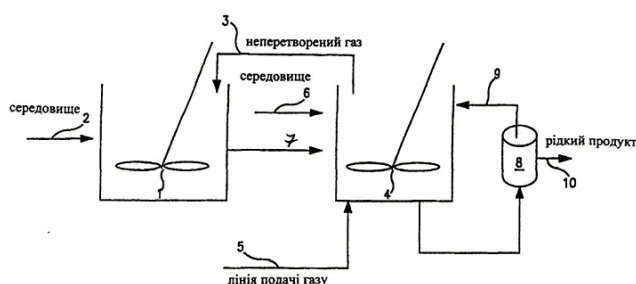


Fig. 2