



[B] (11) **KUULUTUSJULKAISU** 72141
UTLÄGGNINGSSKRIFT

C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 13 04 1987

(51) Kv.Ik.4/Int.Cl.4 C 12 P 7/16

SUOMI—FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patentihakemus — Patentansökning	833854
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	21.10.83
(23) Alkupäivä — Giltighetsdag	21.10.83
(41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig	19.05.84
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. — Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	31.12.86
(86) Kv. hakemus — Int. ansökan	
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet	18.11.82
USA(US) 442806 Toteennäytetty-Styrkt	

- (71) CPC International Inc., International Plaza, Englewood Cliffs,
New Jersey, USA(US)
- (72) Robert E. Heady, Park Forest, Illinois,
Jeffrey R. Frankiewicz, Lombard, Illinois, USA(US)
- (74) Oy Kolster Ab
- (54) Butanolin valmistus jatkuvalla fermentointiprosessilla - Framställning
av butanol medelst kontinuerlig fermentationsprocess

(57) Tiivistelmä

Keksinnön kohteena on parannettu menetelmä
butanolin jatkuvaksi valmistamiseksi fermentoimalla hiilihydraatteja C. acetobutylicum:n kanssa. Tässä prosessissa yhdistetään jatkuva ympin tuottaminen suuressa laimennusmäärässä ja fermentointiliemen palauttaminen aineksen läpi, joka adsorboi butanolia, jolloin ylläpidetään voimakas solutuotanto fermentointireaktorissa pitkiä ajanjaksoja.

(57) Sammandrag

Uppfinningen avser en förbättrad process för kontinuerlig produktion av butanol genom fermentation av kolhydrater med C. acetobutylicum. Denna process kombinerar kontinuerlig ympproduktion med hög utspädningsmängd och returnering av fermentationsvätskan genom ett material som adsorberar butanol, varvid en kraftig cellproduktion upprätthålls i fermentationsreaktorn för långa tidsperioder.

Butanolin valmistus jatkuvalla fermentointiprosessilla

5 Keksinnön kohteena on menetelmä butanolin tuottami-
seksi fermentoimalla hiilihydraattia *C. acetobutylicum*-kan-
nalla, adsorboimalla tuotettu butanoli butanolia adsorboivaan
aineeseen ja eristämällä butanoli desorboimalla se butanolia
adsorboivasta aineesta.

10 Hiilihydraattien fermentointia *Clostridium acetobutyli-*
cum:lla (joka tämän jälkeen lyhennetään *C. acetobutylicum*'ksi
butanolin ja asetonin muodostamiseksi on esitetty US-patentti-
julkaisussa 1315585, Weizmann. Tätä menetelmää käytettiin
monia vuosia asetonin ja butanolin valmistukseen, ja sivutuot-
teena saatiin tietty määrä etyylialkoholia.

15 Lopulta mikrobiologiset prosessit korvattiin kemialli-
silla prosesseilla, jotka antavat samoja tuotteita käyttäen
halpoja fossiilipolttoaineraaka-aineita. Kuitenkin asteittai-
nen kiviöljypolttoaineen vähentyminen, josta on ollut seurauk-
sena petrokemiallisten raaka-aineiden hinnan nousu, on herät-
tänyt uudelleen eloon mielenkiinnon fermentointireaktioon,
20 jossa käytetään hiilihydraatteja, jotka ovat uusiutuvia raaka-
aineita.

Eräs ongelma, joka kohdattiin aikaisemmassa kaupalli-
sessa butanolin tuotannossa fermentointiprosessilla, oli
25 pitkä aika ennenkuin mikro-organismi alkoi tuottaa hyväksyttä-
viä määriä butanolia. Näissä prosesseissa käytettiin tyypil-
lisesti emäviljelmää, joka varastoitiin itiöinä. Fermentoin-
nin alullepanemiseksi itiöt pantiin vesipitoiseen väliaine-
eseen, joka sisälsi erilaisia ravinneaineita, altistettiin
30 lämpökäsittelylle ja siirrettiin sitten kolmen kasvuvaiheen
jälkeen jatkuvasti suureneviin astioihin ennenkuin niitä
käytettiin fermentointisäiliön ympppäämiseen. Tämä prosessi
vaati n. 3 päivää ymppekehitystä varten sekä lisäksi 2 - 3
päivää fermentoinnin loppuunsaattamiseksi.

35 Toinen ongelma panosfermentoinnissa oli mikro-organis-
min epästabiilisuus yli n. 1 paino-%:n butanolipitoisuuksissa.
Solut kuolevat nopeasti sen jälkeen kun tämä tuotteen väke-

vyystaso saavutetaan. Siten fermentointiliemestä saadaan tuotetta ainoastaan alhaisissa pitoisuuksissa. Tällainen prosessi vaatii suuren fermentointikapasiteetin tuottamaan käytännöllisiä määriä liuotinta ja on kallis liuottimien talteenottamiseksi fermentointiliemestä alhaisten väkevyyksiensä johdosta.

On todettu, että jos butanolifermentointi suoritettaisiin jatkuvana menetelmänä, voitaisiin voittaa joitakin panoksittaiseen systeemiin liittyviä vaikeuksia. Tällainen prosessi tekisi fermentoreiden käytön tehokkaammaksi poistamalla tuottamattoman ajan panoksien välillä, kun fermentori on tyhjennettävä, puhdistettava, täytettävä, seriloitava ja jäähdytettävä. Tähän asti tällaisten prosessien käyttökel-
poisuus on ollut vähäinen johtuen viljelyn epästabiilisuu-
desta, kontaminaatio-ongelmista tai butanolin vähäisestä
volumetrisestä tuotannosta.

Käsite "volumetrinen tuottavuus", kuten sitä tässä hakemuksessa käytetään, tarkoittaa tuotteen määrää, joka tuotetaan jatkuvassa fermentoinnissa yksikköä kohti fermentointilientä aikayksikköä kohti. Se ilmaistaan yleensä grammoina litra/tuntia kohti, lyhennettynä g/l-h.

Erään kuvauksen jatkuvasta butanolifermentointitutkimuksesta ovat esittäneet Dyr et al. julkaisussa: Continuous Culture of Microorganisms (prague Symposium), s. 210-227, Prague: Chzechoslovakia Academy of Sciences (1958). Monivai-
heisen fermentointisysteemin avulla ja säätämällä laimennus-
nopeus pystyttiin voittamaan joitakin viljelyn epästabiili-
suusongelmista, mutta ilmoitetun suurimman butanolipitoisuu-
den osoitettiin olevan volumetriseltä tuottavuudeltaan aino-
astaan n. 0,25 g/l-h systeemissä.

Toinen menetelmä, jota on ehdotettu jatkuviin fermentointeihin liittyvän veiljelyn epästabiilisuusongelman välttämiseksi, on mikro-organismin itiöiden tai sellaisten kasvamattomien solujen käyttö, jotka on immobilisoitu geeliin (Häggström et al. International Application PCT/SE80/00231).

Vaikka tämä tekniikka aikaansaa menetelmän jatkuvan fermentoinnin ylläpitämiseksi verraten pitkiksi ajanjaksoiksi, se käyttää kallista raaka-ainetta ja prosessia mikro-organismin immobilisoimiseksi. Ilmoitettu volumetrinen butanolin tuotanto tällä menetelmällä on n. 0,33 g/l-h.

Nyt on keksitty uusi menetelmä, jolla vältetään panoksittaiseen prosessiin luontaisesti liittyvät ongelmat, ja joka sallii fermentoimisen suorittamisen jatkuvana prosessina useampia päiviä ilman viljelmän tuhoutumista. Lisäksi tämä prosessi voidaan helposti toteuttaa käyttäen raaka-aineita, joita on helposti saatavissa maissin märkäjauhatusteollisuudesta ja sillä saadaan paljon suurempi volumetrinen butanolin tuotto. Prosessi tarjoaa edelleen lisäpiirteinä taloudellisen keinon konsentroida ja talteenottaa fermentoinnissa syntynyttä butanolia.

Keksintö tarjoaa menetelmän butanolin tuottamiseksi jatkuvasti fermentoimalla hiilihydraattia C. acetobutylicum-kannalla, adsorboimalla tuotettu butanoli butanolia adsorboivaan aineeseen ja eristämällä butanoli desorboimalla se butanolia adsorboivasta aineesta. Keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaista, että se käsittää vaiheet, joissa

C. acetobutylicum-kannan ATCC 4259 tai ATCC 39236 ymppeä tuotetaan jatkuvasti erillisenä reaktioastiassa laimennysnopeudella noin 0,2 - noin 0,5/h;

ymppeä jatkuvasti syötetään käymisväliaineeseen, jonka pH pidetään alueella noin 4,5 - noin 5,5 ja lämpötila alueella noin 34°C - noin 40°C; ja

osa käymisväliaineesta jatkuvasti kierrätetään butanolia adsorboivan aineen läpi nopeudella, joka on riittävä ylläpitämään alle noin 1 paino-%:n butanolipitoisuuden käymisväliaineessa.

Tämän keksinnön fermentointiprosessi käsittää hiilihydraatin fermentoinnin C. acetobutylicum:n kannalla butanolin muodostamiseksi. Lisäksi muodostuu pienempiä määriä asetonia ja muita liuottimia. Yleisesti voidaan käyttää mitä tahansa

C. acetobutylicum-kantaa, joka muodostaa ensisijaisesti butanolia. Eräs käyttökelpoinen kanta tähän keksinnön toteuttamiseen on C. acetobutylicum-kanta ATCC 4259, jota on saatavissa kokoelmasta American Type Culture Collection, Rockville, Maryland. Edullinen kanta käytettäväksi tässä keksinnössä on C. acetobutylicum, ATCC 39236:n itiötön kanta, joka on yksityiskohtaisesti kuvattu otsikolla "Improved Strain of Clostridium acetobutylicum and Process for Its Preparation", käsittelynalaisessa patenttihakemuksessa, joka on jätetty samanaikaisesti tämän hakemuksen kanssa.

Tässä keksinnössä käytetty hiilihydraatti voi olla mikä tahansa hiilihydraatti, joka voidaan fermentoida C. acetobutylicum:n kantaa käyttäen. Nämä hiilihydraattilähteet sisältävät liuennaita tärkkelyksiä ja sokerisiirappeja sekä myös glukoosia tai sakkaroosia puhtaassa tai raa'assa muodossa. Fermentointiväliaineen tulisi sisältää myös ravinnearaineita ja muita kasvutekijöitä, joita tarvitaan käytetyn mikro-organismin kasvattamiseen ja uudelleentuottamiseen.

Kun C. acetobutylicum kannat ovat ATCC 4259 tai ATCC 39236, on eräs sopiva väliaine tämän keksinnön jatkuvan prosessin toteuttamiseksi vesipitoinen liuos, jossa on alhaisen D.E.:n (dekstroosiekvivalentti) omaavaa tärkkelyshydrolysaattia, johon on lisätty pieni määrä n. 0,5 - n. 2 paino-%, kuivapainosta laskettuna, maissin liotusliuosta. Alhaisen D.E.:n (n. 5 D.E. - n. 20 D.E.) omaavia tärkkelyshydrolysaatteja, joita syntyy tärkkelyksen osittaishydrolyysissä, on helposti saatavissa maissin jauhatusteollisuudesta. Samalla tavalla maissin liotuslientä, jota syntyy, kun maissia liotetaan rikkidioksidin laimealla liuoksella, on saatavissa maissin märkäjauhatusteollisuudesta. Kun väliaine, jota käytetään jatkuvan fermentoinnin toteuttamiseen, käsittää ainoastaan matalan D.E.:n omaavaa tärkkelyshydrolysaattia ja maissin liotuslientä mikroorganismin kasvua parannetaan jaksottaisesti lisäämällä fermentoriin maissigluteenilietettä. Tämä liete samoin kuin muut kaksi aineosaa ovat helposti saatavia

raaka-aineita, joita saadaan maissin märkäjauhatuksesta ja muodostavat siten taloudellisen ja uusiutuvan lähteen hiilihydraatille ja kaikille muille ravinneaineille, joita tarvitaan mikro-organismin kasvua varten.

5 Tämän keksinnön fermentointiprosessi pannaan alulle ympäämällä steriiliä väliainetta ymppiä tuottavaan reaktoriin C. acetobutylicum:n ymppiviljelmällä. Fermentoinnin annetaan
10 jatkaa kunnes solujen hyvään kasvuun on päästy. Reaktoria käytetään sitten jatkuvana reaktorina jolloin steriili väliaine virtaa reaktoriin ja väliaine sekä solut virtaavat reaktorista pois fermentointireaktoriin. Tällä tavalla syntyy ymppiä, ja se syötetään jatkuvasti fermentointireaktoriin, jossa butanolin tuotanto tapahtuu.

Jatkuvaa ymppiä tuottavaa reaktoria käytetään laimennusmäärällä, joka estää liuottimien kasautumisen väliaineeseen ja antaa voimakkaita viljelmän terveitä soluja vähäisessä määrin butanolille altistettuina. Tämän keksinnön selityksessä ilmaisu "laimennusaste" tai "laimennusmäärä" tarkoittaa arvoja, jotka saadaan jakamalla reaktorin läpi tunnissa
20 virtaavan aäliaineen virtausmäärä tilavuusyksikköinä reaktorin toimintatilavuudella mitattuina samoina tilavuusyksikköinä. Sen dimensio on 1/h.

Käyttämällä ymppiä tuottavaa reaktoria laimennusmäärällä n. 0,2 - n. 0,5/h muodostuu jatkuvasti terveitä soluja
25 vähäisessä määrin butanolille altistettuna ja ne kulkevat reaktoriastiasta fermentointireaktoriin, jossa liuotintuotanto etenee. Fermentointireaktoria käytetään myös jatkuvalla tavalla, mutta paljon pienemmällä laimennusmäärällä, kuin astiassa, jossa ymppi tuotetaan.

30 Oikea laimennusmäärä fermentointireaktorissa riippuu hiilihydraatin pitoisuudesta fermentointiväliaineessa ja nopeudesta, jolla väliainetta kierretään butanolia adsorboivan aineen läpi. Tehokasta fermentointia varten laimennus- ja palautusmäärät säädetään niin, että hiilihydraatti tulee pää-
35 asiallisesti kokonaan kulutetuksi. Esimerkeissä laimennusmäärä pidettiin vakiona 0,03/h ja palautusmäärää vaihdeltiin hiilihydraatin pitoisuuden mukaan väliaineessa.

On mahdollista toteuttaa jatkuva ymppituotanto kahdessa tai useammassa reaktioastiassa, joita käytetään sarjassa. Tärkeä ehto on, että jokaista näistä ymppeä tuottavista astioista täytyy käyttää sellaisella laimennusmäärällä, että terveitä, voimakkaasti kasvavia soluja syntyy jatkuvalla tavalla vähäisessä määrin butanolille altistettuina. Ympinmuodostus sekä liuottimen tuottaminen suoritetaan lämpötilassa välillä n. 34°C - n. 40°C ja pH:ssa n. 4,5 - n. 5,5. Reaktiot saatetaan tapahtumaan anaerobisissa olosuhteissa käyttäen väliainetta, joka on steriloitu joko kuumassa tai muulla fermentointialalla hyvin tunnetulla menetelmällä.

Jatkuva fermentointireaktori on yhdistetty laitteeseen, kuten kolonniin, joka sisältää ainetta, joka adsorboi butanolia. Lientä fermentointireaktiosta kierretään tämän laitteen läpi ja takaisin reaktoriin jatkuvasti suuren osan butanolia poistamiseksi fermentointiväliaineesta. Fermentointilientä johdetaan adsorboivan aineen läpi sellaisella nopeudella, että butanolipitoisuus fermentointireaktorissa pysyy tasolla, joka on alle 1 paino-%, edullisesti alle n. 0,8 paino-%.

Fermentointireaktoriin kytketyssä laitteessa käytetty adsorboiva aine voi olla mikä tahansa aine, joka adsorboi butanolia häiritsemättä fermentointireaktiota. Aikaisemmissa tutkimuksissa on todettu, että aktiivihili adsorboi butanolia. Sulzbacker, US-patenttijulkaisu 2474170, käytti tätä ainetta liuottimien poistamiseen suodatetusta liemestä fermentoinnin jälkeen. Yamazaki et al. , Nippon Nogeï Kagaku Kaichi, 32, 758-770 (1958) esittävät, että aktiivihilipussin ripustamista panosfermentatioon voitaisiin käyttää parantamaan sokerin muuttumista butanoliksi. Åsken julkaisussa raportissa laitoksesta Massachusetts Institute of Technology (Alcohol Fuels Prosess R/D Newsletter, sivut 38-39, Winter 1980) todetaan kuitenkin, että hiili häiritsee fermentointia ja on ei-toivottava tähän tarkoitukseen.

Tässä on todettu, että rakeinen aktiivihili on sopiva butanoliadsorbentti tässä prosessissa. Muita adsorbentteja ovat molekyyliseulat ja adsorboivat hartsit. Eräs erityisen

sopiva adsorbentti on PCB Pittsburgh aktiivihili, seulaluku 12-30 mesh (US-standardiseulakoko seula-aukoilla 1,68 mm - 0,59 mm), jota toimittaa Calgon Corporation, Pittsburgh, Pennsylvania.

5 Fermentointiliemen jaksottainen virtausuunnan kääntäminen adsorbenttiainetta sisältävän laitteen läpi auttaa ylläpitämään hyvää virtausta laitteen läpi. Tällä tavalla suurin osa soluista, jotka ovat kasautuneet adsorboivaan aineeseen, palautuvat fermentointireaktoriin.

10 Fermentointiliemen vieminen adsorboivan aineen läpi poistaa butanolin ja muut aineet, jotka ovat myrkyllisiä C. acetobutylicum:lle. Tällä tavalla edistetään tehokasta fermentointia, jonka tuloksena on miltei täydellinen hiilihydraatin fermentointi sinnoinkin, kun sitä on läsnä väliaineessa niinkin suuressa määrässä kuin 15%. Adsorboivan aineen, kuten aktiivihilien käyttö, butanolin ja muiden liuottimien poistamiseksi fermentointiliemestä tarjoaa myös taloudellisen keinoon butanolin talteenottamiseksi. Kun hiili on kyllästynyt butanolilla, butanoli voidaan desorboida hiilestä asetonin tai
15 muiden höyryjen avulla, kuten on esitetty US-patenttihakemuksessa 327 849, joka on jätetty 7.12.1981.

20 Poistovirtausta jatkuvatoimisesti fermentointireaktoriin, joka virtaus sisältää pieniä määriä butanolia ja muita liuottimia, voidaan käsitellä tavanomaisin menetelmin näiden mutanttien talteenottamiseksi.

25 Seuraavat esimerkit kuvaavat lähemmin tämän keksinnön suoritusmuotoja. Kaikki osat ovat paino-osia ja prosentit ovat paino-prosentteja ellei nimenomaan toisin ole esitetty.

30 Liuotinväkevyydet määritettiin käyttäen suurtehoneste-kromatografiaa (HPLC). Komponentit analysoitiin kromatografi-sesti eluoimalla 0,006 N H_2SO_4 :llä kationinvaihtohartsista vetymuodossa. Eluoidut komponentit havaittiin differenti-aalirefraktometrin avulla, merkittiin graafisesti tallentimeen ja määritettiin kvantitatiivisesti käyttäen elektronista
35 integraattoria. Käyrän alapuolella oleva alue, joka edustaa kunkin komponentin pitoisuutta, on esitettyprosenttina

kokonaispinta-alasta. Yhdistelmä on esitetty julkaisussa
" Analysis of Carbohydrate Mixtures by Liquid Chromatography",
Am. Soc. Brew. Chem. Proc. 1973, sivut 43 - 46. Erotukset
tehtiin 0,3048 m:n HPX-87-kolonnissa vetymuodossa, jota saa-
5 daan firmasta Bio-Rad Laboratories, Richmond, California.

Jäljellejäänyt kokonaishiilihydraatti (RTC) ferment-
tointiväliaineessa mitattiin fenolirikkihappomenetelmällä.
Tämän ovat yksityiskohtaisesti selostaneet Dubois et al.,
10 "Colorimetric Method Determination of Sugars and Related
Substances", Anal. Chem. 28, 350-356 (1956).

Esimerkki 1

Kokoelmasta American Type Culture Collection, Rock-
ville, Maryland, saatiin kannan C. acetobutylicum ATCC 4259
15 viljelmä, ja sitä pidettiin itiöitä muodostavassa tilassa
peltomullan, hiekan ja kalsiumkarbonaatin seoksessa. Ympä-
jatkuva viljelyä varten kehitettiin 125 ml:n Erlenmeyer-
ympäyspullossa, joka sisälsi 75 ml vesipitoista väliai-
netta, jossa oli kuivana laskettuna 6-% 10 D.E. tärkkelys-
20 hydrolysaattia (tuottaa firma Grain Processing Company,
Muscatine, Iowa, Maltring M-100:na) ja 0,75 %, kuiva-
aineesta laskettuna, maissin liotuslientä, jota tuottaa
firma Corn Products Unit of CPC International Inc.,
Englewood Cliffs, New Jersey, koodina E801). Väliaineen pH
25 säädettiin 6,6:een 4 N NaOH-liuoksella ennenkuin se steri-
loitiin kuumentamalla autoklaavissa 121 °C:ssa 20 minuut-
tia. Ympäripullossa olevaa jäädytettyä steriiliä väliainet-
tä ympättiin 5 ml:lla saman väliaineen sisältämän vil-
jelmän itiöiden kuumashokkikäsiteltyä suspensiota. Kuuma-
30 shokkikäsitely suoritettiin suspendoimalla ensin n. 0,5 g
multa-itiösuspensiota 10 ml:aan ympäri Väliainetta. Suspen-
sio pantiin sitten kiehuvaan veteen 90 sekunniksi ja jääh-
dytettiin nopeasti huoneen lämpötilaan. Ympäripulloa ympä-
tyine väliaineineen inkuboitiin anaerobisessa kammiassa 21
35 tuntia 35 °C:ssa.

Jatkuva fermentointi toteutettiin kolmivaheisessa
fermentointisysteemissä anaerobisissa olosuhteissa. Ensimmä-

mäisen ja toisen vaiheen fermentorit olivat 2-litran New Brunswick Bioflow, Model C-30 vakio astioita, joissa oli pohjasta käytettävät magneettisekoittimet. Kolmannen vaiheen fermentori oli 14 litran astia, jossa oli pohjasta käytettävä magneettisekoitin. Käyttötilavuudet näissä kolmessa fermentorissa olivat vastaavasti 725 ml, 1450 ml ja 9,5 l. Jokaista fermentoria sekoitettiin nopeudella 200 r/min. Fermentointia varten käytetty vesipitoinen väliaine sisälsi 7,5 paino-%, kuiva-aineesta laskettuna, 10 D.E. tärkkelyshydrolysaattia ja 0,75 paino-%, kuiva-aineesta laskettuna, maissin liotuslientä, joka oli säädetty pH-arvoon 5,0-5,1 4 N NaOH:lla. Fermentointi aloitettiin ympäällä ensimmäisen vaiheen fermentori 75 ml:lla ympäilijelmää sen ensin täyttämisen jälkeen kasvuväliaineella, jota ensin oli suihkutettu CO₂:lla (anaerobista laatua) 30 minuuttia ja säädetty pH-arvoon 6,1-6,2 väkevällä ammoniumhydroksidilla. Ensivaiheen fermentointia pidettiin 37 °C:ssa 4 tuntia ympäämisen jälkeen ennen väliaineen virtaamisen aloittamista ulos ja sisään fermentorista.

Koko seos, joka virtasi ensimmäisestä fermentorista, vietiin toisen vaiheen fermentoriin, joka oli sitä ennen täytetty 850 ml:lla samaa steriiliä väliainetta kuin ensimmäiseen fermentoriin lisätty. Tuoretta steriiliä väliainetta lisättiin myös toisen vaiheen fermentoriin samalla nopeudella kuin poistovirtaus ensimmäisen vaiheen fermentorista kulki siihen. Poistovirtaus toisen vaiheen fermentorista johdettiin kolmannen vaiheen fermentoreihin. Kaikkien fermentoreiden lämpötila säädettiin 37 ° ± 1 °C:seen. Ensivaiheen fermentoria säädettiin lisäämällä ammoniumhydroksidia niin, että pH ei laskenut alle 5,0:n ja toisen vaiheen fermentoria säädettiin lisäämällä 4 N NaOH niin, että sen pH ei laskenut alle 5,0:n. pH-arvoa ei säädetty kolmannen vaiheen fermentoreihin. Kun kolmannen vaiheen fermentorit oli täytetty haluttuun tasoon (9,5 l) poistovirtauksella toisen vaiheen fermentorista, annettiin viljelyliemen virrata samalla nopeudella kuin se tuli toisen vaiheen fermentorista. Virtausnopeudet säädettiin niin, että ensimmä-

mäisen ja toisen vaiheen fermentoreiden (jotka tuottivat ymppeä), laimennusnopeudet olivat n. 0,45/h ja kolmannen vaiheen fermentoreissa n. 0,031/h. Nämä virtausnopeudet tekivät mahdolliseksi toisen vaiheen fermentorin syöttää kahta kolmannen vaiheen fermentoria.

Väliainetta yhdessä kolmannen vaiheen fermentoris-
sa täydennettiin lisäämällä joka 24. tunnin kuluttua 10-
%:sta vesipitoista lietettä, joka sisälsi 25 g, kuiva-ai-
neena laskettuna, maissigluteenia. Tämä liete säädettiin
pH-arvoon 5,2 4 N NaOH:lla ja steriloitiin ennen lisää-
mistä.

Jaksottaisten väliaikojen jälkeen lieminäytteitä
kummastakin kolmannen vaiheen fermentorista lingottiin
sakkojen poistamiseksi ja niiden päällä olevat nesteet
analysoitiin. Taulukossa I esitetyt tulokset osoittavat,
että butanolia syntyy kummassakin fermentorissa ja että
fermentori, joka sisältää lisättyä gluteenia, sisältää
jonkin verran vähemmän jäämähiilihydraattia yhteensä.

TAULUKKO I

Jatkuva fermentointi
(kolme vaihetta)

5	Aika (tuntia)	Fermentori, johon on lisätty gluteenia			Fermentori, johon ei ole lisätty gluteenia		
		pH	RTC ^{a)} (mg/ml)	Butanoli (g/100 ml)	pH	RTC ^{a)} (mg/ml)	Butanoli (g/100 ml)
	21	4,8	67,3	0,01	4,6	59,3	0,02
	27	4,5	61,6	0,03	4,2	62,7	0,05
10	48	4,8	54,6	0,40	4,8	43,3	0,10
	71	5,0	39,5	0,74	4,9	48,3	0,53
	93	5,1	31,0	0,92	5,0	48,2	0,70
	99	5,0	26,7	0,97	5,1	39,3	0,73
	117	4,9	24,3	1,01	5,1	35,2	0,80
15	123	4,9	21,6	1,01	5,1	34,4	0,88
	141	4,7	26,0	0,88	5,1	32,8	0,93
	146	4,7	28,2	0,83	5,1	30,2	0,93

a) RTC = jäljellejäänyt kokonaishiilihydraatti.

20

Kun jatkuvaa fermentointia oli kestänyt 146 tuntia, johdettiin osa kolmannen vaiheen fermentoinnin fermentointiliemestä, joka sisälsi lisättyä gluteenia, ylöspäin aktiivihii-
 25 läpi (n. 2,1 kg), jolloin aktiivihiihi oli sylinteri-
 mäisessä ruostumattomassa teräskolonnissa, jonka pituus oli
 122 cm ja sisäinen läpimitta 7,29 cm. Johtamisnopeus oli n.
 720 ml/h kolonnin läpi, jolloin poistovirtaus kolonnin ylä-
 päästä palautettiin fermentoriin samalla nopeudella. Ko-
 30 lonnissa käytetty hiili oli PCB Pittsburgh aktivoitua hiil-
 tä, seulaluku 12-30 mesh (US-standardiseulakoko seula-au-
 koin 1,68 mm - 0,59 mm), jota tuottaa Calgon Corporation,
 Pittsburgh, Pennsylvania. Joka 2 tunnin kuluttua hiiliko-
 lonnin läpi virtaavan fermentointiliemen virtaussuunta
 35 käännettiin 12 minuutiksi ja johdettiin nopeudella 50 ml/
 min kaikkien kolonnin pohjalle aukkumuloituneiden solujen
 palauttamiseksi fermentoriin. Kun kolonnissa oleva hiili
 kyllästyi butanolilla, kolonni korvattiin tuoretta hiiltä

sisältävällä kolonnilla. Toista kolmannen vaiheen fermentoria käytettiin ilman hiilikolonnia. Tulokset on annettu taulukossa II, jossa esitetty aika on se, joka kului alku-
peräisen fermentoinnin aloittamisesta.

- 5 Nämä tulokset osoittavat, että fermentointiliemen kierrättäminen hiilikolonnin läpi on tehokas vähentämään butanolin väkevöitymistä liemeen. Tulokset osoittavat lisäksi, että fermentointi fermentorissa, jossa liemi kier-
rätetään hiilikolonnin läpi, käyttää hiilihydraatin paljon
10 täydellisemmin kuin fermentoinnissa fermentorissa ilman hiilikolonnia, silloinkin kun kumpaakin fermentoria käytetään samalla laimennusasteella.

TAULUKKO II

15

Jatkuva fermentointi (kolme vaihetta)

20	Aika (tuntia)	Fermentori, jossa on hiilikolonnin			Fermentori, jossa ei ole hiilikolonnia		
		pH	RTC ^{a)} (mg/ml)	Butanoli (g/100 ml)	pH	RTC ^{a)} (mg/ml)	Butanoli (g/100 ml)
	171	4,7	21,3	0,35	5,0	24,6	1,06
	195	4,5	12,6	0,46	4,8	22,3	1,00
	220,5	4,7	2,2	0,43	4,7	35,7	0,71
25	260	4,7	1,9	0,38	4,9	22,4	1,01
	290,5	5,2	1,5	0,56	4,8	25,0	0,97
	332	4,9	1,7	0,43	4,9	24,2	0,92
	356	5,0	2,5	0,39	4,9	24,2	0,99

- 30 a) RTC = jäljelle jäänyt kokonaishiilihydraatti
b) fermentointiliemen virtaus hiilikolonnin läpi alkoi.

Jatkuvaa fermentointia suoritettiin menestykselli-
sesti 40 päivää. Kun fermentoreihin syötetyn väliaineen
35 hiilihydraattipitoisuus oli noussut 10 - 15%:iin, nostet-
tiin virtausnopeutta hiilikolonnin läpi n. 840 ml:aan/h ja
vastaavasti 1500 ml:aan/h. 15 %:n hiilihydraattipitoisuu-

della hiilikolonnin kytketty fermentointi kulutti yli 90 % hiilihydraatista, mikä osoittaa n. 0,9 g/l-h volumetristä tuottavuutta, samalla kun fermentointi ilman tätä kolonnia kulutti ainoastaan n. 30 % hiilihydraattia volumetrisen
5 tuottavuuden ollessa 0,3 g/l-h.

Esimerkki 2

Esimerkin 1 yleinen menetelmä toistettiin, paitsi että jatkuva fermentointi suoritettiin kaksivaiheisessa fermentointisysteemissä ja tärkkelyshydrolysaatin pitoisuus väliaineessa nostettiin 10%:ksi. Ensimmäisen vaiheen
10 fermentori oli 2-litran standardi New Brunswick Bioflow, Model C-30 vakioastia, jota käytettiin käyttötilavuudella 1450 ml, ja toisen vaiheen fermentori oli 14 litran astia, jota käytettiin 9,5 litran käyttötilavuudella. Laimennusmäärä
15 ensivaiheen fermentorissa pidettiin 0,23:ssa/h, kun taas laimennusmäärä toisessa vaiheessa oli 0,031/h. Toisen vaiheen fermentointiin lisättiin 10-%:sta maissigluteenilietettä nopeudella n. 20 ml/h. Fermentointilientä
ainoassa toisen vaiheen fermentorissa kierrätettiin esi-
20 merkissä 1 kuvatun hiilikolonnin läpi. Kolonniin johdettiin n. 900 ml/h, jolloin kolonnin ulosvirtausta palautettiin 600 ml/h fermentoriin ja loppu hylättiin. Butanolipitoisuus ensivaiheen fermentorissa ei koskaan ylittänyt
0,05 g/100 ml. Hiilikolonnista tulevassa poistovirtauksessa oli hyvin vähän butanolia. Taulukossa III annetun toisen vaiheen fermentorin liemen analyysit osoittavat, että
25 jatkuvaa prosessia voidaan käyttää käyttäen ainoastaan yhtä ympärikehitysvaihetta.

Taulukko III

Jatkuva fermentointi
(kaksi vaihetta)

	<u>Aika</u> <u>(tunti)</u>	<u>pH</u>	<u>RTC^{a)}</u> <u>(mg/ml)</u>	<u>Butanoli</u> <u>(g/100 ml)</u>
5	48	4,4	114,5	0,20
	76	4,9	88,0	0,61
	100	4,9	73,9	0,86
10	124	4,9	56,0	0,79
	170	4,8	25,5	1,23
	220	5,0	54,8	0,93
	262	4,9	30,9	0,86
	286	5,0	11,1	0,98
15	310	5,1	4,9	0,93
	316	5,1	7,2	0,93
	337	5,0	4,1	0,88
	358	5,0	5,4	0,80

20 a) RTC = jäljellejäänyt kokonaishiilihydraatti

Keksinnön mukaisesti tarjotaan siis parannettu jatkuva menetelmä butanolin tuottamiseksi fermentointi-reaktiolla. Samalla kun keksintöä on kuvattu sen spesifisten suoritustapojen yhteydessä, on ilmeistä, että
25 alaan perehtyneet voivat tehdä monia vaihtoehtoja, modifiointeja ja muunnoksia edellä esitetyn selityksen valossa.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä butanolin tuottamiseksi fermentoimalla
hiilihydraattia *C. acetobutylicum*-kannalla, adsorboimalla
5 tuotettu butanoli butanolia adsorboivaan aineeseen ja eris-
tämällä butanoli desorboimalla se butanolia adsorboivasta
aineesta, t u n n e t t u siitä, että se käsittää vaiheet,
joissa

C. acetobutylicum-kannan ATCC 4259 tai ATCC 39236
10 ymppeä tuotetaan jatkuvasti erillisenä reaktioastiassa lai-
mennusnopeudella noin 0,2 - noin 0,5 /h;

ymppeä jatkuvasti syötetään käymisväliaineeseen, jonka
pH pidetään alueella noin 4,5 - noin 5,5 ja lämpötila
alueella noin 34°C - noin 40°C; ja

15 osa käymisväliaineesta jatkuvasti kierrätetään butano-
lia adsorboivan aineen läpi nopeudella, joka on riittävä
ylläpitämään alle noin 1 paino-%:n butanolipitoisuuden käy-
misväliaineessa.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n -
20 n e t t u siitä, että ymppeä tuottava vaihe suoritetaan
kahdessa jatkuvatoimisessa reaktioastiassa, joita käytetään
sarjassa.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että butanolia adsorboiva aine on rakeinen
25 aktiivihiili.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av butanol genom att kolhydrat fermenteras med en *C. acetobutylicum*-stam, den
5 producerade butanolen adsorberas i ett butanoladsorberande material och butanolen isoleras genom desorption av denna ur det butanoladsorberande materialet, k ä n n e t e c k n a t därav, att det omfattar skeden, i vilka

10 en ymp av *C. acetobutylicum*-stammen ATCC 4259 eller ATCC 39236 kontinuerligt produceras i ett separat reaktionskärn med en utspädningshastighet av ca 0,2 - ca 0,5/h;

ympen inmatas kontinuerligt i ett fermentationsmedium, vars pH upprätthålls inom området ca 4,5 - ca 5,5 och temperatur inom området ca 34°C - ca 40°C; och

15 en del av fermentationsmediet kontinuerligt cirkuleras genom det butanoladsorberande materialet med en hastighet som är tillräcklig för att upprätthålla en butanolkoncentration mindre än ca 1 vikt-% butanol i fermentationsmediet.

20 2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att det ympproducerande skedet utförs i två kontinuerliga reaktionskärn, som används i serie.

25 3. Förfarande enligt enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att det butanoladsorberande materialet är granulerat aktivt kol.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia:-Öffentliga finska patentansökningar: 824006 (B 01 D 15/00) (PL 2 § 2 mom. 3. virke).

Patenttijulkaisuja:-Patentskrifter: USA(US) 2 474 170 (260-593).