

(19)



(10) **LT 3668 B**

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patento numeris: **3668** (51) Int. Cl.⁵: **C12P 7/06**

(21) Paraiškos numeris: **IP932**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 09 03**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 03 27**

(45) Patento paskelbimo data: **1996 01 25**

(60) SU duomenys: **SU 4614992, 1989 09 26**

(31, 32, 33) Prioritetas: **249898, 1988 09 27, US**

(72) Išradėjas:

Heikki Lommi, FI
Juha Ahvenainen, FI

(73) Patento savininkas:

CULTOR LTD., Kyllikinportti 2, SF-00240 Helsinki, FI

(74) Patentinis patikėtinis:

Marius Jakulis-Jason, 3, A.A.A.Baltic Service Company,
Rūdninkų g. 18/2-12, 2001 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Etanolio ir alkoholinių gėrimų gamybos būdas, naudojant imobilizuotas mieles

(57) Referatas:

Pagal išradimą mielių ląstelės imobilizuojamos ant nepasiduodančio gniuždymui nešiklio, turinčio anijonitinių savybių. Imobilizuotos mielės gali būti panaudojamos cukrų turinčio fermento substrato fermentavimui. Nepasiduodančio gniuždymui nešiklio ypatybė įgalina sistemą sterilizuoti ir leidžia dirbti padidinto slėgio sąlygomis. Pateikiamas optimalaus nešiklio pavyzdys yra granuluota DEAE celiuliozė.

Šis išradimas susijęs su etanolio gamyba, ir ypač su alkoholinių gėrimų gamyba, naudojant imobilizuotas, surištas su regeneruojama medžiaga-nešikliu, mieles. Mielių imobilizaciją galima atlikti fermentacijos reaktoriuje, iki minimumo sumažinant riziką galimu užkrėtimu imobilizacijos metu.

Fermentacija yra menas, kuris pradėtas prieš rašytinę istoriją. Tačiau, tik 1866 m. Pasteras paskelbė savo darbus apie vyno fermentaciją, išanalizavo vyno gedimo priežastis ir nurodė tinkamus vyno darymo būdus.

Pagal tradicijas, fermentacija vyksta laukinių mielių pagalba, kurios randasi visuose vaisiuose ir uogose. Tam, kad gautų geros kokybės vynus, šiandien vis dažniau fermentacija vykdoma grynomis kultūrinėmis mielėmis. Visi šie bendri vyno gamybos aspektai ir mielių charakteristikos yra pateikiami rinkinyje "Biotechnologija", redaguojamame H.J.Rehm ir G.Red, 5t. : Maisto ir maisto produktų gamyba mikroorganizmų pagalba, Verlag Chemie, o taip pat Prescott'o ir Dunn'o "Pramoninė mikrobiologija", 4 leidimas, 9 skyrius, 1982 redaguotas G.Reed'o, kurių pagrindu remiasi čia išdėstyta medžiaga.

Tradicinė periodinė fermentacija sunaudoja daug laiko. Įprastai, gaminant vyną, alkoholinė fermentacija trunka mažiausiai 20-50 dienų. Nežiūrint to, kad naudojant suspenduotas mieles, nepertraukiamas procesas gali būti pagreitintas, yra sunku vykdyti procesą išvengiant mikrobino užkrėtimo. Dar daugiau, norint padidinti fermentacijos greitį, mielių ląstelių koncentraciją fermentacinėje terpėje reikia padidinti, iš kitos pusės, reikia minimizuoti etanolio inhibiciją. Pavyzdžiui, obuolių sulčių periodinėje fermentacijoje, mielių ląstelių koncentracija misoje yra $1-2 \times 10^8$ ląstelių/ml.

Aukštesnė mielių ląstelių koncentracija gali būti pasiekta pvz. imobilizuojant mieles ant atitinkamų nešiklių, pakrautų į koloną. Fermentinei misai praeinant per imobilizuotomis mielėmis pakrautą koloną, mielių ląstelių, kontaktuojančių su misos tūriu, skaičius reaktoriuje žymiai išauga. Fermentacija vyksta greičiau ir dėl didesnio kontaktavimo ploto. Be to, naudojant kolonos reaktorių, sumažinama etanolio inhibicija, kadangi etanolį turintis produktas yra pastoviai pašalinamas nuo mielės ląstelės. Toks etanolio inhibicijos sumažinimas yra žymesnis, sudarant sandarios srovės sistemą.

Yra žinoma, kad mielių ląstelės gali būti įjungtos į kalcio alginatą ir tokios imobilizuotos mielės gali būti naudojamos greitesnei fermentacijai. Daugybėje literatūros nuorodų aprašoma, kaip ši technika paprastai pritaikoma laboratorinėmis sąlygomis. Tačiau buvo bandyta šią techniką pritaikyti ir pramoninėms sąlygoms. Vienas iš labiausiai pavykusių bandymų, tikriausiai yra Kyowa Hakko iš Japonijos, kur imobilizuotos su alginatu mielės buvo pritaikytos maistinio etanolio gamybai.

Pramoninės gamybos atveju, pagrindinis sunkumas susidaro dėl dalelių susidarymo būdo imobilizacijos su alginatu metu. Procesas turi vykti toje gamybos vietoje, kur susimaišo mielių suspensija su natrio alginato tirpalu. Tokį mišinį padavus į kalcio tirpalą, alginatas nusėda ir tuo pačiu metu, viduje nusėdusių dalelių, absorbuojamos mielių ląstelės. Šios dalelės paprastai turi lašelių arba granulių formą.

Pramoniniai įrengimai, kurie naudojami mielių ląstelių imobilizacijai su alginatu, turi turėti specialiai sukonstruotus įrenginius, skirtus kaip tik tokių granulių formavimui. Dar daugiau, egzistuoja potenciali galimybė užkrėsti mieles laukiniais mikroorganizmais. Tai yra ypatingai pavojinga, kai yra svarbus gaminamo alkoholinio gėrimo kvapas (pvz., alaus, vyno, sidro ir kitų panašių produktų). Gaminant techninį ar kurui naudojamą etanolį, užkrėtimo kriterijus nėra toks svarbus, tačiau užkrėtimas turi įtakos produktyvumui.

Kitas didelis sunkumas, kalbant apie alginatinių granulių panaudojimą pramoninės gamybos atveju, yra mechaninis granulių atsparumas. Granulės yra minkštos ir lengvai susispaudžia. Naudojant dideles fermentacijos kolonas, gali kilti problemos, nes greitos žemyn tekančios srovės yra sunkiai valdomos. Iš kitos pusės, esant tipiškam fermentacijos modeliui, kai srovė teka į viršų, granulės greitai susidėvi. Taip pat, reaktoriaus darbas esant gniuždomai medžiagai, kai žemyn tekančios srovės veikiamos spaudimu, faktiškai yra negalimas.

Trečias sunkumas, susijęs su mielių ląstelių įtraukimu, yra difuziniai apribojimai, kurie mažina substrato prieinamumą kontaktuojant su mielėmis granulės viduje.

Pagaliau, jeigu sistema tampa taip užkrėsta ar kaip kitaip pažeista, kad nepertraukiamas procesas turi būti nutrauktas, visa kolonos medžiagos (alginatas kartu su mielėmis) partija turi būti išmesta. Pakartotinas panaudojimas jau yra negalimas.

Taigi, pateikiamo išradimo tikslas yra sukurti nepertraukiamos fermentacijos kolonoje būdą, kuris nereikalauja kolonos medžiagos formavimo on-site (vietoje). Kitas tikslas - sukurti būdą, kuris eliminuotų užterštumo šaltinius. Dar kitas tikslas yra sukurti tokio tipo būdą, kuris gali atlaikyti slėgį. Ir dar vienas šio išradimo tikslas - sukurti būdą, kur medžiaga-nešiklis gali būti regeneruojama ir antrą kartą panaudojama.

Kiti tikslai, kurie sudaro šio išradimo pagrindą, yra procesų sukūrimas, kurių metu alkoholis produkuojamas pakankamai dideliu greičiu taip, kad minimalus kiekis alkoholio, kurį pagamina maždaug 1 sluoksnio tūris, yra 5 procentai alkoholio per dieną.

Šie ir kiti išradimo tikslai yra suformuoti pristatant išradimą, kuris nurodytas kaip būdas pirminei etanolio produktų gamybai. Pagal šį būdą, vandeninis substratas, turintis ištirpusius mielių fermentuotus angliavandenius, kontaktuoja su mielėmis, imobilizuotomis ant nešiklio, turinčio anijonitinį pagrindą. Kontaktas gali būti geriau pasiektas

praleidžiant vandenyje ištirpintą substratą per reaktorių, pakrautą mielių imobilizuotų ant nešiklio, matricomis. Tačiau tai taipogi galima pasiekti naudojant imobilizuotas mieles reaktoriuje su skystomis, nepastoviomis matricomis.

Mielės-nešiklio kombinacija yra sudaryta surišant mieles su nešiklio poringu paviršiumi. Nešiklis iš esmės napasiduoda gniuždymui. Jis sudarytas iš ištisos poringos matricos, arba iš turinčių duobutes ar tinklinę struktūrą poringų dalelių. Tokia matrica ar dalelės, savo ruožtu, yra sudarytos iš atskirų mikrodalelių arba mikroskaidulų. Tokia nešiklio struktūra įgalina sudaryti maksimalų paviršiaus plotą nešamoms mielių ląstelėms. To pasekoje susidaręs didelis mielių ląstelių skaičius, tenkantis nešiklio vienetui, įgalina greitą fermentacijos procesą.

Nešiklis, sudarytas iš dalelių arba turintis matricos charakterį, gaunamas paprastai surišant, suveliant, suaudžiant, sulipdant ar aglomeruojant (toliau tekste - surišant) kartu mikrodaleles arba mikroskaidulas. Surišimas vykdomas sukuriant cheminius, adhezinis arba mechaninius ryšius kai kuriuose kontakto taškuose tarp individualių mikrodalelių arba mikroskaidulų. Cheminis ryšys yra įvykdomas cheminių kryžminių reakcijų, vykstančių šiuose taškuose, dėka. Adhezinis ryšys vyksta dėka mikrodalelių arba mikroskaidulų aglomeracijos arba sulipimo kartu, panaudojant pridėtinius ingredientus, tokius kaip termoplastinė derva. Mechaninis ryšys įvykdomas supainiojant, sumezgant skaidulas kontakto taškuose arba surišant kartu dalelių paviršius. Galutinėje formoje matrica bus sudaryta kaip ištisinė struktūra reaktoriuje, panaši į medvilninius pūkus ar filtrinį popierių, patalpintą į vamzdį. Taipogi galutinėje formoje, dalelės bus atskiros ir individualios.

Mikroskaidulos arba mikrodalelės yra sudarytos iš bet kokios anijonitinės mainų medžiagos, kuri gali būti suformuojama į reikalingas mikroskaidulas arba mikrodaleles nelygiu paviršiumi. Tokioms medžiagoms priklauso gamtinė arba regeneruota celiuliozė ar dirbtinis šilkas, kurie atitinka anijonitinės medžiagos charakterį. Tokios sintetinės anijonitinės mainų dervos kaip fenolformaldehido derva, o taip pat

anijonitinės mainų dervos agarozės ar dekstrino pagrindu. Pirmenybę turintis nešiklis yra poras turinti, anijonitinė derva celiuliozės ar dirbtinio šilko pagrindu, kuri yra chemiškai modifikuota, kad įgytų anijonitinės mainų medžiagos charakterį. Ypač pirmenybę įgyvendinimui turi dietilaminoetilpakeista celiuliozė, mikroskaidulos arba mikrodalelės, tvirtai surištos aglomeracijos būdu su polistirolu.

Manoma, kad elektrinės jėgos, atsirandančios tarp teigiamai įkrautos dervos ir neigiamai įkrautų mielių ląstelių yra svarbiausias momentas susirišant mielių ląstelėms su dervos paviršiumi. Toks susirišimas žymia dalimi minimizuoja mielių šarmėjimą ir dargi leidžia suartinti kontaktą tarp mielių ir vandens terpės.

Vandeninis substratas naudojamas kaip pradinė medžiaga ir yra sudaryta mažiausiai iš vandens ir fermentuojamo angliavandens, tokio kaip hidrolizintas krakmolas, sacharozė, gliukozė, fruktozė, maltozė ar maltotriozė (laktozė ir ksilozė). Cukraus koncentracija turi būti pakankama, kad galėtų vykti nepertraukiamas alkoholio produkavimas, bet neturi būti tokia aukšta, kad visiškai inhibuotų mielių fermentinį aktyvumą.

Remiantis šio išradimo metodika yra svarbu kontroliuoti tokį proceso parametą kaip anglies dioksido išskyrimą fermentacijos metu. Anglies dioksidas gali išlikti skysto produkto srovėje arba pasišalinti. Būdas siūlo naudoti tarpusavyje sujungtų kolonų seriją, kurios yra sukonstruotos taip, kad dujų pašalinimas vyksta srovei ištekant iš kolonos viršaus. Kolonas veikiant slėgiu, gali susidaryti karbonizuoti produktai. Jeigu prie visų sujungtų kolonų yra naudojami čiaupai, gaminsis produktas be karbonatų. Veikiant koloną slėgiu, jis vienok neturi būti toks aukštas, kad susilpnėtų mielių fermentacija. Ši riba gali būti nustatyta tradiciniais metodais ir, paprastai, siekia apie 14 barų.

Be slėgio, galima keisti ir kitus proceso parametrus, kurie turėtų įtaką etanolio produkavimui ir produkto skoniui. Šie parametrai, įskaitant kolonos temperatūrą, vandeninio substrato padavimo greitį, buvimo laiką

kolonoje, substrato srovės kryptis kolonoje (pagal žemės traukos kryptį ar prieš ją), srovės krypties periodinį reversiškumą, mielių kamieną, mielių koncentraciją ir reikalingą mielėms maistinių medžiagų kiekį, esantį vandeniniame substrate. Tinkami intervalai šiems parametrams yra šie: temperatūra nuo 0 iki +40°C, maistinių medžiagų padavimo greitis 0,01-10 reaktoriaus matricos tūrių (BV)/val, išbuvimo laikas kolonoje apie 0,1-100 val ir mielių koncentracija nuo 10^9 iki 10^{12} mielių ląstelių 1 litrui nešiklio. Gali būti naudojamos tokios mielių rūšys kaip Saccharomyces ar Candida. Paprastai šie parametrai įgalina gaminti 0,05:15% koncentracijos etanolį.

Būde, kurį pateikia šis išradimas, pirmiausia kolona pakraunama konkretaus nešiklio mase ir nešiklis gali nusistovėti pakrautoje kolonoje. Nešiklis yra sterilizuojamas tokiu būdu, kaip plovimas karštu šarmu. Po neutralizacijos steriliu praskiestu rūgšties tirpalu ir perplovimo steriliu vandeniu, kolona po to yra eliuuojama mielių terpe taip, kad mielės prisitvirtina prie nešiklio dalelių ir imobilizuojasi. Po šios pirminės procedūros, kolona su mielėmis naudojama taip kaip aprašyta aukščiau.

Dar kitas pateikiamo išradimo bruožas yra tas, kad gaunamas etanolio produktas yra tinkamas vartojimui. Toks produktas gali būti vynas, sakė, alkoholiniai vaisių, uogų arba daržovių gėrimai, jų karbonizuoti variantai, alus ar šių išvardintų produktų variantai su mažu alkoholio kiekiu.

Vandeninis substratas, naudojamas vartojimo produktų gamybai, gaunamos iš tokių šaltinių, kaip vaisiai, uogos ar daržovių sultys arba ekstraktai, misa, hidrolizuota augalinė medžiaga arba vandeniniai sirupai, turintys fermentuojamą cukrų, gauti iš natūralių arba sintetinių šaltinių. Naudojamos sultys yra skystis, gautas išspaudžiant vaisius, uogas arba daržoves. Ekstraktas yra skystis, gautas sumaišant vaisių, uogų ar daržovių sultis su vandeniu ir apdorojant sutrynimo, virimo, spaudimo, maišymo arba panašiais būdais. Hidrolizuota augalinė medžiaga yra

medžiaga, gaunama iš celiuliozės, hemiceliuliozės arba krakmolo, techniškai apdorojant tokiais metodais, kaip rūgštiniu, fermentiniu arba autohidroliziniu.

Kitas išradimo būdas įgalina gauti mažą alkoholio kiekį turinčius gėrimus, kurie turi mažiau negu 0,2 procentus alkoholio kiekio. Pagal šį būdą, naudojamos tokios pačios gamybos stadijos ir mielės-nešiklio medžiaga, kaip ir pagrindiniame gamybos būde. Tačiau cukraus kiekis ir vandeninio substrato padavimo greitis yra modifikuoti, norint gauti "žemo alkoholio" produktus. Maisto medžiagos padavimo greitis yra didinamas iki tokio laipsnio, kokį norima gauti mažesnės alkoholio koncentracijos dydį. Cukraus koncentracija yra taip pat atitinkamai reguliuojama taip, kad gėrimas nebūtų per daug saldus, kai dar pakankamai yra cukraus, kurį galima būtų fermentuoti į alkoholį.

Išradimas dar apima mielių ir nešiklio kompoziciją bet kokioje formoje. Pirminės formos apima tas, kurios gaunamos in-situ, kaip aprašyta aukščiau, ir išdžiovintos kombinacijos būdu. Steriliomis sąlygomis išdžiovinta kombinacija gali būti fasuojama, transportuojama į fermentinius įrengimus ir atstatomos jos savybės, pamerkus į vandeninę mitybinę terpę. Iš kitos pusės, sausa forma gali būti fasuojama namų ūkio tikslams.

Fig. 1 rodo supaprastintą srovės tekėjimo schemą, paruošiant imobilizuotų mielių kolonas.

Pateikiamas išradimas grindžiamas mielės-nešiklio sistema, aprašyta aukščiau, kuri yra nesugniuždoma ir tinkama sterilizacijai. Ypač taikomo nešiklio pavyzdys naudojamoje mielės-nešiklio sistemoje yra specifinė DEAE celiuliozė (silpnas anijonitas) aglomeruota su polistirolu. Šis nešiklis gaunamas pramoniniu būdu ir yra gerai žinomas fermentų imobilizacijai, kaip tipiška izomerazė (žiūr. US Nr. 4 355 117 smulkesniems duomenims apie nešiklį).

Pateikiamos mielės-nešiklio sistemos paruošimas nupieštas fig. 1, kur sausas nešiklis hidrolizuojamas vandenyje ir perpumpuojamas kaip substancija į kolonos reaktorių. Paruoštas DEAE celiuliozinis nešiklis yra stabilus rūgštinėje arba šarminėje aplinkoje ir gali išlaikyti iki 100°C temperatūrą. Tokiu būdu, jis gali būti paprastai sterilizuojamas kolonoje, pavyzdžiui, karštu šarmu. Kitos dervos gali būti atitinkamai sterilizuojamos panašiu būdu.

Mielių imobilizacija ant nešiklio yra atliekama po nešiklio sterilizacijos. Tai yra įvykdoma perpumpuojant kultūrinę, aktyvią mielių substanciją į reaktorių. Po to nešiklis absorbuoja mieles. Dėka optimalaus nešiklio paviršiaus kontūro mielių ląstelės prisitvirtina prie nešiklio paviršiaus. Jis yra šiurkštus, tinklinės struktūros ir egzistuoja kaip ištisinė ar sudaryta iš dalelių poringa matrica. Manoma, kad prisitvirtinimas vyksta dėl elektrinių jėgų tarp nešiklio anijonitinių grupių (turinčių teigiamą krūvį) ir mielės ląstelės sienelės, turinčios neigiamą krūvį.

Yra geriau, kai mielių ląstelės augančios ant nešiklio, sudaro tankį maždaug tokiu santykiu: 10^9 - 10^{12} ląstelių tenka litrai nešiklio, tačiau optimumas yra 10^9 . Toks tankumas užtikrina pakankamą fermentinį aktyvumą paverčiant cukrų, esantį vandeniniam substrate, alkoholiu.

Nešiklis yra svarbus tuo, kad sukuria adekvatišką aplinką mielių augimui ir įgalina kontaktuoti su vandeniniu substratu. Nepasiduodantis gniuždymui anijonitinis nešiklis, kaip aglomeruota DEAE-celiuliozė, turi keletą naudingų savybių, lyginant su minkštais, gelio-pavidalo nešikliais, kaip alginato granulės. Šios savybės taip pat priklauso mažesnės masės perkėlimo problemos, lengvesnė imobilizacija, greitesnis sistemos paleidimas, lengvesnis maštavimas, žymiai tobulesnė regeneracija ir didesnis nešiklio ilgaamžiškumas.

Laboratorinio eksperimento sąlygomis buvo tarpusavyje palyginti gelio tipo nešiklis, t.y. alginatinės granulės ir šiame išradime pateikiamas nešiklis - DEAE-celiuliozės granulės. Nešiklis, padarytas iš DEAE-celiuliozės buvo labiau tinkamas etanolio gamybai ir su daugeliu

substratų davė daug didesnę gamybos našumą. Šie rezultatai rodo geresnį kontaktą tarp mielės ir vandeninio substrato perdirbimo metu.

Nenorint atsiriboti nuo išradimo, manoma, kad sąveikos būdas tarp imobilizuotų mielių ir nešiklio gali paaiškinti padidėjusią išeigą. Elektroninės mikrofotografijos rodo, kad alginato granulėse, mielėms augant kolonijomis kai kurios iš jų perauga kiaurai alginatų sluoksnį iki granulės paviršiaus. Mielių kolonijos veikia kaip "aktyvios vietos" alginato granulėse. Mikrofotografija rodo, kad DEAE-celiuliozės granulės yra poringos, tinklinės struktūros mikroskaidulų matricos. Tokia struktūra leidžia vandeniniam substratui pasiekti mielių ląsteles, augančias granulių viduje. Taigi, mielių ląstelės auga pakankamai laisvai ir atskirai vidinėse ir išorinėse mikroskaidulų kišenėse ir šios individualios ląstelės veikia kolonoje kaip "aktyvios fermentacijos vietos". Atsižvelgiant į tai ir naudojant išradimo pateikiamą nešiklį, daug daugiau mielių ląstelių, skaičiuojant nešiklio paviršiaus ploto vienetui, dalyvauja fermentacijoje. Mielių ląstelių imobilizacijos mechanizmas ant nešiklio, tokio kaip granuliuota DEAE-celiuliozė, paviršiaus siūlo daug naudingų aspektų. Pirma, mielių ląstelės yra pagrindinai visos ant nešiklio paviršiaus. Taigi, ląstelės veikia taip, lyg būtų laisvai suspenduotos tirpale.

Antra, nėra trukdymų esminei difuzijai ir fermentinis skystas substratas gali laisvai kontaktuoti su mielėmis. Taip pat maisto medžiagos, kurių reikalauja ląstelė palaikyti gyvybei, yra prieinamos be trukdymų, joms prasiskverbiant į nešiklio dalelių vidų.

Trečia, remiantis išradimu, nešiklio savybės taip pat leidžia lengvai paleisti sistemą arba regeneruoti, kadangi mielių ląstelių imobilizacija gali vykti in-situ (toje pačioje vietoje) kolonoje. Ši procedūra sumažina užkrėtimo riziką ir sudaro ištisos (vienalytės) sistemos sąlygas. Dar pridursime, kad kolona gali būti lengvai regeneruojama, kas yra svarbi ekonominė ypatybė. Regeneracija kartais yra tikslinga, kadangi būna cheminių teršalų arba nešvarumų iš vandens, gali būti mikrobinis užterštumas arba tų pačių imobilizuotų mielių mutacijos. Norint regeneruoti kolonos reaktorių, padarytą iš tokio nešiklio, kaip pavyzdžiui,

DEAE-celiuliozė, panaudotą koloną galima perplauti vandeniu ir sterilizuoti karštu šarmu arba kokia nors kita sterilizuojančia priemone, kaip organiniu reagentu vandenyje ar pan. Po plovimo ir neutralizacijos, nešiklį galima naudoti darbui ir pakartotinai imobilizuoti. Eksperimentiniuose tūriuose tokia kolona buvo naudojama mažiausiai trylika savaičių be regeneracijos poreikio. Laboratorinėmis sąlygomis panaši kolona buvo naudojama apie 30 savaičių.

Iš esmės, ištisa reaktoriaus sistema, įskaitant ir nešiklį, gali būti sterilizuojama aukščiau paminėtais būdais. Kada aseptinės kultūrinės mielės yra pumpuojamos arba eliuojamos per nešiklio matricą, mielės-nešiklio užkrėtimo rizika laukiniais bakterijų kamienais bus minimali. Prisijungus mielėms prie medžiagos kolonoje (atitinkamas krūvis yra apie 10^9 - 10^{12} mielių ląstelių/litrui nešiklio), koloną galima toliau sąlygoti lėtai pumpuojant mitybinę terpę, kaip amonio fosfato arba cukraus vandeninę terpę, per reaktorių maždaug vieną dieną.

Yra tikrai aišku, kad išradimo siūlomose visose mielės-nešiklio sistemose, vienas iš pateikiamų nešiklių, granuluota DEAE-celiuliozė yra nepasiduodanti gniuždymui (nebrinkstanti). Ši savybė leidžia vykdyti daugybę variantų įvairiomis fermentacijos sąlygomis.

Esant normaliam atmosferos slėgiui, reaktoriaus/nepertaukiamo veikimo fermentatoriaus sistema gali veikti tokiu būdu. Substratas paduodamas iš reaktoriaus dugno ir CO_2 , kuris susiformuoja fermentacijos metu, laisvai išsiskiria iš nešiklio matricos. Pagal šią techniką vienok nepasiekiami ideali sandarios srovės sistema (CO_2 burbuliukai visada pažeidžia matricą) ir toks atgalinis maišymasis sąlygoja etanolio inhibiciją ir žemesnį produktyvumą.

Išradimo pateikiama nepasiduodanti gniuždymui nešiklio sistema taip pat gali veikti esant slėgiui tam, kad susidaręs anglies dioksidas išliktų ištirpusiame būvyje. Kolona taip pat gali dirbti tokiomis sąlygomis, kai srovė teka žemyn ir tokioje pakrautų matricų sistemoje pasiekiami sandarios srovės sistema.

Keletas slėgiu veikiamų kolonų gali būti sujungtos viena su kita, norint išvengti aukšto slėgio susidarymo. Toks serijinis išsidėstymas ypač naudojamas, jeigu galutiniame produkte pageidaujama didelė alkoholio koncentracija. Šis būdas duoda galimybę eksploatuoti esant tekėjimo srovei žemyn, išvengiant žalingo anglies dioksido susidarymo, kurio pasekoje gali būti suardytas kolonos pakrovimo tolygumas, tai yra jo pasekoje gali susidaryti kanalai. Anglies dioksidas tarp kolonų yra pašalinamas iš srovės. Gali būti naudojamas ir mažesnio dydžio reaktorius, kadangi nereikia didesnės erdvės anglies dioksido pertekliui sumažinti ir atskirti.

Bendrai paėmus, bet koks fermentuojamas skystas substratas gali būti naudojamas kaip žaliavinė medžiaga etanolio produktų gamybai taip, kad bet kokios konkrečios priemaišos yra filtruojamos prieš paduodant jas į imobilizuotų mielių koloną. Tipiškų substratų pavyzdžiai gali būti:

- I) misa
- II) vaisių sultys
- III) uogų sultys
- IV) cukraus sirupas
- V) krakmolo sirupas
- VI) bet koks augalinės medžiagos hidrolizatas
- VII) cukraus sirupai, praturtinti bet kokių vaisių, uogų, salyklo arba panašių ekstraktų kvapais
- VIII) bet kokie vandeniniai substratai, kurie naudojami alaus, vyno ar likerio gamyboje.

Tipiška bendra cukraus koncentracija sudarys 100-250 g/l, įskaitant tiek pradinį, tiek pridėtą cukrų, priklausomai nuo žaliavos prigimties. Maisto medžiagos, reikalingos mielėms (įskaitant fosforą, azotą ir kt. šaltinius) turi būti išbalansuotos iki jos parenkamos kaip žaliavinė medžiaga. Cukraus koncentracija gali kisti plačiose ribose, priklausomai nuo to, kiek daug alkoholio ir kokio saldumo produktą gamybos pabaigoje tikimasi gauti. Jis taip pat gali turėti natūralius kvapus, aliejų ir

pan. Cukrus išreiškiamas koncentracija nuo mažiausios reikšmės - apie 1 procentą svorio iki kiekio, kuris inhibuos fermentinę funkciją (pvz: apie 30-40 svorio procentų), pageidautina apie 4-25 svorio %, tenkančio bendram terpės svoriui.

Vandeninio substrato tekėjimo greitis per koloną yra svarbus parametras, kadangi etanolio gamybos našumas priklauso nuo tekėjimo greičio. Taip pat buvo parodyta, kad tekėjimo greitis apsprendžia mielių ląstelių skaičių, kurios lieka susirišusios su nešikliu. Esant dideliame tekėjimo greičiui, mielių ląstelių atsikabinimas didėja; taigi, etanolio gamyba taip pat gali priklausyti nuo ląstelių skaičiaus, surišų imobilizuotoje sistemoje, ir ne tik nuo substrato tekėjimo greičio. Jeigu tekėjimo greitis yra per didelis, etanolio gamyba yra nepilna arba neužbaigta; kontroliuojant tekėjimo greitį, etanolio koncentracija gali būti kontroliuojama, tipiška pasiekiant koncentraciją nuo 0,05 iki 15 procentų, santykinai su bendru vandeninio substrato tūriu. Suregulius tekėjimo greitį, galima gauti koncentraciją šiose ribose.

Mielių ląstelių, kurios pasilieka surištos su nešikliu, kiekis atrodo yra santykinai stabilus esant mažiems tekėjimo greičiams, kas rodo, kad ląstelių augimas ir sušarmėjimas yra subalansuoti. Esant didesniems tekėjimo greičiams, šarmėjimas išauga, bet ląstelių skaičius grįžta į normalią padėtį, kai greitis sumažėja. Tekėjimo greitis turi būti pakankamai didelis, kad įgalintų mirusių ląstelių šarmėjimą, norint išvengti autolizės. Imobilizuotų mielių kolonos darbo metu, mielės išlieka gyvybingos dėl fermentuojamų cukrų vandeniniame substrate.

Imobilizuotų mielių kolonos reaktorius gali būti veikiamas slėgiu pagal aukščiau pateiktą aprašymą. Darbinis slėgis turi būti pakankamai aukštas, kad išlaikytų ištirpusį CO₂ kolonoje ir išvengtų galimo kanalų susidarymo, CO₂ burbuliukams einant per imobilizuotų mielių koloną. Tipiškas slėgis yra 14 barų.

Atitinkama temperatūra yra tokia, kokia naudojama tradiciniuose periodinės fermentacijos procesuose. Intervalas yra nuo 0 iki 40°C,

pageidaujamos ribos 10-35°C. Tokia temperatūra gali išlikti tiek šildant koloną su kaitinančiais šarvais, tiek paliekant koloną kambaryje su kontroliuojama aplinkos temperatūra, tiek šaldant. Žinoma, mielės išskiria tam tikrą kiekį šilumos, kuri taip pat gali būti panaudojama. Slėgis yra parenkamas atitinkamai pagal darbinę temperatūrą.

Po fermentacijos, išskirtas etanolinis produktas yra šaldomas iki laikymo temperatūros ir sukaupiamas buferio rezervuare įprastiniams pofermentaciniams apdorojimams, pvz. filtravimui, pasterizavimui ir fasavimui.

Etanolio gamybos sistema, aprašyta aukščiau, yra greitesnė ir patogesnė, negu tradiciniai fermentacijos procesai ir pagaminamas produktas gaunamas norimo skonio, ekvivalentiško gaunamo įprastiniu fermentaciniu procesu, produkto skoniui. Pagal pateikiamą išradimą laikas, reikalingas fermentacijai, sumažėja nuo savaičių iki valandų, kas, įvertinant nepertraukiamą proceso prigimtį, suteikia plačias galimybes sutaupyti laiką ir išlaidas pramoninėje alkoholio ir alkoholinių gėrimų gamyboje.

Sekantys pavyzdžiai toliau iliustruoja daugybę šio išradimo aspektų. Vienok pavyzdžiai nereiškia, kad gali tapti šio išradimo apribojimais arba charakteristika, kadangi išradimas buvo anksčiau pilnai charakterizuotas.

Kolonos reaktoriaus paruošimas. Granuliuota DEAE-celiuliozė (GDC) pagaminta pagal US Nr. 4 355 117, kompanijos Finnish Sugar Co. Ltd., yra 315-840 μm dalelių dydžio, buvo naudojama kaip nešiklis 1-3 pavyzdžiams. Visuose eksperimentuose nešiklis buvo užpilamas, sterilizuojamas ir imobilizuojamas mielėmis pagal pateikiamą metodiką, naudojant GDC:

GDC kolonos ir imobilizuotų mielių paruošimo metodika. Pagal fig. 1, hidratacijos indas (1) pirmiausia iki pusės pripildomas vandens. Įjungiamas maišymas, ir sausas nešiklis (GDC) yra perduodamas į indą

(1). Pasiekus visišką hidrataciją (apie 5 val.), imobilizuotų mielių reaktorius (2) yra pripildomas iki pusės vandeniu ir nešiklio vandeninė masė iš hidratacinio indo (1) yra pernešama į reaktorių (2). Vandens lygio palaikymui reaktoriuje, dugne esantis vožtuvas sureguliuojamas taip, kad įėjimo ir išėjimo srovės reaktoriuje yra beveik tokios pačios. Po to nešiklis reaktoriuje yra sterilizuojamas praskiestu šarmu (3), jį pumpuojant per reaktorių (2). Nešiklio matrica po to yra praplaunama vandeniu ir neutralizuojama pumpuojant atitinkamai praskiestą rūgštį (4) per nešiklio matricą reaktoriuje (2), o pabaigoje nešiklis yra praplaunamas steriliu vandeniu.

Mielių masė yra paruošiama inde (5). Po to mielių masė maždaug per 1-4 val. perpumpuojama per nešiklio matricą ir mielės pačios prisiriša prie nešiklio. Mielės dabar jau yra imobilizuotos ant nešiklio ir reaktorius (2) yra visiškai paruoštas fermentacijai.

Substratas iš indo (6) perpumpuojamas į reaktorių per dugno arba per viršūnės įėjimo angą. Reguluojant tekėjimo greitį, galima kontroliuoti fermentacijos lygį. Lėtas tekėjimo greitis (apie 1 matric. tūris/dieną) reiškia ilgą kontakto laiką tarp nešiklio ir substrato ir tai duoda didelį alkoholio kiekį. Greitesnis tekėjimo greitis mažina alkoholio kiekį. Reaktorius gali dirbti esant atmosferiniam slėgiui, paduodant maisto medžiagas per dugne esančią įėjimo angą, anglies dioksidui atsiskiriant nuo sistemos ir laisvai išeinant per atskyrimo angą (7). Produktas surenkamas į priėmimo indą (8) iš kur jis prieš paskutinį išpilstymą į butelius yra toliau apdorojamas filtruojant ir t.t.

Sistemai veikiant padidinto slėgio sąlygomis, mitybinis substratas (6) paduodamas per viršūnėje esančią įėjimo angą tam, kad nešiklio matricą palaikytų pakrautoje formoje ir tuo išlaikytų sandarios srovės sistemą. Fermentacijos greitis kontroliuojamas (srovės tekėjimo greičiu) taip, kad tiekiamas slėgis būtų pakankamai aukštas, kad išlaikytų susidariusį anglies dioksidą ištirpusiame būvyje. Slėgio perteklius išleidžiamas per priėmimo indo vožtuvą (9) iki tokios ribos, kiek galutinis produktas gali išlaikyti anglies dioksido. Tam, kad išlaikytų slėgį ir ištirpusį

anglies dvideginį nustatytose ribose, yra tikslinga turėti du ar daugiau panašių, sujungtų į seriją reaktorių (2) ir atpalaiduoti anglies dioksido perteklių tarp kiekvieno reaktoriaus.

1 pavyzdys. Vynas.

Obuolių sultys gali būti panaudojamos kaip substratas keturiems skirtingiems fermentacijos eksperimentams reaktoriaus kolonoje.

Pirmuose dviejuose eksperimentuose (A_1 ir A_2) mielės buvo normaliai kultivuojamos kaip ir periodinės fermentacijos atveju, ir nešiklio matrica, kiekviena apie 500 ml tūrio, buvo paruošta su aukščiau aprašytu mielių ląstelių kiekiu.

Tuoju po to, kai mielės absorbuojosi ant nešiklio matricos, į dvi kolonas (diametras - 50 mm ir aukštis - 250-300 mm) mitybinis substratas buvo paduotas 1 matric. tūris/per dieną tekėjimo greičiu. Substratas buvo pasterizuotos obuolių sultys, kaip mitybinis komponentas mielėms buvo pridėta 1 g/l amonio fosfato. Bendra cukraus koncentracija buvo pasiekta 220 g/l, pridėdant į obuolių sultis cukraus. Fermentacija pradėta lėtai ir po 3 savaičių išpiltas vynas turėjo 4,5-6,5% etanolio. Nešiklis šiame eksperimente buvo 0,315-0,840 mm dalelių dydžio.

Anglies dioksido pašalinimas iš kolonos buvo sudėtingas dėl siauro kolonos viršaus. Kolona, kuri buvo pakrauta nešikliu, kurio dalelių dydis 0,470-0,840 mm, veikė geriau, kadangi anglies dioksidas galėjo laisvai prasikosti iš nešiklio/mielės matricos. Iš abiejų kolonų truputis GDC buvo išpūstas su CO_2 burbuliukais. Po 50 proceso dienų tekėjimo greitis buvo sumažintas iki 0,8 matric. tūrio per dieną, kas įtakojė etanolio kiekio išaugimą per sekančią savaitę nuo 5 iki 7-8%. Po 75 proceso dienų maisto medžiagos toliau buvo padidintos iki 2g/l, bet nebuvo pastebėtas efektas kolonose A_1 arba A_2 .

Trečias eksperimentas A_3 buvo įvykdytas kolonoje, kuri buvo platesnė ir trumpesnė. To pasekoje, buvo sudarytos lengvesnės sąlygos

CO₂ pasišalinimui. Kada nešiklio matrica buvo sterilizuota karštu šarmu, perplauta ir neutralizuota vandeniu bei Na-metabisulfatu, mielių imobilizacija buvo vykdoma su žymiai aukštesne mielių ląstelių koncentracija. 500 ml GDC buvo naudojama 600 ml mielių masės, turinčios 150 milijonų ląst./ml. Prasisunkusių per koloną ląstelių buvo 5 milijon./ml, taigi, bendras imobilizuotų ląstelių kiekis buvo 9×10^{10} ląst. Tai sudaro 2×10^9 ląst/ml GDC arba 5×10^9 ląst/g GDC.

Prieš užpildant koloną obuolių sulčių substratu, vieną dieną kolona buvo eliuuojama mielių mitybinių medžiagų tirpalu. Fermentacija, palyginus su A₁ ir A₂, buvo pradėta greitai ir sekančią dieną etanolio kiekis buvo jau 8%. Tekėjimo greitis buvo 1 BV/per dieną ir maisto medžiagų kiekis 1g/l sulčių. Nedidelis medžiagos kiekis iš kolonos buvo prarastas su CO₂ išsiskyrimu.

Sumažėjęs maitinimo greitis po trijų savaitių buvo vėl išaugusio alkoholio kiekio priežastis. Po 1,5 mėnesio maisto medžiagų kiekis išaugo iki 2g/l, dėl ko toliau didėjo alkoholio kiekis ir sistema stabilizavosi esant 10% etanolio kiekiui trečio gamybos mėnesio metu.

Ketvirtas eksperimentas buvo įvykdytas 8 l reaktoriuje pagal tą pačią procedūrą, kaip ir A₃. Reaktorius sukonstruotas taip, kad išėjimo linijoje yra sumontuota tinklinė plokštelė, sulaikanti bet kokias GDC daleles. Sistema stabilizavosi prie 10% alkoholio kiekio per savaitę. Iš 8 l reaktoriaus paimta produkto porcija toliau buvo pervesta į sekančią 500 ml koloną, siekiant padidinti etanolio kiekį.

Visi eksperimentai buvo vykdomi kambario temperatūroje 20-23°C. Tuo atveju, kai antras reaktorius dirbo pakankamo slėgio sąlygomis, išlaikant ištirpusį CO₂, produktas buvo putojančio šampano tipo vynas, kuris išfasavus į butelius su tuo pačiu slėgiu koks buvo fermentacijos eigoje, tolesnės fermentacijos buteliuose jau nereikalauja, ir tokiu būdu "šampano" darymo procesas yra mažiau kompliktuotas.

2 pavyzdys. Alus.

Šiame pavyzdyje pirminė alaus fermentacija gali būti vykdoma imobilizuotų mielių kolonoje.

Kolonos paruošimas ir mielių imobilizacija gali būti vykdoma pagal procedūrą, aprašytą ankstesniame skyriuje apie reaktoriaus paruošimą. 500 ml nešiklio matricos gali būti pakraunama stiklinėje kolonoje, kuri yra platesnė viršutinėje dalyje tam, kad lengviau atsiskirtų CO₂. Misa gali būti paduodama per fermentacinės kolonos dugną. Paruošiamų mielių ląstelių koncentracija gali siekti 10⁹ ląst./g GDC.

Šiame eksperimente gali būti panaudota tradicinė misa, skirta nestipraus (lager tipo) alaus gamybos darymui. Misa gali būti gaminama iš 18 kg miežių salyklo (pilsnerio tipo), privedant galutinį tūrį iki 100 l misos (12,0°P). Vandens ir salyklo mišinys užraugiamas viename inde pagal suprogramuotą užpylimo būdą, su temperatūros išlaikymais: 48°C temperatūra 15 min, 63°C temp. 30 minučių, 72°C - 20 min ir 78°C- užraugimo pabaigoje.

Misa gali būti skaidrinama filtraciniame inde ir praplaunama 2 kartus 78°C temperatūros vandeniu. Misa gali būti virinama misos katile apie 90 min. Apynių spurgeliai gali būti pridėti virimo pradžioje (bendras kiekis alfa-rūgščių turi būti apie 10 g). Bet kokias virimo metu susidariusias nuosėdas galima atskirti centrifugavimu. Nuskaidrinta misa gali būti atšaldoma plokščiame šilumokaityje nuo 100°C iki 10°C.

Pateikiama parinkta misos sudėtis:

Pradinis ekstraktas	12,0	°Plato
Spalva	10.0	°EBC
Kartumas	25	EBU
pH	5,3	
Laukiamas išeigos santykis	85%	

Tačiau misos sudėtis gali varijuoti sekančiai:

Pradinis ekstraktas	6-18	°Plato
pH	4,5-5,5	
Laukiamas išeigos santykis	65-100%	

Misos fermentacija reaktoriaus kolonoje gali būti pradėta lėtai. Po vienos savaitės trunkančio proceso, greitis, kuris įgalina norimo alaus pagaminimą, bus mažesnis negu vienas matricos tūris /per dieną pamaitinimo greičio. Kolonos sąlygos buvo panašios į aprašytas pavyzdyje 1, gaminant vyną reaktoriuje A₁ ir A₂.

3 pavyzdys. Sakė.

Šiame pavyzdyje parodyta žemą alkoholio kiekį turinčios sakės (Japoniška ryžių degtinė) gamyba. Buvo paruošta kolona ir mielės vėl imobilizuotos pagal anksčiau aprašytą procedūrą, skyriuje apie reaktoriaus paruošimą.

Padarius substratą, ryžiai pirmiausia suskystinami veikiant juos garu ir hidrolizuojami alfa-amilaze ir amilo gliukozidaze. Gautas hidrolizatas buvo nufiltruotas, siekiant pašalinti visas mechanines priemaišas ir nesusihidrolizavusius likučius. Substratas galutinai atskiestas taip, kad gliukozės koncentracija padavimo į koloną metu sudarė 23%. Kolona buvo užpildyta 500 ml nešiklio. Kolona buvo 70 mm diametro ir diametro santykis su nešiklio aukščiu buvo 1:2. Palyginimas atliktas su Ca-alginato surištomis mielėmis. Abiejų fermentacijų pamaitinimo greitis, parametrai ir rezultatai yra pateikiami lentelėje.

Rezultatai

Įkrova	GDCreaktorius	Ca-alginato reaktorius
Fermentacijos trukmė(dienos)	15	25
Temperatūra, °C	15-20	15-20
Etanolio kiekis (tūris/tūryje%)	9,99	13.6
Tekėjimo greitis (matr. tūris/val)	0,069	0,099
Produktyvumas (g/val/l-įkrovos)	5,44	10,62

4 pavyzdys. Gėrimai, turintys mažą alkoholio kiekį.

Šiame pavyzdyje aprašyta tradicinių Skandinavijos gėrimų su mažu alkoholio kiekiu gamyba imobilizuotų mielių sistemoje.

Reguliuojant maitinimo greitį fermentacinėje reaktoriaus kolonoje, gali būti kontroliuojamas fermentacijos greitis, o taip pat gaunamas norimo kvapo ir alkoholio kiekio produktas.

Kolonos paruošimas ir mielių imobilizacija atliekama pagal anksčiau aprašytą procedūrą, pateiktą ankstesniame reaktoriaus paruošimo skyriuje. Mielių ląstelių koncentracija siekia 10^9 ląst./g GDC.

Vandeninis substratas fermentacijai gali būti sudaromas sekančiai:

Kristalinis (baltas) cukrus	500g
Medus	125g
Minkštas rudas cukrus	625g
Dviejų citrinų sultys	
Vanduo	10 l

500 ml nešiklio matrica, esanti stiklinėje kolonoje, eliuuojama substratu, paduodant jį iš apačios. Maitinimo greitis pradžioje gali būti 1 matricos tūris per 5-10 val. ir fermentacijai stabilizavusis, pamaitinimo greitis gali būti reguliuojamas, paduodant 1 matricos tūrį per 1-5 val., priklausomai nuo norimo produkto alkoholio kiekio ir saldumo. Alkoholio kiekis gėrime gali varijuoti nuo 0,2-2,0 tūrių %. Palaikyti mielių gyvybingumą gali būti dedami, kaip mitybinė medžiaga, maži amonio fosfato kiekiai (10-100 m.d.)

Gamyba vykdoma kambario temperatūroje, kiti parametrai - kaip aprašyta aukščiau. Imobilizacijos reaktorius gali taip pat dirbti esant slėgiui bei žemoje temperatūroje. Po to, susidaręs CO₂ ištirpsta ir nereikia papildomai jo pridėti gale.

Be anksčiau nurodyto substrato, kaip substratas gali būti naudojamos ir kitos žaliavos - visi produktai, turintys fermentuojamus cukrus, kaip pvz.: salyklas, vaisiai ir uogos. Galutinis produkto kvapas priklausys nuo žaliavinės medžiagos, cukraus koncentracijos ir fermentacijos greičio.

5 pavyzdys. Mielių imobilizacijos ant kai kurių nešiklių demonstravimas.

Alaus gamybos mielės iš "Suomijos techninio tyrimų centro pramoninių mikro organizmų kolekcijos" (kolekcijos Nr. A-75050) buvo imobilizuotos ant dviejų dervų, pasižyminčių anijotinėmis mainų savybėmis.

Dervos: granuliuota DEAE-celiuliozė, pažymėta kaip SPEZYME GDC 220 ir sintetinė anijonitinė derva, žymėta DUOLITE A 568.

Imobilizacija formuota pagal pateikiamą procedūrą:

Mielės inkubuotos 48 val. salyklo ekstrakto terpėje 30°C temperatūroje. Derva sterilizuota plaunant 1M NaOH, praplauta buferiu ir

perplauta steriliu vandeniu. 10 g sauso svorio dervos pripildyta 20 mm vidinio skersmens stiklinė kolona, įrengta su stiklinio šlako plokšte dugne. 100 ml mielių suspensijos praleista per koloną veikiant gravitacijos jėgoms, maždaug 3 matricų tūriai/val. greičiu, po to kolona buvo plaunama 100 ml sterilaus vandens.

Mielių suspensijos ląstelių koncentracija prieš ir po imobilizacijos buvo nustatyta, skaičiuojant ant agarizuotos lėkštelės. Pagal gautą skirtumą, suskaičiuotas imobilizuotų ląstelių skaičius. Pateikiami rezultatai kiek imobilizuotų ląstelių tenka gramui dervos:

Derva	Mielės	Išėtinis sk.	Imobiliz. sk.
SPEZYME [®]	A-75050	$2,3 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$
DUOLITE [®]	A-75050	$2,3 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$

6 pavyzdys. Nešiklio regeneracija.

Eksperimente naudotą kolonėlę su DEAE-celiulioze regeneruoja paduodant į kolonėlę karštą (apie 60°C) kaustinės sodos 2% tirpalą (NaOH) tol, kol nešiklis pabąla iki pastovios spalvos. Po to kolonėlę plauna steriliu vandeniu tol, kol išbėgusio vandens pH tampa lygus 10, o po to neutralizuoja natrio piro-sulfitu iki pH 7. Po to kolonėlę skalauja steriliu vandeniu ir užpildo misa, turinčia mielių ląstelių (apie 10^{10} ląstelių/1 litrai nešiklio). Ląsteles augina 24 valandas aeruojamoje misoje, tokiu būdu sistema buvo paruošta substrato fermentacijai.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Etanolio ir alkoholinių gėrimų, naudojant imobilizuotas mieles, gamybos būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad vandeninis substratas, turintis fermentinį cukrų, eidamas per mielių ląstelių, imobilizuotų ant nepasiduodančio gniuždymui ir pasižyminčio anijonitinėmis mainų savybėmis nešiklio paviršiaus reaktorių, gamina produktą, turintį etanolį.

2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis apima reaktoriaus pakrovimą vandeniniu mišiniu, sudarytu iš nepasiduodančio gniuždymui ir pasižyminčio anijonitinėmis mainų savybėmis nešiklio bei reaktoriaus paruošimą; pakrauto reaktoriaus sterilizavimą; pakrauto reaktoriaus eliuavimą mielių terpe tam, kad mielės imobilizuotųsi ant nešiklio; vandeninio substrato, turinčio fermentuojamus cukrus, perleidimą per užpildytą imobilizuotomis mielėmis reaktorių, gaunant etanolinį produktą.

3. Būdas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad dar jis apima eliuanto regeneravimą, susidariusio vandeniniam substratui perėjus per reaktorių, tokiu būdu pagaminant etanolinį produktą.

4. Būdas pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad juo gamina vartojimui skirtą etanolinį produktą, o vandeninis substratas yra vaisių arba daržovių sultys, vaisių arba daržovių ekstraktas, javų grūdų ekstraktas arba misa, hidrolizuota augalinė žaliava arba cukraus sirupas.

5. Būdas pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame nešiklis sudaro ištisinę poringą matricą arba duobėtas ar tinklines struktūras, poringas daleles, kur matrica arba dalelės turi struktūrą, suformuotą iš laisvai asocijuotų daugybės mikrodalelių arba mikroskaidulų, kurios yra chemiškai, adheziškai ar mechaniškai surištos kartu mažiausiai keliuose kontakto taškuose tarp atskirų mikrodalelių arba mikroskaidulų.

6. Būdas pagal 5 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame mikrodaleles arba mikroskaidulas sudarančios dalelės yra sudarytos iš anijonitinės mainų dervos.

7. Būdas pagal 5 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame mikrodalelės ar mikroskaidulos yra sudarytos iš anijonitinės dervos, atrinktos iš grupės, sudarytos iš gamtinės arba regeneruotos celiuliozės, pasižyminčios anijonitinėmis savybėmis arba fenol-formaldehidinės anijonitinės mainų dervos, arba agarozės anijonitinės mainų dervos, arba dekstrinų anijonitinės mainų dervos.

8. Būdas pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame anijonitinė mainų derva yra gamtinė arba regeneruota celiuliozė, pasižyminti anijonitinėmis mainų savybėmis.

9. Būdas pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame mikrodalelės arba mikroskaidulos surištos kartu adheziniais ryšiais.

10. Būdas pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame nešiklis apima daleles, suformuotas iš mikrodalelių arba mikroskaidulų aglomeruotų su polistirolu, o anijonitinė mainų derva yra dietilaminoetilpakeista celiuliozė.

11. Būdas pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis apima vandeninio substrato perėjimą per daugybę reaktorių, sujungtų į seriją, įgalinančių dujų atpalaidavimą iš tirpalo, eliuoto iš kiekvieno reaktoriaus.

12. Būdas pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame vandeninis substratas pereina per reaktorių, veikiant slėgiui, kuris įgalina pagrindinei susidariusio anglies dioksido porcijai išlikti ištirpusiame būvyje.

13. Būdas pagal 12 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame slėgimą visiškai reguliuoja gamybos metu, tokiu būdu gaminant karbonizuotus etanolinius produktus.

14. Būdas pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad juo gamina pramoninį etanolį.

15. Būdas pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad juo gamina vartojimui skirtą etanolį.

16. Būdas pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame maitinimo greitį ir reaktoriaus darbo trukmės laiką parenka taip, kad gautų etanolio produktą, kuriame etanolio koncentracija sudarytų nuo 0,05 iki 15 tūrio % nuo bendro produkto tūrio.

17. Būdas pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame vandeninio substrato tekėjimo srovės per reaktorių kryptis yra prieš gravitacinę jėgą.

18. Būdas pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame vandeninio substrato tekėjimo srovė per reaktorių periodiškai keičia kryptį.

19. Būdas pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame nešiklis yra ištisinė matrica arba daugybė duobėtų ar tinklinės struktūros poringų dalelių.

20. Būdas pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad reaktorius yra kolona.

21. Būdas pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis dar apima fermentinio reaktoriaus su praleistom, neproduktyviomis mielėmis našumo regeneravimą, pašalinant neproduktyvias mieles nuo nešiklio, pakrauto kolonoje, taip pat pakrauto nešiklio sterilizavimą ir

naujos mielių terpės į reaktorių užpylimą, siekiant imobilizuoti naujas mielių ląsteles ant nešiklio.

22. Kompozicija, tinkama naudoti fermentacijai, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji turi mielių ląsteles, imobilizuotas ant nepasiduodančio gniuždymui ir pasižyminčio anijonitinėmis mainų savybėmis nešiklio paviršiaus.

23. Kompozicija pagal 22 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad joje nešiklis turi daugybę laisvai asocijuotų mikrodalelių arba mikroskaidulų, kurios yra chemiškai, mechaniškai arba adheziškai surištos kartu mažiausiai keliuose inter-mikrodalelių arba inter-mikroskaidulų kontakto taškuose.

24. Kompozicija pagal 23 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad joje mikroskaidulos arba mikrodalelės yra sudarytos iš anijonitinės mainų dervos.

25. Kompozicija pagal 23 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad joje nešiklis turi daugybę atskirų, duobėtų arba tinklinės struktūros poringų dalelių.

26. Kompozicija pagal 25 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad joje nešiklis turi daugybę poringų dalelių, o kiekviena dalelė suformuota iš individualių mikroskaidulų adheziniais ryšiais kartu surišų mažiausiai keliuose inter-mikroskaidulų kontakto taškuose termoplastinės dervos pagalba.

27. Kompozicija pagal 23 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad kompozicija yra ištisinė matrica.

28. Kompozicija pagal 22 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji yra sausoje formoje.

29. Kompozicija pagal 23 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad mikrodalelės arba mikroskaidulos yra sudarytos iš adaptuotos celiuliozės arba viskozės, turinčios anijonitinių mainų savybių, sintetinės anijonitinės mainų dervos arba agarozės, arba dekstrinų pagrindu anijonitinės mainų dervos.

