



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0027765

(51)⁷ C12P 7/08; C12R 1/645; C12P 7/40;
C12N 1/16

(13) B

(21) 1-2014-03798

(22) 14/05/2013

(86) PCT/KR2013/004256 14/05/2013

(87) WO/2013/172628 A1 21/11/2013

(30) 10-2012-0051083 14/05/2012 KR

(45) 25/03/2021 396

(43) 25/02/2015 323A

(73) 1. GS CALTEX CORPORATION (KR)

679, Yeoksam-dong, Gangnam-gu, Seoul 135-916, Republic of Korea

2. CHANGHAE ETHANOL CO., LTD. (KR)

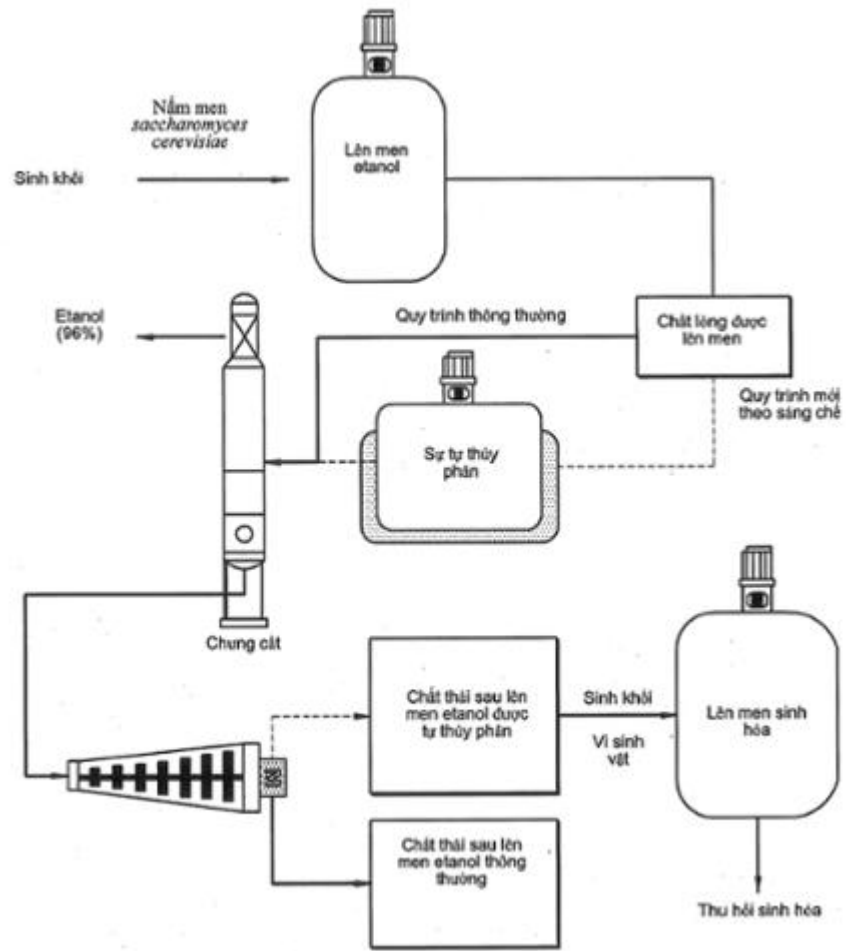
15 Wonmanseong-ro, Deokjin-gu, Jeonju-si, Jeollabuk-do 561-203, Republic of Korea

(72) SONG, Hyo-Hak (KR); LEE, Julia (KR); CHOI, Gi-Wook (KR); MOON, Se-Kwon (KR).

(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT SẢN PHẨM SINH HỌC BẰNG CÁCH SỬ DỤNG
CHẤT THẢI HỮU CƠ ĐƯỢC THỦY PHÂN CỦA QUÁ TRÌNH LÊN MEN

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất sản phẩm sinh học, bao gồm các bước: nuôi cấy vi sinh vật thứ nhất để sản xuất rượu sinh học; tự thủy phân vi sinh vật thứ nhất; phân tách rượu sinh học, thu được chất thải từ sự lên men rượu sinh học được thủy phân; và cấy vi sinh vật thứ hai vào chất thải từ sự lên men rượu sinh học được thủy phân.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm sinh học bằng cách sử dụng chất thải hữu cơ của quá trình lên men bao gồm nấm men đã tự thủy phân.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Để sản xuất các sản phẩm sinh học thông qua quá trình lên men sử dụng vi sinh vật, các loại thành phần dinh dưỡng khác nhau mà cần thiết cho sự sinh trưởng của vi sinh vật cần phải được bổ sung vào môi trường. Môi trường thường được phân loại thành môi trường tổng hợp chỉ chứa các thành phần mà được xác định rõ ràng trong hóa học như các muối vô cơ, các axit amin, các vitamin, và các chất tương tự, và môi trường phức hợp chứa tất cả các thành phần cần thiết cho sự sinh trưởng của vi sinh vật như pepton, nước ngô xay, cao nấm men, và các thành phần tương tự, thậm chí là một số thành phần chưa được xác định.

Tuy nhiên, trong môi trường tổng hợp, có một vấn đề ở chỗ cho đến nay đã biết có một lượng lớn các vi sinh vật không có khả năng sinh trưởng ngay cả trong môi trường tổng hợp chứa tất cả các thành phần dinh dưỡng. Cụ thể, do chi phí của các axit amin và các vitamin được bổ sung vào môi trường tổng hợp đắt đáng kể, nên có sự hạn chế trong việc sử dụng các vật liệu đắt tiền làm thành phần dinh dưỡng của môi trường trong quá trình lên men vi sinh vật để sản xuất hàng loạt vật liệu giá thành thấp như nhiên liệu sinh học và các sản phẩm sinh học.

Do đó, nỗ lực để phát triển nguồn dinh dưỡng phức hợp không chỉ chứa tất cả các thành phần dinh dưỡng cần thiết cho sự sinh trưởng của vi sinh vật và quá trình sản xuất chất chuyển hóa mong muốn thông qua quá trình lên men vi sinh vật mà còn có chi phí rẻ đã được tiến hành tích cực trên toàn thế giới. Đối với nguồn dinh dưỡng phức hợp, có pepton, nước ngô xay, cao nấm men, và các thành phần tương tự, trong

đó một số thành phần này đã được sử dụng trong quá trình công nghiệp sản xuất các vật liệu khác nhau cần thiết cho ngành công nghiệp thực phẩm, như các axit hữu cơ, các axit amin, các axit nucleic, và các chất tương tự, thông qua quá trình lên men vi sinh vật.

Trong trường hợp pepton, các thành phần dinh dưỡng cần thiết cho sự sinh trưởng của vi sinh vật và quá trình sản xuất chất chuyển hóa mong muốn thông qua quá trình lên men vi sinh vật có rất nhiều; tuy nhiên, chi phí của nó tương đối đắt để sản xuất nhiên liệu sinh học và các sản phẩm sinh học thông qua quá trình lên men vi sinh vật.

Ngoài ra, nước ngô xay (corn steep liquor - CSL) có ưu điểm đó là có chi phí rẻ; tuy nhiên, axit sunfuric được sử dụng trong quá trình chế biến và ngâm ngô, dẫn đến axit sunfuric có chứa trong nước ngô xay. Axit sunfuric có thể ức chế sự sinh trưởng của vi sinh vật và sản xuất chất chuyển hóa mong muốn thông qua quá trình lên men vi sinh vật. Ngoài ra, so với pepton hoặc cao nấm men, nước ngô xay có các thành phần dinh dưỡng tương đối không đầy đủ, các thành phần này có khả năng được sử dụng bởi vi sinh vật, dẫn đến cần bổ sung một lượng tương đối lớn nước ngô xay so với lượng pepton hoặc cao nấm men. Thực tế, trong trường hợp sử dụng môi trường chứa nước ngô xay làm thành phần dinh dưỡng cho sự sinh trưởng của vi sinh vật và sản xuất chất chuyển hóa mong muốn thông qua quá trình lên men vi sinh vật, đã có báo cáo rằng tỉ lệ sinh trưởng của vi sinh vật và hiệu suất sản sinh chất chuyển hóa mong muốn bị giảm (Amartey và các đồng tác giả, *Bullet. Chem. Technol., Macedonia*, 19:65, 2000 Silveira và các đồng tác giả, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55:442, 2001).

WO 2011/056991 A1 bộc lộ phương pháp sản xuất etanol sinh học từ sinh khối bao gồm hai bước lên men với nấm men đóng vai trò là đối tượng sản xuất etanol sinh học, trong đó etanol sinh học được phân tách bằng cách chưng cất và nấm men bị thủy

phân.

WO2009/108908 A1 đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm sinh học, ví dụ, etanol hoặc các axit hữu cơ, từ sinh khối bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật thứ nhất, tốt nhất là *Clostridium* trong sự có mặt của oxy để sản sinh etanol sinh học, phân giải vi sinh vật thứ nhất, phân tách etanol sinh học, thu được chất thải sau lên men và ủ chất thải sau lên men này với vi sinh vật thứ hai, ví dụ như nấm men.

WO2009/043012 đề cập đến phương pháp sản xuất etanol sinh học hoặc các sản phẩm hữu cơ khác từ sinh khối bao gồm các bước nuôi cấy vi sinh vật thứ nhất, ở đây là nấm men hoặc nấm, mà sản sinh etanol, tự thủy phân vi sinh vật nói trên nhờ ủ ở nhiệt độ từ 25 đến 45°C, thu được chất thải sau lên men và cấy vi sinh vật thứ hai vào chất thải sau lên men.

Trong khi đó, cao nấm men thường được làm từ *Saccharomyces cerevisiae* mà được sử dụng trong các nhà máy bia và ngành công nghiệp làm bánh, và hữu dụng cho việc nâng cao hiệu suất sản sinh chất chuyển hóa mong muốn cũng như thúc đẩy sự sinh trưởng của vi sinh vật. Tuy nhiên, cao nấm men được tạo ra bằng cách chiết xuất nấm men, dẫn đến chi phí sản xuất cao.

Theo đó, các tác giả sáng chế đã nghiên cứu phương pháp sản xuất sản phẩm sinh học có hiệu suất cao và chi phí thấp, và kết quả là đã phát hiện rằng trong trường hợp sử dụng chất thải sau lên men còn lại sau khi nhiên liệu sinh học được sản xuất bằng cách sử dụng quá trình lên men vi sinh vật, lượng lớn chất thải sau lên men có khả năng được tái chế do chúng, và các sản phẩm sinh học cũng có năng suất cao. Ngoài ra, các tác giả sáng chế phát hiện rằng sau khi nhiên liệu sinh học được sản xuất, vi sinh vật trong các sản phẩm đã lên men được thủy phân trước khi phân tách nhiên liệu sinh học cần thu được, nên các thành phần dinh dưỡng trong chất thải sau lên men còn lại sau khi nhiên liệu sinh học được phân tách được tăng lên nhiều hơn, dẫn đến các sản phẩm sinh học có năng suất cao đáng kể, nhờ đó hoàn thành sáng chế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất sản phẩm sinh học có hiệu suất cao và chi phí thấp.

Để đạt được mục đích này, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất sản phẩm sinh học bằng cách sử dụng các chất thải của quá trình lên men bao gồm nấm men đã tự thủy phân.

Cụ thể, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất sản phẩm sinh học bao gồm:

nuôi cấy vi sinh vật thứ nhất để sản xuất rượu sinh học;

tự thủy phân vi sinh vật thứ nhất dưới điều kiện nhiệt độ từ 45 đến 60°C để giải phóng các axit amin;

phân tách rượu sinh học; nhờ đó thu được chất thải sau lên men; và

ủ vi sinh vật thứ hai vào chất thải sau lên men.

Trong đó vi sinh vật thứ nhất là nấm men, và vi sinh vật thứ hai là không giống với vi sinh vật thứ nhất.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Theo phương pháp sản xuất của sáng chế, các sản phẩm sinh học có thể được sản xuất với năng suất cao và chi phí thấp.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các mục đích, đặc điểm và ưu điểm nêu trên và khác nữa theo sáng chế sẽ trở nên rõ ràng từ phần mô tả các phương án được ưu tiên được đưa ra kết hợp với các hình vẽ kèm theo sau đây, trong đó:

Fig.1 là biểu đồ thể hiện sự so sánh giữa phương pháp sản xuất sản phẩm sinh học bằng cách sử dụng chất thải sau lên men đã thủy phân theo sáng chế và phương pháp sản xuất sản phẩm sinh học mà không thực hiện sự thủy phân.

Fig.2 thể hiện mức độ thủy phân chất thải sau lên men phụ thuộc vào nhiệt độ thủy phân.

Fig.3 thể hiện mức độ thủy phân chất thải sau lên men phụ thuộc vào độ pH của sự thủy phân.

Fig.4 thể hiện mức độ thủy phân chất thải sau lên men phụ thuộc vào thời gian thủy phân.

Fig.5 là biểu đồ thể hiện biểu đồ lên men về mức tiêu thụ glucoza và sản xuất 2,3-butandiol tại thời điểm sử dụng chất thải sau lên men đã thủy phân hoặc chất lỏng sau lên men chưa thủy phân.

Fig.6 thể hiện năng suất 2,3-butandiol tại thời điểm sử dụng chất thải sau lên men đã thủy phân hoặc chất lỏng sau lên men chưa thủy phân.

Fig.7 là biểu đồ thể hiện biểu đồ lên men về mức tiêu thụ glucoza và sản sinh axit lactic ở thời điểm sử dụng chất thải sau lên men đã thủy phân hoặc chất lỏng sau lên men chưa thủy phân.

Fig.8 thể hiện hiệu suất của axit lactic ở thời điểm sử dụng chất thải sau lên men đã thủy phân hoặc chất lỏng sau lên men chưa thủy phân.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất sản phẩm sinh học bao gồm:

nuôi cấy vi sinh vật thứ nhất để sản xuất rượu sinh học;

tự thủy phân vi sinh vật thứ nhất dưới điều kiện nhiệt độ từ 45 đến 60°C để giải phóng các axit amin;

phân tách rượu sinh học; nhờ đó thu được chất thải sau lên men; và

ủ vi sinh vật thứ hai vào chất thải sau lên men.

Trong đó vi sinh vật thứ nhất là nấm men, và vi sinh vật thứ hai là không giống với vi sinh vật thứ nhất. (Fig.1)

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết.

Vi sinh vật thứ nhất

Vi sinh vật thứ nhất được sử dụng theo sáng chế là nấm men sản xuất rượu sinh học từ sinh khối. Vi sinh vật thứ nhất được sử dụng theo sáng chế có thể là nấm men hoang dại (tự nhiên), đột biến, hoặc tái tổ hợp. Vi sinh vật thứ nhất khác với vi sinh vật thứ hai. Vi sinh vật thứ nhất được sử dụng theo sáng chế là nấm men, cụ thể là, *Saccharomyces cerevisiae* được ưu tiên sử dụng. Ngoài ra, đối với vi sinh vật thứ nhất, hai hoặc nhiều loại nấm men có thể được sử dụng đồng thời hoặc lần lượt.

Sinh khối

Vi sinh vật thứ nhất được sử dụng theo sáng chế sản xuất rượu sinh học bằng cách sử dụng nguồn cacbon, trong đó nguồn cacbon này tốt hơn là sinh khối. Sinh khối không được giới hạn cụ thể miễn là sinh khối này là sinh khối thông thường được sử dụng trong sản xuất rượu sinh học. Ví dụ, sinh khối có thể là gỗ, ngô, bột sắn bột, đường mía, glyxerol, và các sinh khối tương tự, nhưng không bị giới hạn trong đó. Người có trình độ chuyên môn trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng có thể chọn loại sinh khối thích hợp phụ thuộc vào các điều kiện cung và cầu của sinh khối, các loại vi sinh vật thứ nhất, và các loại tương tự.

Rượu sinh học

Rượu sinh học được sản xuất bằng cách nuôi cấy vi sinh vật thứ nhất từ sinh khối. Ví dụ, rượu sinh học có thể là etanol, rượu propylic, propanediol, dihydroxy axeton phosphat, butanol, butandiol, và các rượu tương tự, tốt hơn là, có thể là etanol.

Nuôi cấy vi sinh vật thứ nhất

Phương pháp nuôi cấy vi sinh vật thứ nhất không bị giới hạn cụ thể miễn là vi sinh vật thứ nhất này được nuôi cấy thích hợp để sản xuất rượu sinh học. Ví dụ, vi sinh vật thứ nhất có thể được nuôi cấy lên men theo quy trình lên men theo mẻ, liên tục, hoặc theo mẻ có bổ sung cơ chất, và người có trình độ chuyên môn trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng có thể lựa chọn phù hợp các điều kiện nuôi cấy vi sinh vật thứ nhất, và

các điều kiện tương tự, phụ thuộc vào các loại vi sinh vật thứ nhất, các loại rượu sinh học được sản xuất, các loại nguồn cacbon, và các loại tương tự.

Thủy phân

Sự thủy phân vi sinh vật thứ nhất là thủy phân vi sinh vật thứ nhất, trong đó còn được gọi là sự tự thủy phân, để giải phóng các thành phần dinh dưỡng như các protein, các axit amin, và các thành phần tương tự, trong vi sinh vật vào dung dịch chứa nước, có nghĩa là, trên môi trường. Cụ thể là, vi sinh vật thứ nhất được thủy phân, sao cho các protein trong vi sinh vật, và các thành phần khác, bị phân hủy thành các axit amin để làm tăng hàm lượng của các axit amin trong chất thải sau lên men, trong đó các axit amin này được sử dụng làm các thành phần dinh dưỡng quan trọng cho sự sinh trưởng của vi sinh vật thứ hai và sản xuất các sản phẩm sinh học theo các quy trình sau.

Sự thủy phân được thực hiện bằng cách tự thủy phân vi sinh vật thứ nhất. Tuy nhiên, so với việc bổ sung hydrolaza, sự tự thủy phân vi sinh vật thứ nhất có ưu thế hơn về chi phí thấp và bản thân quy trình của nó là đơn giản.

Tự thủy phân

Như được mô tả nêu trên, sự thủy phân vi sinh vật thứ nhất được sử dụng theo sáng chế là sự tự thủy phân. Sự tự thủy phân tốt hơn là được thực hiện trong môi trường nuôi cấy chứa vi sinh vật thứ nhất trong các điều kiện nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 65°C và tốt nhất là ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 7,0. Tốt hơn nữa là, sự tự thủy phân được thực hiện dưới các điều kiện nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 50°C và độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5, và còn tốt hơn nữa là, sự tự thủy phân được thực hiện trong các điều kiện nhiệt độ nằm trong khoảng từ 42,5 đến 47,5°C và độ pH nằm trong khoảng từ 5,25 đến 6,25. Sự tự thủy phân có thể là được thực hiện trong thời gian trong khoảng từ 1 đến 42 giờ, tốt hơn là, trong khoảng từ 1 đến 24 giờ, tốt hơn nữa là, trong khoảng từ 6 đến 18 giờ, và còn tốt hơn nữa là, trong khoảng từ 8 đến 16 giờ. Trong các điều kiện được mô tả nêu trên về nhiệt

độ và độ pH, vi sinh vật thứ nhất sản xuất các enzym cho sự tự thủy phân, và sự tự thủy phân của vi sinh vật thứ nhất, cụ thể là, sự tự phân giải, xảy ra nhờ các enzym. Theo đó, hầu hết các protein trong vi sinh vật thứ nhất bị phân hủy thành các axit amin và được giải phóng vào dung dịch chứa nước, cụ thể là, môi trường.

Sự tự thủy phân được thực hiện sau khi rượu sinh học được sản xuất bằng cách nuôi cấy vi sinh vật thứ nhất, nhưng trước khi rượu sinh học tạo ra được phân tách và được thu hồi. Nói chung, rượu sinh học được phân tách và được thu hồi bằng cách chưng cất. Tại thời điểm này, các enzym của vi sinh vật thứ nhất bị bất hoạt bởi nhiệt độ cao trong quá trình chưng cất trước khi các protein bị phân hủy thành các axit amin có khả năng trực tiếp được sử dụng làm các thành phần dinh dưỡng. Cụ thể là, sau khi rượu sinh học được phân tách và được thu hồi bằng cách chưng cất, mặc dù nhiệt độ và độ pH của chất thải sau lên men được điều chỉnh, nhưng các enzym của vi sinh vật thứ nhất đã bị bất hoạt, dẫn đến sự tự thủy phân không xảy ra nữa.

Phân tách rượu sinh học

Rượu sinh học được phân tách theo các phương pháp thường được thực hiện trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng, và phương pháp phân tách rượu sinh học không bị giới hạn cụ thể. Tuy nhiên, việc phân tách và thu hồi rượu sinh học tốt hơn là được thực hiện bằng cách chưng cất theo quan điểm về chi phí và hiệu suất. Ví dụ, khi chất thải sau lên men chứa etanol đã tự thủy phân được chuyển vào cột chưng cất, và được chưng cất bằng cách tăng nhiệt độ lên đến mức nằm trong khoảng từ 80 đến 90°C, etanol có độ tinh khiết là 95% hoặc lớn hơn có thể là được thu hồi.

Chất thải sau lên men

Chất thải sau lên men là chất thải sau lên men còn lại sau khi phân tách và thu hồi rượu sinh học. Chất thải sau lên men đã ở trạng thái đã thủy phân, và chứa vi sinh vật thứ nhất đã chết, các protein, các axit amin, và các protein hoặc các axit amin được giải phóng từ vi sinh vật thứ nhất, các thành phần dinh dưỡng, và các thành phần

tương tự. Theo đó, chất thải sau lên men chứa các thành phần dinh dưỡng cần thiết cho sự sinh trưởng của vi sinh vật thứ hai và sự sản xuất các sản phẩm sinh học phong phú so với chất lỏng sau lên men chưa thủy phân.

Vi sinh vật thứ hai

Vi sinh vật thứ hai được sử dụng theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể miễn là nó có thể sản sinh các sản phẩm sinh học theo sáng chế và không giống như vi sinh vật thứ nhất. Vi sinh vật thứ hai được sử dụng theo sáng chế có thể là vi sinh vật hoang dại (tự nhiên), đột biến, hoặc tái tổ hợp. Ngoài ra, vi sinh vật thứ hai được sử dụng theo sáng chế có thể thu được bằng nuôi cấy hai hoặc nhiều loại các vi sinh vật đồng thời hoặc lần lượt.

Ví dụ, vi sinh vật thứ hai được sử dụng theo sáng chế có thể là nấm men, vi khuẩn *Clostridium*, *E. coli*, *Bacillus*, *Anaeromyxobacter*, *Alcaligenes*, *Bacteroides*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pichia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Saccharomyces*, *Streptomyces*, *Thermus*, *Thermotoga*, *Thermoanaerobacter*, *Klebsiella*, *Streptomycetaceae*, *Actinomycetaceae*, *Colinebacterium*, *Zymomonas*, và các vi sinh vật tương tự, nhưng không bị giới hạn ở các vi sinh vật này. Những người có trình độ chuyên môn trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng có thể lựa chọn vi sinh vật thứ hai thích hợp phụ thuộc vào các loại sản phẩm sinh học mong muốn.

Phương pháp nuôi cấy vi sinh vật thứ hai không bị giới hạn cụ thể miễn là vi sinh vật thứ hai được nuôi cấy thích hợp để sản xuất các sản phẩm sinh học giống như vi sinh vật thứ nhất. Ví dụ, vi sinh vật thứ hai có thể là được nuôi cấy theo quy trình nuôi cấy theo mẻ, liên tục, hoặc theo mẻ có bổ sung cơ chất, và những người có trình độ chuyên môn trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng có thể lựa chọn các điều kiện nuôi cấy vi sinh vật thứ hai phù hợp, và các điều kiện tương tự khác phụ thuộc vào các loại

của vi sinh vật thứ hai, các loại sản phẩm sinh học được sản xuất, các loại nguồn cacbon, và tương tự.

Các chất phụ gia

Nước, glucoza, maltoza, đường, tinh bột, glyxerol, nitrat, amoni, các axit amin, ure, peptit, các protein, các nguồn cacbon, và các chất tương tự, có thể được bổ sung ở thời điểm nuôi cấy vi sinh vật thứ hai. Ở đây, rõ ràng rằng các loại chất phụ gia và lượng của chúng được xác định một cách thích hợp bởi người có trình độ chuyên môn trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng trong việc xem xét các loại sản phẩm sinh học được sản xuất, các loại vi sinh vật thứ hai, các điều kiện nuôi cấy, và các điều kiện tương tự khác.

Các sản phẩm sinh học

Các sản phẩm sinh học theo sáng chế, trong đó vật liệu có thể sử dụng là vật liệu thô hoặc chất phụ gia được bổ sung vào vật liệu thô trong quá trình sản xuất các hóa chất, chứa rượu, các axit hữu cơ, axit amin, các enzym, các polyme có thể phân hủy sinh học, và các chất tương tự, mà sản xuất được thông qua sự lên men vi sinh vật.

Rượu có thể là rượu có 6 nguyên tử cacbon hoặc ít hơn và chứa một hoặc hai hoặc nhiều hơn hai nhóm hydroxyl. Ví dụ, rượu trong số các sản phẩm sinh học bao gồm etanol, rượu propylic, propanediol, dihydroxyaxeton phosphat, butanol, butandiol, và các rượu tương tự, trong đó rượu có thể là giống hoặc khác với rượu sinh học được sản xuất bởi vi sinh vật thứ nhất. Tuy nhiên, trong việc xem xét về năng suất sản xuất, trường hợp trong đó rượu được sản xuất bởi vi sinh vật thứ hai khác với rượu được sản xuất bởi vi sinh vật thứ nhất là hiệu quả hơn.

Axit hữu cơ có thể là axit hữu cơ có 6 nguyên tử cacbon hoặc ít hơn và chứa một hoặc hai hoặc nhiều hơn hai nhóm carboxylic. Ví dụ, axit hữu cơ bao gồm axit lactic, axit butyric, axit succinic, axit hydroxypropionic, và các axit tương tự.

Axit amin không bị giới hạn cụ thể miễn là đó là axit amin hữu dụng trong ngành công nghiệp. Ví dụ, axit amin bao gồm lysin, methionin, threonin, và các axit amin tương tự.

Polyme có thể phân hủy sinh học là polyme hữu dụng trong ngành công nghiệp, và ví dụ, polyeste sinh học, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Phân tách các sản phẩm sinh học

Phương pháp sản xuất sản phẩm sinh học theo sáng chế có thể còn bao gồm nuôi cấy vi sinh vật thứ hai để sản xuất các sản phẩm sinh học; và phân tách và làm sạch các sản phẩm sinh học.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ưu điểm và các đặc điểm theo sáng chế và các phương pháp để đạt được sẽ được làm rõ ràng từ các phương án ví dụ được mô tả chi tiết sau đây bằng cách viện dẫn đến các hình vẽ kèm theo. Các phương án ví dụ được đề xuất theo cách ví dụ chỉ để người có trình độ chuyên môn thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng có thể hiểu đầy đủ nội dung bộc lộ theo sáng chế và phạm vi của sáng chế. Do đó, sáng chế sẽ chỉ được xác định bởi phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Vật liệu và phương pháp

Chất lỏng sau lên men etanol

Chất lỏng sau lên men etanol được thu trực tiếp từ nhà máy sản xuất etanol thương phẩm thông qua quá trình lên men vi sinh vật bởi công ty ChangHae Etanol Co. Ltd., sản xuất etanol theo quy mô công nghiệp. ChangHae Etanol Co. Ltd., bán etanol thương phẩm thu được bằng cách lên men bằng chủng sản sinh etanol là chủng *Saccharomyces cerevisiae* để sản xuất khoảng 90 g/L etanol từ sinh khối như đường mía, bột sắn bột, và các sinh khối tương tự, và sau đó chủ yếu chưng cất chất lỏng được lên men ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80 đến 90°C để thu được etanol với độ tinh khiết cuối cùng là 95% hoặc lớn hơn. Trước khi chưng cất etanol theo phương

pháp sản xuất etanol thông qua quá trình lên men vi sinh vật, chất lỏng sau lên men etanol thu được và các thử nghiệm sau được thực hiện.

Cao nấm men

Sản phẩm có sẵn trên thị trường (Difco Labs., Detroit, USA) đã được mua và được sử dụng làm cao nấm men.

Chất thải của quá trình lên men chưa thủy phân

Chất lỏng sau lên men etanol được đưa vào quá trình chưng cất trực tiếp mà không thực hiện thủy phân để phân tách và thu hồi etanol. Ngoài ra, chất thải sau lên men etanol còn lại còn gọi là “chất thải của quá trình lên men chưa thủy phân”, và được sử dụng cho các ví dụ thử nghiệm 2 và 3 dưới đây.

Chất thải của quá trình lên men đã thủy phân

Chất lỏng sau lên men etanol được tự thủy phân trong các điều kiện nhiệt độ là 45°C và độ pH là 6,0 trong thời gian 12 giờ. Chất lỏng sau lên men etanol đã tự thủy phân được chưng cất để phân tách và thu hồi etanol, và phần chất thải còn lại còn được gọi là “chất thải của quá trình lên men đã thủy phân”, và được sử dụng cho các ví dụ thử nghiệm 2 và 3 dưới đây.

Phân tích các thành phần dinh dưỡng

Như là các chất chỉ thị là các thành phần dinh dưỡng có trong chất thải sau lên men etanol và cao nấm men, tổng protein, tổng nitơ, và 16 loại axit amin được chấp nhận, và chất thải sau lên men etanol được ly tâm ở nhiệt độ 4°C và tốc độ 12.000 vòng/phút trong thời gian 10 phút, và các thành phần của chất chỉ thị có trong dịch nổi được phân tích. Tổng protein được phân tích bằng cách sử dụng huyết thanh albumin bò làm vật liệu chuẩn và bộ kit phân tích protein (TP0200, Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA). Tổng nitơ được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp phân tích Kjeldahl nitrogen (Tecator Kjeltex Auto 1030 Analyzer, Foss Tecator AB,

Hoganas, Sweden). 16 loại axit amin được phân tích bằng cách sử dụng máy phân tích axit amin (máy phân tích axit amin, Waters 2690, Waters Inc., Milford, MA, USA).

Ví dụ thử nghiệm 1

Sự tự thủy phân được thực hiện bằng cách thay đổi độ pH, nhiệt độ, và thời gian trong máy ủ lắc để đánh giá các điều kiện tối ưu của sự tự thủy phân chất lỏng sau lên men etanol.

1-1. Hiệu suất của sự tự thủy phân chất lỏng sau lên men etanol phụ thuộc vào nhiệt độ

Sự tự thủy phân được thực hiện trong điều kiện độ pH là 4,5 trong thời gian 48 giờ, nhưng bằng cách thay đổi nhiệt độ trong phạm vi từ 40 đến 65°C, tiếp theo thực hiện chưng cất ở nhiệt độ 85°C để thu hồi etanol từ chất lỏng sau lên men etanol đã thủy phân. Sau khi etanol được thu hồi, các thành phần dinh dưỡng của chất thải sau lên men etanol đã tự thủy phân được phân tích.

Kết quả là, đánh giá rằng tổng protein, tổng nitơ, và axit amin với lượng lớn nhất được giải phóng dưới dạng dung dịch nước ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 55°C, và cụ thể là, tổng cộng axit amin trong dung dịch chứa nước cao nhất ở nhiệt độ 45°C (Fig.2).

1-2. Hiệu suất tự thủy phân của chất lỏng sau lên men etanol phụ thuộc vào độ pH

Sự thủy phân được thực hiện trong thời gian 48 giờ ở nhiệt độ 45°C mà tại đó tác dụng thủy phân là tốt nhất ví dụ 1-1 nêu trên, nhưng bằng cách thay đổi độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 7,0. Sau đó, quá trình chưng cất được thực hiện đối với chất lỏng sau lên men etanol đã thủy phân ở nhiệt độ 85°C để thu hồi etanol, và sau khi etanol được thu hồi, các thành phần dinh dưỡng của chất thải sau lên men etanol được tự thủy phân được phân tích.

Kết quả là, đã thể hiện rằng tổng protein, tổng nitơ, và axit amin có lượng lớn nhất được giải phóng dưới dạng dung dịch nước trong điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0, và cụ thể, độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,0, và trong số

các kết quả, tổng cộng axit amin trong dung dịch chứa nước ở thời điểm của sự tự thủy phân ở độ pH là 6,0 là cao nhất (Fig.3).

1-3. Hiệu suất tự thủy phân của chất lỏng sau lên men etanol phụ thuộc vào thời gian

Hiệu suất tự thủy phân được đánh giá phụ thuộc vào thời gian thủy phân trong các điều kiện về độ pH là 6,0 và 45°C mà tại đó hiệu suất sự tự thủy phân là cao nhất ở các ví dụ 1-1 và 1-2 nêu trên. Sự tự thủy phân được thực hiện trong các điều kiện độ pH là 6,0 và ở nhiệt độ 45°C trong thời gian từ 6 đến 42 giờ, với mỗi 6 giờ cho một bộ, tiếp theo thực hiện chưng cất ở nhiệt độ 85°C để thu hồi etanol từ chất lỏng sau lên men etanol đã thủy phân. Sau khi etanol được thu hồi, các thành phần dinh dưỡng của chất thải sau lên men etanol đã tự thủy phân được phân tích.

Kết quả là, mức độ của tự thủy phân của chất lỏng sau lên men etanol được tăng ngay lên 12 giờ, nhưng sau đó, sự tự thủy phân không được tiến hành nữa. Do đó, xác định được rằng sự tự thủy phân của chất lỏng sau lên men etanol tốt hơn là được thực hiện trong thời gian 12 giờ hoặc nhiều hơn, và cụ thể, 12 giờ là điều kiện hiệu quả nhất (Fig.4).

Khi tóm lược các ví dụ từ <1-1> đến <1-3> nêu trên, sự tự thủy phân của chất lỏng sau lên men etanol tốt hơn là được thực hiện trong các điều kiện nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 55°C và độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0 trong thời gian 12 giờ hoặc nhiều hơn, và cụ thể, trong các điều kiện nhiệt độ là 45°C và độ pH là 6,0, trong thời gian 12 giờ.

Ví dụ thử nghiệm 2

Các thành phần dinh dưỡng trong cao nấm men (1g/L), chất lỏng sau lên men chưa thủy phân, và chất thải sau lên men đã thủy phân được phân tích để đánh giá định lượng các thành phần dinh dưỡng được giải phóng vào chất lỏng chứa nước trong quy trình tự thủy phân của chất lỏng sau lên men etanol.

Kết quả

Trong 1 g/L cao nấm men có 0,356 g/L tổng protein và 0,119 g/L tổng nitơ, và 27,05 mg/L tổng 16 loại axit amin. Trong khi chất lỏng sau lên men chưa thủy phân chứa 2,906 g/L tổng protein và 0,471 g/L tổng nitơ, mà tương ứng cao hơn tổng lượng protein trong cao nấm men (1 g/L) là 8,2 lần, và cao hơn tổng lượng nitơ trong cao nấm men (1 g/L) là 4,0 lần. Trong khi đó, tổng 16 loại axit amin trong chất lỏng sau lên men chưa thủy phân là 24,11 mg/L, tức là tương ứng bằng khoảng 90% so với cao nấm men (1 g/L). Theo đó, được xem xét rằng ở sự sinh trưởng vi sinh vật và sự sản xuất chất chuyển hóa mong muốn thông qua quá trình lên men vi sinh vật, chất lỏng sau lên men chưa thủy phân là có lợi về mặt nguồn protein và nitơ; nhưng cao nấm men (1 g/L) có lợi hơn về mặt axit amin.

Trong khi đó, trong chất thải được thủy phân được lên men ethanol có 3,201 g/L tổng protein và 0,532 g/L tổng nitơ. Khi được so sánh với chất thải sau lên men ethanol có sẵn, các giá trị này của chất thải sau lên men đã thủy phân lần lượt tăng khoảng 10% và 13%, và khi được so sánh với cao nấm men (1 g/L), các giá trị này cao đáng kể tương ứng với các giá trị cao nhất lần lượt khoảng 9 lần và 4,5 lần so với các cao nấm men. Cụ thể, 48,51 mg/L axit amin có trong chất thải sau lên men đã thủy phân, mà tăng khoảng 100% hoặc cao hơn như so với chất lỏng sau lên men chưa thủy phân. Có nghĩa là nhiều thành phần có thể sử dụng làm các thành phần dinh dưỡng cho sự sinh trưởng của vi sinh vật và sản xuất chất chuyển hóa mong muốn thông qua quá trình lên men vi sinh vật được giải phóng vào dung dịch nước nhờ sự tự thủy phân của chất lỏng sau lên men ethanol. 48,51 mg/L axit amin có trong chất thải sau lên men đã thủy phân cũng được tăng 80% so với 27,05 mg/L axit amin có trong cao nấm men (1g/L) (Bảng 1).

Bảng 1

thành phần	Cao nấm men	Chất thải sau lên men ethanol chưa thủy phân	Chất thải sau lên men ethanol đã thủy phân
Tổng protein (g/L)	0,356	2,906	3,201

Tổng nitơ (g/L)	0,119	0,471	0,532
Axit amin (g/L)	27,05	24,11	48,51
Axit aspartic	1,50	0,97	1,88
Axit glutamic	4,99	3,55	4,64
Serin	1,58	1,38	2,37
glixin	0,93	0,61	1,31
histidin	0,44	0,35	0,69
threonin	1,50	1,17	2,58
arigin	1,21	2,58	3,06
Alanin	2,89	2,07	4,45
prolin	0,81	4,73	9,17
Tyrosin	0,61	1,36	3,32
valin	1,79	1,65	2,91
methionin	0,85	0,34	1,46
Isoleuxin	1,75	0,65	2,22
Leuxin	3,03	1,58	3,95
Lysin	1,43	1,13	2,04
phenylanin	1,74	0,99	2,46

Ví dụ thử nghiệm 3: Hiệu suất sản xuất các sản phẩm sinh học

3-1. Hiệu suất sản xuất 2,3-butandiol

Canh trường lỏng của chủng tái tổ hợp *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca* ATCC43863 *ldhA*) được nuôi cấy trong bình thủy tinh dung tích 300 mL được cấy truyền vào thiết bị phản ứng sinh học dung tích 6,6L chứa chất thải sau lên men đã thủy phân hoặc chất lỏng sau lên men chưa thủy phân, tương ứng, sau đó thực hiện quá trình lên men theo mẻ để sản xuất 2,3-butandiol. Ở đây, các điều kiện lên men là nồng độ glucoza ban đầu là 300 mM (54 g/L), nhiệt độ lên men là 37°C và tốc độ khuấy là

150 vòng/phút, và không khí được cung cấp liên tục trong khi nuôi cấy ở tốc độ thấp là 1 vvm (3 L/phút), và độ pH trong quá trình lên men được điều chỉnh đến độ pH là 6,0 bằng cách sử dụng dung dịch NaOH 5N.

Chủng tái tổ hợp *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca* ATCC43863 *ldhA*) là chủng tái tổ hợp (*K. oxytoca* ATCC43863 *ldhA*) thu được bằng cách loại bỏ gen *ldhA* mã hóa enzym liên quan đến sự sinh tổng hợp axit lactic (lactat dehydrogenaza) từ chủng *Klebsiella oxytoca* (*Klebsiella oxytoca* ATCC43863), và được sử dụng làm chủng dùng để sản xuất 2,3-butandiol trong thử nghiệm.

Ở đây, môi trường tổng hợp thường được sử dụng dùng để nuôi cấy chủng *Klebsiella oxytoca* được sử dụng làm nhóm đối chứng, và các thành phần của chúng được thể hiện trong Bảng 2 sau đây. 2,3-butandiol được sản xuất theo phương pháp lên men và nuôi cấy tương tự như chất thải sau lên men ngoại trừ việc bổ sung môi trường tổng hợp thay cho chất thải sau lên men đã thủy phân/chưa thủy phân vào thiết bị phản ứng sinh học.

Bảng 2

Thành phần	Nồng độ	Thành phần	Nồng độ
K ₂ HPO ₄	8,657 g/L	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g/L
KH ₂ PO ₄	6,845 g/L	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,001 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	6,6 g/L	MnSO ₄ .H ₂ O	0,001 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25 g/L	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,001 g/L
HCl	10 ml/L		

Kết quả

Trong trường hợp nhóm đối chứng, chủng tái tổ hợp *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca* ATCC43863 *ldhA*) tiêu thụ hoàn toàn 300 mM glucoza được bổ sung vào môi trường làm nguồn cacbon sau khi lên men trong thời gian 30 giờ; tuy nhiên, trong trường hợp sử dụng chất lỏng sau lên men chưa thủy phân làm môi trường, chủng

được tiêu thụ hoàn toàn lượng tương tự của glucoza sau khi lên men trong thời gian 24 giờ. 2,3-butandiol được sản xuất sau khi 300 mM glucoza được tiêu thụ hoàn toàn, trong đó ở trường hợp của nhóm đối chứng, 16 g/L của 2,3-butandiol được sản xuất, nhưng trong trường hợp sử dụng chất lỏng sau lên men chưa thủy phân làm môi trường, 18 g/L của 2,3-butandiol được sản xuất. Trong khi đó, trong trường hợp sử dụng chất thải sau lên men đã thủy phân làm môi trường, 300 mM glucoza được tiêu thụ hoàn toàn sau khi lên men trong thời gian 21 giờ, và lượng 2,3-butandiol được sản xuất là 18 g/L, lượng này bằng với lượng chất lỏng sau lên men chưa thủy phân (Fig.5).

Ngoài ra, kết quả thu được bằng cách tính hiệu suất của 2,3-butandiol, nghĩa là, lượng sản xuất của 2,3-butandiol mỗi lần, được xác nhận rằng năng suất 2,3-butandiol của chất thải sau lên men đã thủy phân là 0,89 g/L/giờ, hiệu suất này cao hơn so với chất lỏng sau lên men chưa thủy phân (0,78 g/L/giờ) và của nhóm đối chứng (0,53 g/L/giờ). Được xem xét bởi các thành phần dinh dưỡng được giải phóng vào dung dịch chứa nước thông qua sự tự thủy phân của chất lỏng sau lên men etanol, và cụ thể, axit amin tăng mức tiêu thụ của glucoza và tỉ lệ sản xuất của 2,3-butandiol, để cải thiện hiệu suất của 2,3-butandiol (Fig.6).

3-2. Hiệu suất sản xuất axit lactic

Thử nghiệm đo hiệu suất sản xuất axit lactic được thực hiện bằng cách sử dụng chủng *Lactobacillus paracasei* (L. paracasei KCTC 11710BP). Cụ thể, canh trường lỏng của chủng *Lactobacillus paracasei* (L. paracasei KCTC 11710BP) được nuôi cấy trong bình thủy tinh dung tích 300 mL được cấy truyền vào thiết bị phản ứng sinh học dung tích 6,6 L chứa lần lượt chất thải sau lên men đã thủy phân hoặc chất lỏng sau lên men chưa thủy phân, tiếp theo thực hiện quá trình lên men theo mẻ, trong đó các điều kiện lên men là nồng độ glucoza ban đầu là 300 mM (54 g/L), nhiệt độ lên men là

37°C và tốc độ khuấy là 150 vòng/phút. Độ pH là trong quá trình lên men được điều chỉnh đến 6,0 bằng cách sử dụng dung dịch NaOH 10N.

Ở đây, môi trường sinh trưởng *Lactobacillus* (Lactobacillus Growth Medium-LGM) thường được sử dụng dùng để lên men *Lactobacillus* được sử dụng làm nhóm đối chứng, và các thành phần của chúng được thể hiện trong Bảng 3 dưới đây. Axit lactic được sản xuất theo phương pháp lên men tương tự làm chất thải sau lên men ngoại trừ việc bổ sung môi trường LGM thay cho chất thải sau lên men đã thủy phân/chưa thủy phân vào thiết bị phản ứng sinh học.

Bảng 3

Thành phần	Nồng độ
Cao nấm men	2 g/L
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4 g/L
Amoni xitrat	1,5 g/L
Natri axetat	1,5 g/L
MnSO ₄ .5H ₂ O	0,012 g/L

Kết quả

Trong trường hợp nhóm đối chứng, chủng *Lactobacillus paracasei* (*L. paracasei* KCTC 11710BP) tiêu thụ hoàn toàn 300 mM glucoza được bổ sung vào môi trường làm nguồn cacbon sau khi lên men trong khoảng 48 giờ; tuy nhiên, trong trường hợp các nhóm chất lỏng sau lên men chưa thủy phân, chủng được tiêu thụ hoàn toàn lượng tương tự của glucoza sau khi lên men trong khoảng 40 giờ. Axit lactic được sản xuất sau khi 300 mM glucoza được tiêu thụ hoàn toàn, trong đó ở trường hợp nhóm đối chứng, 42 g/L axit lactic được sản xuất, nhưng trong trường hợp chất lỏng sau lên men chưa thủy phân, 49 g/L axit lactic được sản xuất, lượng axit lactic này tăng khoảng 17% so với nhóm đối chứng. Trong khi đó, trong trường hợp sử dụng chất thải sau lên men đã thủy phân làm môi trường, 300 mM glucoza được tiêu thụ hoàn

toàn sau khi lên men trong khoảng 32 giờ, và 50 g/L axit lactic được sản xuất, lượng axit lactic này cao hơn so với trường hợp sử dụng chất lỏng sau lên men chưa thủy phân làm môi trường (Fig.7).

Trong khi, trong trường hợp về năng suất của axit lactic, đó là, lượng sản xuất axit lactic mỗi lần, được xác nhận rằng năng suất của axit lactic của chất thải sau lên men đã thủy phân là 1,58 g/L/giờ, lượng axit lactic này cao hơn so với chất lỏng sau lên men chưa thủy phân (1,24 g/L/giờ) và của nhóm đối chứng (0,88 g/L/giờ). Được xem xét bởi các thành phần dinh dưỡng được giải phóng vào dung dịch chứa nước thông qua sự tự thủy phân chất lỏng sau lên men etanol, và cụ thể, axit amin, tăng mức tiêu thụ glucoza và tỉ lệ sản xuất axit lactic, để cải thiện hiệu suất của axit lactic (Fig.8).

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Theo phương pháp sản xuất sản phẩm sinh học theo sáng chế, các sản phẩm sinh học có thể được sản xuất có hiệu suất cao và chi phí thấp.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất sản phẩm sinh học bao gồm:

nuôi cấy vi sinh vật thứ nhất để sản xuất rượu sinh học;

tự thủy phân vi sinh vật thứ nhất dưới điều kiện nhiệt độ từ 40 đến 65°C để giải phóng các axit amin;

phân tách rượu sinh học, nhờ đó thu được chất thải sau lên men; và

cấy vi sinh vật thứ hai vào chất thải sau lên men;

trong đó vi sinh vật thứ nhất là nấm men, và vi sinh vật thứ hai không giống với vi sinh vật thứ nhất.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó sản phẩm sinh học là giống hoặc khác với rượu sinh học.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật thứ nhất sản xuất rượu sinh học từ sinh khối.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó sự thủy phân được thực hiện trong môi trường nuôi cấy chứa vi sinh vật thứ nhất dưới điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 7,0.

5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hàm lượng axit amin trong chất thải sau lên men được tăng lên nhờ sự thủy phân.

6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó rượu sinh học là etanol sinh học.

7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật thứ hai có khả năng sản xuất sản phẩm sinh học.

8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó sản phẩm sinh học là rượu hoặc axit hữu cơ.

9. Phương pháp theo điểm 1, trong đó sản phẩm sinh học là rượu có 6 nguyên tử cacbon hoặc ít hơn hoặc axit hữu cơ có 6 nguyên tử cacbon hoặc ít hơn.

10. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm:

nuôi cấy vi sinh vật thứ hai để sản xuất các sản phẩm sinh học; và

phân tách và làm sạch các sản phẩm sinh học.

11. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật thứ hai là *Klebsiella*; và sản phẩm sinh học là 2,3-butandiol.

12. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật thứ hai là *Lactobacillus*; và sản phẩm sinh học là axit lactic.

Fig.1

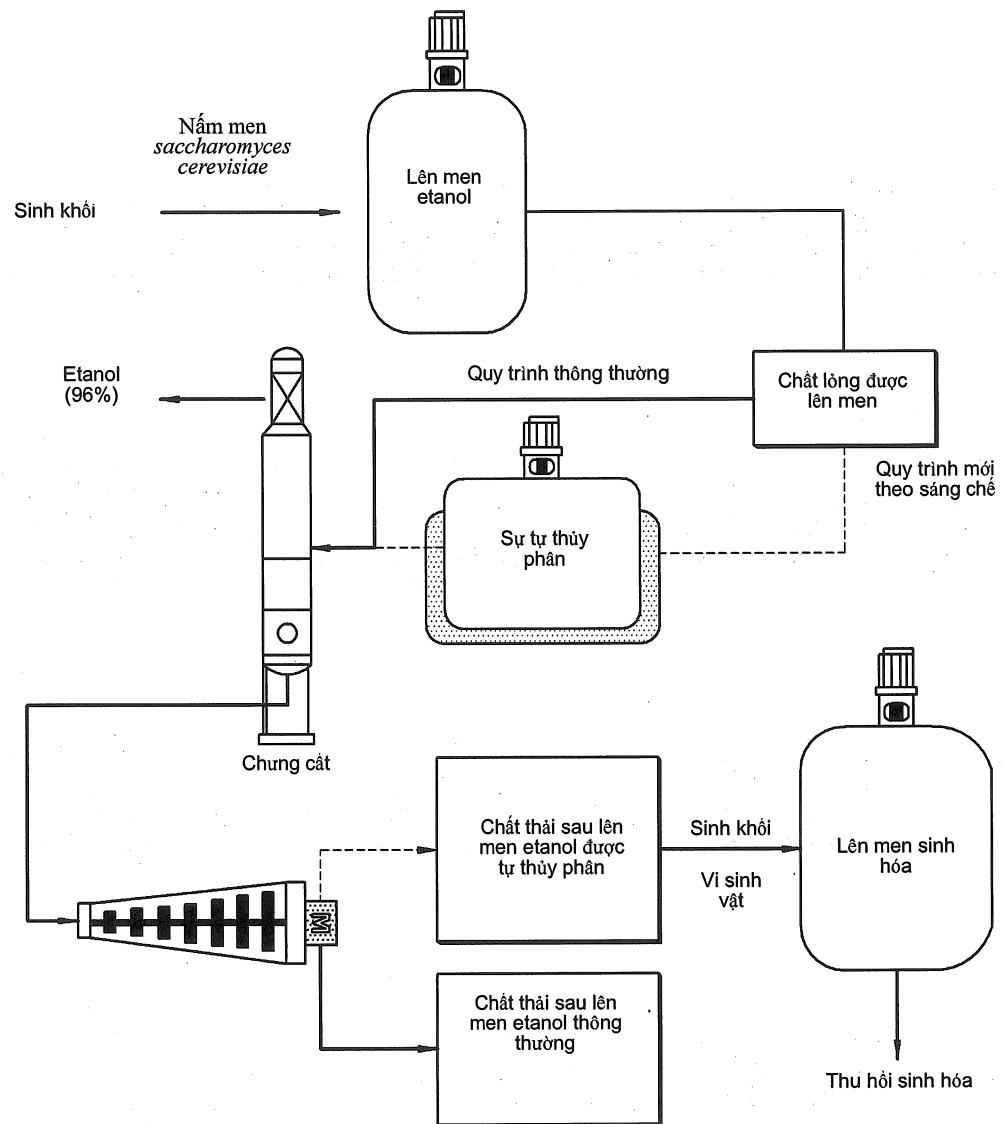


Fig.2

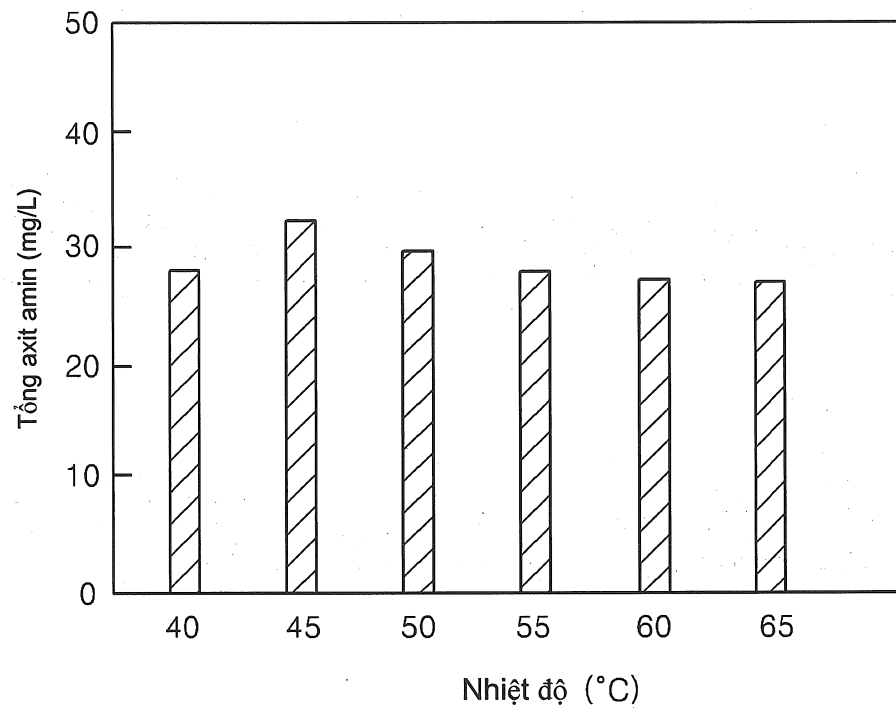


Fig.3

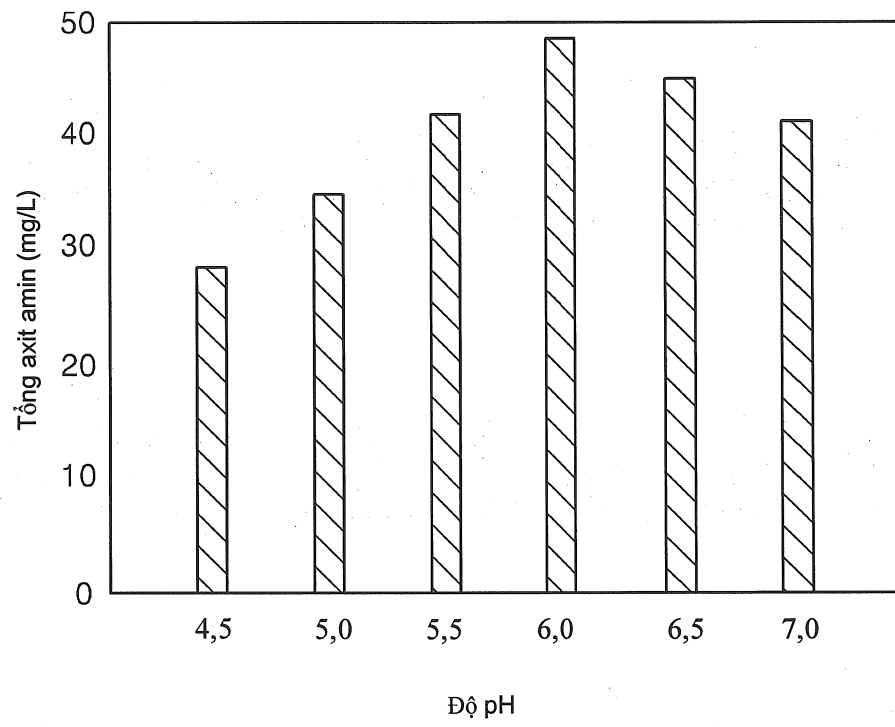


Fig.4

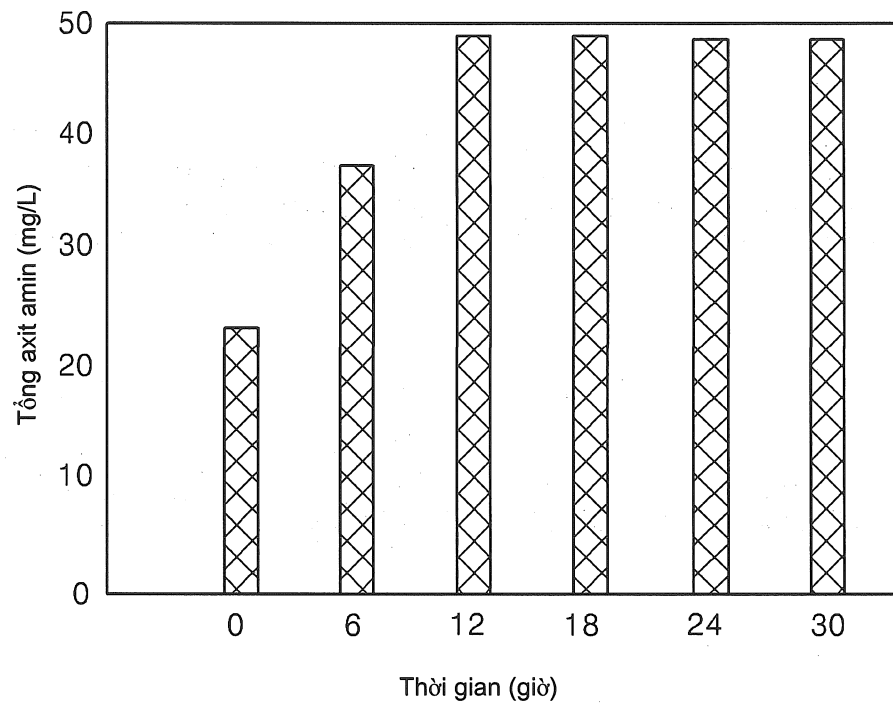
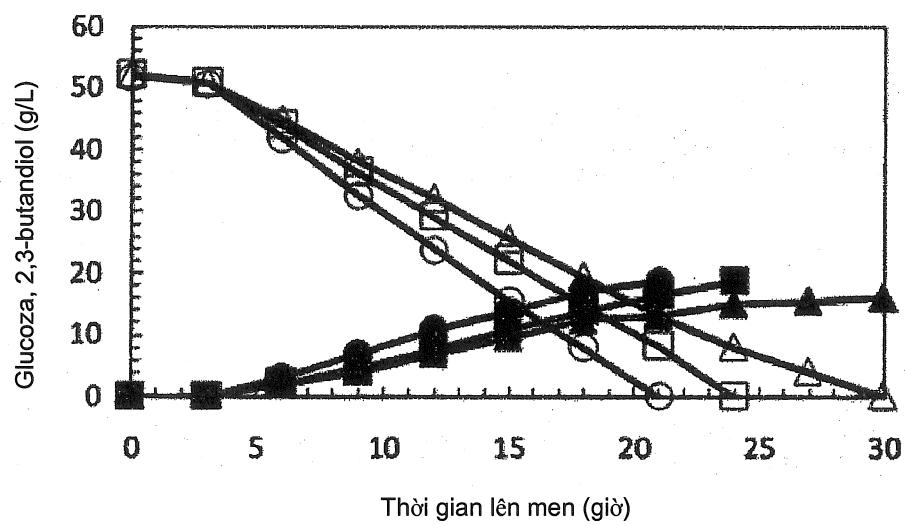


Fig.5



Nhóm chất thải sau lên men đã thủy phân

(Glucose ○, 2,3-butanediol ●)

Nhóm chất thải sau lên men chưa thủy phân

(Glucose □, 2,3-butanediol ■)

Nhóm đối chứng (glucose △, 2,3-Butanediol ▲)

Fig.6

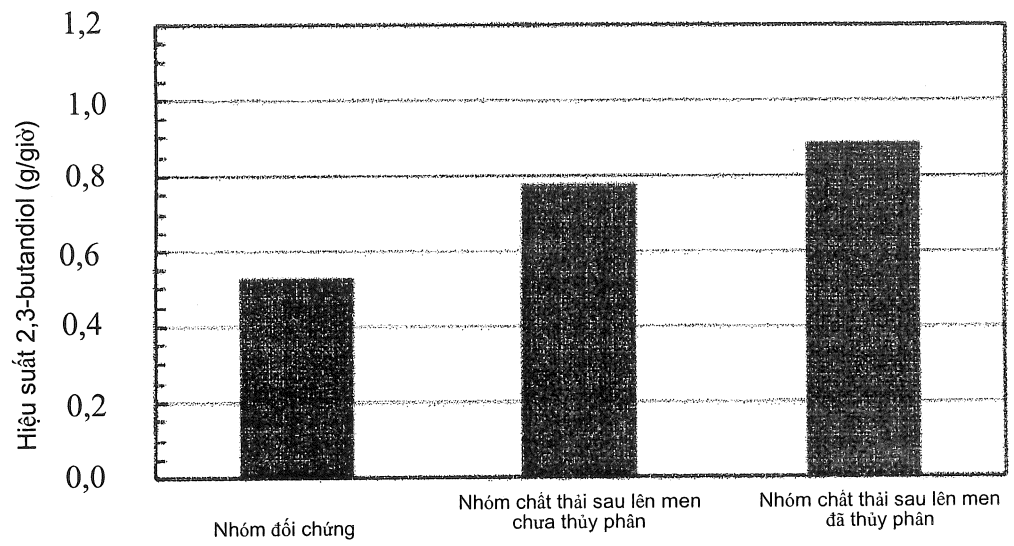


Fig.7

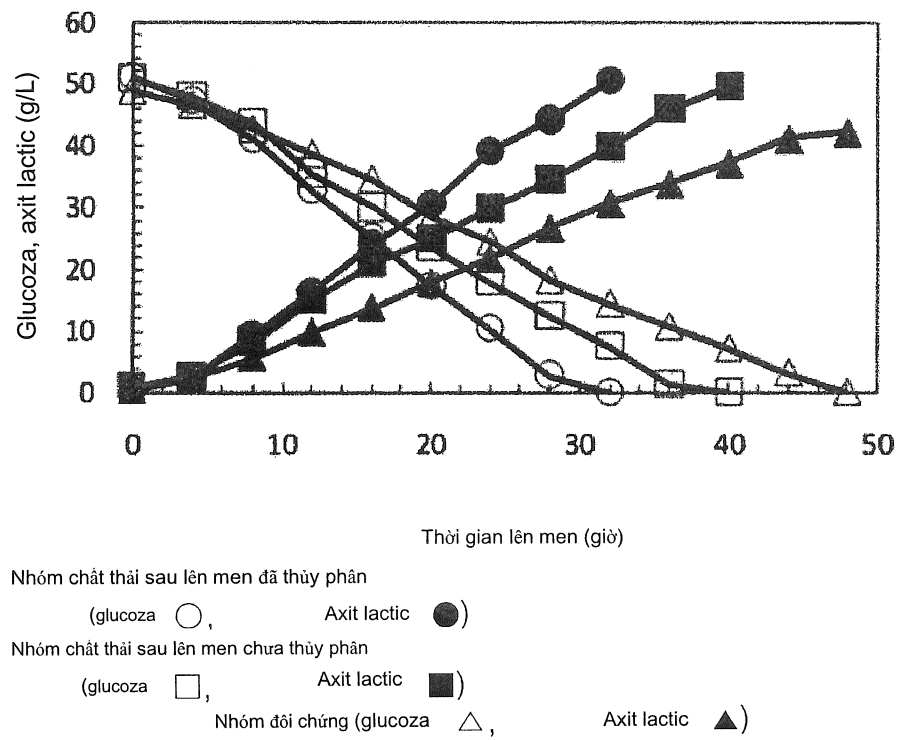


Fig.8

