



(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)



1-0031682

(51)⁷ C12P 21/00; C12N 9/24

(13) B

(21) 1-2015-00159

(22) 10/06/2013

(86) PCT/FR2013/051340 10/06/2013

(87) WO2013/190214 27/12/2013

(30) 12/01730 18/06/2012 FR

(45) 25/04/2022 409

(43) 25/03/2015 324A

(73) IFP ENERGIES NOUVELLES (FR)

1 & 4 avenue du Bois-Préau, F-92852 Reuil-malmaison, France

(72) BEN CHAABANE, Fadhel (FR); LOURET, Sylvain (FR).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT HỆ ENZYM BẰNG CÁCH SỬ DỤNG CẶN BÃ PHA
LỎNG TRONG QUÁ TRÌNH CHUYỂN HÓA SINH HÓA CHẤT LIỆU
LIGNOXENLULOZA

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất hệ enzym dùng vi sinh vật phân hủy xenluloza
gồm hai pha:

- pha a) để sinh trưởng vi sinh vật nêu trên trong bình kín với sự có mặt của dung dịch
sinh trưởng chứa cacbon;

- pha b) để sản xuất hệ enzym nêu trên được thực hiện bằng cách dùng dung dịch sản
xuất chứa cacbon nồng độ của cơ chất cacbon của dung dịch này là nằm trong khoảng từ
150 đến 400 g/lít, dung dịch sản xuất chứa cacbon nêu trên chứa cơ chất cacbon cảm ứng;
khác biệt ở chỗ cơ chất cacbon cảm ứng nêu trên là cặn bã pha lỏng thu được từ bước xử lý
sơ bộ chất liệu lignoxenluloza, mà oligome đường có 5 cacbon của cặn bã này chiếm ít
nhất 1% khối lượng tổng các loại đường có mặt trong cặn bã pha lỏng nêu trên, và ít nhất
0,3% khối lượng tổng các loại đường có mặt trong dung dịch sản xuất chứa cacbon nêu
trên.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến sản xuất các enzym phân hủy xenluloza và phân hủy hemixenluloza, đặc biệt là khi dùng để sản xuất etanol từ chất liệu xenluloza hoặc lignoxenluloza.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Từ những năm 1970, phương pháp chuyển hóa chất liệu lignoxenluloza thành etanol sau khi thủy phân các polysacarit cấu thành nó thành các đường lên men được đã là tâm điểm của nhiều nghiên cứu. Ví dụ có thể được quan tâm đến là các công trình tham khảo của National Renewable Energy Laboratory (Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol, Humbird *et al.*, NREL/TP-5100-57764, tháng 5, 2011).

Lignoxenluloza là chất liệu xenluloza mà trong đó xenluloza và/hoặc lignoxenluloza chiếm hơn 90% khối lượng. Nói theo cách khác, lignoxenluloza được cấu thành từ xenluloza, hemixenluloza (là các polysacarit chủ yếu gồm có pentoza và hexoza) và lignin (là đại phân tử có cấu trúc phức tạp và trọng lượng phân tử cao trên cơ sở các hợp chất phenol).

Gỗ, rơm và lõi ngô là chất liệu lignoxenluloza được sử dụng rộng rãi nhất, nhưng có thể sử dụng các nguồn khác như các sản phẩm lâm nghiệp, cặn bã của cây mía và các cây ngũ cốc dùng sản xuất đường, các sản phẩm và cặn bã của công nghiệp sản xuất giấy và các sản phẩm chuyển hóa của chất liệu lignoxenluloza. Các chất liệu này chủ yếu gồm khoảng từ 35% đến 50% xenluloza, 20% đến 30% hemixenluloza và 15% đến 25% lignin.

Quy trình chuyển hóa sinh hóa chất liệu lignoxenluloza thành etanol bao gồm bước xử lý sơ bộ bằng phương pháp lý hóa tiếp đó là bước thủy phân bằng enzym bằng

cách sử dụng hệ enzym, bước lên men tạo etanol các đường được giải phóng tự do, trong đó bước lên men tạo etanol và bước thủy phân bằng enzym có thể được thực hiện đồng thời, và cuối cùng là bước tinh chế etanol.

Hệ enzym này là hỗn hợp gồm các enzym phân hủy xenluloza (còn được gọi là xenlulaza) và/hoặc enzym phân hủy hemixenluloza. Enzym phân hủy xenluloza có ba dạng hoạt tính chính: endoglucanaza, exoglucanaza và xenlobiaza, các dạng này sau này còn được gọi là ̢-glucosidaza. Enzym phân hủy hemixenluloza đặc biệt là có hoạt tính xylanaza.

Quá trình thủy phân bằng enzym có hiệu quả cao và được thực hiện ở điều kiện vừa phải. Tuy nhiên, chi phí cho enzym vẫn cao, chiếm đến 20% to 50% chi phí của quá trình chuyển hóa chất liệu lignoxenluloza thành etanol. Vì vậy, rất nhiều nghiên cứu đã được thực hiện để làm giảm chi phí này: tối ưu hóa quá trình sản xuất enzym ban đầu là bằng cách chọn lọc vi sinh vật sản xuất quá mức và bằng cách cải thiện quy trình sản xuất các enzym này, bằng cách giảm lượng enzym trong quá trình thủy phân, sau đó là bằng cách tối ưu hóa bước xử lý sơ bộ, bằng cách cải thiện hoạt tính đặc hiệu của các enzym này, và bằng cách tối ưu hóa thực hiện bước thủy phân bằng enzym.

Trong thập kỷ trước, rất nhiều nghiên cứu được thực hiện nhằm hiểu được cơ chế tác dụng và biểu hiện của hệ enzym. Mục đích của nghiên cứu là làm cho hệ enzym sẽ được tiết ra là phù hợp nhất cho quá trình thủy phân chất liệu lignoxenluloza bằng cách cải biến vi sinh vật này.

Vi sinh vật phân hủy xenluloza mà được sử dụng rộng rãi nhất cho sản xuất công nghiệp hệ enzym này là nấm *Trichoderma reesei*. Khi có mặt cơ chất cacbon cảm ứng, ví dụ xenluloza, chủng đại có khả năng tiết ra hệ enzym được xem là phù hợp nhất cho quá trình thủy phân xenluloza. Các protein khác có đặc tính là thiết yếu cho quá trình thủy phân chất liệu lignoxenluloza ví dụ xylanaza cũng được *Trichoderma reesei* tạo ra. Sự có mặt của cơ chất cảm ứng là điều kiện thiết yếu cho sự biểu hiện của enzym phân hủy xenluloza và/hoặc enzym phân hủy hemixenluloza. Bản chất của cơ chất cacbon có ảnh hưởng đáng kể đến thành phần hệ enzym. Đó là trường hợp khi mà xyloza, khi dùng với cơ chất cacbon cảm ứng như xenluloza hoặc lactoza, có thể cải thiện đáng kể hoạt tính enzym là hoạt tính xylanaza.

Lactoza vẫn là một cơ chất thích hợp nhất trong quá trình sản xuất công nghiệp hệ enzym; tuy nhiên, giá thành của nó biến đổi nhiều và chiếm khoảng từ một đến hai phần ba chi phí sản xuất hệ enzym. Khi lactoza được sử dụng làm cơ chất cacbon, quá trình sản xuất hệ enzym này phụ thuộc vào nguồn cacbon bên ngoài. Vì lý do này, việc sử dụng cơ chất cacbon thu được từ quy trình chuyển hóa sinh hóa chất liệu lignoxenluloza là bước tiến lớn.

Đơn yêu cầu cấp patent EP 1 690 944 bộc lộ rằng dịch chiết từ phân đoạn hemixenluloza ở dạng monome từ chất liệu lignoxenluloza đã được xử lý sơ bộ có thể được sử dụng làm cơ chất cacbon không cảm ứng cho sự sinh trưởng vi sinh vật phân hủy xenluloza và sản xuất enzym. Trong trường hợp sau này, nó phải được trộn với cơ chất cacbon cảm ứng để sản xuất xenlulaza (lactoza hoặc xenlobioza).

Các đơn yêu cầu cấp patent WO 09 026 716 A1 và WO 09 0061486 A1 mô tả phương pháp sản xuất hệ enzym từ *Trichoderma reesei* bằng cách sử dụng cơ chất cacbon chứa các đường cảm ứng để sản xuất xenlulaza cũng như nguồn cacbon chính. Đơn sáng chế này cho biết rằng chỉ 3% khối lượng đường cảm ứng là đủ để cảm ứng quá trình sản xuất xenlulaza. Mức sản xuất xenlulaza được tăng lên hơn 4 lần so với chẳng hạn quá trình mà trong đó xyloza được sử dụng đơn lẻ trong dung dịch sản xuất. Các đường cảm ứng được mô tả là các mono-, di- và oligo-sacarit (các đường C₆) có thể được tạo ra bởi quá trình thủy phân xenluloza. Nguồn cacbon chính là tập hợp chứa mono-, di- và các oligosacarit thu được từ hemixenluloza hoặc từ quá trình tổng hợp xyloza.

Tài liệu FR 2 962 444 bộc lộ quy trình sản xuất enzym phân hủy xenluloza và/hoặc enzym phân hủy hemixenluloza. Cơ chất cảm ứng là hỗn hợp gồm glucoza hoặc các dịch thủy phân của xenluloza, lactoza và xyloza hoặc dung dịch chứa dịch thủy phân của hemixenluloza với lượng ít nhất 10% khối lượng của mỗi trong số ba nhóm cấu thành này. Tài liệu này cho thấy là cơ chất cảm ứng là không có bất kỳ đường khác ngoài các thành phần được liệt kê trên đây, dịch thủy phân của xenluloza là glucoza thu được từ thủy phân xenluloza, và dịch thủy phân của hemixenluloza là dung dịch chứa các đường có năm cacbon C₅.

Tài liệu EP 2 371 950 A1 mô tả quy trình sản xuất xenlulaza dựa trên thay đổi áp suất oxy được hoà tan trong môi trường nuôi cấy. Tài liệu này bộc lộ rằng cơ chất cacbon

cảm ứng được được chọn từ lactoza, xyloza, xenlobioza, sophoroza, cần bã thu được sau lên men các đường monome và/hoặc phần chiết thô của pentoza tan trong nước, tức là các đường có năm cacbon tan trong nước.

Tài liệu công bố "Cellulase Production by Continuous Culture of *Trichoderma reesei* Rut C30 using acid hydrolysate prepared to retain more oligosaccharides for induction", Lo et al., Bioresource Technology 101 (2010) 717-723, hướng dẫn quá trình cảm ứng bằng các oligosacarit tạo ra bằng cách thủy phân xenluloza bằng axit, dịch thủy phân nêu trên được cấu thành từ các oligome đường C_6 , được kiềm hóa bằng dung dịch $Ca(OH)_2$ trước khi được trung hoà. Cũng đã biết vai trò như là chất cảm ứng của các C_6 oligome, đặc biệt là xenlobioza.

Mục đích của sáng chế là đề xuất nguồn chất cảm ứng cacbon mới dễ dàng sẵn có, mà có thể tạo ra hệ enzym có hoạt tính thích hợp cho quá trình thủy phân chất liệu lignoxenluloza. So với patent EP 1 690 944, sáng chế đề xuất sử dụng ưu thế của phân đoạn hemixenluloza còn chứa oligome, điều này có nghĩa là có thể không phải bổ sung cơ chất cảm ứng. So với patent WO 09 026716, sáng chế đề xuất việc sử dụng chỉ một nguồn cacbon không được tạo ra bằng con đường tổng hợp đặc biệt thích hợp cho sự biểu hiện hỗn hợp gồm enzym hoàn toàn hữu hiệu để xử lý sinh khối sẽ được thủy phân. Sáng chế còn cho các đồng sản phẩm được nâng cao chất lượng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất quy trình sản xuất hệ enzym bằng vi sinh vật phân hủy xenluloza, khác biệt ở chỗ quy trình này sử dụng cần bã pha lỏng từ quá trình xử lý sơ bộ chất liệu lignoxenluloza làm cơ chất cacbon cảm ứng để cảm ứng sản xuất hệ enzym.

Một ưu điểm của sáng chế là giảm hoặc không cần bổ sung cơ chất cacbon từ nguồn bên ngoài cho quá trình sinh hóa chuyển hóa chất liệu lignoxenluloza. Một ưu điểm nữa là cần bã pha lỏng từ quy trình chuyển hóa sinh hóa nêu trên để sản xuất hệ enzym được nâng cao chất lượng. Sự nâng cao chất lượng theo cách này có nghĩa là lượng dòng chảy ra tạo ra mà phải được xử lý lại trước khi xả hoặc bảo quản có thể được giảm đi.

Vì cặn bã pha lỏng chứa oligome cảm ứng được nâng cao chất lượng để tạo ra hệ enzym, nên giá thành của hệ enzym nêu trên được giảm đi.

Một ưu điểm nữa của quy trình theo sáng chế đó là hệ enzym thu được là đặc biệt thích hợp cho quá trình thủy phân bằng enzym chất liệu lignoxenluloza đã được xử lý sơ bộ được chuyển hóa trong quá trình chuyển hóa sinh hóa. Đặc biệt là, đã phát hiện được là ảnh hưởng tích cực của các oligome có 5 cacbon đến hoạt tính xenlulaza của các enzym thu được.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất quy trình sản xuất hệ enzym bằng vi sinh vật phân hủy xenluloza, bao gồm hai pha:

- pha a) để sinh trưởng vi sinh vật nêu trên trong bình kín với sự có mặt của dung dịch sinh trưởng chứa cacbon;
- pha b) để sản xuất hệ enzym nêu trên được thực hiện bằng cách dùng dung dịch sản xuất chứa cacbon nồng độ của cơ chất cacbon của dung dịch này nằm trong khoảng từ 150 đến 400 g/lít, dung dịch sản xuất chứa cacbon nêu trên chứa cơ chất cacbon cảm ứng;

khác biệt ở chỗ cơ chất cacbon cảm ứng nêu trên là cặn bã pha lỏng thu được từ bước xử lý sơ bộ chất liệu lignoxenluloza được sử dụng mà không qua giai đoạn tiệt trùng hoặc làm biến đổi độ pH cặn bã pha lỏng nêu trên, oligome đường có 5 cacbon của cặn bã này chiếm ít nhất 1% khối lượng tổng các loại đường có mặt trong cặn bã pha lỏng nêu trên, và ít nhất 0,3% khối lượng tổng các loại đường có mặt trong dung dịch sản xuất chứa cacbon nêu trên.

Tốt hơn nữa, dung dịch sinh trưởng chứa cacbon được sử dụng trong pha a) nêu trên ở nồng độ ban đầu nằm trong khoảng từ 10 đến 90 g cơ chất cacbon trên một lít thể tích phản ứng.

Tốt hơn nếu, bước xử lý sơ bộ nêu trên là bước thủy phân bằng axit, đun trong axit hoặc phản ứng nổ hơi với việc ngâm tẩm trước chất liệu lignoxenluloza nêu trên bằng dung dịch axit sulfuric trong nước.

Tốt hơn nếu, cặn bã pha lỏng nêu trên được sử dụng mà không cần qua giai đoạn tiệt trùng và không làm biến đổi độ pH của cặn bã pha lỏng nêu trên. Tốt hơn nữa nếu, cặn bã pha lỏng nêu trên được sử dụng mà không qua giai đoạn tiệt trùng không khử độc tính, không làm biến đổi độ pH của cặn bã pha lỏng nêu trên.

Tốt hơn nếu, oligome đường có 5 cacbon chiếm trong khoảng từ 1% đến 50% khối lượng tổng các loại đường có mặt trong cặn bã pha lỏng nêu trên.

Tốt hơn nếu, cơ chất cacbon cảm ứng nêu trên được sử dụng đơn lẻ hoặc dưới dạng hỗn hợp với ít nhất một cơ chất cacbon không cảm ứng khác.

Tốt hơn nếu, cơ chất cacbon không cảm ứng khác nêu trên được chọn từ glucoza, xyloza, và sacaroza, được dùng đơn lẻ hoặc dưới dạng hỗn hợp.

Tốt hơn nếu, dung dịch sản xuất chứa cacbon nêu trên bao gồm cặn bã pha lỏng và ít nhất một cơ chất cacbon không cảm ứng được chọn từ glucoza, xyloza và sacaroza, được dùng đơn lẻ hoặc dưới dạng hỗn hợp, cặn bã pha lỏng nêu trên thu được từ bước xử lý sơ bộ chất liệu lignoxenluloza, và được sử dụng mà không qua giai đoạn tiệt trùng không khử độc tính không làm biến đổi độ pH, cặn bã pha lỏng nêu trên bao gồm oligome đường có 5 cacbon, monome đường có 5 và 6 cacbon và các sản phẩm thoái biến của monome đường, trong đó monome đường có 5 cacbon chiếm ít nhất 1% khối lượng tổng các loại đường có mặt trong cặn bã pha lỏng nêu trên, và ít nhất 0,3% khối lượng tổng các loại đường có mặt trong dung dịch sản xuất chứa cacbon nêu trên.

Tốt hơn nếu, tốc độ chảy đặc hiệu để cung cấp dung dịch sản xuất chứa cacbon cho pha b) là nằm trong khoảng từ 35 đến 65 mg cơ chất cacbon cho một gam vi sinh vật mỗi giờ.

Tốt hơn nếu, vi sinh vật phân hủy xenluloza này được chọn từ các chủng nấm thuộc giống *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* hoặc *Schizophyllum*.

Tốt hơn nếu, vi sinh vật phân hủy xenluloza này thuộc loài *Trichoderma reesei*.

Quy trình nêu trên để sản xuất hệ enzym được thực hiện bằng cách sử dụng nuôi cấy chìm. Thuật ngữ “nuôi cấy chìm” dùng để chỉ trong môi trường lỏng.

Vi sinh vật phân hủy xenluloza được sử dụng trong quy trình sản xuất hệ enzym theo sáng chế là các chủng nấm phân hủy xenluloza, ví dụ thuộc giống *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* hoặc *Schizophyllum*, tốt hơn nếu thuộc loài *Trichoderma reesei*. Chủng dùng trong công nghiệp tốt nhất là chủng thuộc loài *Trichoderma reesei*, đã được cải biến để cải thiện hệ enzym các quy trình đột biến-chọn lọc như, ví dụ, chủng IFP CL847 (patent Pháp số FR-B-2 555 803). Cũng có thể sử dụng các chủng được cải thiện bằng các kỹ thuật tái tổ hợp di truyền. Các chủng này được nuôi cấy trong các bình có khuấy, thông khí ở điều kiện phù hợp cho sự sinh trưởng và sản xuất enzym.

Thuật ngữ “cơ chất cacbon” dùng để chỉ tất cả các đường trong dung dịch chứa cacbon.

Cơ chất sinh trưởng cacbon cho vi sinh vật nêu trên được sử dụng trong pha a) nêu trên của quy trình theo sáng chế là dung dịch nước tốt hơn nếu chứa cơ chất cacbon được chọn từ các đường công nghiệp hòa tan, tốt hơn nếu từ glucoza, xyloza, cặn bã pha lỏng thu được sau quá trình lên men tạo etanol các monome đường từ dịch thủy phân enzym của chất liệu lignoxenluloza và dịch chiết của các phân đoạn hemixenluloza ở dạng monome thu được từ chất liệu lignoxenluloza đã được xử lý sơ bộ, được sử dụng đơn lẻ hoặc dưới dạng hỗn hợp. Tùy thuộc vào bản chất của nó, dung dịch sinh trưởng chứa cacbon nêu trên được đưa vào bình kín trước khi tiệt trùng hoặc được tiệt trùng riêng biệt và được đưa vào bình kín sau khi tiệt trùng.

Tốt hơn nếu, dung dịch sinh trưởng chứa cacbon nêu trên được sử dụng trong pha a) nêu trên ở nồng độ ban đầu nằm trong khoảng từ 10 đến 90 g cơ chất cacbon trên một lít thể tích phản ứng.

Tốt hơn nếu, pha a) nêu trên được thực hiện trong thời gian nằm trong khoảng từ 30 đến 70 h, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 30 đến 40 h.

Tốt hơn nếu, pha a) nêu trên được thực hiện ở độ pH of 4,8 và ở nhiệt độ 27°C.

Tốt hơn nếu, pha a) nêu trên được thực hiện trong bình kín, thông khí và có khuấy. Quá trình thổi khí được điều chỉnh để thu được VVM (tốc độ chảy thể tích của không khí, $\text{Nm}^3/\text{phút}$, chia cho thể tích phản ứng theo m^3) nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 0,3 đến 0,7, và tốt hơn nữa nếu vào khoảng để thu được VVM bằng 0,5. Việc khuấy được thích ứng để thu được áp suất riêng phần oxy hoà tan nằm trong khoảng từ 20% đến 80% bão hòa theo lý thuyết, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 30% đến 50%, và tốt hơn nữa nếu có giá trị 40%.

Dung dịch chứa cacbon dùng để sản xuất vi sinh vật nêu trên được sử dụng trong pha b) nêu trên theo sáng chế là dung dịch nước chứa cơ chất cacbon cảm ứng. Cơ chất cacbon cảm ứng nêu trên là cặn bã pha lỏng thu được từ bước xử lý sơ bộ chất liệu lignoxenluloza chứa oligome đường có 5 cacbon.

Theo sáng chế, oligome đường có 5 cacbon nêu trên chiếm ít nhất 0,3% khối lượng tổng các loại đường có trong dung dịch sản xuất chứa cacbon nêu trên. Tốt hơn nếu, oligome đường có 5 cacbon nêu trên chiếm trong khoảng từ 0,3% đến 50% khối lượng tổng các loại đường chứa trong dung dịch sản xuất chứa cacbon nêu trên, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 0,3% đến 20% khối lượng, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 0,3% đến 10% khối lượng và còn tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 0,3% đến 6% khối lượng.

Tốt hơn nếu, cơ chất cacbon cảm ứng nêu trên được sử dụng đơn lẻ hoặc dưới dạng hỗn hợp với ít nhất một cơ chất cacbon không cảm ứng khác.

Tốt hơn nếu, cơ chất cacbon không cảm ứng khác nêu trên được được chọn từ đường không cảm ứng, tốt hơn nếu được chọn từ glucoza, sacaroza và xyloza, đơn lẻ hoặc dưới dạng hỗn hợp. Rất tốt hơn nếu, cơ chất cacbon khác nêu trên được được chọn từ glucoza và sacaroza, đơn lẻ hoặc dưới dạng hỗn hợp.

Theo sáng chế, dung dịch sản xuất chứa cacbon nêu trên được sử dụng trong pha b) nêu trên theo sáng chế được điều chế ở nồng độ từ 150 đến 400 g cơ chất cacbon trên một lít dung dịch sản xuất chứa cacbon. Tốc độ chảy đặc hiệu để cung cấp dung dịch sản xuất chứa cacbon cho pha b) nêu trên tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 35 đến 65 mg cơ

chất cacbon cho một gam vi sinh vật mỗi giờ, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 35 đến 45 mg cơ chất cacbon cho một gam vi sinh vật mỗi giờ.

Tốt hơn nếu, pha b) nêu trên được thực hiện trong thời gian ít nhất 30 h hoặc lâu hơn, tốt hơn nếu ít nhất 100 h hoặc lâu hơn.

Tốt hơn nếu, pha b) nêu trên được thực hiện ở độ pH nằm trong khoảng từ 3 đến 5,5 và ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C to 30°C.

Tốt hơn nếu, pha b) nêu trên được thực hiện trong bình phản ứng thông khí và có khuấy. Quá trình thổi khí được điều chỉnh để thu được VVM nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 0,3 đến 0,7, và tốt hơn nữa nếu để thu được VVM bằng 0,5. Quá trình khuấy được điều chỉnh để thu được áp suất riêng phần oxy được hoà tan nằm trong khoảng từ 20% đến 80%, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 30% đến 50%, và tốt hơn nữa nếu có giá trị 40%.

Pha b) nêu trên có thể được thực hiện theo phương thức cấp theo mẻ và chemostat (thể ổn định hóa tĩnh) đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Oligome đường có 5 cacbon được sử dụng làm cơ chất cacbon cảm ứng trong dung dịch sản xuất chứa cacbon được sử dụng trong nêu trên pha b) có trong cặn bã pha lỏng thu được từ bước xử lý sơ bộ chất liệu lignoxenluloza.

Bước xử lý sơ bộ nêu trên chất liệu lignoxenluloza có thể được sử dụng để cải thiện tính nhạy của phân đoạn xenluloza đối với quá trình thủy phân bằng enzym. Bước xử lý sơ bộ nêu trên là bước xử lý sơ bộ bằng phương pháp vật lý như, ví dụ, bước phản ứng nổ hơi, hoặc bước dùng phương pháp hóa học hoặc bằng phương pháp lý hóa. Tốt hơn nếu, bước xử lý sơ bộ nêu trên bước xử lý sơ bộ bằng axit hoặc kiềm như, ví dụ, thủy phân bằng kim loại kiềm, đun trong kim loại kiềm hoặc phản ứng nổ hơi với việc ngâm tẩm trước chất liệu nêu trên với dung dịch của kim loại kiềm trong nước. Tốt hơn nếu, bước xử lý sơ bộ nêu trên là bước xử lý sơ bộ bằng axit, tốt hơn nếu là thủy phân bằng axit, đun trong axit hoặc phản ứng nổ hơi với việc ngâm tẩm trước chất liệu nêu trên với dung dịch axit sulfuric trong nước. Rất tốt hơn nếu, bước xử lý sơ bộ là phản ứng nổ hơi.

Dòng chảy ra từ bước xử lý sơ bộ nêu trên được tách riêng thành hai pha: một pha tạo thành cặn bã pha rắn và pha tạo thành cặn bã pha lỏng. Quá trình tách trên có thể được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, quá trình tách nêu trên có thể thu được bằng cách ly tâm, ép lọc, lắng gạn, hoặc biện pháp kỹ thuật bất kỳ khác cho phép tách pha lỏng và pha rắn.

Trong trường hợp xử lý sơ bộ bằng axit, chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này điều chỉnh các điều kiện vận hành (lượng axit, độ ẩm, nhiệt độ, áp suất, thời gian) tùy theo chất liệu lignoxenluloza cần được xử lý sơ bộ và kỹ thuật được sử dụng. Ví dụ, các điều kiện xử lý nêu trên sẽ tăng cường hơn khi áp dụng cho miscanthus (là một loại thực vật có hoa thuộc họ Hòa thảo) so với cọng rom lúa mì. Các điều chỉnh này được dự định để thực hiện thủy phân hoàn toàn hemixenluloza ở dạng monome, đồng thời giảm thiểu sự tạo ra các sản phẩm thoái biến (đặc biệt là furfural, 5-HMF). Để đạt được mục đích này, bước xử lý sơ bộ cũng có thể được chia thành hai pha: pha thứ nhất để giải phóng tự do oligome đường có 5 cacbon, tiếp đó là pha tạo ra monome từ các oligome tự do (Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol, Humbird *et al.*, NREL/TP-5100-57764, May 2011).

Theo sáng chế, bước xử lý sơ bộ nêu trên được thực hiện bằng cách sử dụng các biện pháp đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này để cho cặn bã pha lỏng chứa các oligome đường có 5 cacbon.

Để thu được oligome đường có 5 cacbon trong cặn bã pha lỏng từ bước xử lý sơ bộ nêu trên, lượng axit được sử dụng trong bước xử lý sơ bộ nêu trên có thể được giảm đi. Cũng có thể giảm nhiệt độ và/hoặc áp suất thực hiện bước xử lý sơ bộ nêu trên so với điều kiện tối ưu để giải phóng tự do chỉ monome.

Theo sáng chế, oligome đường có 5 cacbon nêu trên ở trong cặn bã pha lỏng nêu trên thu được từ bước xử lý sơ bộ chất liệu lignoxenluloza chiếm trong khoảng từ 1% đến 100% khối lượng tổng các loại đường có mặt trong cặn bã pha lỏng nêu trên, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 1% đến 50% khối lượng, và tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 1% đến 30% khối lượng.

Cặn bã pha lỏng nêu trên chứa oligome đường có 5 cacbon thu được từ bước xử lý sơ bộ nêu trên được sử dụng làm nguồn chất cảm ứng cacbon mà không cần phải tiệt trùng cặn bã pha lỏng nêu trên hoặc biến đổi độ pH của cặn bã nêu trên.

Theo một phương án được ưu tiên, chất liệu lignoxenluloza đã được xử lý sơ bộ tương ứng với phân đoạn được gọi là “rắn” được thủy phân trong bước thủy phân bằng enzym. Dòng chảy ra từ bước này sau đó được xử lý trong bước lên men tạo etanol các monome đường của dịch thủy phân enzym. Các xử lý này có thể được thực hiện trong cùng một thiết bị, hoặc trong các thiết bị khác nhau.

Theo một phương án được ưu tiên khác, bước lên men và ít nhất một phần của bước thủy phân được thực hiện đồng thời. Quá trình này được thực hiện, ví dụ, bằng cách bổ sung nấm men lên men etanol trong bước thủy phân bằng enzym.

Các ví dụ sau minh họa sáng chế mà không nhằm giới hạn phạm vi sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1 (không theo sáng chế): Sản xuất hệ enzym trên glucoza

Ví dụ 1 là nuôi cấy bằng cách sử dụng glucoza là cơ chất sản xuất chứa cacbon. Nó là chất ức chế sản xuất xenlulaza. Ví dụ này cho sản xuất enzym với hiệu suất thấp.

Hệ enzym được tạo ra trong bình phản ứng được khuấy cơ học. Môi trường chất khoáng (được gọi là 4N) có thành phần sau đây: KOH 1,66 g/lít, 85% H₃PO₄ 2 ml/L, (NH₄)₂SO₄ 2,8 g/lít, MgSO₄ · 7 H₂O 0,6 g/lít, CaCl₂ 0,6 g/lít, MnSO₄ 3,2 mg/L, ZnSO₄ · 7 H₂O 2,8 mg/lít, CoCl₂ · 10 H₂O 4,0 mg/L, FeSO₄ · 7 H₂O 10 mg/L, dịch chiết ngô 1,2 g/lít, chất chống tạo bọt 0,5 ml/L.

Tiền giống cấy dạng lỏng

Vi sinh vật (chủng Trichoderma reesei CL847) được nuôi cấy, bằng tiền giống cấy bằng cách sử dụng glucoza làm cơ chất sinh trưởng cacbon, ở nồng độ 30 g/lít. Môi trường chất khoáng của tiền giống cấy là môi trường 4N được bổ sung 5 g/lít kali phtalat để đệm độ pH. Sự sinh trưởng của chủng cấy kéo dài 3 ngày và được thực hiện

ở nhiệt độ 30°C trong tủ ấm có khuấy. Việc chuyển vào bình phản ứng được thực hiện nếu nồng độ glucoza còn lại nhỏ hơn 15 g/lít.

Pha sinh trưởng

Bình phản ứng chứa môi trường 4N được tiệt trùng ở nhiệt độ 120°C trong thời gian 20 phút. Cơ chất sinh trưởng cacbon glucoza này được tiệt trùng ở nhiệt độ từ 120°C trong thời gian 20 phút sau đó được cho vào bình phản ứng theo cách thức vô trùng để tạo ra nồng độ 30 g/lít. Bình này được cấy 10% (thể tích/thể tích) tiền giống cấy dạng lỏng chủng *Trichoderma reesei* CL847. Các điều kiện vận hành là nhiệt độ 27°C và độ pH 4,8 (được điều chỉnh bằng cách sử dụng amoniac 5,5 mol/lít). Thổi khí được thực hiện ở mức 0,5 VVM và vận tốc khuấy được tăng lên đến trong khoảng từ 200 đến 800 vòng/phút tùy theo giá trị pO_2 (áp suất oxy hoà tan), được duy trì ở 30%.

Pha sản xuất

Khi cơ chất sinh trưởng cacbon của bình đã hết, bơm liên tục cơ chất sản xuất cacbon là glucoza 250 g/lít ở tốc độ dòng chảy 35 đến 45 mg trên g vi sinh vật mỗi giờ, trong thời gian 164 giờ. Các điều kiện vận hành là: nhiệt độ 25°C và độ pH 4 (được điều hoà bằng amoniac 5,5 mol/lít, quá trình sau này cũng tạo ra nitơ cần thiết cho quá trình tổng hợp các protein được tiết ra). Hàm lượng oxy hoà tan được duy trì ở mức 30% bằng cách điều chỉnh quá trình khuấy.

Sản xuất các enzym này được theo dõi bằng cách thử nghiệm enzym ngoại bào bằng cách sử dụng phương pháp Lowry và BSA tiêu chuẩn sau khi tách vi sinh vật bằng cách lọc hoặc ly tâm. Hoạt tính phân hủy xenluloza được xác định là như sau:

- hoạt tính giấy lọc (FPU: đơn vị giấy lọc) để thử nghiệm hoạt tính chung của hệ enzym endoglucanaza và exoglucanaza;
- hoạt tính aryl α -glucosidaza cho hoạt tính đặc hiệu.

Hoạt tính FPU được đo trên giấy Whatman n° 1 (quy trình được đề xuất bởi Ủy ban công nghệ sinh học IUPAC) ở nồng độ ban đầu 50 g/lít; xác định mẫu dung dịch enzym cần được phân tích giải phóng ra lượng tương đương 2 g/lít glucoza (thử nghiệm

so màu) trong thời gian 60 phút. Nguyên lý của hoạt tính giấy lọc là xác định lượng đường khử thu được từ giấy Whatman n° 1 bằng thử nghiệm DNS (axit đinitrosalixylic) (quy trình được đề xuất bởi Ủy ban công nghệ sinh học IUPAC).

Cơ chất được sử dụng để xác định hoạt tính aryl α -glucosidaza là p-nitrophenyl- β -D-glucopyranosit (PNPG). Chất này bị phân cắt bởi β -glucosidaza giải phóng p-nitrophenol.

Một đơn vị hoạt tính aryl α -glucosidaza được xác định là lượng enzym cần thiết để tạo ra 1 μ mol p-nitrophenol từ PNPG trong thời gian một phút và được thể hiện theo đơn vị IU/ml.

Hoạt tính đặc hiệu được thu nhận bằng cách chia hoạt tính, được đo bằng IU/ml, cho nồng độ protein. Hoạt tính đặc hiệu được thể hiện bằng IU/mg.

Xác định phân tích bột nhào cuối của Ví dụ 1 cho các kết quả sau:

Sinh khối g/lít	15,2
Enzym g/lít	2,9
FPU IU/ml	1,4
Aryl α -glucosidaza đặc hiệu IU/mg	0,35

Ví dụ 2 (không theo sáng chế): Sản xuất enzym trên xyloza

Ví dụ 2 là nuôi cấy sử dụng xyloza là cơ chất sản xuất chứa cacbon. Đó là chất ức chế sản xuất xenlulaza. Ví dụ này cho sản xuất enzym ở mức thấp.

Các enzym được sản xuất trong cùng điều kiện như ở ví dụ 1. Cơ chất cacbon trong pha sinh trưởng là lactoza và trong pha sản xuất, là xyloza tinh khiết.

Sau 30 giờ sinh trưởng, sau khi cạn cơ chất ban đầu, phun liên tục dung dịch 250 g/lít xyloza ở tốc độ chảy 35 mg trên g tế bào mỗi giờ, trong thời gian 164 giờ.

Xác định phân tích được thực hiện trên bột nhão cuối cho các kết quả sau:

Sinh khối g/lít	17,3
Enzym g/lít	3,1
FPU IU/ml	1,2
Aryl ð-glucosidaza đặc hiệu IU/mg	0,1

Ví dụ 3 (không theo sáng chế): Sản xuất enzym trên lactoza

Ví dụ 3 là nuôi cấy sử dụng lactoza làm cơ chất sản xuất chứa cacbon. đó là cảm ứng sản xuất xenlulaza. Ví dụ này cho sản xuất cao hoạt tính enzym cao.

Các enzym này được sản xuất trong cùng điều kiện như ở ví dụ 1. Cơ chất cacbon trong pha sinh trưởng và pha sản xuất là lactoza tinh khiết. Lactoza là chất cảm ứng quan trọng của quá trình sản xuất xenlulaza. Đó là nhất rộng rãi cơ chất công nghiệp được sử dụng rộng rãi nhất để sản xuất xenlulaza.

Sau khi sinh trưởng trong thời gian 30 giờ, sau khi cạn cơ chất ban đầu, bơm liên tục dung dịch được cấp gián đoạn 250 g/lít ở tốc độ chảy 35 mg trên g tế bào mỗi giờ, trong thời gian 164 giờ.

Tiến hành xác định phân tích trên bột nhão cuối cho các kết quả sau:

Sinh khối g/lít	13,5
Enzym g/lít	37,8
FPU IU/ml	22,1
Aryl ð-glucosidaza đặc hiệu IU/mg	0,96

Ví dụ 4 (theo sáng chế): Sản xuất trên 100% căn bã pha lỏng chứa oligome đường có 5 cacbon

Ví dụ 4 là nuôi cấy sử dụng căn bã pha lỏng làm cơ chất sản xuất chứa cacbon. Ví dụ này cho sản xuất enzym và hoạt tính cao hơn hoạt tính thu được ở các Ví dụ 1 và 2.

Do đó cho thấy là cặn bã pha lỏng được sử dụng đơn lẻ cảm ứng sản xuất xenlulaza. Phương pháp cho hiệu quả tương tự với hiệu quả được mô tả trong patent WO 09 026 716 A1, mà không bổ sung dung dịch chất cảm ứng ngoài cặn bã pha lỏng.

Quá trình sản xuất enzyme được thực hiện theo cùng điều kiện như ở ví dụ 1. Cơ chất cacbon trong pha sinh trưởng là glucoza. Cơ chất cacbon trong pha sản xuất là phân đoạn lỏng thu được sau khi xử lý sơ bộ, còn được gọi là “cặn bã pha lỏng”. Cặn bã lỏng này thu được từ miscanthus đã được xử lý sơ bộ bằng phản ứng nổ hơi ở áp suất 14,5 bar trong thời gian 2 phút sau khi ngâm tẩm H_2SO_4 0,65% sau đó là tách pha lỏng/tách pha rắn.

Thành phần của dịch là như sau:

Oligome	0,78 g/lít
Glucoza	8,98 g/lít
Xyloza	31,44 g/lít
Galactoza	1,73 g/lít
Arabinoza	3,85 g/lít
Axit axetic	4,14 g/lít
HMF	0,14 g/lít
Furfural	0,85 g/lít
Tổng cộng	51,91 g/lít

Dịch này được cô đặc thành 300 g/lít. Sau khi sinh trưởng 30 giờ, sau khi cạn cơ chất ban đầu, bơm liên tục dịch thủy phân cô đặc của hemixenluloza ở tốc độ chảy 35 mg trên g tế bào mỗi giờ.

Xác định phân tích trên bột nhão cuối cho các kết quả sau:

Sinh khối g/lít	26,0
Enzym g/lít	19,2
FPU IU/ml	4,9
Aryl ð-glucosidaza đặc hiệu IU/mg	0,48

Ví dụ 5 (theo sáng chế): Sản xuất hai cặn bã pha lỏng khác nhau chứa tỷ lệ oligome khác nhau

Ví dụ 5 là hai nuôi cấy mỗi nuôi cấy sử dụng cặn bã pha lỏng làm cơ chất sản xuất chứa cacbon. Ví dụ này cho sản xuất enzym và hoạt tính cao hơn kết quả thu được ở các Ví dụ 1 và 2. Kết quả này cho thấy là hàm lượng oligome đường có 5 cacbon có ảnh hưởng tích cực đến lượng và hoạt tính của các enzym thu được.

Hai cặn bã pha lỏng khác nhau thu được từ cọng rom lúa mì được gây nổ bằng hơi. Các điều kiện vận hành cho phản ứng nổ hơi là 14,5 bar trong thời gian 2 phút. Thu được cặn bã pha lỏng C1 từ cọng rom lúa mì đã được tẩm với 0,64% H₂SO₄. Thu được cặn bã pha lỏng C2 từ cọng rom lúa mì đã được tẩm với 0,32% H₂SO₄.

Cặn bã pha lỏng C2 có tỷ lệ oligome cao hơn khi thu được từ dịch thủy phân hemixenluloza từ rom so với dịch thủy phân C1 do sử dụng lượng axit thấp hơn để tẩm cọng rom lúa mì.

Thành phần của các cặn bã pha lỏng C1 và C2 được mô tả chi tiết trong bảng sau đây:

	C1	C2
Monome	50,9 g/lít	33,6 g/lít
Oligome	0,9 g/lít	14,1 g/lít
Các đường thoái biến	2,9 g/lít	1,8 g/lít
Tổng số	54,7 g/lít	49,5 g/lít

Các monome tương ứng với tổng cộng glucoza, xyloza, arabinoza, manosa, galactoza và rhamnose. Các oligome tương ứng với tổng cộng oligome đường có 5 cacbon (ví dụ: xylobioza, xylotrioza, xyloarabinoza). Các đường thoái biến tương ứng với tổng cộng furfural, 5HMF, axit levulinic và axit formic.

Hai dung dịch cấp gián đoạn được tạo ra bằng cách hoà tan glucoza trong các dịch thủy phân C1 và C2 để thu được tổng nồng độ đường 250 g/lít. Glucoza là chất ức chế sản xuất xenlulaza.

Các thử nghiệm được thực hiện trong cùng điều kiện như ở ví dụ 1.

Xác định phân tích trên bột nhão cuối thu được cho các kết quả sau:

	Mẻ cấp C1	Mẻ cấp C2
Sinh khối g/lít	24,8	19,2
Enzym g/lít	20,9	32,9
FPU IU/ml	11,4	15,6
Aryl ã-glucosidaza IU/ml	45,2	65,1

Dung dịch mẻ được cấp C2, mà chứa nhiều oligome thu được từ phân đoạn hemixenluloza, cho sản xuất nhiều protein nhiều hơn dung dịch mẻ được cấp C1 với hoạt tính enzym tốt hơn. Trong ví dụ này, việc sản xuất enzym được thực hiện bằng nguồn cacbon có tiềm năng thu được chỉ từ các quy trình sản xuất etanol từ sinh khối lignoxenluloza, glucoza này có thể được thay bằng dịch thủy phân của xenluloza.

Ví dụ 6 (không theo sáng chế) – Sản xuất dùng cặn bã pha lỏng (dịch thủy phân có hoạt tính phân hủy hemixenluloza) không chứa oligome đường có 5 cacbon

Ví dụ 6 cho thấy là, bắt đầu từ cặn bã pha lỏng C2 của Ví dụ 5, thật ra là các oligome đường có 5 cacbon cảm ứng sản xuất enzym

Dung dịch C2 của Ví dụ 5 ban đầu trải qua quá trình thủy phân bằng axit để thủy phân các oligome thành monome. Thành phần của dung dịch C3 mới là như sau:

	C3
Monome	45,7 g/lít
Oligome	0,0 g/lít
Các đường thoái biến	3,5 g/lít
Tổng cộng	49,2 g/lít

Áp dụng cùng điều kiện như ở ví dụ 5 cho nuôi cấy. Dung dịch cấp gián đoạn được tạo ra bằng cách hoà tan glucoza trong C3 để thu được tổng nồng độ các đường 250 g/lít. Xác định phân tích trên bột nhão cuối cho các kết quả sau:

Sinh khối g/lít	21,2
Enzym g/lít	3,9
FPU IU/ml	1,1
Aryl ã-glucosidaza IU/mg	0,2

Ví dụ này cho thấy là khi không có oligome hemixenluloza, cặn bã pha lỏng không cảm ứng sản xuất xenlulaza.

Yêu cầu bảo hộ

1. Quy trình sản xuất hệ enzym bằng cách sử dụng vi sinh vật phân hủy xenluloza, quy trình này bao gồm hai pha:

- pha a) để sinh trưởng vi sinh vật nêu trên trong bình phản ứng kín với sự có mặt của dung dịch sinh trưởng chứa cacbon;
- pha b) để sản xuất hệ enzym nêu trên được thực hiện bằng cách dùng dung dịch sản xuất chứa cacbon mà nồng độ của cơ chất cacbon của dung dịch sản xuất này nằm trong khoảng từ 250 đến 400 g/lít, dung dịch sản xuất chứa cacbon này chứa cơ chất cacbon cảm ứng;

quy trình này khác biệt ở chỗ, cơ chất cacbon cảm ứng nêu trên chỉ là cặn bã pha lỏng thu được từ bước xử lý sơ bộ chất liệu lignoxenluloza được sử dụng mà không qua giai đoạn tiệt trùng, khử độc tính hoặc làm biến đổi độ pH cặn bã pha lỏng nêu trên, cặn bã pha lỏng này chứa đường oligome C5, trong số các đường monome C5 và C6 và trong số các sản phẩm thoái biến đường monome, đường oligome C5 của cặn bã pha lỏng này chiếm từ 1 đến 50% khối lượng tổng các loại đường có mặt trong cặn bã pha lỏng nêu trên, và từ 0,3 đến 10% khối lượng tổng các loại đường có mặt trong dung dịch sản xuất chứa cacbon nêu trên, trong đó vi sinh vật phân hủy xenluloza nêu trên thuộc loài *Trichoderma reesei*.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó dung dịch sinh trưởng chứa cacbon được sử dụng trong pha a) nêu trên ở nồng độ ban đầu nằm trong khoảng từ 10 đến 90 g cơ chất cacbon trên một lít thể tích phản ứng.
3. Quy trình theo điểm 1 hoặc 2, trong đó bước xử lý sơ bộ nêu trên là thủy phân bằng axit, đun trong axit hoặc phản ứng nổ hơi với việc ngâm tẩm trước chất liệu lignoxenluloza nêu trên bằng dung dịch axit sulfuric trong nước.
4. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó cặn bã pha lỏng nêu trên được sử dụng mà không qua giai đoạn tiệt trùng không khử độc tính, cũng không làm biến đổi độ pH của cặn bã pha lỏng nêu trên.

5. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó trong pha b) cơ chất chứa cacbon không cảm ứng khác được thêm vào cơ chất cacbon cảm ứng.
6. Quy trình theo điểm 5, trong đó cơ chất chứa cacbon không cảm ứng khác nêu trên được chọn từ glucoza, xyloza và sacaroza, ở dạng đơn lẻ hoặc hỗn hợp.
7. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó dung dịch sản xuất chứa cacbon nêu trên bao gồm cặn bã pha lỏng và ít nhất một cơ chất cacbon không cảm ứng được chọn từ glucoza, xyloza và sacaroza, đơn lẻ hoặc dưới dạng hỗn hợp, cặn bã pha lỏng nêu trên là thu được từ bước xử lý sơ bộ chất liệu lignoxenluloza, và được sử dụng mà không qua giai đoạn tiệt trùng không khử độc tính không làm biến đổi độ pH, cặn bã pha lỏng nêu trên bao gồm đường oligome C₅, đường monome C₅ và C₆ và của các sản phẩm thoái biến monome đường, trong đó oligome đường có 5 cacbon chiếm từ 1 đến 50% khối lượng tổng các loại đường có mặt trong cặn bã pha lỏng nêu trên, và ít nhất 0,3% khối lượng tổng các loại đường có mặt trong dung dịch sản xuất chứa cacbon nêu trên.
8. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó tốc độ chảy đặc hiệu để cung cấp dung dịch sản xuất chứa cacbon trong pha b) là nằm trong khoảng từ 35 đến 65 mg cơ chất cacbon cho một gam vi sinh vật mỗi giờ.