



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

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

(11)



1-0036342

(51)^{2006.01} C12P 7/10; C12N 9/42; C12P 21/00

(13) B

(21) 1-2018-04104

(22) 24/03/2017

(86) PCT/EP2017/057121 24/03/2017

(87) WO2017/174378 12/10/2017

(30) 1653124 08/04/2016 FR

(45) 25/07/2023 424

(43) 25/06/2019 375A

(73) 1. IFP ENERGIES NOUVELLES (FR)

1 & 4 avenue du Bois-Préau, 92852 RUEIL-MALMAISON, FRANCE

2. AGRO INDUSTRIES RECHERCHE ET DEVELOPPEMENT (FR)

Route de Bazancourt, 51110 POMACLE, FRANCE

3. INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (FR)

147 rue de l'Université, 75338 PARIS CEDEX 07, FRANCE

(72) BEN CHAABANE Fadhel (FR); COHEN Celine (FR).

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

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT ENZYM CÓ THỂ THỦY PHÂN XENLULOZA HOẶC
CÓ THỂ THỦY PHÂN HEMIXENLULOZA

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất enzym có thể thủy phân xenluloza hoặc có thể thủy phân hemixenluloza bao gồm các bước sau: thực hiện pha sinh trưởng a) vi sinh vật có thể thủy phân xenluloza trong thiết bị phản ứng kín, với sự có mặt của ít nhất một cơ chất sinh trưởng cacbon ở nồng độ nằm trong khoảng từ 10 đến 90g/L, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 30°C và độ pH nằm trong khoảng từ 4 đến 5,5, và thực hiện pha sản xuất enzym b) trong đó ít nhất một cơ chất cacbon cảm ứng được bổ sung, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 27°C và độ pH nằm trong khoảng từ 4 đến 5, quy trình có cơ chất cảm ứng là bã ép đã được xử lý sơ bộ thu được từ quy trình xử lý sơ bộ nguyên liệu lignoxenluloza không được thủy phân bằng enzym và được bổ sung theo kiểu theo mẻ hoặc liên tục, và có các đặc điểm đặc trưng là: hiệu suất thủy phân lớn hơn 80% trong thử nghiệm và độ nhớt biểu kiến, đo được trong thử nghiệm này, nhỏ hơn 1 Pa.giây ở tốc độ cắt bằng 10 giây⁻¹.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất enzym có thể thủy phân xenluloza và có thể thủy phân hemixenluloza. Enzym được sử dụng cụ thể trong các quy trình sản xuất nhiên liệu sinh học thế hệ thứ hai (tức là từ sinh khối lignoxenluloza), và đặc biệt khi nhiên liệu sinh học là etanol. Nói chung, quy trình theo sáng chế có thể được sử dụng trong tất cả các quy trình bao gồm thủy phân bằng enzym sinh khối, và đặc biệt là sinh khối lignoxenluloza. Đặc biệt, nó có thể được sử dụng để sản xuất enzym từ nấm dạng sợi.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong hơn 45 năm, quy trình chuyển hóa nguyên liệu lignoxenluloza thành etanol, sau khi thủy phân hợp phần polysaccarit thành các đường lên men, đã trở thành đối tượng của nhiều nghiên cứu.

Nguyên liệu lignoxenluloza là nguyên liệu xenluloza, nghĩa là nguyên liệu chứa hơn 90% khối lượng là xenluloza và/hoặc lignoxenluloza (lignoxenluloza chứa chủ yếu xenluloza, hemixenluloza và lignin). Xenluloza và hemixenluloza là các polysaccarit cấu thành chủ yếu từ pentoza và hexoza. Lignin là đại phân tử có cấu trúc phức tạp và khối lượng phân tử cao, trên cơ sở hợp chất phenol.

Gỗ, rơm rạ và lõi ngô là các nguyên liệu lignoxenluloza được sử dụng rộng rãi nhất, nhưng các nguồn tài nguyên khác như cây rừng chuyên dụng, dư lượng cây lấy gỗ, thực vật và ngũ cốc chứa đường, dư lượng lignoxenluloza từ ngành công nghiệp bột giấy và giấy, và các sản phẩm thu được từ quy trình chuyển hóa nguyên liệu lignoxenluloza có thể được sử dụng. Chúng chứa phần lớn trong khoảng từ 35 đến 50% xenluloza, 20-30% hemixenluloza và 15-25% lignin.

Quy trình chuyển hóa sinh nguyên liệu lignoxenluloza thành etanol bao gồm bước xử lý sơ bộ hóa lý, tiếp theo là bước thủy phân bằng enzym bằng cách sử dụng một hỗn hợp enzym để tạo ra đường, bước lên men bằng etanol các đường đã được giải phóng, trong đó quy trình lên men bằng etanol và thủy phân bằng enzym có thể được thực hiện đồng thời (quy trình SSF) và bước tinh chế etanol. Hỗn hợp enzym là hỗn hợp

của các enzym có thể thủy phân xenluloza (còn được gọi là xenlulaza) và/hoặc enzym có thể thủy phân hemixenluloza (thường được gọi là xylanaza). Enzym nấm mốc có ba tác động chính: endoglucanaza, exoglucanaza và xenlobiaza, được gọi là β -glucosidaza. Enzyme có thể thủy phân hemixenluloza có hoạt tính xylanaza đặc biệt.

Quy trình thủy phân bằng enzym có hiệu quả và được thực hiện trong điều kiện nhẹ.

Chi phí của các enzym vẫn cao, chiếm từ 20 đến 50% chi phí chuyển hóa nguyên liệu lignoxenluloza thành etanol. Kết quả là, rất nhiều bước xử lý đã được thực hiện để làm giảm chi phí này: trước tiên là tối ưu hóa quy trình sản xuất enzym, chọn lọc các vi sinh vật siêu sản xuất và cải thiện quy trình tạo ra các enzym này, tiếp theo là làm giảm lượng enzym trong quy trình thủy phân, và tối ưu hóa bước xử lý sơ bộ, cải thiện các hoạt tính cụ thể của các enzym này, và tối ưu hóa việc thực hiện bước thủy phân bằng enzym.

Trong thập kỷ qua, nhiều nghiên cứu đã tập trung vào việc tìm hiểu cơ chế tác động và biểu hiện của hỗn hợp enzym. Mục đích là nhằm tạo ra hỗn hợp phù hợp nhất cho quy trình thủy phân nguyên liệu lignoxenluloza bằng cách biến đổi vi sinh vật.

Vi sinh vật có thể thủy phân xenluloza được sử dụng phổ biến nhất trong sản xuất công nghiệp là nấm *Trichoderma reesei*. Nó có khả năng tiết, với sự có mặt của cơ chất cacbonat cảm ứng, ví dụ, xenluloza, hỗn hợp enzym ở nồng độ rất cao (lên đến 100g/L). Các protein khác có các đặc tính không thể thiếu cho quy trình thủy phân nguyên liệu lignoxenluloza cũng được tạo ra bởi *Trichoderma reesei*, ví dụ, xylanaza. Sự có mặt của cơ chất cacbonat cảm ứng là rất cần thiết cho sự biểu hiện của enzym có thể thủy phân xenluloza và/hoặc có thể thủy phân hemixenluloza. Bản chất của cơ chất cacbonat có ảnh hưởng mạnh đến thành phần của hỗn hợp enzym. Đây là trường hợp với xyloza, trong đó cơ chất cacbonat cảm ứng như xenluloza hoặc lactoza có thể làm cho hoạt tính của xylanaza được cải thiện đáng kể.

Lactoza vẫn là một trong những cơ chất phù hợp nhất cho quy trình sản xuất công nghiệp hỗn hợp enzym; tuy nhiên, chi phí của nó thay đổi đáng kể và chiếm gần một phần ba đến hai phần ba giá thành của enzym. Trong trường hợp sử dụng lactoza làm cơ chất cacbon, quy trình sản xuất hỗn hợp enzym phụ thuộc vào nguồn cacbon bên ngoài. Do vậy, việc sử dụng cơ chất cacbon thu được từ quy trình chuyển hóa sinh hóa nguyên liệu lignoxenluloza là một con đường quan trọng.

Một cơ chất cảm ứng khác có thể được sử dụng là xenluloza. Tuy nhiên, cơ chất này thậm chí còn đắt hơn cả lactoza.

Đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US-2011/262997 thay thế xenluloza được sử dụng trong quy trình sản xuất xenlulaza thông thường bằng sinh khối đã được xử lý sơ bộ, đặc biệt là được xử lý sơ bộ bằng quy trình nổi bằng hơi nước trong điều kiện axit, sinh khối này tùy ý đã được rửa. Sinh khối đã được xử lý sơ bộ chỉ dùng làm chất cảm ứng, sự sinh trưởng của vi sinh vật thu được với cơ chất cacbon là glucoza. Trong các ví dụ về quy trình được vận hành theo mẻ, bã ép đã được xử lý sơ bộ (đã được nấu bằng axit) và rửa sạch được bổ sung tổng số vào thời điểm bắt đầu thử nghiệm, cũng như dung dịch glucoza và chất chống tạo bọt.

Một mặt, quy trình này có nhược điểm là cần phải khử độc tổ bã ép đã được xử lý sơ bộ trước khi sử dụng. Việc rửa là một lựa chọn được đề cập đến cho bước này. Nếu quy trình này được áp dụng trên quy mô công nghiệp, bước rửa sẽ làm tăng đáng kể chi phí của quy trình.

Mặt khác, thực tế là toàn bộ bã ép đã được xử lý sơ bộ được bổ sung ở thời điểm bắt đầu thử nghiệm làm tăng đáng kể độ nhớt của môi trường, nên cần phải dùng công suất tiêu hao cao. Công suất của mô-tơ (kW/m³) cần để khuấy môi trường này được gọi là “công suất tiêu hao”. Việc tăng độ nhớt cũng đòi hỏi tốc độ sục khí rất cao để cho phép vận chuyển được đủ oxy.

WO13/190064 cũng đề cập đến phương pháp sản xuất enzym cho quy trình thủy phân bằng enzym sinh khối lignoxenluloza đã được xử lý sơ bộ (được gọi là sinh khối đã được xử lý sơ bộ thứ nhất). Quy trình sản xuất này được thực hiện khi không có đường bổ sung (như glucoza), nhưng có mặt chất rắn chứa đường phức và lignin. Tốt hơn nếu, chất rắn này thu được từ quy trình xử lý sinh khối khác nhau, bao gồm quy trình thủy phân bằng enzym, tiếp theo là phân tách chất rắn, quy trình này bắt đầu từ sinh khối đã được xử lý sơ bộ thứ 2. Trong quy trình sản xuất enzym này, quan trọng là tỷ lệ giữa đường phức và lignin của chất rắn này phải nhỏ hơn tỷ lệ giữa đường phức và lignin của sinh khối thứ 2. Tiêu chuẩn này đòi hỏi phải loại bỏ ít nhất 50% lượng nước và đường hòa tan ra khỏi sản phẩm thủy phân. Điều này dẫn đến việc làm tăng chi phí quy trình. Hơn nữa, chất rắn này có phần trăm lignin rất cao, dẫn đến việc sản xuất enzym kém hiệu

quả hơn. Trong thực tế, đã biết các hợp chất phenol chứa lignin có tác dụng ức chế enzym.

WO13/053924 đề cập đến việc vận hành quy trình cùng loại, trong đó sinh khối đã được xử lý sơ bộ cũng đóng vai trò của cơ chất sinh trưởng, mà không có bổ sung (hoặc bổ sung nhẹ) đường đơn (glucoza). Hơn nữa, việc nuôi cấy được thực hiện mà không cần bổ sung vitamin và/hoặc khoáng chất và/hoặc các chất kích thích sản xuất enzym. Quy trình này cũng đòi hỏi phải khử độc tổ bã ép (cụ thể nếu bước xử lý sơ bộ được sử dụng có tính axit).

WO011028554 đề cập đến việc sử dụng phần cặn rắn thu được từ quá trình thủy phân hemixenluloza để sản xuất xenlulaza bằng *Trichoderma reesei*, trong đó phần cặn này đã được loại bỏ phần đoạn lignin trong bước chiết lignin. Quá trình sản xuất được thực hiện với sự có mặt của bước bổ sung đường (glucoza). Các enzym thu được được dùng để thủy phân xenluloza, và không dùng để thủy phân hemixenluloza. Phần cặn rắn đã được khử lignin được sử dụng ở thời điểm bắt đầu pha sinh trưởng của vi sinh vật, gây khó khăn cho quá trình vận hành quy trình.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề cập đến nguồn cacbon cảm ứng thu được từ quy trình sản xuất và có thể làm cho hỗn hợp enzym được tạo ra thích hợp để thủy phân nguyên liệu lignoxenluloza. Tốt hơn nếu, quy trình sản xuất xenlulaza sử dụng bã ép đã được xử lý sơ bộ chưa được khử độc tổ trước đó.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất enzym có thể thủy phân xenluloza hoặc có thể thủy phân hemixenluloza bao gồm các bước sau:

thực hiện pha sinh trưởng a) vi sinh vật có thể thủy phân xenluloza trong thiết bị phản ứng kín, với sự có mặt của ít nhất một cơ chất sinh trưởng cacbon ở nồng độ nằm trong khoảng từ 10 đến 90g/L, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 30°C và độ pH nằm trong khoảng từ 4 đến 5,5, và

thực hiện pha sản xuất enzym b) để tạo ra môi trường enzym trong đó ít nhất một cơ chất cacbon cảm ứng được đưa vào ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 27°C và độ pH nằm trong khoảng từ 4 đến 5,

trong đó:

cơ chất cacbon cảm ứng nêu trên là bã ép đã được xử lý sơ bộ thu được từ quy trình xử lý sơ bộ nguyên liệu lignoxenluloza, bã ép không được thủy phân bằng enzym và được đưa vào thiết bị phản ứng kín theo kiểu theo mẻ hoặc liên tục,

bã ép đã được xử lý sơ bộ nêu trên, khi được tạo hỗn dịch ở nhiệt độ phòng ở hàm lượng chất khô bằng 10% khối lượng, có độ nhớt biểu kiến nhỏ hơn 1 Pa.giây ở tốc độ cắt bằng 10 giây⁻¹,

bã ép này được đưa vào với tốc độ nằm trong khoảng từ 0,3 đến 0,8g chất khô tính cho mỗi lít môi trường và trong mỗi giờ khi theo kiểu bổ sung liên tục; hoặc khi theo kiểu bổ sung theo mẻ, lượng bã ép được bổ sung mỗi f giờ, f nằm trong khoảng từ 0,5 giờ đến 48 giờ, nằm trong khoảng từ 0,3f đến 0,8f gam chất khô tính cho mỗi lít môi trường.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 và Fig.2 là hình vẽ thể hiện sự tiến triển của nồng độ protein của các thử nghiệm khác nhau được thực hiện với bã ép theo sáng chế;

Fig.3 là hình vẽ thể hiện sự thay đổi % CO₂ trong các khí thoát ra, độ pH và tín hiệu pO₂ sau khi bổ sung bã ép theo sáng chế theo kiểu bổ sung theo mẻ.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất hỗn hợp enzym trong môi trường nuôi cấy lên men chìm bằng vi sinh vật có thể thủy phân xenluloza sử dụng bã ép đã được xử lý sơ bộ.

“Bã ép đã được xử lý sơ bộ” dùng để chỉ cơ chất có nguồn gốc từ nguyên liệu lignoxenluloza đã được xử lý sơ bộ, tốt hơn nếu được xử lý bằng cách bùng nổ hơi nước trong môi trường axit. Sinh khối là dạng nguyên liệu được ưu tiên; trong bản mô tả này các thuật ngữ sinh khối và nguyên liệu lignoxenluloza thường được sử dụng hoán đổi lẫn nhau.

Quy trình chuyển hóa sinh hóa nguyên liệu lignoxenluloza thành rượu (đặc biệt là etanol) thường bao gồm bước xử lý sơ bộ hóa lý (tốt hơn nếu bước nổ bằng hơi nước trong môi trường axit), tạo ra bã ép đã được xử lý sơ bộ, tiếp đó là bước thủy phân bằng enzym bằng cách sử dụng hỗn hợp enzym tạo ra đường, sau đó bước lên men etanol đường này, trong đó bước lên men etanol và thủy phân bằng enzym có thể được thực hiện

đồng thời (quy trình SSF) hoặc riêng rẽ (quy trình SHF), và cuối cùng là bước tinh chế etanol.

Quy trình theo sáng chế có nhiều ưu điểm:

- làm giảm hoặc thậm chí loại bỏ được việc phải cung cấp cơ chất cacbon có nguồn gốc từ bên ngoài vào quy trình chuyển hóa sinh hóa nguyên liệu lignoxenuloza.

- tạo ra hỗn hợp enzym đặc biệt phù hợp với quá trình thủy phân bằng enzym nguyên liệu lignoxenuloza đã được xử lý sơ bộ trong quy trình chuyển hóa sinh hóa.

- tạo ra quy trình mà có thể không cần phải khử độc tố (ví dụ, làm sạch) bã ép đã được xử lý sơ bộ được sử dụng. Điều này cho phép tạo ra lượng dòng chảy trong quá trình rửa và phải được tái xử lý trước khi xả ra để khử.

- tạo ra quy trình có độ nhớt của môi trường được giữ ở giá trị thấp, mà hạn chế được nhu cầu oxy và do đó tạo ra được quy trình có thể nâng cấp được lên quy mô công nghiệp.

Quy trình này có thể được vận hành theo kiểu nạp liên tục hoặc nạp theo mẻ.

Theo kiểu bổ sung theo mẻ, phương thức thực hiện quy trình đặc biệt có lợi là thực hiện bổ sung bã ép theo cách tuần tự tùy thuộc vào sự thay đổi độ pH của môi trường phản ứng và % CO₂ trong các khí đầu ra.

Kiểu vận hành này cho phép sử dụng bã ép đã được xử lý sơ bộ chưa được khử độc tố (bã ép chưa được rửa).

Một lợi ích của quy trình này, và đặc biệt là với kiểu vận hành nêu trên, là duy trì được độ nhớt của môi trường thấp. Điều quan trọng là không ảnh hưởng đến sự chuyển vận oxy và là quy trình có thể nâng cấp được lên quy mô công nghiệp.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất enzym bao gồm hai pha:

- pha sinh trưởng a) vi sinh vật được đề cập với sự có mặt của ít nhất một cơ chất sinh trưởng cacbon, trong thiết bị phản ứng kín, pha sinh trưởng này được thực hiện với nồng độ của cơ chất sinh trưởng cacbon nằm trong khoảng từ 10 đến 90g/L. Bã ép đã được xử lý sơ bộ không được đưa vào trong pha này. Môi trường nuôi cấy vi sinh vật được đề cập thu được như vậy.

-pha b) tạo ra hỗn hợp enzym (hoặc các enzym), trong đó ít nhất một cơ chất cacbon cảm ứng được nạp theo mẻ hoặc liên tục, cơ chất cacbon cảm ứng này là một phần của bã ép đã được xử lý sơ bộ, pha sản xuất này được thực hiện với việc bổ sung liên tục hoặc gián đoạn (theo mẻ) bã ép.

Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất enzym có thể thủy phân xenluloza hoặc có thể thủy phân hemixenluloza bao gồm:

-pha sinh trưởng a) vi sinh vật có thể thủy phân xenluloza trong thiết bị phản ứng kín, với sự có mặt của ít nhất một cơ chất sinh trưởng cacbon ở nồng độ nằm trong khoảng từ 10 đến 90 g / l, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 30°C và độ pH nằm trong khoảng từ 4 đến 5,5,

-pha sản xuất enzym b) trong đó ít nhất một cơ chất cacbon cảm ứng được đưa vào ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 27°C và độ pH nằm trong khoảng từ 4 đến 5,

Quy trình trong đó:

-cơ chất cảm ứng là bã ép đã được xử lý sơ bộ thu được từ quy trình xử lý sơ bộ nguyên liệu lignoxenluloza, bã ép này không được thủy phân bằng enzym và được đưa vào theo kiểu theo mẻ hoặc liên tục,

-bã ép này có hiệu suất thủy phân bằng enzym bằng ít nhất 80% sau 96 giờ, quá trình thủy phân này được thực hiện ở 50°C và pH 4,8 với bã ép chứa 15% khối lượng chất khô (chất khô - DM) với 10 mg enzym CELLIC®CTEC2 trên mỗi gam MS, hiệu suất này là tỷ lệ giữa khối lượng của đường đơn được giải phóng bởi quá trình thủy phân bằng enzym chia cho khối lượng tối đa theo lý thuyết mà có thể thu được nếu toàn bộ xenluloza, hemixenluloza và oligome thu được từ quá trình xử lý sơ bộ được thủy phân,

-bã ép đã được xử lý sơ bộ được tạo hỗn dịch ở nhiệt độ phòng ở 10% khối lượng DM có độ nhớt biểu kiến nhỏ hơn 1 Pa.giây ở tốc độ cắt bằng 10 giây⁻¹, tốt hơn nếu nhỏ hơn 0,15 Pa.giây.

-bã ép này được đưa vào với tốc độ nằm trong khoảng từ 0,3 đến 0,8 gam MS tính cho mỗi lít môi trường và trong mỗi giờ theo kiểu liên tục; lượng bã ép theo kiểu bổ sung theo mẻ được bổ sung mỗi f giờ, f nằm trong khoảng từ 0,5 giờ đến 48 giờ, nằm trong khoảng từ 0,3f đến 0,8f gam chất khô tính cho mỗi lít môi trường.

Tốt hơn nếu, độ nhớt biểu kiến của môi trường của bước b) duy trì nhỏ hơn 10 Pa.giây ở tốc độ cắt bằng 10 giây⁻¹, tốt hơn nếu nhỏ hơn 1 Pa.giây.

Bã ép có thể đã không được khử độc tố (rửa) trước khi được đưa vào pha b) hoặc có thể đã không được khử độc tố (rửa). Pha b) thường vận hành khi không có mặt đường bổ sung. Do vậy, rất có lợi nếu bã ép đã được xử lý sơ bộ là cơ chất cảm ứng duy nhất.

Như được giải thích chi tiết dưới đây, bã ép đã được xử lý sơ bộ được tạo ra từ chất lỏng và chất rắn, trong đó chất rắn này chứa 20-70% chất khô, trong đó hàm lượng lignin nằm trong khoảng từ 20% đến 50%. Chất rắn của bã ép đã được xử lý sơ bộ còn chứa xenluloza ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 30% đến 60% khối lượng và chất khoáng ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 10% khối lượng và hemixenluloza, và chất lỏng chứa đường ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 30% đến 80% khối lượng.

Tốt hơn nếu, bước xử lý sơ bộ là bước xử lý bùng nổ bằng hơi nước trong điều kiện axit.

Pha a)

Vi sinh vật được sử dụng trong quy trình sản xuất hỗn hợp enzym theo sáng chế là các chủng nấm thuộc giống *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* hoặc *Schizophyllum*, tốt hơn nếu thuộc loài *Trichoderma reesei*. Các chủng vi sinh vật công nghiệp hiệu quả nhất là các chủng thuộc loài *Trichoderma reesei*, được cải biến sao cho cải thiện được hỗn hợp enzym bằng các quy trình chọn lọc nhờ gây đột biến như, ví dụ, chủng CL847 (Patent Pháp số FR-2555803). Các chủng được cải thiện bằng kỹ thuật tái tổ hợp di truyền cũng có thể được sử dụng. Các chủng này được nuôi cấy trong thiết bị phản ứng có thông khí và khuấy trong các điều kiện tương hợp với sự sinh trưởng của chúng và sự sản xuất enzym. Nhiều chủng cải thiện là đã biết, như MCG77 (Gallo - Patent Mỹ số 4275 167), MCG 80 (Allen, AL and Andreotti, RE, Biotechnol-Bioengi 1982 12, 451-459 1982), RUT C30 (Montenecourt, BS and Eveleigh, DE, Appl. Environ. Microbiol. 1977, 34, 777-782) và CL847 (Durand et al, 1984 Proc.SFM Symposium "Genetics of Industrial Microorganisms", Paris, HESLOT H. Ed, pp 39-50).

Có lợi nếu, cơ chất sinh trưởng cacbon của vi sinh vật được sử dụng trong pha a) này được chọn từ đường công nghiệp dễ hòa tan, và tốt hơn nếu từ glucoza, lactoza, xyloza, phần cặn lỏng (cặn chung cất) thu được sau khi lên men etanol các đường

monome của sản phẩm thủy phân bằng enzym nguyên liệu lignoxenluloza và các phần chiết của phân đoạn hemixenluloza (hợp chất C5) ở dạng monome thu được từ cơ chất lignoxenluloza đã được xử lý sơ bộ (như chất lỏng được phân tách ở giai đoạn xử lý sơ bộ), được sử dụng một mình hoặc dưới dạng hỗn hợp. Tùy thuộc vào bản chất của nó, cơ chất cacbon được đưa vào thiết bị phản ứng kín trước khi khử trùng hoặc được tiệt trùng riêng rẽ và được đưa vào thiết bị phản ứng kín sau khi khử trùng thiết bị.

Cơ chất sinh trưởng cacbon này được sử dụng trong pha a) ở nồng độ ban đầu với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 90 g cơ chất cacbon cho mỗi lít thể tích phản ứng.

Tốt hơn nếu, pha sinh trưởng a) được thực hiện trong khoảng thời gian từ 30 đến 70 giờ, tốt hơn nếu từ 30 đến 40 giờ.

Tốt hơn nếu, pha sinh trưởng a) vận hành ở độ pH nằm trong khoảng từ 4 đến 5,5, và tốt hơn nếu 4,8, và ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 30°C, và tốt hơn nếu 27°C.

Pha b)

Theo sáng chế, có lợi nếu cơ chất cacbon cảm ứng được sử dụng trong pha sản xuất b) là bã ép đã được xử lý sơ bộ.

Bước xử lý sơ bộ nguyên liệu lignoxenluloza có thể làm cho độ nhạy của phân đoạn xenluloza với quá trình thủy phân bằng enzym được cải thiện.

Tốt hơn nếu, bước xử lý sơ bộ được thực hiện trong môi trường axit. Tốt hơn nếu là thủy phân bằng axit, nấu bằng axit hoặc nổ bằng hơi nước. Tốt hơn nếu bước xử lý sơ bộ là bước xử lý bùng nổ bằng hơi nước. Có lợi nếu, việc nổ bằng hơi nước được bắt đầu bằng bước ngâm nguyên liệu lignoxenluloza trong dung dịch axit, tốt hơn nếu là dung dịch nước axit sulfuric. Bước này sau đây được gọi là nổ bằng hơi nước trong điều kiện axit (nguyên liệu chứa axit).

Vào thời điểm cuối của quá trình xử lý sơ bộ, bã ép đã được xử lý sơ bộ thu được và một phần bã ép này được lấy ra để sản xuất enzym, phần còn lại được chuyển vào thủy phân bằng enzym và sau đó được lên men để tạo ra rượu.

Phần bã ép này có thể được sử dụng ở dạng như vậy (toàn bộ bã ép) hoặc, tốt hơn nếu, nó có thể là phần chất rắn của nó hoặc tốt hơn nữa nếu là phần thu được sau khi phân tách chất lỏng nhiều hơn hoặc ít hơn đáng kể.

Theo quy trình xử lý sơ bộ được sử dụng, bã ép ở dạng chất rắn có hơi ẩm nhỏ hơn hoặc cao hơn nhưng không có pha lỏng, hoặc nó chứa pha rắn và lỏng, và trong trường hợp là pha lỏng thì pha lỏng này có thể được phân tách riêng một phần hoặc toàn bộ.

Tùy thuộc vào quy trình xử lý sơ bộ được sử dụng, phần chất rắn chiếm trong khoảng từ 20 đến 70% khối lượng bã ép đã được xử lý sơ bộ. Bã ép được sử dụng để sản xuất enzym có lượng chất khô là 10-85%, tốt hơn nếu 20-70%, và tốt hơn nữa nếu 40%-60% (thường tương đương để thu được bã ép ở dạng chất rắn sau khi xử lý sơ bộ).

Phần chất rắn cấu thành từ lignin, hợp chất khoáng, xenluloza, và không được thủy phân hemixenluloza cặn. Tỷ lệ của xenluloza trong phần chất rắn này là nằm trong khoảng từ 30 đến 60% khối lượng. Tỷ lệ của lignin trong phần chất rắn này là nằm trong khoảng từ 20 đến 50% khối lượng. Tỷ lệ của hợp chất khoáng và hemixenluloza trong phần chất rắn này là nằm trong khoảng từ 1 đến 10% khối lượng.

Phần chất lỏng của bã ép đã được xử lý sơ bộ chứa xyloza, xyloligosaccarit, mannoza và arabinoza chiếm phần trăm trong khoảng từ 30 và 80%.

Theo một phương án thực hiện được ưu tiên, bã ép được sử dụng trực tiếp, nói một cách khác là không được xử lý hóa học hoặc hóa sinh. Do vậy, sáng chế không sử dụng bã ép đã được xử lý sơ bộ mà đã được thủy phân bằng enzym. Một hoặc nhiều bước xử lý vật lý có thể được thực hiện (phân tách, làm nóng, cô chất lỏng, v.v.).

Theo phương án được ưu tiên, bã ép không được rửa. Trong một số trường hợp, bã ép có thể được rửa để khử độc tố, tốt hơn nếu sử dụng lượng nước ở mức tối thiểu.

Tốt hơn nếu, pha sản xuất b) được thực hiện trong khoảng thời gian từ 70 và 200 giờ, tốt hơn nếu từ 100 đến 150 giờ.

Tốt hơn nếu, pha sản xuất b) vận hành ở độ pH nằm trong khoảng từ 4 và 5 và ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 27°C.

Vào thời điểm cuối của bước xử lý sơ bộ, bã ép đã được xử lý sơ bộ được sử dụng trực tiếp hoặc không được sử dụng trong pha sản xuất b) hỗn hợp enzym theo sáng chế dưới dạng cơ chất cacbon cảm ứng.

Pha sản xuất b) được thực hiện theo kiểu liên tục bằng cách bổ sung liên tục bã ép với tốc độ nằm trong khoảng từ 0,3 đến 0,8 gam chất khô tính cho mỗi lít môi trường và trong mỗi giờ (tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 0,4 đến 0,6g/L/h và tốt nhất là 0,5g/L/h),

hoặc theo kiểu bổ sung theo mẻ bằng cách bổ sung tuần tự bã ép mỗi f giờ, f nằm trong khoảng từ 0,5 giờ và 48 giờ, lượng bã ép được bổ sung nằm trong khoảng từ $0,3f$ đến $0,8f$ gam chất khô tính cho mỗi lít môi trường.

Điều đó có nghĩa là nếu, ví dụ, việc bổ sung được thực hiện mỗi 12h, lượng bã ép được bổ sung sẽ nằm trong khoảng từ 3,6 (tức là $0,3 \times 12$) đến 9,6 (tức là $0,8 \times 12$) g chất khô tính cho mỗi lít môi trường, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 4,8 đến 8,4 g chất khô tính cho mỗi lít môi trường.

Theo phương án thực hiện theo mẻ được ưu tiên, việc bổ sung bã ép đã được xử lý sơ bộ được thực hiện tùy thuộc vào tín hiệu của % mol CO_2 trong các khí thoát ra và việc đánh giá độ pH của môi trường. Độ ổn định của % CO_2 ở $\pm 0,02\%$ (đối với vvm bằng $0,5 \text{ min}^{-1}$) kết hợp với mức tăng độ pH là 0,05 đơn vị hoặc mức tăng $p\text{O}_2$ là ít nhất 5% dẫn đến việc bổ sung bã ép tiếp theo.

Thực tế, sau khi bổ sung, có hiện tượng gia tăng % CO_2 trong khí thoát ra, tương ứng với mức tiêu thụ của đường dễ hòa tan có trong bã ép đã được xử lý sơ bộ (về cơ bản là xyloza và glucoza). Sau đó, enzym tiếp xúc với xenluloza, dẫn đến việc tạo ra xenlulaza, và mức % CO_2 suy giảm.

Việc bổ sung được thực hiện khi quan sát được mức giảm % CO_2 trong các khí thoát ra và mức tăng độ pH lớn hơn 0,05 đơn vị.

Tín hiệu $p\text{O}_2$ (nồng độ của oxy hòa tan ở trạng thái bão hòa) thường được giữ ở mức cao (trên 30% nồng độ oxy bão hòa trong môi trường lỏng ở áp suất khí quyển).

Khi thực hiện quy trình, có lợi nếu đảm bảo được rằng độ nhớt biểu kiến của môi trường duy trì dưới 10 Pa.giây ở tốc độ cắt bằng 10 giây^{-1} , tốt hơn nếu dưới 1 Pa.giây.

Thực tế, độ nhớt có tác dụng bất lợi đến sự chuyển vận của oxy. Do đó, cần làm tăng đáng kể công suất tiêu hao và/hoặc tốc độ sục khí để đảm bảo sự chuyển vận này, mà điều này lại dẫn đến việc làm tăng đáng kể sự hao tổn năng lượng và có thể làm cho quy trình này khó đưa được lên quy mô công nghiệp.

Bã ép đã được xử lý sơ bộ có thể được sử dụng trong quy trình theo sáng chế có các đặc điểm đặc trưng sau:

-trong thử nghiệm thủy phân bằng enzym được thực hiện với mẫu bã ép được phục hồi đến 15% chất khô (dry matter - DM), với 10 mg enzym CELLIC® CTEC2 (do

Novozymes cung cấp) trên mỗi gam MS, ở 50°C và pH 4,8, sau 96 giờ hiệu suất thủy phân lớn hơn 80%. Hiệu suất thủy phân là tỷ lệ giữa khối lượng của đường đơn (như glucoza, xyloza) được giải phóng bởi quá trình thủy phân bằng enzym chia cho khối lượng tối đa theo lý thuyết mà có thể thu được nếu toàn bộ xenluloza, hemixenluloza và oligome thu được từ quy trình xử lý sơ bộ được thủy phân,

-trong thử nghiệm độ nhớt, trong hỗn dịch chứa 10% DM, bã ép đã được xử lý sơ bộ có độ nhớt biểu kiến nhỏ hơn 1 Pa.giây, và tốt hơn nếu nhỏ hơn 0,15 Pa.giây, đối với tốc độ cắt bằng 10 giây⁻¹. Phép đo được thực hiện bằng lưu biến kế AR2000 của TA Instrument với hình học dạng dải xoắn ốc như được mô tả trong bài báo “Experimental guidelines to optimize two crucial steps of lignocellulosic bioethanol production: a rheological approach” của Hénault và đồng tác giả, 2014.

Bản chất của sinh khối là nguồn bã ép đã được xử lý sơ bộ có ảnh hưởng đến quá trình sản xuất enzym, và đến cả tính năng thủy phân bằng enzym của quy trình hóa sinh để xử lý sinh khối lignoxenluloza. Các ví dụ này cho thấy cở chế về có tính phản ứng hơn so với rom, tuy nhiên rom lại tạo ra tính năng ở mức cao trong quy trình theo sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ này chứng minh rằng phương thức thực hiện và dạng bã ép được sử dụng có ảnh hưởng đến tính năng của quy trình.

Ví dụ 1: Sử dụng bã ép đã được xử lý sơ bộ theo kiểu bổ sung theo mẻ: toàn bộ bã ép được bổ sung ở thời điểm bắt đầu thử nghiệm.

Việc nuôi cấy sơ bộ nấm được thực hiện trong thiết bị lên men khuấy cơ học. Môi trường khoáng có thành phần như sau: KOH 1,66g/L, H₃PO₄ 85% 2mL/L, (NH₄)₂SO₄ 2,8g/L, MgSO₄. 7H₂O 0,6g/L, CaCl₂ 0,6g/L, MnSO₄ 3,2mg/L, ZnSO₄.7H₂O 2,8mg/L, CoCl₂ 4,0mg/L, FeSO₄. 7H₂O 10mg/L, nước ngâm ngô 1, 2g/L, chất khử bọt 0,5mL/L và bổ sung kali phtalat ở nồng độ 5μL-1 vào dung dịch đệm pH.

Thiết bị lên men chứa môi trường khoáng được tiệt trùng ở 120°C trong 20 phút.

Thiết bị lên men được gieo mầm chủng *Trichoderma reesei* CL847.

Sự sinh trưởng của nấm trong môi trường nuôi cấy sơ bộ được thực hiện bằng cách sử dụng glucoza dưới dạng cơ chất cacbon ở nồng độ 30 gL⁻¹. Sự sinh trưởng của nguyên liệu nuôi cấy kéo dài 2-3 ngày và được thực hiện ở 28°C trong tủ lắc ẩm.

Sự chuyển vận đến thiết bị lên men sản xuất xenlulaza được thực hiện khi nồng độ glucoza cạn nhỏ hơn 15g/L.

Bốn thử nghiệm được thực hiện để tạo ra enzym bằng cách sử dụng cỏ chè vè được xử lý sơ bộ bằng cách bùng nổ hơi nước trong điều kiện axit:

- 2 thử nghiệm được thực hiện ở 10% DM

- 2 thử nghiệm được thực hiện ở 20% DM

Việc sản xuất xenlulaza được thực hiện trong thiết bị lên men lắc cơ học. Môi trường khoáng có thành phần sau: KOH 1,66g/L, H₃PO₄ 85% 2mL/L, (NH₄)₂SO₄ 2,8g/L, MgSO₄ 7H₂O 0,6g/L, CaCl₂ 0,6g/L, MnSO₄ 3,2mg/L, ZnSO₄ 7H₂O 2,8mg/L, CoCl₂ 4,0mg/L, FeSO₄ 7 H₂O 10mg/L, nước ngâm ngô 1, 2g/L, chất chống tạo bọt 0,5mL/L.

Thiết bị lên men chứa môi trường khoáng được tiệt trùng ở 120°C trong 20 phút.

Thiết bị lên men được cấy ở nồng độ là 10% (thể tích/thể tích) môi trường nuôi cấy sơ bộ dạng lỏng chứa chủng *Trichoderma reesei* CL847. Độ pH được điều chỉnh đến 5,5

Thử nghiệm được thực hiện ở 20% DM không thành công: không có sự tạo thành xenlulaza. Môi trường quá nhớt và/hoặc chứa quá nhiều chất ức chế.

Thử nghiệm được thực hiện ở 10% DM tạo ra 15g/L protein sau 150 giờ, tức là hiệu suất là 0,1g/L/h.

Sự tiến triển của nồng độ protein theo kiểu bổ sung theo mẻ với sinh khối lignoxenluloza đã được xử lý sơ bộ trong điều kiện axit được minh họa trên Fig.1.

Ví dụ 2: Thử nghiệm theo kiểu bổ sung theo mẻ

5 thử nghiệm được thực hiện (Thử nghiệm 1 đến 5).

Việc nuôi cấy sơ bộ nấm *Trichoderma reesei* CL847 được thực hiện như trong Ví dụ 1, nhưng với 15g/L glucoza dưới dạng cơ chất cacbon duy nhất. Việc tạo ra xenlulaza bắt đầu sau 24 giờ bằng cách bổ sung bã ép đã được xử lý sơ bộ theo kiểu bổ sung theo mẻ, nói một cách khác là bằng cách bổ sung

- 6 g bã ép khô tính cho mỗi lít môi trường mỗi 12 giờ (Thử nghiệm 3, Thử nghiệm 4, Thử nghiệm 5),

- hoặc 12 g chất khô cho mỗi lít với tần suất giống nhau (Thử nghiệm 1 và Thử nghiệm 2).

5 thử nghiệm được thực hiện bằng cách sử dụng 3 cơ chất lignoxenluloza khác nhau được xử lý sơ bộ bằng cách bùng nổ hơi nước trong điều kiện axit và thu được ở dạng như vậy (không phân tách chất lỏng):

- Cỏ chè vè 1 đáp ứng với thử nghiệm thủy phân và thử nghiệm độ nhớt (độ nhớt biểu kiến ở tốc độ cắt bằng 10 giây^{-1} bằng $0,09 \text{ Pa.giây}$) (Thử nghiệm 1 và Thử nghiệm 5)

- Cỏ chè vè 2 không đáp ứng với thử nghiệm thủy phân (hiệu suất $<70\%$) (Thử nghiệm 2 và Thử nghiệm 3)

- Rơm lúa mì 1 đáp ứng với thử nghiệm thủy phân và thử nghiệm độ nhớt (độ nhớt biểu kiến ở tốc độ cắt bằng 10 giây^{-1} bằng $1,1 \text{ Pa.giây}$) (Thử nghiệm 4)

Thử nghiệm thủy phân và độ nhớt là các thử nghiệm đã mô tả trên đây.

Fig.1 thể hiện sự tiến triển của nồng độ protein của các thử nghiệm khác nhau được thực hiện với bã ép:

Thử nghiệm 1: Bã ép cỏ chè vè 1 - công đoạn với số lượng bã ép lớn hơn hai lần trong công đoạn tối ưu

Thử nghiệm 2: Bã ép cỏ chè vè 2 - công đoạn với lượng bã ép lớn hơn hai lần trong công đoạn tối ưu

Thử nghiệm 3: Bã ép cỏ chè vè 2 - được gọi là công đoạn tối ưu

Thử nghiệm 4: Bã ép rơm lúa mì 1 - được gọi là công đoạn tối ưu

Thử nghiệm 5: Bã ép cỏ chè vè 1 - được gọi là công đoạn tối ưu

Quy trình công đoạn tối ưu để sản xuất xenlulaza, được sử dụng trong Thử nghiệm 3, 4 hoặc 5, là như sau:

Sau khi pha sinh trưởng 24 giờ theo kiểu bổ sung theo mẻ bằng glucoza ở 15g/L , việc bổ sung bã ép cỏ chè vè được thực hiện khoảng mỗi 12 giờ kết hợp bổ sung 6 g chất khô tính cho mỗi lít môi trường. sau 120h, tần suất bổ sung được điều chỉnh theo tín hiệu CO_2 .

Thực tế, sau khi bổ sung có sự gia tăng % CO₂ trong các khí thoát ra (Fig.3), tương ứng với mức tiêu thụ của đường dễ hòa tan có mặt trong bã ép đã được xử lý sơ bộ (chủ yếu là xyloza và glucoza). Sau đó, enzym kích thích xenluloza để tạo ra xenlulaza (Fig.2) và mức % CO₂ suy giảm.

Việc bổ sung được thực hiện khi quan sát được mức giảm % CO₂ trong các khí thoát ra và độ pH tăng hơn 0,05 đơn vị.

Tín hiệu pO₂ (nồng độ oxy hòa tan ở trạng thái bão hòa) được duy trì ở mức cao (trên 30%) trong suốt thử nghiệm với công suất tiêu hao thấp (nhỏ hơn 1 kW/m³).

Trong Fig.1, bã ép được bổ sung khi độ pH gia tăng và mức CO₂ ngừng giảm với tốc độ 6g chất khô cho mỗi lít trong mỗi lần bổ sung. Hàng ngang tương ứng với thời gian khi bã ép được bổ sung.

Các kết quả được thể hiện bằng hình vẽ trong Fig.2 và cho thấy tầm quan trọng của cả kiểu công đoạn xử lý lẫn dạng bã ép được sử dụng theo tính năng của quy trình.

Thực tế, quy trình tối ưu (Thử nghiệm 5 của Fig.2) có thể làm cho đạt được nồng độ xenlulaza cuối là 35g/L trong 210 h, tức là hiệu suất bằng 0,17g/L/h.

Vì vậy, hiệu quả đạt được tốt hơn 70% theo kiểu bổ sung theo mẻ được thể hiện trong Ví dụ 1.

Các thử nghiệm khác có cùng tốc độ bổ sung theo mẻ (công đoạn tối ưu) nhưng sử dụng rom đã được xử lý sơ bộ 1 (đáp ứng với các thử nghiệm) (Thử nghiệm 4) hoặc cỏ chè vè 2 (không đáp ứng với các thử nghiệm) (Thử nghiệm 3) thu được hiệu suất nhỏ hơn lần lượt là 32% và 25% so với hiệu suất của Thử nghiệm 5.

Thử nghiệm có tốc độ bổ sung theo mẻ lớn gấp hai lần tốc độ tối ưu thu được tính năng sản xuất kém với cỏ chè vè đã được xử lý sơ bộ 1 đáp ứng với các thử nghiệm (Thử nghiệm 1) hoặc với cỏ chè vè đã được xử lý sơ bộ 2 không đáp ứng với các thử nghiệm (Thử nghiệm2).

Trong các thử nghiệm này, đã thấy rằng mức pO₂ giảm xuống dưới 10%. Rom đã được xử lý sơ bộ được sử dụng có độ nhớt biểu kiến của nguyên liệu trong hỗn dịch lớn hơn khoảng 12 lần so với độ nhớt biểu kiến của cỏ chè vè, điều này có thể giải thích cho mức giảm pO₂.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất enzym có thể thủy phân xenluloza hoặc có thể thủy phân hemixenluloza bao gồm các bước sau:

thực hiện pha sinh trưởng a) vi sinh vật có thể thủy phân xenluloza trong thiết bị phản ứng kín, với sự có mặt của ít nhất một cơ chất sinh trưởng cacbon ở nồng độ nằm trong khoảng từ 10 đến 90g/L, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 30°C và độ pH nằm trong khoảng từ 4 đến 5,5, và thực hiện pha sản xuất enzym b) để tạo ra môi trường enzym trong đó ít nhất một cơ chất cacbon cảm ứng được đưa vào ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 27°C và độ pH nằm trong khoảng từ 4 đến 5,

trong đó cơ chất cacbon cảm ứng nêu trên là bã ép đã được xử lý sơ bộ thu được từ quy trình xử lý sơ bộ nguyên liệu lignoxenluloza, bã ép không được thủy phân bằng enzym và được đưa vào thiết bị phản ứng kín theo kiểu theo mẻ hoặc liên tục, bã ép đã được xử lý sơ bộ nêu trên, khi được tạo hỗn dịch ở nhiệt độ phòng ở hàm lượng chất khô bằng 10% khối lượng, có độ nhớt biểu kiến nhỏ hơn 1 Pa.giây ở tốc độ cắt bằng 10 giây⁻¹, bã ép này được đưa vào với tốc độ nằm trong khoảng từ 0,3 đến 0,8g chất khô tính cho mỗi lít môi trường và trong mỗi giờ khi theo kiểu bổ sung liên tục; hoặc khi theo kiểu bổ sung theo mẻ, lượng bã ép được bổ sung mỗi f giờ, f nằm trong khoảng từ 0,5 giờ đến 48 giờ, nằm trong khoảng từ 0,3f đến 0,8f gam chất khô tính cho mỗi lít môi trường.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó độ nhớt biểu kiến của môi trường enzym trong pha sản xuất enzym b) duy trì nhỏ hơn 10 Pa.giây ở tốc độ cắt bằng 10 giây⁻¹.

3. Quy trình theo điểm 1, trong đó bã ép đã được rửa trước khi được đưa vào.

4. Quy trình theo điểm 1, trong đó bã ép chưa được rửa trước khi được đưa vào.

5. Quy trình theo điểm 1, trong đó vi sinh vật có thể thủy phân xenluloza là nấm thuộc loài *Trichoderma reesei*.

6. Quy trình theo điểm 1, trong đó bước xử lý sơ bộ là bước xử lý bùng nổ bằng hơi nước trong điều kiện axit.

7. Quy trình theo điểm 1, trong đó pha sản xuất enzym b) được thực hiện khi không có đường bổ sung.

8. Quy trình theo điểm 1, trong đó bã ép đã được xử lý sơ bộ nêu trên là cơ chất cảm ứng duy nhất được sử dụng trong pha sản xuất enzym b).
9. Quy trình theo điểm 1, trong đó bã ép đã được xử lý sơ bộ nêu trên được tạo ra từ chất lỏng và chất rắn, và chất rắn chứa chất khô ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 20% đến 70%, trong đó hàm lượng lignin nằm trong khoảng từ 20% đến 50%.
10. Quy trình theo điểm 1, trong đó bã ép đã được xử lý sơ bộ nêu trên được tạo ra từ chất lỏng và chất rắn, và chất rắn của bã ép đã được xử lý sơ bộ nêu trên chứa xenluloza ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 30% đến 60% khối lượng và chất khoáng ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 10% khối lượng và hemixenluloza, và chất lỏng chứa đường ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 30% đến 80% khối lượng.
11. Quy trình theo điểm 1, trong đó trong pha sản xuất enzym b) trong đó bã ép được bổ sung, áp suất riêng phần pO_2 của oxy được hòa tan trong môi trường enzym ở áp suất khí quyển được duy trì lớn hơn 30% áp suất riêng phần bão hòa oxy.
12. Quy trình theo điểm 1, trong đó bã ép đã được xử lý sơ bộ nêu trên là một phần bã ép đã được xử lý sơ bộ thu được từ bước xử lý sơ bộ sinh khối lignoxenluloza, phần bã ép còn lại đã được xử lý sơ bộ được đưa vào bước thủy phân bằng enzym được thực hiện khi có mặt của enzym thu được bằng pha sản xuất enzym b), sản phẩm thủy phân thu được được đưa vào bước lên men etanol, và dòng chất lỏng thoát ra thu được được chưng cất để phân tách etanol.
13. Quy trình theo điểm 12, trong đó một phần bã ép đã được xử lý sơ bộ thu được từ bước xử lý sơ bộ sinh khối lignoxenluloza được sử dụng trực tiếp trong pha sản xuất enzym b).
14. Quy trình theo điểm 12, trong đó một phần hoặc toàn bộ chất lỏng chứa trong một phần bã ép đã được xử lý sơ bộ thu được từ bước xử lý sơ bộ sinh khối lignoxenluloza được phân tách, và bã ép thu được được đưa vào pha sản xuất enzym b).
15. Quy trình theo điểm 1, trong đó bã ép đã được xử lý sơ bộ nêu trên, khi được tạo hỗn dịch ở nhiệt độ phòng ở hàm lượng chất khô bằng 10% khối lượng, có độ nhớt biểu kiến nhỏ hơn 0,15 Pa.giây ở tốc độ cắt bằng 10 giây⁻¹.
16. Quy trình theo điểm 1, trong đó độ nhớt biểu kiến của môi trường enzym trong pha sản xuất enzym b) duy trì nhỏ hơn 1 Pa.giây ở tốc độ cắt bằng 10 giây⁻¹.

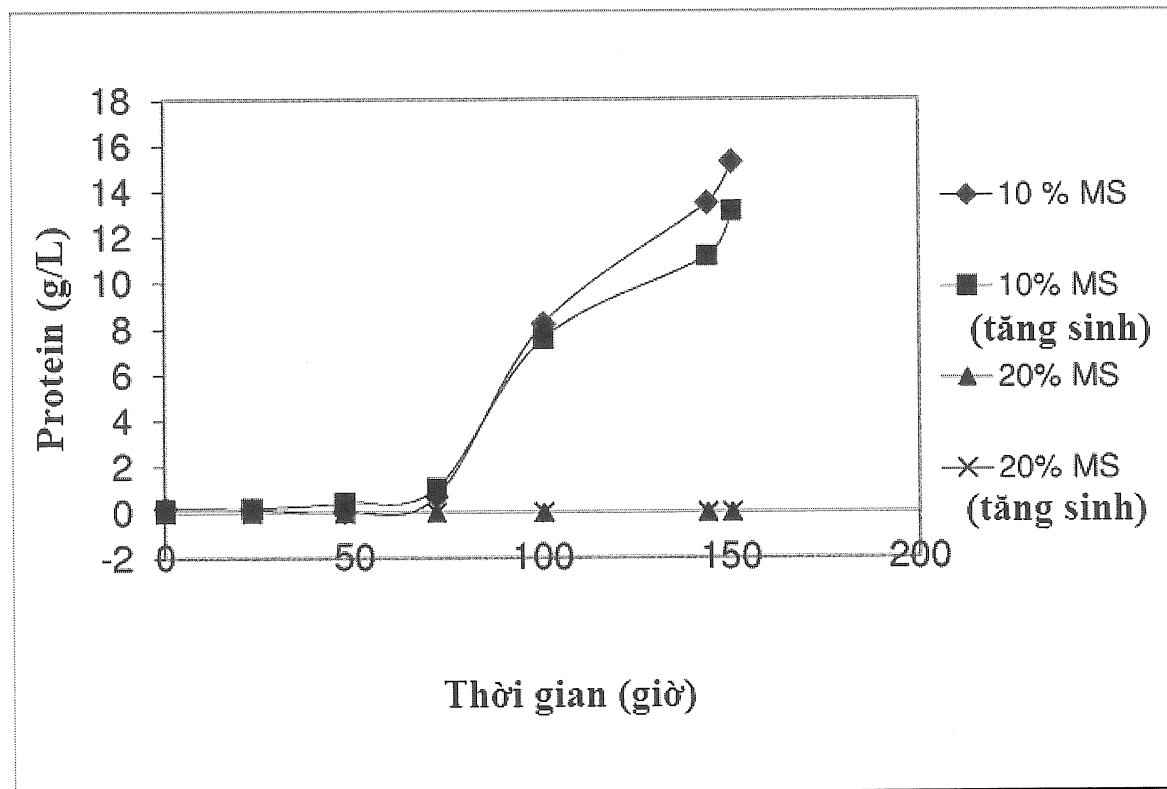


Fig.1

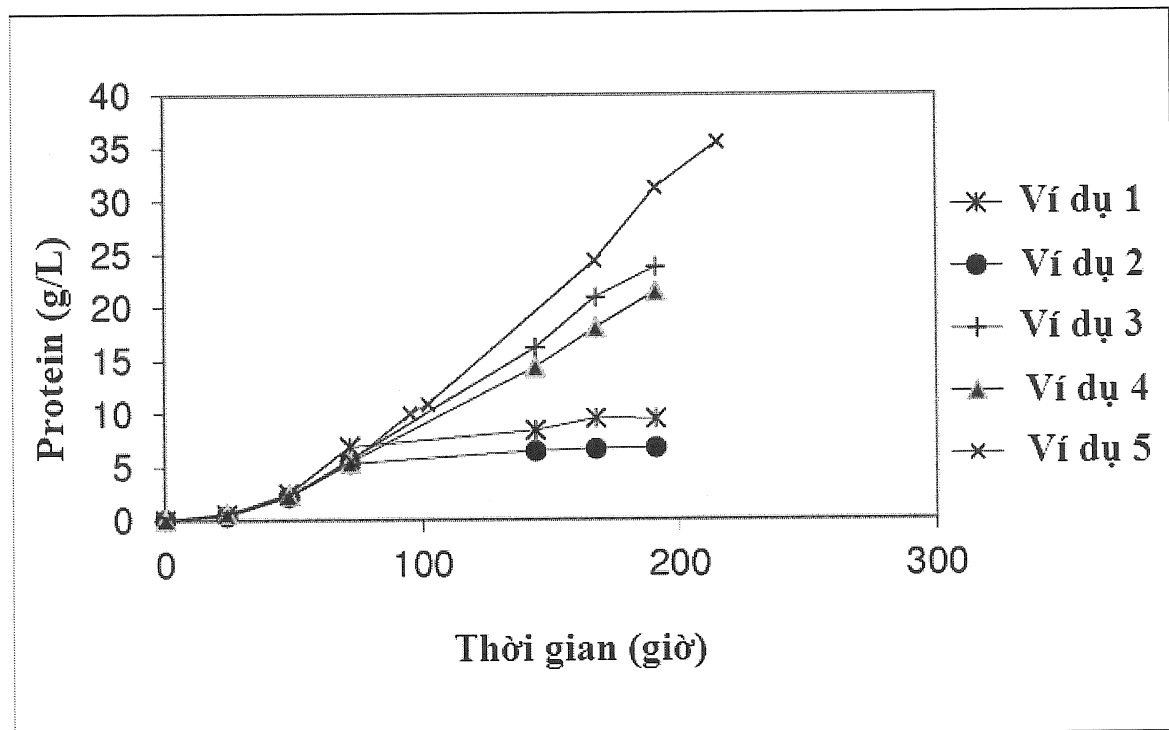


Fig.2

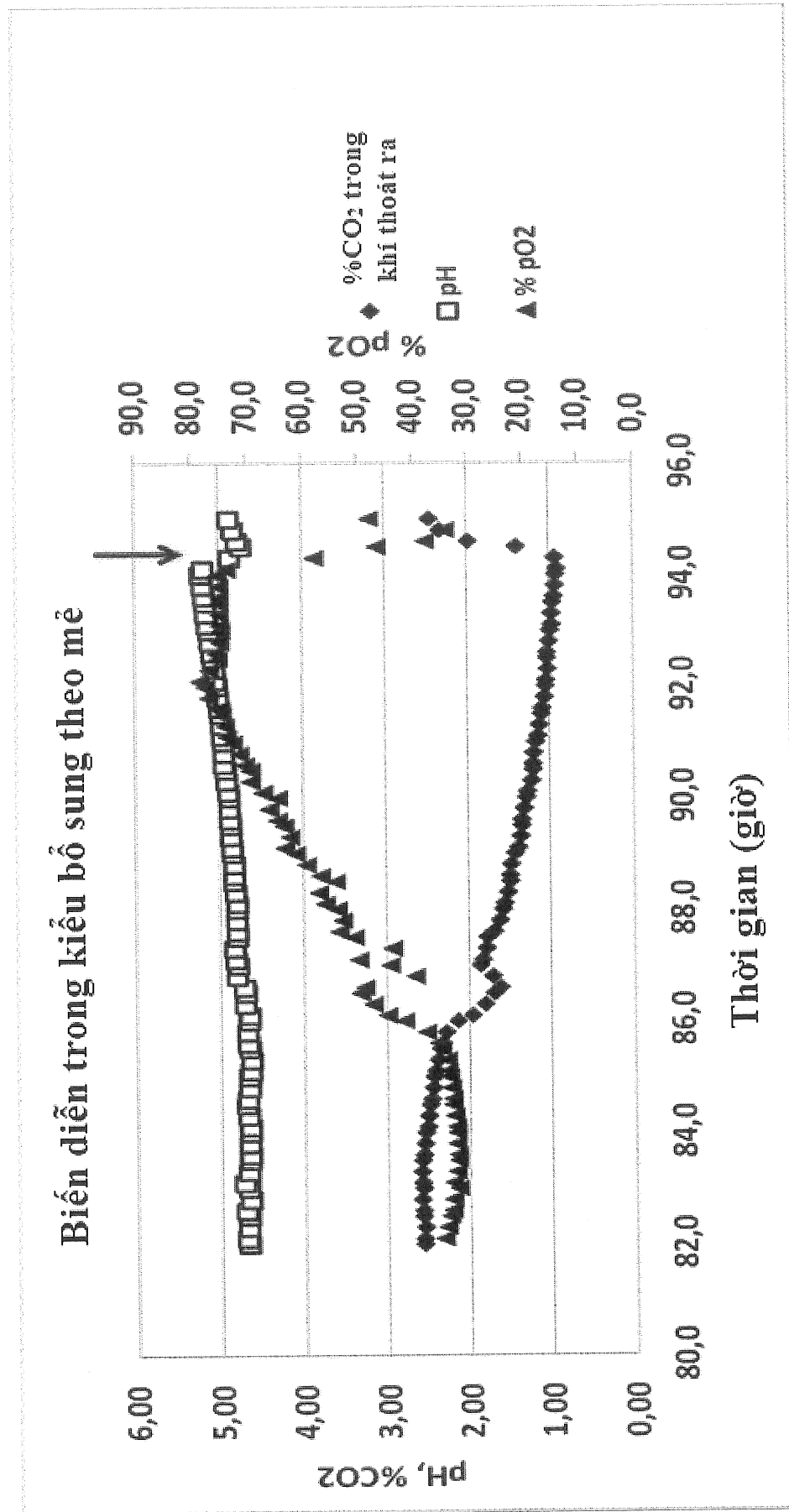


Fig.3