



(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)



1-0037288

(51)⁷ C07K 1/34; C12P 21/00; C12N 9/42; (13) B
C12N 1/02; C12N 1/14

(21) 1-2019-00309

(22) 11/07/2017

(86) PCT/EP2017/067470 11/07/2017

(87) WO2018/015228 25/01/2018

(30) 1657030 22/07/2016 FR

(45) 25/10/2023 427

(43) 27/05/2019 374A

(73) 1. IFP ENERGIES NOUVELLES (FR)

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

2. INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (FR)

147 rue de l'Université 75007 PARIS, France

(72) BEN CHAABANE, Mohamed Fadhel (FR); ROUSSET, Romain (FR).

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

(54) QUY TRÌNH PHÂN LẬP, TỪ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY, NẤM
TRICHODERMA REESEI RA KHỎI ENZYM ĐƯỢC TẠO RA TRONG MÔI
TRƯỜNG NUÔI CẤY BẰNG NẤM TRONG MỘT BƯỚC SẢN XUẤT

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình phân lập, từ môi trường nuôi cấy, dịch cốc-tai enzym và nấm *Trichoderma Reesei*, môi trường nuôi cấy có được từ việc tạo ra enzym bằng nấm, trong quy trình này: môi trường nuôi cấy nêu trên được đưa vào, trong thời gian không lớn hơn 30 giờ từ khi tạm dừng bước sản xuất, vào bước phân lập trên máy lọc ép đặt thẳng hàng với sợi có độ xốp là 3-20 μm , sao cho thu được dịch lọc có mật độ quang hiệu chỉnh OD ở 600nm là nhỏ hơn 2.5; và pha lỏng thu được được đưa vào vi lọc tiếp tuyến trên màng xeramic có ngưỡng cắt là từ 0,5 đến 1,4 μm , sao cho OD hiệu chỉnh ở 600nm không vượt quá 0,1.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình phân lập enzym bằng cách thủy phân xenluloza và bán thủy phân xenluloza chứa trong môi trường nuôi cấy chứa nấm sợi *Trichoderma reesei*.

Cụ thể, sáng chế liên quan đến quy trình tạo ra đường, nhiên liệu sinh học, hoặc phân tử hóa sinh từ sinh khối lignoxeluloza.

Kiểu quy trình này bao gồm bước thủy phân bằng enzym sinh khối được xử lý sơ bộ bằng dịch cóc-tai enym được tạo ra, ví dụ bằng nấm dạng sợi *Trichoderma reesei*. Sáng chế đề cập đến việc phân lập dịch cóc-tai enym này và phân lập nấm dạng sợi *Trichoderma reesei*. Có rất nhiều kỹ thuật phân lập mà được sử dụng riêng rẽ hoặc theo chuỗi.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Về việc phân lập enzym từ nấm, công bố đơn quốc tế số WO-2016/16182 của tác giả đã đề nghị các bước sau đây:

- bước phân lập thứ nhất bằng cách gạn lọc. Trong một số trường hợp, chất kết tụ có thể được thêm vào để làm tăng hiệu quả của bước phân lập,
- bước phân lập thứ hai bằng cách ly tâm để làm giảm hạt kết (còn được gọi là phân hạt kết),
- bước vi lọc (lọc tiếp tuyến) để loại bỏ vết vi sinh vật bất kỳ,

- bước siêu lọc cuối cùng để cô enzym.

Bước gạn lọc và bước ly tâm được sử dụng liên tục trong các quá trình công nghiệp là các quá trình phân lập rắn/lỏng do chức năng về sự khác biệt của chúng về mật độ và bằng cách đưa môi trường vào lực ly tâm.

Thiết bị gạn lọc là máy ly tâm được trang bị vít, bát quay xung quanh trục nằm ngang. Chúng được sử dụng chính để gạn lọc (thiết bị gạn lọc hai pha) hỗn hợp có các hạt hết lớn hoặc có phần chất được tạo hỗn dịch cao (lớn hơn 15% và thường là khoảng 30%, và thậm chí lên tới 60%). Bước gạn lọc có thể làm giảm phần chất này đến khoảng 5%. Hạt kết được xác định bằng cách ly tâm mẫu ở tốc độ 4000 G ($\times 10\text{m/s}^2$) trong 5 phút. Nó tương ứng với phần trăm thể tích chiếm giữ của chất rắn tương ứng với tổng thể tích của mẫu.

Bước ly tâm được sử dụng cùng với dung dịch mà có hạt kết nhỏ hơn 15% và có thể làm giảm phần hạt kết này đến trị số nhỏ hơn 2%, hoặc thậm chí nhỏ hơn 1%. Bước ly tâm này có thể gạn lọc phần chất lỏng lơ lửng tạo thành từ bước gạn lọc.

Nó có thể được sử dụng trong nhiều lĩnh vực: xử lý nước, chế biến thực phẩm, công nghệ sinh học, công nghiệp dược phẩm, v.v..

Quy trình phân lập bằng cách lọc tiếp tuyến hoặc siêu lọc được thực hiện theo kích cỡ của các thành phần sẽ được phân lập. Chúng sử dụng màng.

Do đó, trong trường hợp vi lọc, các hạt có kích cỡ nằm trong khoảng từ 0,1 μm đến 10 μm . Quá trình này được sử dụng để phân lập, ví dụ, các vi sinh vật như nấm dạng sợi. Vì lý do kinh tế, thường là màng hữu cơ sẽ được sử dụng.

Siêu lọc được sử dụng để phân lập các đối tượng có đường kính nằm trong khoảng từ 1 đến 100nm. Các màng này cho phép các phân tử nhỏ (nước, muối) đi qua và chặn các phân tử có khối lượng phân tử lớn (polyme, protein, v.v..). Chúng sẽ được sử dụng để cô, ví dụ, protein hoặc enzym.

Các yếu tố mà có thể ảnh hưởng lên mức độ thực hiện phân lập chủ yếu là kích cỡ của các phân tử, hình dạng của phân tử, điện tích của chúng, tính chất của màng và các điều kiện thực hiện.

Màng được đặc trưng bởi tính chất hóa lý của nó. Nói chung, có 3 nhóm màng chính được phân loại như sau:

- màng hữu cơ (tự nhiên hoặc tổng hợp),
- màng khoáng chất (vô cơ hoặc xeramic),
- màng composit.

Màng hữu cơ được tạo ra từ xenluloza polyme (ví dụ xenluloza axetat). Chúng có giá thành sản xuất thấp, nhưng không thể được sử dụng để phân lập mà có thể thủy phân chúng.

Màng hữu cơ dựa trên cơ sở polyme tổng hợp, như nylon và polysulfon, có nhiều lợi ích so với các loại màng trước đó và chúng được sử dụng rộng rãi để phân lập enzym (protein).

Màng khoáng có khả năng chống chịu hóa học, độ bền cơ học và khả năng chịu nhiệt rất tốt, nhưng chúng đắt hơn rất nhiều so với màng hữu cơ (đắt hơn khoảng 10 lần). Chúng được sử dụng trong công nghệ sinh học trong các quy trình khác nhau, như gạn lọc dịch hoa quả, loại bỏ vi khuẩn trong sữa hoặc gạn lọc đồ uống có cồn (rượu, bia, rượu táo). Chúng còn có nhiều ứng dụng trong việc xử lý nước.

Cuối cùng, màng composit được cấu thành từ phần polyme có trong phần khác, mà ở dạng vi xốp. Loại màng này được phát triển chủ yếu để thẩm thấu ngược.

Có rất nhiều thông tin trong lĩnh vực kỹ thuật này về lĩnh vực này.

Patent Mỹ số US 3 398 055 đề cập đến việc phân lập và tinh chế xenlulaza được tạo ra bằng *Trichoderma reesei*. Nấm được phân lập bằng máy lọc kiểu quay trong chân không. Enzym được phân lập bằng cách sử dụng cotton và được rửa giải bằng dung dịch bazơ.

Đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US-2014/0295525 đề xuất quy trình phân lập 2 bước enzym của nấm *Trichoderma*. Quy trình này mô tả bước cô enzym bằng hai bước siêu lọc, enzym đã trải qua bước phân lập rắn/lỏng trước đó. Trong bước phân lập thứ nhất bằng cách siêu lọc, màng có giá trị MWCO nằm trong khoảng từ 100.000 (Da) đến 200.000 (Da), tức là khoảng ngưỡng cắt là từ 0,01 μ m đến 0,02 μ m. Chất lưu giữ đi vào bước siêu lọc thứ hai trên màng có giá trị MWCO nằm trong khoảng từ 5.000 đến 50.000, và 2 dịch lỏng chứa enzym được trộn lại với nhau.

Đơn này chỉ ra rằng, phương pháp này có thể giải quyết được vấn đề về tắc màng và vấn đề về sự kết tụ xenlulaza trong suốt bước siêu lọc đơn, thậm chí cả khi nó được bước sản xuất bằng cách phân lập các hạt rắn trong máy lọc xeramic hoặc vật liệu không dệt.

Trong đơn yêu cầu cấp patent này, việc duy trì enzym trong chất lưu giữ được ghi lại, bất chấp kích cỡ của enzym này là nằm trong khoảng từ 10 kDa đến 100 Da. Do đó, đơn yêu cầu cấp patent này chủ yếu mô tả việc tối ưu hóa bước cô enzym.

Trong phần mô tả việc cô dịch cốc-tai enzym từ nấm *Trichoderma reesei*, bất ngờ là có thể thấy rằng, sự tồn tại của hiện tượng còn lại enzym cùng với màng hữu cơ mà có kích cỡ là 0,8 μ m, và do đó chúng có lỗ lớn hơn từ 40 đến 80 lần so với các lỗ được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US-2014/0295525. Điều này thực sự làm bất lợi đến hiệu suất phân lập enzym.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất quy trình phân lập bao gồm các bước:

- bước phân lập nấm *Trichoderma reesei* trên máy lọc ép, bước này buộc phải thực hiện thuận lợi trong 30 hoặc 24 giờ sau khi tạo thành sản phẩm,
- tiếp theo là bước vi lọc trên màng khoáng,
- tùy ý tiếp theo bằng bước cô trên màng khoáng hoặc màng hữu cơ.

Cần lưu ý rằng, chuỗi phân lập trên máy lọc ép rồi tiếp theo bằng bước vi lọc trên màng khoáng, và tùy ý bằng cách siêu lọc trên màng khoáng, có thể thu được kết quả là đặc biệt tốt liên quan đến hiệu suất và độ hiệu quả.

Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất quy trình phân lập, từ môi trường nuôi cấy, dịch cốc-tai enzym và nấm *Trichoderma reesei*, môi trường nuôi cấy có được từ việc tạo thành enzym bằng nấm, trong quy trình này

- môi trường nuôi cấy nêu trên được đưa vào, trong thời gian nhỏ hơn hoặc bằng 30 giờ, tốt hơn là nhỏ hơn hoặc bằng 24 giờ, từ khi tạm dừng bước sản xuất, đến bước phân lập trên máy lọc ép đặt thẳng hàng với sợi có độ xốp là 3-20 μ m, sao cho thu được dịch lọc có mật độ quang hiệu chỉnh OD (*optical density*) ở 600nm là nhỏ hơn 2,5; và
- pha lỏng thu được được đưa vào vi lọc tiếp tuyến trên màng xeramic có ngưỡng cắt nằm trong khoảng từ 0,5 đến 1,4 μ m, sao cho OD hiệu chỉnh ở 600nm không vượt quá 0,1.

Có lợi là, môi trường nuôi cấy nêu trên được đưa vào bước phân lập trên máy lọc ép mà không cần làm lạnh trước đó. Tốt hơn là, môi trường nuôi cấy không được đưa vào gạn lọc và/hoặc ly tâm trước khi được phân lập trên máy lọc ép.

Bước phân lập trên máy lọc ép và vi lọc được thực hiện ở khoảng nhiệt độ 20-30°C, tốt hơn là khoảng 22-27°C.

Có lợi là, dịch lọc được tái sử dụng cho việc nạp môi trường nuôi cấy vào máy lọc ép ở tỷ lệ tối đa 10% theo trọng lượng.

Tại thời điểm cuối của bước phân lập trên máy lọc ép (tức là sau khi nén), thường thu được 5-10% theo trọng lượng của bánh lọc (hàm lượng rắn của bánh lọc ít nhất là 20% theo trọng lượng, thường nằm trong khoảng từ 20% đến 65% hoặc 20 đến 45%, thường gặp là khoảng 25-35%) và 90-95% theo trọng lượng của dịch lọc. Hạt kết (phần trăm theo thể tích chiếm giữ của chất rắn tương ứng với tổng thể tích của mẫu, được xác định bằng cách ly tâm mẫu ở 4000 G (m/s²) trong 5 phút) của phần dịch lọc có được từ máy lọc ép là nhỏ hơn 1,5%.

Có lợi là, bước vi lọc dịch lọc thu được tại thời điểm cuối của máy lọc ép được thực hiện trong thời gian tối đa 30 giờ, và tốt hơn là tối đa 24 giờ.

Tốt hơn là, dịch lọc có được từ máy lọc ép này được đưa vào vi lọc mà không cần làm lạnh trước đó.

Tốt hơn là, bước vi lọc tiếp tuyến được thực hiện trên màng xeramic có ngưỡng cắt nằm trong khoảng từ 0,8 đến 1,4 μ m.

Tốt hơn là, pha lỏng thu được sau bước vi lọc được đưa vào siêu lọc, tốt hơn là trên màng xeramic, và thậm chí tốt hơn nữa là trên màng xeramic có ngưỡng cắt nằm trong khoảng từ 5 đến 15 kDa.

Tốt hơn là, pha lỏng thu được sau bước vi lọc được đưa vào bước siêu lọc trong thời gian tối đa 48 giờ, tốt hơn là tối đa 24 giờ.

Theo một phương án ưu tiên, dịch cóc-tai enzym sau khi đã phân lập được cho tiếp xúc với sinh khối lignoxenululoza đã được xử lý sơ bộ, tốt hơn là bằng cách nổi hơi, để thực hiện bước thủy phân enzym và để thu được dịch đường, dịch đường này được đưa vào bước lên men etanol, thủy phân enzym và bước lên men được thực hiện riêng biệt hoặc đồng thời, và etanol được tạo ra được phân tách bằng cách cất.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 và 2 là kết quả của thử nghiệm trong phòng thí nghiệm được thực hiện bằng màng hữu cơ có lỗ xốp nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,8 μ m: màng MFG1: ngưỡng cắt là 0,1 μ m (polysulfon), MFG2: 0,2 μ m (polysulfon), MFG8: 0,8 μ m (polysulfon), MFP5: 0,5 μ m (flo).

Fig. 3 là sự thay đổi về lượng đã được lọc theo hàm thời gian và hình vẽ đối với sự thay đổi về lượng đã được lọc theo hàm về áp suất nạp vào.

Fig. 5 là sự thay đổi về nồng độ protein trong dịch còn lại và dịch thấm. Thấy rằng, độ thấm của hai màng tương ứng với protein là rất tốt. Độ thấm của màng ở 1,4 μ m là tốt hơn và lớn hơn 0,9. Giá trị này là 0,2-0,4 với màng hữu cơ thậm chí có độ xốp là 0,8 μ m.

Mô tả chi tiết sáng chế

Bước thực hiện

Dịch cốc-tai enzym được tạo ra bằng *Trichoderma reesei* theo cách thức thông thường bằng cách lên men hiếu khí.

Quy trình tạo ra dịch cốc-tai enzym bắt đầu bằng pha nhân giống, thường được thực hiện trong bình phản ứng nhỏ có kích cỡ gia tăng, nhằm mục đích làm sinh sôi nấm dạng sợi và nhằm làm giới hạn khoảng pha trễ và các nguy cơ nhiễm bẩn.

Khi quy trình này được điều chỉnh cho phù hợp (nồng độ nấm lớn hơn 10 g/l, tốt hơn là lớn hơn 15 g/l), môi trường nuôi cấy được chuyển vào bình phản ứng cuối cùng có thể tích lớn.

Quy trình tạo ra enzym bao gồm hai pha:

- pha a) là tăng trưởng vi sinh vật đã nêu trên với sự có mặt của ít nhất một cơ chất sinh trưởng trên cơ sở cacbon trong bình phản ứng kín khí, pha tăng trưởng này được thực hiện với nồng độ cơ chất sinh trưởng trên cơ sở cacbon nằm trong khoảng từ 10 đến 90 g/l;

- pha b) của quá trình tạo ra dịch cóc-tai enzym, trong đó ít nhất một cơ chất cảm ứng trên cơ sở cacbon được đưa vào, cơ chất cảm ứng trên cơ sở cacbon này được chọn từ nhóm được tạo thành bằng lactoza, xenlobioza, sophoroza, phần còn lại thu được sau khi lên men trong etanol đường monome của dịch thủy phân enzym sinh khối trên cơ sở xenluloza, và/hoặc dịch chiết thô của pentoza tan trong nước có nguồn gốc từ bước xử lý sơ bộ sinh khối trên cơ sở xenluloza, pha tạo thành này được thực hiện với nồng độ cơ chất hình thành trên cơ sở cacbon nằm trong khoảng từ 150 đến 400 g/l.

Các vi sinh vật được sử dụng trong quy trình tạo ra dịch cóc-tai enzym theo sáng chế là các chủng nấm thuộc loài *Trichoderma reesei*.

Chủng công nghiệp hữu hiệu nhất là chủng thuộc về loài *Trichoderma reesei*, loài này được cải biến để làm cải thiện dịch cóc-tai enzym bằng phương pháp quy trình chọn lọc đột biến, ví dụ chủng IFP CL847 (Patent Pháp số FR-B-2 555 803). Các chủng được cải thiện bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen cũng có thể được sử dụng. Các chủng này được nuôi cấy trong bình phản ứng hiếu khí và được khuấy trong các điều kiện tương hợp với sự tăng trưởng và tạo thành enzym.

Cơ chất sinh trưởng trên cơ sở cacbon này đối với vi sinh vật đã nêu mà được sử dụng trong pha tăng trưởng a) của quy trình theo sáng chế này được chọn thuận lợi từ đường hòa tan loại công nghiệp, và tốt hơn là từ glucoza, lactoza, xyloza, phần cặn lỏng thu được sau khi lên men trong etanol đường monome của dịch thủy phân enzym của các chất lignoxenuloza, và dịch chiết của phân đoạn trên cơ sở hemixenuloza dưới dạng monome có nguồn gốc từ cơ chất linnoxenuloza đã được xử lý sơ bộ, được sử dụng riêng trong hỗn hợp.

Tùy thuộc vào tính chất của mình, cơ chất sinh trưởng trên cơ sở cacbon này được đưa vào bình phản ứng kín trước khi thanh trùng hoặc được thanh trùng riêng và được đưa vào bình phản ứng kín sau khi thanh trùng.

Cơ chất sinh trưởng trên cơ sở cacbon này được sử dụng trong pha tăng trưởng a) nói trên ở nồng độ ban đầu thường nằm trong khoảng từ 20 đến 90g cơ chất trên cơ sở cacbon trên mỗi lít thể tích dung dịch phản ứng.

Tốt hơn là, pha tăng trưởng a) này được thực hiện trong thời gian nằm trong khoảng từ 30 và 70 giờ, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 30 đến 40 giờ.

Tốt hơn là, pha tăng trưởng a) này được thực hiện ở độ pH là 4,8 và ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20 đến 30°C, thường là từ 22 đến 27°C, tốt hơn là khoảng 27°C.

Cơ chất cấu thành trên cơ sở cacbon này được sử dụng trong pha tạo thành b) này được nạp vào thuận lợi theo cách nuôi cấy pha mẻ-bổ sung với dòng chảy giới hạn nằm trong khoảng từ 30 đến 80 mg trên mỗi gam tế bào và trong mỗi giờ. Nhiệt độ thường là giống như trong bước a).

Tại thời điểm cuối của bước tạo thành enzym, thường thu được môi trường chứa các nồng độ rắn nằm trong khoảng từ 10 đến 45 g/l (tương ứng với nấm khô). Hạt kết được xác định sau khi ly tâm (4000 G, 5 phút) là lớn hơn 15% và thường gấp là khoảng 30%, và thậm chí lên tới 60%. Nó tương ứng với phần trăm theo thể tích chiếm giữ của chất rắn tương ứng với tổng thể tích của mẫu.

Quan sát thấy rằng, nấm còn lại một phần lỏng đáng kể.

Mục đích của sáng chế là để phân lập enzym từ nấm và tiếp theo tùy ý cô chúng.

Bước phân lập rắn/lỏng trong đó nấm được phân tách từ dịch lỏng

Dịch lỏng chứa enzym và muối còn lại.

Thử nghiệm được thực hiện bởi Tác giả sáng chế đã cho thấy rằng, việc phân lập trên máy lọc ép tiếp theo là bước vi lọc (*MicroFiltration*: MF) trên màng xeramic sẽ cho kết quả tốt hơn các giải pháp đã biết, liên quan đến hiệu suất hoặc độ hiệu quả.

Hơn nữa, các thử nghiệm thường cho thấy rằng, để cô enzym, bước siêu lọc (*UltraFiltration*: UF) trên màng xeramic là hiệu quả hơn nhiều so với trên màng hữu cơ.

Theo sáng chế, môi trường nuôi cấy được đưa vào vào bước phân lập trên máy lọc ép này có thể làm tối đa hóa mức thu hồi enzym.

Rất có lợi là nó được thực hiện trước khi tự động phân tích sự phát triển của nấm. Điều này là do bước tự động phân tích này có thể làm bất lợi rất nhiều đến độ hiệu quả của bước phân lập bằng cách lọc ép. Trong trường hợp *Trichoderma reesei*, khoảng thời gian là nhỏ hơn hoặc bằng 30 giờ, và tốt hơn là nhỏ hơn hoặc bằng 28 giờ, và thậm chí tốt hơn nữa là nhỏ hơn hoặc bằng 24 giờ.

Tại thời điểm cuối của bước phân lập trên máy lọc ép này, thu được bánh lọc chứa nấm và dịch lỏng chứa enzym.

Dịch lỏng thu được được đưa vào vi lọc tiếp tuyến trên màng xeramic và tiếp theo tùy ý siêu lọc, tốt hơn là bằng cách lọc tiếp tuyến.

Điều này có thể là do bước vi lọc trên màng hữu cơ tạo ra mức giữ lại enzym đáng kể, điều này là bất lợi cho hiệu suất của bước phân lập. Hiện tượng này là bất ngờ do các lỗ lớn hơn đến 100 lần so với kích cỡ của enzym lớn nhất được tạo ra. Không thể giải thích được hiện tượng này.

Mặt khác, còn lưu ý rằng hiện tượng này sẽ bị giới hạn khi màng khoáng được sử dụng. Do đó, hiệu suất thu hồi enzym là ở mức cao.

Bước phân lập bằng cách lọc ép, vi lọc và siêu lọc sẽ được giải thích chi tiết dưới đây.

Phân lập trên máy lọc ép:

Ngay khi bước tạo thành đến giai đoạn cuối, việc thông khí và điều hòa độ pH được chấm dứt. Chất bảo quản được thêm vào một cách thuận lợi, ví dụ natri benzoat.

Bước tạo thành này sẽ ngừng lại khi tất cả đường của pha mẻ-bổ sung được dùng hết hoặc khi tốc độ tiêu thụ cơ bản (là tỷ lệ với tốc độ tạo thành protein) được giảm xuống (tốc độ nhỏ hơn 30% hoặc lớn hơn).

Bước phân lập trên máy lọc ép được thực hiện trong khoảng thời gian trước khi tự động phân tích.

Cần lưu ý rằng, quan trọng là duy trì nhiệt độ dưới 40°C và tốt hơn là dưới 30°C. Ở trên nhiệt độ này, bước phân lập sẽ kém hiệu quả hơn nhiều.

Không có bước làm mát trước khi phân lập trên máy lọc ép. Điều này có nghĩa là, bước làm mát là không được phát hiện thấy; có thể là do sự giảm chậm về nhiệt độ trong quá trình chuyển giao giữa các đơn vị trong khi bước thực hiện xảy ra và các đơn vị lọc ép; mức giảm này có thể 3°C hoặc nhỏ hơn. Do đó, bước phân lập thường được thực hiện ở nhiệt độ gần như là giống với nhiệt độ của pha giảm của bước a), tức là nhiệt độ nằm trong khoảng từ 17 đến 30°C hoặc trong khoảng 20-30°C, thường là khoảng 22-27°C, và thường nhất là 25°C. Đây thường là nhiệt độ trong phòng.

Máy lọc ép được đặt thẳng hàng với sợi, và thường không có đĩa màng. Độ xốp của sợi là nằm trong khoảng từ 3 đến 20µm, tốt hơn là trong khoảng từ 3 đến 7µm và tốt hơn là 5µm. Thường thu được từ 5% đến 10% theo trọng lượng của bánh lọc và từ 90% đến 95% theo trọng lượng của dịch lọc.

Bước phân lập trên máy lọc ép có thể được thực hiện trong 1 hoặc 2 bước.

Bước phân lập trên máy lọc ép thường được thực hiện trong 2 bước: bước lọc thứ nhất ở áp suất P1 và bước nén thứ hai ở áp suất P2 cao hơn P1. Thông thường, áp suất P1 là nằm trong khoảng 1,2 đến 6 bar và P2 là nằm trong khoảng 5 đến 10 bar.

Khi bước phân lập được thực hiện trong bước đơn, không có bước nén, thì bước này chỉ được thực hiện ở áp suất P1.

Độ khô của bánh lọc tùy thuộc vào áp suất được sử dụng.

Mục đích là để thu hồi lượng dịch lọc tối đa mà càng trong càng tốt.

Để thực hiện được điều này, được khuyến là nên tái sử dụng các phân đoạn của dịch lọc đầu tiên (thường là vẫn đục nhất) vào thùng nạp liệu. Bước tái sử dụng này buộc không được vượt quá 10% thể tích dịch lọc. Trong trường hợp phân lập tốt và trường hợp bánh lọc có thể thấm được, nên thêm nước vào bánh lọc để rửa nó và để thu hồi lượng protein tối đa.

Theo cách khác, mà có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc liên tiếp để sử dụng bước tái sử dụng như được nêu ở trên, là cho phép nắm trong bánh lọc được phân giải, sau bước làm lạnh. Tiếp theo, nắm này giải phóng ra enzym, enzym này sẽ được thu hồi sau đó. Quy trình này được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO-2016/016182.

Bước phân lập được thực hiện sao cho thu được dịch lỏng (hoặc huyền phù) có mật độ quang (OD: *optical density*) đã được hiệu chỉnh ở 600nm là nhỏ hơn 2,5 (giá trị trung bình đã được hiệu chỉnh trừ đi hệ số hấp thụ của dịch lọc tương ứng 0,22 μ m). Phép đo này được thực hiện trên mẫu bằng phép đo phổ thông thường trong phòng thí nghiệm.

Hạt kết (4000 g/5 phút) thường nhỏ hơn 1,5%.

Vì lọc với màng khoáng

Bước này có thể loại bỏ tất cả nấm từ dịch lọc. Nó được thực hiện theo cách mà giá trị OD hiệu chỉnh ở 600nm không vượt quá 0,1 (trừ đi hệ số hấp thụ của dịch lọc tương ứng 0,22 μ m).

Tốt hơn là, và theo cách tương tự với bước phân lập bằng cách lọc ép, dịch lọc được đưa vào vi lọc trong thời gian tối đa 30 giờ hoặc tối đa 28 giờ hoặc tốt hơn là tối đa 24 giờ. Thông thường, bước vi lọc có thể được thực hiện trực tuyến với máy lọc ép.

Liên quan đến nhiệt độ, tốt hơn là nó không bị giảm (không làm lạnh). Điều này có thể đảm bảo cho tốc độ chảy của sản phẩm ở mức độ hài lòng. Do đó, nhiệt độ thường nằm trong khoảng từ 17 đến 30°C hoặc khoảng 20-30°C và thường là khoảng 22-27°C, và thường nhất là 25°C. Nhiệt độ này thường là nhiệt độ trong phòng.

Màng được sử dụng có ngưỡng cắt nằm trong khoảng từ 0,5 đến 1,4 μ m, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,6 đến 1,4 μ m và tốt hơn là trong khoảng từ 0,8 đến 1,4 μ m.

Hiệu suất enzym có thể được tối đa hóa bằng cách lọc (thêm nước vào chất còn lại, rồi tiếp đó cho qua vi lọc).

Siêu lọc bằng màng khoáng hoặc màng hữu cơ

Bước này có thể làm cô enzym được tạo ra bằng nấm, cụ thể là bằng *Trichoderma reesei*. Dịch cốc-tai enzym là hỗn hợp phức tạp gồm nhiều enzym, cỡ của các loại enzym này nằm trong khoảng từ 1×10^4 g/mol (10 kDa) đến 10×10^4 g/mol (100 kDa).

Bước siêu lọc này được thực hiện ở nhiệt độ thường nằm trong khoảng từ 20 đến 30°C, và thường là khoảng 22-27°C, và thường nữa là khoảng 25°C. Thuận lợi để thực hiện bước này gần nhất có thể (về thời gian) với bước vi lọc. Thời gian tối đa 48 giờ là được đề xuất, và giai đoạn này tốt hơn là nhỏ hơn hoặc bằng 24 giờ.

Bước này có thể làm cô protein đang được quan tâm đến 150 g/l +/- 10 g/l. Giá trị của hệ số nồng độ thể tích (*volumetric concentration factor*: VCF) thu được tùy thuộc vào nồng độ protein ban đầu.

Một liều chất bảo quản bổ sung có thể được thêm vào dịch còn lại tại thời điểm cuối của bước này. Việc thêm natri benzoat nằm trong khoảng từ 0,1% đến 0,35% là ví dụ được gợi ý.

Được ưu tiên là sử dụng màng khoáng cho bước siêu lọc. Màng xeramic dạng ống có ngưỡng cắt nằm trong khoảng từ 5 đến 15 kDa và tốt hơn là trong khoảng 8-12, thường là khoảng 10 kDa, là 1 ví dụ được sử dụng.

Trong một số trường hợp, màng hữu cơ có thể được sử dụng, nhưng với sự quan tâm và chỉ trong các điều kiện được gợi ý từ nhà cung cấp.

Đặc biệt có lợi là, quy trình theo sáng chế được sử dụng để phân lập enzym trong quy trình chế biến, từ sinh khối lignoxeluloza, dịch đường, nhiên liệu sinh học (như etanol) hoặc phân tử hóa sinh.

Các quy trình này bao gồm bước xử lý sơ bộ sinh khối lignoxeluloza (ví dụ nổ hơi); sinh khối đã được xử lý sơ bộ được đưa vào thủy phân enzym với sự có mặt của enzym (tiết ra từ *Trichoderma reesei*), dịch thủy phân mang dịch đường được đưa vào lên men (ví dụ lên men rượu) và sản phẩm mong muốn (ví dụ rượu) được phân lập (ví dụ bằng cách cất).

Quy trình trong đó sáng chế áp dụng cụ thể bao gồm xử lý sơ bộ sinh khối lignoxeluloza bằng cách nổ hơi; sinh khối đã được xử lý sơ bộ được đưa vào thủy phân enzym với sự có mặt của enzym được tiết ra, ví dụ bằng *Trichoderma reesei* mà từ đó chúng được phân lập theo quy trình của sáng chế, dịch thủy phân mang dịch đường được đưa vào lên men rượu và etanol được phân tách bằng cách cất.

Bước thủy phân enzym và bước lên men có thể được thực hiện riêng biệt hoặc đồng thời.

Cần lưu ý rằng, bước siêu lọc chứng minh là không cần thời gian trong trường hợp thực vật mà tạo ra etanol cùng lúc với việc tạo ra enzym tại chỗ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1 chứng minh độ thấm kém của enzym thu được bằng cách vi lọc bằng màng hữu cơ. Vấn đề này được giải quyết trong Ví dụ 2 bằng cách sử dụng màng khoáng. Ví dụ 3 so sánh 2 loạt thử nghiệm được thực hiện bằng quy trình phân lập thông thường hoặc bằng quy trình được mô tả trong sáng chế này. Ví dụ 4 là sự cân bằng hoàn chỉnh cho việc phân lập trên thể tích lớn.

Ví dụ 1: thử nghiệm vi lọc trên màng hữu cơ (Ví dụ so sánh)

Môi trường nuôi cấy được xử lý thu được từ pha hình thành có thành phần sau đây:

- 40 g/l protein
- 20 g/l sinh khối (nấm *T. reesei*).

Sau khi trải qua phân lập bằng cách lọc ép, dịch lọc được đưa vào thử nghiệm trên các loại màng vi lọc khác nhau.

Fig. 1 và 2 là kết quả của thử nghiệm trong phòng thí nghiệm được thực hiện bằng màng hữu cơ có lỗ xốp nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,8 μ m: màng MFG1: ngưỡng cắt là 0,1 μ m (polysulfon), MFG2: 0,2 μ m (polysulfon), MFG8: 0,8 μ m (polysulfon), MFP5: 0,5 μ m (flo).

VCF là hệ số nồng độ theo thể tích (*volumetric concentration factor*).

Độ thấm thấp của màng này với enzym được ghi lại.

Độ thấm được xác định là tỷ lệ giữa nồng độ của enzym trong dịch thấm (dịch này đi qua màng) và nồng độ trong chất còn lại (chất mà còn lại).

Ví dụ 2: thử nghiệm vi lọc trên màng xeramic

Dịch lọc tương tự được sử dụng cùng với 4 màng có ngưỡng cắt là 0,14, 0,45, 0,8 và 1,4 μ m.

Phương pháp được sử dụng là để thử nghiệm 4 ngưỡng cắt trong thử nghiệm song song đối với mỗi phương pháp lọc. Công cụ được sử dụng là đơn vị lọc thí điểm mà có khả năng nhận được 4 màng khác nhau trong các trường hợp giống nhau. Có một dịch thấm bên ngoài mỗi màng và vòng duy trì đơn. Do đó, có thể nghiên cứu, trong thử nghiệm song song, những biến đổi về tốc độ chảy của dịch thấm đối với 4 màng và tạo ra mẫu.

Phép đo về nồng độ enzym cho thấy sự khác biệt.

Dịch lọc thu được từ máy lọc ép có nồng độ enzym là 38,2 g/l. Dịch còn lại cuối cùng được xác định định lượng là 44,3 g/l.

Do đó, có được nồng độ thấp của dịch còn lại, điều này gợi ý sự còn lại của một hoặc nhiều màng. Nồng độ enzym của 4 dịch thấm là như sau:

Ngưỡng cắt (μ m)	0,14	0,45	0,8	1,4
Nồng độ enzym trong dịch thấm (g/l)	17,1	17,0	33,9	38,1

Khi so sánh với dịch còn lại ban đầu, thấy rằng nồng độ thu được bằng cách lọc ở 0,8 và 1,4 μ m là gần với nồng độ của dung dịch ban đầu. Mặt khác, còn lại enzym rõ rệt trong ống ở 0,14 và 0,45 μ m. Nồng độ protein thu được bằng màng khoáng có ngưỡng cắt 0,8 μ m là cao hơn khoảng 4,3 so với nồng độ protein thu được bằng màng hữu cơ ngưỡng cắt tương tự (Ví dụ 2).

Ví dụ 3:

Ví dụ 3 có thể so sánh 2 seri được thực hiện bằng quy trình thông thường hoặc quy trình theo sáng chế.

Môi trường nuôi cấy được xử lý có được từ pha hình thành có thành phần sau đây:

- 39 g/l protein
- 16,5 g/l sinh khối (nấm *T. reesei*).

Ví dụ 3a:

Seri thông thường của bình thốt cổ, của máy li tâm và MF (vi lọc) trên màng hữu cơ và UF (siêu lọc) trên màng hữu cơ.

Thu được các mức độ biểu hiện sau đây:

- gạn lọc: giảm hạt kết từ 30% đến 5%, nhưng tổn hao protein đáng kể. Hiệu suất 70%.
- Ly tâm: giảm hạt kết từ 5% to 1,5% mà không tổn hao đáng kể. Hiệu suất 95%.
- MF hữu cơ ở 0,8µm: giảm hạt kết từ 1,5% to ~0%. Độ thấm thấp là 0,3. Hiệu suất 50%.
- UF hữu cơ 10 kDa: nồng độ enzym ở 200 g/l. Hiệu suất 80%.

Tổng hiệu suất của loạt thử nghiệm này là 27%. Có thể tiến đến gần 50% hiệu suất bằng cách tái sử dụng hạt kết từ bước gạn lọc và bước ly tâm và dịch còn lại từ bước MF và đưa chúng vào chu trình phân lập tiếp (ly tâm, MF, UF).

Ví dụ 3b theo sáng chế

Tiếp theo, loạt phân lập trên máy lọc ép khi MF trên màng xeramic và UF trên màng xeramic.

Thu được các mức độ biểu hiện sau đây:

- Phân lập trên máy lọc ép: giảm hạt kết từ 30% đến 1,5% mà không tổn hao đáng kể. Hiệu suất 95%
- MF xeramic (1,4 μ m): giảm hạt kết từ 1,5% đến ~0%. Độ thấm cao là 0,9. Hiệu suất 90%.
- UF xeramic 10 kDa: nồng độ enzym ở 200 g/l. Hiệu suất 90%.

Tổng hiệu suất mà không cần thực hiện thêm chu trình tái sử dụng bất kỳ của loạt thử nghiệm này là 77%.

Với các kết quả thu được, cần lưu ý rằng bước UF là không cần thiết trong trường hợp thực vật mà tạo ra etanol với sự tạo thành enzym tại chỗ. Do đó, hiệu suất là 86%.

Ngoài ra, việc lọc MF trên màng xeramic là hiệu quả hơn nhiều so với trên màng hữu cơ. Hơn nữa, hiệu suất trên màng xeramic, thậm chí bằng cách MF hoặc UF, là cao hơn nhiều hiệu suất khi sử dụng màng hữu cơ.

Ví dụ 4: Thử nghiệm ở quy mô phòng thí nghiệm theo sáng chế

Thử nghiệm này sử dụng môi trường nuôi cấy được tạo ra trong bình phản ứng 6m³. Các đặc trưng là như sau:

- Khối lượng của môi trường nuôi cấy: 4260 kg
- Nồng độ protein: 38 g/l
- Nồng độ sinh khối: 15 g/l

Phân lập trên máy lọc ép:

Bước phân lập được thực hiện ngay lập tức sau bước thực hiện, và không làm lạnh sản phẩm. Nhiệt độ là 27°C.

Trong bước này, loại trừ được phần lớn nấm bằng cách phân lập trên máy lọc ép.

Công cụ được sử dụng bao gồm 10 đĩa có diện tích bề mặt lọc tổng thể là 3 m². Như thế có thể tạo ra trên mỗi mẻ 10 bánh lọc nấm dày 30mm và có tổng thể tích trước khi nén là 30 lít. Sợi được sử dụng là sợi gồm nhiều sợi nhỏ có độ xốp là 5µm.

Bước phân lập được thực hiện trong 3 bước:

- Bước thứ nhất gồm lọc bằng áp suất ngược dòng 5 bar kết hợp việc theo dõi tốc độ chảy của việc lọc theo thời gian.
- Trong bước thứ hai, việc nạp liệu vào máy lọc ép được chấm dứt, và bánh lọc nấm được nén lại bằng cách sử dụng áp suất cao (9 bar). Bước thứ hai này sẽ nén nấm và tối đa hóa việc thu hồi enzym.
- Bước thứ ba gồm tháo bỏ (thu hồi) bánh lọc có trọng lượng.

Cần lưu ý rằng, có thể thực hiện việc rửa bánh lọc để làm giảm đến mức tối thiểu tổn hao, hoặc để loại bỏ nấm ra khỏi dịch phân giải, nhưng nó không được thực hiện trong ví dụ này.

Tổng cộng 10 lần lọc/nén là cần thiết để xử lý toàn bộ môi trường nuôi cấy (4260 kg).

Bảng sau đây là phân lập cân bằng khối lượng.

Biến số	Giá trị	Đơn vị
---------	---------	--------

Tổng lượng nạp vào	4260	kg
Lượng dịch lọc thu hồi được mà không nén	3681,5	kg
Lượng dịch lọc thu hồi được bằng cách nén	210	kg
Tổng lượng bánh lọc	211,76	kg
Tổn hao xác định định	30	kg
Cân bằng khối lượng	97	%

Fig. 3 là sự thay đổi về lượng đã được lọc theo hàm thời gian và hình vẽ đối với sự thay đổi về lượng đã được lọc theo hàm về áp suất nạp vào.

Trong bước thứ nhất (lọc ở 5 bar), thời gian của mẻ là 25 phút.

Trong những phút đầu tiên, tốc độ chảy của dịch lọc là cao (nằm trong khoảng từ 500 đến 700 l/m²/h). Nấm “chọc” vào sợi và sẽ đóng vai trò làm môi trường lọc. Áp suất tăng lên và tốc độ chảy của dịch lọc giảm xuống. Nói chung, thường quyết định ngừng lọc khi tốc độ chảy dường như khá thấp khi so sánh với tốc độ ban đầu (ví dụ, nhỏ hơn 10% hoặc 20%) và là hàm số của mục tiêu ban đầu theo thời gian lọc.

Cần lưu ý rằng, không có sự khác biệt đáng kể giữa các mẻ khác nhau được thực hiện. Điều này cho thấy khả năng của sản phẩm được lọc là không thay đổi trong quá trình thực hiện (kéo dài tổng cộng ít hơn 12 giờ)

Khối lượng trung bình của mỗi mẻ trước khi nén là 263±30 kg. Tốc độ chảy trung bình của dịch lọc là 210 kg/m²/giờ.

Tiếp theo, việc nén được thực hiện (9 bar), quá trình nén này kéo dài trung bình 10 phút và có thể thu hồi được trung bình 15kg dịch lỏng mỗi mẻ với tốc độ chảy trung bình là 30 kg/m²/giờ. Khối lượng trung bình của bánh lọc thu được trên mỗi mẻ là 15±1,5 kg.

Phần trăm trọng lượng của bánh lọc tương ứng với dịch lọc trung bình là 5,4% và giá trị hàm lượng rắn (SC: *solid content*) trung bình của nó là 25% theo trọng

lượng, nên có thể nói tổn hao protein trong bước này là 4,05% theo trọng lượng nếu bánh lọc không được rửa.

Hiệu suất thu hồi protein sau bước lọc ép là 95,4%.

Phân lập bằng cách vi lọc trên xeramic khoáng:

Dịch lọc thu được từ máy lọc ép được phân chia tiếp thành nhiều mẫu, các mẫu này được xử lý bằng cách vi lọc trên màng khoáng có độ xốp là 0,8 và 1,4 μ m. Mục đích của thử nghiệm là để so sánh mức độ biểu hiện sau khi lọc ép của dịch lọc chứa enzym và nấm với hệ số nồng độ theo thể tích mong muốn là 10. Tiếp theo bước vi lọc là lọc màng, bước này có thể làm giảm đến mức tối thiểu tổn hao protein (thêm nước tương ứng với 5 thể tích dịch còn lại).

Công cụ vi lọc bao gồm 3 màng có diện tích bề mặt lọc là 0,33m² trong mỗi trường hợp.

Thử nghiệm đầu tiên được thực hiện có thể chọn lọc được màng 1,4 μ m có mức độ biểu hiện lọc tốt hơn so với màng 0,8 μ m ở cùng áp suất chuyển màng. Thực vậy, độ chảy của dịch thấm ổn định ở 100 l/m₂/giờ đối với bước thứ nhất và ở 60 l/m₂/giờ đối với bước thứ hai tối đa đến hệ số nồng độ theo thể tích (*volumetric concentration factor*: VCF) là 7,5. Hai màng này có thể tinh lọc sản phẩm (không thấy sự tăng trưởng của nấm trên dịch thấm được dàn ra trên môi trường PDA).

Fig. 5 là sự thay đổi về nồng độ protein trong dịch còn lại và dịch thấm. Thấy rằng, độ thấm của hai màng tương ứng với protein là rất tốt. Độ thấm của màng ở 1,4 μ m là tốt hơn và lớn hơn 0,9. Giá trị này là 0,2-0,4 với màng hữu cơ thậm chí có độ xốp là 0,8 μ m.

Hiệu suất thu hồi protein sau khi MF trên màng khoáng là 93,3% tương ứng với bước đầu tiên.

Tiếp theo, enzym được cô bằng cách UF trên màng khoáng với hiệu suất thu hồi là 92%, tức là tổng hiệu suất là 86%.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình phân lập, từ môi trường nuôi cấy, nấm *Trichoderma reesei* ra khỏi các enzym được tạo ra trong môi trường nuôi cấy bằng nấm trong một bước sản xuất, trong đó trong quy trình này bao gồm bước:

a) đưa môi trường nuôi cấy nêu trên vào, trong thời gian từ 0 đến 30 giờ, bao gồm cả 2 ngưỡng này, từ khi tạm dừng bước sản xuất, và ở nhiệt độ môi trường xung quanh mà không cần làm lạnh trước, đến bước phân lập các pha rắn và pha lỏng, trên máy lọc ép đặt thẳng hàng với sợi có độ xốp là 3-20 μ m, nhờ đó thu được dịch lọc pha lỏng chứa các enzym có mật độ quang hiệu chỉnh (OD) ở 600nm là nhỏ hơn 2,5; và

b) đưa dịch lỏng pha lỏng vào bước phân lập vi lọc tiếp tuyến các pha rắn và pha lỏng trên màng xeramic có ngưỡng cắt nằm trong khoảng từ 0,8 đến 1,4 μ m, nhờ đó OD hiệu chỉnh ở 600nm của pha lỏng của sản phẩm vi lọc chứa các enzym không vượt quá 0,1,

trong đó:

dịch lọc được tái sử dụng cho việc nạp môi trường nuôi cấy vào máy lọc ép ở tỷ lệ tối đa 10% theo trọng lượng,

cả bước phân lập trên máy lọc ép (bước a)) và vi lọc dịch lọc thu được tại thời điểm cuối của máy lọc ép (bước b)) được thực hiện liên tục trong thời gian từ 0 đến 30 giờ, bao gồm cả 2 ngưỡng này, từ khi tạm dừng bước sản xuất, và

môi trường nuôi cấy không được đưa vào để gạn và/hoặc ly tâm trước được phân lập trên máy lọc ép, và

trong đó, tổng hiệu suất của enzym ít nhất là 86%.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó khoảng thời gian kể từ khi tạm dừng bước sản xuất là nhỏ hơn hoặc bằng 24 giờ.

3. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó tại thời điểm cuối của bước phân lập trên máy lọc ép, thu được 5-10% theo trọng lượng của chất rắn và 90-95% theo trọng lượng của dịch lọc.

4. Quy trình theo điểm 1, trong đó mẫu của dịch lọc pha lỏng thu được từ máy lọc ép được ly tâm ở 4000G trong 5 phút để thu được hạt kết rắn và dịch lỏng, và trong đó hạt kết là nhỏ hơn 1,5% (phần trăm thể tích được tính theo chất rắn tương ứng với tổng thể tích của mẫu).

5. Quy trình theo điểm 1, trong đó dịch lọc này thu được từ máy lọc ép được đưa vào vi lọc mà không cần làm lạnh trước đó.

6. Quy trình theo điểm 1, trong đó bước phân lập trên máy lọc ép và vi lọc được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20 đến 30°C.

7. Quy trình theo điểm 1, trong đó pha lỏng thu được sau bước vi lọc được đưa tiếp vào bước siêu lọc trên màng xeramic thứ hai có ngưỡng cắt nằm trong khoảng từ 5 đến 15kDa.

8. Quy trình theo điểm 1, trong đó pha lỏng thu được sau bước vi lọc được đưa vào tiếp bước siêu lọc, và trong đó tất cả ba bước của quá trình phân lập trên máy lọc ép (bước a)), vi lọc dịch lọc thu được tại thời điểm cuối của máy lọc ép (bước b)), và siêu lọc, được thực hiện liên tục trong thời gian từ 0 đến 48 giờ, kể cả 2 ngưỡng này, từ khi tạm dừng bước sản xuất.

9. Quy trình theo điểm 1, quy trình này còn bao gồm:

cho sinh khối lignoxenuloza đã được xử lý sơ bộ, bằng cách nổi hơi, tiếp xúc với pha lỏng của sản phẩm vi lọc chứa các enzym, nhờ đó thủy phân enzym sinh khối tạo ra đường hòa tan, và

lên men etanol đường hòa tan này,

trong đó bước thủy phân enzym và bước lên men được thực hiện riêng biệt hoặc đồng thời, và etanol được tạo ra được phân tách bằng cách chưng cất.

10. Quy trình theo điểm 1, trong đó enzym bao gồm enzym có thể phân hủy xenluloza và enzym bán phân hủy xenluloza.

11. Quy trình theo điểm 1, trong đó bước vi lọc dịch lọc thu được tại thời điểm cuối của máy lọc ép được thực hiện trong khoảng thời gian nhiều nhất là 24 giờ từ khi tạm dừng bước sản xuất.

12. Quy trình theo điểm 1, trong đó bước tách trên máy lọc ép và bước vi lọc được thực hiện ở 22-27°C.

13. Quy trình theo điểm 1, trong đó pha lỏng thu được sau khi vi lọc được đưa tiếp vào bước siêu lọc trong khoảng thời gian nhiều nhất là 24 giờ từ khi tạm dừng bước sản xuất.

14. Quy trình phân lập, từ môi trường nuôi cấy, nấm *Trichoderma reesei* ra khỏi các enzym được tạo ra trong môi trường nuôi cấy bằng nấm trong một bước sản xuất, trong đó trong quy trình này bao gồm bước:

a) đưa môi trường nuôi cấy nêu trên, trong thời gian từ 0 đến 30 giờ, bao gồm cả 2 ngưỡng này, từ khi tạm dừng bước sản xuất, vào bước phân lập trên máy lọc ép đặt thẳng hàng với sợi có độ xốp là 3-20 μ m, nhờ đó thu được dịch lọc pha lỏng chứa các enzym có mật độ quang hiệu chỉnh (OD) ở 600nm là nhỏ hơn 2,5; và

b) đưa dịch lỏng pha lỏng vào bước phân lập vi lọc tiếp tuyến các pha rắn và pha lỏng trên màng xeramic có ngưỡng cắt nằm trong khoảng từ 0,5 và 1,4 μ m, nhờ đó OD hiệu chỉnh ở 600nm của pha lỏng của sản phẩm vi lọc chứa các enzym không vượt quá 0,1, và có nồng độ protein cao hơn ít nhất 4,3 lần so với pha lỏng của sản phẩm vi lọc thu được với màng hữu cơ có cùng ngưỡng cắt này, và

trong đó, tổng hiệu suất của enzym ít nhất là 86%.

15. Quy trình theo điểm 7, trong đó quy trình này còn bao gồm:

cho tiếp xúc sinh khối lignoxenluloza đã được xử lý sơ bộ, bằng cách nổ hơi, với pha lỏng của sản phẩm vi lọc chứa các enzym, nhờ đó thủy phân enzym sinh khối tạo ra đường hòa tan, và

lên men etanol đường hòa tan này,

trong đó bước thủy phân enzym và bước lên men được thực hiện riêng biệt hoặc đồng thời, và etanol được tạo ra được phân tách bằng cách chưng cất.

Fig. 1

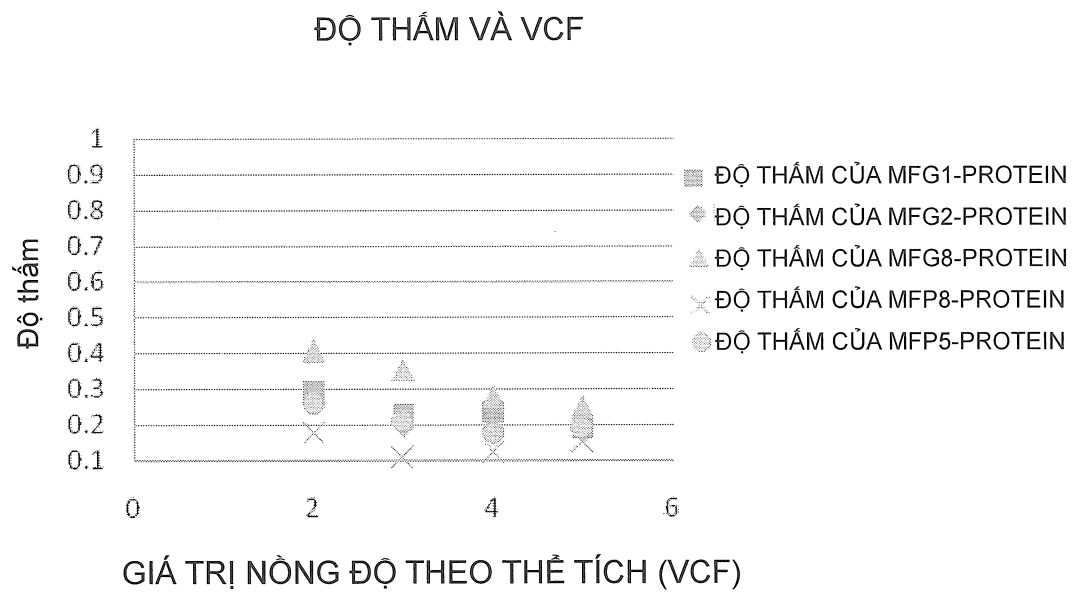


Fig. 2

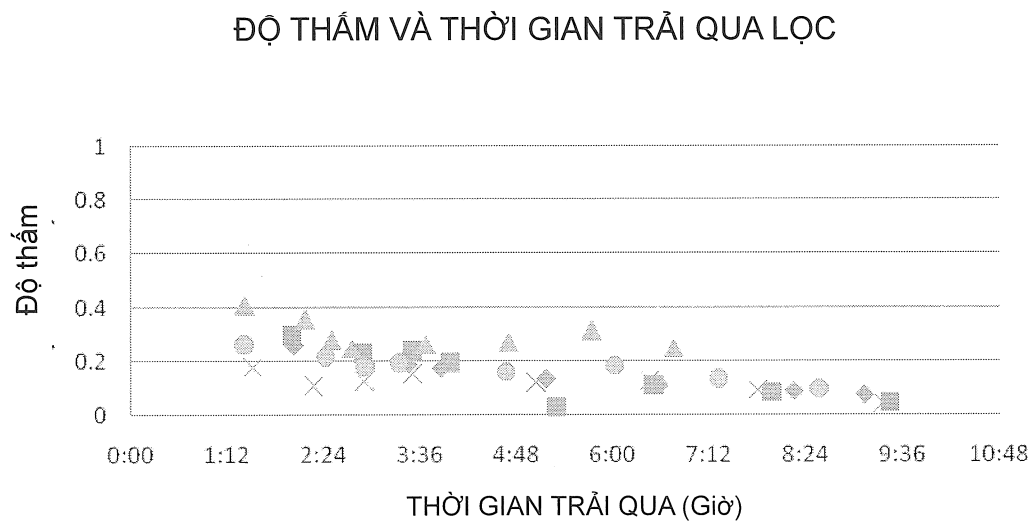


Fig. 3

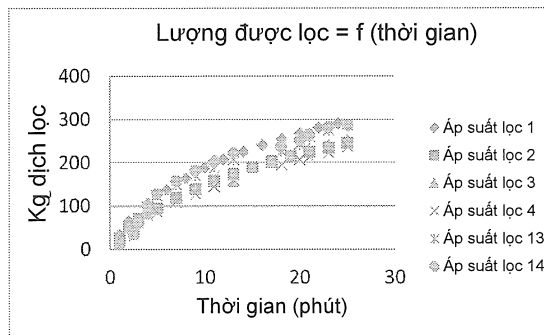


Fig. 4

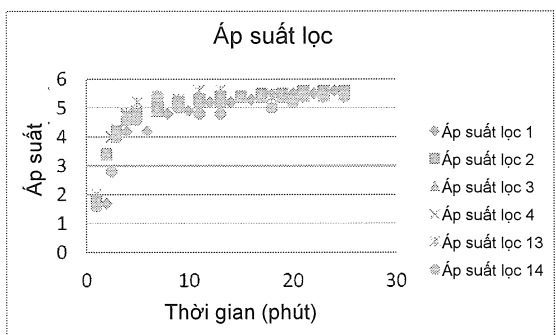


Fig. 5

