



(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) 
1-0019921

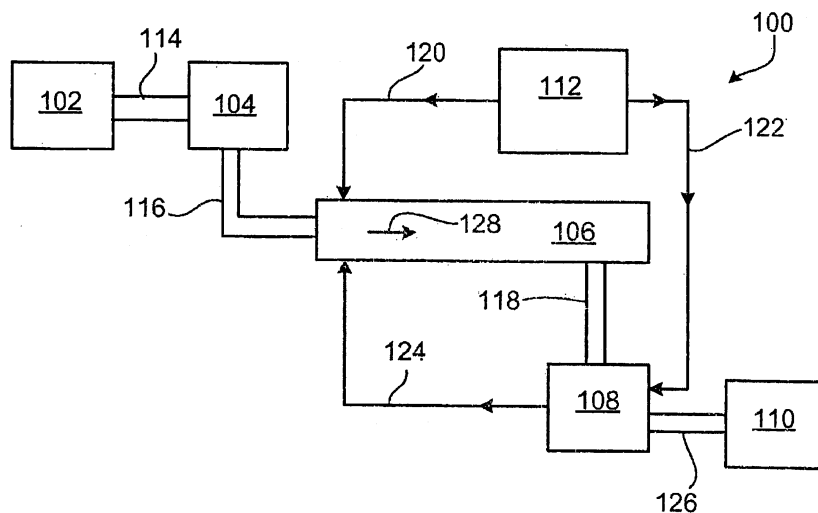
(51)⁷ **C10L 5/00, 5/44, C12P 7/10**

(13) **B**

(21)	1-2017-00264	(22)	15.07.2009
(62)	1-2010-03506		
(86)	PCT/US2009/050705	15.07.2009	(87) WO2010/009240 21.01.2010
(30)	61/081,709	17.07.2008 US	
(45)	25.10.2018 367	(43)	25.04.2017 349
(73)	XYLECO, INC. (US) 271 Salem Street, Unit L, Woburn, Massachusetts 01801, United States of America		
(72)	MEDOFF, Marshall (US)		
(74)	Văn phòng luật sư Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)		

(54) **PHƯƠNG PHÁP LÀM LẠNH VÀ XỬ LÝ NGUYÊN LIỆU**

(57) Sáng chế đề cập đến hệ thống và phương pháp làm lạnh và xử lý nguyên liệu, trong đó nguyên liệu đã hóa giòn được xử lý để tạo ra sản phẩm khác với nguyên liệu đã hóa giòn, nguyên liệu đã hóa giòn đã được tạo ra bằng cách xử lý nguyên liệu ban đầu để hóa giòn nguyên liệu ban đầu.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp làm lạnh và xử lý nguyên liệu, trong đó nguyên liệu đã hóa giòn được xử lý để tạo ra sản phẩm khác với nguyên liệu đã hóa giòn, nguyên liệu đã hóa giòn đã được tạo ra bằng cách xử lý nguyên liệu ban đầu để hóa giòn nguyên liệu ban đầu.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

WO 2008/073186 mô tả quy trình xử lý sinh khối để tạo ra các sản phẩm hữu ích, như nhiên liệu.

EP 1669434 mô tả phương pháp và hệ thống thiết bị để chuyển hóa nguyên liệu hữu cơ có nguồn gốc từ chất thải trong nhà thành nhiên liệu.

US 4,769,082 mô tả quá trình đường hóa và lên men bằng enzym xenluloza trong nguồn thải xenluloza mà hiệu quả có thể được nâng cao bằng cách xử lý sơ bộ bằng cách chiếu xạ ion.

EP 0794243 mô tả dầu có nguồn gốc từ dầu mỏ được dùng để khử nhựa đường propan, nhờ đó thu được cặn nhựa đường rắn và quy trình xử lý dầu này để tạo ra huyền phù.

US 4,797,135 mô tả phương pháp sản xuất bột gỗ nghiền mịn và các loại sinh khối thực vật khác, thích hợp để sử dụng làm nhiên liệu.

Sinh khối, cụ thể là chất thải sinh khối, là nguồn sẵn có phong phú. Việc tạo ra nguyên liệu và nhiên liệu như etanol từ sinh khối là rất hữu ích.

Việc xử lý hiệu quả hơn nguyên liệu chứa dầu mỏ để thu được nhiên liệu và các sản phẩm khác cũng rất hữu ích.

Nguyên liệu, như sinh khối và các nguyên liệu khác, như các sản phẩm dầu mỏ, có thể được xử lý để thay đổi cấu trúc của chúng ở một hoặc nhiều mức bằng cách làm lạnh và xử lý. Nguyên liệu đã xử lý sau đó có thể được sử dụng, ví dụ, làm nguồn nguyên liệu và nhiên liệu.

Nhiều phương án thực hiện theo sáng chế sử dụng các phương pháp hóa học Natural Force™. Các phương pháp hóa học Natural Force™ sử dụng ứng dụng có kiểm soát và sử dụng lực vật lý, như chùm hạt, trọng lực, ánh sáng, nhiệt độ, v.v..., để tạo ra thay đổi của phân tử về mặt cấu trúc và hóa học mong muốn.

Lignin có mặt trong nhiều dạng sinh khối khác nhau, bao gồm sinh khối xenluloza và lignoxenluloza, có thể gây khó khăn cho các nỗ lực nhằm thay đổi sinh khối để tạo thành nguyên liệu trung gian để chuyển hóa thành các đường đơn giản hơn và, cuối cùng là, các sản phẩm như rượu. Kết quả là, hiệu suất của sản phẩm, như etanol thu được từ sinh khối, có thể thấp hơn (và trong một số trường hợp, thấp hơn đáng kể) so với hiệu suất lý thuyết tối đa của các sản phẩm này.

Có nhu cầu đối với phương pháp làm lạnh và xử lý nguyên liệu, như nguyên liệu sinh khối và các nguyên liệu khác.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp làm lạnh và xử lý nguyên liệu, ví dụ, làm lạnh sâu (làm lạnh cryo), riêng rẽ hoặc kết hợp một hoặc nhiều kỹ thuật xử lý khác, như một hoặc nhiều bước xử lý có thể bao gồm, ví dụ, nghiền, cán, khuấy trộn, mài mòn, cắt đứt đoạn, nghiền cắt, tách nước, tách khí, tách hơi nước, một hoặc nhiều bước xử lý bằng bức xạ (ví dụ, cho tiếp xúc với các hạt tích điện như điện tử và/hoặc ion), một hoặc nhiều bước xử lý bằng siêu âm, một hoặc nhiều bước xử lý bằng hóa học (ví dụ, sử dụng các chất như axit, bazơ, chất oxy hóa, chất khử, và/hoặc dung môi), và/hoặc một hoặc nhiều bước xử lý nhiệt (ví dụ, nhiệt phân, với sự có mặt của chất oxy hóa và/hoặc chất khác, và/hoặc trong môi trường áp suất giảm). Các kỹ thuật xử lý khác này, nếu được sử dụng, có thể được thực hiện trước khi, trong khi hoặc sau khi làm lạnh.

Bằng cách làm lạnh sinh khối hoặc nguyên liệu khác, độ giòn của các thành phần khác nhau của sinh khối hoặc nguyên liệu khác (ví dụ, hemixenluloza và/hoặc lignin và/hoặc protein và/hoặc pectin và/hoặc khoáng) có thể được tăng, nhờ đó làm tăng đáng kể hiệu quả của kỹ thuật xử lý được sử dụng để thay đổi

nguyên liệu. Bằng cách làm tăng độ giòn của nguyên liệu, nguyên liệu có thể bị nứt (ví dụ, các đoạn nối của sợi có thể bị đứt gãy) hoặc bị crackinh do nhiều bước xử lý khác nhau. Sự đứt gãy có thể là, ví dụ, sự đứt gãy nhỏ.

Ngoài ra, nguyên liệu làm lạnh có thể có các tác động khác sinh ra do tốc độ giãn nở và/hoặc co rút khác nhau của các thành phần khác nhau của nguyên liệu. Ví dụ, một số thành phần (ví dụ, lignin với sự có mặt của nước) có thể co rút hoặc giãn nở ở tốc độ nhanh hơn so với, hoặc với lượng khác nhau so với các thành phần khác (ví dụ, hemixenluloza, xenluloza) mà chúng kết hợp. Kết quả là, nguyên liệu có thể suy yếu, thúc đẩy nhanh sự tách (ví dụ, tách pha, tách lớp, đứt gãy bề mặt chung, crackinh, hoặc đứt gãy, ví dụ, đứt gãy nhỏ) các thành phần khác nhau của nó. Các quy trình này – có thể được thực hiện một cách độc lập với kỹ thuật xử lý khác hoặc cùng với kỹ thuật xử lý khác – có thể cũng làm tăng hiệu suất của sản phẩm, ví dụ, etanol thu được từ hemixenluloza hoặc xenluloza đã được tách khỏi lignin. Việc tách lignin ra khỏi nguyên liệu làm giảm khả năng chống phân hủy hóa học của nguyên liệu, tạo thuận lợi cho sự chuyển hóa của thành phần xenluloza của nguyên liệu thành dung dịch đường (đường hóa xenluloza nhờ enzym). Nếu không bị giới hạn bởi lý thuyết, sự đứt gãy của nguyên liệu được cho là có thể cho phép enzym thấm qua nguyên liệu ở các vị trí nứt, nhờ đó làm tăng tốc quá trình saccarit hóa. Sau đó, nguyên liệu đã được saccarit hóa có thể được chuyển hóa thành sản phẩm, ví dụ, được lên men thành etanol.

Khi việc làm lạnh được kết hợp với kỹ thuật xử lý khác, ví dụ, bức xạ và/hoặc oxy hóa, các kỹ thuật khác có thể được sử dụng ở mức độ nhỏ hơn để thu được kết quả tương đương. Ví dụ, khi việc làm lạnh được sử dụng với bức xạ, bức xạ có thể được sử dụng ở liều lượng thấp hơn để thu được mức giảm độ cứng giống nhau.

Trong các phương pháp xử lý khác nhau được sử dụng để thay đổi và/hoặc chuyển hóa nguyên liệu thành các nguyên liệu khác, lượng nhiệt đáng kể có thể được sinh ra trong nguyên liệu. Để tránh sự đốt cháy hoặc biến đổi nhiệt khác

không mong muốn ban đầu của nguyên liệu, các phương pháp làm lạnh được đề cập trong bản mô tả này có thể được sử dụng để loại bỏ hoặc bù nhiệt dư. Mức làm lạnh (ví dụ, lượng nhiệt được loại bỏ khỏi nguyên liệu) có thể thay đổi theo lượng nhiệt được sinh ra trong quá trình xử lý nguyên liệu. Mức làm lạnh cũng có thể được điều chỉnh để điều chỉnh một số đặc tính của nguyên liệu sinh khối như độ giòn để làm tăng hiệu quả của một số bước xử lý sau đó. Ví dụ, việc nghiền nhỏ hemixenluloza, xenluloza, và lignin, và việc tách các thành phần này có thể gia tăng nhờ các phương pháp được đề cập trong bản mô tả này.

Các phương pháp làm lạnh và xử lý cũng có thể được sử dụng để xử lý các dạng khác của nguyên liệu như nguyên liệu chứa hydrocacbon (ví dụ, nguyên liệu chứa dầu mỏ). Nhiều dạng khác của nguyên liệu chứa dầu mỏ – bao gồm dầu thô nặng và nhẹ, khí tự nhiên, cát dầu, đá phiến chứa dầu, cát atphan, nhựa bitum, than đá, và/hoặc các hỗn hợp hydrocacbon khác nhau – có thể được làm lạnh và xử lý bằng cách sử dụng các phương pháp được đề cập trong bản mô tả này để đẩy nhanh việc chiết, crackinh, nghiền nhỏ, tách, và tinh chế các thành phần khác nhau của nguyên liệu, và để điều chỉnh nhiệt độ trong quy trình tinh chế, chuyển hóa, và tinh chế như crackinh, trùng chỉnh (có xúc tác và không xúc tác), chưng cất, và chuyển hóa có xúc tác.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, nguyên liệu “cryo” là nguyên liệu có nhiệt độ bằng hoặc nhỏ hơn 200K (-73°C) (ví dụ, bằng hoặc nhỏ hơn 170K (-103°C), bằng hoặc nhỏ hơn 150K (-103°C), bằng hoặc nhỏ hơn 130K (-143°C), bằng hoặc nhỏ hơn 120K (-153°C), bằng hoặc nhỏ hơn 110K (-163°C), bằng hoặc nhỏ hơn 100K (-173°C), bằng hoặc nhỏ hơn 90K (-183°C), bằng hoặc nhỏ hơn 80K (-193°C), bằng hoặc nhỏ hơn 70K (-203°C), bằng hoặc nhỏ hơn 60K (-213°C), bằng hoặc nhỏ hơn 50K (-223°C), bằng hoặc nhỏ hơn 40K (-233°C), bằng hoặc nhỏ hơn 30K (-243°C)). Do đó, ví dụ, “chất lỏng cryo” là chất lỏng có nhiệt độ bằng hoặc nhỏ hơn 200K.

Như được mô tả chi tiết hơn dưới đây, các nguyên liệu khác nhau có thể được sử dụng để làm lạnh gồm, ví dụ, nitơ dạng lỏng, cacbon đioxit, và nước đá.

Phương pháp theo sáng chế, mà sẽ được mô tả chi tiết hơn dưới đây, có thể tạo ra các hạt nguyên liệu (ví dụ, sợi) có tỷ lệ chiều dài với đường kính là bằng hoặc lớn hơn 5:1 (ví dụ, bằng hoặc lớn hơn 6:1, bằng hoặc lớn hơn 8:1, bằng hoặc lớn hơn 10:1, bằng hoặc lớn hơn 12:1, bằng hoặc lớn hơn 15:1, bằng hoặc lớn hơn 20:1).

Phương pháp này cũng có thể tạo ra các hạt có kích thước lớn nhất, ví dụ, đường kính, nhỏ hơn, ví dụ, 2000 nm, 1000, 750, 500, 250, 100, 50, 25, 20, 10, 5, hoặc thậm chí 1 nm.

Phương pháp này có thể tạo ra nguyên liệu có mật độ khối giảm. Ví dụ, mật độ khối của nguyên liệu được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp được đề cập trong bản mô tả này có thể bằng hoặc nhỏ hơn $0,8 \text{ g/cm}^3$ (ví dụ, bằng hoặc nhỏ hơn 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, ví dụ, $0,1 \text{ g/cm}^3$).

Phương pháp này có thể tạo ra nguyên liệu có mặt cắt ngang tương đối mỏng, do tác dụng kết hợp của nguyên liệu làm lạnh để làm tăng độ giòn của nó, và xử lý nguyên liệu bằng cách sử dụng một hoặc nhiều kỹ thuật bất kỳ được đề cập trong bản mô tả này. Nói chung, nguyên liệu có mặt cắt ngang mỏng có thể được làm lạnh hiệu quả hơn so với nguyên liệu có mặt cắt ngang dày hơn; kết quả là, chi phí (ví dụ, tiêu thụ năng lượng) để xử lý nguyên liệu (ví dụ, cụ thể là chi phí cho tiêu thụ năng lượng trong kỹ thuật xử lý) có thể được giảm.

Cụ thể hơn, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp làm lạnh và xử lý bao gồm bước làm lạnh nguyên liệu có ít nhất một thành phần và bề mặt chung giữa các thành phần đến nhiệt độ mà tại đó các thành phần tách ở bề mặt chung. Nguyên liệu đã làm lạnh sau đó có thể được xử lý để tạo ra sản phẩm khác, ví dụ, khác về mặt hóa học, với chính nguyên liệu này. Ví dụ, sinh khối có thể được làm lạnh và sau đó được xử lý để tạo ra etanol.

Theo một số phương án, phương pháp làm lạnh và xử lý theo sáng chế bao gồm một hoặc nhiều đặc điểm sau. Nguyên liệu có thể là hoặc chứa sinh khối, ví dụ, trong một số trường hợp nguyên liệu bao gồm nguyên liệu lignoxenuloza. Các thành phần có thể bao gồm lignin và xenuloza. Nhiệt độ có thể bằng hoặc thấp

hơn điểm giòn của nguyên liệu. Phương pháp này có thể còn bao gồm bước chiếu xạ nguyên liệu, ví dụ, với bức xạ chùm tia điện tử. Phương pháp này có thể còn bao gồm bước xử lý nguyên liệu bằng cơ học, ví dụ, bằng cách nghiền, cán, hoặc nghiền nhỏ. Ví dụ, việc xử lý nguyên liệu bằng cơ học có thể bao gồm việc nghiền đông lạnh hoặc cán đông lạnh nguyên liệu. Việc làm lạnh có thể bao gồm làm lạnh sơ bộ nguyên liệu trước khi nghiền đông lạnh hoặc cán đông lạnh. Các thành phần có thể có hệ số giãn nở nhiệt khác nhau. Phương pháp này có thể bao gồm bước xử lý nguyên liệu theo chu trình nhiệt. Nguyên liệu có thể là hoặc chứa nguyên liệu chứa hydrocacbon.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp làm lạnh và xử lý bao gồm bước xử lý nguyên liệu để tạo ra sản phẩm, nguyên liệu đã được tạo ra bằng cách xử lý nguyên liệu ban đầu để hóa giòn nguyên liệu ban đầu và xử lý nguyên liệu đã hòa giòn để tạo ra sản phẩm khác với nguyên liệu đã hòa giòn. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm bước nghiền hoặc nghiền nhỏ nguyên liệu đã hòa giòn.

Theo một số phương án, phương pháp làm lạnh và xử lý theo sáng chế bao gồm một hoặc nhiều đặc điểm sau. Việc xử lý có thể bao gồm việc làm lạnh nguyên liệu ban đầu. Theo cách khác hoặc ngoài ra, việc xử lý có thể bao gồm việc chiếu xạ hoặc oxy hóa nguyên liệu. Nguyên liệu ban đầu có thể bao gồm sinh khối hoặc nguyên liệu chứa hydrocacbon. Việc xử lý và nghiền hoặc nghiền nhỏ có thể được thực hiện đồng thời, ví dụ, trong thiết bị nghiền đông lạnh hoặc cán đông lạnh. Xử lý nguyên liệu có thể bao gồm cho nguyên liệu tiếp xúc với enzym và/hoặc vi sinh vật. Việc xử lý có thể bao gồm xử lý nguyên liệu theo chu trình nhiệt ban đầu. Sinh khối có thể bao gồm nguyên liệu lignoxenluloza, và phương pháp có thể còn bao gồm việc tách lignin ra khỏi xenluloza.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp làm lạnh và xử lý bao gồm bước làm lạnh nguyên liệu sinh khối để làm giảm khả năng chống phân hủy hóa học của nguyên liệu, và, sau khi làm lạnh, xử lý nguyên liệu đã làm lạnh để tạo ra sản phẩm khác, ví dụ, khác về mặt hóa học, so với nguyên liệu sinh

khối. Theo một số phương án, việc xử lý bao gồm cho nguyên liệu tiếp xúc với enzym và/hoặc vi sinh vật, ví dụ, saccari hóa nguyên liệu bằng enzym hoặc lên men nguyên liệu bằng vi sinh vật.

Theo một số phương án, phương pháp làm lạnh và xử lý theo sáng chế bao gồm một hoặc nhiều đặc điểm sau. Nguyên liệu có thể bao gồm xenluloza, và việc tiếp xúc nguyên liệu có thể bao gồm việc sử dụng enzym để đường hóa xenluloza. Phương pháp này có thể còn bao gồm bước chiếu xạ nguyên liệu sinh khối. Việc làm lạnh có thể được thực hiện trong thiết bị nghiền đông lạnh hoặc cán đông lạnh. Việc tiếp xúc nguyên liệu có thể bao gồm việc sử dụng vi sinh vật để tạo ra rượu. Việc làm lạnh có thể bao gồm việc làm lạnh nguyên liệu đến nhiệt độ thấp hơn điểm giòn của nguyên liệu.

Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp làm lạnh và xử lý nguyên liệu bao gồm bước xử lý, như bằng xử lý cơ học, nguyên liệu sinh khối hoặc nguyên liệu chứa dầu mỡ để làm giảm kích thước như cỡ hạt của nguyên liệu sinh khối hoặc sản phẩm dầu mỡ; và nguyên liệu làm lạnh đến nhiệt độ bằng hoặc thấp hơn 273 K trước khi xử lý, hoặc duy trì nguyên liệu ở nhiệt độ bằng hoặc thấp hơn 273 K trong quá trình xử lý.

Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm bước cho nguyên liệu đã xử lý tiếp xúc với enzym và/hoặc vi sinh vật. Trong một số trường hợp, phương pháp này bao gồm việc siêu âm nguyên liệu, và/hoặc xử lý nguyên liệu bằng các hạt tích điện. Việc làm lạnh có thể hóa giòn nguyên liệu, có thể gây ra việc tách các thành phần của nguyên liệu ở bề mặt chung.

Sáng chế còn đề xuất sản phẩm được tạo thành bằng phương pháp bất kỳ được đề cập trong bản mô này.

Trừ khi có quy định khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa thông thường như được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế có liên quan. Mặc dù phương pháp và nguyên liệu tương tự hoặc tương đương với phương pháp và nguyên liệu được đề cập trong bản mô này có thể được sử dụng trong thực tế hoặc thử nghiệm

của sáng chế, tuy nhiên phương pháp và nguyên liệu thích hợp được mô tả dưới đây. Trong trường hợp mâu thuẫn, sẽ sử dụng các thuật ngữ theo bản mô tả của sáng chế, bao gồm các định nghĩa. Ngoài ra, nguyên liệu, phương pháp, và các ví dụ dưới đây chỉ với mục đích minh họa và không làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Các đặc điểm và ưu điểm khác của sáng chế sẽ được hiểu rõ hơn thông qua phần mô tả chi tiết, hình vẽ, và yêu cầu bảo hộ dưới đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 là biểu đồ thể hiện hệ thống xử lý sinh khối.

FIG. 2 là biểu đồ thể hiện hệ thống xử lý sinh khối.

FIG. 3 là biểu đồ thể hiện bộ phận cán.

Mô tả chi tiết sáng chế

Một số dạng nguyên liệu, bao gồm xenluloza và/hoặc nguyên liệu lignoxenluloza, có thể bao gồm các phân đoạn đáng kể của lignin liên kết với xenluloza và/hoặc hemixenluloza trong cấu trúc khung polyme phức. Nếu không bị giới hạn bởi lý thuyết, một số bằng chứng cho thấy rằng lignin có thể được liên kết cộng hóa trị với cả xenluloza và hemixenluloza trong nguyên liệu (xem, ví dụ, Karlsson et. all., Journal of Pulp và Paper Science 27: 196-201 (2001)). Ngoài ra, thường thấy rằng việc tách lignin ra khỏi xenluloza và/hoặc hemixenluloza làm tăng hiệu suất của đường, rượu, và các sản phẩm khác thu được từ việc xử lý tiếp xenluloza và/hoặc hemixenluloza. Ngoài ra, việc tách lignin ra khỏi xenluloza và hemixenluloza tạo ra sản phẩm phụ có giá trị – bản thân lignin.

Ví dụ về sinh khối nguyên liệu có thể bao gồm nguyên liệu sinh khối bất kỳ là hoặc chứa hydrat cacbon chứa toàn bộ một hoặc nhiều đơn vị saccarit hoặc chứa một hoặc nhiều đơn vị saccarit có thể được xử lý bằng phương pháp bất kỳ được đề cập trong bản mô này. Ví dụ, nguyên liệu sinh khối có thể là nguyên liệu xenluloza hoặc lignoxenluloza, nguyên liệu tinh bột như hạt ngô, hạt gạo hoặc các

thực phẩm khác, hoặc nguyên liệu là hoặc chứa một hoặc nhiều đường có phân tử lượng thấp, như sucroza hoặc xenlobioza.

Ví dụ, sinh khối nguyên liệu này có thể bao gồm giấy, các sản phẩm từ giấy, gỗ, nguyên liệu liên quan đến gỗ, tấm mùn cưa, cỏ, vỏ thóc, bã mía, bông, cây đay, cây gai dầu, lanh, tre, cây sidan, cây chuối abaca, rom, lõi ngô, vỏ thóc, vỏ dừa, tạo, rong biển, bông, xenluloza tổng hợp, hoặc hỗn hợp của các nguyên liệu bất kỳ này.

Sinh khối cũng bao gồm nguồn sợi xenluloza, bao gồm giấy và các sản phẩm từ giấy (ví dụ, giấy bọc nhiều lớp và giấy Kraft), và nguồn sợi lignoxenluloza, bao gồm gỗ, và nguyên liệu liên quan đến gỗ, ví dụ, tấm mùn cưa. Sinh khối khác còn bao gồm nguồn sợi tự nhiên, ví dụ, cỏ, vỏ thóc, bã mía, bông, cây đay, cây gai dầu, lanh, tre, cây sidan, cây chuối abaca, rom, lõi ngô, vỏ thóc, vỏ dừa; nguồn sợi chứa hàm lượng α -xenluloza cao, ví dụ, bông; và nguồn sợi tổng hợp, ví dụ, sợi đùn (sợi có hướng hoặc sợi không có hướng). Các nguồn tự nhiên hoặc tổng hợp có thể thu được từ nguyên liệu vãi vụn còn nguyên, ví dụ, mảnh vãi lẻ, hoặc chúng có thể là phế phẩm sau sử dụng, ví dụ, giẻ. Khi các sản phẩm từ giấy được sử dụng, chúng có thể là nguyên liệu còn nguyên, ví dụ, nguyên liệu vụn còn nguyên, hoặc chúng có thể là phế phẩm sau sử dụng. Ngoài nguyên liệu thô nguyên, phế phẩm sau sử dụng, chất thải công nghiệp (ví dụ, phụ phẩm), và chất thải xử lý (ví dụ, nước thải từ xử lý giấy) cũng có thể được sử dụng. Ngoài ra, nguồn sợi có thể được tạo ra hoặc thu được từ chất thải của người (ví dụ, nước thải), chất thải của động vật hoặc người. Nguồn sinh khối khác nữa đã được đề cập trong các patent Mỹ số 6,448,307, 6,258,876, 6,207,729, 5,973,035 và 5,952,105.

Việc tách lignin ra khỏi xenluloza và/hoặc hemixenluloza có thể gây tiêu tốn cả thời gian lẫn chi phí. Kỹ thuật xử lý, bao gồm các phương pháp như nghiền và cán, có thể bị hạn chế về hiệu quả do các liên kết mạnh liên kết lignin với xenluloza và hemixenluloza.

Nhiều phương pháp xử lý - bao gồm các phương pháp cơ học, phơi sáng bức xạ, siêu âm, và thậm chí cả một số bước xử lý bằng hóa học - sinh ra nhiệt trong nguyên liệu. Mặc dù nhiệt xử lý bổ sung có thể có lợi theo một số phương án thực hiện, lượng nhiệt lớn được sinh ra bởi một số bước xử lý có thể còn gây biến đổi nhiệt của xenluloza và/hoặc hemixenluloza, làm giảm hiệu suất của đường, rượu, và các sản phẩm khác được tạo ra từ xenluloza và/hoặc hemixenluloza.

Ngoài ra, theo ví dụ, khi lignin được làm nóng (ví dụ, bằng nhiệt xử lý được sinh ra trong các bước xử lý) trên nhiệt độ chuyển hoá thủy tinh của nó, lignin có thể trở nên mềm hơn và dễ trùng chỉnh hơn (ví dụ, ít giòn hơn), và vì vậy khó xử lý hơn.

Các phương pháp được đề cập trong bản mô tả này sử dụng kỹ thuật làm lạnh, ví dụ, kỹ thuật làm lạnh cryo, ví dụ để đảm bảo rằng sự phân ly bằng nhiệt không mong muốn, ví dụ, của xenluloza và/hoặc hemixenluloza, không xảy ra trong quá trình xử lý nguyên liệu. Việc làm lạnh cũng có thể được sử dụng để điều chỉnh các đặc tính của nguyên liệu để làm tăng hiệu quả của việc tách, ví dụ, lignin ra khỏi xenluloza và/hoặc hemixenluloza.

Cụ thể, các phương pháp làm lạnh được đề cập trong bản mô tả này có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp để làm tăng độ giòn của nguyên liệu, làm cho nguyên liệu đã được làm lạnh dễ biến đổi hơn để tách bằng một hoặc nhiều phương pháp xử lý như một hoặc nhiều bước xử lý (ví dụ, nghiền, cán, khuấy trộn, mài mòn, cắt đứt đoạn, nghiền cắt), một hoặc nhiều bước xử lý bằng bức xạ (ví dụ, phơi sáng các hạt tích điện như điện tử và/hoặc ion), một hoặc nhiều xử lý bằng bước siêu âm, một hoặc nhiều bước xử lý bằng hóa học (ví dụ, bằng cách sử dụng các chất như axit, bazơ, chất oxy hóa, chất khử, và/hoặc dung môi), và/hoặc một hoặc nhiều bước xử lý nhiệt (ví dụ, nhiệt phân, với sự có mặt của chất oxy hóa và/hoặc chất khác, và/hoặc trong môi trường áp suất giảm). Bằng cách làm tăng độ giòn của nguyên liệu bằng cách làm lạnh và làm tăng hiệu suất mà bằng cách làm lạnh nguyên liệu có thể được xử lý, ví dụ, bằng cách nghiền nhỏ hoặc tách, có thể

làm giảm được chi phí xử lý (ví dụ, chi phí xử lý liên quan đến năng lượng) và có thể làm tăng hiệu suất sản phẩm mong muốn.

Ngoài ra, khi nguyên liệu nhiều thành phần được làm lạnh, các thành phần khác của chúng sẽ co rút và/hoặc giãn nở ở tỷ lệ khác nhau và/hoặc với lượng khác nhau. Theo một số phương án thực hiện, việc xử lý này có thể dẫn đến việc đứt gãy các liên kết hóa học trong nguyên liệu. Ví dụ, việc xử lý làm lạnh này có thể gây ra ứng suất giữa các thành phần đã liên kết, từ đó dẫn đến các quá trình như tách lớp, đứt gãy, tách lớp, phân ly, và tách các thành phần đã liên kết. Kết quả là, hiệu suất mà các thành phần có thể được tách - và hiệu suất của các sản phẩm mong muốn khác nhau thu được từ nguyên liệu - có thể tăng hoặc giảm hoặc không thay đổi.

Việc làm lạnh, riêng rẽ hoặc kết hợp với các xử lý khác như chiếu xạ và/hoặc oxy hóa, có thể được sử dụng để kiểm soát sự chức hóa của nguyên liệu dạng sợi, có nghĩa là, các nhóm chức có trên hoặc trong nguyên liệu. Sự chức hóa nguyên liệu có thể làm tăng độ hòa tan và/hoặc khả năng phân tán và có thể làm cho nguyên liệu nhạy hơn với sự chuyển hóa bởi enzym và/hoặc vi sinh vật.

Theo một số phương án thực hiện, sau khi nguyên liệu được xử lý nằm trong khoảng từ 1 trong số mỗi 2 đến khoảng 1 trong số mỗi 250 đơn vị saccharit bao gồm nhóm axit carboxylic, hoặc este hoặc muối của chúng; trong khi nguyên liệu bazơ tự nhiên hoặc chưa được xử lý có thể có ít hơn 1 nhóm axit carboxylic cho mỗi 300 đơn vị saccharit. Theo các phương án thực hiện khác, nằm trong khoảng từ 1 trong số mỗi 5 đến khoảng 1 trong số mỗi 250 đơn vị saccharit, ví dụ, 1 trong số mỗi 8 đến khoảng 1 trong số mỗi 100 đơn vị hoặc nằm trong khoảng từ 1 trong số 10 đến khoảng 1 trong số 50 đơn vị chứa nhóm axit carboxylic, hoặc este hoặc muối của chúng.

Theo một số phương án thực hiện, nguyên liệu đã được chiếu xạ nằm trong khoảng từ 1 trong số mỗi 5 đến khoảng 1 trong số mỗi 1500 đơn vị saccharit bao gồm nhóm nitril, nhóm nitroso hoặc nhóm nitro. Theo các phương án thực hiện khác, nằm trong khoảng từ 1 trong số mỗi 10 đến khoảng 1 trong số mỗi 1000 đơn

vị saccarit, ví dụ, 1 trong số mỗi 25 đến khoảng 1 trong số mỗi 1000 đơn vị hoặc nằm trong khoảng từ 1 trong số 35 đến khoảng 1 trong số 750 đơn vị chứa nhóm nitril, nhóm nitroso hoặc nhóm nitro.

Theo một số phương án thực hiện, đơn vị saccarit bao gồm hỗn hợp của nhóm axit carboxylic, nhóm nitril, nhóm nitroso và nhóm nitro. Nhóm hỗn hợp có thể làm tăng độ hòa tan của nguyên liệu xenluloza hoặc lignoxenluloza. Nguyên liệu đã xử lý cũng có thể bao gồm các nhóm chức được chọn từ nhóm gồm nhóm aldehyt, nhóm keton, nhóm amino, nhóm alkyl amino, gốc alkyl, gốc cloalkyl, gốc clofloalkyl, và nhóm enol.

FIG. 1 thể hiện biểu đồ về hệ thống xử lý sinh khối 100. Hệ thống 100 gồm bộ phận chứa nguyên liệu 102, hệ thống xử lý nguyên liệu phụ thứ nhất 104, đường ống làm lạnh 106, hệ thống xử lý nguyên liệu phụ thứ hai 108, bể chứa nguyên liệu đã xử lý 110, và bộ phận cấp chất lỏng làm lạnh 112. Trong quá trình vận hành, nguyên liệu được giữ trong bộ phận chứa 102 được chuyển qua đường ống 114 vào hệ thống xử lý nguyên liệu phụ thứ nhất 104.

Hệ thống phụ 104 có thể bao gồm nhiều bộ phận xử lý khác nhau. Ví dụ, theo một số phương án thực hiện, hệ thống phụ 104 có thể bao gồm một hoặc nhiều bộ phận xử lý cơ học (ví dụ, bộ phận nghiền, bộ phận khuấy trộn, bộ phận cán, bộ phận mài mòn, bộ phận cắt đứt đoạn, bộ phận nghiền cắt). Theo một số phương án thực hiện, hệ thống phụ 104 có thể bao gồm một hoặc nhiều bộ phận xử lý bằng bức xạ. Bộ phận xử lý bằng bức xạ có thể bao gồm nguồn hạt tích điện (ví dụ, nguồn chùm tia điện tử và/hoặc nguồn ion), trong đó nguyên liệu được phơi sáng các hạt tích điện để làm thay đổi nguyên liệu. Theo một số phương án thực hiện, hệ thống phụ 104 có thể bao gồm một hoặc nhiều bộ phận siêu âm, trong đó nguyên liệu được phơi sáng sóng siêu âm để thay đổi nguyên liệu. Theo một số phương án thực hiện, hệ thống phụ 104 có thể bao gồm một hoặc nhiều bộ phận nhiệt phân và/hoặc một hoặc nhiều bộ phận xử lý bằng hóa học. Theo một số phương án thực hiện, hệ thống phụ 104 có thể bao gồm một hoặc nhiều bộ phận

xử lý nổ bằng hơi nước. Theo một số phương án thực hiện, hệ thống phụ 104 có thể bao gồm một hoặc nhiều tổ hợp của các bộ phận xử lý này.

Nói chung, hệ thống phụ 104 có thể bao gồm một hoặc nhiều bộ phận xử lý bất kỳ trên đây, ở dạng tổ hợp bất kỳ. Hệ thống phụ 104 thường được thiết kế để thu được giai đoạn thay đổi ban đầu nguyên liệu, để chuẩn bị cho bước xử lý tiếp.

Theo một số phương án thực hiện, hệ thống phụ 104 có thể không có, và nguyên liệu có thể được chuyển trực tiếp từ bộ phận chứa 102 vào đường ống làm lạnh 106. FIG. 2 thể hiện phương án thực hiện của hệ thống xử lý nguyên liệu không có hệ thống xử lý phụ 104. Các cấu thành khác nhau trên FIG. 2 đã được mô tả trên đây trong FIG. 1, và phần mô tả về chúng không được đề cập lại ở phần này.

Trở lại FIG. 1, sau khi nguyên liệu đã được xử lý trong hệ thống phụ 104, ví dụ, bằng cách cắt, cắt đứt đoạn, nghiền cắt, hoặc nghiền vụn, nguyên liệu được chuyển qua đường ống 116 vào đường ống làm lạnh 106. Bộ phận cấp chất lỏng làm lạnh 112 cấp chất lỏng làm lạnh (ví dụ, nitơ dạng lỏng và/hoặc khí nitơ lạnh, và/hoặc heli lỏng và/hoặc khí heli lạnh, và/hoặc agon lỏng và/hoặc khí agon lạnh, và/hoặc CO₂ rắn và/hoặc CO₂ lỏng, và/hoặc không khí lỏng và/hoặc không khí lạnh dạng lỏng) vào đường ống làm lạnh 106 qua đường ống 120. Nguyên liệu được chuyển qua đường ống làm lạnh 106 theo hướng được thể hiện bằng hình mũi tên 128. Khi nguyên liệu đi qua đường ống 106 (ví dụ, trên phương tiện vận chuyển như băng chuyển và/hoặc mũi khoan), nguyên liệu được làm lạnh nhờ trao đổi nhiệt bằng chất lỏng làm lạnh được cấp bằng cách làm lạnh bộ phận cấp chất lỏng 112.

Khi nguyên liệu đến cuối đường ống làm lạnh 106, nguyên liệu được chuyển qua đường ống 118 vào hệ thống xử lý nguyên liệu phụ thứ hai 108. Theo một số phương án thực hiện, bộ phận cấp chất lỏng làm lạnh 112 cấp chất lỏng làm lạnh qua đường ống 122 vào hệ thống phụ thứ hai 108, như được thể hiện trong FIG. 1. Nói chung, hệ thống xử lý phụ thứ hai 108 có thể bao gồm một hoặc nhiều bộ phận xử lý bất kỳ được đề cập trong bản mô tả này liên quan đến hệ thống xử lý phụ đầu tiên 104. Ví dụ về bộ phận xử lý gồm một hoặc nhiều bộ phận

xử lý như nghiền, cắt đứt đoạn, hoặc bộ phận nghiền cắt, bộ phận xử lý bằng bức xạ, siêu âm bộ phận xử lý, nhiệt phân bộ phận xử lý, nổ bằng hơi nước bộ phận xử lý, và bộ phận xử lý bằng hóa học. Chất lỏng đã làm lạnh có thể được tái tuần hoàn để sử dụng tiếp trong đường ống làm lạnh 106 bằng cách chuyển chất lỏng qua đường ống 124.

Nguyên liệu đã xử lý, sau khi xuất hiện trong hệ thống xử lý phụ thứ hai 108, được chuyển vào bể chứa nguyên liệu 110 qua đường ống 126. Khi ở trong bể chứa 110, nguyên liệu có thể được đưa vào bước xử lý tiếp, bao gồm một hoặc nhiều bước bổ sung bất kỳ trong số các bước xử lý được mô tả trong các hệ thống xử lý phụ 104 và 108 trên đây. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, nguyên liệu đã xử lý có thể được đưa vào bước xử lý bổ sung, bao gồm một hoặc nhiều bước xử lý sử dụng chất sinh học như enzym và/hoặc vi sinh vật, như vi khuẩn và/hoặc nấm và các chất hóa học và chế phẩm hóa học và dung dịch hóa học khác nhau.

Nói chung, các phương pháp làm lạnh được đề cập trong bản mô tả này có thể được sử dụng với rất nhiều sinh khối khác nhau và các kỹ thuật xử lý nguyên liệu khác. Ví dụ về kỹ thuật có thể được sử dụng với các phương pháp làm lạnh đề cập trong bản mô tả này được mô tả, ví dụ, trong các tài liệu sau: WO 2008/073186; và patent Mỹ số 12/417,699, 12/417,707, 12/417,720, 12/417,723, 12/417,731, 12/417,786, 12/417,840, 12/417,880, 12/417,900, 12/417,904, 12/429,045, và 12/486,436. Các phương pháp làm lạnh được mô tả thường có thể được sử dụng trước khi, trong khi, và/hoặc sau khi thực hiện các kỹ thuật xử lý bất kỳ được mô tả trên đây.

Bước xử lý bất kỳ được đề cập trong bản mô tả này, ví dụ, như nghiền nhỏ, theo một số phương án thực hiện có thể đặc biệt có lợi khi được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều phương pháp làm lạnh, ví dụ, phương pháp làm lạnh cryo. Nếu không bị giới hạn bởi lý thuyết, tin rằng độ giòn của nguyên liệu lignoxenluloza tăng do bởi nguyên liệu làm lạnh có mặt ít nhất các thành phần tách một phần, ví dụ, ở bề mặt chung. Ngoài ra, bằng cách làm tăng độ giòn của nguyên liệu, tin rằng các kỹ thuật có thể hiệu quả hơn khi làm đứt gãy nguyên liệu – về hiệu quả,

nguyên liệu (và, bằng ví dụ, phân đoạn lignin của nguyên liệu) có thể biến đổi từ polyme dẻo, dễ trùng chỉnh thành nguyên liệu cứng, giống thủy tinh mà có thể “đập vỡ”.

FIG. 3 thể hiện phương án thực hiện ví dụ về bộ phận cán 200 có thể tạo thành một phần hoặc toàn bộ các hệ thống xử lý phụ 104 và 108. Bộ phận cán 200 gồm đường ống 202 để nguyên liệu được chuyển qua. Cánh cố định 204 được đặt trong đường ống. Cánh động 206 được gắn với trục được đặt ở giữa 208. Trong quá trình vận hành, nguyên liệu được cán qua thao tác cắt của các cánh 204 và 206.

Các thiết bị cán đông lạnh, nghiền đông lạnh, cán cryo và nghiền cryo bán trên thị trường có thể được sử dụng. Thiết bị này kết hợp việc làm lạnh nguyên liệu với nghiền nhỏ nguyên liệu. Ví dụ về dụng cụ nghiền cryo bán trên thị trường gồm the Freezer/Mill 6870, do SPEX CertiPrep, Metuchen, New Jersey cung cấp, và dụng cụ nghiền cryo do Pulva Corporation, Saxonburg, PA cung cấp. Các nhà cung cấp khác gồm Air Products, Praxair, và Air Liquide. Theo một số phương án thực hiện, thiết bị có thể bao gồm vùng làm lạnh trước, ví dụ, băng chuyền làm lạnh như máy ép đùn trục vít lạnh. Trong một số trường hợp nitơ dạng lỏng được phun vào nguyên liệu để được làm lạnh trong vùng làm lạnh trước. Dụng cụ nghiền có thể được lắp, ví dụ, chốt tịnh tiến hoặc chi tiết khác. Ví dụ, dụng cụ nghiền có thể là máy nghiền hình ống. Thông thường, tốt hơn là nhiệt độ của nguyên liệu được theo dõi và kiểm soát qua bước nạp liệu và nghiền.

Nghiền đông lạnh có thể được kết hợp với chiếu xạ, trong trường hợp này chiếu xạ có thể được thực hiện trước khi, trong khi, hoặc sau khi nghiền đông lạnh. Trong một số trường hợp, nghiền đông lạnh có thể làm giảm lượng bức xạ cần để làm giảm khả năng chống phân hủy hóa học của nguyên liệu sinh khối hoặc xử lý nguyên liệu chứa hydrocacbon.

Kỹ thuật xử lý bằng siêu âm có thể, theo một số phương án thực hiện, đặc biệt có lợi khi được sử dụng kết hợp với, ví dụ, trước khi, ngay sau khi, hoặc trong khi, các phương pháp làm lạnh được đề cập trong bản mô tả này. Nói chung, xử lý

bằng siêu âm nguyên liệu có hiệu quả khi thay đổi nguyên liệu do nhiệt được cấp vào nguyên liệu nhờ sóng cơ học (ví dụ, sóng âm). Khi các phương pháp làm lạnh được sử dụng để làm giảm nhiệt độ của nguyên liệu, nguyên liệu trở nên giòn hơn, và ít có khả năng trùng chỉnh hơn đáp ứng với sóng cơ học tới và/hoặc bị giãn nở nhanh do nóng cục bộ. Kết quả là, hiệu suất mà siêu âm làm thay đổi một cách hiệu quả nguyên liệu tăng lên.

Theo một số phương án thực hiện, các kỹ thuật sử dụng bức xạ (ví dụ, chùm tia điện tử và/hoặc chùm ion) để xử lý nguyên liệu có thể đặc biệt có lợi khi được sử dụng kết hợp với, ví dụ, trước khi, ngay sau khi, hoặc trong khi, làm lạnh nguyên liệu. Ví dụ, theo một số phương án thực hiện, trước tiên nguyên liệu có thể được chiếu xạ (ví dụ, trong hệ thống phụ 104) trước khi nó được làm lạnh. Theo cách khác, trước tiên nguyên liệu có thể được làm lạnh, và sau đó được chiếu xạ (ví dụ, trong hệ thống phụ 108). Liều lượng bức xạ có thể, ví dụ, nằm trong khoảng từ 0,1Mrad đến 200Mrad, ví dụ, nằm trong khoảng từ 10Mrad đến 100Mrad hoặc nằm trong khoảng từ 30Mrad đến 90Mrad. Bức xạ có thể phóng ra bằng một bước chiếu xạ hoặc nhiều bước chiếu xạ, và nguyên liệu có thể được làm lạnh giữa các bước chiếu xạ, nếu muốn. Việc làm lạnh này được mô tả trong patent Mỹ số 12/417,880.

Việc phơi sáng nguyên liệu bằng một số dạng và liều lượng bức xạ có thể làm tăng độ giòn của nguyên liệu. Nguyên liệu có thể được làm lạnh để làm giảm nhiệt độ của nó và làm tăng thêm độ giòn của nó. Trong khi và/hoặc sau khi làm lạnh nguyên liệu, nguyên liệu có thể được xử lý (ví dụ, bằng cách cán, nghiền, nghiền cắt, và các kỹ thuật khác) để thay đổi nguyên liệu để chuẩn bị cho bước xử lý tiếp tạo ra các sản phẩm hữu ích. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, việc phơi sáng bức xạ (ví dụ, phơi sáng bằng chùm tia điện tử và/hoặc phơi sáng bằng chùm ion) nguyên liệu sau khi làm lạnh nguyên liệu cũng có thể được sử dụng để thay đổi tiếp nguyên liệu và/hoặc làm cho nguyên liệu giòn hơn. Khi cả việc phơi sáng bức xạ và làm lạnh được sử dụng để làm cho nguyên liệu giòn hơn, hiệu suất sản phẩm

(ví dụ, etanol và/hoặc các rượu khác) có thể tăng đáng kể, và lượng năng lượng cần để xử lý nguyên liệu có thể giảm.

Theo một số phương án thực hiện, nhiều giai đoạn làm lạnh và xử lý cơ học, hoặc giai đoạn thay đổi làm lạnh và làm nóng, ví dụ, có hoặc không có bước xử lý cơ học bổ sung hoặc xử lý vật lý khác, có thể được sử dụng để xử lý nguyên liệu, ví dụ, sinh khối. Ví dụ, mỗi giai đoạn liên tiếp có thể làm giảm tiếp kích cỡ trung bình của hạt sinh khối, cho đến khi đạt được cỡ hạt mong muốn. Mỗi giai đoạn làm lạnh có thể là giống nhau hoặc khác nhau (ví dụ, hệ thống này có thể bao gồm nhiều hệ thống làm lạnh phụ tương tự). Theo một số phương án thực hiện, hệ thống có thể bao gồm một hệ thống làm lạnh phụ mà nguyên liệu đi qua nhiều lần. Theo cách khác, theo một số phương án thực hiện, các giai đoạn làm lạnh khác nhau (ví dụ, giai đoạn làm lạnh làm lạnh sinh khối đến các nhiệt độ khác nhau, như nhiệt độ giảm dần) có thể được sử dụng để xử lý nguyên liệu.

Tương tự, theo một số phương án thực hiện, nhiều giai đoạn xử lý cơ học có thể được sử dụng để xử lý sinh khối hoặc các nguyên liệu khác như các sản phẩm dầu mỏ. Nguyên liệu có thể được tái tuần hoàn qua bộ phận xử lý giống nhau nhiều lần, và/hoặc hệ thống có thể bao gồm nhiều bộ phận cơ học. Các bộ phận này có thể hoàn toàn giống với các bộ phận khác, hoặc một số bộ phận có thể khác (ví dụ, về mặt cấu trúc) với các bộ phận khác.

Nói chung, rất nhiều chất lỏng làm lạnh khác nhau có thể được sử dụng để làm lạnh nguyên liệu. Theo các phương án thực hiện được mô tả trên đây, nitơ lỏng và/hoặc nitơ lạnh dạng khí được sử dụng làm chất lỏng làm lạnh. Tuy nhiên, theo một số phương án thực hiện, một hoặc nhiều chất lỏng làm lạnh khác có thể được sử dụng, bao gồm heli lỏng, oxy lỏng, hydro lỏng, không khí lỏng, các dịch lỏng như vậy khác, và tổ hợp của chúng. Theo một số phương án thực hiện, chất lỏng có thể là dạng khí chứ không phải dạng lỏng, hoặc có thể chứa dạng rắn (ví dụ, nước đá, CO₂ rắn) được trộn với, hoặc thay thế bằng, chất lỏng. Ví dụ, rất nhiều khí đã được làm lạnh (gồm khí quý lạnh, khí nitơ lạnh, khí oxy lạnh, và khí

hydro lạnh) có thể được sử dụng thay thế, hoặc cùng với, chất lỏng làm lạnh dạng lỏng.

Theo một số phương án thực hiện, chất rắn có thể được bổ sung vào nguyên liệu để hỗ trợ xử lý nguyên liệu. Ví dụ, CO₂ rắn có thể được bổ sung vào nguyên liệu để hỗ trợ làm thay đổi nguyên liệu ở một hoặc nhiều bộ phận xử lý. Các chất rắn khác cũng có thể được sử dụng là nước đá chẳng hạn. Chất rắn cũng có thể là các yếu tố rắn được loại bỏ sau đó hoặc được tách khỏi nguyên liệu, ví dụ, một hoặc nhiều yếu tố dạng hạt, dạng ống, hoặc các yếu tố rắn được cán khác.

Nhiệt độ mà nguyên liệu được làm lạnh phụ thuộc vào một số yếu tố, bao gồm kỹ thuật xử lý được sử dụng để thay đổi nguyên liệu và bản chất của nguyên liệu. Theo một số phương án thực hiện, ví dụ, nguyên liệu được làm lạnh đến nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ chuyển hoá thủy tinh của lignin, nằm trong khoảng từ 100°C đến 170°C, ví dụ, nằm trong khoảng từ 120°C đến 150°C, ví dụ, khoảng 125°C. Khi lignin được làm lạnh đến nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ chuyển hoá thủy tinh của nó, nó thay đổi từ nguyên liệu mềm, dễ trùng chỉnh thành nguyên liệu giòn, dạng thủy tinh. Lignin giòn, dạng thủy tinh có thể được thay đổi dễ dàng hơn bằng các bước xử lý khác nhau, bao gồm các bước xử lý được mô tả trên đây. Ngoài ra, bằng cách làm lạnh lignin đến nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ chuyển hoá thủy tinh của nó cấu trúc vật lý của lignin có thể bị thay đổi. Sự thay đổi về cấu trúc của lignin có thể gây ra ứng suất trong ở nguyên liệu mà tại đó lignin được liên kết với xenluloza và/hoặc hemixenluloza. Ứng suất trong có thể dẫn đến việc tách lớp và theo đó là việc tách lignin ra khỏi xenluloza và/hoặc hemixenluloza. Theo một số phương án, nguyên liệu được làm lạnh đến nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ mà tại đó nguyên liệu trở nên giòn (“điểm giòn” của nguyên liệu). Điểm giòn này của nguyên liệu cụ thể có thể được đo bằng cách sử dụng thiết bị kiểm tra có bán trên thị trường, ví dụ, máy đo độ giòn Benz BPT2100 do Benz Material Testing Instruments, Providence, Rhode Island cung cấp.

Theo một số phương án thực hiện, nguyên liệu có thể được làm lạnh đến nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ chuyển hoá thủy tinh của một hoặc nhiều đơn vị hoặc

thành phần khác trong nguyên liệu, như hemixenluloza. Những đánh giá tương tự về các yếu tố liên quan đến lignin cũng áp dụng được với hemixenluloza. Cụ thể, việc làm lạnh hemixenluloza có thể làm cho nó giòn hơn, giúp làm tăng hiệu quả của bước xử lý sau đó. Việc làm lạnh cũng có thể tạo ra ứng suất trong cấu trúc sinh khối, có thể dẫn đến việc tách hemixenluloza ra khỏi các thành phần khác (ví dụ, xenluloza) trong nguyên liệu.

Theo một số phương án thực hiện, nguyên liệu có thể được làm lạnh đến nhiệt độ bằng hoặc nhỏ hơn 400K (127°C) (ví dụ, bằng hoặc nhỏ hơn 380K (107°C), bằng hoặc nhỏ hơn 360K (86,9°C), bằng hoặc nhỏ hơn 340K (66,9°C), bằng hoặc nhỏ hơn 320K (46,9°C), bằng hoặc nhỏ hơn 300K (26,9°C), bằng hoặc nhỏ hơn 280K (6,85°C), bằng hoặc nhỏ hơn 260K (-13,1°C), bằng hoặc nhỏ hơn 240K (-33,1°C), bằng hoặc nhỏ hơn 220K (-53,1°C), bằng hoặc nhỏ hơn 200K (-73,1°C), bằng hoặc nhỏ hơn 150K (-123°C), bằng hoặc nhỏ hơn 100K (-173°C), bằng hoặc nhỏ hơn 80K (-193°C), bằng hoặc nhỏ hơn 77K (-196°C), bằng hoặc nhỏ hơn 70K (-203°C), bằng hoặc nhỏ hơn 50K (-223°C) bằng hoặc nhỏ hơn). Theo một số phương án thực hiện, nguyên liệu có thể được làm lạnh đến nhiệt độ bằng hoặc nhỏ hơn nhiệt độ trong phòng (ví dụ, 293K (19,9°C)). Theo một số phương án thực hiện, nguyên liệu có thể được làm lạnh đến nhiệt độ bằng hoặc nhỏ hơn khoảng nhiệt độ của nitơ dạng lỏng (ví dụ, 77K (-196°C)). Việc làm lạnh nguyên liệu đến nhiệt độ nhỏ hơn nhiệt độ của nitơ dạng lỏng có thể đạt được bằng cách sử dụng chất lỏng làm lạnh với điểm sôi thấp hơn so với điểm sôi của nitơ dạng lỏng (ví dụ, heli lỏng).

Theo một số phương án thực hiện, tốc độ mà nguyên liệu được làm lạnh có thể được kiểm soát để hỗ trợ việc tách các thành phần của nguyên liệu. Ví dụ, bằng cách làm lạnh nguyên liệu nhanh, sự sắp xếp với năng lượng thấp nhất của các thành phần liên kết trong sinh khối có thể không có thời gian tạo thành. Nói cách khác, nguyên liệu đã làm lạnh có thể ở trạng thái năng lượng không phải là trạng thái năng lượng tối thiểu, và vì vậy có thể không ổn định và thay đổi dễ dàng hơn bằng cách sử dụng các bước xử lý tiếp. Theo một số phương án thực hiện, ví

du, tốc độ mà tại đó nguyên liệu được làm lạnh là bằng hoặc lớn hơn 1K/s (-272°C/s) (ví dụ, bằng hoặc lớn hơn 2K/s (-271°C/s), bằng hoặc lớn hơn 3K/s (-270°C/s), bằng hoặc lớn hơn 5K/s (-268°C/s), bằng hoặc lớn hơn 7,5K/s (-266°C/s), bằng hoặc lớn hơn 10K/s (-263°C/s), bằng hoặc lớn hơn 15K/s (-258°C/s), bằng hoặc lớn hơn 20K/s (-253°C/s), bằng hoặc lớn hơn 30K/s (-243°C/s), bằng hoặc lớn hơn 40K/s (-233°C/s), bằng hoặc lớn hơn 50K/s (-223°C/s), bằng hoặc lớn hơn 75K/s (-198°C/s), bằng hoặc lớn hơn 100K/s (-173°C), hoặc thậm chí lớn hơn nữa).

Theo một số phương án thực hiện, bằng cách sử dụng hệ thống xử lý được đề cập trong bản mô tả này, nguyên liệu có thể được duy trì ở nhiệt độ đã chọn và/hoặc trong khoảng nhiệt độ đã chọn trong quá trình xử lý nguyên liệu bằng cách sử dụng một hoặc nhiều kỹ thuật xử lý khác nhau được đề cập trong bản mô tả này. Ví dụ, nguyên liệu có thể được duy trì ở nhiệt độ bằng hoặc nhỏ hơn 400K (127°C) (ví dụ, bằng hoặc nhỏ hơn 380K (107°C), bằng hoặc nhỏ hơn 360K (86,9°C), bằng hoặc nhỏ hơn 340K (66,9°C), bằng hoặc nhỏ hơn 320K (46,9°C), bằng hoặc nhỏ hơn 300K (26,9°C), bằng hoặc nhỏ hơn 280K (6,85°C), bằng hoặc nhỏ hơn 260K (-13,1°C), bằng hoặc nhỏ hơn 240K (-33,1°C), bằng hoặc nhỏ hơn 220K (-53,1°C), bằng hoặc nhỏ hơn 200K (-73,1°C), bằng hoặc nhỏ hơn 150K (-123°C), bằng hoặc nhỏ hơn 100K (-173°C), bằng hoặc nhỏ hơn 80K (-193°C), bằng hoặc nhỏ hơn 77K (-196°C), bằng hoặc nhỏ hơn 70K (-203°C), bằng hoặc nhỏ hơn 50K (-223°C)). Theo một số phương án thực hiện, nguyên liệu có thể được duy trì ở nhiệt độ bằng hoặc thấp hơn nhiệt độ trong phòng (ví dụ, 293K (19,9°C)). Theo một số phương án thực hiện, sinh khối có thể được duy trì ở nhiệt độ của nitơ dạng lỏng (ví dụ, 77K (-196°C)) hoặc nhỏ hơn.

Theo một số phương án thực hiện, nguyên liệu có thể được đưa vào chuỗi các giai đoạn làm nóng và làm lạnh được chọn để phá vỡ tiếp sự kết hợp (ví dụ, các liên kết cộng hóa trị giả) giữa lignin và xenluloza và/hoặc hemixenluloza. Việc xử lý nhanh nguyên liệu theo chu trình nhiệt có thể tạo ra ứng suất trong trong

nguyên liệu, có thể dẫn đến việc tách các thành phần sinh khối (ví dụ, không cần xử lý tiếp, hoặc do các bước xử lý tiếp).

Ngoài ra, nhiều chất khác nhau có thể được bổ sung vào nguyên liệu trước khi, trong khi, và/hoặc sau khi làm lạnh nguyên liệu. Ví dụ về các chất có thể được bổ sung là nước (và, phổ biến hơn là hợp chất khác bất kỳ giãn nở hoặc co rút khi được làm lạnh), chất oxy hóa, chất khử, axit, bazơ, và nguyên liệu co rút đáng kể khi làm lạnh. Nói chung, các chất như nước có thể được đưa vào một hoặc nhiều thành phần của nguyên liệu để làm phồng các thành phần khi được hydrat hóa. Ví dụ, khi nguyên liệu, ví dụ, sinh khối, được làm lạnh, nước giãn nở và/hoặc co rút, tạo ra ứng suất bên trong theo chu kỳ trong nguyên liệu có thể dẫn đến việc đứt gãy các liên kết trong nguyên liệu, ví dụ, giữa lignin và xenluloza và/hoặc hemixenluloza. Các chất khác bị thăng hoa (ví dụ, cacbon đioxit) cũng có thể được sử dụng để thu được kết quả tương tự. Các chất thăng hoa thường có khối lượng phân tử gam bị thay đổi đáng kể ở chuyển pha. Các chất như vậy có thể được đưa vào nguyên liệu để đẩy nhanh tiếp việc tách các thành phần mà khi xảy ra giãn nở và/hoặc co rút tương đối nhanh nguyên liệu do các chất bổ sung.

Như lưu ý trên đây, các chất hóa học khác nhau như chất oxy hóa và/hoặc chất khử và/hoặc axit và/hoặc bazơ có thể được bổ sung vào nguyên liệu. Các chất khác nhau phản ứng với nguyên liệu trước khi, trong khi, và/hoặc sau khi làm lạnh còn hỗ trợ tiếp để thay đổi nguyên liệu trước khi tạo thành và chiết sản phẩm. Nói chung, một số thành phần của nguyên liệu có thể ổn định với sự có mặt của một chất, nhưng phản ứng với sự có mặt của các chất khác. Ví dụ, xenluloza ổn định với các bazơ, nhưng bị thay đổi bởi axit. Bằng việc đưa các bazơ vào một hoặc nhiều hệ thống xử lý phụ khác nhau, một hoặc nhiều thành phần đã chọn của nguyên liệu, ví dụ, lignin, có thể được thay đổi một cách chọn lọc và phân ly ra khỏi các thành phần khác, ví dụ, xenluloza và/hoặc hemixenluloza, làm tăng hiệu suất của các sản phẩm thu được từ nguyên liệu. Các chất hóa học có thể được bổ sung vào các hệ thống xử lý phụ khác nhau làm chất lỏng, trong dung dịch, và/hoặc làm chất khí. Theo một số phương án thực hiện, các chất có thể được đưa

vào ở dạng khí, và có thể được ngưng tụ thành chất lỏng như nguyên liệu được làm lạnh.

Theo một số phương án thực hiện, các chất oxy hóa và/hoặc khử khác nhau có thể được bổ sung trước khi, trong khi, và/hoặc sau khi làm lạnh để đẩy nhanh việc tách ít nhất một số thành phần nguyên liệu nhờ các phản ứng hóa học. Việc làm lạnh riêng rẽ, hoặc cùng với một hoặc nhiều kỹ thuật xử lý được mô tả trên đây, có thể được sử dụng để đẩy nhanh sự phân ly, ví dụ, của lignin ra khỏi xenluloza và/hoặc hemixenluloza. Sự phân ly này có thể được đẩy nhanh tiếp bằng phản ứng của xenluloza, hemixenluloza, và/hoặc lignin với các chất sao cho các sản phẩm của các phản ứng như vậy không tái kết hợp một cách dễ dàng. Ví dụ về chất oxy hóa và khử gồm ozon, oxy, không khí, amoniac, và rất nhiều các chất khác.

Theo một số phương án thực hiện, nhiều các giai đoạn làm lạnh khác nhau có thể được sử dụng, mỗi giai đoạn được thiết kế để làm lạnh nguyên liệu đến nhiệt độ khác nhau. Ví dụ, trong giai đoạn xử lý ban đầu, nguyên liệu có thể được làm lạnh đến nhiệt độ đã chọn và có thể được xử lý (ví dụ, bằng cơ học, bằng phơi sáng bức xạ, bằng siêu âm, và/hoặc bằng các kỹ thuật khác nhau khác). Ví dụ, trong mỗi giai đoạn xử lý sau đó, do các hạt nguyên liệu có thể được làm nhỏ hơn một cách nhanh chóng, nguyên liệu có thể được làm lạnh đến các nhiệt độ thấp hơn liên tục và được xử lý tiếp, để tiếp tục để làm giảm kích cỡ của hạt và/hoặc phân ly tiếp các thành phần của nguyên liệu như sinh khối (ví dụ, phân ly lignin ra khỏi xenluloza và/hoặc hemixenluloza) hoặc để thay đổi cấu trúc.

Nói chung, phần mô tả không chỉ giới hạn ở hệ thống xử lý cụ thể được mô tả trên FIG. 1 trên đây. Cụ thể, một số phương pháp làm lạnh khác nhau có thể được sử dụng để làm giảm nhiệt độ của nguyên liệu trước khi, trong khi, và/hoặc sau khi ứng dụng các kỹ thuật xử lý khác nhau. Ngoài ra, nói chung, rất nhiều hệ thống làm lạnh phụ khác nhau có thể được sử dụng để làm lạnh nguyên liệu.

Theo một số phương án thực hiện, hệ thống xử lý được đề cập trong bản mô tả này có thể bao gồm hệ thống tách phụ hoạt động để tách các thành phần

khác nhau của nguyên liệu sau khi nguyên liệu đã được làm lạnh và xử lý. Ví dụ, khi nguyên liệu được xử lý để phân ly lignin ra khỏi xenluloza và/hoặc hemixenluloza, hệ thống xử lý có thể bao gồm hệ thống tách phụ được thiết kế để loại bỏ lignin đã phân ly. Các phương pháp khác nhau, bao gồm các phương pháp tách vật lý như lắng gạn, ly tâm, chưng cất, và chiết có thể được sử dụng để tách các thành phần, ví dụ, lignin ra khỏi các thành phần khác của nguyên liệu lignoxenluloza, hoặc cát ra khỏi hydrocacbon trong cát dầu. Các phương pháp khác có thể được thực hiện trong hệ thống tách phụ gồm xử lý nhiệt hóa, xử lý bằng hóa học, và xử lý bằng phơi sáng bức xạ).

Theo một số phương án thực hiện, hệ thống xử lý được đề cập trong bản mô tả này có thể bao gồm một hoặc nhiều điểm thấm ướt để đưa chất thấm ướt khác nhau – cụ thể là nước và/hoặc các chất lỏng khác như dimetyl sulfoxit - vào nguyên liệu. Ví dụ, các bộ phận xử lý cơ học dưới đây như bộ phận cán được thể hiện trên FIG. 3, hệ thống xử lý có thể bao gồm dụng cụ phun để bổ sung nước và/hoặc các chất khác vào nguyên liệu. Dụng cụ phun có thể tạo ra dạng sương mù mịn nằm trên bề mặt của hạt nguyên liệu. Nếu nguyên liệu được làm lạnh trong khi hoặc sau khi tạo ra sương mù, sương mù này có thể được đông lạnh trên các bề mặt của hạt để đảm bảo sự kết dính. Nhiệt độ của nguyên liệu có thể trải qua một hoặc nhiều chu trình làm nóng-làm lạnh để làm phòng tiếp nguyên liệu với sương mù được tạo ra. Ngoài ra, theo một số phương án thực hiện, các thay đổi, ví dụ, các thay đổi nhanh, về nhiệt độ của nguyên liệu có thể làm thay đổi tiếp cấu trúc nguyên liệu.

Theo một số phương án thực hiện, nhiều giai đoạn thấm ướt có thể được sử dụng. Mỗi giai đoạn thấm ướt có thể đưa chất giống nhau vào nguyên liệu, hoặc các giai đoạn khác nhau có thể đưa các chất khác nhau. Việc chọn lọc chất để đưa vào phụ thuộc vào các yếu tố như ứng dụng mong muốn của nguyên liệu, trạng thái vật lý-hóa học của nguyên liệu, và các điều kiện trong giai đoạn xử lý nguyên liệu sau đó.

Các hệ thống và các phương pháp để làm tăng thẩm ướt nguyên liệu trước khi, trong khi, và sau khi xử lý được mô tả, ví dụ, trong patent Mỹ số 12/417,880. Theo một số phương án thực hiện, sau khi nguyên liệu đã được xử lý bằng cách sử dụng các phương pháp được đề cập trong bản mô tả này, nguyên liệu đã xử lý có thể được đưa vào bước xử lý bổ sung. Cụ thể, nguyên liệu đã xử lý có thể được tiếp xúc với các chất sinh học như enzym, và/hoặc với vi sinh vật như nấm (ví dụ, *P. Stipitis*) và/hoặc vi khuẩn để chiết nhiều sản phẩm hữu ích khác nhau ra khỏi nguyên liệu đã xử lý, bao gồm các sản phẩm như hydro, rượu (ví dụ, etanol và/hoặc butanol), axit hữu cơ (ví dụ, axit axetic), hydrocacbon, các sản phẩm phụ (ví dụ, protein) hoặc hỗn hợp của các chất bất kỳ này. Các chất sinh học và vi sinh vật thích hợp để xử lý tiếp nguyên liệu được mô tả, ví dụ, trong WO 2008/073186.

Ví dụ, theo một số phương án thực hiện, các kỹ thuật được đề cập trong bản mô tả này được sử dụng để tách và loại bỏ lignin ra khỏi nguyên liệu lignoxenluloza, và sau đó các thành phần xenluloza còn lại được saccarit hóa, ví dụ, bằng cách sử dụng enzym. Việc loại bỏ lignin làm giảm khả năng chống phân hủy hóa học của nguyên liệu, cho phép chuyển hóa xenluloza thành đường, mà sau đó có thể được lên men thành rượu.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ khác nhau về nguyên liệu xenluloza được thử nghiệm trong các bình lắc, bằng cách sử dụng *P. stipitis* NRRL Y-7124 và công thức môi trường dinh dưỡng chuẩn ở các mức độ khác nhau. Nồng độ etanol được đo theo thời gian cho mỗi bình. Như được lưu ý dưới đây (xem Chú thích cho Bảng 1), các mẫu xenluloza thu được từ cỏ đã cắt (cut glass - CG). Một số mẫu được để đông lạnh (FG), bằng cách sử dụng máy đông lạnh/nghiền SPEX Certiprep® 6870. Điều kiện nghiền đông lạnh là như sau: 4 phút làm lạnh sơ bộ, tiếp đó là ba chu trình với thời gian chạy 10 phút và 2 phút làm lạnh, với tần số nghiền là 15Hz. Một số các mẫu được chiếu xạ mà không được nghiền đông lạnh, trong khi một số mẫu khác được chiếu xạ sau khi nghiền đông lạnh. Việc chiếu xạ được thực hiện bằng

cách sử dụng chùm tia điện tử. Liều lượng bức xạ được chỉ ra bằng con số đứng sau “CG,” với 0,2E cho biết 0,2Mrad, 0,4E cho biết 0,4Mrad, v.v.. Khi liều lượng bức xạ bằng hoặc nhỏ hơn 10Mrad, nó cho một đường đi qua. Khi liều lượng bức xạ lớn hơn 10Mrad, nó cho nhiều đường 10Mrad đi qua (ví dụ, 50Mrad = 5 x 10Mrad), với khoảng cách thời gian là 1 phút giữa các đường để cho phép làm lạnh nguyên liệu ở nhiệt độ môi trường.

Chất phản ứng được sử dụng

Thành phần môi trường	Nhà sản xuất	Mẫu số	Lô số
Urê	ScholAR Chemistry	9472706	AD-7284-43
Nấm Nitơ Bazo	Becton Dickinson	291940	7128171
Pepton	Becton Dickinson	211677	4303198
Xyloza (>98%)	Alfa Aesar	A10643	10131481
Glucosa (>98,9%)	Fisher	BP-350-1, 50-99-7	030064, 030439
YM canh thịt	Becton Dickinson	271120	6278265
Novozyme® 188*	Novozymes	Sigma C6105	018K0735, 058K1144
Celluclast 1, 5 FG	Novozymes	Sigma C2730	077K0735, 058K1144
Enzym Optimash™ TBG **	Genencor®	N/A	1600925859

* Xenlobiaza từ *Aspergillus niger*

** β-glucanaza EC 3,2,1,6.

Tạo ra ngân hàng tế bào và phát triển bình hạt

Để bảo quản môi trường nuôi cấy gốc, ngân hàng tế bào đang hoạt động của mỗi môi trường nuôi cấy được tạo ra. Ngân hàng tế bào đang hoạt động của *P. stipitis* NRRL Y-7124 được tạo ra từ môi trường nuôi cấy đông lạnh được khử hydrat hóa thu được từ bộ sưu tập môi trường nuôi cấy ARS. Các lọ cryo chứa môi trường nuôi cấy *P. stipitis* trong glyxerol 15% thể tích/thể tích được giữ ở -75°C.

Để tạo ra bình hạt, một phần nguyên liệu của ngân hàng tế bào đang hoạt động đã được làm tan được vạch trên canh thịt nấm mốc (YM) + 20g/L thạch (pH 5,0) và được ủ ở 30°C trong 2 ngày. Các đĩa được giữ trong 2 ngày ở 4°C trước khi sử dụng. Một khuẩn lạc từ thạch chứa nấm mốc được sử dụng để ủ bình hình nón dung tích 250 mL chứa 100mL canh thịt vô trùng (40g/L Glucoza, 1,7g/L nấm nitơ bazơ, 2,27g/L ure, 6,56g/L pepton, 40g/L Xyloza, pH 5,0) và ủ trong 24 giờ ở 25°C và 150 vòng/phút. Sau 23 giờ sinh trưởng, mẫu được lấy ra và phân tích về mật độ quang học (OD 600nm trong quang phổ kế UV), tổng số lượng tế bào, và độ tinh khiết (nhuộm Gram). Dựa trên các kết quả này, bình có OD nằm trong khoảng từ 6 đến 11 và số lượng tế bào nằm trong khoảng từ 2 đến 6 x10⁸ tế bào/mL được sử dụng để ủ các bình thử nghiệm. Một ml các thành phần trong bình hạt được bổ sung vào các bình thử nghiệm dung tích 100mL (1% thể tích/thể tích).

Bình thử nghiệm

Bình thử nghiệm là bình hình nón dung tích 250 mL chứa 100 mL canh thịt. Các bình thử nghiệm chứa môi trường chuẩn (1,7g/L nấm nitơ bazơ, 2,27g/L ure, 6,56g/L Pepton, pH 5,0.). Có ba bộ bình kiểm chứng vì thử nghiệm được thực hiện trong khoảng thời gian ba tuần và các bình kiểm chứng được phân tích cho mỗi tuần thử nghiệm.

Thời gian hoạt động là như sau. Mẫu lignoxenluloza (7,77g) được kết hợp với 100 mL canh thịt vô trùng trong bình dung tích 250ml vô trùng và để ủ đều trong 14 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi ủ đều, độ pH của bình được điều chỉnh đến 5,0 bằng dung dịch NaOH 1N. Khi độ pH được điều chỉnh, 3,89mL

Celluclast 1,5 FG, 0,77mL Novozyme® 188, và 0,77mL Optimash™ TBG được bổ sung và các bình được ủ ở 50°C trong 21 giờ.

Sau khi xử lý bằng enzym, độ pH của bình được điều chỉnh đến 5,5, 6,0, hoặc 6,25. Sau khi điều chỉnh độ pH, các bình được ủ bằng 1mL *P. stipitis* các thành phần trong bình hạt và ủ trong 96 giờ ở 25°C và 125 vòng/phút.

Ba bình kiểm chứng (hai bình dương tính, một bình âm tính) được ủ mỗi tuần, tổng cộng 9 tuần. Hai bình kiểm chứng dương tính chứa đường. Một bình chứa 80g/L đường (40g/L Glucoza và 40g/L Xyloza), bình kia chứa 30 g đường (15g/L Glucoza và 15g/L Xyloza). Đường không được bổ sung vào mẫu bình đối chứng âm tính.

Một bộ bình (tổng cộng 5 bình) canh thịt chỉ chứa xyloza (40g/L Xyloza 1,7g/L nấm nitơ bazơ, 2,27g/L ure, 6,56g/L Pepton) ở độ pH 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5. Các bình được ủ ở 125 vòng/phút và 25°C sau khi ủ với 1mL *P. stipitis*.

Bộ bình thứ hai (tổng cộng 5 bình) canh thịt chỉ chứa xyloza (40g/L Xyloza 1,7g/L nấm nitơ bazơ, 2,27g/L ure, 6,56g/L Pepton) ở độ pH 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5. Các bình được ủ ở 250 vòng/phút và 25°C sau khi ủ với 1mL *P. stipitis*.

Trong tuần 1, các mẫu CG0,4E và CG0,4E-FG4102315 được thử nghiệm trong các bình ở độ pH 5,5. Tuy nhiên, quy trình này cho thấy rằng chúng phải được thử nghiệm ở cả độ pH 5,5 và 6,0. Vì vậy, cả các mẫu được thử nghiệm ở độ pH 5,5 và 6,0 trong tuần thứ 2 của thí nghiệm (các bình từ 28 đến 31).

Phân tích

Tổng tám mẫu được lấy từ mỗi bình ở 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, và 96 giờ sau khi ủ và phân tích về nồng độ glucoza, etanol, và xyloza bằng cách sử dụng thiết bị phân tích YSI Biochem (YSI, Interscience). Các mẫu được ly tâm ở tốc độ 14.000 vòng/phút trong 20 phút và dịch nổi được bảo quản ở -20°C. Mẫu chuẩn được phân tích hằng ngày để đảm bảo tính nguyên vẹn của màng được duy trì.

Số lượng tế bào của mỗi bình hạt được phân tích để xác định mật độ tế bào ban đầu trong các bình thử nghiệm. Một mẫu ở 72 giờ ủ được lấy từ mỗi bình

được phân tích về số lượng tế bào. Các mẫu đã được pha loãng thích hợp được trộn với xanh Trypan 0,05% và đưa vào huyết tốc kế Neubauer. Các tế bào được đếm với độ phóng đại 40X.

Độ pH của mỗi bình được đo ở 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, và 96 giờ.

Kết quả

Số lượng tế bào trong các bình hạt được phân tích. Trong tuần 1 (các bình từ 1 đến 27), mật độ tế bào trong bình hạt là $5,03 \times 10^8$ tế bào/mL. Vì vậy, mật độ tế bào ban đầu trong các bình thử nghiệm là $5,03 \times 10^6$ tế bào/mL. Trong tuần 2 (các bình từ 28 đến 64), số lượng tế bào trong bình hạt là $6,38 \times 10^8$ tế bào/mL. Vì vậy, mật độ tế bào ban đầu trong các bình thử nghiệm là $6,38 \times 10^6$ tế bào/mL. Trong tuần 3 (các bình từ 65 đến 105), số lượng tế bào trong bình hạt là $5,93 \times 10^8$ tế bào/mL. Vì vậy, mật độ tế bào ban đầu trong các bình thử nghiệm là $5,93 \times 10^6$ tế bào/mL.

Nồng độ etanol trong mỗi bình trong quá trình ủ được nêu trong Bảng 1 sau:

Bảng 1

Chú thích: “CG” = cò đã cắt ; “FG” = đông lạnh; 0.xE = được chiếu xạ bằng 0.xMrad bức xạ bằng cách sử dụng chùm tia điện tử.

Bình số	Mẫu số	Độ pH ban đầu	Nồng độ etanol (g/L) ở thời điểm ủ (giờ)							
			0	12	24	36	48	60	72	96
1	CG	5,5	0,10	0,14	0,16	0,05	0,03	0,04	0,05	0,07
2	CG	6,0	0,12	0,21	0,24	0,19	0,14	0,09	0,08	0,07
3	CG-FG	5,5	0,10	1,35	4,34	4,31	5,75	5,98	5,54	3,32
4	CG-FG	6,0	0,10	1,44	4,33	4,12	6,59	6,46	5,71	3,61
5	CG0,2E	5,5	0,10	0,21	0,21	0,07	0,04	0,17	1,25	0,08

6	CG0,2E-FG	5,5	0,10	1,24	4,42	3,85	5,82	6,05	5,52	3,03
7	CG0,4E	5,5	0,10	0,88	2,13	2,80	3,95	3,47	2,54	0,33
8	CG0,4E-FG	5,5	0,09	1,33	4,38	4,38	5,47	5,76	5,92	3,83
9	CG0,6E	5,5	0,11	1,06	1,98	2,67	2,94	0,91	1,13	0,11
10	CG0,6E-FG	5,5	0,10	1,33	4,53	4,65	5,94	6,22	6,33	4,09
11	CG0,8E	5,5	0,10	0,60	2,28	2,75	4,55	3,99	2,07	0,12
12	CG0,8E-FG	5,5	0,10	0,83	4,36	4,44	5,62	5,91	5,43	3,35
13	CG2E	5,5	0,10	0,61	2,23	2,72	3,79	2,33	0,06	0,08
14	CG2E-FG	5,5	0,1	1,13	4,39	4,51	5,74	6,20	6,12	3,91
15	CG4E	5,5	0,10	0,66	2,37	2,78	3,96	3,56	2,04	0,12
16	CG4E-FG	5,5	0,09	1,16	4,75	4,45	5,61	5,94	6,33	4,04
17	CG6E	5,5	0,10	0,62	2,45	2,74	4,26	4,36	3,04	0,20
18	CG6E-FG	5,5	0,00	1,17	4,66	4,38	5,77	6,06	6,27	4,26
19	CG8E	5,5	0,10	0,77	2,18	2,26	2,36	2,33	2,10	1,32
20	CG8E-FG	5,5	0,11	1,05	4,78	4,79	5,70	6,25	6,23	3,81
21	CG10E	5,5	0,12	0,70	2,28	2,62	3,88	4,04	2,82	0,14
22	CG10E	6,0	0,11	0,64	2,21	2,20	3,24	3,84	3,13	1,02
23	CG10E-FG	5,5	0,11	0,99	4,81	4,92	5,71	6,25	6,03	3,98
24	CG10E-FG	6,0	0,10	1,28	4,85	5,12	6,58	6,88	6,46	3,90
25	Kiểm chứng (80g đường)	5,0	0,04	0,89	6,95	9,57	11,10	11,90	12,40	11,90
26	Kiểm chứng (30g đường)	5,0	0,06	1,54	6,09	6,54	7,63	8,11	8,17	6,91
27	Kiểm chứng (không đường)	5,0	0,06	0,01	0,00	0,00	0,00	0,16	0,00	0,04

28	CG0,4E	5,5	0,09	0,12	0,15	0,11	0,15	0,07	0,84	0,05
29	CG0,4E	6,0	0,08	0,30	1,51	1,55	1,92	3,06	2,59	1,18
30	CG0,4E-FG	5,5	0,15	0,49	4,14	4,78	5,27	5,87	5,44	3,73
31	CG0,4E-FG	6,0	0,14	0,58	4,38	5,13	6,09	5,69	5,22	3,53
32	CG20E	5,5	0,18	0,27	2,55	2,70	2,71	3,19	4,14	2,56
33	CG20E-FG	5,5	0,14	0,40	4,98	5,89	5,46	5,36	5,58	3,84
34	CG30E	5,5	0,12	0,19	2,75	3,27	3,19	2,67	3,07	2,18
35	CG30E-FG	5,5	0,15	0,30	5,24	6,33	6,08	5,83	6,12	4,91
36	CG40E	5,5	0,14	0,18	3,18	4,26	4,00	3,20	3,55	2,90
37	CG40E-FG	5,5	0,14	0,30	5,62	6,50	6,99	6,74	6,91	5,37
38	CG50E	5,5	0,17	0,22	3,06	4,33	4,27	3,97	3,60	3,38
39	CG50E	6,0	0,17	0,37	4,47	4,62	5,11	4,93	5,13	3,60
40	CG50E-FG	5,5	0,17	0,27	5,77	7,93	7,58	6,95	6,92	5,90
41	CG50E-FG	6,0	0,16	0,34	6,23	7,70	7,13	5,94	5,81	4,25
42	CG60E	5,5	0,14	0,18	4,24	5,76	5,99	5,58	5,56	4,33
43	CG60E-FG	5,5	0,13	0,25	6,01	8,36	8,92	8,42	8,47	7,63
44	CG70E	5,5	0,15	0,17	6,61	6,40	6,63	6,41	6,35	5,57
45	CG70E-FG	5,5	0,13	0,20	4,52	8,98	9,25	8,75	8,68	7,44
46	CG80E	5,5	0,13	0,18	5,13	7,20	6,93	6,69	7,12	5,88
47	CG80E-FG	5,5	0,14	0,20	6,96	9,58	10,20	9,54	9,03	8,52
48	CG90E	5,5	0,14	0,16	5,10	7,34	7,69	7,07	7,40	6,83
49	CG90E-FG	5,5	0,15	0,21	7,03	9,42	11,50	11,00	9,79	8,90
50	CG100E	5,5	0,18	0,20	5,84	8,05	8,99	8,52	8,32	7,14
51	CG100E	6,0	0,15	0,24	6,46	9,03	8,73	8,75	8,38	5,94
52	CG100E	6,25	0,16	0,18	6,45	9,13	8,88	8,21	7,78	6,56
53	CG100E-FG	5,5	0,13	0,14	7,30	8,87	10,90	10,20	10,40	9,28
54	CG100E-FG	6,0	0,13	0,24	7,30	10,40	10,50	10,10	9,73	8,43
55	CG100E-FG	6,25	0,13	0,19	7,33	10,50	10,70	10,60	10,00	8,94
56	CG110E	5,5	0,16	0,12	6,19	7,95	9,65	8,60	8,66	7,94
57	CG110E	6,0	0,19	0,22	6,35	8,76	9,26	8,70	8,21	7,12
58	CG110E-FG	5,5	0,15	0,14	7,06	8,80	10,40	10,10	9,74	8,88
59	CG110E-FG	6,0	0,14	0,19	7,70	10,50	11,60	10,90	10,00	8,57
60	CG120E	5,5	0,19	0,14	6,45	7,83	9,88	9,79	8,91	8,11
61	CG120E-FG	5,5	0,15	0,13	7,35	9,02	10,60	10,70	10,00	8,88
62	Kiểm chứng (80g đường)	5,0	0,10	0,54	5,22	8,46	9,85	10,90	11,90	12,50
63	Kiểm chứng (30g đường)	5,0	0,09	0,97	5,79	7,07	8,41	8,63	8,82	4,50
64	Kiểm chứng	5,0	0,07	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

65	CG130E	5,5	0,10	0,19	6,71	8,15	9,88	9,13	9,16	9,15
66	CG130E	6,0	0,11	0,28	6,62	9,15	9,86	9,27	9,20	8,52
67	CG130E-FG	5,5	0,11	0,20	7,42	8,72	10,50	10,50	10,10	9,45
68	CG130E-FG	6,0	0,11	0,25	7,08	9,72	10,30	10,50	9,87	8,95
69	CG140E	5,5	0,11	0,16	6,27	7,43	9,27	9,23	9,03	8,82
70	CG140E	6,0	0,09	0,22	6,34	7,90	9,44	8,94	8,88	8,17
71	CG140E-FG	5,5	0,10	0,17	7,08	8,22	9,88	10,10	9,88	8,80
72	CG140E-FG	6,0	0,10	0,30	7,21	9,50	10,30	10,20	9,64	8,72
73	CG150E	5,5	0,10	0,16	6,04	7,65	9,00	8,96	9,20	9,14
74	CG150E	6,0	0,9	0,21	6,89	8,80	9,92	9,90	9,69	8,62
75	CG150E	6,25	0,12	0,23	6,29	8,91	9,66	7,52	9,29	8,38
76	CG150E-FG	5,5	0,10	0,18	5,86	8,36	9,73	9,41	9,31	8,87
77	CG150E-FG	6,0	0,10	0,27	7,05	9,63	9,81	9,76	9,26	8,31
78	CG150E-FG	6,25	0,06	0,28	6,89	8,86	8,90	9,95	7,52	5,97
79	CG160E	5,5	0,10	0,12	6,02	7,55	8,99	8,70	8,62	7,92
80	CG160E-FG	6,0	0,10	0,20	6,92	9,11	9,84	10,10	9,53	8,58
81	CG170E	5,5	0,10	0,14	4,89	7,39	8,60	9,49	8,68	7,59
82	CG170E-FG	6,0	0,11	0,19	7,18	8,66	10,10	9,49	9,16	7,99
83	CG180E	5,5	0,11	0,15	6,27	7,37	8,65	9,58	8,38	7,95
84	CG180E-FG	6,0	0,11	0,22	7,00	8,69	9,22	8,98	8,84	7,85
85	CG190E	5,5	0,01	0,15	5,12	6,92	8,00	9,50	8,65	8,37
86	CG190E-FG	6,0	0,09	0,17	6,66	7,92	9,12	8,87	8,75	8,03
87	CG200E	5,5	0,10	0,15	5,75	7,12	8,68	9,05	7,99	7,55
88	CG200E	6,0	0,08	0,16	6,38	8,80	8,92	8,57	8,30	6,98
89	CG200E	6,25	0,10	0,22	6,28	8,17	8,55	8,67	8,30	7,84
90	CG200E-FG	5,5	0,01	0,16	5,54	7,47	8,69	8,50	8,32	7,67
91	CG200E-FG	6,0	0,11	0,21	5,69	7,78	8,90	8,75	8,44	7,40
92	CG200E-FG	6,25	0,11	0,19	6,29	8,30	9,37	9,08	7,93	7,31
93	Kiểm chứng (80g đường	5,0	0,02	0,50	4,25	6,81	7,75	8,90	8,72	9,46
94	Kiểm chứng (30g đường)	5,0	0,04	0,59	4,49	5,29	6,19	8,60	5,81	5,72

95	Kiểm chứng (Không đường)	5,0	0,04	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
96	Không mẫu, canh thịt chi có xyloza	4,5	0,03	0,28	2,07	3,82	4,37	5,44	6,41	6,72
97		5,0	0,04	0,27	2,63	4,15	7,42	8,16	8,63	9,13
98		5,5	0,04	0,34	2,94	5,00	5,96	7,96	8,77	9,39
99		6,0	0,04	0,29	2,27	5,05	6,29	7,33	8,27	8,36
100	Không mẫu, canh thịt chi có xyloza	6,5	0,04	0,28	1,59	4,40	5,72	5,61	6,93	6,21
101		4,5	0,02	0,18	1,50	2,13	1,91	2,37	1,99	0,23
102		5,0	0,04	0,13	1,62	2,72	2,76	2,36	2,45	1,45
103		5,5	0,04	0,12	0,99	2,31	1,62	1,52	1,41	0,06
104		6,0	0,04	0,09	0,87	1,77	1,90	2,03	1,66	0,09
105	có xyloza	6,5	0,04	0,13	1,17	2,54	2,66	2,69	2,08	0,89

Dữ liệu trong Bảng 1 cho thấy rằng hiệu suất của etanol thường tăng khi liều lượng hoặc bức xạ tăng, lên đến 90 Mrad, sau đó hiệu suất chững lại ở các liều lượng cao. Đối với liều lượng bức xạ và độ pH đã chọn, hiệu suất thường cao hơn đáng kể khi cò đã được để đông lạnh. Đối với cò không được chiếu xạ, hoặc chỉ được chiếu xạ với liều lượng thấp, hiệu suất cao hơn đáng kể nếu cò đã được để đông lạnh.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp làm lạnh và xử lý nguyên liệu bao gồm các bước:
 - tán nhỏ nguyên liệu sinh khối lignoxenluloza;
 - làm lạnh nguyên liệu sinh khối đã tán nhỏ đến 280°K (6,85°C) hoặc thấp hơn;
 - sau khi làm lạnh, tán nhỏ nguyên liệu sinh khối đã làm lạnh này;
 - trước khi hoặc sau khi làm lạnh, chiếu xạ nguyên liệu sinh khối này;
 - sau bước tán nhỏ thứ hai, cho nguyên liệu này tiếp xúc với enzym và/hoặc vi sinh vật để giải phóng đường; và
 - lên men đường đã giải phóng này.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nguyên liệu sinh khối này được chiếu xạ sau khi làm lạnh.
3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nguyên liệu sinh khối này được chiếu xạ trước khi làm lạnh.
4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc làm lạnh được thực hiện trong thiết bị nghiền đông lạnh hoặc thiết bị cán đông lạnh.
5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc lên men được thực hiện trong điều kiện được chọn để tạo ra rượu.
6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó rượu là etanol hoặc n-butanol.
7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc làm lạnh bao gồm việc làm lạnh nguyên liệu đến nhiệt độ dưới điểm giòn của nguyên liệu.
8. Phương pháp theo điểm 2, trong đó phương pháp này còn bao gồm việc làm lạnh lại sau khi chiếu xạ.
9. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc làm lạnh bao gồm việc tuần hoàn nhiệt độ nguyên liệu ban đầu.
10. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nguyên liệu sinh khối này có mật độ khối nhỏ hơn 0,3 g/cm³.

11. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc chiếu xạ được thực hiện bằng cách sử dụng chùm tia điện tử.
12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó nguyên liệu sinh khối tiếp nhận liều lượng bức xạ nằm trong khoảng từ 10 MRad đến 100 MRad.
13. Phương pháp theo điểm 11, trong đó nguyên liệu sinh khối tiếp nhận liều lượng bức xạ nằm trong khoảng từ 30 MRad đến 90 MRad.
14. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nguyên liệu sinh khối được chọn từ nhóm bao gồm gỗ, cỏ, vỏ thóc, bã mía, cây đay, cây gai dầu, cây gai, tre, cây sidal, cây chuối abaca, rom, lõi ngô, vỏ dừa, tảo, rong biển, và hỗn hợp của các nguyên liệu bất kỳ này.
15. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nguyên liệu sinh khối có mật độ khối nhỏ hơn $0,8 \text{ g/cm}^3$.

1/2

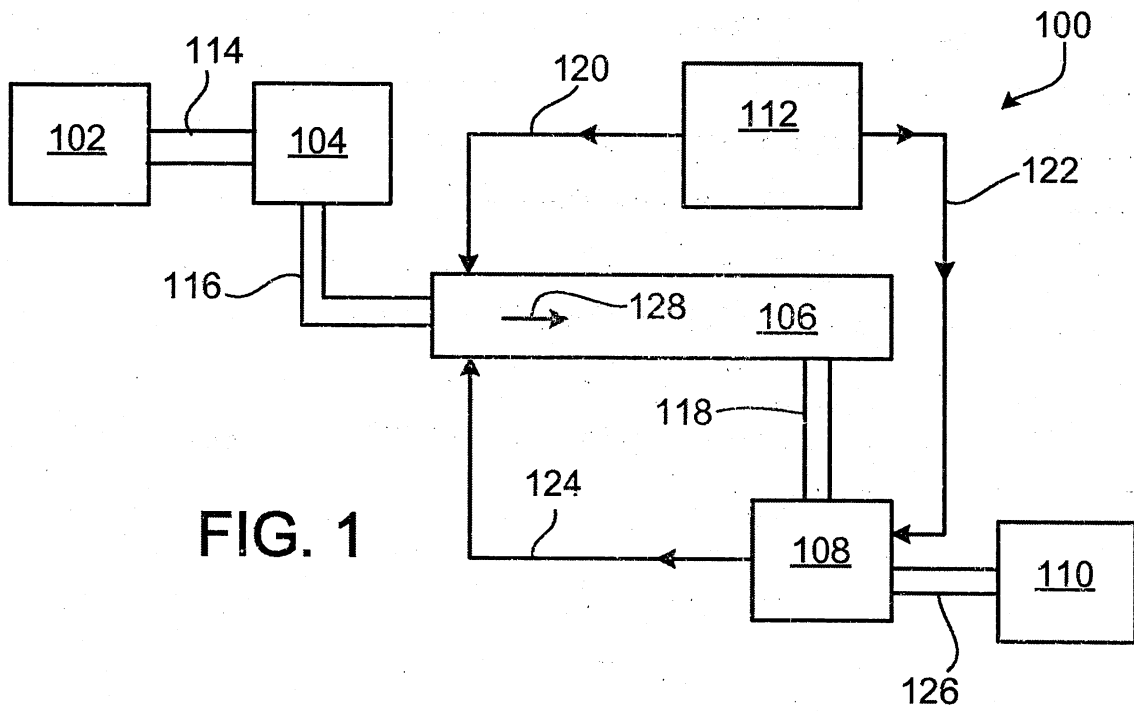


FIG. 1

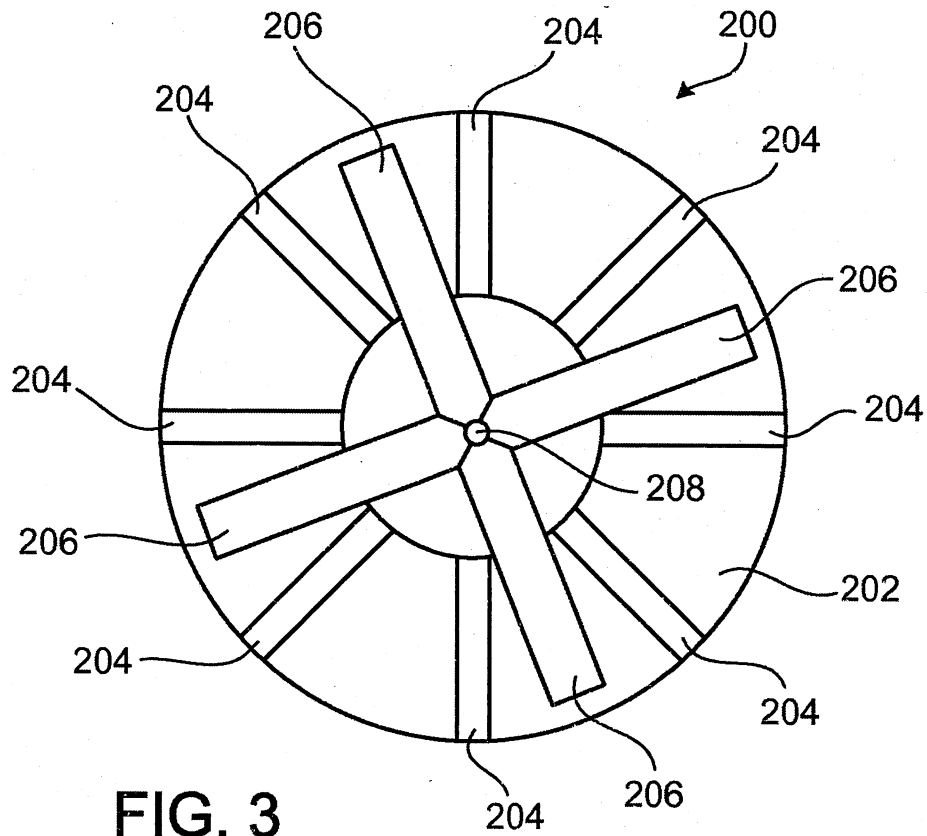


FIG. 3

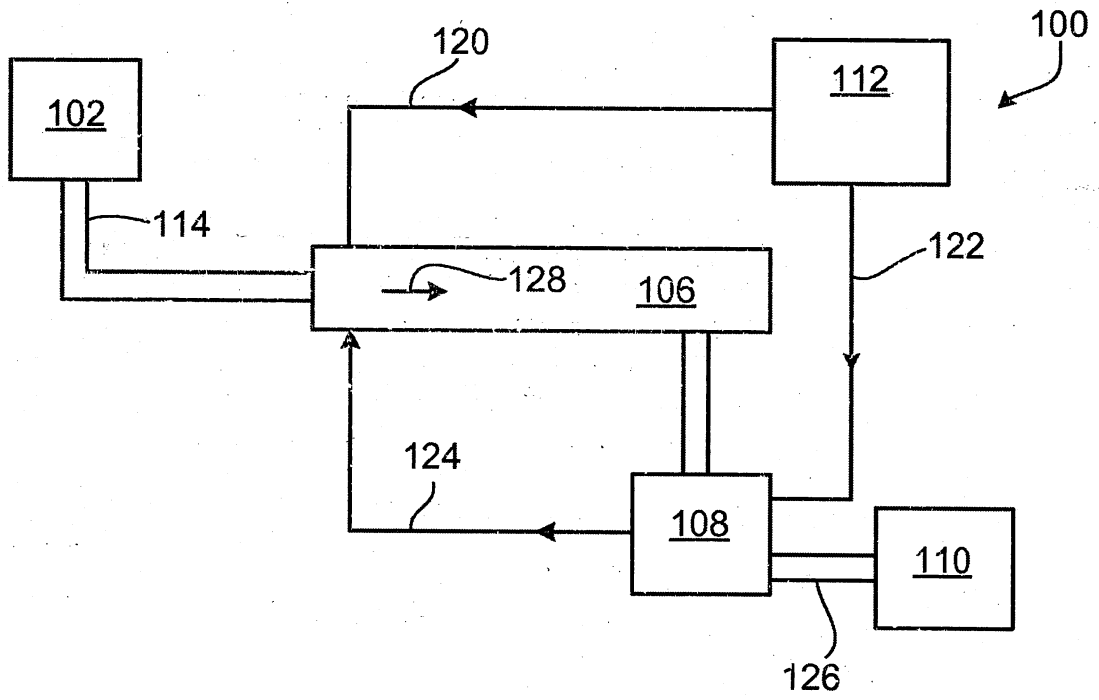


FIG. 2