



(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) 
1-0021195

(51)⁷ **C12P 19/14**

(13) **B**

(21)	1-2011-03614	(22)	26.05.2010		
(86)	PCT/IN2010/000355	26.05.2010	(87)	WO2010/137039	02.12.2010
(30)	1299/MUM/2009	26.05.2009	IN		
	1314/MUM/2009	29.05.2009	IN		
(45)	25.06.2019	375	(43)	27.08.2012	293
(76)	LALI, ARVIND MALLINATH (IN) Chemical Engineering Department, Institute of Chemical Technology (Deemed University), Nathalal Parikh Marg, Matunga (East) Mumbai 400 019, India				
(74)	Công ty Luật TNHH AMBYS Hà Nội (AMBYS HANOI)				

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT ĐƯỜNG LÊN MEN ĐƯỢC TỪ SINH KHỐI**

(57) Sáng chế đề cập tới quy trình sản xuất đường lên men được từ sinh khối bằng cách sử dụng hệ nhiều bước nhiều enzym. Quy trình được bộc lộ trong sáng chế cung cấp đường có năng suất cao trong một khoảng thời gian ít hơn. Hệ nhiều enzym được bộc lộ trong sáng chế chuyển hóa xenluloza, hemixenluloza và/hoặc hỗn hợp của chúng thành đường lên men được với hiệu suất cao và tính kinh tế tốt hơn so với quy trình đã biết trong tình trạng kỹ thuật. Xenluloza và hemixenluloza lấy được từ các nguồn tự nhiên như sinh khối lignoxenluloza bất kỳ được đường hóa trong thời gian được rút ngắn với các tốc độ chuyển hóa cao các chất trung gian được biến đổi bằng các chế phẩm/nhóm enzym của hệ nhiều enzym để nâng cao tốc độ và do đó cung cấp một quy trình đường hóa xenluloza và hemixenluloza có tính kinh tế.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập tới lĩnh vực sản xuất đường lên men được từ sinh khối để sản xuất nhiên liệu sinh học và các sản phẩm thứ cấp khác.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Lignin và hai polysacarit hemixenluloza và xenluloza tạo thành ba thành phần chính của thực vật và được gọi chung là lignoxenluloza. Trong ba thành phần này, xenluloza và hemixenluloza là các polyme cơ bản gồm có các monome đường như glucoza, xyloza, galactoza, arabinoza, v.v.. Do đó, xenluloza và hemixenluloza nhận được từ phế thải thực vật, nếu được thủy phân thành các đường monome, có thể tạo thành nguồn nguyên liệu thô hoàn nguyên phong phú và hữu dụng dùng cho các loại hóa chất và hóa sinh hữu dụng. Chuyển hóa nguyên liệu lignoxenluloza composit được nén chặt nói chung thành đường được thực hiện bằng một quy trình hỗn hợp được biết đến là thủy phân và đường hóa. Nghiên cứu rộng rãi các quy trình đường hóa để chuyển hóa các lignoxenluloza thành đường đi theo ba phương pháp chính. Thứ nhất là thủy phân bằng hóa học, thứ hai là thủy phân bằng nhiệt và thứ ba là thủy phân bằng enzym.

Trong quy trình thủy phân bằng hóa học nói chung, hemixenluloza được tách ra trong bước thứ nhất từ nguyên liệu composit lignoxenluloza bằng cách thêm axit hoặc kiềm. Nguyên liệu thực vật/sinh khối được trộn với dung dịch axit hoặc kiềm loãng và sau đó được đun nóng. Quy trình này giải phóng và "thủy phân" hemixenluloza. Thủy phân hemixenluloza tạo ra các đường pentoza (các đường C5) cũng như một số các đường hexoza (các đường C6). Bước thứ hai là quá trình thủy phân axit ở nhiệt độ cao hơn để thủy phân xenluloza của nguyên liệu thực vật, tạo ra hầu như chỉ có các đường C6 (hexoza), và lignin. Các đường C6, khi được phân tách cơ bản từ lignin, có thể lên men dễ dàng, và lignin thu hồi có thể được sử dụng dùng làm nhiệt quy trình hoặc tạo ra các sản phẩm khác.

Các quy trình thủy phân bằng axit hai giai đoạn được sử dụng trong nhiều năm nay. Tuy nhiên, người ta hiện biết rằng các quy trình axit cũng tạo ra các chất hóa học khác với đường điều này không chỉ thể hiện sự mất mát trong quy trình mà còn dẫn tới những vấn đề sau này trong khi sử dụng đường trong các quá trình xuôi dòng như sự lên men cho các sản phẩm hữu dụng như axit lactic, rượu, các axit hữu cơ, v.v.. Vấn đề lớn khác của các hệ này là axit phải được thu hồi để tái sử dụng hoặc phải được trung hòa nhờ sử dụng vôi để làm giảm dòng thải và các vấn đề ô nhiễm.

Mặt khác các quá trình tự sinh nhiệt không tạo ra sự sử dụng bất cứ chất hóa học nào và do đó là các quy trình sạch. Nhiệt độ cao và phơi ngắn như được sử dụng trong quy trình Nổ Hơi Nước, dẫn tới làm hỏng sinh khối lignoxenluloza thành đường đơn và lignin bị thủy phân. Tuy nhiên, các quy trình này chịu các hạn chế như hiệu suất được thấp, sự tạo thành các sản phẩm phụ không mong muốn làm ức chế các quy trình xuôi dòng, và tổn năng lượng.

Sử dụng các enzym, trước một số hoặc các bước tiền xử lý nhẹ khác, cung cấp quy trình năng lượng thấp và sạch hơn nhiều để thủy phân xenluloza và hemixenluloza và đường hóa và cuối cùng là cung cấp sản phẩm cuối chất lượng tốt hơn, tức là đường có hiệu suất cao hơn.

Một vài enzym được biết đến là để thủy phân đặc hiệu, hoặc không đặc hiệu các polysaccharit ở thành tế bào thực vật. Các enzym này được nhận từ các phân lọc môi trường nuôi cấy vi sinh vật được thấy có các ứng dụng ở quy mô lớn để thủy phân các thành phần ở thành tế bào (Reese, E. T. et al, Can. J. Microbiol. 19, 1973, 1065-1074). Các vi sinh vật tạo ra nhiều protein, và một số vi sinh vật cũng tạo ra các enzym chia tách xenluloza và/hoặc hemixenluloza. Hầu hết các báo cáo và các công nghệ đều sử dụng các enzym xúc tác này dưới dạng hòa tan tự do mà không thể được thu hồi để tái sử dụng. Hơn nữa, thường các chất cụ thể như các polyme của xenluloza và/hoặc hemixenluloza và các sản phẩm thủy phân của chúng, có xu hướng "ức chế, các hoạt động của các enzym". Như vậy việc sử dụng các enzym này làm chúng ít hấp dẫn để sử dụng trên phạm vi thương mại hoặc làm cho việc sử dụng các enzym tốn kém hơn so với thường được mong muốn. Do đó, vì lý do chi phí, lượng enzym được sử dụng trên mỗi đơn vị trọng lượng xenluloza và/hoặc hemixenluloza được thủy phân thường

được giữ tới mức nhỏ nhất, nên nó lần lượt làm giảm tốc độ các phản ứng thủy phân và làm tăng thời gian phản ứng.

Những lý do nêu trên, và những lý do khác được chỉ ra bên dưới sẽ trở nên rõ ràng đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này thông qua việc đọc và hiểu bản mô tả của sáng chế, rằng trong lĩnh vực kỹ thuật này cần một nhu cầu đáng kể cho các hệ thống và phương pháp mà chúng cung cấp sự chuyển hóa sinh khối thành đường được cải thiện theo cách thức hiệu quả về mặt kinh tế. Các thiếu sót của quy trình enzym có thể được giảm bớt, điều này làm cho quy trình enzym thành một sự lựa chọn rõ ràng để phát triển quy trình mới.

Xenluloza và hemixenluloza là các polysacarit phong phú nhất đứng thứ nhất và thứ nhì trong tự nhiên. Xenluloza chiếm từ 30 tới 60% trong khi hemixenluloza chiếm khoảng 20 đến 35% sinh khối của lignoxenluloza (LBM) như chất xơ ngô, thân rạ ngô, vỏ trấu lúa mì, vỏ trấu lúa, và bã mía. Trong khi xenluloza là polyme gần như đồng nhất gồm hàng trăm tới hàng nghìn đơn vị D-glucosa được liên kết nhờ các mối liên kết 1,4 β -glycosidic, hemixenluloza là các polyme không đồng nhất gồm pentoza (xyloza, arabinoza), hexoza (mannoza, glucosa, galactosa), và các axit đường. Các hemixenluloza của cây gỗ cứng chứa hầu hết các xylan, trong khi các hemixenluloza của cây gỗ mềm chứa hầu hết các glucomannan. Xylan của hầu hết các nguyên liệu thực vật do đó là heteropolysacarit với các chuỗi trục chính homopolyme có các đơn vị D-xylopyranoza- β liên kết-1,4. Ngoài xyloza, xylan cũng có thể chứa arabinoza; axit glucuronic hoặc 4-O-metyl ete của nó; và các axit axetic, ferulic, và axit p-coumaric. Tần số xuất hiện và thành phần của các nhánh phụ thuộc vào nguồn xylan trong khi trục chính gồm các nhóm thế của axit O-axetyl, α -arabinofuranosyl, glucuronic liên kết- α -1,2 hoặc 4-O-metylglucuronic.

Cả hai thành phần xenluloza và hemixenluloza được biến đổi hiệu quả thành các thành phần đường đơn của chúng, các thành phần này trước tiên phải được chiết từ phức chất của lignoxenluloza. Đường hóa bằng enzym hai thành phần này sử dụng xenlulaza và hemixenluloza là phương pháp ưu tiên do hoạt động nhanh của enzym, và sự mất mát cơ chất và sự tạo ra sản phẩm phụ không đáng kể. Cả xenluloza và hemixenluloza trong LBM nguyên vẹn, tuy nhiên, không sử dụng được để thủy phân

bằng enzym. Và do đó xử lý sơ bộ LBM làm cho chúng tuân theo hoạt động của enzym là có tính bắt buộc (Himmel, M. E. *et al*, 2007; Bothast and Saha, 1997). Trong khi xenluloza, mặc dù là một homopolyme, là một tinh thể rất kênh cang và là một phân tử chặt, cấu trúc của hemixenluloza là phức tạp hơn vì nó gồm pentoza, một số hexoza và các nhóm mạnh phụ như các axit axetyl và uronic. Do đó, hoạt động thủy phân bằng enzym cả xenluloza và hemixenluloza yêu cầu hoạt động kết hợp của hơn một enzym. Để thủy phân xenluloza, cấu trúc tinh thể của xenluloza cần được làm thành dạng vô định hình một phần hoặc hoàn toàn sau khi hỗn hợp xenlulaza exo và endo được yêu cầu chuyển hóa xenluloza polyme thành các phân tử oligome nhỏ hơn nhiều. Mặt khác, trong trường hợp hemixenluloza, sự có mặt của các nhóm chuỗi bên làm cản trở sự hoạt động của các enzym khử trùng hợp trực chính, tức là các xylanaza exo và endo, và các mannanaza. Để giải quyết vấn đề này, các enzym phụ trợ như α -L-arabinofuranosidaza, α -glucuronidaza, axetylxytan esteraza, esteraza của axit ferulic, và esteraza của axit p-coumaric mà các enzym phụ trợ này có khả năng thủy phân các chuỗi bên phải xuất hiện với các hemixenluloza chính để đạt được sự phân hủy hoàn toàn hemixenluloza để thu được các hiệu suất cao đường monosacarrit (Biely and Tenkanen, 1998).

Do trường hợp như vậy, các chế phẩm xenluloza và hemixenluloza được sử dụng để khử trùng hợp hoặc thủy phân xenluloza và hemixenluloza, tương ứng, chứa vô số các enzym chính và phụ mà tất cả các enzym này hoạt động cùng với nhau.

Tuy nhiên, mặt khác, hiện đều biết rằng, các chất ban đầu và trung gian xuất hiện trong suốt quy trình thủy phân polyme liên tục mà phức tạp, các chất này có xu hướng hoạt động giống như các chất ức chế một phần hoặc hoàn toàn các enzym có mặt trong các chế phẩm hỗn hợp được sử dụng (Beguin P *et.al*, (1994), FEMS Microbiological Review, 13, 25-58 and Ven H Tilbeurgh *et al*, Studies of the cellulytic system of *Trichoderma reesei* QM 94014 (1989), European journal of Biochemistry, 189, 553-559). Kết quả của thực tế này, và thực tế rằng người ta không thể mong muốn sử dụng thừa enzym vì các lý do chi phí, các quy trình đường hóa bằng enzym cho cả xenluloza và hemixenluloza đều là các phản ứng diễn ra trong thời gian dài yêu cầu khoảng thời gian từ 24 tới 48 giờ, và thường lâu hơn để hoàn thành. Người ta từ lâu đã chấp nhận

rằng các enzym là các chất xúc tác thực sự hiệu quả. Tuy nhiên, vì nhận được từ nguồn sinh học và được tinh chế, ít nhất một phần, và vì bản chất nhạy và yếu, vốn phức tạp của chúng, các enzym là tốn kém và không có tính ổn định. Điều này tạo ra một số hạn chế về phổ và phạm vi ứng dụng của các enzym trong công nghiệp (F. Dourado *et al*, 2002, Journal of Biotechnology, 99, 121-131). Một vài phương pháp được tạo ra để làm cho các enzym ổn định và ít tốn kém nhằm sử dụng cho các ứng dụng quy mô sản xuất. Do đó, các enzym mới, gồm các xenlulaza và hemixenlulaza, được phát triển và được sản xuất do chúng ổn định ở khoảng nhiệt độ, pH rộng và các điều kiện khác nhiệt khác như sự có mặt của các chất ức chế (Khare and Gupta, 1988, Applied Biochemistry and Biotechnology, 16, 1-15, Busto *et al*, Bioresource Technology, 1997, 60, 27-33). Tuy nhiên, mặc dù có những nỗ lực này, nhưng các enzym hiện nay góp phần đáng kể vào chi phí để chuyển hóa xenluloza và hemixenluloza vào các đường đơn giản.

Một cách làm giảm chi phí enzym là sử dụng các enzym dưới dạng bất động, hoặc dưới dạng, hoặc theo cách mà cho phép tái sử dụng các enzym qua nhiều chu trình, hoặc các khoảng thời gian kéo dài. Do đó, dưới dạng hoặc cách thức có thể tái sử dụng, các enzym được giữ trong thiết bị phản ứng, trong khi (các) cơ chất và (các) sản phẩm đi vào và đi ra, theo kiểu mẻ hoặc liên tục. Tuy nhiên, sử dụng enzym dưới dạng bất động trên chất nền rắn, yêu cầu các chất phản ứng (hoặc các cơ chất) và các sản phẩm dưới dạng hòa tan để tạo thuận lợi cho phản ứng. Hơn nữa, khi sử dụng enzym cho các phản ứng có các chất phản ứng polyme và các sản phẩm (như xenluloza và hemixenluloza), khả năng dễ bị ảnh hưởng của các enzym trong các lỗ xóp của chất nền cố định làm giới hạn tốc độ và các phản ứng trở nên quá chậm để sử dụng thực tế (Woodward J. 1989, Journal of biotechnology, 11, 299-311). Điều này, và thực tế rằng xenluloza là chất rắn không tan và hemixenluloza là polyme với tính hòa tan thấp trong nước, đã làm ngăn việc sử dụng các xenlulaza và hemixenlulaza dưới các dạng bất động và/hoặc có thể tái sinh.

US4200692 bộc lộ quy trình để sản xuất xyloza bằng cách thủy phân xylan bằng enzym trong đó các enzym được làm bất động tách biệt nhau nhưng được ủ cùng với nhau và, dung dịch xylan được làm vỡ thành xylobioza và xyloza và các đường axit.

Sau tổng thời gian là 4 giờ, sự thủy phân thành xyloza và axit 4-O-metylglucuronic được thấy. US2008/065433 bộc lộ quy trình thu được etanol nhiên liệu bằng cách sử dụng các nguyên liệu thải của ngành nông nghiệp và công nghiệp chế biến nông nghiệp gồm có lignoxenluloza, và đặc biệt là bã mía. Phần hemixenluloza được đưa vào để thủy phân nhẹ bằng axit sulphuric, và nguyên liệu rắn từ sự thủy phân này được đưa vào quy trình đường hóa (thủy phân bằng enzym) với sự lên men rượu nhanh đồng thời dưới các điều kiện cho phép làm tăng đáng kể sự chuyển hóa thành rượu trong khoảng thời gian được rút ngắn lớn, khoảng từ 8 tới 32 giờ.

US6423145 bộc lộ phương pháp thủy phân xenluloza và hemixenluloza trong nguyên liệu lignoxenluloza bằng axit loãng được biến đổi dưới điều kiện để thu được hiệu suất đường lên men được toàn bộ cao hơn, gồm có: thấm nguyên liệu lignoxenluloza bằng hỗn hợp của một lượng dung dịch nước chất xúc tác là axit loãng và chất xúc tác là muối kim loại, đưa nguyên liệu lignoxenluloza đã được thấm này vào trong thiết bị phản ứng và làm nóng trong một khoảng thời gian đủ để thủy phân cơ bản tất cả hemixenluloza và lớn hơn 45% xenluloza thành các đường có thể tan trong nước; và thu thồi các đường có thể tan trong nước này.

US2009/098618 bộc lộ phương pháp xử lý các nguyên liệu thực vật để sinh ra các đường lên men được. Nguyên liệu lignoxenluloza được đưa lên đĩa để tinh chế cùng với thủy phân bằng enzym để tạo ra hơi quy trình giàu đường mà hơi này có thể sau đó cho lên men để tạo ra các nhiên liệu sinh học và các chất hóa học.

US5348871 bộc lộ quy trình chuyển hóa các nguyên liệu xenluloza, như giấy thải, thành các nhiên liệu và các chất hóa học sử dụng phương pháp thủy phân bằng enzym các thành phần chính của giấy, xenluloza. Huyền phù đặc giấy thải được tiếp xúc bằng xenlulaza trong thiết bị thủy phân được khuấy mạnh. Glucoza được tạo ra từ thiết bị thủy phân được lên men thành etanol trong thiết bị phản ứng sinh học tăng sôi, hình trụ, liên tục sử dụng các vi sinh vật bất động. Quy trình được bộc lộ trong sáng chế yêu cầu "nhiều giờ đến nhiều ngày cho các hiệu suất có thể chấp nhận được".

US5637502 bộc lộ quy trình theo mẻ để chuyển hóa các nguyên liệu xenluloza thành các nhiên liệu và chất hóa học, như đường, etanol, sử dụng sự thủy phân xenluloza bằng enzym. Huyền phù đặc giấy thải được tiếp xúc bằng xenlulaza trong

thiết bị thủy phân được khuấy mạnh. Máy khuấy và thiết bị phản ứng xenlobiaza được gắn với thiết bị thủy phân được lắc mạnh để nâng cao hiệu suất phản ứng. Ngoài ra, các bước vi lọc, lọc nhờ siêu âm và thẩm lọc ngược được kể đến để làm tăng thêm hiệu suất phản ứng và thu hồi các enzym. Các đường tạo ra được chuyển hóa thành sản phẩm etanol loãng trong thiết bị phản ứng sinh học tăng sôi sử dụng chất xúc tác sinh học, như các vi sinh vật. Thời gian thủy phân xenluloza từ giấy là khoảng 24 giờ.

US227162 bộc lộ phương pháp chuyển hóa lignoxenluloza thành được với các sự nâng cao về hiệu suất và tốc độ sản xuất đường bằng cách sử dụng phương thức xử lý sơ bộ chất lỏng ion. Tuy nhiên, thời gian được yêu cầu để thủy phân một mẻ hoàn thiện bằng enzym là trong khoảng thời gian từ 16 tới 36 giờ cho hai mẫu sinh khối - là thân rạ ngô, cây dương cơ bản với thời gian lâu hơn.

US5932452 bộc lộ quy trình để thủy phân chất hemixenluloza chứa các xylo-oligome, thu được từ sinh khối thực vật bị tiêu hủy thành hơi hoặc xylan được thủy phân sơ bộ một phần bằng enzym, nhờ enzym bất động. Quy trình này, tuy nhiên, có đòi hỏi trước hết việc tạo ra hemixenluloza đã bị thủy phân một phần mà nó nói cách khác cần được thu từ sinh khối thực vật nhờ quy trình thích hợp như nổ hơi. Nổ hơi là quá trình thủy nhiệt và được biết đến để tạo ra các dẫn xuất furfural mà các dẫn xuất này được biết đến là để tác động đến cả sự chuyển hóa bằng enzym, và các hiệu suất lên men sau này.

US2008/076159 bộc lộ các phương pháp tạo ra các enzym hoặc các tổ hợp enzym mới, chúng cung cấp sự giải phóng đường đồng vận từ sinh khối đã được xử lý sơ bộ. Tuy nhiên, quy trình đã bộc lộ không làm giảm giai đoạn đường hóa mà giai đoạn này kéo dài trong khoảng thời gian từ 24 tới 72 giờ.

EP2017349 bộc lộ phương pháp xử lý nguyên liệu polyme thô bằng enzym trực tiếp và phân tách các thành phần tan thu được. Tuy nhiên, lại không đề cập tới sự thu hồi và tái sử dụng các enzym, và thời gian thủy phân cũng là thời gian bị kéo dài.

WO/2006/063467 bộc lộ hệ thống quy trình liên tục để thủy phân xenluloza đã được xử lý sơ bộ bằng enzym gồm có đưa huyền phù đặc có nước của nguyên liệu xenluloza đã được xử lý sơ bộ ở đáy thiết bị phản ứng thủy phân hình trụ thẳng đứng.

Phân tán quanh trục trong thiết bị phản ứng được giới hạn bằng cách tránh khuấy trộn và giữ vận tốc dòng huyền phù đặc trung bình trong khoảng từ 0,03 tới 6 mét/giờ, do đó các chất rắn không bị hòa tan chảy lên phía trên ở tốc độ chậm hơn so với tốc độ của chất lỏng. Các enzym xenlulaza được bổ sung vào huyền phù đặc có nước trước khi hoặc trong bước đưa vào. Luồng nước gồm có các sản phẩm thủy phân và các chất rắn không bị thủy phân được loại bỏ khỏi thiết bị phản ứng thủy phân và sau khi phân tách chất rắn, xenluloza không bị thủy phân được phục hồi. Cũng được đề xuất là các chế phẩm enzym gồm các enzym xenlulaza và các dạng tủa bông để sử dụng trong quy trình. Ngoài ra, kit thử gồm có các enzym xenlulaza và dạng tủa bông được mô tả được nêu ra để cung cấp sự lộ ra enzym với cơ chất. Mặc dù sự chuyển hóa xenluloza là tốt hơn trong trường hợp này so với thiết bị phản ứng theo mẻ, nhưng thời gian yêu cầu là trong khoảng từ 48 tới 200 giờ tại mức nạp enzym tương ứng trong khoảng từ 32 đơn vị/xenluloza tới 5 đơn vị/xenluloza.

WO/2009/004950 bộc lộ monosacarit và/hoặc polysacarit tan trong nước có thể được tạo ra với mức độ hiệu suất cao bằng cách thủy phân nguyên liệu chứa xenluloza với nguyên liệu cacbon chứa sulfonat. Nguyên liệu cacbon chứa sulfonat được sử dụng có thể được phục hoạt và được tái sử dụng bằng cách cacbon hóa và sulfonat hóa, mà không cần tách nguyên liệu cacbon chứa sulfonat từ phần chưa được phục hoạt của nguyên liệu chứa xenluloza. Phương pháp này, không sử dụng bất cứ enzym nào, nên phương pháp này có thể làm giảm chi phí thủy phân, có thể làm giảm chất thải, và do đó có thể góp phần bảo vệ môi trường toàn cầu.

Khái niệm thủy phân bằng enzym xenluloza và hemixenluloza được biết đến từ lâu. Như được mô tả bên trên, hầu hết các quy trình thủy phân bằng enzym như sử dụng hoặc như đã được báo cáo là các quy trình theo mẻ và kéo dài từ 12 tới 48 giờ để đường hóa hoàn toàn. Thường xuyên, các quy trình enzym vẫn không hoàn thiện dẫn tới chi phí enzym cao và phản ứng chậm dẫn tới nguyên liệu để đưa vào quy trình là thấp và do đó các thiết bị phản ứng lớn có chi phí vốn cao. Trong khi sử dụng các liều enzym cao hơn có thể làm tăng tốc độ thủy phân, việc xem xét tới chi phí làm hạn chế các liều enzym này. Hơn nữa, các liều enzym trong các quy trình theo mẻ thông thường là cao hơn so với mong muốn vì các hiệu quả ức chế của các cơ chất phản ứng

và các sản phẩm trên các enzym. Vì vậy, các phương pháp hiệu quả mới cần cho việc đường hóa hemixenluloza và xenluloza sẽ yêu cầu các liều enzym thấp trên mỗi kilo xenluloza và hemixenluloza, mà không yêu cầu nhiệt độ và áp suất cao, sẽ không tạo ra các sản phẩm phụ nguy hiểm, tiêu tốn ít thời gian, và yêu cầu ít năng lượng do đó tạo ra quy trình có thể hiệu quả hơn về mặt kinh tế.

Ở quy mô mà tại đó cho sinh khối thành đường, cây trồng dự kiến sẽ hoạt động (thường cho từ 100 đến 1000 tấn sinh khối/ngày) ở các thời gian phản ứng lớn dẫn đến các thiết bị phản ứng enzym được định cỡ lớn vượt vài 100KL dung tích. Do đó cần thiết làm tăng tốc độ phản ứng bằng cách tăng các nguyên liệu tính đo theo thể tích để đưa vào quy trình.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất hệ thống nhiều bước nhiều enzym để chuyển hóa hoàn toàn hemixenluloza, xenluloza, và/hoặc hỗn hợp của chúng, thu được từ bất cứ nguyên liệu của lignoxenluloza nào bao gồm mà không hạn chế đối với bã thải nông nghiệp, nguyên liệu thảo mộc, bã thải lâm nghiệp, chất thải rắn đô thị, bã thải từ nhà máy giấy và bột giấy, chất thải giấy hoặc bất cứ nguồn khác nào.

Mục đích khác của sáng chế là phát triển một quy trình hiệu quả, dưới dạng tốc độ quy trình và lượng enzym được dùng trên mỗi đơn vị lượng đường được tạo ra, để thủy phân hemixenluloza và xenluloza nhờ được xúc tác bằng enzym, hoặc hỗn hợp bất kỳ của chúng thành đường lên men được, trong đó quy trình là hiệu quả về mặt chi phí enzym cũng như hiệu quả về mặt thời gian, và có thể thích ứng trên quy mô công nghiệp.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất hệ nhiều enzym trong hai, hoặc nhiều bước để đường hóa hoặc khử trùng hợp hiệu quả xenluloza và hemixenluloza thành các đường lên men được.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất hệ nhiều enzym gồm ít nhất hai nhóm enzym, cùng với chọn các enzym đặc hiệu từ các nhóm đặc hiệu, cho hai hoặc bước đường hóa, nhóm được quyết định bởi bản chất các enzym và như được mô tả bên dưới.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất thêm (các) nhóm enzym đóng vai trò là các enzym phụ trợ cũng như các enzym hỗ trợ, và chúng có thể được bổ sung vào trong suốt quy trình, hoặc cùng với nhóm enzym thứ nhất, hoặc nhóm enzym thứ hai, và hoặc cả hai nhóm của quy trình nhiều bước sử dụng hệ nhiều enzym.

Mục đích thêm nữa của sáng chế là tối ưu hóa mỗi bước của quy trình đường hóa xenluloza và/hoặc hemixenluloza, với nhiệt độ, áp suất, pH, dung môi được sử dụng, thời gian tiếp xúc và các thông số khác để đạt được hơn 90%, hoặc 95% hoặc 98% sự chuyển hóa trong vài giờ.

Một khía cạnh của sáng chế đề xuất quy trình sản xuất đường lên men được từ hemixenluloza và/hoặc xenluloza sử dụng hệ nhiều enzym nhiều bước, trong đó quy trình gồm có xử lý hemixenluloza và/hoặc xenluloza với ít nhất một enzym của nhóm enzym thứ nhất tại nhiệt độ trong khoảng từ 30°C tới 90°C để thu được sản phẩm thủy phân thứ nhất, và xử lý sản phẩm thủy phân đã thu được trong bước (a) với ít nhất một enzym từ nhóm enzym thứ hai để thu được các đường lên men được; trong đó nhóm enzym thứ nhất và thứ hai có khả năng thủy phân hemixenluloza và/hoặc xenluloza.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất quy trình sản xuất đường lên men được từ sinh khối sử dụng hệ enzym đã bước nhiều enzym, trong đó quy trình gồm có trộn sinh khối với 5% tới 10% trọng lượng/thể tích kiềm có độ pH trong khoảng 12-14 tại nhiệt độ trong khoảng từ 50°C tới 200°C ở áp suất từ 0,1 đến 2MPa (1,0 đến 20bar) trong khoảng thời gian từ 5 phút tới 2 giờ để thu được huyền phù đặc sinh khối; lọc huyền phù đặc sinh khối để thu được phần lọc gồm có hemixenluloza; và phần còn lại gồm xenluloza; xử lý phần lọc bằng rượu để thu được kết tủa chứa hemixenluloza; rửa phần còn lại bằng nước để loại bỏ kiềm thừa để thu được xenluloza; rửa kết tủa để thu được hemixenluloza; xử lý hemixenluloza và/hoặc xenluloza thu được bằng ít nhất một enzym của nhóm enzym thứ nhất tại nhiệt độ trong khoảng từ 30°C tới 90°C để thu được sản phẩm thủy phân thứ nhất; và xử lý sản phẩm thủy phân đã thu được bằng ít nhất một enzym từ nhóm enzym thứ hai để thu được các đường lên men được; trong đó nhóm enzym thứ nhất và thứ hai có khả năng thủy phân hemixenluloza và/hoặc xenluloza.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa:

Thuật ngữ "đường lên men được" được sử dụng ở đây đề cập đến tất cả các đường, và hỗn hợp của chúng, có thể tan trong nước và có thể được sử dụng làm các cơ chất cacbon phù hợp với các vi sinh vật.

Thuật ngữ "thời gian lưu trong nước" (Hydraulic retention time - HRT) được sử dụng ở đây đề cập đến thời gian trung bình mà các chất phản ứng trải qua trong hệ thống thiết bị phản ứng và thời gian trung bình dùng cho phản ứng ở đây là phản ứng thủy phân hemixenluloza và/hoặc xenluloza.

Các thuật ngữ "hemixenluloza" và "xenluloza" như được sử dụng ở đây lần lượt đề cập tới các hemixenluloza và xenluloza có thể thủy phân bằng enzym mà các hemixenluloza và xenluloza này bắt nguồn từ sinh khối lignoxenluloza bất kỳ.

Sáng chế đề cập tới phương pháp nhiều bước để sản xuất đường lên men được sử dụng hệ nhiều enzym với việc chọn lọc các nhiều enzym để chuyển hóa hemixenluloza và/hoặc xenluloza thành các đường lên men được với hiệu suất cao về mặt thời gian và sử dụng enzym và do đó tốt hơn về mặt kinh tế so với cái đã biết trong tình trạng kỹ thuật. Xenluloza và hemixenluloza bắt nguồn từ các nguồn tự nhiên như sinh khối lignoxenluloza, được đường hóa trong thời gian được rút ngắn với các tốc độ chuyển hóa cao các chất trung gian đã được biến đổi bằng các chế phẩm/nhóm enzym của hệ nhiều enzym để cải thiện tốc độ, và do đó là tính kinh tế của quy trình đường hóa xenluloza và hemixenluloza.

Theo một phương án thực hiện sáng chế, đề xuất các hemixenluloza và xenluloza là các phần giàu mà các phần này bắt nguồn từ sinh khối lignoxenluloza, và các phần này có thể trải qua sự thủy phân bằng enzym dẫn tới hơn 90% thủy phân thành các đường đơn tương ứng mà không xử lý bằng bất cứ chất hóa học và/hoặc bằng cơ học nào trong và suốt quá trình thủy phân bằng enzym.

Các phần xenluloza và hemixenluloza thu được từ sự cắt phân đoạn và xử lý sơ bộ sinh khối có thể được sử dụng cho quy trình. Xenluloza và hemixenluloza tinh khiết từ các nguồn tương tự hoặc các nguồn khác cũng có thể được sử dụng. Trong sáng

chế, xenluloza và/hoặc hemixenluloza được đường hóa trong khoảng thời gian ít hơn nhiều so với khoảng thời gian đã được biết phổ biến do sự chuyển hóa hay tốc độ phản ứng cao hơn trên mỗi đơn vị thể tích của thiết bị phản ứng và toàn bộ lượng enzym được sử dụng.

Sáng chế về hệ quy trình thủy phân hoặc khử trùng hợp nhiều enzym nhiều bước bao gồm sử dụng riêng biệt và liên tục các tổ hợp enzym để chuyển các hemixenluloza và xenluloza thành đường có thể lên men và oligosacarit có thể tiếp tục được chuyển hóa thành các sản phẩm hữu dụng. Trong một số tổ hợp, quy trình nhiều bước đạt được sự chuyển hóa hydrat cacbon phức tạp như xenluloza và hemixenluloza thành các đường lên men được, và chúng cùng được đề cập tới là "đường hóa".

Tùy thuộc vào cấu trúc phức tạp của các xenluloza và hemixenluloza polyme, một số loại enzym khác nhau cần thiết cho sự phân hủy hoặc biến đổi bằng enzym của chúng. Các enzym trong các tổ hợp hoặc hỗn hợp, có thể phân hủy các polyme đường cụ thể xenluloza và hemixenluloza thành các đường đơn giản hoặc đường oligome. Các enzym có giá trị nhất dùng cho cho các quy trình này thực ra là các tổ hợp hoặc các hỗn hợp enzym thu được từ các vi sinh vật, thực vật, hoặc các sinh vật khác; và các hỗn hợp enzym hiệp lực gồm có các enzym hoặc các sản phẩm nhiều enzym từ các vi sinh vật, thực vật giống hoặc khác nhau, và các sinh vật khác hoặc các enzym và các hỗn hợp của chúng, và có thể được sản xuất tại địa phương và/hoặc thu được trong thương mại.

Theo một trong các phương án thực hiện, sáng chế đề cập tới các enzym có thể được sử dụng trong sáng chế có nguồn gốc vi khuẩn trong đó các vi sinh vật có thể, nhưng không bị giới hạn đối với, là từ tự nhiên hoặc được kỹ thuật di truyền. Các enzym này, để mục đích bộc lộ, được phân loại chung thành hai nhóm như sau cho hai lớp xenlulaza và hemixenlulaza.

Nhóm enzym thứ nhất gồm endo-glucanaza, exo-glucanaza, endo-xylanaza, exo-xylanaza, mannanaza và galactanaza từ nguồn đã biết bất kỳ. Các enzym này thuộc họ enzym thủy phân phân cắt tại các vị trí bên trong cấu trúc phân tử của cơ chất và phân cắt tại các vị trí bên ngoài cấu trúc phân tử của cơ chất, họ này được mô tả bởi khả năng phá vỡ các polysacarit khác nhau để tạo thành các oligosacarit mạch ngắn. Các

enzym này được tạo ra bởi nấm, vi khuẩn, men bia, tảo biển, sinh vật đơn bào, ốc sên, loài giáp xác, côn trùng, hạt, v.v., nhưng các nguồn thương mại chủ yếu là nấm sợi như *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, v.v.. Xylanaza có thể được phân lập từ các vi sinh vật ưa lạnh. Việc tạo ra các xylanaza, β -mannanaza, arabinanaza, và pectinaza có thể, ví dụ, được thực hiện bằng cách sử dụng nấm ưa nhiệt *Thermomyces lanuginosus*. Chủng *Trichoderma harzianum* nấm ưa lạnh T4 tạo ra các hoạt tính mannanaza và xylanaza ngoại bào khi phát triển trong sự có mặt của xylan lúa mạch (*Avena sativa*)-lúa mì spenta và cám lúa mì là các nguồn cacbon tương ứng tách biệt. Xylanaza và mannanaza có thể được thu từ *Streptomyces galbus* NR. Các nguồn xenlulaza, ví dụ, glucanaza gồm nấm như *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *Pharochoete chrysosporium*, *Fusarium solani*, *Trichoderma konigii*, *Sclerotium rolfsii*, v.v; vi khuẩn như *Sporotrichum pruniosum*, *Arthrhorhizopus* sp., *Clostridium thermocellum*, *Ruminococcus albus*, *Streptomyces* spp, v.v..

Nhóm enzym thứ hai gồm xylosidaza, mannosidaza và glucosidaza. Các enzym này thuộc họ enzym glycosidaza, chúng phá vỡ các oligosacarit được giải phóng bởi các enzym thủy phân cắt tại các vị trí bên trong cấu trúc phân tử của cơ chất và tại các vị trí bên ngoài cấu trúc phân tử của cơ chất, thành các đường monome. Xylosidaza và/hoặc các enzym từ cùng một nhóm cũng như các enzym phụ trợ thường được tạo ra cùng với xylanaza hoặc enzym chính. Tương tự, glucosidaza và/hoặc các enzym từ cùng nhóm cũng như các enzym phụ trợ cũng thường được tạo ra với các glucanaza hoặc enzym chính. Ví dụ *Piptoporus betulinus*, là các nấm làm mục cây phổ biến, tạo ra các hoạt tính endo-1,4-beta-glucanaza (EG), endo-1,4-beta-xylanaza, endo-1,4-beta-mannanaza, 1,4-beta-glucosidaza (BG), 1,4-beta-xylosidaza, 1,4-beta-mannosidaza và xenlobiohydrolaza. Nấm tạo ra chủ yếu hoạt tính beta-glucosidaza và beta-mannosidaza trong các thể quả, trong khi các hoạt tính cao hơn của endoglucanaza, endoxylanaza và beta-xylosidaza được thấy trong các câi gỗ có nấm cư trú. β -glucosidaza để thủy phân các oligome xenluloza và xenlobioza có thể được thu được từ vi sinh vật như *Piromyces* sp, *Fusarium oxysporium* v.v..

Tuy nhiên, xylosidaza và các enzym họ của nó có thể được tạo ra và được tinh chế thêm từ một số vi sinh vật đặc hiệu từ các phần chiết thô. Ví dụ, β -D-Xylosidaza

được tạo ra có hiệu suất lớn nhất từ *Humicola grisea* var. *thermoidea*. β -glucosidaza và β -xylosidaza cũng có thể được tạo ra từ men bia như *Aureobasidium* sp. Một số ví dụ khác gồm các vi khuẩn như *Agrobacterium tumefaciens* C58, *Bacillus halodurans* C-125, *Bacillus subtilis* 168, *bifidobacterium longum* NCC2705, *Caulobacter crescentus* CB15, *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Thermotoga maritima*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri* str. 306, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* str. ATCC 33913, *Cellulomonas fimi*, *Cellvibrio japonicas*, *Geobacillus stearothermophilus* T-6, *Geobacillus stearothermophilus* 21, *Penicillium wortmanni*, and *Bacillus pumilus*.

Các chế phẩm thương mại và sẵn có của cả xenlulaza và hemixenlulaza từ các nguồn khác nhau là các sự kết hợp, theo các tỷ lệ khác nhau, của các enzym khác nhau bao gồm các enzym từ hai nhóm được mô tả bên trên.

Trong sáng chế, hemixenluloza và xenluloza, hoặc hỗn hợp bất kỳ của chúng được đường hóa trong hai hoặc nhiều bước bao gồm các enzym từ hai nhóm bên trên. Bước thứ nhất sử dụng chế phẩm enzym chứa ít nhất một enzym từ nhóm thứ nhất, và có thể hoặc không thể chứa các enzym khác từ nhóm thứ nhất và nhóm thứ hai. Bước thứ hai, chế phẩm enzym được sử dụng chứa ít nhất một enzym từ nhóm thứ hai, và chế phẩm có thể hoặc không thể chứa các enzym từ nhóm thứ nhất. Các enzym bổ trợ như amylaza, proteaza, lipaza, glucuronidaza, v.v có thể được thêm tùy ý vào cả hai hoặc một trong hai bước để cho tốc độ thủy phân được nâng cao. (Các) enzym bổ trợ hoặc hỗn hợp enzym bổ trợ được bộc lộ ở đây được định nghĩa là (các) enzym làm tăng hoặc nâng cao tốc độ đường hóa xenluloza hoặc hemixenluloza.

Hiển nhiên rằng, người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể tạo ra các enzym của hai nhóm từ sinh vật tự nhiên hoặc sinh vật biến đổi gen bất kỳ như thực vật, vi khuẩn, men bia hoặc nấm.

Theo một trong các phương án của sáng chế, các enzym của hai nhóm là các thành phần thông thường của hầu hết các chế phẩm enzym trong thương mại và được tạo ra như những sản phẩm lên men nhưng các enzym này có thể được trải qua các bước phân tách trước khi sử dụng.

Theo một phương án, hemixenluloza và xenluloza có thể được thu được từ sinh khối sử dụng một hoặc nhiều kỹ thuật như các quá trình vật lý, hóa học hoặc lý-hóa như, xử lý bằng nhiệt, xử lý bằng thủy nhiệt, xử lý bằng dung môi hữu cơ, xử lý bằng nổ hơi, thẩm vôi với xử lý bằng nổ hơi, xử lý bằng hydro peroxit, xử lý bằng hydro peroxit và ozon, xử lý bằng axit, xử lý bằng axit loãng, xử lý bằng kiềm, xử lý bằng nhiệt, hoặc xử lý bằng nổ cấu trúc amoniac.

Sinh khối bao gồm sinh khối sinh khối chưa khai phá và/hoặc sinh khối đã khai phá như sinh khối nông nghiệp, chất thải từ rừng, các chất hữu cơ thương mại, các vật liệu xây dựng thải ra trong quá trình tháo dỡ công trình, chất thải rắn từ thành phố, giấy thải và rác sân vườn. Các dạng sinh khối phổ biến khác bao gồm cây, cây bụi và cỏ, lúa mì, vỏ trấu lúa mì, bã mía, thân rạ ngô, cây ngũ cốc, hạt ngô gồm chất xơ từ hạt, các sản phẩm và các sản phẩm phụ từ việc xay các hạt như hạt ngũ cốc, hạt lúa mạch đen, cám yến mạch, lúa mì và lúa mạch (bao gồm xay ẩm và xay khô) cũng như chất thải rắn đô thị, giấy thải và chất thải phế liệu. Sinh khối cũng có thể là hoặc bao gồm, nhưng không bị giới hạn đối với, nguyên liệu thảo mộc, bã thải nông nghiệp, bã thải từ rừng, chất thải rắn thành phố, giấy thải, và lõi cây, bã thải nhà máy giấy và nhà máy dầu.

Ngạc nhiên, trong sáng chế, được nhận thấy rằng thủy phân hemixenluloza và/hoặc xenluloza thành đường lên men được thực hiện nhờ sử dụng hệ nhiều enzym trong hai bước đã làm tăng toàn bộ tốc độ phản ứng và do đó làm giảm thời gian quy trình để tạo ra đường lên men được. Cụ thể, khi ít nhất một enzym từ nhóm enzym thứ nhất, và ít nhất một enzym từ nhóm enzym thứ hai được bổ sung vào theo cách thức bậc thang thì thời gian đường hóa giảm đi từ 5 tới 8 lần so với các quy trình đã biết. Trái với điều này, được nhận thấy rằng khi ít nhất một enzym từ nhóm enzym thứ nhất (glycanaza/xylanaza) được bổ sung vào cùng với ít nhất một enzym từ nhóm enzym thứ hai (glucosidaza/xylosidaza) trong môi trường phản ứng trong cùng một bước đơn lẻ, tốc độ phản ứng ban đầu là cao. Tuy nhiên, phản ứng trở nên chậm sau một số thời gian và toàn bộ sự chuyển hóa mất hơn 24 giờ tại các mức liều lượng enzym đã được báo cáo là khoảng 10 đơn vị enzym/g hemixenluloza và/hoặc

xenluloza. Một đơn vị enzym được định nghĩa là lượng enzym làm giải phóng một micromol đường lượng glucoza/phút/mL của thể tích phản ứng.

Trong phản ứng nhiều bước nhiều enzym được bộc lộ trong sáng chế, các enzym đã sử dụng có thể được điều chế bằng các phương pháp được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này, hoặc có thể được thu được trong thương mại.

Một trong các phương án của sáng chế là bước thứ nhất trong đó ít nhất một enzym được chọn đặc hiệu từ nhóm thứ nhất. Do đó chế phẩm enzym được sử dụng trong bước thứ nhất gồm có ít nhất một enzym được nhận/được chọn từ nhóm gồm endo và exo xenlulaza và/hoặc xylanaza, và các hỗn hợp bất kỳ của chúng. Tương tự, trong bước thứ hai, ít nhất một enzym được chọn đặc hiệu từ nhóm enzym thứ hai gồm có xylosidaza, manosidaza và/hoặc glucosidaza, và các hỗn hợp bất kỳ của chúng. Lý do để chọn liên tiếp các enzym đặc hiệu từ các nhóm đặc hiệu, và sử dụng các enzym hoặc nhóm enzym, theo cách thức bậc thang là vì các sản phẩm glycanaza và xylanaza gây cản trở, hoặc ức chế hoạt động của glucosidaza và xylosidaza, và sự cản trở này làm giảm hoạt tính của các enzym được bổ sung vào và làm giảm toàn bộ tốc độ thủy phân hoặc phản ứng khử trùng hợp.

Phương án thêm nữa của sáng chế đề cập tới việc khắc phục những hạn chế của việc sử dụng kết hợp các enzym nhóm thứ nhất và thứ hai theo cách truyền thống, sự sử dụng kết hợp này dẫn tới các sự cản trở hoặc ức chế các enzym bởi các chất phản ứng và sản phẩm phản ứng do đó làm giảm tốc độ phản ứng. Sáng chế bộc lộ quy trình mà nhờ đó hoạt động của hai nhóm enzym được tách ra do đó dẫn tới toàn bộ các tốc độ phản ứng là cao hơn.

Theo phương án ưu tiên của sáng chế, ít nhất một enzym từ nhóm các enzym được đề cập tới ở trên được thêm liên tục trong mỗi bước của hệ nhiều bước để tác dụng lên hemixenluloza hoặc xenluloza đã được tách biệt, hoặc hỗn hợp bất kỳ của hemixenluloza và xenluloza, để chuyển hóa chúng thành các đường lên men được để sản xuất etanol và/hoặc các sản phẩm hữu dụng khác.

Do đó, trong bước thứ nhất, hỗn hợp enzym, gồm ít nhất một enzym từ nhóm enzym thứ nhất, mà có hoặc không có một hoặc nhiều enzym bổ trợ hoặc phụ, được

phản ứng với hemixenluloza và/hoặc xenluloza để thu được oligosacarit tan được. Trong bước thứ nhất, ngoài các enzym từ nhóm thứ nhất, các enzym từ nhóm thứ hai có thể có hoạt tính thấp.

Trong bước thứ hai, enzym hoặc hỗn hợp các enzym gồm ít nhất một enzym từ nhóm enzym thứ hai, mà có hoặc không có một hoặc nhiều enzym từ nhóm thứ nhất và/hoặc enzym hỗ trợ hoặc phụ trợ bất kỳ, và tác dụng lên hỗn hợp phản ứng đã thu được từ bước thứ nhất, trong cùng thiết bị phản ứng hoặc thiết bị phản ứng khác thuộc loại bất kỳ, để thu được đường lên men được.

Một trong các phương án thực hiện của sáng chế đề xuất quy trình thủy phân hemixenluloza và/hoặc xenluloza và quy trình gồm hoạt động bậc thang của các enzym. Hoạt động hai bước làm giảm thiểu tác dụng ức chế của cả sản phẩm trung gian và cuối lên các enzym đang hoạt động trong cả hai bước, cụ thể là tác dụng ức chế xenlulaza, xylobioza và đường đơn lên một hoặc nhiều các thành phần của các enzym xenlulaza và/hoặc hemixenlulaza và, cụ thể, lên endo-glucanaza, và xenlobiohydrolaza và xylobiohydrolaza. Theo phương pháp hiện tại, tất cả các bước phản ứng được thực hiện trong khoảng pH thuận lợi với các enzym, hoặc các hỗn hợp bất kỳ của chúng, các kết quả thích hợp hơn được nhận thấy trong khoảng pH từ 4 tới 8. pH của phản ứng trong hai bước thay đổi trong giới hạn được chỉ ra phụ thuộc vào nguồn enzym và nguồn enzym có thể dễ dàng được xác định bởi những người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo phương án khác của sáng chế, nhiệt độ của phản ứng trong khoảng từ 30°C tới 90°C, và nhiệt độ hoạt động của hỗn hợp enzym phụ thuộc vào đặc điểm hoạt tính và tính ổn định của các enzym và có thể được xác định dễ dàng bởi tất cả những người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Toàn bộ sự thủy phân bằng enzym được thực hiện cho tới khi tất cả các hemixenluloza và/hoặc xenluloza được chuyển hóa thành đường lên men được.

Theo sáng chế, một phương án đề xuất quy trình sản xuất đường lên men được từ hemixenluloza và/hoặc xenluloza sử dụng hệ nhiều enzym nhiều bước, trong đó quy trình gồm có xử lý hemixenluloza và/hoặc xenluloza bằng ít nhất một enzym của nhóm enzym thứ nhất ở nhiệt độ trong khoảng từ 30°C tới 90°C để thu được sản phẩm

thủy phân thứ nhất, và xử lý sản phẩm thủy phân đã thu được bằng ít nhất một enzym từ nhóm enzym thứ hai để thu được đường lên men được; trong đó nhóm enzym thứ nhất và thứ hai có khả năng thủy phân hemixenluloza và/hoặc xenluloza.

Theo một phương án thực hiện sáng chế đề xuất quy trình sản xuất đường lên men được từ hemixenluloza và/hoặc xenluloza sử dụng hệ nhiều enzym nhiều bước, trong đó hemixenluloza và/hoặc xenluloza cơ bản là không có lignin, cụ thể là không chứa nhiều hơn 10% (trọng lượng/trọng lượng) lignin.

Theo phương án khác của sáng chế, đề xuất quy trình sản xuất đường lên men được từ hemixenluloza và/hoặc xenluloza sử dụng hệ nhiều enzym nhiều bước, trong đó quy trình gồm có xử lý hemixenluloza và/hoặc xenluloza bằng ít nhất một enzym của nhóm enzym thứ nhất ở nhiệt độ trong khoảng từ 30°C tới 90°C để thu được sản phẩm thủy phân thứ nhất, và xử lý sản phẩm thủy phân đã thu được bằng ít nhất một enzym từ nhóm enzym thứ hai để thu được đường lên men được; trong đó nhóm enzym thứ nhất và thứ hai có khả năng thủy phân hemixenluloza và/hoặc xenluloza, trong đó nhóm enzym thứ nhất là endo-glucanaza, exo-glucanaza, endo-xylanaza, exo-xylanaza, mannanaza và galactanaza.

Theo phương án khác của sáng chế, đề xuất quy trình sản xuất đường lên men được từ hemixenluloza và/hoặc xenluloza sử dụng hệ nhiều enzym nhiều bước, trong đó quy trình gồm có xử lý hemixenluloza và/hoặc xenluloza bằng ít nhất một enzym của nhóm enzym thứ nhất ở nhiệt độ trong khoảng từ 30°C tới 90°C để thu được sản phẩm thủy phân thứ nhất, và xử lý sản phẩm thủy phân đã thu được bằng ít nhất một enzym từ nhóm enzym thứ hai để thu được đường lên men được; trong đó nhóm enzym thứ nhất và thứ hai có khả năng thủy phân hemixenluloza và/hoặc xenluloza, trong đó nhóm enzym thứ nhất là xylosidaza, mannosidaza và glucosidaza.

Theo phương án khác nữa của sáng chế, đề xuất quy trình sản xuất đường lên men được từ hemixenluloza và/hoặc xenluloza sử dụng hệ nhiều enzym nhiều bước, trong đó quy trình gồm có xử lý hemixenluloza và/hoặc xenluloza bằng ít nhất một enzym của nhóm enzym thứ nhất ở nhiệt độ trong khoảng từ 30°C tới 90°C để thu được sản phẩm thủy phân thứ nhất, và xử lý sản phẩm thủy phân đã thu được bằng ít nhất một enzym từ nhóm enzym thứ hai để thu được đường lên men được; trong đó

nhóm enzym thứ nhất và thứ hai có khả năng thủy phân hemixenluloza và/hoặc xenluloza, trong đó tùy ý các enzym được khâu mạch bằng một hoặc nhiều protein, một hoặc nhiều polyme, hoặc các sự kết hợp của chúng sử dụng một hoặc nhiều chất khâu mạch.

Theo phương án khác nữa của sáng chế đề xuất protein để khâu mạch các enzym, trong đó protein được chọn từ nhóm gồm có nhóm enzym thứ nhất, nhóm enzym thứ hai, transferin, globulin, huyết thanh của động vật, protein đậu tương, protein sữa chua và gluten lúa mì, hoặc các sự kết hợp bất kỳ của chúng.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất các chất khâu mạch được chọn từ nhóm gồm có glutaraldehyt, divinylsulphon, polyetylenimin, và 1,4-butandiol diglycidylete.

Theo phương án khác nữa của sáng chế, đề xuất quy trình sản xuất đường lên men được từ hemixenluloza và/hoặc xenluloza sử dụng hệ nhiều enzym nhiều bước, trong đó quy trình gồm có xử lý hemixenluloza và/hoặc xenluloza bằng ít nhất một enzym của nhóm enzym thứ nhất ở nhiệt độ trong khoảng từ 30°C tới 90°C để thu được sản phẩm thủy phân thứ nhất, và xử lý sản phẩm thủy phân đã thu được bằng ít nhất một enzym từ nhóm enzym thứ hai để thu được đường lên men được; trong đó nhóm enzym thứ nhất và thứ hai có khả năng thủy phân hemixenluloza và/hoặc xenluloza, trong đó hemixenluloza và/hoặc xenluloza chuyển hóa thành đường lên men được trong quy trình theo mẻ trong khoảng thời gian từ 4 tới 8 giờ.

Theo phương án thêm nữa của sáng chế, đề xuất quy trình sản xuất đường lên men được từ hemixenluloza và/hoặc xenluloza sử dụng hệ nhiều enzym nhiều bước, trong đó quy trình gồm có xử lý hemixenluloza và/hoặc xenluloza bằng ít nhất một enzym của nhóm enzym thứ nhất ở nhiệt độ trong khoảng từ 30°C tới 90°C để thu được sản phẩm thủy phân thứ nhất, và xử lý sản phẩm thủy phân đã thu được bằng ít nhất một enzym từ nhóm enzym thứ hai để thu được đường lên men được; trong đó nhóm enzym thứ nhất và thứ hai có khả năng thủy phân hemixenluloza và/hoặc xenluloza, trong đó hemixenluloza và/hoặc xenluloza chuyển hóa thành đường lên men được trong quy trình liên tục trong khoảng thời gian lưu trong nước từ 1 tới 4 giờ.

Theo một phương án của sáng chế đề xuất đường lên men được gồm oligosacarit tan được, xenlobioza, glucoza, xylobioza, xyloza và arabinoza.

Phương án khác của sáng chế đề xuất quy trình thu được hemixenluloza và/hoặc xenluloza từ sinh khối, trong đó quy trình gồm trộn sinh khối với kiềm 5% tới 10% (trọng lượng/thể tích) có pH trong khoảng 12-14 ở nhiệt độ trong khoảng từ 50°C tới 200°C dưới điều kiện áp suất 0,1 đến 2MPa (1,0 đến 20bar) trong thời gian từ 5 phút tới 2 giờ để thu được huyền phù đặc sinh khối; lọc huyền phù đặc sinh khối để thu được phần lọc gồm có hemixenluloza và phần còn lại gồm xenluloza; xử lý phần lọc bằng rượu để thu được kết tủa chứa hemixenluloza; rửa phần còn lại chứa xenluloza bằng nước để loại bỏ kiềm thừa thu được xenluloza; và rửa kết tủa để thu được hemixenluloza.

Phương án khác nữa của sáng chế đề xuất quy trình để thu được hemixenluloza và/hoặc xenluloza từ sinh khối, trong đó sinh khối được chọn từ nhóm gồm có cỏ, rom rạ, vỏ chấu lúa mì, thân cây bông, thân cây thầu dầu, bã mía hoặc bã củ cải đường, lõi ngô, thân rạ ngô, thân cây, cỏ voi và cỏ roi.

Phương án khác của sáng chế đề xuất quy trình để thu được hemixenluloza và/hoặc xenluloza từ sinh khối sử dụng kiềm, trong đó tỷ lệ kiềm với sinh khối trong khoảng từ 0,5 tới 2,0, ưu tiên là 1,4.

Phương án khác của sáng chế đề xuất quy trình thu được hemixenluloza và/hoặc xenluloza từ sinh khối, trong đó quy trình gồm trộn sinh khối với kiềm 5% tới 10% (trọng lượng/thể tích) có pH trong khoảng 12-14 ở nhiệt độ trong khoảng từ 50°C tới 200°C dưới điều kiện áp suất 0,1 đến 2MPa (1,0 đến 20bar) trong thời gian 2 giờ để thu được huyền phù đặc sinh khối; lọc huyền phù đặc sinh khối để thu được phần lọc gồm có hemixenluloza và phần còn lại gồm xenluloza; xử lý phần lọc bằng rượu để thu được kết tủa chứa hemixenluloza; rửa phần còn lại chứa xenluloza bằng nước để loại bỏ kiềm thừa thu được xenluloza; và rửa kết tủa để thu được hemixenluloza.

Phương án khác của sáng chế đề xuất quy trình thu được hemixenluloza và/hoặc xenluloza từ sinh khối, trong đó quy trình gồm trộn sinh khối với kiềm 5% tới 10% (trọng lượng/thể tích) có pH trong khoảng 12-14 ở nhiệt độ trong khoảng từ 50°C tới

200°C dưới điều kiện áp suất 0,1 đến 2MPa (1,0 đến 20bar) trong thời gian từ 5 phút tới 2 giờ để thu được huyền phù đặc sinh khối; lọc huyền phù đặc sinh khối để thu được phần lọc gồm có hemixenluloza và phần còn lại gồm xenluloza; xử lý phần lọc bằng rượu để thu được kết tủa chứa hemixenluloza; rửa phần còn lại chứa xenluloza bằng nước để loại bỏ kiềm thừa thu được xenluloza; và rửa kết tủa để thu được hemixenluloza, trong đó ít nhất 85% hemixenluloza được thu hồi.

Phương án khác của sáng chế đề xuất quy trình thu được hemixenluloza và/hoặc xenluloza từ sinh khối, trong đó quy trình gồm trộn sinh khối với kiềm 5% tới 10% (trọng lượng/thể tích) có độ pH trong khoảng 12-14 ở nhiệt độ trong khoảng từ 50°C tới 200°C dưới điều kiện áp suất 0,1 đến 2MPa (1,0 đến 20bar) trong thời gian từ 5 phút tới 2 giờ để thu được huyền phù đặc sinh khối; lọc huyền phù đặc sinh khối để thu được phần lọc gồm có hemixenluloza và phần còn lại gồm xenluloza; xử lý phần lọc bằng rượu để thu được kết tủa chứa hemixenluloza; rửa phần còn lại chứa xenluloza bằng nước để loại bỏ kiềm thừa thu được xenluloza; và rửa kết tủa để thu được hemixenluloza, trong đó ít nhất 90% hemixenluloza được thu hồi.

Phương án khác của sáng chế đề xuất quy trình sản xuất đường lên men được từ sinh khối sử dụng hệ nhiều enzym nhiều bước, trong đó quy trình gồm có

- a. trộn sinh khối với kiềm 5% tới 10% (trọng lượng/thể tích) có pH trong khoảng 12-14 ở nhiệt độ trong khoảng từ 50°C tới 200°C dưới điều kiện áp suất 0,1 đến 2MPa (1,0 đến 20bar) trong thời gian từ 5 phút tới 2 giờ để thu được huyền phù đặc sinh khối;
- b. lọc huyền phù đặc sinh khối để thu được phần lọc gồm có hemixenluloza và phần còn lại gồm xenluloza;
- c. xử lý phần lọc bằng rượu để thu được kết tủa chứa hemixenluloza;
- d. rửa phần còn lại từ bước (b) bằng nước để loại bỏ kiềm dư để thu được xenluloza;
- e. rửa kết tủa để thu được hemixenluloza;

f. xử lý hemixenluloza từ bước (e) và/hoặc xenluloza từ bước (d) bằng ít nhất một enzym của nhóm enzym thứ nhất ở nhiệt độ trong khoảng từ 30°C tới 90°C để thu được sản phẩm thủy phân; và

g. xử lý sản phẩm thủy phân của bước (f) bằng ít nhất một enzym của nhóm enzym thứ hai để thu được đường lên men được.

trong đó nhóm enzym thứ nhất và thứ hai có khả năng thủy phân hemixenluloza và/hoặc xenluloza.

Phương án thêm nữa của sáng chế đề xuất quy trình sản xuất đường lên men được từ sinh khối sử dụng hệ nhiều enzym nhiều bước, trong đó quy trình gồm có

a. trộn sinh khối với kiềm 5% tới 10% (trọng lượng/thể tích) có pH trong khoảng 12-14 ở nhiệt độ trong khoảng từ 50°C tới 200°C dưới điều kiện áp suất 0,1 đến 2MPa (1,0 đến 20bar) trong thời gian từ 5 phút tới 2 giờ để thu được huyền phù đặc sinh khối;

b. lọc huyền phù đặc sinh khối để thu được phần lọc gồm có hemixenluloza và phần còn lại gồm xenluloza;

c. xử lý phần lọc bằng rượu để thu được kết tủa chứa hemixenluloza;

d. rửa phần còn lại từ bước (b) bằng nước để loại bỏ kiềm dư để thu được xenluloza;

e. rửa kết tủa để thu được hemixenluloza;

f. xử lý hemixenluloza từ bước (e) và/hoặc xenluloza từ bước (d) bằng ít nhất một enzym của nhóm enzym thứ nhất ở nhiệt độ trong khoảng từ 30°C tới 90°C để thu được sản phẩm thủy phân; và

g. xử lý sản phẩm thủy phân của bước (f) bằng ít nhất một enzym của nhóm enzym thứ hai để thu được đường lên men được.

trong đó nhóm enzym thứ nhất và thứ hai có khả năng thủy phân hemixenluloza và/hoặc xenluloza; trong đó nhóm enzym thứ nhất và thứ hai được khâu mạch bằng protein hoặc polyme sử dụng chất khâu mạch.

Theo phương án khác của sáng chế, các enzym được tái sinh và được tái sử dụng để cung cấp một quy trình hiệu quả chi phí về mặt chi phí enzym trên mỗi đơn vị hemixenluloza và/hoặc xenluloza được thủy phân thành đường lên men được. Ví dụ, các enzym có thể được sử dụng dưới dạng bất động trong các thiết bị phản ứng đệm nổi, được khuấy hoặc tăng sôi, hoặc trong các thiết bị phản ứng dạng màng, hoặc các sự kết hợp của chúng.

Enzym bất động là enzym được gắn với nguyên liệu trợ, không tan, xốp hoặc không xốp. Điều này có thể cung cấp tính ổn định và tính chống chịu tăng của các enzym để thay đổi các điều kiện như sự dịch chuyển, áp suất, pH hoặc nhiệt độ. Sự bất động cũng cho phép các enzym được giữ đúng chỗ, hoặc trong các ranh giới của thiết bị phản ứng trong suốt lúc phản ứng, sau đó chúng dễ dàng được phân tách ra khỏi các sản phẩm và có thể được sử dụng lại.

Các enzym bất động có hiệu quả về mặt chi phí cũng như đơn giản để sử dụng trong nhiều hơn một chu trình. Enzym bất động được loại bỏ dễ dàng khỏi thiết bị phản ứng, làm dễ dàng tái sinh chất xúc tác sinh học. Các enzym bất động thường có tính ổn định nhiệt và hoạt động lớn hơn so với dạng enzym tan. Các enzym bất động có thể được điều chế bằng các phương pháp khác nhau. Phương pháp được sử dụng rộng rãi là hấp thụ các enzym trên nền xốp rắn thích hợp. Enzym được gắn với bề mặt rắn của nền bằng các phương pháp khác nhau từ sự hấp thụ đơn giản tới phản ứng cộng hóa trị. Enzym cũng có thể bị giữ trong các hạt không tan hoặc hạt vi cầu, như các hạt canxi alginat. Tuy nhiên, các chất không tan này gây cản trở sự chuyển đến của chất, và sự thoát sản phẩm, đặc biệt khi chất là phân tử polyme và kênh cang.

Enzym cũng có thể được liên kết cộng hóa trị với nền hoặc protein/enzym bất kỳ nhờ phản ứng hóa học. Phương pháp này do đó là phương pháp có hiệu quả nhất trong số các phương pháp được liệt kê ở đây. Vì phản ứng hóa học đảm bảo rằng vị trí liên kết không bao phủ vị trí hoạt tính của enzym, hoạt tính của enzym chỉ bị tác động bởi tính bất động. Enzym và nền được khâu mạch nhờ chất khâu mạch như glutaraldehyt hoặc carbodiimidit.

Theo một trong các phương án ưu tiên của sáng chế, enzym bị bất làm bất động trên một nền rắn thích hợp. Các chất mang hoặc thể mẹ được sử dụng để làm bất động

có thể gồm nguyên liệu hữu cơ hoặc vô cơ và nguyên liệu tự nhiên hoặc tổng hợp bất kỳ, ví dụ, polyme tổng hợp ưa nước như polyacrylamit, polymetacrylamit, polyacrylat, polymetylacrylat, polyimit, các polyme ưa nước polyvinyl, polystyren, polysulfon hoặc tương tự và các polysacarit nhân tạo hoặc tổng hợp như tinh bột, dextran, chitin aga hoặc agaroza; nguyên liệu vô cơ như các nguyên liệu silic như silic dioxit gồm silic và thạch anh vô định hình, vật liệu thủy tinh xốp, titan dioxit và gốm hoặc các sự kết hợp thích hợp của chúng.

Theo phương án khác của sáng chế, các enzym có thể được khâu mạch với chính nó hoặc protein khác bất kỳ, hoặc monome hoặc polyme khác bất kỳ, bằng chất khâu mạch, để tạo thành các khối kết tập tan hoặc không tan được gọi là các khối kết tập enzym được khâu mạch (CLEA), và chúng có thể được sử dụng làm enzym bất động, hoặc trong các thiết bị phản ứng dạng màng trong đó các màng có thể giữ các enzym hoặc các khối kết tập enzym cũng như các nền polyme, trong khi cho phép các sản phẩm phản ứng nhỏ hơn thấm hoặc đi qua.

Theo phương án khác của sáng chế, khi sử dụng enzym để tác động lên nền rắn, như xenluloza dạng rắn, chi phí quy trình là hiệu quả về mặt chi phí nhờ tái sinh các enzym, các enzym được sử dụng trong các thiết bị phản ứng kiểu màng giống như các đại phân tử dưới dạng tự nhiên của chúng, hoặc được khâu mạch với chính nó, hoặc với protein/enzym thích hợp, hoặc monome hoặc polyme khác bất kỳ, sử dụng chất khâu mạch thích hợp để thu được các chế phẩm enzym tan được khâu mạch có hoạt tính với 100% hệ số loại bỏ màng. Các protein được sử dụng để khâu mạch là transferin, globulin, các albumin huyết thanh động vật, protein đậu tương, protein sữa chua, và gluten lúa mì.

Theo một phương án ưu tiên của sáng chế, quy trình đường hóa xenluloza và hemixenluloza, riêng biệt hoặc kết hợp, được thực hiện trong các thiết bị phản ứng sinh học và các thiết bị phản ứng sinh học được sử dụng cho bước thứ nhất và/hoặc bước thứ hai có thể là các thiết bị phản ứng sinh học tầng sôi hoặc đệm nhồi, hoặc là các thiết bị phản ứng sinh học dạng bể khuấy được gắn các hệ thống lọc màng sử dụng các màng lọc siêu âm, các màng vi lọc, và/hoặc các màng lọc nano.

Theo phương án ưu tiên khác của sáng chế, hemixenluloza được xử lý bằng ít nhất một trong các enzym của nhóm enzym thứ nhất, trong đó các enzym phá vỡ cấu trúc polyme của hemixenluloza thành các oligosacarit tan. Hơn nữa, trong bước thứ hai, các oligosacarit này được xử lý bằng ít nhất một trong các enzym từ nhóm thứ hai, trong đó các enzym chuyển hóa oligosacarit tan thành các đường lên men được.

Theo phương án khác của sáng chế, bước thứ nhất đường hóa hemixenluloza được thực hiện trong thiết bị phản ứng sinh học bể khuấy được gắn với hệ thống lọc màng, như màng vi lọc, màng lọc siêu âm và/hoặc màng lọc nano, ưu tiên chỉ riêng màng lọc siêu âm, nó giữ và tái sinh các enzym tan của bước thứ nhất vào thiết bị phản ứng sinh học dạng bể và các oligosacarit tan đi qua đó. Bước thứ hai được thực hiện trong thiết bị phản ứng sinh học dạng bể khuấy thứ hai, thiết bị được gắn với hệ thống lọc màng khác nữa, như màng lọc siêu âm hoặc màng lọc nano, ưu tiên màng lọc nano giữ và tái sinh các enzym tan của bước thứ hai cũng như các oligosacarit tan lớn hơn trong khi các đường lên men được sẽ đi qua như thấm qua.

Theo phương án ưu tiên khác của sáng chế, bước thứ nhất đường hóa hemixenluloza được thực hiện trong thiết bị phản ứng đệm nhồi trong đó các enzym được sử dụng trong bước thứ nhất được làm bất động trên bề mặt thích hợp. Oligosacarit tan được tạo thành trong thiết bị phản ứng đi vào bước thứ hai. Bước thứ hai được thực hiện trong cột của thiết bị phản ứng đệm nạp thứ hai chứa các enzym bất động từ nhóm enzym thứ hai để thu được đường lên men được. Hoặc, thiết bị phản ứng thứ hai là thiết bị phản ứng sinh học bể khuấy, thiết bị được gắn với hệ thống lọc màng khác nữa, như màng lọc siêu âm hoặc màng lọc nano, ưu tiên màng lọc siêu âm, chúng giữ và tái sinh các enzym tan của nhóm thứ hai cũng như các oligosacarit lớn trong khi thu được các đường lên men được nhờ thấm qua.

Theo phương án khác của sáng chế, bước thứ nhất đường hóa hemixenluloza được thực hiện trong thiết bị phản ứng sinh học, thiết bị được gắn với hệ lọc kiểu màng, như lọc siêu âm hoặc lọc nano, ưu tiên lọc siêu âm, nó giữ các enzym tan được sử dụng trong bước thứ nhất cũng như các oligosacarit không tan và tan lớn hơn. Các oligosacarit tan đi qua màng, và trong bước thứ hai được tiếp xúc với các enzym bất

động của nhóm thứ hai trong thiết bị phản ứng đệm nhồi và được chuyển hóa thành đường lên men được.

Theo phương án ưu tiên khác của sáng chế, bước thứ nhất đường hóa hemixenluloza được thực hiện trong thiết bị phản ứng đệm nhồi trong đó các enzym được sử dụng trong bước thứ nhất được làm bất động trên thể mẹ thích hợp. Oligosacarit tan được tạo ra và được đi qua cột/thiết bị phản ứng sinh học thứ hai, trong đó các enzym của nhóm thứ hai được làm bất động trên thể mẹ thích hợp. Dòng ra từ thiết bị phản ứng cột thứ hai chứa đường lên men được.

Theo phương án ưu tiên khác của sáng chế, xenluloza được xử lý trong bước thứ nhất bằng ít nhất một trong các enzym của nhóm enzym thứ nhất và/hoặc một số enzym từ nhóm thứ hai, trong đó các enzym phá vỡ cấu trúc polyme cơ bản của xenluloza thành các oligosacarit. Hơn nữa, trong bước thứ hai, các oligosacarit này được xử lý bằng ít nhất một trong các enzym từ nhóm thứ hai và/hoặc một số enzym từ nhóm khác, và trong đó các enzym này chuyển hóa oligosacarit thành các đường lên men được.

Một trong các phương án thực hiện sáng chế đó là các oligosacarit được tạo ra trong quá trình đường hóa xenluloza, cụ thể là xenlobioza, có tác dụng ức chế lên các enzym và, cụ thể, lên endo-gluconaza và xenlobiohydrolaza. Hơn nữa, glucosidaza chuyển hóa xenlobioza thành glucoza mà glucoza cũng có thể ức chế glucanaza. Tác dụng ức chế này có thể được giảm thiểu bằng cách xử lý hai bước enzym.

Theo phương án khác của sáng chế, các enzym của bước thứ nhất có thể được khâu mạch với protein có trọng lượng phân tử cao, hoặc monome khác bất kỳ, hoặc polyme, bằng chất khâu mạch. Xenluloza là chất rắn không tan và do đó không chắc rằng sự bất động của các enzym giúp cho sự hoạt động của enzym. Do đó làm cho chi phí quá trình đường hóa xenluloza có tính kinh tế nhờ tái sinh enzym của bước thứ nhất, nhóm enzym thứ nhất được khâu mạch với protein hoặc polyme bằng chất khâu mạch thích hợp.

Theo phương án khác của sáng chế, nhóm enzym thứ nhất được sử dụng để đường hóa xenluloza được khâu mạch với cùng các enzym hoặc protein như transferin,

globulin, albumin huyết thanh động vật, protein đậu tương, protein sữa chua, hoặc gluten lúa mì.

Theo phương án khác của sáng chế, chất khâu mạch được sử dụng là từ nhóm gồm có glutaraldehyt, divinylsulphon, polyetylenimin, và 1,4-butandioldiglycidylete.

Theo một phương án ưu tiên của sáng chế, bước thứ nhất đường hóa hemixenluloza được thực hiện trong thiết bị phản ứng bể khuấy được gắn với thiết bị phân tách kiểu màng để giữ và tái sinh các enzym đã được khâu mạch/tan được sử dụng trong bước thứ nhất. Thiết bị phân tách kiểu màng có thể bao gồm các màng vi lọc, màng lọc siêu âm hoặc màng lọc nano, để giữ các enzym và các polyme đường, trong khi oligosacarit tan đi qua các màng và được đưa qua thiết bị phản ứng thứ hai chứa enzym từ nhóm thứ hai. Thiết bị phản ứng bể khuấy thứ hai này cũng được ghép với thiết bị phân tách dạng màng mà thiết bị phân tách dạng màng này có thể bao gồm các màng lọc siêu âm hoặc các màng lọc nano, để giữ các enzym và các oligosacarit lớn trong khi các đường lên men được nhỏ hơn đi qua các màng.

Theo một phương án khác của sáng chế, bước thứ nhất đường hóa hemixenluloza được thực hiện trong thiết bị phản ứng sinh học mà thiết bị này được gắn với thiết bị phân tách dạng màng để giữ các enzym đã được khâu mạch hoặc tan tự nhiên từ nhóm thứ nhất. Thiết bị phân tách kiểu màng có thể bao gồm các màng lọc siêu âm hoặc màng lọc nano, để giữ và tái sinh các enzym và các oligosacarit lớn hơn trong khi các oligosacarit nhỏ hơn đi qua các màng này và được đưa qua thiết bị phản ứng cột thứ hai. Bước thứ hai được thực hiện trong thiết bị phản ứng sinh học hoặc cột thứ hai, trong đó các enzym của bước thứ hai được làm bất động trên thể mẹ thích hợp. Các enzym này chuyển hóa oligosacarit tan thành các đường lên men được.

Theo phương án ưu tiên khác của sáng chế, hỗn hợp hemixenluloza và xenluloza được xử lý trong bước thứ nhất bằng ít nhất một trong các enzym của nhóm enzym thứ nhất và/hoặc một số enzym từ nhóm thứ hai, trong đó các enzym phá vỡ cấu trúc polyme cơ bản của hemixenluloza và xenluloza thành các oligosacarit. Hơn nữa trong bước thứ hai, các oligosacarit này được xử lý bằng ít nhất một trong các enzym từ nhóm thứ hai và/hoặc một số enzym của nhóm khác, và trong đó các enzym này chuyển hóa oligosacarit tan thành các đường lên men được.

Thường yêu cầu thực hiện đồng thời đường hóa hemixenluloza và xenluloza để thu được sản phẩm thủy phân kết hợp trong khối thiết bị phản ứng enzym hai bước cho một bước đơn lẻ kế tiếp và lên men kết hợp các đường thu được thành sản phẩm mong muốn như etanol. Trong các trường hợp này, hemixenluloza và xenluloza thu được từ sinh khối được xử lý làm hỗn hợp cho các bước thủy phân và đường hóa. Lập luận cơ bản sau phản ứng enzym hai bước của sáng chế, tuy nhiên, được nhận thấy là có thể áp dụng cho hỗn hợp hemixenluloza và xenluloza hoặc cho mỗi thành phần đơn lẻ.

Theo một trong các phương án thực hiện sáng chế đó là các oligosacarit được tạo ra trong khi đường hóa hemixenluloza và xenluloza, cụ thể xenlobioza và xylobioza, có tác dụng ức chế lên các enzym và, cụ thể, trên endo-glucanaza và biohydrolaza. Hơn nữa, glycosidaza chuyển hóa các bioza thành đường đơn và các đường đơn này cũng có thể ức chế glucanaza. Tác dụng ức chế này có thể được giảm thiểu bằng cách xử lý hai bước enzym.

Theo phương án khác của sáng chế, các enzym của bước thứ nhất có thể được khâu mạch bằng protein có trọng lượng phân tử cao, hoặc monome, hoặc polyme khác bất kỳ, bằng chất khâu mạch. Xenluloza là chất rắn không tan và do đó không chắc sự bất động của các enzym trợ giúp hoạt tính enzym. Do đó làm cho chi phí quá trình đường hóa xenluloza có tính kinh tế nhờ tái sinh enzym của bước thứ nhất, nhóm enzym thứ nhất được khâu mạch với protein hoặc polyme bằng chất khâu mạch thích hợp.

Theo phương án khác của sáng chế, nhóm enzym thứ nhất được sử dụng để đường hóa hỗn hợp hemixenluloza và xenluloza được khâu mạch với cùng các enzym hoặc protein như transferin, globulin, albumin huyết thanh động vật, protein đậu tương, protein sữa chua, hoặc gluten lúa mì.

Theo phương án khác của sáng chế, chất khâu mạch được sử dụng là từ nhóm gồm có glutaraldehyt, divinylsulphon, polyetylenimin, và 1,4-butandioldiglycidylete.

Theo một phương án ưu tiên của sáng chế, bước thứ nhất đường hóa hỗn hợp hemixenluloza và xenluloza được thực hiện trong thiết bị phản ứng bể khuấy được gắn với thiết bị phân tách kiểu màng để giữ và tái sinh các enzym đã được khâu mạch/tan

được sử dụng trong bước thứ nhất. Thiết bị phân tách kiểu màng có thể bao gồm các màng vi lọc, các màng lọc siêu âm hoặc các màng lọc nano, để giữ lại các enzym và các polyme đường, trong khi các oligosacarit tan đi qua các màng và được đi qua thiết bị phản ứng dạng bể khuấy thứ hai chứa enzym từ nhóm thứ hai. Thiết bị phản ứng thứ hai này cũng được gắn với bộ phân tách kiểu màng gồm các màng lọc siêu âm hoặc các màng lọc nano để giữ các enzym và oligosacarit lớn trong khi các đường lên men được nhỏ hơn đi qua các màng.

Theo phương án khác của sáng chế, bước thứ nhất đường hóa hỗn hợp hemixenluloza và xenluloza được thực hiện trong thiết bị phản ứng bể khuấy mà thiết bị này được gắn với thiết bị phân tách dạng màng để giữ các enzym đã được khâu mạch hoặc tan tự nhiên từ nhóm thứ nhất. Thiết bị phân tách kiểu màng bao gồm các màng lọc siêu âm hoặc màng lọc nano, để giữ và tái sinh các enzym và các oligosacarit lớn hơn trong khi các oligosacarit nhỏ hơn đi qua các màng này và được đưa qua thiết bị phản ứng cột thứ hai. Bước thứ hai được thực hiện trong thiết bị phản ứng cột thứ hai, trong đó các enzym của nhóm thứ hai được làm bất động trên thể mẹ thích hợp. Các enzym này chuyển hóa các oligosacarit tan thành đường nhỏ lên men.

Các thiết bị phản ứng được sử dụng và mô tả bên trên để thực hiện quy trình theo sáng chế được thay đổi để đáp ứng bất cứ yêu cầu cụ thể nào. Do đó, các thủy động lực học của phản ứng được duy trì để đảm bảo chuyển hóa tối ưu dung dịch sản phẩm bởi dòng chảy thành lớp và bằng cách giữ sự chuyển động tối thiểu trong các thiết bị phản ứng kiểu cột nhồi và kiểu màng, có khuấy.

Các ví dụ dưới đây được đưa ra để minh họa sáng chế và do đó không được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Nên hiểu rằng các ví dụ dưới đây được mô tả chỉ nhằm mục đích minh họa và các thay đổi hay biến thể khác về thông số kỹ thuật sẽ là gợi ý đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và được kể đến trong phạm vi và tinh thần của sáng chế và phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ 1**Điều chế hemixenluloza từ thân cây bông**

3g thân cây bông đã được sấy khô và được làm giảm kích cỡ được xử lý bằng 100ml kiềm 5% ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 30 phút trong nồi hấp hoặc thiết bị phản ứng áp suất. Mẫu đã xử lý được lọc để loại bỏ cặn rắn. Phần lọc chứa hemixenluloza được xử lý bằng 500ml etanol nguyên chất. Kết tủa tạo ra được lọc và rửa bằng etanol dư để thu được hemixenluloza là bột có màu vàng sẫm.

Ví dụ 2**Điều chế xenluloza và hỗn hợp hemixenluloza + xenluloza từ rơm rạ**

1g thân cây bông đã được sấy khô và được làm giảm kích cỡ được xử lý bằng 20 ml kiềm 5% ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 15 phút trong nồi hấp. Mẫu đã xử lý được lọc và rửa bằng nước để thu hồi cặn rắn là phần xenluloza. Phần lọc chứa hemixenluloza được xử lý bằng 50ml etanol nguyên chất, và kết tủa thu được được lọc và được rửa bằng etanol dư để thu được hemixenluloza là kết tủa có màu vàng sẫm. Xenluloza còn lại và hemixenluloza thu được được trộn để cho hỗn hợp hemixenluloza và xenluloza để xử lý tiếp theo.

Ví dụ 3**Thủy phân hemixenluloza****(a) Phản ứng theo mẻ mà không tái sinh enzym**

Hemixenluloza (40g) trong 1000mL dung dịch đệm xitrat 50mM có độ pH=5 được xử lý bằng 4000IU chủ yếu là enzym endo-xylanaza ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 2 giờ. Một đơn vị enzym được định nghĩa là các micromol sản phẩm được sinh ra bởi một mililit enzym mỗi phút. Sắc ký lọc gel chỉ ra xylobioza là sản phẩm chính. Trong bước thứ hai, 2000IU enzym xylosidaza được sử dụng là nhóm enzym thứ hai và được bổ sung vào môi trường phản ứng. Sự chuyển hóa hoàn toàn hemixenluloza thành xyloza được thu được trong khoảng 2 giờ tiếp theo. Bảng 1 đưa ra các chi tiết của quy trình phản ứng với HM1 là enzym thứ nhất và HMII là enzym thứ hai.

(b) Thủy phân hemixenluloza liên tục cùng với tái sinh enzym

3% trọng lượng/thể tích huyền phù hemixenluloza trong 50mM dung dịch đệm xitrat có độ pH=5,0 được bổ sung vào ở lưu lượng khoảng 10mL/phút sử dụng bơm định lượng để giữ mức chất lỏng ở chiều cao không đổi trong thiết bị phản ứng có khuấy được làm nóng bằng áo nước 500mL trong đó một lượng là 1000IU endo-xylanaza cũng được bổ sung trong một phần ban đầu. Thiết bị phản ứng có khuấy được duy trì ở nhiệt độ 50°C và được gắn với hệ thống lọc màng. Toàn bộ khối thiết bị phản ứng gồm thiết bị phản ứng dạng bể có khuấy (500mL) được trang bị bơm vi lượng để tuần hoàn khối phản ứng qua hệ thống màng lọc siêu âm dạng ống (trọng lượng 5KDa và diện tích 0,01 mét vuông). Sản phẩm không thấm qua màng từ hệ thống màng được đưa lại vào bể có khuấy trong khi sản phẩm thấm qua màng được thu vào trong cốc bệse mà từ cốc này bơm vi lượng khác chuyển khối phản ứng qua tầng nạp beta-xylosidaza bất động (đường kính 10mm x 500mm H). Lưu lượng của sản phẩm thấm qua màng và cột được duy trì ở lưu lượng 10mL/phút. Dòng chảy từ thiết bị phản ứng thứ hai được phân tích hàm lượng glucoza. 95% chuyển hóa hemixenluloza thành đường đơn được nhận thấy diễn ra trên cơ sở trạng thái ổn định liên tục. Giữ toàn bộ thời gian lưu trong nước trung bình trong khoảng từ 40 tới 50 phút.

Ví dụ 4

Thủy phân hỗn hợp hemixenluloza và xenluloza

(a) Phản ứng theo mẻ mà không tái sinh enzym

Hỗn hợp hemixenluloza và xenluloza (40g) được tạo huyền phù trong nước axit (độ pH=5) và được xử lý bằng 4000IU hỗn hợp endo-và exo-glucanaza ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 2 giờ. Một đơn vị enzym được định nghĩa là các micromol glucoza tương đương với các đường khử được tạo ra trên mỗi mililit enzym trên mỗi phút. Sắc ký lọc gel hỗn hợp phản ứng sau khoảng thời gian 2 giờ chỉ ra các oligosacarit tan là các sản phẩm chính được tạo ra. Phản ứng bước thứ hai được thực hiện nhờ sử dụng hỗn hợp beta-glucosidaza và beta-xylosidaza (mỗi loại 1000IU) được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng từ bước thứ nhất. Sự chuyển hóa hoàn toàn polysacarit thành glucoza và xyloza thu được trong khoảng 2 giờ tiếp theo. Các kết quả của tiến trình phản ứng được đưa ra trong bảng 2.

(b) Phản ứng liên tục với tái sinh enzym

4% trọng lượng/thể tích huyền phù của hỗn hợp hemixenluloza và xenluloza (theo tỷ lệ 3:7) trong nước axit (độ pH=5) được bổ sung ở lưu lượng khoảng 15mL/phút sử dụng bơm định lượng để giữ mức chất lỏng ở chiều cao không đổi trong thiết bị phản ứng có khuấy được đun nóng bằng áo nước 500mL, một lượng là 1000IU hỗn hợp endo- và exo-glucanaza được bổ sung vào thiết bị phản ứng này. Nhiệt độ bể có khuấy được giữ ở 50°C. Khối thiết bị phản ứng dạng màng là giống với khối thiết bị được đề cập trong ví dụ 3(b). Thiết bị phản ứng có khuấy được gắn với hệ thống lọc màng. Sản phẩm không qua màng từ hệ thống màng được đưa lại tới bể có khuấy trong khi sản phẩm thấm qua màng được thu lại vào trong cốc bêse, từ cốc này một bơm vi lượng khác chuyển khối phản ứng qua tầng nạp hỗn hợp beta-glucosidaza bất động và beta-xylosidaza bất động (đường kính 10mm x 500mm H). Lưu lượng sản phẩm thấm qua màng và cột được duy trì ở lưu lượng 15mL/phút. Dòng chảy từ thiết bị phản ứng thứ hai được phân tích hàm lượng glucoza. Trung bình là 90% độ chuyển hóa kết hợp thành đường đơn được nhận thấy diễn ra trên cơ sở trạng thái ổn định liên tục. Giữ tổng thời gian lưu trong nước trung bình trong khoảng từ 40 tới 50 phút.

Ví dụ 5**Thủy phân xenluloza**(a) Thủy phân theo mẻ xenluloza

Xenluloza (10g) được tạo huyền phù trong 50mM dung dịch đệm xitrat với pH=4,8 và được xử lý bằng 1000IU hỗn hợp endo- và exo-xenlulaza trong thiết bị phản ứng có khuấy ở nhiệt độ 50°C. Một đơn vị enzym được định nghĩa là các micromol sản phẩm được tạo ra bởi một mililit enzym trên mỗi phút. GPC chỉ ra oligosacarit là các sản phẩm chính sau khoảng thời gian 2 giờ. Sau đó trong bước thứ hai, beta-glucosidaza (500IU) được bổ sung vào môi trường phản ứng. Chuyển hóa hoàn toàn xenlobioza thành glucoza trong khoảng 2 giờ tiếp theo.

(b) Thủy phân liên tục xenluloza cùng với tái sinh enzym

3% trọng lượng/thể tích huyền phù hemixenluloza trong 50mM dung dịch đệm xitrat có độ pH=5,0 được bổ sung vào ở lưu lượng khoảng 10mL/phút sử dụng bơm

định lượng để giữ mức chất lỏng ở chiều cao không đổi trong thiết bị phản ứng có khuấy được đun nóng bằng áo nước 500mL trong đó tổng 1000IU hỗn hợp endo- và exo-xenlulaza được thêm vào bể có khuấy và phản ứng được thực hiện ở nhiệt độ 50°C. Khối thiết bị phản ứng gồm thiết bị phản ứng dạng bể có khuấy được trang bị bơm vi lượng để tuần hoàn khối phản ứng qua hệ thống màng lọc siêu âm dạng ống (trọng lượng 5KDa và diện tích 0,01 mét vuông). Sản phẩm không qua màng từ hệ thống màng được đưa lại tới bể có khuấy trong khi sản phẩm thấm qua màng được thu lại vào trong cốc bệse, từ cốc này một bơm vi lượng khác chuyển khối phản ứng qua tầng nạp beta-glucosidaza bất động (đường kính 10mm x 500mm H). Lưu lượng sản phẩm thấm qua màng và cột được duy trì ở lưu lượng 15mL/phút. Dòng chảy từ thiết bị phản ứng thứ hai được phân tích hàm lượng glucoza. Nhận thấy 90% sự chuyển hóa xenluloza thành glucoza diễn ra trên cơ sở trạng thái ổn định liên tục. Giữ tổng thời gian lưu trong nước trung bình trong khoảng từ 40 tới 50 phút.

Ví dụ 6

Điều chế xenlulaza khâu mạch

Hỗn hợp exo-glucanaza và/hoặc endo-glucanaza có tổng hoạt độ là 10IU được khâu mạch bằng cách phân lập protein đậu tương (2mg/ml) được điều chế trong phòng thí nghiệm sử dụng glutaraldehyt là chất khâu mạch dưới điều kiện môi trường kiềm. Thời gian phản ứng khâu mạch được kiểm soát để thu được các khối enzym chế phẩm tan (như được chứng minh trong phương pháp điện di không biến tính Native-PAGE). Chế phẩm được lọc màng và được cô đặc trên màng lọc siêu âm 30KDa để loại bỏ các protein không khâu mạch và chất khâu mạch dư. Chế phẩm lỏng chứa 50mg/mL protein được sử dụng là chế phẩm enzym.

Ví dụ 7

Thủy phân liên tục xenluloza sử dụng xenlulaza được khâu mạch

3% trọng lượng/thể tích huyền phù xenluloza tinh khiết trong 50mM dung dịch đệm xitrat có độ pH=5,0 được bổ sung vào ở lưu lượng khoảng 10mL/phút sử dụng

bơm định lượng để duy trì mức chất lỏng ở chiều cao không đổi trong thiết bị phản ứng có khuấy được đun nóng bằng áo nước 500mL trong đó một lượng là 1000IU đương lượng hoạt độ endoglucanaza và exoglucanaza khô mạch được bổ sung vào bể có khuấy được duy trì ở nhiệt độ 45°C. Hỗn hợp phản ứng được tuần hoàn liên tục qua màng lọc siêu âm 30KDa. Sản phẩm thẩm qua màng được đi qua cột có tầng nạp chứa enzym bất động như được sử dụng trong ví dụ 5(b). Hỗn hợp phản ứng từ thiết bị phản ứng kiểu cột nhồi được phân tích hàm lượng glucoza. Độ chuyển hóa trung bình khoảng 90% chuyển hóa xenluloza thành glucoza được nhận thấy diễn ra ở trạng thái ổn định liên tục. Giữ tổng thời gian lưu trong nước trung bình trong khoảng từ 40 tới 50 phút.

Bảng 1: So sánh tốc độ và mức độ thủy phân hemixenlulaza bằng enzym sử dụng hai chế phẩm enzym hemixenlulaza là HMI và HMII, mỗi chế phẩm enzym chủ yếu chứa các enzym từ nhóm thứ nhất và nhóm thứ hai tương ứng. Thử nghiệm 1 là trường hợp truyền thống trong đó hai chế phẩm enzym được sử dụng cùng với nhau, và các thử nghiệm 2 và 3 ở đó hai chế phẩm enzym được sử dụng trong hai bước như được mô tả trong sáng chế.

Các enzym		Tỷ lệ đường hóa theo giờ				
		1	2	3	4	24
Thử nghiệm 1	HM I+HM II tại lúc bắt đầu	ND	70	ND	80	100
Thử nghiệm 2	HM I (1 giờ) sau đó là HM II	37	78	84	86	100
Thử nghiệm 3	HM I (2 giờ) sau đó là HM II	ND	56	84	100	-

Bảng 2: So sánh tốc độ và mức độ thủy phân xenluloza + hemixenlulaza theo tỷ lệ 64:20 bằng enzym sử dụng hai chế phẩm enzym xenlulaza là xenlulaza và xenlulaza

+ glucosidaza, mỗi chế phẩm enzym chủ yếu chứa các enzym từ nhóm thứ nhất và nhóm thứ hai tương ứng. Thử nghiệm 1 là trường hợp truyền thống trong đó hai chế phẩm enzym được sử dụng cùng với nhau, và thử nghiệm 2 ở đó hai chế phẩm enzym được sử dụng trong hai bước như được mô tả trong sáng chế.

Thời gian lưu (giờ)	Tỷ lệ đường hóa	
	Thử nghiệm 1: Xenlulaza	Thử nghiệm 2: Xenlulaza + Glucosidaza
1	60,5	62,0
2	63,7	81,0
4	68,8	96,4
6	71,6	98,1

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất đường lên men được từ hemixenluloza và/hoặc xenluloza bằng cách sử dụng hệ nhiều enzym nhiều bước, quy trình này bao gồm các bước:
 - a. xử lý hemixenluloza và/hoặc xenluloza bằng một hoặc nhiều enzym được chọn từ endo-glucanaza, exo-glucanaza, endo-xylanaza, exo-xylanaza, mannanaza, galactanaza ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 90°C để thu được sản phẩm thủy phân thứ nhất, và
 - b. tách sản phẩm thủy phân thứ nhất khỏi các enzym nêu trên để thu được dung dịch chứa các oligosacarit; và
 - c. xử lý dung dịch thu được trong bước (b) bằng một hoặc nhiều enzym được chọn từ xylosidaza, mannosidaza, glucosidaza để thu được đường lên men được, trong đó tỷ lệ phần trăm sản xuất đường lên men được là 98.
2. Quy trình theo điểm 1, trong đó hemixenluloza và/hoặc xenluloza không chứa nhiều hơn 10% (trọng lượng/trọng lượng) lignin.
3. Quy trình theo điểm 1, trong đó tùy ý các enzym được khâu mạch bằng một hoặc nhiều protein, một hoặc nhiều polyme, hoặc sự kết hợp của chúng bằng cách sử dụng một hoặc nhiều chất khâu mạch.
4. Quy trình theo điểm 3, trong đó protein được chọn từ nhóm gồm nhóm enzym thứ nhất, nhóm enzym thứ hai, transferin, globulin, albumin huyết thanh động vật, protein đậu tương, protein sữa và gluten lúa mì, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng.
5. Quy trình theo điểm 3, trong đó chất khâu mạch được chọn từ nhóm gồm glutaraldehyt, divinylsulphon, polyetylenimin, và 1,4-butandiol diglycidylete.
6. Quy trình theo điểm 1, trong đó hemixenluloza và/hoặc xenluloza chuyển hóa thành các đường lên men được trong quy trình theo mẻ trong khoảng thời gian từ 4 tới 8 giờ.
7. Quy trình theo điểm 1, trong đó hemixenluloza và/hoặc xenluloza chuyển hóa thành các đường lên men được trong quy trình liên tục với thời gian lưu trong nước từ 1 tới 4 giờ.

8. Quy trình theo điểm 1, trong đó đường lên men được gồm có các oligosacarit tan, xenlobioza, glucoza, xylobioza, xyloza và arabinoza.

9. Quy trình theo điểm 1, trong đó hemixenluloza và/hoặc xenluloza thu được bằng quy trình bao gồm các bước:

- a. trộn sinh khối với từ 5% tới 10% trọng lượng/thể tích kiềm có độ pH nằm trong khoảng từ 12 đến 14 ở nhiệt độ trong khoảng từ 50°C tới 200°C dưới điều kiện áp suất trong khoảng 0,1 đến 2MPa (1,0 đến 20bar) trong khoảng thời gian từ 5 phút tới 2 giờ để thu được huyền phù đặc sinh khối; trong đó tỷ lệ kiềm so với sinh khối là từ 0,5 đến 2,0;
- b. lọc huyền phù đặc sinh khối đã nêu để thu được dịch lọc chứa hemixenluloza; và phần còn lại chứa xenluloza;
- c. xử lý dịch lọc bằng rượu để thu được kết tủa chứa hemixenluloza;
- d. rửa phần còn lại từ bước b bằng nước để loại bỏ kiềm dư để thu được xenluloza; và
- e. rửa kết tủa để thu được hemixenluloza.

10. Quy trình theo điểm 9, trong đó sinh khối được chọn từ nhóm gồm có cỏ, rơm rạ, vỏ trấu lúa mì, thân cây bông, bã mía hoặc bã cây lúa miến, lõi ngô, thân và rạ ngô, và thân cây thầu dầu.

11. Quy trình theo điểm 9, trong đó ít nhất 85% hemixenluloza được thu hồi.

12. Quy trình theo điểm 9, trong đó ít nhất 90% xenluloza được thu hồi.

13. Quy trình sản xuất đường lên men được từ sinh khối bằng cách sử dụng hệ nhiều enzym nhiều bước, quy trình này bao gồm các bước:

- a. trộn sinh khối với kiềm với lượng từ 5% tới 10% trọng lượng/thể tích kiềm có độ pH nằm trong khoảng 12-14 ở nhiệt độ trong khoảng từ 50°C tới 200°C dưới áp suất từ 0,1 đến 2MPa (1,0 đến 20bar) trong thời gian từ 5 phút tới 2 giờ để thu được huyền phù đặc sinh khối;
- b. lọc huyền phù đặc sinh khối đã nêu để thu được dịch lọc chứa hemixenluloza; phần còn lại chứa xenluloza;

- c. xử lý dịch lọc bằng rượu để thu được kết tủa chứa hemixenluloza;
- d. rửa phần còn lại từ bước b bằng nước để loại bỏ kiềm dư để thu được xenluloza;
- e. rửa kết tủa để thu được hemixenluloza;
- f. xử lý hemixenluloza từ bước (e) và/hoặc xenluloza từ bước (d) bằng một hoặc nhiều enzym được chọn từ endo-glucanaza, exo-glucanaza, endo-xylanaza, exo-xylanaza, mannanaza, galactanaza tại nhiệt độ trong khoảng từ 30°C tới 90°C để thu được sản phẩm thủy phân thứ nhất; và
- g. tách sản phẩm thủy phân thứ nhất khỏi các enzym nêu trên để thu được dung dịch chứa các oligosacarit; và
- h. xử lý dung dịch thu được trong bước (g) bằng một hoặc nhiều enzym được chọn từ xylosidaza, mannosidaza, glucosidaza để thu được đường lên men được, trong đó tỷ lệ phần trăm sản xuất đường lên men được là 98.