



(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) 
1-0022313

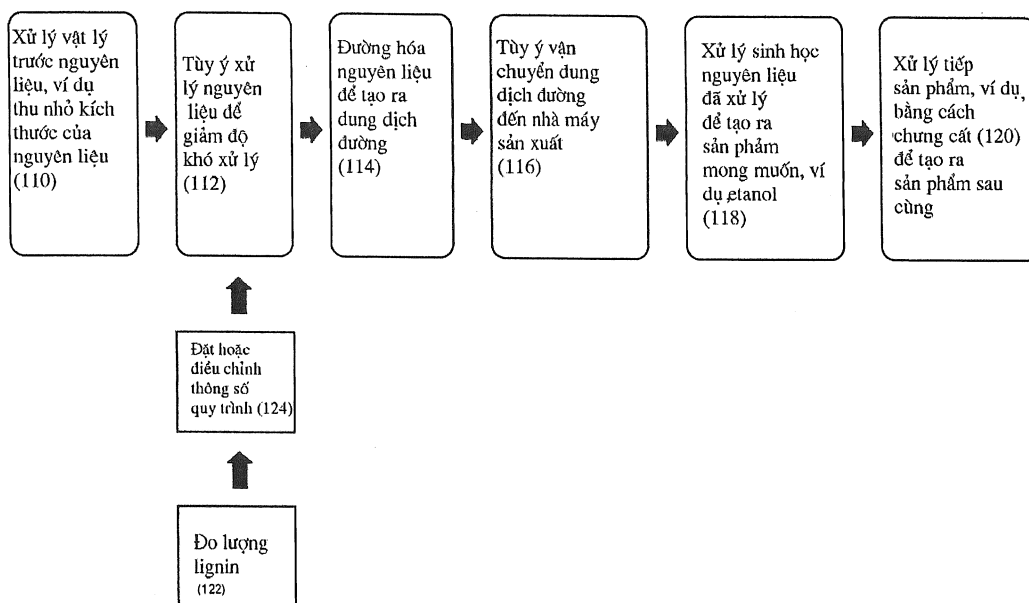
(51)⁷ **C13K 1/02, C12P 3/00, 7/10, 7/42, 7/54**

(13) **B**

- (21) 1-2012-03924 (22) 15.07.2011
(86) PCT/US2011/044271 15.07.2011 (87) WO2012/012297A1 26.01.2012
(30) 61/365,493 19.07.2010 US
(45) 25.11.2019 380 (43) 27.05.2013 302
(73) XYLECO, INC. (US)
271 Salem St., Unit L, Woburn, Massachusetts 01801, United States of America
(72) MEDOFF, Marshall (US), MASTERMAN, Thomas (US), BAE, Seula (US),
WALLICK, Kelly (US)
(74) Công ty TNHH Quốc tế D & N (D&N INTERNATIONAL CO.,LTD.)

(54) **PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ NGUYÊN LIỆU SINH KHỐI**

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp xử lý nguyên liệu sinh khối (ví dụ, sinh khối thực vật, sinh khối của động vật, và sinh khối từ nguồn thải đô thị) để tạo ra các chất trung gian và sản phẩm có ích, như năng lượng, nhiên liệu, thực phẩm hoặc nguyên liệu. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến phương pháp có thể sử dụng các nguyên liệu sinh khối, như xenluloza và/hoặc lignoxenluloza, để sản xuất sản phẩm trung gian hoặc thành phẩm, ví dụ, bằng quá trình lên men.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp xử lý nguyên liệu sinh khối (ví dụ, sinh khối thực vật, sinh khối của động vật, và sinh khối từ nguồn thải đô thị) để tạo ra các chất trung gian và sản phẩm có ích, như năng lượng, nhiên liệu, thực phẩm hoặc nguyên liệu. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến phương pháp có thể sử dụng các nguyên liệu sinh khối, như xenluloza và/hoặc lignoxenluloza, để sản xuất sản phẩm trung gian hoặc thành phẩm, ví dụ, bằng quá trình lên men.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các nguyên liệu xenluloza và lignoxenluloza được sản xuất, xử lý, và sử dụng với lượng lớn trong nhiều ứng dụng. Các nguyên liệu này thường được sử dụng một lần, và sau đó được loại bỏ ở dạng phế thải, hoặc đơn giản được coi là nguyên liệu phế thải, ví dụ, nước thải, bã mía, mùn cưa, và rơm khô.

Các nguyên liệu xenluloza và lignoxenluloza khác nhau, việc sử dụng chúng, và các ứng dụng đã được bộc lộ trong các patent Mỹ số 7,074,918, 6,448,307, 6,258,876, 6,207,729, 5,973,035 và 5,952,105; và trong các đơn yêu cầu cấp patent khác, bao gồm “*Fibrous materials and composites*” PCT/US2006/010648, nộp ngày 23 tháng 3 năm 2006, và “*Fibrous materials and composites*” công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2007/0045456.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Nói chung, sáng chế đề cập đến phương pháp xử lý sinh học các nguyên liệu chứa cacbon, như các nguyên liệu chứa hydrat cacbon (ví dụ, nguyên liệu sinh khối, nguyên liệu có nguồn gốc từ sinh khối hoặc chitin), cụ thể là các nguyên liệu xenluloza và lignoxenluloza, và các nguyên liệu chứa hydrat cacbon được đường hóa. Các phương pháp kỹ thuật xử lý sinh học được bộc lộ trong bản mô tả này bao gồm việc kết hợp các nguyên liệu chứa hydrat cacbon với vi sinh vật mà sử dụng nguyên liệu chứa hydrat cacbon, hoặc dẫn xuất được đường hóa của nó, để tạo ra sản phẩm hoặc chất trung gian. Nói chung, việc xử lý này được thực hiện trong môi trường chất lỏng, và theo một số

phương án thực hiện bao gồm quá trình lên men.

Nguồn sinh khối phổ biến chứa xenluloza, hemixenluloza, và lignin cùng với lượng nhỏ hơn của các protein, các phân chiết được và các chất khoáng. Các hydrat cacbon phức có trong các phân đoạn xenluloza và hemixenluloza có thể được xử lý thành các đường có khả năng lên men, mà có thể được chuyển hóa bằng cách xử lý sinh học thành nhiều loại sản phẩm, như rượu hoặc các axit hữu cơ. Sản phẩm thu được phụ thuộc vào vi sinh vật được sử dụng và các điều kiện mà việc xử lý sinh học diễn ra.

Khác với các nguyên liệu lên men truyền thống như ngô, các loại nho, và các nguyên liệu tương tự, nói chung các nguyên liệu xenluloza và lignoxenluloza chứa chất dinh dưỡng với lượng tương đối nhỏ đến mức không đáng kể. Điều này là đặc biệt đúng đối với các nguyên liệu mà được xử lý, ví dụ, bằng cách nghiền nhão, ví dụ, giấy loại và bột giấy loại. Kết quả là, khi các nguyên liệu này được sử dụng, việc lên men thường diễn ra từ từ (nếu không muốn nói là không diễn ra), và khó có thể thu được etanol có nồng độ cao. Trong khi các gói dinh dưỡng thương phẩm có sẵn, như pepton hoặc môi trường kiềm chứa nitơ cho nấm men, có thể được bổ sung vào môi trường lên men, các nguyên liệu này thường là đắt tiền, ảnh hưởng đến tính khả thi về mặt kinh tế của các quy trình lên men ở quy mô lớn.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng bằng cách bổ sung các chất dinh dưỡng cụ thể vào môi trường xử lý sinh học để nuôi vi sinh vật, hiệu quả của việc xử lý sinh học có thể được nâng cao một cách đáng kể và chi phí có thể được giảm một cách đáng kể. Các chất dinh dưỡng bao gồm thực phẩm, ví dụ, hạt hoặc rau; cặn thực phẩm, ví dụ, cặn của sản phẩm thu hoạch như cám gạo, hoặc cặn của sản phẩm thịt, ví dụ, nước hầm, các loại mỡ, nước canh thịt hoặc phân chiết từ thịt bò, thịt gà, thịt lợn hoặc các loại thịt tương tự; hoặc hỗn hợp của chúng. Trong bản mô tả này, các chất này được gọi chung là “các nguồn dinh dưỡng từ thực phẩm”. Vì sử dụng các nguồn dinh dưỡng từ thực phẩm, các chất dinh dưỡng có thể được cung cấp cho quy trình lên men với chi phí tương đối thấp, làm giảm tổng chi phí của sản phẩm sản xuất được theo quy trình này. Nguồn chất dinh dưỡng từ thực phẩm có thể là thấp về hàm lượng đường, do nguyên liệu đang được sử dụng chủ yếu hoặc chỉ nguồn chất dinh dưỡng, chứ không phải là nguyên liệu lên men. Do đó, các nguyên liệu có thể được sử dụng không được coi là nguồn đường.

Theo một số phương án thực hiện, nguồn chất dinh dưỡng từ thực phẩm được phân phối như một phần của gói dinh dưỡng, mà có thể chứa một hoặc nhiều thành phần bổ sung. Trong một số phương án thực hiện ưu tiên, gói dinh dưỡng còn chứa nguồn nitơ, ví dụ, ure, amoniac, amoni sulfat, và hỗn hợp của chúng.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp xử lý bao gồm bước kết hợp nguyên liệu, bao gồm nguyên liệu chứa cacbon, như nguyên liệu xenluloza hoặc nguyên liệu lignoxenluloza và/hoặc nguyên liệu xenluloza hoặc nguyên liệu lignoxenluloza đã được đường hóa, với vi sinh vật và nguồn chất dinh dưỡng từ thực phẩm để tạo ra hỗn hợp, vi sinh vật sử dụng nguyên liệu để tạo ra sản phẩm hoặc chất trung gian.

Một số phương án thực hiện bao gồm một hoặc nhiều các dấu hiệu sau. Trong một số trường hợp, nguồn chất dinh dưỡng từ thực phẩm được chọn từ nhóm bao gồm hạt, các loại rau, cặn của hạt, cặn của các loại rau, cặn của thịt (ví dụ, nước hầm, chiết phẩm, nước canh thịt hoặc các loại mỡ), và hỗn hợp của chúng. Ví dụ, nguồn chất dinh dưỡng có thể được chọn từ nhóm bao gồm lúa mỳ, yến mạch, lúa mạch, đậu nành, đậu Hà Lan, quả đậu, khoai tây, ngô, cám gạo, bột ngô, cám lúa mỳ, cặn sản phẩm thịt, và hỗn hợp của chúng.

Sản phẩm này có thể là hoặc bao gồm, ví dụ, nhiên liệu được chọn từ nhóm bao gồm hydro, rượu, các axit hữu cơ, các hydrocacbon, và hỗn hợp của chúng. Ví dụ, sản phẩm này có thể bao gồm rượu được chọn từ nhóm bao gồm metanol, etanol, propanol, isopropanol, *n*-butanol, etylen glycol, propylen glycol, 1,4-butan diol, glyxerin, và hỗn hợp của chúng. Trong một số trường hợp, sản phẩm này có thể là axit hữu cơ được chọn từ nhóm bao gồm axit formic, axit axetic, axit propionic, axit butyric, axit valeric, caproic, axit palmitic, axit stearic, axit oxalic, axit malonic, axit succinic, axit glutaric, axit oleic, axit linoleic, axit glycolic, axit lactic, axit γ -hydroxybutyric và hỗn hợp của chúng. Các hydrocacbon bao gồm, ví dụ, metan, etan, propan, isobuten, pentan, *n*-hexan, và hỗn hợp của chúng. Các sản phẩm và các chất trung gian khác cũng có thể được sản xuất.

Bước sử dụng có thể bao gồm, ví dụ, bước đường hóa và/hoặc bước lên men. Trong một số trường hợp, bước sử dụng bao gồm bước đường hóa và lên men đồng thời

(SSF). Vi sinh vật có thể bao gồm, ví dụ, nấm men và/hoặc enzym, như loại bất kỳ trong số các loại được bộc lộ một cách chi tiết trong bản mô tả này. Trong một số trường hợp, bước đường hóa có thể được thực hiện ở độ pH nằm trong khoảng từ 3,8 đến 4,2 và bước lên men có thể được thực hiện ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,8 đến 5,2, và phương pháp có thể còn bao gồm bước điều chỉnh độ pH giữa mức đường hóa và mức lên men. Trong một số trường hợp, hỗn hợp này có thể chứa nguồn nitơ, mà có thể là một phần của gói dinh dưỡng hoặc có thể được bổ sung vào một cách riêng biệt. Ví dụ, nguồn nitơ có thể được chọn từ nhóm bao gồm ure, amoniac, amoni sulfat, và hỗn hợp của chúng.

Trong một số phương án thực hiện ưu tiên, hỗn hợp này còn chứa hệ enzym được chọn để giải phóng các chất dinh dưỡng, ví dụ, nitơ, axit amin, và mỡ, từ nguồn chất dinh dưỡng từ thực phẩm. Ví dụ, hệ enzym có thể bao gồm một hoặc nhiều enzym được chọn từ nhóm bao gồm amylaza, proteaza, và hỗn hợp của chúng. Trong một số trường hợp, hệ enzym chứa proteaza và amylaza.

Trừ khi có quy định khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và thuật ngữ khoa học dùng trong bản mô tả này đều có cùng nghĩa thường được hiểu bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế. Mặc dù các phương pháp và các nguyên liệu tương tự hoặc tương đương với phương pháp và nguyên liệu được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được sử dụng trên thực tế hoặc kiểm nghiệm theo sáng chế, song phương pháp và các nguyên liệu thích hợp được bộc lộ dưới đây. Nội dung của tất cả các công bố, đơn yêu cầu cấp patent, patent, và các tài liệu được trích dẫn khác của bản mô tả này đều được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn. Nếu có mâu thuẫn thì bản mô tả này kể cả các định nghĩa sẽ được ưu tiên. Ngoài ra, các nguyên liệu, các phương pháp, và các ví dụ đều chỉ minh họa và không nhằm mục đích giới hạn.

Các dấu hiệu và các ưu điểm khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng nhờ phân mô tả chi tiết sáng chế dưới đây, và từ các điểm yêu cầu bảo hộ.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là hình vẽ dạng sơ đồ khối thể hiện sự chuyển hóa nguyên liệu thành etanol thông qua sự tạo ra dung dịch glucoza.

Fig.2 là hình vẽ dạng sơ đồ thể hiện nhà máy sản xuất etanol.

Fig.3 là hình vẽ dạng sơ đồ khối thể hiện bước thủy phân xenluloza bằng enzym thành glucoza.

Mô tả chi tiết sáng chế

Bằng cách sử dụng các phương pháp và các gói dinh dưỡng được bộc lộ trong bản mô tả này, các nguyên liệu chứa cacbon như các nguyên liệu xenluloza và lignoxenluloza và các chất dẫn xuất đã được đường hóa của chúng có thể được xử lý sinh học, ví dụ, bằng cách sử dụng việc lên men, để tạo ra các chất trung gian và các sản phẩm có ích như các sản phẩm được bộc lộ trong bản mô tả này.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng bằng cách bổ sung lượng nhỏ thực phẩm và/hoặc cặn thực phẩm vào mẻ lên men, có thể thực hiện việc lên men có hiệu quả, tạo ra etanol có nồng độ tương đối cao, ví dụ, đến 10%, 15%, 20%, 25%, hoặc thậm chí đến 30% hoặc cao hơn. Ví dụ, trong một số trường hợp, nồng độ có thể nằm trong khoảng từ 0,1 đến 80g/L, ví dụ, nằm trong khoảng từ 0,1g/L đến 40g/L, nằm trong khoảng 0,5g/L đến 20g/L, nằm trong khoảng 1g/L đến 10g/L hoặc trong một số ứng dụng nằm trong khoảng từ 1g/L đến 5g/L. Nồng độ được sử dụng thay đổi tùy theo loại chất dinh dưỡng của nguyên liệu được sử dụng.

Các nguồn dinh dưỡng từ thực phẩm thích hợp bao gồm hạt, ví dụ, lúa mỳ, các loại yến mạch, và lúa mạch, và rau, ví dụ, đậu nành, đậu Hà Lan, quả đậu, khoai tây, và ngô, và cặn của các nguyên liệu này, ví dụ, cám gạo, bột ngô, và cám lúa mỳ. Các nguồn này đại diện, nhưng chỉ là một vài ví dụ, cho nhiều loại hạt và các loại rau có thể được sử dụng. Như nêu trên, ngoài hoặc theo cách khác nguồn chất dinh dưỡng từ thực phẩm có thể bao gồm các cặn thịt như nước hầm, nước canh thịt, chiết phẩm hoặc các loại mỡ bò, gà, lợn, hoặc các loại thịt khác. Nguồn chất dinh dưỡng từ thực phẩm có thể bao gồm các hỗn hợp gồm hai hoặc nhiều hạt và/hoặc các loại rau và/hoặc các cặn thịt. Theo cách có lợi, các nguyên liệu này nói chung có chi phí thấp. Trong một số trường hợp, các nguyên liệu được sử dụng mà nói cách khác được coi là phế thải, ví dụ, thực phẩm hoặc các loại cặn mà theo cách khác phải được chôn lấp.

Ngoài nguồn chất dinh dưỡng từ thực phẩm, các gói dinh dưỡng được ưu tiên chứa nguồn nitơ. Các nguồn nitơ thích hợp bao gồm, ví dụ, ure, amoniac, amoni sulfat, và hỗn hợp của chúng. Trong một số ứng dụng, nguồn nitơ được bổ sung vào ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 đến 10, từ 2 đến 8 hoặc tốt hơn là từ 3 đến 6g/L tính theo thể tích của môi trường lỏng.

Các hợp chất khác mà có thể có trong gói dinh dưỡng là các phosphat, mà được sử dụng bởi vi sinh vật để sao chép.

Theo các phương án thực hiện ưu tiên, gói dinh dưỡng được sử dụng với sự kết hợp cụ thể của enzym mà bao gồm một hoặc nhiều enzym được chọn để đường hóa trên nguyên liệu xenluloza hoặc nguyên liệu lignoxenluloza, và một hoặc nhiều enzym được chọn để giải phóng các chất dinh dưỡng (ví dụ, nitơ, các axit amin và mỡ) ra khỏi nguồn chất dinh dưỡng từ thực phẩm. Trong một số trường hợp, sự kết hợp enzym là amylaza, vốn để phân hủy tinh bột trong nguồn chất dinh dưỡng, và proteaza, vốn để thủy phân protein và sinh ra các peptit từ nguồn chất dinh dưỡng. Các tổ hợp enzym được ưu tiên sẽ được mô tả một cách chi tiết hơn dưới đây.

Các bước xử lý mà trong đó các nguồn dinh dưỡng từ thực phẩm hoặc các gói dinh dưỡng có thể được sử dụng sẽ được mô tả.

Chuyển hóa các nguyên liệu xenluloza và lignoxenluloza thành rượu

Fig.1 thể hiện quy trình để sản xuất rượu, ví dụ, etanol, có thể bao gồm, ví dụ, các bước: tùy ý xử lý cơ học nguyên liệu (bước 110), trước và/hoặc sau bước xử lý này, tùy ý xử lý nguyên liệu theo phương pháp xử lý vật lý khác, ví dụ, chiếu xạ (ví dụ, chiếu xạ chùm điện tử), để tiếp tục giảm độ khó xử lý của nguyên liệu (bước 112), đường hóa nguyên liệu để tạo ra dung dịch đường (bước 114), tùy ý vận chuyển dung dịch (hoặc nguyên liệu, enzym và nước, nếu bước đường hóa được thực hiện trên đường) ví dụ, bằng đường ống, toa xe lửa, xe tải hoặc sà lan đến nhà máy sản xuất (bước 116), và sau đó xử lý sinh học nguyên liệu đã được xử lý để tạo ra sản phẩm mong muốn (bước 118), sau đó sản phẩm này tiếp tục được xử lý, ví dụ, bằng cách chưng cất (bước 120). Nếu muốn, hàm lượng lignin có thể được đo (bước 122) và các thông số xử lý có thể được đặt hoặc điều chỉnh trên cơ sở đo (bước 124), như đã được bộc lộ trong đơn tạm thời yêu cầu cấp patent

Mỹ số 61/151,724, nộp ngày 11 tháng 2 năm 2009 mà toàn bộ nội dung của nó được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Nguồn chất dinh dưỡng từ thực phẩm hoặc gói dinh dưỡng có mặt trong khi xử lý sinh học (bước 118), ví dụ, bước lên men, và theo một số phương án thực hiện được ưu tiên chúng còn có thể có mặt ở bước đường hóa (bước 114). Theo một số phương án thực hiện, nguồn chất dinh dưỡng từ thực phẩm hoặc gói dinh dưỡng được bổ sung vào khi bắt đầu bước 114, cùng với việc kết hợp enzym thích hợp để đường hóa, lên men, và giải phóng các chất dinh dưỡng ra khỏi nguồn chất dinh dưỡng từ thực phẩm. Quá trình đường hóa được thực hiện trong điều kiện xử lý thứ nhất (ví dụ, nhiệt độ và độ pH), và sau đó khi bước đường hóa đã diễn ra đến mức độ mong muốn thì các điều kiện xử lý này được điều chỉnh (ví dụ, bằng cách điều chỉnh độ pH đến trị số nằm trong khoảng từ 4 đến 5) nhằm cho phép sự lên men được diễn ra.

Nhà máy sản xuất được sử dụng trong các bước từ 118-120 (và trong một số trường hợp tất cả các bước nêu trên) có thể là, ví dụ, nhà máy sản xuất etanol từ đường hoặc tinh bột hiện có hoặc nhà máy đã được cải biến bằng cách loại bỏ hoặc vô hiệu hóa thiết bị nằm trước ra khỏi hệ thống xử lý sinh học (trong nhà máy sản xuất etanol thông thường thì thường bao gồm thiết bị tiếp nhận hạt, máy nghiền kiểu búa, bộ trộn huyền phù đặc, thiết bị nấu và thiết bị hóa lỏng). Trong một số trường hợp, nguyên liệu đã được nhà máy tiếp nhận có thể được nạp một cách trực tiếp vào thiết bị lên men. Nhà máy cải biến được thể hiện dưới dạng sơ đồ trên Fig.2.

Các bước từ 110 đến 112 được bộc lộ, ví dụ, trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 12/429,045, nộp ngày 23 tháng 4 năm 2009 mà toàn bộ nội dung của nó được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Các bước 114, 118 và 120 (đường hóa, lên men, và chưng cất), mà gắn liền với sản phẩm rượu bằng cách xử lý sinh học, sẽ tiếp tục được mô tả.

Đường hóa

Để chuyển hóa nguyên liệu thành đường có khả năng lên men, xenluloza trong nguyên liệu được thủy phân bởi tác nhân đường hóa, ví dụ, enzym, bước xử lý này được gọi là bước đường hóa. Các nguyên liệu bao gồm xenluloza được xử lý bằng enzym, ví dụ, bằng cách kết hợp nguyên liệu và enzym trong dung môi, ví dụ, trong dung dịch nước.

Enzym và các sinh vật phá hủy sinh khối mà phân hủy sinh khối, như xenluloza và/hoặc các phần lignin của sinh khối, chứa hoặc sinh ra enzym phân giải xenluloza (các xenlulaza), các ligninaza hoặc các chất chuyển hóa phá hủy sinh khối có phân tử nhỏ khác. Các enzym này có thể là phức hợp của các enzym tác động hiệp đồng để làm thoái biến xenluloza tinh thể hoặc các phần lignin sinh khối. Các ví dụ về enzym phân giải xenluloza bao gồm: các endoglucanaza, các xenlobiohydrolaza, và xenlobiaza (các β -glucosidaza). Trên Fig.3, đầu tiên các chất xenluloza được thủy phân bởi các endoglucanaza ở các vị trí ngẫu nhiên để tạo ra các chất trung gian oligome. Sau đó, các chất trung gian này sẽ các chất nền để ngoại tách các glucanaza như xenlobiohydrolaza nhằm tạo ra xenlobioza từ các đầu tận cùng của polyme xenluloza. Xenlobioza là dime liên kết ở vị trí 1,4 tan được trong nước của glucoza. Cuối cùng, xenlobiaza tách xenlobioza ra để tạo ra glucoza.

Các tác nhân đường hóa thích hợp được bộc lộ, ví dụ, trong phần nguyên liệu nêu dưới đây.

Như nêu trên, tốt hơn nếu nguồn chất dinh dưỡng từ thực phẩm hoặc gói dinh dưỡng được bổ sung vào trước khi hoặc trong khi đường hóa, và enzym được bổ sung vào bước đó được chọn để giải phóng các chất dinh dưỡng từ nguồn chất dinh dưỡng từ thực phẩm. Ví dụ, enzym thích hợp được bộc lộ, trong phần nguyên liệu nêu dưới đây.

Quy trình đường hóa có thể được thực hiện một phần hoặc hoàn toàn trong thùng chứa (ví dụ, thùng chứa có thể tích thấp nhất 4.000, 40.000, 400.000, hoặc 1.000.000 lit) trong nhà máy sản xuất, và/hoặc có thể được thực hiện một phần hoặc hoàn toàn trong khi vận chuyển, ví dụ, trên toa xe lửa, xe bồn, hoặc trên tàu chở cực lớn hoặc hầm tàu biển. Thời gian cần thiết để hoàn thành bước đường hóa sẽ phụ thuộc vào các điều kiện xử lý và nguyên liệu và enzym được sử dụng. Nếu bước đường hóa được thực hiện trong nhà máy sản xuất trong các điều kiện được kiểm soát, xenluloza có thể gần như được chuyển hóa một cách hoàn toàn thành glucoza trong khoảng thời gian từ 12 giờ đến 96 giờ. Nếu bước đường hóa được thực hiện một phần hoặc hoàn toàn trong khi vận chuyển, việc đường hóa có thể kéo dài hơn.

Nói chung, tốt hơn nếu các chất có trong bình chứa được trộn trong khi đường hóa,

ví dụ, bằng cách sử dụng bước trộn phun như đã được bộc lộ trong Đơn yêu cầu cấp patent Mỹ tạm thời số 61/218,832, toàn bộ nội dung của đơn này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Việc bổ sung các chất hoạt động bề mặt có thể nâng cao tốc độ đường hóa. Các ví dụ về các chất hoạt động bề mặt bao gồm chất hoạt động bề mặt không ion, như các chất hoạt động bề mặt polyetylen glycol Tween[®] 20 hoặc Tween[®] 80, các chất hoạt động bề mặt mang ion, hoặc các chất hoạt động bề mặt lưỡng tính.

Nói chung, tốt hơn nếu nồng độ của dung dịch glucoza thu được là tương đối cao, ví dụ, lớn hơn 40%, hoặc lớn hơn 50, 60, 70, 80, 90 hoặc thậm chí lớn hơn 95% trọng lượng. Điều này làm giảm thể tích cần phải vận chuyển, nếu việc đường hóa và lên men được thực hiện ở các vị trí khác nhau, và còn ức chế sự phát triển của vi khuẩn trong dung dịch. Tuy nhiên, có thể sử dụng dung dịch có nồng độ thấp hơn, trong trường hợp đó có thể nên bổ sung chất phụ gia kháng khuẩn, ví dụ, kháng sinh phổ rộng với lượng ít, ví dụ, nằm trong khoảng từ 50 đến 150ppm. Thuốc kháng sinh thích hợp khác bao gồm amphotericin B, ampicillin, chloramphenicol, ciprofloxacin, gentamicin, hygromycin B, kanamycin, neomycin, penicillin, puromycin, streptomycin. Thuốc kháng sinh sẽ ức chế sự sinh trưởng của vi sinh vật trong khi vận chuyển và bảo quản, và có thể được sử dụng với lượng thích hợp, ví dụ, nằm trong khoảng từ 15ppm đến 1000ppm trọng lượng, ví dụ, nằm trong khoảng từ 25ppm đến 500ppm, hoặc nằm trong khoảng từ 50ppm đến 150ppm. Nếu muốn, kháng sinh có thể được đưa vào ngay cả khi nồng độ đường là tương đối cao.

Dung dịch có nồng độ tương đối cao có thể thu được bằng cách hạn chế lượng nước được bổ sung vào nguyên liệu với enzym. Nồng độ có thể được kiểm soát, ví dụ, bằng cách kiểm soát lượng đường hóa diễn ra. Ví dụ, nồng độ có thể được gia tăng bằng cách bổ sung nhiều nguyên liệu hơn vào dung dịch. Để duy trì đường đang được sinh ra trong dung dịch, chất hoạt động bề mặt có thể được bổ sung vào, ví dụ, một trong số các chất hoạt động bề mặt nêu trên. Độ hòa tan cũng có thể được gia tăng bằng cách tăng nhiệt độ của dung dịch. Ví dụ, dung dịch này có thể được duy trì ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 50°C, 60°C đến 80°C, hoặc thậm chí cao hơn.

Theo một số phương án, nguyên liệu được xử lý để được chuyển hóa thành nguyên liệu thuận tiện và cô rắn, ví dụ, dưới dạng bột, cốm hoặc dạng hạt. Nguyên liệu dạng cô rắn có thể có dạng tinh khiết, hoặc dạng chưa tinh chế hoặc dạng thô. Ví dụ, dạng cô rắn có thể có tổng nồng độ đường nằm trong khoảng từ 90% trọng lượng và đến 100% trọng lượng, ví dụ, 92, 94, 96 hoặc 98% trọng lượng đường. Dạng này có thể là dạng đặc biệt có hiệu quả để vận chuyển, ví dụ, đến nhà máy xử lý sinh học, như nhà máy sản xuất nhiên liệu sinh học. Dạng này cũng có lợi để bảo quản và xử lý, dễ dàng hơn trong sản xuất và trở thành cả chất trung gian lẫn sản phẩm, tạo ra sự lựa chọn đối với việc tinh chế sinh học như đối với các sản phẩm cần được sản xuất.

Trong một số trường hợp, nguyên liệu dạng bột, cốm hoặc dạng hạt còn có thể chứa một hoặc nhiều nguyên liệu, ví dụ, các chất phụ gia hoặc các hóa chất, được bộc lộ trong bản mô tả này, như chất dinh dưỡng từ thực phẩm hoặc gói dinh dưỡng, nguồn nitơ, ví dụ, ure, chất hoạt động bề mặt, enzym, hoặc vi sinh vật bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này. Trong một số trường hợp, tất cả nguyên liệu cần để xử lý sinh học được đưa vào trong nguyên liệu dạng bột, cốm hoặc dạng hạt. Dạng này có thể là dạng đặc biệt thuận tiện để vận chuyển đến các nhà máy xử lý sinh học ở xa, như nhà máy sản xuất nhiên liệu sinh học ở xa. Dạng này cũng là có lợi để bảo quản và xử lý.

Trong một số trường hợp, nguyên liệu dạng bột, cốm hoặc dạng hạt (có hoặc không có các nguyên liệu bổ sung, như các chất phụ gia và các hóa chất) có thể được xử lý bởi phương pháp xử lý bất kỳ trong số các phương pháp xử lý đã được bộc lộ trong Đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 12/429,045, mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Ví dụ, việc chiếu xạ nguyên liệu dạng bột, cốm hoặc dạng hạt có thể làm tăng độ hòa tan của nguyên liệu này và có thể khử trùng nguyên liệu sao cho nhà máy xử lý sinh học có thể hợp nhất nguyên liệu vào vào quy trình của chúng một cách trực tiếp như có thể là cần thiết đối với chất trung gian hoặc sản phẩm dự định.

Trong các trường hợp nhất định, nguyên liệu dạng bột, cốm hoặc dạng hạt (có hoặc không có các nguyên liệu bổ sung, như các chất phụ gia và các hóa chất) có thể được mang trong cấu trúc hoặc chất mang để tiện cho việc vận chuyển, bảo quản, và xử lý. Ví dụ, cấu trúc hoặc chất mang có thể bao gồm hoặc kết hợp túi và hoặc lớp lót, như túi hoặc lớp lót có khả năng thoái biến. Dạng này có thể là đặc biệt có lợi để bổ sung một cách

trực tiếp vào hệ thống xử lý sinh học.

Lên men

Vi sinh vật có thể sinh ra nhiều chất trung gian và các sản phẩm hữu ích bằng cách lên men đường có phân tử lượng thấp sản xuất được bằng cách đường hóa các nguyên liệu sinh khối đã được xử lý. Ví dụ, bước lên men hoặc các bước xử lý sinh học khác có thể sinh ra rượu, các axit hữu cơ, các hydrocacbon, hydro, các protein hoặc hỗn hợp gồm chất liệu bất kỳ trong số các chất liệu này.

Nấm men và vi khuẩn *Zymomonas*, ví dụ, có thể được sử dụng để lên men hoặc chuyển hóa. Vi sinh vật đã được bàn luận đến ở phần Nguyên liệu dưới đây. Độ pH tối ưu đối với nấm men nằm trong khoảng từ 4 đến 5, trong khi độ pH tối ưu đối với *Zymomonas* nằm trong khoảng từ 5 đến 6. Thời gian lên men thường kéo dài trong khoảng từ 24 giờ đến 96 giờ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 26°C đến 40°C, tuy nhiên vi sinh vật ưa nhiệt ưa thích các khoảng nhiệt độ cao.

Theo một số phương án, toàn bộ hoặc một phần của quy trình lên men có thể bị gián đoạn trước khi đường có phân tử lượng thấp được chuyển hóa hoàn toàn thành ethanol. Các sản phẩm lên men trung gian chứa đường và các hydrat cacbon ở nồng độ cao. Các sản phẩm lên men trung gian này có thể được sử dụng để chế biến thực phẩm dùng cho người hoặc dùng cho động vật. Ngoài ra hoặc theo cách khác, các sản phẩm lên men trung gian có thể được nghiền thành hạt mịn trong máy nghiền thực nghiệm bằng thép không gỉ để tạo ra chế phẩm dạng bột.

Các bình lên men di động có thể được sử dụng, như đã được bộc lộ trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ tạm thời số 60/832,735, nay là công bố đơn quốc tế số WO 2008/011598. Tương tự, thiết bị đường hóa có thể là loại di động. Hơn nữa, bước đường hóa và/hoặc lên men có thể được thực hiện một phần hoặc hoàn toàn trong khi vận chuyển.

Chưng cất

Sau khi lên men, các chất lỏng thu được có thể được chưng cất bằng cách sử dụng, ví dụ, “cột sản xuất bia” để tách ethanol và rượu khác ra khỏi phần lớn nước và các chất

rắn còn sót lại. Hơi ra khỏi cột bia có thể là, ví dụ, 35% trọng lượng etanol và có thể được cấp vào cột tinh cất. Hỗn hợp gần như đồng sôi gồm (92,5%) etanol và nước từ cột tinh cất có thể được tinh chế thành etanol tinh khiết (99,5%) bằng cách sử dụng các rây phân tử pha hơi. Phần đáy cột bia có thể được đưa đến hiệu ứng thứ nhất của thiết bị bay hơi ba hiệu ứng. Thiết bị ngưng hồi lưu của cột tinh cất có thể cấp nhiệt cho hiệu ứng thứ nhất này. Sau hiệu ứng thứ nhất, các chất rắn có thể được tách bằng cách sử dụng máy ly tâm và được làm khô trong máy sấy quay. Một phần (25%) của dòng ra khỏi máy ly tâm có thể được tái tuần hoàn để lên men và phần còn lại được đưa đến hiệu ứng bay hơi thứ hai và hiệu ứng bay hơi thứ ba. Hầu hết phần ngưng bay hơi có thể được đưa về lại quy trình này làm phần ngưng khá sạch với phần nhỏ tách sang bước xử lý nước thải nhằm ngăn ngừa sự tích tụ của các hợp chất có điểm sôi thấp.

Chất trung gian và sản phẩm

Các bước xử lý và các chất dinh dưỡng nêu dưới đây có thể được sử dụng để chuyển hóa các nguyên liệu chứa hydrat cacbon, ví dụ, các xenluloza hoặc các nguyên liệu lignoxenluloza, thành một hoặc nhiều sản phẩm, như năng lượng, nhiên liệu, thực phẩm và các nguyên liệu. Các ví dụ cụ thể về các sản phẩm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hydro, rượu (ví dụ, rượu đơn chức hoặc rượu hai chức, như etanol, *n*-propanol hoặc *n*-butanol), rượu hydrat hoặc rượu hydro, ví dụ, chứa nhiều hơn 10%, 20%, 30% hoặc thậm chí nhiều hơn 40% nước, các loại đường, diezen sinh học, các axit hữu cơ (ví dụ, axit axetic và/hoặc axit lactic), các hydrocacbon, các đồng sản phẩm (ví dụ, các protein, như các protein phân giải xenluloza (enzym) hoặc các protein đơn bào), và các hỗn hợp gồm chất bất kỳ trong số chúng theo cách kết hợp bất kỳ hoặc nồng độ tương đối, và tùy ý kết hợp với các chất phụ gia bất kỳ, ví dụ, các chất phụ gia nhiên liệu. Các ví dụ khác bao gồm axit carboxylic, như axit axetic hoặc axit butyric, các muối của axit carboxylic, hỗn hợp gồm axit carboxylic và các muối của axit carboxylic và các este của axit carboxylic (ví dụ, metyl, etyl và các este *n*-propyl), các loại keton, aldehyt, các axit chưa no, như axit acrylic và các olefin, như etylen. Rượu khác và các chất dẫn xuất của rượu bao gồm propanol, propylen glycol, 1,4-butandiol, 1,3-propandiol, metyl hoặc các este etyl của rượu bất kỳ trong số các rượu này. Các sản phẩm khác bao gồm metyl acrylat, metylmetacrylat, axit lactic, axit propionic, axit butyric, axit succinic, axit 3-

hydroxypropionic, muối của axit bất kỳ trong số các axit và hỗn hợp gồm axit bất kỳ trong số các axit và các muối tương ứng.

Các chất trung gian và các sản phẩm khác, bao gồm thực phẩm và các sản phẩm dùng trong y tế, bộc lộ trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 12/417,900, mà toàn bộ nội dung của nó được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Nguyên liệu

Các thành phần của gói dinh dưỡng

Như nêu trên, các gói dinh dưỡng được ưu tiên chứa nguồn chất dinh dưỡng từ thực phẩm, nguồn nitơ, và trong một số trường hợp các thành phần khác, ví dụ, các loại phosphat. Các nguồn dinh dưỡng từ thực phẩm thích hợp bao gồm hạt và các loại rau, bao gồm các loại nêu trên và nhiều loại khác. Nguồn chất dinh dưỡng từ thực phẩm có thể bao gồm các hỗn hợp gồm hai hoặc nhiều hạt và/hoặc các loại rau.

Các gói dinh dưỡng được ưu tiên có thể chứa khoảng từ 2% đến 5% trọng lượng theo thể tích của nguồn chất dinh dưỡng từ thực phẩm, ví dụ, từ 3% đến 4% trọng lượng theo thể tích của bột cám gạo hoặc từ 4% đến 5% trọng lượng theo thể tích của bột ngô, khoảng 3g/L đến 4g/L nguồn nitơ, ví dụ, khoảng 3,5g/L ure, và khoảng 8g/L đến 12g/L chất hoạt động bề mặt không ion, ví dụ, khoảng 10g/L chất hoạt động bề mặt Tween[®] 80.

Enzym để giải phóng các chất dinh dưỡng

Như nêu trên, tốt hơn nếu hỗn hợp đường hóa và/hoặc lên men còn gồm hệ enzym được chọn để giải phóng các chất dinh dưỡng, ví dụ, nitơ, axit amin, và mỡ, từ nguồn chất dinh dưỡng từ thực phẩm. Ví dụ, hệ enzym có thể gồm một hoặc nhiều enzym được chọn từ nhóm bao gồm các amylaza, các proteaza, và hỗn hợp của chúng.

Trong một số trường hợp, hệ enzym chứa proteaza và amylaza. Ví dụ về proteaza thích hợp là enzym phân giải protein axit FERMGENTM, có thể mua được từ Genencor[®], một chi nhánh của Danisco. Enzym này là proteaza nấm cấu thành từ 5-10% Aspergillopepsin 1 trong dung dịch nước với glyxerol, natri sulfat, và natri benzoat. Ví dụ về amylaza thích hợp là enzym STARGENTM, có thể mua được từ Genencor[®], một chi

nhánh của Danisco. Enzym này là glucoamylaza và hỗn hợp alpha-amylaza, chứa *Aspergillus kawachi alpha-amylase* được biểu hiện trong *Trichoderma reesei* và glucoamylaza từ *Trichoderma reesei*.

Theo một số phương án thực hiện ưu tiên, mỗi amylaza và proteaza được đưa vào với lượng nằm trong khoảng từ 0,5% đến 1,5% trọng lượng tính theo lượng nguồn chất dinh dưỡng từ thực phẩm bổ sung vào, ví dụ, mỗi chất có mặt với lượng 1% trọng lượng. Đây là lượng rất nhỏ, nếu so với lượng thường là cần thiết khi cùng loại các nguyên liệu gốc thực phẩm được sử dụng làm nguyên liệu để đường hóa và lên men, chứ không phải là nguồn chất dinh dưỡng. Ví dụ, lượng được khuyến nghị với enzym FERMGENTM và enzym STARGENTM lần lượt là 26% đến 38% thể tích và 20-34% trọng lượng, khi các enzym này được sử dụng ở bước đường hóa và lên men ngô và các loại hạt thành etanol.

Mặc dù tốt hơn nếu sử dụng hỗn hợp gồm proteaza và amylaza, song trong một số trường hợp chất này hoặc chất kia có thể được sử dụng riêng, và/hoặc các enzym khác có thể được sử dụng nếu có khả năng giải phóng các chất dinh dưỡng ra khỏi nguồn chất dinh dưỡng từ thực phẩm.

Nguyên liệu sinh khối

Sinh khối có thể là nguyên liệu xenluloza hoặc lignoxenluloza chẳng hạn. Các nguyên liệu này bao gồm giấy và các sản phẩm từ giấy (ví dụ, giấy nhiều lớp bọc và giấy gói hàng loại dày), gỗ, các nguyên liệu liên quan đến gỗ, ví dụ, ván ghép, các loại cỏ, vỏ trấu, bã, sợi đay, xơ gai, sợi lanh, tre, sợi xizan, cây chuối abaca, rom, cỏ đánh đồng, cỏ linh lăng, cỏ khô, lõi ngô, rom từ ngô, xơ dừa; và các nguyên liệu chứa lượng lớn α -xenluloza, ví dụ, bông. Các nguyên liệu này có thể thu được từ các mẫu nguyên liệu dẹt mới nguyên, ví dụ, mảnh vải thừa, phế thải sau tiêu dùng, ví dụ, giẻ rách. Khi được sử dụng, các sản phẩm từ giấy có thể là các nguyên liệu mới nguyên, ví dụ, các mẫu nguyên liệu mới nguyên, hoặc chúng có thể là phế thải sau tiêu dùng. Ngoài nguyên liệu mới nguyên, phế thải sau tiêu dùng, phế thải công nghiệp (ví dụ, đồ thừa), và phế thải xử lý (ví dụ, dòng nhánh từ quy trình xử lý giấy) cũng có thể được sử dụng làm nguồn sợi. Các nguyên liệu sinh khối cũng có thể thu được hoặc thu được từ từ phế thải của người (ví dụ, chất thải), phế thải của động vật hoặc phế thải thực vật. Các nguyên liệu xenluloza và

lignoxenluloza khác đã được mô tả trong các patent Mỹ số 6,448,307, 6,258,876, 6,207,729, 5,973,035 và 5,952,105.

Theo một số phương án, nguyên liệu sinh khối chứa hydrat cacbon là nguyên liệu hoặc chứa nguyên liệu có một hoặc nhiều liên kết β -1,4 và có số phân tử lượng trung bình nằm trong khoảng từ 3.000 đến 50.000. Hydrat cacbon này là xenluloza hoặc chứa xenluloza, thu được từ (β -glucoza) thông qua sự ngưng tụ các liên kết β (1,4)-glycosit. Liên kết này trái ngược với liên kết α (1,4)-glycosit có mặt trong tinh bột và hydrat cacbon khác.

Tác nhân đường hóa

Các enzym thích hợp là các xenlobiaza và các xenlulaza có khả năng phân giải sinh khối.

Các xenlobiaza thích hợp là xenlobiaza thu được từ *Aspergillus niger* được bán với tên thương mại NOVOZYME 188™.

Các xenlulaza có khả năng phân giải sinh khối, và có thể từ nấm mốc hoặc có nguồn gốc từ vi khuẩn. Các enzym thích hợp là các xenlulaza từ các giống *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, *Chrysosporium* và *Trichoderma*, và bao gồm các loài *Humicola*, *Coprinus*, *Thielavia*, *Fusarium*, *Myceliophthora*, *Acremonium*, *Cephalosporium*, *Scytalidium*, *Penicillium* hoặc *Aspergillus* (ví dụ, xem patent châu Âu số EP 458162), đặc biệt là các loại tạo ra bởi chúng được chọn từ các loài *Humicola insolens* (được phân loại lại là *Scytalidium thermophilum*, ví dụ, xem patent Mỹ số 4,435,307), *Coprinus cinereus*, *Fusarium oxysporum*, *Myceliophthora thermophila*, *Meripilus giganteus*, *Thielavia terrestris*, *Acremonium sp.*, *Acremonium persicinum*, *Acremonium acremonium*, *Acremonium brachypenium*, *Acremonium dichromosporum*, *Acremonium obclavatum*, *Acremonium pinkertoniae*, *Acremonium roseogriseum*, *Acremonium incoloratum*, và *Acremonium furatum*; tốt hơn là từ các loài *Humicola insolens* DSM 1800, *Fusarium oxysporum* DSM 2672, *Myceliophthora thermophila* CBS 117.65, *Cephalosporium sp.* RYM-202, *Acremonium sp.* CBS 478.94, *Acremonium sp.* CBS 265.95, *Acremonium persicinum* CBS 169.65, *Acremonium acremonium* AHU 9519, *Cephalosporium sp.* CBS 535.71,

Acremonium brachypenum CBS 866.73, *Acremonium dichromosporum* CBS 683.73, *Acremonium obclavatum* CBS 311.74, *Acremonium pinkertoniae* CBS 157.70, *Acremonium roseogriseum* CBS 134.56, *Acremonium incoloratum* CBS 146.62, và *Acremonium furatum* CBS 299.70H. Các enzym phân giải xenluloza còn có thể thu được từ *Chrysosporium*, tốt hơn là từ chủng *Chrysosporium lucknowense*. Ngoài ra, *Trichoderma* (đặc biệt là *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei*, và *Trichoderma koningii*), *Bacillus* ưa kiềm (ví dụ, xem patent Mỹ số 3,844,890 và patent châu Âu số EP 458162), và *Streptomyces* (ví dụ, xem patent châu Âu số EP 458162) có thể được sử dụng.

Các phức hợp enzym có thể được sử dụng, như loại do Genencore® cung cấp với tên thương mại ACCELLERASE®, ví dụ, phức hợp enzym Accellerase® 1500. Phức hợp enzym Accellerase® 1500 chứa nhiều hoạt tính enzym, chủ yếu là exoglucanaza, endoglucanaza (từ 2200CMC U/g đến 2800CMC U/g), hemi-xenlulaza, và beta-glucosidaza (từ 525pNPG U/g đến 775pNPG U/g), và có độ pH nằm trong khoảng từ 4,6 đến 5,0. Hoạt tính endoglucanaza của phức hợp enzym được biểu thị theo các đơn vị hoạt tính carboxymetylxenluloza (CMC U), trong khi hoạt tính của beta-glucosidaza được biểu thị theo các đơn vị hoạt tính pNP-glucosit (pNPG U). Phức hợp enzym thích hợp khác là phức hợp enzym Accellerase® Duet. Phức hợp enzym Accellerase® Duet cũng nhiều hoạt tính enzym, chủ yếu là exoglucanaza, endoglucanaza (từ 2400 đến 3000 CMC U/g), hemi-xenlulaza (bao gồm xylanaza, > 3600 ABX U/g), và beta-glucosidaza (>400 pNPG U/g), và có độ pH nằm trong khoảng từ 4,3 đến 4,6. Hoạt tính endoglucanaza của phức hợp enzym được biểu thị theo các đơn vị hoạt tính carboxymetylxenluloza (CMC U), trong khi hoạt tính beta-glucosidaza được biểu thị theo đơn vị hoạt tính pNP-glucosit (pNPG U) và hoạt tính xylanaza được biểu thị theo đơn vị Axit Birchwood Xylanaza (ABXU). Theo một số phương án thực hiện sáng chế, hỗn hợp bao gồm Accellerase® 1500 hoặc phức hợp enzym Accellerase® Duet với xenlobiaza NOVOZYME™ 188 được sử dụng.

Tác nhân lên men

Các vi sinh vật dùng để lên men có thể là các vi sinh vật tự nhiên và/hoặc các vi sinh vật được tạo ra theo công nghệ di truyền. Ví dụ, vi sinh vật có thể là vi khuẩn, ví dụ,

vi khuẩn phân giải xenluloza, nấm, ví dụ, nấm men, thực vật hoặc sinh vật đơn bào, ví dụ, tảo, động vật nguyên sinh hoặc sinh vật đơn bào kiểu nấm, ví dụ, nấm mốc nhầy. Nếu các sinh vật tương hợp, thì hỗn hợp gồm các sinh vật có thể được sử dụng.

Các vi sinh vật lên men thích hợp có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon, như glucoza, xyloza, arabinoza, mannoza, galactozo, oligosacarit hoặc polysacarit thành các sản phẩm lên men. Các vi sinh vật lên men bao gồm các chủng thuộc giống *Sacchromyces* spp. Ví dụ, *Sacchromyces cerevisiae* (men bánh mỳ), *Saccharomyces distaticus*, *Saccharomyces uvarum*; giống *Kluyveromyces*, ví dụ, các loài *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces fragilis*; giống *Candida*, ví dụ, *Candida pseudotropicalis*, và *Candida brassicae*, *Pichia stipitis* (họ *Candida shehatae*, giống *Clavispora*, ví dụ, các loài *Clavispora lusitaniae* và *Clavispora opuntiae*, giống *Pachysolen*, ví dụ, các loài *Pachysolen tannophilus*, giống *Bretannomyces*, ví dụ, các loài *Bretannomyces clausenii* (Philippidis, G. P., 1996, Cellulose bioconversion technology, trong Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C.E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212).

Các nấm men có bán trên thị trường bao gồm, ví dụ, Red Star®/Lesaffre Etanol Red (do Red Star/Lesaffre, USA cung cấp), FALI® (do Fleischmann's Yeast, một bộ phận của Bums Philip Food Inc., USA, cung cấp), SUPERSTART® (do Alltech, nay là Lalemand, cung cấp), GERT STRAND® (do Gert Strand AB, Sweden, cung cấp) và FERMOL® (do DSM Specialties cung cấp).

Vi khuẩn cũng có thể được sử dụng để lên men, ví dụ, *Zymomonas mobilis* và *Clostridium thermocellum* (Philippidis, 1996, nêu trên).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Nguyên liệu (trong Ví dụ 2 được gọi là “XP”) được tạo ra bằng cách sử dụng quy trình sau.

1500 pao (680,38kg) chân bảng làm bằng giấy dày tẩy trắng mới nguyên có tỷ trọng là 30 pao/fut³ (0,453kg/0,3m³) do International Paper cung cấp. Nguyên liệu này

được cắt thành các mẫu từ 8 1/4 inso (0,21m) đến 11 inso (0,28m) bằng cách sử dụng máy xén và đưa vào máy cắt dao quay kiểu Munson, mẫu SC30. Sàng đầu ra có các mắt 1/8 inso (3,2mm). Khe hở giữa lưỡi dao quay và lưỡi dao cố định được đặt khoảng 0,020 inso (0,51mm). Máy cắt dao quay sẽ băm các mẫu cắt, giải phóng nguyên liệu sợi.

Ví dụ 2

Môi trường được điều chế bằng cách làm nóng 4l nước đã khử ion đến 50°C và trộn trong khi bổ sung 4% trọng lượng theo thể tích bột cám gạo, 3,405g/L ure, và chất hoạt động bề mặt 10g/L Tween 80® vào. Tiếp theo, ba enzym được bổ sung vào theo lượng sau:

Enzym ACCELLERASE®	0,25mL/1 gam nguyên liệu XP
Enzym STARGEN™	1% trọng lượng cám
Enzym FERMGENTM	1% trọng lượng cám

ACCELLERASE được bổ sung vào tại thời điểm 0 giờ, và hai enzym khác được bổ sung vào tại thời điểm 3 giờ.

Sau đó, nguyên liệu XP được bổ sung vào theo lượng gia, lượng và tần suất bổ sung được xác định theo độ đặc của hỗn hợp này và tốc độ trộn. Nguyên liệu được bổ sung vào trong khoảng thời gian 27 giờ, với mức tăng của các lần bổ sung nằm trong khoảng từ 150g đến 275g. Tổng lượng bổ sung vào là 1096g.

Các dao động nhiệt độ được kiểm soát trong khi trộn, để ngăn ngừa làm nóng quá nhiệt độ 55°C, mà sẽ dẫn đến sự biến tính của các enzym.

Thông qua quy trình này, bước trộn được thực hiện ở tốc độ 250rpm (vòng/phút), bằng cách sử dụng máy trộn IKA ROTOTRON®. Nhiệt độ được duy trì ở khoảng 50°C, và độ pH là khoảng 3,7.

Sau khi nguyên liệu tăng lần cuối cùng được bổ sung vào, tại thời điểm 27 giờ, mẻ này được phép tiếp tục đường hóa để đến tổng thời gian 70 giờ tính từ khi bắt đầu quy trình này. Tại thời điểm này, nồng độ glucoza đạt 90g/L.

Hỗn hợp đã đường hóa này được chuyển sang bình phản ứng sinh học BioFlow® 115 để lên men. Sau đó, các thông số được thay đổi, và hỗn hợp này được ủ để bắt đầu lên men. Bước trộn được thực hiện bằng bộ cánh quạt Rushton ở 250rpm (vòng/phút), với không khí được cấp ở 0,025vvm, và độ pH được điều chỉnh đến 5,0. Nhiệt độ được giảm đến 30°C. Việc kiểm soát độ pH được thực hiện bằng cách sử dụng H₃PO₄ 1M (đối chứng axit) và NaOH 1M (đối chứng kiềm). Việc ủ được dựa trên tỷ lệ sau: 1mg nấm men Superstart™ với 1g glucoza. nấm men được bổ sung một cách trực tiếp vào hỗn hợp này dưới dạng giống cấy được được đông khô.

Sau 20 giờ lên men trong các điều kiện này, nồng độ của etanol trong hỗn hợp này là khoảng 50g/L, và nồng độ của glucoza giảm xuống còn 0g/L. Nồng độ này chỉ hơi thấp hơn nồng độ etanol thu được bằng cách lên men 150g/L glucoza và 40g/L xyloza trong môi trường chứa 1,7g/L YNB, 2,27g/L ure và 6,6g/L pepton của đậu tương trong cùng các điều kiện xử lý.

Các phương án khác

Nhiều phương án thực hiện sáng chế đã được mô tả. Tuy nhiên, cần phải hiểu rằng các biến thể khác nhau có thể được thực hiện mà không vượt quá ý tưởng và phạm vi của sáng chế.

Ví dụ, trong khi các lý do chi phí được ưu tiên do các gói dinh dưỡng đã được bộc lộ trong bản mô tả này chỉ chứa các nguồn chất dinh dưỡng từ thực phẩm (và cụ thể là rau và/hoặc hạt), nếu muốn gói dinh dưỡng có thể chứa các hỗn hợp gồm các nguồn chất dinh dưỡng với nguồn phi thực phẩm hoặc nguồn gốc không hạt/phi rau củ.

Do vậy, các phương án thực hiện khác của sáng chế đều nằm trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp xử lý nguyên liệu sinh khối bao gồm bước:

kết hợp nguyên liệu, bao gồm nguyên liệu xenluloza hoặc lignoxenluloza và/hoặc nguyên liệu xenluloza hoặc lignoxenluloza đã được đường hóa, với nguồn chất dinh dưỡng từ thực phẩm để tạo ra hỗn hợp,

trong đó hỗn hợp này chứa môi trường và nồng độ của nguồn chất dinh dưỡng từ thực phẩm trong môi trường này nằm trong khoảng từ 0,1 đến 80g/L, và

trong đó hỗn hợp này còn chứa hệ enzym bao gồm một hoặc nhiều enzym được chọn từ nhóm gồm amylaza, proteaza và hỗn hợp của chúng để giải phóng chất dinh dưỡng từ nguồn chất dinh dưỡng từ thực phẩm, và

đưa hỗn hợp chứa các chất dinh dưỡng được giải phóng vào tiếp xúc với vi sinh vật,

trong đó vi sinh vật sử dụng nguyên liệu này để tạo ra sản phẩm hoặc chất trung gian.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nguồn chất dinh dưỡng từ thực phẩm được chọn từ nhóm bao gồm hạt, các loại rau, cặn của hạt, cặn của các loại rau, cặn của các sản phẩm thịt, và hỗn hợp của chúng.

3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó sản phẩm là nhiên liệu được chọn từ nhóm bao gồm hydro, rượu, các axit hữu cơ, các hydrocacbon, và hỗn hợp của chúng.

4. Phương pháp theo điểm 1, 2 hoặc 3, trong đó bước sử dụng là quá trình lên men.

5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó vi sinh vật là nấm men.

6. Phương pháp theo điểm 4, trong đó bước lên men được thực hiện ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,8 đến 5,2.

7. Phương pháp điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 6, trong đó hỗn hợp này còn được đưa vào quá trình đường hóa.

8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó hỗn hợp này chứa enzym đường hóa.
9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó enzym này là hemixenlulaza hoặc xenlulaza.
10. Phương pháp theo điểm 7, trong đó bước đường hóa được thực hiện ở độ pH nằm trong khoảng từ 3,8 đến 4,2.
11. Phương pháp điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 10, trong đó hỗn hợp này còn gồm nguồn nitơ.
12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó nguồn nitơ được chọn từ nhóm bao gồm ure, amoniac, amoni sulfat, và hỗn hợp của chúng.
13. Phương pháp theo điểm 2, trong đó nguồn chất dinh dưỡng từ thực phẩm được chọn từ nhóm bao gồm lúa mỳ, yến mạch, lúa mạch, đậu nành, đậu Hà Lan, quả đậu, khoai tây, ngô, cám gạo, bột ngô, cám lúa mỳ, và hỗn hợp của chúng.
14. Phương pháp điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 13, trong đó hệ enzym bao gồm proteaza và amylaza.
15. Phương pháp theo điểm 14, trong đó hệ enzym còn chứa hemixenlulaza hoặc xenlulaza.
16. Phương pháp điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 15, trong đó nồng độ của nguồn chất dinh dưỡng từ thực phẩm trong môi trường nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10g/L.
17. Phương pháp theo điểm 3, trong đó rượu được chọn từ nhóm bao gồm metanol, etanol, propanol, isopropanol, *n*-butanol, etylen glycol, propylen glycol, 1,4-butan diol, glyxerin, và hỗn hợp của chúng.
18. Phương pháp theo điểm 3, trong đó axit hữu cơ được chọn từ nhóm bao gồm axit formic, axit axetic, axit propionic, axit butyric, axit valeric, caproic, axit palmitic, axit stearic, axit oxalic, axit malonic, axit succinic, axit glutaric, axit oleic, axit linoleic, axit glycolic, axit lactic, axit γ -hydroxybutyric và hỗn hợp của chúng.
19. Phương pháp theo điểm 3, trong đó hydrocacbon được chọn từ nhóm bao gồm metan, etan, propan, isobuten, pentan, *n*-hexan, và hỗn hợp của chúng.

20. Phương pháp điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 19, trong đó nguyên liệu xenluloza hoặc lignoxenluloza đã được xử lý để làm giảm độ khó xử lý của nguyên liệu này.

21. Phương pháp theo điểm 20, trong đó nguyên liệu xenluloza hoặc lignoxenluloza đã được xử lý bằng bức xạ.

22. Phương pháp theo điểm 21, trong đó bức xạ là chùm tia điện tử.

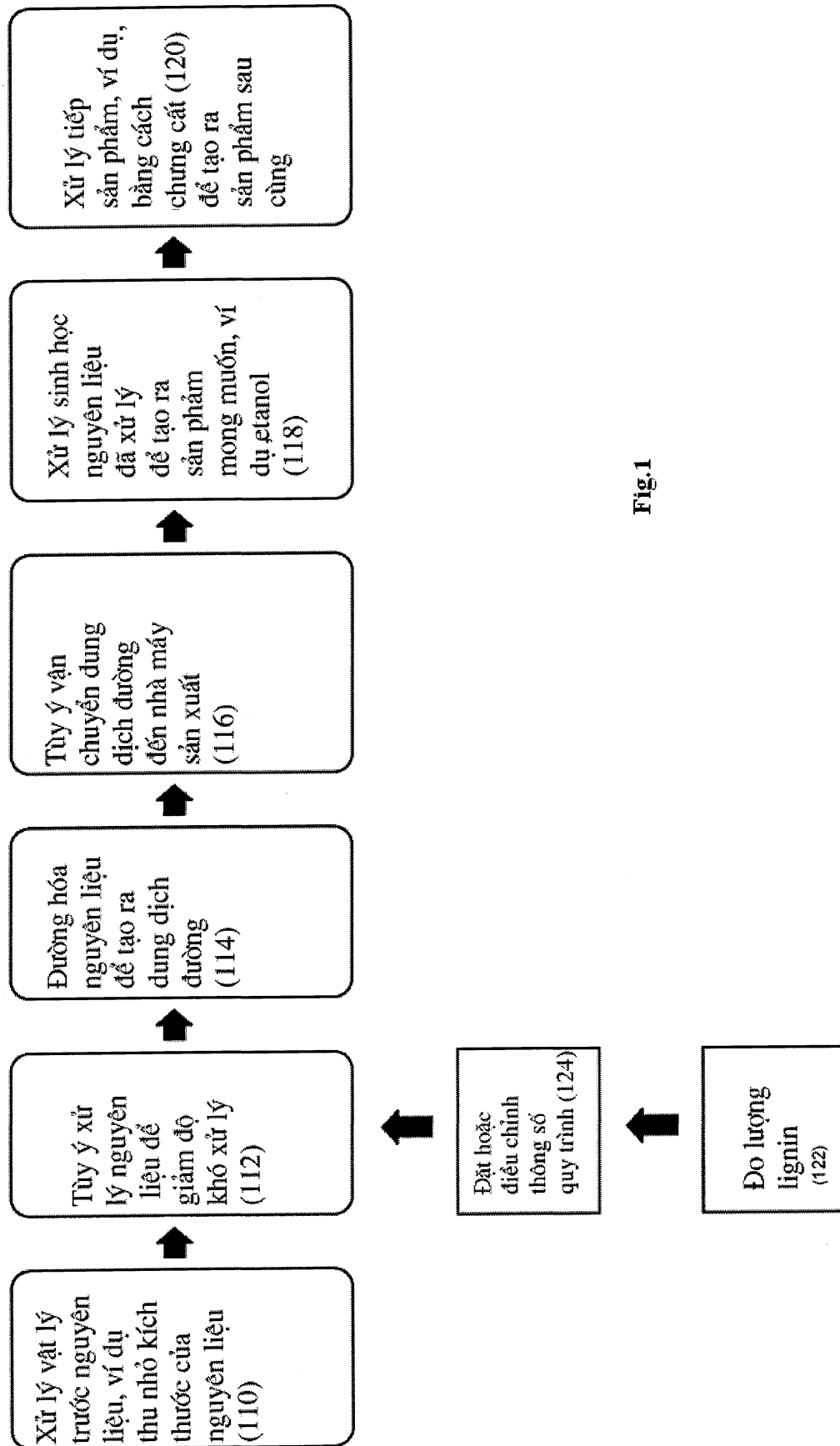


Fig.1

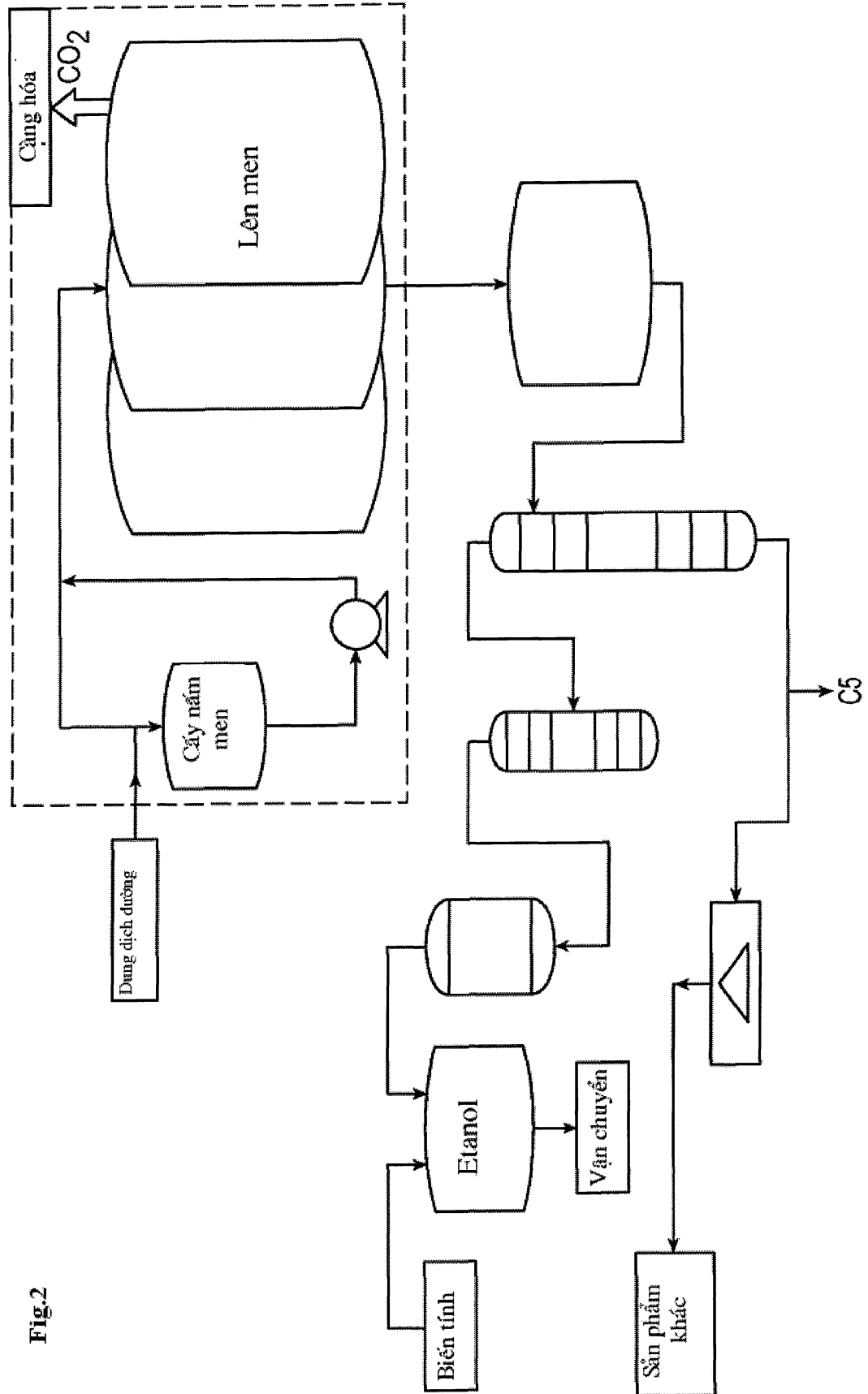


Fig.2

