



(21) 1-2014-00841 (22) 02/08/2012
(86) PCT/FR2012/000328 02/08/2012 (87) WO2013/026964 28/02/2013
(30) 11/02556 19/08/2011 FR
(45) 27/07/2020 388 (43) 25/07/2014 316A
(73) 1. IFP ENERGIES NOUVELLES (FR)
Direction - Propriété Industrielle, 1 & 4 avenue de Bois Préau, P-92852 Rueil
Malmaison Cedex, France
2. INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (FR)
147 rue de l'Université, F-75338 Paris, France
3. AGRO INDUSTRIES RECHERCHE ET DEVELOPPEMENT (FR)
Route de Bazancourt, F-51110 Pomacle, France
(72) BEN CHAABANE, Fadhel (FR); JOURDIER, Etienne (FR); COHEN, Céline (FR);
CHAUSSEPIED, Bernard (FR).
(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất xenlulaza bằng cách sử dụng chủng nấm sợi cần thiết cho quá trình thủy phân nguyên liệu sinh khối lignoxenluloza bằng enzym được sử dụng trong các quy trình sản xuất nhiên liệu sinh học thế hệ thứ hai hoặc trong các quy trình công nghiệp hóa chất, giấy hoặc dệt may.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hiện nay, việc phát triển các quy trình sản xuất nhiên liệu sinh học thế hệ hai một cách kinh tế đang rất được quan tâm. Các nhiên liệu này được sản xuất từ nguyên liệu sinh khối lignoxenluloza và ít ảnh hưởng đến việc sử dụng đất nông nghiệp hơn so với nhiên liệu sinh học thế hệ một được sản xuất từ mía, ngô, lúa mì hoặc củ cải đường.

Nguyên liệu sinh khối lignoxenluloza chủ yếu chứa ba thành phần chính: xenluloza, hemixenluloza và lignin. Quy trình thông thường để biến đổi nguyên liệu sinh khối lignoxenluloza thành etanol bao gồm nhiều bước. Bước xử lý sơ bộ bao gồm cho xenluloza tiếp xúc với các enzym, chẳng hạn như các xenlulaza. Bước thủy phân bằng enzym có thể được sử dụng để biến đổi xenluloza thành glucoza, sau đó glucoza được biến đổi thành etanol trong bước lên men bằng cách sử dụng nấm men *Saccharomyces cerevisiae*. Cuối cùng, bước chưng cất có thể được sử dụng để phân tách và thu hồi etanol từ dịch lên men này.

Các nghiên cứu kinh tế kỹ thuật đã kiểm chứng được rằng việc giảm chi phí sản xuất xenlulaza là một trong những nhân tố quan trọng trong quy trình sản xuất etanol sinh học từ nguyên liệu lignoxenluloza. Hiện nay, các xenlulaza công nghiệp chủ yếu được sản xuất từ chủng nấm sợi *Trichoderma reesei*, do loài này có khả năng tiết xenlulaza mạnh. Phương thức được áp dụng trong công nghiệp là tạo điều kiện cho nấm *Trichoderma reesei* phát triển nhanh chóng đến số lượng nhất định, sau đó thúc đẩy quá trình sản xuất xenlulaza để tối đa hóa năng suất và sản lượng. *Trichoderma reesei* là vi sinh vật hiếu khí bắt buộc và sự sinh trưởng của chủng nấm này làm tăng đáng kể độ nhớt của môi

trường nuôi cấy, gây khó khăn cho việc vận chuyển oxy cần thiết cho sự sống của nó. Tốc độ vận chuyển oxy được xác định theo hệ số chuyển khối thể tích oxy/đơn vị thể tích môi trường nuôi cấy K_{La} . Hệ số chuyển khối K_{La} được xác định bằng tích của hệ số trao đổi oxy tổng K_L tính theo đơn vị m/giây hoặc m/giờ và hệ số diện tích trao đổi riêng/đơn vị thể tích của môi trường nuôi cấy pha lỏng a tính theo đơn vị m^2/m^3 môi trường nuôi cấy. Hệ số chuyển khối K_{La} tỷ lệ thuận với tốc độ khuấy và tốc độ sục khí. Để đáp ứng nhu cầu oxy sinh học gia tăng trong quá trình sinh trưởng của nấm sợi *Trichoderma reesei*, cần tăng mức vận chuyển oxy, thường là bằng cách tăng tốc độ khuấy hoặc tăng tốc độ sục khí. Điều này dẫn đến làm tăng mức tiêu thụ năng lượng của quy trình (công suất mô tơ để khuấy và máy nén để sục khí) và làm tăng chi phí vận hành. Chi phí khuấy và sục khí có thể chiếm đến 50% chi phí vận hành của quy trình sản xuất xenlulaza.

Do đó một phương án để giảm chi phí vận hành là giảm chi phí sản xuất enzym xenlulaza bằng cách cải biến quy trình sản xuất để giảm thiểu hệ số K_{La} mà vẫn duy trì được năng suất xenlulaza. Điều này cũng có nghĩa là có thể đơn giản hóa việc mở rộng kích thước thiết bị phản ứng sinh học công nghiệp (thông thường nằm trong khoảng từ $100m^3$ đến $1000m^3$), là điều khó khăn đối với thiết bị phản ứng sinh học có hệ số K_{La} lớn hơn 200 giờ^{-1} .

Phức hệ enzym của *Trichoderma reesei* gồm ba dạng hoạt tính chính: endoglucanaza, exoglucanaza và xenlobiaza hoặc beta-glucosidaza. Các protein khác có chức năng hoặc hoạt tính cần thiết cho quá trình thủy phân nguyên liệu lignoxenluloza cũng được sản sinh bởi *Trichoderma reesei*, ví dụ xylanaza. Sự có mặt của cơ chất cảm ứng là cần thiết để biểu hiện enzym phân hủy xenluloza và/hoặc hemixenluloza.

Quá trình điều hòa các gen mã hóa cho xenlulaza trên nhiều nguồn cơ chất cacbon khác nhau đã được nghiên cứu chi tiết. Các gen này được điều hòa khi có mặt xenluloza, sản phẩm thủy phân của nó (ví dụ, xenlobioza) hoặc một số oligosacarit như là lactoza hoặc sophoroza (Ilmen et al, 1997; *Appl Environ Microbiol* 63: 1298-1306).

Kỹ thuật biến đổi gen thông thường đã cho phép chọn lọc được các chủng *Trichoderma reesei* có khả năng sản sinh mạnh xenlulaza, ví dụ các chủng *Trichoderma reesei* MCG77 (Gallo - Patent Mỹ số 4275 167), *Trichoderma reesei* MCG 80 (Allen,

A.L. and Andreotti, R.E., Biotechnol- Bioengi 1982, 12, 451-20 459 1982), *Trichoderma reesei* RUT C30 (Montenecourt, B.S. and Eveleigh, D.E., Appl Environ Microbiol 1977, 34, 777-782) và *Trichoderma reesei* CL847 (Durand et al, 1984, Proc Colloque SFM “Genetique des microorganismes industriels” [Genetics of industrial microorganisms]. Paris. H. HESLOT Ed, pp 39-50).

Để đạt được năng suất sản sinh enzym cao, quy trình sản xuất xenlulaza như được mô tả trong Patent Pháp số 2 881 753 được thực hiện theo hai bước:

- bước nuôi cấy sinh trưởng theo mẻ, bao gồm bước cung cấp nguồn cacbon có thể được đồng hóa nhanh cần thiết cho sự phát triển của *Trichoderma reesei*, sau đó
- bước sản xuất enzym xenlulaza theo mẻ có bổ sung dinh dưỡng bằng cách sử dụng cơ chất cảm ứng, ví dụ lactoza, cho phép biểu hiện và bài tiết các xenlulaza vào môi trường nuôi cấy. Nhờ có sự bổ sung liên tục nguồn cơ chất cacbon hòa tan, nên đã hạn chế được nồng độ dư thừa của cơ chất cacbon trong môi trường nuôi cấy và tối ưu hóa được nồng độ đường, tức là có thể thu được năng suất sản sinh enzym xenlulaza cao. Tốc độ dòng tối ưu của nguồn cơ chất cacbon theo Patent này là nằm trong khoảng từ 35 đến 45mg đường/g sinh khối khô tế bào/giờ.

Nhược điểm của quy trình nêu trên là cần sử dụng nhiều điện năng để đáp ứng nhu cầu oxy của nấm *Trichoderma reesei*. Vào giai đoạn kết thúc của bước nuôi cấy sinh trưởng, nhu cầu oxy của nấm *Trichoderma reesei* là rất cao. Trong thực tế, khi dư thừa tất cả các cơ chất, thì tốc độ của quá trình sinh trưởng sẽ xấp xỉ tốc độ sinh trưởng tối đa của nấm *Trichoderma reesei*. Nhu cầu oxy sinh học của nấm *Trichoderma reesei* sẽ tăng, do nó phụ thuộc vào tốc độ sinh trưởng và nồng độ sinh khối tế bào. Do các chủng này điều hòa nồng độ oxy hòa tan đến trị số hằng định, nên tốc độ chuyển khối oxy phải bằng tốc độ tiêu thụ oxy (hoặc nhu cầu oxy sinh học).

$$K_L a^* (O_2^* - O_2 L) = (\mu^* X) / R_{X/O_2}$$

trong đó:

O_2^* : nồng độ oxy bão hòa

O_{2L} : nồng độ oxy trong pha lỏng

μ : tốc độ sinh trưởng của nấm *Trichoderma reesei* (giờ⁻¹)

R_{X/O_2} : hiệu suất sinh khối tế bào so với lượng oxy đã được tiêu thụ

X = nồng độ sinh khối tế bào (trọng lượng khô)

Do đó, quy trình theo Patent nêu trên cần có hệ số chuyển khối thể tích oxy $K_L a$ rất lớn để đáp ứng nhu cầu oxy sinh học của nấm *Trichoderma reesei*. Thông thường, quá trình này được thực hiện bằng cách tăng tốc độ khuấy hoặc tốc độ sục khí và tiêu thụ nhiều điện năng.

Nếu hệ số chuyển khối $K_L a$ giảm một nửa, thì sinh khối tối đa có thể thu được ở cùng một tốc độ sinh trưởng cũng giảm một nửa. Có thể thu được cùng một lượng sinh khối với tốc độ sinh trưởng thấp hơn, nhưng cần nhiều thời gian hơn và do đó làm giảm năng suất sản sinh enzym xenlulaza được tiết ra.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề cập đến quy trình sản xuất xenlulaza bằng cách sử dụng chủng nấm sợi trong thiết bị phản ứng sinh học có sục khí và khuấy trộn, bao gồm ít nhất hai bước: bước thứ nhất là nuôi cấy theo mẻ với sự có mặt của ít nhất một cơ chất cacbon sinh trưởng ở nồng độ nằm trong khoảng từ 10g/L đến 80g/L; và bước thứ hai là nuôi cấy theo mẻ có bổ sung dinh dưỡng với sự có mặt của ít nhất một cơ chất cacbon cảm ứng, và tốc độ dòng cấp nguồn cacbon nằm trong giới hạn từ 50 đến 140mg/g sinh khối tế bào/giờ.

Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất xenlulaza bằng cách sử dụng chủng nấm sợi có khả năng duy trì năng suất sản sinh enzym này và thiết bị phản ứng sinh học có hệ số chuyển khối thể tích oxy $K_L a$ thấp.

Quy trình theo sáng chế có thể được sử dụng để kiểm soát hiệu quả hơn nhu cầu oxy sinh học của chủng nấm sợi theo sáng chế mà không làm giảm năng suất sản sinh enzym xenlulaza mong muốn. Quy trình theo sáng chế có thể thực hiện được bằng cách khai thác đặc tính sinh lý của chủng nấm sợi như là *Trichoderma reesei* trong điều kiện nồng độ cơ chất cacbon bị hạn chế.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 là biểu đồ so sánh các trị số được mô phỏng bằng mô hình dùng trị số thực nghiệm của Tolan và Foody (1999) thu được bằng một chủng *Trichoderma reesei* khác.

Fig.2 là biểu đồ thể hiện sự thay đổi nồng độ sinh khối tế bào, protein và hệ số chuyển khối $K_L a$ theo thời gian của quy trình được mô tả trong Ví dụ 1.

Fig.3 là biểu đồ thể hiện sự thay đổi nồng độ sinh khối tế bào, protein, glucoza và lactoza theo thời gian của quy trình được mô tả trong Ví dụ 2.

Fig.4 là biểu đồ thể hiện sự thay đổi nồng độ sinh khối tế bào, protein, glucoza và lactoza theo thời gian của quy trình được mô tả trong Ví dụ 3.

Fig.5 là biểu đồ thể hiện sự thay đổi hệ số chuyển khối $K_L a$ theo thời gian của quy trình được mô tả trong Ví dụ 3.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất xenlulaza bằng cách sử dụng chủng nấm sợi trong thiết bị phản ứng sinh học có sục khí và khuấy trộn, bao gồm ít nhất hai bước: bước thứ nhất là nuôi cấy theo mẻ với sự có mặt của ít nhất một cơ chất cacbon sinh trưởng ở nồng độ nằm trong khoảng từ 10g/L đến 80g/L; và bước thứ hai là nuôi cấy theo mẻ có bổ sung dinh dưỡng với sự có mặt của ít nhất một cơ chất cacbon cảm ứng, và tốc độ dòng cấp nguồn cacbon nằm trong giới hạn từ 50 đến 140mg/g sinh khối tế bào/giờ.

Tốt hơn nếu, nồng độ của cơ chất cacbon sinh trưởng nằm trong khoảng từ 10g/L đến 20g/L. Tốt hơn nữa nếu, nồng độ của cơ chất cacbon sinh trưởng nằm trong khoảng từ 12g/L đến 17g/L.

Trong giai đoạn sinh trưởng, nồng độ cơ chất cacbon giá trị cần có để đạt được tốc độ sinh trưởng tối đa.

Tốt hơn nếu, nồng độ của cơ chất cacbon cảm ứng được sử dụng trong bước nuôi cấy theo mẻ có bổ sung dinh dưỡng nằm trong khoảng từ 70 đến 100mg/g sinh khối tế

bào/giờ. Tốt hơn nữa nếu, nồng độ của cơ chất cảm ứng này nằm trong khoảng từ 80 đến 90mg/g sinh khối tế bào/giờ.

Do đó, thiết bị phản ứng sinh học theo sáng chế có thể có hệ số chuyển khối thể tích oxy K_{La} nằm trong khoảng từ 40 giờ⁻¹ đến 180 giờ⁻¹, tốt hơn nếu hệ số chuyển khối thể tích oxy K_{La} của thiết bị phản ứng sinh học theo sáng chế nằm trong khoảng từ 40 giờ⁻¹ đến 150 giờ⁻¹.

Bước thứ hai được thực hiện trong điều kiện nồng độ cơ chất cacbon cảm ứng được giới hạn ở tốc độ dòng nhỏ hơn khả năng tiêu thụ tối đa của chủng nấm sợi theo sáng chế.

Tốt hơn nếu, cơ chất cacbon sinh trưởng được chọn từ nhóm bao gồm lactoza, glucoza, xyloza, phần bã thu được sau khi lên men etanol đường monome trong sản phẩm thủy phân nguyên liệu sinh khối xenluloza và/hoặc dịch chiết thô chứa pentoza hòa tan thu được từ quá trình xử lý sơ bộ nguyên liệu sinh khối xenluloza.

Tốt hơn nếu, cơ chất cacbon cảm ứng được chọn từ nhóm bao gồm lactoza, xenlobioza, sophoroza, phần bã thu được sau khi lên men etanol đường monome trong sản phẩm thủy phân nguyên liệu sinh khối xenluloza và/hoặc dịch chiết thô chứa pentoza hòa tan thu được từ quá trình xử lý sơ bộ nguyên liệu sinh khối xenluloza.

Các cơ chất cacbon cảm ứng nêu trên có thể được sử dụng riêng hoặc dưới dạng hỗn hợp.

Tùy thuộc vào bản chất, cơ chất cacbon sinh trưởng được chọn để sản xuất sinh khối được nạp vào thiết bị phản ứng sinh học trước khi khử trùng hoặc cơ chất này được khử trùng riêng sau đó nạp vào thiết bị phản ứng sinh học.

Cơ chất cacbon cảm ứng được khử trùng riêng trước khi nạp vào thiết bị phản ứng sinh học trong bước nuôi cấy theo mẻ có bổ sung dinh dưỡng.

Tốt hơn nếu, khi cơ chất cacbon cảm ứng là lactoza, thì dung dịch nước chứa cơ chất này có nồng độ nằm trong khoảng từ 200g/L đến 250g/L.

Quy trình theo sáng chế có thể được sử dụng để đạt được năng suất xenlulaza tương tự bằng cách sử dụng thiết bị phản ứng sinh học có hệ số chuyển khối thể tích oxy K_{La} , nhỏ hơn 2,5 lần so với K_{La} bằng 250 giờ⁻¹, tức là bằng 100 giờ⁻¹. Mối tương quan giữa hệ số chuyển khối K_{La} và công suất tiêu hao trong thiết bị phản ứng sinh học hiếu khí có khuấy đã được mô tả trong tài liệu: “*Lignoxenluloza biomass to etanol process design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis, current and futuristic scenarios*”, R Wooley et al. NREL/TP-580-26157 (1999), cụ thể như sau

$$K_{La} = 0,026 \cdot (P/V)^{0,4} \cdot V_G^{0,5}$$

trong đó:

P/V : công suất tiêu hao tính theo W/m³

V_G : vận tốc bề mặt của khí (m/s).

Do đó, theo mối tương quan này, công suất tiêu hao (P/V) khi K_{La} bằng 100 giờ⁻¹ nhỏ hơn xấp xỉ 10 lần công suất tiêu hao cần thiết khi K_{La} bằng 250 giờ⁻¹.

Ưu điểm của quy trình theo sáng chế là cho phép đơn giản hóa việc mở rộng sản xuất trên quy mô công nghiệp (thông thường nằm trong khoảng từ 100m³ đến 1000m³) và giảm chi phí sản xuất.

Quy trình theo sáng chế là đơn giản, hiệu quả và khai thác được đặc tính sinh lý của chủng nấm sợi theo sáng chế trong điều kiện giới hạn đối với nồng độ cơ chất cacbon.

So với quy trình sản xuất xenlulaza thông thường, quy trình theo sáng chế được cải tiến bằng cách giảm nồng độ cơ chất cacbon sinh trưởng ban đầu trong bước thứ nhất là nuôi cấy theo mẻ để giảm nhu cầu oxy sinh học tối đa vào giai đoạn kết thúc của bước này và mặt khác là làm tăng tốc độ dòng cấp cơ chất cacbon trong bước thứ hai là nuôi cấy theo mẻ có bổ sung dinh dưỡng để tiếp tục sản sinh sinh khối tế bào tại giai đoạn bắt đầu của bước này ở tốc độ sinh trưởng giảm, đồng thời với quá trình sản sinh enzym. Đặc tính sinh lý của chủng nấm sợi theo sáng chế đã được khai thác để xác định được tốc độ

dòng trong bước nuôi cấy theo mẻ có bổ sung dinh dưỡng và nồng độ sinh khối tế bào mong muốn.

Điều này có nghĩa là năng suất xenlulaza cuối cùng vẫn có thể được duy trì với thiết bị phản ứng sinh học theo sáng chế có hệ số chuyển khối thể tích oxy $K_L a$ thấp hơn.

Chủng nấm sợi được sử dụng trong quy trình theo sáng chế là loài thuộc chi *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* hoặc *Schizophyllum*.

Tốt hơn nữa, chủng nấm sợi được sử dụng trong quy trình theo sáng chế là loài *Trichoderma reesei*.

Các chủng *Trichoderma reesei* công nghiệp được sử dụng theo sáng chế có thể được biến đổi để làm tăng hoạt tính của các enzym phân hủy xenluloza và/hoặc hemixenluloza bằng phương pháp đột biến-chọn lọc, ví dụ, chủng *Trichoderma reesei* IFP CL847; các chủng được đột biến bằng kỹ thuật gen tái tổ hợp cũng có thể được sử dụng. Các chủng này được nuôi cấy trong thiết bị phản ứng sinh học hiếu khí có khuấy ở điều kiện phù hợp với sự sinh trưởng và sản sinh enzym của chúng. Các chủng nấm khác có khả năng sản sinh enzym xenlulaza bằng cách sử dụng quy trình tương tự như quy trình được sử dụng đối với chủng *Trichoderma* có thể được sử dụng.

Tốt hơn nữa, chủng nấm sợi được sử dụng trong quy trình theo sáng chế là loài *Trichoderma reesei* đã được biến đổi gen bằng phương pháp tái tổ hợp, chọn lọc hoặc đột biến.

Ví dụ về chủng *Trichoderma reesei* đã được biến đổi gen có thể được sử dụng theo sáng chế bao gồm chủng *Trichoderma reesei* CL847, *Trichoderma reesei* RutC30, *Trichoderma reesei* MCG77, hoặc *Trichoderma reesei* MCG80.

Khi tốc độ dòng cấp cơ chất cacbon cảm ứng lớn hơn 140mg đường/g sinh khối tế bào/giờ, sẽ xảy ra hiện tượng tích tụ đường trong môi trường nuôi cấy và làm biến đổi đặc tính sinh lý của *Trichoderma reesei*, dẫn đến làm giảm tốc độ sản sinh protein (hiệu ứng ức chế quá trình dị hóa). Khi ở các điều kiện giới hạn, bằng cách giới hạn tốc độ dòng này trong khoảng từ 50 đến 140mg đường/g sinh khối tế

bào/giờ, chủng *Trichoderma reesei* sẽ sản sinh đồng thời sinh khối tế bào và enzym và có xu hướng chuyển đến trạng thái cân bằng ở đó nó chỉ sản sinh enzym.

Một mô hình được thiết lập dựa trên các thông số nêu trên và được sử dụng để mô phỏng quá trình sản xuất sinh khối tế bào và enzym một cách liên tục ở tốc độ pha loãng bằng $0,018 \text{ giờ}^{-1}$ với các nồng độ cơ chất cacbon ban đầu khác nhau. Các điều kiện này là tương tự như trong nghiên cứu được Tolan và Foody mô tả trong tài liệu: (“*Cellulase from submerged fermentation*”, (1999), *Adv in biochemical engineering biotechnology, Vol 65, p42-67*), trong đó có trích dẫn công trình của Nicholson et al. (1989) (*Proceedings of the 7th Canadian bioenergy seminar, Energy Mines, and Resources*) và đưa ra các kết quả thực nghiệm về nồng độ sinh khối tế bào và protein. Các tác giả sáng chế vẫn dùng các thông số động học đã được xác định đối với chủng *Trichoderma reesei* CL847 mặc dù một chủng *Trichoderma reesei* khác đã được sử dụng. Kết quả được thể hiện trên Fig.1 chứng tỏ sự phù hợp giữa mô hình và thực nghiệm.

Điều này cũng chứng tỏ rằng mô hình nêu trên có thể được áp dụng đối với các chủng *Trichoderma reesei* khác có đặc tính sinh lý tương tự như chủng *Trichoderma reesei* CL847.

Nồng độ của cơ chất cacbon sinh trưởng trong bước nuôi cấy theo mẻ là thấp hơn so với nồng độ cơ chất cacbon sinh trưởng được bộc lộ trong Patent Pháp số 2 881 753 để giảm nhu cầu oxy sinh học tối đa ở cuối giai đoạn này (ở tốc độ sinh trưởng tối đa) đối với thiết bị phản ứng sinh học có hệ số chuyển khối KLa bằng 100 giờ^{-1} . Sau đó, tốc độ dòng cấp cơ chất cacbon trong bước nuôi cấy theo mẻ có bổ sung dinh dưỡng được gia tăng đến trị số cao hơn so với tốc độ dòng cấp cơ chất cacbon được bộc lộ trong Patent Pháp số 2 881 753 (theo Patent này tốc độ dòng của cơ chất cacbon nằm trong khoảng từ 35 đến $45 \text{ mg cơ chất cacbon cảm ứng/g sinh khối tế bào/giờ}$). Điều này có nghĩa là sinh khối tế bào có thể tiếp tục được tạo ra đồng thời với enzym xenlulaza trong giai đoạn đầu của bước nuôi cấy theo mẻ có bổ sung dinh dưỡng, nhưng ở tốc độ sinh trưởng giảm, tức là nhu cầu oxy sinh học có thể được kiểm soát. Do đó, tốc độ dòng của cơ chất cacbon trong bước nuôi cấy theo mẻ có bổ sung dinh dưỡng được tăng đến trị số lớn hơn $50 \text{ mg đường/g sinh khối tế bào/giờ}$ trong giai đoạn đầu của bước này. Quá trình sinh trưởng

được tiếp tục đồng thời với quá trình sản sinh enzym và được ổn định khi tốc độ dòng cấp cơ chất cacbon gần bằng giá trị tối ưu cho chủng nấm sợi được sử dụng theo sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Quy trình sản xuất xenlulaza bằng glucoza theo Patent Pháp số 2 881 753

Ví dụ 1 mô tả quy trình sản xuất xenlulaza bằng cách sử dụng các điều kiện nuôi cấy được mô tả trong Patent Pháp số 2 881 753 với thiết bị phản ứng sinh học có hệ số chuyển khối thể tích oxy K_{La} bằng 250 giờ⁻¹. Ví dụ 2 mô tả quy trình sản xuất xenlulaza thử nghiệm được thực hiện ở cùng điều kiện như quy trình theo Ví dụ 1 với thiết bị phản ứng sinh học có hệ số chuyển khối thể tích oxy K_{La} bằng 100 giờ⁻¹. Khi kết thúc quy trình theo Ví dụ 2, cơ chất cacbon được tích tụ, sản sinh nhiều sinh khối nhưng sản sinh ít enzym xenlulaza. Ví dụ 3 mô tả quy trình sản xuất xenlulaza theo sáng chế. Quy trình này được sử dụng để thu được năng suất sản sinh enzym xenlulaza tương đương với năng suất sản sinh enzym xenlulaza của quy trình theo Ví dụ 1 với thiết bị phản ứng sinh học có hệ số chuyển khối thể tích oxy K_{La} bằng 100 giờ⁻¹.

Quy trình này được thực hiện trong thiết bị phản ứng sinh học có khuấy cơ học. Môi trường khoáng chứa các thành phần sau: KOH 1,66g/L, H₃PO₄ 85% 2mL/L, (NH₄)₂SO₄ 2,8g/L, MgSO₄.7 H₂O 0,6g/L, CaCl₂ 0,6g/L, MnSO₄ 3,2mg/L, ZnSO₄.7 H₂O 2,8mg/L, CoCl₂ 10 4,0mg/L, FeSO₄.7 H₂O 10mg/L, chất chiết xuất từ ngô 1,2g/L, chất chống tạo bọt 0,5mL/L.

Thiết bị phản ứng sinh học chứa môi trường khoáng nêu trên được khử trùng ở nhiệt độ 120°C trong 20 phút, nguồn cơ chất cacbon là dung dịch glucoza được khử trùng ở nhiệt độ 120°C trong 20 phút, sau đó bổ sung vào thiết bị phản ứng sinh học theo phương pháp vô trùng để thu được nồng độ cuối cùng bằng 30g/L. Thiết bị phản ứng sinh học được cấy bằng dịch nuôi cấy sơ bộ của chủng *Trichoderma reesei* CL847 đến nồng độ 10% (tt/tt). Môi trường khoáng để nuôi cấy sơ bộ chủng *Trichoderma reesei* CL847 là giống như môi trường khoáng của thiết bị phản ứng sinh học ngoại trừ có bổ sung 5g/L kali phtalat để đệm pH. Quá trình sinh trưởng

của chủng nấm sợi này trong bước nuôi cấy sơ bộ được thực hiện bằng cách sử dụng glucoza làm nguồn cơ chất cacbon ở nồng độ bằng 30g/L. Bước nuôi cấy sơ bộ được thực hiện trong từ 2 đến 3 ngày ở nhiệt độ 28°C trong tủ nuôi cấy có khuấy ở áp suất khí quyển. Sau đó, dịch nuôi cấy sơ bộ này được bổ sung vào thiết bị phản ứng sinh học khi nồng độ glucoza còn lại nhỏ hơn 15g/L.

Thực nghiệm trong thiết bị phản ứng sinh học này bao gồm hai bước:

- bước sinh trưởng trên cơ chất cacbon glucoza (nồng độ ban đầu = 30g/L) ở nhiệt độ 27°C và pH = 4,8 (được thiết lập bằng cách bổ sung dung dịch amoniac 5,5M). Tốc độ sục khí bằng 3L/phút và tốc độ khuấy được gia tăng đến trị số nằm trong khoảng từ 200 vòng/phút đến 800 vòng/phút theo áp suất riêng phần của khí O₂ (áp suất riêng phần của oxy hòa tan) , được đặt ở 30%.

- bước sản xuất enzym. Sau 30 giờ, dung dịch lactoza 250g/L được bơm liên tục ở tốc độ dòng bằng 35mg/g sinh khối tế bào/giờ trong 250 giờ. Nhiệt độ giảm đến 25°C và pH giảm đến pH 4 cho đến khi quá trình nuôi cấy đã kết thúc. Độ pH được thiết lập bằng cách bổ sung dung dịch amoniac 5,5M, dung dịch này cũng cung cấp nitơ cần thiết cho quá trình tổng hợp protein tiết ra. Nồng độ oxy hòa tan được duy trì trên 30% bằng cách khuấy.

Quá trình sản xuất enzym được kiểm soát bằng cách định lượng nồng độ protein ngoại bào theo phương pháp đường chuẩn Lowry được xây dựng trên albumin huyết thanh bò (BSA- Bovine serum albumin), sau khi tách các sợi nấm bằng cách lọc hoặc ly tâm. Hoạt tính phân giải xenluloza được xác định như sau:

- hoạt tính trên giấy lọc hoặc hoạt tính FP, được biểu diễn theo đơn vị FPU (đơn vị giấy lọc) có thể được sử dụng để định lượng tổng hoạt tính của endoglucanaza và exoglucanaza;

- hoạt tính β -glucosidaza và xylanaza có thể được sử dụng để định lượng hoạt tính riêng.

Hoạt tính FP được định lượng trên giấy lọc Whatman N°1 theo quy trình của IUPAC biotechnological commission ở nồng độ ban đầu bằng 50g/L; mẫu thử chứa

dung dịch enzym cần phân tích đã giải phóng lượng đường tương đương với 2g/L glucoza (phương pháp so màu) trong 60 phút. Nguyên lý định lượng hoạt tính trên giấy lọc là xác định nồng độ đường khử thu được từ giấy lọc Whatman N°1 bằng axit đinitrosalixylic.

Cơ chất được sử dụng để định lượng hoạt tính β -glucosidaza là *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranosit. Cơ chất này bị phân cắt bởi β -glucosidaza và giải phóng ra *p*-nitrophenol.

Một đơn vị hoạt tính β -glucosidaza được định nghĩa là lượng enzym cần thiết để tạo ra 1 μ mol *p*-nitrophenol từ *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranosit trong một phút và được biểu diễn theo đơn vị IU/mL.

Nguyên lý định lượng hoạt tính xylanaza là để xác định nồng độ đường khử thu được từ dung dịch xylan đã được thủy phân bằng axit đinitrosalixylic. Phương pháp định lượng này sử dụng tính khử của đường, chủ yếu là xyloza. Hoạt tính xylanaza là lượng enzym cần thiết để tạo ra 1 μ mol xyloza trong một phút và được biểu diễn theo đơn vị IU/mL.

Hoạt tính riêng được xác định bằng cách lấy hoạt tính theo IU/mL chia cho nồng độ protein. Hoạt tính riêng được biểu diễn theo đơn vị IU/mg.

Hệ số chuyển khối thể tích oxy $K_L a$ được định lượng từ trạng thái cân bằng khí sau khi kiểm chứng lại trạng thái cân bằng cacbon và cân bằng oxy hóa khử.

Kết quả phân tích định lượng cuối cùng của quy trình theo Ví dụ 1 như sau:

Sinh khối tế bào = 15,5g/L

Protein = 50,1g/L

Hiệu suất protein = 0,20g/L/giờ

Hoạt tính FPU = 29,1IU/mL

Hoạt tính riêng xylanaza = 8,2IU/mg

Hoạt tính riêng β -glucosidaza = 1,0IU/mg

Fig.2 là biểu đồ thể hiện sự thay đổi nồng độ sinh khối tế bào, protein và hệ số chuyển khối thể tích oxy K_{La} theo thời gian của quy trình theo Ví dụ 1. Kết quả định lượng trên Fig.2 cho thấy sinh khối tế bào đã tăng đến 15g/L trong 50 giờ đầu thử nghiệm và hệ số chuyển khối thể tích oxy K_{La} bằng 240 giờ⁻¹. Nồng độ protein tăng nhẹ trong 50 giờ đầu, sau đó tăng mạnh từ thời điểm nồng độ sinh khối tế bào ổn định. Nồng độ protein đạt 50g/L khi quá trình nuôi cấy đã hoàn toàn kết thúc.

Ví dụ 2

Quy trình theo Ví dụ 2 được thực hiện ở các điều kiện tương tự như quy trình theo Ví dụ 1, ngoại trừ việc sử dụng thiết bị phản ứng sinh học có hệ số chuyển khối thể tích oxy tối đa K_{La} bằng 100 giờ⁻¹ và thể tích ban đầu bằng 750mL. Quá trình lên men đã tạo ra nhiều sinh khối tế bào hơn (45g/L) và ít protein hơn (19g/L) (xem Fig.3).

Kết quả này là do quy trình sử dụng dư nhiều cơ chất cacbon (lactoza, glucoza) trong quá trình lên men. Nó đã tái sản sinh xenluloza được cảm ứng trong điều kiện giới hạn về cơ chất cacbon cảm ứng. Glucoza đã không được tiêu thụ do hệ số chuyển khối thể tích oxy của thiết bị phản ứng sinh học theo quy trình này nhỏ hơn 2,5 lần so với hệ số chuyển khối của thiết bị phản ứng sinh học theo quy trình của Ví dụ 1, nên đã làm giảm tốc độ tiêu thụ cơ chất cacbon – trị số này tỷ lệ thuận với tốc độ tiêu thụ oxy.

Thực tế, tốc độ chuyển khối oxy được biểu diễn như sau:

$$OTR = K_{La} (O_2^* - O_{2L})$$

trong đó:

O_2^* : nồng độ oxy bão hòa

O_{2L} : nồng độ oxy trong pha lỏng

Do đó, tốc độ tiêu thụ oxy bị giới hạn bởi tốc độ chuyển khối oxy và nhỏ hơn 2,5 lần so với tốc độ tiêu thụ oxy của quy trình theo Ví dụ 1.

Kết quả phân tích định lượng cuối cùng của quy trình theo Ví dụ 2 như sau:

Sinh khối tế bào = 45g/L

Protein = 19g/L

Hoạt tính FPU = 10,1IU/mL

Hoạt tính riêng xylanaza = 8,5IU/mg

Hoạt tính riêng β -glucosidaza = 1,2IU/mg

Ví dụ 3

Quy trình sản xuất xenlulaza theo sáng chế

Thiết bị phản ứng sinh học có hệ số chuyển khối thể tích oxy K_{La} bằng 100 giờ⁻¹ được sử dụng, nhưng quy trình sản xuất được cải tiến theo giải pháp của sáng chế.

Theo đó, nồng độ glucoza ban đầu được giảm xuống bằng 15g/L sao cho tốc độ tiêu thụ oxy sinh học tối đa là phù hợp với thiết bị phản ứng sinh học được sử dụng. Hiệu suất sinh khối tế bào so với glucoza bằng 0,5g/g khi sử dụng lượng dư glucoza. Điều này có nghĩa là tốc độ tiêu thụ oxy tối đa bằng 0,5g/L/giờ đối với nồng độ glucoza nêu trên (tương ứng với tốc độ sinh trưởng tối đa bằng 0,08 giờ⁻¹ và hiệu suất biến đổi oxy thành sinh khối tế bào bằng 1,2 g/g).

Bước nuôi cấy theo mẻ và bổ sung dinh dưỡng được thực hiện sau 24 giờ với tốc độ dòng bằng 89mg cơ chất/g sinh khối tế bào/giờ (dung dịch lactoza 250g/L). Giai đoạn sinh trưởng diễn ra đồng thời với quá trình sản sinh protein. Sau 240 giờ lên men, tốc độ sinh trưởng cuối cùng bằng 51,7g/L (Fig.4). Mặc dù sử dụng thiết bị phản ứng sinh học có hệ số chuyển khối thể tích oxy thấp, nhưng hiệu suất protein cuối cùng vẫn được duy trì. Hiệu suất protein cuối cùng bằng 0,21g/L/giờ (hiệu suất protein cuối cùng của quy trình theo Ví dụ 1 bằng 0,20g/L/giờ).

Fig.5 là biểu đồ thể hiện sự thay đổi của hệ số chuyển khối thể tích oxy $K_L a$ trong quá trình thực hiện quy trình theo Ví dụ 3; hệ số này vẫn nhỏ hơn 100 giờ^{-1} .

Kết quả phân tích định lượng cuối cùng của quy trình theo Ví dụ 3 như sau:

Sinh khối tế bào = $18,9 \text{ g/L}$

Protein = $51,7 \text{ g/L}$

Hiệu suất protein = $0,21 \text{ g/L/giờ}$

Hoạt tính FPU = $30,1 \text{ IU/mL}$

Hoạt tính riêng xylanaza = $9,5 \text{ IU/mg}$

Hoạt tính riêng β -glucosidaza = $1,12 \text{ IU/mg}$.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất xenlulaza bằng cách sử dụng chủng nấm sợi trong thiết bị phản ứng sinh học có sục khí và khuấy trộn, bao gồm ít nhất hai bước:

bước thứ nhất là nuôi cấy theo mẻ với sự có mặt của ít nhất một cơ chất cacbon sinh trưởng ở nồng độ nằm trong khoảng từ 10g/L đến 60g/L;

bước thứ hai là nuôi cấy theo mẻ có bổ sung dinh dưỡng với sự có mặt của ít nhất một cơ chất cacbon cảm ứng, và tốc độ dòng cấp nguồn cacbon nằm trong giới hạn từ 50 đến 140mg/g sinh khối tế bào/giờ, và

thiết bị phản ứng sinh học có hệ số chuyển khối thể tích oxy K_La nằm trong khoảng từ 40 giờ⁻¹ đến 180 giờ⁻¹.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó nồng độ của cơ chất cacbon sinh trưởng nằm trong khoảng từ 10g/L đến 20g/L.

3. Quy trình theo điểm 2, trong đó nồng độ cơ chất cacbon sinh trưởng nằm trong khoảng từ 12 đến 17g/L.

4. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó tốc độ dòng cấp nguồn cơ chất cacbon nằm trong giới hạn từ 70 đến 100 mg/g sinh khối tế bào/giờ.

5. Quy trình theo điểm 4, trong đó tốc độ dòng cấp nguồn cơ chất cacbon nằm trong giới hạn từ 80 đến 90 mg/g sinh khối tế bào/giờ.

6. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó thiết bị phản ứng sinh học có hệ số chuyển khối thể tích oxy K_La nằm trong khoảng từ 40 giờ⁻¹ đến 150 giờ⁻¹.

7. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó cơ chất cacbon sinh trưởng được chọn từ nhóm bao gồm lactoza, glucoza, xyloza, phần bã thu được sau khi lên men etanol đường monome trong sản phẩm thủy phân nguyên liệu sinh khối xenluloza và/hoặc dịch chiết thô chứa pentoza hòa tan thu được từ quá trình xử lý sơ bộ nguyên liệu sinh khối xenluloza.

8. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó cơ chất cacbon cảm ứng được chọn từ nhóm bao gồm lactoza, xenlobioza, sophoroza, phần bã thu được sau khi lên men etanol đường monome trong sản phẩm thủy phân nguyên liệu sinh khối xenluloza và/hoặc dịch chiết thô chứa pentoza hòa tan thu được từ quá trình xử lý sơ bộ nguyên liệu sinh khối xenluloza.
9. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó cơ chất cacbon sinh trưởng được chọn để sản xuất sinh khối tế bào được nạp vào thiết bị phản ứng sinh học trước khi khử trùng.
10. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó cơ chất cacbon sinh trưởng được chọn để sản xuất sinh khối tế bào được khử trùng riêng và sau đó được nạp vào thiết bị phản ứng sinh học sau khi khử trùng.
11. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó cơ chất cacbon cảm ứng được khử trùng riêng trước khi nạp vào thiết bị phản ứng sinh học trong bước nuôi cấy theo mẻ có bổ sung dinh dưỡng.
12. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chủng nấm sợi được sử dụng là loài *Trichoderma reesei*.
13. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chủng nấm sợi được sử dụng là loài *Trichoderma reesei* đã được biến đổi gen bằng phương pháp tái tổ hợp, chọn lọc hoặc đột biến.

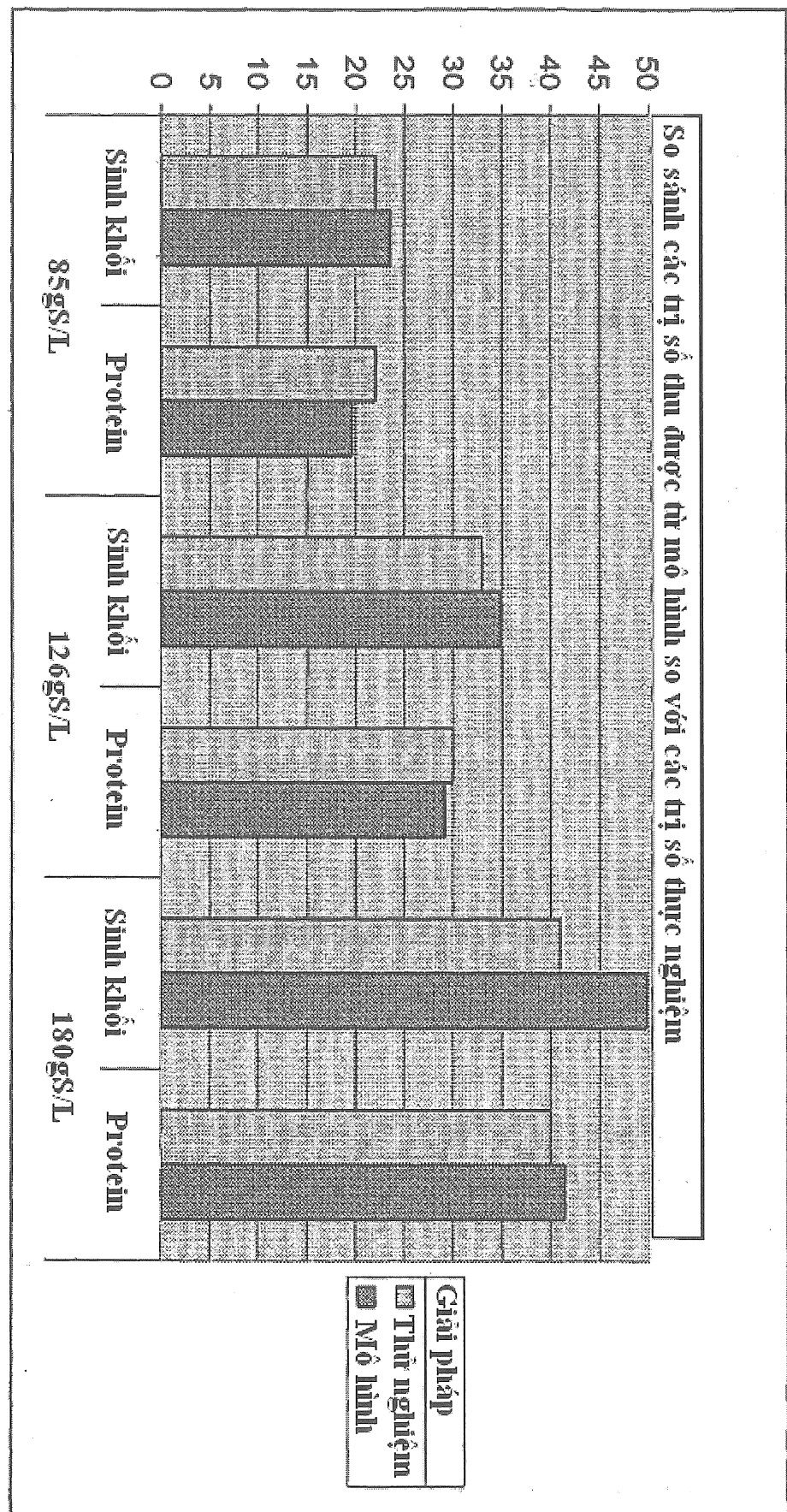


Fig.1

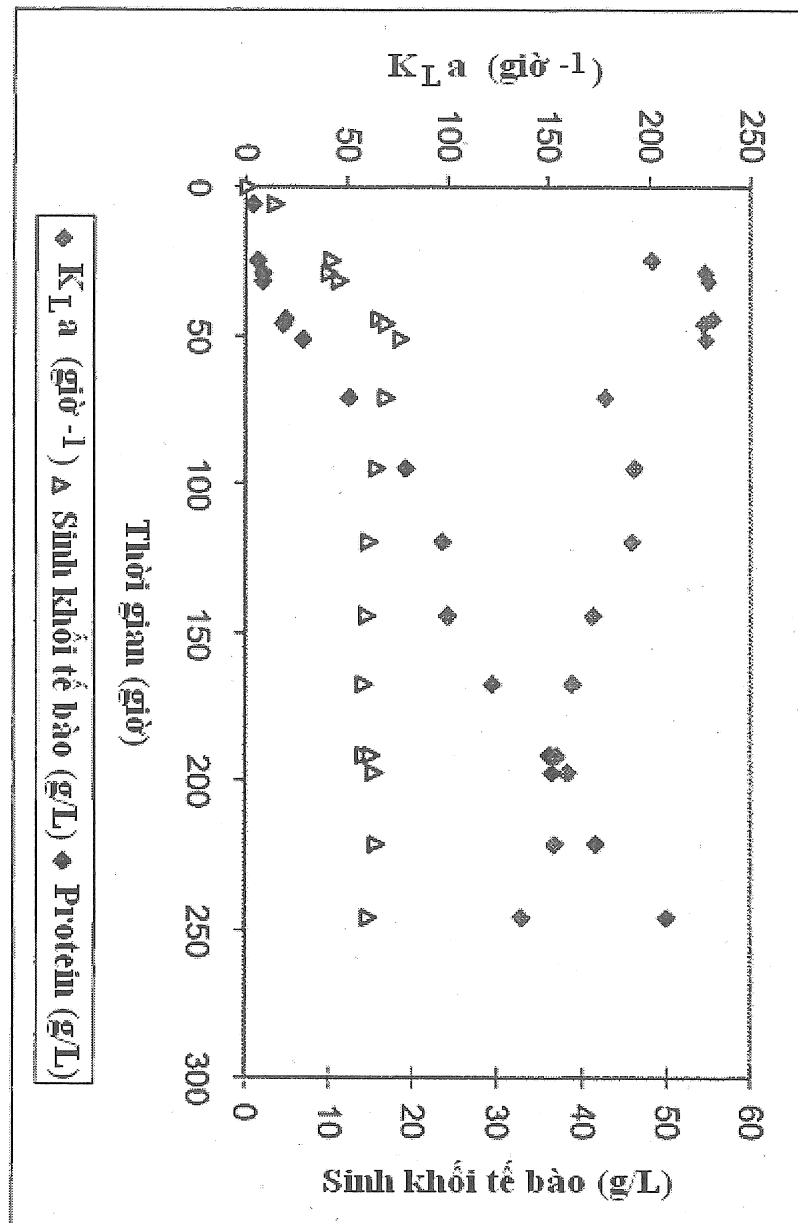


Fig.2

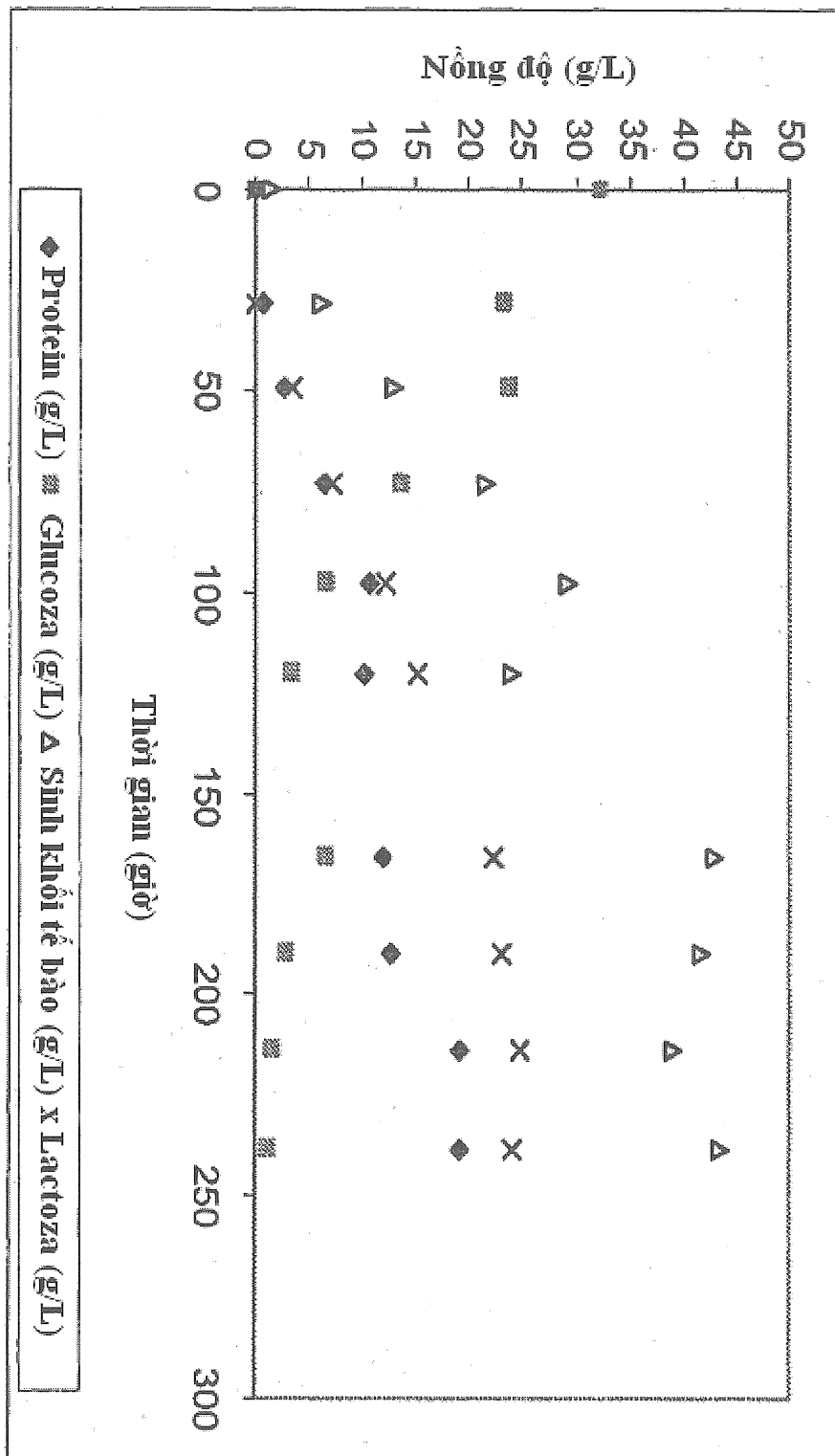


Fig.3

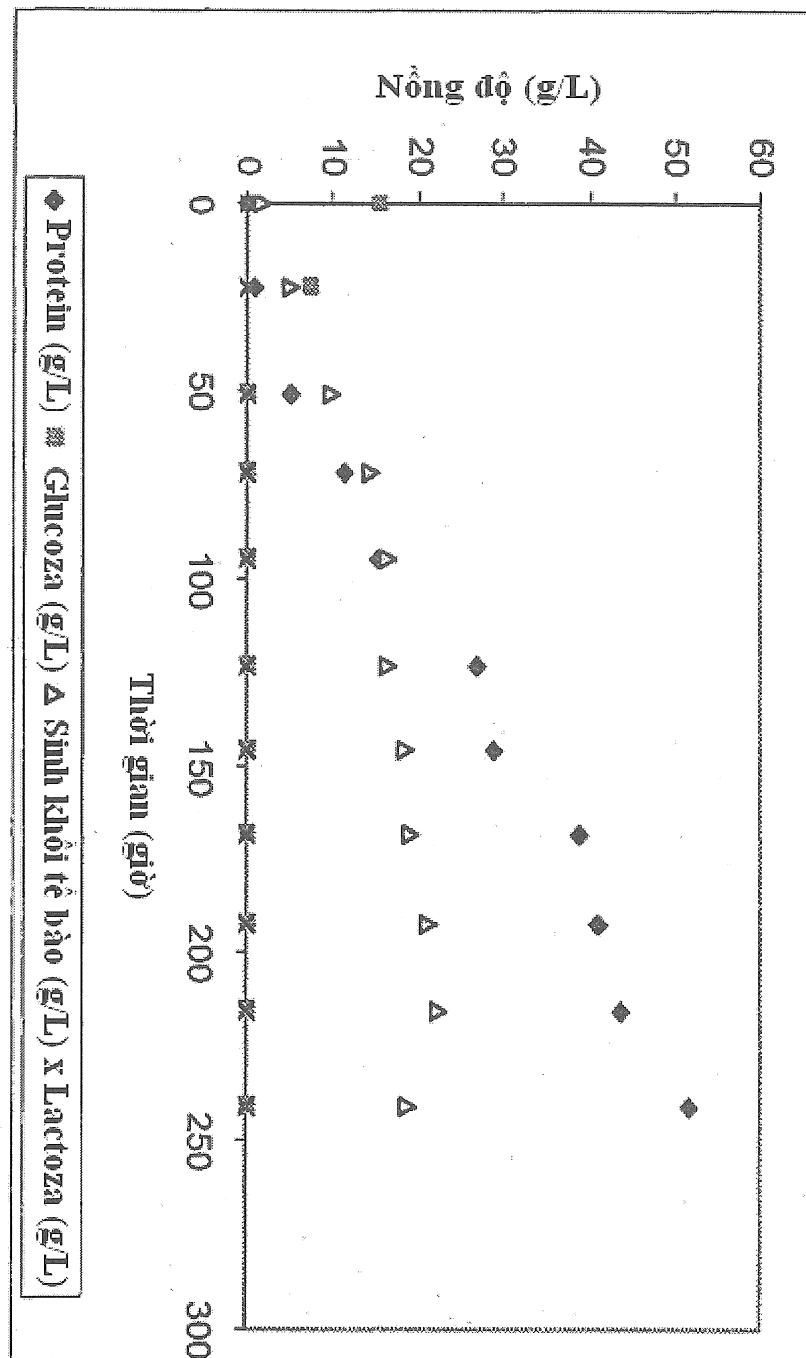


Fig.4

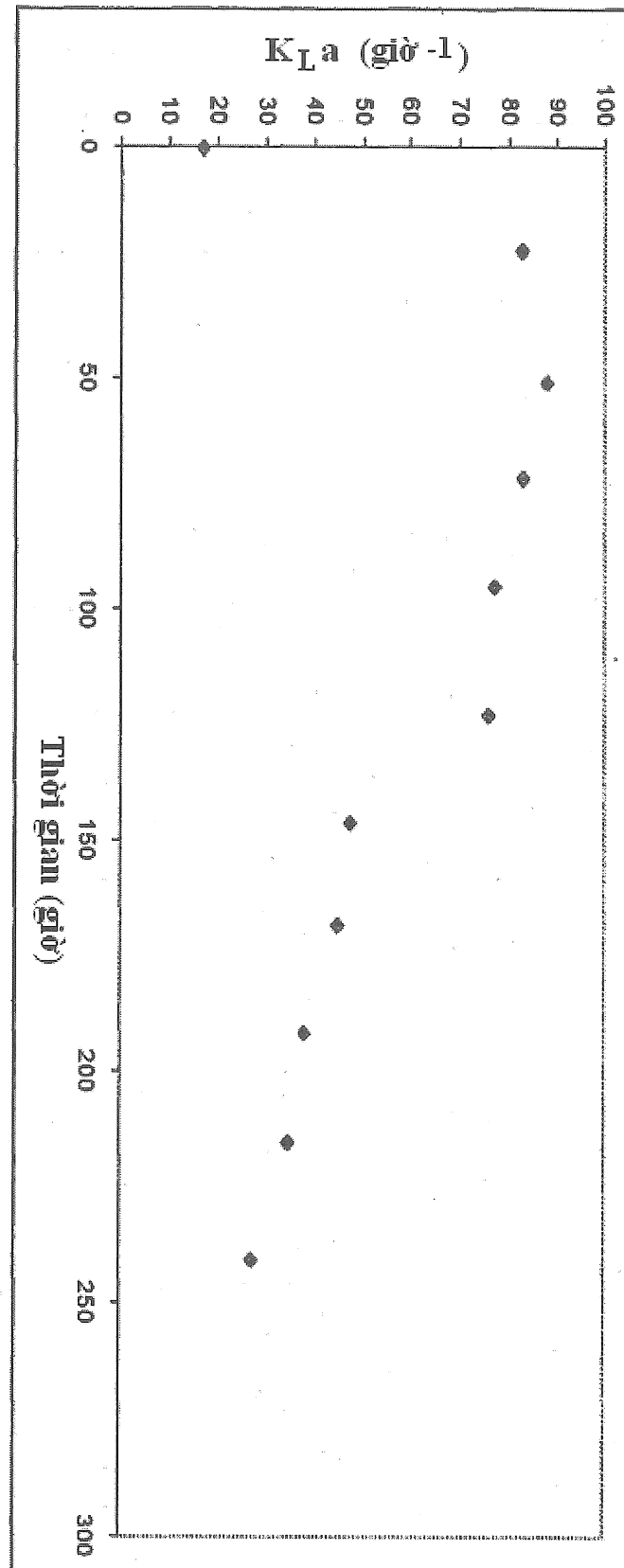


Fig.5