



(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)



1-0024768

(51)⁷ C12P 7/6

(13) B

(21) 1-2014-02202

(22) 04/07/2014

(30) 10-2013-0090174 30/07/2013 KR

(45) 27/07/2020 388

(43) 25/02/2015 323A

(73) CHANGHAE ETHANOL CO., LTD. (KR)

15, Wonmanseong-ro, Deokjin-gu, Jeonju-si, Jeollabuk-do, 561-203, Republic of Korea

(72) CHOI GI WOOK (KR); MOON SE KWON (KR); KANG SUNG WOOK (KR).

(74) Công ty TNHH Tư vấn ALIATLEGAL (ALIATLEGAL CO., LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT SẢN PHẨM LÊN MEN TỪ SINH KHỐI TINH BỘT

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất sản phẩm lên men từ sinh khối tinh bột, phương pháp bao gồm bước nghiền sinh khối tinh bột, nấu thành gelatin và hóa lỏng nguồn sinh khối, tách sinh khối đã được hóa lỏng thành chất rắn và chất lỏng, và thu sản phẩm lên men thứ nhất bằng cách tiến hành đồng thời quá trình lên men và đường hóa chất lỏng thu được từ sinh khối đã được hóa lỏng. Phương pháp sản xuất sản phẩm lên men có thể có hiệu quả cao và giá trị kinh tế.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất sản phẩm lên men từ sinh khối tinh bột.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong lĩnh vực hóa sinh, sinh khối là nguyên liệu sinh học thu được từ sinh vật bao gồm thực vật và vi sinh vật và thường được sử dụng thông qua quá trình nhiệt phân hoặc lên men để tạo ra năng lượng sinh học, ví dụ như metanol, etanol và hydro. Sinh khối là nguồn năng lượng được cung cấp với lượng lớn hàng năm và không sợ bị hết, đồng thời đáp ứng yêu cầu như một nguồn nguyên liệu hóa học. Tuy nhiên, các phương pháp sản xuất năng lượng sử dụng sinh khối có chi phí sản xuất rất lớn và thực tế sản lượng đường hóa từ sinh khối thấp làm cho khó khăn trong việc sử dụng hiệu quả nguồn sinh khối.

2,3-butanediol, gần đây nhận được sự quan tâm trong lĩnh vực hóa sinh, được sử dụng không chỉ để tổng hợp các dung môi, các dung dịch chống lại sự đông đá và nhựa các loại mà còn dùng để sản xuất 1,3-butadien được sử dụng để sản xuất cao su tổng hợp thông qua sự chuyển hóa hóa học, methyl ethyl keton (MEK) là chất phụ gia trong chất đốt dạng lỏng, axetoin và diacetyl được sử dụng như chất tạo mùi cho thực phẩm và hợp chất polyurethan (nhựa nhiệt dẻo).

2,3-butanediol có thể được tạo ra bằng các phương pháp sinh học, trong đó 2,3-butanediol được chọn tạo ra từ pyruvat hoặc axetoin, hoặc từ diacetyl thông qua chu trình butanediol nếu đường glucoza được sử dụng như nguồn carbon.

2,3-butanediol có ba chất đồng phân D(-), L(+) và chất trung gian ($\pm$). Các dạng đồng phân D(-), L(+) và trung gian ($\pm$) của 2,3-butanediol được tạo ra riêng lẻ hoặc dưới dạng hỗn hợp tùy vào các chủng sản xuất. Chủng phát triển thông qua kỹ thuật trao đổi được biết tới như sản phẩm quang học chọn lọc 2,3-butanediol.

Thực tế, để phát triển công nghệ sản xuất 2,3-butanediol sinh học dựa trên kỹ thuật cơ bản của công nghiệp hóa sinh C-zero, cần thiết sản xuất 2,3-butanediol ở mức chi phí sản xuất cơ bản bằng với chi phí sản xuất các dẫn xuất của 1,3-butadien và

MEK, đồng thời sản xuất bằng các phương pháp hóa dầu sử dụng 2,3-butanediol như là nguyên liệu chính và với chi phí thấp hơn.

Để tiết kiệm chi phí sản xuất 2,3-butanediol, cần đảm bảo các thao tác nhân tạo thuộc về kỹ thuật công nghệ chuyển hóa và tối ưu con đường sinh học tạo ra 2,3-butanediol, các cơ chất rẻ tiền và tốc độ chuyển hóa tối ưu thành sản phẩm 2,3-butanediol. Để sản xuất một lượng lớn 2,3-butanediol tinh khiết, cần thiết phát triển quy trình lên men hiệu suất và tập trung cao thông qua sự phát triển các chủng và tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy, nguồn carbon và các điều kiện mở để sản xuất 2,3-butanediol với hiệu quả cao trong khi tối thiểu hóa việc tạo thành sản phẩm phụ.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập tới phương pháp sản xuất sản phẩm lên men từ sinh khối tinh bột có khả năng sản xuất sản phẩm lên men đậm đặc sử dụng sinh khối tinh bột với chi phí thấp.

Sáng chế nhằm giải quyết không chỉ các vấn đề như được đề cập ở phần trên mà còn cả các vấn đề chưa được đề cập mà các chuyên gia trong lĩnh vực có thể dễ dàng hiểu dựa trên phần mô tả sau đây.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất sản phẩm lên men từ sinh khối tinh bột, phương pháp bao gồm bước nghiền sinh khối tinh bột, nấu thành gelatin và hóa lỏng nguồn sinh khối, tách riêng các phần rắn và lỏng trong sinh khối đã hóa lỏng và thu được sản phẩm lên men thứ nhất bằng quá trình hóa đường và lên men đồng thời chất lỏng được tách ra từ sinh khối đã được hóa lỏng.

Sinh khối tinh bột có thể gồm ít nhất một loại được chọn từ nhóm bột sắn, bột ngô, bột mỳ, gạo, lúa mạch và khoai tây.

Quá trình nấu thành gelatin và hóa lỏng có thể được thực hiện ở 90 đến 100°C trong 1 tới 2 giờ.

Sản phẩm lên men thứ nhất thu được có thể được đường hóa và lên men ở pH thứ nhất và sau đó tiếp tục được đường hóa và lên men ở pH thứ hai, khác với pH thứ nhất.

pH thứ nhất có thể là pH thúc đẩy sự phát triển của vi sinh vật và pH thứ hai có thể là pH để thúc đẩy sự hoạt hóa enzym đường hóa.

pH thứ nhất có thể nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,0 và pH thứ hai có thể nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,0.

pH thứ hai có thể được dùng khi ít nhất một trong các điều kiện đó là nồng độ vi sinh vật OD 660 là 15 hoặc cao hơn, nồng độ glucoza là 10 g/L hoặc thấp hơn, và quá trình lên men và hóa đường được thực hiện đồng thời trong thời gian từ 12 đến 20 giờ.

Sản phẩm lên men thứ nhất thu được có thể là 2,3-butanediol.

Phương pháp theo sáng chế có thể còn thu được sản phẩm khác gồm sản phẩm lên men thứ hai từ quá trình lên men và đường hóa hoặc lên men và đường hóa đồng thời phân chất rắn được tách ra.

Sản phẩm lên men thứ hai có thể là một trong các chất như metanol sinh học, etanol sinh học và hydro sinh học.

Phương pháp theo sáng chế còn có thể thu được nguyên liệu dùng làm thức ăn cho gia súc bằng cách làm khô chất rắn đã được tách ra.

Như được mô tả ở phần trên, theo một phương án khác, sáng chế còn đề cập tới sản phẩm lên men sinh khối bằng phương pháp tiết kiệm và hiệu quả cao. Ngoài ra, phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để sản xuất nhiều loại sản phẩm lên men, từ đó có thể sử dụng hiệu quả sinh khối. Đặc biệt, phương pháp có thể không chỉ để sản xuất hợp chất 2,3-butanediol đậm đặc như sản phẩm được lên men từ sinh khối mà còn sử dụng chất rắn được tách ra trong quá trình sản xuất hợp chất 2,3-butanediol để sản xuất năng lượng sinh học và thức ăn cho gia súc.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các phương án, tính chất và ưu điểm của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng và dễ hiểu từ phần mô tả các phương án thực hiện và các hình vẽ đi kèm:

Fig. 1 là sơ đồ minh họa phương pháp sản xuất sản phẩm lên men theo một phương án của sáng chế;

Fig. 2 minh họa các đặc tính của quá trình lên men theo ví dụ thực nghiệm 1 của sáng chế;

Fig. 3 minh họa những thay đổi về tỉ lệ đường hóa theo ví dụ thực nghiệm 2 của sáng chế;

Fig. 4 minh họa sự tiêu thụ đường và tạo thành 2,3-butanediol theo ví dụ thực nghiệm 3 của sáng chế; và

Fig. 5 minh họa sự tiêu thụ đường và tạo thành 2,3-butanediol theo ví dụ 1 của sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các phương án của sáng chế sẽ được mô tả chi tiết như dưới đây.

Một phương án theo sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất sản phẩm lên men từ sinh khối tinh bột có thể tăng hiệu quả quá trình lên men và đường hóa sinh khối đã được hóa lỏng và cung cấp sản phẩm lên men đậm đặc với chi phí thấp.

Phương pháp có thể bao gồm bước nghiền, nấu thành gelatin và hóa lỏng, tách riêng chất rắn và chất lỏng để thu được sản phẩm lên men thứ nhất. Ngoài ra, phương pháp có thể còn thu được sản phẩm lên men thứ hai.

Nghiền

Bước nghiền là thực hiện việc nghiền sinh khối thành bột có kích cỡ 1 mm hoặc nhỏ hơn, trong bước này thực hiện cả nghiền ướt và nghiền khô. Mặt khác, bất kỳ phương pháp nghiền nào khác có thể được dùng mà không bị giới hạn bởi một phương pháp cụ thể.

Sinh khối thu được từ thực vật, tốt hơn là từ sinh khối tinh bột. Sinh khối tinh bột bao gồm ngũ cốc và khoai tây, tốt hơn là bao gồm ít nhất một trong số nhóm gồm bột sắn, ngô, lúa mỳ, gạo, lúa mạch và khoai tây nhưng không chỉ giới hạn bởi các loại tinh bột này.

Nấu thành gelatin và hóa lỏng

Nấu thành gelatin và hóa lỏng là thêm nước và enzym đã được hóa lỏng vào nguồn sinh khối và nấu thành gelatin và hóa lỏng sinh khối ở 50 đến 120°C, tốt hơn là từ 90 đến 100°C trong 1 đến 2 giờ. Nguồn sinh khối có thể được trộn với nước theo tỉ lệ 300 đến 400 g/L, và enzym đã được hóa lỏng có thể là α -amylaza, ví dụ như Termamyl, Liquozyme và sản phẩm thương mại Amylex.

Tách chất rắn và chất lỏng

Bước tách chất rắn và chất lỏng là quá trình tách chất rắn từ dung dịch đã được hóa lỏng bằng màng lọc hoặc tách li tâm sinh khối đã được hóa lỏng. Chất rắn và chất lỏng được tách ra có thể là nguồn nguyên liệu cho nhiều quá trình xử lý sau đó phụ thuộc vào các sản phẩm lên men mong muốn được yêu cầu, ví dụ đường hóa, lên men và sấy khô. Chất lỏng được tách ra là dung dịch đã được hóa lỏng thu được bằng cách tách 90% hoặc cao hơn, tốt hơn là 94% hoặc cao hơn chất rắn từ sinh khối đã được hóa lỏng, trong đó chất rắn bao gồm xơ và tro được tách riêng, theo đó độ dính của dung dịch đã được hóa lỏng giảm đi để tăng hiệu quả của việc khuấy và tăng sản phẩm lên men thu được.

Thu sản phẩm lên men thứ nhất

Thu sản phẩm lên men thứ nhất là bước thu sản phẩm lên men thứ nhất thông qua quá trình đường hóa và lên men đồng thời chất lỏng tách ra từ sinh khối đã được hóa lỏng trong lò phản ứng thứ nhất. Sản phẩm lên men thứ nhất có thể là 2,3-butanediol.

Trong quá trình lên men và đường hóa đồng thời (SSF), chủng lên men và enzym đường hóa được thêm vào chất lỏng đã tách chất rắn, tiếp đó là đường hóa và lên men ở pH thứ nhất rồi tiếp đến là lên men và đường hóa ở pH thứ hai.

Tại pH thứ nhất sau khi chủng tăng trưởng đủ, pH thứ nhất được thay đổi sang pH thứ hai để phù hợp với quá trình hoạt hóa enzym đường hóa khi sự tiêu thụ đường glucoza bắt đầu được gia tăng và quá trình lên men và đường hóa được thực hiện ở pH thứ 2. Ví dụ, pH thứ hai có thể được dùng với một hoặc nhiều điều kiện mà mật độ vi sinh vật OD 660 (OD: mật độ quang học, bước sóng dài ánh sáng: 660 nm) là 15 hoặc cao hơn, nồng độ glucoza là 10 g/L hoặc thấp hơn, và SSF được thực hiện trong thời gian từ 12 tới 20 giờ.

pH thứ nhất và pH thứ hai là khác nhau và có thể được điều chỉnh trong một khoảng chính xác phụ thuộc vào các chủng và các enzym đường hóa được sử dụng để sản xuất sản phẩm lên men thứ nhất. Tốt hơn là, pH thứ nhất nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,0 phù hợp với sự phát triển của các vi sinh vật ở các điều kiện lên men của sản phẩm lên men thứ nhất. pH thứ hai nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,0, tốt hơn là từ 4,5 đến 5,5 phù hợp với quá trình hoạt hóa enzym đường hóa sinh khối tinh bột.

pH có thể được điều chỉnh bằng cách sử dụng dung dịch axit như axit sulfuric, axit hydrocloric và axit axêtic, và dung dịch kiềm như natri hydroxit và dung dịch

amoniac. Quá trình thu sản phẩm lên men thứ nhất được tiến hành ở 20 đến 40°C, tốt hơn là ở 37°C trong vòng 15 đến 100 giờ.

Trong bước thu sản phẩm lên men thứ nhất, chủng lên men được chọn từ ít nhất một trong nhóm gồm *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aerobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter* sp., *Bacillus* sp., *Rhodococcus* sp. và *Paenibacillus* sp., tốt hơn là *Klebsiella oxytoca*.

Trong bước thu sản phẩm lên men thứ nhất, enzym đường hóa có thể được chọn từ ít nhất một trong nhóm gồm gluco-amylaza, cellulaza, xylanaza, β -glucosidaza và pullulanaza. Ví dụ sử dụng sản phẩm thương mại sẵn có AMG 300 L, Spirizyme Plus FG, Promozyme D2, Dextrozyme và Spirizyme Fuel, tốt hơn là sử dụng Spirizyme Fuel. enzym đường hóa có thể được điều chỉnh lượng cho vào và các thời điểm cho vào dựa trên mức độ tiêu thụ đường của các vi sinh vật và tốc độ đường hóa của glucoza.

Phương pháp có thể còn bao gồm bước tách và làm sạch sản phẩm lên men thứ nhất sau khi thu sản phẩm lên men thứ nhất bằng phương pháp đã biết không nằm ngoài phạm vi của phương án theo sáng chế.

Thu sản phẩm lên men thứ hai

Phương pháp có thể còn bao gồm bước thu sản phẩm lên men thứ hai sau khi tách riêng chất lỏng và chất rắn. Bước thu sản phẩm lên men thứ hai là việc thu sản phẩm lên men thứ hai thông qua quá trình đường hóa và lên men hoặc đồng thời đường hóa và lên men chất rắn tách ra trong lò phản ứng thứ hai. Bước thu sản phẩm lên men thứ hai sử dụng enzym đường hóa và chủng lên men, trong đó enzym đường hóa giống như được đề cập ở phần trên và chủng lên men có thể được lựa chọn từ một trong nhóm gồm *Saccaromyces* sp., *Pichi* sp., *Zymomonas* sp., *Kluyveromyces* sp., *Schizosaccharomyces* sp., *Klebsiella* sp., *Brettanomyces* sp., *Candida* sp., *E. coli*, *Methanobacterium* sp., *methanobrevilbacter* sp., *methanococcus* sp., *Methanogenium* sp., *Methanospirillum* sp., *Methanosarcina* sp., *Methanosarcina* sp. và *Methanothrix* sp.

Bước thu sản phẩm lên men thứ hai có thể được thực hiện ở nhiệt độ từ 20 đến 40°C trong 15 đến 100 giờ.

Chất rắn được tách ra gồm một lượng đáng kể các đường lên men như glucoza, maltozo và maltooligosaccarit, và có thể được sử dụng để sản xuất năng lượng sinh học như là sản phẩm lên men thứ hai. Năng lượng sinh học là etanol sinh học, metanol sinh học và hydro sinh học, tốt hơn là etanol sinh học.

Phương pháp có thể còn bao gồm bước tách và làm sạch sản phẩm lên men thứ hai sau khi thu sản phẩm lên men thứ hai được thực hiện bằng phương pháp đã biết không nằm ngoài phạm vi của phương án theo sáng chế.

Phương pháp có thể còn bao gồm bước làm khô sau khi tách chất rắn và chất lỏng. Bước làm khô là làm khô chất rắn được tách ra và chất rắn sau khi làm khô có thể được sử dụng làm thức ăn cho gia súc.

Mặc dù sáng chế sẽ được mô tả chi tiết ở phần sau cùng với các ví dụ minh họa, nhưng cần hiểu rằng sáng chế này không chỉ giới hạn trong phương pháp được bộc lộ tại đây mà còn bao gồm các cải tiến, thay đổi và biến thể của phương pháp theo sáng chế này không tách rời tinh thần và phạm vi bảo hộ của sáng chế được xác định trong các yêu cầu bảo hộ đi kèm.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ chuẩn bị 1: Chuẩn bị dung dịch hóa lỏng

1.000 g sản (lượng đường glucoza: 776 g, lượng tinh bột: 70%) nghiền thành bột có kích cỡ 1 mm hoặc nhỏ hơn được trộn với nước theo tỉ lệ 320 g/L, và 0,08% enzym hóa lỏng (Termamyl SC, 120 KNU-S g-1, Novozymes, Denmark) được thêm vào hỗn hợp, tiếp đó hóa lỏng ở 100°C trong 90 phút, tiếp theo chuẩn bị dung dịch bột sản hóa lỏng.

Ví dụ thực nghiệm 1: Lọc chất rắn và chất lỏng và so sánh các sản phẩm 2,3-butanediol

3.240 ml dung dịch bột sản hóa lỏng được chuẩn bị trong Ví dụ chuẩn bị 1 được tách chất rắn-lỏng bằng cách sử dụng màng 25- μ m để thu được 2.680 ml phần nước lọc ra. Hàm lượng chất rắn và độ dính trước và sau khi lọc được minh họa trong Bảng 1.

Tiếp theo đó, dung dịch hóa lỏng chưa lọc và dung dịch hóa lỏng để đem đi lọc chất rắn-lỏng được làm mát tới nhiệt độ lên men 37°C, sau đó 0,2% enzym đường hóa (Spirizyme Fuel, 750 AUG g-1, Novozymes, Denmark) được tính dựa trên lượng bột sắn được thêm vào dung dịch và 8% hỗn hợp môi trường nuôi cấy chủng *Klebsiella oxytoca* (K. oxytoca ATCC43863 Δ ldhA), nuôi trong 10 giờ, chủng sản xuất 2,3-butanediol được cấy trên các dung dịch, tiếp đó là quấy môi trường nuôi cấy trong khi điều chỉnh pH tới điều kiện lên men lý tưởng là 6,5. Môi trường lên men là hỗn hợp gồm 8,66 g/L of K₂HPO₄, 6,85 g/L of KH₂PO₄, 0,25 g/L of MgSO₄·7H₂O, và 2% chất bã etanol đặc hoặc 5 g/L chiết xuất nấm men như là nguồn nitơ. Hàm lượng 2,3-butanediol được sản xuất trong 14 giờ lên men được minh họa ở Fig. 2.

Bảng 1

Loại	Trước khi lọc	Sau khi lọc
Độ dính (cp)	8,5	3,4
Hàm lượng chất rắn (%)	3,4	0,2

Theo Bảng 1, 1, 94% chất rắn thu được từ dung dịch hóa lỏng bằng cách lọc chất rắn-lỏng, và độ dính giảm sau khi lọc. Ngoài ra, như được mô tả trong Fig. 2, sau 14 giờ lên men, có lần lượt 17,6 g/L và 34,7 g/L of 2,3-butanediol được tạo ra trong môi trường dung dịch hóa lỏng đã lọc và dung dịch hóa lỏng được đem lọc chất rắn-lỏng lần lượt, kết quả này cho thấy rằng việc lọc có thể tăng tỉ lệ sản phẩm tạo thành lên 2 lần hoặc cao hơn.

Ví dụ thực nghiệm 2: Các đặc tính của quá trình đường hóa bột sắn phụ thuộc vào pH.

Dung dịch bột sắn hóa lỏng được chuẩn bị trong Ví dụ chuẩn bị 1 được lọc chất rắn-lỏng bằng màng lọc 25- μ m. pH phần nước lọc được điều chỉnh bằng cách sử dụng dung dịch kiềm natri hydroxit tới 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 và 7,0, sau đó 0,2% enzym đường hóa (Spirizyme Fuel, 750 AUG g-1, Novozymes, Denmark) dựa trên bột sắn được thêm vào phần nước lọc, tiếp theo được đường hóa trong 48 giờ. Nồng độ glucoza được xác định trong quá trình đường hóa nhằm xác định tỉ lệ đường hóa tại mỗi pH, xác định hiệu quả của quá trình đường hóa. Các kết quả đo được minh họa trên Fig. 3.

Trên Fig. 3, tại pH 4,5; 5,0 và 5,5, các tỉ lệ đường hóa là 90% hoặc cao hơn chỉ trong 24 giờ đường hóa và đạt 96,9; 96,3 và 95,6% sau 48 giờ, chứng minh rằng các mức pH như vậy là các điều kiện tối ưu cho quá trình đường hóa. Ngoài ra, tại pH 6,5 và 7,0, hoạt động đường hóa giảm trầm trọng sau 12 giờ đường hóa, nên các tỉ lệ đường hóa cuối cùng là 72,8 và 61,5%, điều đó chỉ ra rằng sử dụng hiệu quả sinh khối tinh bột là khó. Tại pH 6,0, mặc dù tỉ lệ đường hóa là 92,6% sau 48 giờ đường hóa, tốc độ đường hóa giảm sau 12 giờ và quá trình đường hóa tiếp tục chậm tới 48 giờ, điều đó có nghĩa rằng tốc độ đường hóa không đạt tới tốc độ tiêu thụ glucoza của vi khuẩn.

Ví dụ thực nghiệm 3: Các đặc tính của quá trình lên men và đường hóa đồng thời bột sản phụ thuộc vào pH

Dung dịch tinh bột hóa lỏng được chuẩn bị ở Ví dụ chuẩn bị 1 được lọc chất rắn-lỏng bằng màng lọc 25- μ m. Phần nước lọc được lên men và đường hóa đồng thời (SSF) theo cách giống như trong Ví dụ thực nghiệm 1 ngoại trừ pH của phần nước lọc được điều chỉnh lên 5,5; 6,0 và 6,5. Mức tiêu thụ glucoza và sự tạo thành 2,3-butanediol bằng SSF 2,3-butanediol được minh họa trên Fig. 4.

Trên Fig. 4, tại pH 6,0 và 6,5, quá trình đường hóa được bắt đầu bằng khởi động SSF, và nồng độ glucoza tăng ban đầu với quá trình tiêu thụ glucozo bằng vi sinh vật nhưng sẽ đứng yên ở 0 g/L sau 24 giờ và 30 giờ lên men, điều đó có nghĩa rằng tốc độ tiêu thụ glucoza bởi vi sinh vật nhanh hơn tốc độ tiêu thụ glucoza bằng quá trình đường hóa và 2,3-butanediol không được lên men theo cách thông thường. Tại pH 5,5; nồng độ 2,3-butanediol tạo ra thấp 71,1 g/L sau 78 giờ lên men mặc dù đủ glucoza với mức độ pH thích hợp cho quá trình đường hóa lý do là vì giá trị pH không phải là điều kiện quan trọng nhất cho sự sinh trưởng của vi sinh vật. Kết quả này chỉ ra rằng, việc sản xuất 2,3-butanediol nồng độ cao bằng cách sử dụng sinh khối tại một giá trị pH là khó khăn.

Ví dụ 1: Sản xuất 2,3-butanediol từ bột sản bằng SSF

3.240 ml dung dịch hóa lỏng bột sản (hàm lượng chất rắn: 3,4%) được chuẩn bị theo cách được nêu ở Ví dụ thực nghiệm 1 và được lọc chất rắn-lỏng để tách riêng chất rắn và 2.680 ml dung dịch hóa lỏng (hàm lượng chất rắn: 0,2%, glucoza: 656,6 g). Tiếp theo đó, 0,2% enzym đường hóa (Spirizyme Fuel, 750 AUG g-1, Novozymes, Denmark) dựa trên lượng bột sản được thêm vào dung dịch và 8% hỗn hợp môi trường

nuôi cấy chủng *Klebsiella oxytoca* (K. oxytoca ATCC43863 Δ ldhA), được nuôi cấy trong 10 giờ, chủng sản xuất 2,3-butanediol được cấy vào dung dịch, tiếp theo là khuấy môi trường trong 90 giờ tại pH ban đầu 6,5, pH tối ưu cho quá trình sinh trưởng của vi sinh vật tạo ra 2,3-butanediol. Tiếp đó, sau 14 giờ lên men, khi nồng độ vi khuẩn OD 660 là 15 hoặc cao hơn và nồng độ glucoza giảm xuống 10 g/L hoặc thấp hơn, pH được thay đổi về 5,5 phù hợp cho quá trình hoạt hóa của enzym đường hóa, tại đó SSF được thực hiện. Sau 48 giờ lên men, 102,3 g/L (tổng dung dịch được lên men: 2,89 L) 2,3-butanediol được tạo thành với hiệu suất về thể tích là 2,13 g/L/h, và tỉ lệ đường hóa tinh bột là 95,3%, như được minh họa trên Fig. 5.

Như được thể hiện trên Fig. 5, trong quá trình SSF sinh khối tinh bột sử dụng pH thay đổi, pH được thay đổi từ điều kiện lý tưởng ban đầu cho sự sinh trưởng của vi sinh vật tới điều kiện lý tưởng cuối cùng cho quá trình đường hóa tinh bột, theo đó sử dụng hiệu quả sinh khối tinh bột và tạo ra 2,3-butanediol nồng độ cao.

Ví dụ 2: Sản xuất etanol

518g chất rắn (hàm lượng ẩm: 64,5%, hàm lượng chất khô: 34,5%, glucoza: 119,1 g) được tách ở Ví dụ 1 được trộn với 300% nước dựa trên lượng chất rắn, theo đó chuẩn bị hỗn hợp với hợp chất trên nền glucoza có tỉ lệ 60g/L. Tiếp đó, 0,2% enzym đường hóa (Spirizyme Fuel, 750 AUG g-1, Novozymes, Denmark) được tính dựa trên lượng glucoza được tạo ra được thêm vào hỗn hợp và 5% môi trường nuôi cấy chủng *Saccharomyces cerevisiae* (CHY1011, KCTC 11250BP) được nuôi trong 10 giờ như là chủng sản xuất etanol được cấy vào hỗn hợp, tiếp theo là lắc môi trường ở 32°C trong 24 giờ, theo đó sản xuất 3,2 %(v/v) etanol (dung dịch lên men: 2,6 L, etanol: 58,5 g).

Ví dụ 3: Thức ăn gia súc

518g chất rắn (hàm lượng chất ẩm: 64,5%, hàm lượng chất khô: 34,5%, glucoza: 119,1 g) được tách ở Ví dụ 1 được làm khô ở 80°C trong 24 giờ, theo đó tạo ra 178 g nguyên liệu thức ăn cho gia súc.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất sản phẩm lên men từ sinh khối tinh bột bao gồm các bước sau:

nghiên sinh khối tinh bột;

nấu thành gelatin và hóa lỏng nguồn sinh khối;

tách sinh khối đã hóa lỏng thành chất rắn và chất lỏng; và

thu sản phẩm lên men thứ nhất bằng cách thực hiện đồng thời quá trình lên men và đường hóa chất lỏng tách ra từ sinh khối đã được hóa lỏng,

trong đó quá trình thu sản phẩm lên men thứ nhất bằng cách tiến hành lên men và đường hóa tại pH thứ nhất và tiếp đó tiến hành lên men và đường hóa ở pH thứ hai khác với pH thứ nhất.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó sinh khối tinh bột bao gồm ít nhất một loại tinh bột được chọn từ nhóm gồm bột sắn, ngô, lúa mỳ, gạo, lúa mạch và khoai tây.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó quá trình nghiền sinh khối thành hạt có cỡ 1 mm hoặc nhỏ hơn.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó quá trình nấu thành gelatin và hóa lỏng được thực hiện ở 90 đến 100°C trong 1 đến 2 giờ.

5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó pH thứ nhất là pH để thúc đẩy sự phát triển của vi sinh vật và pH thứ hai là pH để tăng cường hoạt hóa enzym đường hóa.

6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó pH thứ nhất nằm trong khoảng 6,0 đến 7,0 và pH thứ hai nằm trong khoảng 4,5 đến 6,0.

7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó pH thứ hai được dùng khi ít nhất một trong các điều kiện đó là nồng độ vi sinh vật OD 660 là 15 hoặc cao hơn, nồng độ glucoza là 10 g/L hoặc thấp hơn và tiến hành đồng thời quá trình lên men và đường phân trong 12 đến 20 giờ.

8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó quá trình thu sản phẩm lên men thứ nhất được tiến hành ở 20 đến 40°C trong 15 đến 100 giờ.

9. Phương pháp theo điểm 1, trong đó quá trình thu sản phẩm lên men thứ nhất sử dụng sản phẩm chủng lên men và enzym đường hóa và lên men.
10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó chủng lên men gồm ít nhất một chủng được chọn từ nhóm gồm *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aerobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter* sp., *Bacillus* sp., *Rhodococcus* sp. và *Paenibacillus* sp.
11. Phương pháp theo điểm 9, trong đó enzym lên men và đường hóa bao gồm ít nhất một loại được chọn từ nhóm chứa gluco-amylaza, cellulaza, xylanaza, β -glucosidaza và pullulanaza.
12. Phương pháp theo điểm 1, trong đó sản phẩm lên men thứ nhất là 2,3-butanediol.
13. Phương pháp theo điểm 1, còn bao gồm bước thu sản phẩm lên men thứ hai bằng quá trình đường hóa và lên men hoặc tiến hành đồng thời lên men và đường hóa chất rắn được tách ra.
14. Phương pháp theo điểm 13, trong đó sản phẩm lên men thứ hai ít nhất là một trong số chất metanol sinh học, etanol sinh học và hydro sinh học.
15. Phương pháp theo điểm 1, còn bao gồm bước thu nguyên liệu làm thức ăn cho gia súc bằng cách sấy khô chất rắn tách ra.

FIG. 1

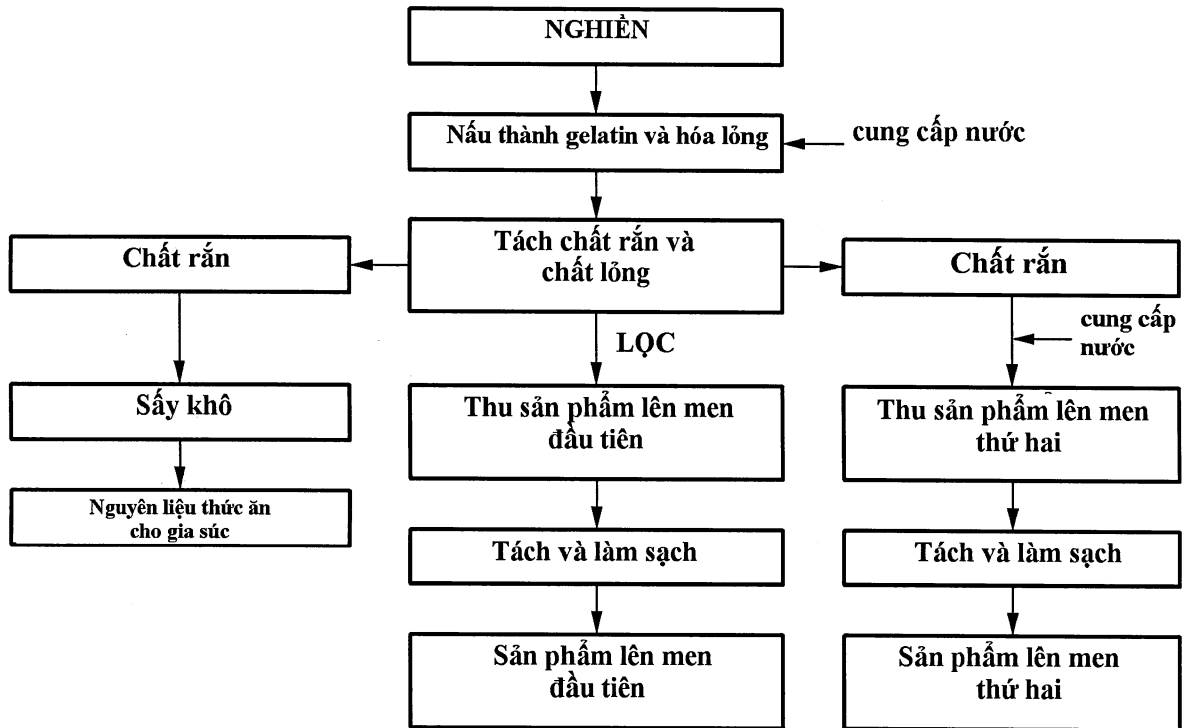


FIG. 2

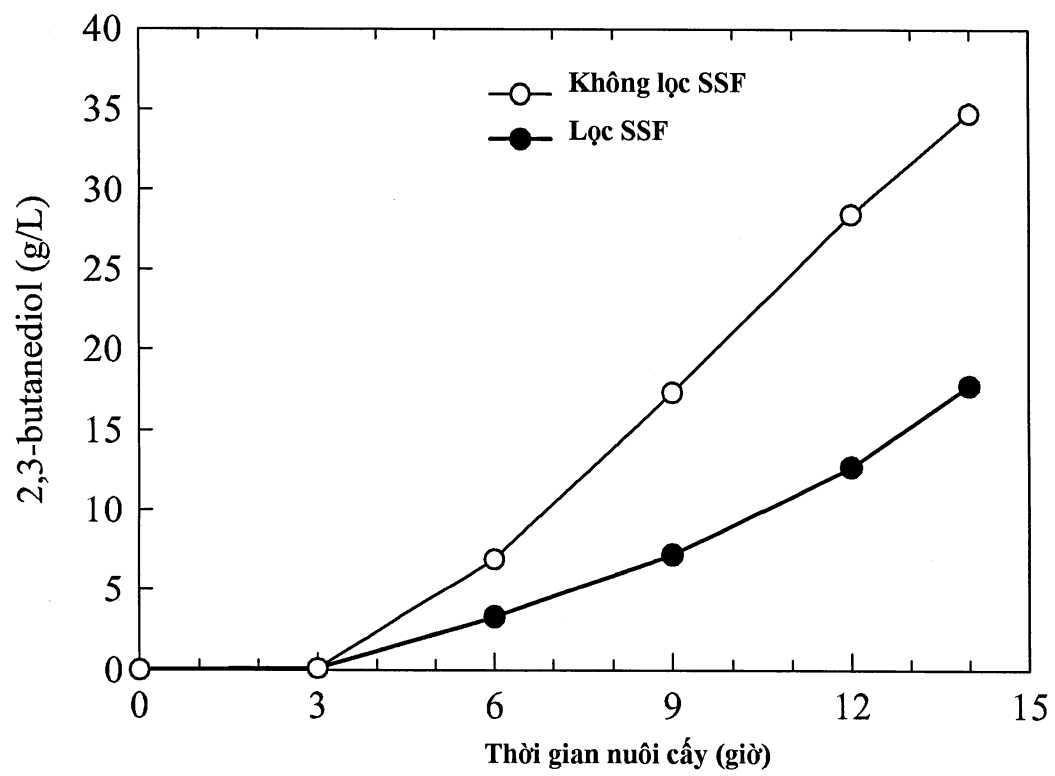


FIG. 3

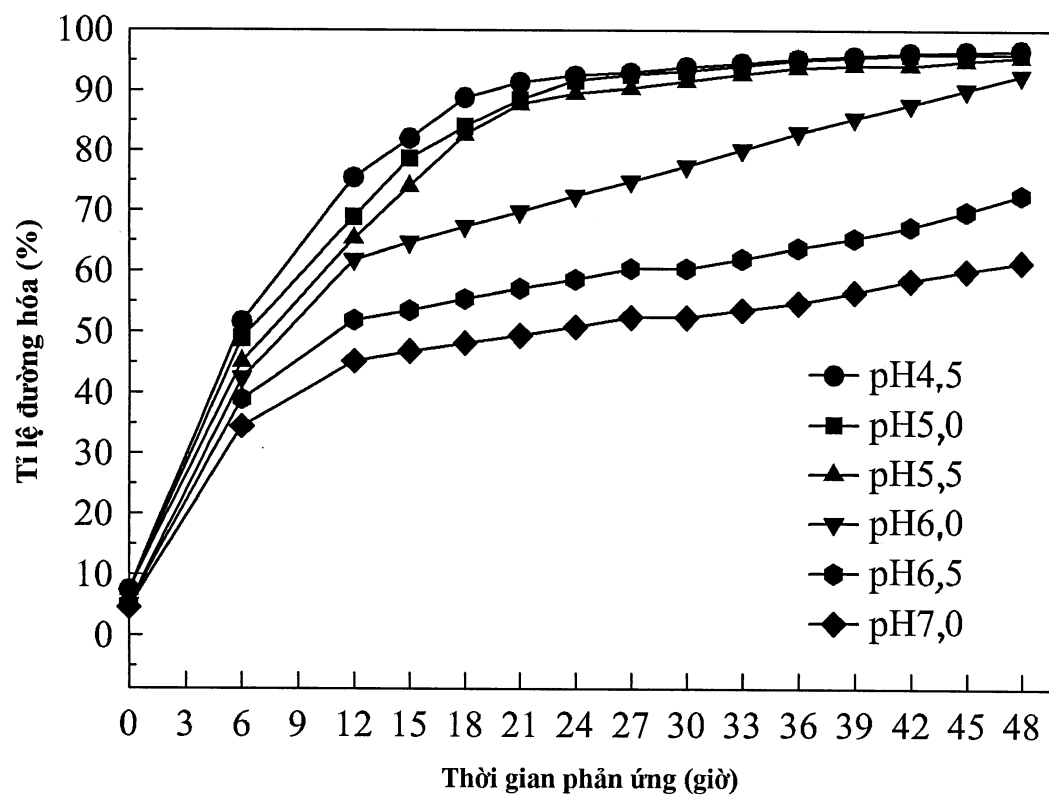


FIG. 4

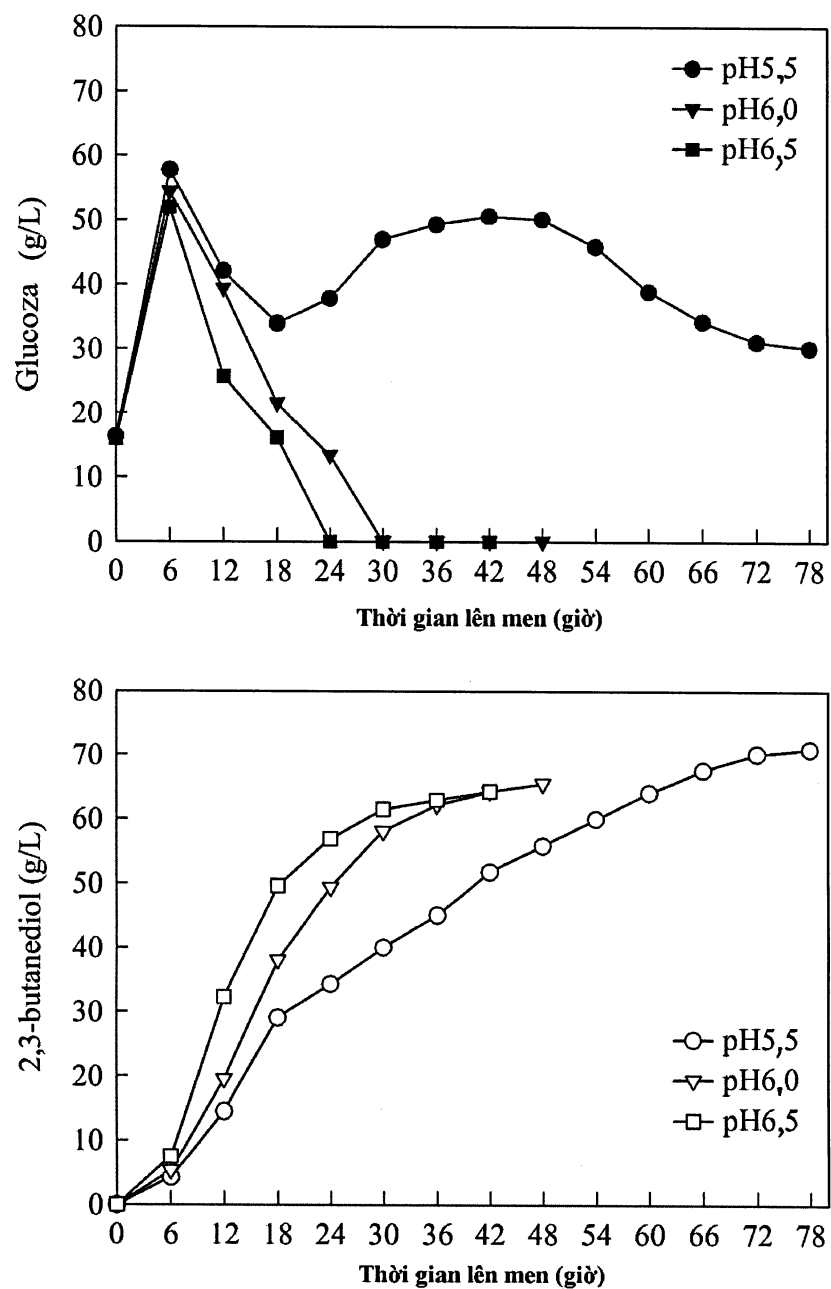


FIG. 5

