



(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)



1-0027418

(51)⁷ C08G 63/06; C07C 51/367; C12P 7/64; (13) B
C12P 7/52; C12P 7/54; C07C 51/363;
C08G 63/78

(21) 1-2017-02882

(22) 17/02/2016

(86) PCT/FR2016/050363 17/02/2016

(87) WO/2016/135396 01/09/2016

(30) 1551672 27/02/2015 FR

(45) 25/02/2021 395

(43) 25/12/2017 357A

(73) AFYREN (FR)

Biopole Clermont Limagne, 63360 Saint Beuzire, France

(72) NOUAILLE, Régis (FR); PESSIOT, Jérémy (FR); THIEULIN, Marie (FR).

(74) Công ty TNHH Quốc tế D & N (D&N INTERNATIONAL CO.,LTD.)

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT POLYHYDROXYALKANOAT TỪ CÁC TIỀN CHẤT THU ĐƯỢC BẰNG CÁCH LÊN MEN KỶ KHÍ TỪ SINH KHỐI CÓ THỂ LÊN MEN ĐƯỢC

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất polyhydroxyalkanoat (PHA) từ các phân tử axit béo dễ bay hơi (volatile fatty acid-VFA), được gọi là các tiền chất, được sản xuất bằng cách lên men kỵ khí từ sinh khối có thể lên men được, khác biệt ở chỗ, quy trình này ít nhất bao gồm các bước sau:

a) chiết các phân tử axit béo dễ bay hơi (VFA), mà không cần dừng quá trình lên men, bằng tác nhân chiết được chọn từ các tác nhân mà ít nhất không hòa tan trong môi trường lên men,

b) thu gom các phân tử axit béo dễ bay hơi (VFA) khi chúng được chiết ở bên ngoài thùng lên men,

c) tổng hợp axit α -halo xác định, bằng cách halogen hóa, sử dụng loại axit béo dễ bay hơi (VFA) được chọn từ các axit béo dễ bay hơi thu được ở bước b) và được xác định theo loại PHA mong muốn,

d) tổng hợp axit α -hydroxy xác định từ các phân tử axit α -halo này bằng cách phản ứng với bazơ,

e) polyme hóa tạo ra polyhydroxyalkanoat (PHA) xác định từ axit α -hydroxy thu được.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất polyhydroxyalkanoat từ các tiền chất thu được bằng cách lên men kỵ khí từ sinh khối có thể lên men được.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Để thuận tiện cho việc đọc phần mô tả dưới đây, polyhydroxyalkanoat sẽ được viết tắt là PHA. Họ này bao gồm một vài phân tử, như hàm số nguyên tử cacbon.

PHA là các polyeste dẻo nhiệt có thể được sản xuất bằng cách lên men vi sinh vật từ đường có nguồn gốc thực vật, cụ thể là tinh bột ngô hoặc chất thải thực vật. Vi sinh vật tổng hợp PHA khi gặp các điều kiện thiếu hụt các chất chuyển hóa nhất định kết hợp với lượng cacbon cung cấp dư. Nói cách khác, lúc đó vi sinh vật sẽ tích lũy cacbon, có nguồn gốc từ đường, ở dạng các hạt PHA. PHA được sử dụng làm vật liệu tạo nên bao bì chẳng hạn hay được sử dụng làm nguyên liệu cho chỉ khâu trong lĩnh vực y học. Ngoài ra, chúng còn thay thế cho các polyme gốc dầu mỏ.

Các quy trình lên men được biết đến là sử dụng các chủng vi sinh vật chọn lọc tinh khiết và cả một cơ chất đặc hiệu để sản xuất PHA. Giải pháp này khó áp dụng ở quy mô công nghiệp với chi phí sản xuất có thể chấp nhận được.

Một quy trình được điều chỉnh để sử dụng trong công nghiệp cũng được biết đến trong đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số EP-A-2 749 650. Cơ chất sử dụng được lấy từ nước thải và được làm giàu axit béo dễ bay hơi (volatile fatty acid-VFA), mà được biết đến là các tiền chất PHA. Bằng cách sử dụng tổ hợp vi khuẩn và bằng cách thay đổi các pha sinh trưởng của sinh khối và các pha thiếu hụt theo cách kiểm soát được, sự sinh trưởng của vi khuẩn và sự tổng hợp PHA được kích thích. Tuy nhiên, quy trình như vậy đòi hỏi phải kiểm soát chính xác các điều kiện lên men và xử lý thích hợp để tách chiết PHA tổng hợp được, mà cần hệ thống thiết bị tương đối lớn. Hơn nữa, không thể tiến hành tách chiết liên tục như vậy và quy trình này không cho phép tổng hợp tất cả các loại PHA. Một nhược điểm khác của quy trình này là tính đặc hiệu của nó: quy trình này chỉ tổng hợp được các PHA vi khuẩn, tức là các PHA được tổng hợp bởi vi sinh vật.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vì các lý do nêu trên, mục đích của sáng chế là đề xuất quy trình tổng hợp PHA mà có thể tổng hợp được nhiều loại PHA, đặc biệt là các axit amin không tạo nên protein, một cách dễ dàng mà không cần các điều kiện ràng buộc có liên quan đến các phương pháp tổng hợp đã biết trong giải pháp kỹ thuật đã biết.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất polyhydroxyalkanoat hay PHA từ các phân tử axit béo dễ bay hơi (VFA), được gọi là các tiền chất, được tổng hợp bằng cách lên men kỵ khí từ sinh khối có thể lên men được, khác biệt ở chỗ quy trình này ít nhất bao gồm các bước sau:

a) chiết các phân tử axit béo dễ bay hơi (VFA), mà không cần dừng quá trình lên men, nhờ các tác nhân chiết được chọn từ các tác nhân mà ít nhất không hòa tan trong môi trường lên men,

b) thu gom các phân tử axit béo dễ bay hơi (VFA) khi chúng được chiết ở bên ngoài thùng lên men,

c) tổng hợp axit α -halo xác định, bằng cách halogen hóa, sử dụng loại axit béo dễ bay hơi (VFA) được chọn từ các axit béo dễ bay hơi thu được ở bước b) và được xác định theo loại PHA mong muốn,

d) tổng hợp axit α -hydroxy xác định từ các phân tử axit α -halo này bằng cách phản ứng với bazơ,

e) polyme hóa tạo ra polyhydroxyalkanoat (PHA) xác định từ axit α -hydroxy thu được.

Do đó, quy trình này có thể kết hợp được pha tổng hợp liên tục các tiền chất nhờ vi sinh vật với pha tổng hợp được thực hiện bên ngoài quy trình lên men, quy trình này cho phép kiểm soát dễ dàng các thông số khác nhau, đồng thời cho phép độ biến thiên về loại polyhydroxyalkanoat (PHA) được tổng hợp lớn hơn.

Quy trình này có thể tổng hợp liên tục các tiền chất, tức là axit béo dễ bay hơi, đồng thời duy trì được khả năng sản xuất của vi sinh vật có mặt trong bình phản ứng sinh học.

Mô tả chi tiết sáng chế

Cụ thể là, các bước chiết và thu gom a) và b) không chỉ có thể chiết và thu gom liên tục các phân tử axit béo dễ bay hơi được tổng hợp trong thùng lên men, mà còn duy trì các vi sinh vật tham gia thực hiện quy trình tổng hợp này. Cụ thể là, quy trình chiết, và thực ra là thu gom, được tiến hành trong các điều kiện mà ít nhất không làm chết toàn bộ vi sinh vật, tức là trong các điều kiện chiết và thu gom tương thích sinh học, vì quy trình chiết phải duy trì được hoạt tính của vi sinh vật và quy trình thu gom được tiến hành bên ngoài thùng lên men.

Theo cách này, các vấn đề có liên quan đến sự tích lũy các chất chuyển hóa trong thùng lên men được khắc phục, ví dụ vấn đề axit hóa môi trường lên men do sự tích lũy các axit béo dễ bay hơi được tổng hợp, mà gây hại đối với vi sinh vật. Lượng và hoạt tính của vi sinh vật được duy trì ở mức cao, gần bằng mức ban đầu, suốt chu trình lên men.

Bằng cách tạo ra quy trình sản xuất VFA chuẩn và liên tục, đã tạo ra nguồn các tiền chất khác nhau có thể sử dụng nhanh và dễ dàng. Trong quy trình theo sáng chế, việc sử dụng này diễn ra ở bước c), bằng cách tổng hợp hóa học và trong các điều kiện có thể dễ dàng thay đổi và kiểm soát, đã thu được nhiều loại phân tử được tổng hợp. Cụ thể là, trong bước c), tùy thuộc vào VFA được chọn để tiến hành halogen hóa, một loại axit α -halo xác định được tổng hợp và nhờ vậy, sau đó, một loại axit α -hydroxy xác định được tổng hợp và nhờ vậy một loại α -PHA xác định được tổng hợp. Sáng chế cũng có thể đề xuất việc kết hợp một vài axit α -hydroxy được tổng hợp như vậy để tạo ra các dị polyme ở bước cuối của quy trình.

Một vài loại PHA hiện có được quan tâm để sử dụng trong công nghiệp, mỹ phẩm, y tế, thực phẩm hoặc mục đích sử dụng khác. Ví dụ về các loại mà có thể được đề cập bao gồm polyhydroxybutyrat hay PHB và poly(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat) hay PHBV. Cũng có thể được đề cập là quy trình sản xuất axit polyglycolic hay PGA hoặc axit polylactic hay PLA, trong số các loại PHA, được cho rằng, thông qua quy trình đã biết nêu trong giải pháp đã biết, không thể tổng hợp được PLA trực tiếp, PLA phải được polyme hóa từ quy trình sản xuất nhờ lên men axit lactic.

Nói cách khác, theo sáng chế, quy trình tổng hợp một vài loại PHA, đó là các loại homo-, co- hoặc dị polyme, có thể được tiến hành, theo cách chính xác và kiểm soát

được, từ cơ chất có nguồn gốc sinh học bằng cách kết hợp quy trình tổng hợp sinh học và quy trình tổng hợp hóa học.

Quy trình như vậy có thể sử dụng sinh khối có thể lên men được trong suốt giai đoạn lên men kỵ khí. Thuật ngữ "sinh khối có thể lên men được" ở đây được dùng để chỉ cơ chất hữu cơ, mà thuận lợi là không phải loại thực phẩm, thu được từ chất thải, sản phẩm phụ và các đồng sản phẩm được tạo thành từ nguyên liệu hữu cơ, tức là từ sinh khối, thu được từ các hoạt động của con người, dù là các hoạt động trong gia đình, trong công nghiệp, nông nghiệp, lâm nghiệp, thủy sản, công nông nghiệp, thu được từ việc chăn nuôi gia súc hoặc hoạt động tương tự. Ví dụ không giới hạn về các cơ chất hữu cơ mà có thể được đề cập bao gồm phân bón, phần hữu cơ của rác thải sinh hoạt, các đồng sản phẩm từ lò mổ, bã có thành phần chính là xenluloza hoặc lignoxenluloza có nguồn gốc từ ngành công-nông nghiệp, như bã thu được từ quá trình chế biến cây mía (bã mía), cây hướng dương hoặc cây đậu tương.

Thuật ngữ "lên men kỵ khí" có nghĩa là quy trình lên men được tiến hành trong các điều kiện kỵ khí nhờ các vi sinh vật có nhân điển hình hoặc vi sinh vật nhân sơ, như vi khuẩn, nấm, tảo hoặc nấm men.

Theo các khía cạnh có lợi nhưng không bắt buộc của sáng chế, quy trình này có thể bao gồm một hoặc nhiều đặc điểm sau:

- Trong bước c), hợp chất halo được sử dụng là dibrom.
- Trong bước c), hợp chất halo được sử dụng không phải là dibrom.
- Trong bước c), anhydrit axetic được sử dụng với lượng phần trăm mol so với axit béo dễ bay hơi là khoảng 12%.
- Trong bước c), anhydrit tương ứng với axit béo dễ bay hơi (VFA) được halogen hóa được sử dụng.
- Trong bước c), nhiệt độ tại đó phản ứng brom hóa được tiến hành là nằm trong khoảng từ 20°C đến 40°C dưới điểm sôi của axit béo dễ bay hơi.
- Trong bước d), bazơ được sử dụng là natri hydroxit.

- Trong bước d), lượng natri hydroxit là lượng bằng mol với axit α -halo.

- Trong bước d), phản ứng của axit α -halo với natri hydroxit được tiến hành ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 120°C, thuận lợi là nằm trong khoảng từ 50°C đến 90°C.

- Trong bước d), phản ứng của axit α -halo với natri hydroxit là tối ưu ở nhiệt độ khoảng 50°C nếu axit α -halo có ít nhất bốn nguyên tử cacbon và ở nhiệt độ khoảng 90°C nếu axit α -halo có ít hơn bốn nguyên tử cacbon.

Sáng chế sẽ được hiểu rõ hơn và các ưu điểm khác của sáng chế sẽ trở nên rõ hơn khi đọc phần mô tả một vài phương án của sáng chế, mà được đưa ra bằng cách ví dụ không giới hạn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các bước khác nhau của quy trình được mô tả ở đây có viện dẫn đến một vài phương án, cần hiểu rằng các bước này mà là đã biết không được mô tả chi tiết.

Trước tiên, thuận lợi là cơ chất được sử dụng không được xử lý, tức là cơ chất này không trải qua quá trình xử lý sơ bộ bằng enzym hoặc bằng biện pháp lý hóa bất kỳ. Cơ chất này là thành phần cấu tạo chủ yếu của sinh khối có thể lên men. Giống như các ví dụ không giới hạn khác, được đề cập là chất thải nông nghiệp hoặc có thành phần chính là thực vật (rom, bã mía, bã từ quá trình chưng cất ngô, cỏ, gỗ, đồng rom rạ), giấy lộn (bìa cứng, giấy), chất thải từ nông sản thực phẩm, chất thải từ lò mổ, phần hữu cơ của rác thải sinh hoạt, chất thải từ chăn nuôi gia súc (phân, phân chuồng lỏng, phân thú), tảo, chất thải từ nuôi trồng thủy sản, chất thải từ hoạt động lâm nghiệp hoặc các đồng sản phẩm có thể lên men từ ngành công nghiệp mỹ phẩm. Các cơ chất nhất định chứa các phân tử hữu cơ, như axit hữu cơ, mà ít hoặc không tác động đến quy trình lên men. Mặt khác, các phân tử này được tìm thấy trong môi trường lên men và có thể tham gia vào, chẳng hạn quá trình tổng hợp các phân tử hữu cơ cuối cùng được xác định.

Như một lời nhắc nhở và theo cách đã biết, cơ chất này được đưa vào thùng lên men, mà là đã biết và được định kích thước cho quy trình tổng hợp mong muốn, cho dù là quy trình tổng hợp này diễn ra ở quy mô trong phòng thí nghiệm để tiến hành các thử nghiệm hay là ở quy mô công nghiệp trong trường hợp sản xuất. Nói cách khác, thùng lên men hay thùng phản ứng sinh học có thể tích nằm trong khoảng từ một vài lít đến vài

trăm mét khối, tùy thuộc vào nhu cầu.

Đầu tiên, thuận lợi là vi sinh vật được đưa vào thùng lên men, với lượng đủ để bắt đầu quá trình lên men. Thuận lợi là, vi sinh vật được cấy truyền ở dạng tổ hợp. Thuật ngữ "tổ hợp" có nghĩa là hỗn hợp của các vi sinh vật nhân thực hoặc nhân sơ, dù chúng là vi khuẩn, nấm men, nấm hay tảo. Các vi sinh vật khác nhau này chủ yếu có nguồn gốc từ các hệ sinh thái tự nhiên, thuận lợi là, nhưng không loại trừ, từ các hệ sinh thái kỵ khí như, các ví dụ không giới hạn, tầng kỵ khí của môi trường nước như tầng thiếu oxy của các hồ, đất, đầm lầy, cặn tinh chế, dạ cỏ của các động vật nhai lại hoặc ruột của con mồi nhất định. Cũng cần hiểu rằng sự phân bố về mặt số lượng và chất lượng của nhiều loại và loài vi sinh vật khác nhau trong tổ hợp này không được biết chính xác và có thể khác nhau trong khoảng tỷ lệ lớn. Ngạc nhiên nhận thấy là sự đa dạng về mặt số lượng và chất lượng tạo ra tình trạng mạnh và khả năng thích ứng của các vi sinh vật, mà có thể đảm bảo việc sử dụng tối ưu các cơ chất, bất kể thành phần của các cơ chất và các điều kiện lên men có thể thay đổi.

Hơn thế nữa, do thực tế là cơ chất được sử dụng ở dạng không bị biến đổi, tức là nó không được vô trùng hay, nói chung hơn nữa là, nó chứa các vi sinh vật trước khi được đưa vào thùng phản ứng sinh học, đã nhận thấy rằng các vi sinh vật đặc hữu với cơ chất, thực tế được đưa vào tổ hợp hoặc ít nhất được kết hợp với tổ hợp trong bình phản ứng sinh học.

Hơn thế nữa, quy trình lên men diễn ra trong các điều kiện kỵ khí, chính xác hơn là khi điện thế oxy hóa khử nhỏ hơn -300mV, thuận lợi là nằm trong khoảng từ -550mV đến -400mV và khi độ pH nhỏ hơn 8, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 4 đến 7. Thuận lợi là quy trình lên men được giới hạn ở việc tổng hợp các "tiền" chất chuyển hóa lên men, đó là axit béo dễ bay hơi hay VFA có từ hai đến tám nguyên tử cacbon, tốt hơn là từ hai đến sáu nguyên tử cacbon. Vì thế, một phản ứng tương tự với hiện tượng nhiễm axit được bắt gặp ở động vật nhai lại được gây ra đồng thời có mức tổng hợp metan gần bằng 0. Thông thường, metan là một trong số các chất chuyển hóa cuối cùng của quy trình lên men thu được ở quy trình lên men kỵ khí bởi các vi sinh vật thu được từ các hệ sinh thái tự nhiên.

Ở giai đoạn đầu, quy trình lên men tạo ra axit béo dễ bay hơi chủ yếu có từ hai đến bốn nguyên tử cacbon, ví dụ axit axetic, axit propionic và axit butyric. Axit béo dễ bay hơi mạch dài, tới mức dài hơn bốn nguyên tử cacbon, như axit valeric, axit caproic, axit

heptanoic hoặc axit octanoic, cũng được tạo ra, với lượng nhỏ hơn. Bằng cách tiếp tục lên men và/hoặc bằng cách làm tăng lượng vi sinh vật trong thùng phản ứng sinh học, nếu cần với các vi sinh vật chọn lọc, có thể thúc đẩy quá trình tổng hợp VFA mạch cacbon dài, tới mức dài hơn bốn nguyên tử cacbon.

Nói cách khác, axit béo dễ bay hơi được tổng hợp với lượng trong quá trình lên men chủ yếu là axit béo dễ bay hơi có hai đến sáu nguyên tử cacbon.

Trong mọi trường hợp, quy trình lên men được tiến hành để đảm bảo tổng hợp VFA, trong pha lỏng. Thông thường, thời gian lên men nằm trong khoảng từ 1 đến 7 ngày, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2 đến 4 ngày. Nồng độ của các chất chuyển hóa thu được trong môi trường lên men ở cuối giai đoạn này là khác nhau, nhưng với các axit béo dễ bay hơi thường nằm trong khoảng từ 10 đến 20g/L, tùy thuộc vào các axit béo dễ bay hơi, cần hiểu rằng trong các điều kiện nhất định, lượng axit béo dễ bay hơi có thể lớn hơn 35g/L, ví dụ khoảng 50g/L. Cuối bước lên men, môi trường lên men ở độ pH axit, thường nằm trong khoảng từ 4 đến 6, do sự có mặt của các axit béo dễ bay hơi trong môi trường lên men.

Khi quá trình tổng hợp VFA đạt đến lượng xác định, thường ở giai đoạn ổn định của quy trình lên men, bước a) chiết các phân tử được bắt đầu. Tốt hơn là, nhưng không bắt buộc, lượng xác định của VFA này tương ứng với sự chậm sinh trưởng của vi sinh vật, đến mức nằm trong khoảng ngưỡng ức chế vi sinh vật.

Tác nhân chiết được chọn từ tác nhân chiết lỏng hoặc rắn, mà ít nhất không hòa tan trong môi trường lên men. Nếu tác nhân chiết là chất lỏng, thì khi đó nó là một dung môi, tốt hơn là, tỷ trọng của dung môi là nhỏ hơn tỷ trọng của môi trường lên men.

Chính xác hơn, quá trình chiết được tiến hành bằng tác nhân chiết rắn hoặc lỏng, các điều kiện hoạt động của quá trình chiết có thể duy trì hoạt động và/hoặc sự sinh trưởng của vi sinh vật trong các điều kiện lên men phổ biến trong bình phản ứng sinh học và được xác định để tiến hành lên men. Tốt hơn là các phân tử VFA được chiết bằng các họ phân tử và sau đó thuận lợi là được tách riêng rẽ bằng các kỹ thuật đã biết.

Nếu các phân tử như axit béo dễ bay hơi được chiết từ môi trường lên men, trên thực tế việc axit hóa môi trường lên men bởi các axit này được làm giảm. Do đó, quy trình lên men và sự tổng hợp các chất chuyển hóa như vậy, tiếp tục diễn ra trong các điều kiện tương tự với các điều kiện ban đầu, môi trường lên men vẫn hơi có tính axit.

Thuận lợi là, quy trình chiết được tiến hành liên tục hoặc ít nhất liên tục, ví dụ

chiết mỗi 12 giờ. Nói cách khác, có thể tiếp tục lên men đồng thời chiết các chất chuyển hóa được tổng hợp, hoặc từ từ khi chúng được tổng hợp hoặc đều đặn.

Chiết trong pha lỏng-lỏng bằng các dung môi hữu cơ làm tác nhân chiết là phương pháp chiết được ưu tiên nhưng không phải duy nhất được sử dụng.

Theo một phương án, quá trình chiết không được tiến hành trong bộ phận tách riêng với thùng lên men, mà trực tiếp trong thùng này. Dung môi được đưa vào, ví dụ, thông qua một thiết bị kiểu sục khí được bố trí ở đáy của thùng. Theo một phương án khác, bộ phận chiết được nối với thùng nối thông với môi trường lên men được lắp đặt.

Kết thúc quá trình chiết, bước thu gom b) được tiến hành. Trong bước này, các VFA được thu gom từ pha hữu cơ bằng các kỹ thuật mà đã biết, như kỹ thuật chưng cất hoặc bay hơi.

Quá trình thu gom được tiến hành dưới dạng hỗn hợp các VFA hoặc theo loại VFA. Rõ ràng là việc chọn VFA hay hỗn hợp các VFA được xác định bởi loại (các) phân tử cuối cùng mong muốn. Vì điều này, các điều kiện thu gom, thường là các thông số chưng cất hoặc bay hơi được điều chỉnh.

Khi bước thu gom này được tiến hành, thì bước c) dưới đây được tiến hành. Thuận lợi là, nhưng không loại trừ, bước này được tiến hành sau bước thu gom. Theo một phương án khác, bước này được tiến hành ở thời điểm khác và/hoặc vị trí khác, các VFA được tổng hợp được vận chuyển và/hoặc được lưu trữ, theo các kỹ thuật đã biết.

Bước halogen hóa này bao gồm cho halogen phản ứng với VFA để tổng hợp axit α -halo, mà là loại phân tử có khả năng phản ứng cao và do đó đặc biệt thuận lợi để tổng hợp các phân tử khác. Phản ứng như vậy, mà đã biết được tiến hành bằng cách bổ sung brom, được ưu tiên, cần hiểu rằng các halogen khác cũng có thể được sử dụng, đó là clo, flo hoặc iot hoặc các phân tử được halogen hóa như phospho trihalogenua, axit halo hoặc axyl halogenua.

Dibrom được chọn vì axit α -halo được brom hóa có khả năng phản ứng tốt hơn so với axit α -halo được clo hóa tương ứng, liên kết cacbon-brom dễ phá vỡ hơn so với liên kết cacbon-clo. Hơn nữa, dibrom dễ xử lý hơn nhờ dạng lỏng của nó.

Để tiến hành tổng hợp axit α -bromo, con đường sử dụng anhydrit, trong trường hợp này là anhydrit axetic, và pyridin được chấp nhận. Rõ ràng là các con đường tổng hợp khác, ví dụ bằng axit polyphosphoric hoặc phospho trihalogenua là đã biết. Các thử nghiệm với axit polyphosphoric được tiến hành, nhưng các kết quả bị bỏ lửng, không kể

các lý do khác là do độ nhớt của hợp chất này cao khiến cho nó khó xử lý.

Các thử nghiệm clo hóa cũng được tiến hành bởi người nộp đơn để tổng hợp axit α -cloro, ví dụ bằng axit trichloroisoxyanuric. Các kết quả thu được là kém hơn, về hiệu suất và mức độ dễ thực hiện, so với các kết quả thu được với dibrom.

Con đường tổng hợp sử dụng anhydrit tương ứng với axit béo dễ bay hơi mà được mong muốn để halogen hóa là thuận lợi và có thể thu được axit α -halo, trong trường hợp này là axit α -bromo thuộc loại xác định. Việc sử dụng anhydrit axetic với các VFA khác và/hoặc với hỗn hợp các VFA có từ hai đến sáu nguyên tử cacbon làm cho có thể thu được hỗn hợp của các axit α -halo có từ hai đến sáu nguyên tử cacbon.

Các thử nghiệm sử dụng axit axetic (VFA có hai nguyên tử cacbon), axit propionic (VFA có ba nguyên tử cacbon), axit butyric (VFA có bốn nguyên tử cacbon), axit caproic (VFA có sáu nguyên tử cacbon) và cả hỗn hợp của các VFA có từ hai đến sáu nguyên tử cacbon được tiến hành bằng cách thay đổi lượng của anhydrit axetic và cả các thông số khác như nhiệt độ.

Trong các thử nghiệm khác nhau, quy trình thực hiện được coi trọng. Quy trình này bao gồm, ở giai đoạn đầu, gia nhiệt đến hồi lưu hỗn hợp ban đầu của VFA, anhydrit axetic và pyridin. Tiếp theo, trong quá trình brom hóa hiện nay, dibrom được bổ sung từ từ, trong vài giờ, ở nhiệt độ dưới điểm sôi của hỗn hợp, và, khi dibrom đã được bổ sung, hỗn hợp lại được hồi lưu trước khi được làm nguội. Ở cuối phản ứng, thuận lợi là, nước được bổ sung để phá hủy anhydrit có mặt. Sau đó, axit α -bromo được chiết bằng nhiều phương pháp khác nhau, tùy thuộc vào axit. Các phương pháp này là, chưng cất hoặc chiết tách chẳng hạn.

Nhiệt độ ban đầu, để hồi lưu hỗn hợp, là nằm trong khoảng từ 120°C, đối với VFA có hai nguyên tử cacbon, đến 200°C, đối với VFA có sáu nguyên tử cacbon. Nhiệt độ brom hóa nằm trong khoảng từ 80°C đến 180°C, tùy thuộc vào việc liệu VFA có từ hai đến sáu nguyên tử cacbon hay không. Thời gian của phản ứng brom hóa, và trên thực tế là thời gian bổ sung dibrom, chênh nhau từ một giờ đối với VFA có sáu nguyên tử cacbon đến bốn giờ đối với VFA có hai nguyên tử cacbon.

Các thử nghiệm brom hóa axit béo dễ bay hơi có hai, ba, bốn hoặc sáu nguyên tử cacbon được tiến hành, cùng với thử nghiệm trên hỗn hợp của các axit béo dễ bay hơi:

axit axetic (C2): 0,53 mol

axit propionic (C3): 0,53 mol

axit butyric (C4): 0,53 mol

axit caproic (C6): 0,24 mol

hỗn hợp của các VFA có từ 2 đến 6 nguyên tử cacbon: 0,54 mol.

Lượng dibrom được bổ sung là 0,21 mol hoặc 0,11 mol sao cho axit béo dễ bay hơi dư. Thuận lợi là, người nộp đơn đã nhận thấy rằng tỷ lệ mol bằng 2:1 nghiêng về VFA là tối ưu.

Lượng anhydrit được bổ sung là, đối với mỗi axit, 0,06 mol đối với một thử nghiệm và 0,03 mol đối với thử nghiệm khác.

Hỗn hợp VFA bao gồm axit axetic (C2), axit propionic (C3), axit butyric (C4), axit valeric (C5) và axit caproic (C6).

Nhiệt độ hồi lưu, ở giai đoạn đầu, khác nhau theo VFA: 120°C đối với axit axetic; 120°C và 140°C đối với các thử nghiệm với axit propionic; 150°C và 160°C đối với axit butyric; 200°C đối với axit caproic và 180°C đối với hỗn hợp.

Nhiệt độ brom hóa đối với các thử nghiệm khác nhau với mỗi axit là nằm trong khoảng từ 10°C đến 50°C và thuận lợi là nằm trong khoảng từ 20°C đến 40°C dưới nhiệt độ hồi lưu và vì thế dưới cả điểm sôi của axit béo dễ bay hơi.

Hiệu suất và độ tinh khiết của các axit α -bromo thu được cuối các thử nghiệm khác nhau được thể hiện dưới đây trong bảng 1. Để đơn giản hóa, các VFA được ký hiệu bằng số nguyên tử cacbon.

Bảng 1

Axit	Lượng anhydrit (mol)	Thời gian brom hóa (giờ)	Nhiệt độ hồi lưu (°C)	Nhiệt độ brom hóa (°C)	Hiệu suất (%)	Độ tinh khiết (%)
C2	0,06	2,2	120	100	87	98
C2	0,03	4	120	90	80	93
C3	0,06	3	120	80 đến 110	77	80
C3	0,03	3	140	125	100	93
C4	0,06	1,25	160	140	80	95
C4	0,03	3	150	110 đến 140	100	96
C6	0,03	0,92	200	150	100	NC
Hỗn hợp	0,06	1,5	180	130	100	NC

Phân tích và tính toán hiệu suất được tiến hành bằng các kỹ thuật phân tích đã biết, đó là kỹ thuật cộng hưởng từ hạt nhân (nuclear magnetic resonance-NMR) và bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (high performance liquid chromatography-HPLC). Hiệu suất được xác định so với với lượng VFA được tiêu thụ.

Người nộp đơn đã nhận thấy rằng tốc độ phản ứng, được minh họa bằng sự khử màu của hỗn hợp phản ứng sau khi bổ sung dibrom, là nhanh hơn nếu lượng anhydrit lớn hơn, độ tinh khiết bị ảnh hưởng một chút. Tuy nhiên, thích hợp là nhiệt độ của hai bước, bước ban đầu và bước brom hóa, là tối ưu.

Vì lý do này, người nộp đơn lưu ý rằng nhiệt độ brom hóa thấp hơn điểm sôi của axit béo dễ bay hơi là cần thiết, mà không quá xa nhiệt độ này.

Nhiều thử nghiệm khác nhau được tiến hành có thể xác định được rằng nhiệt độ brom hóa nằm trong khoảng từ 10°C đến 50°C thấp hơn điểm sôi của axit béo dễ bay hơi, thuận lợi là dưới 20°C, ở tất cả các điều kiện khác tương đương, có thể thu được hiệu suất tối ưu, thường nằm trong khoảng từ 60% đến 100% với thời gian phản ứng nằm trong khoảng từ 1 giờ đến 4 giờ.

Đối với vai trò của anhydrit axetic, dựa vào các kết quả thu được trong bảng này, dường như là phần trăm mol của anhydrit so với VFA phải là khoảng 12% để phản ứng brom hóa được tối ưu, cần hiểu rằng phần trăm nằm trong khoảng từ 5% đến 20% là có thể chấp nhận được.

Sử dụng các axit α -bromo thu được, hoặc chính xác hơn là sử dụng axit α -bromo xác định, khi đó quá trình tổng hợp axit được α -hydroxyl hóa xác định, còn được gọi là axit α -hydroxy được tiến hành, ở bước d). Để thực hiện quá trình này, bazơ được bổ sung. Thuận lợi là, nhưng không phải là độc nhất, bazơ này là natri hydroxit.

Các thử nghiệm được tiến hành bởi người nộp đơn bằng cách thay thế natri hydroxit (NaOH) trên các axit α -bromo, cụ thể là trên axit bromoaxetic, axit α -bromopropionic, axit α -bromobutyric, trên axit α -bromocaproic và trên hỗn hợp của các axit α -bromo có từ hai đến sáu nguyên tử cacbon. Sự thay thế này cho phép tổng hợp các axit α -hydroxy có chuỗi cacbon gồm hai, ba, bốn, năm hoặc sáu nguyên tử cacbon tương ứng, tức là axit glycolic, axit lactic, axit α -hydroxybutyric, axit α -hydroxyvaleric hoặc

axit α -hydroxycaproic.

Trong số nhiều axit, các axit α -hydroxy này được sử dụng nhiều nhất, để sau khi polyme hóa, tạo ra mỹ phẩm hoặc bao bì thực phẩm. Dễ dàng được hiểu rằng quy trình này là đối tượng của sáng chế cho phép tổng hợp các loại khác của axit để polyme hóa các loại khác của PHA. Bằng cách ví dụ, loại khác của axit có thể được đề cập là axit α -hydroxydecanoic.

Đối với nhiều thử nghiệm khác nhau, quy trình thực hiện bao gồm hồi lưu hỗn hợp đẳng mol của natri hydroxit và axit α -bromo trong khoảng thời gian từ 1 đến 2 giờ. Nhiệt độ gia nhiệt nằm trong khoảng từ 80°C đến 120°C. Các mẫu được lấy ra ở các khoảng thời gian cách đều nhau đã cho thấy rằng hiệu suất phản ứng nằm trong khoảng từ 60% đến 100% và thuận lợi là nằm trong khoảng từ 80% đến 100% đối với các axit có ít nhất ba nguyên tử cacbon.

Cũng nhận thấy rằng hiệu suất tối ưu đạt được khi tăng dần nhiệt độ đối với các hợp chất có nhiều hơn bốn nguyên tử cacbon. Theo đó người nộp đã nhận thấy rằng hiệu suất là tối ưu khi nhiệt độ duy trì dưới nhiệt độ bằng và trên nhiệt độ mà tại đó sự thoái biến axit α -hydroxy bắt đầu, nhiệt độ này trên thực tế là nhỏ hơn điểm sôi của axit α -bromo.

Cụ thể là, người nộp đơn đã ngạc nhiên nhận ra rằng nhiệt độ mà tại đó hiệu suất tối ưu đạt được là nằm trong khoảng từ 20°C đến 120°C, thuận lợi là nằm trong khoảng từ 50°C đến 90°C.

Đặc biệt người nộp đơn đã bất ngờ nhận thấy rằng nhiệt độ mà tại đó hiệu suất tối ưu đạt được là khoảng 50°C đối với axit α -bromo có ít nhất bốn nguyên tử cacbon và khoảng 90°C đối với axit α -bromo có ít hơn bốn nguyên tử cacbon, cần hiểu rằng đối với các axit α -hydroxy C2 và C3, nhiệt độ trên 100°C gây thoái biến hợp chất.

Đặc biệt là, khi hiệu suất tối ưu đạt được, việc kéo dài thời gian phản ứng chỉ làm tăng thêm rất ít hiệu suất phản ứng, ví dụ hiệu suất phản ứng tăng thêm 4% đối với thời gian phản ứng là hai giờ thay vì là một giờ đối với axit α -bromo có bốn nguyên tử cacbon.

Bảng 2 dưới đây thể hiện tóm tắt một vài thử nghiệm được tiến hành.

Bảng 2

Axit halo	Mol axit	Mol NaOH	Nhiệt độ gia nhiệt (°C)	Thời gian hồi lưu (giờ)	Hiệu suất (%)
BrC2	0,05	0,05	110-120	2	80
BrC2	0,05	0,05	110-120	2	85
BrC3	0,05	0,05	110-120	2	80
BrC4	0,05	0,05	110-120	2	100
BrC4	0,05	0,05	110-120	1	96
BrC6 + BrC2	0,041+0,0019	0,043	100	1	95
BrC3 + BrC2	0,05+0,014	0,064	100	2	62
Hỗn hợp BrC2-BrC6	0,042	0,042	80	2	83

Phân tích và tính toán hiệu suất được tiến hành nhờ các kỹ thuật phân tích NMR và HPLC, đã được đề cập. Hiệu suất được xác định so với lượng axit halo ban đầu.

Bước cuối của quy trình bao gồm polyme hóa polyhydroxyalkanoat hay PHA tương ứng bắt đầu bằng axit α -hydroxy thu được. Bằng cách ví dụ, có thể đề cập đến axit polylactic hay PLA, mà được sử dụng trong bao bì thực phẩm, và axit polyglycolic hay PGA được sử dụng trong lĩnh vực y học làm nguyên liệu cho chỉ khâu. PLA được tổng hợp từ axit lactic thu được từ axit α -bromopropionic. PGA được tổng hợp từ axit glycolic thu được từ axit bromoacetic.

Quy trình polyme hóa này, là đã biết, thuận lợi là được tiến hành theo ba con đường: bằng cách mở vòng (polyme hóa mở vòng), bằng cách polyme hóa ở pha rắn (polyme hóa ở trạng thái rắn) hoặc bằng cách đa trùng ngưng trực tiếp. Sau quá trình polyme hóa này là thu hồi PHA, là quy trình đã biết.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất polyhydroxyalkanoat (PHA) từ các phân tử axit béo dễ bay hơi (volatile fatty acid-VFA), được gọi là các tiền chất, được sản xuất bằng cách lên men kỵ khí từ sinh khối có thể lên men được, khác biệt ở chỗ, quy trình này ít nhất bao gồm các bước sau:

a) chiết các phân tử axit béo dễ bay hơi (VFA), mà không cần dừng quá trình lên men, nhờ tác nhân chiết được chọn từ các tác nhân mà ít nhất không hòa tan trong môi trường lên men,

b) thu gom các phân tử axit béo dễ bay hơi (VFA) khi chúng được chiết ở bên ngoài thùng lên men,

c) tổng hợp axit α -halo xác định, bằng cách halogen hóa, sử dụng loại axit béo dễ bay hơi (VFA) được chọn từ các axit béo dễ bay hơi thu được ở bước b) và được xác định theo loại PHA mong muốn,

d) tổng hợp axit α -hydroxy xác định từ các phân tử axit α -halo này bằng cách phản ứng với bazơ,

e) polyme hóa tạo ra polyhydroxyalkanoat (PHA) xác định từ axit α -hydroxy thu được.

2. Quy trình theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, trong bước c), hợp chất halo được sử dụng là dibrom.

3. Quy trình theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, trong bước c), hợp chất halo được sử dụng không phải là dibrom.

4. Quy trình theo điểm 1 hoặc 2, khác biệt ở chỗ, trong bước c), anhydrit axetic được sử dụng với lượng phần trăm mol so với axit béo dễ bay hơi là khoảng 12%.

5. Quy trình theo điểm 1 hoặc 2, khác biệt ở chỗ, trong bước c), anhydrit tương ứng với axit béo dễ bay hơi (VFA) được halogen hóa được sử dụng.

6. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, khác biệt ở chỗ, trong bước c),

nhệt độ mà tại đó phản ứng brom hóa được tiến hành là nằm trong khoảng từ 20°C đến 40°C thấp hơn điểm sôi của axit béo dễ bay hơi.

7. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, khác biệt ở chỗ, trong bước d), bazơ được sử dụng là natri hydroxit.

8. Quy trình theo điểm 7, khác biệt ở chỗ, trong bước d), natri hydroxit được sử dụng với lượng bằng mol với axit α -halo.

9. Quy trình theo điểm 7 hoặc 8, khác biệt ở chỗ, trong bước d), phản ứng giữa axit α -halo với natri hydroxit được tiến hành ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 120°C, thuận lợi là nằm trong khoảng từ 50°C đến 90°C.

10. Quy trình theo điểm 9, khác biệt ở chỗ, trong bước d), phản ứng giữa axit α -halo với natri hydroxit là tối ưu với nhiệt độ khoảng 50°C nếu axit α -halo có ít nhất bốn nguyên tử cacbon và với nhiệt độ khoảng 90°C nếu axit α -halo có ít hơn bốn nguyên tử cacbon.