



(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)



1-0031906

(51)⁷ C12P 7/46; C12R 1/845

(13) B

(21) 1-2018-03214

(22) 22/12/2016

(86) PCT/JP2016/088288 22/12/2016

(87) WO/2017/110970 29/06/2017

(30) 2015-251574 24/12/2015 JP

(45) 25/05/2022 410

(43) 26/11/2018 368A

(73) KAO CORPORATION (JP)

14-10, Nihonbashi-Kayabacho 1-chome, Chuo-ku, Tokyo 1038210 (JP)

(72) IRIE, Yutaka (JP); KOYAMA, Shingo (JP).

(74) Công ty Cổ phần Hỗ trợ phát triển công nghệ Detech (DETECH)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT AXIT FUMARIC

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp mới để sản xuất axit hữu cơ một cách hiệu quả. Phương pháp sản xuất axit hữu cơ từ nguồn cacbon trong môi trường sử dụng nấm sợi, phương pháp này bao gồm việc nuôi cấy nấm sợi trong môi trường nuôi cấy dịch thể, trong đó nguồn cacbon được bao gồm và nồng độ oxy hòa tan được điều chỉnh ở 8 ppm hoặc lớn hơn và 35 ppm hoặc nhỏ hơn, để thu được axit hữu cơ.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất axit hữu cơ, và cụ thể là đề cập đến phương pháp sản xuất axit fumaric.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Axit fumaric được sử dụng để làm, ví dụ, nguyên liệu thô của chất dẻo như nhựa alkit, phụ gia thực phẩm, hóa chất nhuộm và các nguyên liệu trung gian để chuyển hóa thành các hóa chất thương mại như axit aspartic. Axit fumaric được sản xuất công nghiệp dưới dạng các chất hóa dầu được làm từ benzen hoặc butan. Gần đây, việc sản xuất axit fumaric sử dụng các tài nguyên tái tạo được được yêu cầu từ quan điểm làm cạn kiệt các tài nguyên hóa thạch và vấn đề về môi trường như sự nóng lên toàn cầu.

Ví dụ, phương pháp sản xuất axit fumaric từ các sacarit bằng cách nuôi cấy một loại nấm sợi như chủng *Rhizopus delemar* (nấm chủng *Rhizopus delemar*) đã được biết đến như một phương pháp sản xuất axit fumaric bằng cách sử dụng các nguồn tài nguyên tái tạo.

Khi nuôi cấy nấm sợi, người ta cho rằng axit fumaric chủ yếu được sản xuất theo chu trình TCA khởi đầu từ axit pyruvic được sản xuất từ nguồn cacbon. Mặt khác, có một quá trình sản xuất ethanol cũng từ axit pyruvic, và do đó việc sản xuất axit fumaric bằng cách sử dụng nấm sợi có một vấn đề là ethanol

được sản xuất như một sản phẩm phụ. Do đó, để cải thiện việc sản xuất axit fumaric, điều quan trọng là giảm việc sản xuất etanol như một sản phẩm phụ và tăng tỷ lệ chuyển hóa thành axit fumaric.

Ví dụ về các kỹ thuật thông thường để cải thiện năng suất sản xuất axit fumaric bao gồm phương pháp duy trì nồng độ oxy hòa tan trong môi trường nuôi cấy ở khoảng 80 đến 100% bão hòa trong giai đoạn tăng sinh tế bào, và khoảng 30 đến 80% bão hòa trong giai đoạn sản xuất axit trong bước lên men để sản xuất axit fumaric bằng cách phát triển nấm thuộc chi *Rhizopus* trong môi trường nuôi cấy bao gồm nguồn cacbon (Tài liệu sáng chế 1).

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: JP H3-505396 A

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất axit hữu cơ từ nguồn cacbon trong môi trường sử dụng nấm sợi, bao gồm việc nuôi cấy nấm sợi trong môi trường nuôi cấy dịch thể, trong đó có chứa nguồn cacbon và nồng độ oxy hòa tan được điều chỉnh ở 8 ppm hoặc lớn hơn và 35 ppm hoặc nhỏ hơn, để thu được axit hữu cơ.

Mô tả chi tiết sáng chế

Tuy nhiên, các tác giả sáng chế này đã phát hiện ra rằng khi bước nuôi cấy nấm sợi được thực hiện với nồng độ oxy hòa tan trong môi trường được điều chỉnh trong khoảng từ khoảng 30 đến 80% như được mô tả trong Tài liệu sáng

chế 1 nêu trên, nghĩa là, từ khoảng 2,1 đến 5,7 ppm, một lượng lớn etanol đã được sản xuất, và do đó không đạt được năng suất sản xuất axit fumaric thích hợp trong một số trường hợp.

Do đó, sáng chế đề xuất việc cung cấp phương pháp mới có thể sản xuất một cách hiệu quả axit hữu cơ, cụ thể là axit fumaric.

Sau khi theo đuổi các nghiên cứu để cải thiện năng suất của axit hữu cơ bằng cách sử dụng nấm sợi, các tác giả sáng chế này đã nhận thấy rằng việc sản xuất etanol từ nguồn cacbon có thể được giảm bớt và tỷ lệ chuyển hóa thành axit hữu cơ có thể được tăng lên bằng cách tăng nồng độ oxy hòa tan trong môi trường nuôi cấy dịch thể có chứa nguồn cacbon trong khi nuôi cấy nấm sợi, và điều chỉnh nồng độ trong phạm vi được xác định trước.

Theo sáng chế, tỷ lệ chuyển hóa từ nguồn cacbon thành axit hữu cơ có thể được tăng lên và axit hữu cơ có thể được sản xuất với năng suất cao bằng cách sử dụng nấm sợi.

Phương pháp sản xuất axit hữu cơ theo sáng chế bao gồm việc nuôi cấy nấm sợi trong môi trường nuôi cấy dịch thể, trong đó có chứa nguồn cacbon và nồng độ oxy hòa tan được điều chỉnh ở 8 ppm hoặc lớn hơn và 35 ppm hoặc nhỏ hơn, để thu được axit hữu cơ.

Theo sáng chế, axit hữu cơ đề cập đến axit hữu cơ được sản xuất từ nguồn cacbon trong quá trình nuôi cấy nấm sợi. Các ví dụ về axit hữu cơ bao gồm axit fumaric, axit lactic, axit itaconic, axit malic, và axit pyruvic. Cụ thể là, axit hữu

cơ tốt hơn là ít nhất được chọn từ nhóm bao gồm axit fumaric, axit pyruvic, axit lactic, và axit malic, tốt hơn hơn nữa là ít nhất được chọn từ nhóm bao gồm axit fumaric và axit pyruvic, thậm chí tốt hơn hơn là axit fumaric.

Nấm sợi

Các ví dụ về nấm sợi được sử dụng theo sáng chế bao gồm vi sinh vật thuộc chi *Rhizopus*, nấm *Aspergillus*, và nấm *Mucor*. Các ví dụ cụ thể về nấm sợi bao gồm chủng *Rhizopus delemar*, chủng *Rhizopus oryzae*, nấm *Aspergillus oryzae*, nấm *Aspergillus niger*, nấm *Aspergillus terreus*, và nấm *Mucor mandshuricus*.

Cụ thể, từ quan điểm về khả năng sản xuất axit hữu cơ cao, nấm *Rhizopus* sp. được ưu tiên, và chủng *Rhizopus delemar* (*Rhizopus Delemar*) và chủng *Rhizopus oryzae* được ưu tiên hơn.

Theo sáng chế, nấm sợi có thể được sử dụng ở dạng viên, dạng bông, dạng cụm, hoặc dạng nấm sợi bất động. Nấm sợi có thể được sử dụng riêng rẽ, hoặc nấm có thể được sử dụng dưới dạng hỗn hợp. Như được sử dụng ở đây, nấm sợi "dạng viên" đề cập đến khối sợi nấm có kích thước từ vài trăm micro mét đến vài milli mét được tạo thành độc lập bởi sợi nấm do nuôi cấy lỏng. Hơn nữa, nấm sợi "dạng bông" đề cập đến sợi nấm thưa có kích thước vài chục micro mét. Nấm sợi "dạng cụm" đề cập đến khối sợi nấm được phát triển với kích thước vài chục mili mét trở lên bằng cách kết hợp các sợi nấm. "Nấm sợi bất động" đề cập đến nấm sợi được giữ lại hoặc được nhúng vào chất mang.

Cụ thể là, từ quan điểm về khả năng sản xuất axit hữu cơ cao và từ quan điểm xử lý, viên nấm sợi và nấm sợi bất động được ưu tiên, và viên nấm sợi được ưu tiên hơn.

Có thể sử dụng một trong các loại nấm sợi có bán trên thị trường. Ngoài ra, ví dụ, có thể sử dụng viên nấm sợi hoặc nấm sợi bất động được điều chế theo các bước sau đây.

Bước điều chế viên nấm sợi

Viên nấm sợi có thể được điều chế bằng phương pháp nuôi cấy.

Môi trường được sử dụng để nuôi cấy có thể là môi trường tổng hợp bất kỳ, môi trường tự nhiên, và môi trường bán tổng hợp có chứa môi trường tổng hợp có bổ sung thành phần tự nhiên, với điều kiện môi trường đó là môi trường nuôi cấy dịch thể có thể phát triển nấm sợi. Nói chung, môi trường chứa, ví dụ, nguồn cacbon, nguồn nitơ, và muối vô cơ, như được mô tả dưới đây. Một chế phẩm của các thành phần có thể được chọn như mong muốn.

Trong điều kiện nuôi cấy, nhiệt độ nuôi cấy, từ quan điểm về sự phát triển của viên nấm sợi, tốt hơn là 20°C hoặc lớn hơn, tốt hơn hơn nữa là 25°C hoặc lớn hơn; và còn tốt hơn hơn là 40°C hoặc nhỏ hơn, tốt hơn hơn nữa là 30°C hoặc nhỏ hơn. Hơn nữa, độ pH (ở 25°C) của môi trường, từ quan điểm về sự phát triển của viên nấm sợi, tốt hơn là 2 hoặc lớn hơn, tốt hơn hơn nữa là 3 hoặc lớn hơn; và còn tốt hơn hơn là 7 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn hơn nữa là 6 hoặc nhỏ hơn.

Là một phương pháp nuôi cấy, một phương pháp đã được biết đến rộng rãi

có thể được sử dụng. Ví dụ, phương pháp bao gồm việc cấy bào tử nấm sợi vào môi trường nuôi cấy dịch thể, sau đó cho bào tử này nảy mầm để phát triển thành sợi nấm, cho phép sợi nấm tạo thành các tế bào nấm, và tạo viên các tế bào nấm. Việc nuôi cấy thường được thực hiện trong các điều kiện ưa khí.

Thời gian nuôi cấy, từ quan điểm về sự phát triển của viên nấm sợi, tốt hơn là 1 ngày hoặc nhiều hơn, tốt hơn hơn nữa là 3 ngày hoặc nhiều hơn; và còn tốt hơn hơn là 7 ngày hoặc ít hơn, tốt hơn hơn nữa là 6 ngày hoặc ít hơn sau khi cấy bào tử nấm sợi vào môi trường nuôi cấy dịch thể.

Một bình nuôi cấy được sử dụng để nuôi cấy có thể được chọn phù hợp từ các bình đã biết thông thường. Cụ thể, các ví dụ về bình nuôi cấy bao gồm bình nuôi cấy khuấy sục khí khí, bình nuôi cấy cột bong bóng, và bình nuôi cấy tầng sôi. Các điều kiện sục khí, từ quan điểm về sự phát triển của viên nấm sợi, tốt hơn là 0,1 vvm hoặc lớn hơn, tốt hơn hơn nữa là 0,3 vvm hoặc lớn hơn; và còn tốt hơn hơn là 4 vvm hoặc nhỏ hơn, tốt hơn hơn nữa là 2 vvm hoặc nhỏ hơn.

Sau khi hoàn thành quá trình nuôi cấy, viên nấm sợi có thể được loại bỏ khỏi bình nuôi cấy cùng với môi trường nuôi cấy, được phân lập và được thu hồi bằng một thao tác thuận tiện như lọc hoặc tách ly tâm, và được sử dụng trong bước nuôi cấy để sản xuất axit hữu cơ. Trong khi đó, viên nấm sợi cũng có thể được để trong bình nuôi cấy, và có thể thực hiện bước nuôi cấy trong cùng bình nuôi cấy.

Hơn nữa, bước này cũng có thể được thực hiện bằng cách chia nhỏ thành 2

hoặc nhiều bước.

Bước điều chế nấm sợi bất động

Nấm sợi bất động có thể được điều chế bằng phương pháp nuôi cấy.

Là một phương pháp nuôi cấy, một phương pháp đã được biết đến rộng rãi có thể được sử dụng. Ví dụ, phương pháp bao gồm việc cấy bào tử nấm sợi vào môi trường nuôi cấy dịch thể có chứa chất mang để làm bất động nấm sợi, sau đó làm nảy mầm bào tử để phát triển sợi nấm, để từ đó điều chế nấm sợi bất động từ sợi nấm được giữ trong chất mang. Là chất mang được sử dụng để làm bất động, có thể sử dụng polyme uretan, polyme olefinic, polyme dien, polyme ngưng tụ, polyme silicon, hoặc polyme flo.

Chất mang có thể có hình dạng bất kỳ bao gồm dạng tấm, nhiều lớp, gấp nếp, tứ diện, hình cầu, dạng dải, dạng lưới, hình cột, dạng mạng, và dạng hình trụ.

Sau đó, để làm bất động nấm sợi, có thể sử dụng môi trường và bình nuôi cấy tương tự như môi trường và bình nuôi cấy được sử dụng trong điều chế viên nấm sợi. Hơn nữa, có thể sử dụng các điều kiện nuôi cấy tương tự như các điều kiện nuôi cấy được mô tả để điều chế viên nấm sợi.

Hơn nữa, sau khi hoàn thành quá trình nuôi cấy, nấm sợi bất động có thể được phân lập và được thu hồi theo cách tương tự như được sử dụng để điều chế viên nấm sợi, và có thể được sử dụng trong bước nuôi cấy để sản xuất axit hữu cơ. Trong khi đó, nấm sợi bất động cũng có thể được để lại trong bình nuôi cấy,

và bước nuôi cấy có thể được thực hiện trong cùng bình nuôi cấy.

Hơn nữa, bước này cũng có thể được thực hiện bằng cách chia nhỏ thành 2 hoặc nhiều bước.

Môi trường nuôi cấy dịch thể có chứa nguồn cacbon

Môi trường nuôi cấy dịch thể được sử dụng để sản xuất axit hữu cơ theo sáng chế chứa nguồn cacbon.

Môi trường nuôi cấy dịch thể có thể là môi trường tổng hợp bất kỳ, môi trường tự nhiên, hoặc môi trường bán tổng hợp có chứa môi trường tổng hợp có bổ sung thành phần tự nhiên.

Các ví dụ về nguồn cacbon bao gồm glyxerin, sorbitol, và các sacarit. Nguồn cacbon, từ quan điểm về khả năng sản xuất axit hữu cơ cao, tốt hơn là các sacarit.

Ví dụ về các sacarit bao gồm các monosacarit, chẳng hạn như glucoza, fructoza, và xyloza, và các disacarit, chẳng hạn như sucroza, lactoza, và maltoza. Các sacarit có thể là anhydrit hoặc hydrat. Cụ thể, nguồn cacbon, từ quan điểm về khả năng sản xuất axit hữu cơ cao, tốt hơn là glucoza, fructoza, xyloza, sucroza, lactoza, maltoza, và sorbitol, tốt hơn hơn nữa là glucoza, fructoza, xyloza, sucroza, lactoza, và maltoza, thậm chí tốt hơn hơn là glucoza.

Nồng độ của nguồn cacbon trong môi trường nuôi cấy dịch thể, từ quan điểm về khả năng sản xuất axit hữu cơ cao, tốt hơn là 1% khối lượng hoặc lớn hơn, tốt hơn hơn nữa là 2% khối lượng hoặc lớn hơn, thậm chí tốt hơn hơn là

3% khối lượng hoặc lớn hơn; và còn tốt hơn hơn là 40% khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn hơn nữa là 30% khối lượng hoặc nhỏ hơn, thậm chí tốt hơn hơn là 20% khối lượng hoặc nhỏ hơn, thậm chí tốt hơn hơn là 15% khối lượng hoặc nhỏ hơn.

Môi trường nuôi cấy dịch thể có thể chứa nguồn nitơ, muối vô cơ, và các chất dinh dưỡng cần thiết khác ngoài nguồn cacbon. Khi nguồn cacbon chứa các chất dinh dưỡng nêu trên ở nồng độ thích hợp để nuôi cấy, nguồn cacbon có thể được sử dụng duy nhất.

Các ví dụ về nguồn nitơ bao gồm các hợp chất chứa nitơ, như amoni sulfat, ure, amoni nitrat, kali nitrat, và natri nitrat.

Nồng độ nitơ trong môi trường nuôi cấy dịch thể, từ quan điểm về khả năng sản xuất axit hữu cơ cao, tốt hơn là 0,001% khối lượng hoặc lớn hơn, tốt hơn hơn nữa là 0,002% khối lượng hoặc lớn hơn, thậm chí tốt hơn hơn là 0,004% khối lượng hoặc lớn hơn; và còn tốt hơn hơn là 0,1% khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn hơn nữa là 0,08% khối lượng hoặc nhỏ hơn, thậm chí tốt hơn hơn là 0,06% khối lượng hoặc nhỏ hơn.

Các ví dụ về muối vô cơ bao gồm sulfat, muối magie, và muối kẽm. Các ví dụ về sulfat bao gồm magie sulfat, kẽm sulfat, kali sulfat, và natri sulfat. Các ví dụ về muối magie bao gồm magie sulfat, magie nitrat, và magie clorua. Các ví dụ về muối kẽm bao gồm kẽm sulfat, kẽm nitrat, và kẽm clorua.

Nồng độ của ion sulfat trong môi trường nuôi cấy dịch thể, từ quan điểm về

khả năng sản xuất axit hữu cơ cao, tốt hơn là 0,001% khối lượng hoặc lớn hơn, tốt hơn hơn nữa là 0,005% khối lượng hoặc lớn hơn, thậm chí tốt hơn hơn là 0,01% khối lượng hoặc lớn hơn; và còn tốt hơn hơn là 0,1% khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn hơn nữa là 0,08% khối lượng hoặc nhỏ hơn, thậm chí tốt hơn hơn là 0,04% khối lượng hoặc nhỏ hơn.

Nồng độ của ion magie trong môi trường nuôi cấy dịch thể, từ quan điểm về khả năng sản xuất axit hữu cơ cao, tốt hơn là 0,001% khối lượng hoặc lớn hơn, tốt hơn hơn nữa là 0,002% khối lượng hoặc lớn hơn; và còn tốt hơn hơn là 0,5% khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn hơn nữa là 0,2% khối lượng hoặc nhỏ hơn, thậm chí tốt hơn hơn là 0,1% khối lượng hoặc nhỏ hơn.

Nồng độ của ion kẽm trong môi trường nuôi cấy dịch thể, từ quan điểm về khả năng sản xuất axit hữu cơ cao, tốt hơn là 0,00001% khối lượng hoặc lớn hơn, tốt hơn hơn nữa là 0,00005% khối lượng hoặc lớn hơn; và còn tốt hơn hơn là 0,1% khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn hơn nữa là 0,01% khối lượng hoặc nhỏ hơn, thậm chí tốt hơn hơn là 0,005% khối lượng hoặc nhỏ hơn.

Độ pH (ở 35°C) của môi trường nuôi cấy dịch thể, từ quan điểm về sự phát triển của các tế bào nấm và khả năng sản xuất axit hữu cơ cao, tốt hơn là 2 hoặc lớn hơn, tốt hơn hơn nữa là 3 hoặc lớn hơn; và còn tốt hơn hơn là 7 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn hơn nữa là 6 hoặc nhỏ hơn.

Độ pH (ở 35°C) của môi trường nuôi cấy dịch thể tốt hơn là 2 đến 7, tốt hơn hơn nữa là 3 đến 6. Độ pH của môi trường có thể được điều chỉnh bằng

cách sử dụng các bazơ, như canxi hydroxit, natri hydroxit, canxi cacbonat, và amoniac, hoặc các axit, như axit sulfuric, và axit clohydric.

Phương pháp nuôi cấy

Axit hữu cơ có thể được sản xuất bằng cách nuôi cấy nấm sợi trong môi trường nuôi cấy dịch thể đã được đề cập trên đây. Nấm sợi có thể được nuôi cấy theo các điều kiện nuôi cấy thường được sử dụng. Ví dụ, nhiệt độ nuôi cấy, từ quan điểm về sự phát triển của các tế bào nấm và khả năng sản xuất axit hữu cơ cao, cụ thể là axit fumaric, tốt hơn là 20°C hoặc lớn hơn, tốt hơn hơn nữa là 30°C hoặc lớn hơn; và còn tốt hơn hơn là 40°C hoặc nhỏ hơn, tốt hơn hơn nữa là 37°C hoặc nhỏ hơn.

Một bình nuôi cấy được sử dụng để nuôi cấy có thể là bình đã biết thông thường. Tuy nhiên, từ quan điểm về khả năng sản xuất axit hữu cơ cao, cụ thể là axit fumaric, bình này tốt hơn là bình nuôi cấy khuấy sục khí khí, bình nuôi cấy cột bong bóng, và bình nuôi cấy tầng sôi. Sự nuôi cấy có thể là nuôi cấy theo đợt, nuôi cấy bán đợt, và nuôi cấy liên tục.

Thời gian nuôi cấy có thể được điều chỉnh tùy ý.

Theo sáng chế, việc sản xuất axit hữu cơ, cụ thể là axit fumaric, được thực hiện trong môi trường nuôi cấy dịch thể, trong đó nồng độ oxy hòa tan được điều chỉnh ở 8 ppm hoặc lớn hơn và 35 ppm hoặc nhỏ hơn.

Nồng độ oxy hòa tan trong môi trường nuôi cấy dịch thể trong bước nuôi cấy, từ quan điểm giảm sản phẩm phụ của etanol và cải thiện năng suất của axit

hữu cơ, cụ thể là axit fumaric, tốt hơn là 8,5 ppm hoặc lớn hơn, tốt hơn hơn nữa là 9 ppm hoặc lớn hơn, thậm chí tốt hơn hơn là 12 ppm hoặc lớn hơn, thậm chí tốt hơn hơn là 15 ppm hoặc lớn hơn, thậm chí tốt hơn hơn là 28 ppm hoặc lớn hơn; và tốt hơn là 34 ppm hoặc nhỏ hơn, thậm chí tốt hơn hơn là 33 ppm hoặc nhỏ hơn.

Nồng độ oxy hòa tan trong môi trường nuôi cấy dịch thể tốt hơn là từ 8,5 đến 34 ppm, tốt hơn hơn là từ 9 đến 33 ppm, tốt hơn hơn nữa là từ 12 đến 33 ppm, tốt hơn hơn nữa là từ 15 đến 33 ppm, tốt hơn hơn nữa là từ 28 đến 33 ppm.

Sau đó, việc điều chỉnh nồng độ oxy hòa tan trong môi trường nuôi cấy dịch thể tốt hơn là được thực hiện cùng với việc theo dõi nồng độ oxy hòa tan theo thời gian. Nồng độ oxy hòa tan có thể được đo bằng phương pháp được mô tả trong các ví dụ sau đây.

Nồng độ oxy hòa tan trong môi trường nuôi cấy dịch thể có thể được điều chỉnh, ví dụ, bởi nồng độ oxy sục khí, tốc độ sục khí (lượng luồng khí), tốc độ khuấy, và áp suất.

Theo sáng chế, nồng độ oxy sục khí đề cập đến nồng độ oxy trong khí được cung cấp cho môi trường. Nồng độ oxy sục khí, từ quan điểm điều chỉnh nồng độ oxy hòa tan ở 8 ppm hoặc lớn hơn và 35 ppm hoặc nhỏ hơn, 21% (tỷ lệ thể tích, áp dụng tương tự dưới đây) hoặc lớn hơn, tốt hơn là 35% hoặc lớn hơn, tốt hơn hơn nữa là 40% hoặc lớn hơn. Giới hạn trên tốt hơn là 100%. Nồng độ oxy sục khí có thể thay đổi theo hoạt động nuôi cấy. Các ví dụ về phương pháp thu

được khí với nồng độ oxy của 21% hoặc lớn hơn bao gồm phương pháp tách đông lạnh, phương pháp PSA (phương pháp hấp thụ), và phương pháp tách màng.

Tốc độ sục khí (lượng luồng khí) tốt hơn là 0,1 vvm hoặc lớn hơn, tốt hơn hơn nữa là 0,2 vvm hoặc lớn hơn; và còn tốt hơn hơn là 2 vvm hoặc nhỏ hơn, tốt hơn hơn nữa là 1 vvm hoặc nhỏ hơn.

Tốc độ khuấy tốt hơn là được chọn để khí được cung cấp cho môi trường có thể được phân tán, và có thể được điều chỉnh theo quy mô. Tốt hơn là áp suất từ áp suất bình thường đến điều kiện áp suất nhẹ. Khi có áp suất, áp suất tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0 đến 0,1 MPa.

Khi axit hữu cơ, cụ thể là axit fumaric được sản xuất, độ pH của môi trường nuôi cấy sẽ giảm do axit hữu cơ được sản xuất. Do đó, việc nuôi cấy thường được tiếp tục cùng với quá trình trung hòa sử dụng chất trung hòa.

Các ví dụ về chất trung hòa được sử dụng để điều chỉnh pH bao gồm hydroxit của kim loại kiềm hoặc kim loại kiềm thổ, cacbonat của kim loại kiềm hoặc kim loại kiềm thổ, hợp chất amoni, hoặc sự kết hợp của chúng. Cụ thể, từ quan điểm axit hữu cơ cao, cụ thể là khả năng sản xuất axit fumaric, chất trung hòa là natri hydroxit, kali hydroxit, canxi hydroxit, magie hydroxit, natri cacbonat, kali cacbonat, canxi cacbonat, magie cacbonat, dung dịch nước amoniac, amoni cacbonat, và amoni bicarbonat; tốt hơn là natri hydroxit, natri cacbonat, và kali cacbonat; thậm chí tốt hơn hơn là natri hydroxit. Chất trung

hòa có thể được sử dụng riêng rẽ, hoặc hai hoặc nhiều chất trung hòa có thể được sử dụng kết hợp.

Axit hữu cơ được sản xuất có thể tạo thành muối với chất trung hòa để tồn tại ở dạng muối của axit hữu cơ.

Kết quả của quá trình nuôi cấy, axit hữu cơ được tích lũy trong môi trường.

Đối với môi trường nuôi cấy có chứa axit hữu cơ, sau khi hoàn thành quá trình nuôi cấy, tốt hơn là chất không hòa tan, chẳng hạn như vi sinh vật, được loại bỏ khỏi môi trường nuôi cấy bằng các phương pháp phân tách thích hợp, ví dụ, tách ly tâm hoặc xử lý màng như vi lọc. Việc loại bỏ chất không hòa tan có thể được thực hiện hoặc trong bình nuôi cấy, hoặc bên ngoài bình sau khi chuyển tạm thời khỏi bình. Mặt khác, nấm sợi được phân lập từ môi trường nuôi cấy có thể được tái sử dụng để sản xuất axit hữu cơ.

Theo sáng chế, sản phẩm phụ của etanol từ nguồn cacbon có thể được giảm bớt, và tỷ lệ chuyển hóa thành axit hữu cơ có thể tăng lên. Cụ thể, axit hữu cơ có thể được sản xuất từ glucoza với tỷ lệ chuyển hóa là 40% hoặc lớn hơn, tốt hơn hơn nữa là 50% hoặc lớn hơn.

Sau đó, tỷ lệ chuyển hóa thành axit hữu cơ (%) dùng để chỉ giá trị thu được bằng cách chia nồng độ của axit hữu cơ khi hoàn thành quá trình nuôi cấy cho nồng độ của glucoza đã tiêu thụ khi sản xuất axit hữu cơ bằng sự nuôi cấy. Phương pháp tính tỷ lệ chuyển hóa thành axit hữu cơ được mô tả chi tiết trong các ví dụ.

Môi trường nuôi cấy có chứa axit hữu cơ được cô đặc khi cần. Sau đó, axit hữu cơ có thể được phân lập và thu hồi từ môi trường nuôi cấy, ví dụ, bằng phương pháp kết tinh, phương pháp trao đổi ion, chiết xuất bằng dung môi, hoặc phương pháp bao gồm kết tủa axit hữu cơ dưới dạng muối của kim loại kiềm thổ, và sau đó phân hủy chất kết tủa bằng cách phân ly axit.

Đối với các phương án được mô tả trên đây, sáng chế cũng bộc lộ các phương pháp sản xuất sau đây.

<1> Phương pháp sản xuất axit hữu cơ từ nguồn cacbon trong môi trường sử dụng nấm sợi, bao gồm việc nuôi cấy nấm sợi trong môi trường nuôi cấy dịch thể, trong đó nguồn cacbon được bao gồm và nồng độ oxy hòa tan được điều chỉnh ở 8 ppm hoặc lớn hơn và 35 ppm hoặc nhỏ hơn, để thu được axit hữu cơ.

<2> Phương pháp sản xuất axit hữu cơ theo mục <1>, trong đó nấm sợi tốt hơn là nấm thuộc chi *Rhizopus*, nấm *Aspergillus*, hoặc nấm *Mucor*, tốt hơn hơn nữa là chủng *Rhizopus delemar*, chủng *Rhizopus oryzae*, nấm *Aspergillus oryzae*, nấm *Aspergillus niger*, nấm *Aspergillus terreus*, hoặc nấm *Mucor mandshuricus*.

<3> Phương pháp sản xuất axit hữu cơ theo mục <1>, trong đó nấm sợi tốt hơn là nấm *Rhizopus* sp., tốt hơn hơn nữa là chủng *Rhizopus delemar* (*Rhizopus Delemar*), hoặc chủng *Rhizopus oryzae*.

<4> Phương pháp sản xuất axit hữu cơ theo mục bất kỳ trong số các mục từ <1> đến <3>, trong đó nấm sợi tốt hơn là ở dạng được chọn từ nhóm bao gồm dạng viên, dạng bông, dạng cụm, và nấm sợi bất động, tốt hơn hơn nữa là viên

nấm sợi, và nấm sợi bất động, thậm chí tốt hơn hơn là viên nấm sợi.

<5> Phương pháp sản xuất axit hữu cơ theo mục bất kỳ trong số các mục từ <1> đến <4>, trong đó nguồn cacbon tốt hơn là ít nhất một nguồn được chọn từ nhóm bao gồm glyxerin, sorbitol, và các sacarit, tốt hơn hơn nữa là các sacarit, thậm chí tốt hơn hơn là ít nhất một nguồn được chọn từ nhóm bao gồm glucoza, fructoza, xyloza, sucroza, lactoza, maltoza, và sorbitol, thậm chí tốt hơn hơn là ít nhất một nguồn được chọn từ nhóm bao gồm glucoza, fructoza, xyloza, sucroza, lactoza, và maltoza, thậm chí tốt hơn hơn là glucoza.

<6> Phương pháp sản xuất axit hữu cơ theo mục bất kỳ trong số các mục từ <1> đến <5>, trong đó nồng độ của nguồn cacbon trong môi trường nuôi cấy dịch thể tốt hơn là 1% khối lượng hoặc lớn hơn, tốt hơn hơn nữa là 2% khối lượng hoặc lớn hơn, thậm chí tốt hơn hơn là 3% khối lượng hoặc lớn hơn; còn tốt hơn hơn là 40% khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn hơn nữa là 30% khối lượng hoặc nhỏ hơn, thậm chí tốt hơn hơn là 20% khối lượng hoặc nhỏ hơn, thậm chí tốt hơn hơn là 15% khối lượng hoặc nhỏ hơn; và còn tốt hơn hơn là từ 1 đến 40% khối lượng, tốt hơn hơn là từ 2 đến 30% khối lượng, tốt hơn hơn nữa là từ 3 đến 20% khối lượng, còn tốt hơn hơn là từ 3 đến 20% khối lượng.

<7> Phương pháp sản xuất axit hữu cơ theo mục bất kỳ trong số các mục từ <1> đến <6>, trong đó môi trường nuôi cấy dịch thể tốt hơn là còn bao gồm nguồn nitơ và muối vô cơ.

<8> Phương pháp sản xuất axit hữu cơ theo mục bất kỳ trong số các mục từ

<1> đến <7>, trong đó nguồn nitơ tốt hơn là amoni sulfat, ure, amoni nitrat, kali nitrat, hoặc natri nitrat, và muối vô cơ tốt hơn là sulfat, muối magie, hoặc muối kẽm, tốt hơn hơn nữa là magie sulfat, kẽm sulfat, kali sulfat, natri sulfat, magie sulfat, magie nitrat, magie clorua, kẽm sulfat, kẽm nitrat, hoặc kẽm clorua.

<9> Phương pháp sản xuất axit hữu cơ theo mục <7> hoặc <8>, trong đó nồng độ nitơ trong môi trường nuôi cấy dịch thể tốt hơn là 0,001% khối lượng hoặc lớn hơn, tốt hơn hơn nữa là 0,002% khối lượng hoặc lớn hơn, thậm chí tốt hơn hơn nữa là 0,004% khối lượng hoặc lớn hơn; còn tốt hơn hơn là 0,1% khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn hơn nữa là 0,08% khối lượng hoặc nhỏ hơn, thậm chí tốt hơn hơn là 0,06% khối lượng hoặc nhỏ hơn; và còn tốt hơn hơn là từ 0,001 đến 0,1% khối lượng, tốt hơn hơn là từ 0,002 đến 0,08% khối lượng, còn tốt hơn hơn là từ 0,004 đến 0,06% khối lượng.

<10> Phương pháp sản xuất axit hữu cơ theo mục <7> hoặc <8>, trong đó nồng độ của ion sulfat trong môi trường nuôi cấy dịch thể tốt hơn là 0,001% khối lượng hoặc lớn hơn, tốt hơn hơn nữa là 0,005% khối lượng hoặc lớn hơn, thậm chí tốt hơn hơn là 0,01% khối lượng hoặc lớn hơn; còn tốt hơn hơn là 0,1% khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn hơn nữa là 0,08% khối lượng hoặc nhỏ hơn, thậm chí tốt hơn hơn là 0,04% khối lượng hoặc nhỏ hơn; và còn tốt hơn hơn là từ 0,001 đến 0,1% khối lượng, tốt hơn hơn là từ 0,005 đến 0,08% khối lượng, thậm chí tốt hơn hơn là từ 0,01 đến 0,04% khối lượng.

<11> Phương pháp sản xuất axit hữu cơ theo mục <7> hoặc <8>, trong đó

nồng độ của ion magie trong môi trường nuôi cấy dịch thể tốt hơn là 0,001% khối lượng hoặc lớn hơn, tốt hơn hơn nữa là 0,002% khối lượng hoặc lớn hơn; còn tốt hơn hơn là 0,5% khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn hơn nữa là 0,2% khối lượng hoặc nhỏ hơn, thậm chí tốt hơn hơn là 0,1% khối lượng hoặc nhỏ hơn; và còn tốt hơn hơn là từ 0,001 đến 0,5% khối lượng, tốt hơn hơn là từ 0,002 đến 0,2% khối lượng, thậm chí tốt hơn hơn là từ 0,002 đến 0,1% khối lượng.

<12> Phương pháp sản xuất axit hữu cơ theo mục <7> hoặc <8>, trong đó nồng độ của ion kẽm trong môi trường nuôi cấy dịch thể tốt hơn là 0,00001% khối lượng hoặc lớn hơn, tốt hơn hơn nữa là 0,00005% khối lượng hoặc lớn hơn; còn tốt hơn hơn là 0,1% khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn hơn nữa là 0,01% khối lượng hoặc nhỏ hơn, thậm chí tốt hơn hơn là 0,005% khối lượng hoặc nhỏ hơn; và còn tốt hơn hơn là từ 0,00001 đến 0,1% khối lượng, tốt hơn hơn là từ 0,00005 đến 0,01% khối lượng, tốt hơn hơn nữa là từ 0,00005 đến 0,005% khối lượng.

<13> Phương pháp sản xuất axit hữu cơ theo mục bất kỳ trong số các mục từ <1> đến <12>, trong đó pH (ở 35°C) của môi trường nuôi cấy dịch thể tốt hơn là 2 hoặc lớn hơn, tốt hơn hơn nữa là 3 hoặc lớn hơn; còn tốt hơn hơn là 7 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn hơn nữa là 6 hoặc nhỏ hơn; và còn tốt hơn hơn là từ 2 đến 7, tốt hơn hơn là từ 3 đến 6.

<14> Phương pháp sản xuất axit hữu cơ theo mục bất kỳ trong số các mục từ <1> đến <13>, trong đó nhiệt độ nuôi cấy tốt hơn là 20°C hoặc lớn hơn, tốt

hơn hơn nữa là 30°C hoặc lớn hơn; còn tốt hơn hơn là 40°C hoặc nhỏ hơn, tốt hơn hơn nữa là 37°C hoặc nhỏ hơn; và còn tốt hơn hơn là từ 20 đến 40°C, tốt hơn hơn là từ 30 đến 37°C.

<15> Phương pháp sản xuất axit hữu cơ theo mục bất kỳ trong số các mục từ <1> đến <14>, trong đó nồng độ oxy hòa tan trong môi trường nuôi cấy dịch thể tốt hơn là 8,5 ppm hoặc lớn hơn, tốt hơn hơn nữa là 9 ppm hoặc lớn hơn, thậm chí tốt hơn hơn là 12 ppm hoặc lớn hơn, thậm chí tốt hơn hơn là 15 ppm hoặc lớn hơn, thậm chí tốt hơn hơn là 28 ppm hoặc lớn hơn; còn tốt hơn hơn là 34 ppm hoặc nhỏ hơn, còn tốt hơn hơn nữa là 33 ppm hoặc nhỏ hơn; và còn tốt hơn hơn là từ 8,5 đến 34 ppm, tốt hơn hơn là từ 9 đến 33 ppm, tốt hơn hơn nữa là từ 12 đến 33 ppm, tốt hơn hơn nữa là từ 15 đến 33 ppm, tốt hơn hơn nữa là từ 28 đến 33 ppm.

<16> Phương pháp sản xuất axit hữu cơ theo mục bất kỳ trong số các mục từ <1> đến <15>, trong đó nồng độ oxy hòa tan trong môi trường nuôi cấy dịch thể được điều chỉnh tốt hơn là bằng nồng độ oxy sục khí, tốc độ sục khí (lượng luồng khí), tốc độ khuấy, hoặc áp suất.

<17> Phương pháp sản xuất axit hữu cơ theo mục <16>, trong đó nồng độ oxy sục khí tốt hơn là 21% (tỷ lệ thể tích, áp dụng tương tự dưới đây) hoặc lớn hơn, tốt hơn hơn nữa là 35% hoặc lớn hơn, thậm chí tốt hơn hơn là 40% hoặc lớn hơn; còn tốt hơn hơn là 100% hoặc nhỏ hơn; và còn tốt hơn hơn là từ 21 đến 100%, tốt hơn hơn là từ 35 đến 100%, tốt hơn hơn nữa là từ 40 đến 100%.

<18> Phương pháp sản xuất axit hữu cơ theo mục <16> hoặc <17>, trong đó tốc độ sục khí (lượng luồng khí) tốt hơn là 0,1 vvm hoặc lớn hơn, tốt hơn hơn nữa là 0,2 vvm hoặc lớn hơn; còn tốt hơn hơn là 2 vvm hoặc nhỏ hơn, tốt hơn hơn nữa là 1 vvm hoặc nhỏ hơn; và còn tốt hơn hơn là từ 0,1 đến 2 vvm, tốt hơn hơn là từ 0,2 đến 1 vvm.

<19> Phương pháp sản xuất axit hữu cơ theo mục bất kỳ trong số các mục từ <16> đến <18>, trong đó áp suất tốt hơn là từ áp suất bình thường đến điều kiện áp suất nhẹ, và khi có áp suất, áp suất tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0 đến 0,1 MPa.

<20> Phương pháp sản xuất axit hữu cơ theo mục bất kỳ trong số các mục từ <1> đến <19>, trong đó axit hữu cơ được sản xuất từ glucoza với tỷ lệ chuyển hóa tốt hơn là 40% hoặc lớn hơn, tốt hơn hơn nữa là 50% hoặc lớn hơn.

<21> Phương pháp sản xuất axit hữu cơ theo mục bất kỳ trong số các mục từ <1> đến <20>, trong đó axit hữu cơ là ít nhất một axit được chọn từ nhóm bao gồm axit fumaric, axit lactic, axit itaconic, axit malic, và axit pyruvic, tốt hơn hơn nữa là ít nhất một axit được chọn từ nhóm bao gồm axit fumaric, axit pyruvic, axit lactic, và axit malic, thậm chí tốt hơn hơn là ít nhất một axit được chọn từ nhóm bao gồm axit fumaric và axit pyruvic, thậm chí tốt hơn hơn là axit fumaric.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Phương pháp phân tích

Đo từng thành phần bằng sắc ký lỏng năng suất cao (HPLC)

Môi trường nuôi cấy được pha loãng thích hợp với dung dịch axit sulfuric chứa nước 0,0085 N, và được lọc bằng bộ lọc màng xenluloza axetat có kích thước lỗ 0,22 μm (được sản xuất bởi ADVANTEC Co., Ltd.) để cung cấp mẫu cho phân tích HPLC. Các điều kiện phân tích HPLC như sau.

Cột: ICSep ICE-ION-300

Chất tách: axit sulfuric 0,0085 N, 0,4 mL/phút

Phương pháp dò i: RI (HITACHI, L-2490)

Phương pháp dò ii: UV (HITACHI, L-2455, bước sóng đo: 250 nm)

Nhiệt độ cột: 40°C

Thể tích phun: 20 μL

Thời gian lưu giữ: 40 phút

Thời gian lưu giữ của từng thành phần trong hệ phân tích này như sau.

Axit pyruvic: 15 phút

Glucose: 16 phút

Axit fumaric: 26 phút

Ethanol: 34 phút

Đo nồng độ oxy hòa tan

Nồng độ oxy hòa tan trong môi trường nuôi cấy được đo bằng thiết bị cảm biến DO (O24100e) được sản xuất bởi METTLER TOLEDO.

Điều chế viên nấm sợi

Điều chế huyền phù bào tử

Các chủng nấm được sử dụng là nấm hình sợi chủng *Rhizopus delemar* JCM5557 và các chủng NBRC5441 thu được từ Viện kỹ thuật và đo lường quốc gia Nhật Bản (NITE). Các tế bào nấm của mỗi nấm sợi được xếp thành từng vệt riêng biệt và được áp dụng cho môi trường thạch nghiêng (Difco Potato Dextroza Agar, Becton, Dickinson and Company) được tạo thành trong ống thử nghiệm, được nuôi cấy tĩnh ở 30°C, và được nuôi cấy thường xuyên. Để sử dụng các tế bào nấm, 10 mL nước chung cất đã khử trùng được thêm vào ống thử nghiệm trong đó các tế bào nấm được phát triển, sau đó khuấy trong 4 phút bằng máy trộn cảm ứng để thu hồi các bào tử. Sau đó, các bào tử được pha loãng để điều chỉnh đến 1×10^6 bào tử /mL bằng cách thêm nước chung cất vô trùng, và được sử dụng như huyền phù bào tử.

Tạo viên nấm sợi

Việc điều chế viên nấm sợi được thực hiện bằng cách nuôi cấy hai bước sau đây.

Bước thứ nhất của quá trình nuôi cấy được thực hiện như sau. Bình Erlenmeyer có vách ngăn 500 mL chứa 200 mL môi trường PDB (Difco Potato Dextroza Broth, Becton, Dickinson and Company) được khử trùng, và sau đó huyền phù bào tử được điều chế bằng phương pháp nêu trên được cấy để tạo ra 1×10^4 bào tử/mL và được nuôi cấy trong 3 ngày trong các điều kiện nuôi cấy ở pH trong khoảng từ 3 đến 6 ở 27°C cùng với khuấy ở 170 vòng/phút (PRECI

CO., LTD., PRXYg-98R).

Bước thứ hai của quá trình nuôi cấy được thực hiện như sau. Bình khuấy sục khí 1L khí có chứa 500 mL môi trường tạo viên (10% khối lượng glucoza (được sản xuất bởi Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 0,025% khối lượng magie sulfat heptahydrat, 0,009% khối lượng kẽm sulfat heptahydrat, 0,1% khối lượng amoni sulfat, và 0,06% khối lượng kali dihydro phosphat) được khử trùng, và sau đó các tế bào nấm ở lượng 500 mL môi trường nuôi cấy của bước thứ nhất được cấy và nuôi cấy trong 2 ngày trong các điều kiện ở 27°C cùng với khuấy ở 500 vòng/phút với việc cung cấp không khí ở tốc độ sục khí là 0,3 vvm. Độ pH được điều chỉnh bằng cách thêm dung dịch natri hydroxit 7 N thích hợp để duy trì độ pH (ở 27°C) là 4,0.

Thu hồi viên nén

Môi trường nuôi cấy viên nấm sợi thu được trong mỗi bước được đề cập trên đây được lọc bằng lưới lọc nylon trong vài chục giây cho đến khi sự nhỏ giọt của dịch lọc hầu như đã dừng lại để thu được viên nấm sợi ướt. Viên nén thu được ở bước thứ hai ngay lập tức được chuyển sang bước nuôi cấy tiếp theo.

Sản xuất axit hữu cơ

Phương pháp nuôi cấy

Ví dụ 1

Cho vào bình khuấy sục khí 1 L, 500 mL của môi trường nuôi cấy dịch thể (chế phẩm: 10% khối lượng glucoza (được sản xuất bởi Wako Pure Chemical

Industries, Ltd.), 0,025% khối lượng magie sulfat heptahydrat, 0,009% khối lượng kẽm sulfat heptahydrat, 0,1% khối lượng amoni sulfat) được thêm vào, và sau đó toàn bộ viên nấm sợi của JCM5557 (trong điều kiện ướt) đã điều chế ở trên được thêm vào. Ngay sau đó, tiến hành lấy mẫu tại thời điểm 0 của quá trình nuôi cấy, và sau đó sự nuôi cấy khuấy trộn được thực hiện cùng với sục khí có nồng độ oxy 100% được sản xuất bởi máy tạo oxy (AIR SEP CORPORATION, NEWLIFE J) trong các điều kiện ở nhiệt độ 35°C cùng với khuấy ở 500 vòng/phút với tốc độ sục khí 0,3 vvm trong 2 ngày trong khi lấy mẫu theo thời gian.

Trong khi nuôi cấy, nồng độ oxy hòa tan trong môi trường nuôi cấy là 32 ppm. Hơn nữa, trong khi nuôi cấy, pH của môi trường nuôi cấy được điều chỉnh bằng cách thêm dung dịch natri hydroxit 7N thích hợp để duy trì pH (ở 35°C) là 4,0. Sau khi hoàn thành nuôi cấy, các tế bào nấm được loại bỏ bằng cách lọc môi trường nuôi cấy để thu được môi trường nuôi cấy có chứa axit fumaric.

Ví dụ 2

Môi trường nuôi cấy có chứa axit fumaric thu được bằng cách nuôi cấy theo cách tương tự như Ví dụ 1, không kể nồng độ oxy sục khí được thay đổi thành 50% bằng cách trộn khí được sản xuất bởi máy tạo oxy (AIR SEP CORPORATION, NEWLIFE J) với không khí. Trong khi nuôi cấy, nồng độ oxy hòa tan trong môi trường nuôi cấy là 9,5 ppm.

Ví dụ 3

Môi trường nuôi cấy có chứa axit fumaric thu được bằng cách nuôi cấy theo cách tương tự như Ví dụ 1, không kể nồng độ oxy sục khí được thay đổi thành 35% bằng cách trộn khí được sản xuất bởi máy tạo oxy (AIR SEP CORPORATION, NEWLIFE J) với không khí. Trong khi nuôi cấy, nồng độ oxy hòa tan trong môi trường nuôi cấy là 8,0 ppm.

Ví dụ so sánh 1

Môi trường nuôi cấy có chứa axit fumaric thu được theo cách tương tự như Ví dụ 1, không kể khí được sử dụng trong quá trình sục khí được thay thế bằng không khí (nồng độ oxy sục khí: 21%). Trong khi nuôi cấy, nồng độ oxy hòa tan trong môi trường nuôi cấy là 5,4 ppm.

Ví dụ 4

Cho vào bình khuấy sục khí 1L, 500 mL môi trường nuôi cấy dịch thể (chế phẩm: 3% khối lượng glucoza (được sản xuất bởi Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 0,025% khối lượng magie sulfat heptahydrat, 0,009% khối lượng kẽm sulfat heptahydrat, 0,1% khối lượng amoni sulfat) được thêm vào, và sau đó toàn bộ viên nấm sợi của NBRC5441 (trong điều kiện ướt) đã điều chế ở trên được thêm vào. Ngay sau đó, tiến hành lấy mẫu tại thời điểm 0 của quá trình nuôi cấy, và sau đó sự nuôi cấy khuấy trộn được thực hiện cùng với sục khí có nồng độ oxy 100% được sản xuất bởi máy tạo oxy (AIR SEP CORPORATION, NEWLIFE J) trong các điều kiện ở nhiệt độ 35°C cùng với khuấy ở 500 vòng/phút với tốc độ sục khí 0,3 vvm trong 2 ngày trong khi lấy

mẫu theo thời gian. Trong khi nuôi cấy, nồng độ oxy hòa tan trong môi trường nuôi cấy là 28 ppm. Hơn nữa, trong khi nuôi cấy, độ pH của môi trường nuôi cấy được điều chỉnh bằng cách thêm dung dịch natri hydroxit 7N thích hợp để duy trì pH (ở 35°C) là 3,0. Sau khi hoàn thành nuôi cấy, các tế bào nấm được loại bỏ bằng cách lọc môi trường nuôi cấy để thu được môi trường nuôi cấy chứa axit hữu cơ.

Ví dụ so sánh 2

Môi trường nuôi cấy chứa axit hữu cơ thu được theo cách tương tự như Ví dụ 4, không kể khí được sử dụng trong quá trình sục khí được thay thế bằng không khí (nồng độ oxy sục khí: 21%). Trong khi nuôi cấy, nồng độ oxy hòa tan trong môi trường nuôi cấy là 5,0 ppm.

Ví dụ 5

Cho vào bình khuấy sục khí 1L, 500 mL môi trường nuôi cấy dịch thể (chế phẩm: 3% khối lượng glucoza (được sản xuất bởi Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 0,025% khối lượng magie sulfat heptahydrat, 0,009% khối lượng kẽm sulfat heptahydrat, 0,1% khối lượng amoni sulfat) được thêm vào, và sau đó toàn bộ viên nấm sợi của NBRC5441 (trong điều kiện ướt) đã điều chế ở trên được thêm vào. Ngay sau đó, tiến hành lấy mẫu tại thời điểm 0 của quá trình nuôi cấy, và sau đó sự nuôi cấy khuấy trộn được thực hiện cùng với sục khí có nồng độ oxy 100% được sản xuất bởi máy tạo oxy (AIR SEP CORPORATION, NEWLIFE J) trong các điều kiện ở nhiệt độ 35°C cùng với

khuấy ở 500 vòng/phút với tốc độ sục khí 0,3 vvm trong 2 ngày trong khi lấy mẫu theo thời gian. Trong khi nuôi cấy, nồng độ oxy hòa tan trong môi trường nuôi cấy là 28 ppm. Hơn nữa, trong khi nuôi cấy, độ pH của môi trường nuôi cấy được điều chỉnh bằng cách thêm dung dịch natri hydroxit 7N thích hợp để duy trì pH (ở 35°C) là 7,0. Sau khi hoàn thành nuôi cấy, các tế bào nấm được loại bỏ bằng cách lọc môi trường nuôi cấy để thu được môi trường nuôi cấy chứa axit hữu cơ.

Ví dụ so sánh 3

Môi trường nuôi cấy chứa axit hữu cơ thu được bằng cách nuôi cấy theo cách tương tự như Ví dụ 5, không kể nồng độ oxy sục khí được thay đổi thành 21% bằng cách trộn khí được sản xuất bởi máy tạo oxy (AIR SEP CORPORATION, NEWLIFE J) với không khí. Trong khi nuôi cấy, nồng độ oxy hòa tan trong môi trường nuôi cấy là 5,0 ppm.

Ví dụ 6

Cho vào bình khuấy sục khí vô trùng 1L, 500 mL môi trường nuôi cấy dịch thể (chế phẩm: 5% khối lượng của các sacarit hỗn hợp (tỷ lệ trộn glucoza : fructoza : sucroza : xyloza : lactoza : maltoza = 5 : 5 : 2 : 1 : 1 : 1), 0,025% khối lượng magie sulfat heptahydrat, 0,009% khối lượng kẽm sulfat heptahydrat, 0,1% khối lượng amoni sulfat) được thêm vào, và sau đó toàn bộ viên nấm sợi của JCM5557 (trong điều kiện ướn) đã điều chế ở trên được thêm vào. Ngay sau đó, tiến hành lấy mẫu tại thời điểm 0 của quá trình nuôi cấy, và sau đó sự nuôi

cấy khuấy trộn được thực hiện cùng với sục khí có nồng độ oxy 100% được sản xuất bởi máy tạo oxy (AIR SEP CORPORATION, NEWLIFE J) trong các điều kiện ở nhiệt độ 35°C cùng với khuấy ở 500 vòng/phút với tốc độ sục khí 0,3 vvm trong 2 ngày trong khi lấy mẫu theo thời gian. Trong khi nuôi cấy, nồng độ oxy hòa tan trong môi trường nuôi cấy là 30 ppm. Hơn nữa, trong khi nuôi cấy, độ pH của môi trường nuôi cấy được điều chỉnh bằng cách thêm dung dịch natri hydroxit 7N thích hợp để duy trì pH (ở 35°C) là 4,0. Sau khi hoàn thành nuôi cấy, các tế bào nấm được loại bỏ bằng cách lọc môi trường nuôi cấy để thu được môi trường nuôi cấy chứa axit hữu cơ.

Ví dụ so sánh 4

Môi trường nuôi cấy chứa axit hữu cơ thu được bằng cách nuôi cấy theo cách tương tự như Ví dụ 6, không kể nồng độ oxy sục khí được thay đổi thành 21% bằng cách trộn khí được sản xuất bởi máy tạo oxy (AIR SEP CORPORATION, NEWLIFE J) với không khí. Trong khi nuôi cấy, nồng độ oxy hòa tan trong môi trường nuôi cấy là 5,0 ppm.

Phương pháp đánh giá

Trong các giá trị thu được bằng cách phân tích môi trường nuôi cấy, các mục từ (1) đến (6) sau đây được xác định là các mục tiêu đánh giá. Các công thức để tính các mục được thể hiện trong Bảng 1 và các phương trình từ (1) đến (6), tương ứng.

Bảng 1

		Ký hiệu
Nồng độ của từng thành phần [g/L]	Glucosa (Glc)	G
	Các sacarit hỗn hợp (Mix)	M
	Axit fumaric (FA)	F
	Axit pyruvic (PyA)	Py
	Etanol (EtOH)	E

(1) Tỷ lệ chuyển hóa từ sacarit thành axit fumaric

$$P1 [\%] = (F - F_0) / (G_0 - G) \times 100 \quad (1)$$

(2) Tỷ lệ chuyển hóa từ sacarit thành etanol

$$Q [\%] = (E - E_0) / (G_0 - G) \times 100 \quad (2)$$

(3) Tỷ lệ chuyển hóa thành cacbon dioxit được sản xuất theo sự chuyển đổi etanol nêu trên

$$R [\%] = Q \times (\text{trọng lượng phân tử của CO}_2 / \text{trọng lượng phân tử của EtOH}) \times 100 \quad (3)$$

(4) Tỷ lệ chuyển hóa từ sacarit thành axit pyruvic

$$S1 [\%] = (Py - Py_0) / (G_0 - G) \times 100 \quad (4)$$

(5) Tỷ lệ chuyển hóa từ các sacarit hỗn hợp thành axit fumaric

$$P2 [\%] = (F - F_0) / (M_0 - M) \times 100 \quad (5)$$

(6) Tỷ lệ chuyển hóa từ các sacarit hỗn hợp thành axit pyruvic

$$S2 [\%] = (Py - Py_0) / (M_0 - M) \times 100 \quad (6)$$

Trong các phương trình, G_0 , M_0 , F_0 , E_0 , và Py_0 là nồng độ của glucosa,

nồng độ của các sacarit hỗn hợp, nồng độ của axit fumaric, nồng độ của etanol, và nồng độ của axit pyruvic tại thời điểm 0 của quá trình nuôi cấy, tương ứng. G, M, F, E, và Py là nồng độ của glucoza, nồng độ của các sacarit hỗn hợp, nồng độ của axit fumaric, nồng độ của etanol, và nồng độ của axit pyruvic sau khi hoàn thành nuôi cấy, tương ứng.

Các điều kiện và các kết quả của các ví dụ và các ví dụ so sánh được thể hiện ở các Bảng 2 đến Bảng 4.

Bảng 2

	Ví dụ 1	Ví dụ 2	Ví dụ 3	Ví dụ so sánh 1
Nồng độ oxy hòa tan	32ppm	9,5ppm	8,0ppm	5,4ppm
pH của môi trường nuôi cấy	4,0	4,0	4,0	4,0
Tỷ lệ chuyển hóa thành axit fumaric	65,7%	50,7%	42,4%	36,9%
Tỷ lệ chuyển hóa thành etanol	9,9%	17,2%	16,1%	20,6%
Tỷ lệ chuyển hóa thành CO ₂	9,4%	16,5%	15,4%	19,7%

Bảng 3

	Ví dụ 4	Ví dụ so sánh 2	Ví dụ 5	Ví dụ so sánh 3
Nồng độ oxy hòa tan	28ppm	5,0ppm	30ppm	5,0ppm
pH của môi trường nuôi cấy	3,0	3,0	7,0	7,0
Tỷ lệ chuyển hóa thành axit fumaric	51,0%	30,0%	58,2%	41,4%
Tỷ lệ chuyển hóa thành axit pyruvic	42,5%	9,5%	4,1%	0,1%
Tỷ lệ chuyển hóa thành etanol	2,2%	19,2%	0,0%	12,9%
Tỷ lệ chuyển hóa thành CO ₂	2,1%	18,4%	0,0%	12,3%

Bảng 4

	Ví dụ 6	Ví dụ so sánh 4
Nồng độ oxy hòa tan	30ppm	5,0ppm
pH của môi trường nuôi cấy	4,0	4,0
Tỷ lệ chuyển hóa thành axit fumaric	39,0%	30,0%
Tỷ lệ chuyển hóa thành axit pyruvic	21,2%	4,5%
Tỷ lệ chuyển hóa thành etanol	2,8%	11,4%
Tỷ lệ chuyển hóa thành CO ₂	2,7%	10,9%

Như được thể hiện trong các Bảng 2 đến Bảng 4, người ta thấy rằng việc chuyển đổi từ glucoza hoặc các sacarit hỗn hợp thành axit fumaric và axit pyruvic được thúc đẩy bằng cách điều chỉnh nồng độ oxy hòa tan trong môi trường nuôi cấy trong phạm vi của sáng chế trong bước nuôi cấy của nấm sợi, trong khi sản phẩm phụ của etanol được giảm bớt, và do đó thu được axit hữu cơ với năng suất cao.

Trong các ví dụ so sánh 1 đến 4 trong đó không khí bình thường (khí trong khí quyển) được cung cấp, một lượng lớn etanol được sản xuất dưới dạng sản phẩm phụ, và do đó thu được axit hữu cơ với năng suất thấp.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất axit fumaric từ nguồn cacbon bao gồm các sacarit trong môi trường sử dụng nấm sợi, phương pháp bao gồm việc nuôi cấy nấm sợi trong môi trường nuôi cấy dịch thể, trong đó nguồn cacbon được bao gồm và nồng độ oxy hòa tan được điều chỉnh ở 8 ppm hoặc lớn hơn và 35 ppm hoặc nhỏ hơn, để thu được axit fumaric.
2. Phương pháp sản xuất axit fumaric theo điểm 1, trong đó nấm sợi là *Rhizopus* sp.
3. Phương pháp sản xuất axit fumaric theo điểm 1, trong đó nấm sợi là *Rhizopus delemar* hoặc *Rhizopus oryzae*.
4. Phương pháp sản xuất axit fumaric theo điểm 1, trong đó nấm sợi là ở dạng viên hoặc nấm sợi bất động.
5. Phương pháp sản xuất axit fumaric theo điểm 1, trong đó môi trường nuôi cấy dịch thể là môi trường nuôi cấy dịch thể trong đó nồng độ oxy hòa tan được điều chỉnh ở 8,5 ppm hoặc lớn hơn.
6. Phương pháp sản xuất axit fumaric theo điểm 1, trong đó môi trường nuôi cấy dịch thể được sục khí với khí có nồng độ oxy lớn hơn hoặc bằng 21% và nhỏ hơn hoặc bằng 100%.
7. Phương pháp sản xuất axit fumaric theo điểm 1, trong đó nguồn cacbon bao gồm glucoza.
8. Phương pháp sản xuất axit fumaric theo điểm 1, trong đó nồng độ của

nguồn cacbon trong môi trường nuôi cấy dịch thể lớn hơn hoặc bằng 1 % khối lượng và nhỏ hơn hoặc bằng 40 % khối lượng.

9. Phương pháp sản xuất axit fumaric theo điểm 1, trong đó pH ở 35°C của môi trường nuôi cấy dịch thể trong bước nuôi cấy lớn hơn hoặc bằng 2 và nhỏ hơn hoặc bằng 7.

10. Phương pháp sản xuất axit fumaric theo điểm 1, trong đó pH ở 35°C của môi trường nuôi cấy dịch thể trong bước nuôi cấy lớn hơn hoặc bằng 3 và nhỏ hơn hoặc bằng 6.

11. Phương pháp sản xuất axit fumaric theo điểm 1, trong đó pH của môi trường nuôi cấy dịch thể trong bước nuôi cấy được điều chỉnh bằng cách sử dụng hydroxit của kim loại kiềm hoặc kim loại kiềm thổ, hoặc cacbonat của kim loại kiềm hoặc kim loại kiềm thổ.