



(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)



1-0031910

(51)⁷ C12P 7/46; C12N 1/14

(13) B

(21) 1-2018-03213

(22) 22/12/2016

(86) PCT/JP2016/088277 22/12/2016

(87) WO/2017/110963 29/06/2017

(30) 2015-251573 24/12/2015 JP

(45) 25/05/2022 410

(43) 25/10/2018 367A

(73) KAO CORPORATION (JP)

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

(72) NOBA, Masahiro (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 sản xuất axit fumaric mới có tông màu thuận lợi. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất axit fumaric, bao gồm các bước (1) và (2) sau đây:

(1) bước nuôi cấy vi sinh vật có năng suất axit fumaric trong môi trường nuôi cấy dịch thể bao gồm nguồn cacbon để thu được một hoặc nhiều chất được chọn từ axit fumaric và fumarat,

(2) bước kết tinh một hoặc nhiều chất được chọn từ axit fumaric và fumarat thu được ở bước (1) với sự có mặt của một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt được chọn từ chất hoạt động bề mặt không ion và chất hoạt động bề mặt lưỡng tính.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế 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 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 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.

Các ví dụ về phương pháp đã biết để sản xuất axit fumaric bằng cách sử dụng các nguồn tài nguyên tái tạo bao gồm phương pháp sản xuất axit fumaric từ glucoza bằng cách nuôi cấy chủng *Rhizopus* sp. (Tài liệu không phải sáng chế 1). Tài liệu không phải sáng chế 1 bộc lộ phương pháp tinh chế axit fumaric bằng cách thêm axit vào môi trường nuôi cấy có chứa fumarat, lọc và làm khô tinh thể thu được của axit fumaric.

Tài liệu không phải sáng chế

Tài liệu không phải sáng chế 1: Appl. Biochem. Biotechnol., 1990, vol. 24-25, p. 663-677

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất axit fumaric, bao gồm các bước (1)

và (2) sau đây:

(1) bước nuôi cấy vi sinh vật có năng suất axit fumaric trong môi trường nuôi cấy dịch thể chứa nguồn cacbon để thu được một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm axit fumaric và fumarat,

(2) bước kết tinh một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm axit fumaric và fumarat thu được ở bước (1) với sự có mặt của một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt được chọn từ nhóm bao gồm chất hoạt động bề mặt không ion và chất hoạt động bề mặt lưỡng tính.

Mô tả chi tiết sáng chế

Để sử dụng axit fumaric tinh khiết trong công nghiệp, cụ thể là làm phụ gia thực phẩm, cần có axit fumaric ít nhuộm màu hơn.

Tuy nhiên, khi axit fumaric được tinh chế và sản xuất bằng phương pháp được mô tả trong Tài liệu không phải sáng chế 1, vấn đề là axit fumaric được nhuộm màu đã được bộc lộ.

Nói chung, như một phương pháp để giảm màu của sản phẩm nuôi cấy, một phương pháp bao gồm việc xử lý bằng than hoạt tính trước bước kết tinh đã được biết đến. Tuy nhiên, các tác giả sáng chế này đã tiết lộ rằng, kết quả của việc xem xét, sự biến đổi về màu của axit fumaric không thể đạt được bằng cách xử lý bằng than hoạt tính ở mức độ thực tế trong công nghiệp. Mặt khác, người ra thấy rằng mặc dù việc xử lý bằng than hoạt tính quá mức có thể khử màu của axit fumaric, tốc độ phục hồi sẽ giảm đáng kể do sự hấp thụ của axit fumaric trên than hoạt tính, và do đó xử lý bằng than hoạt tính là không phù hợp như một

phương tiện để khử màu của axit fumaric trong công nghiệp.

Theo đó, sáng chế đề cập đến việc cung cấp phương pháp sản xuất axit fumaric mới có tông màu thuận lợi.

Các tác giả sáng chế này, sau khi theo đuổi nghiên cứu chuyên sâu về các vấn đề nêu trên, đã nhận thấy rằng axit fumaric có tông màu thuận lợi có thể thu được bằng cách kết tinh một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm axit fumaric và fumarat thu được bằng bước nuôi cấy tế bào nấm với sự có mặt của một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt được chọn từ nhóm bao gồm chất hoạt động bề mặt không ion và chất hoạt động bề mặt lưỡng tính.

Theo phương pháp của sáng chế, axit fumaric có tông màu thuận lợi có thể thu được bằng một hoạt động thuận tiện.

Phương pháp sản xuất axit fumaric theo sáng chế bao gồm: (1) bước nuôi cấy vi sinh vật có năng suất axit fumaric trong môi trường nuôi cấy dịch thể có chứa nguồn cacbon để thu được một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm axit fumaric và fumarat, và (2) bước kết tinh một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm axit fumaric và fumarat thu được ở bước (1) với sự có mặt của một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt được chọn từ nhóm bao gồm chất hoạt động bề mặt không ion và chất hoạt động bề mặt lưỡng tính.

Như được sử dụng ở đây, "một hoặc nhiều chất được chọn từ axit fumaric và fumarat" cũng được đề cập đến như "axit fumaric (muối)".

Bước (1)

Theo phương pháp của sáng chế, đầu tiên, vi sinh vật có năng suất axit

fumaric được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy dịch thể có chứa nguồn cacbon để thu được một hoặc nhiều chất được chọn từ axit fumaric và fumarat.

(Môi trường nuôi cấy dịch thể có chứa nguồn cacbon)

Môi trường nuôi cấy dịch thể như được sử dụng ở đây 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 được bổ sung thành phần tự nhiên.

Các ví dụ về nguồn cacbon bao gồm các sacarit. Các ví dụ về các sacarit bao gồm các monosacarit như glucoza, fructoza, và xyloza và các disacarit như sucroza, lactoza, và maltoza. Các sacarit có thể là anhydrit hoặc hydrat. Hơn nữa, dung dịch carbohydrat có chứa sacarit, ví dụ, dung dịch carbohydrat hoặc mật đường (mật đường đen) thu được từ tinh bột hoặc dung dịch carbohydrat thu được từ sinh khối xenluloza cũng có thể được sử dụng. Cụ thể là, glucoza và fructoza được ưu tiên xét về năng suất axit fumaric cao bằng vi sinh vật.

Nguồn cacbon nêu trên có thể được sử dụng riêng rẽ, hoặc hai hoặc nhiều nguồn cacbon có thể được sử dụng kết hợp.

Xét về năng suất axit fumaric cao bằng vi sinh vật, nồng độ của nguồn cacbon trong môi trường nuôi cấy dịch thể tốt hơn là 1% khối lượng hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 2% khối lượng hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 3% khối lượng hoặc lớn hơn; và tốt hơn là 40% khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 30% khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 20% khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 10% khối lượng hoặc nhỏ hơn.

Môi trường nuôi cấy dịch thể có thể chứa, ví dụ, nguồn ni tơ, các muối vô

cơ, và các chất dinh dưỡng cần thiết khác bổ sung cho nguồn cacbon.

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

Nồng độ của nguồn ni tơ trong môi trường nuôi cấy dịch thể tốt hơn là 0,001% khối lượng hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 0,05% khối lượng hoặc lớn hơn; và tốt hơn là 0,5% khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 0,2% 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 sulfat trong môi trường nuôi cấy dịch thể tốt hơn là 0,01% khối lượng hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 0,02% khối lượng hoặc lớn hơn; và tốt hơn là 0,5% khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 0,2% khối lượng hoặc nhỏ hơn.

Nồng độ của muối magie trong môi trường nuôi cấy dịch thể tốt hơn là 0,001% khối lượng hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 0,01% khối lượng hoặc lớn hơn; và tốt hơn là 0,5% khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 0,1% khối lượng hoặc nhỏ hơn.

Nồng độ của muối kẽm trong môi trường nuôi cấy dịch thể tốt hơn là 0,001% khối lượng hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 0,005% khối lượng hoặc lớn hơn; và tốt hơn là 0,05% khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 0,02% khối

lượng hoặc nhỏ hơn.

Độ pH của môi trường nuôi cấy dịch thể (ở 25°C, áp dụng tương tự sau đây) tốt hơn là 3 hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 3,5 hoặc lớn hơn; và tốt hơn là 7 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 6 hoặc nhỏ hơn. Độ pH của môi trường có thể được điều chỉnh bằng cách sử dụng chất đệm, như mong muốn.

Vi sinh vật có năng suất axit fumaric

Các ví dụ về vi sinh vật có năng suất axit fumaric bao gồm nấm sợi, trực khuẩn ruột kết, *Bacillus subtilis*, nấm men, và khuẩn hình roi. Cụ thể là, xét về việc xử lý và năng suất axit fumaric cao, nấm sợi được ưu tiên.

Các ví dụ về nấm sợi bao gồm các vi sinh vật thuộc chi *Rhizopus*, *Aspergillus*, và *Mucor*. Vi sinh vật thuộc chi *Rhizopus* được ưu tiên.

Các ví dụ về *Rhizopus* sp. bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus chinensis*, *Rhizopus nigricans*, *Rhizopus tonkinensis*, và *Rhizopus tritici*. *Rhizopus* sp. có thể được sử dụng riêng rẽ, hoặc hai hoặc nhiều loại có thể được sử dụng kết hợp.

Tốt hơn là, nấm sợi, cụ thể là chủng *Rhizopus* được sử dụng ở dạng viên nhỏ, hoặc ở dạng được gắn cố định vào vật mang. Thuật ngữ "viên nhỏ" của chủng *Rhizopus* đề cập đến khối sợi nấm có kích thước từ vài trăm micro mét đến vài mili mét được tạo thành một cách tự chủ bởi sợi nấm do nuôi cấy lỏng. Thuật ngữ "được gắn cố định vào vật mang" đề cập đến trạng thái được giữ lại bằng hoặc được gắn vào vật mang. Có thể sử dụng viên nhỏ có bán trên thị trường hoặc viên nhỏ được gắn cố định vào vật mang, và viên nhỏ hoặc viên nhỏ

được gắn cố định vào vật mang được điều chế bằng cách sử dụng bào tử hoặc một sợi nấm cũng có thể được sử dụng.

Phương pháp nuôi cấy

Việc sản xuất axit fumaric được thực hiện bằng cách nuôi cấy vi sinh vật có năng suất axit fumaric trong môi trường nuôi cấy dịch thể nêu trên. Vi sinh vật có thể được nuôi cấy theo các điều kiện nuôi cấy thường được sử dụng. Ví dụ, nhiệt độ nuôi cấy tốt hơn là 20°C hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 30°C hoặc lớn hơn; và tốt hơn là 40°C hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 37°C hoặc nhỏ hơn xét về sự phát triển của tế bào nấm và năng suất axit fumaric cao.

Bình nuôi cấy thông thường đã biết có thể được sử dụng thích hợp như một bình nuôi cấy. Tuy nhiên, xét về năng suất axit fumaric cao, bình tốt hơn là bình nuôi cấy khuấy sục khí, bình nuôi cấy cột nổi bọt, và bình nuôi cấy lớp lỏng tầng sôi. Sự nuôi cấy có thể là nuôi cấy theo đợt, nuôi cấy bán đợt, và nuôi cấy liên tục. Điều kiện sục khí tốt hơn là 0,1 vvm hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 0,2 vvm hoặc lớn hơn; và tốt hơn là 2 vvm hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 1 vvm hoặc nhỏ hơn xét về năng suất axit fumaric cao. Thời gian nuôi cấy có thể được điều chỉnh thích hợp.

Khi axit fumaric được tạo ra, pH của môi trường nuôi cấy được giảm xuống bằng axit fumaric được tạo ra. Do đó, tốt hơn là sự nuôi cấy được thực hiện cùng với quá trình trung hòa bằng cách sử dụng chất trung hòa.

Các ví dụ về chất trung hòa được sử dụng cho sự 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 là, xét về độ hòa tan của axit fumaric và xét về sự tiết kiệm, chất trung hòa tốt hơn là natri hydroxit, kali hydroxit, canxi hydroxit, natri cacbonat, kali cacbonat, canxi cacbonat, magie cacbonat, dung dịch amoniac, amoni cacbonat, và amoni bicarbonat; tốt hơn nữa là natri hydroxit, natri cacbonat, và kali cacbonat; tốt hơn nữa 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 fumaric được tạo ra có thể tạo thành muối với chất trung hòa để tạo ra fumarat.

Kết quả của sự nuôi cấy, axit fumaric (muối) được tích lũy trong môi trường.

Đối với môi trường nuôi cấy có chứa axit fumaric (muối), khi sự nuôi cấy được hoàn thành, chất không hòa tan, chẳng hạn như vi sinh vật, tốt hơn là được loại bỏ khỏi môi trường nuôi cấy bằng một phương tiện phân tách thích hợp, ví dụ, tách ly tâm hoặc xử lý màng như vi lọc. Mặt khác, vi sinh vật như chủng *Rhizopus* sp. được tách khỏi môi trường nuôi cấy có thể được tái sử dụng để sản xuất axit fumaric.

Lượng của axit fumaric (muối) được chứa trong môi trường nuôi cấy thu được ở bước (1) tốt hơn là 0,5% khối lượng hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 1% khối lượng hoặc lớn hơn; và tốt hơn là 20% khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 10% khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 3% khối lượng hoặc nhỏ hơn xét về tốc độ phục hồi và chi phí sản xuất.

Bước (2)

Bước (2) là bước kết tinh một hoặc nhiều chất được chọn từ axit fumaric và fumarat thu được ở bước (1) với sự có mặt của một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt được chọn từ chất hoạt động bề mặt không ion và chất hoạt động bề mặt lưỡng tính.

Bước (2) có thể là bước kết tinh axit fumaric từ môi trường nuôi cấy có chứa một hoặc nhiều chất được chọn từ axit fumaric và fumarat thu được ở bước (1) với sự có mặt của một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt được chọn từ chất hoạt động bề mặt không ion và chất hoạt động bề mặt lưỡng tính. Ngoài ra, bước có thể là bước tách một hoặc nhiều chất được chọn từ axit fumaric và fumarat thu được ở bước (1) từ môi trường nuôi cấy, và sau đó kết tinh axit fumaric lần nữa từ dung dịch chứa nước có chứa một hoặc nhiều chất được chọn từ axit fumaric và fumarat với sự có mặt của một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt được chọn từ chất hoạt động bề mặt không ion và chất hoạt động bề mặt lưỡng tính.

Ở bước (2), khi một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt được chọn từ chất hoạt động bề mặt không ion và chất hoạt động bề mặt lưỡng tính được bổ sung trực tiếp cho môi trường nuôi cấy có chứa axit fumaric (muối) để kết tinh axit fumaric, bước này được đơn giản hóa và có lợi về chi phí. Hơn nữa, khi axit fumaric (muối) được tách từ môi trường nuôi cấy và sau đó dung dịch chứa nước có chứa axit fumaric tách rời (muối) được thêm một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt được chọn từ chất hoạt động bề mặt không ion và chất hoạt động bề

mặt lưỡng tính để kết tinh axit fumaric, axit fumaric có thể được kết tinh cùng với các chất ít gây ô nhiễm, và do đó mức độ tinh chế có thể dễ dàng tăng lên.

Theo sáng chế, bước (2) tốt hơn là bước kết tinh axit fumaric từ môi trường nuôi cấy có chứa một hoặc nhiều chất được chọn từ axit fumaric và fumarat thu được ở bước (1) với sự có mặt của một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt được chọn từ chất hoạt động bề mặt không ion và chất hoạt động bề mặt lưỡng tính.

Chất hoạt động bề mặt

Các chất hoạt động bề mặt được sử dụng theo sáng chế là một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt được chọn từ chất hoạt động bề mặt không ion và chất hoạt động bề mặt lưỡng tính. Chất hoạt động bề mặt có thể được sử dụng riêng rẽ, hoặc phần lớn các chất hoạt động bề mặt có thể được sử dụng kết hợp. Khi nhiều chất hoạt động bề mặt được sử dụng kết hợp, chất hoạt động bề mặt không ion và chất hoạt động bề mặt lưỡng tính có thể được sử dụng kết hợp. Hơn nữa, nhiều chất hoạt động bề mặt không ion có thể được sử dụng kết hợp, hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt lưỡng tính có thể được sử dụng kết hợp.

Thời điểm bổ sung chất hoạt động bề mặt cho môi trường nuôi cấy hoặc dung dịch chứa nước có chứa axit fumaric (muối) không có giới hạn cụ thể. Chất hoạt động bề mặt có thể được bổ sung ở thời điểm bất kỳ với điều kiện là chất hoạt động bề mặt có mặt trong khi kết tinh axit fumaric.

Chất hoạt động bề mặt không ion

Các ví dụ về chất hoạt động bề mặt không ion được sử dụng theo sáng chế bao gồm glycerin este của axit béo, propylen glycol este của axit béo, sorbitan

este của axit béo, polyoxyetylen sorbitan este của axit béo, sucroza este của axit béo, polyoxyetylen sorbitol este của axit béo, polyoxyetylen alkyl ete, polyoxyetylen alkenyl ete, polyoxyetylen polyoxypropylen glycol, polyoxyetylen polyoxypropylen alkyl ete, polyoxyetylen polyoxypropylen alkenyl ete, polyetylen glycol este của axit béo, dầu thầu dầu polyoxyetylen, dầu thầu dầu polyoxyetylen được hydro hóa, và polyglyxerol este của axit béo.

Khi chất hoạt động bề mặt không ion có chuỗi etylen oxit (EO) được sử dụng, số các phân tử gam của etylen oxit được bổ sung tốt hơn là 4 hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 5 hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 6 hoặc lớn hơn; và tốt hơn là 250 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 160 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 80 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 60 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 50 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 25 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 18 hoặc nhỏ hơn. Số cacbon của gốc axit béo, gốc alkyl, gốc alkylen, và gốc alkenyl của chất hoạt động bề mặt không ion tốt hơn là 6 hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 8 hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 10 hoặc lớn hơn; và tốt hơn là 24 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 22 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 20 hoặc nhỏ hơn.

Xét về việc cung cấp hiệu quả loại bỏ các thành phần tạo màu, các loại chất hoạt động bề mặt không ion tốt hơn là polyoxyetylen alkyl ete, polyoxyetylen sorbitan este của axit béo, dầu thầu dầu polyoxyetylen được hydro hóa, polyoxyetylen sorbitol este của axit béo, và polyoxyetylen polyoxypropylen alkyl ete; tốt hơn nữa là polyoxyetylen alkyl ete, và polyoxyetylen sorbitan este của axit béo.

HLB (Cân bằng ưa nước-ưa béo - Hydrophilic Lipophilic Balance) của chất hoạt động bề mặt không ion tốt hơn nữa là 10 hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 12 hoặc lớn hơn; và tốt hơn là 20 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 19 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 17 hoặc nhỏ hơn xét về việc cung cấp hiệu quả loại bỏ các thành phần tạo màu, tốt hơn là 6 hoặc lớn hơn.

Theo sáng chế, HLB có thể được tính từ giá trị vô cơ và giá trị hữu cơ thu được theo ODA và TERAMURA et.al.

HLB được tính từ giá trị vô cơ và giá trị hữu cơ có thể được tính toán cụ thể bằng công thức sau: $HLB = (\Sigma \text{ giá trị vô cơ} / \Sigma \text{ giá trị hữu cơ}) \times 10$. Đối với "giá trị vô cơ" và "giá trị hữu cơ", "các giá trị vô cơ" và "các giá trị hữu cơ" tương ứng với các nguyên tử khác nhau hoặc các nhóm chức khác nhau được xác định (ví dụ, xem Yoshio KODA (1984). Yuki Gainenzu - Kiso to Oyo (Organicity Chart - Basics and Applications), 11-17, SANKYO SHUPPAN Co., Ltd.). Ví dụ, "giá trị hữu cơ" của một nguyên tử cacbon trong một phân tử là 20, và "giá trị vô cơ" của một nhóm hydroxyl trong phân tử là 100. HLB của hợp chất hữu cơ nhất định có thể được tính bằng cách cộng "các giá trị vô cơ" và "các giá trị hữu cơ" của tất cả các nguyên tử và các nhóm chức trong hợp chất hữu cơ.

Hơn nữa, khi chế phẩm của các chất hoạt động bề mặt bao gồm hai hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt không ion, HLB của chế phẩm là giá trị trung bình cộng của các giá trị HLB của mỗi chất hoạt động bề mặt không ion dựa trên các tỷ lệ khối lượng của chúng trong chế phẩm theo công thức sau đây.

$$\text{HLB của chế phẩm} = \Sigma (\text{HLB}_x \times W_x) / \Sigma W_x$$

Trong công thức, HLB_x thể hiện giá trị HLB của chất hoạt động bề mặt không ion X, và W_x thể hiện khối lượng (g) của chất hoạt động bề mặt không ion X có giá trị của HLB_x .

Chất hoạt động bề mặt lưỡng tính

Các ví dụ về chất hoạt động bề mặt lưỡng tính bao gồm chất hoạt động bề mặt amidobetain, chất hoạt động bề mặt amit axit amin, chất hoạt động bề mặt alkyl betain, chất hoạt động bề mặt sulfobetain, chất hoạt động bề mặt imidazolinium betain, và chất hoạt động bề mặt phosphobetain. Cụ thể là, xét về việc cung cấp hiệu quả loại bỏ các thành phần tạo màu, chất hoạt động bề mặt alkyl betain và chất hoạt động bề mặt sulfobetain được ưu tiên, và axit alkyldimethylamino axetic betain được ưu tiên hơn. Số cacbon của gốc alkyl của alkyl betain chất hoạt động bề mặt tốt hơn là 6 hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 8 hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 10 hoặc lớn hơn; và tốt hơn là 22 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 20 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 18 hoặc nhỏ hơn xét về việc cung cấp hiệu quả loại bỏ các thành phần tạo màu.

Theo sáng chế, xét về việc cung cấp hiệu quả loại bỏ các thành phần tạo màu, tốt hơn là một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt được chọn từ các chất hoạt động bề mặt không ion được sử dụng. HLB của chất hoạt động bề mặt không ion khi chất hoạt động bề mặt được sử dụng riêng rẽ, và giá trị trung bình cộng của các HLB của hai hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt không ion khi sử dụng hai hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt, tốt hơn là 10 hoặc lớn hơn, tốt hơn

nữa là 12 hoặc lớn hơn; và tốt hơn là 20 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 17 hoặc nhỏ hơn.

Có thể sử dụng các chất hoạt động bề mặt không ion và các chất hoạt động bề mặt lưỡng tính có bán trên thị trường.

Nồng độ của chất hoạt động bề mặt

Một lượng chất hoạt động bề mặt được sử dụng để kết tinh axit fumaric không có giới hạn cụ thể. Tuy nhiên, xét về tỷ lệ loại bỏ các thành phần tạo màu, lượng tốt hơn là 0,0001 hoặc lớn hơn, và xét về năng suất công nghiệp và chi phí, lượng tốt hơn là 1 hoặc nhỏ hơn so với axit fumaric (muối).

Hơn nữa, theo cùng quan điểm, tổng nồng độ của các chất hoạt động bề mặt để kết tinh của axit fumaric tốt hơn là 0,0001% khối lượng hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 0,001% khối lượng hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 0,01% khối lượng hoặc lớn hơn; và tốt hơn là 5% khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 2% khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 1% khối lượng hoặc nhỏ hơn trong môi trường nuôi cấy hoặc dung dịch chứa nước có chứa axit fumaric (muối).

Phương pháp kết tinh axit fumaric

Phương pháp kết tinh axit fumaric không có giới hạn cụ thể. Axit fumaric có thể được kết tinh bằng cách điều chỉnh pH, làm mát, và cô đặc.

Tốt hơn là sự kết tinh của axit fumaric được thực hiện sử dụng lò phản ứng được trang bị lưỡi khuấy để khuấy. Lưỡi khuấy có thể có hình dạng bất kỳ. Cụ thể, để trộn các tinh thể một cách hiệu quả, lưỡi khuấy tốt hơn là lưỡi cánh quạt, lưỡi tua bin, lưỡi chân vịt, lưỡi neo, lưỡi cánh quạt đường kính lớn, và lưỡi Max

Blend. Mô tả sau đây là một ví dụ về kết tinh axit fumaric từ môi trường nuôi cấy có chứa axit fumaric (muối).

Trong quá trình kết tinh bằng cách điều chỉnh pH, do sự phân tách của fumarat thành axit fumaric và muối, nồng độ axit fumaric có thể được tăng lên bằng hoặc cao hơn độ hòa tan của axit fumaric, và do đó axit fumaric có thể được kết tinh.

Axit được sử dụng để điều chỉnh pH của môi trường nuôi cấy không có giới hạn cụ thể, với điều kiện axit là axit vô cơ có pKa thấp hơn của axit fumaric. Các ví dụ về axit vô cơ bao gồm axit clohydric, axit nitric, axit sulfuric, và axit phosphoric. Axit vô cơ tốt hơn là axit sulfuric và axit clohydric. Lượng axit vô cơ được thêm vào có thể được điều chỉnh thích hợp theo pH của môi trường nuôi cấy có chứa axit fumaric (muối) thu được ở bước (1).

Xét về tốc độ phục hồi axit fumaric, pH của môi trường được điều chỉnh đến tốt hơn là 3,5 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 3 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 2,5 hoặc nhỏ hơn. Hơn nữa, xét về độ kiềm, pH tốt hơn là 0,5 hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 1 hoặc lớn hơn.

Nhiệt độ khi axit fumaric được kết tinh bằng cách điều chỉnh pH không có giới hạn cụ thể. Tuy nhiên, xét về tốc độ phục hồi axit fumaric, được ưu tiên là thực hiện sự kết tinh sau khi làm mát môi trường nuôi cấy.

Xét về tốc độ phục hồi axit fumaric, nhiệt độ làm mát tốt hơn là 35°C hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 30°C hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 25°C hoặc nhỏ hơn; và tốt hơn là 0°C hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 4°C hoặc lớn hơn.

Xét về năng suất, tốc độ bổ sung của axit tốt hơn là 0,1 [mmol axit/L của môi trường nuôi cấy/phút] hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 0,3 [mmol axit/L của môi trường nuôi cấy/phút] hoặc lớn hơn; và xét về độ tinh khiết, tốt hơn là 20 [mmol axit/L của môi trường nuôi cấy/phút] hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 10 [mmol axit/L của môi trường nuôi cấy/phút] hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 5 [mmol axit/L của môi trường nuôi cấy/phút] hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 3 [mmol axit/L của môi trường nuôi cấy/phút] hoặc nhỏ hơn.

Khi kết tinh bằng cách làm mát, do làm mát của môi trường nuôi cấy có chứa axit fumaric, nồng độ axit fumaric có thể tăng lên bằng hoặc cao hơn độ hòa tan của axit fumaric, và do đó axit fumaric có thể được kết tinh.

Đối với sự kết tinh đồng nhất của axit fumaric, có thể thực hiện việc làm mát sau khi đun nóng. Hơn nữa, môi trường nuôi cấy có thể được cô đặc, sau đó được đun nóng, và sau đó được làm mát. Hơn nữa, xét về độ tinh khiết, môi trường nuôi cấy có thể được đun nóng, và axit nêu trên có thể được thêm vào môi trường nuôi cấy trước khi làm mát để điều chỉnh pH trong phạm vi nêu trên. Nhiệt độ gia nhiệt tốt hơn là 40°C hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 55°C hoặc lớn hơn; và tốt hơn là 100°C hoặc nhỏ hơn.

Xét về tốc độ phục hồi axit fumaric, nhiệt độ làm mát tốt hơn là 35°C hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 30°C hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 25°C hoặc nhỏ hơn; và tốt hơn là 0°C hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 4°C hoặc lớn hơn.

Tốc độ làm mát được tính dựa trên thời gian cần thiết để đạt đến nhiệt độ làm mát bắt đầu từ nhiệt độ nuôi cấy hoặc nhiệt độ gia nhiệt tốt hơn là 0,05

[°C/phút] hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 0,1 [°C/phút] hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 0,2 [°C/phút] xét về hiệu suất và độ tinh khiết; và tốt hơn là 10 [°C/phút] hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 5 [°C/phút] hoặc nhỏ hơn xét về độ tinh khiết.

Khi kết tinh bằng cách cô đặc, do nồng độ của môi trường nuôi cấy có chứa axit fumaric, nồng độ axit fumaric có thể tăng lên bằng hoặc cao hơn độ hòa tan của axit fumaric, và do đó axit fumaric có thể được kết tinh.

Xét về tốc độ phục hồi axit fumaric, trước khi kết tinh theo nồng độ, axit nêu trên có thể được thêm vào môi trường nuôi cấy để điều chỉnh pH trong phạm vi nêu trên.

Các phương pháp kết tinh này có thể được thực hiện riêng rẽ, hoặc hai hoặc nhiều phương pháp có thể được thực hiện kết hợp. Khi hai hoặc nhiều phương pháp được thực hiện kết hợp, tốt hơn là sự kết tinh bằng cách điều chỉnh pH, và sự kết tinh bằng cách làm mát và/hoặc sự kết tinh bằng cách cô đặc được thực hiện dựa trên tốc độ phục hồi axit fumaric.

Theo sáng chế, như một phương pháp kết tinh axit fumaric, xét về việc thu được axit fumaric có độ tinh khiết cao và xét về tốc độ phục hồi axit fumaric, tốt hơn là phương pháp này bao gồm việc đun nóng môi trường nuôi cấy có chứa axit fumaric (muối), sau đó điều chỉnh pH, và sau đó kết tinh axit fumaric bằng cách làm mát. Cụ thể, tốt hơn là phương pháp này bao gồm việc đun nóng môi trường nuôi cấy có chứa axit fumaric (muối) đến 55°C hoặc lớn hơn, sau đó bổ sung axit để thu được pH 3 hoặc thấp hơn, và sau đó làm mát đến 25°C hoặc nhỏ hơn để kết tinh axit fumaric.

Hơn nữa, như một phương pháp kết tinh axit fumaric, xét về việc thu được axit fumaric tinh khiết một cách kinh tế, tốt hơn là phương pháp này bao gồm việc làm mát môi trường nuôi cấy có chứa axit fumaric (muối), và sau đó kết tinh axit fumaric bằng cách điều chỉnh pH. Cụ thể, tốt hơn là phương pháp này bao gồm việc làm mát môi trường nuôi cấy có chứa axit fumaric (muối) đến 25°C hoặc nhỏ hơn, và sau đó bổ sung axit để thu được pH 3 hoặc thấp hơn để kết tinh axit fumaric.

Theo phương pháp kết tinh bất kỳ, xét về tốc độ phục hồi axit fumaric, nhiệt độ làm mát của môi trường nuôi cấy khi hoàn thành sự kết tinh tốt hơn là 35°C hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 30°C hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 25°C hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 20°C hoặc nhỏ hơn; và tốt hơn là 0°C hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 4°C hoặc lớn hơn xét về tốc độ phục hồi axit fumaric.

Hơn nữa, pH của môi trường nuôi cấy khi hoàn thành sự kết tinh được điều chỉnh đến tốt hơn là 3,5 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 3 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 2,5 hoặc nhỏ hơn xét về tốc độ phục hồi axit fumaric; và tốt hơn là 0,5 hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 1 hoặc lớn hơn xét về độ kiềm.

Tinh thể của axit fumaric có thể được phân lập bằng các phương pháp tách rắn-lỏng như tách ly tâm, lọc và lắng gạn. Các hoạt động như hoạt động tách tinh thể tốt hơn là được thực hiện ở nhiệt độ trong phạm vi nêu trên.

Tinh thể của axit fumaric thu được như nêu trên được rửa sạch khi cần thiết, và được làm khô để thu được axit fumaric tinh khiết.

Phương pháp làm khô không có giới hạn cụ thể. Việc làm khô có thể được

thực hiện bằng cách sử dụng máy làm khô thông thường như máy làm khô nhiều tầng, máy làm khô kiểu cánh quạt, máy trộn Nauta, máy làm khô lớp lỏng tầng sôi, máy làm khô hỗn hợp chân không, và máy làm khô kiểu đĩa.

Nhiệt độ làm khô tốt hơn là 80°C hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 90°C hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 100°C hoặc lớn hơn; và tốt hơn là 150°C hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 130°C hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 120°C hoặc nhỏ hơn. Việc làm khô có thể được thực hiện dưới áp suất giảm.

Axit fumaric thu được bằng phương pháp của sáng chế có tông màu tốt. Độ hấp thụ ở bước sóng 400 nm được đo bằng phương pháp được mô tả trong các ví dụ sau đây tốt hơn là 0,02 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 0,015 hoặc nhỏ hơn.

Axit fumaric có tông màu tốt có thể được sử dụng, ví dụ, làm nguyên liệu thô của các chất dẻo, phụ gia thực phẩm, hóa chất nhuộm, và nguyên liệu trung gian để chuyển hóa thành các hóa chất thương mại, như axit aspartic. Cụ thể là, axit fumaric có tông màu tốt được sử dụng làm phụ gia thực phẩm.

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

<1> Phương pháp sản xuất axit fumaric, bao gồm các bước (1) và (2) sau đây:

(1) bước nuôi cấy vi sinh vật có năng suất axit fumaric trong môi trường nuôi cấy dịch thể bao gồm nguồn cacbon để thu được một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm axit fumaric và fumarat,

(2) bước kết tinh một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm axit

fumaric và fumarat thu được ở bước (1) với sự có mặt của một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt được chọn từ nhóm bao gồm chất hoạt động bề mặt không ion và chất hoạt động bề mặt lưỡng tính.

<2> Phương pháp sản xuất axit fumaric theo mục <1>, trong đó nguồn cacbon tốt hơn là các sacarit, tốt hơn nữa là glucoza hoặc fructoza, tốt hơn nữa là glucoza.

<3> Phương pháp sản xuất axit fumaric theo mục <1> hoặc <2>, trong đó vi sinh vật có năng suất axit fumaric tốt hơn là nấm sợi, trực khuẩn ruột kết, *Bacillus subtilis*, nấm men, hoặc khuẩn hình roi, tốt hơn nữa là nấm sợi.

<4> Phương pháp sản xuất axit fumaric theo mục <3>, trong đó nấm sợi tốt hơn là vi sinh vật thuộc chi *Rhizopus*, *Aspergillus*, hoặc *Mucor*, tốt hơn nữa là vi sinh vật thuộc chi *Rhizopus*.

<5> Phương pháp sản xuất axit fumaric theo mục <4>, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Rhizopus* tốt hơn là chủng *Rhizopus delemar*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus chinensis*, *Rhizopus nigricans*, *Rhizopus tonkinensis*, hoặc *Rhizopus tritici*.

<6> Phương pháp sản xuất axit fumaric theo mục bất kỳ trong số các mục từ <1> đến <5>, trong đó nuôi cấy vi sinh vật có năng suất axit fumaric được thực hiện dưới điều kiện sục khí tốt hơn là 0,1 vvm hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 0,2 vvm hoặc lớn hơn; và tốt hơn là 2 vvm hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 1 vvm hoặc nhỏ hơn; ở nhiệt độ tốt hơn là 20°C hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 30°C hoặc lớn hơn; và tốt hơn là 40°C hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 37°C hoặc nhỏ hơn.

<7> Phương pháp sản xuất axit fumaric theo mục bất kỳ trong số các mục từ <1> đến <6>, trong đó nuôi cấy vi sinh vật có năng suất axit fumaric tốt hơn là được thực hiện cùng với quá trình trung hòa bằng cách sử dụng chất trung hòa.

<8> Phương pháp sản xuất axit fumaric theo mục <7>, trong đó chất trung hòa tốt hơn là hydroxit của kim loại kiềm hoặc kim loại kiềm thổ, cacbonat của kim loại kiềm hoặc kim loại kiềm thổ, hợp chất amoni, và hỗn hợp của chúng; tốt hơn nữa là một hoặc nhiều chất trung hòa được chọn từ natri hydroxit, kali hydroxit, canxi hydroxit, natri cacbonat, kali cacbonat, canxi cacbonat, magie cacbonat, dung dịch amoniac, amoni cacbonat, và amoni bicarbonat; tốt hơn nữa là một hoặc nhiều chất trung hòa được chọn từ natri hydroxit, natri cacbonat, và kali cacbonat; tốt hơn nữa là natri hydroxit.

<9> Phương pháp sản xuất axit fumaric theo mục bất kỳ trong số các mục từ <1> đến <8>, trong đó lượng của một hoặc nhiều chất được chọn từ axit fumaric và fumarat trong môi trường nuôi cấy thu được ở bước (1) tốt hơn là 0,5% khối lượng hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 1% khối lượng hoặc lớn hơn; và tốt hơn là 20% khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 10% khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 3% khối lượng hoặc nhỏ hơn.

<10> Phương pháp sản xuất axit fumaric theo mục bất kỳ trong số các mục từ <1> đến <9>, trong đó chất hoạt động bề mặt không ion tốt hơn là một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt được chọn từ glycerin este của axit béo, propylen glycol este của axit béo, sorbitan este của axit béo, polyoxyetylen sorbitan este của axit béo, sucroza este của axit béo, polyoxyetylen sorbitol este của axit béo,

polyoxyetylen alkyl ete, polyoxyetylen alkenyl ete, polyoxyetylen polyoxypropylen glycol, polyoxyetylen polyoxypropylen alkyl ete, polyoxyetylen polyoxypropylen alkenyl ete, polyetylen glycol este của axit béo, dầu thầu dầu polyoxyetylen, dầu thầu dầu polyoxyetylen được hydro hóa, và polyglyxerol este của axit béo; tốt hơn nữa là một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt được chọn từ polyoxyetylen alkyl ete, polyoxyetylen sorbitan este của axit béo, dầu thầu dầu polyoxyetylen được hydro hóa, polyoxyetylen sorbitol este của axit béo, và polyoxyetylen polyoxypropylen alkyl ete; và tốt hơn nữa là một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt được chọn từ polyoxyetylen alkyl ete, polyoxyetylen sorbitan este của axit béo.

<11> Phương pháp sản xuất axit fumaric theo mục bất kỳ trong số các mục từ <1> đến <10>, trong đó HLB của chất hoạt động bề mặt không ion tốt hơn là 6 hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 10 hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 12 hoặc lớn hơn; tốt hơn là 20 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 19 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 17 hoặc nhỏ hơn; và tốt hơn là từ 6 đến 20, tốt hơn nữa là từ 10 đến 19, và tốt hơn nữa là từ 12 đến 17.

<12> Phương pháp sản xuất axit fumaric theo mục bất kỳ trong số các mục từ <1> đến <11>, trong đó chất hoạt động bề mặt lưỡng tính tốt hơn là một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt được chọn từ chất hoạt động bề mặt amidobetain, chất hoạt động bề mặt amit axit amin, chất hoạt động bề mặt alkyl betain, chất hoạt động bề mặt sulfobetain, chất hoạt động bề mặt imidazolinium betain, và chất hoạt động bề mặt phosphobetain; tốt hơn nữa là một hoặc nhiều chất hoạt

động bề mặt được chọn từ chất hoạt động bề mặt alkyl betain, và chất hoạt động bề mặt sulfobetain; tốt hơn nữa là axit alkyldimetylamin axetic betain.

<13> Phương pháp sản xuất axit fumaric theo mục bất kỳ trong số các mục từ <1> đến <12>, trong đó chất hoạt động bề mặt tốt hơn là chất hoạt động bề mặt không ion, tốt hơn nữa là chất hoạt động bề mặt không ion có HLB là 12 hoặc lớn hơn.

<14> Phương pháp sản xuất axit fumaric theo mục bất kỳ trong số các mục từ <1> đến <13>, trong đó bước (2) tốt hơn là bước kết tinh axit fumaric từ môi trường nuôi cấy có chứa một hoặc nhiều chất được chọn từ axit fumaric và fumarat thu được ở bước (1) với sự có mặt của một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt được chọn từ chất hoạt động bề mặt không ion và chất hoạt động bề mặt lưỡng tính, hoặc bước tách một hoặc nhiều chất được chọn từ axit fumaric và fumarat thu được ở bước (1) từ môi trường nuôi cấy, và sau đó kết tinh axit fumaric lần nữa từ dung dịch chứa nước có chứa một hoặc nhiều chất được chọn từ axit fumaric và fumarat với sự có mặt của một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt được chọn từ chất hoạt động bề mặt không ion và chất hoạt động bề mặt lưỡng tính; tốt hơn nữa là bước kết tinh axit fumaric từ môi trường nuôi cấy có chứa một hoặc nhiều chất được chọn từ axit fumaric và fumarat thu được ở bước (1) với sự có mặt của một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt được chọn từ chất hoạt động bề mặt không ion và chất hoạt động bề mặt lưỡng tính.

<15> Phương pháp sản xuất axit fumaric theo mục bất kỳ trong số các mục từ <1> đến <14>, trong đó lượng chất hoạt động bề mặt được sử dụng tốt hơn là

0,0001 hoặc lớn hơn, và tốt hơn là 1 hoặc nhỏ hơn so với một hoặc nhiều chất được chọn từ axit fumaric và fumarat.

<16> Phương pháp sản xuất axit fumaric theo mục bất kỳ trong số các mục từ <1> đến <14>, trong đó tổng nồng độ của các chất hoạt động bề mặt trong môi trường nuôi cấy hoặc dung dịch chứa nước có chứa một hoặc nhiều chất được chọn từ axit fumaric và fumarat tốt hơn là 0,0001% khối lượng hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 0,001% khối lượng hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 0,01% khối lượng hoặc lớn hơn ; tốt hơn là 5% khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 2% khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 1% khối lượng hoặc nhỏ hơn; và tốt hơn là từ 0,0001 đến 5% khối lượng, tốt hơn nữa là từ 0,001 đến 2% khối lượng, tốt hơn nữa là từ 0,01 đến 1% khối lượng.

<17> Phương pháp sản xuất axit fumaric theo mục bất kỳ trong số các mục từ <1> đến <16>, trong đó phương pháp kết tinh axit fumaric tốt hơn là một hoặc nhiều phương pháp được chọn từ kết tinh bằng cách điều chỉnh pH, kết tinh bằng cách làm mát, và kết tinh bằng cách cô đặc.

<18> Phương pháp sản xuất axit fumaric theo mục <17>, trong đó axit được sử dụng để kết tinh bằng cách điều chỉnh pH tốt hơn là axit vô cơ có pKa thấp hơn của axit fumaric, tốt hơn nữa là axit clohydric, axit nitric, axit sulfuric, hoặc axit phosphoric, tốt hơn nữa là axit sulfuric hoặc axit clohydric.

<19> Phương pháp sản xuất axit fumaric theo mục <18>, trong đó tốc độ bổ sung của axit tốt hơn là 0,1 [mmol axit/L của môi trường nuôi cấy/phút] hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 0,3 [mmol axit/L của môi trường nuôi cấy/phút] hoặc lớn

hơn; và tốt hơn là 20 [mmol axit/L của môi trường nuôi cấy/phút] hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 10 [mmol axit/L của môi trường nuôi cấy/phút] hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 5 [mmol axit/L của môi trường nuôi cấy/phút] hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 3 [mmol axit/L của môi trường nuôi cấy/phút] hoặc nhỏ hơn.

<20> Phương pháp sản xuất axit fumaric theo mục bất kỳ trong số các mục từ <17> đến <19>, trong đó kết tinh bằng cách điều chỉnh pH được thực hiện bằng cách điều chỉnh pH đến tốt hơn là 3,5 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 3 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 2,5 hoặc nhỏ hơn; và tốt hơn là 0,5 hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 1 hoặc lớn hơn.

<21> Phương pháp sản xuất axit fumaric theo mục bất kỳ trong số các mục từ <17> đến <20>, trong đó kết tinh bằng cách điều chỉnh pH được thực hiện tốt hơn là sau khi làm mát môi trường nuôi cấy; và sự kết tinh được thực hiện sau khi làm mát môi trường nuôi cấy đến tốt hơn nữa là 35°C hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 30°C hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 25°C hoặc nhỏ hơn; và còn tốt hơn là 0°C hoặc lớn hơn, cũng tốt hơn nữa là 4°C hoặc lớn hơn.

<22> Phương pháp sản xuất axit fumaric theo mục bất kỳ trong số các mục từ <17> đến <21>, trong đó kết tinh bằng cách điều chỉnh pH được thực hiện tốt hơn là bằng cách làm mát môi trường nuôi cấy đến 25°C hoặc nhỏ hơn, và sau đó bổ sung axit để điều chỉnh pH đến 3 hoặc nhỏ hơn.

<23> Phương pháp sản xuất axit fumaric theo mục <17>, trong đó kết tinh bằng cách làm mát được thực hiện tốt hơn là sau khi đun nóng môi trường nuôi cấy; và sự kết tinh được thực hiện sau khi đun nóng môi trường nuôi cấy đến tốt

hơn nữa là 40°C hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 55°C hoặc lớn hơn; và còn tốt hơn là 100°C hoặc nhỏ hơn.

<24> Phương pháp sản xuất axit fumaric theo mục <17> hoặc <23>, trong đó kết tinh bằng cách làm mát được thực hiện tốt hơn là sau khi đun nóng môi trường nuôi cấy, và sau đó bổ sung axit để điều chỉnh pH đến tốt hơn là 3,5 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 3 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 2,5 hoặc nhỏ hơn; và còn tốt hơn là 0,5 hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 1 hoặc lớn hơn.

<25> Phương pháp sản xuất axit fumaric theo mục <17>, <23>, hoặc <24>, trong đó kết tinh bằng cách làm mát được thực hiện bằng cách làm mát môi trường nuôi cấy đến tốt hơn là 35°C hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 30°C hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 25°C hoặc nhỏ hơn; và còn tốt hơn là 0°C hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 4°C hoặc lớn hơn.

<26> Phương pháp sản xuất axit fumaric theo mục bất kỳ trong số các mục từ <17>, và <23> đến <25>, trong đó tốc độ làm mát được tính dựa trên thời gian cần thiết để đạt đến nhiệt độ làm mát từ khi bắt đầu từ nhiệt độ nuôi cấy hoặc nhiệt độ gia nhiệt tốt hơn là 0,05 [°C/phút] hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 0,1 [°C/phút] hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 0,2 [°C/phút] hoặc lớn hơn; và tốt hơn là 10 [°C/phút] hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 5 [°C/phút] hoặc nhỏ hơn.

<27> Phương pháp sản xuất axit fumaric theo mục bất kỳ trong số các mục từ <17>, và <23> đến <26>, trong đó kết tinh bằng cách làm mát được thực hiện tốt hơn là bằng cách đun nóng môi trường nuôi cấy đến 55°C hoặc lớn hơn, sau đó bổ sung axit để thu được pH 3 hoặc nhỏ hơn, và sau đó làm mát đến 25°C

hoặc nhỏ hơn.

<28> Phương pháp sản xuất axit fumaric theo mục <17>, trong đó kết tinh bằng cách cô đặc được thực hiện tốt hơn là sau khi bổ sung axit cho môi trường nuôi cấy để điều chỉnh pH đến tốt hơn là 3,5 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 3 hoặc nhỏ hơn, và tốt hơn nữa là 2,5 hoặc nhỏ hơn; và còn tốt hơn là 0,5 hoặc lớn hơn, và tốt hơn nữa là 1 hoặc lớn hơn.

<29> Phương pháp sản xuất axit fumaric theo mục bất kỳ trong số các mục từ <1> đến <28>, trong đó nhiệt độ làm mát của môi trường nuôi cấy khi hoàn thành của sự kết tinh axit fumaric tốt hơn là 35°C hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 30°C hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 25°C hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 20°C hoặc nhỏ hơn; và còn tốt hơn là 0°C hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 4°C hoặc lớn hơn.

<30> Phương pháp sản xuất axit fumaric theo mục bất kỳ trong số các mục từ <1> đến <29>, trong đó pH của môi trường nuôi cấy khi hoàn thành sự kết tinh axit fumaric tốt hơn là 3,5 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 3 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 2,5 hoặc nhỏ hơn; và còn tốt hơn là 0,5 hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 1 hoặc lớn hơn.

<31> Phương pháp sản xuất axit fumaric theo mục bất kỳ trong số các mục từ <1> đến <30>, trong đó độ hấp thụ của axit fumaric thu được bằng phương pháp của sáng chế ở bước sóng là 400 nm được đo bằng phương pháp được nêu trong các ví dụ ở đây tốt hơn là 0,02 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 0,015 hoặc nhỏ hơn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Nấm sợi nấm mốc chủng Rhizopus

Chủng vi khuẩn được sử dụng là nấm sợi nấm mốc chủng Rhizopus delemar JCM5557 thu được từ Viện Kỹ thuật và Đo lường Quốc gia Nhật Bản (NITE).

Chất hoạt động bề mặt

Các chất hoạt động bề mặt được sử dụng như sau.

Chất hoạt động bề mặt không ion

Polyoxyetylen (6) lauryl ete: EMULGEN (nhãn hiệu đã đăng ký) 108, có HLB được tính từ giá trị vô cơ và giá trị hữu cơ là 10,3 (HLB được ghi trong danh mục liệt kê: 12,1), được sản xuất bởi Kao Corporation.

Polyoxyetylen (12) lauryl ete: EMULGEN 120, có HLB được tính từ giá trị vô cơ và giá trị hữu cơ là 13,1 (HLB được ghi trong danh mục liệt kê: 15,3), được sản xuất bởi Kao Corporation.

Polyoxyetylen (47) lauryl ete: EMULGEN 150, có HLB được tính từ giá trị vô cơ và giá trị hữu cơ là 16,8 (HLB được ghi trong danh mục liệt kê: 18,4), được sản xuất bởi Kao Corporation.

Polyoxyetylen (20) sorbitan monolaurat, có HLB được tính từ giá trị vô cơ và giá trị hữu cơ là 14,9 (HLB được ghi trong danh mục liệt kê: 16,7), được sản xuất bởi Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

Polyoxyetylen (20) sorbitan monooleat, có HLB được tính từ giá trị vô cơ và giá trị hữu cơ là 13,5 (HLB được ghi trong danh mục liệt kê: 15,0), được sản xuất bởi Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

Polyoxyetylen polyoxypropylen (C12-C14) alkyl ete: EMULGEN LS-114, có HLB được tính từ giá trị vô cơ và giá trị hữu cơ là 14, được sản xuất bởi Kao Corporation.

Polyoxyetylen (60) dầu thầu dầu được hydro hóa: EMANON CH-60(K), có HLB được tính từ giá trị vô cơ và giá trị hữu cơ là 13,6, được sản xuất bởi Kao Corporation.

Polyoxyetylen (60) sorbitol tetraoleat: RHEODOL 460V, có HLB được tính từ giá trị vô cơ và giá trị hữu cơ là 11,7, được sản xuất bởi Kao Corporation. Số trong ngoặc đơn là số phân tử gam EO trung bình được thêm vào.

Chất hoạt động bề mặt lưỡng tính

Axit lauryldimetylamin axetic betain: AMPHITOL 20BS, được sản xuất bởi Kao Corporation.

3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat: CHAPS, được sản xuất bởi DOJINDO LABORATORIES.

Chất hoạt động bề mặt anion

Natri lauryl sulfat: EMAL 0, được sản xuất bởi Kao Corporation (Ví dụ so sánh).

Chất hoạt động bề mặt cation

Hexadexyltrimetyl amoni bromua, được sản xuất bởi Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Ví dụ so sánh).

Đánh giá về tông màu

Cho 0,2 g axit fumaric khô, 4 mL NaOH 1 mol/L được thêm vào để hòa tan

axit fumaric, và sau đó đo độ hấp thụ ở bước sóng 400 nm bằng cách sử dụng pin thạch anh có độ dài quang trình là 1 cm (máy phân tích quang phổ tử ngoại khả kiến UV-VIS UV-1800, được sản xuất bởi SHIMADZU CORPORATION). Khi độ hấp thụ nhỏ hơn, kết quả được đánh giá là thuận lợi về tông màu.

Ví dụ 1

(1) môi trường nuôi cấy thu được

Cho 15 L môi trường nuôi cấy dịch thể (4% khối lượng glucoza, 0,025% khối lượng magie sulfat heptahydrat, 0,009% khối lượng kẽm sulfat heptahydrat, 0,1% khối lượng amoni sulfat), nấm mốc chủng *Rhizopus* được cấy, và việc nuôi cấy khuấy sục khí được thực hiện trong 12 giờ dưới các điều kiện pH 4, nhiệt độ của môi trường 35°C, tốc độ khuấy 200 vòng/phút (lưỡi khuấy: 1/2 lưỡi đĩa tuabin), và sục khí 0,6 vvm. Trong khi nuôi cấy, pH được điều chỉnh đến 4 bằng cách sử dụng natri hydroxit có nước.

Khi sự nuôi cấy được hoàn thành, các tế bào nấm được loại bỏ bằng cách lọc môi trường nuôi cấy sử dụng hệ thống lọc màng có kích thước lỗ 0,2 μm để thu được môi trường nuôi cấy chứa 2,23% khối lượng axit fumaric hoặc muối của nó. Độ pH của môi trường nuôi cấy là 4,0.

(2) Sự kết tinh của axit fumaric

Sự kết tinh của axit fumaric được thực hiện trong lò phản ứng hai vỏ (đường kính của lò phản ứng: 7,5 cm) có thể tích bên trong 600 mL được trang bị một lưỡi neo có đường kính lưỡi 7 cm với tốc độ khuấy 200 vòng/phút.

Đầu tiên, 450 g môi trường nuôi cấy thu được ở (1) nêu trên được gia nhiệt

đến 60°C. Sau đó, 0,45 g EMULGEN 108 được thêm vào, và sau đó axit sulfuric được thêm vào để điều chỉnh độ pH đến 2,2. Sau đó, môi trường nuôi cấy được làm mát đến 5°C với tốc độ làm mát 0,6°C/phút để kết tinh axit fumaric. Sau đó, huyền phù axit fumaric trong đó axit fumaric kết tinh được lọc bằng cách hấp thụ bằng giấy lọc số 2 (được sản xuất bởi ADVANTECH CO., LTD., áp dụng tương tự sau đây), và sau đó 200 g nước trao đổi ion được thêm vào để lọc rửa. Một bánh axit fumaric sau khi lọc được làm khô ở 105°C để thu được axit fumaric. Độ hấp thụ của axit fumaric tinh khiết ở bước sóng 400 nm là 0,015.

Ví dụ 2 đến 17

Axit fumaric thu được ở cách tương tự như Ví dụ 1, không kể các loại và nồng độ của các chất hoạt động bề mặt, pH, tốc độ khuấy, tốc độ làm mát, và nhiệt độ làm mát được thay đổi như được thể hiện ở Bảng 1. Hơn nữa, độ hấp thụ của axit fumaric tinh khiết ở bước sóng 400 nm cũng như được thể hiện ở Bảng 1.

Ví dụ 18

Sự kết tinh của axit fumaric được thực hiện trong lò phản ứng hai vỏ (đường kính của lò phản ứng: 7,5 cm) có thể tích bên trong 600 mL được trang bị một lưỡi neo có đường kính lưỡi 7 cm với tốc độ khuấy 200 vòng/phút.

Đầu tiên, 450 g môi trường nuôi cấy thu được ở Ví dụ 1(1) nêu trên được gia nhiệt đến 60°C, và sau đó axit sulfuric được thêm vào để điều chỉnh độ pH đến 2,0. Sau đó, môi trường nuôi cấy được làm mát đến 5°C với tốc độ làm mát

0,6°C/phút để kết tinh axit fumaric. Sau đó, huyền phù axit fumaric trong đó axit fumaric kết tinh được lọc bằng cách hấp thụ sử dụng giấy lọc số 2 (được sản xuất bởi ADVANTECH CO., LTD., áp dụng tương tự sau đây), và sau đó 200 g nước trao đổi ion được thêm vào để lọc rửa. Một bánh axit fumaric sau khi lọc được làm khô ở 105°C để thu được axit fumaric. Độ hấp thụ của axit fumaric ở bước sóng 400 nm là 0,026.

Đối với nước trao đổi ion, axit fumaric nêu trên được thêm vào để thu được lên đến 300 g, sau đó được đổ vào lò phản ứng hai vỏ (đường kính của lò phản ứng: 7,5 cm) có thể tích bên trong 600 mL được trang bị một lưỡi neo có đường kính lưỡi 7 cm, và được khuấy ở tốc độ khuấy 200 vòng/phút. Hỗn hợp được gia nhiệt đến 60°C. Sau đó, 0,45 g EMULGEN 108 được thêm vào. Sau đó, dung dịch chứa nước axit fumaric được làm mát đến 5°C ở tốc độ làm mát 0,6°C/phút để kết tinh axit fumaric. Sau đó, huyền phù axit fumaric được lọc bằng cách hấp thụ sử dụng giấy lọc số 2 (được sản xuất bởi ADVANTECH CO., LTD., áp dụng tương tự sau đây). Một bánh axit fumaric sau khi lọc được làm khô ở 105°C để thu được tinh thể axit fumaric không màu.

Ví dụ so sánh 1

Sự kết tinh của axit fumaric được thực hiện trong lò phản ứng hai vỏ (đường kính của lò phản ứng: 7,5 cm) có thể tích bên trong 600 mL được trang bị một lưỡi neo có đường kính lưỡi 7 cm với tốc độ khuấy 200 vòng/phút.

Đầu tiên, 450 g môi trường nuôi cấy thu được ở Ví dụ 1(1) nêu trên được gia nhiệt đến 60°C, và sau đó axit sulfuric được thêm vào để điều chỉnh độ pH

đến 2,0. Sau đó, môi trường nuôi cấy được làm mát đến 5°C ở tốc độ làm mát 0,6°C/phút để kết tinh axit fumaric. Sau đó, huyền phù axit fumaric trong đó axit fumaric kết tinh được lọc bằng cách hấp thụ sử dụng giấy lọc số 2 (được sản xuất bởi ADVANTECH CO., LTD., áp dụng tương tự sau đây), và sau đó 200 g nước trao đổi ion được thêm vào để lọc rửa. Một bánh axit fumaric sau khi lọc được làm khô ở 105°C để thu được axit fumaric. Độ hấp thụ của axit fumaric tinh khiết ở 400 nm là 0,026.

Ví dụ so sánh 2

Cho 500 g môi trường nuôi cấy thu được ở Ví dụ 1(1) nêu trên, 0,5 g than hoạt tính (SHIRASAGI WH2C8/32 có hạt, được sản xuất bởi Japan EnviroChemicals, Ltd.) được thêm vào để thực hiện xử lý hấp thụ. Xử lý bằng than hoạt tính được thực hiện bằng cách trộn lắc 100 vòng/phút ở 25°C trong 24 giờ. Sau khi xử lý hấp thụ, than hoạt tính được loại bỏ bằng cách lọc môi trường nuôi cấy sử dụng hệ thống lọc màng có kích thước lỗ 0,2 µm. Sau đó, nồng độ của axit fumaric hoặc muối của nó là 2,21% khối lượng.

Sự kết tinh của axit fumaric được thực hiện trong lò phản ứng hai vỏ (đường kính của lò phản ứng: 7,5 cm) có thể tích bên trong 600 mL được trang bị một lưỡi neo có đường kính lưỡi 7 cm với tốc độ khuấy 200 vòng/phút.

Đầu tiên, 450 g môi trường nuôi cấy được xử lý bằng than hoạt tính được gia nhiệt đến 60°C, và sau đó axit sulfuric được thêm vào để điều chỉnh độ pH đến 2,2. Sau đó, môi trường nuôi cấy được làm mát đến 5°C ở tốc độ làm mát 0,6°C/phút để kết tinh axit fumaric. Sau đó huyền phù axit fumaric trong đó axit

fumaric kết tinh được lọc bằng cách hấp thụ sử dụng giấy lọc số 2 (được sản xuất bởi ADVANTECH CO., LTD., áp dụng tương tự sau đây), và sau đó 200 g nước trao đổi ion được thêm vào để lọc rửa. Một bánh axit fumaric sau khi lọc được làm khô ở 105°C để thu được axit fumaric. Độ hấp thụ của axit fumaric tinh khiết ở 400 nm là 0,021.

Ví dụ so sánh 3

Sự kết tinh của axit fumaric được thực hiện trong lò phản ứng hai vỏ (đường kính của lò phản ứng: 7,5 cm) có thể tích bên trong 600 mL được trang bị một lưỡi neo có đường kính lưỡi 7 cm với tốc độ khuấy 200 vòng/phút.

Đầu tiên, 450 g môi trường nuôi cấy thu được ở Ví dụ 1(1) nêu trên được gia nhiệt đến 60°C. Sau đó, 0,45 g EMAL 0 được bổ sung, và axit sulfuric được thêm vào để điều chỉnh độ pH đến 2,1. Sau đó, môi trường nuôi cấy được làm mát đến 5°C ở tốc độ làm mát 0,6°C/phút để kết tinh axit fumaric. Sau đó huyền phù axit fumaric trong đó axit fumaric kết tinh được lọc bằng cách hấp thụ sử dụng giấy lọc số 2 (được sản xuất bởi ADVANTECH CO., LTD., áp dụng tương tự sau đây), và sau đó 200 g nước trao đổi ion được thêm vào để lọc rửa. Một bánh axit fumaric sau khi lọc được làm khô ở 105°C để thu được axit fumaric. Cho 0,2 g axit fumaric khô, 4 mL NaOH 1 mol/L được thêm vào để hòa tan axit fumaric, tuy nhiên, axit fumaric không được hòa tan hoàn toàn và thu được chất lỏng đục màu vàng. Độ hấp thụ của chất lỏng ở bước sóng là 400 nm là 2,0.

Ví dụ so sánh 4

Sự kết tinh của axit fumaric được thực hiện trong lò phản ứng hai vỏ

(đường kính của lò phản ứng: 7,5 cm) có thể tích bên trong 600 mL được trang bị một lưỡi neo có đường kính lưỡi 7 cm với tốc độ khuấy 200 vòng/phút.

Đầu tiên, 450 g môi trường nuôi cấy thu được ở Ví dụ 1(1) nêu trên được gia nhiệt đến 60°C. Sau đó, 0,45 g hexadexyltrimetyl amoni bromua được thêm vào, và sau đó axit sulfuric được thêm vào để điều chỉnh độ pH đến 2,2. Sau đó, môi trường nuôi cấy được làm mát đến 5°C ở tốc độ làm mát 0,6°C/phút để kết tinh axit fumaric. Sau đó huyền phù axit fumaric trong đó axit fumaric kết tinh được lọc với sự hấp thụ sử dụng giấy lọc số 2 (được sản xuất bởi ADVANTECH CO., LTD., áp dụng tương tự sau đây), và sau đó 200 g nước trao đổi ion được thêm vào để lọc rửa. Một bánh axit fumaric sau khi lọc được làm khô ở 105°C để thu được axit fumaric. Độ hấp thụ của axit fumaric tinh khiết ở 400 nm là 0,044.

Bảng 1

(g)	Ví dụ 1	Ví dụ 2	Ví dụ 3	Ví dụ 4	Ví dụ 5	Ví dụ 6	Ví dụ 7	Ví dụ 8	Ví dụ 9	Ví dụ 10	Ví dụ 11	Ví dụ 12	Ví dụ 13	Ví dụ 14	Ví dụ 15	Ví dụ 16	Ví dụ 17	Ví dụ so sánh 1	Ví dụ so sánh 3	Ví dụ so sánh 4
Môi trường nuôi cấy	450	450	450	450	450	450	450	450	450	450	450	450	450	450	450	450	450	450	450	450
47% Axit sulfuric	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	27	10	13	13	13	13	13
Polyoxyetylen (6) lauryl ete : EMULGEN 108	0,45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Polyoxyetylen (12) lauryl ete : EMULGEN 120	-	0,45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Polyoxyetylen (47) lauryl ete : EMULGEN 150	-	-	0,45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Polyoxyetylen (20) sorbitan- monolaurat	-	-	-	0,45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[illegible]

[illegible]

[illegible]

Ví dụ 19

(1) Môi trường nuôi cấy thu được

Môi trường nuôi cấy thu được bằng cách nuôi cấy chủng *Rhizopus* sp. theo cách tương tự với cách của Ví dụ 1.

(2) Sự kết tinh của axit fumaric

Sự kết tinh của axit fumaric được thực hiện trong lò phản ứng hai vỏ (đường kính của lò phản ứng: 7,5 cm) có thể tích bên trong 600 mL được trang bị một lưỡi neo có đường kính lưỡi 7 cm với tốc độ khuấy 200 vòng/phút theo cách tương tự như ở Ví dụ 1.

Đầu tiên, cho 450 g môi trường nuôi cấy thu được ở (1) nêu trên, 0,45 g EMULGEN 120 được thêm vào, và sau đó được làm mát đến 5°C. Sau đó, axit fumaric được kết tinh bằng cách thêm axit sulfuric ở tốc độ bổ sung 0,5 [mmol H₂SO₄/L của môi trường nuôi cấy/phút] để thu được độ pH 2,3. Sau đó, huyền phù axit fumaric trong đó axit fumaric kết tinh được lọc bằng cách hấp thụ sử dụng giấy lọc số 2 (được sản xuất bởi ADVANTECH CO., LTD., áp dụng tương tự sau đây), và sau đó 200 g nước trao đổi ion được thêm vào để lọc rửa. Một bánh axit fumaric sau khi lọc được làm khô ở 105°C để thu được axit fumaric. Độ hấp thụ của axit fumaric tinh khiết ở 400 nm là 0,015.

Ví dụ 20

Axit fumaric thu được theo cách tương tự như ở Ví dụ 19, không kể pH và tốc độ bổ sung axit được thay đổi như được thể hiện ở Bảng 2. Hơn nữa, độ hấp thụ của axit fumaric tinh khiết ở 400 nm cũng tương tự như được thể hiện ở

Bảng 2.

Ví dụ so sánh 5

Sự kết tinh của axit fumaric được thực hiện trong lò phản ứng hai vỏ (đường kính của lò phản ứng: 7,5 cm) có thể tích bên trong 600 mL được trang bị một lưỡi neo có đường kính lưỡi 7 cm với tốc độ khuấy 200 vòng/phút theo cách tương tự như ở Ví dụ 1.

Đầu tiên, 450 g môi trường nuôi cấy thu được ở (1) nêu trên được làm mát đến 5°C. Sau đó, axit fumaric được kết tinh bằng cách thêm axit sulfuric ở tốc độ bổ sung là 5,5 [mmol H₂SO₄/L của môi trường nuôi cấy/phút] để thu được độ pH 2,2. Sau đó huyền phù axit fumaric trong đó axit fumaric kết tinh được lọc bằng cách hấp thụ sử dụng giấy lọc số 2 (được sản xuất bởi ADVANTECH CO., LTD., áp dụng tương tự sau đây), và sau đó 200 g nước trao đổi ion được thêm vào để lọc rửa. Một bánh axit fumaric sau khi lọc được làm khô ở 105°C để thu được axit fumaric. Độ hấp thụ của axit fumaric tinh khiết ở 400 nm là 0,041.

Bảng 2

(g)		Ví dụ 19	Ví dụ 20	Ví dụ so sánh 5
Môi trường nuôi cấy		450	450	450
47% Axit sulfuric		13	13	13
Polyoxyetylen (12) lauryl ete	EMULGEN 120	0,45	0,45	-
Tốc độ khuấy [vòng/phút]		200	200	200
Nhiệt độ làm mát [°C]		5	5	5

Tốc độ bổ sung của axit sulfuric [mmol H ₂ SO ₄ /L của môi trường nuôi cấy/phút]	0,5	2,7	5,5
pH	2,3	2,1	2,2
Nhiệt độ làm khô [°C]	105	105	105
Độ hấp thụ của axit fumaric	0,015	0,018	0,041

Như được thể hiện ở Bảng 1, màu của axit fumaric được loại bỏ thích hợp bằng phương pháp của sáng chế, và axit fumaric tinh khiết có tông màu thuận lợi. Từ Bảng 2, đã phát hiện ra rằng tốc độ bổ sung axit thấp hơn để kết tinh bằng cách điều chỉnh pH có xu hướng tạo ra tông màu thuận lợi của axit fumaric.

Hơn nữa, theo phương pháp của sáng chế, hiệu quả loại bỏ màu đạt được ngay cả khi một lượng nhỏ chất hoạt động bề mặt được sử dụng.

Mặt khác, khi axit fumaric được tinh chế bằng cách xử lý bằng than hoạt tính ở mức độ áp dụng công nghiệp trước bước kết tinh, màu không được giảm thích hợp. Hơn nữa, khi sử dụng quá mức than hoạt tính, màu của axit fumaric có xu hướng giảm, tuy nhiên, tốc độ phục hồi axit fumaric được giảm đáng kể bằng cách hấp thụ axit fumaric trên than hoạt tính (dữ liệu không được hiển thị).

Do đó, theo phương pháp của sáng chế, axit fumaric có tông màu thuận lợi có thể thu được mà không làm giảm tốc độ phục hồi do xử lý hấp thụ, ví dụ, xử lý hấp thụ thông thường với than hoạt tính.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất axit fumaric, bao gồm các bước (1) và (2) sau đây:

(1) bước nuôi cấy vi sinh vật có năng suất axit fumaric trong môi trường nuôi cấy dịch thể bao gồm nguồn cacbon để thu được một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm axit fumaric và fumarat,

(2) bước kết tinh một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm axit fumaric và fumarat thu được ở bước (1) với sự có mặt của một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt được chọn từ nhóm bao gồm chất hoạt động bề mặt không ion và chất hoạt động bề mặt lưỡng tính.

2. Phương pháp sản xuất axit fumaric theo điểm 1, trong đó vi sinh vật có năng suất axit fumaric là *Rhizopus* sp..

3. Phương pháp sản xuất axit fumaric theo điểm 1, trong đó chất hoạt động bề mặt không ion là chất hoạt động bề mặt không ion có HLB là 10 hoặc lớn hơn.

4. Phương pháp sản xuất axit fumaric theo điểm 3, trong đó chất hoạt động bề mặt không ion có HLB là 10 hoặc lớn hơn là ít nhất một trong các chất hoạt động bề mặt được chọn từ nhóm bao gồm polyoxyetylen alkyl ete, polyoxyetylen sorbitan este của axit béo, dầu thầu dầu polyoxyetylen được hydro hóa, polyoxyetylen sorbitol este của axit béo, và polyoxyetylen polyoxypropylen alkyl ete.

5. Phương pháp sản xuất axit fumaric theo điểm 1, trong đó tổng nồng độ của các chất hoạt động bề mặt trong môi trường nuôi cấy hoặc dung dịch chứa nước

bao gồm một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm axit fumaric và fumarat là từ 0,0001 đến 5% khối lượng.

6. Phương pháp sản xuất axit fumaric theo điểm 1, trong đó bước (2) còn bao gồm bước điều chỉnh pH của môi trường nuôi cấy bao gồm một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm axit fumaric và fumarat thu được ở bước (1) đến 3,5 hoặc nhỏ hơn.

7. Phương pháp sản xuất axit fumaric theo điểm 1, trong đó phương pháp kết tinh axit fumaric là một hoặc nhiều phương pháp được chọn từ nhóm bao gồm kết tinh bằng cách điều chỉnh pH, kết tinh bằng làm mát, và kết tinh bằng cách cô đặc.

8. Phương pháp sản xuất axit fumaric theo điểm 7, trong đó tốc độ bổ sung của axit được sử dụng cho sự kết tinh bằng cách điều chỉnh pH là từ 0,1 [mmol axit/L của môi trường nuôi cấy/phút] đến 20 [mmol axit/L của môi trường nuôi cấy/phút].

9. Phương pháp sản xuất axit fumaric theo điểm 7, trong đó tốc độ làm mát của sự kết tinh bằng làm mát là từ 0,05 [°C/phút] đến 10 [°C/phút].

10. Phương pháp sản xuất axit fumaric theo điểm 1, còn bao gồm bước (1-A) giữa bước (1) và bước (2), bước (1-A) thêm một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt được chọn từ nhóm bao gồm chất hoạt động bề mặt không ion và chất hoạt động bề mặt lưỡng tính cho môi trường nuôi cấy hoặc dung dịch chứa nước có chứa một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm axit fumaric và fumarat thu được ở bước (1).

11. Phương pháp sản xuất axit fumaric, bao gồm các bước (1) và (2) sau đây:

(1) bước nuôi cấy vi sinh vật có năng suất axit fumaric trong môi trường dịch thể bao gồm nguồn cacbon để thu được một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm axit fumaric và fumarat,

(2) bước kết tinh một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm axit fumaric và fumarat thu được ở bước (1) với sự có mặt của một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt được chọn từ nhóm bao gồm chất hoạt động bề mặt không ion và chất hoạt động bề mặt lưỡng tính; trong đó phương pháp còn bao gồm việc bổ sung một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt được chọn từ nhóm bao gồm chất hoạt động bề mặt không ion và chất hoạt động bề mặt lưỡng tính sau bước (1).

12. Phương pháp sản xuất axit fumaric theo điểm 1, trong đó lượng chất hoạt động bề mặt được sử dụng để kết tinh của axit fumaric là 0,0001 hoặc lớn hơn và 1 hoặc nhỏ hơn so với một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm axit fumaric và fumarat.

13. Phương pháp sản xuất axit fumaric theo điểm 1, trong đó tổng nồng độ của các chất hoạt động bề mặt để kết tinh của axit fumaric là 0,0001% khối lượng hoặc lớn hơn và 5% khối lượng hoặc nhỏ hơn trong môi trường nuôi cấy hoặc dung dịch chứa nước có chứa một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm axit fumaric và fumarat.