



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0035326

(51)⁷ **B01D 11/04; C12P 7/54; C12P 7/52;** (13) **B**
B01D 15/00; C12P 7/40

(21) 1-2017-00251

(22) 17/07/2015

(86) PCT/FR2015/051964 17/07/2015

(87) WO 2016/012698 A1 28/01/2016

(30) 1457201 25/07/2014 FR

(45) 25/04/2023 421

(43) 25/08/2017 353A

(73) AFYREN (FR)

Biopôle Clermont Limagne, 63360 Saint Beaulieu, France

(72) NOUAILLE, Régis (FR).

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

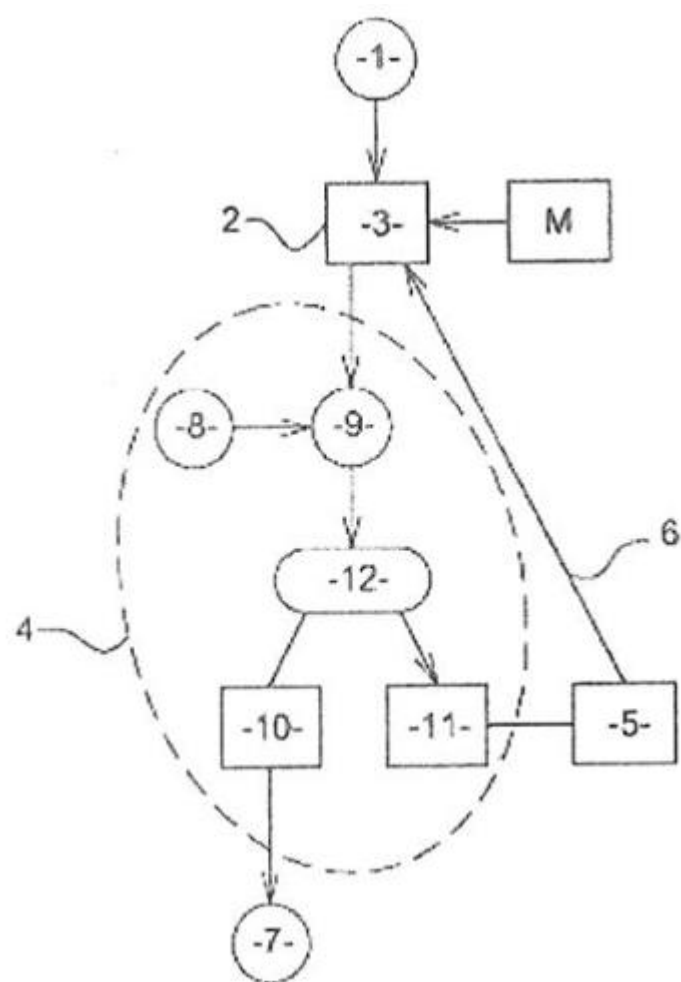
(54) QUY TRÌNH CHIẾT AXIT BÉO DỄ BAY HƠI

(57) Quy trình chiết axit béo dễ bay hơi (volatile fatty acid - VFA), phân tử hữu cơ được gọi là tiền chất được sản xuất bởi vi sinh vật (M) trong bình phản ứng lên men (2) bởi quá trình lên men kỵ khí (3) sử dụng sinh khối có thể lên men (1), các phân tử này là chất chuyển hóa lên men, quy trình này bao gồm ít nhất các bước sau:

-a) lựa chọn phương tiện chiết (8) từ phương tiện chiết ít nhất là không tan được trong môi trường lên men và các điều kiện xử lý của nó bảo toàn được khả năng sản xuất các phân tử này của vi sinh vật (M) có trong môi trường lên men,

-b) cho phương tiện chiết đã chọn (8) tiếp xúc (9) với môi trường lên men mà không làm gián đoạn quá trình lên men (3),

-c) thu hồi (12) các phân tử chiết được, ở độ pH thấp hơn 4,5, bằng phương tiện chiết (8) bên ngoài bình phản ứng lên men (2).



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình chiết các phân tử được tạo ra bởi quá trình lên men kỵ khí từ sinh khối có thể lên men.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thuật ngữ “sinh khối có thể lên men”, trong bản mô tả này có nghĩa là cơ chất hữu cơ, tốt hơn là các sản phẩm phụ và sản phẩm thừa không phải là thức ăn, thu được từ chất thải, cấu tạo từ các nguyên liệu hữu cơ, có nghĩa là sinh khối này thu được từ các hoạt động của con người, cho dù chúng có nguồn gốc từ gia đình, công nghiệp, nông nghiệp, lâm nghiệp, nuôi trồng thủy sản, công nghiệp chế biến nông sản, hoặc từ vật nuôi. Theo ví dụ không giới hạn, có thể kể đến cơ chất hữu cơ, phân xanh, phần hữu cơ của rác trong sinh hoạt, sản phẩm thừa trong lò mổ, phần xenluloza hoặc lignoxenluloza có nguồn gốc từ công nghiệp chế biến nông sản như các phần xenluloza hoặc lignoxenluloza thu được từ việc chế biến mía (bã mía), của hạt hướng dương hoặc đậu nành.

Quá trình lên men kỵ khí là quá trình lên men được tiến hành trong điều kiện hiếm khí do vi sinh vật, sinh vật có nhân điển hình hoặc nhân không điển hình, như vi khuẩn, nấm, tảo hoặc nấm men.

Thuật ngữ phân tử sử dụng trong bản mô tả này chỉ, ưu tiên nhưng không loại trừ, chất chuyển hóa có thể lên men gọi là tiền chất. Các tiền chất này sau đó có thể tạo ra các phân tử có lợi ích về mặt hóa học và/hoặc năng lượng cao hơn, hiểu rằng chúng là phân tử hữu cơ. Các phân tử có lợi ích về mặt hóa học và/hoặc năng lượng cao hơn có thể kể đến là, ví dụ, các phân tử có mạch cacbon gồm có axit, hydrocacbon, metan, este, rượu, amit hoặc polyme.

Trong số tiền chất chuyển hóa có thể lên men được tạo ra trong quá trình lên men, có thể kể đến axit béo dễ bay hơi hoặc VFA, các chất này có thể được chuyển hóa thành, ví dụ, keton, alkan, rượu, alken, hiểu rằng quá trình lên men như vậy cũng tạo ra, cùng với chất khác, este, khí, axit lactic, rượu, hydro và cacbon dioxit.

Patent Mỹ số 6,043,392 bộc lộ quy trình để tạo ra keton bằng cách xử lý nhiệt muối của axit béo dễ bay hơi thu được nhờ quá trình lên men kỵ khí. Một số axit béo dễ bay hơi cũng được chuyển hóa thành hydrocacbon lỏng, aldehyt và rượu. Nó chỉ ra rằng quy trình này được tiến hành trong hai bước riêng biệt, cụ thể là bước lên men và sau đó bước xử lý VFA bằng cách chiết ở dạng muối kết tủa bằng chất chiết amin bậc ba. Cũng đã biết rằng sự tạo ra axit béo dễ bay hơi diễn ra bởi quá trình lên men kỵ khí sẽ gây axit hóa môi trường, điều này bất lợi cho vi sinh vật. Sự axit hóa môi trường sẽ gây ức chế vi sinh vật; do đó, nó sẽ làm chậm hoặc làm dừng quá trình lên men, nên quy trình này cần phải thực hiện theo mẻ. Với mục đích này, các VFA được chiết sau thời gian lên men đã biết, bằng các kỹ thuật đã được biết rõ. Quy trình này do đó không cho phép tạo ra nhanh và liên tục các phân tử được gọi là tiền chất, do hiệu quả là không tối ưu. Quá trình lên men kỵ khí được thiết kế để tạo ra butanol đã được biết từ Patent Mỹ số 4,424,275. Việc chiết được tiến hành liên tục với dung môi chứa clo và flo. EP-A-216 221 bộc lộ phương pháp chiết lỏng/lỏng kết hợp với việc lên men bằng dung môi không độc đối với vi sinh vật. Các quy trình như vậy sẽ tiêu thụ các chủng vi sinh vật và tạo ra ít hoặc không tạo ra chất thải tái chế được.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất một quy trình chiết khác có thể sản xuất, theo cách liên tục, tương thích sinh học, ổn định, và có kiểm soát, với mức chất thải giá trị thấp tối thiểu, các phân tử đa dạng, được gọi là tiền chất, thu được bằng quá trình lên men kỵ khí.

Kết quả là, đối tượng của sáng chế là quy trình chiết axit béo dễ bay hơi (VFA-volatile fatty acid), các phân tử hữu cơ được gọi là tiền chất được sản xuất bởi vi sinh vật trong bình phản ứng lên men bởi quá trình lên men kỵ khí bằng sinh khối có thể lên men, các phân tử này là chất chuyển hóa lên men, đặc trưng ở chỗ quy trình này bao gồm ít nhất các bước sau:

- a) lựa chọn phương tiện chiết từ phương tiện, ít nhất là, không tan được trong môi trường lên men và điều kiện xử lý của nó bảo toàn khả năng sản xuất các phân tử này của vi sinh vật có mặt trong môi trường lên men,

- b) cho phương tiện chiết đã chọn tiếp xúc với môi trường lên men mà không làm gián đoạn quá trình lên men,

- c) thu hồi phân tử đã chiết được, ở độ pH thấp hơn 4,5, bằng phương tiện chiết bên ngoài bình phản ứng lên men.

Quy trình như vậy có thể chiết liên tục các phân tử, cụ thể là các tiền chất chuyển hóa, như axit béo dễ bay hơi, trong khi vẫn bảo toàn khả năng sản xuất của vi sinh vật có trong bình phản ứng sinh học. Trên thực tế, bước chiết có thể không chỉ thu thập liên tục các phân tử được tạo ra trong bình phản ứng lên men, mà còn bảo toàn vi sinh vật chịu trách nhiệm cho việc sản xuất này, bước chiết được tiến hành trong các điều kiện không gây chết cho tất cả vi sinh vật, có nghĩa là trong các điều kiện chiết tương thích sinh học. Theo cách này, các vấn đề liên quan đến sự tích tụ tiền chất trong bình phản ứng lên men được loại bỏ, ví dụ từ sự axit hóa môi trường lên men bởi sự tích lũy axit béo dễ bay hơi được tạo ra, điều này gây hại cho vi sinh vật. Hoạt tính của vi sinh vật được duy trì ở mức độ cao, gần với mức ban đầu, trong suốt chu trình lên men.

Theo phương án thuận lợi nhưng không bắt buộc của sáng chế, phương pháp này có thể có một hoặc nhiều đặc điểm sau đây:

- Phương tiện chiết là dung môi có điểm sôi thấp hơn 70°C, khi quy trình chiết là kiểu lỏng-lỏng.

- Phương tiện chiết là dung môi có điểm sôi thấp hơn nhiệt độ lên men.

- Phương tiện chiết là dung môi có tỷ trọng thấp hơn tỷ trọng của môi trường lên men.

- Phương tiện chiết là chất rắn, quy trình chiết là kiểu rắn-lỏng.

- Bước đặt môi trường lên men và môi trường chiết tiếp xúc với nhau diễn ra trong bình phản ứng, phương tiện chiết là riêng biệt hoặc không từ môi trường lên men.

- Bước cho môi trường lên men và phương tiện chiết tiếp xúc với nhau diễn ra bên ngoài bình phản ứng, môi trường lên men được lấy mẫu liên tục.

- Bước cho môi trường lên men và phương tiện chiết tiếp xúc với nhau diễn ra bên ngoài bình phản ứng, môi trường lên men được lấy mẫu theo tuần tự.

- Sau bước c) ít nhất một phần của pha lỏng thu được từ bước chiết và được đưa trở lại vào trong bình phản ứng lên men và được kết hợp vào môi trường lên men.

Sáng chế cũng đề cập đến hệ thống thiết bị để thực hiện phương pháp theo một trong các đặc điểm nêu trên, đặc trưng ở chỗ bao gồm ít nhất:

- bình phản ứng lên men,
- bộ phận chiết thích hợp để đảm bảo sự tiếp xúc giữa môi trường lên men và phương tiện chiết.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sáng chế sẽ được hiểu rõ hơn và các thuận lợi của nó sẽ rõ ràng hơn bởi mô tả chi tiết nhiều phương án của sáng chế được đưa ra bằng các ví dụ không giới hạn và tham khảo các hình vẽ sau, trong đó:

- Fig. 1 là sơ đồ đơn giản hóa thể hiện quy trình là đối tượng của sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các bước khác nhau của phương pháp này sẽ được mô tả theo các phương án khác nhau, sẽ hiểu rằng các bước đã biết rõ thì sẽ không được nêu chi tiết. Cụ thể, tham khảo sơ đồ trong Fig. 1 minh họa một phương án thuận lợi của sáng chế.

Đầu tiên, cơ chất 1 được sử dụng thuận lợi là chưa được xử lý, tức là, nó chưa trải qua quy trình xử lý sơ bộ hóa-lý hoặc bằng enzym bất kỳ. Cơ chất 1 này chủ yếu gồm có sinh khối có thể lên men. Theo các ví dụ không giới hạn, có thể kể đến chất thải nông nghiệp hoặc hoa màu (rom, bã mía, thân cây ngô, cỏ, gỗ, mẫu lông cừu vụn), giấy loại (bìa cứng, giấy), thức ăn nông nghiệp thừa, chất thải lò mổ, phần hữu cơ của chất thải sinh hoạt, phân xanh của vật nuôi (phân xanh, nước thải, phân động vật), tảo, chất thải từ nuôi trồng thủy sản, chất thải lâm nghiệp hoặc sản phẩm thừa có thể lên men từ công nghiệp mỹ phẩm. Một số cơ chất chứa các phân tử hữu cơ, như axit hữu cơ, sẽ không gây ảnh hưởng đến, hoặc làm chậm, quy trình lên men. Mặt khác, các phân tử này có thể được tìm thấy trong môi trường lên men và tham gia vào, ví dụ, quá trình tạo ra các phân tử hữu cơ đã xác định cuối cùng.

Cơ chất 1 được đưa vào trong bình phản ứng lên men 2, bình này đã được biết rõ và có kích thước phù hợp với quy trình sản xuất mong muốn, cho dù quy trình này là ở

quy mô phòng thí nghiệm để tiến hành các thử nghiệm hoặc ở quy mô công nghiệp trong trường hợp sản xuất. Nói cách khác, bình phản ứng lên men 2 hoặc bình phản ứng sinh học có thể tích nằm trong khoảng từ cỡ vài lít đến vài trăm mét khối, theo yêu cầu.

Đầu tiên, vi sinh vật được đưa vào một cách thuận lợi trong phản ứng lên men với lượng đủ để khởi động quá trình lên men. Vi sinh vật được chủng ở dạng một tập hợp, minh họa bởi mũi tên M. Thuật ngữ tập hợp để chỉ hỗn hợp hoặc tổ hợp các vi sinh vật, sinh vật có nhân điển hình và nhân không điển hình, có thể là vi khuẩn, nấm men, nấm hoặc tảo. Các vi sinh vật này về cơ bản có nguồn gốc từ hệ sinh thái tự nhiên, thuận lợi nhưng không hạn chế từ hệ sinh thái kỵ khí như là, theo ví dụ không giới hạn, vùng kỵ khí của môi trường thủy sinh như vùng thiếu oxy của một số hồ, đất, đầm lầy, dạ cỏ của động vật nhai lại hoặc ruột mối. Nên chú ý rằng sự phân bố định lượng và định tính của các kiểu và loài vi sinh vật khác nhau trong tổ hợp M chưa được biết chính xác và đặc biệt có thể thay đổi trong khoảng tỷ lệ lớn. Nó chỉ ra rằng sự đa dạng về định tính và định lượng này mang lại độ mạnh và khả năng thích nghi của vi sinh vật đáng ngạc nhiên có thể đảm bảo việc sử dụng tối ưu cơ chất bất kể thành phần của cơ chất và trong các điều kiện lên men thay đổi.

Hơn nữa, khi cơ chất 1 được sử dụng ở dạng nguyên bản của nó, tức là nó chưa được tiệt khuẩn hoặc, thông thường hơn, nó chưa được loại bỏ vi sinh vật mà nó có trước khi được đưa vào trong bình phản ứng sinh học 2, cho thấy là các vi sinh vật đặc hữu với cơ chất 1, trên thực tế, được kết hợp vào trong tổ hợp M hoặc ít nhất kết hợp với tổ hợp M trong bình phản ứng sinh học 2.

Tổ hợp M của vi sinh vật, kết hợp với vi sinh vật có thể có trong cơ chất 1, cho phép quá trình lên men 3 của cơ chất 1, mà không cần bổ sung các sản phẩm như enzym. Hơn nữa, quá trình lên men 3 diễn ra trong điều kiện hiếm khí, cụ thể hơn là khi điện thế oxi hóa khử thấp hơn -300mV, thuận lợi là nằm trong khoảng từ -550mV đến -400mV, và khi độ pH thấp hơn 8, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 4 đến 7. Quá trình lên men 3 thuận lợi được giới hạn ở việc tạo ra tiền chất chuyển hóa có thể lên men, cụ thể là axit béo dễ bay hơi hoặc VFA. Do đó, gây ra phản ứng tương tự với hiện tượng nhiễm axit gặp phải ở động vật nhai lại trong khi sự sản sinh metan gần như bằng 0. Metan

thông thường là một trong các chất chuyển hóa lên men cuối cùng thu được trong quá trình lên men kỵ khí do vi sinh vật có nguồn gốc từ hệ sinh thái tự nhiên.

Bước lên men 3 ban đầu dẫn đến sự tạo ra axit béo dễ bay hơi có từ một đến tám cacbon, chủ yếu là từ hai đến bốn cacbon, như axit axetic, axit propionic và axit butyric. Các axit béo dễ bay hơi mạch dài, cũng có nhiều hơn bốn cacbon, như axit valeric và caproic, heptanoic hoặc octanoic cũng có thể thu được. Bằng cách tiếp tục quá trình lên men và/hoặc tăng lượng vi sinh vật trong bình phản ứng sinh học 2, nếu cần bằng vi sinh vật được chọn, có thể thúc đẩy sự tạo ra các VFA mạch cacbon dài, tức là nhiều hơn bốn cacbon.

Nói cách khác, các chất chuyển hóa tạo ra về lượng trong bước lên men 3 chủ yếu là các axit béo dễ bay hơi có từ hai đến sáu cacbon. Sau đó, bước chiết chủ yếu bao gồm việc chiết các chất chuyển hóa này, dựa trên kiến thức là quy trình này có thể được sử dụng cho các phân tử khác được tạo ra trong các kiểu lên men khác. Bước lên men 3 có thể được tiến hành từng mẻ, liên tục, không liên tục hoặc mẻ bổ sung cơ chất hoặc tốt hơn là, liên tục, trong một hoặc nhiều bình phản ứng lên men được bố trí liên tiếp.

Bước lên men 3 trong tất cả các trường hợp được tiến hành để đảm bảo việc sản xuất các phân tử được nêu, tức là, VFA, trong pha lỏng, sẽ hiểu rằng sáng chế đề cập đến loại phân tử hữu cơ bất kỳ được tạo ra bởi quá trình lên men hoặc chất chuyển hóa, khi chúng được tạo ra ở pha lỏng, càng nhiều càng tốt. Do đó, dễ dàng để nhận thấy rằng môi trường lên men bao gồm pha rắn chứa, ít nhất là ban đầu, phân đoạn rắn của cơ chất 1 cũng như phân đoạn rắn của tổ hợp M chứa vi sinh vật. Pha lỏng của môi trường lên men chứa các phân tử tạo ra trong bước lên men 3 cũng như phân đoạn lỏng của cơ chất 1, ít nhất là khi bắt đầu quá trình lên men.

Thời gian lên men thay đổi, cùng với các yếu tố khác, là hàm của cơ chất 1, vi sinh vật M có mặt và điều kiện lên men. Phổ biến là, thời gian lên men là từ 1 đến 7 ngày, tốt hơn là từ 2 đến 4 ngày. Nồng độ của chất chuyển hóa thu được trong môi trường lên men khi kết thúc giai đoạn này là thay đổi, nhưng, ví dụ đối với axit béo dễ bay hơi, thường là trong khoảng từ 10 đến 20g/L, phụ thuộc vào axit béo dễ bay hơi, dựa trên kiến thức là trong các điều kiện nhất định nó có thể cao hơn 35g/L, ví dụ gần đạt đến mức 50g/L. Khi kết thúc bước lên men 3, độ pH của môi trường lên men là axit,

thường là nằm trong khoảng từ 4 đến 6, do sự có mặt của axit béo dễ bay hơi trong môi trường lên men.

Khi quá trình tạo ra chất chuyển hóa, hoặc các phân tử định trước, trong bản mô tả này là VFA, do bước lên men 3 với cơ chất 1 đạt đến lượng xác định, thường trong giai đoạn ổn định của quá trình lên men, bước chiết 4 các phân tử được bắt đầu. Tốt hơn là, nhưng không bắt buộc, lượng này tương ứng với mức làm chậm sự phát triển của vi sinh vật, và do đó gần ngưỡng ức chế vi sinh vật.

Phương tiện chiết được chọn từ các phương tiện chiết, lỏng hoặc rắn, ít nhất là không tan được trong môi trường lên men. Khi phương tiện chiết là lỏng, và do đó trong trường hợp là dung môi, điểm sôi của dung môi thuận lợi là nhỏ hơn 70°C. Tốt hơn là, tỷ trọng của dung môi này thấp hơn tỷ trọng của môi trường lên men.

Cụ thể hơn, bước chiết 4 được tiến hành bằng phương tiện chiết rắn hoặc lỏng 8, các điều kiện xử lý của nó có thể bảo toàn hoạt tính và/hoặc sự phát triển của vi sinh vật M trong điều kiện lên men đang có trong bình phản ứng sinh học 2 và được xác định để tiến hành bước lên men 3. Các phân tử, và do đó là chất chuyển hóa lên men, tốt hơn là được chiết riêng biệt, hoặc ít nhất được chiết theo từng họ phân tử, từ pha lỏng của môi trường lên men, điều này khiến có thể đạt được hiệu suất tối ưu, cùng với các yếu tố khác, và tạo điều kiện cho quá trình sản xuất hợp chất cụ thể từ các phân tử được chiết này.

Trong tất cả các trường hợp, chất chuyển hóa tạo ra bởi bước lên men 3, ở đây là bước lên men kỵ khí, và chúng được chiết, ít nhất từng phần, trong các điều kiện sao cho bước chiết 4 không phá hủy vi sinh vật M, hoặc ít nhất theo các tỷ lệ không làm thay đổi đáng kể sự liên tục của bước lên men 3 do vi sinh vật M có trong môi trường lên men. Nói cách khác, phương tiện chiết 8 không gây chết cho tất cả vi sinh vật. Bước chiết 4 do đó không gây cản trở hoặc làm suy giảm môi trường lên men cũng như khả năng lên men của vi sinh vật M trong môi trường này. Do đó, bước chiết 4 được tiến hành trong các điều kiện sao cho tương thích sinh học.

Khi các phân tử như axit béo dễ bay hơi được chiết từ môi trường lên men, trên thực tế sự axit hóa môi trường lên men do các axit này được giảm đi. Theo cách này, bước lên men, và do đó là sự sản xuất chất chuyển hóa, tiếp tục trong các điều kiện

tương tự với các điều kiện ban đầu, với độ axit của môi trường lên men được duy trì ở mức thấp.

Thuận lợi là, theo phương pháp chiết đã chọn không gây chết cho tất cả vi sinh vật, phát hiện ra rằng pha lỏng còn dư 5, sau bước chiết 4, có thể chứa vi sinh vật sống M, do đó là vi sinh vật có thể hoạt động. Khi trong pha lỏng 5 có ít axit béo dễ bay hơi hơn ban đầu, độ pH của pha lỏng 5 là kém axit hơn. Do đó, có khả năng được bơm lại pha lỏng còn dư vào trong bình phản ứng lên men 2, như được minh họa bởi mũi tên 6. Do đó, không chỉ là hiện tượng nhiễm axit được giảm và/hoặc độ pH của môi trường lên men bị hạ thấp hơn trong bước lên men 3, mà bằng bước chiết 4 các hợp chất axit, ở một mức độ nhất định môi trường này cũng được cấy vi sinh vật lại để đảm bảo cho bước lên men 3, mà không làm giảm độ pH của môi trường lên men.

Giải pháp như vậy giúp có thể tối ưu hóa hiệu suất của bước lên men 3 và tiến hành quá trình lên men liên tục, bằng cách giảm thời gian lên men, trong khi vẫn hướng đến mức chất thải bằng 0.

Bước chiết 4 được tiến hành liên tục hoặc theo tuần tự, ví dụ một lần chiết trong mỗi 12 giờ. Nói cách khác, có thể tiếp tục bước lên men 3 trong khi vẫn chiết chất chuyển hóa đã tạo ra, hoặc khi chúng được tạo ra hoặc khi đã ổn định. sau khi chiết, chất chuyển hóa được tinh chế và/hoặc được biến đổi thành sản phẩm khác 7, như alkan, alken, amit, amin, este, polyme bằng các kỹ thuật hóa học đã biết rõ như, kỹ thuật chưng cất, tổng hợp, điện tổng hợp, amit hóa hoặc polyme hóa.

Quy trình chiết lỏng/lỏng bằng dung môi hữu cơ phân cực hoặc không phân cực làm phương tiện chiết 8, tốt hơn là, nhưng không hạn chế ở, kiểu chiết lưu.

Cụ thể hơn, khi quy trình chiết là kiểu lỏng-lỏng, hỗn hợp tạo ra chứa dung môi hữu cơ 8 và pha lỏng có nguồn gốc từ môi trường lên men được đưa vào bước tiếp xúc 9, tốt hơn là bằng cách khuấy, để tạo thuận lợi cho việc chuyển pha nước vào pha hữu cơ.

Sau bước tiếp xúc 9, pha hữu cơ 10 và pha nước 11 thuận lợi được tách bằng bước gạn 12. Khi kết thúc bước gạn, pha nước 11 được rút chất chuyển hóa, trong trường hợp này, là axit béo dễ bay hơi, pha hữu cơ 10 được làm đặc chất chuyển hóa, và do đó làm đặc axit béo dễ bay hơi.

Theo một phương án, quá trình chiết không được tiến hành trong một bộ phận riêng biệt với bình phản ứng lên men mà trực tiếp trong bình phản ứng lên men. Dung môi, ví dụ, được đưa vào bằng một dụng cụ kiểu sục được đặt ở phần dưới của bình phản ứng. Theo một phương án biến đổi, bộ phận chiết được lồng vào trong thể tích của bình phản ứng, tạo ra sự kết nối với môi trường lên men.

Do đó có thể đưa lại pha nước 11, và nhờ đó có thể là đưa cả vi sinh vật M, vào trong bình phản ứng sinh học 2.

Các tiền chất chuyển hóa được thu thập từ pha hữu cơ 10 bằng các kỹ thuật đã biết, như kỹ thuật chưng cất hoặc bay hơi. Một cách thuận lợi, dung môi hữu cơ 8 được chọn có điểm sôi thấp và, trong trường hợp bất kỳ, nằm trong khoảng nhiệt độ không gây chết cho vi sinh vật, tức là thấp hơn 70°C . Nói cách khác, điểm sôi của dung môi này tốt hơn là thấp hơn nhiệt độ lên men sao cho không còn vết của dung môi trong môi trường lên men.

Hơn nữa, sự bay hơi của dung môi có điểm sôi thấp là không tốn năng lượng và bảo toàn ở mức tốt nhất các phân tử được chiết, nhiệt độ đạt được để làm bay hơi dung môi này sẽ không gây ra sự suy biến do nhiệt đối với các phân tử cần chiết.

Nói cách khác, điểm sôi của dung môi hữu cơ thuận lợi là cũng thấp hơn điểm sôi của phân tử được chiết.

Hơn nữa, tỷ trọng của dung môi thấp hơn tỷ trọng của môi trường lên men giúp có thể thu được, tốt hơn là, dịch nổi trong đó có các phân tử. Trong trường hợp bước chiết được tiến hành bên ngoài bình phản ứng sinh học 2, vi sinh vật bất kỳ có mặt sau đó sẽ bị giữ bởi trọng lực trong pha nước và theo cách này, được tách khỏi dịch nổi và khỏi dung môi 8. Sự hạn chế này ít nhất là được giới hạn theo cách đó, nếu không sẽ phá hủy vi sinh vật bởi dung môi.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các thử nghiệm được tiến hành để chiết axit béo dễ bay hơi theo các phương án khác nhau.

Thử nghiệm 1:

Axit béo dễ bay hơi đã được tạo ra trong quá trình lên men tiến hành trên cơ chất chứa phân đoạn lên men được của rác trong sinh hoạt có hàm lượng 50g/L về chất khô (MS- dry matter). 50ml môi trường lên men, và do đó là pha lỏng, được thu hồi. Độ pH của mẫu này là 4,3. 50ml mẫu này sau đó được đưa vào bước chiết với pentan làm phương tiện chiết 8, kèm bước khuấy vừa phải 9, bước chiết này sử dụng một thể tích tương đương của pha hữu cơ (tức là, 50ml) và của pha nước.

Sau khi tách pha hữu cơ 10 và pha nước 11 bằng bước gạn 12, thu hồi được axit béo dễ bay hơi 14,3g/L trong pha hữu cơ bằng cách làm bay hơi dung môi và axit béo dễ bay hơi 41,1g/L trong pha nước, hoặc hiệu suất chiết là 26%. Thu hồi được 0,7g axit béo dễ bay hơi nguồn gốc sinh học, có nghĩa là từ bước lên men 3 đối với cơ chất 1.

Thử nghiệm 2:

Thử nghiệm 1 được lặp lại nhưng mẫu được lấy từ môi trường lên men được axit hóa bằng axit clohydric 10M (HCl) đến độ pH =2,25 thay vì là 4,3. Sau bước khuấy 9, bước gạn 12 và làm bay hơi dung môi, thu hồi được VFA 18g/L trong pha hữu cơ, và VFA 32,5g/L trong pha nước theo cách này. Hiệu suất chiết thu được trong trường hợp này là 36%.

Thử nghiệm 3:

Thử nghiệm 2 được lặp lại sử dụng cùng môi trường nuôi cấy nhưng bằng cách đưa độ pH đến giá trị 5,35 thay vì là 4,3 bằng dung dịch NaOH 10M. Theo cách này, thu hồi được VFA 6g/L trong pha hữu cơ và 44,5g/L VFA trong pha nước. Hiệu suất chiết thu được trong trường hợp này là 12%.

Thử nghiệm 4:

Thử nghiệm 1 được lặp lại với dietyl ete thay vì pentan là phương tiện chiết 8, và sự ảnh hưởng của độ pH đến hiệu suất chiết được nghiên cứu. Hiệu suất chiết thu được đối với chiết bằng di-etyl ete 1/1 ở các giá trị pH khác nhau là như sau:

Độ pH	Hiệu suất chiết
1,5	55%

4,3	43%
6	8%

Theo đó, cho thấy hiệu suất thu được là khác nhau theo các điều kiện pH của quá trình chiết, cho dù là phương tiện chiết lỏng 8 được lưu lại, trong trường hợp này là dung môi hữu cơ. Cụ thể là, ngạc nhiên phát hiện ra rằng với giá trị pH cao hơn 4,5, hiệu suất sẽ giảm. Độ pH thấp hơn độ pH ban đầu của môi trường lên men, thuận lợi là độ pH thấp hơn 3, sẽ mang lại hiệu quả chiết tốt hơn so với độ pH trung hòa, sẽ hiểu rằng độ pH trung hòa sẽ cho hiệu quả chiết tốt hơn so với độ pH cao hơn 6. Các kết quả cũng được quan sát thấy vượt quá mức mong đợi đối với các kiểu dung môi khác như được minh họa bởi kết quả của Thử nghiệm 5.

Thử nghiệm 5:

Ảnh hưởng của bản chất dung môi đến hiệu suất chiết với môi trường axit hóa ở độ pH nhỏ hơn 3 được nghiên cứu. Các kết quả thu được là:

Dung môi	Hiệu suất chiết
Pentan	36%
Xyclopentan	35%
Hexan	33%
Xyclohexan	24%
Heptan	30%

Cho thấy hiệu suất thu được là cao nhất khi sử dụng dung môi như pentan, xyclopentan hoặc diethyl ete như thấy trong Thử nghiệm 4, sẽ hiểu rằng trong tất cả các trường hợp hiệu suất đều cao hơn 20%. Có thể hiểu là phương tiện chiết có thể là hỗn hợp của ít nhất hai dung môi, với điều kiện là hỗn hợp này ít nhất là không tan được trong môi trường lên men. Các dung môi có lợi ích hơn ở mức độ điểm sôi của chúng, là các dung môi có điểm sôi thấp hơn, tức là, thấp hơn 100°C, và cụ thể hơn nằm trong khoảng từ 30°C đến 70°C. Nó cho phép chiết các phân tử trực tiếp vào trong bình phản ứng 2 mà không cần thay đổi mô hình ưa nhiệt độ trung bình hoặc ưa nhiệt. Hơn nữa, mặc dù kiểu dung môi này là gần như không tan được trong nước, điểm sôi thấp của nó cho phép tách

dễ dàng giữa pha hữu cơ và pha nước ở nhiệt độ gấp phải trong bình phản ứng trong quá trình lên men.

Pha nước, chứa ít axit béo dễ bay hơi hơn ban đầu, và chưa bị thay đổi bởi bước chiết 4 có thể được thu hồi, tức là, được đưa trở lại vào trong bình phản ứng lên men, để tiếp tục bước lên men 3.

Một loạt các thử nghiệm được tiến hành bằng cách thay đổi tỷ lệ dung môi/chất tan của quy trình chiết lỏng-lỏng. Quy trình chiết được tiến hành với tỷ lệ dung môi/chất tan theo thể tích là 2/1, thay vì 1/1, trên môi trường lên men tương tự với ví dụ đầu tiên. Hiệu suất chiết là 43% so với 36% trong Ví dụ 1 quan sát được.

Thử nghiệm được lặp lại với tỷ lệ dung môi/chất tan là 1/2 theo thể tích. Hiệu suất chiết là 27% so với 36% trong Ví dụ 1.

Do đó, chú ý thấy rằng hiệu suất chiết tăng lên bằng cách tăng đáng kể tỷ lệ của dung môi so với chất tan, mà không gây ảnh hưởng đến vi sinh vật.

Một cách thuận lợi, phát hiện ra rằng có thể tăng hiệu suất chiết lỏng-lỏng bằng cách sử dụng một hoặc nhiều hợp chất thường được ký hiệu bằng thuật ngữ "chất chiết xuất" kết hợp với dung môi hoặc hỗn hợp của các dung môi, có nghĩa là hợp chất có khả năng phản ứng với chất tan trong dung dịch như, trong số các dung dịch khác, TBP (TriButylPhosphat). Với nồng độ chất chiết xuất là 10% trên môi trường lên men tương tự như Ví dụ 1, hiệu suất chiết là 53% với pentan và 50% với hexan so với 36% trong Thử nghiệm 1 mà không có chất chiết xuất, có độ pH và điều kiện tỷ lệ tương tự với điều kiện của Thử nghiệm 1.

Các thử nghiệm cũng đã được tiến hành với phương tiện chiết khác, cụ thể là với các thành phần chiết rắn, trong trường hợp phương pháp chiết rắn-lỏng. Bao gồm nhựa thông, cacbon hoạt tính hoặc zeolit làm phương tiện chiết này.

Trong tất cả các trường hợp, phương tiện chiết rắn thuận lợi là có khả năng kỵ nước cao nhất.

Thử nghiệm có sử dụng nhựa thông anion cho hiệu suất chiết các axit béo dễ bay hơi từ môi trường lên men tương tự như Thử nghiệm 1 là 22% trong 15 phút. Khi bước

chiết được tiến hành, các phương tiện rắn có thể được tái tạo và sử dụng trong các bước chiết khác.

Việc sử dụng cacbon hoạt tính là chất đã được sử dụng và được tái tạo để chiết axit béo dễ bay hơi được tiến hành thử nghiệm trên môi trường lên men tương tự với môi trường lên men của Thử nghiệm 1. Khi môi trường lên men được giảm một phần của tổng lượng axit béo dễ bay hơi, bằng cách chiết trên cacbon hoạt tính, nó được tái sử dụng cho quá trình lên men kỵ khí mới, với tập hợp vi sinh vật khác và trên cơ chất khác.

Kết quả thu được từ quá trình chiết axit béo dễ bay hơi, bất kể là kiểu chiết nào, chỉ ra rằng nồng độ axit béo dễ bay hơi, của tất cả quá trình lên men, và do đó từ các cơ chất và/hoặc tập hợp vi sinh vật khác nhau, đều cao hơn nồng độ ban đầu của axit béo dễ bay hơi trong môi trường trước khi lên men qua nhiều lần nuôi cấy. Hoạt tính lên men được duy trì bằng cách sử dụng môi trường đã trải qua các bước chiết. Điều này chỉ ra rằng quy trình chiết lỏng-lỏng hoặc rắn-lỏng không làm thay đổi đặc điểm của môi trường lên men và cho phép sản xuất liên tục và thu hồi ít nhất một phần môi trường lên men này.

Các thử nghiệm chiết *in situ* giúp có thể biểu hiện khả năng tương thích sinh học của phương tiện chiết, nói cách khác khả năng thu hồi theo tuần tự hoặc liên tục các phân tử như axit béo dễ bay hơi được sản xuất bởi vi sinh vật trong quá trình lên men trên cơ chất trong nhiều hơn 2000 giờ. Khả năng tương thích sinh học này được đặc trưng bởi số lượng vi sinh vật có trong mỗi ml bình phản ứng sinh học được xác định bởi kỹ thuật phân tích trắc lưu tế bào. Kết quả là, ví dụ, nằm trong khoảng các mẫu được lấy trước và sau khi chiết *in situ*, nằm trong khoảng từ $2,3 \cdot 10^8$ đến $8,0 \cdot 10^7$ vi sinh vật/ml, trong một lượt đo và nằm trong khoảng từ $2,9$ đến $2,3 \cdot 10^8$ vi sinh vật/ml đối với lượt đo khác. Điều này chỉ ra rằng có sự giảm quần thể vi sinh vật có trong bình phản ứng sinh học, sau khi chiết các phân tử đã tạo ra, trong trường hợp này có nghĩa là, axit béo dễ bay hơi, và do đó trên thực tế, sau khi lấy mẫu môi trường lên men, nhưng sự giảm này không dẫn đến sự phá hủy mạnh và toàn bộ vi sinh vật. Quần thể vi sinh vật này là đủ, về mặt định lượng và định tính, để cho vi sinh vật hoạt động và giảm ít hoặc không giảm hoạt tính lên men của tập hợp vi sinh vật. Nói cách khác, sự dao động trong quần thể vi sinh vật, do quá

trình chiết, không gây ảnh hưởng đến hoạt tính chung của vi sinh vật trên quy mô lớn, do đó duy trì được quá trình tối ưu để tạo ra chất chuyển hóa lên men được gọi là tiền chất.

Do đó, quá trình chiết được tiến hành, không cần căng thẳng không thuận nghịch, trực tiếp trong bình phản ứng lên men, cho dù là phương pháp chiết lỏng-lỏng hoặc rắn-lỏng.

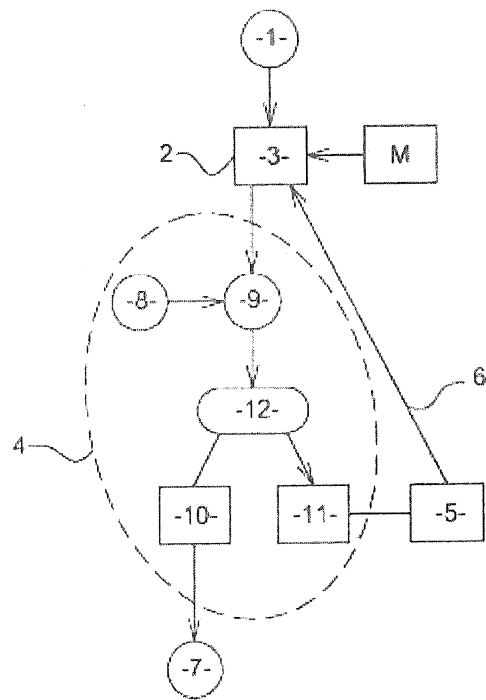
Do đó có thể, theo một phương án ưu tiên, tiến hành quá trình lên men liên tục có bước chiết *in-situ* chất chuyển hóa ức chế quá trình lên men, tức là chiết các axit béo dễ bay hơi có vai trò trong việc làm nhiễm axit môi trường, khi chúng được tạo ra hoặc ít nhất ở các khoảng thời gian đều đặn. Theo một phương án biến thể không được thể hiện, các quy trình chiết này có thể được tiến hành trong một ngăn thứ hai. Trong trường hợp này, sẽ diễn ra sự rút môi trường lên men liên tục hoặc đều đặn.

Việc tiến hành phương pháp này không chỉ đòi hỏi hệ thống thiết bị có ít nhất một bình phản ứng lên men, mà còn bao gồm ít nhất một thiết bị chiết, thích hợp để tiến hành bước chiết. Các thiết bị này đã được biết rõ, và số lượng và kích thước của chúng được điều chỉnh thích hợp với kiểu sản xuất, phụ thuộc vào bước chiết được thực hiện bên trong hay bên ngoài bình phản ứng.

Hệ thống thiết bị như vậy bao gồm, một cách thuận lợi, ít nhất một bộ phận để chứa sản phẩm thu được từ quá trình chiết. Phương tiện để điều khiển và kiểm soát, như bộ cảm biến nhiệt độ, bộ dò độ pH và/hoặc bộ dò oxi hóa khử, được cung cấp. Ngoài ra, việc theo dõi hoạt tính vi sinh vật được tiến hành bởi các phương pháp đã được biết rõ, ví dụ bằng cách theo dõi phân tích mức sinh chất chuyển hóa khí và lỏng, đếm bằng máy đếm dòng tế bào, kỹ thuật sinh học phân tử như chất đánh dấu phân tử hoặc chíp sinh học.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình chiết axit béo dễ bay hơi (volatile fatty acids - VFA) được sản xuất bởi vi sinh vật trong bình phản ứng lên men bởi quá trình lên men kỵ khí nhờ sử dụng sinh khối có thể lên men, axit béo dễ bay hơi (volatile fatty acids - VFA) này là chất chuyển hóa lên men, quy trình bao gồm các bước:
 - a) lựa chọn phương tiện chiết lỏng hoặc rắn mà không tan được trong môi trường lên men và bảo toàn được khả năng sản xuất axit béo dễ bay hơi (volatile fatty acids - VFA) của vi sinh vật có mặt trong môi trường lên men,
 - b) cho phương tiện chiết tiếp xúc với môi trường lên men mà không làm gián đoạn quá trình lên men, nhờ đó chiết axit béo dễ bay hơi (volatile fatty acids - VFA) từ môi trường lên men,
 - c) thu hồi axit béo dễ bay hơi (volatile fatty acids - VFA) chiết được từ phương tiện chiết ở pH thấp hơn 4,5, bên ngoài bình phản ứng lên men, trong đó phương tiện chiết này là dung môi có điểm sôi thấp hơn 70°C và có điểm sôi thấp hơn nhiệt độ lên men.
2. Quy trình chiết theo điểm 1, trong đó phương tiện chiết là dung môi có tỉ trọng thấp hơn tỉ trọng của môi trường lên men.
3. Quy trình chiết theo điểm 1, trong đó phương tiện chiết là chất rắn, và quy trình chiết là kiểu rắn-lỏng.
4. Quy trình chiết theo điểm 1, trong đó việc cho phương tiện chiết tiếp xúc với môi trường lên men diễn ra trong bình phản ứng.
5. Quy trình chiết theo điểm 1, trong đó việc cho phương tiện chiết tiếp xúc với môi trường lên men diễn ra bên ngoài bình phản ứng, và môi trường lên men được lấy mẫu liên tục.
6. Quy trình chiết theo điểm 1, trong đó việc cho phương tiện chiết tiếp xúc với môi trường lên men diễn ra bên ngoài bình phản ứng, và môi trường lên men được lấy mẫu theo tuần tự.
7. Quy trình chiết theo điểm 1, trong đó, sau bước c), ít nhất một phần của pha lỏng thu được từ quá trình chiết được đưa trở lại vào bình phản ứng lên men và kết hợp vào môi trường lên men.
8. Quy trình theo điểm 1, trong đó quy trình chiết là kiểu lỏng-lỏng.

**Fig. 1**