



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11)



2-0004223

(51) C12N 15/09
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2023-00704

(22) 31/08/2021

(67) 1-2021-05369

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/11/2021 404A

(73) Đại học Bách khoa Hà Nội (VN)

Số 1, Đại Cồ Việt, Hai Bà Trưng, Hà Nội

(72) Lê Quang Diễn (VN); Nguyễn Hoàng Chung (VN); Phạm Tuấn Anh (VN); Thái Đình Cường (VN); Nguyễn Trung Thành (VN); Nguyễn Thị Minh Phương (VN); Phan Huy Hoàng (VN); Nguyễn Tiến Thành (VN); Lê Thị Lan Chi (VN); Nguyễn Thị Minh Nguyệt (VN).

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT PROTEIN ĐƠN BÀO TỪ PHẾ LIỆU GỖ

(21) 2-2023-00704

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất protein đơn bào từ phế liệu gỗ sử dụng nguyên liệu là dăm mảnh vụn gỗ keo tai tượng. Quy trình nhằm đường hoá phế liệu gỗ để thu được các dịch đường xyloza và glucoza. Các dịch đường này được phối trộn với nhau làm môi trường nhân nuôi nấm men chủng *Candida utilis* nhằm thu được sinh khối nấm men là protein đơn bào. Quy trình bao gồm các bước: thuỷ phân axit, ngược biến dịch đường, trung hoà dịch đường, làm sạch dịch đường, rửa phần bã thu được sau thuỷ phân axit, nấu kiềm, đường hoá bằng enzym, lọc dịch đường thuỷ phân enzym, nhân nuôi nấm men, cô đặc, và sấy nấm men.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ hóa học và sinh học, cụ thể là đề cập đến quy trình sản xuất protein đơn bào sử dụng nguồn đường từ dăm mảnh vụn gỗ keo tai tượng, là phế liệu nguyên liệu sản xuất bột giấy. Quá trình sản xuất nhằm đường hóa phế liệu gỗ để thu dung dịch đường lên men, và nuôi cấy nấm men đơn bào trên dịch đường để thu sinh khối nấm men là protein đơn bào, phù hợp làm phụ gia thức ăn chăn nuôi gia súc, gia cầm và thủy sản.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Nấm men là một loại sản phẩm có hàm lượng protein cao (40-60%), được sử dụng làm thực phẩm cung cấp protein cho người và động vật. Protein đơn bào hay protein vi sinh là protein tinh khiết được tạo thành từ quá trình nuôi cấy các tế bào vi sinh vật, như vi khuẩn, nấm men, tảo hoặc nấm sợi, trên các cơ chất là nguồn cacbon khác nhau. Hiện nay protein vi sinh đang là sản phẩm phổ biến trước nhu cầu ngày càng tăng dân số và sự thiếu hụt nguồn lương thực của thế giới. Các sản phẩm được thương mại hóa dưới dạng vi khuẩn tinh chế, pha tạp, dạng khô hoặc ẩm. Ngoài protein ra, nấm men còn có hàm lượng chất béo thấp và hàm lượng vitamin cao, các khoáng chất phù hợp cho phát triển của cơ thể.

Hiện nay ở Việt Nam chưa sản xuất được protein cho cả người và động vật. Trong khi đó nhu cầu thức ăn chăn nuôi giàu protein rất lớn. Các sản phẩm tương tự như bột cá hay phế phụ phẩm chế biến hải sản là những loại sản phẩm chứa protein thô.

Để sản xuất protein vi sinh, có thể sử dụng các nguồn nguyên liệu là nguồn cacbon khác nhau, để lên men như tinh bột, rỉ đường, ... Nhưng tinh bột cũng là nguồn nguyên liệu hiếm chưa đủ cung cấp cho sản xuất các sản phẩm hữu ích khác, trong khi đó phế phụ phẩm như rỉ đường của sản xuất đường thì số lượng lại rất hạn chế. Vì vậy, nguồn nguyên liệu tiềm năng lớn cho sản xuất protein vi sinh hay các sản phẩm hữu ích khác, chính là sinh khối lignoxenluloza, trong đó gỗ là dạng nguyên liệu chất lượng cao có hàm lượng hydrat cacbon chiếm tới 65-70%. Sử dụng các loại phế phụ phẩm nông nghiệp khác như rơm rạ, bã mía, thân cây ngô hay cỏ cây khác không khả thi về quy mô sản xuất và hiệu quả kinh tế, gặp nhiều khó khăn trong thu gom, bảo quản và tồn trữ.

Hiện nay, sản lượng dăm mảnh nguyên liệu giấy chủ yếu là gỗ keo tai tượng của Việt Nam mỗi năm đạt xấp xỉ 10 triệu tấn, phục vụ sản xuất bột giấy trong nước và phần lớn xuất khẩu sang các nước trong khu vực. Trong quá trình chế biến dăm mảnh gỗ nguyên liệu giấy, hình thành khoảng 2-3% phế liệu là dăm mảnh vụn không hợp quy cách cho sản xuất bột giấy, được tập trung tại các nhà máy sản xuất bột giấy, các nhà máy chế biến dăm mảnh nguyên liệu giấy. Về thành phần hóa học, chất lượng của dăm mảnh không thua kém nhiều so với dăm mảnh nguyên liệu. Sự khác biệt chỉ là kích thước nhỏ và dễ bị phân hủy sinh học hơn ở điều kiện tự nhiên. Phương thức tận dụng hiện nay với số lượng dăm mảnh này là chưa hiệu quả: được sử dụng như một dạng phế thải làm chất đốt, phân bón vi sinh, còn lại thải bỏ. Vì vậy tận dụng để sản xuất protein là giải pháp công nghệ mang tính sáng tạo và thực tiễn. Hơn nữa, nhu cầu protein làm thức ăn chăn nuôi là rất lớn và không ngừng tăng.

Trên thế giới hiện nay protein đơn bào hay nấm men *Torula* được sản xuất từ gỗ bằng hai phương pháp: nuôi cấy nấm men (các chủng *Candida utilis*, *Candida tropicalis*,...) trong dung dịch đường thu được từ quá trình xử lý dịch đen nấu bột giấy sulfít, và nuôi cấy nấm men trong dung dịch đường thủy phân gỗ bằng axit loãng ở nhiệt độ cao (150-200°C). Cả hai phương pháp đều dựa trên cơ sở thủy phân hydrat cacbon của gỗ (xenluloza và hemixenluloza) bằng axit loãng ở nhiệt độ cao.

Phương pháp thứ nhất là nhằm tận dụng đường chủ yếu là pentoza (C5) của dịch đen (chất thải lỏng sản xuất bột giấy theo phương pháp nấu sulfít ở nhiệt độ 150-160°C). Hạn chế phương pháp này là chỉ sử dụng dung dịch đường pentoza để nuôi cấy nấm men, tuy nhiên do mục tiêu là xử lý chất thải sản xuất, nên có thể xem là hiệu quả về mặt kỹ thuật và kinh tế. Phương pháp thứ hai được áp dụng ở quy mô công nghiệp để sản xuất protein đơn bào, theo đó gỗ được thủy phân bằng axit sulfuric loãng nhiệt độ 150-180°C, thu được dung dịch đường C5-C6 và chất thải rắn là lignin thủy phân, sau đó dung dịch đường được xử lý qua nhiều bước liên tiếp bao gồm các bước trung hòa, làm sạch bằng sục khí và sử dụng chất trợ lắng. Hạn chế và nhược điểm của các phương pháp này là hiệu suất đường thu được thấp, chỉ đạt 60-70% so với tính theo lý thuyết, do đường tạo thành bị phân hủy mạnh ở nhiệt độ cao, các sản phẩm phụ tạo thành ức chế quá trình lên men của nấm men, nên hiệu quả không cao. Bên cạnh đó đường hóa ở nhiệt độ cao bằng axit gây ô nhiễm môi trường, nên nhiều nơi đã phải buộc ngừng sản xuất.

Đối với cả hai phương pháp, dung dịch đường thu được có pH thấp (khoảng 1,3), chứa nhiều tạp chất ức chế quá trình lên men của nấm men, nên đòi hỏi phải xử lý phức tạp và kéo dài, cần phải điều chỉnh pH liên tục của dung dịch đường trong quá trình nuôi cấy nấm men, do nấm men chỉ phát triển tốt trong điều kiện pH ổn định. Những vấn đề khác như sử dụng thiết bị chuyên dụng chống ăn mòn axit ở nhiệt độ cao, ô nhiễm môi trường vẫn hiện hữu.

Đường hóa bằng enzym là giải pháp thay thế hiệu quả, được nghiên cứu phát triển mạnh trong những năm gần đây, vậy nhưng cho đến nay chỉ có enzym xenlulaza xúc tác thủy phân xenluloza thành glucoza là đạt hiệu quả cao, nhưng đòi hỏi phải tiền xử lý nguyên liệu gỗ bằng các tác nhân khác nhau, để tách các thành phần không phải xenluloza trước khi thủy phân xenluloza bằng enzym. Hiện vẫn chưa có loại enzym nào có thể thay thế hiệu quả axit vô cơ làm xúc tác thủy phân hemixenluloza trong thành phần của sinh khối gỗ.

Trong nước đã có giải pháp hữu ích “Phương pháp sản xuất etanol sinh học từ phế liệu gỗ cứng” được cấp bằng độc quyền số 1161 năm 2011, với giải pháp đường hóa phế liệu gỗ keo tai tượng và bạch đàn urô theo quy trình hai bước, là tiền xử lý phế liệu gỗ bằng axit sulfuric loãng không thu đường và nấu kiềm kết hợp với thủy phân xenluloza bằng enzym Cellic Ctec2. Glucoza được lên men thành etanol. Chưa có nghiên cứu và ứng dụng nào về sử dụng đường glucoza thu được bằng phương pháp thủy phân enzym, cho sản xuất protein đơn bào.

Nấm men là loại vi sinh vật đầu tiên được nhận biết một cách khoa học (Barnett, 2003), được nghiên cứu kỹ nhất và được chấp nhận rộng rãi bởi người tiêu dùng. Nấm men hiếm khi gây chết người hoặc gây bệnh và có thể được sử dụng để cung cấp thức ăn cho con người. Mặc dù hàm lượng protein trong nấm men khó vượt qua 60% nhưng nồng độ các axit amin thiết yếu như lysin, tryptophan và threonin vẫn thỏa mãn (Gabriel et al., 2014). Ngược lại, chúng chứa lượng nhỏ axit amin bị sulfat hóa - cystein và methionin. Chúng cũng giàu các vitamin (nhóm B), và hàm lượng axit nucleic khác nhau từ 4 – 10%. Chúng thậm chí có kích thước lớn hơn nên việc phân tách cũng dễ dàng hơn so với vi khuẩn. Chúng có thể được sử dụng ở trạng thái thô. Tuy nhiên, tốc độ sinh trưởng riêng của nấm men tương đối chậm với thời gian sinh sản 2 – 5h. Năng suất sản xuất sinh khối nấm men trên thế giới lên tới 0,4 triệu tấn/ năm trong đó 0,2 triệu tấn nấm men cho sản xuất bánh mỳ (*S. cerevisiae*) (Gabriel et al., 2014). Nấm men sản sinh axit amin từ các

axit vô cơ và lưu huỳnh do các muối cung cấp. Chúng chứa cacbon và năng lượng từ các phế phẩm hữu cơ, như tinh bột, nước sữa, cùi trái cây bột gỗ, và dịch nấu sulfite (Upadhyaya et al., 2015).

Theo CN101781625B, nấm men *Candida Pracis* SUGS -01 được nhân nuôi theo phương pháp lên men đồng thời trong ít nhất 24 giờ, trong môi trường lên men chứa đường nồng độ 35-36g/L chế tạo từ bã mía theo phương pháp thủy phân axit, bổ sung dưỡng chất 10-12g/L amoni sulfat, 12-13 g/L monokali phosphat, 0,05-0,06g/L magie sulfat và 4-5g/L methionin, tạo pH của môi trường lên men là 5,5-6,0 bằng cách bổ sung NaOH, thu được nấm men *Candida useis* làm phổ dinh dưỡng phát triển rộng, ít sản sinh etanol trong quá trình lên men, khả năng tổng hợp protein và các chất tương tự mạnh mẽ, và có triển vọng ứng dụng công nghiệp tốt. Tuy nhiên quy mô triển khai lên men chỉ ở mức 1 lít/mẻ.

CN103289907A đề cập đến phương pháp lên men rắn nấm *Candida* để thu protein sử dụng làm thức ăn chứa protein và các ứng dụng của thức ăn loại này trong ngành chăn nuôi. *Candida useis* được cấy vào môi trường rắn tối ưu hóa để nuôi cấy ở 25-28°C, và quá trình lên men quy mô lớn được thực hiện sau khi nuôi cấy khuếch đại ba mức. Quy trình sản xuất đơn giản và ổn định, mật độ tế bào và hàm lượng protein cao, sản phẩm lên men không cần tách lọc và tinh chế, do đó thức ăn đậm *Candida useis* rất dễ phổ biến để sử dụng. Thông qua việc bổ sung sản phẩm lên men của nấm *Candida useis* vào thức ăn cho lợn, có thể đạt được các tác dụng tốt như ngăn ngừa các bệnh đường tiêu hóa, thúc đẩy tăng trưởng, tăng trọng.

Theo quy trình nhân nuôi nấm men của N.D. Dimova và các cộng sự (N.D,Dimova et al., Biotechnological Equipment, 24 (1), 2010), các chủng nấm men *Candida tropicalis* và *Candida utilis* đã được nuôi cấy trong dịch đường nồng độ đường khử 20 g/L, chế tạo từ cỏ và trấu bằng cách thủy phân axit sulfuric ở 121°C trong 20 phút, bổ sung dưỡng chất $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,2% và KH_2PO_4 0,2%, cho hiệu suất sinh khối nấm men 62-64 mg/g đường. Hiệu suất nấm men thấp và duy trì pH trong suốt 70 giờ nhân nuôi.

Trong một công bố gần đây (Cristina Emanuela Barbosa Magalhães et al., Biotechnology Research and Innovation, 2(1), 2018), chủng nấm *Candida tropicalis* (KP276650) được nhân nuôi trên dịch đường có nồng độ đường khử 59,94 g/L, chế tạo từ thủy phân hemixenluloza của bã mía bằng axit sulfuric 1% (ở 121°C trong 40 phút), với thời gian nhân nuôi trong 96 giờ, cho hiệu suất sinh khối nấm men 0,1767 g/l/h, tức

tổng 16,9 g/L. Hàm lượng prortein của nấm men đạt 60,05%. Với một loại dung dịch đường chủ yếu C5, thời gian nhân nuôi kéo dài, hiệu suất sinh khối chỉ đạt xấp xỉ 29,2% so với đường khử. Trong quá trình nhân nuôi phải liên tục bổ sung dung dịch NaOH để duy trì pH ổn định.

Để sản xuất nấm men trên dịch đường từ phế liệu gỗ chế tạo theo phương pháp thủy phân axit hay dịch đen nấu bột giấy sulfit, các chủng nấm men hiện nay đang được sử dụng ở quy mô công nghiệp tại một số nước như Nga, Ucraina, Belarus, Mỹ, Trung Quốc,...là các chủng *Candida*. Thực tế sản xuất công nghiệp cho thấy, các chủng giống *Candida* đều là những chủng hiệu quả, như *Candida scottii* cho năng suất sinh khối cao, có thể tuyển nổi để thu hồi hoàn toàn sau lên men, tuy nhiên khả năng duy trì sự sống và phát triển của chúng dưới tác dụng của các yếu tố ức chế tương đối thấp, đồng thời giá thành nuôi cấy cao. *Candida tropicalis* hay *Tr. cuntaneum* và hỗn hợp chủng khác kháng ức chế tương đối tốt, nhưng tốc độ sinh trưởng chậm, mặc dù chúng hấp thụ đường tương đối triệt để và tương đối phù hợp đối với bã hèm sản xuất còn có hàm lượng axit hữu cơ cao. Bên cạnh đó *Candida tropicalis* được khuyến cáo không sử dụng ở quy mô công nghiệp, bởi đã có nghiên cứu cho thấy một số chủng trong loài này có thể gây bệnh truyền nhiễm khi tiếp xúc dài hạn. *Candida utilis* là chủng có khả năng hấp thụ hiệu quả cả đường C5 và C6, phù hợp với dịch đường từ gỗ, đồng thời protein trong sinh khối có chất lượng tốt. Hạn chế chính của quá trình nuôi cấy nấm men trong các loại dung dịch đường hiện này, là pH của dịch lên men thay đổi liên tục trong quá trình lên men, ảnh hưởng đến hiệu suất lên men vì vậy cần phải liên tục điều chỉnh. Xác định được thành phần dung dịch đường và hỗn hợp dưỡng chất cần thiết bổ sung, tạo cho dịch lên men có pH ổn định trong suốt quá trình lên men sẽ tạo tăng trưởng sinh khối đều và kết quả là hiệu suất sinh khối nấm men cao. Đây sẽ là sáng tạo của nghiên cứu.

Vì vậy, cần phát triển kỹ thuật đường hóa gỗ theo hướng tận dụng được toàn bộ hydrat cabon của gỗ, cải tiến quá trình đường hóa gỗ để đạt hiệu suất đường cao hơn, chất lượng sinh học của dung dịch đường phù hợp hơn với quá trình phát triển của nấm men khi nuôi cấy. Tất cả những cải tiến này đều cho hiệu quả kỹ thuật và kinh tế cao, phù hợp với nhiều loại nguồn nguyên liệu tương tự và khả thi áp dụng trong điều kiện thực tiễn của Việt Nam cũng như ngoài nước.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích nhằm giải quyết những vấn đề tồn tại và hạn chế của công nghệ hiện đại, áp dụng đối với nguồn nguyên liệu là phế liệu gỗ của Việt Nam, để có thể triển khai áp dụng ở quy mô công nghiệp trong điều kiện Việt Nam. Theo đó, giải pháp hữu ích đề cập đến quá trình sản xuất dung dịch đường từ dăm mảnh vụn gỗ keo tai tượng, có chất lượng sinh học cao phù hợp cho nuôi cấy nấm men từ chủng *Candida utilis* cho hiệu suất protein cao, cụ thể là:

Đường hóa phế liệu gỗ gồm hai bước chính:

+ bước thứ nhất: thủy phân bằng axit sulfuric loãng, ở nhiệt độ 140°C trong thời gian giới hạn để thủy phân hemixenluloza thành đường xyloza (đường C5). Quá trình này được tiến hành tương tự như các quá trình đang áp dụng ở quy mô công nghiệp, nhưng quá trình thủy phân được tối ưu hóa cho hiệu suất đường đạt >80% so với lý thuyết, nhờ sử dụng nguyên liệu có kích thước nhỏ;

+ bước thứ hai: xử lý bã rắn còn lại bằng kiềm để thu xenluloza và đường hóa xenluloza bằng enzym xenlulaza. Quá trình đường hoá được tiến hành ở nhiệt độ thấp (50°C) tiết kiệm năng lượng, không đòi hỏi thiết bị thủy phân chuyên dụng và đơn giản về vận hành, cho phép sản xuất đường glucoza với hiệu suất đạt >90% so với tính theo lý thuyết.

Nuôi cấy nấm men trong dung dịch đường hỗn hợp, được phối trộn từ dịch đường xyloza đã qua xử lý có pH=4,0 và dung dịch đường glucoza có pH=5,1-5,2, và khi bổ sung dưỡng chất với thành phần tối ưu, tạo thành một dung dịch có pH ổn định như một dung dịch đậm trong khoảng 4,5-4,6 trong suốt quá trình nuôi cấy nấm men, vì vậy nấm men phát triển tốt, sinh khối tăng trưởng đều và hiệu suất chung của quá trình cao hơn.

Sử dụng dung dịch glucoza thu được từ gỗ bằng phương pháp thủy phân enzym để nuôi cấy nấm men là giải pháp công nghệ mới chưa có trong nước và trên thế giới. Bên cạnh đó, có thể sử dụng hai loại dịch đường để nuôi cấy nấm men riêng biệt, đều cho nấm men phát triển tốt, nhưng trong quá trình lên men cần điều chỉnh pH liên tục để đảm bảo điều kiện thích hợp cho lên men, trong khi phối trộn hai loại dịch đường với nhau theo tỉ lệ nhất định, kết hợp với tối ưu hóa thành phần dưỡng chất, sẽ tạo được dung dịch đường hỗn hợp có pH ổn định trong suốt thời gian phát triển của nấm men, cho quá trình lên men đạt hiệu suất sinh khối cao. Đây là sáng tạo của quá trình tạo dịch đường cho nuôi

cấy nấm men, đáp ứng hiệu quả cao của quá trình lên men protein đơn bào và nâng cao tính khả thi áp dụng vào thực tiễn.

Quy trình sản xuất protein đơn bào từ phế liệu gỗ là dăm mảnh vụn gỗ keo tai tượng theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước: a) thủy phân axit; b) ngược biến dịch đường; c) trung hòa dịch đường; d) làm sạch dịch đường thủy phân axit; e) rửa bã sau thủy phân axit; f) nấu kiềm; g) đường hóa bằng enzym; h) lọc dịch đường thủy phân enzym; i) nhân nuôi nấm men; k) cô đặc nấm men; và l) Sấy nấm men.

Mô tả văn tắt hình vẽ

Hình 1 thể hiện sơ đồ khối quá trình sản xuất protein đơn bào từ phế liệu gỗ được áp dụng cho các quy mô thiết bị khác nhau.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích được mô tả chi tiết cùng với các phương án thực hiện cụ thể. Tuy nhiên các phương án thực hiện chỉ nhằm mục đích bộc lộ giải pháp hữu ích, mà không nhằm mục đích giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Theo giải pháp hữu ích, nguyên liệu là dăm mảnh vụn gỗ keo tai tượng, được thu gom từ quá trình sàng chọn dăm mảnh nguyên liệu giấy, có kích thước và độ ẩm phù hợp. Tùy thuộc vào tình trạng của nguyên liệu, dăm mảnh có thể được sàng chọn để thu được nguyên liệu có kích thước đồng đều, hay để làm sạch đất, cát hoặc các thành phần không phải gỗ khác, có thể lẫn trong quá trình thu gom, tồn trữ nguyên liệu.

Dăm mảnh vụn gỗ keo tai tượng có thành phần hóa học cơ bản không cố định, độ ẩm 11-12%, hàm lượng xenluloza 40-42%; pentozan 14-16%; lignin 21-23%; các chất trích ly bằng axeton 2,0-2,2%; độ tro 1,2-1,3%. Hàm lượng các chất tan trong nước lạnh 5-6%; hàm lượng các chất tan trong nước nóng 7-8%; hàm lượng các chất tan trong dung dịch NaOH 1% trong khoảng 18-19%. Các polysacarit dễ thủy phân chiếm 27-28 %, các polysacarit khó thủy phân chiếm 38-39% khối lượng nguyên liệu.

Nên sử dụng loại nguyên liệu vừa được thu gom từ quá trình chế biến dăm mảnh nguyên liệu giấy, bảo quản nơi khô thoáng, có mái che tránh mưa, trước khi sử dụng cần trộn đều.

Quy trình sản xuất protein đơn bào từ phế liệu gỗ là dăm mảnh vụn gỗ keo tai tượng bao gồm các bước:

a) Thủy phân axit

Nguyên liệu là phế liệu gỗ được xử lý với dung dịch H_2SO_4 0,75%, theo tỉ lệ 1:8 (theo khối lượng/thể tích) (1,0 kg phế liệu gỗ trên 8,0 lít dung dịch), trong thiết bị phản ứng ở 140°C trong 40 phút, sau đó hạ áp suất, rồi chiết lấy dịch đường, để đưa sang bước xử lý tiếp theo (bước b). Bã rắn còn lại đưa sang bước e) xử lý tiếp. Chế độ gia nhiệt: từ nhiệt độ phòng ($25\text{-}35^\circ\text{C}$) đến nhiệt độ 140°C trong 50-60 phút, bảo ôn ở 140°C trong 40 phút. Kết thúc thời gian xử lý, thì tiến hành xả áp trong thời gian nhất định để xả khí rồi tiến hành chiết dịch đường.

b) Ngược biến dịch đường

Dịch đường thủy phân axit được để yên ở nhiệt độ $75\text{-}85^\circ\text{C}$ trong 1 giờ, không khuấy trộn để thủy phân các oligosaccarit thành monosaccarit (xyloza và glucoza), đồng thời cải thiện chất lượng dịch đường.

c) Trung hòa dịch đường

Dịch đường được lần lượt trung hòa bằng dung dịch $\text{Ca}(\text{OH})_2$ và NH_3 : Trước tiên bổ sung dung dịch $\text{Ca}(\text{OH})_2$ nồng độ 150 g/L, với lượng 4,0-4,1 g/L, ở $70\text{-}75^\circ\text{C}$, tới pH= 3,0-3,5. Tiếp đó, bổ sung dung dịch NH_3 25% với lượng 2,9-3,0 ml/L tới pH= 4,2-4,5. Duy trì khuấy trộn dịch đường trong 40 phút để kết thúc phản ứng trung hòa. Sau đó để lắng và làm nguội dịch đường đến $35\text{-}40^\circ\text{C}$, tách kết tủa để thu dịch đường sau khi trung hòa.

d) Làm sạch dịch đường

Sau khi trung hòa, tiến hành sục không khí với lưu lượng 20 lít/L trong vòng 60 phút, rồi bổ sung polyaluminium clorua (PAC) làm chất trợ lắng với lượng 0,05 g/L, khuấy đều trong 1-2 phút, rồi để lắng trong thời gian khoảng 70 phút, sau đó lọc hoặc gạn để tách phần dịch trong là xyloza có nồng độ 14,0-14,5 g/L, pH=4,0 để sử dụng.

e) Rửa phần bã rắn thu được sau thủy phân axit

Cấp một lượng nước theo tỷ lệ (7,5-8,0):1 (theo thể tích/khối lượng phế liệu gỗ ban đầu khô tuyệt đối) vào thiết bị phản ứng chứa bã sau thủy phân axit, giữ trong khoảng 10-30 phút, rồi chiết xả phần nước. Bước này được thực hiện nhằm tách axit sulfuric dư ra khỏi bã rắn.

f) Nấu kiềm

Bổ sung dung dịch kiềm gồm hỗn hợp NaOH và Na_2S với lượng tương ứng là 14,8% và 4,8% so với khối lượng phế liệu gỗ ban đầu, với tỷ lệ phế liệu gỗ ban đầu khô tuyệt đối:dung dịch kiềm là 1: (5,5-6,0), rồi gia nhiệt tới nhiệt độ tối đa $155\text{-}160^\circ\text{C}$, bảo ôn

trong 130 phút. Quá trình gia nhiệt phải thực hiện, sao cho thời gian gia nhiệt từ nhiệt độ 50-70°C đến khoảng 110°C kéo dài trong khoảng 20 phút, bảo ôn ở nhiệt độ này trong 30 phút (bảo ôn giữa), rồi tiếp tục gia nhiệt đến nhiệt độ tối đa (155-160°C) trong khoảng 20-40 phút. Trong thời gian bảo ôn giữa, tiến hành xả nhẹ khí trong 10-20 giây. Kết thúc thời gian nấu, tiến hành dỡ bột xenluloza, tách bỏ dịch đen, rửa bột bằng nước đến phản ứng trung hòa (pH của nước rửa cuối trong khoảng 6,5-7,5), rồi vắt nước thu được bột xenluloza.

g) Đường hóa bằng enzym

Bổ sung một lượng dung dịch đệm natri xitrat có pH=5,2 vào bột xenluloza theo tỉ lệ 10:1 (theo thể tích/khối lượng bột khô tuyệt đối) và enzym xenlulaza (loại SAE0020 của Sigma Aldrich hoặc tương đương) với lượng khoảng 400 FPU/100 g bột xenluloza khô tuyệt đối, khuấy trộn đều huyền phù bột và giữ ở nhiệt độ 50°C trong 144 giờ. Trong thời gian đường hóa, cần thường xuyên khuấy trộn huyền phù bột xenluloza. .

h) Lọc dịch đường thủy phân enzym

Huyền phù bột xenluloza thu được sau quá trình đường hoá được đem lọc hoặc để lắng để tách phần chất rắn gồm lignin và phần xenluloza chưa thủy phân hết, thu được dịch trong là glucoza có nồng độ 50-55 g/L, pH=5,1-5,2 để sử dụng.

i) Nhân nuôi nấm men

Để nuôi cấy nấm men, dịch đường xyloza và glucoza được trộn với nhau theo tỉ lệ thể tích là 1,2:1,0 để thu được hỗn hợp dịch đường có nồng độ xyloza khoảng 7,5 g/L và glucoza khoảng 22,5 g/L, tổng lượng đường khử khoảng 30 g/L, pH trong khoảng 4,4-4,8.

Sau khi cấp dịch đường, bổ sung dưỡng chất với tỉ lệ 1,7 g KCl; 13,8 g Na₂HPO₄.12H₂O; 10,0 g Ure; 1,25 g cao nấm men và 3,0 g MgSO₄.7H₂O tính trên 1 lít dịch đường.

Hỗn hợp dưỡng chất có thể được chuẩn bị riêng, khuấy trộn tới khi tan đều trong nước, rồi bổ sung vào thiết bị lên men, sau đó bổ sung chủng giống *Candida utilis* với tỉ lệ 0,12-0,14 g sinh khối/L dịch đường. Sau khi bổ sung dưỡng chất, pH của dịch đường trong khoảng 3,9-4,0. Tiến hành điều chỉnh pH của dịch nuôi cấy bằng dung dịch NH₃ nồng độ 5 % tới pH=4,5-4,6 (tiêu hao khoảng 3,0 ml/L). Tiến hành gia nhiệt (nếu cần) tới nhiệt độ 35-37°C và duy trì nhiệt độ ổn định trong khoảng 20 giờ, tới khi nồng độ nấm men đạt 7,5-8,0 g/L (tính theo nấm men khô) hoặc hết tăng trưởng sinh khối. Duy trì sục

khí với lưu lượng 45-50 L/L/h. Trong thời gian nuôi cấy tiến hành theo dõi thay đổi pH. Giá trị pH có thể tăng tới khoảng 5,0-5,2 khi tăng trưởng sinh khối đạt mức tối đa, vì vậy cần bổ sung dung dịch NH_3 5% để duy trì pH ổn định. Kết thúc quá trình lên men, dỡ dịch lên men và chuyển sang bước tiếp theo.

k) Cô đặc nấm men

Dịch lên men chứa sinh khối nấm men thu được được đem lọc, cô đặc bằng cách ly tâm để thu được sinh khối nấm men có độ khô từ 25-27%.

l) Sấy nấm men

Sinh khối nấm men thu được được đem sấy bằng phương pháp sấy thăng hoa, hoặc sấy phun tới độ khô từ 94-95%; hàm lượng protein thô từ 56,7-57,8 %; hàm lượng xơ thô từ 0,37-0,38 %; độ tro thô từ 11,6-14,2%; hiệu suất nấm men đạt được khoảng 8-9% so với khối lượng phế liệu gỗ khô tuyệt đối.

Chủng nấm men *Candida utilis* là chủng giống được nhân nuôi từ chủng giống gốc *Candida utilis* NBRC10707 (ATCC22023) của Trung tâm nghiên cứu sinh học Quốc Gia Nhật Bản, được lưu giữ tại Viện Công nghiệp thực phẩm dưới nhãn *Candida utilis* 060920.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1

Cân 300 g phế liệu gỗ có độ ẩm 11,34% được lấy từ nhà máy giấy Bãi Bằng (Tổng Công ty Giấy Việt Nam), chuyển vào thiết bị phản ứng dung tích 3,5 lít, rồi bổ sung 2,4 lít dung dịch axit sulfuric nồng độ 0,75%. Tiến hành gia nhiệt từ nhiệt độ 32°C đến 140°C trong 52 phút, rồi bảo ôn ở nhiệt độ này trong 40 phút. Sau đó làm nguội thiết bị bằng nước lạnh để hạ áp suất, rồi tiến hành chiết dịch đường sang bình thủy tinh dung tích 3 lít, thu được 1,62 lít dịch đường, giữ trong bể ổn nhiệt ở nhiệt độ 75°C trong 60 phút. Tiếp theo, trung hòa dung dịch đường bằng 6,5 ml dung dịch $\text{Ca}(\text{OH})_2$ nồng độ 150 g/L, sử dụng máy khuấy đĩa trục đứng để khuấy trộn đều trong 10 phút, đến khi pH của dung dịch ổn định và đạt 3,2. Sau đó bổ sung 4,8 ml dung dịch NH_3 25% và khuấy đều cho pH đạt 4,4. Duy trì khuấy trộn dịch đường trong 40 phút để kết thúc phản ứng trung hòa, sau đó để lắng và làm nguội dịch đường đến 35°C, tách bỏ kết tủa để thu dịch đường sau khi trung hòa. Tiếp đó, tiến hành sục không khí từ bơm sục khí công suất 32 lít/h trong 60 phút, bổ sung 0,08 g PAC, lại khuấy đều trong 1 phút, rồi để lắng trong 70 phút, khi đó

nhệt độ dung dịch hạ xuống còn khoảng 38°C. Sau đó lọc bằng bộ lọc hút chân không để tách kết tủa, tách bột bẩn và thu 1650 ml dung dịch đường xyloza có màu sẫm có nồng độ xyloza 14,01 g/L.

Song song với xử lý dịch đường thủy phân axit, cấp 2,0 lít nước vào thiết bị phản ứng, giữ trong 10 phút để axit từ dăm mảnh khuếch tán vào dung dịch, rồi chiết dung dịch ra khỏi thiết bị. Tiếp đó bổ sung 1,6 lít dung dịch kiềm chứa 44,4 g NaOH và 14,4 g Na₂S (đã được đun nóng đến nhiệt độ 60°C), rồi gia nhiệt tới 110°C trong 20 phút. Khi nhiệt độ đạt 110°C thì ngừng gia nhiệt và giữ trong 30 phút. Sau đó tiếp tục gia nhiệt tới 155°C trong 24 phút, rồi bảo ôn trong 130 phút, sau đó tiến hành làm nguội thiết bị phản ứng. Khi áp suất hạ xuống còn 0,2 MPa thì tiến hành chiết dịch đen ra bình thủy tinh 3 lít, tháo dỡ thiết bị phản ứng và chuyển bã rắn là bột xenluloza sang sàng bột, rửa bằng nước đến phản ứng trung hoà (pH của nước rửa cuối trong khoảng 6,5-7,5), đánh tơi bằng máy đánh tơi, bổ sung 2 lít nước và đánh tơi bột trong 5 phút, sau đó vắt nước bằng bộ lọc hút chân không, thu được 502 g bột xenluloza có độ khô 28,2% (141,5 g bột xenluloza khô tuyệt đối).

Chuyển bột xenluloza vào bình thủy tinh dung tích 3 lít, bổ sung 1415 mL dung dịch đệm natri xitrat pH=5,2. Tiếp theo bổ sung 0,5 g enzym SAE0020 (loại Cellic Ctec2 của Novozymes hoạt lực 1126 FPU/g), đặt trong bể khuấy siêu âm trong 20 phút, rồi chuyển vào tủ ấm cài đặt nhiệt độ ở 50°C trong 144 giờ. Sau đó tiến hành lọc dịch đường glucoza bằng bộ lọc hút chân không, thu được 1364 mL dung dịch glucoza có nồng độ 51,6 g/L, pH=5,1. Loại bỏ phần bã rắn còn lại là lignin.

Phối trộn 1650 mL dung dịch xyloza với 1364 mL dung dịch glucoza thu được ở trên và chuyển vào thiết bị lên men dung tích 5 lít, bổ sung các hợp chất KCl; Na₂HPO₄.12H₂O; ure, cao nấm men và MgSO₄.7H₂O với khối lượng tương ứng là 5,1 g; 41,5 g; 30,0 g; 3,75 g và 9,0 g, rồi tiến hành khuấy trộn đều đến khi các chất bổ sung hòa tan hết, sau đó bổ sung 0,38 g sinh khối nấm men chủng giống *Candida utilis*, tiến hành khuấy, bổ sung dung dịch NH₃ nồng độ 5% tới pH=4,6, cấp không khí từ bơm sục khí với công suất 150 lít/h và tiến hành quá trình lên men trong 20 giờ, duy trì nhiệt độ ổn định ở 35-37°C, điều chỉnh pH trong khoảng 4,6 bằng cách bổ sung dung dịch NH₃ 5%.

Sau khi kết thúc 20 giờ lên men liên tục, khi dịch lên men có nồng độ sinh khối 7,51 g/L (tính theo nấm men khô) thì ngừng lên men và lọc, cô đặc sinh khối bằng thiết bị ly tâm, thu nấm men ẩm và sấy tới độ khô từ 94-95% để thu được 22,5 g sinh khối nấm

men khô là protein đơn bào có hàm lượng protein thô 57,2 %, hàm lượng xơ thô 0,38 %, và độ tro thô 13,4%.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình nêu trong giải pháp nhằm tận dụng dăm mảnh vụn gỗ keo tai tượng, một phế phụ phẩm của ngành công nghiệp sản xuất bột giấy, để sản xuất protein đơn bào, là sản phẩm có giá trị và hữu ích, đáp ứng nhu cầu làm thức ăn chăn nuôi gia súc, gia cầm, nâng cao hiệu quả sử dụng nguồn chất thải sản xuất. Quy trình nhằm đường hóa được toàn bộ hemixenluloza và xenluloza của phế liệu gỗ, sử dụng đồng thời cả hai loại đường xyloza và glucoza thu được cho nuôi cấy nấm men nhằm thu sinh khối nấm men là protein đơn bào. Quy trình được thực hiện đơn giản có thể áp dụng được khi sản xuất ở quy mô công nghiệp.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất protein đơn bào từ phế liệu gỗ là dăm mảnh vụn gỗ keo tai tượng bao gồm các bước:

a) thủy phân axit

xử lý phế liệu gỗ với dung dịch H_2SO_4 0,75% theo tỷ lệ 1:8 (theo khối lượng/thể tích) ở 140°C trong 40 phút, chế độ gia nhiệt: từ nhiệt độ $25-35^\circ\text{C}$ đến nhiệt độ 140°C trong 50-60 phút, bảo ôn ở 140°C trong 40 phút; chiết dịch đường để thu dịch đường và phần bã rắn sau thủy phân axit;

b) ngược biến dịch đường

dịch đường thu được ở bước a) được để yên ở nhiệt độ $75-85^\circ\text{C}$ trong 1 giờ để thủy phân các oligosacarit thành monosacarit;

c) trung hòa dịch đường

dịch đường thu được ở bước b) được xử lý lần lượt bằng dung dịch $\text{Ca}(\text{OH})_2$ nồng độ 150 g/L ở $70-75^\circ\text{C}$ tới pH= 3,0-3,5, dung dịch NH_3 25% tới pH= 4,2-4,5; duy trì khuấy trộn dịch đường trong 40 phút; để lắng, làm nguội dịch đường đến $35-40^\circ\text{C}$, tách kết tủa để thu dịch đường sau khi trung hòa;

d) làm sạch dịch đường

tiến hành sục không khí dịch đường thu được ở bước c) với lưu lượng 20 lít/L trong khoảng 60 phút; bổ sung polyaluminium clorua (PAC) với lượng 0,05 g/L vào, khuấy đều trong 1-2 phút; để lắng trong khoảng 70 phút, sau đó lọc tách kết tủa để thu dịch đường xyloza có nồng độ 14,0-14,5 g/L;

e) rửa phần bã rắn thu được sau thủy phân axit

bổ sung nước vào phần bã rắn thu được sau thủy phân axit theo tỉ lệ (7,5-8):1 (theo thể tích/khối lượng phế liệu gỗ ban đầu khô tuyệt đối), giữ trong khoảng 10-30 phút để loại bỏ axit dư ra khỏi bã rắn, sau đó tách bỏ phần nước;

f) nấu kiềm

bổ sung dung dịch kiềm gồm hỗn hợp NaOH và Na_2S vào phần bã rắn thu được ở bước e) với lượng tương ứng là 14,8% và 4,8% so với khối lượng phế liệu gỗ ban đầu, với tỷ lệ nguyên liệu gỗ ban đầu khô tuyệt đối:dung dịch kiềm là 1: (5,5-6,0), gia nhiệt theo chế độ: tăng nhiệt độ từ $50-70^\circ\text{C}$ đến khoảng 110°C trong khoảng 20 phút, bảo ôn ở nhiệt độ này trong 30 phút, tiếp tục gia nhiệt đến nhiệt độ tối đa là $155-160^\circ\text{C}$ trong

khoảng 20-40 phút, bảo ôn ở nhiệt độ tối đa trong 130 phút; tiến hành dỡ bột xenluloza, tách bỏ dịch đen, rửa bột bằng nước đến phản ứng trung hòa, vắt nước để thu được bột xenluloza;

g) đường hóa bằng enzym

bổ sung dung dịch đệm natri xitrat có độ pH=5,2 vào bột xenluloza thu được ở bước h) theo tỉ lệ 10:1 (theo thể tích/khối lượng bột khô tuyệt đối) và enzym xenulaza (loại SAE0020 của Sigma Aldrich) với lượng khoảng 400 FPU/100 g bột xenluloza khô tuyệt đối, khuấy trộn đều huyền phù bột và giữ ở nhiệt độ 50°C trong 144 giờ;

h) lọc dịch đường thủy phân enzym

huyền phù bột xenluloza thu được ở bước g) được đem lọc để tách bỏ phần chất rắn gồm lignin và phần xenluloza chưa thủy phân hết, thu được dịch đường glucoza có nồng độ 50-55 g/L, pH=5,1-5,2;

i) nhân nuôi nấm men

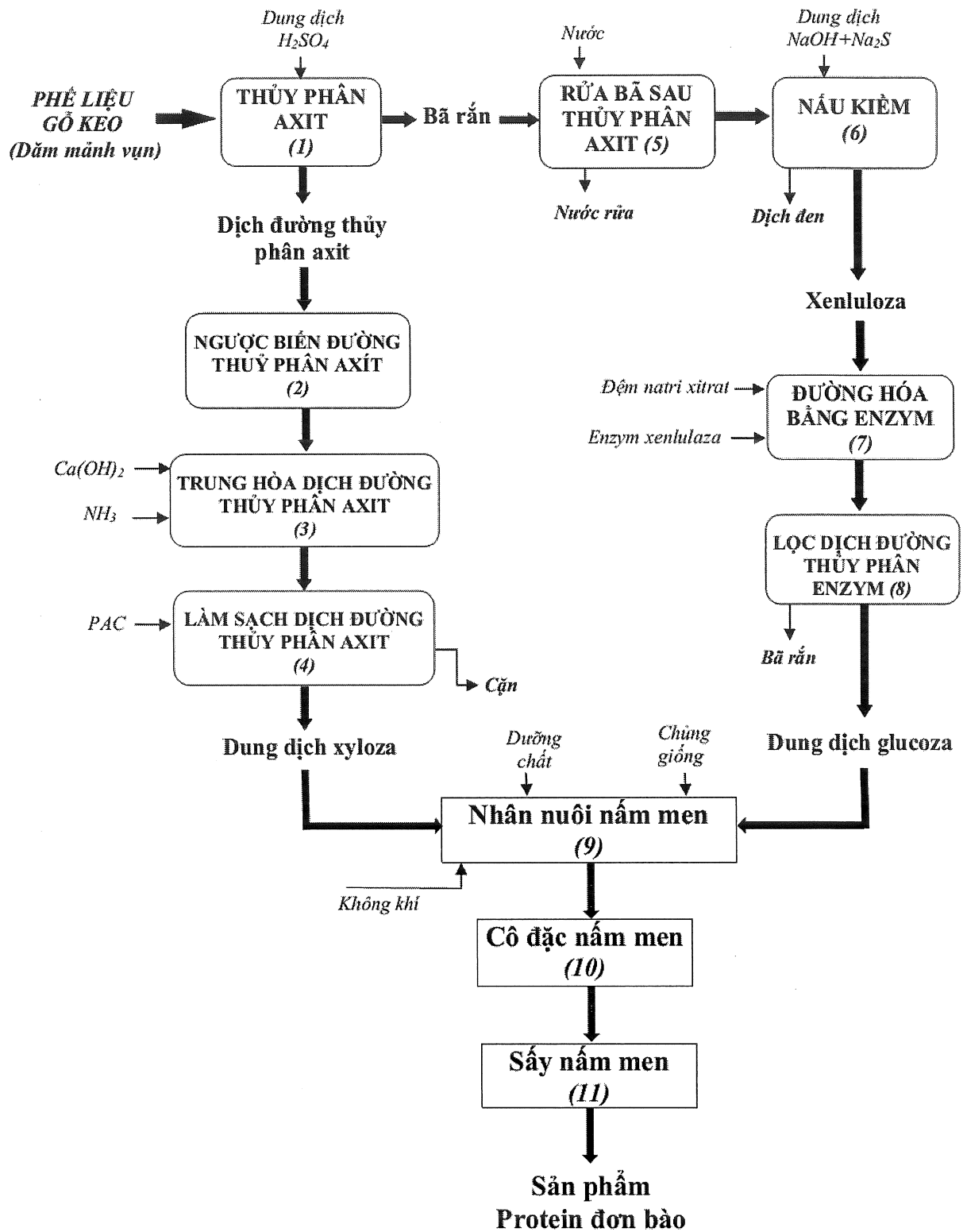
trộn dịch đường xyloza thu được ở bước d) với dịch đường glucoza thu được ở bước h) theo tỉ lệ thể tích 1,2:1,0; bổ sung dưỡng chất vào với tỉ lệ 1,7 g KCl; 13,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 10,0 g Ure; 1,25 g cao nấm men và 3,0 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ trên 1 lít dịch đường; bổ sung chủng *Candida utilis* NBRC10707 (số đăng ký tại ATCC 22023) với tỉ lệ 0,12-0,14 g sinh khối /L dịch đường, và tiến hành nhân nuôi nấm men trong khoảng 20 giờ tới khi nồng độ nấm men đạt 7,5-8,0 g/L tính theo nấm men khô hoặc hết tăng trưởng sinh khối; các điều kiện nhân nuôi: duy trì pH của dịch nuôi cấy trong khoảng 4,5-4,6 bằng dung dịch NH_3 5 %, sục khí với lưu lượng 45-50 L/L/h, duy trì nhiệt độ của dịch nuôi cấy ở 35-37°C;

k) cô đặc nấm men

dịch lên men chứa sinh khối nấm men thu được ở bước i) được đem lọc và cô đặc bằng cách ly tâm để thu sinh khối nấm men có độ khô từ 25-27%;

l) sấy nấm men

sinh khối nấm men thu được được đem sấy tới độ khô từ 94-95% là protein đơn bào có hàm lượng protein thô từ 56,7-57,8 %, hàm lượng xơ thô từ 0,37-0,38 %, và độ tro thô từ 11,6-14,2%.



Hình 1