



(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) 
2-0002063

(51)⁷ **C12P 7/06, 7/10, 7/14**

(13) **Y**

(21) 2-2016-00431

(22) 08.12.2016

(45) 25.07.2019 376

(43) 25.05.2017 350

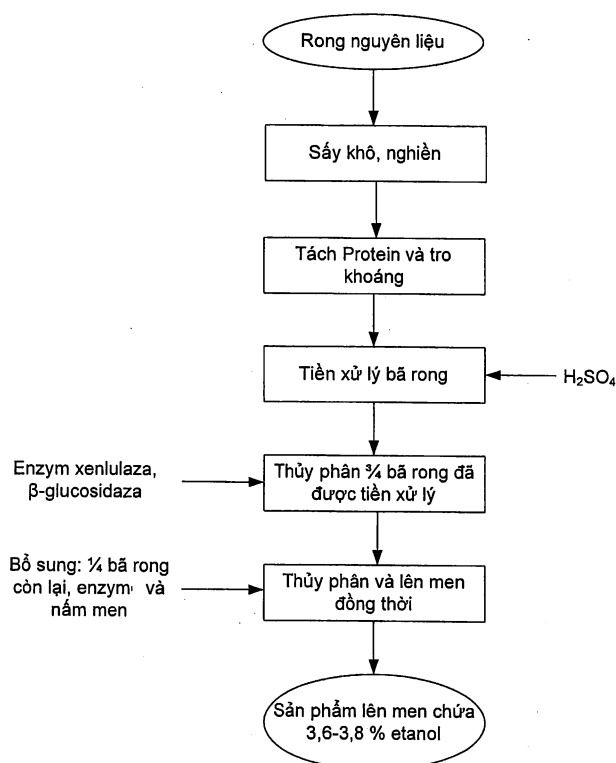
(73) **CÔNG TY CỔ PHẦN THIẾT KẾ CÔNG NGHIỆP HÓA CHẤT (VN)**
21A phố Cát Linh, phường Cát Linh, quận Đống Đa, thành phố Hà Nội

(72) **Hoàng Kim Anh (VN), Ngô Quốc Khánh (VN), Lưu Ngọc Vĩnh (VN), Nguyễn Minh Hải (VN)**

(74) **Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ PADEMARK (PADEMARK CO.,LTD.)**

(54) **PHƯƠNG PHÁP ĐƯỜNG HÓA VÀ LÊN MEN ĐỒNG THỜI SINH KHỐI RONG
CHAETOMORPHA SP.**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến phương pháp đường hóa và lên men đồng thời sinh khối rong *Chaetomorpha* sp. nhằm làm tăng hàm lượng etanol thu được. Phương pháp này bao gồm các bước: sấy khô trong nước lợ *Chaetomorpha* sp., rồi nghiền nhỏ; tách protein và tro khoáng từ rong; tiền xử lý bã rong; thủy phân bã rong; và thủy phân và lên men đồng thời dịch thủy phân để thu được dịch lên men sinh khối rong *Chaetomorpha* sp., chứa hàm lượng etanol đạt khoảng 3,6-3,8% (v/v).



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực sản xuất hóa chất, cụ thể là đề cập đến việc làm tăng hiệu quả thu nhận etanol từ sinh khối rong nói chung và từ sinh khối rong nước lợ nói riêng, cụ thể là đề cập đến phương pháp đường hóa và lên men đồng thời sinh khối rong nước lợ *Chaetomorpha* sp. nhằm sản xuất etanol. Giải pháp hữu ích góp phần chọn lựa nguyên liệu thay thế cho ngũ cốc trong quá trình sản xuất etanol.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Trong nhóm nhiên liệu sinh học đang được sử dụng hiện nay, etanol là đối tượng được sử dụng phổ biến nhất trong nhiều lĩnh vực của đời sống, chẳng hạn làm dung môi cho các ngành công nghiệp dược phẩm, mỹ phẩm, làm nguyên liệu để sản xuất các hợp chất hữu cơ, được sử dụng rộng rãi trong y tế, được sử dụng làm chất đốt, nhiên liệu vận hành các loại động cơ, v.v.. Hoa Kỳ và Brazil hiện là hai quốc gia tiêu thụ etanol lớn nhất thế giới. Hoa Kỳ cũng là nước sản xuất etanol lớn nhất với 6,5 tỷ gallon/năm, tuy nhiên lượng etanol này cũng chỉ thay thế được cho 6,4% nhu cầu về xăng dầu (Westcott, 2007).

Nhiên liệu etanol sinh học có thể được sản xuất dễ dàng bằng phương pháp lên men các nguồn hydrat cacbon có sẵn trong tự nhiên như đường, ngô, sắn, mùn, gỗ, v.v. sử dụng các vi sinh vật có năng suất cao có thể chuyển đổi các loại đường đơn thành etanol. Mặc dù etanol sinh học có thể được sản xuất từ sinh khối lignocellulose (như gỗ, rơm, rạ, bã mía, cỏ, v.v.), nhưng các loại cây lương thực vẫn được coi là nguồn nguyên liệu tốt nhất do hiệu suất sinh etanol cao, công nghệ thủy phân tinh bột và lên men khá dễ dàng. Hiện nay, Hoa Kỳ sản xuất etanol chủ yếu từ nguyên liệu ngũ cốc (Westcott, 2007). Điều này không được xem là phát triển bền vững do vấn đề về môi trường, cũng như tác động về kinh tế và an ninh lương thực toàn cầu.

Một nguồn nguyên liệu mới được xem là ứng viên có tiềm năng thay thế được các nguyên liệu nêu trên đó là các loại rong (tảo). Rong (tảo) có cấu trúc mềm dẻo, không

chứa hoặc chứa rất ít lignin. Điều này giúp cho rong có thể được dễ dàng chuyển hóa thành các dạng đường có thể lên men để sản xuất etanol.

Phương pháp sản xuất etanol sinh học từ rong (tảo) đã biết là phương pháp đường hóa toàn bộ sinh khối rồi sau đó tiến hành lên men (SHF-Separate Hydrolysis and Fermentation) như được thể hiện trên Hình 1. Dựa trên phương pháp này, Park và cộng sự (2012) đã sử dụng sinh khối rong đỏ *Gelidium amansii* làm nguyên liệu để sản xuất etanol và sử dụng phương pháp đường hóa liên tục với H_2SO_4 loãng (2%) ở nhiệt độ $150^\circ C$. Phân tích bằng cột Bio-LC sử dụng sắc ký lỏng tính năng cao (HPLC) cho thấy rằng tổng lượng hydrat cacbon của rong này là 67,3% (w/w). Do đó, hàm lượng glucoza tối đa dự đoán được là 0,166g, galactoza là 0,256g trên 1g sinh khối rong khô. Tổng số đường lên men được (glucoza và galactoza) là 0,422g trên 1g sinh khối *G. amansii*. Kết quả của phương pháp này cho thấy hàm lượng galactoza thu được sau khi thủy phân bằng axit đạt được khoảng 68% so với galactoza lý thuyết. Nguyên nhân là do quá trình chuyển hóa bằng axit cộng với nhiệt độ cao đã làm một số đường chuyển hóa thành các chất ức chế như 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF). Do các chất ức chế có mặt khá nhiều nên hiệu suất lên men chỉ đạt được 38%, với nồng độ etanol thu được là 0,5%.

Một phương pháp được đề xuất để khắc phục nhược điểm của phương pháp SHF là phương pháp đường hóa và lên men đồng thời (SSF- Simultaneous Saccharification and Fermentation) như được thể hiện trên hình 2. Phương pháp này được cho là tiết kiệm được thời gian thực hiện. Lee và cộng sự (2013) đã thực hiện phương pháp SSF trên sinh khối rong nâu *Saccharina japonica* với sự kết hợp hai loại enzym là endoglucanaza và β -glucosidaza. Kết quả cho thấy hiệu suất lên men etanol đạt trên 80%. Tuy nhiên, hàm lượng etanol thu được chỉ đạt 1%. Kết quả này cũng khá tương đồng với một số nghiên cứu khác, khi nồng độ etanol sau quá trình lên men chỉ đạt 0,6-0,7% (Mitsunori Yanagisawa et al., 2011b; Min-Ji Kim, 2012) hay 0,8-1% (Jessica M. Adams, 2009; Lee et al., 2009; Yeon et al., 2010; Jang et al., 2012). Nguyên nhân chính của việc tạo ra etanol với lượng thấp là do lượng đường có thể lên men trong sinh khối rong không nhiều. Mitsunori Yanagisawa et al. (2011) đã tiến hành nghiên cứu trên các đối tượng rong lục và rong đỏ có hàm lượng hydrat cacbon cao hơn và sử dụng kết hợp các enzym

thủy phân tinh bột, β -1,3 glucan và xenluloza cho thấy hàm lượng glucoza thu được trong dịch lên men cao. Tuy nhiên, nồng độ etanol sau quá trình lên men các loại rong lục và rong đỏ này cũng chỉ đạt khoảng 2-3%.

Nhật Bản là nước đi đầu trong các nghiên cứu sử dụng rong nước lợ làm nguyên liệu đầu vào để sản xuất nhiên liệu sinh học. Akiko Isa (2009) đã xác định thành phần hydrat cacbon của một số loài rong nước lợ *Enteromorpha* sp., *Cheatomorpha* sp., *Cladophora* sp., *Ulva* sp., mọc tự nhiên ở Thái Lan, Việt Nam và Nhật Bản. Kết quả cho thấy, rong *Cheatomorpha* sp. ở Việt Nam chứa hàm lượng glucoza cao nhất (có thể lên tới 300mg/g sinh khối) và sử dụng xenulaza có thể chuyển 95% hydrat cacbon thành đường. Hàm lượng đường tạo ra trong dung dịch đạt 3,7% (w/v). Rong cũng được chuyển hóa thành etanol bằng nấm men *S. cerevisiae* IR-2 với hiệu suất lên men đạt 90% và hàm lượng etanol cuối là 14-15g/l.

Tại Việt Nam, nhóm nghiên cứu của các tác giả giải pháp hữu ích hợp tác giữa Viện Sinh học nhiệt đới, Công ty Cổ phần thiết kế Công nghiệp hóa chất (CECO) và Trường Đại học Công nghệ Sài Gòn đã nghiên cứu chuyển hóa sinh khối rong nước lợ *Chaetomorpha* sp. thành etanol sinh học. Đây là loài rong sống phổ biến trong các kênh rạch và các ao nuôi thủy sản nước lợ ở các tỉnh đồng bằng sông Cửu Long. Rong *Chaetomorpha* sp. có sinh khối rất lớn và tốc độ sinh trưởng rất nhanh nên chúng thường chiếm ưu thế trong các loại thủy vực. Loài rong này có hàm lượng hydrat cacbon từ 40% đến 50% tùy theo mùa, hàm lượng glucoza trên 70% trong tổng số hydrat cacbon của rong. Tuy nhiên, khi áp dụng phương pháp SHF và SSF trên loài rong này, hàm lượng etanol thu được sau quá trình lên men cũng chỉ đạt tương ứng là 1,4% và 1,9% (v/v), với hiệu suất lên men tương ứng là 72% và 80%, khiến cho quá trình chưng cất thu etanol 96% trở nên khó khăn và tốn kém.

Do vậy, vẫn có nhu cầu tìm kiếm phương pháp khác dựa trên nguồn sinh khối rong *Chaetomorpha* sp. trong nước nhằm nâng cao hiệu suất cũng như hàm lượng etanol thu được sau quá trình lên men.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là đề xuất phương pháp đường hóa và lên men đồng thời sinh khối rong nước lợ *Chaetomorpha* sp. nhằm làm tăng hàm lượng etanol thu được so với các giải pháp kỹ thuật đã biết.

Để đạt được mục đích nêu trên, phương pháp theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước:

Rong nước lợ *Chaetomorpha* sp. sau khi thu nhận được loại tạp chất như bùn đất, và các loại động vật thủy sinh, rồi đem sấy khô đến độ ẩm 4-8%, sau đó nghiền nhỏ tới kích thước nằm trong khoảng 0,1-1mm.

Tách protein và tro khoáng từ rong nước lợ *Chaetomorpha* sp. bằng cách ngâm sinh khối rong đã sấy khô và nghiền nhỏ trong dung dịch NaOH nồng độ 0,75%-1,0%, với tỷ lệ nguyên liệu/dung dịch là 1/20 (w/v), ở nhiệt độ 48-50°C trong 1 giờ, trong điều kiện khuấy liên tục với tốc độ 100-150 vòng/phút; sau đó tách dung dịch NaOH có chứa protein hòa tan, bã rong thu được được rửa để loại bỏ kiềm dư, và sấy khô về độ ẩm 4-8%;

Tiền xử lý bã rong bằng cách bổ sung dung dịch H₂SO₄ nồng độ 1,75 % (w/v) vào bã rong theo tỷ lệ khối lượng bã rong/tổng thể tích hỗn hợp nguyên liệu nằm trong khoảng 13-15% (w/v), ở nhiệt độ nằm trong khoảng 120-125°C, trong thời gian 25-30 phút;

Thủy phân ba phần tư lượng bã rong đã được tiền xử lý bằng enzym xenlulaza và β -glucosidaza, trong đó nồng độ enzym xenlulaza nằm trong khoảng 25-30 FPU/g hydrat cacbon có trong lượng bã rong đem thủy phân, nồng độ enzym β -glucosidaza nằm trong khoảng 8-10 CBU/g hydrat cacbon có trong lượng bã rong đem thủy phân, quá trình thủy phân được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng 50-55°C trong thời gian 35-36 giờ với tốc độ khuấy nằm trong khoảng 180-200 vòng/phút để thu được dịch thủy phân;

Thủy phân và lên men đồng thời bằng cách bổ sung thêm vào dịch thủy phân lượng bã rong đã được tiền xử lý còn lại cùng với enzym xenlulaza, β -glucosidaza và nấm men *Saccharomyces cerevisiae*, trong đó nồng độ enzym xenlulaza nằm trong khoảng 20-25 FPU/g hydrat cacbon có trong lượng bã rong bổ sung, nồng độ enzym β -glucosidaza

nằm trong khoảng 8-10 CBU/g hydrat cacbon có trong lượng bã rong bổ sung, mật độ nấm men nằm trong khoảng $20-25 \times 10^6$ CFU/mL dịch lên men, nhiệt độ lên men từ 37-38°C, thời gian lên men từ 32-36 giờ với tốc độ khuấy từ 80 đến 120 vòng/phút để thu được dịch lên men sinh khối rong *Chaetomorpha* sp. có hàm lượng etanol đạt khoảng 3,6-3,8% (v/v).

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là sơ đồ thể hiện các bước của phương pháp đường hóa toàn bộ sinh khối rồi sau đó tiến hành lên men (phương pháp SHF);

Hình 2 là sơ đồ thể hiện các bước của phương pháp đường hóa và lên men đồng thời (phương pháp SSF);

Hình 3 là sơ đồ thể hiện các bước của phương pháp đường hóa và lên men đồng thời theo giải pháp hữu ích;

Hình 4a, Hình 4b và Hình 4c lần lượt là giản đồ phân bố kích thước hạt của rong (hình 4a), bã rong sau khi loại protein và trước bước tiền xử lý (hình 4b) và bã rong sau bước tiền xử lý (hình 4c).

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Nguyên nhân cơ bản khiến cho hàm lượng etanol thu được từ quá trình lên men thấp là do hàm lượng hydrat cacbon trong nguyên liệu ban đầu không cao (xấp xỉ 45% theo tỷ lệ khối lượng so với khối lượng khô của nguyên liệu là sinh khối rong). Bên cạnh đó, lượng đường lên men được hiệu quả nhất là glucoza cũng chỉ chiếm khoảng 70-74% tổng lượng hydrat cacbon, cấu trúc tinh thể phức tạp của xenluloza trong rong *Chaetomorpha* sp. cũng gây khó khăn cho quá trình chuyển hóa thành đường có thể lên men. Ngoài ra, do sinh khối rong có cấu trúc phức tạp và không tan trong nước nên nếu sử dụng một lượng nguyên liệu ban đầu quá lớn sẽ làm tăng độ nhớt của môi trường và làm giảm hiệu suất lên men.

Giải pháp hữu ích được đề xuất nhằm giải quyết hai vấn đề là làm tăng lượng hydrat cacbon ban đầu của nguyên liệu và tăng lượng nguyên liệu đưa vào quá trình lên men nhằm làm tăng hàm lượng etanol thu được, cụ thể là:

- Làm tăng hàm lượng hydrat cacbon tổng trong sinh khối rong bằng cách loại protein và các loại khoáng. Điều này giúp tăng hàm lượng hydrat cacbon trong bã rong sau khi tách protein, đồng thời tạo ra một sản phẩm phụ có giá trị là protein của rong.

- Cải tiến phương pháp lên men SSF bã rong sau khi tách protein qua hai giai đoạn:

i) Thủy phân bã rong bằng hệ enzym xenlulaza, bã rong sau thủy phân sẽ chuyển một phần thành dạng lỏng và có độ nhớt thấp;

ii) Bổ sung thêm vào dịch thủy phân một lượng bã rong đã được tiền xử lý phù hợp để làm tăng hàm lượng hydrat cacbon trong môi trường lên men, đồng thời bổ sung thêm một lượng enzym xenlulaza, β -glucosidaza và nấm men *Saccharomyces cerevisiae*. Môi trường lên men có hàm lượng hydrat cacbon cao nhưng độ nhớt thấp, kết hợp với một quá trình lên men hiệu quả sẽ giúp tăng lượng etanol thu được.

Các hóa chất được sử dụng trong quy trình: NaOH (dạng tinh thể, độ tinh khiết trên 90%); H_2SO_4 (dung dịch, độ tinh khiết 95%); nước cất; $Ca(OH)_2$ (dạng bột, độ tinh khiết 98%); enzym xenlulaza (dạng dịch, có hoạt lực trên 150 FPU/mL enzym); enzym β -glucosidaza (dạng dịch, có hoạt lực trên 300 CBU/mL enzym); nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (dạng bột, mật độ vi sinh vật trên 10^8 CFU/g).

Các thiết bị được sử dụng trong quy trình như máy điện trở, máy nghiền đĩa, thiết bị ly tâm, nồi hơi, bình phản ứng đều là các thiết bị chuyên dụng và được sử dụng thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Phương pháp đường hóa và lên men đồng thời theo giải pháp hữu ích được thể hiện như nêu trong hình 3, cụ thể là:

Chuẩn bị nguyên liệu:

Rong nước lợ *Chaetomorpha* sp. được thu nhận từ các ao nuôi thủy sản nước lợ thuộc một số tỉnh ven biển đồng bằng sông Cửu Long. Rong được loại tạp chất như bùn đất, và các loại động vật thủy sinh (ốc, tôm, cá nhỏ...). Sinh khối rong thu được được đem sấy khô đến độ ẩm 4-8%, rồi nghiền nhỏ tới kích thước 0,1-1mm. Nguyên liệu rong

ban đầu có thành phần hóa học bao gồm: tổng hydrat cacbon 40-47%, protein 12-15%, lipit 3-4%, và tro khoáng 28-29%.

Tách protein và tro khoáng từ rong:

Protein trong rong phần lớn là nhóm tan trong dung môi kiềm, chiếm khoảng 50-55% và nhóm tan trong nước chiếm tỷ lệ từ 30 đến 35%. Do đó, dung dịch NaOH loãng với nồng độ 0,75% -1% được sử dụng làm dung môi tách protein.

Nguyên liệu được ngâm trong dung dịch NaOH với tỷ lệ nguyên liệu/dung dịch là 1/20 (w/v). Quá trình tách protein và các thành phần khoáng của nguyên liệu được tiến hành ở nhiệt độ 48-50°C, trong điều kiện khuấy liên tục với tốc độ 100-150 vòng/phút và thời gian là 1 giờ. Sau khi kết thúc quá trình này, dung dịch chứa protein hòa tan sẽ được tách bằng phương pháp ly tâm. Bã rong được thu nhận, rửa để loại bỏ kiềm dư, sấy khô về độ ẩm 4-8%, và được sử dụng làm nguyên liệu cho quá trình lên men tiếp theo. Sau quá trình tách protein và tro khoáng, hàm lượng hydrat cacbon trong nguyên liệu gia tăng đến 70-72% (trong bã rong), hàm lượng protein tổng còn sót lại là 4%, lipit còn khoảng 1% và đặc biệt thành phần tro khoáng chỉ còn 9-12%. Việc sử dụng dung dịch NaOH làm dung môi tách protein và tro khoáng còn góp phần phân rã nguyên liệu và giảm kích thước hạt của nguyên liệu. Điều này sẽ làm tăng bề mặt tiếp xúc của nguyên liệu với các enzym thủy phân và làm tăng hiệu quả đường hóa giải phóng các đường đơn giúp quá trình lên men dễ dàng hơn. Kết quả cho thấy (xem Hình 4a và Hình 4b), giá trị D_{v50} (giá trị trung vị - biểu thị 50% tổng số hạt có kích thước nhỏ hơn D_{v50}) của rong *Chaetomorpha* sp. là 502,69 μ m, trong khi giá trị này ở bã rong sau khi loại protein giảm xuống còn 444,807 μ m. Điều này cho thấy một phần cấu trúc nguyên liệu đã bị phá vỡ làm giảm kích thước hạt của nguyên liệu. Bên cạnh đó, việc giảm kích thước hạt cũng làm tăng tổng diện tích bề mặt của hạt nguyên liệu từ 206,01 lên 275,96cm²/cm³.

Tiền xử lý bã rong:

Mục đích của quá trình tiền xử lý là nhằm phá vỡ cấu trúc của polysacarit và giảm kích thước hạt của nguyên liệu (bã rong sau khi tách protein) để tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình thủy phân bằng enzym tiếp theo. Bước tiền xử lý bã rong được thực hiện

bằng cách bổ sung dung dịch H_2SO_4 nồng độ 1,75 % (w/v) vào bã rong theo tỷ lệ khối lượng bã rong/tổng thể tích hỗn hợp nguyên liệu nằm trong khoảng 13-15% (w/v), ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 120 đến 125°C, trong thời gian từ 25-30 phút;

Sau quá trình tiền xử lý, kích thước hạt của bã rong tiếp tục giảm rõ rệt và đồng thời diện tích bề mặt của hạt cũng tăng lên đáng kể (xem Hình 4b và hình 4c). Kết quả cho thấy D_{v50} của bã rong từ 444,807 μm giảm xuống còn 83,786 μm và diện tích bề mặt hạt tăng mạnh từ 275,96 lên 1481,4 cm^2/cm^3 .

Thủy phân bã rong đã được tiền xử lý:

Ba phần tư lượng bã rong thu được sau quá trình tiền xử lý sẽ được trung hòa bằng $\text{Ca}(\text{OH})_2$ về pH=5 để tiếp tục quá trình thủy phân. Tiến hành thủy phân số bã rong này bằng enzym xenlulaza và β -glucosidaza. Các enzym này là loại có bán trên thị trường, trong đó nồng độ enzym xenlulaza nằm trong khoảng 25-30 FPU/g hydrat cacbon có trong lượng bã rong đem thủy phân, nồng độ enzym β -glucosidaza nằm trong khoảng 8-10 CBU/g hydrat cacbon có trong lượng bã rong đem thủy phân. Quá trình thủy phân được thực hiện trong bình phản ứng hóa học có cánh khuấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50 đến 55°C trong thời gian 35-36 giờ với tốc độ khuấy nằm trong khoảng 180-200 vòng/phút để thu được dịch thủy phân. Dịch thủy phân này có hàm lượng đường khử vào khoảng 64,8 g/L trong đó có 39,3 g/L là đường glucoza.

Thủy phân và lên men đồng thời:

Bã rong sau giai đoạn thủy phân đã tạo ra một lượng đáng kể đường có thể lên men là glucoza. Trong giai đoạn thủy phân và lên men đồng thời tiếp theo, lượng bã rong còn lại (một phần tư lượng bã rong) được bổ sung cùng với enzym và nấm men. Lúc này, dịch thủy phân được điều chỉnh tiếp về pH=5 bằng $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Do đã có sẵn một lượng glucoza được tạo ra trong giai đoạn thủy phân trước đó, quá trình thủy phân và lên men đồng thời theo giải pháp hữu ích diễn ra nhanh và mạnh hơn so với các quá trình SSF thông thường. Nồng độ enzym xenlulaza được bổ sung nằm trong khoảng 20-25 FPU/g hydrat cacbon có trong lượng bã rong bổ sung, nồng độ enzym β -glucosidaza nằm trong khoảng 8-10 CBU/g hydrat cacbon có trong lượng bã rong bổ sung và mật độ nấm men được sử dụng

nằm trong khoảng $20\text{-}25 \times 10^6$ CFU/mL dịch lên men. Việc bổ sung các enzym và nấm men thích hợp giúp tăng cường quá trình thủy phân và tăng tốc độ chuyển hóa bã rong thành đường đơn trong cả hai giai đoạn. Hàm lượng hydrat cacbon cao cộng với tốc độ thủy phân mạnh đã làm tăng đáng kể hiệu quả thủy phân và lên men đồng thời. Quá trình lên men được thực hiện ở nhiệt độ từ $37\text{--}38^\circ\text{C}$, trong thời gian từ 32-36 giờ với tốc độ khuấy nằm trong khoảng 80-120 vòng/phút.

Kết quả của quá trình thủy phân và lên men đồng thời thu được dịch lên men sinh khối rong *Chaetomorpha* sp. với hàm lượng etanol đạt khoảng 3,6-3,8% (v/v) khi đo được bằng sắc ký lỏng cao áp, hiệu suất lên men xấp xỉ 86-90%, được cải thiện đáng kể so với phương pháp SSF (nồng độ etanol chỉ đạt khoảng 1,7-1,8% (v/v) và hiệu suất lên men xấp xỉ 80 %). Phương pháp này là tiền đề cho việc sử dụng nguyên liệu thay thế ngũ cốc trong sản xuất etanol sinh học.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ: Sản xuất dịch lên men sinh khối rong nước lợ *Chaetomorpha* sp. bằng pháp đường hóa và lên men đồng thời.

Các hóa chất được sử dụng trong quy trình: NaOH (dạng tinh thể, độ tinh khiết trên 90%); H_2SO_4 (dung dịch, độ tinh khiết 95%); nước cất; $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (dạng bột, độ tinh khiết 98%); enzym xenlulaza dùng loại Cellic Ctec2, enzym β -glucosidaza dùng loại Novozyme 188; sử dụng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* chủng thương mại Lallemmand.

Các thiết bị được sử dụng là máy sấy điện trở, dung tích 150L, nhiệt độ sử dụng từ 60 đến 200°C ; máy nghiền đĩa, công suất 5kg/giờ; bình phản ứng hóa học hình trụ đứng, có hệ thống kiểm soát nhiệt độ (từ 30 đến 100°C), với cánh khuấy và điều chỉnh tốc độ khuấy (từ 10 đến 250 vòng/phút), dung tích 300L, được sử dụng để tách protein và khoáng trong sinh khối rong; thiết bị ly tâm liên tục có năng suất 250L/giờ, công suất 7,5 HP và tốc độ đạt 20.000 vòng/phút, được sử dụng để tách dịch trích protein ra khỏi bã rong; nồi hơi nước áp lực cao, dung tích 180L, nhiệt độ hoạt động từ 50 đến 150°C , có cánh khuấy với tốc độ khuấy từ 10 đến 50 vòng/phút được sử dụng để tiền xử lý bã rong; bình phản ứng hóa học hình trụ đứng, có hệ thống kiểm soát nhiệt độ (từ 30 đến 100°C),

với cánh khuấy và điều chỉnh tốc độ khuấy từ 10 đến 250 vòng/ phút, dung tích 200L được sử dụng để thủy phân và lên men bã rong.

Quy trình được tiến hành như sau:

Rong *Chaetomorpha* sp. được thu nhận từ các ao nuôi thủy sản nước lợ thuộc một số tỉnh ven biển đồng bằng sông Cửu Long. Rong được loại tạp chất như bùn đất, và các loại động vật thủy sinh (ốc, tôm, cá nhỏ...).

Sấy khô 300kg rong *Chaetomorpha* sp. bằng máy sấy điện trở đến độ ẩm khoảng 4-8%, sau đó nghiền nhỏ bằng thiết bị nghiền đĩa tới kích thước 0,1-1mm, thu được 30 kg nguyên liệu.

Tách protein và tro khoáng bằng cách ngâm 10kg nguyên liệu trong 200 lít dung dịch NaOH nồng độ 0,75%. Quá trình tách protein và tro khoáng được tiến hành ở nhiệt độ 50°C, trong điều kiện khuấy liên tục với tốc độ 100 vòng/phút và thời gian là 1 giờ. Sau đó dung môi chứa protein hòa tan được tách bằng phương pháp ly tâm. Bã rong thu được được rửa để loại bỏ kiềm dư, sấy khô về độ ẩm 4-8%, thu được khoảng 6,5kg bã rong. Thực hiện 3 lần để thu được khoảng 20kg bã rong khô.

Tiền xử lý bã rong thu được trong nồi hơi nước áp lực cao bằng cách bổ sung 120 lít dung dịch H₂SO₄ nồng độ 1,75% (w/v) vào 20kg bã rong (để đạt được tỷ lệ khối lượng bã rong/tổng thể tích hỗn hợp nguyên liệu là 14%), ở nhiệt độ 120°C trong thời gian 30 phút. Kết quả thu được khoảng 140 lít dịch.

Chuyển ba phần tư lượng bã rong đã được tiền xử lý (khoảng 105 lít dịch, chứa tương ứng 15kg bã rong) vào thiết bị thủy phân và lên men. Trung hòa ba phần tư bã rong đã tiền xử lý về pH=5 bằng cách bổ sung Ca(OH)₂ vào nguyên liệu. Thủy phân bã rong đã trung hòa bằng cách bổ sung 2100 mL enzym xenlulaza (Cellic Ctec2) và 335 mL enzym β -glucosidaza (Novozyme 188), để đạt nồng độ enzym xenlulaza là 30 FPU/g hydrat cacbon có trong lượng bã rong đem thủy phân và nồng độ enzym β -glucosidaza là 10 CBU/g hydrat cacbon có trong lượng bã rong đem thủy phân, bổ sung 12-15 lít nước để đạt nồng độ chất khô trong bã rong là 12%. Quá trình thủy phân được thực hiện ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 36 giờ với tốc độ khuấy là 200 vòng/phút để thu được khoảng 120 lít dịch thủy phân.

Sau khi kết thúc quá trình thủy phân, tiến hành bổ sung thêm nốt lượng bã rong đã được tiền xử lý còn lại (khoảng 35 lít dịch, chứa tương ứng 5kg bã rong), điều chỉnh tiếp độ pH của dịch thủy phân về pH=5 bằng $\text{Ca}(\text{OH})_2$, sau đó 450 mL enzym xenlulaza, 115 mL enzym β -glucosidaza và 10 lít dung dịch nấm men *Saccharomyces cerevisiae*, tương ứng với nồng độ enzym xenlulaza là 20 FPU/g hydrat cacbon có trong lượng bã rong bổ sung, nồng độ enzym β -glucosidaza là 10 CBU/g hydrat cacbon có trong lượng bã rong bổ sung, mật độ nấm men nằm trong khoảng $20\text{-}25 \times 10^6$ CFU/mL dịch lên men. Quá trình thủy phân và lên men đồng thời được thực hiện ở nhiệt độ $37,5^\circ\text{C}$, trong thời gian 36 giờ với tốc độ khuấy 100 vòng/phút. Kết quả thu được 165 lít dịch lên men sinh khối rong *Chaetomorpha* sp. với hàm lượng etanol đạt khoảng 3,6-3,8% (v/v), hiệu suất lên men xấp xỉ 86-90%.

Hiệu quả của giải pháp hữu ích

Phương pháp theo giải pháp hữu ích được cải tiến hơn so với các phương pháp SHF và SSF đã biết nhằm làm tăng lượng hydrat cacbon ban đầu của nguyên liệu, tăng lượng nguyên liệu đưa vào quá trình lên men, và giảm độ nhớt của môi trường lên men dẫn đến làm tăng hàm lượng etanol thu được đạt đến khoảng 3,6-3,8% (v/v), với hiệu suất lên men xấp xỉ 80-90%, là tiền đề cho việc chọn lựa nguyên liệu trong nước là rong nước lợ *Chaetomorpha* sp. thay thế cho ngũ cốc trong quá trình sản xuất etanol.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp đường hóa và lên men đồng thời sinh khối rong *Chaetomorpha* sp. bao gồm các bước:

Sấy khô rong nước lợ *Chaetomorpha* sp. đã loại tạp chất về độ ẩm 4-8%, sau đó nghiền nhỏ tới kích thước nằm trong khoảng 0,1-1mm;

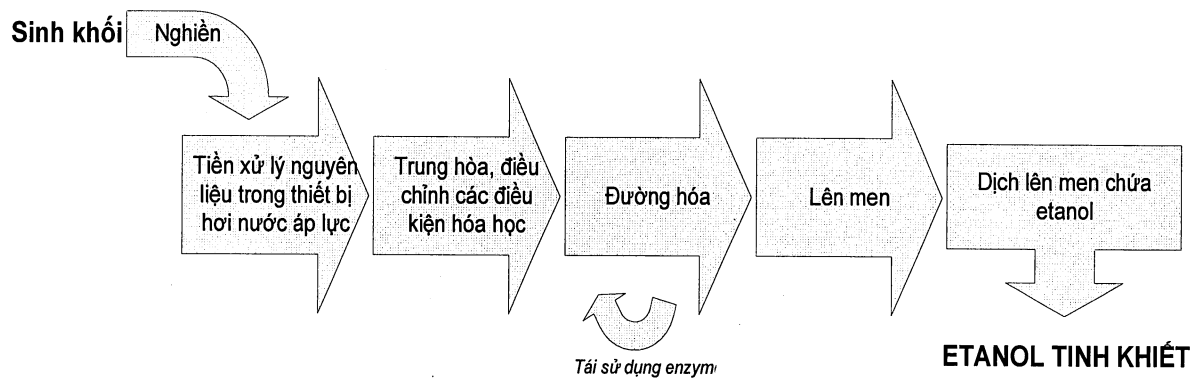
Tách protein và tro khoáng từ rong nước lợ *Chaetomorpha* sp. bằng cách ngâm sinh khối rong đã sấy khô và nghiền nhỏ trong dung dịch NaOH nồng độ 0,75 %-1,0 %, với tỷ lệ nguyên liệu/dung dịch NaOH là 1/20 (w/v), ở nhiệt độ 48-50°C trong 1 giờ, trong điều kiện khuấy liên tục với tốc độ 100-150 vòng/phút, sau đó tách dung dịch NaOH có chứa protein hòa tan, bã rong thu được được rửa để loại bỏ kiềm dư, và sấy khô về độ ẩm 4-8%;

Tiền xử lý bã rong bằng cách bổ sung dung dịch H₂SO₄ nồng độ 1,75 % (w/v) vào bã rong theo tỷ lệ khối lượng bã rong/tổng thể tích hỗn hợp nguyên liệu nằm trong khoảng 13-15% (w/v), ở nhiệt độ nằm trong khoảng 120-125°C, trong thời gian 25-30 phút;

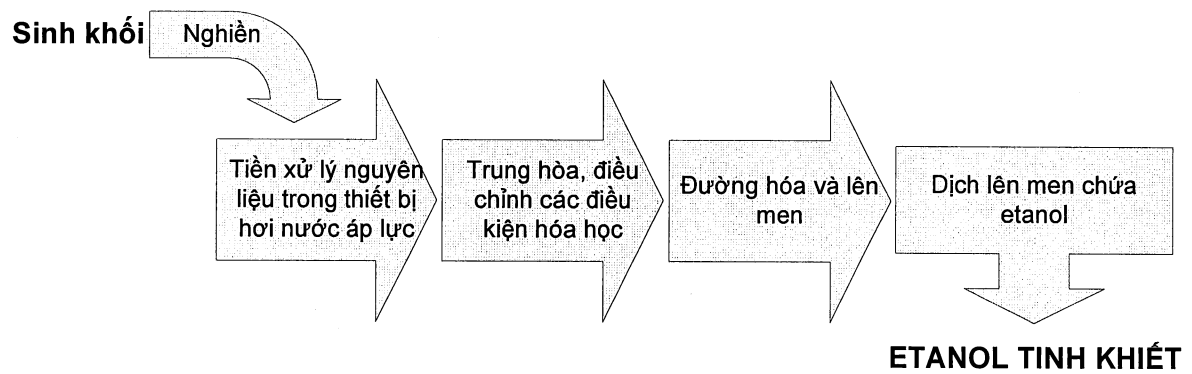
Thủy phân ba phần tư lượng bã rong đã được tiền xử lý bằng enzym xenlulaza và β -glucosidaza, trong đó nồng độ enzym xenlulaza nằm trong khoảng 25-30 FPU/g hydrat cacbon có trong lượng bã rong đem thủy phân, nồng độ enzym β -glucosidaza nằm trong khoảng 8-10 CBU/g hydrat cacbon có trong lượng bã rong đem thủy phân, quá trình thủy phân được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng 50-55°C, trong thời gian 35-36 giờ, với tốc độ khuấy nằm trong khoảng 180-200 vòng/phút để thu được dịch thủy phân;

Thủy phân và lên men đồng thời bằng cách bổ sung thêm vào dịch thủy phân lượng bã rong đã được tiền xử lý còn lại cùng với enzym xenlulaza, β -glucosidaza và nấm men *Saccharomyces cerevisiae*, nồng độ enzym xenlulaza nằm trong khoảng 20 -25 FPU/g hydrat cacbon có trong lượng bã rong bổ sung, nồng độ enzym β -glucosidaza nằm trong khoảng 8-10 CBU/g hydrat cacbon có trong lượng bã rong bổ sung, mật độ nấm men nằm trong khoảng 20-25x10⁶ CFU/mL dịch lên men, nhiệt độ lên men từ 37 -38°C,

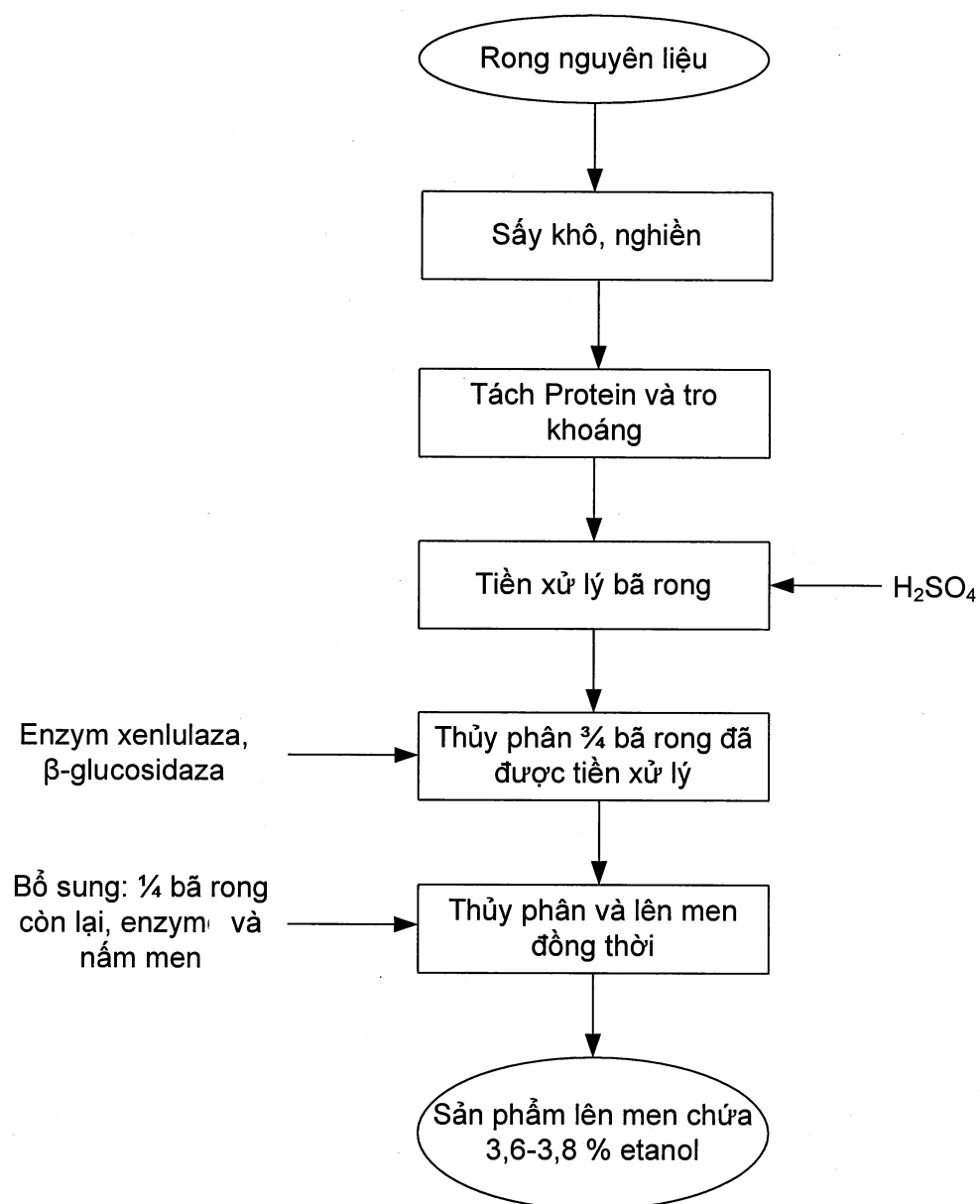
thời gian lên men từ 32-36 giờ với tốc độ khuấy nằm trong khoảng 80 - 120 vòng/phút để thu được dịch lên men sinh khối rong *Chaetomorpha* sp. với hàm lượng etanol đạt khoảng 3,6-3,8% (v/v).



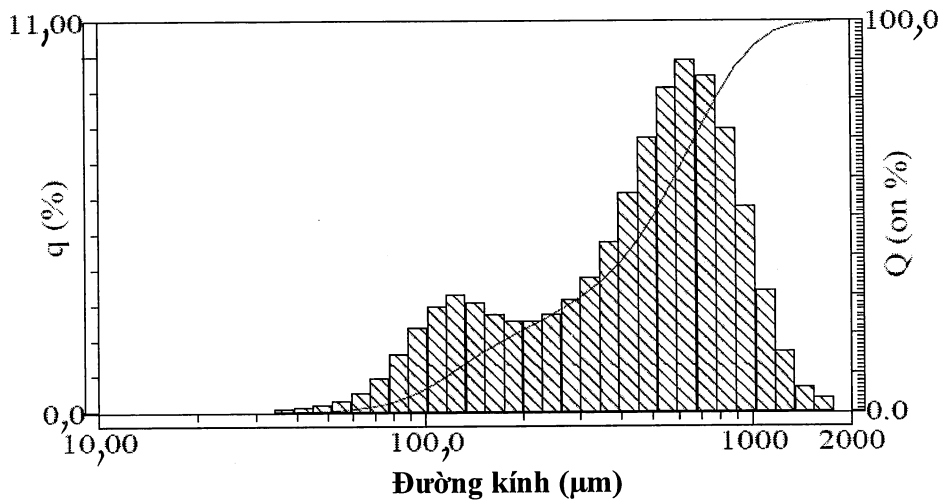
Hình 1



Hình 2



Hình 3

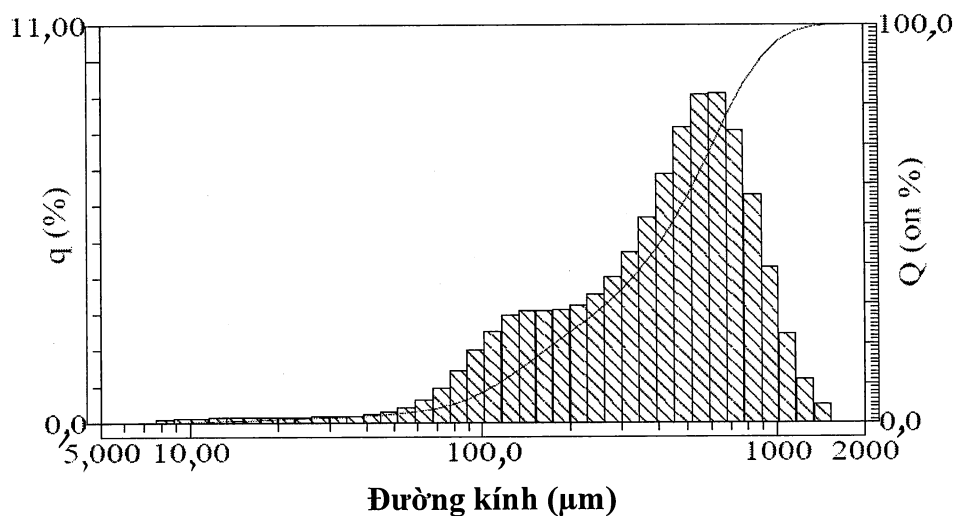


Kết quả tính toán bằng phần mềm HORIBA LA-920 trên Windows (TM) [WET(LA-920)] Ver.3.37:

Tổng diện tích bề mặt hạt : 206,01 (cm²/cm³)
 50% tổng số hạt có kích thước nhỏ hơn (D₅₀) : 502,6950 (μm)
 Kích thước hạt trung bình : 517,2453 (μm)
 Kích thước thường gặp nhất : 635,4276 (μm)

STT	Đường kính (μm)	Tỷ lệ (q %)	Tổng tỷ lệ (Q %)	STT	Đường kính (μm)	Tỷ lệ (q %)	Tổng tỷ lệ (Q %)	STT	Đường kính (μm)	Tỷ lệ (q %)	Tổng tỷ lệ (Q %)
1	1,005	0,000	0,000	22	17,377	0,000	0,000	43	300,518	3,126	29,235
2	1,151	0,000	0,000	23	19,904	0,000	0,000	44	344,206	3,786	33,021
3	1,318	0,000	0,000	24	22,797	0,000	0,000	45	394,244	4,770	37,791
4	1,510	0,000	0,000	25	26,111	0,000	0,000	46	451,556	6,123	43,914
5	1,729	0,000	0,000	26	29,907	0,000	0,000	47	517,200	7,700	51,614
6	1,981	0,000	0,000	27	34,255	0,000	0,000	48	592,387	9,129	60,743
7	2,269	0,000	0,000	28	39,234	0,109	0,109	49	678,504	9,879	70,622
8	2,599	0,000	0,000	29	44,938	0,136	0,244	50	777,141	9,460	80,082
9	2,976	0,000	0,000	30	51,471	0,193	0,437	51	890,116	7,972	88,054
10	3,409	0,000	0,000	31	58,953	0,310	0,747	52	1019,515	5,762	93,816
11	3,905	0,000	0,000	32	67,523	0,544	1,290	53	1167,725	3,416	97,231
12	4,472	0,000	0,000	33	77,339	0,973	2,263	54	1337,481	1,686	98,917
13	5,122	0,000	0,000	34	88,583	1,628	3,890	55	1531,914	0,696	99,613
14	5,867	0,000	0,000	35	101,460	2,378	6,268	56	1754,613	0,387	100,000
15	6,720	0,000	0,000	36	116,210	2,948	9,217	57	2000,000	0,000	100,000
16	7,697	0,000	0,000	37	133,103	3,303	12,520				
17	8,816	0,000	0,000	38	152,453	3,058	15,578				
18	10,097	0,000	0,000	39	174,616	2,728	18,306				
19	11,565	0,000	0,000	40	200,000	2,540	20,846				
20	13,246	0,000	0,000	41	229,075	2,536	23,383				
21	15,172	0,000	0,000	42	262,376	2,726	26,108				

Hình 4a

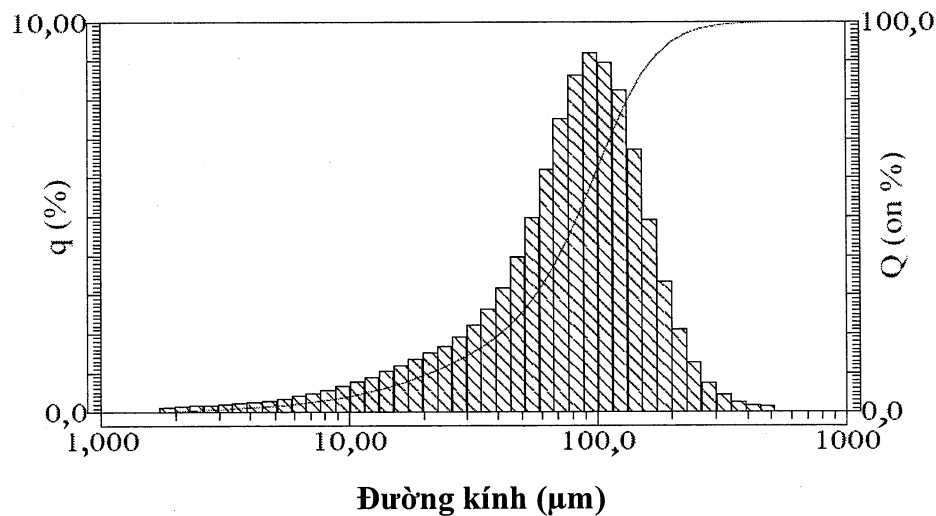


Kết quả tính toán bằng phần mềm HORIBA LA-920 trên Windows (TM) [WET(LA-920)] Ver.3.37:

Tổng diện tích bề mặt hạt : 275,96 (cm²/cm³)
 50 % tổng số hạt có kích thước nhỏ hơn (D₅₀) : 444,8065 (μm)
 Kích thước hạt trung bình : 467,7795 (μm)
 Kích thước thường gặp nhất : 629,2654 (μm)

STT	Đường kính (μm)	Tỷ lệ (q %)	Tổng tỷ lệ (Q %)	STT	Đường kính (μm)	Tỷ lệ (q %)	Tổng tỷ lệ (Q %)	STT	Đường kính (μm)	Tỷ lệ (q %)	Tổng tỷ lệ (Q %)
1	5,122	0,000	0,000	22	88,583	1,452	5,885	43	1531,914	0,515	100,000
2	5,867	0,000	0,000	23	101,460	2,007	7,892	44	1754,613	0,000	100,000
3	6,720	0,000	0,000	24	116,210	2,522	10,414	45	2000,000	0,000	100,000
4	7,697	0,000	0,000	25	133,103	2,980	13,394				
5	8,816	0,101	0,101	26	152,453	3,100	16,494				
6	10,097	0,117	0,218	27	174,616	3,089	19,584				
7	11,565	0,130	0,349	28	200,000	3,119	22,703				
8	13,246	0,142	0,490	29	229,075	3,256	25,959				
9	15,172	0,150	0,640	30	262,376	3,539	29,498				
10	17,377	0,155	0,795	31	300,518	4,013	33,510				
11	19,904	0,158	0,953	32	344,206	4,710	38,220				
12	22,797	0,160	1,113	33	394,244	5,663	43,883				
13	26,111	0,163	1,276	34	451,556	6,881	50,764				
14	29,907	0,168	1,444	35	517,200	8,165	58,928				
15	34,255	0,179	1,623	36	592,387	9,072	68,000				
16	39,234	0,200	1,824	37	678,504	9,114	77,114				
17	44,938	0,240	2,063	38	777,141	8,068	85,183				
18	51,471	0,310	2,373	39	890,116	6,324	91,507				
19	58,953	0,434	2,808	40	1019,515	4,310	95,817				
20	67,523	0,645	3,453	41	1167,725	2,462	98,278				
21	77,339	0,980	4,433	42	1337,481	1,207	99,485				

Hình 4b



Kết quả tính toán bằng phần mềm HORIBA LA-920 trên Windows(TM) [WET(LA-920)] Ver.3.37:

Tổng diện tích bề mặt hạt : 1481,4 (cm²/cm³)
 50 % tổng số hạt có kích thước nhỏ hơn (D₅₀) : 83,7860 (μm)
 Kích thước hạt trung bình : 92,3146 (μm)
 Kích thước thường gặp nhất (Mode) : 95,0420 (μm)

STT	Đường kính (μm)	Tỷ lệ (q %)	Tổng tỷ lệ (Q %)	STT	Đường kính (μm)	Tỷ lệ (q %)	Tổng tỷ lệ (Q %)	STT	Đường kính (μm)	Tỷ lệ (q %)	Tổng tỷ lệ (Q %)
1	1,005	0,000	0,000	22	17,377	1,176	7,874	43	300,518	0,737	98,994
2	1,151	0,000	0,000	23	19,904	1,330	9,204	44	344,206	0,433	99,427
3	1,318	0,000	0,000	24	22,797	1,493	10,697	45	394,244	0,265	99,692
4	1,510	0,000	0,000	25	26,111	1,676	12,374	46	451,556	0,177	99,869
5	1,729	0,000	0,000	26	29,907	1,901	14,275	47	517,200	0,131	100,000
6	1,981	0,127	0,127	27	34,255	2,200	16,475	48	592,387	0,000	100,000
7	2,269	0,151	0,278	28	39,234	2,615	19,090	49	678,504	0,000	100,000
8	2,599	0,166	0,444	29	44,938	3,189	22,279	50	777,141	0,000	100,000
9	2,976	0,181	0,625	30	51,471	3,967	26,245	51	890,116	0,000	100,000
10	3,409	0,200	0,824	31	58,953	4,977	31,222	52	1000,000	0,000	100,000
11	3,905	0,226	1,050	32	67,523	6,196	37,418				
12	4,472	0,256	1,306	33	77,339	7,499	44,918				
13	5,122	0,289	1,595	34	88,583	8,616	53,534				
14	5,867	0,337	1,932	35	101,460	9,189	62,723				
15	6,720	0,398	2,330	36	116,210	8,958	71,681				
16	7,697	0,471	2,801	37	133,103	8,236	79,916				
17	8,816	0,556	3,357	38	152,453	6,720	86,636				
18	10,097	0,655	4,012	39	174,616	4,922	91,558				
19	11,565	0,766	4,778	40	200,000	3,328	94,886				
20	13,246	0,892	5,670	41	229,075	2,108	96,994				
21	15,172	1,029	6,699	42	262,376	1,264	98,258				

Hình 4c