

ĐẠI HỌC QUỐC GIA TP. HCM
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA

NGUYỄN MINH HẢI

**THU NHẬN ETHANOL TỪ SINH KHỐI RONG NƯỚC
LỢ *CHAETOMORPHA* SP.**

Chuyên ngành: Công nghệ Thực phẩm

Mã số chuyên ngành: 62540101

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ KỸ THUẬT

Tp. Hồ Chí Minh năm 2022

Công trình được hoàn thành tại **Trường Đại học Bách Khoa – ĐHQG-HCM**

Người hướng dẫn 1: Giáo sư Tiến sĩ Lê Văn Việt Mẫn

Người hướng dẫn 2: Phó Giáo sư Tiến sĩ Hoàng Kim Anh

Phản biện độc lập 1:

Phản biện độc lập 2:

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án họp tại

.....
.....

vào lúc giờ ngày tháng năm 20

Có thể tìm hiểu luận án tại thư viện:

- Thư viện Trường Đại học Bách Khoa – ĐHQG-HCM

- Thư viện Khoa học Tổng hợp Tp.HCM

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Tại Việt Nam, ethanol được sản xuất từ nguyên liệu ngũ cốc (gạo) và củ (khoai mì). Sản xuất ethanol từ gạo và khoai mì ảnh hưởng lớn đến nguồn lương thực trong nước, đặc biệt là việc xuất khẩu. Để đảm bảo nhu cầu ngày càng gia tăng của ethanol và cân bằng lương thực cho con người, các nhà khoa học trên thế giới đã và đang tìm kiếm nguồn nguyên liệu mới để sản xuất ethanol sinh học.

Rong biển được xem là nguồn nguyên liệu từ sinh vật thủy sinh đã và đang được nhiều nhà khoa học chú ý đến như là nguồn nguyên liệu sản xuất ethanol thế hệ thứ ba sau tinh bột và lignocellulose. Rong biển có sinh khối lớn, không cạnh tranh với cây lương thực, không chiếm diện tích đất canh tác nên được xem là nguồn nguyên liệu phù hợp để sản xuất ethanol.

Giống rong biển *Chaetomorpha* sp. có mặt tự nhiên với số lượng lớn trong khắp các ao hồ nuôi tôm quảng canh tại các tỉnh Tây Nam Bộ. Sau khi thu hoạch thủy sản, loài rong này thường bị bỏ phí và gây ô nhiễm môi trường. Việc nghiên cứu thu nhận các sản phẩm có giá trị từ loài rong trên sẽ tận dụng nguồn nguyên liệu sẵn có để tạo ra các sản phẩm có giá trị gia tăng. Với các tiền đề và yêu cầu thực tiễn nêu trên, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu sử dụng sinh khối rong nước lợ *Chaetomorpha* sp. làm nguyên liệu để sản xuất ethanol sinh học.

2. Mục tiêu nghiên cứu

- Khảo sát chi tiết thành phần hóa học của rong để làm cơ sở cho việc chọn lựa các phương pháp xử lý rong thích hợp.
- Nghiên cứu các phương pháp tiền xử lý sinh khối rong để làm tăng tỷ lệ carbohydrate trong rong *Chaetomorpha* sp. và tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình lên men ethanol.
- Nghiên cứu chuyển hóa sinh khối rong thành ethanol bằng một số phương pháp khác nhau và so sánh hiệu quả của chúng: Phương pháp

đường hóa và lên men tách biệt; phương pháp đường hóa và lên men đồng thời; phương pháp kết hợp SHF-SSF.

3. Những đóng góp mới của luận án

Về mặt khoa học:

- Xác định được thành phần hóa học cơ bản của rong, làm cơ sở cho việc sử dụng các phương pháp chuyển hóa rong thành ethanol thích hợp.
- Xác định các quy luật tiền xử lý rong *Chaetomorpha* sp. bằng các hợp chất hóa học (NaOH, H₂SO₄) kết hợp với các điều kiện vật lý là nhiệt độ và siêu âm nhằm nâng cao hàm lượng polysaccharide và làm giảm cấu trúc tinh thể của rong.
- Xác định được các quy luật chuyển hóa rong *Chaetomorpha* sp. thành ethanol bằng các phương pháp SHF, SSF và kết hợp SHF-SSF.

Về mặt thực tiễn:

- Xác định được chi tiết thành phần hóa học của rong đặc biệt là các liên kết glycoside
- Xác định được các tham số công nghệ cho quá trình tiền xử lý rong *Chaetomorpha* sp. bằng NaOH kết hợp với sóng siêu âm để nâng cao hàm lượng polysaccharide trong rong.
- Xác định được các tham số công nghệ cho quá trình tiền xử lý rong *Chaetomorpha* sp. bằng H₂SO₄ kết hợp nhiệt độ cao để loại bỏ phần lớn cấu trúc tinh thể trong rong.
- Xác định được các tham số kỹ thuật cho các quá trình chuyển hóa rong *Chaetomorpha* sp. thành ethanol theo các phương pháp SHF, SSF và kết hợp SHF-SSF.

4. Cấu trúc luận án

Luận án được trình bày trong 104 trang bao gồm các nội dung: Mở đầu (2 trang), Tổng quan (17 trang), Nguyên liệu và phương pháp (24 trang), Kết quả và biện luận (60 trang) và Kết luận (3 trang).

NỘI DUNG LUẬN ÁN

Chương 1. TỔNG QUAN

1. Rong *Chaetomorpha* sp. ở đồng bằng sông Cửu Long

Theo kết quả khảo sát cho thấy, *Chaetomorpha* sp. thường được tìm thấy trong các ao nuôi tôm nước lợ quảng canh và các kênh mương tại khu vực Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL). Đến nay, khoảng 10% diện tích nuôi tôm quảng canh nước lợ ở ĐBSCL có *Chaetomorpha* sp. phát triển. Hiện nay, chỉ một lượng nhỏ sinh khối rong mềm tại ĐBSCL được sử dụng làm phân bón; một lượng lớn sinh khối rong bị vứt bỏ, vừa lãng phí vừa gây ô nhiễm môi trường. Chính vì vậy, việc nghiên cứu chuyển hóa rong *Chaetomorpha* sp. thành các sản phẩm có giá trị có tính cấp thiết cao và có nhiều ý nghĩa khoa học lẫn thực tiễn.

1.2 Thu nhận ethanol từ sinh khối rong

Quy trình sản xuất ethanol từ sinh khối rong: **Nguyên liệu**→**Tiền xử lý**→**Thủy phân/Đường hóa**→**Lên men**→**Ethanol**.

1.2.1 Tiền xử lý

Các nguyên liệu chứa polysaccharide tương tự cellulose thường có cấu trúc tinh thể nên thường gây khó khăn cho quá trình đường hóa bằng các enzyme cellulase. Tiền xử lý có tác dụng phá vỡ cấu trúc tinh thể của nguyên liệu, giúp cho các enzyme cellulase dễ dàng hình thành phức enzyme/cơ chất.

Các quá trình tiền xử lý thường được thực hiện bằng các phương pháp vật lý (nhiệt độ cao, nỏ hơi nước, nghiền...) hoặc xử lý bằng các hợp chất hóa học (kiềm, acid, các dung dịch ion hóa...) hoặc kết hợp vật lý và hóa học.

1.2.2 Đường hóa và lên men

1.2.2.1 Phương pháp SHF

SHF (Separate Hydrolysis and Fermentation) là phương pháp thủy phân nguyên liệu thành đường bằng các enzyme hoặc acid và sau đó lên men đường bằng vi sinh vật để thu nhận ethanol.

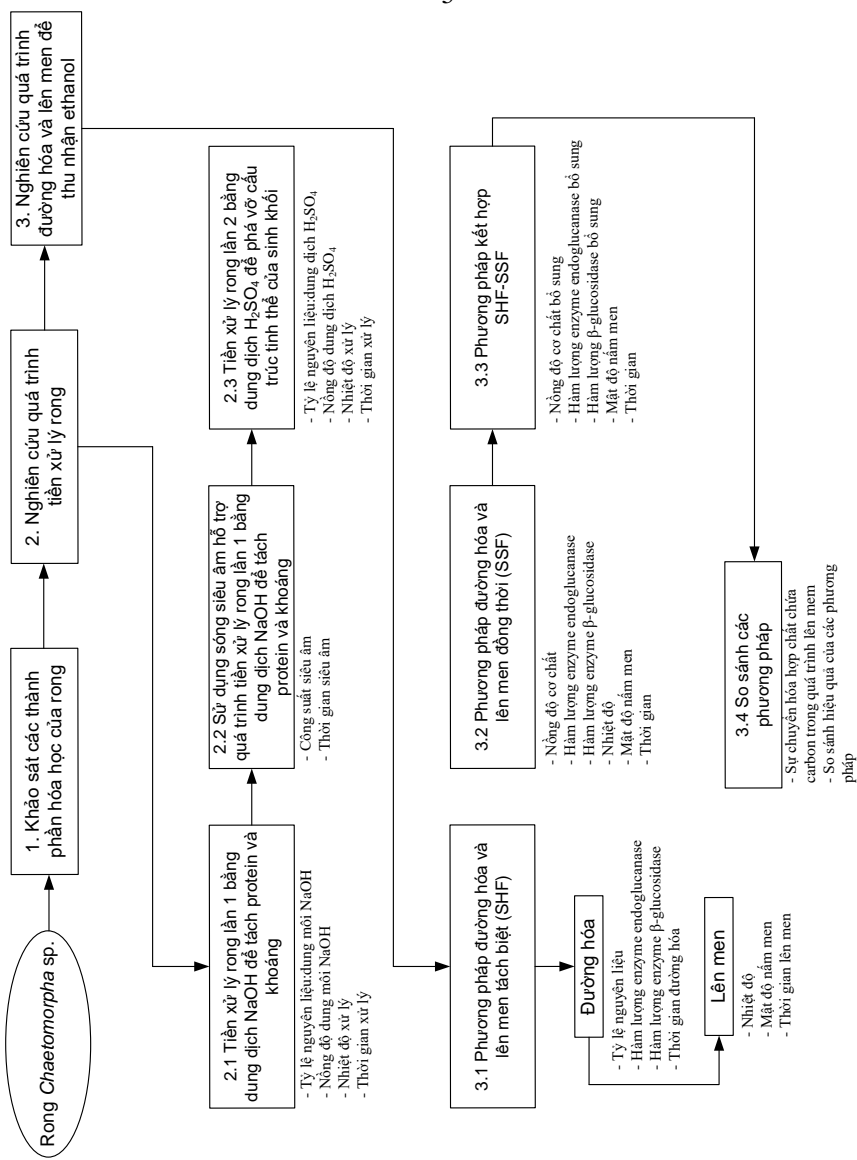
1.2.2.2 Phương pháp SSF

SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation) là quá trình mà quá trình thủy phân nguyên liệu thành đường bằng enzyme được thực hiện song song với quá trình lên men ethanol của vi sinh vật. Ưu điểm của phương pháp này là rút ngắn được thời gian, đường được tạo ra từ quá trình thủy phân bằng enzyme sẽ được chuyển hóa ngay lập tức thành ethanol.

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Nguyên vật liệu, hóa chất và thiết bị

- Rong *Chaetomorpha* sp. được thu nhận tại các ao nuôi tôm nước lợ quảng canh tại tỉnh Bạc Liêu. Rong được làm sạch và sấy ở nhiệt độ 50 °C tới độ ẩm xấp xỉ 10%.
- Hóa chất: Dung dịch H₂SO₄, thuốc thử DNS, methanol, acetonitril, ethanol tuyệt đối (Merck-Đức); NaOH, Ca(OH)₂, K-Na tartrate (Xilong-Trung Quốc); bộ kit GOD-PAP 6x250 (Biolabo-Pháp).
- Enzyme: Chế phẩm Cellic Ctec2 (Novozyme, Đan Mạch), dung dịch có hoạt lực endoglucanase 150 FPU/mL (Filter Paper Unit). Chế phẩm Novozyme 188 (Sigma Aldrich, Mỹ) dạng dung dịch có hoạt lực β-glucosidase không thấp hơn 300 CBU/mL (CelloBiase Unit).
- Nấm men: chế phẩm nấm men ThermoSacc® DRY (LBDS-Mỹ) chứa loài *Saccharomyces cerevisiae* ở dạng khô và có độ ẩm không quá 5%, số lượng tế bào sống trung bình là 2×10^{10} /g.



Hình 2.1 Sơ đồ nghiên cứu quá trình chuyển hóa rong *Chaetomorpha* sp. thành ethanol

- Thiết bị: Thùng gia nhiệt Sandbath và ống phản ứng bằng thép không gỉ (Techne, Mỹ), bể ổn nhiệt Elma S300H (Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co. KG, Đức), máy siêu âm Vibra-Cell VCX 750 (Sonics, Mỹ), máy lắc ổn nhiệt Innova 4230 (New Brunswick Scientific, Mỹ), hệ thống HPLC và đầu dò RI (Water, Nhật) dùng cột phân tích HPX 87H (BioRad, Mỹ), máy quang phổ UV – Vis 8453 (Agilent, Mỹ), máy đo phân bố kích thước hạt LA-920 (Horiba, Nhật), máy đo nhiễu xạ tia X D8 Advance (Bruker, Mỹ), kính hiển vi điện tử quét JSM-7401F (Jeol, Đức).

2.2 Bố trí thí nghiệm

Các thí nghiệm được bố trí theo sơ đồ ở hình 2.1, sử dụng phương pháp xác định yếu tố tối ưu theo phương pháp cổ điển.

2.3 Phương pháp phân tích

Tổng lượng polysaccharide được định lượng bằng phương pháp thủy phân. Protein tổng được định lượng bằng phương pháp Kjeldahl. Tro tổng được định lượng bằng phương pháp nung. Tổng lượng đường khử được định lượng theo phương pháp quang phổ so màu sử dụng thuốc thử là acid 3,5-dinitrosalicylic. Phương pháp ICP/OES được dùng để xác định thành phần khoáng. Phương pháp GC/MS được dùng để xác định thành phần các liên kết glycosid và acid amin trong rong. Hàm lượng đường glucose được xác định bằng phương pháp enzyme với chế phẩm glucose-oxydase. Ethanol và một số loại đường đơn khác được định lượng bằng phương pháp HPLC. Sự phân bố kích thước hạt (PSD) của rong được xác định bằng phương pháp tán xạ laser (LDS). Hình dạng của hạt nguyên liệu được quan sát bằng kính hiển vi điện tử quét. Tổng lượng carbon hữu cơ được xác định bằng phương pháp chuẩn độ Walkley-Black có sự hiệu chỉnh. Chỉ số tinh thể (CrI-Crystallization Index) của nguyên liệu được tính toán từ phổ nhiễu xạ tia X trên nguyên liệu rong dạt bột mịn.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

3.1 Khảo sát các thành phần hóa học của rong *Chaetomorpha* sp.

Bảng 3.1 Thành phần hóa học cơ bản của rong
Chaetomorpha sp. (g/100g chất khô)

Mẫu <i>Chaetomorpha</i> sp.	Lipid	Protein	Polysaccharide	Tro khoáng	Thành phần khác*
Mùa khô (tháng 1 đến 4)	3,38±0,08	12,7±0,30	47,26±1,75	29,26±1,29	7,40±0,15
Mùa mưa (tháng 5 đến 8)	4,47±0,05	20,9±0,45	40,29±1,64	28,55±1,34	5,79±0,17

*Thành phần khác bao gồm các chất màu như chlorophyll, carotenoid, các hợp chất phenolic...

Rong *Chaetomorpha* sp. có hàm lượng polysaccharide tương đối cao (khoảng 40-47%), hàm lượng lipid thấp (3-4%) và hàm lượng protein ở mức độ trung bình (13-21%). Điểm lưu ý là, các mẫu rong có hàm lượng khoáng (tro tổng) rất cao, lên tới 28-29%.

3.1.1 Thành phần polysaccharide

Kết quả trên bảng 3.2 cho thấy, hàm lượng glucose chiếm tỷ lệ rất lớn (70-74%) so với tổng lượng đường đơn có trong carbohydrate của rong *Chaetomorpha* sp. Liên kết 1,4-glucopyrasosyl có tỷ lệ lên đến 74,4%; điều này cho thấy cơ sở cho việc chọn lựa hệ enzyme thích hợp để thủy phân liên kết này. Tuy nhiên, kết quả còn cho thấy một lượng đáng kể các loại liên kết glycoside khác nhau, chứng tỏ polysaccharide của rong có cấu trúc khác phức tạp.

Bảng 3.2 Các loại liên kết glycoside trong carbohydrate của rong
Chaetomorpha sp.

Các gốc Glycosyl	Tỷ lệ (%)
Các liên kết mạch thẳng	
Gốc Rhamnopyranosyl ở đầu mạch (t-Rha)	0,2
Gốc Arabinofuranosyl ở đầu mạch (t-Araf)	0,1
Gốc liên kết 2- Rhamnopyranosyl	0,1
Gốc Manopyranosyl ở đầu mạch (t-Man)	2,2
Gốc Glucopyranosyl ở đầu mạch (t-Glc)	4,6
Gốc Galactopyranosyl đầu mạch (t-Gal)	3,5
Gốc 3-Glucopyranosyl + Gốc 2,4-Rhamnopyranosyl	1,3
Gốc liên kết 2-Glucopyranosyl (2-Glc)	0,4
Gốc liên kết 3-Glucopyranosyl (3-Gal)	0,2
Gốc liên kết 3 - Manopyranosyl (4-Manl)	0,6
Gốc liên kết 6 - Manopyranosyl (6-Manl)	2,0
Gốc liên kết 6 - Glucopyranosyl (6-Glc)	1,1
Gốc liên kết 4 – Glucopyranosyl (4-Glc)	74,4
Gốc liên kết 6 - Galactopyranosyl (6-Gal)	1,7
Các liên kết mạch nhánh	
Gốc liên kết 3,4 - Glucopyranosyl (3,4-Glc)	1,2
Gốc liên kết 2,4 - Manopyranosyl (2,4-Manl)	0,1
Gốc liên kết 2,4 - Glucopyranosyl (2,4-Glc)	0,7
Gốc liên kết 2,3,4 - Xylopyranosyl (2,3,4-Xyl)	0,8
Gốc liên kết 4,6 - Glucopyranosyl (4,6-Glc)	1,7
Gốc liên kết 2,3,4,6 - Glucopyranosyl (2,3,4,6-Glc)	3,2

3.1.2 Thành phần protein

Theo kết quả trên bảng 3.3 cho thấy, aspartic acid và glutamic acid là hai acid amin chiếm tỷ lệ cao nhất và lần lượt là 12,1% và 12,6%. Bên cạnh đó, tổng hàm lượng các acid amin thiết yếu chiếm đến 42,11% so với tổng

lượng protein có trong rong *Chaetomorpha* sp., trong đó lysine và methionine rất cần cho nhu cầu dinh dưỡng của con người, đặc biệt là đối với trẻ em.

Bảng Error! No text of specified style in document.3 Thành phần acid amin trong protein của rong *Chaetomorpha* sp.

Acid amin	Tỷ lệ*	Acid amin	Tỷ lệ*
Lysine	4,84	Serine	3,58
Leucin	9,54	Proline	4,67
Iso Leucine	5,47	Hydroxyl-L-proline	0,11
Methionine	2,53	Arginine	4,63
Phenylalani	6,13	Aspartic acid	12,12
Threonine	4,93	Glutamic acid	12,59
Tryptophan	1,62	Cysteine	0,64
Valine	7,05	Histidine	2,04
Glycine	5,91	Tyrosine	4,58
Alanine	6,86	Cystine	0,16
Taurin	0,14 (% tính theo tổng lượng chất khô của rong)		

* Tính theo % (w/w) tổng protein của rong

3.1.3 Khoáng

Bảng 3.4 Thành phần khoáng của rong *Chaetomorpha* sp.

Các nguyên tố đa lượng	Hàm lượng (g/100g)	Các nguyên tố vi lượng	Hàm lượng (ppm)
Calcium	2,54	Iron	2060
Phosphorus	0,48	Zinc	24
Magnesium	1,83	Copper	7
Potassium	2,23	Manganese	<1
Sodium	0,51	Molybdenum	1
Sulfur	3,17	As, Cd, Pb, Hg	không phát hiện

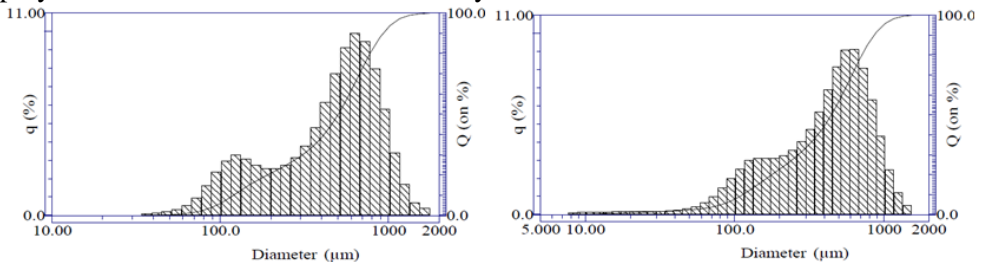
Tương tự như các loài rong biển khác, rong nước lợ *Chaetomorpha* sp. rất giàu khoáng chất, có thể được dùng trong sản xuất thức ăn cho con người và gia súc, cũng như trong sản xuất phân bón. Sinh khối rong *Chaetomorpha* sp. phát triển trong các ao đầm nuôi tôm nên không chứa các kim loại nặng.

3.1 Tiền xử lý nguyên liệu

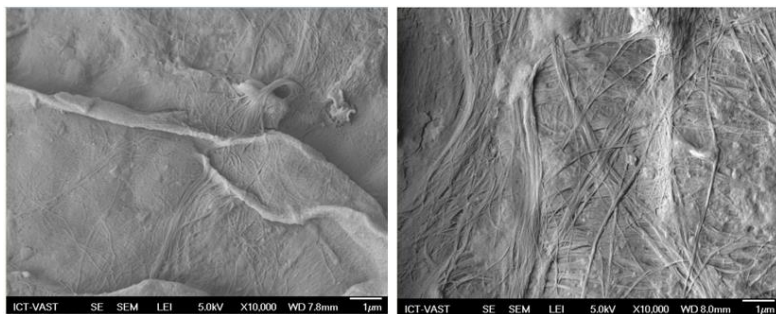
3.1.1 Tiền xử lý bằng dung dịch NaOH để tách protein và khoáng

Với tỷ lệ nguyên liệu:dung dịch NaOH thay đổi từ 1:10 đến 1:25; nồng độ NaOH từ 0,25 đến 1,5% (w/v); nhiệt độ xử lý từ 40 đến 80 °C và thời gian xử lý từ 30 đến 90 phút. Kết quả chọn được các yếu tố phù hợp cho quá trình xử lý bằng dung dịch NaOH là tỷ lệ nguyên liệu:dung dịch NaOH là 1:25, nồng độ NaOH sử dụng là 1,0%, nhiệt độ xử lý là 60 °C và thời gian xử lý là 60 phút. Quá trình xử lý bằng NaOH đã loại protein và khoáng ra khỏi rong với tỷ lệ lần lượt là 62 và 57% so với rong ban đầu; đồng thời làm tăng hàm lượng polysaccharide trong nguyên liệu lên thêm 39%.

Ngoài ra, sự tác động của NaOH trong quá trình tách protein và khoáng còn giúp trương phồng sợi và cắt đứt một phần polysaccharide của rong. Điều này đã làm kích thước trung bình của rong giảm từ 503 μm xuống còn 445 μm , diện tích bề mặt riêng của rong cũng tăng từ 206 lên 276 cm^2/cm^3 (hình 3.1). Hình 3.2 cho thấy bề mặt hạt rong trở nên gồ ghề và lộ ra các bó sợi polysaccharide so với trước khi tiền xử lý.



Hình 3.1 Biểu đồ phân bố kích thước hạt của mẫu rong nguyên liệu (trái) và mẫu rong sau quá trình tiền xử lý bằng dung dịch NaOH



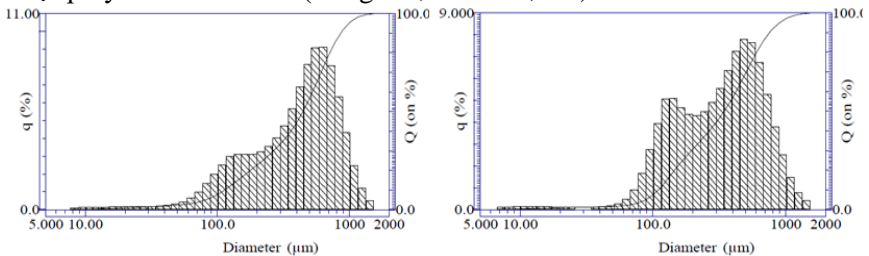
Hình 3.2 Ảnh chụp dưới kính hiển vi điện tử quét bề mặt hạt rong trước (trái) và sau quá trình tiền xử lý bằng dung dịch NaOH

3.1.2 Tiền xử lý rong bằng sóng siêu âm và dung dịch NaOH

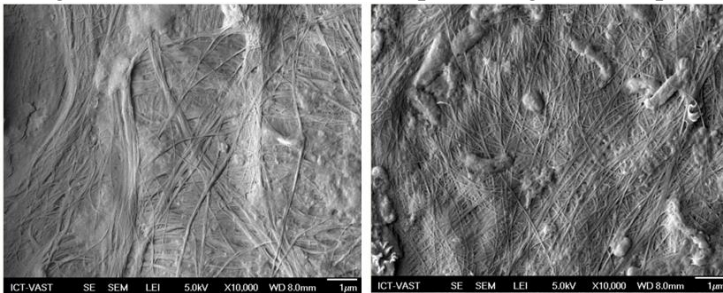
Bảng 3.7 So sánh quá trình tiền xử lý rong để tách protein và khoáng bằng dung dịch NaOH khi không có và có sóng siêu âm hỗ trợ

Thông số	Không có sóng siêu âm hỗ trợ	Có sóng siêu âm hỗ trợ
Nồng độ dung dịch NaOH (%)	1	
Tỷ lệ nguyên liệu:dung môi (w:v)	1:25	
Công suất siêu âm (W/g)	0	45
Thời gian siêu âm (phút)	0	5
Nhiệt độ (°C)	60	
Thời gian xử lý NaOH (phút)	60	
Tỷ lệ polysaccharide trong rong (%)	58,4 ^a ± 0,8	72,3 ^b ± 1,1
Tỷ lệ protein trong rong (%)	5,3 ^a ± 0,2	2,5 ^b ± 0,2
Tỷ lệ khoáng trong rong (%)	13,8 ^b ± 0,3	8,2 ^a ± 0,2
Kích thước hạt nguyên liệu sau quá trình tiền xử lý (µm)	445 ^b	344 ^a
Tổng diện tích bề mặt hạt sau quá trình tiền xử lý (cm ² /cm ³)	276 ^a	308 ^b
Chỉ số tinh thể hóa (CrI-Crystallinity Index) (%)	75 ^b	71 ^a

Nguyên liệu được xử lý siêu âm trước khi đưa vào xử lý NaOH để loại protein và khoáng. Khoảng khảo sát như sau: công suất siêu âm thay đổi từ 0 đến 45 W/g nguyên liệu và thời gian siêu âm từ 0 đến 6 phút. Kết quả thí nghiệm thu được cho thấy, so với mẫu không được xử lý siêu âm thì đã loại thêm được protein và khoáng trong rong lần lượt là 53 và 47%; đồng thời làm tăng thêm 24% lượng polysaccharide còn lại trong rong. Bên cạnh đó, sóng siêu âm đã góp phần làm đứt gãy thêm một phần sợi polysaccharide nên kích thước trung bình của hạt rong giảm 23%, ngược lại tổng diện tích bề mặt riêng tăng thêm 12%; bề mặt hạt rong xuất hiện nhiều bó sợi polysaccharide hơn (Bảng 3.7, hình 3.3, 3.4)



Hình 3.3 Biểu đồ phân bố kích thước hạt của rong sau quá trình tiền xử lý bằng NaOH (trái) và NaOH kết hợp với sóng siêu âm (phải)

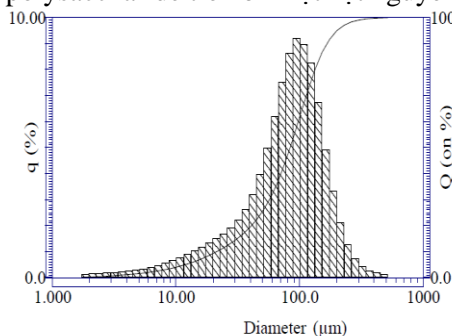


Hình 3.4 Ảnh chụp dưới kính hiển vi điện tử quét bề mặt hạt rong sau quá trình tiền xử lý bằng NaOH (trái) và NaOH kết hợp với sóng siêu âm (phải)

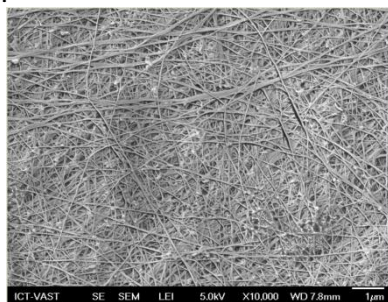
3.1.3 Tiền xử lý rong bằng dung dịch H_2SO_4

Rong sau khi được tiền xử lý bằng NaOH sẽ tiếp tục được tiền xử lý bằng H_2SO_4 để phá vỡ cấu trúc tinh thể của polysaccharide trong rong. Với các

điều kiện kỹ thuật thay đổi như sau: nồng độ dung dịch H_2SO_4 thay đổi từ 0 đến 1,75% (w/v), tỷ lệ nguyên liệu rong trong dung dịch H_2SO_4 từ 5 đến 15% (w/v), nhiệt độ xử lý từ 110 đến 140 °C và thời gian tiên xử lý từ 15 đến 75 phút. Kết quả thu được là một phần nguyên liệu bị thủy phân thành đường khử hòa tan với hàm lượng là 20,2g/L và một phần đường khử bị chuyển hóa thành HMF (Hydroxymethylfurfural) ở điều kiện thích hợp là nồng độ H_2SO_4 là 1,75%, tỷ lệ nguyên liệu trong dung dịch H_2SO_4 là 12,5%, nhiệt độ tiên xử lý là 120 °C và thời gian tiên xử lý là 30 phút. Bên cạnh đó, chỉ số tinh thể của nguyên liệu cũng bị giảm đi 34% so với mẫu chỉ xử lý với NaOH và siêu âm. Ngoài ra, kích thước trung bình hạt rong giảm thêm 4,1 lần và tổng diện tích bề mặt hạt tăng gấp 4,8 lần (hình 3.5). Hình 3.6 còn cho thấy sự xuất hiện một số lỗ xốp và rất nhiều bó sợi polysaccharide trên bề mặt hạt nguyên liệu.



Hình 3.5 Giản đồ phân bố kích thước hạt của rong sau quá trình tiên xử lý với dung dịch H_2SO_4



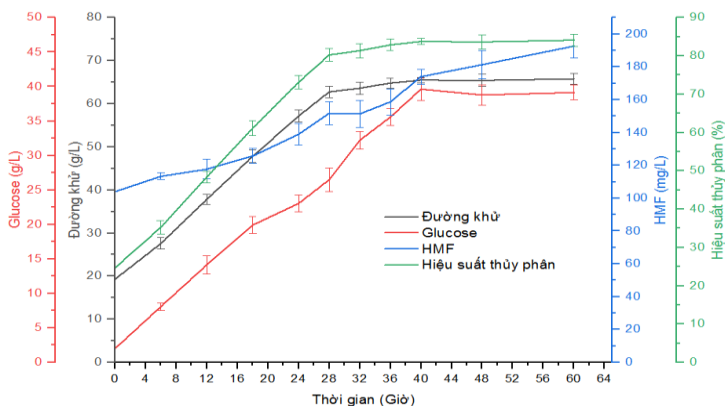
Hình 3.6 Ảnh chụp SEM bề mặt sợi rong sau quá trình tiên xử lý với dung dịch H_2SO_4

3.2 Chuyển hóa sinh khối rong thành ethanol bằng phương pháp SHF

3.2.1 Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình đường hóa

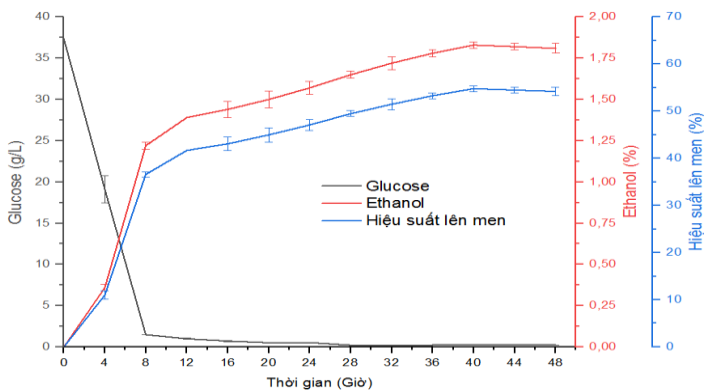
Nguyên liệu sau quá trình tiên xử lý bằng NaOH kết hợp siêu âm và H_2SO_4 được sử dụng để tiến hành quá trình đường hóa với các tham số được khảo sát như sau: tỷ lệ nguyên liệu từ 5 đến 15% (w/v), lượng enzyme

endoglucanase sử dụng từ 5 đến 40 FPU/g nguyên liệu, lượng enzyme β -glucosidase từ 5 đến 25 CBU/g và thời gian thủy phân từ 0 đến 60 giờ. Các giá trị tối ưu được chọn là tỷ lệ nguyên liệu là 10%, lượng enzyme endoglucanase và β -glucosidase sử dụng lần lượt là 30 FPU/g và 10 CBU/g nguyên liệu và thời gian là 40 giờ, kết quả thu được dung dịch có hàm lượng đường khử là 65,5 g/L, lượng glucose trong dung dịch là 39,6 g/L, bên cạnh đó hàm lượng HMF cũng tăng thêm và đạt 174 mg/L (hình 3.7)



Hình 3.7 Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình đường hóa

3.2.2 Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men



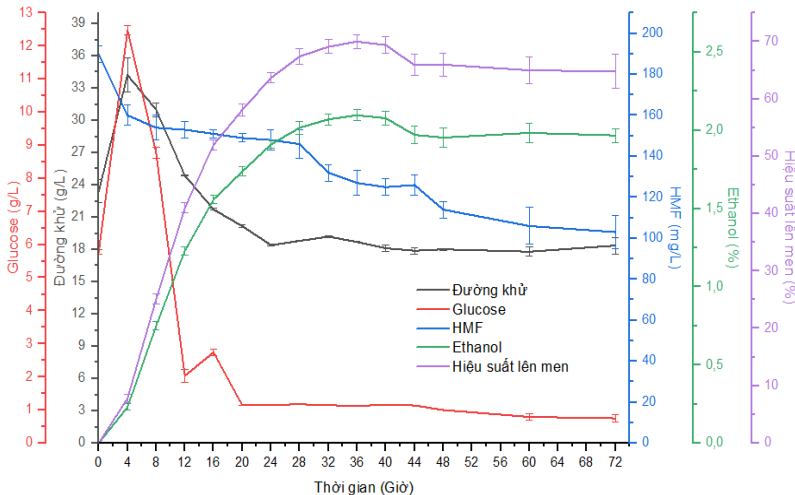
Hình 3.8 Ảnh hưởng của thời gian đến phương pháp lên men SHF

Sau khi thu được dịch thủy phân từ rong, tiến hành quá trình lên men dịch đường bằng chủng nấm men ThermoSacc®Dry. Các tham số khảo sát là

nhệt độ lên men từ 25 đến 35 °C, mật độ nấm men từ 1 đến 20×10^6 CFU/mL và thời gian lên men từ 0 đến 48 giờ. Các tham số phù hợp cho quá trình lên men là nhiệt độ 35 °C, mật độ nấm men là 10×10^6 CFU/mL và thời gian lên men là 40 giờ với kết quả thu được dung dịch có hàm lượng ethanol là 1,83% (v/v) ứng với hiệu suất lên men là 54,8% (hình 3.8).

3.3 Chuyển hóa sinh khối rong thành ethanol bằng phương pháp SSF

Nguyên liệu sau khi được tiền xử lý bằng NaOH kết hợp siêu âm và H_2SO_4 được đưa vào quá trình đường hóa và lên men đồng thời với các tham số kỹ thuật được khảo sát như sau: tỷ lệ nguyên liệu thay đổi từ 5-10% (w/v), nồng độ enzyme endoglucanase và β -glucosidase lần lượt là 5 đến 30 FPU/g và 2 đến 7 CBU/g nguyên liệu, nhiệt độ lên men từ 32 đến 42 °C, mật độ nấm men từ 5 đến 25×10^6 CFU/mL và thời gian lên men từ 0 đến 72 giờ. Kết quả nghiên cứu chọn được các tham số kỹ thuật thích hợp bao gồm tỷ lệ nguyên liệu là 9%, hai enzyme endoglucanase và β -glucosidase sử dụng lần lượt là 25 FPU/g và 4 CBU/g nguyên liệu, nhiệt độ lên men là 38 °C, mật độ nấm men là 10×10^6 CFU/mL và thời gian lên men thích hợp là 36 giờ. Hàm lượng ethanol tối ưu thu được trong nghiên cứu này là 2,1% (v/v) với hiệu suất lên men là 70,0% (hình 3.9).

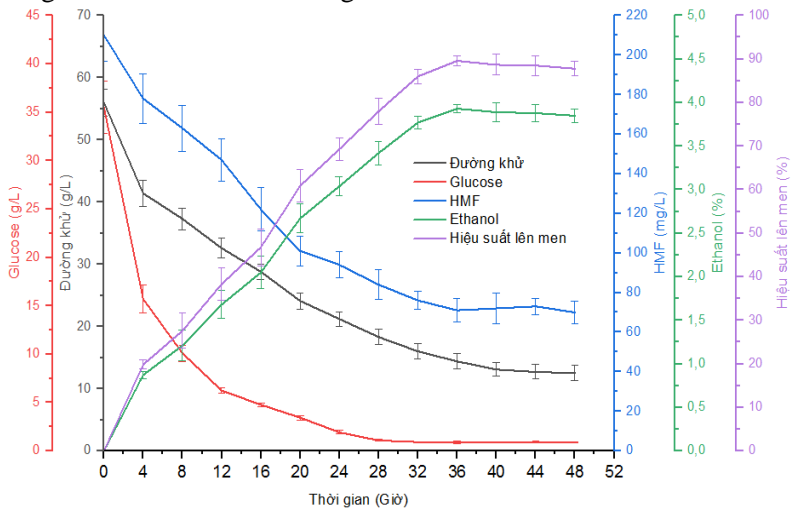


Hình 3.9 Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình lên men SSF

3.4 Chuyển hóa sinh khối rong *Chaetomorpha* sp. thành ethanol bằng phương pháp kết hợp SHF-SSF

Quá trình đường hóa được thực hiện theo các tham số đã xác định trong phương pháp SHF. Dịch đường sau đường hóa rong sẽ được bổ sung thêm lần lượt là rong chưa qua đường hóa, enzyme endoglucanase, enzyme β -glucosidase cùng với một lượng nấm men thích hợp và tiến hành quá trình đường hóa và lên men đồng thời ở nhiệt độ 38 °C.

Các tham số được khảo sát lần lượt là lượng rong nguyên liệu bổ sung thay đổi từ 25 đến 100% so với lượng nguyên liệu ban đầu được đường hóa, enzyme endoglucanase từ 10 đến 25 FPU/g và β -glucosidase từ 1 đến 7 CBU/g nguyên liệu bổ sung, mật độ nấm men từ 10 đến 25×10^6 CFU/mL và thời gian lên men từ 0 đến 48 giờ.



Hình 3.10 Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình lên men theo phương pháp kết hợp SHF-SSF

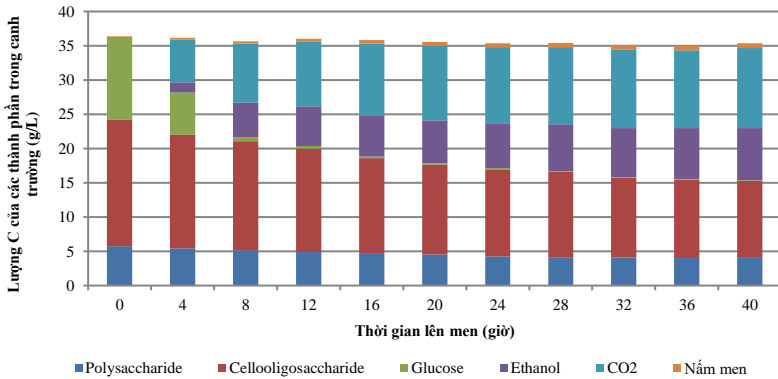
Kết quả thu được hàm lượng ethanol cao nhất với các tham số có giá trị là 37,5% nguyên liệu bổ sung, 20 FPU/g endoglucanase, 5 CBU/g β -glucosidase, mật độ nấm men là 20×10^6 CFU/mL và thời gian lên men là 36 giờ; hàm lượng ethanol thu được là 3,93% (v/v) với hiệu suất lên men là 89,6%. Điều này cho thấy việc gia tăng hàm lượng nguyên liệu đầu vào

cùng với việc sử dụng enzyme và nấm men thích hợp đã giúp cho hiệu quả chuyển hóa nguyên liệu rất cao. Hiệu suất chuyển hóa cao đã giúp gia tăng hàm lượng ethanol (hình 3.10).

3.5 Sự chuyển hóa của các thành phần chứa carbon trong quá trình

3.5.1 Phương pháp SHF

Khi bắt đầu quá trình lên men, hàm lượng carbon của polysaccharide không tan, cellooligosaccharide và glucose chiếm tỷ lệ lần lượt là 15,8%, 33,2% và 15,8%; lượng carbon của nấm men giống chỉ chiếm 0,3% tổng lượng carbon trong canh trường.



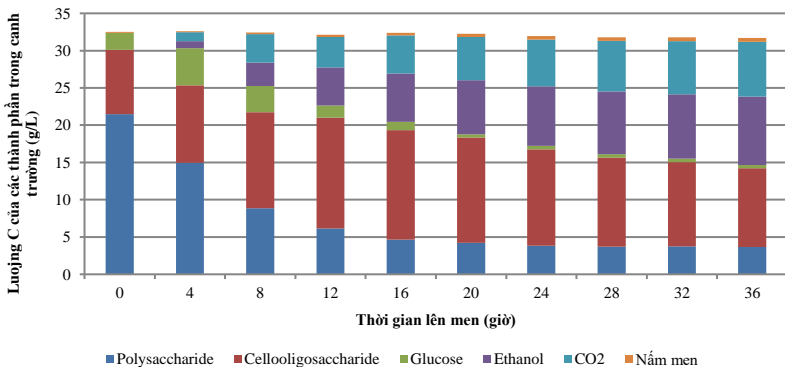
Hình 3.11 Sự chuyển hóa của các thành phần chứa carbon trong phương pháp lên men SHF

Sau 4 giờ lên men đầu tiên, hàm lượng carbon của glucose giảm đi 48,8% so với ban đầu trong khi lượng carbon của sinh khối nấm men tăng thêm 17,2% so với tổng lượng carbon của sinh khối được sinh ra trong quá trình lên men. Ethanol cũng được tạo thành trong 4 giờ lên men đầu tiên và lượng carbon của ethanol chiếm 19,6% so với tổng lượng carbon của ethanol khi quá trình lên men kết thúc. Lượng CO₂ sinh ra trong giai đoạn này chiếm 53,6% tổng lượng CO₂ sinh ra trong cả quá trình lên men được khảo sát. Bên cạnh đó, phần polysaccharide không hòa tan và các hợp chất cellooligosaccharide trong canh trường được chuyển hóa rất chậm; lượng

carbon của polysaccharide và cellooligosaccharide giảm đi lần lượt là 5,9% và 10,2% so với ban đầu. Từ giờ thứ 4 đến giờ thứ 28 là giai đoạn mà ethanol và CO₂ được sinh ra nhiều nhất; hàm lượng carbon của ethanol và CO₂ ở giờ lên men thứ 28 đạt tỷ lệ lần lượt là 90,2% và 96,1% so với tổng lượng carbon của ethanol và CO₂ sinh ra trong cả quá trình lên men. Hàm lượng carbon của cellooligosaccharide và polysaccharide giảm đi lần lượt 32,1% và 30,0% so với thời điểm bắt đầu quá trình lên men. Từ giờ thứ 28 đến giờ thứ 40, lượng carbon của cellooligosaccharide giảm đi 39,9% so với thời điểm bắt đầu lên men, polysaccharide hầu như không được thủy phân thêm. Lượng carbon của ethanol và CO₂ ở giờ lên men thứ 40 tăng lần lượt là 10,9% và 5,1% so với giờ lên men thứ 28; trong khi lượng carbon trong sinh khối chỉ tăng thêm 5,2% ở giờ thứ 40 so với giờ thứ 28.

Có xấp xỉ 55,8% lượng carbon của các thành phần cơ chất trong môi trường ban đầu đã được chuyển hóa thành các sản phẩm trong quá trình lên men, với tỷ lệ lượng carbon của ethanol và CO₂ trong phương pháp SSF là 1:1,5.

3.5.2 Phương pháp SSF



Hình 3.12 Sự chuyển hóa của các thành phần chứa carbon trong phương pháp lên men SSF

Hàm lượng carbon của polysaccharide, cellooligosaccharide và glucose lần lượt là 66,0%, 26,6% và 7,1% so với tổng lượng carbon trong nguyên liệu

ban đầu. Lượng carbon của sinh khối nấm men chiếm xấp xỉ 0,3% so với tổng lượng carbon của canh trường.

Trong 12 giờ đầu tiên, hàm lượng carbon của polysaccharide giảm đi 71,3% trong khi hàm lượng của cellooligosaccharide tăng thêm 76,1% so với ban đầu. Lượng carbon của glucose tăng thêm 116% trong 4 giờ đầu; tuy nhiên, từ giờ thứ 4 đến giờ thứ 12 thì hàm lượng carbon của glucose bị giảm đi; lượng carbon của ethanol, CO₂ và sinh khối nấm men đạt được lần lượt là 10,4%, 16,4 và 4,8% so với tổng lượng carbon của chúng sinh ra trong suốt quá trình lên men.

Từ giờ thứ 12 đến giờ thứ 36, lượng carbon của ethanol và CO₂ tăng liên tục nhưng sự biến đổi lượng carbon của polysaccharide, cellooligosaccharide và glucose xảy ra theo những quy luật khác nhau. Từ giờ lên men thứ 12 trở đi, hàm lượng carbon của polysaccharide giảm dần, ở giờ lên men thứ 24 giảm 82,1% so với ban đầu và sau đó không thay đổi. Lượng cellooligosaccharide giảm liên tục từ giờ thứ 12 đến giờ lên men thứ 36, giảm đi 29,2% trong giai đoạn này; trong khi lượng carbon của glucose giảm đi 71,4% trong khoảng thời gian từ giờ lên men thứ 12 đến giờ thứ 20.

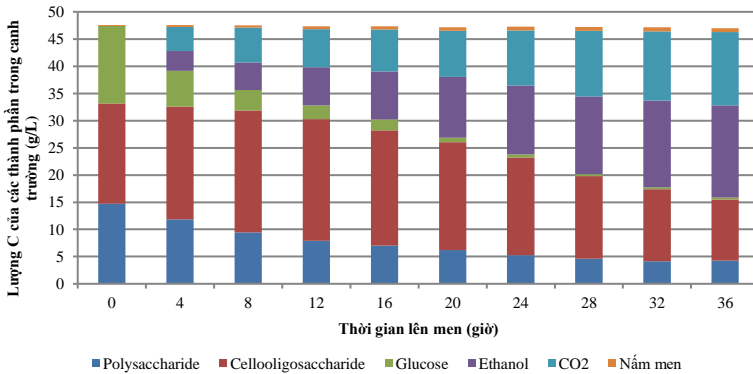
Có xấp xỉ 56,3% lượng carbon của nguyên liệu được chuyển hóa thành các sản phẩm lên men. Tỷ lệ lượng carbon của ethanol và CO₂ là 1:0,8.

3.5.3 Phương pháp kết hợp SHF-SSF

Ở thời điểm bắt đầu quá trình, hàm lượng carbon trong polysaccharide, cellooligosaccharide và glucose chiếm tỷ lệ lần lượt là 31,0%, 38,7% và 29,9% so với tổng lượng carbon có trong canh trường. Lượng carbon của nấm men giống chỉ chiếm tỷ lệ 0,5% so với tổng lượng carbon của môi trường ban đầu.

Trong 12 giờ đầu tiên, lượng carbon của polysaccharide và glucose lần lượt giảm đi 46,3% và 82,1% còn lượng carbon của cellooligosaccharide tăng thêm 22,0% so với ban đầu. Khi đó, lượng carbon của ethanol, CO₂ và sinh

khối nấm men tăng thêm và chiếm tỷ lệ lần lượt là 41,3%, 52,1% và 50,0% so với tổng lượng carbon của chúng sinh ra trong suốt quá trình lên men.



Hình 3.13 Sự chuyển hóa của các thành phần có chứa carbon trong phương pháp lên men kết hợp SHF-SSF

Từ giờ lên men thứ 12 đến giờ lên men thứ 36, quá trình thủy phân polysaccharide và cellooligosaccharide vẫn tiếp diễn. Ở giờ lên men thứ 32, lượng carbon của polysaccharide còn lại 28,2% so với ban đầu và không thay đổi cho đến khi kết thúc quá trình lên men. Bên cạnh đó, hàm lượng carbon của cellooligosaccharide liên tục giảm và khi quá trình lên men kết thúc, lượng carbon của cellooligosaccharide trong canh trường còn lại là 60,9% so với ban đầu. Từ giờ lên men thứ 12 đến giờ lên men thứ 28, lượng carbon của glucose liên tục giảm và không đổi từ giờ thứ 28 trở đi, chỉ còn xấp xỉ 2,7% so với ban đầu; trong khi đó lượng carbon của ethanol, CO₂ và sinh khối nấm men đều tăng và ở giờ thứ 28 đạt tỷ lệ lần lượt là 84,0%, 89,7% và 98,1% so với tổng lượng carbon của các thành phần này sinh ra trong suốt quá trình lên men. Từ giờ thứ 28 đến giờ thứ 36, lượng carbon của glucose và sinh khối không đổi nhưng lượng carbon của ethanol, CO₂ vẫn tiếp tục tăng thêm.

Với phương pháp này, 66,8% lượng carbon nguyên liệu đã được chuyển hóa thành sản phẩm với tỷ lệ carbon của ethanol và CO₂ là 1:0,8.

3.6 So sánh hiệu quả của các phương pháp

Bảng 3.26 So sánh hiệu quả của các phương pháp lên men

Phương pháp		SHF	SSF	Kết hợp SHF-SSF
Lượng nguyên liệu trong môi trường (% w/v)	Ban đầu	10	9	10
	Bổ sung	0	0	37,5% nguyên liệu ban đầu
Nồng độ endoglucanase (FPU/g nguyên liệu)	Ban đầu	30	25	30
	Bổ sung	0	0	20 FPU/g nguyên liệu bổ sung
Nồng độ β -glucosidase (CBU/g nguyên liệu)	Ban đầu	10	4	10
	Bổ sung	0	0	5 CBU/g nguyên liệu bổ sung
Hàm lượng ethanol cuối (% v/v)		1,83 ^a	2,10 ^b	3,93 ^c
Hiệu suất lên men (%)		54,8 ^a	70,0 ^b	89,6 ^c
Y _{P/S} (Ethanol)		0,364 ^a	0,504 ^b	0,539 ^c
Y _{P/S} (CO ₂)		0,558 ^c	0,402 ^a	0,427 ^b
Tỷ lệ C _{ethanol} /C _{CO2}		1:1,5 ^b	1:0,8 ^a	1:0,8 ^a
Tổng thời gian của quá trình (giờ)		80	36	76
	Thời gian thủy phân (giờ)	40	0	40
	Thời gian lên men (giờ)	40	36	36

Các kết quả trong bảng 3.26 cho thấy, phương pháp kết hợp SHF-SSF có ưu điểm vượt trội về hiệu suất chuyển hóa cơ chất thành sản phẩm và hàm lượng sản phẩm (ethanol) thu được so với các phương pháp truyền thống chuyển hóa sinh khối rong *Chaetomorpha* sp. thành ethanol.

Chương 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1 Kết luận

1. Rong *Chaetomorpha* sp. là một loại nguyên liệu mới có thể được sử dụng để sản xuất ethanol và nhiều sản phẩm có giá trị gia tăng khác. Thành phần liên kết glycosid của rong có chứa 74,4% là các liên kết 1,4-glucopyranosyl. Đây là cơ sở cho việc sử dụng hệ enzyme cellulase thủy phân sinh khối rong thành đường.

2. Rong *Chaetomorpha* sp. cần được xử lý trước với dung dịch NaOH và sóng siêu âm để làm tăng tỷ lệ polysaccharide trước khi được chuyển hóa thành ethanol. Điều kiện xử lý như sau:

Nồng độ NaOH 1,0% w/v, tỷ lệ rong:dung dịch NaOH 1:25 (w:v), công suất siêu âm 45W/g, thời gian siêu âm 5 phút, thời gian trích ly protein và khoáng 60 phút, nhiệt độ trích ly 60 °C. Khi đó, lượng protein, khoáng và kích thước hạt rong lần lượt giảm đi 81,8%, 73,2% và 31,6% so với ban đầu. Sau xử lý, hạt rong chứa xấp xỉ 72% polysaccharide.

3. Rong *Chaetomorpha* cũng cần được xử lý với dung dịch H₂SO₄ để làm tăng hiệu quả xúc tác của hệ enzyme cellulase. Điều kiện xử lý như sau:

Nồng độ H₂SO₄ 1,75% w/v, tỷ lệ rong trong dung dịch H₂SO₄ 12,5% w/v, nhiệt độ 120 °C và thời gian 30 phút. Khi đó, kích thước và chỉ số tinh thể của hạt rong bị giảm đi lần lượt là 83,3% và 42,0% so với ban đầu.

Phương pháp tách protein và khoáng bằng cách sử dụng dung dịch NaOH kết hợp với sóng siêu âm đã làm tăng đáng kể tỷ lệ polysaccharide trong rong *Chaetomorpha* sp., từ đó làm tăng hàm lượng cơ chất để thu được nồng độ ethanol trong dịch lên men cao hơn. Bên cạnh đó, việc tách protein còn góp phần tạo ra một sản phẩm có giá trị từ rong để tiếp tục nghiên cứu ứng dụng trong các loại thực phẩm khác

4. Đối với phương pháp SHF; quá trình đường hóa được thực hiện với tỷ lệ rong 10%, nồng độ endoglucanase và β -glucosidase lần lượt là 30 FPU/g và 10 CBU/g nguyên liệu, thời gian đường hóa 40 giờ; dịch thủy phân có tổng

lượng đường khử và glucose lần lượt là 65,8 g/L và 39,3 g/L; quá trình lên men được tiến hành ở nhiệt độ 35 °C, mật độ giống cấy 10×10^6 CFU/mL và thời gian 40 giờ; canh trường thu được có nồng độ ethanol là 1,83% v/v và hiệu suất lên men đạt 54,8%

5. Đối với phương pháp SSF; môi trường có tỷ lệ rong 9% w/v, nồng độ endoglucanase và β -glucosidase lần lượt là 25 FPU/g và 4 CBU/g, mật độ giống cấy là 10×10^6 CFU/mL nhiệt độ lên men 38 °C và thời gian 36 giờ; canh trường thu được có hàm lượng ethanol là 2,1% v/v và hiệu suất lên men đạt 70,0%.

6. Đối với phương pháp kết hợp SHF-SSF; sử dụng dịch rong được đường hóa theo các điều kiện của phương pháp SHF, bổ sung thêm rong với tỷ lệ 37,5% so với lượng ban đầu, nồng độ endoglucanase và β -glucosidase lần lượt là 20 FPU/g và 5 CBU/g rong bổ sung, mật độ giống cấy là 20×10^6 CFU/mL, nhiệt độ và thời gian lên men lần lượt là 38 °C và 36 giờ; canh trường thu được có hàm lượng ethanol là 3,93% (v/v) và hiệu suất lên men là 89,6%.

7. Đối với việc khảo sát sự chuyển hóa các thành phần chứa carbon trong nguyên liệu cho thấy: cả hai phương pháp SHF và SSF đều có khả năng chuyển đổi rong nguyên liệu thành sản phẩm tương đương nhau (55,8 và 56,3) và thấp hơn so với phương pháp kết hợp là 66,8%; tuy nhiên, với phương pháp SHF thì tỷ lệ chuyển hóa thành ethanol và CO₂ là 1:1,5 và thấp hơn nhiều so với hai phương pháp SSF và kết hợp SHF-SSF có tỷ lệ là 1:0,8. Dù có cùng tỷ lệ chuyển đổi nguyên liệu thành sản phẩm, nhưng phương pháp kết hợp cho hiệu suất lên men cao hơn phương pháp SSF là 28% và vượt trội so với phương pháp SHF là 63,5%. Trong cả 3 phương pháp thì phần lớn nguyên liệu còn sót lại trong môi trường chủ yếu là các cellooligosaccharide hòa tan .

Phương pháp kết hợp SHF-SSF cho hiệu quả lên men cao vượt trội hơn so với các phương pháp truyền thống chuyển hóa rong thành ethanol. Kết

quả này sẽ là tiền đề cho việc xây dựng một phương pháp lên men mới ở quy mô công nghiệp để làm tăng khả năng chuyển hóa sinh khối rong thành ethanol.

4.2 Kiến nghị

Hướng nghiên cứu tiếp theo của đề tài có thể thực hiện là tận dụng các hợp chất được tách ra trong quá trình chuyển hóa nguyên liệu rong thành ethanol như protein và khoáng sau quá trình tiền xử lý hoặc các thành phần còn lại của môi trường lên men sau khi thu nhận ethanol. Việc nghiên cứu sử dụng các thành phần này góp phần nâng cao hiệu quả sử dụng sinh khối rong và hạn chế chất thải ở mức thấp nhất có thể.

Nghiên cứu kết hợp các phương pháp tiền xử lý khác nhau như: nổ hơi nước, oxy hóa ẩm, dung dịch ion hóa... để làm giảm hơn nữa chỉ số tinh thể của rong *Chaetomorpha* sp.; từ đó, làm tăng hiệu quả thủy phân của hệ enzyme cellulase trên đối tượng này.

Nghiên cứu các chủng vi sinh vật lên men ethanol có khả năng sử dụng các loại đường đơn mà nấm men ThermoSac® DRY không lên men được (đường 5C như xylose, arabinose hay đường 6C như rhamnose, mannose...) để cải thiện nồng độ ethanol cuối và hiệu suất lên men.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

1. Nguyễn Minh Hải, Bạch Ngọc Minh, Đỗ Thị Tuyền, Lê Thị Hồng Chuyên, Hoàng Kim Anh, Lê Văn Việt Mẫn – Tối ưu hóa quá trình tiền xử lý bã rong *Chaetomorpha* sp. bằng H_2SO_4 để sử dụng trong sản xuất ethanol sinh học, Tạp chí hóa học 6ABC (2013) 815-820
2. Hoàng Kim Anh, Lê Thị Hồng Ánh, Bạch Ngọc Minh, Nguyễn Minh Hải – Nghiên cứu thành phần hóa học cơ bản của rong nước lợ *Chaetomorpha* sp. tại khu vực Đồng bằng sông Cửu Long. Tạp chí Khoa học và Công nghệ 52 (5C) 2014, 247-254.
3. Nguyễn Minh Hải, Lê Văn Việt Mẫn, Hoàng Kim Anh – Ảnh hưởng của một số yếu tố công nghệ đến quá trình đường hóa và lên men đồng thời sinh khối bã rong *Chaetomorpha* sp. để thu nhận ethanol sinh học. Tạp chí Khoa học và Công nghệ 52 (5C) 2014, 185-192
4. Nguyen Minh Hai, Tran Ngoc Hieu, Le Van Viet Man, Hoang Kim Anh – Bioethanol production from *Chaetomorpha* sp. residue by separate hydrolysis and fermentation method. Journal of Science and Technology 53 (2A) 2015, 13-19.
5. Bằng độc quyền Giải pháp Hữu ích số 2063 – Phương pháp đường hóa và lên men đồng thời sinh khối rong *Chaetomorpha* sp.. Cấp theo quyết định số 48168/QĐ-SHTT, ngày 18/6/2019.