

ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ ĐẾN KHẢ NĂNG SINH KHÍ HYDRO CỦA CHỦNG VI KHUẨN *CLOSTRIDIUM* sp. Tr2 TRONG ĐIỀU KIỆN LÊN MEN VI HIỆU KHÍ VỚI NGUỒN CƠ CHẤT RỈ ĐƯỜNG

Đặng Thị Yên¹, Lại Thúy Hiền¹, Nguyễn Thị Thu Huyền^{1,2*}

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

²Trường Đại học Tôn Đức Thắng, tp Hồ Chí Minh, *huyen308@gmail.com

TÓM TẮT: Ngành công nghiệp mía đường của Việt Nam đang ngày càng phát triển cùng với các ngành kinh tế khác. Sản lượng đường sản xuất không chỉ đáp ứng nhu cầu tiêu dùng trong nước mà còn xuất khẩu. Bên cạnh đó, một lượng lớn rỉ đường thải chưa được sử dụng hợp lý và hiệu quả. Thành phần của rỉ đường là hỗn hợp nhiều loại đường và một lượng nhỏ vitamin, khoáng chất có thể tận dụng làm nguyên liệu cho các ngành sản xuất khác. Sản xuất hydro sinh học từ rỉ đường là một hướng đi mới và triển vọng, mang lại một nguồn năng lượng sạch, có khả năng tái tạo, giá cả hợp lý đáp ứng nhu cầu năng lượng ngày càng cao của con người và giải quyết vấn đề ô nhiễm môi trường. Trong bài báo này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu quá trình lên men tối với nguồn cơ chất rỉ đường trong điều kiện vi hiếu khí để sản xuất khí hydro sinh học nhờ chủng vi khuẩn *Clostridium* sp. Tr2 phân lập từ phân trâu tại Việt Nam. Ảnh hưởng của các thành phần môi trường nuôi cấy (thể tích giống đầu vào, nguồn cacobon, nitơ, sắt, natri) và các yếu tố môi trường (pH ban đầu và nhiệt độ nuôi cấy) đến quá trình sinh trưởng và khả năng sinh khí hydro của chủng *Clostridium* sp. Tr2 đã được đánh giá. Các kết quả thu được cho thấy điều kiện thích hợp nhất cho quá trình sinh trưởng và sinh khí hydro trong điều kiện lên men tối, vi hiếu khí của chủng Tr2 bao gồm: Tỷ lệ giống đầu vào 10% (v/v), rỉ đường 15 ml/l; cao men 3 g/l, FeSO₄.7H₂O 100 mg/l, pH ban đầu 6,5 và nhiệt độ nuôi cấy 30°C.

Từ khóa: Hydro sinh học, vi khuẩn có khả năng sinh hydro, lên men tối, vi hiếu khí, rỉ đường.

MỞ ĐẦU

Hiện nay, thế giới đang phải đối mặt với ba vấn đề cấp bách, đó là giá nhiên liệu ngày càng tăng, biến đổi khí hậu và ô nhiễm môi trường. Nguồn năng lượng chính như than đá, dầu mỏ, khí đốt đang có nguy cơ cạn kiệt do nhu cầu sử dụng năng lượng của con người ngày càng cao. Hơn nữa, quá trình đốt cháy các nguồn năng lượng hóa thạch thải ra một lượng lớn khí CO₂ vào bầu khí quyển. Lượng khí CO₂ trong khí quyển tăng lên gây hiện tượng hiệu ứng nhà kính và một số hiện tượng thời tiết khắc nghiệt như băng tan, hạn hán, lũ lụt, sóng thần [12]. Trước tình hình này, các nhà khoa học cần tìm ra một nguồn năng lượng sạch đáp ứng nhu cầu năng lượng của thế giới và đảm bảo thân thiện với môi trường.

Hydro là một nguồn năng lượng tái tạo, bền vững, cung cấp lượng nhiệt lớn nhất (286 KJ/mol) và không thải ra khí CO₂ trong quá trình đốt cháy [5]. Do đó, hydro được coi là sự lựa chọn đúng đắn thay thế cho nguồn năng lượng hóa thạch không có khả năng tái tạo,

đồng thời mở ra cánh cửa mới cho nhân loại nhằm góp phần giảm sự phụ thuộc của con người vào nguồn năng lượng hóa thạch đang có nguy cơ cạn kiệt. Hydro được sản xuất chủ yếu bằng phương pháp điện phân nước, nhiệt hóa khí thiên nhiên và nguyên liệu hóa thạch. Điểm hạn chế của các phương pháp này là chi phí sản xuất cao và khó khăn khi ứng dụng trên quy mô công nghiệp. Phương pháp sinh học sản xuất hydro nhờ các vi khuẩn dị dưỡng lên men tối là một hướng mới của ngành công nghiệp năng lượng thế giới. Bởi các ưu điểm nổi bật như không cần ánh sáng, tốc độ sinh trưởng của vi khuẩn nhanh, năng suất cao và ổn định, kỹ thuật vận hành và kiểm soát quy trình đơn giản, yêu cầu năng lượng thấp, giá thành vận hành thấp, giảm thiểu tối đa ô nhiễm môi trường, khả năng ứng dụng sản xuất công nghiệp cao [5].

Nguồn cơ chất ưa thích mà các chủng vi khuẩn lên men sinh khí hydro thường sử dụng là glucose [1, 2, 4, 6]. Đây là những nguồn nguyên liệu có giá thành tương đối cao, dẫn đến giá thành sản xuất hydro tăng, tính cạnh tranh

thương mại của sản phẩm hydro sinh học thấp. Vì vậy, cần tìm kiếm nguồn cơ chất có chi phí thấp nhằm giảm giá thành sản phẩm. Ở Việt Nam, ngành công nghiệp chế biến đường đang rất phát triển, rỉ đường là sản phẩm phụ của quá trình sản xuất đường có thành phần rất phức tạp chứa khoảng 51% đường saccarose và một số loại đường khác, vitamin, khoáng. Sử dụng rỉ đường cho quá trình lên men hydro không chỉ làm giảm ô nhiễm môi trường mà còn hạ giá thành nguyên liệu đầu vào cho quá trình sản xuất hydro [9, 10].

Chủng *Clostridium* sp. Tr2, phân lập từ phân trâu tại Việt Nam, có khả năng lên men nhiều nguồn carbon khác nhau để sinh hydro, trong đó có rỉ đường. Trong bài báo này, chúng tôi nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố môi trường và điều kiện nuôi cấy đến khả năng lên men sinh khí hydro từ nguồn rỉ đường của chủng *Clostridium* sp. Tr2 nhằm hướng tới tối ưu hóa quá trình lên men tối, vì hiệu suất sinh hydro của chủng *Clostridium* sp. Tr2 trên nguồn cơ chất rỉ đường.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu, môi trường nuôi cấy và điều kiện nuôi cấy

Chủng vi khuẩn sinh hydro *Clostridium* sp. Tr2 dùng trong nghiên cứu được lấy từ bộ sưu tập giống của Phòng Vi sinh vật dầu mỏ, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Môi trường nuôi cấy chủng vi khuẩn *Clostridium* sp. Tr2 là môi trường NMV với nguồn cơ chất rỉ đường [7].

Điều kiện thí nghiệm: chủng *Clostridium* sp. Tr2 được hoạt hóa qua đêm trong lọ peni (dung tích 12 ml) chứa 10 ml môi trường NMV với nguồn cơ chất rỉ đường. Dịch nuôi cấy chứa vi khuẩn đang ở giai đoạn tăng trưởng sẽ được chọn làm giống khởi động để thực hiện thí nghiệm. Thí nghiệm được tiến hành trong bình thí nghiệm (dung tích 150 ml) chứa 100 ml môi trường NMV với mật độ tế bào ban đầu với OD_{660 nm} = 0,05-0,1. Thành phần môi trường

và điều kiện nuôi cấy được điều chỉnh tùy theo từng thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố môi trường đến khả năng sinh khí hydro của chủng Tr2. Cứ sau 4 giờ nuôi cấy, tiến hành lấy mẫu để xác định mật độ tế bào bằng cách đo mật độ quang của dịch nuôi cấy và xác định lượng khí thu được bằng phương pháp thế chỗ nước.

Phương pháp

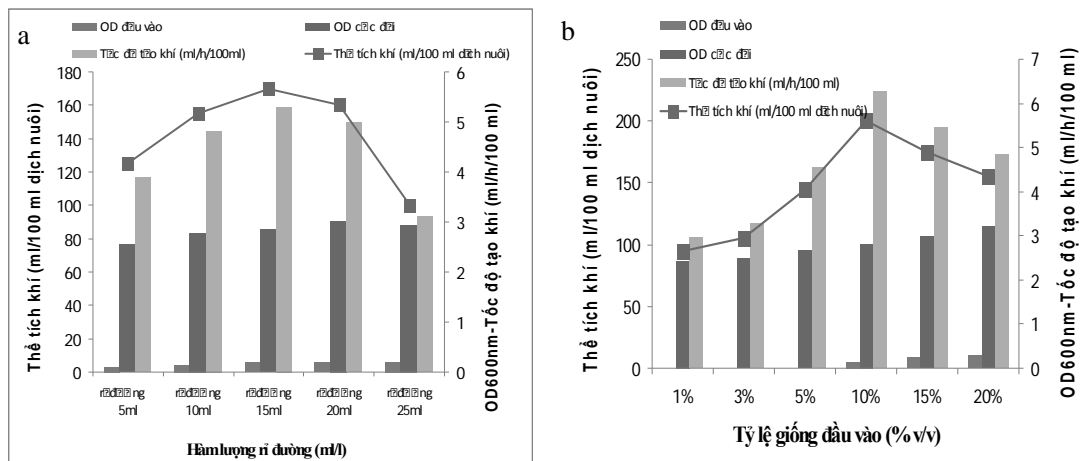
Xác định mật độ tế bào bằng phương pháp đo độ đục tế bào trên máy quang phổ (Secoman).

Xác định thể tích khí hydro tạo thành theo phương pháp thế chỗ nước (water displacement method).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của hàm lượng rỉ đường

Chủng Tr2 có khả năng sử dụng nhiều nguồn carbon khác nhau để lên men sinh hydro trong đó rỉ đường là nguồn cơ chất cho lượng khí cao (kết quả chưa công bố). Với những ưu điểm như: thành phần gồm nhiều loại đường khác nhau, rẻ tiền, dễ kiếm vì vậy, rỉ đường được lựa chọn làm nguồn carbon cho quá trình lên men của chủng Tr2. Hàm lượng nguồn carbon cũng là một trong các yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng và lên men tối sinh hydro của vi khuẩn. Vì vậy, chúng tôi tiến hành thí nghiệm chọn nồng độ rỉ đường tối ưu cho quá trình sinh trưởng và tạo khí hydro của chủng Tr2. Kết quả thu được chỉ ra ở hình 1a cho thấy, khi nuôi cấy với hàm lượng rỉ đường từ 5-25 ml/l, khả năng tạo khí của chủng Tr2 tăng dần khi hàm lượng rỉ đường tăng lên 15 ml/l và giảm dần khi hàm lượng rỉ đường lớn hơn 15 ml/l mặc dù khả năng sinh trưởng của chủng Tr2 như nhau. Điều này cho thấy, hàm lượng rỉ đường ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng tạo khí của chủng Tr2. Với hàm lượng rỉ đường 15 ml/l, chủng Tr2 cho lượng khí nhiều nhất. So với kết quả của Wang & Jin (2009) [9] thì lượng rỉ đường chủng Tr2 dùng để lên men sinh hydro ít hơn rất nhiều, vì vậy tiết kiệm được chi phí đầu vào được nhiều hơn.



Hình 1. Ảnh hưởng của hàm lượng ri đường (a) và tỷ lệ giống đầu vào (b) đến quá trình sinh trưởng và tạo khí của chủng Tr2

Ảnh hưởng của tỷ lệ giống đầu vào

Tỷ lệ giống đầu vào là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng tới quá trình sinh trưởng và tạo khí hydro. Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ giống đầu vào đến quá trình sinh trưởng và tạo khí của Tr2 để lựa chọn tỷ lệ tiếp giống ban đầu thích hợp nhất bổ sung vào quá trình lên men sinh hydro trên nguồn cơ chất ri đường của chủng này. Kết quả trình bày ở hình 1b cho thấy, tỷ lệ tiếp giống ảnh hưởng trực tiếp tới khả năng sinh trưởng, tốc độ tạo khí và lượng khí tạo thành của chủng Tr2. Chủng Tr2 đều có khả năng sinh trưởng và tạo khí khi tỷ lệ tiếp giống đầu vào từ 1-20% (v/v) và lượng khí tạo thành tỷ lệ thuận với tốc độ tạo khí. Khả năng sinh trưởng của chủng Tr2 tăng khi lượng giống đầu vào tăng, mặc dù mật độ tế bào cực đại trong các điều kiện tỷ lệ giống đầu vào khác nhau không có sự khác biệt lớn. Tuy nhiên, tốc độ tạo khí và lượng khí tạo thành của chủng Tr2 lại khác nhau khi nuôi cấy với tỷ lệ tiếp giống khác nhau. Tốc độ tạo khí và lượng khí tạo thành chỉ tăng tuyến tính khi tỷ lệ giống đầu vào từ 1-10%. Khi tỷ lệ giống đầu vào lớn hơn 10% thì giảm tuyến tính với tỷ lệ giống đầu vào mặc dù lượng khí tạo thành vẫn cao. Như vậy, tỷ lệ giống đầu vào ảnh hưởng đến tốc độ tạo khí và lượng khí tạo thành. Điều này ngược với quan điểm của Ferchichi et al. (2005) [2] cho rằng, thể tích giống chỉ ảnh hưởng đến tốc độ tạo khí. Kết quả còn cho thấy, tốc độ tạo khí và lượng

khí tạo thành của chủng Tr2 cao khi nuôi cấy với tỷ lệ giống đầu vào 5-20% và đạt mức cao nhất khi lượng giống đầu vào là 10%. Kết quả này tương tự với kết quả của Alalayah et al. (2009) [1] cho rằng, tỷ lệ tiếp giống 10% là tỷ lệ thích hợp nhất cho quá trình sinh trưởng và tạo khí của các chủng vi khuẩn sinh hydro.

Ảnh hưởng của nguồn nitơ

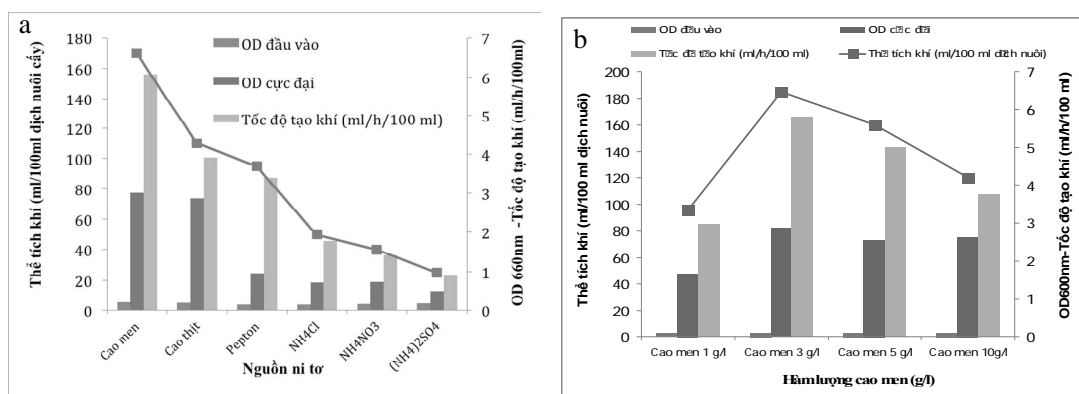
Mặc dù nguồn nitơ không tham gia trực tiếp vào quá trình lên men sinh hydro nhưng đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh trưởng của vi khuẩn, vì vậy có ảnh hưởng gián tiếp đến sản lượng hydro. Chính vì vậy, khả năng sinh trưởng và tạo khí của chủng Tr2 trên các nguồn nitơ khác nhau được khảo sát để chọn loại nitơ thích hợp nhất cho lên men sản xuất hydro. Các nguồn nitơ được sử dụng là nguồn nitơ hữu cơ (pepton, cao men, cao thịt) và nguồn nitơ vô cơ (NH_4Cl , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Kết quả trình bày ở hình 2a cho thấy, chủng Tr2 có khả năng sinh trưởng trên cả 6 nguồn nitơ vô cơ và nitơ hữu cơ thử nghiệm. Kết quả cũng cho thấy có khả năng sinh trưởng và tạo khí của chủng Tr2 trên nguồn nitơ hữu cơ tốt hơn vô cơ. Kết quả này cũng tương tự với phát hiện của Ferchichi et al. (2005) [2] cho rằng, nguồn nitơ hữu cơ cho kết quả tạo khí cao hơn nguồn nitơ vô cơ. Ngoài ra, kết quả của nghiên cứu này cũng cho thấy nguồn cao men là nguồn nitơ thích hợp nhất cho quá trình lên men sinh hydro của chủng này. Kết quả này cũng tương tự với kết

lượn của Ferchichi et al. (2005) [2] mặc dù một số ít chủng vi khuẩn có khả năng sử dụng riêng một loại nitơ vô cơ hay peptone cho quá trình lên men sinh hydro [8, 9].

Ảnh hưởng của hàm lượng cao men

Sau khi chọn được cao men là nguồn nitơ thích hợp nhất, kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ cao men đến quá trình sinh khí hydro của chủng Tr2 để chọn nồng độ cao men thích hợp nhất và mang hiệu suất cao nhất cho quá trình lên men sinh hydro được chỉ ra ở hình 2b. Hình 2b cho thấy, với nguồn cacbon ri

đường, chủng Tr2 đều sinh trưởng và tạo khí tốt ở tất cả các nồng độ cao men thử nghiệm. Lượng cao men bổ sung ít (1 g/l), lượng khí hydro tạo thành ít. Nếu bổ sung hàm lượng cao men nhiều (10 g/l) thì chính nguồn cao men lại là nhân tố ức chế quá trình tạo khí của vi khuẩn, lượng khí hydro tạo thành thấp. Hàm lượng cao men phù hợp nhất cho quá trình lên men sinh hydro của chủng này là 3g/l. Như vậy, lượng cao men cần cho quá trình lên men sinh hydro tốt nhất của chủng này cao hơn so với kết quả nghiên cứu của Ferchichi et al. (2005) [2].



Hình 2. Ảnh hưởng của nguồn nitrơ (a) và hàm lượng cao men (b) đến quá trình sinh trưởng và tạo khí của chủng Tr2

Ảnh hưởng của hàm lượng Fe

Fe²⁺ có vai trò rất quan trọng trong quá trình sản xuất hydro của vi khuẩn, ảnh hưởng trực tiếp tới hiệu suất tạo hydro [1, 2]. Vì vậy, chúng tôi tiến hành thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của Fe²⁺ đến quá trình sinh trưởng và tạo khí hydro của chủng Tr2 với các nồng độ Fe²⁺: 0; 1; 10; 10; 50; 100; 500 và 1000 mg/l để chọn nồng độ sắt thích hợp nhất cho thể tích khí cao nhất. Kết quả hình 3a cho thấy, chủng Tr2 có thể sinh trưởng tốt và tạo khí ở tất cả các nồng độ Fe nghiên cứu. Khả năng sinh khí của chủng Tr2 tăng dần khi lượng FeSO₄.7H₂O tăng dần đến 100 mg/l và giảm dần khi hàm lượng sắt lớn hơn 100 mg/l. Thể tích khí cực đại của chủng này thu được trong điều kiện môi trường chứa 100 mg FeSO₄.7H₂O trong 1 lít môi trường lên men. Các tài liệu trước đã công bố trước đây cho thấy, lượng FeSO₄.7H₂O thích hợp cho quá trình sinh khí hydro cũng dao động tùy từng loài, có loài

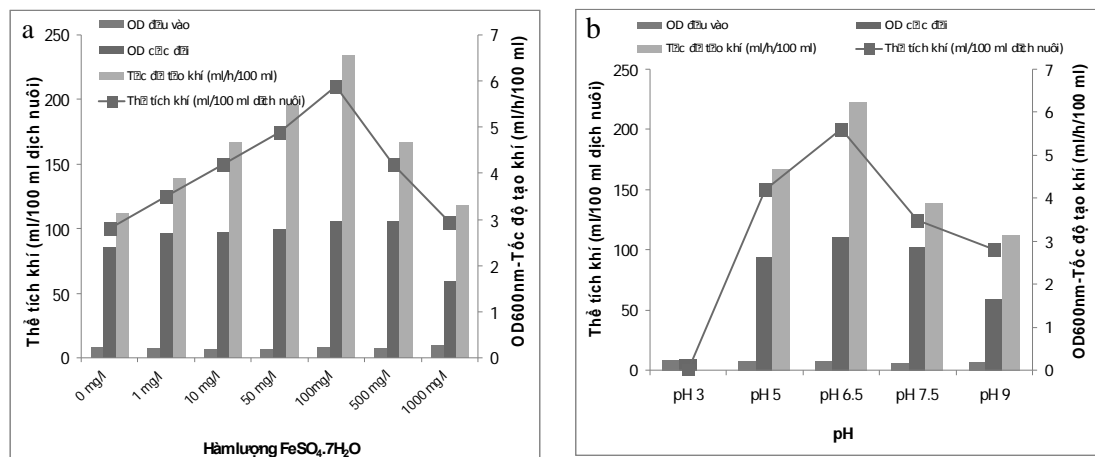
cần ít (25 mg/l) có loài cần nhiều 1 g/l [1, 2]. Do đó, kết quả thu được của chúng tôi cho thấy nhu cầu sắt của các loài vi khuẩn sinh hydro rất khác nhau mặc dù sắt đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh khí hydro của chúng.

Ảnh hưởng của pH

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi về khả năng sinh trưởng và tạo khí của chủng Tr2 trong các điều kiện pH môi trường khác nhau: 3; 5; 6,5 và 9 để chọn được khoảng pH đầu vào thích hợp nhất cho quá trình lên men sản xuất hydro được chỉ ra ở hình 3b. Kết quả cho thấy, khi pH đầu vào quá axit (pH 3), chủng Tr2 không có khả năng sinh trưởng và tạo khí. Khi pH môi trường axit (pH 5), chủng Tr2 có khả năng sinh trưởng và tạo khí. Điều này khác hẳn với nghiên cứu của Ferchichi et al. (2005) [2] khi họ cho rằng ở pH 5, vi khuẩn không có khả năng tạo khí hydro. Khi pH môi trường hơi axit (pH 6,5), chủng Tr2 đều sinh trưởng và tạo khí tốt nhất.

Kết quả này cũng tương tự với nghiên cứu của Kawagoshi et al. (2005) [3]. Nhóm tác giả này cho rằng, với pH đầu vào là 6,5, thì hiệu suất tạo hydro là cao nhất. Khi pH đầu vào hơi kiềm (pH 7,5) và quá kiềm (pH 9), khả năng sinh trưởng và tạo khí của chủng này giảm hẳn. Kết quả này khác hẳn so với nghiên cứu của

Ferchichi et al. (2005) [2] khi họ cho rằng pH 7,5-8,5 là pH tối ưu cho quá trình lên men sinh hydro. Tuy nhiên, kết quả thu được lại tương tự như công bố của Zhang et al. (2007) [11], pH đầu vào quá kiềm hay quá axit đều ức chế quá trình sinh khí hydro.



Hình 3. Ảnh hưởng của hàm lượng FeSO₄.7H₂O (a) và pH (b) đến quá trình sinh trưởng và tạo khí của chủng Tr2

Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ có ảnh hưởng rất rõ tới quá trình sinh trưởng của vi sinh vật nói chung và vi khuẩn sinh khí hydro nói riêng. Khi nhiệt độ tăng lên, tốc độ phản ứng của các enzyme trong tế bào vi sinh vật cũng tăng lên làm cho các hoạt động trao đổi chất trong tế bào vi sinh vật diễn ra nhanh hơn. Tuy nhiên, khi nhiệt độ quá cao sẽ làm biến tính màng sinh chất trong tế bào vi khuẩn làm ức chế quá trình sinh trưởng. Khi nhiệt độ thấp thì màng sinh chất của tế bào vi khuẩn bị kết đông lại và enzyme cũng ngừng hoạt động. Vì vậy, nếu nhiệt độ môi trường nuôi cấy của vi khuẩn vượt ra khỏi ngưỡng nhiệt độ cho phép của vi khuẩn thì quá trình sinh trưởng của chúng sẽ bị ức chế và thậm chí ngừng hẳn. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi về khả năng thích nghi của vi khuẩn sinh khí hydro Tr2 ở các ngưỡng nhiệt độ khác nhau 20, 30, 37 và 55°C được chỉ ra ở hình 4a. Kết quả cho thấy, chủng ưa ấm Tr2 khá bảo thủ về khả năng thích nghi với điều kiện nhiệt độ khác nhau, chủng Tr2 chỉ có khả năng sinh trưởng và tạo khí trong

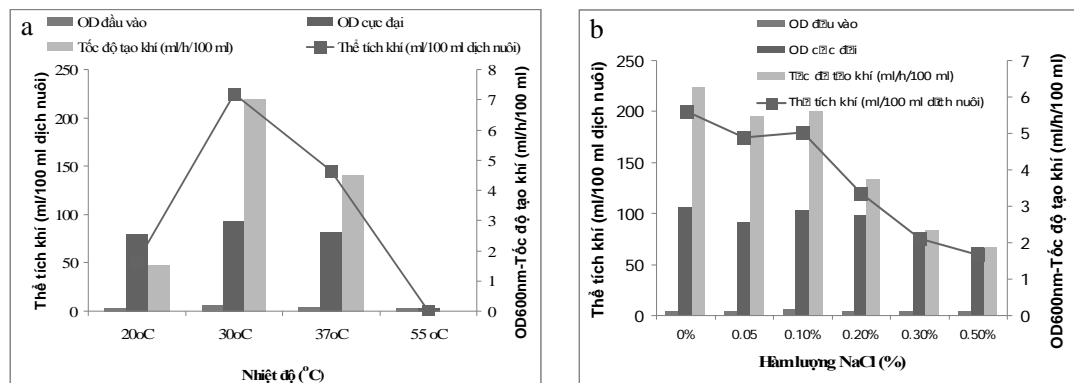
khoảng nhiệt độ 20-37°C. Khi nhiệt độ tăng lên 55°C (nhiệt độ phù hợp cho quá trình sinh trưởng của nhiều loại vi khuẩn ưa nhiệt) thì chủng này không sinh trưởng được. Kết quả còn cho thấy, nhiệt độ tối ưu cho quá trình sinh trưởng và tạo khí của chủng Tr2 là 30°C. Đây là giá trị nhiệt độ thuộc khoảng nhiệt độ tối ưu (30-37°C) cho quá trình sinh trưởng và tạo khí của vi khuẩn ưa ấm sinh hydro [1, 2].

Ảnh hưởng của hàm lượng NaCl

NaCl là một thành phần trong hệ thống vận chuyển của tế bào, duy trì áp suất thẩm thấu của tế bào nên có ảnh hưởng đến hoạt động của tế bào. Vì thế, NaCl cũng được chúng tôi nghiên cứu để chọn nồng độ thích hợp nhất cho quá trình lên men sinh hydro của chủng Tr2 (hình 4b). Kết quả cho thấy, chủng Tr2 có khả năng sinh trưởng và tạo khí trong toàn bộ khoảng NaCl thí nghiệm 0-5%, như vậy, chủng Tr2 có khả năng chịu mặn. nhưng lại là chủng ưa thích môi trường ít NaCl, khi môi trường chứa hàm lượng NaCl càng tăng thì khả năng sinh trưởng và tạo khí của chúng càng giảm. Kết quả này

cũng tương tự với kết luận của Khanna et al. (2011) [4]. Kết quả còn cho thấy, chủng này sinh trưởng vào tạo khí tốt nhất trong môi trường không chứa NaCl. So với nghiên cứu của

Khanna et al. (2011) [4] thì các chủng trong nghiên cứu này cần nồng độ NaCl cho quá trình sinh trưởng và tạo khí thấp hơn rất nhiều.



Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ (a) và hàm lượng NaCl (b) đến quá trình sinh trưởng và tạo khí của chủng Tr2

KẾT LUẬN

Các điều kiện và môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng lớn đến khả năng sinh trưởng và tạo khí hydro của chủng Tr2 trên nguồn cơ chất ri đường. Điều kiện thích hợp nhất cho quá trình sinh trưởng và tạo khí hydro của chủng Tr2 với nguồn cơ chất ri đường gồm: Ri đường (15 ml/l); cao men (3 g/l); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (100 mg/l); pH 6.5; nhiệt độ 30°C; tỷ lệ tiếp giống 10%.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện với sự tài trợ về kinh phí của Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, mã số VAST 05.02/11-12.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alalayah M. W., Kalil S. M., Kadhum H. A., Jahim M. J., Alauj M. N., 2009. Effect of Environmental Parameters on hydrogen Production using *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564). American J. Environ. Sci., 5(1): 80-86.
- Ferchichi M., Crabbe E., Hintz W., Gil G.-H., Almadidy A., 2005. Influence of culture parameters on biological hydrogen production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* ATCC 27021. World J. Microbiol. Biotechnol., 21: 855-862.
- Kawagoshi Y., Hino N., Fujimoto A., Nakao M., Fujita Y., Sugimura S., Furukawa K., 2005. Effect of inoculums conditioning on hydrogen fermentation and pH effect on bacterial community relevant to hydrogen production. J. Biosci. Bioeng., 100: 524-530.
- Khanna N., Kotay S.M., Gilbert J., Das D., 2011. Improvement of biohydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 under regulated pH. Biotechnol., 152: 9-15.
- Levin D. B., Pitt L., Love M., 2004. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. Int. J. Hydrogen Energy, 29: 173-85.
- Li Y., Zhu J., Wu X., Miller C., Wang L., 2010. The effect of pH on continuous biohydrogen production from swine wastewater supplemented with glucose. Appl. Biochem. Biotechnol., 162: 1286-1296.
- Nguyen Thi Thu Huyen, Dang Thi Yen, Nguyen Thi Yen, Vuong Thi Nga, Lai Thuy Hien, 2012. Using of response surface

- methodology for optimization of biohydrogen production by *Clostridium* sp. Tr2 isolated in Vietnam. TAP CHI SINH HOC, 34(4): 479-484.
8. Saratale D. G., Chen D. S., Lo C. Y., Saratale G. R., Chang S. J., 2008. Outlook of biohydrogen production from lignocellulosic feedstock using dark fermentation-a review. J. Sci. Indust. Res., 67: 962-979.
 9. Wang X., Jin B., 2009. Process optimization of biological hydrogen production from molasses by a newly isolated *Clostridium butyricum* W5. J. Biosci. Bioeng., 107(2): 138-44.
 10. Wei H., Bing W., Xiaoye L., Chunyu L., Liran Y., Yongfeng L., 2012. Fermentative Hydrogen Production from Molasses in an Activated Sludge Immobilized Bioreactor. Int. J. Energy Eng., 2: 2225-6571.
 11. Zhang M. L., Fan Y. T., Xing Y., Pan C. M., Zhang G. S., Lay J. J., 2007. Enhanced biohydrogen production from cornstalk wastes with acidification pretreatment by mixed anaerobic cultures. Biomass Bioenerg., 31: 250-254.
 12. Zuttel A., Remhof A., Borgschulte A., Friedrichs O., 2010. Hydrogen: the future energy carrier. Phil. Trans R. Soc., 368: 3329-3342.

**EFFECTS OF SOME FACTORS ON BIOHYDROGEN PRODUCTION
CAPACITY OF BACTERIUM *CLOSTRIDIUM* sp. Tr2 FROM MOLASSES
BY MICRO-AEROBIC FERMENTATION**

Dang Thi Yen¹, Lai Thuy Hien¹, Nguyen Thi Thu Huyen^{1,2}

¹Institute of Biotechnology, VAST

²Ton Duc Thang University, Ho Chi Minh city

SUMMARY

In Vietnam, sugar industry is strongly developed. In this industry, sugar output not only satisfy domestic demand but also for the export and a large amount of molasses was not effectively used. Molasses containing the mixture of sugar and a little amount of vitamins and minerals could be used as materials for other industries. Biohydrogen production from molasses is regarded as a new, potential way to produce a clean, renewable energy with suitable price in order to satisfy the energy demand as well as to solve environmental pollution. In this paper, we studied the biohydrogen production from molasses by bacterium *Clostridium* Tr2 isolated from buffalo-dung in Vietnam using micro-aerobic fermentation. Various medium components (inoculum size, carbon and nitrogen sources, iron, sodium) and environmental factors (initial medium pH and temperature) were evaluated for their effects on the growth and the hydrogen production capacity by *Clostridium* sp. Tr2. Obtained results showed that the most suitable conditions for the growth and hydrogen production of strain Tr2 in dark, micro-aerobic fermentation consist of 10% (v/v) pre-culture, 15 ml/l molasses, 3 g/l yeast extract, 100 mg/l FeSO₄.7H₂O, initial medium pH 6.5, 30°C.

Keywords: biohydrogen, hydrogen producing bacteria, dark fermentation, micro-aerobic, molasses.

Ngày nhận bài: 30-6-2013