

## NGHIÊN CỨU CỐ ĐỊNH TẾ BÀO NẤM MEN ỨNG DỤNG TRONG LÊN MEN CỒN TỪ RỈ ĐƯỜNG

Nguyễn Thị Hương<sup>1\*</sup>, Đặng Hồng Ánh<sup>2</sup>, Nguyễn Thu Vân<sup>2</sup>, Giang Thế Việt<sup>2</sup>,  
Nguyễn Xuân Bách<sup>2</sup>, Trần Ngọc Bích<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

<sup>2</sup>Viện Công nghiệp Thực phẩm

\*Email: [huongnt-uto@mail.hut.edu.vn](mailto:huongnt-uto@mail.hut.edu.vn)

Đến Toà soạn: 2/7/2012; Chấp nhận đăng: 25/12/2012

### TÓM TẮT

Các điều kiện cố định tế bào nấm men phù hợp cho quá trình lên men cồn từ rỉ đường bằng phương pháp lên men liên tục đã được khảo sát, bao gồm nồng độ Na-alginate, nồng độ CaCl<sub>2</sub>, tốc độ dòng chảy tạo hạt, mật độ tế bào trong dung dịch gel. Ngoài ra đã đánh giá được việc tái sử dụng tế bào nấm men cố định trong lên men cồn trên môi trường rỉ đường qua 4 lần lên men.

Kết quả cho thấy điều kiện cố định tế bào thích hợp là nồng độ chất mang Na-alginate 3 %, nồng độ dung dịch tạo gel CaCl<sub>2</sub> 2 %, mật độ giống thích hợp trong dịch chất mang 10<sup>9</sup> tế bào/ml gel, tốc độ dòng chảy tạo hạt tế bào cố định cho hệ thống tạo hạt 24 kim (đường kính hạt 0,5 cm) là 200 ml/phút. Ngoài ra kết quả đánh giá lên men cho thấy sau 4 lần lên men thì hạt tế bào cố định tái sử dụng vẫn có hoạt lực khá tốt, nồng độ cồn tạo ra chỉ giảm nhẹ (từ 11 %v/v xuống 10,5 % v/v) so với lần đầu sử dụng.

*Từ khóa:* cồn, lên men liên tục, tế bào cố định, rỉ đường.

### 1. MỞ ĐẦU

Kỹ thuật cố định các xúc tác sinh học nói chung và kỹ thuật cố định tế bào nói riêng đã có nhiều ứng dụng quan trọng trong nhiều lĩnh vực khoa học và đời sống. Các loại hình kỹ thuật này đã mang lại nhiều hiệu quả kinh tế thiết thực và nhanh chóng đi vào thực tế. Cố định tế bào được hiểu là sự giam giữ các tế bào trong một không gian phản ứng và vẫn giữ được tính chất xúc tác và có thể được tái sử dụng nhiều lần hoặc liên tục để sản xuất những sản phẩm theo mong muốn. Nói cách khác cố định tế bào nhằm hạn chế mọi sự vận động vật lý của các tế bào bằng cách cố định chúng trên các vật thể gọi là chất mang bằng nhiều phương pháp như hấp thụ, liên kết ion, liên kết nguyên tử, bọc trong gel mà không ảnh hưởng tới hoạt tính sinh học của chúng [1 - 3].

Đối với phương pháp bao trong gel thì tế bào được bao bọc trong các chất polyme tự nhiên hay tổng hợp có khả năng gel hóa. Hình dáng bề ngoài của các chất xúc tác sinh học đã được cố định theo phương pháp bọc gel có thể thay đổi theo yêu cầu ví dụ hình cầu, hình trụ, sợi mảnh hay màng mỏng, nhưng dạng hình cầu là thông dụng nhất. Các chất mang thường được sử dụng

là alginat, k-carrageenan, pectin, agar, gelatin... Đây là các polyme tự nhiên không độc, dễ tạo gel và không có hại cho tế bào [4].

Một trong các chiến lược cải tiến quá trình lên men etanol là áp dụng kỹ thuật cố định tế bào để thu được quá trình lên men có năng suất và hiệu suất cao. Trong số các chất mang trong kỹ thuật cố định tế bào ứng dụng trong lên men cồn thì Ca-alginat được sử dụng rộng rãi nhất do gel có độ xốp cao cho phép cơ chất và sản phẩm lên men đi vào, đi ra được dễ dàng tạo thuận lợi cho việc trao đổi chất. Sự khuếch tán của glucoza và etanol vào và ra khỏi mạng lưới gel rất cao khoảng 90 % so với trong nước và do tính tương thích sinh học rất tốt cho phép các tế bào sống duy trì hoạt động sống của mình khi cố định trên mạng lưới gel, không độc, không gây ức chế hoạt động sống của tế bào [5 - 11].

## **2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP**

### **2.1. Nguyên liệu**

#### *2.1.1. Giống vi sinh vật*

Sử dụng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* CNTP 7028 có trong bộ sưu tập giống vi sinh vật công nghiệp của Viện công nghiệp thực phẩm.

#### *2.1.2. Rỉ đường*

Rỉ đường của nhà máy đường Nông Công - Thanh Hóa đã được lựa chọn.

### **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

#### *2.2.1. Phương pháp cố định tế bào nấm men trong hạt Ca - Alginate*

Nấm men được nhân giống các cấp trên môi trường glucose 60 g/l,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g/l,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,6 g/l, cao nấm men 5 g/l ở 28 °C, li tâm lấy sinh khối tế bào, rửa bằng nước muối sinh lý 0,85%; sau đó trộn đều khuấy 30 phút với dung dịch Na - Alginate (đã thanh trùng 110 °C/30 phút) theo tỉ lệ nhất định để được nồng độ tế bào mong muốn từ  $10^6$  -  $10^{10}$  tế bào/ml alginate gel; hỗn hợp được khuấy đều trên máy khuấy từ và sau đó đưa vào bình chứa và tiến hành tạo hạt gel nhờ bơm định lượng qua hệ thống tạo hạt gồm 24 lỗ kim. Ở đây dung dịch tế bào/ Na Alginate từ các kim tạo hạt chảy vào bình đựng  $\text{CaCl}_2$  có nồng độ đã định và gel hóa ngay lập tức. Các hạt hình thành sẽ được lưu lại trong dung dịch (khuấy liên tục) trong thời gian nhất định để có độ bền cơ học mong muốn. Sau đó sử dụng ngay hoặc bảo quản trong dung dịch  $\text{CaCl}_2$  0,5 % ở 2 – 4 °C [12].

#### *2.2.2. Phương pháp lên men*

Rỉ đường được xử lý, tách cặn và điều chỉnh về độ đường 210 g/l. Các thí nghiệm lên men được tiến hành trong bình tam giác 500 ml chứa 400 ml môi trường rỉ đường đã được tiệt trùng. Nhiệt độ lên men từ 28 – 30 °C. Bình lên men được nút kín bằng nút cao su thông với ống thủy tinh hình chữ U phình to ở một trong hai nhánh; cho glycerine vào chỗ phình to để tránh bay hơi nước. Theo dõi quá trình lên men bằng cách cân trọng lượng  $\text{CO}_2$  thoát ra nhờ cân khối lượng bình.

#### *2.2.3. Xác định tế bào nấm men nhờ buồng đếm Thomas*

Dịch được gạn bỏ hạt Ca - Alginate, lắc đều, pha loãng rồi đưa vào buồng để đếm. Khi xác định lượng tế bào có trong hạt, thì lấy một lượng hạt nhất định, rửa sạch rồi xử lý hòa tan hạt với dung dịch xitrat - Na 5 % trong 30 phút sau đó đem pha loãng và đếm nhờ buồng đếm Thomas.

#### *2.2.4. Xác định lượng tế bào sống*

Dịch lên men: pha loãng 4 lần, lấy 1 ml cho lên môi trường thạch, dùng bàn trang trang đều rồi để trong tủ ẩm 30 °C trong 48 giờ; sau đó đếm số khuẩn lạc đã mọc rồi đem nhân với hệ số pha loãng ta có số tế bào sống trong 1ml dịch men [12].

Hạt Ca - Alginate: lấy một gam hạt, rửa sạch, xử lý với dung dịch Na - xitrat 5 % trong 30 phút, sau đó pha loãng và đưa lên mặt thạch của hộp petri và làm tiếp như đã làm với dịch nấm men. Kết quả thu được là lượng tế bào sống có trong 1 gam hạt Ca – Alginate.

#### *2.2.5. Xác định nồng độ cồn nhờ máy xác định cồn của hãng DUJARDIN - SALLERON*

Dựa trên nguyên tắc xác định điểm sôi của dung dịch cồn nước. Từ nhiệt độ sôi tra bảng sẽ có kết quả phần trăm cồn chứa trong dịch men (tính theo phần trăm thể tích).

#### *2.2.6. Xác định lượng CO<sub>2</sub> thoát ra trong quá trình lên men*

Cân trọng lượng bình lên men để xác định được lượng CO<sub>2</sub> tạo thành trong quá trình lên men.

#### *2.2.7. Xác định hàm lượng axit tổng theo phương pháp chuẩn độ*

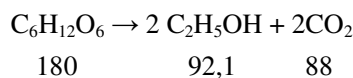
Độ chua được biểu thị bằng số ml dung dịch NaOH 0,1 N cần thiết để trung hòa hết lượng axit tự do chứa trong 10 ml dịch cần phân tích [13].

#### *2.2.8. Phân tích đường khử: theo phương pháp Graxianop.*

#### *2.2.9. Tính hiệu suất chuyển hóa đường ra cồn*

Tính theo lượng cồn thu được trong thực tế chia cho lượng cồn nhận được theo lý thuyết và biểu thị theo phần trăm.

Lượng cồn tính được theo phương trình Gaylussac:



Nếu tính cho 100 kg đường đôi thì nhân với hệ số 1,0526. Lượng cồn thu được từ 100 kg đường đôi tính theo lý thuyết là 68,2 lít hoặc 53,83 kg.

Lượng nguyên liệu đường đôi được đưa đi lên men là: a kg

Lượng dịch sau lên men thu được là b lít

Nồng độ rượu trong dịch sau lên men là c (% v/v)

$$\text{HSCH} = (b.c/ a.0,682). 100 \%$$

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Lựa chọn nồng độ chất mang Na – Alginate phù hợp cho quá trình cố định tế bào

Để xác định nồng độ chất mang Na - alginate phù hợp với quá trình cố định tế bào cho lên men cồn, tiến hành làm thí nghiệm với các mẫu có nồng độ Na - alginate khác nhau thay đổi từ 2 % đến 4 %, sử dụng nồng độ tế bào là  $10^9$  tế bào/ml dịch Na - alginate, nồng độ dung dịch tạo gel  $\text{CaCl}_2$  là 2 %. Sau đó các hạt có chứa tế bào nấm men được lên men trong các bình tam giác 500 ml có chứa 400 ml ri đường nồng độ đường khoảng 200 g/l, đã được xử lí và bổ sung các chất vi lượng: Cao nấm men 1 g/l,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1 g/l, urea 0,1 g/l, tỉ lệ hạt tế bào cố định so với dịch lên men là 10 (% w/v). Bình lên men được gắn với ống cổ cong chữ U. Cân khối lượng bình để xác định lượng  $\text{CO}_2$  thoát ra hàng ngày để đánh giá năng lực lên men của các mẫu thí nghiệm, đo các chỉ tiêu khác như: nồng độ cồn, đường dư, đếm số lượng tế bào nấm men ... vào cuối quá trình lên men. Các kết quả thu được thể hiện ở bảng 3.1 và bảng 3.2.

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của nồng độ Na – Alginate đến diễn biến lên men.

Thời gian lên men (ngày)	Lượng $\text{CO}_2$ thoát ra (g)				
	2 %	2,5 %	3 %	3,5 %	4 %
1	20,5	20,6	21,3	20,5	20,2
2	15,2	15,3	15,3	14,6	14,5
3	10,2	10,4	10,5	10,3	10,4
4	4,4	4,5	4,6	4,2	4,3
5	0,3	0,3	0,6	0,5	0,4
6	0,2	0,1	0,3	0,3	0,3
7	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
8	0,1	0	0	0,1	0,1

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của nồng độ Na - Alginate đến các chỉ tiêu dịch lên men.

Chỉ tiêu	2 %	2,5 %	3 %	3,5 %	4 %
Đường dư (%)	1,8	1,5	0,8	1,4	1,9
Cồn % (v/v)	10,3	10,7	11,3	10,8	10,2
HSCH đường ra cồn (%)	88,58	90,53	92,00	90,97	88,22
Nồng độ tế bào thoát ra ngoài $\times 10^4$ (tế bào/ml)	7,2	6,9	6,5	6,8	7,3

Qua bảng 3.1 và bảng 3.2 ta nhận thấy rằng động học quá trình lên men thể hiện qua lượng CO<sub>2</sub> tạo thành không có sự khác biệt nhiều giữa các mẫu thí nghiệm, với nồng độ chất mang là 3 % sẽ thu được lượng cồn cao (11,3 % v/v), lượng đường sót thấp (0,8 %), hiệu suất chuyển hóa cao nhất (92 %) trong các nồng độ chất mang. Nồng độ chất mang thấp thì khả năng giữ tế bào trong gel không tốt, độ bền cơ học của hạt kém, cho nên hạt dễ bị vỡ, tế bào nấm men dễ thoát ra khỏi hạt. Nếu nồng độ chất mang cao quá thì cũng ảnh hưởng đến độ bền và khả năng lên men của hạt tế bào cố định, điều này có thể là do sự tồn tại ở mức cao của ion Na<sup>+</sup> là một sự trở ngại đối với sự bền vững của gel vì Na<sup>+</sup> có thể cạnh tranh với vị trí Ca<sup>+2</sup> và nếu như hai ion này đối chỗ cho nhau thì gel sẽ bị hòa tan. Vì thế hạt tái sử dụng sẽ không được hiệu quả như mong muốn. Vì vậy, với nồng độ chất mang Na - alginate là 3 % là tối ưu cho khả năng gel hóa.

### 3.2. Lựa chọn nồng độ dung dịch tạo gel CaCl<sub>2</sub> phù hợp cho quá trình cố định tế bào

Sau khi đã xác định được nồng độ chất mang alginate thích hợp, chúng tôi tiếp tục làm thí nghiệm để xác định nồng độ của dung dịch tạo gel CaCl<sub>2</sub> với 5 mẫu khác nhau, thay đổi từ 1 % đến 5 %. Quá trình lên men được thực hiện tương tự như mục 3.1.

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch tạo gel đến diễn biến lên men.

Thời gian lên men (ngày)	Lượng CO <sub>2</sub> thoát ra (g)				
	1 %	2 %	3 %	4 %	5 %
1	18,7	21,3	19,2	17,5	17,2
2	13,1	15,25	13,6	12,3	12,1
3	9,6	10,5	10,3	9,6	9,5
4	4,5	5,2	5,0	4,6	4,2
5	1,4	1,8	1,6	1,2	0,8
6	0,4	0,8	0,6	0,5	0,4
7	0,1	0,3	0,2	0,2	0,1
8	0,1	0	0,1	0,1	0,1

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch tạo gel đến các chỉ tiêu của dịch lên men.

Chỉ tiêu	1 %	2 %	3 %	4 %	5 %
Đường dư (%)	1,5	1,0	2,3	2,9	3,2
Cồn % (v/v)	10,5	11,2	10,2	9,4	9,0
HSCH đường ra cồn (%)	91,25	92,26	90,28	85,79	84,11
Nồng độ tế bào thoát ra ngoài × 10 <sup>4</sup> (tế bào/ml)	12	6,5	5,5	5,1	4,6
Tỉ lệ tế bào sống/chết trong dịch	6,8	6,0	4,1	3,9	3,7

Lượng CO<sub>2</sub> tạo thành cho thấy khi cố định tế bào với nồng độ dung dịch tạo gel khác nhau đã có ảnh hưởng tới quá trình lên men, nồng độ CaCl<sub>2</sub> 2 % cho động học lên men diễn ra tốt nhất thể hiện qua lượng CO<sub>2</sub> tạo thành cao nhất. Với nồng độ dung dịch tạo gel CaCl<sub>2</sub> 1 % lượng tế

bào thoát ra ngoài khá lớn ( $12 \times 10^4$ ). Nguyên nhân là do trong quá trình tạo gel ở nồng độ  $\text{CaCl}_2$  thấp, quá trình tạo gel chậm và xảy ra không hoàn toàn, kích thước lỗ gel lớn, tế bào nấm men thoát ra ngoài nhiều, trở thành những tế bào nấm men tự do, điều đó sẽ ảnh hưởng đến việc tái sử dụng các hạt tế bào cố định. Nếu như nồng độ  $\text{CaCl}_2$  cao, quá trình polyme hóa diễn ra nhanh chóng, tốc độ khuếch tán các ion  $\text{Ca}^{2+}$  vào tâm hạt gel nhanh nhưng lại ảnh hưởng tới tế bào nấm men vì  $\text{CaCl}_2$  là muối rất háo nước. Ở nồng độ cao, áp suất thẩm thấu lớn diễn ra quá trình thoát nước từ trong tế bào của nấm men ra ngoài, làm cho tế bào nấm men co lại và chết đi, điều này thể hiện rất rõ qua tỉ lệ tế bào sống/chết giảm đi đáng kể. Với nồng độ dung dịch tạo gel  $\text{CaCl}_2$  2 % thu được lượng còn cao (11,2 % v/v), lượng đường sót thấp (1,0 %), hiệu suất chuyển hóa cao (92,26 %), so với các chỉ tiêu tương ứng của các mẫu có nồng độ  $\text{CaCl}_2$  khác là cao hơn hẳn.

### 3.3. Lựa chọn tỉ lệ giống thích hợp trong dung dịch chất mang cho khả năng giam giữ và độ bền của hạt tế bào cố định tốt nhất

Để khảo sát vấn đề này, chúng tôi tiếp tục làm thí nghiệm với các mẫu có tỉ lệ giống khác nhau, thay đổi từ  $10^6$  đến  $10^{10}$  tế bào/ml dịch Na - alginate. Thực hiện quá trình lên men tương tự như mục 3.1. Các kết quả thu được ghi trong bảng 3.5 và bảng 3.6.

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của tỉ lệ giống trong hạt tế bào cố định đến diễn biến lên men.

Thời gian lên men (ngày)	Lượng $\text{CO}_2$ thoát ra (g)				
	$10^6$ (tế bào/ml)	$10^7$ (tế bào/ml)	$10^8$ (tế bào/ml)	$10^9$ (tế bào/ml)	$10^{10}$ (tế bào/ml)
1	11,2	17,7	20,7	21,6	22,1
2	7,6	12,5	13,4	15,6	15,9
3	4,1	8,3	9,3	10,4	10,5
4	1,6	3,5	4,2	5,8	6,1
5	0,8	1,2	1,5	2,0	2,3
6	0,2	0,2	0,4	0,6	0,8
7	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2
8	0,1	0,1	0,1	0	0

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của tỉ lệ giống trong hạt tế bào cố định đến chỉ tiêu của dịch lên men.

Chỉ tiêu	$10^6$ (tế bào/ml)	$10^7$ (tế bào/ml)	$10^8$ (tế bào/ml)	$10^9$ (tế bào/ml)	$10^{10}$ (tế bào/ml)
Thời gian lên men (ngày)	11	10	9	8	8
Đường dư (%)	4,1	2,1	1,3	0,9	0,9
Còn % (v/v)	8,2	9,5	10,2	11,0	11,0
HSCH đường ra còn (%)	80,25	83,14	85,45	91,12	91,12
Nồng độ tế bào thoát ra ngoài $\times 10^4$ (tế bào/ml)	0,52	0,78	2,1	6,3	120

Số liệu ở bảng 3.5 và bảng 3.6 cho thấy khi cố định tế bào với mật độ càng cao thì quá trình lên men diễn ra nhanh hơn, nồng độ còn và hiệu suất biến đổi đường thành cồn cao hơn so với

mật độ tế bào thấp, mật độ tế bào trong gel ảnh hưởng tới hầu như mọi chỉ tiêu dịch sau lên men. Ví dụ, tại mật độ tế bào  $10^9$  và  $10^{10}$  tế bào/ml dịch Na - alginate, thời gian lên men ngắn lại, trong khi đó tại mật độ tế bào thấp hơn ( $10^6$  tế bào/ml dịch Na - alginate), thời gian lên men lại kéo dài hơn. Các hạt cố định tế bào nồng độ giống cao ( $10^9$  và  $10^{10}$  tế bào/ml dịch Na - alginate) tạo ra 11,0 (% v/v) cồn với hiệu suất chuyển hóa đường/cồn là 91,12 %, cao hơn khá nhiều so với các hạt tế bào cố định nồng độ giống thấp. Qua bảng 3.6 ta thấy, mẫu có nồng độ  $10^{10}$  tế bào/ml dịch Na - alginate thì nồng độ tế bào thoát ra là  $120 \times 10^4$ , nhiều hơn đáng kể so với mẫu có nồng độ  $10^9$  tế bào/ml dịch Na - Alginate, như vậy việc cố định tế bào với mật độ giống quá cao thì cũng không thực sự hiệu quả. Vì vậy tỉ lệ  $10^9$  tế bào/ml dịch Na - Alginate là phù hợp nhất cho quá trình cố định tế bào.

### 3.4. Lựa chọn tốc độ dòng chảy tạo hạt tế bào cố định

Tiến hành làm thí nghiệm để xác định tốc độ dòng chảy tạo hạt cố định để hạt có độ bền phù hợp nhất với quá trình lên men nhờ tế bào cố định. Thí nghiệm được thực hiện với các mẫu có tốc độ dòng chảy dịch chất mang có chứa sinh khối nấm men vào dịch  $\text{CaCl}_2$  thay đổi từ 150 ml/phút đến 250 ml/phút qua hệ thống tạo hạt 24 lỗ kim (tạo hạt có đường kính hạt 0,5 cm). Các điều kiện khác thực hiện tương tự như thí nghiệm trên. Kết quả của thí nghiệm với 5 mẫu với các tốc độ dòng chảy khác nhau được nêu ở bảng 3.7 và bảng 3.8.

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của tốc độ dòng chảy tạo hạt tế bào cố định đến diễn biến lên men.

Thời gian lên men (ngày)	Lượng $\text{CO}_2$ thoát ra (g)				
	150 ml/phút	180 ml/phút	200 ml/phút	220 ml/phút	250 ml/phút
0	0	0	0	0	0
1	21,3	21,5	21,6	21,6	21,2
2	14,6	14,1	14,8	14,8	14,3
3	9,8	10,2	10,4	9,9	9,6
4	5,4	5,3	5,7	5,4	5,6
5	1,3	1,7	2,2	2,0	1,8
6	0,4	0,6	0,9	0,6	0,3
7	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2
8	0,1	0	0	0	0,1

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của tốc độ dòng chảy tạo hạt tế bào cố định đến chỉ tiêu lên men

Chỉ tiêu	150 ml/phút	180 ml/phút	200 ml/phút	220 ml/phút	250 ml/phút
Đường dư (%)	2,4	2,0	1,8	2,3	2,6
Cồn % (v/v)	9,8	10,1	10,9	10,3	10,0
HSCH đường ra cồn (%)	87,34	87,91	91,03	90,25	90,08
Nồng độ tế bào thoát ra ngoài $\times 10^4$ (tế bào/ml)	6,2	6,4	6,5	6,9	7,0

Qua bảng số liệu ta thấy động học của quá trình lên men không khác biệt nhiều thể hiện qua lượng CO<sub>2</sub> tạo thành giữa các mẫu thí nghiệm là gần như tương đương nhau, tất cả các chỉ tiêu của các mẫu đều không quá chênh lệch, nhưng với mẫu có tốc độ dòng chảy là 200 ml/phút cho các kết quả tối ưu hơn: Độ cồn cao nhất (10,9 % v/v), lượng đường dư thấp (1,8 %), hiệu suất chuyển hóa (HSCH) đường ra cồn cao nhất (91,03 %). Vì vậy, tốc độ dòng chảy 200 ml/phút là thích hợp nhất để tạo hạt cố định tế bào.

### 3.5. Đánh giá hoạt lực lên men của tế bào cố định theo thời gian lên men

Để tìm hiểu khả năng sử dụng lâu dài hạt gel cố định nhằm tiết kiệm trong sản xuất và làm tiền đề cho lên men liên tục vốn là lợi thế của công nghệ cố định tế bào, đã tiến hành bốn đợt lên men liên tiếp bằng hạt gel cố định tái sử dụng. Sau mỗi đợt lên men, gạn bỏ dịch rỉ đường, rửa hạt gel bằng nước muối sinh lí vô trùng, sau đó cho môi trường mới vào và lên men tiếp. Các điều kiện cố định tế bào và lên men thực hiện tương tự như các thí nghiệm trên.

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của thời gian tái sử dụng tế bào cố định đến diễn biến lên men.

Thời gian lên men (ngày)	Lượng CO <sub>2</sub> thoát ra (g)			
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 4
1	21,3	21,1	21,0	20,7
2	15,6	15,4	15,2	14,6
3	10,2	10,0	9,8	9,4
4	5,7	5,4	5,2	4,8
5	1,4	0,6	0,5	0,3
6	0,8	0,3	0,2	0,2
7	0,3	0,1	0,1	0,1
8	0	0	0	0

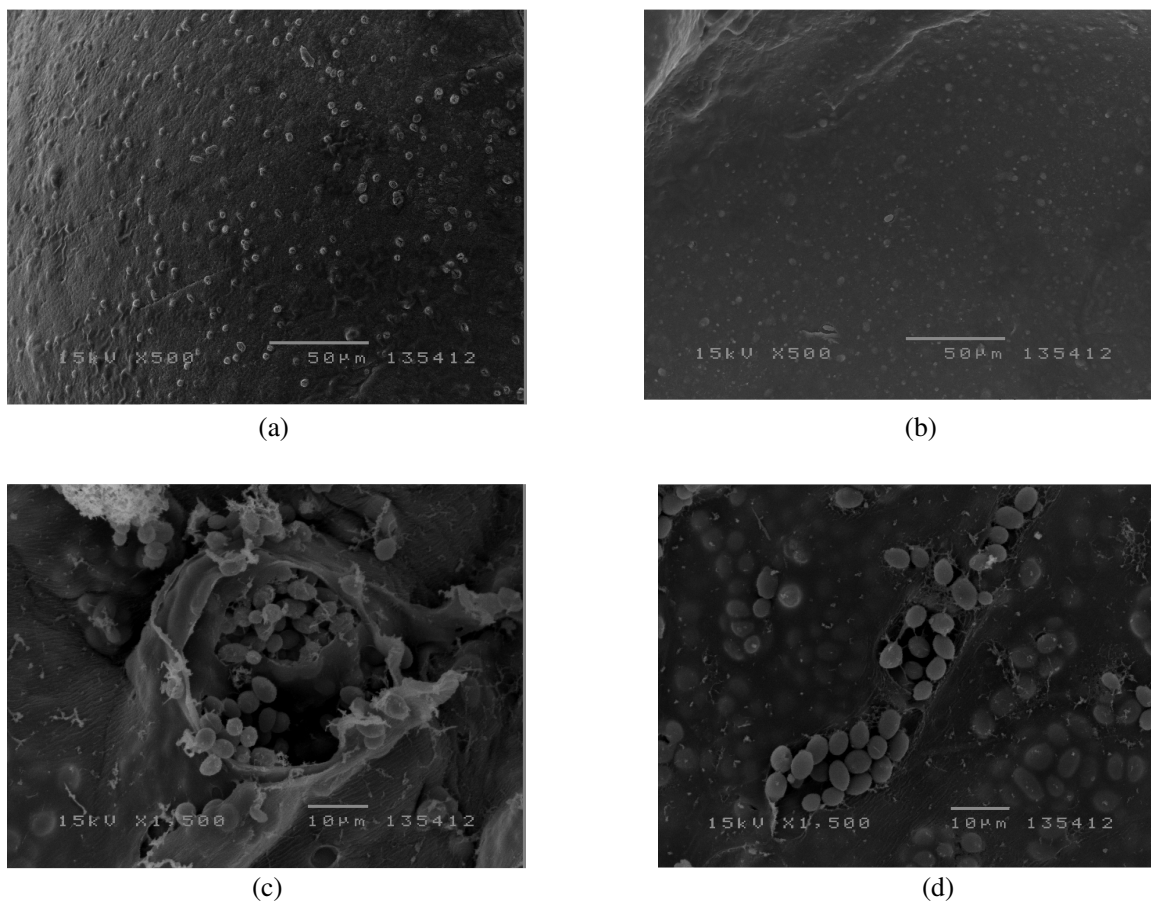
Bảng 3.10. Các chỉ tiêu dịch lên men theo các lần tái sử dụng tế bào cố định.

Chỉ tiêu	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 4
Đường dư (%)	1,2	1,5	1,6	1,9
Cồn % (v/v)	11,0	10,8	10,7	10,5
HSCH đường ra cồn (%)	91,5	91,35	91,18	90,81
Nồng độ tế bào thoát ra ngoài × 10 <sup>4</sup> (tế bào/ml)	5,9	6,2	6,5	6,8

Khi sử dụng tới 4 lần hoạt lực lên men của tế bào nấm men trong các hạt gel cố định vẫn không bị thay đổi đáng kể thể hiện qua cả lượng CO<sub>2</sub> tạo thành và kết quả phân tích dịch sau lên men. Nồng độ cồn trong dịch đậm chín và hiệu suất chuyển hóa đường/cồn có xu hướng giảm, nhưng không nhiều lắm (từ 11,0 % v/v) cồn và 91,5 % hiệu suất chuyển hóa lần đầu xuống 10,5



(% v/v cồn) và 90,81 % hiệu suất chuyển hóa ở lần thứ 4. Nồng độ tế bào thoát ra ngoài có xu hướng tăng lên sau mỗi lần lên men có thể vì sau mỗi lần tái sử dụng hạt cố định tế bào thì kích thước của hạt tăng do hạt gel bị trương nở và đồng thời lỗ của các hạt gel này ngày một to ra, dẫn đến tế bào nấm men có thể thoát ra ngoài nhiều hơn, tuy nhiên tỉ lệ thoát so với lượng còn lưu giữ được trong hạt là không nhiều, có thể nhận thấy điều này qua hình ảnh chụp hạt tế bào cố định (hình 1). Sau bốn lần lên men tái sử dụng mà độ cồn tạo thành thay đổi không nhiều cho nên khả năng tái sử dụng các hạt gel này là rất lớn, điều này mở ra khả năng ứng dụng hạt tế bào cố định trong lên men liên tục [14].



Hình 1. Hình ảnh chụp mặt ngoài và mặt cắt tế bào cố định:

- (a): Mặt ngoài hạt trước khi lên men                      (c) Mặt ngoài hạt sau khi lên men lần 4  
(b) Mặt cắt hạt trước khi lên men                      (d) Mặt cắt hạt sau khi lên men lần 4.

#### 4. KẾT LUẬN

Lựa chọn được điều kiện cố định tế bào là nồng độ chất mang Na-alginate là 3 %, nồng độ dung dịch tạo gel  $\text{CaCl}_2$  là 2 %, tỉ lệ giống thích hợp trong dịch chất mang là  $10^9$  tế bào/ml gel cho khả năng giam giữ tế bào trong hạt gel cao, tốc độ dòng chảy tạo hạt tế bào cố định cho hệ thống tạo hạt 24 kim (đường kính hạt 0,5 cm) là 200 ml/phút.

Sơ bộ đánh giá hoạt lực lên men của tế bào cố định theo thời gian lên men là rất tốt, nồng độ cồn trong dịch lên men vẫn đạt tới 10,5 (% v/v) sau khi sử dụng hạt tế bào cố định lên men đến lần thứ 4.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bayrock D. and Michael Ingledew W. - Application of multistage continuous fermentation for production of fuel alcohol by very - high - gravity fermentation technology, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **27** (2001) 87-93.
2. Mai Ngoc Dung, Dong Thi Thanh Thu - Use of immobilized yeast cell in alcohol fermentation from molasses, *Science and Technology Development* **11** (09) (2008) 90-99.
3. E. Palmqvist, M. Galbe, B. Hahn Hagerdal - Evaluation of cell recycling in continuous fermentation of enzymatic hydrolysates of spruce *Sacchromyces cerevisiae* and on-line monitoring of glucose and ethanol, *Appl. Microbiol Biotechnol* **50** (1998) 545-551.
4. Denis D. G. Mater, Barbotin Jean Noel - Effect of gelation temperature and gel-dissolving solution on cell viability and recovery of two *Pseudomonas putida* strains co-immobilized within calcium alginate or  $\kappa$ -carrageenan gel bead, *Biotechnology techniques*, **9** (10) (1995) 747-752.
5. Sheoran A., Yadav B. S., Nigam P., and Singh D. - Continuous ethanol production from sugarcane molasses using a column reactor of immobilized *Sacchromyces cerevisiae* HAU-1, *J. Basic Microbiol* **38** (1998) 123-128.
6. Wieczorek A. and Michalski H. - Continuous ethanol production by flocculating yeast in the fluidized bed bioreactor, *FEMS Microbiology Review* **14** (1994) 69-74.
7. Minoru Nagashima, Masaki Azuma, Sadao Noguchi, Keiichi Inuzuka - Continuous ethanol fermentation using immobilized yeast cell, *Biotechnology and Bioengineering* **26** (1984) 992-997.
8. Peiter J. Verbelen, David P. De Schutter, Phillip Delvaux, Kevin J. Verstrepen - Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications, *Biotechnol Lett, Biotechnol Lett* **28** (2006) 1515-1525.
9. Sanches E. N, Alhadeff E. M, Rocha-Leão M. H. M., and Pereira Jr., N. - Performance of a continuous bioreactor with immobilized yeast cells in the ethanol fermentation of molasses-stillage medium, *Biotechnol Lett* **18** (1996) 91- 94.
10. Yekta G.Kungur, Nese Zorlu - Production of Ethanol from Beet Molasses by Ca- Alginate Immobilized Yeast Cells in a Packed-Bed Bioreactor, Ege University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, Turkey, *Turk J. Biol.* **25** (2001) 265-275.
11. Wendhausen R., Fregonesi A., Moran. P. J. S., Joekes I., Augusto J. A. R., Tonella E. and Althoff K. - Continuous fermentation of sugar cane syrup using immobilized yeast cells, *Journal of Bioscience and Bioengineering* **91** (2001) 48-52.
12. Jianliang Yu, Xu Zhang, Tianwei Tan - An novel immobilization method of *Sacchromyces cerevisiae* to sorghum bagasses for ethanol production, *Journal of Biotechnology* **129** (2007) 415- 420.
13. PGS.TS Lê Thanh Mai và các cộng sự, Các phương pháp phân tích ngành công nghệ lên men, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội 2005.

14. F. Taylor, M. J. Kurantz, N. Goldberg, J. C. Craig Jr. - Effects of ethanol concentration and stripping temperature on continuous fermentation rate, *Appl. Microbiol Biotechnol* **48**, 311-316.
15. Peiter J. Verbelen, David P. De Schutter, Phillip Delvaux, Kevin J. Verstrepen - Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications, *Biotechnol Lett, Biotechnol Lett* **28** (2006) 1515-1525.

### **ABSTRACT**

#### **IMMOBILIZATION OF YEAST CELLS FOR APPLICATION IN ALCOHOL FERMENTATION FROM MOLASSES**

Nguyen Thi Huong<sup>1,\*</sup>, Dang Hong Anh<sup>2</sup>, Nguyen Thu Van<sup>2</sup>, Giang The Viet<sup>2</sup>,  
Nguyen Xuan Bach<sup>2</sup>, Tran Ngoc Bich<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Hanoi University of Science and Technology*

<sup>2</sup>*Food Industries Research Institute*

\*Email: [huongnt-uto@mail.hut.edu.vn](mailto:huongnt-uto@mail.hut.edu.vn)

The optimal condition to immobilize yeast cells for continuous alcohol fermentation such as sodium alginate and calcium chloride concentration, immobilized bead flow rate, yeast cell density in gel solution was investigated. Besides, the activity of immobilized beads reused for 4 times was checked.

The result indicated that the concentration of sodium alginate 3 % and calcium chloride 2 %, cell density in gel solution about  $10^9$  CFU/ml, immobilized bead flow rate 200 ml/min were suitable conditions. At this condition, after 4 times reused, the immobilized cells were determined stable activity while alcohol concentration in mash reduced slightly (from 11 % v/v to 10,5 % v/v).

*Keywords:* alcohol, continuous fermentation, immobilized cell, molasses