

Lên men ethanol từ rỉ đường sử dụng nấm men chịu nhiệt

Ngô Thị Phương Dung^{1*}, Nguyễn Ngọc Thanh¹, Võ Bá Phúc¹, Bùi Hoàng Đăng Long¹,
Pornthap Thanonkeo², Mamoru Yamada³, Huỳnh Xuân Phong¹

¹Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

²Khoa Công nghệ, Đại học Khon Kaen, Thái Lan

³Khoa Nông nghiệp, Đại học Yamaguchi, Nhật Bản

Ngày nhận bài 3/4/2017; ngày chuyển phản biện 7/4/2017; ngày nhận phản biện 5/5/2017; ngày chấp nhận đăng 12/5/2017

Tóm tắt:

Rỉ đường là một trong những nguồn nguyên liệu chính trong công nghiệp sản xuất ethanol sinh học. Ứng dụng nấm men chịu nhiệt trong lên men ethanol là hướng đi có tiềm năng với nhiều lợi ích, đặc biệt đối với các nước có khí hậu nhiệt đới như Việt Nam. Nghiên cứu nhằm mục đích tuyển chọn nấm men chịu nhiệt có hoạt tính lên men tốt và ứng dụng trong sản xuất ethanol từ rỉ đường ở nhiệt độ cao. Kết quả tuyển chọn được 6 chủng nấm men (Y8, Y80, Y81, YVN7, YVN8 và YVN12) có khả năng lên men từ rỉ đường 20°Brix ở 37°C trong 5 ngày, với hàm lượng ethanol thu được trong khoảng 5,54-6,40% (v/v). Trong đó, chủng Y81 sinh ethanol cao nhất ở 37°C và 40°C, hàm lượng ethanol đạt được lần lượt là 6,40% và 3,17% (v/v). Kết quả định danh đã xác định chủng Y8, Y80, Y81, YVN8 là *Saccharomyces cerevisiae*, chủng YVN7 là *Candida glabrata* và chủng YVN12 là *Torulaspora globosa*. Điều kiện thích hợp của chủng *S. cerevisiae* Y81 khi lên men ethanol rỉ đường ở 40°C được xác định là: Nồng độ đường 186 g/l, mật số giống chủng 10^7 tế bào/ml và lên men 6 ngày, hàm lượng ethanol đạt 7,36% (v/v).

Từ khóa: Lên men ethanol, nấm men chịu nhiệt, rỉ đường, *S. cerevisiae*.

Chỉ số phân loại: 2.8

Đặt vấn đề

Ethanol ngày càng trở nên quan trọng và được ứng dụng nhiều trong sản xuất một số thành phần trong thuốc, nhiên liệu sinh học, dung môi và nguyên liệu cho một số ngành công nghiệp khác... Tình trạng biến đổi khí hậu toàn cầu trong những năm gần đây đã đặt ra những thách thức lớn cho ngành công nghiệp sản xuất ethanol với việc sử dụng các vi sinh vật lý tưởng có thể chịu nhiệt và lên men mạnh. Sự phát triển của vi sinh vật chịu nhiệt ứng dụng cho các công nghệ sản xuất ethanol là hướng đi tiềm năng và dự báo sẽ có sự tăng trưởng cao. Theo Brooks (2008) [1], vi sinh vật lý tưởng được sử dụng để tổng hợp ethanol phải có khả năng lên men mạnh, sinh trưởng tốt, sức chống chịu cao, đặc biệt là khả năng chịu nhiệt. Việc nghiên cứu ứng dụng nấm men chịu nhiệt trong sản xuất ethanol ngày càng được quan tâm, do chúng có khả năng tăng trưởng và lên men trong điều kiện nhiệt độ cao của khí hậu ở các nước nhiệt đới. Nhiệt độ cao giúp đẩy mạnh quá trình đường hóa và hiệu quả lên men của quá trình chưng cất, giảm nguy cơ tạp nhiễm, tạo môi trường yếm khí hơn do giảm lượng oxy hòa tan, tạo thuận lợi cho quá trình lên men và đặc biệt là phù hợp với điều kiện nước ta.

Rỉ đường là một sản phẩm phụ của quá trình tinh chế đường. Rỉ đường được sản xuất tại hơn 45 quốc gia trên

thế giới, trong đó có Việt Nam. Nền công nghiệp mía đường ở nước ta phát triển khá mạnh trong thời gian qua nên nguồn nguyên liệu rỉ đường khá phong phú và rẻ hơn so với các nguồn nguyên liệu khác được sử dụng trong sản xuất ethanol cũng như không gây ảnh hưởng đến nguồn cung lương thực. Từ những lý do trên mà nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu tuyển chọn, định danh một số chủng nấm men chịu nhiệt triển vọng và thử nghiệm ứng dụng lên men ethanol từ rỉ đường ở nhiệt độ cao.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Chủng nấm men và môi trường

- 23 chủng nấm men đã được phân lập và sơ tuyển dựa vào đặc tính chịu nhiệt và lên men ethanol được lưu trữ tại Phòng thí nghiệm công nghệ sinh học thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ [2] và chủng *Kluyveromyces marxianus* (Đại học Yamaguchi, Nhật Bản).

- Môi trường YPD (yeast extract 0,5%; peptone 0,5%; D-glucose 2,0%) và môi trường YPD agar (môi trường YPD bổ sung 1,5 g/l agar) [3].

- Rỉ đường từ Nhà máy đường Phụng Hiệp, Hậu Giang (hàm lượng đường tổng 43-47%, độ Brix trong khoảng 74-79° và pH 4,6-4,7).

*Tác giả liên hệ: Email: ntpdung@ctu.edu.vn

Ethanol fermentation from molasses using thermotolerant yeasts

Thi Phuong Dung Ngo^{1*}, Ngoc Thanh Nguyen¹,
Ba Phuc Vo¹, Hoang Dang Long Bui¹,
Pornthap Thanonkeo², Mamoru Yamada³,
Xuan Phong Huynh¹

¹Biotechnology Research and Development Institute, Can Tho University, Vietnam

²Faculty of Technology, Khon Kaen University, Thailand

³Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Japan

Received 3 April 2017; accepted 12 May 2017

Abstract:

Molasses is one of the common raw materials for the industry of bioethanol production. The application of thermotolerant yeasts to produce ethanol from molasses is a quite potential step, promising to bring many benefits to the ethanol industry, particularly in a country with a tropical climate as Vietnam. The objectives of this study were to select a number of potential thermotolerant yeasts for ethanol fermentation, and to study favorable conditions for ethanol production from molasses at high temperature. At 37°C, six strains of yeasts (Y8, Y80, Y81, YVN7, YVN8, and YVN12) were selected as the most ethanol producing strains with the ethanol contents ranging from 5.54 to 6.40% (v/v). The yeast strains of Y8, Y80, Y81, and YVN8 were characterized as *Saccharomyces cerevisiae*. YVN7 was *Candida glabrata*, and YVN12 was *Torulaspora globosa*. The *S. cerevisiae* Y81 was found giving the highest ethanol produced at 37°C and 40°C with the ethanol concentrations of 6.40% (v/v) and 3.17% (v/v), respectively. The favorable conditions for ethanol production at 37°C from molasses of the *S. cerevisiae* Y81 were determined as follows: 10⁷ yeast cells/ml of inoculum level, initial sugar concentration of 186 g/l, and 6 days of fermentation, which gave the achieved ethanol concentration of 7.36% (v/v).

Keywords: Ethanol fermentation, molasses, *S. cerevisiae*, thermotolerant yeast.

Classification number: 2.8

Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát khả năng lên men của nấm men ở 37°C: Tăng sinh khối nấm men trong môi trường YPD, cấy chủng và ủ lactic ở nhiệt độ phòng (28-32°C) trong 24 giờ, mật số đạt 10⁸ tế bào/ml. Ri đường được khử trùng ở 115°C, trong 10 phút. Chủng 1 ml dịch tăng sinh (mật số 10⁸ tế bào/ml) vào bình tam giác 250 ml có chứa 99 ml ri đường (20°Brix và pH 4,5), đậy kín bằng waterlock và ủ trong 5 ngày ở 37°C. Xác định pH, Brix, hàm lượng đường và ethanol.

Khảo sát khả năng lên men của nấm men ở 40°C: Các chủng nấm men được tuyển chọn từ thử nghiệm khả năng lên men ở 37°C được sử dụng trong thử nghiệm này ở 40°C với 3 lần lặp lại.

Định danh nấm men chịu nhiệt được tuyển chọn: Các chủng nấm men tuyển chọn được tăng sinh, trích DNA và khuếch đại trình tự vùng D1/D2 trên 26S rDNA với cặp mồi NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') và NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') [4] bằng phản ứng PCR. Sản phẩm PCR được giải trình tự bằng hệ thống ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, California, USA). Dựa trên trình tự 26S rDNA để phân tích và so sánh với trình tự các chủng nấm men trên ngân hàng dữ liệu NCBI. Xây dựng cây phả hệ dựa trên trình tự đoạn gene 26S rDNA theo phương pháp neighbor-joining trong chương trình MEGA 6 với chỉ số bootstrap 1.000 lần lặp lại [5].

Khảo sát điều kiện lên men từ ri đường của nấm men tuyển chọn: Chủng nấm men có khả năng lên men mạnh nhất từ các thí nghiệm trên được tuyển chọn sử dụng trong thử nghiệm này. Thí nghiệm được thực hiện với 100 ml dịch ri đường ở 37°C với 3 nhân tố: Nồng độ giống (10⁵, 10⁶ và 10⁷ tế bào/ml), hàm lượng đường (20, 25 và 30°Brix, tương đương với nồng độ đường lần lượt là 146,87 g/l, 185,80 g/l và 206,51 g/l) và thời gian lên men (5, 6 và 7 ngày) [6]. Phân tích các chỉ tiêu như ở các thí nghiệm trước. Các điều kiện thích hợp tiếp tục được thử nghiệm ở quy mô 1 l ri đường.

Phân tích và xử lý kết quả: Giá trị pH được xác định bằng pH kế (Sartorius, PB-20, Đức), độ Brix được xác định bằng khúc xạ kế (Hand Refractometer, FG103/113, Euromex, Hà Lan), hàm lượng đường được xác định bằng phương pháp DNS [7], hàm lượng ethanol được xác định bằng phương pháp chưng cất [8]. Hiệu suất lên men (%) là tỷ lệ phần trăm của lượng ethanol thực tế thu được so với lượng ethanol lý thuyết từ tổng lượng đường đã được sử dụng. Kết quả được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA). Số liệu thống kê sử

dụng chương trình Statgraphics Centurion XV (Statpoint Technologies, Inc., USA).

Kết quả

Khả năng lên men của nấm men chịu nhiệt ở 37°C

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, sau khi lên men, dịch lên men có độ pH từ 4,31-4,47, độ Brix từ 12,97-18,17°, lượng đường sử dụng từ 92,23-168,91 g, hàm lượng ethanol từ 1,36-6,40% (v/v), hiệu suất lên men từ 22,99-59,00%. Trong đó, chủng Y81 lên men tạo ethanol cao nhất (6,40% v/v) và hiệu suất lên men đạt 59,0%. Hàm lượng ethanol từ các chủng Y81, YVN12, Y80, Y8, YVN7, YVN8 đạt 5,54-6,40% (v/v) và hiệu suất lên men đạt 50,81-59,00%, khác biệt không ý nghĩa về mặt thống kê nhưng khác biệt có ý nghĩa so với kết quả từ các chủng còn lại với độ tin cậy 95%.

Bảng 1. Độ cồn, pH, độ Brix, hiệu suất sau lên men cơ chất rỉ đường ở 37°C.

Chủng nấm men	pH sau lên men	Brix sau lên men	Đường sử dụng (g)	Hàm lượng ethanol (% v/v)	Hiệu suất lên men (%)
Y8	4,32 ^{ab 1}	13,80 ^b	167,36 ^a	5,93 ^{ab}	54,65 ^{ab}
Y29	4,43 ^{bij}	17,00 ^{de}	111,9 ^{cd}	2,05 ^d	28,24 ^d
Y31	4,41 ^{ghij}	16,87 ^d	109,22 ^{cd}	3,31 ^c	46,78 ^{bc}
Y32	4,47 ^k	17,27 ^{defg}	106,12 ^{cde}	1,95 ^{de}	28,35 ^d
Y33	4,47 ^k	17,57 ^{defgh}	107,06 ^{cde}	2,22 ^d	31,76 ^d
Y34	4,47 ^k	17,57 ^{defgh}	111,29 ^{cd}	1,66 ^{de}	23,01 ^d
Y35	4,44 ^{ijk}	17,33 ^{defg}	109,48 ^{cd}	2,14 ^d	31,48 ^d
Y37	4,45 ^{ijk}	17,77 ^{efgh}	118,80 ^c	1,94 ^{de}	25,05 ^d
Y38	4,44 ^{ijk}	17,13 ^{def}	114,40 ^{cd}	2,01 ^{de}	26,97 ^d
Y39	4,47 ^k	17,00 ^{de}	112,76 ^{cd}	2,19 ^d	30,79 ^d
Y42	4,34 ^{abc}	17,93 ^{gh}	113,27 ^{cd}	1,68 ^{de}	23,16 ^d
Y47	4,42 ^{ghij}	17,80 ^{fgh}	92,40 ^e	1,70 ^{de}	28,28 ^d
Y53	4,44 ^{ijk}	17,80 ^{fgh}	110,86 ^{cd}	1,62 ^{de}	23,19 ^d
Y54	4,44 ^{ijk}	17,37 ^{defg}	105,25 ^{cde}	1,98 ^{de}	29,07 ^d
Y80	4,31 ^a	13,73 ^{ab}	165,29 ^a	5,98 ^{ab}	55,83 ^{ab}
Y81	4,32 ^{ab}	12,97 ^a	167,36 ^a	6,40 ^a	59,00 ^a
Y88	4,46 ^{jk}	17,70 ^{efgh}	102,41 ^{de}	2,12 ^d	32,09 ^d
Y104	4,43 ^{bij}	17,60 ^{defgh}	102,84 ^{de}	1,85 ^{de}	27,58 ^d
YVN3	4,35 ^{bcd}	17,90 ^{fgh}	92,23 ^e	1,36 ^e	22,99 ^d
YVN7	4,38 ^{def}	13,53 ^{ab}	168,23 ^a	5,54 ^b	50,81 ^{ab}
YVN8	4,39 ^{efg}	13,00 ^a	168,91 ^a	5,80 ^{ab}	52,95 ^{ab}
YVN12	4,40 ^{fgh}	13,37 ^{ab}	165,46 ^a	6,10 ^{ab}	56,93 ^a
YVN30	4,33 ^{abc}	18,17 ^h	116,12 ^{cd}	1,71 ^{de}	22,99 ^d
<i>K. marxianus</i>	4,36 ^{cde}	15,33 ^c	140,19 ^b	3,77 ^c	41,49 ^c

¹Giá trị trung bình của 3 lần lặp lại; trong cùng một cột các chữ số mũ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%.

Khả năng lên men của nấm men chịu nhiệt ở 40°C

Kết quả sau lên men ở 40°C của 6 chủng tuyển chọn là: pH 4,29-4,42, độ Brix 14,80-18,53°, lượng đường sử dụng 26,22-88,67 g, hàm lượng ethanol 1,23-3,96% (v/v), hiệu suất lên men 54,48-69,08% (bảng 2). Trong đó, ba chủng

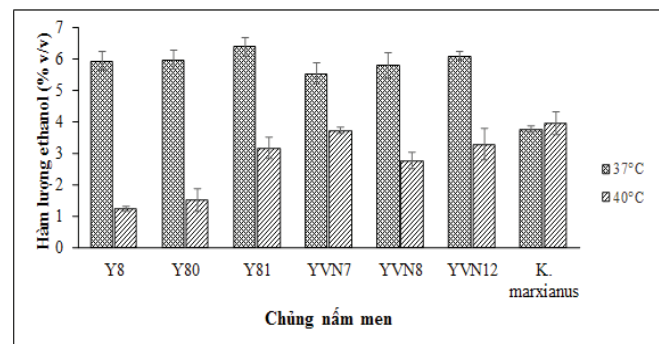
Y81, YVN7 và YVN12 có hàm lượng ethanol đạt từ 3,17-3,74% (v/v), khác biệt không ý nghĩa ở độ tin cậy 95% với *K. marxianus* (3,96% (v/v)), nhưng khác biệt có ý nghĩa so với các chủng còn lại.

Bảng 2. Độ cồn, hiệu suất, pH, độ Brix và hiệu suất sau lên men cơ chất rỉ đường ở 40°C.

Chủng nấm men	pH sau lên men	Brix sau lên men	Đường sử dụng (g)	Hàm lượng ethanol (% v/v)	Hiệu suất lên men (%)
Y8	4,40 ^{a 1}	18,53 ^c	26,22 ^c	1,23 ^c	54,48 ^c
Y80	4,40 ^a	17,53 ^{de}	52,19 ^d	1,51 ^c	56,52 ^{bc}
Y81	4,42 ^a	16,67 ^{cd}	71,25 ^c	3,17 ^{ab}	68,53 ^a
YVN7	4,41 ^a	15,53 ^{ab}	83,59 ^{ab}	3,74 ^a	69,06 ^a
YVN8	4,29 ^b	15,93 ^{bc}	74,18 ^{bc}	2,77 ^b	57,55 ^{bc}
YVN12	4,39 ^a	15,53 ^{ab}	79,18 ^{abc}	3,30 ^{ab}	64,08 ^{ab}
<i>K. marxianus</i>	4,32 ^b	14,80 ^a	88,67 ^a	3,96 ^a	69,08 ^a

¹Giá trị trung bình của 3 lần lặp lại; trong cùng một cột các chữ số mũ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%.

Hàm lượng ethanol khi lên men ở 37 và 40°C được tổng hợp và so sánh ở hình 1. Chủng Y81 cho hàm lượng ethanol khác biệt không ý nghĩa so với các chủng tuyển chọn khi lên men ở 40°C (chủng YVN7, YVN12 và *K. marxianus*), tuy nhiên hàm lượng ethanol và hiệu suất lên men đạt được của chủng Y81 là cao nhất khi lên men ở 37°C.



Hình 1. Hàm lượng ethanol (v/v) ở thử nghiệm lên men 37 và 40°C.

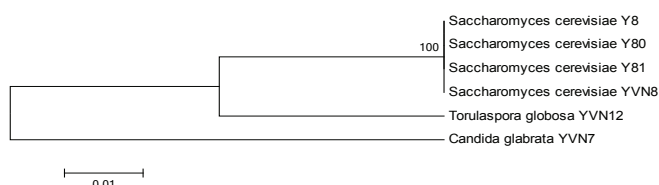
Định danh các chủng nấm men đã được tuyển chọn

Các chủng Y8, Y80, Y81, YVN7, YVN12 và YVN8 được tuyển chọn do có khả năng lên men ethanol cao ở 37°C được giải trình tự vùng D1/D2 trên 26S rDNA với cặp môi NL-1 và NL-4. Kết quả so sánh mức độ tương đồng trình tự DNA trong ngân hàng gene trên NCBI cho thấy 4 chủng Y8, Y80, Y81 và YVN8 thuộc *S. cerevisiae*, chủng YVN7 thuộc *Candida glabrata* và chủng YVN12 thuộc *Torulaspora globosa* với mức độ tương đồng so sánh BLAST trên cơ sở dữ liệu đạt 99-100% (bảng 3).

Bảng 3. Kết quả định danh các chủng nấm men chịu nhiệt tuyển chọn.

Chủng nấm men	Tên loài	Độ tương đồng (%)	Mã số
Y8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100	KR063021.1
Y80	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100	KR063021.1
Y81	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100	KR063021.1
YVN7	<i>Candida glabrata</i>	99	KJ624034
YVN8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	JF715188.1
YVN12	<i>Torulaspora globosa</i>	99	U72166.1

Trình tự DNA các chủng nấm men phân lập được sử dụng để vẽ cây phân loại gene 26S rDNA bằng chương trình MEGA 6 (theo thông số neighbor - joining) với độ tin cậy của nhánh phả hệ thông qua chỉ số bootstrap 1.000 (hình 2). Cây phân loại được xây dựng phù hợp với kết quả định danh của 6 chủng nấm men chịu nhiệt. Bốn chủng *S. cerevisiae* Y8, Y80, Y81 và YVN8 cùng loài và có chỉ số bootstrap lên đến 100%, bốn chủng này có mối quan hệ gần với chủng *T. globosa* YVN12 hơn so với chủng *C. glabrata* YVN7.



Hình 2. Cây phân loại di truyền của 6 chủng nấm men tuyển chọn.

Điều kiện lên men thích hợp của nấm men chịu nhiệt

Kết quả khảo sát các điều kiện thích hợp cho quá trình lên men ethanol từ rỉ đường (bảng 4) cho thấy nghiệm thức 14 (6 ngày - 25°Brix - 10⁶ tế bào/ml), nghiệm thức 15 (6 ngày - 25°Brix - 10⁷ tế bào/ml) và nghiệm thức 27 (7 ngày - 30°Brix - 10⁷ tế bào/ml) lên men tạo ethanol cao nhất, lần lượt là 6,80%, 7,14% và 6,90% (v/v).

Các nghiệm thức 9, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 23 và 26 đều có hiệu suất lên men khá cao (79,03-90,58%), khác biệt không ý nghĩa về mặt thống kê. Trong đó ở nghiệm thức 14 và 15 lần lượt là 87,43% và 90,58%, khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy 95% so với các nghiệm thức còn lại (trừ nghiệm thức 9, 10, 13, 16, 17, 23 và 26). Nghiệm thức 14 và 15 cũng cho kết quả hàm lượng ethanol cao nhất, lần lượt là 6,80% (v/v) và 7,14% (v/v). Các nghiệm thức 1, 10 và 19 có hàm lượng ethanol khá thấp, lần lượt là 2,94%, 3,09% và 3,10% (v/v), khác biệt có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95% so với các nghiệm thức còn lại.

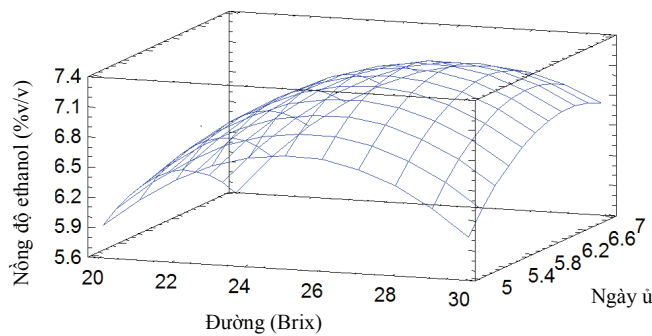
Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ đường, thời gian lên men và mật số nấm men đến hàm lượng ethanol và hiệu suất lên men.

Nghiệm thức	Ngày-Brix -Mật số giống	Brix sau lên men	Đường sử dụng (g)	Hàm lượng ethanol (% v/v)	Hiệu suất (%)
1	5-20-10 ⁵	17,0	85,66	2,94 ¹	52,85 ^{hij}
2	5-20-10 ⁶	14,3	92,64	4,07 ^{kl}	67,22 ^{efg}
3	5-20-10 ⁷	13,1	124,60	6,17 ^{bcdef}	76,56 ^{bcdef}
4	5-25-10 ⁵	20,0	103,64	4,31 ^{jk}	64,49 ^{fgh}
5	5-25-10 ⁶	18,7	109,47	5,24 ^{efghij}	74,12 ^{cdefg}
6	5-25-10 ⁷	18,0	146,73	6,51 ^{bcd}	68,47 ^{defg}
7	5-30-10 ⁵	24,9	118,65	3,99 ^{kl}	51,73 ^{ij}
8	5-30-10 ⁶	22,8	114,13	5,64 ^{cdefghi}	76,35 ^{bcdef}
9	5-30-10 ⁷	22,0	114,90	6,00 ^{bcdef}	80,57 ^{abcd}
10	6-20-10 ⁵	15,5	56,93	3,09 ^j	83,99 ^{abc}
11	6-20-10 ⁶	13,9	106,49	4,30 ^{jk}	62,39 ^{ghi}
12	6-20-10 ⁷	12,5	127,6	6,24 ^{bcd}	75,89 ^{bcdef}
13	6-25-10 ⁵	19,9	96,01	5,01 ^{fghijk}	80,67 ^{abcd}
14	6-25-10 ⁶	18,5	119,94	6,80 ^{abc}	87,43 ^{ab}
15	6-25-10 ⁷	16,7	131,85	7,14 ^a	90,58 ^a
16	6-30-10 ⁵	23,6	80,22	4,33 ^{jk}	83,17 ^{abc}
17	6-30-10 ⁶	22,4	114,64	5,95 ^{bcdefg}	79,96 ^{abcd}
18	6-30-10 ⁷	21,4	138,71	6,36 ^{bcd}	70,79 ^{defg}
19	7-20-10 ⁵	16,3	101,45	3,10 ^j	46,44 ^j
20	7-20-10 ⁶	14,1	101,32	4,81 ^{ghijk}	72,89 ^{cdefg}
21	7-20-10 ⁷	13,2	114,90	5,72 ^{cdefgh}	76,74 ^{bcdef}
22	7-25-10 ⁵	20,0	97,05	4,54 ^{ijk}	72,32 ^{cdefg}
23	7-25-10 ⁶	18,4	109,34	5,60 ^{defghi}	79,03 ^{abcde}
24	7-25-10 ⁷	17,7	131,98	6,37 ^{bcd}	74,47 ^{cdefg}
25	7-30-10 ⁵	24,0	97,05	4,72 ^{hijk}	74,82 ^{cdef}
26	7-30-10 ⁶	22,4	107,40	6,30 ^{bcd}	90,42 ^a
27	7-30-10 ⁷	21,9	137,93	6,90 ^{ab}	77,13 ^{bcde}

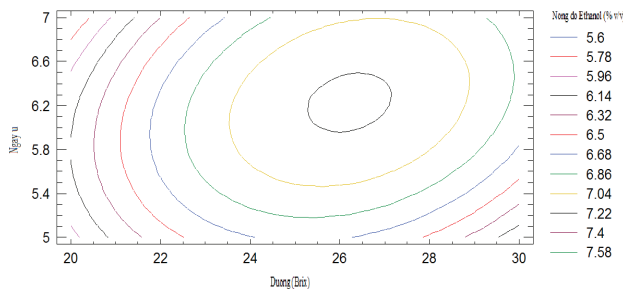
Kết quả phân tích hồi quy bằng phần mềm thống kê Statgraphics centurion XV (độ tin cậy 95%) xác định được các điều kiện thích hợp theo phương trình như sau:

$$\begin{aligned} \text{Nồng độ ethanol} = & -66,176 + 2,41094 \cdot \text{Duong} \\ & + 7,94083 \cdot \text{Mat so} + 7,18361 \cdot \text{Ngay} - \\ & 0,0302444 \cdot \text{Duong} \cdot \text{Duong} - 0,162667 \cdot \text{Duong} \cdot \text{Mat so} \\ & - 0,0853333 \cdot \text{Duong} \cdot \text{Ngay} - 0,186944 \cdot \text{Mat so} \cdot \text{Mat so} \\ & - 0,552708 \cdot \text{Mat so} \cdot \text{Ngay} - 0,371944 \cdot \text{Ngay} \cdot \text{Ngay} + \\ & 0,019375 \cdot \text{Ngay} \cdot \text{Mat so} \cdot \text{Duong}. \end{aligned}$$

Biểu đồ mặt đáp ứng và biểu đồ đường mức thể hiện sự tương quan giữa nồng độ đường và thời gian lên men được thể hiện ở hình 3 và hình 4. Kết quả điều kiện lên men ethanol từ rỉ đường của chủng *S. cerevisiae* Y81 được xác định từ phương trình hồi quy là 26,21°Brix, mật số giống chủng 10⁷ tế bào/ml và 6 ngày lên men.



Hình 3. Biểu đồ mặt đáp ứng tương quan giữa nồng độ đường và thời gian lên men.



Hình 4. Biểu đồ đường mức sự tương quan giữa nồng độ đường và thời gian lên men.

Kết quả lên men 1 l dịch ri đường với các điều kiện thích hợp được xác định là: Dịch sau lên men có pH 4,43, 18,0°Brix, lượng đường sử dụng 142,98 g/l, hàm lượng ethanol 7,36% (v/v) và hiệu suất lên men đạt 92,38%.

Thảo luận

Sau quá trình lên men, pH có sự biến động không đáng kể nhưng độ Brix ở tất cả các chủng nấm men đều giảm so với ban đầu (bảng 1). Trong quá trình lên men, đường và các chất dinh dưỡng sẽ được hấp thu vào tế bào nấm men, ở đó các enzyme sẽ tác dụng qua nhiều trung gian rồi cuối cùng tạo thành sản phẩm chính là rượu và khí CO₂ [8]. Sự chênh lệch về độ Brix trước và sau lên men cũng thể hiện khả năng hoạt động của nấm men. Brix chênh lệch càng cao, lượng CO₂ và cồn tạo ra càng nhiều, nấm men hoạt động càng mạnh. Kết quả cho thấy các chủng Y81, YVN12, Y80, YVN7, YVN8 và *K. marxianus* lên men tạo ethanol (lần lượt là 6,40; 6,10; 5,98; 5,40; 5,80; 3,77% v/v) và đạt hiệu suất (59%, 56,93%, 55,83%, 50,81%, 52,95%, 41,49%), cao hơn và có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê so với các chủng còn lại.

Kết quả ở bảng 2 và hình 1 cho thấy, trong môi trường cơ chất ri đường ở nhiệt độ 40°C các chủng nấm men hoạt động yếu đi, lên men tạo cồn thấp so với ở 37°C, trừ chủng *K. marxianus*. Nhiệt độ là yếu tố ảnh hưởng lớn đến sự tạo ethanol của nấm men. Khi nhiệt độ tăng cao thì lượng

ethanol tích lũy nội bào trong nấm men tăng cao, làm ngưng trệ sự phát triển của nấm men nên lượng cồn tạo ra sẽ thấp. Theo Edgardo, et al. (2008) [9], chủng nấm men *Kluyveromyces* có khả năng chịu nhiệt cao hơn các chủng nấm men khác như *Saccharomyces* hay *Candida*, nhưng lại kém hơn trong khả năng lên men sinh ethanol.

Kết quả thống kê cho thấy các chủng nấm men *K. marxianus*, YVN7, YVN12 và Y81 vẫn có khả năng sinh trưởng và tạo ethanol ở 40°C, hàm lượng ethanol cao hơn và khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với các chủng còn lại ở độ tin cậy 95% (bảng 3). Trong đó, hiệu suất lên men ở 40°C của chủng Y81 là 68,53%, khác biệt không có ý nghĩa so với chủng YVN7 (69,06%) và chủng *K. marxianus* (69,08%), nhưng lại sử dụng lượng đường ít hơn, chỉ 71,25 g so với chủng YVN7 (83,59 g) và *K. marxianus* (88,67 g), vì thế khả năng chuyển hóa của chủng Y81 là tốt hơn.

Sáu chủng nấm men chịu nhiệt tuyển chọn được định danh là *S. cerevisiae*, *T. globosa* và *C. glarata*, đây là các chủng nấm men có khả năng chịu nhiệt và lên men khá tốt trong các nghiên cứu về nấm men chịu nhiệt và lên men ethanol. *T. globosa* có thể phát triển và lên men ở nhiệt độ từ 30-40°C. *T. globosa* BM3 có khả năng chịu ethanol đến 15% (v/v) và phát triển ở 40°C [10]. Sree, et al. (2000) [11] đã phân lập 4 chủng nấm men *S. cerevisiae* từ đất ở Ấn Độ có khả năng sinh trưởng ở nhiệt độ đến 44°C. Chủng *S. cerevisiae* M30 có khả năng lên men trong môi trường ri đường và dịch ép nước mía trong khoảng nhiệt độ 33-45°C [12].

Kết quả thử nghiệm điều kiện thích hợp cho thấy nghiệm thức 25°Brix sau lên men tạo ra hàm lượng ethanol tương đối cao hơn so với hai nghiệm thức còn lại trong 5 và 6 ngày (bảng 4). Ở ngày lên men thứ 7, các nghiệm thức 30°Brix có phần cao hơn. Theo [8], ở độ Brix quá thấp gây ảnh hưởng đến khả năng lên men của nấm men, giảm năng suất của thiết bị. Nhưng nếu Brix quá cao thì sẽ làm tăng áp suất thẩm thấu gây ảnh hưởng đến khả năng hấp thu, chuyển hóa và thay đổi cân bằng sinh lý của nấm men. Về mật số giống chủng, có sự khác biệt khá rõ ràng về độ cồn tạo ra giữa các mật số. Trong đó, mật số 10⁷ tế bào/ml tạo ra cồn cao hơn hẳn so với mật số 10⁶ và 10⁵ tế bào/ml. Kết quả từ phương trình hồi quy cho thấy điều kiện thích hợp trong lên men ethanol trên cơ chất ri đường của chủng *S. cerevisiae* Y81 với hàm lượng đường 186 g/l, mật số giống men chủng 10⁷ tế bào/ml và lên men trong 6 ngày, hàm lượng ethanol theo lý thuyết đạt 7,25% (v/v).

Kết quả thử nghiệm với 1 l dịch ri đường cho thấy, hàm lượng ethanol đạt cao hơn so với độ cồn lý thuyết của phương trình tối ưu (7,25% v/v) cũng như từ thực nghiệm

(7,14%, nghiệm thức 15, bảng 4) và hiệu suất lên men đạt 92,38%. Hàm lượng ethanol thu được với hàm lượng ethanol từ phương trình lý thuyết không có sự chênh lệch đáng kể (7,36% so với lý thuyết là 7,25% v/v). *S. cerevisiae* có khả năng lên men đạt 7,4-7,7% (v/v) khi lên men ri đường trong điều kiện nhiệt độ môi trường khoảng 30-32°C và có khả năng phát triển đến 40-44°C [13, 14].

Kết luận

Sáu chủng nấm men chịu nhiệt được tuyển chọn do lên men tốt ở 37°C với hàm lượng ethanol đạt được 5,54-6,40% (v/v), trong đó chủng Y81 có hàm lượng ethanol cao nhất ở 37°C và 40°C lần lượt đạt 6,40% và 3,17% (v/v). Sáu chủng nấm men được xác định thuộc các loài *S. cerevisiae*, *C. glabrata* và *T. globosa*. Điều kiện lên men ethanol từ ri đường của chủng *S. cerevisiae* Y81 ở 37°C được xác định là: Hàm lượng đường ban đầu 186 g/l (26,21°Brix), mật số giống chủng 10^7 tế bào/ml, lên men 6 ngày, hàm lượng ethanol đạt 7,36% (v/v). Thử nghiệm lên men với 1 l dịch ri đường trong các điều kiện thích hợp cho thấy tiềm năng ứng dụng chủng nấm men chịu nhiệt trong lên men ethanol ở nhiệt độ cao từ nguồn nguyên liệu phụ phẩm như ri đường.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài Nghị định thư của Bộ Khoa học và Công nghệ (09/2014/HĐ-NĐT) và một phần hỗ trợ từ đề tài nghiên cứu trong Chương trình công nghệ sinh học tiên tiến của Trường Đại học Cần Thơ và Chương trình CCP (Core-to-Core Program, 2014-2019).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Brooks (2008), "Ethanol production potential of local yeast strains isolated from ripe banana peels", *African Journal of Biotechnology*, **7**, pp.3749-3752.
- [2] Dung Ngo Thi Phuong, Huynh Xuan Phong, Pornthap Thanonkeo, Preekamol Klanrit, Toshiharu Yakushi, Kazunobu Matsushita, Mamoru Yamada (2015), "The diversified collection of thermotolerant microorganisms isolated in Vietnam for fermentation of ethanol, acetic acid and lactic acid", *International*

Symposium on Microbial Research and Biotechnology for Biomass Utilization, p.27. JR Hakata City, Fukuoka, Japan.

- [3] S. Limtong, C. Srirang, W. Yongmanitchai (2007), "Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*", *Bioresources Technology*, **98**, pp.3367-3374.
- [4] K. O'Donnell (1993), "Fusarium and its near relatives. In D.R. Reynolds & J.W. Taylor (Eds.), *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*, pp.225-233.
- [5] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipinski, S. Kumar (2013), "MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0", *Molecular Biology and Evolution*, **30**(12), pp.2725-2729.
- [6] Nguyễn Hữu Tường, Phạm Hồng Quang, Ngô Thị Phương Dung, Huỳnh Xuân Phong, Nguyễn Minh Đồi (2013), "Thử nghiệm lên men ethanol ở nhiệt độ cao bằng nấm men chịu nhiệt", *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, **27**, tr.17-23.
- [7] C. Bennett (1971), "Spectrophotometric acid dichromate method for the determination of ethyl alcohol", *The American Journal of Medical Technology*, **37**(6), p.217.
- [8] Nguyễn Đình Thường, Nguyễn Thanh Hằng (2005), *Công nghệ sản xuất và kiểm tra cồn etylic*, Nxb Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- [9] A. Edgardo, P. Carolina, R. Manuela, F. Juanita, B. Jaimea (2008), "Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production", *Enzyme and Microbial Technology*, **43**, pp.120-123.
- [10] N.T.P. Dung, P. Thanonkeo, H.X. Phong (2012), "Screening useful isolated yeasts for ethanol fermentation at high temperature", *International Journal of Applied Science and Technology*, **2**(4), pp.65-71.
- [11] N.K. Sree, M. Sridhar, K. Suresh, I.M. Banat, L. Venkateswar Rao (2000), "Isolation of thermotolerant, osmotolerant, flocculating *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production", *Bioresource Technology*, **72**(1), pp.43-46.
- [12] A. Eiadpum, S. Limtong, M. Phisalaphong (2012), "High-temperature ethanol fermentation by immobilized coculture of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **114**(3), pp.325-329.
- [13] N.K. Sree, M. Sridhar, L.V. Rao, A. Pandey (1999), "Ethanol production in solid substrate fermentation using thermotolerant yeast", *Process Biochemistry*, **34**, pp.115-119.
- [14] W.R. Abdel-Fattah, M. Fadil, P. Nigam, I.M. Banat (2000), "Isolation of thermotolerant ethanologenic yeast and use of selected strains in industrial scale fermentation in an Egyptian distillery", *Biotechnology Bioengineering*, **68**(7), pp.531-535.