ISSN: 1859-2171
e-ISSN: 2615-9562
TNU Journal of Science and Technology
202(09): 185 - 192

LÊN MEN ETHANOL TỪ DỊCH ÉP MÍA SỬ DỤNG NẤM MEN CHỊU NHIỆT

Huỳnh Xuân Phong*, Hà Phú Quý, Nguyễn Ngọc Thạnh,
Bùi Hoàng Đăng Long, Ngô Thị Phương Dung
Viện Nghiên cứu và phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

TÓM TẮT

Việc sử dụng nấm men chịu nhiệt trong sản xuất ethanol là một hướng đi có tiềm năng lớn với các nước có điều kiện khí hậu nhiệt đới như Việt Nam. Trong nghiên cứu này, 23 dòng nấm men được thử khả năng lên men ethanol từ dịch ép mía ở 37 °C và 40 °C. Tối ưu hóa điều kiện lên men được thực hiện với mật số giống chủng (10^5, 10^6 và 10^7 tế bào/mL), hàm lượng đường ban đầu (150, 200 và 250 g/L) và thời gian lên men (5, 6 và 7 ngày). Kết quả thử nghiệm lên men ở 37 °C đã tuyển chọn được 10 chủng nấm men với hàm lượng ethanol sinh ra trong khoảng 10,03-10,57% (v/v), trong đó chủng Y8 có hiệu suất lên men cao nhất, đạt 92,62%. Kết quả thử nghiệm lên men ở 40 °C với chủng Y8 cho thấy hàm lượng ethanol sinh ra và hiệu suất lên men cao nhất lần lượt là 5,74% (v/v) và 71,47%. Kết quả định danh xác định chủng Y8, Y31, Y32, Y33, Y34, Y35 và Y42 là *Saccharomyces cerevisiae*, chủng Y39 là *Candida tropicalis*, chủng YVN7 là *C. glabrata* và chủng YVN12 là *Torulaspora globosa*. Trong đó, chủng *S. cerevisiae* Y8 thích hợp nhất để sản xuất ethanol với điều kiện lên men từ dịch ép mía ở 37 °C, nồng độ giống 10^7 tế bào/mL, hàm lượng đường ban đầu 248,2 g/L và thời gian lên men 6 ngày, hàm lượng ethanol đạt 10,58% (v/v).
Từ khóa: *Lên men ethanol, nấm men chịu nhiệt, dịch ép mía, Saccharomyces cerevisiae, tối ưu hóa.*

Ngày nhận bài: 27/6/2019; Ngày hoàn thiện: 21/7/2019; Ngày đăng: 27/7/2019

ETHANOL PRODUCTION FROM SUGAR-CANE JUICE BY USING THERMOTOLERANT YEASTS

Huynh Xuan Phong*, Ha Phu Quy, Nguyen Ngoc Thanh,
Bui Hoang Dang Long, Ngo Thi Phuong Dung
Biotechnology Research and Development Institute, Can Tho University

ABSTRACT

Using thermotolerant yeasts for ethanol fermentation is a potential orientation in tropical countries as Vietnam. In this study, 23 yeast strains were tested for ethanol fermentation ability at 37 °C and 40 °C in sugarcane juice. The fermentation conditions were set up in a factorial design (three factors) at three levels: yeast inoculum (10^5, 10^6 and 10^7 cells/mL), initial sugar concentration (150, 200 and 250 g/L) and fermentation time (5, 6 and 7 days). The results showed that 10 yeast isolates were able to produce ethanol with high concentrations (10.03-10.57% v/v) at 37 °C. Of which, strain Y8 got the highest efficiency (92.62%). At 40 °C, strain Y8 got the highest produced ethanol concentration and efficiency, 5.74% (v/v) and 71.47%, respectively. Yeast strains were identified as follows: 7 strains (Y8, Y31, Y32, Y33, Y34, Y35, Y42) as *Saccharomyces cerevisiae*, Y39 as *Candida tropicalis*, YVN7 as *C. glabrata*, and YVN12 as *Torulaspora globosa*. The optimized conditions for ethanol production from sugarcane juice at 37 °C by using *S. cerevisiae* Y8 were determined: inoculum level of 10^7 cells/mL, initial sugar concentration of 248.2 g/L, and 6 days of fermentation, the ethanol concentration was obtained at 10.58% (v/v).
Keywords: *Ethanol fermentation, thermotolerant yeast, sugarcane juice, S. cerevisiae, optimization*

Received: 27/6/2019; Revised: 21/7/2019; Published: 27/7/2019

* Corresponding author. *Email: hxphong@ctu.edu.vn*

1. Giới thiệu

Ethanol không chỉ sử dụng chủ yếu cho sản xuất hay sử dụng trong y tế, mà còn cho sản xuất chất màu sơn và các ngành công nghiệp hóa chất khác. Trong thế kỷ 19, ngành thương mại này đã trở thành một ngành công nghiệp với sản lượng rất lớn, do những lợi ích kinh tế trong cải tiến của quá trình chưng cất. Ngày nay, ethanol là một hóa chất công nghiệp quan trọng có tiềm năng như một nguồn nhiên liệu sinh học để thay thế cho nguyên liệu hóa thạch [1, 2]. Hầu hết các nước phát triển và một số nước đang phát triển đã sử dụng ethanol sinh học để thay thế một phần cho xăng. Lý do của tình trạng này là do sự suy giảm dự trữ dầu, chi phí cho nguyên liệu hóa thạch tăng cao cùng những vấn đề về môi trường [3].

Sản xuất ethanol thường được lên men bằng nấm men từ các nguồn nguyên liệu nông nghiệp. Khả năng chịu đựng của nấm men trong điều kiện nhiệt độ và độ ethanol cao trong quá trình lên men đang trở thành một đặc điểm ngày càng quan trọng thu hút nhiều nhà nghiên cứu với nhiều lợi ích có thể được khai thác thông qua việc sử dụng các chủng nấm men chịu nhiệt để sản xuất ethanol [4-6]. Chi phí làm mát trong quá trình sản xuất ethanol rất tốn kém, do đó bằng cách sử dụng nấm men chịu nhiệt, chi phí cho quá trình làm mát sẽ được giảm xuống [5, 7]. Bên cạnh đó, quá trình biến đổi khí hậu, nóng lên toàn cầu thúc đẩy việc tìm kiếm các chủng vi sinh vật có khả năng chịu nhiệt để ứng phó với sự thay đổi này [6, 8]. Nhiệt độ thích hợp cho quá trình lên men ethanol sử dụng nấm men trong khoảng 25-30 ^{o}C [4, 5]. Tuy nhiên, với xu hướng gia tăng nhiệt độ toàn cầu hiện nay cũng như nhiệt độ ở Việt Nam vào mùa hè thường gia tăng đến khoảng 35-37 ^{o}C, thậm chí là 40 ^{o}C. Do đó, việc tuyển chọn và ứng dụng các chủng nấm men chịu nhiệt sẽ giúp duy trì ổn định quá trình lên men trong những khoảng thời gian nhiệt độ gia tăng, đặc biệt là vào mùa hè, mà không cần tốn nhiều chi phí để làm mát.

Ethanol có nguồn gốc đường thường được sản xuất từ mía, củ cải đường, lúa miến ngọt,… Theo Goldemberg [9], mía là một trong những nguyên liệu được sử dụng nhiều nhất trong sản xuất ethanol chủ yếu ở Brazil. Ở một số nước có ngành công nghiệp mía đường như Brazil, Ấn Độ và Thái Lan, sản lượng mía thô có thể đạt trên 77 tấn/ha và sản lượng mía thành phẩm (đã loại bỏ lá) đạt trên 58 tấn/ha. Cũng tại các quốc gia này, mỗi hecta mía đượng có thể sản xuất 4.000 lít ethanol mỗi năm [10]. Tại Việt Nam, diện tích mía cả nước là 298.200 ha với năng suất mía bình quân đạt 63,9 tấn/ha. Phần lớn nguồn nguyên liệu mía ở nước ta sử dụng để sản xuất đường, tuy nhu cầu tiêu thụ là rất lớn nhưng trong những năm gần đây nguồn mía cho sản xuất đường đang có dấu hiệu bão hòa, giá mía trong nước tụt giảm khiến cho hàng ngàn tấn mía ứ đọng mỗi năm. Do đó, nếu có thể tận dụng được nguồn nguyên liệu này cho việc sản xuất ethanol sinh học thì sẽ tạo ra một lợi thế rất lớn trong việc sản xuất nguyên liệu thay thế. Mục tiêu của nghiên cứu nhằm tuyển chọn các chủng nấm men chịu nhiệt triển vọng có khả năng ứng dụng lên men sản xuất ethanol từ dịch ép mía ở nhiệt độ cao.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Nguyên vật liệu và hóa chất

Dịch ép nước mía được mua tại chợ P. Trà An, Q. Bình Thủy, TP. Cần Thơ. Hai mươi ba chủng nấm men đã được phân lập và sơ tuyển dựa vào đặc tính chịu nhiệt và lên men ethanol được lưu trữ ở phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Thực phẩm, trường Đại học Cần Thơ [11] và chủng *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 [4]. Hóa chất sử dụng như yeast extract, malt extract, peptone, D-glucose, agar từ HiMedia Laboratories (Ấn Độ); ethanol và NaOH (Merck, Đức). Môi trường YPD bao gồm yeast extract 0,5%; peptone 0,5%; D-glucose 2,0%; môi trường YPD agar (môi trường YPD bổ sung 1,5 g/L agar) [4].

2.2. Thử nghiệm khả năng lên men của nấm men ở 37 ºC từ dịch ép mía

Thử nghiệm được thực hiện với mục đích đánh giá khả năng lên men của các chủng nấm men chịu nhiệt nhằm lựa chọn chủng nấm men có khả năng lên men tốt ở 37 ^{o}C. Nấm men được lấy khoảng nửa vòng kim cấy từ mẫu trữ chủng vào bình tam giác 250 mL có chứa 100 mL môi trường tăng sinh YPD đã được khử trùng ở 121 °C trong 15 phút. Ủ lắc 150 vòng/phút ở nhiệt độ phòng (28-30 ^{o}C) trong 24 giờ (mật số đạt 10^8 tế bào/mL). Dịch ép mía được thanh trùng bằng $NaHSO_3$

(140 mg/L trong 2 giờ). Điều chỉnh dịch ép mía ở 200 g/L và pH 5,5. Một mL (mật số 10^8 tế bào/mL) các chủng nấm men và chủng *K. marxianus* dịch tăng sinh vào bình tam giác 250 mL có chứa 99 mL dịch ép nước mía, đậy bằng water-lock và ủ ở 37 ^oC trong 5 ngày. Các chỉ tiêu như pH, hàm lượng đường và hàm lượng ethanol được phân tích sau khi kết thúc quá trình lên men.

2.3. Thử nghiệm khả năng lên men của nấm men ở 40 ºC từ dịch ép mía

Các chủng nấm men được tuyển chọn từ thử nghiệm lên men ở 37 °C được tiếp tục đánh giá khả năng lên men ở 40 °C với mục tiêu tuyển chọn chủng nấm men có thể duy trì khả năng lên men tốt nhất. Môi trường được chuẩn bị, các bước thực hiện và chỉ tiêu theo dõi tương tự như thử nghiệm ở 37 °C với 3 lần lặp lại.

2.4. Định danh các chủng nấm men chịu nhiệt được tuyển chọn

Các chủng nấm men chịu nhiệt tuyển chọn được tăng sinh trong 10 mL môi trường YPD ở 37 °C trong 24 giờ. Nấm men được trích DNA và để khuếch đại trình tự vùng D1/D2 trên 26S rDNA với cặp mồi NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') và NL-4 (5'-GGTCCGTG TTTCAAGACGG-3') bằng phản ứng PCR [12]. Sản phẩm PCR được giải trình tự sử dụng hệ thống giải trình tự ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, California, USA) tại Trường Đại học Yamaguchi (Nhật Bản). 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 neigbor-joining trong chương trình MEGA 6 với chỉ số bootstrap 1.000 lần lặp lại [13].

2.5. Tối ưu hóa điều kiện lên men ethanol bằng nấm men chịu nhiệt

Chủng nấm men có khả năng lên men mạnh nhất từ các thí nghiệm trên được tuyển chọn sử dụng trong thử nghiệm này. Nuôi nấm men trong môi trường tăng sinh YDP, ly tâm dịch tăng sinh, và mật số nấm men sau khi chủng vào bình tam giác lần lượt là 10^7, 10^6 và 10^5 tế bào/mL). Thí nghiệm được thực hiện với 100 mL dịch ép mía lên men ở 37 ^oC với 3 nhân tố: nồng độ giống (10^5, 10^6 và 10^7 tb/mL), hàm lượng đường (150, 200 và 250 g/Lvà thời gian lên men (5, 6 và 7 ngày).

2.6. Phân tích và xử lý kết quả

Giá trị pH được xác định bằng pH kế (Sartorius, PB-20, Đức), 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 [14] và hàm lượng ethanol được xác định bằng phương pháp chưng cất [15]. Hiệu suất lên men được tính dựa trên tỷ lệ hàm lượng ethanol thực tế thu được so với ethanol lý thuyết được tính theo lượng đường tiêu thụ [4]. Kết quả được xử lý và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA). Số liệu được xử lý thống kê bằng chương trình Statgraphics Centurion XV ver 15.1.02 (Statpoint Technologies, Inc., USA).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Khả năng lên men ở 37 °C của nấm men từ dịch ép mía

Kết quả sau lên men cho thấy sự giảm thấp của pH về mức 3,11-3,73 so với pH ban đầu là 5,5 (Bảng 1). Nguyên nhân chính khiến độ pH giảm là do sự hình thành của các sản phẩm phụ trong quá trình lên men như CO_2 và các acid hữu cơ. Hàm lượng ethanol đạt được sau 5 ngày lên men trong khoảng 2,20-10,57% (v/v) và hiệu suất lên men đạt 59,61-92,62%. Hàm lượng đường tiêu thụ trong khoảng 55,72-192,45 g. Tuy nhiên, phần lớn chủng nấm men tuyển chọn cho thấy sự tương thích cao với môi trường dịch ép mía với 10 chủng Y8, Y31, Y32, Y33, Y34, Y35, Y39, Y42, YVN7 và YVN12 cho độ cồn trên 10% (v/v), trong khoảng 10,03-10,57 g/L với hiệu suất lên men đạt 83,06 - 92,62%. Trong đó, 3 chủng Y8, Y31 và YVN12 có lượng ethanol cao nhất lần lượt là 10,37, 10,57 và 10,36% (v/v), với hiệu suất lần lượt là 92,62, 85,53 và 83,06%.

Dựa theo kết quả thống kê về độ rượu về hiệu suất lên men chọn được 10 chủng nấm men Y8, Y31, Y32, Y33, Y34, Y35, Y39, Y42, YVN7 và YVN12 cho khả năng lên men ethanol tốt nhất từ 10,03-10,57% (v/v) để thử nghiệm lên men dịch nước ép mía ở 40 ^oC.

3.2. Khả năng lên men ở 40 ^oC của nấm men từ dịch ép mía

Mười chủng nấm men có khả năng lên men sinh ethanol cao ở 37 ^oC (Y8, Y31, Y32, Y33,

Y34, Y35, Y39, Y42, YVN7 và YVN12) được tuyển chọn sử dụng cho lên men ethanol từ dịch ép mía ở 40 ^{o}C. Kết quả sau 5 ngày lên men được thể hiện trong Bảng 2. Kết quả cho thấy tất cả 10 chủng nấm men tuyển chọn đều có khả năng sinh ethanol ở 40 ^{o}C từ dịch ép mía. Hàm lượng ethanol đạt được trong khoảng 2,21-5,74% (v/v) với hiệu suất lên men đạt 54,18-71,47 tương ứng với lượng đường tiêu thụ trong khoảng 56,41-123,78 g. Trong đó, chủng Y8 có nồng độ ethanol cao nhất đạt 5,74% (v/v) và có hiệu suất lên men cao nhất, đạt 71,47%, khác biệt có ý nghĩa so với các chủng còn lại.

Bảng 1. *Kết quả lên men của nấm men từ dịch ép mía ở 37 ^{o}C*

STT	Chủng	pH sau lên men	Đường sử dụng (g/L)	Ethanol (% v/v)	Hiệu suất lên men (%)
1	Y8	3,42$^{c\ 1}$	172,69^{e}	10,37^{a}	92,62^{a}
2	Y29	3,39^{c}	96,35^{gh}	4,77^{ef}	76,49^{fg}
3	Y31	3,66^{ab}	190,55^{ab}	10,57^{a}	85,53^{abcde}
4	Y32	3,65^{ab}	186,23^{abc}	10,29^{ab}	85,24^{abcde}
5	Y33	3,67^{ab}	179,59^{cde}	10,12^{ab}	86,96^{abcd}
6	Y34	3,65^{ab}	178,73^{cde}	10,29^{ab}	88,81^{abc}
7	Y35	3,71^{ab}	180,80^{bcde}	10,10^{ab}	86,17^{abcde}
8	Y37	3,16^{def}	66,77^{j}	2,28^{hi}	65,11^{i}
9	Y38	3,11^{f}	82,55^{i}	3,60^{gh}	67,33^{hi}
10	Y39	3,68^{ab}	177,95^{cde}	10,22^{ab}	88,72^{abc}
11	Y42	3,73^{a}	183,65^{abcd}	10,03^{ab}	84,25^{bcdef}
12	Y47	3,14^{f}	73,84^{ij}	2,85^{hi}	59,61^{i}
13	Y53	3,14^{f}	66,18^{j}	2,77^{hi}	61,85^{i}
14	Y54	3,26^{d}	122,83^{f}	6,32^{c}	79,41^{defg}
15	Y80	3,15^{ef}	98,59^{gh}	5,01^{de}	78,247^{efg}
16	Y81	3,19^{def}	103,34^{g}	5,42^{de}	80,86^{cdefg}
17	Y88	3,25^{de}	92,64^{h}	4,93^{e}	81,34^{cdefg}
18	Y104	3,15^{ef}	55,72^{k}	2,20^{i}	60,80^{i}
19	YVN3	3,66^{ab}	175,71^{de}	9,47^{b}	83,18^{cdefg}
20	YVN7	3,66^{ab}	187,70^{abc}	10,34^{ab}	84,94^{abcde}
21	YVN8	3,25^{d}	97,73^{gh}	5,84^{cd}	92,55^{ab}
22	YVN12	3,67^{ab}	192,45^{a}	10,36^{a}	83,06^{cdefg}
23	YVN30	3,61^{b}	179,25^{cde}	9,81^{ab}	84,35^{abcdef}
24	*K. mar* ^{2}	3,19^{def}	81,34^{i}	3,98^{fg}	75,39^{gh}
CV%		7,12	17,27	14,19	13,26

^{1} Giá 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 5% (P<0,05). ^{2} Kluyveromyces marxianus

Bảng 2. *Kết quả lên men ở 40 ^{o}C của nấm men từ dịch ép mía*

STT	Chủng	pH sau lên men	Đường sử dụng (g/L)	Ethanol (% v/v)	Hiệu suất lên men (%)
1	Y8	3,94$^{ab\ 1}$	123,78^{a}	5,74^{a}	71,47^{a}
2	Y31	3,93^{abc}	56,41^{d}	2,21^{g}	60,66^{cd}
3	Y32	3,90^{bcd}	77,63^{c}	3,15^{cd}	62,53^{bc}
4	Y33	3,98^{a}	57,88^{d}	2,39^{fg}	63,69^{bc}
5	Y34	3,53^{f}	77,63^{c}	2,73^{def}	54,18^{d}
6	Y35	3,87^{cde}	65,23^{d}	2,62^{efg}	62,06^{bc}
7	Y39	3,88^{bcde}	80,65^{c}	3,01^{cde}	57,95^{cd}
8	Y42	3,83^{e}	65,23^{d}	2,37^{fg}	56,05^{cd}
9	YVN7	3,83^{e}	84,71^{c}	3,31^{c}	60,00^{cd}
10	YVN12	3,85^{de}	107,65^{b}	4,83^{b}	69,31^{ab}
11	*K. mar* ^{2}	3,85^{de}	83,67^{c}	3,43^{c}	63,35^{bc}
CV%		3,08%	15,55%	23,61	10,14

^{1} Giá trị trong bảng là 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 5% (P<0,05). ^{2} Kluyveromyces marxianus

Kết quả khả năng lên men ở 37 ^{o}C và 40 ^{o}C cho thấy hàm lượng ethanol của 10 chủng nấm men thử nghiệm đều giảm khi tăng nhiệt độ từ 37 ^{o}C lên 40 ^{o}C. Trong đó, chủng Y8 giảm ít nhất, từ 10,37% xuống 5,74% (giảm 4,63% v/v), chủng Y31 giảm mạnh nhất, từ 10,57% xuống 2,21% (giảm 8,36% v/v). Chủng nấm men chịu nhiệt *K. marxianus* có sự thay đổi không đáng kể về hàm lượng ethanol, từ 3,98% ở 37 ^{o}C giảm xuống 3,43% ở 40 ^{o}C (giảm 0,55% v/v). Thử nghiệm ở 40 ^{o}C cho thấy hàm lượng ethanol của chủng *K. marxianus* cao hơn độ cồn của 8/10 chủng được thử nghiệm, trong khi trước đó lượng ethanol của *K. marxianus* thấp hơn lượng ethanol của 18/23 chủng được thử nghiệm ở 40 ^{o}C. Nguyên nhân của sự khác biệt này là do các chủng nấm men *Kluyveromyces* có khả năng chịu nhiệt cao hơn so với các chủng nấm men khác như *Saccharomyces* hay *Candida*, nhưng lại kém hơn trong khả năng sinh cũng như chịu ethanol [16].

Hiệu suất lên men của 10 chủng được tuyển chọn thử nghiệm lên men trong môi trường dịch ép mía ở 40 ^{o}C cũng giảm mạnh so với thử nghiệm ở 37 ^{o}C. Chủng Y8 và YVN12 đạt hiệu suất lên men ở 40 ^{o}C cao nhất lần lượt đạt 71,34% và 69,31% khác biệt có ý nghĩa so với hiệu suất lên men của các chủng còn lại. Chủng YVN12 có độ giảm hiệu suất lên men ít nhất từ 83,06% ở 37 ^{o}C xuống 69,31% ở 40 ^{o}C (giảm 13,75%), chủng Y34 có độ giảm hiệu suất lên men mạnh nhất từ 88,81% ở 37 ^{o}C xuống 54,18% ở 40 ^{o}C (giảm 34,63%). Dựa vào các kết quả thử nghiệm lên men ethanol từ dịch ép mía ở 37 ^{o}C và 40 ^{o}C, chủng Y8 được tuyển chọn để tiến hành thử nghiệm các điều kiện lên men của nấm men chịu nhiệt.

3.3. Định danh nấm men tuyển chọn

Kết quả định danh và độ tương đồng so với chủng nấm men trên ngân hàng gen NCBI được thể hiện ở Bảng 3. Trong đó, 7 chủng nấm men (Y8, Y31, Y32, Y33, Y34, Y35 và Y42) thuộc loài *S. cerevisiae*. Một số chủng nấm men *Saccharomyces* spp. có khả năng phát triển và sinh ethanol ở mức nhiệt độ từ 35-42 ^{o}C [17]. Các chủng nấm men *Saccharomyces* spp. cho khả năng sinh ethanol cao hơn các chủng khác nhưng mức nhiệt độ tối ưu thường thấp và bị ức chế ở nhiệt độ cao.

Hai chủng nấm men Y39 và YVN7 thuộc chi *Candida*. Trong đó, chủng Y39 được định danh là *C. tropicalis* và chủng YVN7 được định danh là *Candida glabrata*. Chủng nấm men YVN12 được định danh là *T. globosa*. Nấm men *T. globosa* có khả năng sinh trưởng và lên men trong điều kiện nhiệt độ từ 30-40 ^{o}C [16]. Chủng nấm men Y8, Y31, Y32, Y33, Y34, Y35 và Y42 được định danh là *S. cerevisiae*, đây là chủng được ứng dụng phổ biến nhất trong lên men ethanol, gần đây cũng có nhiều nghiên cứu khả năng lên men của chủng này ở nhiệt độ 40 °C [18-20].

Quan hệ di truyền của 7 chủng nấm men được định danh được thể hiện ở Hình 1. Dựa vào sự phân nhánh trên cây phát sinh loài loài cho thấy các chủng nấm men được tuyển chọn có mối quan hệ gần với chỉ số bootstrap từ 85-100%. Nhóm các chủng *S. cerevisiae* Y8, Y33, Y35 và Y42 có mối quan hệ mật thiết với nhau, chỉ số bootstrap của các chủng trong nhóm là 99%. Nhóm này cũng có mối quan hệ gần với chủng *T. globosa* YVN12 với chỉ số bootstrap là 53%, kết này tương tự so với nghiên cứu của Kurtzman và Robnett [12].

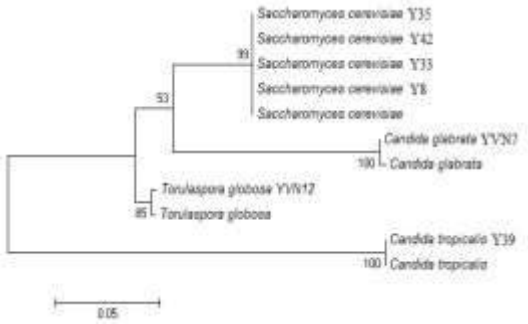
Bảng 3. *Kết quả định danh của các chủng nấm men chịu nhiệt tuyển chọn*

Chủng	Tên loài	Mức độ tương đồng	Mã số
Y8	*Saccharomyces cerevisiae*	100%	KT222662.1
Y31	*Saccharomyces cerevisiae*	96%	KC544490.1
Y32	*Saccharomyces cerevisiae*	96%	KC544490.1
Y33	*Saccharomyces cerevisiae*	100%	KT222662.1
Y34	*Saccharomyces cerevisiae*	97%	KP998094.1
Y35	*Saccharomyces cerevisiae*	100%	KT222662.1
Y39	*Candida tropicalis*	100%	KR632573.1
Y42	*Saccharomyces cerevisiae*	100%	KT222662.1
YVN7	*Candida glabrata*	100%	KJ624034.1
YVN12	*Torulaspora globosa*	99%	AB499015.1

Bảng 4. *Kết quả thử nghiệm tối ưu hóa các điều kiện lên men*

Nghiệm thức			pH sau lên men	Hàm lượng ethanol (% v/v)	Hiệu suất lên men (%)
Thời gian (ngày)	Mật số (tb/mL)	Hàm lượng đường (g/L)			
5	10^5	150	$3,3^{ghijk\ 1}$	$5,82^{o}$	$71,69^{j}$
5	10^6	150	$3,4^{ef}$	$7,70^{jk}$	$86,95^{cdefg}$
5	10^7	150	$3,58^{ab}$	$9,73^{bcde}$	$96,80^{abc}$
5	10^5	200	$3,34^{fghi}$	$6,52^{mno}$	$88,69^{abcdef}$
5	10^6	200	$3,47^{cde}$	$9,60^{cdef}$	$90,99^{abcde}$
5	10^7	200	$3,66^{a}$	$10,45^{ab}$	$94,70^{abcd}$
5	10^5	250	$3,35^{fgh}$	$6,52^{mno}$	$72,57^{ij}$
5	10^6	250	$3,47^{cde}$	$9,25^{defgh}$	$92,49^{abcd}$
5	10^7	250	$3,63^{a}$	$10,05^{abc}$	$92,97^{abcd}$
6	10^5	150	$3,19^{m}$	$6,83^{lmn}$	$77,97^{ghij}$
6	10^6	150	$3,31^{ghij}$	$8,78^{hi}$	$93,09^{abcd}$
6	10^7	150	$3,49^{cd}$	$8,94^{fghi}$	$88,98^{abcdef}$
6	10^5	200	$3,22^{klm}$	$7,32^{kl}$	$93,47^{abcd}$
6	10^6	200	$3,35^{fgh}$	$10,14^{abc}$	$98,30^{a}$
6	10^7	200	$3,54^{bc}$	$9,27^{defgh}$	$79,50^{fghij}$
6	10^5	250	$3,23^{jklm}$	$6,96^{klmn}$	$77,15^{ghij}$
6	10^6	250	$3,35^{fgh}$	$10,58^{a}$	$97,55^{ab}$
6	10^7	250	$3,53^{bc}$	$9,94^{abcd}$	$88,14^{bcdef}$
7	10^5	150	$3,26^{ijklm}$	$7,18^{klm}$	$80,36^{ghij}$
7	10^6	150	$3,37^{fg}$	$8,33^{ij}$	$86,21^{defgh}$
7	10^7	150	$3,59^{ab}$	$9,47^{cdefg}$	$92,17^{abcde}$
7	10^5	200	$3,21^{lm}$	$5,82^{o}$	$80,14^{fghij}$
7	10^6	200	$3,41^{ef}$	$9,51^{cdefg}$	$90,69^{abcde}$
7	10^7	200	$3,61^{ab}$	$9,14^{efgh}$	$79,81^{fghij}$
7	10^5	250	$3,28^{hijkl}$	$6,52^{no}$	$76,79^{hij}$
7	10^6	250	$3,41^{def}$	$8,78^{ghi}$	$82,30^{efghi}$
7	10^7	250	$3,6^{ab}$	$9,48^{cdefg}$	$86,11^{defgh}$
CV%			4,20	17,83	9,70

[1] *Giá trị trong bảng là 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 5% (P<0,05).*



Hình 1. *Cây phát sinh loài của các chủng nấm men được tuyển chọn*

3.4. Tối ưu hóa điều kiện lên men của nấm men chịu nhiệt

Từ kết quả về khả năng lên men ethanol ở 37 ^{o}C và 40 ^{o}C, chủng *S. cerevisiae* Y8 được chọn sử dụng trong thử nghiệm điều kiện tối ưu lên men ethanol từ dịch ép mía. Kết quả ở Bảng 4 cho thấy hàm lượng ethanol sinh ra và hiệu suất lên men thể hiện sự khác biệt ở các nghiệm thức khác nhau. Ở nghiệm thức thời gian lên men 6 ngày, nồng độ giống 10^6 tb/mL và hàm lượng đường 250 g/L, nồng độ ethanol thu được là 10,58% (v/v) với hiệu suất lên men 97,55%. Ở nghiệm thức lên men 6 ngày, nồng độ giống 10^6 tb/mL và hàm lượng đường 200 g/L, nồng độ ethanol thu được là 10,14% (v/v) và hiệu suất lên men là 98,3%.

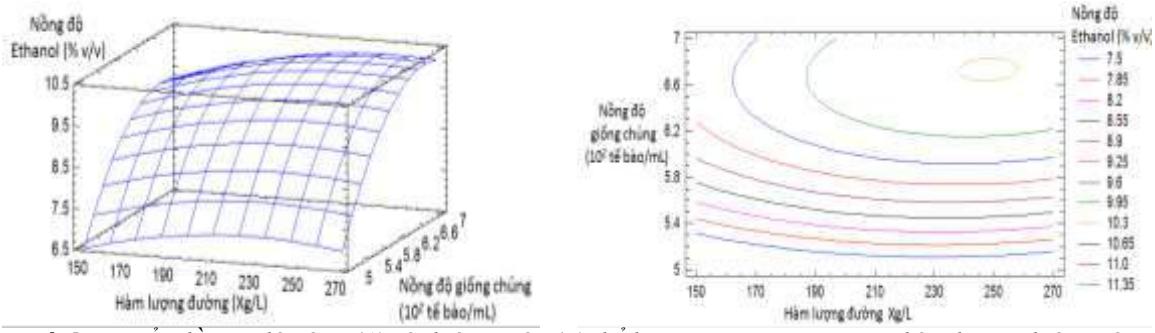
Sự thay đổi của pH của các nhân tố không đáng kể. Ở nhân tố nồng độ giống, mật số cao thì thời gian lên men cũng như thời gian đạt lượng ethanol cao nhất sẽ ngắn lại, ở nồng độ giống là 10^7 tb/mL, nồng độ ethanol giảm liên tục theo thời gian lên men từ ngày 5 đến ngày 7, điều đó cho thấy quá trình lên men dừng lại từ rất sớm. Ở các ngày tiếp theo ethanol sẽ tiếp tục phản ứng với các acid hữu cơ làm

giảm năng suất cũng như tăng độ pH. Ngược lại, ở nồng độ giống là 10^5 tb/mL quá trình diễn ra chậm, lượng ethanol thấp nhưng liên tục tăng từ 5 đến 7 ngày, sự xuất hiện của bọt khí diễn ra trong toàn bộ thử nghiệm chứng tỏ lượng khí CO_2 được sinh ra trong suốt thời gian này làm giảm thấp độ pH.

Trong sản xuất ethanol sinh học thì hàm lượng ethanol thu được sau lên men là chỉ tiêu quan trọng nhất. Trong thử nghiệm này, từ các kết quả và so sánh ở Bảng 4 cho thấy ở các nghiệm thức với thời gian lên men là 6 ngày cho khả năng sinh ethanol và hiệu suất lên men cao nhất. Như vậy, thời gian lên men là 6 ngày là nghiệm thức tốt nhất cho quá trình lên men ethanol ở dịch ép mía. Phần mềm thống kê Statgraphics Centurion được sử dụng xử lý số liệu thực nghiệm để thiết lập phương trình hồi quy qua đó xác định nghiệm thức tối ưu cho quá trình sản xuất ethanol bằng nấm men chịu nhiệt từ dịch ép mía. 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 2.

Phương trình hồi quy đa biến: Nồng độ ethanol (% /v/v) = -92,2046 + 0,167413*X + 19,2369*Z + 11,1349*Y - 0,0000971661*X*X - 0,0162604*X*Z - 0,0223532*X*Y - 0,425556*Y*Y - 0,88518*Y*Z - 1,07472*Z*Z + 0,00307967*X*Y*Z. Trong đó: X là hàm lượng đường ban đầu (155,01-268,82 g/L), Y là thời gian lên men (5-7 ngày) và Z là Log của nồng độ giống (5-7 log tb/mL). Từ phương trình hồi quy, cố định thời gian lên men tại tại 6 ngày (Y = 6). Giải phương trình hồi quy bằng cách lấy đạo hàm lần lượt theo X và Z được kết quả X = 248,2 và Z = 6,7 (~7,0).

Kết quả phân tích cho thấy điều kiện tối ưu lên men dịch ép mía ở 37 °C sử dụng chủng nấm men Y8 là hàm lượng đường ban đầu 248,2 g/L, thời gian lên men 6 ngày, nồng độ giống 10^7 tế bào/mL, hàm lượng ethanol đạt 10,58% (v/v). Limtong và cộng sự [4] lên men dịch ép mía với chủng *K. marxianus* DMKU-3042 ở 37 °C thu được 8,7% (w/v) ethanol với hiệu suất lên men đạt 77,5%. Kết quả lên men dịch ép mía với chủng *S. cerevisiae* HAU-21 dược ghi nhận với 10,02% (v/v) ở 30 °C [21].



Hình 2. *Biểu đồ mặt đáp ứng (A) và đường mức (B) thể hiện sự tương quan giữa hàm lượng đường và nồng độ giống chủng lên hàm lượng ethanol*

4. Kết luận

Tuyển chọn được 10 chủng nấm men Y8, Y31, Y32, Y33, Y34, Y35, Y39, Y42, YVN7 và YVN12 có khả năng lên men mạnh với hiệu suất cao trong môi trường dịch ép mía ở 37 °C. Trong đó, 3 chủng Y8, Y31 và YVN12 sinh ra lượng ethanol cao nhất, trong khoảng 10,36-10,57% (v/v). Chủng Y8 có khả năng lên men tốt nhất ở 40 ^oC với hàm lượng ethanol đạt được ở mức 5,74% (v/v) và hiệu suất 71,34% nên được tuyển chọn để xác định điều kiện lên men tối ưu. Các chủng nấm men tuyển chọn được định danh là *S. cerevisiae*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* và *T. globosa*. Xác định được điều kiện lên men thích hợp của chủng *S. cererevisiae* Y8 trong môi trường dịch ép mía ở 37 °C với hàm lượng đường ban đầu là 248,2 g/L, lên men 6 ngày và nồng độ giống 10^7 tế bào/mL, hàm lượng ethanol đạt 10,58% (v/v).

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí đề tài nghiên cứu khoa học trong Chương trình Công nghệ Sinh học Tiên tiến (Trường Đại học Cần Thơ) và Chương trình CCP (Core-to-Core Program, 2014-2019).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. S. Alfenore, C. Molina-Jouve, S. E. Guillounet, J. L. Uribelarrea, G. Goma, L. Benbadis, "Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, pp. 67-72, 2002.

[2]. C. A. Cardona, J. A. Quintero, I. C. Paz, "Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives", *Bioresources Technology*, 101(13), pp. 4754-4766, 2010.

[3]. H. B. Aditiya, T. M. I. Mahlia, W. T. Chong, H. Nur, A. H. Sebayang, "Second generation bioethanol production: A critical review", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, pp. 631-653, 2016.

[4]. S. Limtong, C. Sringiew, W. Yongmanitchai, "Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*", *Bioresources Technology*, 98, pp. 3367-3374, 2007.

[5]. B. M. Abdel-Banat, H. Hoshida, A. Ano, S. Nonklang, R. Akada, "High-temperature fermentation: How can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast?", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4), pp. 861-867, 2010.

[6]. M. Koutinas, M. Patsalou, S. Stavrinou, I. Vyrides "High temperature alcoholic fermentation of orange peel by the newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* KVMP10, *Letters in Applied Microbiology*, 62, pp. 75-83, 2015.

[7]. M. Roehr, *The Biotechnology of Ethanol: Classical and Future Applications*. Chichester: Wiley-VCH, 2001.

[8]. J. Choudhary, S. Singh, L. Nain, "Thermotolerant fermenting yeasts for simultaneous saccharification fermentation of lignocellulosic biomass", *Electronic Journal of Biotechnology*, 21, pp. 82-92, 2016.

[9]. J. Goldemberg, "Ethanol for a sustainable energy future", *Science*, 315, pp. 808-810, 2007.

[10] A.V. Rosa, *Fundamentals of Renewable Energy Processes*, 1st ed, Academic Press, Elsevier Inc., 2009.

[11]. N. T. P. Dung, H. X. Phong, P. Thanonkeo, P. Klanrit, T. Yakushi, K. Matsushita, M. Yamada, "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, 2015.

[12]. C. P. Kurtzman and C. J. Robnett, "Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene", *Journal of Clinical Microbiology*, 35(5), pp. 1216-1223, 1997.

[13]. K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar "MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0", *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), pp. 2725-2729, 2013.

[14]. R. S. S. Teixeira, A. S. da Silva, V. S. Ferreira-Leitão, E. P. S. Bon, "Amino acids interference on the quantification of reducing sugars by the 3,5-dinitrosalicylic acid assay mislead carbohydrase activity measurements", *Carbohydrate Research*, 363, pp. 33-37, 2012.

[15]. Nguyễn Đình Thưởng và Nguyễn Thanh Hằng, *Công nghệ sản xuất và kiểm tra cồn etylic*, Nxb Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội, 2005.

[16]. A. Edgardoa, P. Carolinaa, R. Manuela, F. Juanitaa, B. Jaimea, "Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production", *Enzyme and Microbial Technology*, 43, pp. 120-123, 2008.

[17]. R. Jutakanoke, S. Tanasupawat, A. Akarachananya, "Characterization and ethanol fermentation of *Pichia* and *Torulaspora* strains", *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4, pp. 52-56, 2014.

[18]. S. Nuanpeng, S. Thanonkeo, M. Yamada, P. Thanonkeo, "Ethanol production from sweet sorghum juice at high temperatures using a newly isolated thermotolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae* DBKKU Y-53", *Energies*, 9(4), pp. 253, 2016.

[19]. A. Techaparin, P. Thanonkeo, P. Klanrit, "High-temperature etanol production using thermotolerant yeast newly isolated from Greater Mekong Subregion", *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(3), pp. 461-475, 2017.

[20]. H. X. Phong, P. Klanrit, N. T. P. Dung, M. Yamada, P. Thanonkeo, "Isolation and characterization of thermotolerant yeasts for the production of second-generation bioethanol", *Annals of Microbiology*, 69(7), pp. 765-776, 2019.

[21]. R. Giri, B. S. Kundu, P. Diwan, K. Raj, L. Wati, "Ethanol production from direct sugarcane and juice by yeast", *Agricultural Science Digest*, 33(3), pp. 188-192, 2013.