

## TUYỂN CHỌN CHỦNG NẤM MEN CÓ HOẠT LỰC CAO VÀ ĐÁNH GIÁ HIỆU SUẤT LÊN MEN ETHANOL DỊCH THỦY PHÂN BÈO NHẬT BẢN BẰNG ACID LOÃNG

Nguyễn Minh Trí, Hồ Phan Ngọc Thúy  
Trường Đại học Khoa học Huế

Ethanol là một loại nhiên liệu sinh học, được sản xuất chủ yếu bằng phương pháp lên men đường, tinh bột hay cellulose từ các loại cây nông nghiệp như ngô, lúa mì, lúa mạch, mía... chuyển hóa thành đường đơn và cũng có thể sản xuất ethanol từ cây cỏ có chứa hợp chất cellulose. Chính vì vậy, người ta đang nghiên cứu theo hướng sản xuất ethanol từ các nguồn phế liệu của nông nghiệp [3].

Bèo Nhật Bản (*Eichhornia crassipes*) hay còn gọi là bèo Tây, Lục Bình... có nguồn gốc từ Nam Mỹ đã được di nhập vào Việt Nam từ những năm 1902 với mục đích làm cảnh. Hiện nay đối tượng này đã phân bố rộng khắp tại các thủy vực ở Việt Nam nói chung và ở địa bàn tỉnh Thừa Thiên -Huế nói riêng. Vì vậy, việc xử lý sinh khối bèo Nhật Bản đang là một vấn đề cần quan tâm hiện nay [10].

Bài báo này giới thiệu một số kết quả về tuyển chọn chủng nấm men có hoạt tính lên men ethanol cao được phân lập từ các nguồn khác nhau và xác định khả năng lên men ethanol từ dịch thủy phân bèo Nhật Bản bằng acid loãng nhằm giải quyết một lượng lớn sinh khối bèo Nhật Bản đang phát triển quá mức và tận dụng loại nguyên liệu này như một nguồn nguyên liệu tiềm năng trong quá trình sản xuất ethanol sinh học.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### Đối tượng nghiên cứu:

- Bèo Nhật Bản
- Chủng nấm men được phân lập từ các nguồn khác nhau

#### Phương pháp nghiên cứu

Phân lập các chủng nấm men từ: 13 loại bánh men rượu, 2 loại bã rượu, 2 loại trái cây chín... [1].

Sơ tuyển hoạt lực lên men của các chủng nấm men đã được phân lập bằng cách xác định chiều cao cột khí CO<sub>2</sub> sinh ra trong ống Durham tại các thời điểm nuôi cấy [7].

Xác định hàm lượng cellulose của bèo Nhật Bản bằng phương pháp thủy phân [2].

Xác định hàm lượng đường khử bằng phương pháp so màu với acid picric [2].

Xác định nồng độ ethanol trong quá trình lên men bằng phương pháp so màu [8].

Các thí nghiệm được thực hiện trong ba lần lặp lại, kết quả là giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Tất cả các số liệu được xử lý bằng chương trình Microsoft Excell 2010.

### II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 1. Phân lập các chủng nấm men

Qua quá trình phân lập từ các nguồn khác nhau, chúng tôi đã thu nhận được 17 chủng nấm men. Sau đó quan sát các khuẩn lạc hiện diện trên môi trường dinh dưỡng dựa vào các đặc điểm khác nhau về màu sắc, hình dạng, kích thước của tế bào nấm men để phân loại sơ bộ các chủng nấm men (Bảng 1) (Kurtzman and Fell, 1998).

Bảng 1

**Đặc điểm hình thái của 17 chủng nấm men được phân lập**

Mẫu	Chủng	Mô tả khuẩn lạc	Hình dạng tế bào
Bánh men Quảng Ngãi	QN1	Khuẩn lạc nhỏ, màu trắng nhạt, trơn	hình oval lớn
	QN2	Khuẩn lạc trắng đục, khô	hình cầu
	QN3	Khuẩn lạc to, màu trắng sữa, đậm trong và nhạt dần ra ngoài	hình oval lớn
	QN4	Khuẩn lạc lớn, màu trắng đục, bề mặt khô,	hình oval lớn
	QN5	Khuẩn lạc trung bình, màu trắng sữa, bề mặt khô	hình oval nhỏ
	QN6	Khuẩn lạc nhỏ, màu trắng đục, bề mặt trơn láng	hình oval lớn
Bánh men Sài Gòn	SG1	Khuẩn lạc trắng trung bình sữa nhạt, trơn	Hình oval nhỏ
	SG2	Khuẩn lạc nhỏ, trắng đục, khô	Hình elip
	SG3	Khuẩn lạc trắng sữa trơn hơi to	Hình oval nhỏ
Men bánh mì	BM1	Khuẩn lạc to, bề mặt trơn, bóng có màu trắng sữa	Hình oval lớn
	BM2	Khuẩn lạc vừa, nhạt trong và đậm dần từ ngoài vào trong	Hình elip
	BM3	Khuẩn lạc nhỏ, nhân trắng sữa	Hình oval nhỏ
	BM4	Khuẩn lạc nhỏ, trắng đục, khô	Hình oval nhỏ
Bã rượu Sake	BR1	Khuẩn lạc trung bình, trơn láng	Hình cầu
	BR2	Khuẩn lạc vừa, khô	Hình cầu
Trái cây	TC1	Khuẩn lạc trung bình, màu trắng nhạt, trơn	Hình cầu
	TC2	Khuẩn lạc trắng sữa to, khô	Hình cầu

**2. Khảo sát hoạt lực lên men ethanol của các chủng nấm men**

Để xác định hoạt lực lên men của các chủng nấm men có thể dựa vào khả năng sinh khí CO<sub>2</sub> trong quá trình lên men. Tuy nhiên do thời gian lên men trong ống Durham ngắn, trong khi quá trình lên men rượu có thời gian dài ngày hơn. Vì vậy phương pháp xác định chiều cao cột khí CO<sub>2</sub> bằng ống Durham chỉ là cơ sở ban đầu để tuyển chọn chủng nấm men có hoạt lực cao.

Trên cơ sở đó, chúng tôi tiến hành nuôi cấy các chủng nấm men trong môi trường dinh dưỡng ở điều kiện nhiệt độ 30°C và xác định chiều cao của cột khí CO<sub>2</sub> sau mỗi đợt theo dõi là 6 giờ. Kết quả khảo sát qua 3 lần lặp lại cho thấy: tại các thời điểm khác nhau, chiều cao cột khí CO<sub>2</sub> trong ống Durham cũng khác nhau, cho thấy cường độ lên men của các chủng nấm men cũng khác nhau (Bảng 2).

Bảng 2

**Chiều cao cột khí CO<sub>2</sub> sinh ra trong ống Durham của các chủng nấm men qua 3 lần lặp lại**

STT	Chủng nấm men	Chiều cao cột khí CO <sub>2</sub> (cm)					
		6 giờ	12 giờ	18 giờ	24 giờ	30 giờ	36 giờ
1	QN1	4,2	7,5	9,0	11,0	11,0	<b>11,0</b>
2	QN2	-	-	-	-	-	-

3	QN3	-	-	-	-	-	-
4	QN4	0,3	1,4	2,2	7,8	8,6	<b>10,8</b>
5	QN5	2,1	3,8	5,1	8,3	9,0	<b>10,6</b>
6	QN6	-	-	-	-	-	-
7	SG1	0,2	1,9	3,4	5,6	7,8	8,9
8	SG2	-	-	-	-	-	-
9	SG3	1,1	2,5	5,3	7,9	8,0	8,2
10	BR1	<b>3,6</b>	4,5	6,6	7,5	8,9	<b>10,4</b>
11	BR2	1,3	2,5	5,8	6,0	6,9	7,5
12	BM1	2,0	3,4	5,6	6,1	7,5	8,0
13	BM2	-	-	1,0	2,4	4,7	6,2
14	BM3	1,2	2,0	3,8	5,3	7,9	9,0
15	BM4	-	-	-	-	-	-
16	TC1	-	1,1	2,0	4,4	5,9	7,0
17	TC2	0,9	2,6	3,7	5,0	6,5	7,4

**Ghi chú:** (-) chưa tạo CO<sub>2</sub> trong ống Durham

Ở thời điểm 6 giờ đầu của quá trình lên men, đa số các chủng nấm men đều có khả năng lên men và tạo khí CO<sub>2</sub>. Chủng QN1 có chiều cao cột khí cao hơn cả so với các chủng còn lại, cho thấy các chủng này có khả năng lên men nhanh. Sau 36 giờ lên men, chiều cao cột khí trong ống Durham ít thay đổi do quá trình lên men đã kết thúc.

Trong số 17 chủng nấm men được khảo sát ở trên thì chủng QN1 có thời gian lên men ngắn (24 giờ) và chiều cao cột khí sinh ra trong ống Durham đạt tối đa (11,00 cm). Một số chủng nấm men không thấy xuất hiện bọt khí CO<sub>2</sub> trong ống Durham chứng tỏ chủng nấm men này không lên men được trong môi trường dinh dưỡng đó.

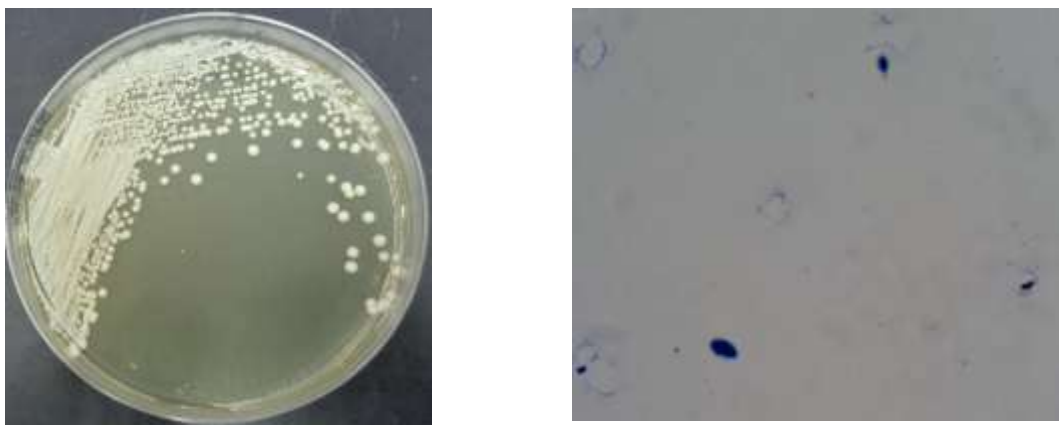
Từ kết quả khảo sát khả năng lên men thông qua chiều cao cột khí CO<sub>2</sub> này chúng tôi lựa chọn chủng QN1 để định danh tên khoa học và thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

### 3. Phân loại

Chủng nấm men QN1 được phân loại bằng phương pháp giải trình tự gen 18S rRNA và tra cứu trên Gen Bank để định danh loài. Kết quả giải trình tự gen của chủng nấm men QN1 như sau:

Query	1	CTCCTCGCCACACGGGATTCTCACCCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACATAGACAAG	60
Sbjct	1021	CTCCTCGCCACACGGGATTCTCACCCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACATAGACAAG	962
Query	61	GAACGGCCCCAAAGTTGCCCTCTCCAAATTACAACCTCGGGCACC GAAGGTACCAGATTTCT	120
Sbjct	961	GAACGGCCCCAAAGTTGCCCTCTCCAAATTACAACCTCGGGCACC GAAGGTACCAGATTTCT	902
Query	121	AAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTAAGGCAATCCCGGTTGGTTCTTTT	180
Sbjct	901	AAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTAAGGCAATCCCGGTTGGTTCTTTT	842
Query	181	CCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTACTCCTACCTGATTTGAGGTCAAACCT	240
Sbjct	841	CCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTACTCCTACCTGATTTGAGGTCAAACCT	782
Query	241	TTAAGAACATTGTTTCGCCTAGACGCTCTCTTCTTATCGATAACGTTCCAATACGCTCAGT	300
Sbjct	781	TTAAGAACATTGTTTCGCCTAGACGCTCTCTTCTTATCGATAACGTTCCAATACGCTCAGT	722
Query	301	ATAAAAAAGATTAGCCGAGTTGGTAAAACCTAAAACGACCGTACTTGCATTATACCTCA	360
Sbjct	721	ATAAAAAAGATTAGCCGAGTTGGTAAAACCTAAAACGACCGTACTTGCATTATACCTCA	662
Query	361	AGCACGCAGAGAAACCTCTTTTG	394
Sbjct	661	AGCACGCAGAGAAACCTCTTTTG	628

Hình 1: Trình tự nucleotide đoạn gen 18S rARN của chủng QN1



Hình 2: Chủng QN1 trên môi trường thạch đĩa và ảnh tiêu bản nhuộm Gram (x40)

Bảng 3

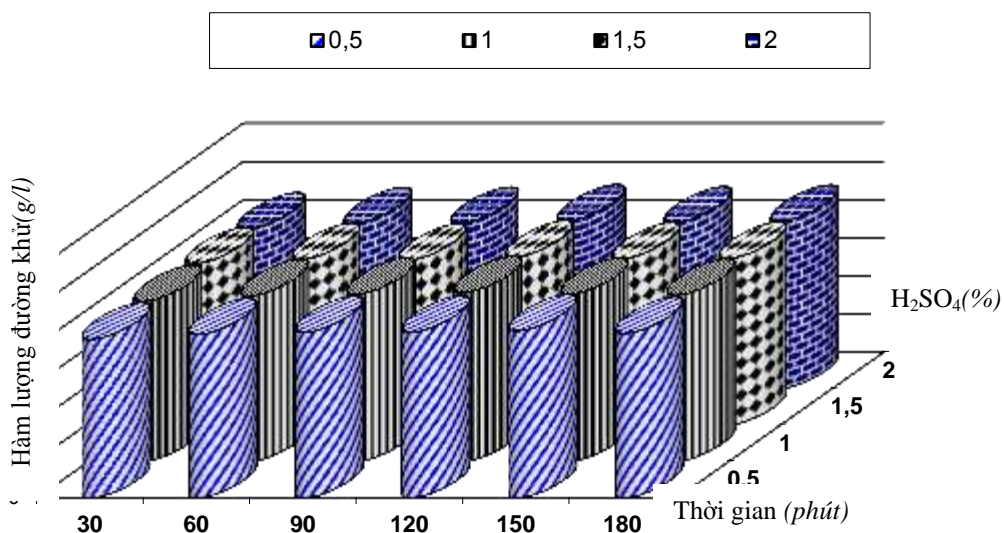
Đánh giá mức độ tương đồng trình tự đoạn gen 18S rRNA của chủng QN1

Tên loài	Tên chủng	Mã số truy cập	Độ tương đồng (%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YZ	KT459474.1	100

Qua kết quả giải mã trình tự gen, chúng tôi nhận thấy trình tự đoạn gen 18S rRNA của chủng nấm men BĐ1 tương đồng 100% với trình tự đoạn gen 18S rRNA ở chủng *Saccharomyces cerevisiae* YZ, KT459474.1. Chủng QN1 được xếp vào chi *Saccharomyces*, loài *Saccharomyces cerevisiae*. Chúng tôi đặt tên loài này là *Saccharomyces cerevisiae* QN1.

#### 4. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ acid và thời gian đến quá trình thủy phân bột Nhặt Bản

Phản ứng thủy phân được tiến hành ở các nồng độ acid  $H_2SO_4$  loãng từ 0,5 - 2% ở  $100^{\circ}C$  trong những thời điểm khác nhau qua lặp lại 3 lần và kết quả được thể hiện ở hình 3.



Hình 3: Ảnh hưởng của nồng độ acid và thời gian đến phản ứng thủy phân

Kết quả ở hình 3 cho thấy, trong khoảng thời gian từ 30 – 120 phút thì hàm lượng đường khử được tạo thành trong dịch thủy phân bèo Nhật Bản ở các nồng độ acid  $H_2SO_4$  tăng tỷ lệ thuận với thời gian phản ứng. Tại thời điểm 120 phút thì hàm lượng đường khử có giá trị cao nhất (2,208 g/l) ứng với nồng độ acid  $H_2SO_4$  1%, tiếp đến (2,198 g/l) ở nồng độ  $H_2SO_4$  1,5% và thấp nhất (2,193 g/l) ở nồng độ  $H_2SO_4$  0,5%... Với kết quả khảo sát này, theo chúng tôi việc sử dụng nồng độ acid  $H_2SO_4$  1% để thực hiện phản ứng thủy phân bèo Nhật Bản trong thời gian 120 phút là thích hợp cho việc thu nhận dung dịch đường khử.

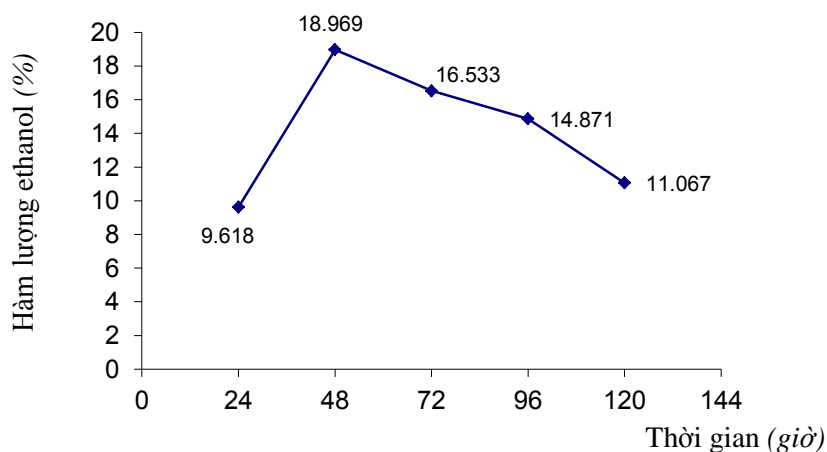
Theo nghiên cứu của Das Arpan thì bèo Nhật Bản được xử lý với tỷ lệ rắn lỏng 1:10 (w/v) bằng acid sulfuric 2% ở nhiệt độ và áp suất cao, lượng đường khử thu được tối đa là 425,6 mg/g [4].

Theo kết quả nghiên cứu của Nguyễn Xuân Cự (2010), thì quá trình thủy phân thân cây ngô bằng  $H_2SO_4$  2% ở  $120^\circ C$  trong 60 phút với tỷ lệ nguyên liệu/dung dịch  $H_2SO_4$  2% là 1/10 (w/v) có hàm lượng đường khử tạo thành khá cao (4,2 g/l) trong dung dịch [3].

### 5. Kết quả lên men ethanol dịch thủy phân bèo Nhật Bản

Từ kết quả khảo sát về ảnh hưởng của nồng độ acid và thời gian đến quá trình thủy phân bèo Nhật Bản, chúng tôi chọn được nồng độ  $H_2SO_4$  1% và thời gian cho phản ứng thủy phân là 120 phút. Tiến hành thủy phân bèo Nhật Bản bằng  $H_2SO_4$  1% trong thời gian 120 phút, sau đó lọc lấy dịch trong và trung hòa bằng NaOH 1M.

Thực hiện quá trình lên men: phân phối dịch thủy phân bèo Nhật Bản đã được trung hòa vào các bình lên men, mỗi bình là 100 ml và khử trùng ở 1at trong 60 phút. Sau đó dùng pipet vô trùng lấy 1ml dịch từ bình nuôi cấy chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* QN1 cho vào các bình lên men. Nuôi ở nhiệt độ phòng từ  $25-29^\circ C$ . Sau 24 giờ, tiến hành lấy 1 – 5 ml để xác định nồng độ ethanol được tạo thành bằng phương pháp trắc quang trên máy Cobas C311 Analyzer của hãng Hitachi (hình 4).



Hình 4: Hàm lượng ethanol tạo thành theo thời gian lên men qua 3 lần lặp lại

Kết quả khảo sát qua 3 lần lặp lại được thể hiện ở hình 4 cho thấy: hàm lượng ethanol tạo thành cao nhất ở ngày thứ 2 sau lên men đạt 18,696%, những ngày sau hàm lượng ethanol có xu hướng giảm dần. Theo chúng tôi, thời gian 2 ngày cũng là khoảng thời gian nấm men thích nghi với môi trường cơ chất mới và phản ứng lên men tạo ethanol tăng mạnh. Trong điều kiện lên men kỵ khí, ngoài ethanol được tạo thành thì còn có nhiều sản phẩm phụ khác như acid lactic,

phenol, furfural... làm hạn chế khả năng lên men của vi sinh vật nên. Mặt khác, khi nồng độ ethanol đạt cao nhất thì hoạt động của chủng nấm men sẽ bị kìm hãm vì vậy chủng sẽ không lên men để chuyển hóa đường thành ethanol, do vậy nồng độ ethanol từ ngày thứ 3 trở đi sẽ giảm dần. Kết quả của Kumar sau khi lên men dịch thủy phân bèo Nhật Bản với  $H_2SO_4$  2% bằng chủng nấm men *Pichia stipitis* NCIM-3497 đã thu được ethanol với hàm lượng 0,425 g/g [6].

Theo nghiên cứu của Isarankura-Na-Ayudhya, ban đầu thủy phân bèo Nhật Bản với acid sulfuric 10% và sau đó lên men dịch thủy phân bằng chủng nấm *Candida shehatae*. Kết quả thu được hệ số sản xuất ethanol tối đa là 0,19 g/g và năng suất là 0,008 g/l/h [5]. Cũng như so với kết quả của Satyanagalakshmi khi nghiên cứu và sản xuất bioethanol từ nguồn nguyên liệu là bèo Nhật Bản được xử lý với  $H_2SO_4$  4%. Trong điều kiện tối ưu, đã thu được bioethanol với hiệu suất thực tế là 59,3% [9].

### III. KẾT LUẬN

Đã phân lập được 17 chủng nấm men từ các nguồn khác nhau, trong đó có 12 chủng nấm men có hoạt tính lên men ethanol.

Kết quả khảo sát hoạt tính lên men ethanol bằng phương pháp Durham của chủng QN1 là 11 cm cao hơn so với các chủng nấm men còn lại.

Bằng phương pháp giải trình tự gen 18S rRNA và tra cứu trên Gen Bank, kết quả định danh chủng QN1 là loài *Saccharomyces cerevisiae*, xếp vào chi *Saccharomyces*.

Các thông số tối ưu cho quá trình thủy phân bèo Nhật Bản bằng dung dịch acid  $H_2SO_4$  loãng: thời gian thủy phân là 120 phút với acid  $H_2SO_4$  1% ở nhiệt độ  $100^{\circ}C$ .

Sau quá trình lên men dịch thủy phân bèo Nhật Bản bằng *Saccharomyces cerevisiae* QN1, hàm lượng ethanol đạt giá trị cao nhất là 18,969 g/l ở thời điểm 48 giờ.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lý Nguyễn Bình, Trần Văn Khánh, Hà Phương Thảo, Nguyễn Văn Thành, 2015. "Phân lập và tuyển chọn nấm men có hoạt lực cao từ men rượu". *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, tr. 18–28.
2. Phạm Thị Trân Châu, 2007. *Thực hành hóa sinh học*, Nxb. Giáo dục.
3. Nguyễn Xuân Cự, 2010. "Nghiên cứu khả năng thủy phân bằng axit loãng và bước đầu đánh giá hiệu quả sản xuất etanol sinh học từ thân cây ngô", *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học tự nhiên và Công nghệ* (26), tr. 211 – 216.
4. Das Arpan, et al, 2016 "Production of bioethanol as useful biofuel through the bioconversion of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*)."  
*3 Biotech* 6.1: 1 – 9.
5. Isarankura-Na-Ayudhya, C., Kongpanpee, T., Prabkate, P., Prachayasittikul, V., & Tantimongcolwat, T., 2007. Appropriate technology for the bioconversion of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) to liquid ethanol.
6. Kumar, Ashish, L. K. Singh, Sanjoy Ghosh., 2009 "Bioconversion of lignocellulosic fraction of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to ethanol by *Pichia stipitis*." *Bioresource Technology* 100.13: 3293-3297.
7. Nguyễn Đức Lượng, Phan Thị Huyền, Nguyễn Ánh Tuyết, 2003. *Thí nghiệm công nghệ sinh học, tập 2 - Thí nghiệm vi sinh vật học*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh.

8. **Lê Thanh Mai**, 2009. *Các phương pháp phân tích ngành công nghệ lên men*, NXB giáo dục, Hà Nội.
9. **Satyanagalakshmi, K., Sindhu, R., Binod, P., Janu, K. U., Sukumaran, R. K., & Pandey, A**, 2011. Bioethanol production from acid pretreated water hyacinth by separate hydrolysis and fermentation.
10. **Nguyễn Minh Trí, Ngô Nguyễn Quỳnh Chi**, 2016. *Xử lý bèo Nhật Bản bằng chế phẩm sinh học Vixura tạo nguồn phân hữu cơ sinh học*, Tạp chí KH&CN, trường ĐHKH Huế. Tập: 4, Số: 1, tr: 115-120

**SELECTION OF HIGH PERFORMANCE YEAST STRAIN AND INITIAL  
EVALUATION OF ETHANOL FERMENTATION EFFICIENCY WITH  
DILUTE ACID DILUTED**

**Nguyen Minh Tri, Ho Phan Ngoc Thuy**

SUMMARY

The study was carried out with the aim of selecting domesticated yeast strains to increase the performance of ethanol fermentation. The study was conducted based on the yeast strains isolated from traditional yeast cake: Ba Don, Saigon, Hue, yeast breads, distillers Sake and ripe fruits. In total, we had 17 yeast strains. Of which, the QN1 yeast strains has high ethanol fermentation activity and good heat resistance compare with the other strains. By sequencing the 18S rRNA gene and looking up Gen Bank, the results of identifying candidate BD1 are classified as Candida species, Candida tropicalis. The optimal parameters for hydrolysis of Eichhornia crassipes is at concentration of dilute acid: The hydrolysis time is 120 minutes with 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 100°C. After fermenting the Eichhornia crassipes with Saccharomyces cerevisiae QN1, ethanol reached the highest value of 18,969 g / l at 48 hours.