

ẢNH HƯỞNG KỸ THUẬT CỐ ĐỊNH NẤM MEN ĐẾN QUÁ TRÌNH LÊN MEN RƯỢU VANG NHO - DẦU TẦM

● PHAN THỊ KIỀU LINH

TÓM TẮT:

Bài viết khảo sát ảnh hưởng của kỹ thuật cố định nấm men *Saccharomyces cerevisiae* đến quá trình lên men rượu vang nho - dầu tầm (tỷ lệ 8:2), trong đó bao gồm việc so sánh khả năng lên men của nấm men tự do và nấm men cố định trong gel Alginate 1 lớp và 2 lớp. Kết quả cho thấy, điều kiện cố định tế bào thích hợp hơn so với tế bào nấm men tự do thông qua tốc độ sử dụng glucose sinh tổng hợp ethanol, do nấm men cố định được bảo vệ bởi lớp chất mang ít chịu ảnh hưởng của pH môi trường tăng khả năng giải phóng ethanol nội bào nên nấm men cố định trên gel Alginate 1 lớp cho hàm lượng 16%(v/v) và cố định 2 lớp cho hàm lượng ethanol 17.35%(v/v) cao hơn so với hàm lượng ethanol ở nấm men tự do là 13% (v/v).

Từ khóa: Ethanol, nấm men cố định, rượu vang nho, rượu vang dầu tầm.

1. Đặt vấn đề

Trên thế giới, nhu cầu về ethanol của ngành công nghiệp đồ uống vẫn ở mức cao nhưng nhiên liệu ngày càng tăng. Vì vậy, công nghệ lên men truyền thống đang ngày càng được cải tiến để tạo năng suất ethanol cao từ nguồn cơ chất rẻ hơn và có thể tái tạo là hai khía cạnh được quan tâm trong các nghiên cứu lên men ethanol gần đây. Một số kỹ thuật đã được nghiên cứu để đạt được mục tiêu này bao gồm nuôi cấy liên tục, cố định tế bào và tái tạo tế bào. Việc sử dụng các tế bào vi sinh vật cố định để sản xuất ethanol đã được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu gần đây. [1]

Kỹ thuật cố định tế bào được định nghĩa là: Kỹ thuật bao bọc hoặc định vị các tế bào còn nguyên vẹn lên một "vùng không gian nhất định" - "chất mang" nhằm bảo vệ các hoạt tính xúc tác mong muốn. [2]

Các chất mang thường được sử dụng là alginate, k-carrageenan, pectin, agar, gelatin.... Đây là các polymer tự nhiên không độc, dễ tạo gel và không có hại cho tế bào [3]. Trong số các chất mang trong kĩ thuật cố định tế bào ứng dụng trong lên men ethanol thì Ca-alginate 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 [4].

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Sử dụng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* của công ty Brentag cung cấp.

Enzyme Penitex của công ty Brentag. Nho đen từ vườn nho tỉnh Phan Rang có độ pH: 4.09, độ tro 0.9%. Dầu tầm Đà Lạt có độ Brix là 9, pH: 3.52, độ tro: 0.65%.

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 60g/l, (NH₄)₂SO₄ 3g/l, MgSO₄.7H₂O 0,5g/l, K₂HPO₄ 0,6g/l, cao nấm men 5g/l ở 28°C. lấy sinh khối tế bào.

Tiếp đó, alginate được chuẩn bị ở dạng dung dịch 3% (w/v) trong nước và đem tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút. Trộn dung dịch alginate và dịch huyền phù tế bào theo tỉ lệ 1:1 (v/v). Dùng bơm tiêm nhỏ từng giọt hỗn hợp này vào dịch CaCl₂ 2%, để yên trong thời gian cho các hạt gel cứng lại. Sau đó vớt các hạt gel ra, rửa sạch CaCl₂ và đem đi lên men mật độ 5.10⁶tb/ml.

2.2.2. Phương pháp lên men

Nho - dâu tằm ép xử lý enzyme pectinase 0.1%/55°C. Sau đó lọc loại bỏ phần bã và phối chế dịch nho và dâu tằm (8:2) sau khi lọc được bổ sung dịch syrup và acid citric để đạt Brix 28°, Natri bisulfite với nồng độ 30mg/l. Tiến hành lên men ở 25°C.

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

Xác định lượng tế bào có trong hạt bằng cách lấy một lượng hạt nhất định, rửa sạch, hòa tan hạt với dung dịch citrat - Na 5%/30 phút, sau đó đem pha loãng và đếm buồng đếm Thomas.

2.2.4. Phương pháp hóa học (Bảng 1)

Bảng 1. Các phương pháp hóa học sử dụng

Thông số	Phương pháp	Ghi chú
Đo độ Brix	Brix kế	
pH	pH kế	
Độ nhớt	Máy đo độ nhớt	
Hàm ẩm nguyên liệu	Máy đo độ ẩm	
Axit tổng trong rượu	Phương pháp chuẩn độ	
Độ cồn trong rượu	Phương pháp chưng cất	TCVN 8008:2009
Đường khử	Phương pháp Bertrand	TCVN 4075: 1985

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của kỹ thuật cố định nấm men tới sự thay đổi Bx của dịch lên men

Ở nấm men tự do, hàm lượng chất khô chỉ giảm trong 6 ngày đầu lên men và sau đó gần như bị vô hoạt làm cho nồng độ chất khô không đổi và giữ nguyên ở 12°Bx cho đến hết quá trình lên men. Trong khi đó, nấm men cố định vẫn có khả năng sử dụng cơ chất và tiếp tục lên men, hàm lượng chất khô giảm triệt để hơn xuống còn khoảng 9°Bx. Sự thay đổi hàm lượng chất khô giữa mẫu sử dụng kỹ thuật cố định nấm men trong gel alginate 1 lớp và nấm men cố định trong gel alginate hai lớp không có sự khác biệt. Nấm men cố định có tốc độ sử dụng glucose, tốc độ sinh tổng hợp ethanol và glycerol cao hơn nhiều so với nấm men tự do, mặc dù diện tích bề mặt của chúng dùng để vận chuyển chất dinh dưỡng nhỏ hơn [5]. (Hình 1)

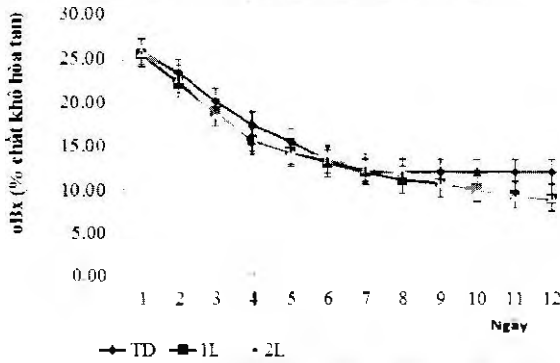
3.2. Ảnh hưởng của kỹ thuật cố định nấm men tới sự thay đổi pH

Nhìn chung pH giảm dần ở 2 ngày đầu, sau đó tăng dần qua các ngày lên men tiếp theo. Khả năng lên men của tế bào nấm men cố định không phụ thuộc vào pH nằm trong khoảng 3.1 - 6.26. Trong khi đó, khả năng lên men của nấm men tự do phụ thuộc vào pH và giá trị pH tối thích khoảng 4. [6]. [7] (Hình 2)

3.3. Ảnh hưởng của kỹ thuật cố định nấm men đến sự thay đổi của hàm lượng đường khử trong dịch lên men

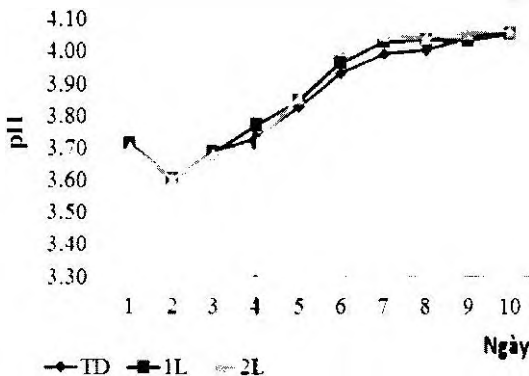
Ở giai đoạn đầu, nấm men tự do có tốc độ sử dụng đường khử nhanh hơn các mẫu còn lại do nấm men có thể trực tiếp hấp thụ các thành phần của môi trường để sinh tổng hợp. Đối với mẫu sử dụng nấm men cố định 1 lớp thì chậm hơn so với nấm men tự do nhưng nhanh hơn so với nấm men sử dụng kỹ thuật cố định 2 lớp. Nguyên nhân là do lớp chất mang alginate đã làm giảm tốc độ hấp thụ cơ chất trong môi trường, do đó hàm lượng đường khử giảm chậm hơn. Nhưng giai đoạn sau hàm lượng đường khử còn lại gần như giống nhau ở các kỹ thuật lên men. (Hình 3)

Hình 1: Ảnh hưởng của kỹ thuật cố định nấm men tới sự thay đổi Bx



Ghi chú: TD: Nấm men được lên men ở trạng thái tự do; 1L: Nấm men được cố định trong gel Alginate (3%) 1 lớp; 2L: Nấm men được cố định trong gel Alginate (3%) 2 lớp.

Hình 2: Ảnh hưởng của kỹ thuật cố định nấm men tới sự thay đổi pH

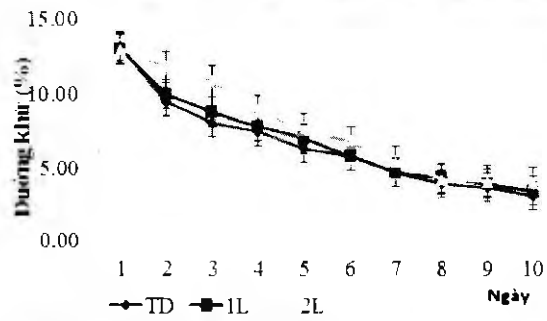


Ghi chú: TD: Nấm men được lên men ở trạng thái tự do; 1L: Nấm men được cố định trong gel Alginate (3%) 1 lớp; 2L: Nấm men được cố định trong gel Alginate (3%) 2 lớp.

3.4. Sự thay đổi độ cồn

Độ cồn của mẫu sử dụng nấm men tự do giữ ở mức 13%(v/v). Trong khi đó nấm men cố định trong gel alginate 1 lớp độ cồn tăng lên đến 16%(v/v) và cao nhất là mẫu nấm men cố định trong gel alginate hai lớp độ cồn lên tới 17.35%(v/v). Do nấm men cố định được bảo vệ trong chất mang khỏi các tác nhân ức chế môi trường nên tốc độ sử dụng cơ chất và chuyển hóa thành cồn vẫn tương đối nhanh và cao hơn hẳn so với nấm men tự do. Đồng thời, quá trình

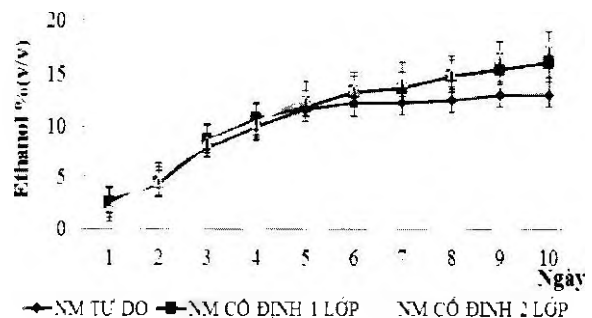
Hình 3: Ảnh hưởng của kỹ thuật cố định nấm men đến sự thay đổi của hàm lượng đường khử



Ghi chú: TD: Nấm men được lên men ở trạng thái tự do; 1L: Nấm men được cố định trong gel Alginate (3%) 1 lớp; 2L: Nấm men được cố định trong gel Alginate (3%) 2 lớp.

cố định làm thay đổi sự vận chuyển proton qua màng tế bào nấm men, làm tăng tốc độ sử dụng ATP mà quá trình sinh tổng hợp ethanol bị hạn chế khi có mặt của ATP nên tăng khả năng giải phóng ethanol nội bào ra ngoài môi trường [8-9]. (Hình 4)

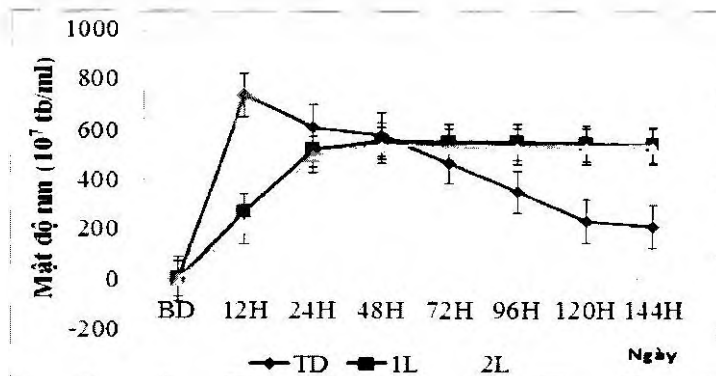
Hình 4: Ảnh hưởng của kỹ thuật cố định nấm men đến sự thay đổi của hàm lượng cồn



3.5. Ảnh hưởng của kỹ thuật cố định nấm men đến sự thay đổi của mật độ nấm men

Mẫu sử dụng nấm men tự do có mật độ nấm men cực đại cao hơn hẳn so với nấm men cố định là do khi cố định trong gel alginate thì khả năng nảy chồi của nấm men bị hạn chế so với nấm men tự do [10]. Nhưng đồng thời pha suy vong của nấm

Hình 5: Ảnh hưởng của kỹ thuật cố định nấm men đến sự thay đổi của mật độ nấm men



Ghi chú: TD: Nấm men được lên men ở trạng thái tự do; 1L: Nấm men được cố định trong gel Alginate (3%) 1 lớp; 2L: Nấm men được cố định trong gel Alginate (3%) 2 lớp.

men tự do rất dài. Điều này chứng tỏ rằng sự cố mật của chất mang đã bảo vệ tế bào khỏi ảnh hưởng của áp suất thẩm thấu do hàm lượng đường cao gây ra, nhờ có lớp chất mang mà nấm men cố định tiếp xúc chậm hơn do đường cần có thời gian để khuếch tán từ bên ngoài vào bên trong chất mang, nhờ đó nấm men cố định ít bị ức chế hơn [11].

3. Kết luận

Từ kết quả khảo sát có thể nhận thấy rằng, nấm men cố định có tính ưu việt hơn nấm men tự do, đặc biệt nấm men cố định 2 lớp cho kết quả tối ưu hơn ■

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. A. Sheoran, B. S. Yadav, P. Nigam, and D. Singh. (1998). Continuous ethanol production from sugarcane molasses using a column reactor of immobilized *Saccharomyces cerevisiae* HAU-1." *J. Basic Microbiol.*, 38(2), 123-128.
2. S. F. Karel, S. B. Libicki, and C. R. Robertson. (1985). The immobilization of whole cells: Engineering principles. *Chem. Eng. Sci.*, 40(8), 1321-1354.
3. P. J. Verbelen, D. P. De Schutter, F. Delvaux, K. J. Verstrepen, and F. R. Delvaux. (2006). Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications." *Biotechnol. Lett.*, 28(19), 1515-1525.
4. Y. Gökşungur and N. Zorlu. (2001). Production of Ethanol from Beet Molasses by Ca-Alginate Immobilized Yeast Cells in a Packed-Bed Bioreactor." *Turkish J. Biol.*, 25(3), 265-275.
5. J. L. Galazzo and J. E. Bailey. (1990). Growing *Saccharomyces cerevisiae* in calcium-alginate beads induces cell alterations which accelerate glucose conversion to ethanol." *Biotechnol. Bioeng.*, 36(4), 417-426.
6. B. Szajáni, Z. Buzás, K. Dallmann, I. Gimesi, J. Krisch, and M. Tóth. (1996). Continuous production of ethanol using yeast cells immobilized in preformed cellulose beads. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46(2), 122-125.
7. D. Williams and D. M. Munnecke. (1981). The production of ethanol by immobilized yeast cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 23(8), 1813-1825.
8. J. L. Galazzo, J. V. Shanks, and J. E. Bailey. (1987). Comparison of suspended and immobilized yeast metabolism using ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biotechnology Techniques*, 1(1), 1-6.
9. P. Xu, A. Thomas, C. D. Gilso. (1996). Combined use of three methods for high concentration ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.*, 18(12), 1439-1440.
10. D. Balli et al. (2003). Effect of yeast cell immobilization and temperature on glycerol content in alcoholic fermentation with respect to wine making. *Process Biochem.*, 39(4), 499-506.

11. P. K. Bajpai and A. Margaritis. (1985). Kinetics of ethanol production by immobilized cells of *Zymomonas mobilis* at varying d-glucose concentrations, "Enzyme Microb. Technol.", 7(9), 462-464.

Ngày nhận bài: 6/6/2020

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 16/6/2020

Ngày chấp nhận đăng bài: 26/6/2020

Thông tin tác giả:

PHAN THỊ KIỀU LINH

Khoa Kỹ thuật thực phẩm và môi trường

Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

**THE EFFECT OF THE YEAST IMMOBILIZATION
TECHNIQUE OF *SACCHAROMYCES CEREVISIEA*
YEAST ON GRAPE - MULBERRY WINE FERMENTATION**

● **PHAN THI KIEU LINH**

Faculty of Environmental and Food Engineering
Nguyen Tat Thanh University

ABSTRACT:

This paper examines the effect of the yeast immobilization technique of *Saccharomyces cerevisiea* yeast on grape - mulberry wine fermentation (ratio 8: 2) including the comparison of free and immobilized yeasts in 1-layer and 2-layer alginate gel. The results show that the cell fixation conditions are more favourable than the cells in free yeast conditions by evaluating the use of ethanol biosynthesis glucose. This is because the immobilized yeast is protected by a layer that is less affected by the environmental pH, supporting the immobilized yeast to release intracellular ethanol. The released intracellular ethanol of the yeast in 1-layer and 2-layer alginate gel with 16% (v/v) and 17.35% (v/v), respectively. These values are higher than that of free yeast with 13% (v/v).

Keywords: Ethanol, immobilized yeast, grape wine, mulberry wine.