

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA NGUYÊN LIỆU GẠO, NẤM MEN VÀ ENZYME ĐƯỜNG HÓA ĐẾN HIỆU SUẤT LÊN MEN TRONG QUY TRÌNH SẢN XUẤT CỒN KHÔNG GIA NHIỆT Ở NỒNG ĐỘ CHẤT KHÔ CAO

Tiền Tiến Nam^{1,2,*}, Nguyễn Tiến Cường¹,

Nguyễn Chính Nghĩa¹, Phạm Tuấn Anh¹, Chu Kỳ Sơn^{1,*}

TÓM TẮT

Nghiên cứu tập trung vào việc lựa chọn nguyên liệu gạo, nấm men và enzyme đường hóa cho quy trình lên men sản xuất cồn không gia nhiệt ở nồng độ chất khô cao (310,8 g/L). Năm loại gạo (OM5451, Bụi sữa, IR64, 404 và Hàm Châu), ba chế phẩm nấm men khô (Ethanol Red®, Thermosacc®, Angel super alcohol) và bốn chế phẩm enzyme đường hóa (Amigase Mega L, Distillase ASP, GA-260, Spirizyme) được lựa chọn để khảo sát trong. Gạo 404 có hàm lượng tinh bột cao nhất (79,04%), giá thành thấp nhất và là loại gạo được sản xuất với sản lượng lớn. Sau 120 giờ lên men nồng độ cồn đạt được của gạo 404 là 17,15% v/v (hiệu suất lên men 86,1%) và không có sự khác biệt so với nồng độ cồn thu được đối với gạo IR64 và OM5451. Nghiên cứu chỉ ra nguyên liệu gạo có hàm lượng amylose cao có xu hướng đạt độ cồn thấp hơn so với gạo có hàm lượng amylose thấp. Nấm men Ethanol Red® cho khả năng lên men hiệu quả nhất, khối lượng nấm men sử dụng thấp nhất là 0,92 g/L. Ở 120 giờ lên men enzyme Amigase Mega L cho độ cồn cao nhất là 17,23% v/v (tương ứng với hiệu suất lên men 86,56%). Các kết quả nghiên cứu này là cơ sở để hoàn thiện các thông số công nghệ cho quy trình sản xuất cồn không gia nhiệt ở nồng độ chất khô cao từ gạo.

Từ khóa: *Enzyme đường hóa, gạo, nấm men, nồng độ chất khô cao, sản xuất cồn không gia nhiệt.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Quy trình sản xuất cồn không gia nhiệt ở nồng độ chất khô cao hay còn gọi là quy trình dịch hóa, đường hóa và lên men đồng thời ở nồng độ chất khô cao (SLSF-VHG) đã và đang được các nhà nghiên cứu trong và ngoài nước tập trung nghiên cứu. Khác với quy trình sản xuất cồn truyền thống là nguyên liệu tinh bột cần trải qua quá trình hồ hoá ở nhiệt độ cao nhằm tạo thuận lợi cho quá trình đường hoá bởi enzyme sau này. Trong quy trình SLSF-VHG, quá trình thủy phân tinh bột được thực hiện ở nhiệt độ thường (30-32°C), nhờ hệ enzyme thế hệ mới có thể thủy phân tinh bột

sống ở trạng thái chưa bị hồ hóa [1, 2]. Ưu điểm của quy trình này là tiết kiệm được năng lượng, giảm chi phí đầu tư cho thiết bị, giảm tổn thất do quá trình nấu chín nguyên liệu và tăng năng suất tạo cồn [1].

Ở Việt Nam, nguồn nguyên liệu sản xuất cồn phổ biến là gạo, ngô và sắn. Trong đó gạo được sử dụng là nguyên liệu chính để sản xuất rượu truyền thống và sản xuất cồn ở quy mô công nghiệp. Một số nghiên cứu quy trình SLSF-VHG để sản xuất cồn từ nguyên liệu gạo ở Việt Nam cho kết quả khả quan và cho thấy, tiềm năng lớn để ứng dụng trong sản xuất cồn thực phẩm [2]. Ảnh hưởng của thành phần nguyên liệu quyết định đến hiệu quả lên men và là yếu tố quyết định đến giá thành sản xuất cồn. Tuy nhiên, đến nay chưa có nghiên cứu nào lựa chọn loại gạo phù hợp cho quy trình SLSF-VHG ở Việt Nam.

¹ Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ thực phẩm, Đại học Bách khoa Hà Nội

² Trung tâm Thí nghiệm Thực hành, Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm thành phố Hồ Chí Minh

*Email: son.chuky@hust.edu.vn; namtt@hufi.edu.vn

Enzyme đường hoá thủy phân tinh bột sống Stargen 002 được cấu thành bởi hệ hai enzyme (α -amylase và glucoamylase), enzyme này có giá thành khá cao. Ở nồng độ chất khô cao, để giảm chi phí trong quá trình sản xuất cồn, nghiên cứu này sử dụng thêm enzyme đường hoá để hỗ trợ cho enzym Stargen 002 [2].

Bên cạnh đó, việc nghiên cứu lựa chọn loại nấm men, enzyme đường hóa phụ trợ cho quy trình SLSF-VHG cũng chưa được nghiên cứu đầy đủ. Do đó, nghiên cứu này tập trung đánh giá ảnh hưởng và lựa chọn loại gạo phù hợp với quy trình SLSF-VHG cũng như sàng lọc, lựa chọn chế phẩm nấm men, chế phẩm enzyme đường hóa phù hợp cho quy trình lên men không gia nhiệt ở nồng độ chất khô cao.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Năm loại gạo OM5451, Bụi Sưa, IR64, 404 (IR50404) và Hàm Châu có nguồn gốc ở các tỉnh miền Tây Nam bộ được dùng trong nghiên cứu. Gạo được nghiền bằng máy nghiền búa qua lưới kích thước 0,3 mm và được phân tích các chỉ tiêu chất lượng độ ẩm, hàm lượng tinh bột, protein và amylose.

Ba chế phẩm nấm men (*Saccharomyces cerevisiae*) được sử dụng trong nghiên cứu là ER (Ethanol Red®, Fermentis, Pháp), TD (Thermosacc® Dry, Lallemand, Mỹ) và AS (Angel super alcohol active dry yeast, Angel, Trung Quốc). Mật độ tế bào sống của các nấm men ER, TD và AS tương ứng là $3,8 \times 10^{10}$; $2,7 \times 10^{10}$ và $2,9 \times 10^{10}$ tế bào/g.

Chế phẩm enzyme dùng cho nghiên cứu bao gồm: enzyme thủy phân bột gạo sống Stargen 002 (Dupont, Mỹ) có hoạt độ glucoamylase theo nhà sản xuất cung cấp là 570 GAU/g. Các enzyme đường hóa phụ trợ có đặc tính glucoamylase được sử dụng để tăng cường khả năng đường hóa trong dịch lên men ở nồng độ chất khô cao là AML (Amigase Mega L, DSM, Hà Lan) hoạt độ 646

GAU/g, DA (Distillase ASP, Dupont, Mỹ) hoạt độ 845 GAU/g, GA-260 (Angel, Trung Quốc) hoạt độ 516 GAU/g và SC (Spirizyme, Novozymes, Đan Mạch) có hoạt độ 704 GAU/g. Chế phẩm enzyme protease là Fermgen 2.5X (Dupont, Mỹ) có hoạt độ 2500 SAPU/g.

2.2. Bố trí thí nghiệm

2.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của các loại gạo trong quy trình SLSF-VHG

Quy trình dịch hóa, đường hóa và lên men đồng ở nồng độ chất khô cao (>300 g/L) được thực hiện theo quy trình của Chu Kỳ và cs (2016) với một số điều chỉnh nhỏ [2]. Năm loại bột gạo (RF) là OM5451, Bụi Sưa, IR64, 404 (IR50404) và Hàm Châu được hòa trộn với nước trong các bình lên men 1 L để đạt được nồng độ chất khô 310,8 g/L. pH của dịch bột được điều chỉnh về 4,5 bằng dung dịch H_2SO_4 10% [1]. Bổ sung các chế phẩm enzyme bao gồm Stargen 002 (1130 GAU/kg RF), Amigase Mega L (0,035% w/w), Fermgen 2.5X (600 SAPU/kg RF), nấm men Ethanol Red® ($3,5 \times 10^7$ tế bào/mL), urea (16 mM) và KH_2PO_4 (4,8 mM). Quy trình SLSF-VHG được thực hiện ở nhiệt độ 30°C trong 120 giờ. Nấm men được hoạt hóa với nước ở 35°C trong 20 phút trước khi cấp giống cho dịch lên men. Trong 24 giờ đầu dịch lên men được khuấy trộn liên tục với tốc độ khuấy 50 vòng/phút.

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của loại chế phẩm nấm men trong quy trình SLSF-VHG

Quy trình được thực hiện với lượng enzyme, hóa chất, điều kiện lên men tương tự như mục 2.2.1. Thí nghiệm này sử dụng ba chế phẩm nấm men ER, TD và AS để lựa chọn nấm men cho quy trình SLSF-VHG. Chỉ tiêu xác định là độ cồn và hiệu suất lên men. Nấm men có hiệu quả lên men cao nhất được dùng cho nghiên cứu tiếp theo.

2.2.3. Khảo sát lựa chọn chế phẩm enzyme đường hóa phụ trợ cho quy trình SLSF - VHG

Loại gạo và nấm men cho hiệu quả lên men cao nhất được dùng cho thí nghiệm này. Quy trình

được thực hiện tương tự như mục 2.2.2 với bốn loại enzyme glucoamylase là AML, DA, GA-260 và SC. Một quy trình đối chứng (Control) là quy trình không sử dụng enzyme đường hóa phụ để so sánh đánh giá hiệu quả của các enzyme khảo sát.

2.3. Phương pháp phân tích

Xác định độ ẩm theo AOAC 930.04 (2000), protein xác định bằng phương pháp Kjeldahl, hàm lượng amylose được xác định theo Juliano (1971) [3].

Hàm lượng tinh bột, đường tổng trong mẫu gạo được xác định dựa trên nguyên tắc thủy phân tinh bột thành đường bằng axit HCl 2% [4], xác định hàm lượng đường bằng phương pháp sử dụng thuốc thử DNS (3,5-dinitro salicylic acid) [5]. Mẫu đường khử được ly tâm ở 4.000 x g trong 10 phút, phân dịch trong được pha loãng đến nồng độ thích hợp và được xác định nồng độ đường bằng phương pháp DNS.

Xác định nồng độ cồn bằng phương pháp chưng cất. Đo nồng độ cồn bằng máy đo cồn Snap 51 (Anton Paar GmbH, Áo). Tính toán hiệu suất lên men theo Chu Kỳ và cs (2016) [2].

Chi phí sản xuất cồn được tính từ tổng nguyên liệu, nấm men, enzyme, chất bổ sung cho 1 L dịch lên men, quy về chi phí sản xuất 1 L cồn tuyệt đối, đơn giá theo giá bán lẻ trên thị trường.

μ_{max} được xác định dựa trên đường cong sinh trưởng của nấm men, năng suất tạo cồn Q_P được tính theo Krajanc và cs (2021) [6]; sản lượng cồn/đơn vị đường glucose ban đầu $Y_{P/S}$ được tính theo Chan-u-tit và cs (2013) [7].

Mật độ tế bào nấm men được xác định bằng phương pháp đếm trực tiếp bằng buồng đếm Neubauer cải tiến (Đức) với thuốc nhuộm xanh methylen [8].

2.4. Xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, kết quả được thể hiện bằng giá trị trung bình và độ lệch chuẩn. Kết quả thực nghiệm được phân tích phương sai (ANOVA) với mức khác biệt có ý nghĩa 95% ($p \leq 0,05$). Phần mềm xử lý thống kê được sử dụng là Statgraphics Centurion 19 (Statgraphics Technologies, Inc. Plains, Virginia, Mỹ).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của loại gạo trong quy trình SLSF-VHG đến hiệu suất lên men

Bảng 1. Thành phần dinh dưỡng gạo nguyên liệu cho sản xuất cồn

Loại gạo	Thành phần dinh dưỡng (%)			
	Độ ẩm	Tinh bột	Protein	Amylose*
OM5451	11,80±0,27	77,71±0,58	8,41±0,25	19,33±0,14
Bụi Sưa	11,82±0,19	75,21±0,30	7,16±0,15	22,16±0,50
IR64	11,23±0,25	77,49±0,85	7,52±0,33	18,21±0,11
404 (IR50404)	11,20±0,16	79,04±0,69	6,72±0,14	26,32±0,08
Hàm Châu	11,37±0,46	77,11±0,31	8,84±0,38	32,71±0,25

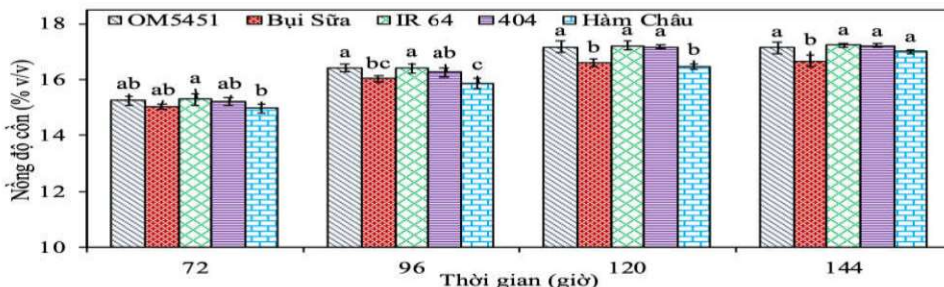
Ghi chú: * % khối lượng chất khô.

Cả năm loại gạo đều có màu sắc tự nhiên, không lẫn tạp chất, nấm mốc, mối mọt và mùi vị lạ. Hàm lượng tinh bột trong gạo là chỉ tiêu quan trọng nhất quyết định đến năng suất tạo sản phẩm trong công nghệ sản xuất cồn. Theo kết quả phân tích ở bảng 1, tất cả năm mẫu gạo đều có hàm lượng tinh bột cao (trên 75%). Trong đó gạo 404

cho hàm lượng tinh bột cao nhất (79,04%), gạo Bụi Sưa có hàm lượng tinh bột thấp nhất (75,21%) trong các mẫu khảo sát. Hàm lượng protein các loại gạo dao động trong khoảng giá trị 6,72% đến 8,84%. Hàm lượng amylose liên quan đến tính chất loại gạo, gạo có hàm lượng amylose thấp sẽ có đặc tính dẻo, mềm khi được nấu chín, ngược lại hàm lượng amylose cao sẽ cho cơm có đặc tính khô,

cứng [9]. Theo Juliano (1979), gạo được xem là có hàm lượng amylose thấp (9 - 20%), hàm lượng amylose trung bình (20 - 25%) và hàm lượng amylose cao (25 - 33%) [10]. Hai loại gạo dẻo IR64 và OM5451 thuộc loại có hàm lượng amylose thấp, tương ứng là 18,21% và 19,33%. Gạo Bụi Sưa có đặc tính nở, mềm với hàm lượng amylose trung bình 22,16%. Hai loại gạo có hàm lượng amylose cao có

đặc tính nở, xốp là 404 và Hàm Châu với hàm lượng amylose tương ứng là 26,32% và 32,71%. Các loại gạo đều có độ ẩm trong khoảng 11% - 12%. Như vậy, các chỉ tiêu cơ bản của năm loại gạo đều có giá trị phù hợp để làm nguyên liệu trong quy trình SLSF-VHG. Mục tiêu là lựa chọn được loại gạo cho sản lượng cồn cao với chi phí thấp nhất.



Hình 1. Nồng độ cồn tạo thành trong dịch lên men theo loại gạo trong quy trình SLSF-VHG

Ghi chú: Các ký tự a, b, c tại mỗi mốc thời gian thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Kết quả nồng độ cồn tạo ra trong quá trình lên men của năm mẫu gạo khảo sát được trình bày trong hình 1. Tại 72 giờ, ngoại trừ mẫu gạo Hàm Châu có nồng độ cồn thấp nhất 14,98% v/v, các mẫu gạo còn lại đều có nồng độ cồn trên 15% v/v. Sau đó, nồng độ cồn của các mẫu khảo sát tiếp tục tăng cho đến 120 giờ độ cồn của năm mẫu gạo đạt giá trị xấp xỉ 17% v/v. Để xác định thời gian kết thúc lên men, các mẫu được theo dõi nồng độ cồn đến 144 giờ. Theo kết quả phân tích ANOVA, nồng độ cồn của từng mẫu gạo theo thời gian có sự khác nhau từ 72 - 120 giờ với mức ý nghĩa $p < 0,05$. Các loại gạo OM5451, Bụi Sưa, IR64 và 404 có thời gian kết thúc lên men ở 120 giờ. Riêng gạo Hàm Châu kết quả phân tích ANOVA cho thấy, thời gian lên men kéo dài hơn và kết thúc quá trình lên men ở 144 giờ ($p < 0,05$). Ở 120 giờ lên men, nồng độ cồn của gạo IR64 cao nhất (17,20% v/v) nhưng không khác biệt ($p > 0,05$) so với gạo OM5451 (17,17% v/v) và 404 (17,15% v/v), cả ba loại gạo này có nồng độ cồn cao hơn ($p < 0,05$) so với hai mẫu gạo Bụi Sưa và Hàm Châu với nồng độ cồn tương ứng là 16,60 và 16,46% v/v.

Hàm lượng tinh bột và đặc điểm cấu tạo tinh bột (hàm lượng amylose) có ảnh hưởng lớn đến nồng độ cồn và hiệu suất lên men trong quy trình SLSF-VHG. Gạo có hàm lượng tinh bột cao có xu hướng tạo độ cồn cao khi kết thúc quá trình lên men (OM5451, IR64 và 404). Tuy nhiên, gạo Hàm Châu cho độ cồn thấp và thời gian lên men dài hơn mặc dù có hàm lượng tinh bột cao hơn gạo Bụi Sưa. Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng hàm lượng amylose có liên quan đến khả năng tiêu hóa của tinh bột, hàm lượng amylose cao làm khả năng kháng tiêu hóa của tinh bột cao hơn [11, 12]. Điều này giải thích nguyên nhân gạo IR64 cho độ cồn cao nhất tương ứng với lượng amylose thấp nhất (18,21%), trong khi gạo Hàm Châu cho độ cồn thấp và thời gian lên men kéo dài khi có hàm lượng amylose cao nhất (32,71%). Đánh giá hiệu suất lên men tại 120 giờ cho thấy gạo IR64 có hiệu suất lên men cao nhất (88,1%) sau đó là OM5451, Bụi Sưa, 404 (tương ứng hiệu suất 87,7; 87,6; 86,1%) và hiệu suất lên men thấp nhất là Hàm Châu (84,7%).

Bảng 2. Chi phí sản xuất cồn theo loại gạo

Thành phần		Lượng dùng	Đơn giá (đồng/kg)	Thành tiền (đồng)	
Stargen 002 (g)		0,53	188.000	100,4	
Fermgen 2.5X (g)		0,12	700.000	87,0	
Amygase Mega L (g)		0,11	345.000	38,0	
Nấm men (g)		0,92	275.000	253,0	
Urea (g)		0,98	18.000	17,6	
KH ₂ PO ₄ (g)		0,66	45.000	29,7	
Tổng cộng (chi phí enzyme, nấm men, chất bổ sung)*				525,7	
Loại gạo	OM5451	Bụi Sữa	IR 64	404	Hàm Châu
Lượng sử dụng (g)	352,4	352,5	350,1	350,0	350,7
Đơn giá (VNĐ/kg)	12.000	11.000	12.000	9.500	12.000
Thành tiền (VNĐ)**	4.228	3.877	4.202	3.325	4.208
CP1 = * + ** (VNĐ)	4.754	4.403	4.727	3.851	4.734
CP2 (VNĐ)	27.683	26.522	27.479	22.449	28.754

Ghi chú: CP1: chi phí sản xuất 1 L dịch lên men; CP2: chi phí sản xuất quy về sản xuất 1 L cồn tuyệt đối.

Như vậy, hiệu suất lên men tỉ lệ nghịch với hàm lượng amylose trong quy trình SLSF-VHG. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với nghiên cứu của Wu và cs (2006), hiệu suất lên men ngô nếp (7,5% amylose) tăng 0,9% so với ngô thường (22,8% amylose), đối với lúa mì nếp hiệu suất cao hơn 5% so với lúa mì thông thường [13]. Một số nghiên cứu khác cũng cho kết quả tương tự khi đánh giá ảnh hưởng của hàm lượng amylose đến hiệu suất lên men trên nguyên liệu tinh bột mì và gạo [14, 15]. Ngoài ra, hoạt tính của amylase đối với gạo hàm lượng amylose thấp cao hơn gạo có hàm lượng amylose cao, tinh bột trong gạo amylose thấp có nhiều chuỗi mạch ngắn hơn nên dễ bị thủy phân bởi amylase thành các mạch ngắn do đó tạo lượng đường hòa tan nhiều hơn [15].

Chi phí sản xuất cồn được thể hiện trong bảng 2. Trên cơ sở thành phần nguyên liệu của quá trình lên men, xem như các chi phí điện, nước và các chi phí khác như nhau cho các loại gạo. Gạo 404 có giá thành thấp nhất nên có chi phí sản xuất

1 L dịch lên men thấp nhất (3.851 đồng). Nếu tính trên cơ sở lượng cồn tạo ra trong 1 L dịch lên men quy về chi phí sản xuất ra 1 L cồn tuyệt đối thì gạo 404 có chi phí sản xuất thấp nhất (22.449 đồng) và chi phí cao nhất là gạo Hàm Châu (28.754 đồng).

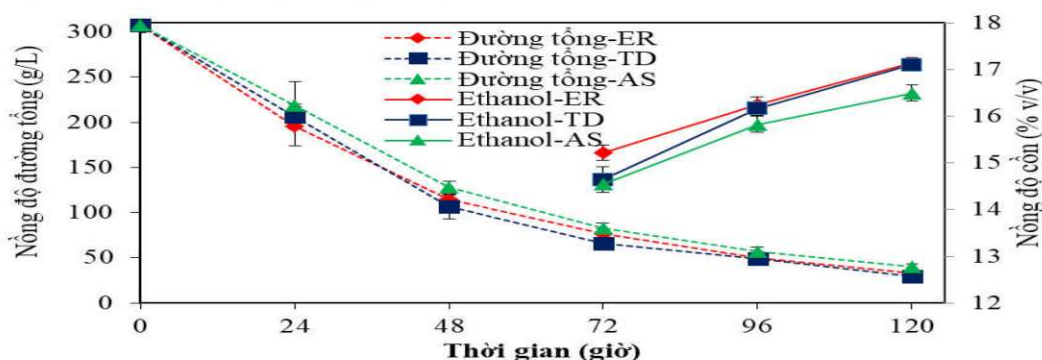
Gạo 404 có hàm lượng tinh bột cao nhất trong năm loại gạo. Khi áp dụng quy trình SLSF-VHG, mặc dù hiệu suất lên men còn thấp (86,1%) nhưng độ cồn đạt được tương đương với gạo IR64 và OM5451 và cao hơn so với hai loại gạo Bụi Sứa và Hàm Châu. Gạo 404 được sử dụng làm nguyên liệu trong nhiều lĩnh vực công nghiệp chế biến (làm bún, phở, bột gạo, bếp ăn công nghiệp...) nên cũng rất phù hợp làm nguyên liệu cho sản xuất cồn ở quy mô công nghiệp. Ngoài ra, yếu tố về giá nguyên liệu là yếu tố quyết định đến chi phí sản xuất và giá thành sản phẩm. Theo đó giá gạo 404 thấp hơn 500 đồng/kg so với tất cả bốn loại gạo còn lại, chi phí cho sản xuất 1 L cồn tuyệt đối cũng thấp nhất. Gạo 404 còn có tiềm năng nâng cao độ

cồn và hiệu suất lên men khi tối ưu các yếu tố công nghệ cho quy trình SLSF-VHG.

3.2. Ảnh hưởng của chế phẩm nấm men trong quy trình SLSF-VHG

Nấm men ER cho khả năng sử dụng đường hiệu quả hơn trong 24 giờ lên men so với nấm men TD và AS (Hình 2). Nồng độ đường tổng trong dịch lên men ở 24 giờ của ER, TD và AS lần lượt là 195,6; 206,6 và 218,9 g/L. Từ 48 giờ trở đi, ER và TD có sự tiêu thụ đường tổng tương đương nhau

($p > 0,05$), ở 120 giờ nồng độ đường tổng tương ứng của hai nấm men này là 32,9 và 29,8 g/L. AS cho thấy, hiệu quả sử dụng đường thấp hơn, nồng độ đường tổng trong dịch lên men luôn cao hơn so với ER và TD và ở 120 giờ nồng độ đường tổng còn sót lại của AS khá cao với giá trị là 40,0 g/L. Kết quả này chứng tỏ rằng, môi trường VHG ảnh hưởng khá nhiều đến khả năng hoạt động của nấm men AS.



Hình 2. Biến đổi độ cồn và đường tổng theo loại nấm men

Nồng độ cồn của ba loại nấm men khảo sát được trình bày trong hình 2. ER duy trì nồng độ cồn cao nhất từ 72 giờ đến khi kết thúc quá trình lên men. TD có độ cồn thấp hơn ER ở 72 giờ nhưng sau đó tăng nhanh và tương đương với độ cồn của ER ở 96 giờ và 120 giờ. Độ cồn của AS luôn thấp hơn hai loại nấm men còn lại ($p < 0,05$). Cả ba loại nấm men có độ cồn thay đổi không đáng kể sau 120 giờ (dữ liệu không hiển thị) cho thấy, quá trình lên men đều kết thúc ở 120 giờ. Để đánh giá hiệu quả lên men, các thông số đường khử (120 giờ), năng suất tạo cồn (Q_p), sản lượng cồn/đơn vị đường glucose ($Y_{p/s}$), hiệu suất lên men (E) của ba loại nấm men đã được tính toán và so sánh (Bảng 3). Theo đó, AS có nồng độ đường khử khá cao (5,7 g/L) ở thời điểm kết thúc lên men chứng tỏ nấm men sử dụng đường chưa triệt để. ER có nồng độ đường khử cao hơn TD ($p > 0,05$). Ngoài ra, ER còn có giá trị Q_p , $Y_{p/s}$ và E cao nhất cho thấy, sự lên men hiệu quả của nấm men này. TD có các thông số trung bình Q_p , $Y_{p/s}$ và E thấp hơn so với ER nhưng không có sự khác biệt

có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) chứng tỏ khả năng lên men của hai nấm men này là tương đương nhau. AS có các thông số Q_p , $Y_{p/s}$ và E thấp hơn so với ER và TD ($p < 0,05$) cho thấy, hiệu quả lên men thấp hơn của nấm men này trong quy trình SLSF-VHG.

Đường cong sinh trưởng của nấm men được thể hiện trong hình 3. Pha lag của nấm men ER có thời gian ngắn hơn so với TD và AS cho thấy, khả năng thích nghi với môi trường SLSF-VHG của nấm men này tốt hơn, nấm men AS có thời gian thích nghi dài nhất. Thời gian thực hiện pha tăng trưởng của nấm men ER cũng ngắn nhất, chỉ sau 24 giờ lên men đường cong sinh trưởng của nấm men này đã đạt đến pha ổn định với nồng độ tế bào (tb) sống đạt $4,74 \times 10^8$ tb/mL. Thời gian đạt đến pha ổn định của nấm men TD và AS là 36 giờ (dài hơn 12 giờ so với nấm men ER) với nồng độ tế bào sống ở pha ổn định tương ứng là $5,11 \times 10^8$ và $4,00 \times 10^8$ tb/mL. Nấm men TD có nồng độ tế bào sống ở pha ổn định và pha suy vong cao nhất, trong khi nấm men AS có nồng độ tế bào ở pha ổn

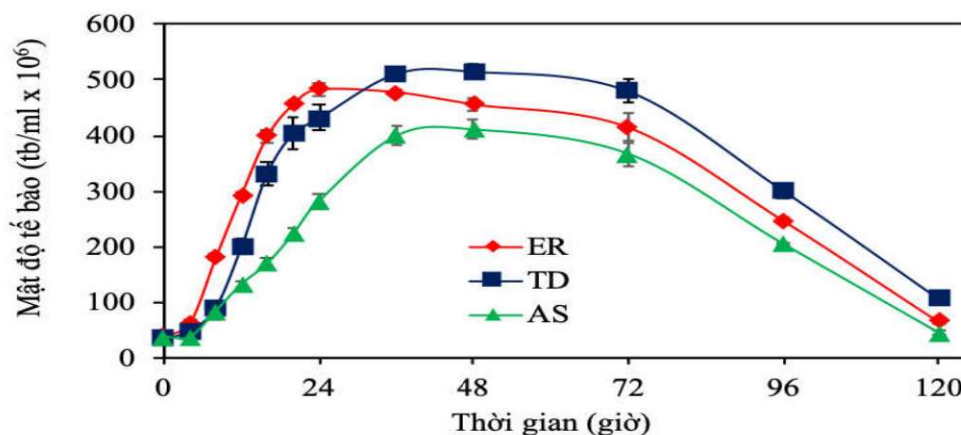
định thấp nhất và thấp nhất trong tất cả các pha của đường cong sinh trưởng so với hai nấm men còn lại. Cả ba loại nấm men đều cho thấy bắt đầu vào pha suy vong từ 72 giờ, sau đó nồng độ tế bào sống giảm rất nhanh và ở 120 giờ nồng độ tế bào sống của nấm men ER, TD và AS tương ứng là $0,66 \times 10^8$; $1,07 \times 10^8$ và $0,45 \times 10^8$ tb/mL. Nấm men TD có tốc độ tăng trưởng ($\mu_{\max}$) cao nhất là $0,163 \text{ giờ}^{-1}$ nhưng không có sự khác biệt ($p > 0,05$) so với giá

trị $\mu_{\max}$ của ER ($0,151 \text{ giờ}^{-1}$) và AS có giá trị thấp nhất $0,126 \text{ giờ}^{-1}$ (Bảng 3). Ở 120 giờ, cả ba nấm men ER, TD và AS đều có tỉ lệ tế bào chết đáng kể (87,65; 81,46 và 91,53% tương ứng) chứng tỏ quá trình lên men kết thúc. Điều này cho thấy, hàm lượng đường khử giai đoạn kết thúc lên men tăng lên do enzyme vẫn tiếp tục hoạt động thủy phân tinh bột sót trong khi nấm men hết khả năng tiêu thụ cơ chất.

Bảng 3. Thông số quá trình lên men (ở 120 giờ) của nấm men ER, TD và AS

Nấm men	Đường khử (g/L)	$\mu_{\max}$ (giờ^{-1})	Q_p ($\text{g.L}^{-1}.\text{giờ}^{-1}$)	$Y_{p/s}$ (kg.kg^{-1})	E (%)
ER	$2,258 \pm 0,213^b$	$0,151 \pm 0,011^{ab}$	$1,128 \pm 0,004^a$	$0,441 \pm 0,002^a$	$86,15 \pm 0,33^a$
TD	$1,242 \pm 0,099^c$	$0,163 \pm 0,01^a$	$1,125 \pm 0,009^a$	$0,439 \pm 0,004^a$	$85,93 \pm 0,7^a$
AS	$5,745 \pm 0,272^a$	$0,126 \pm 0,003^b$	$1,085 \pm 0,011^b$	$0,424 \pm 0,004^b$	$82,85 \pm 0,88^b$

Ghi chú: $\mu_{\max}$ = tốc độ tăng trưởng cực đại, Q_p = năng suất tạo cồn; $Y_{p/s}$ = sản lượng cồn/đơn vị đường glucose ban đầu, E = hiệu suất lên men. Giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (SD) của ba thí nghiệm lặp lại. Ký hiệu (a, b, c) trên mỗi cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với mức $p < 0,05$.



Hình 3. Đường cong sinh trưởng của nấm men ER, TD và AS

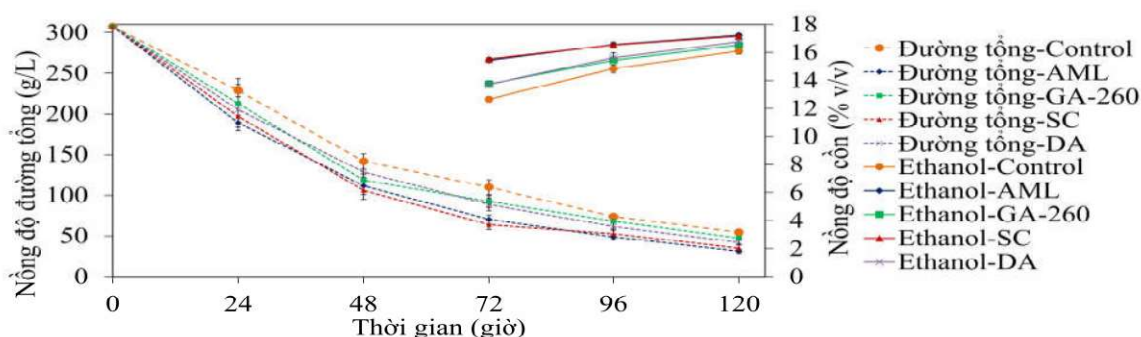
Kết quả lên men của nấm men ER trong nghiên cứu này tương tự như kết quả nghiên cứu trước đó của Chu Kỳ và cs (2016) [2]. Với quy trình SLSF-VHG ở nồng độ bột gạo 311,5 g/L, sử dụng nấm men Ethanol Red cho kết quả thời gian lên men 120 giờ, độ cồn đạt được 17,6% v/v tương đương với hiệu suất lên men 86,3%. Nấm men ER có độ cồn, Q_p , $Y_{p/s}$ và E cao nhất trong ba loại nấm men khảo sát. Nấm men TD mặc dù có nồng độ nấm men cao hơn ER nhưng độ cồn, đường sót và

đường khử khi kết thúc quá trình lên men thấp hơn; kết quả này có thể do khả năng chuyển hóa đường thành cồn hoặc khả năng nấm men sử dụng đường để chuyển thành sinh khối. Nấm men AS cho thấy hiệu quả thấp nhất về độ cồn, năng suất, hiệu suất lên men, nồng độ nấm men... nấm men này có hiệu quả hoạt động thấp trong quy trình SLSF-VGH. Theo Stanley và cs (2010), biểu hiện kiểu gen, quá trình sinh tổng hợp các chất phản ứng với điều kiện khắc nghiệt của môi trường, cơ

sở di truyền và đột biến của nấm men có ảnh hưởng đến hiệu quả lên men [16]. Do đó, mặc dù điều kiện lên men giống nhau về cơ chất, enzyme và nồng độ nấm men nhưng kết quả lên men của ER, TD và AS cũng có sự khác biệt do đặc điểm từng loại nấm men thương mại. Nấm men Ethanol Red (ER) có độ cồn và hiệu suất lên men cao nhất, khả năng thích ứng với môi trường SLSF-VHG nhanh, thời gian sử dụng đến pha cân bằng của đường cong sinh trưởng nấm men ngắn, hiệu quả sử dụng đường tốt hơn hai nấm men TD và AS. Ngoài ra, nấm men Ethanol Red có khối lượng sử dụng trên một đơn vị thể tích dịch lên men thấp hơn so với hai nấm men còn lại (0,92 g/L so với 1,28 và 1,20 g/L của TD và AS). Do đó, nghiên cứu này lựa chọn nấm men Ethanol Red cho các nghiên cứu tiếp theo trong quy trình SLSF-VHG.

3.3. Ảnh hưởng của loại chế phẩm enzyme đường hóa phụ trợ trong quy trình SLSF-VHG đến hàm lượng đường tổng và hiệu suất lên men

Enzyme đường hóa chính trong quy trình SLSF-VHG là enzyme Stargen 002 có cả hai hoạt tính alpha-amylase và glucoamylase. Trong quá trình lên men cần thêm enzyme đường hóa để hỗ trợ thủy phân các dextrin thành đường khử [2]. Trong thí nghiệm này, bốn loại enzyme đường hóa mang đặc tính glucoamylase là AML, GA-260, SC, DA được so sánh khả năng hỗ trợ quá trình lên men bằng quy trình SLSF-VHG với cùng lượng hoạt tính của enzyme glucoamylase là 226,1 GAU/kg nguyên liệu khô (tương đương với 0,035% w/w lượng sử dụng enzyme AML) [2] và quy trình đối chứng Control. Các chỉ tiêu xác định là đường tổng, đường khử, độ cồn, thời gian và hiệu suất lên men.



Hình 4. Ảnh hưởng enzyme đường hóa phụ trợ đến hàm lượng đường tổng và hiệu suất lên men

Ảnh hưởng của enzyme đường hóa phụ trợ đến biến đổi đường tổng và nồng độ cồn trong dịch lên men được trình bày trong hình 4. Tất cả các mẫu thí nghiệm đều có nồng độ đường tổng giảm nhanh trong 72 giờ đầu lên men. Ở 72 giờ nồng độ đường tổng của bốn thí nghiệm có enzyme phụ trợ đều có giá trị dưới 100 g/L, trong khi mẫu Control có nồng độ đường tổng trên 110 g/L. Nồng độ đường tổng của mẫu Control cao nhất trong hầu hết thời gian lên men. Biến đổi đường tổng của GA-260 và DA tương đương nhau ($p > 0,05$). Tương tự, biến đổi đường tổng của AML và SC cũng có giá trị tương đương nhau. Từ sau 24

giờ lên men, nồng độ đường tổng khi dùng AML và SC thấp hơn so với sử dụng hai enzyme GA-260 và DA ($p < 0,05$). Kết thúc lên men, nồng độ đường tổng khi có mặt của các enzyme AML, SC, GA-260, DA và Control lần lượt là 31,2; 34,9; 47,6 và 42,1; 54,6 g/L. Tương tự như biến đổi đường tổng, nồng độ cồn từ 72 - 120 giờ khi sử dụng enzyme AML và SC tương đương nhau ($p > 0,05$) và cao hơn ($p < 0,05$) so với khi sử dụng hai enzyme GA-260 và DA, mẫu Control có nồng độ thấp nhất. Cả bốn enzyme cho thấy, khả năng kết thúc lên men ở 120 giờ (khi so sánh với nồng độ cồn ở 144 giờ, dữ liệu không hiển thị). AML và SC lên men hiệu quả hơn

khi độ cồn ở 120 giờ lần lượt là 17,23 và 17,16% v/v, trong khi hai enzyme GA-260 và DA có độ cồn ở 120 giờ thấp hơn tương ứng với giá trị 16,53 và 16,76% v/v. Mẫu Control có độ cồn thấp nhất 16,10% v/v và vẫn cho thấy khả năng tiếp tục lên men chậm sau 120 giờ.

Các enzyme đường hóa phụ trợ có ảnh hưởng đến sự biến đổi nồng độ đường khử trong dịch lên men, kết quả được trình bày trong bảng 4. Theo xu hướng chung của quy trình SLSF-VHG là nồng độ đường khử của tất cả các thí nghiệm đều duy trì ở mức thấp (dưới 3,5 g/L). Enzyme AML cho thấy, có nồng độ đường khử hầu như cao hơn ($p < 0,05$) trong suốt thời gian lên men (ngoại trừ ở 48 giờ lên men tương đương với nồng độ đường khử của SC) so với các enzyme còn lại, SC có nồng độ đường khử thấp hơn một chút so với AML. DA, GA-260 và Control có nồng độ đường khử thấp (dưới 1 g/L) trong suốt quá trình lên men. Mặc dù nồng độ đường khử của mẫu Control thấp nhất nhưng không có sự khác biệt ($p > 0,05$) so với DA, GA-260 trong hầu hết quá trình lên men. Sau 96 giờ lên

men nồng độ đường khử AML và SC có xu hướng tăng nhẹ nhưng không quan sát được hiện tượng tương tự ở hai enzyme DA, GA-260 và Control.

Theo Devantier và cs (2005), nấm men Ethanol Red sử dụng đường khử (chủ yếu là glucose, maltose và maltotriose) làm cơ chất cho quá trình lên men, việc duy trì nồng độ đường khử thấp bằng cách phân cắt từ từ các DP4+ trong điều kiện nồng độ chất khô cao giúp giảm ảnh hưởng của áp suất thẩm thấu đến nấm men trong quy trình SSF [17]. Tuy nhiên, có khả năng hai enzyme DA và GA-260 xúc tác ở nhiệt độ lên men trong quy trình SLSF-VHG thấp (trong khi nhiệt độ tối ưu theo nhà sản xuất công bố là 60°C), nên lượng đường khử tạo ra không đáp ứng kịp so với nhu cầu của nấm men nên khả năng lên men thấp. Trong khi hai enzyme AML và SC tạo ra và duy trì lượng đường khử cao hơn nên khả năng và hiệu quả lên men cao hơn so với hai enzyme còn lại. Thí nghiệm Control ở nồng độ chất khô cao làm giảm nhanh hoạt tính của enzyme đường hóa chính nên khả năng thủy phân bột gạo sống thấp.

Bảng 4. Ảnh hưởng enzyme đường hóa phụ trợ đến hàm lượng đường khử

Enzyme	Thời gian lên men (giờ), nồng độ đường khử (g/L)				
	24	48	72	96	120
AML	3,30±0,33 ^a	3,02±0,25 ^a	2,57±0,14 ^a	1,45±0,20 ^a	1,94±0,12 ^a
GA-260	0,700±0,09 ^c	0,88±0,11 ^b	0,82±0,08 ^c	0,87±0,07 ^b	0,89±0,04 ^c
SC	2,74±0,29 ^b	2,62±0,48 ^a	2,19±0,33 ^b	1,01±0,09 ^b	1,39±0,15 ^b
DA	0,85±0,08 ^c	0,96±0,05 ^b	0,99±0,03 ^c	0,98±0,02 ^b	0,90±0,05 ^c
Control	0,69±0,08 ^c	0,80±0,08 ^c	0,75±0,18 ^c	0,59±0,10 ^c	0,75±0,10 ^c

Ghi chú: Giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (SD) của ba thí nghiệm lặp lại. Ký hiệu (a, b, c) trên mỗi cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với mức $p < 0,05$.

Enzyme đường hóa Amigase® Mega L (AML) có hiệu quả cao nhất trong việc nâng cao độ cồn và hiệu suất lên men so với các enzyme đường hóa SC, DA và GA-260. Ở 120 giờ lên men, nồng độ cồn khi dùng enzyme AML là 17,23% v/v tương ứng với hiệu suất lên men 86,56%. Enzyme AML có sự

giảm nhanh nồng độ đường tổng và nồng độ đường luôn cao hơn so với ba enzyme đường hóa còn lại trong thí nghiệm này chứng tỏ khả năng thủy phân hiệu quả các dextrin trong dịch lên men tạo cơ chất cho hoạt động của nấm men trong quy trình SLSF-VHG. Do đó, nghiên cứu này lựa chọn

enzyme đường hóa AML cho các nghiên cứu tiếp theo trong quy trình sản xuất cồn không gia nhiệt ở nồng độ chất khô cao.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã đánh giá ảnh hưởng của năm loại gạo đến hiệu quả lên men trong qui trình SLSF-VHG. Gạo 404 có hàm lượng tinh bột, chi phí tốt nhất phù hợp với trình sản xuất cồn thực phẩm. Nghiên cứu cũng đã lựa chọn được chế phẩm nấm men Ethanol Red cho hiệu quả lên men cao, chịu được nồng độ cồn lớn. Kết quả khảo sát enzyme đường hóa phụ trợ cho thấy, Amigase Mega L có khả năng hỗ trợ đường hóa hiệu quả trong quy trình lên men không gia nhiệt với hiệu suất lên men cao nhất đạt 86,56%, thời gian lên men 120 giờ. Các kết quả nghiên cứu này cho thấy, tiềm năng để ứng dụng công nghệ sản xuất cồn không gia nhiệt ở nồng độ chất khô cao trong sản xuất cồn từ gạo tại Việt Nam.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được Bộ Khoa học và Công nghệ tài trợ thông qua đề tài độc lập mã số ĐTĐL.CN-07/20.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. V. Gohel, G. Duan (2012). *No-Cook Process for ethanol production using Indian broken rice and pearl millet*. Int. J. Microbiol., 2012, <https://doi.org/10.1155/2012/680232>.
- S. Chu-Ky, T. H. Pham, K. L. T. Bui, T. T. Nguyen, K. D. Pham, H. D. T. Nguyen, H. N. Luong, V. P. Tu, T. H. Nguyen, P. H. Ho, T. M. Le (2016). *Simultaneous liquefaction, saccharification and fermentation at very high gravity of rice at pilot scale for potable ethanol production and distillers dried grains composition*. Food Bioprod. Process., 98, pp.79–85, <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.10.003>.
3. B.. Juliano (1971). *A Simplified Assay for Milled-Rice Amylose*. Am. Assoc. Cereal Chem., 16, pp.334–340.
4. C. N. Nguyen, T. M. Le, S. Chu-Ky (2014). *Pilot scale simultaneous saccharification and*

fermentation at very high gravity of cassava flour for ethanol production. Ind. Crops Prod., 56, pp.160–165, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.02.004>.

5. G. L. Miller (1959). *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*. Analytical Chem., 31, pp.426–428.

6. M. Krajang, K. Malairuang, J. Sukna, K. Rattanapradit, S. Chamsart (2021). *Single-step ethanol production from raw cassava starch using a combination of raw starch hydrolysis and fermentation, scale-up from 5-L laboratory and 200-L pilot plant to 3000-L industrial fermenters*. Biotechnol. Biofuels, 14, pp.1–15, <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01903-3>.

7. P. Chan-u-tit, L. Laopaiboon, P. Jaisil, P. Laopaiboon (2013). *High Level Ethanol Production by Nitrogen and Osmoprotectant Supplementation under Very High Gravity Fermentation Conditions*. Energies, 6, pp.884–899, <https://doi.org/10.3390/en6020884>.

8. D. Szymanowska-Powalowska, G. Lewandowicz, P. Kubiak, W. Błaszczak (2014). *Stability of the process of simultaneous saccharification and fermentation of corn flour: the effect of structural changes of starch by stillage recycling and scaling up of the process*. Fuel, 119, pp.328–334, <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.11.034>

9. J. Bao, C. J. Bergman (2018). *Rice Flour and Starch Functionality*, in: M. Sjö, L. Nilsson (Eds.), *Starch Food*, 2nd ed., Elsevier, : pp. 373–419 <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100868-3.00010-X>.

10. B. O. Juliano (1979). *Chemical Aspects of Rice Grain Quality*. https://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=hAh_3eYATMwC&pgis=1.

11. E. Jyothsna, T. Hymavathi (2017). *Resistant starch: Importance, categories, food sources and physiological effects*. J. Pharmacogn. Phytochem. JPP, 6, pp.67–69, <http://www.phytojournal.com/archives/2017/vol6issue2/PartA/6-5-188-903.pdf>.

12. F. Qin, J. Man, B. Xu, M. Hu, M. Gu, Q. Liu, C. Wei (2011). *Structural Properties of Hydrolyzed High-Amylose Rice Starch by α -Amylase from Bacillus licheniformis*. J. Agril. Food Chem, 59, pp.12667–12673.
13. X. Wu, R. Zhao, D. Wang, S. R. Bean, P. A. Seib, M. R. Tuinstra, M. Campbell, A. O. Brien (2006). *Effects of Amylose, Corn Protein and Corn Fiber Contents on Production of Ethanol from Starch-Rich Media*. Cereal Chem, 83, pp.569–575.
14. R. Zhao, X. Wu, B. W. Seabourn, S. R. Bean, L. Guan, Y. C. Shi, J. D. Wilson, R. Madl, D. Wang (2009). *Comparison of waxy vs. nonwaxy wheats in fuel ethanol fermentation*. Cereal Chem., 86, pp.145–156, <https://doi.org/10.1094/CCHEM-86-2-0145>.
15. Q. Lai, Y. Li, Y. Wu, J. Ouyang (2019). *The quality of rice wine influenced by the crystal structure of rice starch*. J. Food Sci. Technol., 56, pp.1988–1996, <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03667-z>.
16. D. Stanley, A. Bandara, S. Fraser, P. J. Chambers, G. A. Stanley (2010). *The ethanol stress response and ethanol tolerance of Saccharomyces cerevisiae*. J. Appl. Microbiol., 109, pp.13–24, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04657.x>.
17. R. Devantier, S. Pedersen, L. Olsson (2005). *Characterization of very high gravity ethanol fermentation of corn mash. Effect of glucoamylase dosage, pre-saccharification and yeast strain*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 68, pp.622–629, <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1902-9>.

EFFECTS OF RICE VARIETIES, YEAST AND GLUCOAMYLASE ENZYMES ON ETHANOL YIELD DURING NO-COOK PROCESS AT VERY HIGH GRAVITY

Tien Tien Nam, Nguyen Tien Cuong,

Nguyen Chinh Nghia, Pham Tuan Anh, Chu Ky Son

Summary

The study selected rice varieties, yeasts, and glucoamylase enzymes for no-cook fermentation at very-high-gravity (310.8 g/L) for potable ethanol production. Five types of rice (OM5451, Bui Sua, IR64, 404, Ham Chau), three yeasts (Ethanol Red®, Thermosacc®, Angel super alcohol) and four glucoamylase enzyme products (Amigase Mega L, Distillase ASP, GA-260, Spirizyme) were studied for ethanol fermentation by a no-cook process at very high gravity. Rice 404 has the highest starch content, lowest cost, and large yield. After 120 h of fermentation, the ethanol concentration for 404 rice was 17.15% v/v (corresponding to 86.1% of the ethanol yield) and there was no significant difference compared to the ethanol concentration for IR64 and OM5451 rices. Rice with a high amylose content tends to have lower ethanol concentrations than rice having a low amylose content. Ethanol Red yeast gave the most effective fermentation, the lowest amount of yeast used is 0.92 g/L. At 120 h of fermentation, the Amigase Mega L enzyme exhibited the highest ethanol content of 17.23% v/v, equivalent to a fermentation efficiency of 86.56%. These results could be considered the basis to improve the ethanol yield during no-cook process under very high gravity.

Keywords: *Glucoamylase, rice, yeast, very-high-gravity, no-cook process.*

Người phản biện: GS.TS. Nguyễn Minh Thủy

Ngày nhận bài: 15/12/2022

Ngày thông qua phản biện: 16/01/2023

Ngày duyệt đăng: 13/3/2023