



# SỨC CHỐNG CHỊU FURFURAL VÀ SỰ CHUYỂN HÓA GLUCOSE VÀ XYLOSE THÀNH ETHANOL CỦA NẤM MEN *BLASTOBOTRYNS ADENINIVORANS* XE1

## Furfural tolerance and glucose and xylose conversion to ethanol of yeast *Blastobotrys adeninivorans* XE1

Phan Thị Phầm\*, Nguyễn Trọng Anh, Đỗ Minh Anh

Khoa Kỹ thuật Hóa học và Môi Trường, Trường Đại học Lạc Hồng, Đồng Nai, Việt Nam

**TÓM TẮT.** Sức chống chịu với độc tố và khả năng chuyển hóa cả đường glucose và xylose trong sản phẩm thủy phân thành ethanol của vi sinh vật là các yếu tố quan trọng trong sản xuất ethanol thế hệ hai. Thực nghiệm cho thấy nấm men *Blastobotrys adeninivorans* XE1 có thể chống chịu furfural ở nồng độ 3 g/L và có khả năng chuyển hóa cả glucose và xylose thành ethanol. Trong vòng 6 giờ, nấm men này đã phân hủy hoàn toàn furfural, sau đó tạo ra 8,87 g/L ethanol (hiệu suất 58%) và 1,81 g/L xylitol khi cấy khoảng  $10^8$  CFU nấm men trong 50 ml môi trường gồm 3 g/L furfural, 20 g/L glucose, 10 g/L xylose, 5 g/L peptone and 3 g/L yeast extract.

**TỪ KHÓA:** Furfural, ethanol, glucose and xylose conversion

**ABSTRACT.** Inhibitor tolerance and conversion of both glucose and xylose in hydrolysate to ethanol of microorganism are important factors for second generation ethanol production. Experiment showed that the yeast *Blastobotrys adeninivorans* XE1 was able to resist to 3 g/L furfural and convert both glucose and xylose to ethanol. Within 6 h, this yeast degraded all furfural, then produced 8.87 g/L ethanol and 1.81 g/L xylitol when inoculating approximately  $10^8$  CFU yeast into 50 ml medium which contained 3 g/L furfural, 20 g/L glucose, 10 g/L xylose, 5 g/L peptone and 3 g/L yeast extract.

**KEYWORDS:** Furfural, ethanol, sự chuyển đổi glucose và xylose

### 1. GIỚI THIỆU

Nhằm giảm áp lực lên nguồn nhiên liệu hóa thạch đang ngày càng cạn kiệt và gây ô nhiễm môi trường, thế giới cũng như Việt Nam đã và đang đẩy mạnh nghiên cứu và đưa vào sử dụng các nguồn nhiên liệu mới, thân thiện với môi trường. Theo ước tính của ngành dầu khí Việt Nam, nhu cầu nhiên liệu hóa lỏng của Việt Nam năm 2020 là 2,1 triệu tấn/năm. Tuy nhiên, với tình hình khai thác và sử dụng như hiện nay, Việt Nam sẽ sớm cạn kiệt loại tài nguyên này [1]. Trong các loại nhiên liệu mới, thân thiện với môi trường, ethanol sinh học rất được quan tâm vì nó có thể sử dụng để bổ sung hay thay thế xăng từ nhiên liệu hóa thạch. Ngoài ra, đây là nguồn nhiên liệu sạch vì quá trình sản xuất và sử dụng ethanol sinh ra ít khí thải CO<sub>2</sub> hơn so với quá trình sản xuất và sử dụng xăng truyền thống nhiều xét trên cùng một mức năng lượng tạo ra [1,2-4]. Do đó, ethanol sinh học không những đóng góp vào sự giảm phát thải CO<sub>2</sub> mà còn là giải pháp cho ngành dầu khí Việt Nam hiện tại và tương lai. Hiện tại, sản xuất ethanol sinh học thế hệ một gặp nhiều cạnh tranh về giá và an ninh lương thực vì thường nguồn nguyên liệu sản xuất là tinh bột từ cây lương thực và ngũ cốc [5,6]. Vì vậy, sản xuất ethanol sinh học thế hệ hai dựa trên nguồn nguyên liệu là lignocellulose thải có nhiều ưu thế hơn và do đó rất được quan tâm hiện nay.

Trong sản xuất ethanol thế hệ hai, quá trình sản xuất gồm hai công đoạn quan trọng là thủy phân cellulose và hemicellulose trong vật liệu lignocellulose thành các đường đơn và chuyển hóa các đường này thành ethanol. Việc lên men cả hai đường chính gồm glucose từ cellulose và xylose từ hemicellulose (glucose thường nhiều hơn xylose) thành ethanol góp phần quan trọng trong hiệu quả của quá trình sản xuất vì hiện nay, hầu hết các vi sinh vật tự nhiên phổ biến trong sản xuất ethanol sinh học như *Saccharomyces cerevisiae* chỉ có thể tạo thành ethanol từ đường glucose [7,8]. Ngoài ra, quá trình thủy phân vật liệu lignocellulose,

đặc biệt là thủy phân bằng hóa chất, thường sinh ra các chất ức chế vi sinh vật mà furfural được xem là chất đại diện [9,10]. Trong một số nghiên cứu thành công về sản xuất ethanol thế hệ hai (nồng độ ethanol sinh ra đạt khoảng 4% v/v), nồng độ furfural khoảng 0,9 g/L, cùng với tác động hiệp lực của một số chất ức chế khác đã ảnh hưởng đáng kể đến quá trình tạo ethanol của vi sinh vật [11,12]. Việc loại bỏ các chất ức chế này có thể thực hiện bằng cacbon hoạt tính hay kết tủa trong môi trường kiềm cao. Tuy nhiên, công đoạn này làm tăng chi phí sản xuất và một lượng đường đáng kể cũng mất đi do sự lôi cuốn hay bám dính [13–15]. Do vậy, việc tìm kiếm các vi sinh vật có thể chuyển hóa cả hai đường glucose và xylose thành ethanol và có sức chống chịu với furfural là hướng nghiên cứu rất đang được chú ý. Trong bài báo này, nấm men *Blastobotrys adeninivorans* XE1, một giống nấm men được phân lập từ lá trà lên men, có thể sử dụng nhiều nguồn carbon [16], sẽ được khảo sát về khả năng lên men đường glucose và xylose thành ethanol và sức chống chịu với chất ức chế furfural, hướng đến dùng làm vi sinh vật chuyển hóa đường thành ethanol trong sản xuất ethanol thế hệ hai.

### 2. NỘI DUNG

#### 2.1 Vật liệu và phương pháp

##### *Giống nấm men*

Vi sinh vật được dùng để khảo sát khả năng chuyển hóa đường glucose và xylose thành ethanol sinh học và chống chịu furfural độc tố là nấm men *B. adeninivorans* XE1 [16]. Nấm men được trải trên môi trường thạch YM gồm 10 g/L glucose, 5 g/L peptone, 3 g/L yeast extract, 3 g/L malt extract

Received: July, 1st, 2019

Accepted: July, 26th, 2019

\*Corresponding Author

Email: pham8384@gmail.com

và 15 g/L agar (được điều chỉnh pH khoảng 5 bằng HCl và hấp khử trùng trước khi được đổ đĩa để nguội) và đặt vào tủ nuôi 30°C trong 48 h, sau đó được bảo quản ở nhiệt độ 4°C trong vòng 30 ngày. Môi trường nhân giống nấm men là bình thủy tinh 100 ml có chứa 50 ml môi trường YM lỏng không chứa agar, được điều chỉnh pH khoảng 5, có nút đậy và được hấp khử trùng và làm nguội trước khi cấy nhân giống nấm men. Dùng que cấy tròn lấy 1 mẫu đầu que đầy nấm men cấy vào bình nhân giống và nuôi ở tủ nuôi 30°C, tốc độ lắc 120 vòng/phút. Sau 36 giờ nuôi nhân giống, nồng độ nấm men khoảng 10<sup>8</sup> CFU/ml.

**Hóa chất**

Các hóa chất được dùng trong nghiên cứu này do Merck, Đức sản xuất.

**Bố trí thí nghiệm**

Để khảo sát khả năng chuyển đổi đường glucose và xylose thành ethanol và chống chịu với chất ức chế furfural của nấm men *B. adenivorans* XE1, các thí nghiệm với các nồng độ glucose, xylose, furfural được bố trí như bảng 1.

**Bảng 1. Bố trí thí nghiệm**

Thí nghiệm	Thành phần	Nấm men
E1	20 g/L glucose 5 g/L peptone 3 g/L yeast extract	Lấy li tâm 1 ml môi trường nhân giống sau 36 h nuôi nấm men <i>B. adenivorans</i> XE1, sau đó đổ bỏ phần lỏng bên trên, chỉ lấy phần lắng bên dưới đưa vào bình thí nghiệm
E2	10 g/L xylose 5 g/L peptone 3 g/L yeast extract	
E3	20 g/L glucose 10 g/L xylose 5 g/L peptone 3 g/L yeast extract 1 g/L furfural	
E4	20 g/L glucose 10 g/L xylose 5 g/L peptone 3 g/L yeast extract 2 g/L furfural	
E5	20 g/L glucose 10 g/L xylose 5 g/L peptone 3 g/L yeast extract 3 g/L furfural	

Các môi trường thí nghiệm được chuẩn bị với thành phần như Bảng 1, được điều chỉnh pH khoảng 5. Sau đó lấy 50 ml mỗi môi trường cho vào các bình thủy tinh 100 ml có nút đậy và hấp khử trùng, làm nguội trước khi cấy nấm men. Các thí nghiệm lên men được thực hiện ở tủ nuôi 30°C, tốc độ lắc 120 vòng/phút. Sau mỗi 3, 6 hay 12 giờ nuôi, mẫu sẽ được lấy để phân tích. Mỗi thí nghiệm đều được thực hiện lặp lại.

**Phân tích và tính toán**

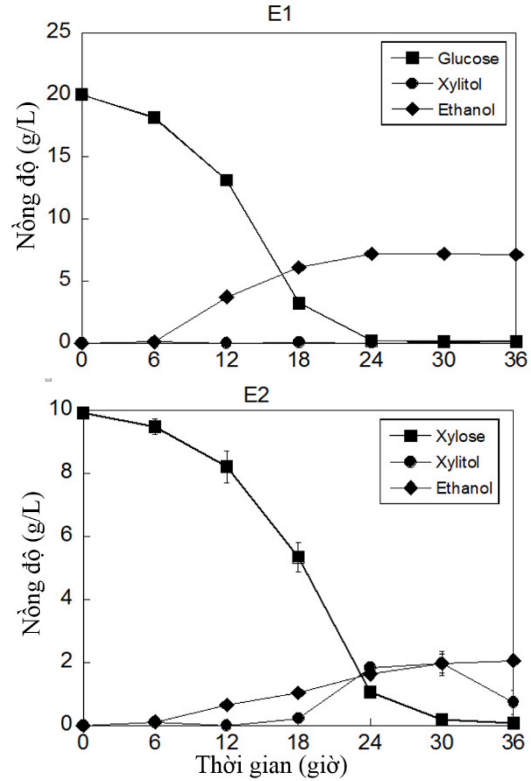
Nồng độ glucose, xylose, xylitol, ethanol và furfural được đo đạc bằng máy sắc kí lỏng hiệu năng cao (High-performance liquid chromatography - HPLC) sử dụng cột phân tích đường Shodex SH1011, đầu dò RI, L – 3300 (Hitachi Ltd., Nhật Bản). Các phân tích được thực hiện 3 lần.

Hiệu suất tạo ethanol của nấm men *B. adenivorans* XE1 được đánh giá dựa trên tỉ số giữa năng suất ethanol thực tế và lí thuyết. Theo phương trình phản ứng tạo ethanol từ đường glucose và xylose, năng suất lí thuyết là 0,51 g ethanol/g đường glucose hoặc/và xylose bị tiêu thụ. Năng suất thực tế là lượng (g) ethanol sinh ra/g đường glucose hoặc/và xylose bị tiêu thụ [15,17].

**2.2 Kết quả và thảo luận**

**Sự chuyển đổi glucose và xylose thành ethanol bởi nấm men *B. adenivorans* XE1**

Thí nghiệm E1 và E2 được thực hiện nhằm khảo sát khả năng tạo ethanol từ đường glucose và xylose của nấm men *B. adenivorans* XE1. Hình 1 cho thấy *B. adenivorans* XE1 có khả năng sử dụng cả đường glucose và xylose chuyển thành ethanol.



**Hình 1. Khả năng chuyển đổi glucose và xylose thành ethanol bởi nấm men *B. adenivorans* XE1**

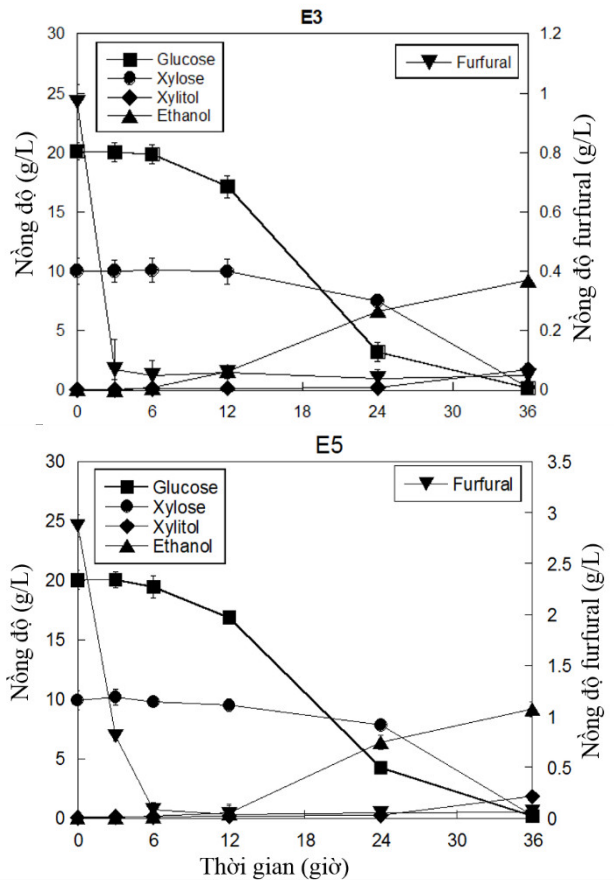
Trong môi trường lên men với cơ chất là glucose (Hình 1. E1), nấm men nhanh chóng sử dụng glucose và chuyển thành ethanol. Sau 24 giờ cấy nuôi, nấm men đã sử dụng hết 20,03 g/L đường glucose và nồng độ ethanol cao nhất đạt được là 7,21 g, năng suất 0,36 g ethanol/g glucose, hiệu suất 71%.

Đối với môi trường lên men với cơ chất là xylose (Hình 1. E2), tuy có chậm hơn so với glucose nhưng nấm men *B. adenivorans* XE1 cũng đã sử dụng hết 9,93 g xylose trong vòng 30 giờ sau khi cấy nuôi và tạo ra nồng độ ethanol cao nhất đạt 2,06 g/L ethanol, năng suất 0,21 g/L, hiệu suất 41%. Trong môi trường lên men với cơ chất xylose, ngoài ethanol còn thu được 1,97 g xylitol. Đây là sản phẩm phụ trung gian rất đáng quan tâm của quá trình trao đổi, chuyển hóa các chất của nấm men từ đường xylose. Xylitol rất có ý nghĩa về dược phẩm nên có thể nghiên cứu sâu thêm tính chất này của nấm men *B. adenivorans* XE1.

Hiệu suất sản xuất ethanol của vi sinh vật sản xuất ethanol nói chung và nấm men *B. adenivorans* XE1 nói riêng không đạt 100% bởi một phần đường đã được vi sinh vật sử dụng cho sự phát triển sinh khối và tạo một số sản phẩm phụ khác [12]. Hình 1 còn củng cố thêm một đặc điểm khác ở các vi sinh vật có thể lên men đồng thời đường cả xylose và glucose là tốc độ và hiệu suất lên men từ đường glucose của sinh vật cao hơn từ đường xylose vì sự hình thành chậm ATP trong quá trình trao đổi chất của vi sinh vật từ đường xylose [18].

### Sức chống chịu furfural của nấm men *B. adenivorans* XE1

Sức chống chịu furfural của nấm men *B. adenivorans* XE1 được thực hiện bằng 3 thí nghiệm E3, E4 và E5. Hình 2 sẽ biểu đồ hóa kết quả thí nghiệm E3 và E5.



Hình 2. Sức chống chịu furfural của nấm men *B. adenivorans* XE1

Trong các thí nghiệm này, nấm men được nuôi cấy trên môi trường nhân tạo hỗn hợp gồm glucose, xylose và furfural vì đây là các thành phần chủ yếu trong sản phẩm thủy phân, đặc biệt là thủy phân bằng hóa chất vật liệu lignocellulose. Sức chống chịu furfural của nấm men *B. adenivorans* XE1 ở thí nghiệm E4 tương tự E3 nên không được thể hiện bằng đồ thị. Hình 2 cho thấy khi trong môi trường có sự hiện diện của furfural, nấm men đã phân hủy furfural trước khi sử dụng glucose và xylose để chuyển thành ethanol. Đây là đặc tính chung của nhiều nấm men và nếu furfural nằm trong giới hạn sức chịu đựng của nấm men, furfural sẽ được chuyển hóa thành furoic acid trong môi trường hiếu khí hoặc furfuryl trong môi trường kỵ khí [10]. Hình 2 cũng cho thấy khi tăng nồng độ furfural từ 1 g/L đến 3 g/L đã ảnh hưởng đến tốc độ phân hủy furfural (mất nhiều thời gian hơn) và quá trình tạo ethanol của nấm men *B. adenivorans* XE1 cũng chậm hơn (sau 12 giờ nuôi cấy). Tuy vậy, cuối thí nghiệm E3 và E5, kết quả tạo ethanol tương tự nhau (E3: 9,25 g/L ethanol, 60%; E5: 8,87 g/L ethanol, 58%). Ngoài ra, sản phẩm phụ xylitol cũng được tạo thành từ quá trình tạo ethanol từ đường xylose có trong hỗn hợp. Như đã đề cập từ đầu, trong dung dịch thủy phân bằng hóa chất vật liệu cellulose trong các nghiên cứu thành công về sản xuất ethanol thế hệ hai, nồng độ furfural khoảng 0,9 g/L. Do đó, nấm men *B. adenivorans* XE1 trong nghiên cứu này chịu được nồng độ furfural 3 g/L furfural nên được xem là có sức chống chịu với độc tố furfural, thích hợp dùng làm tác nhân chuyển hóa sinh học cho quá trình sản xuất ethanol sinh học thế hệ hai.

### 3. KẾT LUẬN

Nấm men *B. adenivorans* XE1 có thể chuyển hóa cả đường glucose và xylose thành ethanol với hiệu suất 58% trong môi trường gồm 3 g/L furfural, 20 g/L glucose, 10 g/L xylose nên là vi sinh vật tiềm năng cho sản xuất ethanol sinh học thế hệ hai. Tuy nhiên, đây chỉ mới là kết quả nghiên cứu trên môi trường nhân tạo. Do đó, cần có những nghiên cứu sâu hơn, cụ thể hơn về cơ chất thật (sản phẩm thủy phân từ vật liệu lignocellulose) cũng như đối chứng, so sánh khả năng chuyển hóa đường glucose và xylose cũng như sức chống chịu furfural của một số vi sinh vật khác trong cùng điều kiện nuôi cấy để có thể lựa chọn, đánh giá khả năng ứng dụng nấm men này vào quá trình sản xuất ethanol sinh học thế hệ hai.

### 4. LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin cảm ơn Viện Công nghệ Tokyo, Nhật Bản đã hỗ trợ về giống nấm men và thiết bị kỹ thuật để thực hiện nghiên cứu này. Nhóm tác giả cũng xin cảm ơn trường đại học Lạc Hồng đã tạo điều kiện về tài chính để nhóm tác giả có thể hoàn thành nghiên cứu.

### 5. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Phan Thị Phẩm, Lê Thị Thu Hương, Đoàn Thị Tuyết Lê, Lê Phú Đông. Sự chuyển đổi sinh khối lignocellulose: Từ phế thải đến nguyên liệu tiềm năng cho sản xuất ethanol sinh học thế hệ thứ hai tại Việt Nam. *Tạp chí Khoa học Lạc Hồng*, **2017**, số đặc biệt, 159-164.
- [2] Ngô Quang Nhâm, Nguyễn Quang Khải, Trần Văn Mạnh, Phạm Ngọc Hòa, Phan Thị Phẩm. Tiềm năng sản xuất ethanol sinh học từ phế thải nông nghiệp tại Đồng Nai nhằm giảm sử dụng xăng từ nhiên liệu hóa thạch. *Tạp chí Khoa học Lạc Hồng*, **2017**, Số Đặc Biệt, 180-183.
- [3] Schmer, M. R.; Vogel, K. P.; Varvel, G. E.; Follett, R. F.; Mitchell, R. B. and Jin, V. L. Energy Potential and Greenhouse Gas Emissions from Bioenergy Cropping Systems on Marginally Productive Cropland. *PLoS One*, **2014**, 9 (3).
- [4] Ramos, J. and Valdivia, M. Opinion Benefits and perspectives on the use of biofuels. *Microb. Biotechnol.*, **2016**, 9, 436-440.
- [5] Mohr, A. and Raman, S. Lessons from first generation biofuels and implications for the sustainability appraisal of second generation biofuels. *Energy Policy*, **2013**, 63, 114-122.
- [6] Branco, R. H.; Serafim, R. S. and Xavier, A. M. R. B. Second Generation Bioethanol Production : On the Use of Pulp and Paper Industry Wastes as Feedstock. *Fermentation*, **2019**, 5 (4), 1-30.
- [7] Ishola, M. M.; Ylittervo, P. and Taherzadeh, M. J. Co-Utilization of Glucose and Xylose for Enhanced Lignocellulosic Ethanol Production with Reverse Membrane Bioreactors. *Membranes (Basel)*, **2015**, 5, 844-856.
- [8] Buzafa, K.; Kalinowska, P. H.; Przybysz, P. and Malachowska, E. Conversion of various types of lignocellulosic biomass to fermentable sugars using kraft pulping and enzymatic hydrolysis. *Wood Sci. Technol.*, **2017**, 51 (4), 873-885.
- [9] Ylittervo, P.; Franzén, C. J. and Taherzadeh, M. J. Impact of Furfural on Rapid Ethanol Production Using a Membrane Bioreactor. *Energies*, **2013**, 6, 1604-1617.
- [10] Field, S. J. *et al.* Identification of furfural resistant strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* from a collection of environmental and industrial isolates. *Biotechnol. Biofuels*, **2015**, 8, 1-8.
- [11] Sun, Z.; Tang, Y.; Iwanaga, T.; Sho, T. and Kida, K. Bioresource Technology Production of fuel ethanol from bamboo by concentrated sulfuric acid hydrolysis followed by continuous ethanol fermentation. *Bioresour. Technol.*, **2011**, 102 (23), 10929-10935.
- [12] Tanaka, K. *et al.* International Biodeterioration & Biodegradation Production of high-concentration bioethanol

- from cassava stem by repeated hydrolysis and intermittent yeast inoculation. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **2019**, 138, 1–7.
- [13]Martinez, A.; Rodriguez, M. E.; York, S. W.; J. F. and Preston, L.; Ingram, O. Effects of Ca (OH) 2 Treatments (‘ Overliming ’) on the Composition and Toxicity of Bagasse Hemicellulose Hydrolysates. *Biotechnol. Bioeng.*, **2000**, 69, 526–536.
- [14]Chandel, A. K.; Singh, O. V; Rao, L. V.; Chandrasekhar, G. and Narasu, M. L. Bioresource Technology Bioconversion of novel substrate *Saccharum spontaneum* , a weedy material , into ethanol by *Pichia stipitis* NCIM 3498. *Bioresour. Technol.*, **2011**, 102 (2), 1709–1714.
- [15]Yadav, K. S.; Naseeruddin, S.; Prashanthi, G. S.; Sateesh, L. and Rao, L. V. Bioresource Technology Bioethanol fermentation of concentrated rice straw hydrolysate using co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*,” *Bioresour. Technol.*, **2011**, 102 (11), 6473–6478.
- [16]Abe, M.; Takaoka, N.; Idemoto, Y. *et al.* International Journal of Food Microbiology Characteristic fungi observed in the fermentation process for Puer tea. *Int. J. Food Microbiol.*, **2008**, 124, 199–203.
- [17]Srimachai, T.; Nuithitikul, K.; O-thong, S. and Kongjan, P. Optimization and Kinetic Modeling of Ethanol Production from Oil Palm Frond Juice in Batch Fermentation, *Energy Procedia*, **2015**, 79, 111 - 118.
- [18]Nielsen, F.; Zacchi, G.; Galbe, M. and Wallberg, O. Sequential Targeting of Xylose and Glucose Conversion in Fed-Batch Simultaneous Saccharification and Co-fermentation of Steam-Pretreated Wheat Straw for Improved Xylose Conversion to Ethanol. *Bioenerg. Res.*, **2017**, 10, 800–810.