



Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ

Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học

website: sj.ctu.edu.vn



DOI:10.22144/ctu.jsi.2019.063

SẢN XUẤT ETHANOL SINH HỌC TỪ VỎ QUẢ CÀ PHÊ

Đỗ Viết Phương^{1,2*}, Đặng Thị Sáu³, Phạm Văn Tấn³ và Lê Nguyễn Đoàn Duy⁴

¹Nghiên cứu sinh Khóa 2014-2018, ngành Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ

²Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh

³Trường Đại học Bách khoa Hồ Chí Minh

⁴Phân viện Cơ điện Nông nghiệp và Công nghệ Sau thu hoạch

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Đỗ Viết Phương (email: dovietphuong@iuh.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 13/11/2018

Ngày nhận bài sửa: 06/03/2019

Ngày duyệt đăng: 12/04/2019

Title:

Bioethanol production from coffee pulp

Từ khóa:

Thủy phân cellulose, tiền xử lý kiềm, sinh khối nông nghiệp, vỏ quả cà phê

Keywords:

Alkaline pretreatment, cellulose hydrolysis, coffee pulp, lignocellulose biomass

ABSTRACT

In this study, the coffee pulp was pretreated by NaOH (0.2 g/g biomass) at 120°C in 20 minutes to remove lignin and hemicellulose. This pretreatment resulted in a removal of 46.11% hemicellulose and 76.63% lignin. After the pretreatment, the biomass was hydrolyzed with enzyme Viscozyme Cassava C (enzyme loading was 25 FPU/g) at temperature 50°C. After 96 hours of hydrolysis, the maximum concentration of reducing sugars and glucose was 37.33 g/L and 24.36 g/L, respectively. The *Saccharomyces cerevisiae* yeast was added at a density of 3×10^8 cells/mL. The fermentation was processed at 35°C in 72 hours. The maximum production of 10.06 g/L ethanol was obtained. The result indicated that the coffee pulp, an inedible but plentiful material, will be a potential feedstock for bioethanol production in Vietnam.

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, vỏ quả cà phê được tiền xử lý bởi NaOH (0,2 g/g nguyên liệu) ở nhiệt độ 120°C trong thời gian 20 phút nhằm mục đích loại bỏ bớt lignin và hemicellulose (kết quả loại bỏ được 46,11% hemicellulose và 76,63% lignin). Nguyên liệu đã qua quá trình tiền xử lý được thủy phân bởi enzyme Viscozyme Cassava C (25 FPU/g) ở nhiệt độ 50°C. Sau thời gian 96 giờ thủy phân thu được dịch thủy phân có hàm lượng đường khử và đường glucose tương ứng là 37,33 g/L và 24,36 g/L. Chúng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* được bổ sung vào dịch thủy phân với mật độ 3×10^8 tế bào/mL. Quá trình lên men được thực hiện ở nhiệt độ 35°C trong thời gian 72 giờ, hàm lượng ethanol đo được sau quá trình lên men là 10,06 g/L. Nghiên cứu này cũng chỉ ra rằng, vỏ quả cà phê là nguồn nguyên liệu dồi dào và có nhiều tiềm năng để sản xuất ra ethanol sinh học ở Việt Nam.

Trích dẫn: Đỗ Viết Phương, Đặng Thị Sáu, Phạm Văn Tấn và Lê Nguyễn Đoàn Duy, 2019. Sản xuất ethanol sinh học từ vỏ quả cà phê. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học)(2): 212-217.

1 GIỚI THIỆU

Việt Nam hiện nay là nước xuất khẩu cà phê vối đứng thứ nhất trên thế giới. Tổng sản lượng trong

năm 2017 là 1.758.000 tấn cà phê nhân (USDA, 2017) và hàng năm thải ra môi trường khoảng 460.000 tấn vỏ quả cà phê khô. Lượng phế liệu này chủ yếu là làm chất đốt để sấy quả, hạt cà phê. Tuy

nhiên, việc dùng vỏ quả cà phê để làm chất đốt hiện nay gây ô nhiễm môi trường một cách trầm trọng. Ngoài ra, một phần vỏ quả cà phê còn được người dân ủ đông và bón lại cho các gốc cây cà phê nhưng cũng không có ý nghĩa gì vì vỏ quả chưa qua xử lý để chuyển thành phân bón. Cho đến thời điểm hiện tại, chỉ một phần nhỏ được sản xuất làm phân bón và làm thức ăn gia súc.

Trên thế giới cũng có các công trình nghiên cứu tận dụng phế thải của ngành cà phê như: sử dụng vỏ quả cà phê, lá cà phê làm giá thể để trồng nấm (Leifa *et al.*, 2001). Sử dụng vỏ quả, vỏ trấu cà phê làm nguồn carbon để lên men tạo acid gibberellic từ đó sản xuất acid citric (Shankaranand and Lonsane, 1994). Vỏ quả cà phê còn được sử dụng để sản xuất than hoạt tính trong công nghiệp xử lý nước thải (Franca *et al.*, 2009). Ngoài ra, vỏ quả cà phê cũng được nghiên cứu sản xuất ra ethanol bằng phương pháp hóa học (Shenoy *et al.*, 2011). Tuy nhiên, nghiên cứu này có hạn chế lớn khi dùng acid và kiềm để thủy phân vỏ quả sẽ gây ô nhiễm môi trường ở mức nghiêm trọng cũng như trang thiết bị cơ giới hóa tốn kém, khó chế tạo.

Mặt khác, trong vỏ quả cà phê có hàm lượng cellulose khá cao và nó được các nhà khoa học đánh giá là nguồn nguyên liệu tiềm năng để sản xuất ethnaol (Oliveira *et al.*, 2008). Những nghiên cứu gần đây hầu hết tập trung vào nghiên cứu sản xuất ethanol từ sinh khối lignocellulose bởi vì chi phí nguyên liệu giảm đi rất nhiều. Các nhà khoa học ước tính rằng sản xuất ethanol từ sinh khối lignocellulose có thể tăng gấp 16 lần sản lượng hiện tại (Saha and Cotta, 2008).

Cho đến hiện nay, các nhà khoa học vẫn luôn tìm kiếm nguồn năng lượng xanh thay thế cho nguồn năng lượng hóa thạch dần cạn kiệt đồng thời cũng góp phần giải quyết vấn đề ô nhiễm môi trường và biến đổi khí hậu đang ngày càng diễn biến phức tạp. Hướng nghiên cứu này có thể mở ra một giải pháp tốt cho vấn đề nêu trên.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu

Vỏ quả cà phê vối tươi (*Coffea robusta*) được thu nhận tại xã Pong Drang, huyện Krông Buk, tỉnh Đắk Lắk. Quả cà phê chín có màu đỏ tươi, không bị dập, không bị mốc được tách lấy vỏ quả và sấy khô (ở 60°C) đến độ ẩm 5÷8%. Toàn bộ nguyên liệu được nghiền và sàng để thu được nguyên liệu có kích thước 0,5÷1 mm.

Enzyme Viscozyme Cassava C: được cung cấp bởi công ty Brenntag Việt Nam (202 Hoàng Văn Thụ, phường 09, quận Phú Nhuận, thành phố Hồ Chí

Minh). Đây là enzyme được thu nhận và tinh sạch từ *Trichoderma reesei*, d = 1,22 g/ml, hoạt tính CMCase (Enzyme carboxymethyl cellulase) 71,51 UI/ml và FPU (Filter paper assay for saccharifying cellulase) là 95 U/g, khoảng nhiệt độ hoạt động tối ưu 40÷50°C trong đệm acetate pH = 4,8.

Nấm men *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602TM được cung cấp bởi phòng thí nghiệm vi sinh Trường Đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh.

2.2 Một số phương pháp phân tích

Độ ẩm và thành phần hóa học của nguyên liệu được xác định theo AOAC.

Đường tổng (TRS) được xác định bởi phương pháp phenol sulphuric acid (DuBois, 1956)

Đường khử (RS) được xác định bởi phương pháp DNS (Dinitrosalicylic Acid) (Miller, 1959)

Đường glucose được xác định bởi thiết bị đo đường máu cầm tay Clever Check (model TD 4230, Germany)

Các thành phần chất xơ: cellulose, hemicellulose và lignin được xác định bởi phương pháp sử dụng chất tẩy rửa (Van Soest and Wine, 1967).

Hàm lượng ethanol được phân tích bởi phương pháp đo quang UV-Vis (Genesis 10S) (Sayyad *et al.*, 2015).

2.3 Phương pháp tiền xử lý

Cân 50 g nguyên liệu vỏ quả cà phê đã sấy khô cho vào bình cầu 1 lít, thêm 500 mL dung dịch NaOH nồng độ 0,2 g NaOH/g nguyên liệu. Nguyên liệu được tiền xử lý trong lò vi sóng ở 120°C trong 20 phút. Dùng vải để lọc thu lấy phần bã rắn. Bã được rửa nhiều lần với nước cho đến khi pH trung tính và sấy khô ở 60°C đến độ ẩm khoảng 5÷8%. Quá trình tiền xử lý này sẽ giúp loại bỏ bớt hemicellulose và lignin ra khỏi nguyên liệu, đồng thời cũng giảm vùng kết tinh trong phân tử cellulose. Khi đó, enzyme cellulase sẽ dễ dàng tấn công và thủy phân cellulose (Chen *et al.*, 2007).

2.4 Phương pháp thủy phân

Cân 20 g nguyên liệu đã qua tiền xử lý cho vào erlen 250 mL và thêm 200 mL dung dịch đệm citrate 0,05 mol/L, pH 4,8. Một thể tích enzyme cellulase thương mại Viscozyme Cassava xác định đã tính toán được sử dụng để thực hiện quá trình thủy phân (25 FPU/g cơ chất). Quá trình này được thực hiện trên máy lắc có gia nhiệt ở 50°C, 150 vòng/phút trong thời gian 96 giờ. Kết thúc quá trình thủy phân, dịch được ly tâm 2.500 vòng trong 10 phút, thu lấy dịch ly tâm và bỏ phần cặn. Dịch ly tâm được xác định các chỉ tiêu như đường tổng, đường khử, đường

glucose. Mẫu đối chứng thực hiện tương tự mẫu thử nhưng thay vào đó là nguyên liệu chưa qua tiền xử lý.

Hiệu suất quá trình thủy phân được tính theo công thức:

$$Y_{EH} (\%) = \frac{0,9(G_e - G_w)}{C_p} \cdot 100 \quad (1) \quad (\text{Menezes et al., 2014})$$

Trong đó: G_e (g/L) là nồng độ glucose cuối quá trình thủy phân. G_w (g/L) là nồng độ glucose mà không qua xử lý bằng enzyme. C_p (g/L) là nồng độ cellulose có trong nguyên liệu đã tiền xử lý.

2.5 Phương pháp lên men

Cho 250 mL dịch thủy phân vào bình lên men 500 mL. Bổ sung thêm vào 1 số thành phần môi trường: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 g/L), K_2HPO_4 (0,1 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g/L). Hỗn hợp sẽ được hấp tiệt trùng ở 121°C trong 20 phút rồi làm nguội đến nhiệt độ phòng. Bổ sung vào dịch lên men lượng tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae* ban đầu là 3×10^8 tế bào/mL (Chen et al., 2007). Quá trình lên men được thực hiện ở điều kiện pH = 5, nhiệt độ 35°C và lắc 120 vòng/phút. Tại các thời điểm lên men khác nhau lấy ra 1 lượng dịch lên men xác định các chỉ tiêu: ethanol, đường khử, đường glucose. Mẫu đối chứng được tiến hành tương tự như mẫu thử nhưng không qua tiền xử lý.

Sản lượng ethanol tạo ra được tính theo công thức:

$$Y_{P/S} = \frac{EC}{G_b - G_e} \quad (2) \quad (\text{Menezes et al., 2014})$$

Bảng 1: Thành phần hóa học của vỏ quả cà phê (*robusta*) (g/100g chất khô)

Thành phần	*	a	b	c	d
Độ ẩm	73,85 ± 1,06	-	-	77,9	82
Đường tổng số	9,18 ± 0,23	9,70	-	-	-
Đường khử	8,34 ± 0,17	9,63	12,40	-	-
Tinh bột	10,20 ± 0,27	-	-	-	-
Pectin	4,37 ± 0,06	11,37	6,50	-	-
Protein	9,52 ± 0,23	10,47	10,1	-	-
Cellulose	25,88 ± 0,91	20,7	17,7	23	20,6
Hemicellulose	3,60 ± 0,18	3,60	2,30	20	17,2
Ligin	20,07 ± 0,56	14,30	17,5	22	15,5
Chất béo	1,22 ± 0,11	1,20	-	-	-
Tro	6,29 ± 0,09	7,33	8,30	15,4	7,9
Caffeine	0,78 ± 0,01	-	1,3	-	-
Total Polyphenols	8,69 ± 0,12	-	1,8 ÷ 8,56	-	-

Ghi chú: *Nghiên cứu này; ^aBonilla-Hermosa et al., 2014; ^bElias, 1979; 31. ^cGurram et al., 2016; ^dMenezes, 2014

Trong nghiên cứu của Palonen (2004) sinh khối lignocellulose là thành phần cấu trúc chính của thực vật thân gỗ và các thực vật khác như cỏ, lúa, ngô... Thành phần chủ yếu của lignocellulose là cellulose, hemicellulose và lignin. Xơ thô có trong vỏ quả cà

Trong đó: EC (g/L) là hàm lượng ethanol đo được sau lên men. G_b (g/L) là nồng độ glucose trước khi lên men. G_e (g/L) là nồng độ glucose cuối quá trình lên men.

Hiệu suất lên men theo lý thuyết được tính theo công thức:

$$Y_{et} (\%) = \frac{Y_{P/S}}{0,51} \cdot 100 \quad (3) \quad (\text{Ballesteros et al., 2004})$$

0,51 là lượng ethanol tạo ra cao nhất theo lý thuyết khi chuyển đổi 1 g glucose thành ethanol.

2.6 Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên, lặp lại 3 lần với độ tin cậy 95%. Phân tích phương sai 1 chiều bằng cách sử dụng ANOVA và sử dụng phần mềm Statgraphics Centurion 15.1.02 để xác định sự khác biệt thống kê giữa các mẫu thí nghiệm.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Thành phần hóa học của vỏ quả cà phê (*robusta*)

Kết quả ở Bảng 1 cho thấy, hàm lượng cellulose và lignin có trong vỏ quả cà phê vối (*Coffea robusta*) chiếm lần lượt là 25,88% và 20,07%. Hàm lượng này cao hơn so với trong nghiên cứu của Elias (1979), Bonilla et al. (2014), Menezes et al. (2014), nhưng hàm lượng hemicellulose thì có sự tương đồng. Sự khác biệt này là do các nghiên cứu trước đây thực hiện trên nguyên liệu cà phê chè (*C. robusta*) còn trong nghiên cứu này là cà phê vối.

phê bao gồm: cellulose 25,88% (tương đương với 52,23%, g cellulose/100g xơ thô), hemicellulose 3,6% (tương đương với 7,3%, g hemicellulose/100g xơ thô) và lignin 20,07% (tương đương với 40,5%, g lignin/100g xơ thô). Nó có tỷ lệ tương đồng với

một số nguồn sinh khối lignocellulose phổ biến khác như: thân cây ngô hay vỏ trấu. Trong khi đó, tỷ lệ điển hình của cellulose, hemicellulose và lignin trong sinh khối lignocellulose bao gồm: cellulose (40-60%), hemicellulose (20-40%) and lignin (10-25%) (Gnansounou, 2008). Do vậy, vỏ quả cà phê cũng được xem như là 1 nguồn sinh khối lignocellulose dùng trong sản xuất bioethanol (thế hệ sản xuất ethanol thứ 2).

3.2 Tiền xử lý vỏ quả cà phê bằng NaOH

Kết quả Bảng 2 cho thấy 71,25% cellulose được giữ lại, 46,11% và 76,63% là lượng hemicellulose và lignin tương ứng bị loại bỏ. Kết quả này tuy không cao nhưng chưa thể kết luận hiệu quả chuyển đổi thành ethanol thấp mà cần phải trải qua các công đoạn tiếp theo (thủy phân và lên men) để đánh giá hiệu quả chuyển đổi thành ethanol.

Bảng 2: Sự thay đổi thành phần chất xơ trong vỏ quả cà phê trước và sau tiền xử lý

Thành phần chất xơ	Trước tiền xử lý (g/100g)	Sau tiền xử lý (g/100g)	Phần trăm giữ lại (Rx)
Cellulose (%)	25,88 ^a ± 0,91	18,44 ^b ± 0,65	71,25 ± 1,84
Hemicellulose (%)	3,6 ^a ± 0,18	1,94 ^b ± 0,11	53,89 ± 2,33
Lignin (%)	20,07 ^a ± 0,56	4,69 ^b ± 0,29	23,37 ± 1,13

Số liệu trong bảng thể hiện giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Các chữ số mũ trên các số liệu trong cùng 1 hàng khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 0,05

Theo nghiên cứu của Menezes *et al.* (2014) khi tiền xử lý vỏ quả cà phê chè (*C. arabica*) bằng NaOH 4% (w/v) ở 121°C trong 25 phút thì hiệu quả mang lại là 74,81% lignin bị loại bỏ, 55,85% hemicellulose bị loại bỏ nhưng chỉ giữ lại được 69,18% cellulose. Ngoài ra Xu and Cheng (2011) cho rằng, điều kiện tốt nhất cho tiền xử lý cô là 0,5 ÷ 2% NaOH ở 121°C trong thời gian 15 phút, 30 phút và 1 giờ. Kết quả lignin bị loại bỏ là 85,8%. Còn khi tiến hành tiền xử lý thân cây bông bằng 4 loại hóa chất: NaOH, H₂SO₄, H₂O₂ và O₃ thì kết quả cũng tương tự những nghiên cứu khác khi thấy rằng NaOH là kiềm cho hiệu quả tốt nhất (65,63% chất

xơ bị loại bỏ khi sử dụng 2% NaOH trong 90 phút ở 121°C) (Silverstein *et al.*, 2007).

3.3 Thủy phân cellulose bởi enzyme cellulase

Để đánh giá hiệu quả của quá trình tiền xử lý bằng kiềm ngoài việc dựa vào phần trăm hemicellulose và lignin bị loại bỏ, yếu tố khả năng thủy phân bởi enzyme để sản sinh ra glucose (hoặc đường khử) nhiều hay ít cần được xem xét. Mẫu đối chứng cũng được thủy phân cùng lúc với mẫu thử trong cùng 1 điều kiện như nhau chỉ khác là mẫu đối chứng chưa qua tiền xử lý. Tuy nhiên, hiệu quả thủy phân sẽ khác nhau.

Bảng 3: So sánh hiệu quả thủy phân của một số nguồn lignocellulose

Mẫu	Đường khử (g/L)	Đường glucose (g/L)
Vỏ quả cà phê (<i>robusta</i>)	37,33 ^a ± 0,22	24,36 ^a ± 0,59
Control (đối chứng)	11,1 ^b ± 0,18	8,63 ^b ± 0,39

Số liệu trong bảng thể hiện giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Các chữ số mũ trên các số liệu trong cùng 1 cột khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 0,05

Từ kết quả ở Bảng 3 kết hợp với công thức (1), có 76,8% lượng cellulose được chuyển đổi thành glucose sau quá trình thủy phân hiệu suất thủy phân (tương đương hiệu suất thủy phân 76,8%). Theo Menezes *et al.* (2014) khi tiến hành thủy phân vỏ quả cà phê chè (*C. arabica*) lượng glucose tạo thành là 27,02 g/L và hiệu suất thủy phân đạt 60,48% hoặc theo Silverstein *et al.* (2007) khi tiền xử lý thân cây bông bằng NaOH (2% NaOH, 60 phút, 121°C) cho hiệu suất thủy phân đạt 60,8%, thấp hơn so với trong nghiên cứu này. Điều này được lý giải như sau: khi tiền xử lý lignocellulose bằng kiềm kết hợp với vi sóng thì năng suất thủy phân cao hơn và hàm lượng đường sau thủy phân cũng được cải thiện hơn so với chỉ tiền xử lý bằng kiềm. Ngoài ra, hiệu suất thủy phân khi tiền xử lý bằng kiềm kết hợp với vi sóng sẽ

làm tăng diện tích bề mặt tiếp xúc của cellulose từ việc phân hủy lớp hemicellulose và lignin từ đó làm tăng tính nhạy cho các enzyme thủy phân (Ooshima *et al.*, 1984). Mặt khác, quá trình thủy phân cellulose bởi enzyme bao gồm 3 giai đoạn: hấp thụ các enzyme cellulase lên bề mặt phân tử cellulose, sự phân hủy sinh học của các cellulose và sự giải hấp thụ của enzyme cellulase ra khỏi cơ chất. Trong đó quá trình hấp thụ các enzyme lên bề mặt cellulose được xem là tiền đề cho quá trình thủy phân (Converse *et al.*, 1988). Trong nghiên cứu này, Tween 80 với nồng độ 1% (w/v) đã được lựa chọn cho thêm vào quá trình thủy phân nhằm tăng cường sự hấp thụ enzyme lên bề mặt cellulose. Kết quả cho thấy hiệu suất thủy phân cải thiện đáng kể (tăng lên 39%) so với khi không bổ sung Tween 80. Kết quả

này khá tương đồng với nghiên cứu của Wu and Ju (1998) khi thực hiện bổ sung thêm Tween 80 0,5% vào quá trình thủy phân giấy báo cho kết quả cải thiện 33% hiệu suất thủy phân.

3.4 Ảnh hưởng của quá trình lên men đến hàm lượng ethanol thu được

Các điều kiện lên men được tiến hành như Mục 2.5. Trong đó, nồng độ glucose trong dịch thủy phân

Bảng 4: Ảnh hưởng của thời gian lên men đến hàm lượng ethanol thu được

Thời gian lên men (giờ)	Glucose (g/L)	Ethanol (g/L)	Sản lượng lên men Yp/s (g Et/g Glucose)	Hiệu suất lên men Yet (%)
0	29,82 ^f ± 0,54			
24	8,41 ^c ± 0,49	6,71 ^b ± 0,32	0,3 ^b ± 0,021	58,72 ^b ± 1,21
48	6,07 ^d ± 0,42	9,02 ^c ± 0,41	0,36 ^{cd} ± 0,008	71,45 ^{cd} ± 1,75
72	4,88^e ± 0,36	10,06^d ± 0,31	0,39^d ± 0,012	75,96^d ± 2,04
72 (Control)	3,67 ^{ab} ± 0,27	4,67 ^a ± 0,32	0,17 ^a ± 0,014	33,71 ^a ± 1,08
96	4,39 ^{bc} ± 0,4	9,46 ^{cd} ± 0,28	0,36 ^{cd} ± 0,02	70,16 ^{cd} ± 1,92
120	3,25 ^a ± 0,34	9,25 ^{cd} ± 0,22	0,33 ^{bc} ± 0,01	65,73 ^{bc} ± 2,00

Số liệu trong bảng thể hiện giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Các chữ số mũ trên các số liệu trong cùng 1 cột giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 0,05

Kết quả Bảng 4 cho thấy, hàm lượng ethanol tạo ra trong quá trình lên men tăng dần theo thời gian lên men và đạt cực đại tại 72 giờ với hiệu suất lên men đạt 75,96%. Sau thời gian 72 giờ hàm lượng ethanol không tăng nữa mà có xu hướng giảm nhẹ. Lý do nấm men đã sử dụng hết đường glucose có trong dịch lên men để chuyển hóa thành ethanol. Đồng thời, quá trình đó có sự suy giảm mật độ tế bào nấm men theo thời gian lên men, từ đó làm cho hiệu suất lên men giảm cũng như hàm lượng ethanol không được sản sinh ra nữa. Nghiên cứu này hoàn toàn phù hợp với kết quả nghiên cứu của Park *et al.* (2010), khi thủy phân giấy thải bởi enzyme cellulase Novo Nordisk Co. (Bagsvaerd, Denmark) trong điều kiện pH 4,8; nhiệt độ 50°C, tỷ lệ enzyme 9 FPU/g thì thấy hiệu suất lên men tăng nhanh ở thời gian 24 giờ đầu của quá trình lên men. Sau 48 giờ thì hiệu suất tăng chậm, tuy nhiên hiệu suất lên men vẫn tiếp tục tăng cho đến thời điểm 120 giờ thì không tăng nữa.

Theo nghiên cứu của Menezes *et al.* (2014), vỏ quả cà phê chèn (*C. arabica*) được tiền xử lý với 4% (w/v) NaOH rồi thủy phân bởi hỗn hợp enzyme cellulase (13,82 FPU/g). Kết quả đạt được: 27,02 g glucose/L tạo thành từ quá trình thủy phân và sau khi lên men bằng nấm men khô (3 g/L) thì thu được 11,99 g ethanol/L. Trong nghiên cứu này, sau quá trình lên men lượng ethanol thu được chỉ đạt 10,06 g/L, kết quả này thấp hơn so với nghiên cứu của Menezes *et al.* (2014). Điều này có thể lý giải: Trong nghiên cứu của Menezes sử dụng nấm men khô (3 g/L) còn trong nghiên cứu này sử dụng nấm men đã nhân giống cấp 2 sau đó được bổ sung vào dịch thủy

trước khi lên men đo được là 29,82 g/L. Song song với quá trình lên men mẫu thử thì mẫu đối chứng được thiết lập với nồng độ glucose đo được trước khi lên men là 16,86 g/L. Các mẫu được lên men ở nhiệt độ 35°C, lắc 120 vòng/phút và sau các khoảng thời gian 24, 48, 72, 96, 120 giờ, lấy 1 phần dịch lên men đem đi xác định hàm lượng glucose còn lại và hàm lượng ethanol tạo thành.

phân với mật độ tế bào 3×10^8 (tế bào/mL) nên hiệu suất lên men còn thấp, chỉ đạt 0,39 (so với lý thuyết là 0,51, có nghĩa là ứng với 1 g glucose nếu lên men sẽ tạo thành 0,51 g ethanol). Qua đó, hiệu suất chuyển đổi ethanol cho biết được hàm lượng glucose trong dịch lên men cao. Hàm lượng glucose cao cho thấy quá trình thủy phân rất hiệu quả hoặc quá trình lên men diễn ra rất tốt.

4 KẾT LUẬN

Vỏ quả cà phê được xem như là nguồn sinh khối lignocellulose trong sản xuất ethanol vì có hàm lượng cellulose tương đối cao (25,8%) và hemicellulose lại rất thấp (3,6%). Trong khi lignin chiếm tới 20,07%, điều này gây khó khăn cho quá trình thủy phân bởi enzyme. Để giải quyết khó khăn trên, nghiên cứu này lựa chọn quá trình tiền xử lý bằng kiềm để giúp loại bỏ lignin trong vỏ quả cà phê và hiệu suất loại bỏ lignin đạt được là 76,63%. Ở các điều kiện thủy phân, lên men như trên thì 100 g vỏ quả cà phê (chưa qua tiền xử lý) sản xuất ra được 10,13 g ethanol (tương ứng với hiệu suất chuyển đổi glucose thành ethanol là 0,39).

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Trường Đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh, Trường Đại học Cần Thơ và tất cả đồng nghiệp đã hỗ trợ kỹ thuật cũng như trang thiết bị cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

CUNIFF, P.E., 1995. Official Methods of Analysis of AOAC International: Agricultural Chemicals; Contaminants; Drugs. AOAC International.

- Ballesteros, M., Oliva, J.M., Negro, M.J., Manzaneres, P. and Ballesteros, I., 2004. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochemistry*. 39(12): 1843-1848.
- Bonilla-Hermosa, V.A., Duarte, W.F., and Schwan, R.F., 2014. Utilization of coffee by-products obtained from semi-washed process for production of value-added compounds. *Bioresource Technology*. 166: 142-150.
- Chen, Y., Sharma-Shivappa, R.R., Keshwani, D., and Chen, C., 2007. Potential of agricultural residues and hay for bioethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 142(3): 276-290.
- Converse, A.O., Matsuno, R., Tanaka, M. and Taniguchi, M., 1988. A model of enzyme adsorption and hydrolysis of microcrystalline cellulose with slow deactivation of the adsorbed enzyme. *Biotechnology and Bioengineering*. 32(1): 38-45.
- DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.T. and Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28(3): 350-356.
- Elias, L.G., 1979. Chemical composition of coffee-berry by-products. In: Braham, J.E. (Ed). *Coffee pulp: composition, technology, and utilization*. IDRC. Ottawa, pp. 11-16.
- Franca, A. S., Oliveira, L. S. and Franca, A. S., 2009. Coffee processing solid wastes: current uses and future perspectives. In: Geoffrey, S.A. and Pablo, A. (Eds). *Agricultural Wastes*. Nova Science Publishers Inc.. New York, 155-189.
- Gnansounou, E., 2008. Fuel ethanol. Current status and outlook. In: Pandey, A. (Ed). *Handbook of Plant-Based Biofuels*. CRC Press. Taylor and Francis Group, pp. 57-71.
- Gurram, R., Al-Shannag, M., Knapp, S., Das, T., Singsaas, E., and Alkasrawi, M., 2016. Technical possibilities of bioethanol production from coffee pulp: a renewable feedstock. *Clean Technologies and Environmental Policy*. 18(1): 269-278.
- Leifa, F., Pandey, A. and Soccol, C.R., 2001. Production of *Flammulina velutipes* on coffee husk and coffee spent-ground. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 44(2): 205-212.
- Menezes, E.G., do Carmo, J.R., Alves, J.G.L. et al., 2014. Optimization of alkaline pretreatment of coffee pulp for production of bioethanol. *Biotechnology Progress*. 30(2): 451-462.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31: 426-428.
- Oliveira, L.S., Franca, A.S., Camargos, R.R.S., et al. 2008. Coffee oil as a potential feedstock for biodiesel production. *Bioresource Technol.* 99: 3244-3250.
- Ooshima, H., Aso, K., Harano, Y., and Yamamoto, T., 1984. Microwave treatment of cellulosic materials for their enzymatic hydrolysis. *Biotechnology Letters*. 6(5): 289-294.
- Palonen, H., 2004. Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. VTT Technical Research Centre of Finland, 84 pages.
- Park, I., Kim, I., Kang, K., Sohn, H., Rhee, I., Jin, I., and Jang, H., 2010. Cellulose ethanol production from waste newsprint by simultaneous saccharification and fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. *Process Biochemistry*. 45(4): 487-492.
- Saha, B.C. and Cotta, M.A., 2008. Fuel ethanol production from agricultural residues: current status and future prospects. *Journal of Biotechnology*. 136: 285-286.
- Sayyad, S.A.F., Chaudhari, S.R., and Panda, B.P., 2015. Quantitative determination of ethanol in arishta by using UV-visible spectrophotometer. *Pharmaceutical and Biological Evaluations*. 2(5): 204-207.
- Shankaranand, V. and Lonsane, B., 1994. Coffee husk: an inexpensive substrate for production of citric acid by *Aspergillus niger* in a solid-state fermentation system. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 10(2): 165-168.
- Shenoy, D., Pai, A., Vikas, R., Neeraja, H., Deeksha, J., Nayak, C., and Rao, C.V., 2011. A study on bioethanol production from cashew apple pulp and coffee pulp waste. *Biomass and Bioenergy*. 35(10): 4107-4111.
- Silverstein, R.A., Chen, Y., Sharma-Shivappa, R.R., Boyette, M.D., and Osborne, J., 2007. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Bioresource Technology*. 98(16): 3000-3011.
- Van Soest P.J. and Wine R.H., 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. Determination of plant cellwall constituents. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 50: 50-55.
- Wu, J., and Ju, L.K., 1998. Enhancing enzymatic saccharification of waste newsprint by surfactant addition. *Biotechnology Progress*. 14(4): 649-652.
- Xu, J., and Cheng, J.J., 2011. Pretreatment of switchgrass for sugar production with the combination of sodium hydroxide and lime. *Bioresource Technology*. 102(4): 3861-3868.