

NGHIÊN CỨU ĐIỀU KIỆN THỦY PHÂN VÀ LÊN MEN ETHANOL TỪ VỎ XOÀI SỬ DỤNG NẤM MEN SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Huỳnh Xuân Phong*

TÓM TẮT

Đề tài nhằm tận dụng nguồn phế phẩm từ sản phẩm nông nghiệp là vỏ xoài để sản xuất ethanol sử dụng nấm men *Saccharomyces cerevisiae*. Nội dung nghiên cứu bao gồm: Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ H_2SO_4 cũng như nhiệt độ và thời gian đến quá trình thủy phân vỏ xoài, nghiên cứu ảnh hưởng mật số tế bào nấm men và pH đến khả năng lên men, xác định thời gian và nhiệt độ thích hợp cho quá trình lên men ethanol. Kết quả nghiên cứu cho thấy vỏ xoài khi được thủy phân với nồng độ H_2SO_4 3% (v/v) ở $121^\circ C$ trong 1 giờ có hàm lượng đường khử cao nhất là 8,49% (w/v). Điều kiện lên men ethanol từ dịch thủy phân vỏ xoài được xác định ở pH 5,5, mật số tế bào nấm men 10^5 tb/mL và lên men 7 ngày ở nhiệt độ $30^\circ C$, hàm lượng ethanol đạt 3,08% (v/v).

ABSTRACT

The objective of this study was to examine the feasibility for the production of ethanol from mango peel using *Saccharomyces cerevisiae*. The experimental activities included: studying the effects of H_2SO_4 concentration, time and temperature on the hydrolysis of mango peel, assessing the effects of yeast inoculum levels, pH levels to the fermentation capacity, determining the favourable time and temperature for ethanol fermentation. The results showed that the hydrolysis of mango peel with H_2SO_4 of 3% (v/v) at $121^\circ C$ for 1 hour released 8.49% (w/v) reducing sugars. The fermentation conditions including yeast inoculum levels at 10^5 cells/mL and pH 5.5 were found to be favourable for ethanol fermentation. In the treatment of 7 days of incubation at $30^\circ C$, the ethanol concentration of 3.08% (v/v) was obtained.

Title: Study on the hydrolysis of mango peel and ethanol fermentation conditions using *Saccharomyces cerevisiae*

Từ khóa: Dịch đường thủy phân, ethanol, lên men ethanol, *Saccharomyces cerevisiae*, vỏ xoài

Keywords: Ethanol, ethanol fermentation, hydrolysate, mango peel, *Saccharomyces cerevisiae*

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 23/9/2016;

Ngày nhận kết quả bình duyệt: 05/10/2016;

Ngày chấp nhận đăng bài: 05/01/2017.

Tác giả:

* ThS., Trường ĐH Cần Thơ
hxphong@ctu.edu.vn

1. Giới thiệu

Ethanol là một trong những hợp chất hữu cơ có nhiều ứng dụng nhất trong đời sống cũng như trong công nghiệp. Tùy theo nồng độ, nó được sử dụng như thức uống, chất sát trùng, chất chống đông, chất ức chế, dung môi và là một chất trung gian trong sản xuất các hóa chất như acetaldehyde, acid acetic, ethyl acetate, ethyl acrylate, ethylamine, ethyl chloride và glycol ether. Bên cạnh đó, ethanol còn là nguyên liệu thô chủ yếu trong quá trình sản xuất dược phẩm, nhựa, sơn mài, nước hoa

và mỹ phẩm. Hiện nay, nhu cầu về ethanol công nghiệp với độ tinh sạch cao ngày càng cấp thiết, bởi ethanol đã được chứng minh là một loại nhiên liệu sinh học có tiềm năng thay thế những nguồn nhiên liệu hóa thạch đang dần cạn kiệt (Alfenore et al., 2002). Có thể pha trộn hợp lý một lượng vừa phải ethanol với xăng để làm nhiên liệu nhằm tăng tính thân thiện với môi trường đồng thời hạ giá thành.

Việc sản xuất ethanol từ quá trình lên men chịu ảnh hưởng đáng kể của giá thành nguyên liệu, hơn một nửa chi phí sản xuất (Classen et

al., 1999). Để giảm chi phí sản xuất thì việc tận dụng các nguồn nguyên liệu rẻ tiền từ phế phẩm nông nghiệp là giải pháp đang được quan tâm. Xoài được xem là một trong những loại trái cây được ưa chuộng nhất trên thế giới bởi màu sắc hấp dẫn, mùi vị thơm ngon và giá trị dinh dưỡng cao. Các nước sản xuất xoài lớn nhất trên thế giới (trên 1 triệu tấn/năm) là Ấn Độ, Trung Quốc, Thái Lan, Indonesia, Pakistan, Mexico, Brazil. Sản lượng xoài của 7 nước này chiếm 78% sản lượng xoài thế giới và có ảnh hưởng rất lớn đến thị trường xoài thế giới. Việt Nam thuộc nhóm 20 nước sản xuất xoài có tiềm năng của thế giới, sản lượng xoài của Việt Nam năm 2012 đạt 775.942 tấn trên diện tích khoảng 73.692 ha (FAO, 2013). Xoài không những được sử dụng như một loại trái cây tươi mà còn được chế biến thành nhiều loại sản phẩm khác nhau. Đó đó, một lượng rất lớn phế phẩm từ xoài được tạo ra hàng năm từ các nhà máy. Trong quá trình sản xuất, vỏ xoài là phế phẩm chính, chiếm khoảng 15-20% thành phần quả và được thải ra ngoài môi trường do không có giá trị kinh tế. Tuy nhiên, do trong vỏ xoài chứa một lượng lớn chất xơ tổng (73,04%) và đường khử (Arumugam & Manikandan, 2011) nên nghiên cứu này nhằm khảo sát các điều kiện thích hợp cho quá trình thủy phân và xác định các điều kiện lên men sản xuất ethanol từ vỏ xoài.

2. Nội dung nghiên cứu

2.1. Nguyên vật liệu và hóa chất

- Vỏ xoài được thu từ Công ty Rau quả Tiền Giang, tỉnh Tiền Giang.

- Nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (No. 2.1, LU1250) được lưu trữ tại Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, trường Đại học Cần Thơ.

- Hóa chất: H_2SO_4 , NaOH, H_3BO_3 , $NaHSO_3$, D-glucose, yeast extract, peptone,... được mua từ sản phẩm thương mại của Merck (Đức) và HiMedia Laboratories (Ấn Độ).

- Môi trường nuôi cấy nấm men: YPG (yeast extract 0,3%; khoai tây 20%; glucose 2%).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chuẩn bị nguyên liệu

Vỏ xoài được phơi dưới ánh nắng mặt trời trong 2-3 ngày và được cắt thành miếng nhỏ

(khoảng 2-3 cm). Sau đó vỏ tiếp tục được sấy ở nhiệt độ 65°C trong 24 giờ. Nguyên liệu được xay thành bột, trộn đều và trữ ở 4°C để thực hiện các thí nghiệm trong đề tài nghiên cứu.

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ H_2SO_4 đến quá trình thủy phân

Thí nghiệm nhằm xác định nồng độ H_2SO_4 thích hợp cho quá trình thủy phân. Cân 10 g vỏ xoài đã xay nhuyễn và cho vào 100ml dung dịch acid H_2SO_4 được pha loãng với các nồng độ 0,5; 1; 2; 3 và 4% (v/v). Xử lý nhiệt ở 121°C trong 15 phút (Arumugam & Manikandan, 2011). Lọc dịch thủy phân và chỉnh pH về 6,0 bằng NaOH 20N. Hàm lượng đường khử được xác định bằng phương pháp DNS (Bennett, 1971) và độ Brix được đo bằng khúc xạ kế (Hand Refractometer, FG103/113, Euromex-Hà Lan). Thử nghiệm được thực hiện 3 lần lặp lại.

2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian đến quá trình thủy phân

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 2 nhân tố và 3 lần lặp lại: Nhiệt độ với 4 mức độ (nhiệt độ phòng, 60°C, 90°C, 100°C và 121°C) và thời gian với 5 mức độ (15 phút, 30 phút, 1 giờ, 2 giờ và 3 giờ). Cho 10g vỏ xoài đã xay nhuyễn vào 100ml dung dịch acid H_2SO_4 được pha loãng với nồng độ thích hợp từ thí nghiệm trước. Ủ hỗn hợp ở nhiệt độ và thời gian như bố trí thí nghiệm. Lọc dịch thủy phân và chỉnh pH về 6,0 bằng NaOH 20N. Mẫu được xác định hàm lượng đường khử và độ Brix.

2.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của mật số giống nấm men *S. cerevisiae*

Thí nghiệm với mục đích xác định mật số giống chủng thích hợp cho quá trình lên men ethanol. Nấm men được tăng sinh trong môi trường YPG ở 30°C trong 16-24 giờ, mật số tế bào đạt khoảng $2,4 \times 10^8$ tế bào/ml (xác định bằng phương pháp đếm trực tiếp trên buồng đếm hồng cầu). Pha loãng dịch nuôi cấy nấm men để đạt các nồng độ giống chủng ban đầu là 10^8 , 10^7 và 10^6 tế bào/ml. Cho 100ml dung dịch xoài được thủy phân vào bình tam giác 250 mL, khử trùng bằng $NaHSO_3$ (140 mg/L) trong 30 phút. Cấy 1ml dịch huyền phù nấm men vào mỗi bình tam giác 250ml chứa 100

mL môi trường dịch lên men, mật số nấm men ban đầu trong dịch lên men tương ứng là 10^6 , 10^5 và 10^4 tế bào/mL. Ủ trong điều kiện kỵ khí (đậy bằng waterlock) ở nhiệt độ môi trường (28-32°C). Sau 7 ngày ủ, chưng cất dịch lên men để xác định hàm lượng ethanol và quy về nồng độ ethanol ở 20°C.

2.2.5. Khảo sát ảnh hưởng của pH đến quá trình lên men

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 1 nhân tố và 3 lần lặp lại. pH dịch vò thủy phân được điều chỉnh với 5 mức độ: 4,0; 4,5; 5; 5,5 và 6,0. Thí nghiệm bố trí với 100ml dịch thủy phân với pH đã được điều chỉnh như bố trí thí nghiệm. Thanh trùng bằng NaHSO_3 (140 mg/L) trong 30 phút. Cấy nấm men theo nồng độ đã khảo sát. Đậy kín bình bằng waterlock và lên men trong 7 ngày ở nhiệt độ môi trường. Các chỉ tiêu theo dõi: Độ Brix, pH và hàm lượng ethanol (ở 20°C) sau lên men bằng phương pháp chưng cất.

2.2.6. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian đến quá trình lên men

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 2 nhân tố và 3 lần lặp lại: Nhiệt độ (25, 30 và 35°C) và thời gian lên men (3, 5, 7 và 9 ngày). Cho vào bình tam giác 100 mL dịch vò xoài được thủy phân với pH thích hợp ở thí nghiệm trước. Thanh trùng bằng NaHSO_3 (140 mg/L) trong 30 phút. Cấy nấm men với mật số đã khảo sát, đậy kín bình bằng water-lock và tiến hành lên men ở các điều kiện nhiệt độ và thời gian lên men theo bố trí thí nghiệm. Các chỉ tiêu theo dõi: độ Brix, pH và hàm lượng ethanol (ở 20°C).

2.2.7. Xử lý kết quả:

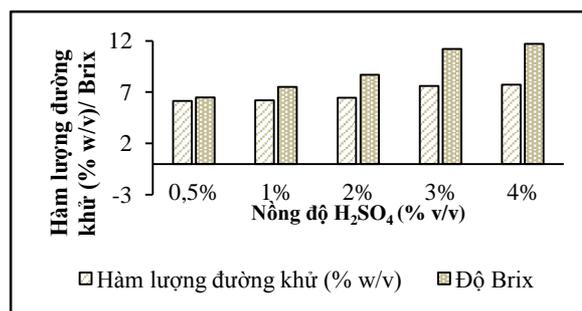
Kết quả thí nghiệm được xử lý và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA). Số liệu thí nghiệm được xử lý thống kê bằng chương trình Statgraphics v5.0 (Statpoint Technologies, Inc., USA).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ H_2SO_4 đến quá trình thủy phân

Kết quả cho thấy nồng độ acid ảnh hưởng rất lớn đến quá trình thủy phân các hợp chất

lignocellulose, thể hiện ở lượng đường khử được tạo thành tăng nhanh theo nồng độ acid (Hình 1). Khả năng thủy phân tỷ lệ thuận với nồng độ ion H^+ , lượng ion H^+ được hình thành càng nhiều trong dung dịch thì quá trình thủy phân xảy ra càng nhanh (Mosier, Ladisch & Ladich, 2002). Vì vậy, việc phá vỡ những liên kết glucosic diễn ra nhanh, giúp quá trình chuyển hóa hemicellulose thành xylose. Acid hoạt động như một chất xúc tác nên với nồng độ cao thì sẽ tăng tốc độ phản ứng và tạo ra hàm lượng đường khử cao.



Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ H_2SO_4 (% v/v) đến quá trình thủy phân

*Ghi chú: Các cột có cùng mẫu tự giống nhau theo cùng nhóm chỉ tiêu thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% ($CV = 1,75\%$).

Sau 15 phút thủy phân, lượng đường khử có giá trị cao nhất (7,74% w/v) ở nồng độ H_2SO_4 4% (v/v), tiếp đến (7,61% w/v) ở nồng độ H_2SO_4 3% (v/v), sau đó là 2% (w/v), 1% (w/v) và thấp nhất (6,14% w/v) ở nồng độ H_2SO_4 0,5% (v/v). Kết quả đo độ Brix cũng cho thấy hàm lượng chất hòa tan trong dịch thủy phân tăng theo giá trị nồng độ H_2SO_4 (Hình 1). Ở nồng độ acid cao cho giá trị độ Brix cao và ngược lại. Cụ thể là ở nồng độ acid 4%, sản phẩm thủy phân có độ Brix cao nhất (11,7°Brix) trong khi độ Brix thấp nhất (6,5°Brix) khi thủy phân với acid ở nồng độ 0,5% (v/v). Việc lựa chọn nồng độ acid thích hợp cho quá trình thủy phân có ý nghĩa lớn và ảnh hưởng đến hiệu quả sản xuất ethanol từ vỏ xoài. Ở nồng độ acid thấp (0,5% v/v), hiệu quả thủy phân khá thấp. Ngược lại, ở nồng độ acid cao (4% v/v) quá trình thủy phân diễn ra mạnh nhưng sẽ tổn hóa chất và gây khó khăn cho quá trình trung hòa để lên men ethanol sau

này. Kết quả thống kê cho thấy hàm lượng đường khử sinh ra khi được xử lý với H₂SO₄ 3% và 4% (v/v) không có khác biệt ý nghĩa (tương ứng 7,61% và 7,74% w/v). Do vậy, nồng độ acid 3% (v/v) được xem là thích hợp cho quá trình thủy phân vỏ xoài.

3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian đến quá trình thủy phân

Kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian đến phản ứng thủy phân vỏ xoài cho thấy hàm lượng đường khử thu được tăng dần theo nhiệt độ thủy phân (Bảng 1). Theo nghiên cứu của Xiang, Kim & Lee (2003), sự phá vỡ liên kết hydrogen trong thành phần hemicellulose và cellulose diễn ra nhanh chóng khi gia tăng nhiệt độ. Ở nhiệt độ thấp (30 - 90°C) quá trình thủy phân vỏ xoài diễn ra chậm hơn so với khi thực hiện ở nhiệt độ cao (100 - 121°C). Cụ thể, hàm lượng đường thu được tăng gần như gấp đôi khi được thủy phân ở nhiệt độ cao từ 100 - 121°C (khoảng 8%) so với khi thủy phân ở các mức nhiệt độ thấp hơn. Theo Girio et al. (2010), nhiệt độ thích hợp cho quá trình thủy phân hemicellulose bằng acid sulphuric hoặc acid hydrochloric là khoảng 121 - 160°C.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian đến quá trình thủy phân

Nhiệt độ thủy phân (°C)	Thời gian thủy phân	Hàm lượng đường khử (w/v %)	Độ Brix sau thủy phân
Nhiệt độ phòng	15 phút	1,84 ^l	5,0
	30 phút	3,54 ^l	6,17
	1 giờ	4,07 ^k	6,33
	2 giờ	4,10 ^k	6,33
	3 giờ	4,33 ^k	7,17
60°C	15 phút	3,29 ^l	6,17
	30 phút	3,33 ^l	6,83
	1 giờ	4,02 ^k	7,0
	2 giờ	4,18 ^k	7,67
	3 giờ	4,42 ^{ik}	8,17
90°C	15 phút	4,83 ^{hi}	7,83
	30 phút	5,07 ^{gh}	8,17
	1 giờ	6,17 ^{de}	8,17
	2 giờ	5,85 ^{def}	9,0
	3 giờ	5,50 ^{fg}	9,17

100°C	15 phút	5,76 ^{ef}	9,33
	30 phút	6,22 ^d	9,83
	1 giờ	7,25 ^c	9,83
	2 giờ	7,67 ^{bc}	10,17
	3 giờ	8,03 ^b	10,33
121°C	15 phút	7,53 ^c	10,83
	30 phút	7,58 ^c	11,33
	1 giờ	8,49 ^a	12,17
	2 giờ	8,53 ^a	12,33
	3 giờ	8,58 ^a	12,5
CV (%)		3,69	

*Ghi chú: Các trị trung bình trong cùng một cột theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%.

Như vậy phản ứng thủy phân các hợp chất lignocellulose trong vỏ xoài xảy ra mạnh ở 121°C trong thời gian khoảng 60 phút đầu tiên của quá trình xử lý mẫu. Để đạt hiệu suất cao của quá trình thủy phân có thể duy trì phản ứng trong thời gian dài hơn. Tuy nhiên sẽ tiêu tốn nhiều thời gian cho quá trình xử lý mẫu, nên làm giảm hiệu quả của quá trình sản xuất. Đồng thời, theo Lenihan et al. (2011), khi thủy phân ở nhiệt độ quá cao và thời gian kéo dài có thể làm cho các monosaccharide phân hủy thành các chất không mong muốn, có khả năng ức chế quá trình lên men sau đó như furfural, hydroxymethylfurfural-HMF, acid acetic, acid levulinic, acid formic, acid uronic, acid vanillic, phenol, cinnamaldehyde, formaldehyde, ... Do vậy tốt nhất có thể lựa chọn thời gian xử lý mẫu trong 60 phút để có thể đạt được hiệu suất và hiệu quả cao ở mức độ hợp lý.

Hàm lượng xơ tổng trong vỏ xoài là 9,33% (Ashoush & Gadallah, 2011), với 8,49% đường khử sinh ra trong nghiệm thức nhiệt độ 121°C và thời gian 1 giờ thủy phân thì hiệu suất phản ứng đạt 79,21%. Kết quả này cao gấp đôi so với hiệu suất thu được (38,6%) trong nghiên cứu thủy phân bã mía ở điều kiện 6% acid phosphoric, nhiệt độ 100°C trong thời gian 5 giờ đã được công bố bởi Gamez, Ramírez, Garrote & Vázquez (2004). Hàm lượng đường khử sinh ra từ việc thủy phân vỏ sầu riêng là 5,6% (w/v) ở 121°C trong 45 phút với 2% acid sulphuric (Matura, Nuanphan & Woatthichai, 2012). Quá trình thủy phân táo đỏ (Dwi, Sri, Indah, Neli & Pandit, 2012)

cũng cho hàm lượng đường khử cao nhất (3,28% w/v) khi được thực hiện ở 121°C trong 1 giờ. Do vậy, có thể thấy điều kiện cho quá trình xử lý H₂SO₄ 3% (v/v) ở điều kiện 121°C trong 1 giờ là có hiệu quả vì cho hàm lượng đường khử cao đồng thời tránh được sự phân hủy các loại đường tạo thành, tiết kiệm chi phí và thời gian thủy phân.

3.3. Ảnh hưởng của mật số giống chủng nấm men *S. cerevisiae*

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của mật số nấm men *S. cerevisiae* đến quá trình lên men ethanol từ dịch thủy phân vỏ xoài được trình bày trong Bảng 2. Dịch sau lên men có pH thấp hơn so với trước lên men (pH ban đầu là 6,0), giá trị pH của dịch đường giảm dần qua các giai đoạn lên men, khoảng dao động pH giữa các nghiệm thức sau lên men là 5,25 - 5,91. Sự giảm pH này do sự oxy hoá đường thành các acid hữu cơ. Điều này có thể giải thích do trong quá trình chuyển hóa đường thành ethanol, nấm men đã phân giải đường thành các sản phẩm trung gian - các acid hữu cơ, làm giảm pH của dịch lên men. Bên cạnh đó, kết quả chứng tỏ quá trình lên men xảy ra tốt, nấm men phát triển vượt trội so với vi khuẩn gây chua nên pH không giảm xuống đến mức 3,0 - 3,5.

Tương tự như pH, độ Brix trước và sau lên men có sự chênh lệch. Nguyên nhân do sự chuyển hóa từ đường sang ethanol của dòng nấm men. Độ Brix ban đầu đạt giá trị 12°Brix, sau thời gian lên men ở nghiệm thức log 6 tb/mL kết quả đo được là 9°Brix, ở log 5 tb/ml là 9,5°Brix. Khi chủng với mật số log 4 tb/ml thì độ Brix giảm rất ít (11,5°Brix) so với thời điểm trước lên men.

Bảng 2. Kết quả ảnh hưởng của mật số nấm men đến quá trình lên men

Mật số nấm men	pH sau lên men	Độ Brix sau lên men	Độ cồn (% v/v ở 20°C)
Log 6 tb/ml	5,25	9,0	3,47 ^a
Log 5 tb/ml	5,37	9,5	3,21 ^a
Log 4 tb/ml	5,91	11,5	0,37 ^b
CV (%)			4,56

*Ghi chú: Các trị trung bình trong cùng một cột theo sau có các mẫu tự giống nhau thể

hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%.

Kết quả thống kê giá trị trung bình hàm lượng ethanol 3 lần lặp lại cho thấy mật số nấm men log 5 và log 6 tế bào/ml cho giá trị trung bình hàm lượng ethanol cao hơn (lần lượt là 3,21% và 3,47% v/v) và khác biệt có ý nghĩa với 0,37% (v/v) ở mật số log 4 tế bào/ml. Do đó mật số log 5 tế bào/ml (10⁵ tế bào/ml) được chọn để lên men nhằm tạo ra ethanol cao đồng thời tiết kiệm một lượng nấm men so với khi chủng với mật số log 6 tế bào/ml.

3.4. Ảnh hưởng của pH đến quá trình lên men

Kết quả độ Brix và pH sau lên men cho thấy quá trình lên men ethanol đã làm giảm độ Brix (Brix ban đầu là 12) và pH của môi trường (Bảng 3.). Kết quả cũng cho thấy ở pH 5,5 và 6,0 sản phẩm thu được có lượng ethanol tương ứng là 3,01% và 3,14% (v/v), cao hơn và khác biệt có ý nghĩa so với các mẫu lên men ở các giá trị pH 4,0; 4,5 và 5,0. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu đã được công bố bởi Arumugam & Manikandan (2011). Kết quả thống kê với độ tin cậy 95%, lượng ethanol ở pH 5,5 và 6,0 không có sự khác biệt. Như vậy, nhằm tiết kiệm NaOH dùng trong quá trình trung hòa dịch thủy phân, pH 5,5 là thích hợp để lên men ethanol từ vỏ xoài.

Bảng 3. Ảnh hưởng của pH đến quá trình lên men

pH trước lên men	pH sau lên men	Độ Brix sau lên men	Hàm lượng ethanol (% v/v ở 20°C)
4,0	3,92	11,0	0,43 ^c
4,5	4,42	10,7	0,94 ^b
5,0	4,67	10,2	1,13 ^b
5,5	5,28	10,0	3,01 ^a
6,0	5,25	9,2	3,14 ^a
CV (%)			2,23

*Ghi chú: Các trị trung bình trong cùng một cột theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%.

3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian đến quá trình lên men

Trong thí nghiệm này, dịch vỏ xoài sau khi thủy phân được tiến hành lên men với thời gian 3, 5, 7 và 9 ngày tại các điều kiện nhiệt độ 25°C, 30°C và 35°C. Các giá trị pH và nồng độ chủng giống ban đầu được điều chỉnh theo kết quả ở thí nghiệm trên. Kết quả sau lên men được trình bày trong Bảng 4. Tương tự như các thí nghiệm trước, độ Brix và pH sau lên men đều giảm (độ Brix và pH ban đầu tương ứng là 12 và 5,5). Kết quả cũng cho thấy không có sự khác biệt ở độ tin cậy 95% về độ cồn ở hai mức nhiệt độ 25°C và 30°C khi lên men sau 3, 5, 7 và 9 ngày. Như vậy, hai mức nhiệt độ 25°C và 30°C là thích hợp cho quá trình lên men do các enzyme hoạt động hiệu quả ở khoảng nhiệt độ này.

Tốc độ các enzyme xúc tác phản ứng tăng cùng với nhiệt độ cho đến khi đạt đến nhiệt độ mà ở đó enzyme bắt đầu biến tính (Southernland, 1990). Ở nhiệt độ lên men 35°C cho thấy khả năng lên men của nấm men có khuynh hướng giảm, hàm lượng ethanol chỉ đạt 2,63% và 2,87% (v/v) sau 7 và 9 ngày lên men. Nguyên nhân là do nhiệt độ cao (35°C) hạn chế hoạt tính của các enzyme chuyển hóa đường thành ethanol, đồng thời việc tiến hành lên men ở nhiệt độ này cũng tiêu hao năng lượng để nâng nhiệt độ lên cao. Thời gian lên men ở nhiệt độ 30°C được chọn là 7 ngày vì ở mức thời gian này hàm lượng ethanol sinh ra cao nhất (3,08% v/v) và không có sự khác biệt khi lên men 9 ngày (2,94% v/v). Việc lựa chọn mức thời gian như trên có thể giảm thời gian lên men. Hàm lượng ethanol sau 7 ngày lên men ở 30°C (3,08% v/v) cũng không khác biệt ý nghĩa so với hàm lượng ethanol đạt được sau 7 và 9 ngày lên men ở 25°C, hàm lượng ethanol lần lượt là 3,15% và 3,21% (v/v). Nhiệt độ lên men ở 30°C nằm trong khoảng nhiệt độ môi trường xung quanh (trong khoảng 28-32°C) nên sẽ tiết kiệm được chi phí điều nhiệt cũng như chi phí giảm nhiệt độ về mức 25°C. Ngoài ra, kết quả cũng cho thấy khi lên men ở 35°C thì hàm lượng ethanol có giảm nhưng vẫn còn duy trì khả năng lên men của nấm men, điều đó cũng cho thấy một điểm thuận lợi đối với chủng nấm men thử nghiệm là khi vào thời điểm mùa hè và trong tình trạng nóng lên toàn cầu hiện nay, chủng nấm men *S. cerevisiae* vẫn không hoàn toàn bị ức chế. Tóm lại, nhiệt độ 30°C và thời gian lên men 7 ngày là điều kiện thích hợp cho lên men ethanol từ dịch thủy phân vỏ xoài.

Bảng 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian lên men lên lượng ethanol sinh ra

Nhiệt độ lên men (°C)	Thời gian lên men (ngày)	pH sau lên men	Độ Brix sau lên men	Hàm lượng ethanol (% v/v ở 20°C)
25	3	5,46	11,2	0,12 ^e
	5	5,36	10,7	1,86 ^c
	7	5,13	9,2	3,15 ^a
	9	5,12	8,8	3,21 ^a
30	3	5,45	11,0	0,06 ^e
	5	5,34	10,2	1,61 ^c
	7	5,16	8,8	3,08 ^{ab}
	9	5,22	9,7	2,94 ^{ab}
35	3	5,49	12,0	0 ^e
	5	5,43	10,8	0,73 ^d
	7	5,28	10,2	2,63 ^b
	9	5,27	9,7	2,87 ^{ab}
CV (%)				6,96

*Ghi chú: Các trị trung bình trong cùng một cột theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%.

Quá trình lên men dịch thủy phân vỏ xoài tạo ra ethanol với nồng độ 3,08% (v/v). Nếu so với sản xuất ethanol từ nguyên liệu tinh bột có thể đạt tới 6,0 - 9,5% (v/v), lượng ethanol sản xuất từ nguyên liệu vỏ xoài là không cao (chỉ vào khoảng gần 50% so với sản xuất từ tinh bột). Tuy nhiên, kết quả này cũng chỉ ra tiềm năng lớn cho việc sản xuất ethanol vì đây là nguồn phế phẩm nông nghiệp khá dồi dào và không ảnh hưởng đến cung cấp lương thực cho con người, đồng thời giúp giải quyết các vấn đề về môi trường do thải bỏ trong sản xuất.

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy quá trình thủy phân vỏ xoài thành dịch đường đạt hiệu quả cao khi được thực hiện với H₂SO₄ 3% (v/v) ở điều kiện nhiệt độ và thời gian là 121°C trong 1 giờ, hàm lượng đường khử thu được là 8,49% (w/v). Kết quả khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men cho thấy điều kiện thích hợp cho lên men ethanol từ dịch thủy phân vỏ xoài với mật số tế bào nấm men 10⁵ tb/mL và pH 5,5, lên men trong 7 ngày ở nhiệt độ 30°C cho hàm lượng ethanol đạt 3,08% (v/v). Kết quả cho thấy tiềm năng tận dụng các nguồn phụ phế phẩm nông nghiệp trong sản xuất ethanol trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alfenore, S., C. Molina-Jouve, S.E. Guillouet, J.L. Uribelarrea, G. Goma & L. Benbadis. (2002). Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 67-72.
2. Arumugam, R. & M. Manikandan. (2011). Fermentation of pretreated hydrolyzates of banana and mango fruit wastes for ethanol production. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*, 2(2), 246-256.
3. Ashoush, I.S & M.G.E. Gadallah. (2011). Utilization of mango peels and seed kernels powders as sources of phytochemicals in biscuit. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 6(1), 35-42.
4. Bennett, C. (1971). Spectrophotometric acid dichromate method for the determination of ethyl alcohol. *The American Journal of Medical Technology*, 37(6), 217.
5. Classen, P.A.M, J. B. van Lier, A. M. Lopez Contreras, E. W. J. van Niel, L. Sijtsma, A. J. M. Stams, S. S. de Vries & R. A. Weusthuis. (1999). Utilization of the biomass for the supply of energy carries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 741-755.
6. Dwi, S., W. Sri, K. Indah, M. Neli & H. Pandit. (2012). Acid hydrolysis technique and yeast adaptation to increase red macroalgae ethanol production. *International Journal of Environment and Bioenergy*, 3(2), 98-110.
7. FAO. (2013). *Production/crops of mangoes including mangosteens and guavas for 2013*. Rome: United Nations Food and Agriculture Organization, Statistics Division.
8. Gámez, S., J.A. Ramírez, G. Garrote & M. Vázquez. (2004). Manufacture of fermentable sugar solutions from sugar cane bagasse hydrolyzed with phosphoric acid at atmospheric pressure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(13), 4172-4177.
9. Gírio FM, C. Fonseca, F. Carvalheiro, L.C. Duarte, S. Marques & R. Bogel-lukasik. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, 101, 4775-4800.
10. Kim, B. J., H.N. Hsieh & F.J. Tai. (1999). Anaerobic digestion and acid hydrolysis of nitrocellulose. *CERL Technical Report 99/45, US Army Corps of Engineers, Construction Engineering Research Laboratories*.
11. Lenihan, P., A. Orozco, E. O'Neill, M.N.M. Ahmad, D.W. Rooney, C. Mangwandi & G.M. Walker. (2011). *Kinetic modelling of dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass, biofuel production-recent developments and prospects*. InTech, DOI: 10.5772/17129.
12. Matura, U., N. Nuanphan & N. Woatthichai. (2012). Reducing sugar production from durian peel by hydrochloric acid hydrolysis. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 6 (9). waset.org/Publication/12589.
13. Mosier, N. S., C. M. Ladisch & M. R. Ladich. (2002). Characterization of acid catalytic domains for cellulose hydrolysis and glucose degradation. *Biotechnology and Bioengineering*, 6(79), 610-618.
14. Southerland, W.M. (1990). *Foundations of Medicine: Biochemistry*. New York: Churchill Livingstone Inc.
15. Xiang, Q., J.S. Kim & Y.Y. Lee. (2003). A comprehensive kinetic model for dilute-acid hydrolysis of cellulose. *Applied Biochemical Biotechnology*, 105(108), 337-352.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí từ Trường Đại học Cần Thơ thông qua đề tài nghiên cứu khoa học trong Chương trình Công nghệ Sinh học Tiên tiến và một phần hỗ trợ từ đề tài Nghị định thư của Bộ Khoa học và Công nghệ (09/2014/HĐ-NĐT) và Chương trình CCP (New Core to Core Program).