

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG THỦY PHÂN VỎ TRÁI CA CAO BẰNG ACID ỨNG DỤNG TRONG SẢN XUẤT ETHANOL SINH HỌC

• ThS. Huỳnh Xuân Phong^(*), Phạm Thiếu Quân^(**),
Nguyễn Ngọc Thạnh^(**), PGS, TS. Ngô Thị Phương Dung^(*)

Tóm tắt

Với thành phần chứa hơn 40% là cellulose, vỏ trái ca cao là nguồn nguyên liệu thích hợp cho quá trình thủy phân để thu được dung dịch có chứa glucose, một nguồn carbon thích hợp cho quá trình lên men ethanol. Nghiên cứu nhằm đánh giá khả năng thủy phân loại nguyên liệu này và bước đầu ứng dụng trong lên men ethanol sinh học. Kết quả cho thấy quá trình thủy phân vỏ trái ca cao khô ở 90°C đạt hiệu suất 63,79% sau 8 giờ bằng acid HCl 0,75 M và hàm lượng đường khử đạt 7,22% (w/v). Dịch thủy phân được lên men bằng chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* VLK06 trong 5 ngày, lượng ethanol thu được 4,31% (v/v). Kết quả cho thấy tiềm năng trong việc sản xuất ethanol sinh học từ một nguồn phế phẩm nông nghiệp là vỏ trái ca cao.

Từ khóa: ethanol, lên men ethanol, thủy phân, vỏ trái ca cao.

1. Đặt vấn đề

Vấn đề sản sinh lượng lớn khí thải CO₂ trong những năm gần đây góp phần dẫn đến hiệu ứng nhà kính, cùng với những lo ngại về an ninh năng lượng đã làm gia tăng sự quan tâm của thế giới đến các nguồn năng lượng thay thế không phụ thuộc vào dầu mỏ. Một trong những định hướng cơ bản và lâu dài được hướng đến là năng lượng sạch từ ethanol sinh học. Theo nghiên cứu của Tổ chức Lương Nông Liên hợp quốc (FAO), Ủy ban Kinh tế Mỹ La Tinh (CEPAL) và Ngân hàng Phát triển Brazil, sản lượng ethanol toàn cầu tăng 200% từ 55,7 tỷ lít lên 162 tỷ lít trong giai đoạn 2007-2015 nhằm đáp ứng nhu cầu tiêu dùng nhiên liệu sinh học tăng cao trên thế giới vào năm 2015 [2]. Sản phẩm ethanol sinh học hiện nay chủ yếu được sản xuất từ đường và tinh bột, nhưng đã có nhiều cuộc tranh cãi đáng chú ý về tính lâu dài và vấn đề đảm bảo an ninh lương thực. Do vậy, việc thay thế nguyên liệu đường và tinh bột bằng nguyên liệu lignocellulose, trong đó có vỏ trái ca cao, với chi phí rẻ hơn và dồi dào hơn là định hướng được nhiều nhà khoa học quan tâm.

Việc sử dụng vỏ trái ca cao làm nguyên liệu cho quá trình thủy phân có rất nhiều ưu điểm. Trước hết, trong thành phần của vỏ có chứa phần lớn các chất hữu cơ có khả năng thủy phân thành dung dịch đường, bao gồm có 43,9-45,2% carbohydrate, 35-40% lignocellulose, phần còn lại là

các protein và vitamin [5]. Tuy nhiên, việc sử dụng trực tiếp vỏ trái ca cao làm phân bón hoặc thức ăn gia súc còn gặp nhiều trở ngại do đặc tính lý hóa của nó. Do đó, hầu hết lượng vỏ trái ca cao không được tận dụng. Đến cuối năm 2010, diện tích trồng ca cao ở Việt Nam là 16.725 ha và diện tích cho thu hoạch khoảng 7.300 ha, chiếm 43,6% tổng diện tích trồng. Với sản lượng hàng năm khoảng 1-2 tấn/ha, lượng vỏ thải ra là gánh nặng rất lớn đối với môi trường. Bên cạnh đó, cây ca cao cho thu hoạch gần như quanh năm nên vấn đề nguồn cung nguyên liệu khá thuận lợi. Nguồn vỏ ca cao đang bị bỏ phí và có thể được tận dụng để thử nghiệm làm nguồn nguyên liệu trong lên men sản xuất ethanol sinh học. Từ thực tế trên, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá khả năng thủy phân vỏ trái ca cao bằng các dung dịch acid loãng và bước đầu ứng dụng dịch thủy phân để lên men sản xuất ethanol sinh học.

2. Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên vật liệu

- Vỏ trái ca cao: thu tại vườn ca cao xã Mỹ Ái, huyện Phong Điền, thành phố Cần Thơ.

- Bốn chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (YM5C, BVK2, VLK06 và 2.1) được lưu trữ tại Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.

- Hóa chất và thuốc thử: acid citric 10%, NaOH 2%, HCl, H₂SO₄, HNO₃, dung dịch DNS (NaOH tinh khiết, acid dinitrosalicylic, kali natri tartrate) và dung dịch dichromate (7,5 g K₂Cr₂O₇ trong 250 ml H₂SO₄ 5 M). Dung dịch DNS và

(*) Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.

(**) Cử nhân, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.

dichromate được trữ trong chai nâu, giữ kín bằng paraffin và trữ ở nhiệt độ 4-5°C.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xử lý nguyên liệu

Vỏ trái ca cao được rửa sạch, phơi dưới ánh nắng mặt trời trong 1 ngày, sau đó được cắt ra thành các mảnh nhỏ có kích thước khoảng 1 cm. Sấy khô ở nhiệt độ 70°C trong 3 ngày (đến khi khối lượng không đổi) và được xay nhuyễn thành dạng bột.

2.2.2. Xác định loại acid và nồng độ acid thích hợp cho quá trình thủy phân

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại với hai nhân tố (3 loại acid (HCl, H₂SO₄ và HNO₃) và 6 mức nồng độ (0,25 M, 0,5 M, 0,75 M, 1 M, 1,25 M và 1,5 M)). Cân 15 g bột nguyên liệu cho vào bình tam giác 250 ml, cho vào mỗi bình tam giác 100 ml dung dịch acid ở các nồng độ khảo sát, đậy kín và lắc đều. Ủ ở 90°C và lắc 150 vòng/phút trong 4 giờ. Thu nhận dịch thủy phân bằng cách lọc qua giấy lọc Whatman No.4.

2.2.3. Xác định nhiệt độ và thời gian thích hợp cho quá trình thủy phân

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 2 nhân tố. Nhân tố nhiệt độ có 5 mức độ (70, 80, 90, 100 và 110°C) và nhân tố thời gian có 5 mức độ (2, 4, 6, 8 và 10 giờ). Cân 15 g bột nguyên liệu cho vào bình tam giác 250 ml, cho vào mỗi bình 100 ml acid với nồng độ đã được chọn ở thí nghiệm trên, lắc đều. Ủ lắc 150 vòng/phút ở các điều kiện nhiệt độ và thời gian như bố trí. Dịch thủy phân được lọc và trung hoà acid dư bằng NaOH 2% đến pH 7,0.

2.2.4. Thử nghiệm khả năng lên men ethanol từ dịch thủy phân vỏ trái ca cao

Dịch thủy phân được chuẩn bị theo các thông số từ hai thí nghiệm trên, pH của dung dịch thủy phân được chỉnh về pH 5,5 bởi acid citric 10% (w/v) để sử dụng cho thử nghiệm khả năng lên men. Thử nghiệm được thực hiện với 4 chủng nấm men (YM5C, BVK2, VLK06 và 2.1) trong 100 ml dịch thủy phân với nồng độ giống chủng ban đầu là 10⁶ tế bào/ml. Kết quả được ghi nhận sau 3 và 5 ngày lên men ở 30°C.

2.2.5. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

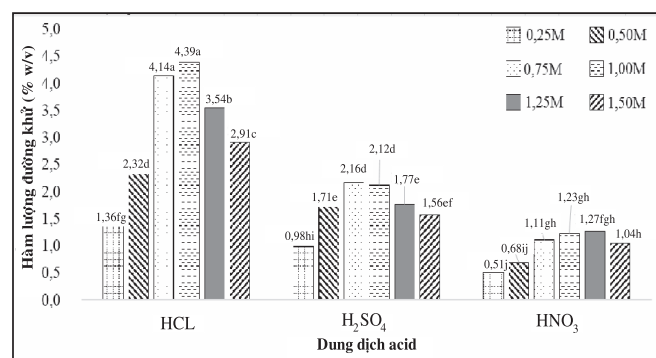
Hàm lượng đường khử được phân tích thông qua phản ứng với acid dinitrosalicylic (phương pháp DNS) [6]. Hàm lượng ethanol được xác định bằng thuốc thử dichromate [1]. Kết quả được phân

tích phương sai và kiểm định LSD bằng phần mềm Statgraphics Centurion XV (Manugistics Inc., USA).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Loại acid và nồng độ acid thích hợp cho quá trình thủy phân

Thử nghiệm khảo sát ảnh hưởng của 6 mức nồng độ (0,25 M; 0,5 M; 0,75 M; 1 M; 1,25 M và 1,5 M) với 3 loại acid vô cơ (HCl, H₂SO₄ và HNO₃) đến khả năng thủy phân vỏ trái ca cao. Kết quả xác định hàm lượng đường khử sau 4 giờ thủy phân ở 90°C được trình bày ở Hình 1.



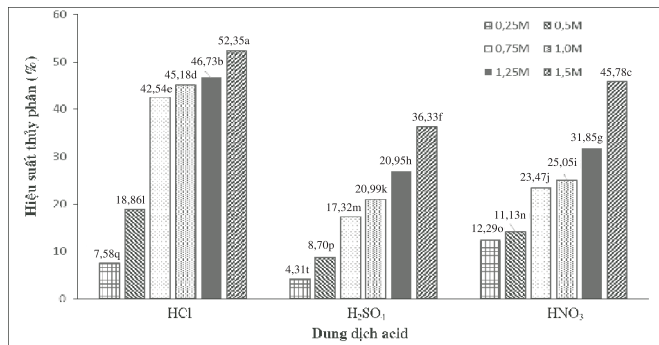
Hình 1. Hàm lượng đường khử thu được sau 4 giờ thủy phân ở 90°C

Ghi chú: Các trung bình có ký tự giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%.

Lượng đường khử thu được từ mẫu thủy phân với dung môi là nước (đối chứng) là 0,06% (w/v), thấp hơn 8-73 lần so với khi thủy phân có sử dụng acid; điều này cho thấy acid có ảnh hưởng lớn đến quá trình thủy phân. Hàm lượng đường khử tăng khi nồng độ acid tăng nhưng lại giảm sau khi tiếp tục tăng nồng độ acid (Hình 1). Mặc dù HCl và H₂SO₄ đều có khả năng phân giải tốt vật liệu có chứa cellulose và carbohydrate, nhưng HCl cho khả năng phản ứng nhanh hơn và dễ kiểm soát hơn (phản ứng bởi HCl không tạo ra nhiều bọt khí bằng H₂SO₄ trong cùng điều kiện) [4]. Bên cạnh đó, H₂SO₄ có chiều hướng sản sinh ra nhiều tạp chất hơn so với HCl do vậy lượng đường khử tạo thành không cao.

Xét về hiệu suất thủy phân, nhìn chung khối lượng vỏ ca cao bị phân giải tăng theo nồng độ acid trong khoảng 0,5-1,5 M (Hình 2). HCl cho khả năng phân giải vật chất khô cao hơn 2 loại còn lại; HNO₃ có khả năng xâm nhập và phá hủy cơ chất tốt hơn, nhưng do nó có khuynh hướng hình thành các độc chất nên lượng đường khử tạo thành luôn nhỏ hơn H₂SO₄ có cùng nồng độ [4]. Kết quả cho thấy có sự tương quan nghịch giữa

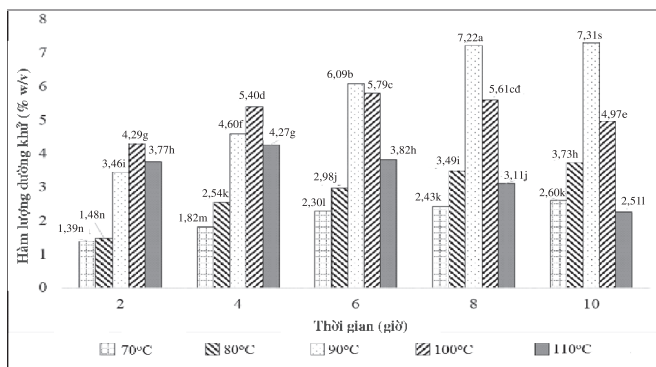
đường khử hình thành và khối lượng khô bị mất đi trong khoảng nồng độ 1,0-1,5 M ở cả 3 loại acid. Điều này cho thấy có sự tồn tại của một số rào cản vật lý như sự sản sinh fufural và các độc tố hay khả năng xâm nhập vào cấu trúc sợi cellulose của cả 3 loại acid giảm theo chiều tăng nồng độ trong khoảng bố trí [5]. Về mặt thống kê, lượng đường khử thu được từ dịch thủy phân bằng HCl 0,75 M và 1,0 M đạt cao nhất (tương ứng với 4,14% và 4,39% (w/v)) so với 17 nghiệm thức còn lại. Do đó, nghiệm thức HCl 0,75 M được chọn làm điều kiện thích hợp cho quá trình thủy phân.



Hình 2. Hiệu suất thủy phân vật chất khô sau 4 giờ ở 90°C
Ghi chú: Xem Hình 1.

3.2. Nhiệt độ và thời gian thích hợp cho quá trình thủy phân.

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của 5 mức nhiệt độ (70, 80, 90, 100 và 110°C) và 5 mức thời gian (2, 4, 6, 8 và 10 giờ) đến quá trình thủy phân vỏ trái ca cao được trình bày ở Bảng 1. Hàm lượng đường khử trung bình thu được từ mẫu thủy phân đối chứng là 0,09% (w/v) trong cùng điều kiện nhiệt độ và thời gian ủ, thấp hơn 17-91 lần so với khi thủy phân có sử dụng acid. Bên cạnh đó, theo Hình 3, hàm lượng đường khử đạt cao nhất (7,22% và 7,31% (w/v)) sau 8 giờ và 10 giờ thủy phân ở 90°C, kết quả từ 2 nghiệm thức này khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê đối với các nghiệm thức còn lại.



Hình 3. Hàm lượng glucose thu được theo nhiệt độ và thời gian thủy phân
Ghi chú: Xem Hình 1.

Dựa vào kết quả thống kê theo từng nhân tố, nhìn chung có 2 xu hướng chính, khi thủy phân ở nhiệt độ 70°C, 80°C và 90°C, lượng đường khử thu được tăng theo thời gian; khi ở nhiệt độ 100°C và 110°C thì có sự giảm lượng đường khử sau một khoảng thời gian nhất định. Cụ thể, ở nhiệt độ thủy phân là 70°C và 80°C, hiệu suất hình thành đường khử không cao (tương ứng 1,39-2,60% và 1,48-3,73% (w/v)) và sau 8 giờ, lượng đường khử chỉ khoảng 50% so với ở nhiệt độ 90°C. Điều này có thể được giải thích theo Jeevan và cộng sự (2011), nhiệt độ thấp hơn 80°C khó làm đứt gãy liên kết α (1→4)-glycosidic trong sợi cellulose, khả năng xâm nhập của acid loãng cũng giảm nên chủ yếu chỉ có thể phân giải hoặc hòa tan carbohydrate và một phần lipid trong thành phần của vỏ [3].

Bảng 1. Tổng hợp ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian đến quá trình thủy phân

Nghiệm thức	Nhân tố		Chỉ tiêu theo dõi		
	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (giờ)	Hàm lượng đường khử (% w/v)	Khối lượng chất khô (g)	Hiệu suất thủy phân (%)
1	70	2	1,39 ⁿ	13,81	7,91 ^v
2	70	4	1,82 ^m	9,29	38,07 ^s
3	70	6	2,30 ^l	8,43	43,83 ^p
4	70	8	2,43 ^{kl}	8,34	44,41 ^o
5	70	10	2,60 ^k	7,74	48,40 ^m
6	80	2	1,48 ⁿ	13,76	8,25 ^v
7	80	4	2,54 ^k	8,79	41,39 ^q
8	80	6	2,98 ^j	7,86	47,60 ⁿ
9	80	8	3,49 ⁱ	7,54	49,76 ^l
10	80	10	3,73 ^h	6,97	53,55 ^j
11	90	2	3,46 ⁱ	12,23	18,49 ^y
12	90	4	4,60 ^f	7,75	48,34 ^m
13	90	6	6,09 ^b	6,78	54,81 ⁱ
14	90	8	7,22 ^a	5,78	61,49 ^f
15	90	10	7,31 ^s	5,33	64,49 ^d
16	100	2	4,29 ^g	10,70	28,67 ^t
17	100	4	5,40 ^d	7,15	52,32 ^k
18	100	6	5,79 ^c	6,57	56,17 ^h
19	100	8	5,61 ^{cd}	5,49	63,42 ^e
20	100	10	4,97 ^e	4,11	72,60 ^b
21	110	2	3,77 ^h	8,92	40,53 ^r
22	110	4	4,27 ^g	6,20	58,64 ^g
23	110	6	3,82 ^h	5,56	62,90 ^e
24	110	8	3,11 ^j	4,92	67,17 ^c
25	110	10	2,25 ^l	3,22	78,51 ^a

Ghi chú: Trong cùng một cột, các chữ cái giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%.

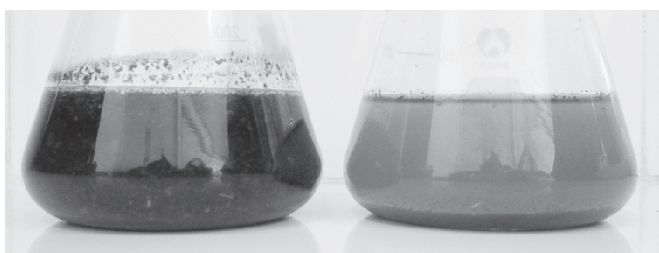
Hàm lượng đường khử thu được giảm trong điều kiện ở 100°C/8 giờ và 110°C/6 giờ được lý giải là do sự biến tính các hợp chất có tính khử trong dung dịch thành các sản phẩm phụ như furfural, HMF và acid acetic; kết quả là hàm lượng đường khử giảm ở các thời gian sau đó. Đường khử trong môi trường acid yếu (trường hợp này là HCl 0,75 M) và nhiệt độ cao (100°C và 110°C) dẫn đến hiện tượng caramel hóa, trong đó có sự khử nước tạo thành furfural và dung dịch có màu nâu đặc trưng [7]. Trong khoảng thời gian 2-10 giờ, lượng chất khô bị phân giải ở nhiệt độ 110°C cao hơn ở 100°C và cao hơn so với 90°C (Bảng 1). Như vậy, nhiệt độ 90°C là phù hợp cho quá trình thủy phân vì vừa tạo khả năng xâm nhập và phân giải tốt nguyên liệu, vừa hạn chế được sự hình thành các độc chất và các sản phẩm phụ. Bên cạnh đó, nghiệm thức 90°C/8 giờ có thời gian thủy phân ngắn hơn so với nghiệm thức 90°C/10 giờ nên được chọn cho quá trình thủy phân và hiệu suất thủy phân đạt 61,49%.

Tóm lại, điều kiện thích hợp cho quá trình thủy phân vỏ trái cao được xác định là sử dụng dung dịch HCl 0,75 M, ủ lactic với tốc độ 150 vòng/phút trong 8 giờ ở nhiệt độ 90°C, hàm lượng đường khử thu được 7,22% (w/v) từ 15 g bột nguyên liệu vỏ trái cao (tỷ lệ rắn/lỏng 1,5/10). Các thành phần vật chất rắn và dịch thủy phân trước và sau thủy phân được trình bày ở Bảng 2 và Hình 4.

Bảng 2. Thành phần vật chất rắn vỏ cao trước và sau thủy phân bằng HCl 0,75 M sau 8 giờ ở nhiệt độ 90°C

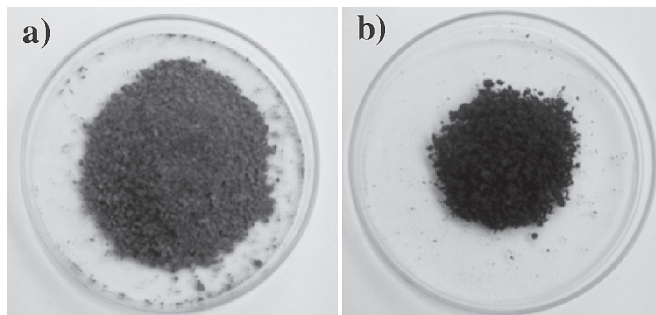
Hợp chất	Trước thủy phân (% w/w)	Sau thủy phân (% w/w)*	Hiệu suất thủy phân (%)
Protein tổng	6,27	3,13	50,11
Cellulose tổng	40,55	13,55	66,59
Tro	5,43	5,37	1,06
Carbohydrate và lipid	47,75	14,16	70,35
Tổng	100	36,21	63,79

Ghi chú: (*) so với khối lượng chất khô.



Hình 4. Dịch thủy phân trước a) và sau thủy phân b) bằng HCl 0,75 M sau 8 giờ ở nhiệt độ 90°C

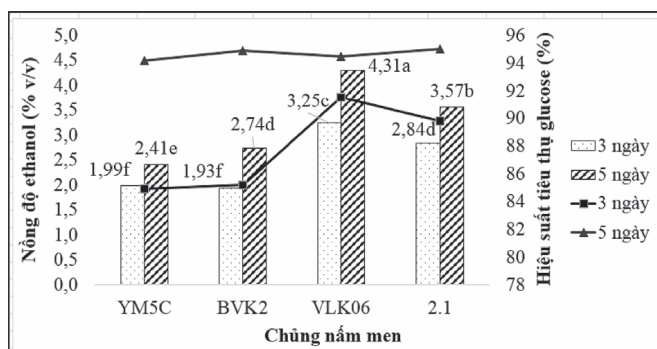
Sau khi kết thúc quá trình thủy phân, hiệu suất phân giải chất rắn đạt trên 63%. Khi đó, cấu trúc sợi cellulose đã bị đứt gãy do tác dụng của acid nên thời gian phân giải của chúng khi được thải ra ngoài môi trường giảm. Điều này có thể nhận thấy qua Hình 5, trong đó từ 15 g vỏ cao khô, sau khi thủy phân bằng HCl 0,75 M trong 8 giờ chỉ còn lại 5,43 g chất rắn màu nâu đen chứng tỏ cấu trúc sợi cellulose đã bị đứt gãy và biến tính.



Hình 5. Vỏ cao trước a) và sau thủy phân b) bằng HCl 0,75 M trong 8 giờ ở nhiệt độ 90°C

3.3. Kết quả thử nghiệm khả năng lên men ethanol từ dịch thủy phân vỏ trái cao

Thử nghiệm được tiến hành để đánh giá sơ bộ khả năng lên men ethanol từ dịch thủy phân thu được. Kết quả phân tích hàm lượng ethanol thu được và hiệu suất tiêu thụ đường sau quá trình lên men với 4 chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (YM5C, BVK2, VLK06 và 2.1) được thể hiện ở Hình 6.



Hình 6. Lượng ethanol thu được và hiệu suất tiêu thụ đường sau 3 và 5 ngày lên men

Ghi chú: xem Hình 1.

Kết quả cho thấy lượng ethanol thu được khi lên men 5 ngày bằng chủng nấm men *S. cerevisiae* VLK06 đạt cao nhất (4,31% (w/v)) và hiệu suất tiêu thụ đường khoảng 95%. Điều này cho thấy tiềm năng trong việc lên men ethanol từ dịch thủy phân vỏ trái cao.

3. Kết luận

Điều kiện thích hợp cho quá trình thủy phân vỏ trái ca cao được xác định với dung dịch HCl 0,75 M trong 8 giờ ở 90°C, hiệu suất phân giải đạt 63,79% và lượng đường khử thu được 7,22% (w/v). Kết quả thử nghiệm khả năng lên men cho thấy triển vọng ứng dụng của nguồn vỏ ca cao

trong sản xuất ethanol sinh học

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 cấp cơ sở 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)/.

Tài liệu tham khảo

- [1]. Bennett, C. (1971), "Spectrophotometric acid dichromate method for the determination of ethyl alcohol", *The American Journal of Medical Technology*, 37 (6), p. 217.
- [2]. 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 carriers", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52 (2), p. 741-755.
- [3]. Jeevan, P., Nelson, R., and Rena, A. E. (2011), "Optimization studies on acid hydrolysis of corn cob hemicellulosic hydrolysate for microbial production of xylitol", *Journal of Microbiology & Biotechnology Research*, 1 (4), p. 114-123.
- [4]. Moutta, R. O., Chandel, A. K., Rodrigues, R. C. L. B., Silva, M. B., Rocha, G. J. M., and Silva, S. S. (2012), "Statistical optimization of sugarcane leaves hydrolysis into simple sugars by dilute sulfuric acid catalyzed process", *Sugar Tech*, 14 (1), p. 53-60.
- [5]. Samah, O. A., Sias, S., Hua, Y. G., and Hussin, N. N. (2011), "Production of ethanol from cocoa pod hydrolysate", *ITB Journal of Science*, 43 (2), p. 87-94.
- [6]. Tasun, K., Chose, P., and Ghen, K. (1970), "Sugar determination of DNS method", *Biotechnology and Bioengineering*, (12), p. 921.
- [7]. Tsai, P. J., Yu, T. Y., Chen, S. H., Liu, C. C., and Sun, Y. F. (2009), "Interactive role of color and antioxidant capacity in caramels", *Food Research International*, 42 (3), p. 380-386.

A STUDY ON THE POSSIBILITY OF HYDROLYSIS OF COCOA POD FOR ETHANOL FERMENTATION

Summary

With more than 40% cellulose, the pod is a good source for hydrolysis to get glucose fluid, a source of carbon suitable for fermentation. This study estimates its hydrolysis possibility and application for ethanol production. The results show that the hydrolyzation at 90°C got 63.79% of efficiency after 8 hours by using HCl 0.75 M, and sugar concentration was 7.22% (w/v). Ethanol concentration of 4.31% (v/v) was achieved when fermenting cocoa pod hydrolysate in 5 days by *Saccharomyces cerevisiae* VLK06. These outputs indicate the highly promising ethanol production from agricultural wastes like cocoa pods.

Keywords: ethanol, ethanol fermentation, hydrolysis, cocoa pod.

Ngày nhận bài: 13/8/2015; Ngày nhận lại: 17/10/2015; Ngày duyệt đăng: 23/10/2015.