

TIỀN XỬ LÝ VỎ QUẢ CÀ PHÊ BẰNG CHỦNG NẤM GÂY MỤC TRẮNG *PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM*

ĐỖ VIỆT PHƯƠNG

*Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh
dovietphuong@iuh.edu.vn*

DOIs: <https://doi.org/10.46242/jstiuh.v59i05.4598>

Tóm tắt. Vỏ quả cà phê là một trong những nguồn phụ phẩm nông nghiệp dồi dào ở Việt Nam. Trong vỏ quả cà phê, cellulose chiếm một hàm lượng lớn, đây là thành phần quan trọng trong việc chuyển đổi thành ethanol sinh học. Tuy nhiên, để có thể chuyển đổi vỏ quả cà phê thành ethanol thì trước hết nguyên liệu này cần phải qua bước tiền xử lý nhằm làm giảm lượng lignin và hemicellulose mà vẫn giữ lại thành phần cellulose. Trong nghiên cứu này, chủng nấm gây mục trắng *Phanerochaete chrysosporium* được sử dụng để thực hiện quá trình tiền xử lý trước khi quá trình thủy phân và lên men diễn ra. Tại điều kiện độ ẩm nguyên liệu 85%, nhiệt độ môi trường 35°C, tỷ lệ sinh khối/nguyên liệu là 1,5%, sau 40 ngày tiền xử lý cellulose giảm 20,7%; hemicellulose giảm 12,8% và lignin giảm 50,2%. Nguyên liệu sau khi tiền xử lý tiếp tục thực hiện quá trình thủy phân bởi tổ hợp enzyme thương mại (25 FPU/g Viscozyme Cassava và 34 CBU/g Novozyme 188). Kết quả thu được hàm lượng đường khử và đường glucose trong dịch thủy phân tương ứng là: 13,19 g/L và 5,42 g/L, đồng thời hiệu suất thủy phân đạt 60,23%. Nghiên cứu này chỉ ra rằng, chủng nấm gây mục *P. chrysosporium* có tính tương thích cao khi phát triển mạnh trên nguồn sinh khối vỏ quả cà phê đồng thời chúng đã tiết ra môi trường một số enzyme giúp phân hủy sinh học cellulose, lignin và hemicellulose.

Từ khóa: *Phanerochaete chrysosporium*, tiền xử lý, vỏ quả cà phê

1. GIỚI THIỆU

Tiền xử lý được xem là bước đầu tiên và quan trọng nhất của quy trình sản xuất ethanol từ sinh khối lignocellulose bởi vì thông qua quá trình tiền xử lý mà các polymer carbohydrate trong sinh khối lignocellulose bị chuyển đổi thành dạng đường đơn giản hơn trước khi thực hiện quá trình lên men tạo ethanol. Việc chuyển đổi này thường được thực hiện bởi enzyme thủy phân. Tuy nhiên do tính chất không đồng nhất và rất phức tạp của sinh khối lignocellulose (ví dụ như: độ kết tinh cellulose, mức độ trùng hợp, độ ẩm, diện tích bề mặt, mức độ liên kết của lignin và hemicellulose) nên sinh khối này bắt buộc phải tiền xử lý trước để có thể điều chỉnh được hoạt động thủy phân của enzyme. Ngoài ra, điều quan trọng của quá trình tiền xử lý là phải làm giảm nhiều nhất có thể lượng lignin và hemicellulose có trong nguyên liệu mà vẫn giữ lại càng nhiều thành phần cellulose và làm giảm độ kết tinh của cellulose.

Một trong những nguồn sinh khối lignocellulose rất dồi dào và phong phú ở Việt Nam đó là vỏ quả cà phê. Vỏ quả cà phê là phụ phẩm đầu tiên thu được trong quá trình chế biến cà phê nhân ướt và mỗi năm ngành công nghiệp sản xuất cà phê ở Việt Nam thải ra môi trường gần 500 nghìn tấn vỏ quả khô. Trong khi đó toàn thế giới ước tính xấp xỉ 22 triệu tấn vỏ quả tươi, 2,4 triệu tấn vỏ nhót và gần 8,6 triệu tấn vỏ trấu (thóc) [1]. Để xử lý nguồn phế phụ phẩm này đòi hỏi rất nhiều yếu tố như công nghệ, kinh tế và vấn đề môi trường. Thành phần hóa học chủ yếu của vỏ quả cà phê bao gồm: cellulose (28,6%), hemicellulose (3,8%), lignin (24,2%), protein thô (8%), đường tổng (10,1%) và tro 8,9%. Trong đó, lignin được biết đến như là một trong những thành phần chính cấu thành nên thành tế bào thực vật và tảo. Lignin hiện diện nhiều nhất trong tất cả các loại thân cây gỗ, chính vì thế nó còn được gọi là “chất gỗ” [2]. Lignin trong vỏ quả cà phê chiếm khoảng 17,5÷20,07%. Trong khi lignin trong rơm rạ chiếm 4,65%; lignin trong lõi bắp chiếm 15%; trong bã mía là 20% và trong cỏ là 12 ÷ 18% [3, 4]. Có thể nhận thấy rằng, hàm lượng lignin trong vỏ quả cà phê cao hơn một số nguồn sinh khối lignocellulose tương tự và điều này sẽ là một cản trở lớn cho quá trình tiền xử lý vỏ quả cà phê trước khi thủy phân và lên men tạo ethanol.

Cho đến thời điểm hiện tại, các phương pháp tiền xử lý để loại bỏ lignin và hemicellulose đã được nghiên cứu bao gồm: tiền xử lý bằng acid, tiền xử lý bằng kiềm, tiền xử lý bằng nổ hơi, tiền xử lý bằng vi sóng, tiền xử lý bằng thủy nhiệt hay tiền xử lý bằng vi sinh vật. Các phương pháp tiền xử lý bởi các tác nhân hóa học hoặc nhiệt độ cao đều có chung nhược điểm đó là gây ô nhiễm môi trường, ăn mòn thiết bị, chi phí cao và sản sinh một số chất gây ức chế nấm men. Trong khi đó, tiền xử lý bằng vi sinh vật lại khắc phục được

TIỀN XỬ LÝ VỎ QUẢ CÀ PHÊ BẰNG...

tất cả các nhược điểm của các phương pháp tiền xử lý khác nhưng bản thân nó lại cũng có nhược điểm là thời gian xử lý lâu, hiệu quả loại bỏ lignin và hemicellulose là chưa cao. Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng có sáu nhóm vi sinh vật có khả năng phân hủy lignin và hemicellulose bao gồm: vi khuẩn, nấm mốc sơ cấp, nấm Saptain, nấm mục mềm, Basidiomycetes gây mục gỗ (nấm gây mục trắng) và các nấm mốc thứ cấp mọc trên gỗ. Trong những nhóm trên, nhóm có khả năng khoáng hóa lignin một cách hiệu quả đó là nấm gây mục trắng [5, 6].

Đã có một số nghiên cứu sử dụng nấm mục trắng *P. chrysosporium* trong việc tiền xử lý sinh khối lignocellulose ứng dụng sản xuất ethanol. Điển hình như nghiên cứu của Zeng và cộng sự (2011) khi nghiên cứu quá trình tiền xử lý lúa mì bởi chủng nấm mục trắng *P. chrysosporium* [7, 8] hoặc là tiền xử lý thân cây bông bằng nấm mục trắng [9]; sử dụng chủng *P. chrysosporium* tiền xử lý rom rạ [10]; tiền xử lý thân cây ngô [11] và thậm chí là trên cây cỏ [12]. Tuy nhiên, có rất ít nghiên cứu tiền xử lý bằng nấm mục trắng thực hiện trên vỏ quả cà phê. Chỉ có một vài nghiên cứu về sản xuất ethanol sinh học từ vỏ quả cà phê. Chẳng hạn như nghiên cứu của Shenoy và cộng sự (2011) đã nghiên cứu về quá trình sản xuất ethanol từ vỏ quả cà phê bằng phương pháp thủy phân bởi acid H_2SO_4 2% [13] hoặc một nghiên cứu khác thực hiện tiền xử lý và thủy phân vỏ trái cà phê bằng acid H_2SO_4 1÷5% [14]. Một trong những nhược điểm lớn của một số nghiên cứu về quá trình sản xuất ethanol từ vỏ cà phê là sử dụng acid loãng hoặc đậm đặc để thực hiện quá trình tiền xử lý và thậm chí là quá trình thủy phân. Điều này đã phát sinh thêm chi phí cho quá trình xử lý các hóa chất tồn dư trong nguyên liệu cũng như sự phát sinh một số chất ức chế nấm men và điều nguy hại hơn đó là sự ô nhiễm nguồn nước thải và ô nhiễm môi trường. Do đó, cần thiết phải có những nghiên cứu khác có thể khắc phục những nhược điểm nêu trên.

Trong nghiên cứu, chủng nấm mục trắng *P. chrysosporium* được nhân giống rồi nuôi cấy bán rắn để thu sinh khối. Sinh khối này dùng để thực hiện tiền xử lý vỏ quả cà phê nhằm mục đích làm suy giảm hàm lượng lignin và hemicellulose. Vỏ quả cà phê sau khi tiền xử lý tiếp tục thực hiện quá trình thủy phân nhờ hệ enzyme cellulase nhằm mục đích đánh giá hiệu quả quá trình tiền xử lý thông qua sự suy giảm hai thành phần trên.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu

Quả cà phê vối (*Coffea robusta*) tươi được thu nhận tại xã Pong Drang – huyện Krông Buk – tỉnh Đắk Lắk trong thời gian từ tháng 11 đến tháng 12, đây là thời điểm mà quả cà phê đạt độ chín sau thu hoạch. Quả cà phê sau khi thu hái sẽ cho vào máy xát vỏ để tách lấy vỏ quả rồi sấy khô vỏ quả này đến độ ẩm 5÷8% (nhiệt độ sấy 60°C, thời gian 12 giờ). Vỏ quả khô được xay nhỏ rồi nghiền bằng máy nghiền đĩa. Tiếp đến là sàng qua hệ sàng nhiều tầng: phần nằm trên lưới sàng 2 mm đem đi nghiền lại, phần nguyên liệu lọt qua các lỗ sàng (1÷2 mm) chính là nguyên liệu dùng cho toàn bộ các thí nghiệm trong nghiên cứu này.



Hình 1. (A) Vỏ quả cà phê tươi; (B) vỏ quả cà phê đã sấy khô; (C) vỏ quả cà phê kích thước 1-2 mm

2.2 Hóa chất, enzyme, chủng vi sinh vật

Thuốc thử 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS): Chai 25g, độ tinh khiết 98%, Trung Quốc.

Cetyl-trimethylammonium bromide (CTAB): Sigma-Aldrich.

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA): Chai 250g, Trung Quốc.

Lignin (Sigma, Hoa Kỳ).

Carboxymethyl Cellulose (CMC): Sigma, Hoa Kỳ.

Tri-n-butyl phosphate (TBP): Sigma, Hoa Kỳ.

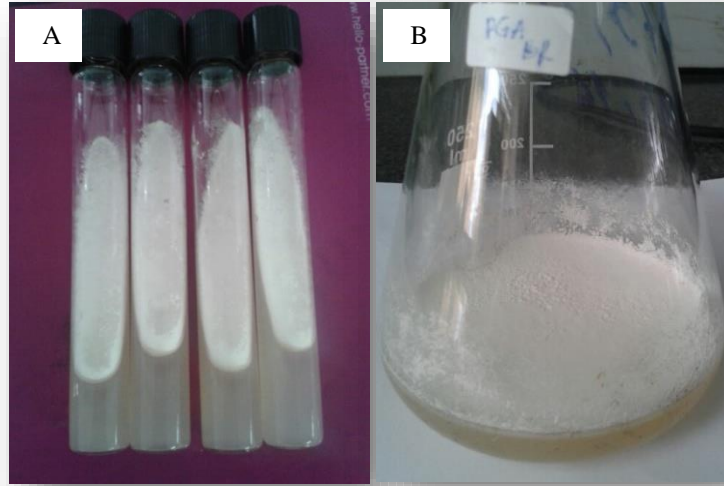
Glucose (Sigma, Hoa Kỳ).

Môi trường Potato glucose agar (PGA) (Himedia, Ấn Độ).

Viscozyme® Cassava C (Bagsvaerd, Đan Mạch): > 450 EGU/g.

Glucosidase (Novozyme 188): (Novozyme, Đan Mạch): > 750 CBU/g.

Chủng nấm gây mục trắng *P. chrysosporium*: Được cung cấp từ bộ sưu tập giống thuộc Viện Công nghệ Sinh học và Ứng dụng vi sinh Miền nam (SIAMB).



Hình 2. (A) ống giống *P. chrysosporium*; (B) chủng *P. chrysosporium* nuôi cấy trên PGA

2.3 Hoạt hóa giống nấm

P. chrysosporium từ ống giống được cấy sang môi trường PGA trong ống thạch nghiêng, nuôi cấy trong tủ ẩm 7 ngày ở nhiệt độ 30°C. Sau khi kết thúc quá trình nuôi cấy cho thêm nước muối sinh lý vào các ống thạch nghiêng, rồi dùng máy vortex trộn đều trong 20 phút. Sau quá trình vortex các bào tử nấm đã phân tán đều trong nước muối sinh lý, có thể đếm trực tiếp số bào tử bằng buồng đếm hồng cầu.

2.4 Quá trình lên men bán rắn thu sinh khối

Chủng nấm mục trắng sau khi hoạt hóa được nuôi cấy trong môi trường bán rắn với các thành phần cơ bản như sau: 20 g cám gạo; 80 g mạch dứa; 25 g bột cá; 25 g bánh dầu; 0,15 g ri đường. Bổ sung nước cho đạt độ ẩm 60÷70%. Dem toàn bộ hấp khử trùng ở 121°C trong 30 phút. Sau đó để nguội, quan sát môi trường có bị nhiễm hay không. Chủng nấm *P. chrysosporium* sau khi được hoạt hóa sẽ được cho vào môi trường để thực hiện quá trình lên men bán rắn thu sinh khối. Quá trình lên men được thực hiện ở nhiệt độ 30°C trong tủ ẩm trong thời gian 7 ngày, sau đó cho thêm nước cất vô trùng rồi tiến hành lọc và ly tâm 5.000 vòng/phút thu được sinh khối nấm mục trắng.

2.5 Quá trình tiền xử lý bằng nấm mục trắng

Vỏ quả cà phê trước khi thực hiện quá trình tiền xử lý sẽ được khử trùng ở 121°C và 30 phút trong nồi hấp tiệt trùng. Sinh khối nấm mục trắng được trộn đều với 10 g vỏ quả cà phê. Điều chỉnh độ ẩm của nguyên liệu bằng cách cho thêm nước vô trùng, quá trình được thực hiện trong tủ cấy vô trùng. Sinh khối nấm mục trắng cho vào theo tỷ lệ sinh khối:nguyên liệu là 1,5% (g/g). Quá trình tiền xử lý thực hiện ở nhiệt độ 35°C trong tủ ẩm. Sau những khoảng thời gian 10, 20, 30, 40 và 50 ngày lấy một phần nguyên liệu đem đi xác định hàm lượng cellulose, hemicellulose và lignin [7].

2.6 Quá trình thủy phân vỏ quả cà phê

Vỏ quả cà phê đã qua tiền xử lý sẽ được tiếp tục quá trình thủy phân. Cứ 15 g nguyên liệu thì cho thêm vào 150 mL dung dịch đệm citrate 0,05 mol/L, pH 4,8. Bổ sung enzyme celulase với các nồng độ như sau: Viscozyme Cassava 25 FPU/g và Novozyme 188 là 34 CBU/g. Quá trình này được thực hiện trên máy lắc có gia nhiệt ở 50°C, 150 vòng/phút trong thời gian 72 giờ. Kết thúc quá trình thủy phân, hỗn hợp được ly tâm 2500 vòng trong 10 phút [15] thu lấy dịch ly tâm và bỏ phần cặn. Dịch ly tâm sẽ đem xác định các chỉ tiêu 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 xác định theo nghiên cứu Menezes và cộng sự (2014) và được trình bày qua công thức (1) [16]:

$$YEH (\%) = \frac{0.9(G_e - G_w)}{C_p} \cdot 100 \quad (1)$$

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

2.7 Phương pháp phân tích và đo đạc

2.7.1 Xác định đường khử

Hàm lượng đường khử trong mẫu được xác định theo phương pháp Miller (1959). Mẫu được trộn chung với thuốc thử DNS và sau đó đem đun sôi 5 phút cho phản ứng xảy ra hoàn toàn. Sau đó dịch được làm lạnh và đo độ hấp thụ ở bước sóng 540 nm. Kết quả đo dựa trên đường chuẩn đã dựng trước đó với chất chuẩn là D-glucose [17].

2.7.2 Xác định đường glucose

Hàm lượng đường glucose được xác định theo phương pháp Glucose oxidase của Sadasivam (1996). Hút 0,5 ml dịch mẫu, thêm 0,5 ml nước cất và 1 mL thuốc thử glucose oxidase peroxidase. Thêm vào một loạt các ống nghiệm pipet ra 0 (để trống), 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 và 1 mL dung dịch glucose chuẩn và tạo thành thể tích đến 1,0 mL bằng nước cất. Sau đó thêm 1 mL thuốc thử glucose oxyase-peroxidase. Ủ tất cả các ống ở 35°C trong 40 phút. Chấm dứt phản ứng bằng cách thêm 2 mL HCl 6 N. Đo quang ở bước sóng 540 nm. Từ biểu đồ đường chuẩn, tính toán lượng glucose có trong mẫu [18].

2.7.3 Xác định hàm lượng cellulose

Hàm lượng cellulose trong mẫu được xác định theo phương pháp của Scharrer và Kurscher. Cân 1g mẫu đã sấy khô tới khối lượng không đổi và loại bỏ chất trích ly cho vào bình tam giác 250 mL. Thêm vào bình 16,5 mL hỗn hợp gồm 1,5 mL acid nitric và 15 mL acid acetic. Lắp ống làm lạnh hồi lưu vào bình và đun sôi hỗn hợp 30 phút. Để nguội, pha loãng hỗn hợp bằng nước nóng. Lọc qua cốc lọc đã biết trước khối lượng. Rửa mẫu lại nhiều lần bằng nước nóng. Rửa bằng rượu etylic 96% 1÷2 lần. Sấy giấy lọc có chứa cellulose ở nhiệt độ 105°C đến khối lượng không đổi khoảng 6 giờ đem cân được m (g). Đem mẫu nung ở 550°C trong 6 giờ, làm nguội trong bình hút ẩm và cân được t (g) [19].

2.7.4 Xác định hàm lượng hemicellulose

Hàm lượng hemicellulose trong mẫu được xác định thông qua phương pháp Neutral Detergent Fiber. Lấy 0,5 g nguyên liệu (m_1) đã được tách béo, sấy khô và nghiền nhỏ cho vào bình cầu. Lấy 100 mL dung dịch Acid Detergent Solution (ADS), 2 mL decahydronaphtalene và 0,5 g Na_2SO_3 sau đó đun sôi tuần hoàn trong vòng 60 phút. Lọc dung dịch bằng phễu Gooch Crucible, sau đó rửa vài lần bằng nước sôi và acetone (2 lần). Sấy khô Crucible ở nhiệt độ 105°C trong vòng 8 giờ, sau đó cân khối lượng crucible (W_1). Nung Crucible trong lò nung (550°C) trong 3 giờ, sau đó cân lại khối lượng Crucible (W_2) [19].

2.7.5 Xác định hàm lượng lignin

Hàm lượng lignin trong mẫu được xác định theo tiêu chuẩn TAPPI T-222. Lấy 2g mẫu ngâm vào 35 mL hỗn hợp ethanol – benzene trong 2 ngày, gạn bỏ hỗn hợp trên, cho thêm 25 mL ethanol để trong 15 phút, gạn bỏ ethanol, rửa lại bằng nước nóng, lọc để loại nước, sấy khô trong tủ sấy 60°C tới khối lượng không đổi.

Cân lấy 1g mẫu đã loại bỏ chất trích ly và sấy khô đến khối lượng không đổi cho vào erlen 250 mL, cho từ từ 15 mL H_2SO_4 72% vào, dùng đũa khuấy thật kỹ và giữ mẫu ở 20°C cho đến khi mẫu tan.

Sau khi mẫu tan, bao miệng erlen lại và giữ ở nhiệt độ thường trong 2 giờ. Thường xuyên khuấy mẫu cho đến khi mẫu tan thành dịch. Cho khoảng 300÷400 mL nước vào erlen 1000 mL và chuyển mẫu từ erlen 250 mL vào, rửa và pha loãng tới thể tích 575 mL (nồng độ H_2SO_4 khoảng 3%). Lắp ống sinh hàn ngược (hồi lưu) và đun trong 4 giờ kể từ lúc sôi. Để yên cho lắng tủa, hút (gạn) bỏ phần dịch nổi. Rửa acid lần trong lignin với ít nước nóng. Sấy khô cạn và giấy lọc đến trọng lượng không đổi. Cân được h (g). Cho giấy và cạn vào cốc, nung ở 550°C trong vòng 6 giờ, làm nguội trong bình hút ẩm và cân được khối lượng t (g) [20].

2.7.6 Phương pháp chụp SEM

Hệ thống chụp ảnh dưới kính hiển vi điện tử (Jeol JSM-7401F, USA) được sử dụng để kiểm tra sự thay đổi cấu trúc bề mặt nguyên liệu trước và sau tiền xử lý. Tất cả các mẫu nguyên liệu đều được chụp ở các điều kiện như sau: gia tốc điện áp (Accelerating Voltage) 3.0 kV; khoảng cách làm việc (Working Distance) 8.5 mm; độ phóng đại (Magnification) từ 500, 1000, 2000, 3000 và 5000 lần.

2.8 Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên, lặp lại ba lần, với một hay hai nhân tố thay đổi. Sử dụng phương pháp phân tích phương sai (ANOVA) theo kiểm định LSD để kết luận sự sai khác giữa trung bình các nghiệm thức. Số liệu được thu thập và xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphics Centurion 15.2 và phần mềm Excel dùng để tính toán trung bình và độ lệch chuẩn của các phép đo.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Sự thay đổi hàm lượng cellulose, hemicellulose và lignin theo thời gian và độ ẩm nguyên liệu ban đầu

Theo kết quả phân tích ở Bảng 1, khi tăng thời gian tiền xử lý thì cả ba thành phần cellulose, hemicellulose và lignin đều có chiều hướng giảm dần nhưng sự suy giảm này là không giống nhau. Cụ thể, sau 50 ngày tiền xử lý: cellulose giảm 23,7%, hemicellulose giảm 14,1% và lignin giảm 51,4%. Kết quả sự suy giảm ba thành phần trên đã được Henriksson, Yao và các cộng sự báo cáo và giải thích như sau: khi tiến hành thu nhận và tinh sạch enzyme từ chủng *P. chrysosporium* ở điều kiện nhiệt độ 37°C, pH 5 trong đệm natri acetat thu được hơn năm loại enzyme khác nhau có trọng lượng phân tử từ 14÷94 kDa và thông qua điện di SDS/PAGE cho thấy sự có mặt của cellulase, xylanase, lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP) và laccase [21, 22]. Trong đó LiP, MnP và laccase là các enzyme phân hủy sinh học lignin. Chúng phân cắt cấu nối carbon α và carbon β , mở vòng thơm, oxy hóa nhóm hydroxyl, oxy hóa phenolic thành phenoxyl và demethyl hóa. Còn nhóm enzyme cellulase có nhiệm vụ thủy phân cellulose, enzyme xylanase thủy phân hemicellulose [23, 24].

Bảng 1: Hàm lượng cellulose, hemicellulose và lignin trước và sau tiền xử lý

Thời gian (ngày)	Độ ẩm NL (%)	Cellulose (g/100g vỏ khô)	Hemicellulose (g/100g vỏ khô)	Lignin (g/100g vỏ khô)
Vỏ quả cà phê		25,88±0,2 ^a	3,67±0,17 ^a	20,07±0,18 ^a
10	55	25,7±0,12 ^a	3,64±0,1 ^{ab}	19,44±0,11 ^b
	65	25,37±0,1 ^b	3,61±0,09 ^{abc}	19,4±0,14 ^b
	75	25,14±0,14 ^{bc}	3,56±0,09 ^{abcd}	18,08±0,14 ^{cd}
	85	25,06±0,16 ^c	3,55±0,07 ^{abcd}	17,86±0,07 ^d
20	55	25,33±0,19 ^b	3,62±0,08 ^{ab}	18,17±0,13 ^c
	65	24,29±0,16 ^f	3,56±0,05 ^{abcd}	18,07±0,09 ^{cd}
	75	23,59±0,16 ^g	3,47±0,06 ^{abcd}	14,1±0,07 ^g
	85	23,33±0,14 ^g	3,45±0,07 ^{bcd}	13,44±0,09 ^h
30	55	24,99±0,11 ^{cd}	3,61±0,09 ^{abc}	17,34±0,14 ^e
	65	23,33±0,11 ^g	3,51±0,08 ^{abcd}	17,19±0,12 ^{ef}
	75	22,19±0,14 ⁱ	3,41±0,09 ^{def}	11,49±0,08 ⁱ
	85	21,78±0,12 ^j	3,37±0,07 ^{defg}	10,54±0,14 ^k
40	55	24,72±0,08 ^{de}	3,57±0,06 ^{abcd}	17,19±0,07 ^{ef}
	65	22,54±0,11 ^h	3,42±0,07 ^{cde}	17,03±0,14 ^f
	75	21,05±0,09 ^k	3,25±0,11 ^{efgh}	11,15±0,07 ^j
	85	20,51±0,07 ^l	3,2±0,07 ^{gh}	9,99±0,14 ^l
50	55	24,55±0,1 ^{ef}	3,56±0,11 ^{abcd}	17,12±0,11 ^{ef}
	65	22,05±0,09 ^{ij}	3,4±0,07 ^{defg}	16,95±0,14 ^f
	75	20,35±0,09 ^l	3,21±0,09 ^{fgh}	10,77±0,08 ^k
	85	19,73±0,1 ^m	3,15±0,09 ^h	9,74±0,1 ^k

Các giá trị cùng một cột có ký tự in thường khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$

Vỏ quả cà phê khô có độ ẩm 6,8% db

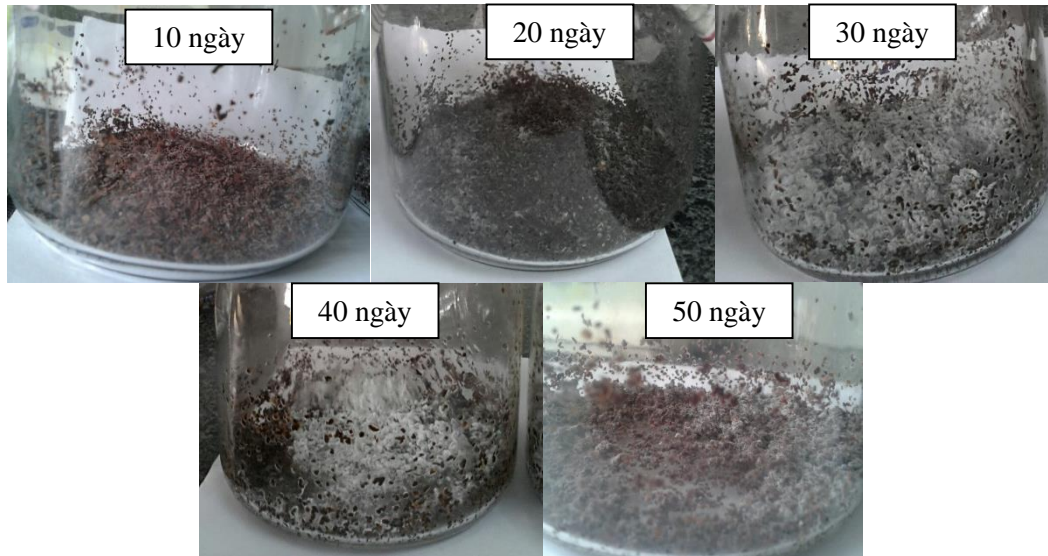
Mức độ thoái hóa lignin phụ thuộc vào hoạt tính của các enzyme do nấm mục trắng tổng hợp cũng có nghĩa là phụ thuộc vào môi trường nuôi cấy, nguồn dinh dưỡng và đặc biệt là phải có giai đoạn chuyển hóa thứ cấp. Do đó, theo thời gian tăng dần thì sự suy thoái lignin tăng dần. Tương tự, hàm lượng cellulose cũng bị suy giảm theo thời gian xử lý nhưng mức độ suy giảm chậm ở thời gian đầu và tăng dần ở những khoảng thời gian sau. Đó là do cấu tạo của sinh khối lignocellulose, cellulose được “che chắn” bởi hàng rào hemicellulose và lignin. Hay nói cách khác để phân giải được cellulose thì trước tiên hàng rào che chắn này phải bị cắt đứt, cho nên khoảng thời gian đầu sự suy giảm cellulose là chậm chạp.

Sự suy giảm hàm lượng lignin không hoàn toàn tuyến tính theo thời gian tiền xử lý bởi chủng nấm mục trắng *P. chrysosporium*. Sau các khoảng thời gian 10, 20, 30, 40, 50 ngày thì hàm lượng lignin giảm so với ban đầu tương ứng là 11%, 33%, 47,5%, 50,2% và 51,4%. Kết quả cho thấy, lignin giảm nhẹ trong khoảng thời gian đầu của quá trình xử lý, sau thời gian 10 ngày hàm lượng lignin bắt đầu giảm mạnh nhưng càng về sau (ngày thứ 30) thì lại giảm từ từ. Điều này được lý giải như sau: những ngày đầu của quá trình tiền xử lý là quá trình thích nghi và bắt đầu phát triển tăng sinh của nấm mục trắng và cho đến khi trong môi trường bắt đầu thiếu hụt nguồn nitrogen thì bắt đầu sản sinh một số enzyme ngoại bào như laccase, LiP hay MnP và các enzyme này bắt đầu quá trình thủy phân sinh học lignin, hemicellulose và cả cellulose [25]. Theo báo cáo của Yao và cộng sự (2014) thì sau 166 giờ (khoảng 7 ngày) nuôi cấy thì chủng *P. chrysosporium* bắt đầu sinh enzyme laccase sau đó là LiP và MnP và các enzyme này sẽ hoạt động tối đa sau 288 giờ (12 ngày) [22]. Hay theo nghiên cứu của Potumarthi và cộng sự (2013), hoạt tính enzyme LiP đạt cao nhất ở 19 ngày, MnP hoạt động mạnh trong khoảng thời gian 12÷26 ngày, các enzyme GLOX và AAO hoạt động mạnh từ ngày thứ 16÷18 của quá trình tiền xử lý. Ngoài ra, trong quá trình xử lý Potumarthi cũng thấy rằng chủng *P. chrysosporium* ngoài sinh các enzyme ngoại bào để phân hủy lignin còn có mặt của enzyme thủy phân như celulase hoạt lực mạnh nhất ở ngày thứ 20 và xylanase hoạt lực cao nhất ở ngày thứ 16 [26].

Thực tế cho thấy rằng, trong khoảng 5 ngày đầu của quá trình nuôi cấy, lượng oxy trong môi trường lúc này dồi dào và nấm mục trắng sử dụng để tăng sinh nhanh chóng đến khi các sợi nấm tích lũy ngày càng lớn dần và bắt đầu thâm nhập sâu hơn vào bên trong nguyên liệu và lan ra toàn bộ khối nguyên liệu sau 11 ngày nuôi cấy cho nên sau khoảng 11 ngày nếu quan sát ta thấy không có sự tăng trưởng đáng kể về sợi nấm và đây cũng là thời điểm các enzyme ngoại bào hoạt động mạnh nhất.

Bên cạnh đó, sự suy giảm của ba thành phần cellulose, hemicellulose và lignin có tương quan dương với hàm lượng nước có trong nguyên liệu (Bảng 1). Khi tăng hàm lượng nước ban đầu từ 55% lên 85% thì hàm lượng chất xơ giảm dần theo thời gian. Điều này được giải thích như sau: nước trong nguyên liệu đóng vai trò như một dung môi để vận chuyển chất dinh dưỡng cũng như giúp duy trì cấu trúc tế bào và phân tử ổn định [27, 28]. Mặc dù sự phát triển của vi nấm có thể được bắt đầu ở mức độ ẩm 50%, chức năng trao đổi chất của *P. chrysosporium* dường như không thể được hỗ trợ tích cực, bằng chứng chỉ 5,1% cellulose suy giảm, 2,9% hemicellulose suy giảm và 14,6% lignin bị suy giảm so với ban đầu ở mức độ ẩm 55%. Tuy nhiên khi tăng độ ẩm lên 75% và 85% thì sự suy giảm này là đáng kể. Cụ thể, cellulose giảm 21,3% ở độ ẩm 75% và 23,7% ở độ ẩm 85%; hemicellulose giảm 12,5% ở độ ẩm 75% và 14,1% ở độ ẩm 85% và lignin giảm 46,3% ở độ ẩm 75% và 51,4% ở độ ẩm 85% sau 50 ngày xử lý ở nhiệt độ 35°C.

Kết quả này chứng minh rằng độ ẩm ban đầu ảnh hưởng rất lớn đến sự phát triển của nấm mục trắng cũng như sự suy giảm hàm lượng chất xơ có trong vỏ quả cà phê. Điều này cũng được báo cáo trong các nghiên cứu của Lonsane [29] hay Mitchell [30]. Ngoài ra, kết quả của nghiên cứu cũng tương đồng với quan sát về chủng *P. chrysosporium* của Yao và cộng sự (2014) khi khảo sát sự ảnh hưởng của độ ẩm đến sự suy thoái lignin khi tiền xử lý thân cây ngô. Kết quả cho thấy ở độ ẩm 50% chỉ có 14,4% lignin bị suy giảm và 36,4% lignin bị suy giảm ở độ ẩm 80% sau 10 ngày tiền xử lý bằng chủng *P. chrysosporium* ở nhiệt độ 35°C [22]. Hay theo báo cáo của Shi và cộng sự (2008), ở độ ẩm 65% có 21% lignin bị loại bỏ, khi độ ẩm tăng lên 75% có khoảng 26% lignin bị loại bỏ và nếu tiếp tục tăng độ ẩm ban đầu của nguyên liệu lên 80% thì sự suy giảm lignin không tăng nhanh mà chỉ tăng từ từ (khoảng 27% lignin bị loại bỏ) [9].



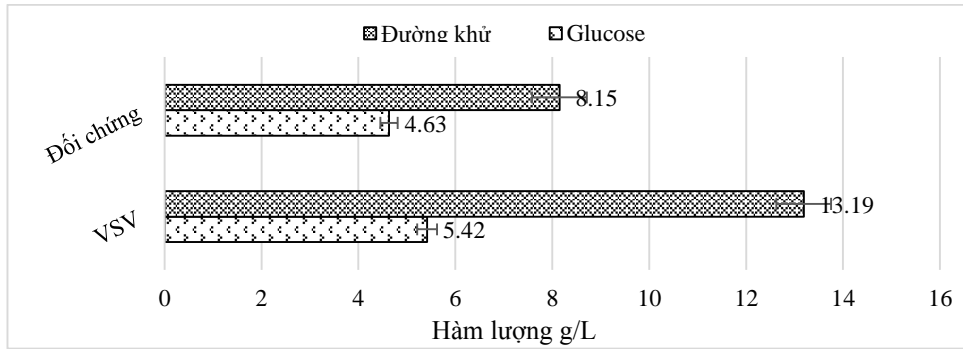
Hình 3. Sự sinh trưởng và phát triển của nấm mốc trắng trên môi trường chỉ có vỏ quả cà phê theo thời gian tiền xử lý

Khi so sánh quá trình tiền xử lý bởi chủng *P. chrysosporium* trên một số nguồn sinh khối lignocellulose khác, Liu và cộng sự (2014) đã tiến hành tiền xử lý thân cây ngô bằng chủng nấm mốc trắng *P. chrysosporium* kết quả thu được 19,9% cellulose bị thủy phân, 32,4% hemicellulose bị phân hủy và 39% lignin bị suy thoái sau 30 ngày xử lý ở nhiệt độ 28°C [31]. Kết quả loại bỏ lignin trong nghiên cứu của Liu tuy có thấp hơn so với trong nghiên cứu này là bởi vì thời gian xử lý ngắn hơn và nhiệt độ thấp hơn nhưng theo dự đoán của Liu thì nếu tiếp tục kéo dài thêm thời gian tiền xử lý thì mức độ suy giảm lignin sẽ tiếp tục tăng. Tuy nhiên, theo Yao và cộng sự (2014) điều kiện xử lý thân cây ngô tốt nhất là 7 ngày vì ở thời điểm này sự hao hụt cellulose chỉ khoảng 18% so với 11 ngày là 30,75%, trong khi đó hiệu quả loại bỏ lignin giảm đi 25% [22]. Ngoài ra, theo báo cáo của Potumarthi và cộng sự (2013), sau 60 ngày xử lý rơm lúa mì bằng chủng *Phanerochaete ostreatus* (cũng là nấm mốc trắng) thu được kết quả khả quan khi 28,4% lignin bị phân hủy và 36,8% holocellulose (bao gồm cellulose và hemicellulose) bị mất đi [26]. Nhiều nghiên cứu cho thấy rằng, *P. chrysosporium* còn được sử dụng để xử lý thân cây bông. Điển hình là nghiên cứu của Shi và cộng sự (2009), khi nhóm tác giả thực hiện tiền xử lý thân cây bông bằng chủng *P. chrysosporium* thu được kết quả: 33,9% lignin bị suy thoái sau 14 ngày nuôi cấy có bổ sung mangan vào môi trường [28].

Qua những phân tích và nhận định bên trên, điều kiện tiền xử lý tốt nhất đối với chủng nấm *P. chrysosporium* là độ ẩm ban đầu 85%, sau 40 ngày tiền xử lý cellulose suy giảm 20,7%, loại bỏ được 12,8% hemicellulose và 50,2% lignin ra khỏi nguyên liệu.

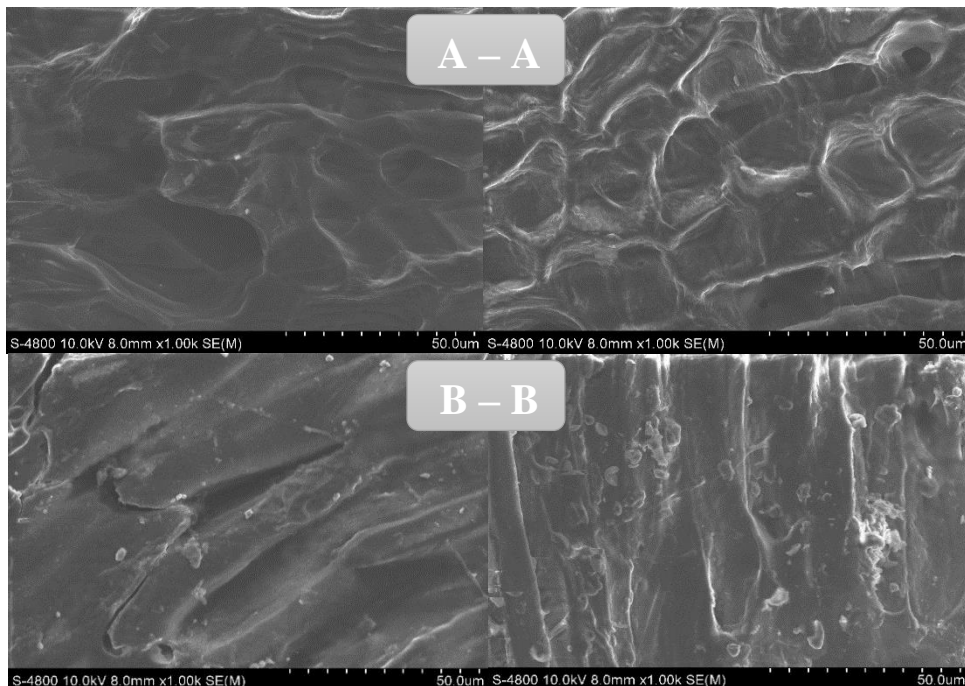
3.2 Đường khử và đường glucose sản sinh ra sau quá trình thủy phân

Để đánh giá một cách toàn diện hiệu quả của quá trình tiền xử lý ngoài chỉ tiêu phần trăm loại bỏ lignin và hemicellulose, phần trăm cellulose được giữ lại, cần phải xét đến các yếu như mức độ làm giảm vùng kết tinh của cellulose, mức độ làm rỗng cấu trúc và tăng diện tích tiếp xúc bề mặt sẽ giúp cho quá trình thủy phân diễn ra tốt hơn. Do vậy, hiệu quả của quá trình tiền xử lý sẽ được so sánh thông qua hàm lượng glucose và đường khử được giải phóng dưới tác động của hệ enzyme cellulase thương mại bao gồm Viscozyme Cassava và Novozyme 188. Kết quả phân tích hàm lượng đường glucose và đường khử thể hiện trong Hình 4.



Hình 4. Sự hình thành đường glucose và đường khử sau quá trình thủy phân

Quá trình thủy phân cellulose bởi enzyme bao gồm ba 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 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 [32]. Kết quả chụp SEM bề mặt vỏ quả cà phê cho thấy, khi nguyên liệu chưa qua tiền xử lý thì bề mặt nguyên liệu có cấu trúc cứng chắc, rất nhỏ gọn và không xốp (Hình 5-A), trong khi mẫu xử lý bởi chủng *P. chrysosporium* cho thấy diện tích bề mặt tiếp xúc tăng lên, giảm độ trùng hợp, giảm độ kết tinh bằng cách tách các liên kết giữa lignin và cellulose hoặc giữa hemicellulose và cellulose hoặc do phá vỡ cấu trúc mạch vòng của lignin (Hình 5-B) [33]. Do đó, mẫu nguyên liệu đã qua tiền xử lý sẽ giúp tăng quá trình hấp thụ enzyme cellulase lên bề mặt từ đó hiệu quả thủy phân sẽ tăng lên so với mẫu nguyên liệu không qua tiền xử lý. Cụ thể, hàm lượng đường khử tăng so với mẫu đối chứng là 38,2%, đường glucose là 14,6%. Nếu tính theo công thức (1) thì hiệu suất quá trình thủy phân trong nghiên cứu này là 60,23%. Hiệu suất thủy phân chưa phải là cao nhất khi so sánh với một số nghiên cứu khác trên đối tượng lignocellulose khác. Chẳng hạn như trong báo cáo của Bak và cộng sự (2009), sử dụng chủng nấm *P. chrysosporium* để tiền xử lý rom rạ trong thời gian 15 ngày thì kết quả loại bỏ được 10,9% hemicellulose; 19,9% lignin và có đến 37,7% cellulose bị mất đi. Nguyên liệu sau đó thủy phân với 60 FPU Celluclast 1.5L và 30 CBU Novozyme 188 ở thời gian 120 giờ thì hiệu suất thủy phân đạt cao nhất 64,9%.



(A-A) Nguyên liệu chưa qua tiền xử lý, (B-B) tiền xử lý bằng vi sinh vật

Hình 5. Bề mặt của vỏ quả cà phê sau khi được tiền xử lý bằng các phương pháp khác nhau dưới kính hiển vi điện tử (SEM)

Có thể thấy rằng hiệu suất thủy phân khi tiền xử lý bằng chủng nấm mục trắng là chưa cao, thấp hơn so với hiệu suất thủy phân từ các phương pháp tiền xử lý khác như kiềm, acid hoặc nổi hơi, hiệu suất thường đạt 80-90% [34-36]. Tuy nhiên, các phương pháp tiền xử lý này lại có nhược điểm lớn đó là nguyên liệu sau khi tiền xử lý phải được rửa về trung tính hoặc phải trung hòa acid/kiềm dư do đó tốn kém về chi phí và gây ô nhiễm môi trường. Ngoài ra, các phương pháp tiền xử lý thông thường này luôn sử dụng nhiệt độ cao nên trong dịch thủy phân sẽ hình thành các chất ức chế nấm men từ đó sẽ làm giảm hiệu suất quá trình lên men tạo ethanol [37]. Trong khi đó, phương pháp tiền xử lý bằng nấm mục trắng, nguyên liệu sau tiền xử lý không cần rửa mà thực hiện ngay quá trình thủy phân do đó sẽ giảm chi phí liên quan đến vận hành cũng như giảm thiểu nước thải ra môi trường.

4. KẾT LUẬN

Hai kết luận quan trọng được rút ra từ nghiên cứu này: (i) Hiệu quả loại bỏ lignin và hemicellulose tăng khi tăng thời gian tiền xử lý và độ ẩm ban đầu của nguyên liệu. Hiệu quả tiền xử lý đạt cao nhất khi độ ẩm nguyên liệu ban đầu đạt 85%, ở nhiệt độ 35°C trong thời gian 40 ngày. (ii) Hiệu quả thủy phân tạo thành đường khử và đường glucose tuy không cao bằng các phương pháp tiền xử lý bằng nhiệt hay hóa học nhưng phương pháp tiền xử lý bằng chủng nấm mục trắng *P. chrysosporium* là an toàn, ít tốn kém, không gây ô nhiễm môi trường và đặc biệt là không sản sinh ra các chất gây ức chế nấm men trong quá trình lên men tạo ethanol sau này.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin cảm ơn các đồng nghiệp và cộng sự Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Tp.HCM đã hỗ trợ chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] F. USDA, *Coffee: world markets and trade*. Glob. Mark. Anal, 2020.
- [2] P.T. Martone, J.M. Estevez, F. Lu, K. Ruel, M.W. Denny, C. Somerville, and J. Ralph, Discovery of lignin in seaweed reveals convergent evolution of cell-wall architecture, *Current biology*, vol. 19, no. 2, pp. 169-175, 2009.
- [3] P. Sassner, M. Galbe, and G. Zacchi, Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials, *Biomass and bioenergy*, vol. 32, no. 5, pp. 422-430, 2008.
- [4] Y. Zheng, Z. Pan, and R. Zhang, Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production, *International journal of agricultural and biological engineering*, vol. 2, no. 3, pp. 51-68, 2009.
- [5] M. Castillo, J. Stenstrom, and P. Ander, Determination of manganese peroxidase activity with 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone and 3-(dimethylamino) benzoic acid, *Analytical Biochemistry*, vol. 218, no. 2, pp. 399-404, 1994.
- [6] M. del Pilar Castillo, S. von Wirén-Lehr, I. Scheunert, and L. Torstensson, Degradation of isoproturon by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Biology and Fertility of Soils*, vol. 33, no. 6, pp. 521-528, 2001.
- [7] J. Zeng, D. Singh, and S. Chen, Biological pretreatment of wheat straw by *Phanerochaete chrysosporium* supplemented with inorganic salts, *Bioresource technology*, vol. 102, no. 3, pp. 3206-3214, 2011.
- [8] Z. Zhi and H. Wang, White-rot fungal pretreatment of wheat straw with *Phanerochaete chrysosporium* for biohydrogen production: simultaneous saccharification and fermentation, *Bioprocess and biosystems engineering*, vol. 37, no. 7, pp. 1447-1458, 2014.
- [9] J. Shi, M.S. Chinn, and R.R. Sharma-Shivappa, Microbial pretreatment of cotton stalks by solid state cultivation of *Phanerochaete chrysosporium*, *Bioresource technology*, vol. 99, no. 14, pp. 6556-6564, 2008.
- [10] J.S. Bak, J.K. Ko, I.G. Choi, Y.C. Park, J.H. Seo, and K.H. Kim, Fungal pretreatment of lignocellulose by *Phanerochaete chrysosporium* to produce ethanol from rice straw, *Biotechnology and bioengineering*, vol. 104, no. 3, pp. 471-482, 2009.
- [11] J. Zhang, X. Ren, W. Chen, and J. Bao, Biological pretreatment of corn stover by solid state fermentation of *Phanerochaete chrysosporium*, *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, vol. 6, no. 2, pp. 146-151, 2012.
- [12] Y.Y. Liang, R. Halis, O.M. Lai, and R. Mohamed, Conversion of lignocellulosic biomass from grass to bioethanol using materials pretreated with alkali and the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*, *BioResources*, vol. 7, no. 4, pp. 5500-5513, 2012.
- [13] D. Shenoy, A. Pai, R. Vikas, H. Neeraja, J. Deeksha, C. Nayak, and C.V. Rao, A study on bioethanol production from cashew apple pulp and coffee pulp waste, *Biomass and bioenergy*, vol. 35, no. 10, pp. 4107-4111, 2011.
- [14] B. Gouvea, C. Torres, A. Franca, L. Oliveira, and E. Oliveira, Feasibility of ethanol production from coffee husks, *Biotechnology letters*, vol. 31, no. 9, pp. 1315-1319, 2009.

- [15] P. Do Viet, T.Q. Le Pham, and D.D. Le Nguyen, Production of bioethanol from Robusta coffee pulp (*Coffea robusta* L.) in Vietnam, *Foods and Raw materials*, vol. 7, no. 1, pp. 10-17, 2019.
- [16] E.G. Menezes, J.R. do Carmo, J.G.L. Alves, A.G. Menezes, I.C. Guimarães, F. Queiroz, and C.J. Pimenta, Optimization of alkaline pretreatment of coffee pulp for production of bioethanol, *Biotechnology progress*, vol. 30, no. 2, pp. 451-462, 2014.
- [17] G.L. Miller, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical chemistry*, vol. 31, no. 3, pp. 426-428, 1959.
- [18] S. Sadasivam and A. Manickam, *Biochemical Methods New Age International*. New Delhi, 1996.
- [19] P.v. Soest and R. Wine, Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, vol. 50, no. 1, pp. 50-55, 1967.
- [20] T. Tappi, 222 om-02: *Acid-insoluble lignin in wood and pulp*. 2002–2003 TAPPI Test Methods, 2002.
- [21] G. Henriksson, A. Nutt, H. Henriksson, B. Pettersson, J. Ståhlberg, G. Johansson, and G. Pettersson, Endoglucanase 28 (Cel12A), a new *Phanerochaete chrysosporium* cellulase, *European Journal of Biochemistry*, vol. 259, no. 1- 2, pp. 88-95, 1999.
- [22] W. Yao and S.E. Nokes, *Phanerochaete chrysosporium* pretreatment of biomass to enhance solvent production in subsequent bacterial solid-substrate cultivation, *biomass and bioenergy*, vol. 62, pp. 100-107, 2014.
- [23] C. Rüttimann-Johnson, D. Cullen, and R.T. Lamar, Manganese peroxidases of the white rot fungus *Phanerochaete sordida*, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 60, no. 2, pp. 599-605, 1994.
- [24] C. Srinivasan, T. Dsouza, K. Boominathan, and C. Reddy, Demonstration of laccase in the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 61, no. 12, pp. 4274-4277, 1995.
- [25] T. GLUMOFF, P.J. HARVEY, S. MOLINARI, M. GOBLE, G. FRANK, J.M. PALMER, J.D.G. SMIT, and M.S. LEISOLA, Lignin peroxidase from *Phanerochaete- chrysosporium*: Molecular and kinetic characterization of isozymes, *European journal of biochemistry*, vol. 187, no. 3, pp. 515-520, 1990.
- [26] R. Potumarthi, R.R. Baadhe, P. Nayak, and A. Jetty, Simultaneous pretreatment and saccharification of rice husk by *Phanerochaete chrysosporium* for improved production of reducing sugars, *Bioresource technology*, vol. 128, pp. 113-117, 2013.
- [27] P. Gervais and P. Molin, The role of water in solid-state fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, vol. 13, no. 2-3, pp. 85-101, 2003.
- [28] J. Shi, R.R. Sharma-Shivappa, and M.S. Chinn, Microbial pretreatment of cotton stalks by submerged cultivation of *Phanerochaete chrysosporium*, *Bioresource technology*, vol. 100, no. 19, pp. 4388-4395, 2009.
- [29] B. Lonsane, N. Ghildyal, S. Budiartman, and S. Ramakrishna, Engineering aspects of solid state fermentation, *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 7, no. 6, pp. 258-265, 1985.
- [30] D.A. Mitchell, M. Berovic, and N. Krieger, Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing, *New products and new areas of bioprocess engineering*, pp. 61-138, 2000.
- [31] S. Liu, X. Li, S. Wu, J. He, C. Pang, Y. Deng, and R. Dong, Fungal pretreatment by *Phanerochaete chrysosporium* for enhancement of biogas production from corn stover silage, *Applied biochemistry and biotechnology*, vol. 174, no. 5, pp. 1907-1918, 2014.
- [32] A.O. Converse, R. Matsuno, M. Tanaka, and M. Taniguchi, A model of enzyme adsorption and hydrolysis of microcrystalline cellulose with slow deactivation of the adsorbed enzyme, *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 32, no. 1, pp. 38-45, 1988.
- [33] M. Imai, K. Ikari, and I. Suzuki, High-performance hydrolysis of cellulose using mixed cellulase species and ultrasonication pretreatment, *Biochemical Engineering Journal*, vol. 17, no. 2, pp. 79-83, 2004.
- [34] M. Gharpuray, Y.H. Lee, and L. Fan, Structural modification of lignocellulosics by pretreatments to enhance enzymatic hydrolysis, *Biotechnology and bioengineering*, vol. 25, no. 1, pp. 157-172, 1983.
- [35] T. Jeoh, C.I. Ishizawa, M.F. Davis, M.E. Himmel, W.S. Adney, and D.K. Johnson, Cellulase digestibility of pretreated biomass is limited by cellulose accessibility, *Biotechnology and bioengineering*, vol. 98, no. 1, pp. 112-122, 2007.
- [36] S.B. Lee, I. Kim, D.D. Ryu, and H. Taguchi, Structural properties of cellulose and cellulase reaction mechanism, *Biotechnology and bioengineering*, vol. 25, no. 1, pp. 33-51, 1983.
- [37] Y. Zhao, Y. Wang, J. Zhu, A. Ragauskas, and Y. Deng, Enhanced enzymatic hydrolysis of spruce by alkaline pretreatment at low temperature, *Biotechnology and bioengineering*, vol. 99, no. 6, pp. 1320-1328, 2008.

PRETREATMENT OF COFFEE PULP BY *PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM*

DO VIET PHUONG

*Institute of Biotechnology and Food technology, Industrial University of Ho Chi Minh City
dovietphuong@iuh.edu.vn*

Abstract. Coffee pulp is one of the abundant sources of agricultural byproducts in Vietnam. Coffee pulp contains high amount of cellulose, which is an important ingredient to be converted into bioethanol. However, in order to sufficiently convert the coffee pulp into ethanol, this material firstly needs to be pretreated to reduce the amount of lignin and hemicellulose while retaining cellulose composition. In this study, the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* was used for the pretreatment prior to hydrolysis and fermentation steps. In the conditions of raw material humidity of 85%, environmental temperature of 35°C and biomass/material ratio of 1.5%. After 40 days of pretreatment, the contents of cellulose, hemicellulose and lignin were reduced by 20.7%, 12.8% and 50.2%, respectively. The pretreated raw materials were then subjected to hydrolysis step using the commercial enzyme complexes (25 FPU/g Viscozyme Cassava and 34 CBU/g Novozyme 188). As a result, the reducing sugar content of 13.19 g/L and the glucose content of 5.42 g/L with the hydrolyzed efficiency of 60.23%. The results showed that the *P. chrysosporium* was highly compatible when cultured on the source of coffee pulp biomass and they were able to secrete some enzymes capable of biodegrading cellulose, lignin and hemicellulose into the environment.

Keywords. Coffee pulp, *Phanerochaete chrysosporium*, pretreatment.

Ngày gửi bài: 12/03/2022

Ngày chấp nhận đăng: 21/05/2022