

THỦY PHÂN VÀ LÊN MEN ĐỒNG THỜI THU NHẬN BIOETHANOL TỪ LÁ CÂY DỨA (*ANANAS COMOSUS*)

TRẦN THỊ TƯỜNG AN^{1*} - ĐẶNG THỊ HOÀNG DIỄM¹

¹Trường Đại học Bách khoa - Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

Ho Chi Minh City University of Technology,

Vietnam National University, Ho Chi Minh City, Vietnam

*Email: trantuongan@hcmut.edu.vn

Ngày nhận bài: 6/7/2026

Ngày sửa bài: 24/7/2026

Ngày duyệt đăng bài: 7/8/2026

Tóm tắt:

Nghiên cứu khảo sát khả năng sử dụng lá cây dứa (*Ananas comosus*), một phụ phẩm lignocellulose, làm nguyên liệu sản xuất bioethanol bằng phương pháp thủy phân và lên men đồng thời (SSF). Lá dứa khô chứa $40,37 \pm 0,32\%$ cellulose, $25,71 \pm 0,14\%$ lignin, $17,01 \pm 0,02\%$ đường khử, $12,69 \pm 0,10\%$ ẩm và $1,41 \pm 0,04\%$ tro. Tiền xử lý được khảo sát với NaOH và H_2SO_4 ở nồng độ 1-5%. NaOH 4% được lựa chọn do khả năng loại lignin tốt hơn và ít ảnh hưởng đến cellulose; thời gian tiền xử lý được chọn là 24 giờ. Quá trình SSF sử dụng cellulase và *Saccharomyces cerevisiae* được khảo sát theo thời gian, pH, nhiệt độ, tỷ lệ enzyme và tỷ lệ giống. Các điều kiện được lựa chọn gồm thời gian 48 giờ, pH 5,0, nhiệt độ $37^\circ C$, tỷ lệ enzyme 5% và tỷ lệ nấm men 5%. Trong các khảo sát tuần tự, nồng độ ethanol cao nhất ghi nhận là 2,93% tại pH 5,0. Kết quả cho thấy, lá dứa khô có tiềm năng làm nguồn nguyên liệu lignocellulose cho sản xuất bioethanol, đồng thời cho thấy tiền xử lý kiềm và lựa chọn điều kiện SSF phù hợp là các yếu tố quan trọng đối với hiệu quả chuyển hóa.

Từ khóa: bioethanol, lá dứa, *Ananas comosus*, lignocellulose, SSF, *Saccharomyces cerevisiae*.

Simultaneous saccharification and fermentation of pineapple leaves (*Ananas comosus*) for bioethanol production

Abstract:

This study investigates dried pineapple leaves (*Ananas comosus*) as a lignocellulosic feedstock for bioethanol production by simultaneous saccharification and fermentation (SSF). The material contained $40.37 \pm 0.32\%$ cellulose, $25.71 \pm 0.14\%$ lignin, and $17.01 \pm 0.02\%$ reducing sugars. Pretreatment with 1 - 5% NaOH and H_2SO_4 was evaluated, and 4% NaOH for 24 hours was selected because it provided better lignin removal while limiting cellulose loss. SSF using cellulase and *Saccharomyces cerevisiae* was subsequently optimized for time, pH, temperature, enzyme loading, and yeast inoculum. The selected conditions were 48 hours, pH 5.0, $37^\circ C$, 5% enzyme, and 5% yeast inoculum. The highest ethanol concentration recorded was 2.93%. The findings demonstrate the potential of pineapple leaves as a feedstock for bioethanol production.

Keywords: bioethanol, pineapple leaves, *Ananas comosus*, lignocellulose, SSF, *Saccharomyces cerevisiae*

1. Đặt vấn đề

Nhu cầu tìm kiếm nguồn năng lượng tái tạo và tận dụng phụ phẩm nông nghiệp thúc đẩy các nghiên cứu sản xuất bioethanol từ sinh khối lignocellulose. Khác với nguyên liệu giàu đường hoặc tinh bột, lignocellulose không cạnh tranh trực tiếp với nguồn lương thực nhưng có cấu trúc bền do cellulose và hemicellulose được bao bọc bởi lignin, vì vậy cần có bước tiền xử lý trước thủy phân và lên men.

Lá cây dứa là phụ phẩm phát sinh sau thu hoạch. Dữ liệu của nghiên cứu cho thấy, lá dứa khô chứa trên 40% cellulose, đồng thời hàm lượng lignin khoảng 25,7%, cho thấy vừa có tiềm năng cung cấp carbohydrate lên men vừa đặt ra yêu cầu loại lignin trước quá trình đường hóa. Phương pháp thủy phân và lên men đồng thời (SSF) có ưu điểm là glucose sinh ra từ thủy phân được nấm men sử dụng ngay, góp phần hạn chế ức chế enzyme do sản phẩm.

Nghiên cứu này nhằm khảo sát tác chất và thời gian tiền xử lý lá dứa, sau đó xác định các điều kiện thích hợp của quá trình SSF sử dụng cellulase và *Saccharomyces cerevisiae*, gồm thời gian, pH, nhiệt độ, tỷ lệ enzyme và tỷ lệ giống nấm men.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu và vi sinh vật

Nguyên liệu lá cây dứa được sấy khô đến độ ẩm khoảng 12%, xay nhỏ. *S.cerevisiae* được hoạt hóa và nhân giống trước lên men; cellulase được sử dụng cho quá trình thủy phân cellulose. Chất dinh dưỡng corn steep liquor (CSL) được bổ sung ở tỷ lệ 1% trong các thí nghiệm SSF.

2.2. Tiền xử lý nguyên liệu

Mẫu 5 g được xử lý với H_2SO_4 hoặc NaOH ở các nồng độ 1, 2, 3, 4 và 5%, tỷ lệ nguyên liệu/dung dịch 1:10, trong 24 giờ ở khoảng 28°C và tốc độ lắc 120 vòng/phút. Hiệu quả được đánh giá thông qua lượng lignin tách ra, đường khử và cellulose. Sau khi lựa chọn tác chất, ảnh hưởng của thời gian tiền xử lý được khảo sát.

2.3. Thủy phân và lên men đồng thời

Bã sau tiền xử lý được dùng cho SSF với tỷ lệ bã/dịch lên men 1:10. Các khảo sát được tiến hành tuần tự đối với thời gian lên men; pH 4,0-6,0; nhiệt độ 28-40°C; tỷ lệ enzyme 1-9%; và tỷ lệ nấm men 1-9%. Tốc độ lắc là 120 vòng/phút. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Đường khử được xác định bằng phương pháp DNS; cellulose theo phương pháp Kiursher-Hoff. Số liệu được xử lý bằng ANOVA một yếu tố với mức ý nghĩa $\alpha=0,05$.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Thành phần lá dứa khô

Hàm lượng cellulose $40,37 \pm 0,32\%$ cho thấy, lá dứa khô chứa tỷ lệ carbohydrate đáng kể. Tuy nhiên lignin cũng chiếm $25,71 \pm 0,14\%$, có thể hạn chế khả năng tiếp cận cellulose của enzyme; do đó bước tiền xử lý là cần thiết trước SSF.

Bảng 1. Thành phần lá dứa khô trước tiền xử lý

Cellulose (%)	Đường khử (%)	Lignin (%)	Tro (%)	Ẩm (%)
$40,37 \pm 0,32$	$17,01 \pm 0,02$	$25,71 \pm 0,14$	$1,41 \pm 0,04$	$12,69 \pm 0,10$

Nguồn: Kết quả nghiên cứu

3.2. Lựa chọn điều kiện tiền xử lý

Bảng 2. Hàm lượng lignin tách ra khi tiền xử lý bằng NaOH và H₂SO₄

Nồng độ (%)	NaOH (%)	H ₂ SO ₄ (%)
1	17,40	4,24
2	18,63	3,41
3	18,75	3,04
4	20,12	2,92
5	19,41	3,40

Nguồn: Kết quả nghiên cứu

NaOH cho mức tách lignin cao hơn rõ rệt so với H₂SO₄ ở toàn bộ dải nồng độ khảo sát; giá trị cao nhất đạt 20,12% ở NaOH 4%. Với khảo sát thời gian, sau 72 giờ lượng lignin tách ra gần đạt trạng thái cân bằng, trong khi ANOVA đối với đường khử và cellulose không cho thấy khác biệt có ý nghĩa theo thời gian; vì vậy tác giả chọn thời gian ngắn 24 giờ nhằm giảm thời gian xử lý.

3.3. Ảnh hưởng của thời gian SSF

Bảng 3. Biến đổi đường khử và cellulose theo thời gian SSF

Thời gian (h)	Đường khử (mg/mL)	Cellulose (mg/mL)
0	9,52 ± 2,08	42,14 ± 12,80
18	25,49 ± 4,19	37,49 ± 4,92
36	43,52 ± 6,68	26,29 ± 6,33
48	20,85 ± 4,43	10,19 ± 4,29
60	20,29 ± 2,62	9,16 ± 2,38
72	19,53 ± 5,06	8,18 ± 2,21

Nguồn: Kết quả nghiên cứu

Độ cồn tăng từ 0,23% ở 6 giờ lên cực đại 2,65% tại 48 giờ, sau đó giảm. Đồng thời, cellulose giảm mạnh trong giai đoạn lên men và đường khử tăng trước khi được nấm men tiêu thụ. Mật độ tế bào trong dịch lên men cũng đạt cao nhất quanh 48 giờ. Vì vậy 48 giờ là thời gian SSF thích hợp.

3.4. Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ

Độ cồn đạt cực đại 2,93% ở pH 5,0. Đây cũng là điều kiện mà lượng cellulose còn lại thấp nhất trong khảo sát pH. ANOVA cho thấy ảnh hưởng của pH đến đường khử và cellulose có ý nghĩa ($p < 0,05$), do đó pH 5,0 được lựa chọn.

Bảng 4. Ảnh hưởng của pH đến đường khử và cellulose sau SSF

pH	Đường khử (mg/mL)	Cellulose (mg/mL)
4,0	29,18 ± 7,59	30,25 ± 3,63
4,5	31,61 ± 7,87	32,61 ± 3,43

5,0	26,83 ± 2,84	20,56 ± 5,67
5,5	35,96 ± 6,46	28,30 ± 4,23
6,0	28,36 ± 3,88	26,83 ± 2,84

Nguồn: Kết quả nghiên cứu

Bảng 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến đường khử và cellulose sau SSF

Nhiệt độ (°C)	Đường khử (mg/mL)	Cellulose (mg/mL)
28	40,25 ± 4,47	25,48 ± 9,48
32	32,61 ± 3,43	31,60 ± 7,87
35	30,16 ± 6,95	36,00 ± 6,46
37	23,50 ± 8,17	28,56 ± 3,81
40	25,83 ± 7,47	26,83 ± 2,84

Nguồn: Kết quả nghiên cứu

Ở 37°C, độ còn đạt 2,72%, cao nhất trong khảo sát nhiệt độ. Kết quả phản ánh yêu cầu dung hòa giữa nhiệt độ thuận lợi cho hoạt động của cellulase và khả năng sinh trưởng, lên men của *S.cerevisiae*. Các khác biệt về đường khử và cellulose theo nhiệt độ có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

3.5. Ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme và nấm men

Bảng 6. Ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme cellulase

Enzyme (%)	Đường khử (mg/mL)	Cellulose (mg/mL)
1	23,85 ± 3,20	27,58 ± 5,26
3	18,04 ± 6,00	26,21 ± 7,11
5	11,67 ± 2,45	21,56 ± 3,03
7	15,62 ± 3,88	23,57 ± 1,33
9	18,03 ± 4,98	24,83 ± 2,08

Nguồn: Kết quả nghiên cứu

Tỷ lệ enzyme 5% cho độ còn cao nhất trong khảo sát này (2,33%). Khi tăng enzyme lên 7-9%, mức cải thiện không đáng kể. Nghiên cứu vì vậy lựa chọn 5% nhằm cân bằng hiệu quả chuyển hóa và lượng enzyme sử dụng.

Tỷ lệ giống 5% được lựa chọn do độ còn đạt mức cao và lượng đường khử còn lại thấp nhất trong các nghiệm thức. Khi tăng tỷ lệ giống lên 7-9%, độ còn không thay đổi đáng kể; lượng tế bào cao hơn có thể làm tăng tiêu thụ đường cho sinh khối thay vì tiếp tục tăng ethanol.

Bảng 7. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống nấm men

Nấm men (%)	Đường khử (mg/mL)	Cellulose (mg/mL)
1	33,71 ± 17,36	17,77 ± 1,98
3	27,21 ± 5,39	14,81 ± 2,09

5	17,52 ± 10,64	11,42 ± 8,37
7	23,40 ± 9,61	13,51 ± 6,91
9	22,93 ± 5,91	16,45 ± 1,35

Nguồn: Kết quả nghiên cứu

4. Kết luận

Lá cây dứa trong nghiên cứu chứa 40,37% cellulose và 25,71% lignin, cho thấy tiềm năng sử dụng làm nguyên liệu lignocellulose cho sản xuất bioethanol. Trong các điều kiện khảo sát, NaOH 4% được lựa chọn cho tiền xử lý và thời gian tiền xử lý 24 giờ được sử dụng. Các thông số SSF được lựa chọn gồm 48 giờ, pH 5,0, 37°C, cellulase 5% và giống *S.cerevisiae* 5%. Nồng độ ethanol cao nhất ghi nhận trong chuỗi khảo sát là 2,93%. Kết quả là cơ sở ban đầu cho việc tận dụng phụ phẩm lá dứa; các nghiên cứu tiếp theo cần tối ưu đa yếu tố, đánh giá hiệu suất ethanol theo khối lượng nguyên liệu và khảo sát các chủng có khả năng sử dụng đường pentose ■

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

- Ado, S. A., Olutokun G. B., Amen, J. B. and Yabaya, A. (2009). Bioconversion of cassava starch to ethanol in a simultaneous saccharification and fermentation process by co - cultures of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Science World Journal*, 4(1), 19 - 22.
- Buaban B, et al. (2010). Bioethanol production from ball milled bagasse using an on-site produced fungal enzyme cocktail and xylose-fermenting *Pichia stipites*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(1), 18-25.
- Charles E. Wyman (1996). *Handbook on Bioethanol: Product and Utilization*. Taylor & Francis, USA, 119-285.
- Hetti Palonen (2004). Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *VTT Biotechnology*, 15(3), 11-39.
- Huseyin Serdar Yucesu, Tolga Topgul, Can Cinar and Melih Okur (2006). Effect of ethanol gasoline blends on engine performance and exhaust emission in different compression ratios. *Applied -Thermal Engineering*, 26, 2272-2278.
- Karunanithy C., Muthukumarappan K., Julson J. L. (2008). Influence of high shear bioreactor parameters on carbohydrate release from different biomasses. *American Society of Agricultural and Biological Engineers Annual International Meeting*. DOI:10.13031/2013.24960.
- Kim, T. H., Kim, J. S., Sunwoo, C., Lee, Y. Y. (2003). Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia. *Bioresource Technology*, 39-47.
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 48, 3713-3729.
- López-Linares, Juan C., et al. (2015). Optimization of uncatalyzed steam explosion pretreatment of rapeseed straw for biofuel production. *Bioresource Technology*, 190, 97-105.
- M. P., Coughlan (1985). The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 3, 37-109.
- Parveen Kumar et al. (2009). *Industrial and Engineering Chemistry Research Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production*, 48(8), 3713-3729.
- Takahashi C. M., Lima K. G. C., Takahashi D. F. (2000). Alterthum F. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate and sugar mixtures to ethanol by recombinant *Escherichia coli* KO11. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 829-34.
- Zhu J. Y., Pan X. J. (2010). Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: technology and energy consumption evaluation. *Bioresour Technology*, 101, 4992-5002.