

TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN LÊN MEN ETHANOL TỪ DỊCH THỦY PHÂN VỎ TRÁI CA CAO

Huỳnh Xuân Phong¹, Nguyễn Ngọc Thanh², Ngô Thị Phương Dung³
Phạm Thiếu Quân⁴, Lê Thị Vân An⁵

Tóm tắt – Nghiên cứu được thực hiện với mục đích khảo sát ảnh hưởng của các nhân tố đến quá trình lên men ethanol từ dịch thủy phân vỏ trái ca cao như chủng và mật số nấm men, pH dịch thủy phân, nhiệt độ và thời gian lên men. Thử nghiệm lên men được thực hiện với bốn chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (YM5C, BVK2, VLK06 và 2.1) và bốn mức độ mật số giống chủng ban đầu (10^2 , 10^4 , 10^6 và 10^7 tế bào/mL). Các điều kiện thích hợp cho quy trình lên men được thực hiện ở nhiệt độ 25°C, 30-32°C và 37°C với pH ban đầu 4,5; 5,0; 5,5 và 6,0 trong thời gian 5, 7 và 9 ngày. Hàm lượng ethanol của dịch lên men đạt 5,27% (v/v) khi sử dụng chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* VLK06 trong 7 ngày ở nhiệt độ 30°C, mật số giống chủng 10^6 tế bào/mL dịch lên men và pH ban đầu là 5,38. Kết quả cho thấy khả năng trong việc sản xuất ethanol từ nguồn phế phẩm là vỏ trái ca cao.

Từ khóa: ca cao, dịch thủy phân vỏ ca cao, ethanol, lên men ethanol, *Saccharomyces cerevisiae*.

Abstract – The aim of this study is to investigate the conditions for ethanol production from cocoa pod hydrolysate including yeast strains and their inoculated concentrations, pH, fermentation temperatures and duration. The fermentation process was conducted with four strains of *Saccharomyces cerevisiae* (YM5C, BVK2, VLK06, and 2.1) with initial inoculum concentration at 10^2 , 10^4 , 10^6 , and 10^7 cells/mL. The optimum conditions were designed with different temperatures (25°C, 30-32°C, and 37°C), pH (4.5, 5.0, 5.5, and 6.0), and fermentation time (5, 7, and 9

days). The results showed that the cocoa pod hydrolysate was fermented by *Saccharomyces cerevisiae* VLK06 with initial culture concentration of 10^6 cells/mL, pH 5.38 within 7 days at 30°C, ethanol concentration reached to 5.27% (v/v). This study shows the possibility of using cocoa pod as a waste material for ethanol production.

Keywords: cocoa pod hydrolysate, ethanol, ethanol fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bioethanol hay nhiên liệu sinh học là một loại nhiên liệu sinh học có tiềm năng thay thế nguồn nhiên liệu hóa thạch. Bioethanol là nguồn nhiên liệu khá mới ngay cả với những nước tiên tiến đi đầu trong lĩnh vực này, tiêu biểu là Brazil và Hoa Kỳ vì sản xuất bioethanol đòi hỏi khắt khe về yêu cầu kỹ thuật cũng như nguồn nguyên liệu đầu vào. Ở Việt Nam, để đảm bảo được giá thành sản xuất ổn định và có tính cạnh tranh, các nhà sản xuất xăng sinh học đang khuyến khích việc sử dụng nguồn nguyên liệu đầu vào rẻ hơn và phong phú hơn so với nguồn nguyên liệu đang được sử dụng là khoai mì và các loại nông sản khác chứa nhiều carbohydrate. Sử dụng nguyên liệu giàu cellulose là một giải pháp đang được hướng đến để tránh việc cạnh tranh với nguồn lương thực của con người [1].

Tuy nhiên, việc định hướng nguyên liệu là cellulose gặp khó khăn về vấn đề kinh tế và kỹ thuật. Bên cạnh đó, nguồn nguyên liệu rơm rạ hay bã mía hiện đang được tận dụng khá triệt để, vỏ trái ca cao với thành phần cellulose đến 45% là một nguồn nguyên liệu có triển vọng ứng dụng để lên men ethanol [2]. Ngoài ra, với khuynh hướng phát triển cây ca cao như ở Việt Nam, lượng vỏ trái thải ra là rất lớn, đây cũng là một vấn đề cần giải quyết để giảm lượng thải ra môi trường cũng như tận dụng triệt để hơn loại phế phẩm này. Hiện nay, nước ta gần như vẫn chưa có các

^{1,2,3}Viện NC&PT Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

^{4,5}Sinh viên lớp Công nghệ Sinh học Tiên tiến khóa 35, Trường Đại học Cần Thơ

Ngày nhận bài: 24/9/2015, ngày nhận kết quả bình duyệt: 18/11/2016, ngày chấp nhận đăng: 20/12/2016

đề tài nghiên cứu hướng đến việc xử lý vỏ trái ca cao thành ethanol. Do đó, vỏ trái ca cao là một loại nguyên liệu có tiềm năng rất lớn trong việc sản xuất ethanol ở Việt Nam và nghiên cứu này được đặt ra với mong muốn sản xuất thành công ethanol từ nguồn nguyên liệu rẻ tiền là vỏ trái ca cao. Mục tiêu cụ thể của nghiên cứu là nhằm khảo sát các nhân tố ảnh hưởng đến quá trình lên men ethanol từ dịch thủy phân vỏ trái ca cao như chủng và mật số nấm men, pH dịch thủy phân, nhiệt độ và thời gian lên men.

II. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

A. Nguyên vật liệu

- Nguyên liệu được sử dụng trong nghiên cứu này là dịch thủy phân vỏ trái ca cao. Vỏ trái ca cao được thủy phân bằng dung dịch acid HCl nồng độ 0,75 M ở 90°C trong thời gian 8 giờ và dịch thủy phân thu được có 8,62% (w/v) glucose [3]. 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 dichromate được trữ trong chai nâu, giữ kín bằng paraffin và trữ ở nhiệt độ 4-5°C.

B. Phương pháp nghiên cứu

1) Khảo sát ảnh hưởng của giá thể thân sậy đến quá trình lên men ethanol

Thí nghiệm nhằm đánh giá ảnh hưởng của giá thể trong quá trình lên men, ba chủng nấm men thử nghiệm là *S. cerevisiae* YM5C, BVK2, VLK06 và 2.1. Giá thể thân sậy hình trụ có kích thước khoảng 9×130 mm và được sấy khô đến khối lượng không đổi trong 3 ngày ở 70°C. Bố trí thí nghiệm một nhân tố với số lượng giá thể lần lượt là 0, 1 và 2. Kết thúc thí nghiệm, xác định hàm lượng ethanol và hàm lượng đường khử để tính hiệu suất tiêu thụ đường.

2) Khảo sát ảnh hưởng của loại nấm men và mật số giống chủng

Thí nghiệm gồm 2 nhân tố với 3 lần lặp lại, trong đó nhân tố loại nấm men là 4 chủng *S.*



Hình 1: Giá thể thân sậy ở dạng thẳng

cerevisiae (YM5C, BVK2, VLK06 và 2.1) và nhân tố mật số giống chủng có 4 mức độ (10², 10⁴, 10⁶ và 10⁷ tế bào/mL). Nấm men được nuôi cấy trên môi trường YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose). Chủng 1 mL dung dịch nấm men vào 99 mL dịch thủy phân vỏ ca cao trong bình tam giác 250 mL đã được thanh trùng bằng NaHSO₃ (140 mg/L) trong 30 phút. Ủ trong điều kiện kỵ khí (đậy bằng water-lock) ở nhiệt độ (30-32°C) trong 5 ngày, thu mẫu và xác định hàm lượng ethanol.

3) Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ, pH và thời gian lên men

Mục đích của thí nghiệm là xác định nhiệt độ, pH ban đầu và thời gian thích hợp cho quá trình lên men. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 nhân tố và 3 lần lặp lại. Nhân tố nhiệt độ lên men có 3 mức độ (25°C, 30-32°C và 37°C), nhân tố pH ban đầu có 4 mức độ (4,5; 5,0; 5,5 và 6,0) và thời gian lên men có 3 mức độ (5, 7 và 9 ngày). pH được điều chỉnh bằng acid citric 10% (w/v). Dịch thủy phân vỏ ca cao có hàm lượng đường khử là 8,62% (w/v), lên men với 100 mL dung dịch trong bình tam giác 250 mL được thanh trùng bằng NaHSO₃ (140 mg/L) trong 30 phút. Chủng giống 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, pH và thời gian lên men theo bố trí thí nghiệm.

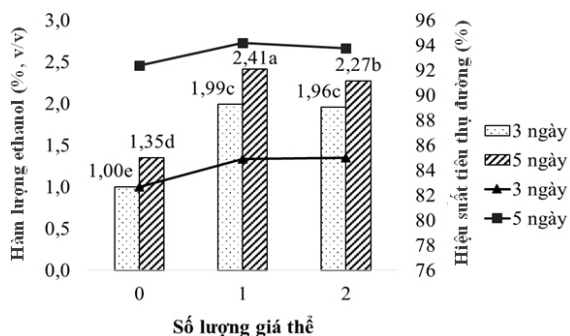
4) Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

Hàm lượng đường khử được phân tích thông qua phản ứng với acid dinitrosalicylic (phương pháp DNS) [4]. Hàm lượng ethanol được xác định bằng thuốc thử dichromate [5]. Kết quả phân tích ANOVA và kiểm định LSD sử dụng phép thử Duncan bằng phần mềm thống kê Statgraphics Centurion XV (Manugistics Inc., USA).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

A. Ảnh hưởng của giá thể thân sậy đến quá trình lên men ethanol

Lượng ethanol tạo thành khi bổ sung 1 và 2 giá thể so với đối chứng (không có giá thể) được khảo sát sau 3 và 5 ngày lên men. Nồng độ ethanol được tính toán dựa theo phương trình đường chuẩn ethanol từ 1-6% (v/v). Kết quả lên men với chủng nấm men *S. cerevisiae* YM5C được thể hiện ở Hình 2. Kết quả cho thấy việc



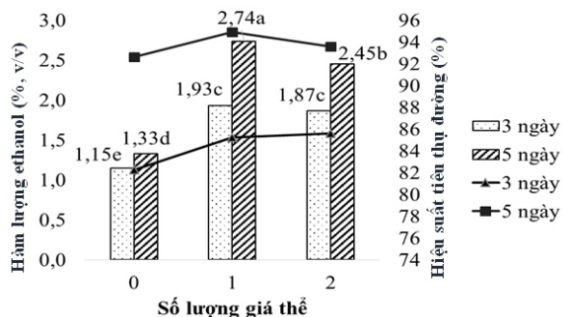
Hình 2: Nồng độ ethanol và hiệu suất tiêu thụ đường của chủng YM5C

Các chữ cái giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức độ tin cậy 95%

bổ sung 1 giá thể làm tăng lượng ethanol gấp 2 lần sau 3 ngày và 1,8 lần sau 5 ngày lên men so với đối chứng. Tuy nhiên, khi tăng lượng giá thể lên 2 và tiến hành ủ lactic trong 5 ngày với cùng điều kiện thì kết quả nồng độ ethanol thu được lại thấp hơn so với khi ủ với 1 giá thể. Bên cạnh đó, hiệu suất tiêu thụ đường đạt cao nhất sau 5 ngày lên men với 1 giá thể và đạt thấp nhất khi không bổ sung giá thể nào chứng tỏ việc bổ sung 1 giá thể làm tăng khả năng tiếp xúc với nguồn dinh dưỡng của chủng YM5C và tăng khả năng lên men ethanol. Kết quả phù hợp với nghiên cứu của Najafpour et al. [6], theo đó giá thể có tác dụng tích cực trong việc cố định nấm men, tăng khả năng tiếp xúc của tế bào đối với nguồn dinh dưỡng trong môi trường và do đó làm tăng khả năng lên men.

Đối với chủng BVK2, hàm lượng ethanol tạo thành sau 3 và 5 ngày lên men có bổ sung 1 giá thể lần lượt cao gấp 1,8 và 2,1 lần so với đối chứng (Hình 3). Tuy nhiên, sau 5 ngày lên men,

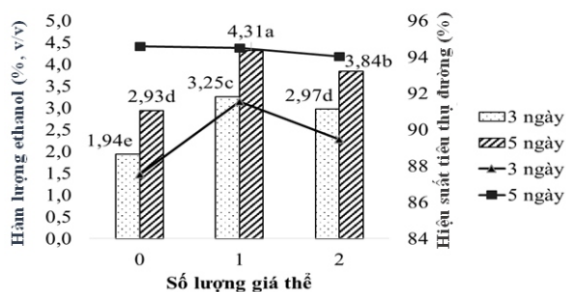
hàm lượng ethanol thu được khi bổ sung 1 giá thể cao hơn so với khi bổ sung 2 giá thể, điều này cũng xảy ra tương tự khi lên men với chủng VLK06 và chủng 2.1. Kết quả lên men với chủng



Hình 3: Nồng độ ethanol sinh ra và hiệu suất tiêu thụ glucose của chủng BVK2

Các chữ cái giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức độ tin cậy 95%

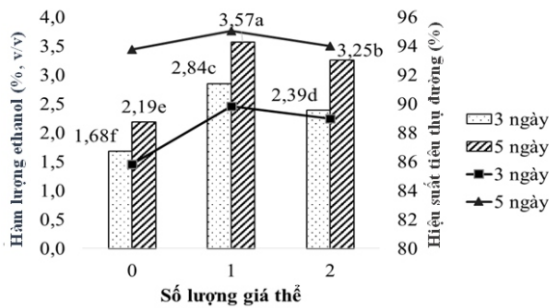
VLK06 và 2.1 được trình bày lần lượt ở Hình 4 và Hình 5. Tương tự với kết quả lên men khi



Hình 4: Nồng độ ethanol và hiệu suất tiêu thụ đường của chủng VLK06

Các chữ cái giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức độ tin cậy 95%

sử dụng chủng nấm men *S. cerevisiae* YM5C và BVK2, hàm lượng ethanol sinh ra sau 3 ngày khi bổ sung 2 giá thể ở chủng VLK06 và 2.1 đều thấp hơn về mặt thống kê ở độ tin cậy 95% so với khi bổ sung 1 giá thể. Kết quả cho thấy đối với cả 4 chủng nấm men thử nghiệm, hiệu quả sản sinh ethanol của việc bổ sung 1 giá thể cao hơn 2 giá thể. Mục tiêu của việc sử dụng giá thể nhằm tạo điều kiện để cố định tế bào nấm men và có thể dễ dàng tái sử dụng lại nấm men, tăng lượng giá



Hình 5: Nồng độ ethanol và hiệu suất tiêu thụ đường của chủng 2.1

Các chữ cái giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức độ tin cậy 95%

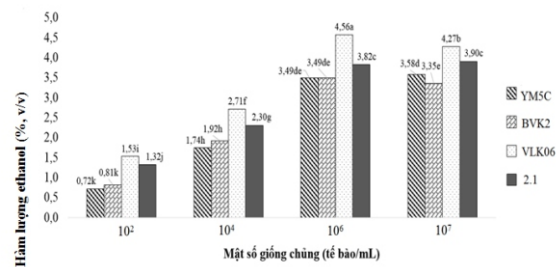
thể sẽ tạo điều kiện tăng bề mặt cho nấm men cố định. Tuy nhiên, do đặc tính của môi trường với hàm lượng đường ban đầu thấp (8,62% w/v) nên khi nấm men tăng sinh khối nhiều hơn sẽ tiêu tốn lượng đường để sản xuất ethanol.

B. Ảnh hưởng của loại nấm men và mật số giống chủng

Hàm lượng ethanol sinh ra sau 5 ngày của 4 chủng nấm men (YM5C, BVK2, VLK06 và 2.1) với 4 mức độ mật số giống chủng (10^2 , 10^4 , 10^6 và 10^7 tế bào/mL) được thể hiện trong Hình 5. Kết quả cho thấy với mật số nấm men ban đầu là 10^2 và 10^4 tế bào/mL không đủ để quá trình lên men ethanol có thể diễn ra một cách hiệu quả. Vì hệ khảo sát là hệ kín nên mật số giống chủng càng thấp thì nấm men càng dành nhiều thời gian và dinh dưỡng hơn cho pha sinh trưởng [7]; điều này dẫn tới việc lượng ethanol sinh ra rất thấp (0,72-1,53% v/v) ứng với mật số giống chủng 10^2 tế bào/mL, thấp hơn 1,8-2 lần so với mật số giống chủng 10^4 tế bào/mL (1,74-2,71% v/v) và 3-5 lần so với mật số giống chủng 10^6 tế bào/mL (3,49-4,56% v/v).

Như vậy, khi mật số nấm men ban đầu tăng lên, nồng độ ethanol tạo thành tăng và do đó hiệu suất của quá trình lên men cũng tăng tương ứng. Tuy nhiên, điều này chỉ đúng với một khoảng nhất định, kết quả thử nghiệm cho thấy ở mật số giống chủng 10^7 tb/mL, hàm lượng ethanol sinh ra không những không tăng thêm mà còn có xu hướng thấp hơn so với mật số giống chủng 10^6

tb/mL. Cụ thể với chủng *S. cerevisiae* VLK06, hàm lượng ethanol giảm khác biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%, từ 4,56% (v/v) giảm xuống còn 4,27% (v/v) (Hình 6). Điều này được giải thích là với mật số nấm men cao và hàm lượng glucose ban đầu thấp (8,62% w/v) nên phần lớn đường được sử dụng để gia tăng sinh khối, làm hiệu suất sản sinh ethanol không tăng nữa. Tóm



Hình 6: Hàm lượng ethanol sinh ra theo loại nấm men và mật số giống chủng

Các chữ cái giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức độ tin cậy 95%

lại, từ kết quả thí nghiệm này, chủng nấm men VLK06 (hàm lượng ethanol đạt cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% so với các chủng còn lại ở tất cả các nồng độ khảo sát) với mật số giống chủng là 10^6 tế bào/mL được chọn cho thử nghiệm tiếp theo.

C. Ảnh hưởng của nhiệt độ, pH và thời gian đến quá trình lên men ethanol

Ảnh hưởng của nhiệt độ, pH và thời gian lên men đến hàm lượng ethanol thu được và hiệu suất tiêu thụ đường được tổng hợp ở Bảng 1. Nhiệt độ lên men không có sự khác biệt rõ giữa các nghiệm thức, hầu hết nấm men đều có thể phát triển lên men tốt trong khoảng nhiệt độ 28-32°C (Lương Đức Phẩm [8]). Do đó, các nghiệm thức với khoảng nhiệt độ bố trí trong điều kiện môi trường tự nhiên (30-32°C) sẽ thuận lợi cho việc thử nghiệm ở điều kiện thực tiễn. Kết quả phân tích thống kê cho thấy ảnh hưởng của pH đến sự thay đổi hiệu suất lên men ethanol là có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%. Theo Pampulha et al. [9], pH ảnh hưởng lớn đến hoạt tính của nấm men, có khả năng làm thay đổi điện tích các chất của vỏ tế bào, làm tăng hoặc giảm mức độ thẩm thấu

Bảng 1. Ảnh hưởng tương tác của nhiệt độ, pH và thời gian đến quá trình lên men

STT	Nhân tố			Chỉ tiêu theo dõi		
	Thời gian (ngày)	Nhiệt độ (°C)	pH	Ethanol ở 20°C (% v/v)	pH	Hiệu suất (%)
1	5	25	4,5	3,13 ^o	4,39	93,29 ^o
2	5	25	5,0	3,50 ^k	4,72	93,00 ^p
3	5	25	5,5	3,92 ⁱ	5,26	94,57 ^l
4	5	25	6,0	2,56 ^t	5,84	93,00 ^p
5	5	30-32	4,5	4,20 ^h	4,36	94,57 ^{lm}
6	5	30-32	5,0	4,53 ^f	4,52	94,71 ^k
7	5	30-32	5,5	4,82 ^d	5,11	95,29 ^j
8	5	30-32	6,0	3,44 ^{kl}	5,71	94,43 ^m
9	5	37	4,5	2,32 ^o	4,38	92,00 ^r
10	5	37	5,0	2,85 ^{qr}	4,73	92,43 ^q
11	5	25	5,5	2,97 ^p	5,25	94,29 ⁿ
12	5	25	6,0	1,83 ^w	5,82	90,86 ^s
13	5	25	4,5	2,86 ^q	4,30	97,14 ^g
14	5	25	5,0	4,38 ^g	4,55	97,00 ^h
15	5	25	5,5	4,55 ^{ef}	5,22	97,43 ^e
16	5	25	6,0	4,14 ^h	5,76	97,00 ^h
17	5	30-32	4,5	3,31 ⁿ	4,32	97,29 ^f
18	5	30-32	5,0	4,98 ^c	4,36	97,29 ^f
19	5	30-32	5,5	5,28 ^a	5,09	97,71 ^d
20	5	30-32	6,0	4,62 ^e	5,52	97,29 ^f
21	5	37	4,5	2,37 ^u	4,28	96,86 ⁱ
22	5	37	5,0	3,33 ^{mn}	4,51	97,00 ^h
23	5	37	5,5	3,86 ⁱ	5,19	97,43 ^e
24	5	37	6,0	3,41 ^l	5,57	96,86 ⁱ
25	5	25	4,5	2,70 ^s	4,26	98,57 ^c
26	5	25	5,5	3,91 ⁱ	4,27	98,57 ^c
27	5	25	6,0	4,15 ^h	5,13	98,71 ^b
28	5	25	6,5	3,75 ^j	5,72	98,57 ^c
29	5	30-32	4,5	3,39 ^{lm}	4,19	98,71 ^b
30	5	30-32	5,0	4,51 ^f	4,30	98,71 ^b
31	5	30-32	5,5	5,12 ^b	5,06	98,86 ^a
32	5	30-32	6,0	4,78 ^d	5,46	98,71 ^b
33	5	37	4,5	1,97 ^v	4,26	98,57 ^c
34	5	37	5,0	2,85 ^q	4,26	98,57 ^c
35	5	37	5,5	3,3 ^{ln}	5,13	98,71 ^b
36	5	37	6,0	2,78 ^r	5,53	98,57 ^c

Giải thích: 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%.

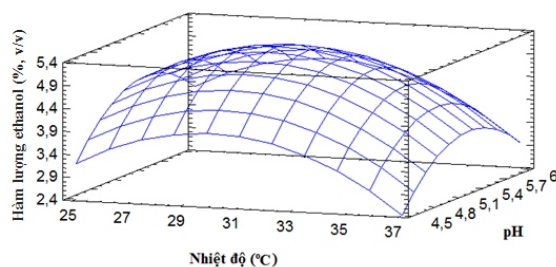
các chất dinh dưỡng và chiều hướng lên men. Nếu pH trong khoảng 4,5-5,5 thì quá trình lên men ethanol diễn ra bình thường. Xét về nhân tố thời gian, nhìn chung tất cả các nghiệm thức đều cho kết quả nồng độ ethanol sinh ra tăng lên sau 7 ngày lên men và giảm nhẹ trong 2 ngày sau đó và kết quả thống kê theo nhân tố này cũng thể hiện điều tương tự.

Các số liệu kết quả thí nghiệm được phân tích để tìm ra phương trình hồi quy đa biến bằng

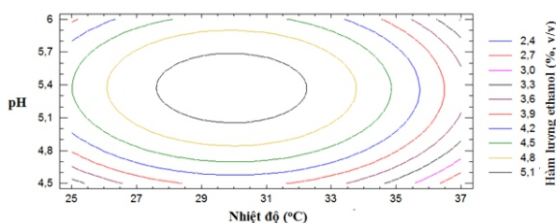
chương trình thống kê Statgraphics và nghiệm thức tốt nhất cho quy trình lên men ethanol có thể được tính toán theo phương trình:

$$A = -66,8788 + 1,85342 * X - 0,131579 * Y + 15,9554 * Y^2 - 0,0320047 * X * X + 0,0135837 * X * Y - 0,113475 * Y * Y + 0,352005 * Y * Y^2 - 0,00297367 * X * Y * Y$$

Trong đó, A (nồng độ ethanol sinh ra, % v/v), X (nhiệt độ, 25-37°C) và Y (pH, 4,5-6,0). Dựa theo phương trình hồi quy đa biến được thiết lập theo các nhân tố trên, đồ thị bề mặt đáp ứng có dạng hình vòm (Hình 7) và đồ thị đường mức có tâm được xác định (Hình 8) theo nhân tố nhiệt độ (X) và pH (Y).



Hình 7: Đồ thị bề mặt đáp ứng biểu diễn nồng độ ethanol theo nhiệt độ và pH



Hình 8: Đồ thị đường mức biểu diễn nồng độ ethanol theo nhiệt độ và pH

Từ phương trình hồi quy lấy đạo hàm theo từng biến số X và Y, cho thấy hàm lượng ethanol cao nhất được xác định là 5,27% (v/v) ở nhiệt độ 30°C và pH ban đầu 5,38.

Như vậy, các điều kiện thích hợp cho quy trình lên men ethanol từ dịch thủy phân vỏ trái ca cao được xác định với chủng nấm men *S. cerevisiae* VLK06 là mật số giống chủng 10^6 tế bào/mL, nhiệt độ 30°C, pH ban đầu 5,38 và thời gian lên men 7 ngày.

IV. KẾT LUẬN

Kết quả lên men dịch thủy phân từ vỏ trái ca cao bằng chủng nấm men *S. cerevisiae* VLK06 với mật số giống chủng là 10^6 tế bào/mL ở nhiệt độ 30°C và pH ban đầu 5,38 trong 7 ngày thu được 5,27% (v/v) ethanol. Kết quả cho thấy triển vọng ứng dụng nguồn phế phẩm là vỏ trái ca cao trong sản xuất ethanol sinh học và có thể góp phần giảm lượng phế thải ra môi trường trong quá trình sản xuất nông nghiệp.

V. 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 (Core-to-Core Program).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Kulkarni M K, Kininge P T, Ghasghase N V, Mathapati P R, Joshi S S. Effect of additives on alcohol production and kinetic studies of *S. cerevisiae* for sugar cane wine production. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*. 2011;2(1):154–158.
- [2] Samah O A, Sias S, Hua Y G, Hussin N N. Production of ethanol from cocoa pod hydrolysateation in a immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *ITB Journal of Science*. 2011;43(2):87–94.
- [3] Phạm Thiếu Quân, Lê Thị Vân An, Phan Lê Bảo Ngọc, Trần Hải My, Nguyễn Ngọc Thanh, Huỳnh Xuân Phong. *Nghiên cứu khả năng thủy phân và điều kiện lên men sản xuất ethanol sinh học từ vỏ trái ca cao*; 2013. Đề tài nghiên cứu khoa học cấp cơ sở, Trường Đại học Cần Thơ.
- [4] Tasun K, Chose P, Ghen K. Sugar determination of DNS method. *Biotechnology and Bioengineering*. 2011;12:921.
- [5] Bennett C. Spectrophotometric acid dichromate method for the determination of ethyl alcohol. *The American Journal of Medical Technology*. 1971;37(6):217.
- [6] Najafpour G, Younesi H, Ismail K S K. Ethanol fermentation in a immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*. 2004;92:251–260.
- [7] Galazzo J L, Bailey J E. Fermentation pathway kinetics and metabolic flux control in suspended and immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*. 1990;12(3):162–172.
- [8] Lương Đức Phẩm. *Nấm men công nghiệp*. Hà Nội: Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật; 2009.
- [9] Pampulha M E, Loureiro-Dias M C. Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1989;31(5):547–550.