

NGHIÊN CỨU QUÁ TRÌNH CHUYỂN HÓA SINH KHỐI RONG LỤC NƯỚC NGỌT THÀNH ĐƯỜNG CÓ THỂ LÊN MEN BẰNG ENZYME

Nguyễn Thị Liên, Nguyễn Thanh Tuyền
Trường Đại học Thủ Dầu Một

TÓM TẮT

Đề tài sẽ đề xuất một quy trình mới nhằm chuyển hóa các loại rong lục là nguồn nguyên liệu chứa ít thành phần lignin thành đường có thể lên men tạo cồn, với nhiều ưu điểm hơn so với quy trình sản xuất nhiên liệu sinh học từ nguyên liệu lignocellulose thông thường. Qua nghiên cứu, chúng tôi đã đưa ra các điều kiện tối ưu cho quá trình tiền xử lý rong lục bằng acid và quá trình thủy phân rong lục bằng enzyme cellulase với hiệu suất thủy phân là 43,58% (288.54mg/g).

Từ khóa: rong lục, enzyme cellulase, tiền xử lý, đường hóa, enzyme

1. Giới thiệu

Ở Việt Nam, quá trình đô thị hóa cùng với sự phát triển các ngành nghề kinh tế, dịch vụ du lịch, giao thông vận tải thủy, sản xuất nông nghiệp, nuôi trồng thủy sản... gây ra sức ép lớn đối với môi trường nước. Khi hàm lượng các chất dinh dưỡng trong nước tăng cao sẽ gây ra hiện tượng phú dưỡng, làm bùng phát các loại thực vật như rong, tảo, dẫn đến hàm lượng oxy trong nước giảm, gây chết các loài thủy sinh. Đồng thời sự phân hủy của chúng làm cho nước có mùi hôi, ảnh hưởng đến chất lượng cuộc sống của khu vực. Vì vậy, việc thu gom rong, tảo góp phần giảm thiểu ô nhiễm môi trường đồng thời biến chúng trở thành nguồn nguyên liệu có giá trị cho quá trình sản xuất nhiên liệu sinh học[8].

Xuất phát từ lý do trên, chúng tôi tiến hành sử dụng nguồn sinh khối rong để thủy phân thành đường có thể lên men tạo cồn, làm cơ sở để nghiên cứu sản xuất nhiên liệu sinh học thân thiện với môi trường. Đây là

nguồn nguyên liệu tự nhiên dồi dào, không cạnh tranh với cây lương thực, không chiếm diện tích đất canh tác đã được chú ý đến như là một trong những giải pháp phù hợp nhất trong bối cảnh thiếu hụt nguồn nguyên liệu cho việc sản xuất ethanol. Sau khi rong được trích ly protein thì hàm lượng carbohydrate trong bã rong tăng lên đến 65 – 70% w/w. Điều này cho thấy bã rong là nguồn nguyên liệu thích hợp cho quá trình chuyển hóa sinh khối thành đường và lên men ethanol [8].

2. Đối tượng, phương pháp nghiên cứu

Đối tượng: Rong lục (*Ceratophyllum* sp.) sử dụng được lấy từ các ao hồ, sông suối, kênh, rạch, cống ở những khu vực có hiện tượng phú dưỡng như Thủ Dầu Một (Bình Dương), Củ Chi (TP.HCM) được rửa sạch, phơi khô dưới ánh nắng mặt trời và xay nhỏ. Rong được xay nhỏ được cho vào tủ sấy (mẫu được sấy khô ở 105°C trong 5 tiếng), để nguội đóng gói (ở nhiệt độ phòng) được dùng để sử dụng cho các thí nghiệm.

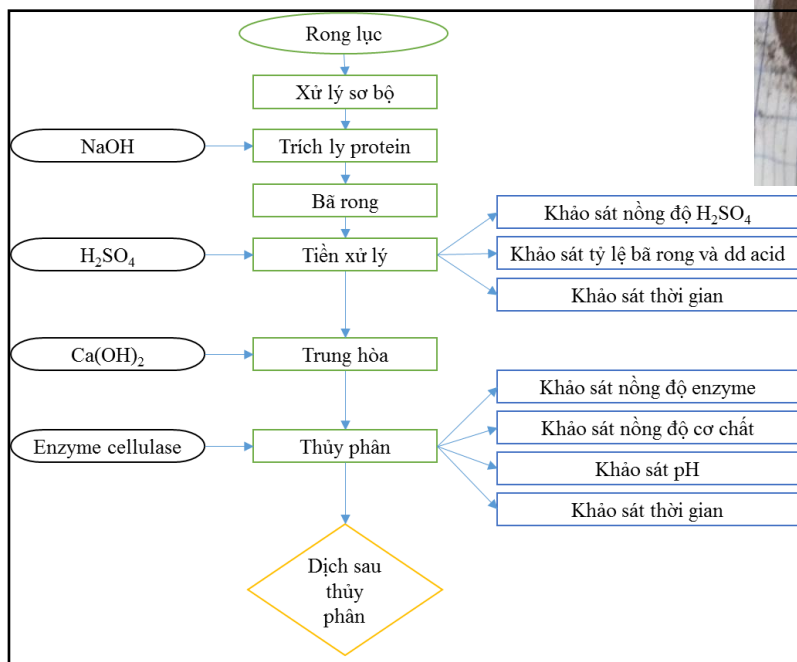
2.2. Phương pháp nghiên cứu

Quá trình nghiên cứu tiến hành theo sơ đồ hình 2.

Hình 1: Rong lục xay nhỏ, sấy khô



Hình 2. Sơ đồ thực nghiệm



Trích ly protein từ rong: Sử dụng dung môi NaOH 1%; tỉ lệ NaOH : rong là 4:1 [7]. Sau trích ly tiến hành lọc lấy bã rong để sử dụng cho những thí nghiệm tiếp theo.

Xác định hàm lượng carbohydrate tổng trong rong và bã rong: Chuẩn bị mẫu: Mẫu rong và bã rong được sấy đến khối lượng không đổi ở 105°C. Acid hóa carbohydrate thành đường khử: Cân chính xác 300 mg mẫu khô tuyệt đối vào chai thủy tinh chịu nhiệt. Thêm vào 3ml dung dịch H₂SO₄ 72%, đậy nắp chai, lắc đều, để yên ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sau 30 phút, thêm vào mẫu thử 50ml nước cất để đạt được nồng độ H₂SO₄ là 4%, lắc đều. Hấp mẫu ở 121°C trong 60 phút. Đo hàm lượng đường khử tạo thành: Làm nguội mẫu sau khi hấp về nhiệt độ phòng. Lấy mẫu, pha

loãng với nồng độ thích hợp và đo đường khử ở bước sóng OD_{540nm}. Mục tiêu: xác định hàm lượng carbohydrate tổng trong rong và bã rong; so sánh hàm lượng carbohydrate tổng có trong mẫu rong chưa trích ly protein và mẫu đã trích ly protein.

Nghiên cứu quá trình tiền xử lý rong lục bằng H₂SO₄ loãng: Chuẩn bị khối lượng mẫu 4g được sử dụng cho mỗi nghiệm thức (mẫu được sấy khô ở 105°C đến khối lượng không đổi trước khi tiến hành thí nghiệm). Mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần.

Khảo sát nồng độ tác nhân hóa học tiền xử lý: Thông số cố định: tỷ lệ bã rong và dung dịch H₂SO₄: 12,5% w/v, nhiệt độ: 120°C, thời gian: 30 phút. Thông số khảo sát: thay đổi nồng độ H₂SO₄ lần lượt là 0; 1; 1,25; 1,5; 1,75; 2 % w/v. Đo hàm lượng

đường khử tạo thành: Làm nguội mẫu sau khi hấp về nhiệt độ phòng. Tiến hành lọc, sau đó pha loãng 10 lần và đo đường khử ở bước sóng OD_{540nm}.

Khảo sát tỷ lệ bã rong và dung dịch H₂SO₄: Thông số cố định: nồng độ H₂SO₄ kết quả thu được từ quá trình khảo sát nồng độ tác nhân hóa học tiền xử lý, nhiệt độ 120⁰C, thời gian 30 phút. Thông số khảo sát: tỷ lệ bã rong và dung dịch H₂SO₄ thay đổi lần lượt là 5; 7,5; 10; 12,5; 15 % w/v. Đo hàm lượng đường khử tạo thành: Làm nguội mẫu sau khi hấp về nhiệt độ phòng. Tiến hành lọc, sau đó pha loãng 10 lần và đo đường khử ở bước sóng OD_{540nm}.

Khảo sát thời gian tiền xử lý: Thông số cố định: Nồng độ H₂SO₄ kết quả thu được từ quá trình khảo sát nồng độ tác nhân hóa học tiền xử lý; tỷ lệ bã rong và dung dịch H₂SO₄ kết quả thu được từ quá trình khảo sát tỷ lệ bã rong và dung dịch H₂SO₄; nhiệt độ: 120⁰C. Thông số khảo sát: thay đổi thời gian tiền xử lý lần lượt là 15; 30; 45; 60; 75 phút. Đo hàm lượng đường khử tạo thành: Làm nguội mẫu sau khi hấp về nhiệt độ phòng. Tiến hành lọc, sau đó pha loãng 10 lần và đo đường khử ở bước sóng OD_{540nm}.

Nghiên cứu quá trình đường hóa bã rong bằng enzyme cellulase (Cellulase của Trung Quốc): Chuẩn bị: Mẫu đã qua tiền xử lý với các điều kiện tối ưu đã khảo sát được tiếp tục được đường hóa bằng enzyme cellulase.

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ enzyme cellulase: Thông số cố định pH = 4,8, nhiệt độ 50⁰C, thời gian phản ứng 40 giờ. nồng độ cơ chất 10% w/v. Thông số khảo sát: thay đổi nồng độ enzyme lần lượt là 5%, 10%, 15%, 20%, 25% w/w. Đo hàm lượng đường khử tạo thành: Làm nguội mẫu sau khi hấp về nhiệt độ phòng. Tiến hành lọc, sau đó pha loãng 10 lần và đo đường khử ở bước sóng OD_{540nm}.

hành lọc, sau đó pha loãng 10 lần và đo đường khử ở bước sóng OD_{540nm}.

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ cơ chất: Thông số cố định: pH = 4,8, nhiệt độ 50⁰C, thời gian phản ứng 40 giờ, nồng độ enzyme – kết quả thu được từ quá trình khảo sát ảnh hưởng của nồng độ enzyme cellulase. Thông số khảo sát: thay đổi nồng độ cơ chất lần lượt là 2,5%; 5%; 7,5%; 10%; 12,5% w/v. Đo hàm lượng đường khử tạo thành: Làm nguội mẫu sau khi hấp về nhiệt độ phòng. Tiến hành lọc, sau đó pha loãng 10 lần và đo đường khử ở bước sóng OD_{540nm}.

Khảo sát ảnh hưởng của pH: Thông số cố định: nhiệt độ: 50⁰C, thời gian phản ứng 40h, nồng độ enzyme – kết quả thu được từ quá trình khảo sát ảnh hưởng của nồng độ enzyme cellulase, nồng độ cơ chất – kết quả thu được từ quá trình khảo sát ảnh hưởng của nồng độ cơ chất. Thông số khảo sát: thay đổi pH của quá trình thủy phân lần lượt là 4,2; 4,5; 4,8; 5,1; 5,4. Đo hàm lượng đường khử tạo thành: Làm nguội mẫu sau khi hấp về nhiệt độ phòng. Tiến hành lọc, sau đó pha loãng 10 lần và đo đường khử ở bước sóng OD_{540nm}.

Khảo sát thời gian quá trình thủy phân: Thông số cố định: nồng độ enzyme – kết quả thu được từ quá trình khảo sát ảnh hưởng của nồng độ enzyme cellulase, nồng độ cơ chất – kết quả thu được từ quá trình khảo sát ảnh hưởng của nồng độ cơ chất, pH – kết quả thu được từ quá trình khảo sát ảnh hưởng của pH, nhiệt độ thủy phân 50%. Thông số khảo sát: thời gian của quá trình thủy phân lần lượt là 0; 21; 45; 65; 70 giờ. Đo hàm lượng đường khử tạo thành: Làm nguội mẫu sau khi hấp về nhiệt độ phòng. Tiến hành lọc, sau đó pha loãng 10 lần và đo đường khử ở bước sóng OD_{540nm}.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân tích carbohydrate tổng

Phân tích carbohydrate tổng

Bảng 1. Kết quả phân tích carbohydrate tổng của rong lục

Nguyên liệu	Thành phần carbohydrate (%w/w trọng lượng khô)
Rong	27,40% ± 0,0084
Bã rong	66,21% ± 0,0014

Nhận xét: Sau quá trình trích ly protein, thành phần carbohydrate có sự biến đổi sâu sắc. Đối với bã rong thành phần carbohydrate chiếm 66,21% gấp 2,4 lần so với rong chưa qua trích ly protein. Vì vậy, bã rong là nguồn nguyên liệu thích hợp cho quá trình thủy phân thành đường có thể lên men với hiệu quả cao. Bên cạnh đó, còn tận dụng protein trích ly được làm nguồn nguyên liệu cho những nghiên cứu sau này nhằm sử dụng lượng protein này k làm nguồn đạm bổ sung vào thức ăn chăn nuôi.

3.2. Kết quả tìm điều kiện tối ưu cho quá trình tiền xử lý bã rong

Khảo sát nồng độ tác nhân hóa học tiền xử lý

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ acid H_2SO_4 đến lượng đường khử thu được

Stt	Nồng độ acid H_2SO_4 (% w/v)	Nồng độ đường khử (g/l)
1	1	1,29±0,0003
2	1,25	1,34±0,0178
3	1,5	1,97±0,0069
4	1,75	3,24±0,0829
5	2	3,21±0,0552

Nhận xét: Acid có vai trò làm trương nở cellulose, thủy phân liên kết glycoside trong các phân tử carbohydrate, thủy phân một phần hemicellulose và tăng độ xốp của cơ chất. Sử dụng nồng độ acid cao thì thu được lượng đường khử cao, tuy nhiên chỉ

đến một giới hạn nhất định. Nếu nồng độ acid tăng cao hơn mức giới hạn thì đường khử sẽ bị phá hủy. Kết quả khảo sát đã cho thấy tại nồng độ acid 1,75% w/v thì cho lượng đường khử cao nhất vì vậy đây là thông số phù hợp cho quá trình tiền xử lý.

Khảo sát tỷ lệ bã rong và dung dịch H_2SO_4

Bảng 3. Ảnh hưởng của tỷ lệ bã rong và dung dịch H_2SO_4 đến lượng đường khử thu được

Stt	Tỷ lệ bã rong và dung dịch acid (% w/v)	Nồng độ đường khử (g/l)
1	5	1,56±0,0005
2	7,5	2,31±0,004
3	10	2,78±0,0069
4	12,5	3,20±0,0027
5	15	2,07±0,0034

Nhận xét: Nồng độ đường khử tăng khi tỷ lệ nguyên liệu và acid tăng. Tuy nhiên, khi tỷ lệ này tăng quá cao thì acid sẽ bị bão hòa làm khả năng tác động của acid lên nguyên liệu giảm, ảnh hưởng tới lượng đường khử tạo thành. Kết quả cho thấy khi tỷ lệ này là 12,5% thì nồng độ đường khử thu được là cao nhất (3,20 g/l). Vì vậy, tỷ lệ bã rong và dung dịch H_2SO_4 12,5% w/v là thông số tối ưu cho quá trình tiền xử lý.

Khảo sát thời gian tiền xử lý

Bảng 4. Ảnh hưởng của thời gian tiền xử lý đến lượng đường khử thu được

Stt	Thời gian (phút)	Nồng độ đường khử (g/l)
1	15	1,85±0,005
2	30	3,32±0,005
3	45	6,59±0,038
4	60	9,67±0,008
5	75	9,3±0,004

Nhận xét: Khi thời gian tiền xử lý càng tăng thì nồng độ đường khử tạo ra càng nhiều. Tuy nhiên nếu thời gian quá dài sẽ làm cho lượng đường khử tạo thành bị phân hủy một phần. Do đó, 60 phút là khoảng thời gian phù hợp cho quá trình tiền xử lý.

3.3. Kết quả khảo sát quá trình đường hóa bã rong bằng enzyme cellulase

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ enzyme cellulase

Bảng 5. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme đến lượng đường khử thu được

Stt	Nồng độ enzyme (% w/w)	Nồng độ đường khử (g/l)
1	5	19,88±0,02
2	10	25,46±0,03
3	15	25,55±0,03
4	20	26,13±0,01
5	25	26,46±0,001

Nhận xét: Ở nồng độ enzyme cellulase thấp, lượng enzyme cho vào không đủ phản ứng. Khi tăng nồng độ enzyme, nồng độ đường khử tăng và đạt trạng thái bão hòa. Lượng đường khử thu được là 25,46 g/l ở nồng độ enzyme 10%, ở các điều kiện khảo sát tiếp theo thì hàm lượng đường khử tạo thành tăng thêm không đáng kể. Nếu tăng hàm lượng enzyme cao hơn nữa, không làm tăng nồng độ đường khử, gây lãng phí, làm cho giá thành sản phẩm tạo ra sau này tăng cao. Vì vậy, nồng độ enzyme 10% w/w sẽ là thông số phù hợp cho những thí nghiệm tiếp theo.

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ cơ chất

Bảng 6. Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất đến lượng đường khử thu được

Stt	Nồng độ cơ chất (% w/v)	Nồng độ đường khử (g/l)
1	2,5	5,13±0,02
2	5	7,92±0,0055
3	7,5	12,77±0,0024
4	10	26,22±0,0082
5	12,5	22,39±0,0341

Nhận xét: Khi nồng độ cơ chất tăng từ 5 đến 10%, hàm lượng đường khử thu được tăng. Tuy nhiên, khi nồng độ cơ chất là 12,5% thì lượng đường khử thu được giảm. Do khi nồng độ cơ chất cao, lượng cellulose

có thể bị tấn công bởi enzyme sẽ lớn và kết quả là lượng glucose, cellobiose hình thành trong dung dịch cao. Tuy nhiên, khi nồng độ này vượt qua mức giới hạn, enzyme sẽ bị bão hòa cơ chất, do đó khả năng tác động giảm, ảnh hưởng tới lượng glucose tạo thành. Mặt khác, dung dịch đậm đặc sẽ làm quá trình khuếch tán của enzyme trong toàn khối nguyên liệu trở nên khó khăn, phản ứng thủy phân diễn ra chậm.

Khảo sát ảnh hưởng của pH

Bảng 7. Ảnh hưởng của pH đến lượng đường khử thu được trong quá trình thủy phân

Stt	pH	Nồng độ đường khử (g/l)
1	4,2	21,44±0,008
2	4,5	23,53±0,0116
3	4,8	26,30±0,0113
4	5,1	18,65±0,0179
5	5,4	18,52±0,0232

Nhận xét: Khi pH tăng từ 4,2 đến 4,8 thì nồng độ đường khử thu được tăng nhưng khi pH tăng từ 4,8 đến 5,4 thì nồng độ đường khử thu được giảm. Do mỗi enzyme sẽ hoạt động tốt nhất ở một khoảng giá trị pH nhất định. Đối với enzyme cellulase, có thể thấy khoảng giá trị pH mà enzyme hoạt động tốt nhất là từ 4,5 – 4,8, trong đó pH 4,8 cho giá trị cao nhất với nồng độ đường khử tạo thành là 26,30 g/l. Khoảng pH hoạt động của enzyme rất có ý nghĩa với sản xuất công nghiệp vì trong quy mô công nghiệp, việc giữ pH ở một giá trị không đổi là rất khó khăn, vì vậy, việc đưa ra kết luận về một khoảng pH hoạt động sẽ giúp quá trình vận hành đơn giản hơn mà vẫn đạt được hiệu quả cao.

Khảo sát thời gian quá trình thủy phân

Bảng 8. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến lượng đường khử thu được

Stt	Thời gian (giờ)	Nồng độ đường khử (g/l)
1	0	18,34±0,0038
2	21	19,51±0,0542

3	45	27,07±0,0281
4	65	27,14±0,0224
5	70	27,19±0,0124

Nhận xét: Trong những giờ đầu tiên, lượng đường khử tạo thành ít. Từ 21 giờ trở lên, nồng độ đường khử tăng nhanh. Do cellulose và enzyme vẫn còn mới, các cấu trúc dễ bị tấn công của cellulose còn nhiều và không có chất ức chế hoạt tính của enzyme. Qua 45 giờ, nồng độ đường khử có xu hướng bão hòa do cellobiose và glucose tích tụ trong dung dịch gây ức chế enzyme, những phần cellulose dễ thủy phân đã hết. Mặt khác, hoạt tính enzyme đã bị giảm nhiều sau một thời gian tác động, một số enzyme bị nhốt trong cấu trúc xộp của cellulose. Vì vậy, thời gian tối ưu cho quá trình thủy phân là 45 giờ với nồng độ đường khử thu được là 27,07 g/l.

4. KẾT LUẬN

Việc thu gom rong, tảo từ các khu vực nước ô nhiễm hữu cơ vừa góp phần giảm thiểu ô nhiễm môi trường đồng thời vừa là nguồn nguyên liệu có giá trị cho quá trình sản xuất ethanol sinh học. Rong sau khi trích ly protein thì phần bã rong có hàm lượng carbohydrate cao gấp 2,4 lần so với rong ban đầu, sau quá trình tiền xử lý và thủy phân thì tạo ra ra được lượng đường khử 27,07g/l, tương ứng với hiệu suất thủy phân carbohydrate trong nguyên liệu là 43,58% (288.54mg/g). Kết quả này cao hơn so với công bố của Trivedi và ctv (2013) khi chuyển hóa sinh khối rong lục *Ulva fasciata* thành đường bằng enzyme thu được hàm lượng đường khử với hiệu suất là 206.82 mg/g [14]. Đây được xem là nguyên liệu thích hợp cho quá trình tạo ethanol sinh học.

STUDY ON THE TRANSFORMATION BIOMASS GREEN ALGAE LIVING IN FRESHWATER ECOSYSTEMS INTO FERMENTABLE SUGARS BY ENZYME

Nguyen Thi Lien, Nguyen Thanh Tuyen

ABSTRACT

We've launched a new process to transform biomass green algae raw materials contain less lignin into fermentable sugars to create alcohol. This process has many advantages over the production process of biofuels from lignocellulosic materials normally. Through research, we have found the optimal conditions for the pretreatment process green algae with acid and the hydrolysis by cellulase enzymes. The performance of hydrolysis was 43.58% (288.54mg/g).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Xuân Cự (2010), *Nghiên cứu khả năng thủy phân bằng acid loãng và bước đầu đánh giá hiệu quả sản xuất ethanol sinh học từ thân cây ngô*, Tạp chí Phát triển khoa học và công nghệ (VN-HCM), Khoa học tự nhiên và Công nghệ, tập 26, trang 211-216.
- [2] Nguyễn Hoài Hương (2009), *Giáo trình Thực hành hóa sinh*, Trường Đại học Kỹ Thuật Công Nghệ TP.HCM.
- [3] Lê Thanh Hải (2013), *Giáo trình Công nghệ protein*, Trường Cao đẳng Kinh tế Công nghệ TP.HCM.
- [4] Nguyễn Đức Lượng (2001), *Công nghệ enzyme*, NXB Đại học Quốc gia TP.HCM.
- [5] Trần Diệu Lý (2008), *Nghiên cứu sản xuất ethanol nhiên liệu từ rong rêu*, Luận văn cử nhân, Trường Đại học Bách Khoa (VNU-HCM).

- [6] Bạch Ngọc Minh (2013), *Sử dụng sóng siêu âm để cải thiện hiệu suất trích ly protein từ sinh khối rong biển*, Luận văn thạc sĩ, Trường Đại học Bách Khoa TP.HCM.
- [7] Nguyễn Thị Liên (2013), *Nghiên cứu quá trình lên men ethanol từ nguồn sinh khối rong nước lợ Chaetomorpha sp. sau trích ly protein*, Luận văn thạc sĩ, Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM.
- [8] Hoàng Minh Nam (2009), *Nghiên cứu công nghệ và thiết bị xử lý rom rạ bằng hơi nước để lên men ethanol*, Đề tài nghiên cứu khoa học Trường Đại học Bách Khoa (VNU-HCM), mã số B207-20-05-TĐ.
- [9] Akiko Isa, Yasufumi Mishima, Osamu Takimura and Tomoaki Minowa (2009), “*Preliminary Study on Ethanol Production by Using Macro Green Algae*”, Journal of the Japan Institute of Energy.
- [10] Luque-Garcia, J.L. and Luque de Castro, M.D. (2003), “*Ultrasound: a powerful tool for leaching*”, Trends in Analytical Chemistry, 22(1), 41-47.
- [11] Lonnie O. Ingram, Joy B.Doran (1995), *Conversion of cellulosic materials to ethanol*, FEMS Microbiology Reviews.
- [12] Harmsen P., Huijgen W., Bermudez L. and Bakker R. (2010), *Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass*, pp. 22-23.
- [13] Aizawa M., Asaoka K., Atsumi M., Sakou T. (2007), *Seaweed Bioethanol Production in Japan - The Ocean Sunrise Project*, Oceans 2007:1-5.
- [14] Trivedi N., Gupta V., Reddy C.R.K., Jha B. (2013), *Enzymatic hydrolysis and production of bioethanol from common macrophytic green alga Ulva fasciata Delile*, Bioresource Technology 150 (2013) 106–112.

- Ngày nhận bài: 16/02/2016
- Chấp nhận đăng: 31/03/2016