

Sử dụng enzyme lipase *Candida rugosa* làm xúc tác cho phản ứng tổng hợp biodiesel từ dầu cá tra (*Pangasius hypophthalmus*)

- Nguyễn Thị Tuyết Như
- Nguyễn Thị Nguyên
- Phan Ngọc Hòa

Trường Đại học Bách khoa, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 21 tháng 11 năm 2014, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 25 tháng 3 năm 2014)

TÓM TẮT

Enzyme lipase từ *Candida rugosa* (LCR) được sử dụng làm xúc tác cho phản ứng transester hóa dầu cá tra bằng methanol. Quá trình nghiên cứu gồm ba giai đoạn: xác định tính chất nguyên liệu và hoạt tính của enzyme từ *Candida rugosa*, transester hoá dầu cá tra bằng methanol với xúc tác enzyme lipase, đánh giá một số chỉ tiêu chất lượng của sản phẩm biodiesel thu được. Dầu cá tra có chứa 62% acid béo không bão hòa, chỉ số acid là 2,2 mg KOH/g. Enzyme lipase từ *Candida rugosa* có hoạt tính và hoạt tính riêng lần lượt là 1064 U/mg enzyme và 2782 U/mg protein. Các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất chuyển hóa thành methyl ester của các acid béo (fatty acid methyl ester – FAME) được khảo

sát bao gồm: tỷ lệ mol methanol/dầu cá, tỷ lệ enzyme cố định/dầu cá, nhiệt độ phản ứng, pH tối ưu của enzyme, hàm lượng đệm pH và thời gian phản ứng. Hiệu suất thu biodiesel đạt 92,65% khi tiến hành phản ứng với tỷ lệ methanol/dầu cá là 4:1, tỷ lệ enzyme là 2%, ở 40°C, bổ sung 10% dung dịch đệm pH 7 với thời gian phản ứng 96 giờ. Sản phẩm biodiesel thu được có thành phần FAME chiếm 98,94%; tỷ trọng ở 15°C là 0,8816 g/ml; không có nước và glycerine tự do, phù hợp với tiêu chuẩn biodiesel gốc (B100) (TCVN 7717:2007). Tuy nhiên chỉ số acid của sản phẩm là 1,7 mg KOH/g cao hơn giá trị cho phép của tiêu chuẩn là 0,5 mg KOH/g.

Từ khóa: Transester hóa, methanol phân, dầu cá tra, enzyme lipase, *Candida rugosa*.

1. MỞ ĐẦU

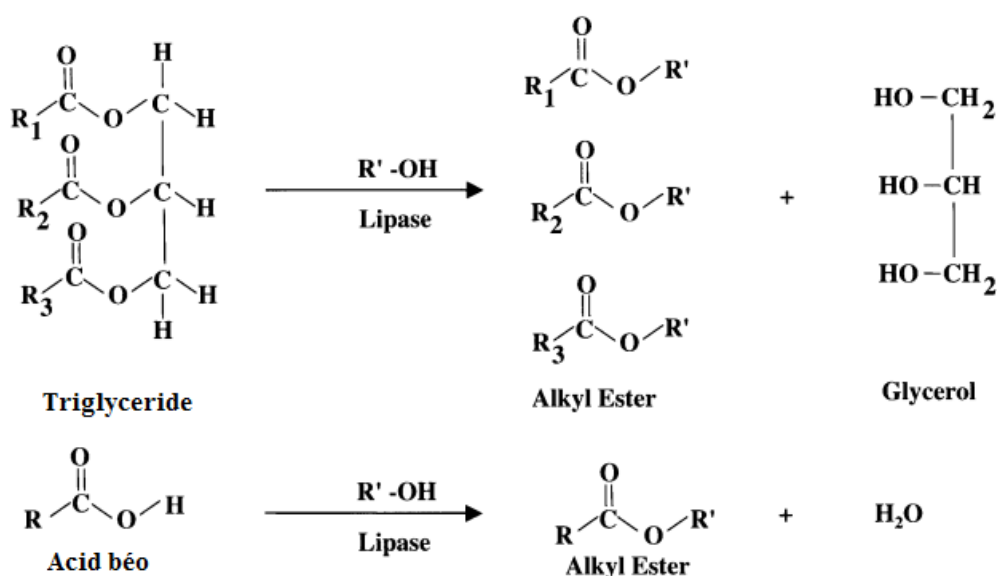
Trong bối cảnh nguồn năng lượng hóa thạch ngày càng cạn kiệt cũng như các mối lo ngại về môi trường (đặc biệt là hiệu ứng nhà kính) do các loại động cơ sử dụng các nhiên liệu từ các nguồn năng lượng này gây nên, nhiên liệu sinh học đang

ngày càng thu hút được sự quan tâm của các nhà nghiên cứu. Biodiesel được điều chế từ dẫn xuất từ một số loại dầu mỡ sinh học (dầu thực vật, mỡ động vật) thông qua quá trình transester hóa bằng cách cho phản ứng với các loại rượu mạch ngắn,

ví dụ: methanol, ethanol. Để tăng vận tốc phản ứng, dẫn tới tăng hiệu quả quá trình, người ta sử dụng các loại xúc tác đồng thể, dị thể hoặc các loại xúc tác sinh học. Xúc tác hóa học sử dụng kiềm cần nhiều giai đoạn xử lý mới thu được dầu diesel sinh học như: xử lý bột, tách glycerol, loại bỏ chất xúc tác và lượng nước thải kiềm khá lớn. Vì vậy, trên quan điểm về tiêu thụ năng lượng và bảo vệ môi trường, việc sử dụng xúc tác hóa học có những hạn chế. Trái lại, enzyme không tạo bột và có thể ester hóa cả axit béo tự do và triglyceride trong một giai đoạn. Xúc tác sinh học, cụ thể là enzyme lipase có được các ưu điểm nhất định là điều kiện tiến hành phản ứng ôn hòa hơn, thân thiện với môi trường, giảm lượng chất thải độc hại ra môi trường bên ngoài. Vì vậy, các enzyme chính là xúc tác tiềm năng cho sản xuất quy mô công nghiệp. Nhiều tác giả đã nghiên cứu sử dụng enzyme

lipase để xúc tác cho phản ứng transester hóa các loại dầu mỡ khác nhau. Zaks và Klivanov(1988) đã sử dụng enzyme lipase từ *Candida rugosa* để thực hiện phản ứng transester hóa dầu đậu nành, mức độ chuyển hóa cao nhất là 58,12%[1]. Kaieda và cs.(2001) sử dụng lipase tự do từ *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudo-monas cepacia*, *Candida rugosa* xúc tác cho phản ứng transester hóa trên dầu đậu nành ở 35°C, tỷ lệ mol 3:1, 90 h, 150 rpm, hiệu suất đạt được 80% - 90% [2]. Nie K.L và cs.(2006) sử dụng lipase từ *Rhizopus arrhizus* trong phản ứng chuyển ester dầu cọ với nồng độ cơ chất khảo sát từ 3-50 g/l, tốc độ chuyển hóa ester đạt được cao nhất là 3,2 $\mu\text{mol/phút}$ tại nồng độ cơ chất 25 g/l [3].

Phản ứng transester hóa là phản ứng giữa triglyceride và alcohol. Sản phẩm biodiesel thu được là hỗn hợp mono-alkyl ester:



Hình 1. Sơ đồ phản ứng transester hóa triglyceride và acid béo với xúc tác lipase
(An Fei Hsu và cs., 2002) [4]

Hiện nay, nghề nuôi cá tra và công nghiệp chế biến cá tra đang là một ngành chủ lực của Đồng bằng sông Cửu Long. Mỡ cá là loại phụ phẩm của ngành công nghiệp này và vẫn chưa được quan tâm sử dụng một cách hiệu quả. Quá trình transester hóa mỡ cá đã được khảo sát trong một số công trình nghiên cứu với các chất xúc tác hóa học. Nguyễn Hồng Thanh và cs. (2009) đã điều chế được biodiesel từ mỡ cá basa bằng phương pháp transester hóa với methanol và xúc tác kiềm kết hợp siêu âm ở tần số 35 kHz, hiệu suất phản ứng trên 90% [5]. Trần Thị Việt Hoa và cs. (2007) sử dụng xúc tác p-toluensulfonicacid trong phản ứng methanol phân mỡ cá tra thì hiệu suất thu biodiesel đạt trên 98% [6].

Nhằm tìm ra công nghệ tổng hợp biodiesel từ dầu cá tra bằng xúc tác sinh học thân thiện với môi trường, ít tốn năng lượng mà vẫn bảo đảm đầy đủ tiêu chuẩn của sản phẩm biodiesel, chúng tôi sử dụng xúc tác là enzyme lipase *Candida rugosa* làm xúc tác cho phản ứng transester hóa dầu cá tra bằng methanol và khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình phản ứng.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu

Enzyme lipase *Candida rugosa*, Type VII, ký hiệu L1754-5G do hãng Sigma-Aldrich cung cấp.

Mỡ cá tra do công ty TNHH Xuất Nhập Khẩu Tây Nam cung cấp.

Tất cả hóa chất sử dụng trong phân tích là hóa chất tinh khiết (Merk).

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Trích ly dầu cá từ mỡ cá tra

Mỡ cá được rửa sạch và bảo quản lạnh ở -18°C. Mỡ cá sau khi được rã đông được rửa sạch với nước, xay nhỏ. Sau khi xay, tiến hành gia nhiệt gián tiếp mỡ cá ở 80°C, thu nhận phần tan chảy,

lọc để bỏ cặn. Rửa dầu cá thu được bằng dung dịch nước muối 10% (NaCl 10%). Lắng tách nước được dầu cá tra sạch. Bảo quản dầu cá tra thu được ở nhiệt độ 4-6°C.

2.2.2. Khảo sát enzyme [7]

2.2.2.1. Xác định hàm lượng protein của enzyme:

Hàm lượng protein của enzyme được xác định theo phương pháp Bradford. Sử dụng bovine serum albumin (BSA) làm chất chuẩn. Khi thuốc thử Coomassie Brilliant Blue tạo phức màu xanh dương với protein thì hấp thu cực đại ở bước sóng 595 nm. Độ hấp thu này có liên hệ một cách trực tiếp với nồng độ protein. Từ đó có thể xác định được hàm lượng protein của mẫu enzyme dựa vào đường chuẩn.

2.2.2.2. Xác định hoạt tính và hoạt tính riêng của enzyme:

Theo nhà cung cấp, 1 đơn vị hoạt tính U được định nghĩa là lượng enzyme sẽ thủy phân ra 1 μ mol acid béo từ triglyceride trong 30 phút tại pH 7, nhiệt độ 37°C, sử dụng dầu olive làm cơ chất.

Hoạt tính (HT) và hoạt tính riêng (HTR) của enzyme được tính theo công thức sau:

$$HT \left(\frac{U}{mg} \right) = \frac{(a-b) \cdot 10000 \cdot 0,1}{m} \quad (1)$$

Với: a - Thể tích NaOH dùng chuẩn độ ở mẫu cần khảo sát (có enzyme), ml

b - Thể tích NaOH dùng chuẩn độ ở mẫu trắng, ml

m - Khối lượng enzyme, g.

$$HTR (U/mg \text{ protein}) = \frac{HT}{P} \cdot 100\% \quad (2)$$

Với: P - hàm lượng protein của enzyme, %.

2.2.3. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất tổng hợp biodiesel với xúc tác enzyme *Candida rugosa*

Phản ứng transester hóa dầu cá tra: Hỗn hợp phản ứng gồm dầu cá tra, methanol theo tỷ lệ xác định, dung dịch đệm có pH xác định. Đồng hóa hỗn hợp trên máy đồng hóa cơ trong 15 phút. Cho

enzyme lipase vào hỗn hợp. Phản ứng tiến hành trong bình cầu gắn ống sinh hàn hoàn lưu trên máy khuấy từ gia nhiệt. Lấy mẫu theo những khoảng thời gian nhất định để xác định lượng methyl ester tạo thành.

Hỗn hợp sau phản ứng được ly tâm ở 6600 vòng/phút trong 15 phút. Tách lấy lớp biodiesel trên cùng, rửa sạch bằng nước cất sau đó sấy khô đến khối lượng không đổi. Hiệu suất chuyển hóa thành biodiesel được tính theo công thức:

$$H = \frac{\text{Khối lượng biodiesel thu được}}{\text{Khối lượng biodiesel lý thuyết}} \cdot 100\% \quad (3)$$

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần và lấy giá trị trung bình.

Các yếu tố khảo sát:

- Thí nghiệm 1- Ảnh hưởng của tỷ lệ methanol/dầu cá: Phản ứng được tiến hành với tỷ lệ mol methanol : dầu cá 4:1; 5:1; 6:1; 7:1; 8:1. Các thông số cố định: 8,6 g dầu cá tra; 20% dung dịch đệm pH 6,5; bổ sung 2% enzyme lipase *Candida rugosa* tự do ở nhiệt độ 40°C trong 24 giờ.

- Thí nghiệm 2- Ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme/dầu cá: Phản ứng được tiến hành với các tỷ lệ khối lượng enzyme : dầu cá thay đổi từ 1-5%. Các thông số cố định là 8,6 g dầu cá tra; 20% dung dịch đệm pH 6,5; nhiệt độ 40°C trong 24 giờ, tỷ lệ mol methanol : dầu cá được chọn từ thí nghiệm 1.

- Thí nghiệm 3- Ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng: Phản ứng được tiến hành ở các mức nhiệt độ xác định từ 30-50°C. Các thông số cố định là 8,6 g dầu cá tra; 20% dung dịch đệm pH 6,5; tỷ lệ mol methanol : dầu cá được chọn từ thí nghiệm 1; tỷ lệ enzyme: dầu cá được chọn từ thí nghiệm 2, thời gian phản ứng 24 giờ.

- Thí nghiệm 4- Ảnh hưởng của pH phản ứng: Phản ứng được tiến hành với các giá trị pH 6; 6,5; 7; 7,5; 8 bằng cách thay đổi pH dung dịch đệm. Các thông số cố định là 8,6 g dầu cá tra; 20% dung

dịch đệm; tỷ lệ mol methanol : dầu cá được chọn từ thí nghiệm 1; tỷ lệ enzyme : dầu cá được chọn từ thí nghiệm 2; nhiệt độ được chọn từ thí nghiệm 3, thời gian phản ứng 24 giờ.

- Thí nghiệm 5- Ảnh hưởng của hàm lượng dung dịch đệm: Phản ứng được tiến hành với hàm lượng đệm thay đổi từ 5-25%. Các thông số cố định là 8,6 g dầu cá tra; tỷ lệ mol methanol : dầu cá được chọn từ thí nghiệm 1; tỷ lệ enzyme : dầu cá được chọn từ thí nghiệm 2; nhiệt độ được chọn từ thí nghiệm 3; pH được chọn từ thí nghiệm 4; thời gian phản ứng 24 giờ.

- Thí nghiệm 6- Khảo sát phản ứng theo thời gian: Phản ứng được tiến hành với các điều kiện thích hợp theo các thí nghiệm từ 1 đến 5. Lấy mẫu sau mỗi khoảng thời gian xác định.

2.2.4. Phương pháp phân tích

- Xác định chỉ số acid, hàm lượng nước và chất dễ bay hơi của dầu cá tra theo TCVN 6127:2010, TCVN 6120:2007

- Xác định thành phần và hàm lượng acid béo bằng phương pháp sắc ký khí theo tiêu chuẩn AOAC 969.33 tại Công Ty CP DV KH-CN Sắc Ký Hải Đăng.

- Xác định khối lượng phân tử trung bình của các acid béo có trong dầu theo công thức:

$$\bar{M} = \sum_i^n M_i \cdot \frac{x_i}{100} \quad (4)$$

Với: $\bar{M}$: Khối lượng phân tử trung bình của các acid béo có trong dầu;

x_i là tỉ lệ phần trăm theo khối lượng của từng acid thành phần thứ i ;

M_i là khối lượng phân tử của thành phần acid béo thứ i ;

n là số acid béo có mặt trong dầu.

- Xác định khối lượng phân tử trung bình của dầu cá:

$$\overline{MW} = G + 3\bar{M} - 3W \cong 38,05 + 3\bar{M} \quad (5)$$

Với: G - khối lượng phân tử glycerol (92,0935 g/mol);

W - khối lượng phân tử nước (18,0125 g/mol).

- Xác định khối lượng của biodiesel thu được theo lý thuyết khi phản ứng hết một mol dầu cá:

$$MB = \overline{MW} + 3M - G \cong \overline{MW} + 4,0265 \quad (6)$$

Với: M - khối lượng phân tử methanol (32,04 g/mol);

- Hàm lượng methyl ester và hàm lượng glycerine tự do của sản phẩm được phân tích tại Công Ty CP DV KHCN Sắc Ký Hải Đăng.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Thành phần và các thông số cơ bản của dầu cá tra

Với kết quả phân tích ở bảng 1 và bảng 2, dầu cá có hàm lượng acid béo không bão hòa và chỉ số acid tương đối cao, theo nhận định của Sharma và cs. (2010) thì tính chất nhiên liệu của biodiesel phụ

thuộc vào thành phần hóa học của dầu mỡ nguyên liệu [8]. Các acid béo no như C14:0, C16:0, C18:0 sẽ làm cho biodiesel có chỉ số xetan, độ bền oxy hóa, điểm đục, điểm chảy và độ nhớt cao; do đó, dễ bị kết tinh, không phù hợp trong môi trường khí hậu lạnh. Các acid béo không no dễ bị oxy hóa nhưng lại sử dụng tốt trong môi trường này. Chiều dài mạch hydrocarbon của biodiesel tăng và mạch thẳng thì chỉ số xetan tăng. Độ nhớt tăng theo chiều dài mạch hydrocarbon và mức độ no nhưng số nối đôi trong mạch hydrocarbon tăng thì độ nhớt lại giảm. Như vậy, có thể nhận định dầu cá tra là nguyên liệu phù hợp để sản xuất biodiesel có độ nhớt thấp, chịu được nhiệt độ thấp với tỷ lệ acid béo không no chiếm đến 62%.

Từ kết quả ở bảng 2, có thể tính được phân tử lượng trung bình của dầu cá là 858,50g/mol và phân tử lượng trung bình của acid béo tự do trong dầu cá là 273,48 g/mol, khối lượng của biodiesel thu được theo lý thuyết khi phản ứng hết một mol dầu cá là 862,765 g.

Bảng 1. Một số tính chất hóa lý của dầu cá tra

Thông số	Đơn vị	Kết quả
Acid béo không bão hòa	% chất béo	62
Hàm lượng nước và chất dễ bay hơi	% khối lượng	0,05
Hàm lượng acid béo tự do (FFA)	mg KOH/g mẫu	2,2

Bảng 2. Thành phần acid béo trong dầu cá tra

Thành phần acid béo	Hàm lượng, %
Tetradecanoic acid C14:0	4,12
Hexadecanoic acid C16:0	26,8
Octadecanoic acid C18:0	7,5

Cis-9-Octadecenoic acid C18:1	44,5
Cis-9,12-Octadecadienoic acid C18:2	13,7
Octadecatrienoic acid C18:3	0,65
Cis-11-Eicosenoic acid C20:1	1,22
Eicosatetraenoic acid C20:4	1,56

3.2. Hoạt tính của enzyme *Candida rugosa*

3.2.1. Hàm lượng protein của enzyme *Candida rugosa*

Đường chuẩn về hàm lượng protein của BSA được xây dựng. Nồng độ enzyme được pha trong khoảng nồng độ của đường chuẩn. Từ phương trình đường chuẩn suy ra được nồng độ protein của enzyme nhờ quan hệ giữa nồng độ và mật độ quang (OD):

$$y = 222,6x + 1,060 \quad (7)$$

Với $R^2 = 0,994$

Từ đó tính được hàm lượng protein theo khối lượng của enzyme là 38,25%.

3.2.2 Hoạt tính và hoạt tính riêng của enzyme *Candida rugosa*

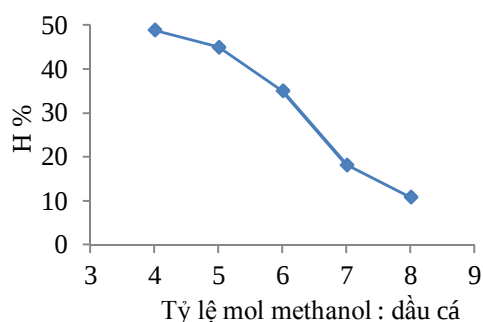
Hoạt tính và hoạt tính riêng của lipase *Candida rugosa* đo được theo phương pháp của nhà cung cấp lần lượt là 1064 U/mg enzyme và 2782U/mg protein.

3.3. Kết quả khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất thu biodiesel

3.3.1. Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ methanol: dầu cá

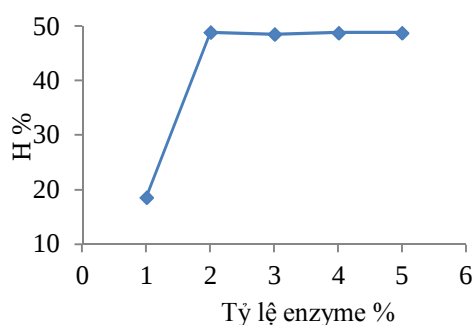
Tỷ lệ mol methanol:dầu là một trong những yếu tố quan trọng nhất ảnh hưởng đến hiệu suất phản ứng. Theo sơ đồ chuyển hóa ở hình 1 thì 1 mol dầu phản ứng với 3 mol methanol, tuy nhiên do đây là phản ứng cân bằng nên để chuyển hóa hết dầu cá cần phải lấy dư methanol. Vì vậy tỷ lệ

mol methanol : dầu cần lớn hơn 3. Kết quả trên đồ thị của hình 2 chỉ ra rằng ở tỷ lệ methanol : dầu là 4 thì hiệu suất của phản ứng transester dầu cá là cao nhất, đạt 48,89%. Hiệu suất giảm dần từ tỷ lệ 4 đến 8. Điều này cho thấy 4:1 là tỷ lệ vừa đủ để phản ứng dịch chuyển theo chiều từ triglyceride sang FAME, khi vượt tỷ lệ này thì lượng methanol (ancol mạch ngắn) dư sẽ kết hợp với đầu háo nước của enzyme lipase làm một số enzyme bị vô hoạt, giảm hoạt tính xúc tác của enzyme (Manxiao và cs., 2009) [9]. Tỷ lệ mol 4:1 cũng cho hiệu suất thu biodiesel là cao nhất trong các nghiên cứu của Hong-yan Zeng và cs. (2009) khi sử dụng enzyme lipase từ *Saccharomyces cerevisiae* transester hóa dầu hạt cải [10]; M.Nasratun và cs. (2009) sử dụng *Candida rugosa* chuyển hóa dầu ăn thành biodiesel [11]. Tỷ lệ mol này được sử dụng cho các khảo sát tiếp theo.



Hình 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ methanol: dầu cá đến hiệu suất thu biodiesel

3.3.2. Khảo sát tỷ lệ enzyme

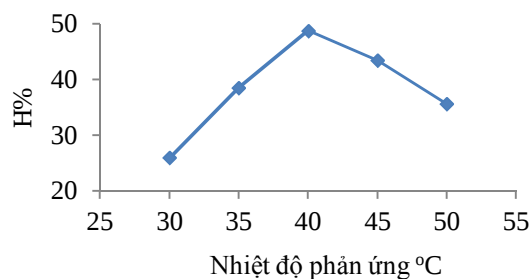


Hình 3. Ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme/dầu cá đến hiệu suất thu biodiesel

Khi tăng tỷ lệ enzyme lipase từ 1% đến 2% thì hiệu suất thu biodiesel cũng tăng từ 18,62% lên 48,89%, tuy nhiên tiếp tục tăng tỷ lệ enzyme lên 5% thì hiệu suất phản ứng hầu như không thay đổi (hình 3). Điều này có lẽ là do enzyme đã bão hòa với diện tích bề mặt giữa pha dầu và pha nước, sự tiếp tục gia tăng nồng độ enzyme không còn mang lại thay đổi đáng kể trong hiệu suất phản ứng. Vì vậy chọn tỷ lệ enzyme 2% để tiếp tục khảo sát.

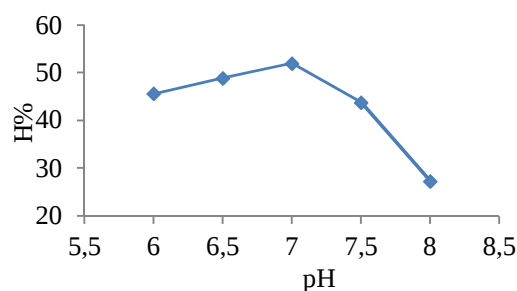
3.3.3. Khảo sát nhiệt độ phản ứng

Hiệu suất thu biodiesel tăng từ 25,96% lên 48,89% khi nhiệt độ tăng từ 30°C lên 40°C, tuy nhiên từ 40°C đến 50°C thì hiệu suất giảm (hình 4). Trong nghiên cứu của Chen và cs. (2006) sử dụng lipase *Rhizopusoryzae* để methanol hóa dầu ăn đã qua sử dụng thì khi nhiệt độ vượt 40°C, hoạt tính enzyme sẽ giảm [12]. Jeong và Park (2008) cũng chỉ ra nhiệt độ tối ưu của Novozyme 435 là 40°C [13]. Nhiệt độ phản ứng thấp là một trong những yếu tố quan trọng nhằm giảm chi phí năng lượng cho quá trình sản xuất biodiesel theo Manxiao và cs. (2009) [9]. Chọn nhiệt độ 40°C để tiếp tục khảo sát.



Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất thu biodiesel

3.3.4. Khảo sát pH của dung dịch đệm



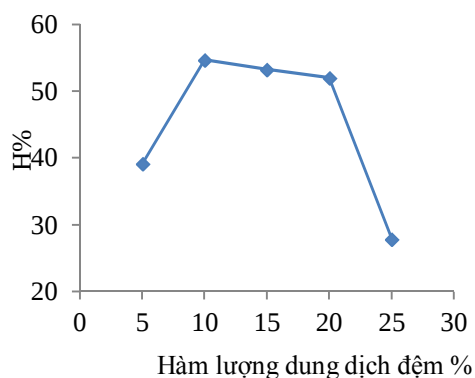
Hình 5. Ảnh hưởng của pH đến hiệu suất thu biodiesel

pH có ảnh hưởng khá lớn đến vận tốc của phản ứng sử dụng xúc tác enzyme, mỗi enzyme hoạt động mạnh trong 1 dãy pH khác nhau. Hiệu suất thu biodiesel tăng chậm từ pH 6 (45,61%), pH 6,5 (48,89%) đến pH 7 (52,01%) và giảm nhanh khi giá trị pH vượt 7. Điều này cho thấy lipase *Candida rugosa* hoạt động mạnh trong khoảng pH 6-7 và pH 7 là pH tối ưu cho phản ứng transester hóa dầu cá. Tương tự, Ernendes B. Pereira và cs. (2001) trong quá trình nghiên cứu động học phản ứng đã xác định pH tối ưu của enzyme *Candida rugosa* tự do là 7 [14]. Chọn pH 7 cho các khảo sát tiếp theo.

3.3.5. Khảo sát hàm lượng dung dịch đệm

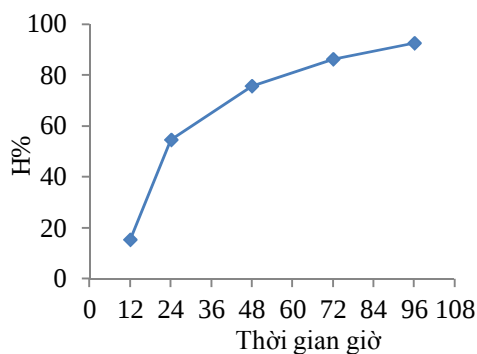
Kết quả trên hình 6 cho thấy hiệu suất đạt giá trị từ 54,72% - 52,01% khi hàm lượng đệm thay

đổi từ 10% đến 20% (theo thể tích). Khi tăng hàm lượng đệm lên trên 10%, hiệu suất thu nhận biodiesel giảm rõ rệt. Việc bổ sung dung dịch đệm pH với hàm lượng thích hợp sẽ gia tăng sức bền cho lipase trong môi trường phản ứng chứa các chất có khả năng ức chế enzyme như ancol, glycerol... Tuy nhiên khi bổ sung dung dịch đệm vào hỗn hợp phản ứng thì bên cạnh phản ứng sinh tổng hợp biodiesel, với sự có mặt của nước, lipase còn xúc tác cho phản ứng thủy phân triglyceride thành acid béo tự do. Khi vượt quá mức cần thiết cho phản ứng transester hóa, hoạt động xúc tác của enzyme cho phản ứng thủy phân tăng lên làm hiệu suất thu biodiesel giảm theo Shah và Gupta (2007) [15]. Tianwei Tan và cs. (2010) kết luận rằng hàm lượng nước tối ưu cho phản ứng transester hóa triglyceride của lipase *Candida* sp. 99-125 nằm trong khoảng 10-20% [16]. Vậy ta chọn giá trị 10% cho khảo sát thời gian phản ứng.



Hình 6. Ảnh hưởng của hàm lượng đệm đến hiệu suất thu biodiesel

3.3.6. Khảo sát phản ứng theo thời gian



Hình 7. Biến thiên hiệu suất thu biodiesel theo thời gian

Tiến hành xác định hiệu suất thu biodiesel ở từng thời điểm 12 giờ, 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ và 96 giờ. Ta nhận thấy hiệu suất tạo biodiesel cũng tăng theo thời gian (hình 7), nhưng sau 72 giờ phản ứng, tốc độ giảm rõ rệt. Sau 96 giờ phản ứng, hiệu suất của phản ứng transester hóa dầu cá đạt 92,65%.

3.3. Đánh giá chất lượng sản phẩm biodiesel

Bảng 4 cho thấy một số chỉ tiêu hóa lý của biodiesel từ dầu cá tra được so sánh với Bộ tiêu chuẩn của Việt Nam cho dầu diesel gốc sinh học (TCVN 7717:2007). Các chỉ tiêu về hàm lượng nước và tạp chất, hàm lượng glycerine tự do, hàm lượng ester nằm trong giới hạn cho phép của biodiesel. Trong đó, hàm lượng glycerine tự do là chỉ tiêu rất quan trọng vì nếu thành phần glycerine tự do vượt giới hạn cho phép thì không chỉ ảnh hưởng đến việc kích nổ, mà bản thân nó là một chất gây nổ (đồng thời khi nổ sẽ sinh nhiệt rất lớn), thậm chí không kiểm soát được, máy nóng hơn bình thường dẫn đến phá hỏng máy [5]. Tuy nhiên trị số acid của biodiesel từ dầu cá vượt hơn giới hạn cho phép của biodiesel. Chỉ số acid của biodiesel cao có thể dẫn đến khả năng ăn mòn động cơ. Sản phẩm của phản ứng cần phải được nghiên cứu xử lý thêm để đạt chỉ số acid theo tiêu chuẩn.

Bảng 3. Thành phần methyl ester trong biodiesel từ dầu cá

Thành phần acid béo	% khối lượng
Dodecanoic acid, methyl ester C12:0	0,24
Tetradecanoic acid, methyl ester C14:0	6,73
Pentadecanoic acid, methyl ester C15:0	0,23
Hexadecanoic acid, methyl ester C16:0	34,47
9-Hexadecanoic acid, methyl ester C16:1	1,22
Octadecanoic acid, methyl ester C18:0	7,84
Cis-9-Octadecenoic acid, methyl ester C18:1	35,89
Cis-9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester C18:2	9,48
Octadecatrienoic acid, methyl ester C18:3	0,72
11-Eicosanoic acid, methyl ester C20:1	0,99
Cis-11,14- Eicosadienoic acid, methyl ester C20:2	0,31
Cis-8,11,14- Eicosatrienoic acid, methyl ester C20:3	0,39
Cis-5,8,11,14- Eicosatetraenoic acid, methyl ester C20:4	0,24

Bảng 4. Các tính chất hóa lý của biodiesel từ dầu cá tra và biodiesel (B100)

Chỉ tiêu	Biodiesel từ dầu cá	Biodiesel (B100) TCVN 7717:2007 [17]
Tỷ trọng ở 15°C, g/ml	0,8816	-
Hàm lượng nước và tạp chất,%khối lượng	0	0,050 max
Hàm lượng glycerine tự do,% khối lượng	0	0,020 max
Hàm lượng ester, % khối lượng	98,94	96,5 min
Trị số acid, mg KOH/g	1,70	0,50 max

4. KẾT LUẬN

Các yếu tố ảnh hưởng đến phản ứng transester dầu cá tra bằng xúc tác lipase *Candida rugosa* tự do đã được khảo sát. Điều kiện phản ứng thích hợp như sau: tỷ lệ mol methanol:dầu cá là 4:1; tỷ lệ enzyme là 2% (tính theo khối lượng dầu); nhiệt độ tối ưu là 40°C; bổ sung dung dịch đệm có pH 7 với hàm lượng 10% (tính theo thể tích dầu). Với điều kiện phản ứng thích hợp, sau thời gian phản ứng 96 giờ, hiệu suất thu biodiesel đạt 92,65%.

Sản phẩm biodiesel tạo thành đáp ứng được các chỉ tiêu về hàm lượng nước và tạp chất, hàm lượng glycerine tự do và hàm lượng ester theo tiêu chuẩn biodiesel của Việt Nam nhưng chỉ số acid còn cao hơn quy định.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được tài trợ bởi Đại học Bách khoa – Đại học Quốc gia – Thành phố Hồ Chí Minh trong khuôn khổ đề tài mã số TSDH-2013-KTHH-05

Using lipase *Candida rugosa* as a catalyst for the biodiesel production from Tra fish (*Pangasius hypophthalmus*) oil

- Nguyen Thi Tuyet Nhu
- Nguyen Thi Nguyen
- Phan Ngoc Hoa

Ho Chi Minh City University of Technology - VNU-HCM

ABSTRACT:

In this work, lipase from Candida rugosa (LCR) was used as a catalyst for the transesterification reaction of fish oil with methanol. The research process consists of three stages: determine the material properties and the activity of the enzyme from Candida rugosa, transester of fish oil with methanol catalyzed by the enzyme lipase, evaluation indicators of the quality of biodiesel obtained. Fish oil contains 62% unsaturated fatty acid, acid value of 2.2 mg KOH/g. Activity and specific activity of enzyme were respectively 1064 U/mg enzyme and 2782 U/mg protein. Factors affecting the efficiency of conversion of fatty acid methyl esters - FAME were investigated: the molar ratio of

methanol/fish oil, ratio of enzyme/fish oil, temperature reaction, pH reaction, concentration of buffer and reaction time. Yield of biodiesel conversion was 92.65% with optimal conditions: rate of methanol/fish oil was 4:1, the ratio of enzyme/substrate was 2%, reaction temperature was 40°C, additional 10% buffer solution pH 7 with 96 hour response time. Products biodiesel obtained FAME components accounted for 98.94%; density at 15°C is 0.8816 g/ml; no free water and glycerine, consistent with the original standard biodiesel (B100) (TCVN 7717:2007). However, the acid value of 1.7 mg KOH products/g higher than the allowable value.

Keywords: transesterification, fish oil, enzyme lipase, *Candida rugosa*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Zaks A, Klivanov A.M., The effect of water on enzyme action in organic media, Journal of Biological Chemistry, 263, 8017–8021(1988).
- [2]. Kaieda M., Samukawa T., Kondo A., Fukuda H., Effect of methanol and water contents on production of biodieselfuel from plant oil catalyzed by various lipases in a

- solventfree system, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91, 12–15 (2001)
- [3]. Nie K.L, Xie F., Wang F., Tan T.W, Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: optimization of the biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B – Enzymatic*, 43, 142–147 (2006).
- [4]. An-Fei Hsu, Kerby Jones, Thomas A. Foglia, William N. Marmer, Immobilized lipase-catalysed production of alkyl esters of restaurant grease as biodiesel, *Biotechnology And Applied Biochemistry*, 36, 181-186 (2002)
- [5]. Nguyễn Hồng Thanh, Nguyễn Trần Tú Nguyên, Nguyễn Thị Phương Thoa, Điều chế Biodiesel từ dầu cá tra bằng phương pháp hóa siêu âm, *Tạp Chí Phát Triển Khoa Học và Công Nghệ*, 12 (3), 51-61 (2009)
- [6]. Trần Thị Việt Hoa, Lê Thị Thanh Hương, Phan Minh Tân, Trương Vũ Thanh, Điều chế biodiesel từ dầu cá basa xúc tác p-toluensulfonic, Tuyển tập các công trình “Hội nghị khoa học và công nghệ Hóa học Hữu cơ” toàn quốc lần thứ IV, NXB Đại học Quốc gia Hà Nội, 834-839 (2007)
- [7]. Trần Thị Bé Lan, Nguyễn Minh Nam, Tạ Thị Thanh Thúy, Phan Ngọc Hòa, So sánh một số tính chất của chế phẩm enzyme lipase từ *Candida rugosa* và *Porcine pancreas*, *Tạp Chí Khoa Học*, 22b, 210-220 (2012)
- [8]. Sharma Y., Singh B., “An ideal feedstock, kusum (*Schleichera triguga*) for preparation of biodiesel: Optimization of parameters”. *Fuel*, 89:1470-1474, 2010.
- [9]. Man Xiao, Sini Mathew, Jeffrey Philip Obbard, Biodiesel fuel production via transesterification of oils using lipase biocatalyst, *GCB Bioenergy*, 1, 115-125 (2009)
- [10]. Hong-yan Zeng, Kai-bo Liao, Xin Deng, He Jiang, Fan Zhang, 2009, Characterization of the lipase immobilized on Mg–Al hydrotalcite for biodiesel, *Process Biochemistry*, 44, 791-798 (2007)
- [11]. M.Nasratun, H.A.Said, A.Noraziah, A.N.Abd Alla, Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* on Chitosan Beads for Transesterification Reaction, *American Journal of Applied Sciences*, 6(9), 1653-1657 (2009)
- [12]. Chen G, Ying M, Li W, Enzymatic conversion of waste cooking oils into alternative fuel–biodiesel, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 129-132, 911-921 (2006)
- [13]. Jeong GT, Park DH, Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oil for biodiesel production with tert-butanol, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 148, 131-139 (2008)
- [14]. Ernendes B. Pereira, Heizir F. De Castro, Flávio F. De Moraes, Gisella M. Zanin, Kinetic studies of lipase from *Candida rugosa*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 91-93, 739-752 (2001)
- [15]. Shah S, Gupta MN, Lipase catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a solvent free system, *Process Biochemistry*, 42, 409-414 (2007)
- [16]. Tianwei Tan, Jike Lu, Kaili Nie, Li Deng, Fang Wang, Biodiesel production with immobilized lipase: A review, *Biotechnology Advances*, 28, 628-634 (2010)
- [17]. TCVN 7717 : 2007, Nhiên liệu diesel sinh học gốc (B100), Yêu cầu kỹ thuật