

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG LOẠI BỎ PHENOL TRONG DỊCH TIỀN THỦY PHÂN LIGNOCELLULOSE ỨNG DỤNG SẢN XUẤT ETHANOL

Nguyễn Thị Phương Mai

Trường Đại học Tài nguyên và Môi trường Hà Nội

Tóm tắt

Bài báo tập trung nghiên cứu vào các kỹ thuật khử độc phenol trong dịch tiền thủy phân đáp ứng khả năng lên men sản xuất ethanol từ nấm men *Saccharomyces cerevisiae* 4182 ở qui mô phòng thí nghiệm với tỷ lệ cấp giống 10^6 CFU/ml. Kết quả cho thấy, dịch tiền thủy phân trước khi lên men được tiến hành loại bỏ phenol ở 37°C . Tại điều kiện này enzyme laccase tác dụng vào các tiểu phần phenol của lignin cắt các liên kết $\text{Ca-C}\beta$ và liên kết aryl-aryl cho khả năng loại bỏ phenol lên đến 46,61%, thời gian thủy phân dịch đạt cao nhất 59%, tốc độ phản ứng để loại bỏ phenol đạt cao nhất trong 60 phút. Enzyme laccase được sử dụng để loại bỏ phenol ở nồng độ từ $20 \div 120$ (IU/g bã mía), khả năng loại bỏ phenol đạt hiệu quả cao $49,91\% \pm 2,5\%$, hiệu suất thu hồi ethanol đạt $76,27 \pm 2\%$ ở 70 (IU/g bã mía). Nghiên cứu cho thấy, vai trò laccase trong quá trình thu nhận dịch thủy phân lignocellulose có thể lên men phục vụ cho sản xuất ethanol.

Từ khóa: Dịch tiền thủy phân; Lignocellulose; Phenol; Lên men; Ethanol.

Abstract

Study on the possibility of eliminating phenol from pre-hydrolyzate of lignocellulose in producing ethanol

*This study focuses on the technique of eliminating phenol from pre-hydrolyzate to meet the requirement of fermentation to produce ethanol from *Saccharomyces cerevisiae* 4182 yeast with the concentration of 10^6 CFU/ml at laboratory scale. The results showed that before pre-hydrolyzate was used for fermentation, phenol had been removed at 37°C . In this condition, laccase enzyme acted on the phenol fractions of lignin to cut $\text{Ca-C}\beta$ bonds and aryl-aryl bonds resulting in removing of 46.61% phenol. The longer the hydrolysis, the higher the phenol removal efficiency (up to 59%). The phenol removal efficiency, however, reached the highest in the first 60 minutes. The laccase enzyme was used to remove phenol at $20 \div 120$ IU/g bagasse. The results indicated that at 70 IU/g bagasse, the phenol removal efficiency was at the highest efficiency $49.91\% \pm 2.5\%$ and the ethanol extraction efficiency was at $76.27 \pm 2\%$. The study results confirmed the laccase's role in lignocellulose hydrolyzate extraction for ethanol production.*

Keywords: Pre-hydrolyzate; Lignocellulose; Phenol; Fermentation; Ethanol

1. Đặt vấn đề

Trong số các giải pháp có thể, cồn nhiên liệu được sản xuất từ các nguồn sinh khối khác nhau hiện đang là một trong những giải pháp đang được quan tâm. Hiện nay, ethanol sản xuất từ các nguồn nguyên liệu liên quan đến tinh bột

(ngô, sắn) hoặc đường (củ cải, mía) là giải pháp duy nhất hiện nay thay thế xăng dầu và giữ vai trò quan trọng: năng lượng tái tạo, giúp cắt giảm phát thải CO_2 , đảm bảo an ninh năng lượng, nâng cao thu nhập cho người làm nông nghiệp. Tuy nhiên, đối mặt với an ninh lương thực và hạn chế

đất trồng làm việc sản xuất ethanol từ loại nguyên liệu thực phẩm gặp khó khăn và chỉ là giải pháp trước mắt [3].

Bioethanol thế hệ 2 từ lignocellulose là một sản phẩm tiềm năng của công nghệ sinh khối lignocellulose. Với sản lượng lớn của lignocellulose, bioethanol từ nguồn sinh khối này có khả năng đáp ứng nhu cầu ethanol nhiên liệu để thay thế cho nhiên liệu hóa thạch đang dần cạn kiệt. Nếu lượng sinh khối này được chuyển hóa thành đường lên men được, thì sinh khối lignocellulose sẽ là một trong các nguồn nguyên liệu quan trọng cho mục tiêu sản xuất ethanol ở nước ta nói riêng và trên thế giới nói chung [4].

Sự tạo thành các chất ức chế trong quá trình tiền xử lý có sự khác biệt lớn ở các phương pháp tiền xử lý khác nhau. Nhiều phương pháp loại bỏ phenol được nghiên cứu nhằm loại bỏ ảnh hưởng của chất ức chế đến quá trình lên men. Trong các biện pháp loại bỏ phenol được sử dụng thì loại bỏ phenol có sự kết hợp giữa laccase và các yếu tố hóa - lý được chú ý hơn cả, giúp cải thiện hiệu suất lên men ethanol [2].

Xuất phát từ thực trạng trên, nhóm tác giả đã tiến hành nghiên cứu khả năng loại bỏ phenol trong dịch tiền thủy phân lignocellulose ứng dụng sản xuất ethanol nhằm đánh giá hiệu quả loại phenol của laccase và khả năng thu hồi ethanol.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng và thời gian nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: Dịch tiền xử lý, enzyme laccase, nấm men *S. cerevisiae* 4182

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 5 đến tháng 10 năm 2019.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

a. Phương pháp xác định hoạt độ enzyme laccase với ABTS [6]

Dung dịch phản ứng enzyme gồm: 850 μ l dung dịch đệm sodium acetate 0,1 M pH 5, 100 μ l ABTS 1mM. Ủ hỗn hợp này ở 27°C trong 10 phút. Bổ sung 50 μ l enzyme. Trộn đều hỗn hợp phản ứng so sánh với mẫu kiểm chứng sau mỗi phút phản ứng. Phản ứng kiểm chứng sử dụng nước khử ion thay cho enzyme.

Một đơn vị hoạt độ laccase là lượng enzyme cần thiết để xúc tác oxy hóa 1 μ mol ABTS trong 1 phút ở 27°C trong dung dịch đệm sodium acetate pH 5.

b. Phương pháp xác định hàm lượng ethanol [1]

Để xác định lượng cồn trong dịch sau lên men, trước tiên dịch sau lên men cần được chưng cất để tách cồn khỏi các thành phần khác của dịch. Quá trình chưng cất dựa trên nguyên tắc về sự bay hơi và ngưng tụ của dung dịch. Trong quá trình chưng cất, cồn và nước bay hơi sau đó được ngưng tụ nhờ hệ thống sinh hàn nước.

Nhiệt độ sôi của dung dịch ethanol hòa tan trong nước tỉ lệ thuận với nồng độ ethanol. Biết được nhiệt độ sôi của dung dịch cần phân tích ta có thể tra được nồng độ cồn tương ứng.

c. Xác định hàm lượng phenol tổng số trong dung dịch bằng phương pháp Folin Ciocalteu [7]

Phương pháp dựa trên cơ sở phản ứng tạo màu của thuốc thử Folin Ciocalteu và hợp chất phenol trong dung dịch. Trong điều kiện dư Folin, cường độ màu sau phản ứng tỉ lệ thuận với hàm lượng phenol trong một phạm vi nhất định. Biết được mật độ quang của dung dịch chứa phenol nghiên cứu với thuốc thử Folin, dựa vào đường chuẩn của axit gallic nồng độ 0 ÷ 0,75 (mg/ml) với thuốc thử này, tính được hàm lượng phenol tổng số trong dung dịch nghiên cứu.

d. Khảo sát vai trò khử độc dịch thủy phân lignocellulose của laccase

Để đánh giá hiệu quả khử độc tính của các chất sinh ra trong quá trình tiền xử lý bởi laccase, mẫu tiền xử lý được làm nguội, điều chỉnh tới pH 4,8 bổ sung đệm natri citrate pH 4,8 tới 150 ml và laccase 0 ÷ 120 (IU/g bã mía), thời gian phản ứng 0 ÷ 360 phút ở nhiệt độ 30 ÷ 35°C, lắc mẫu 150 vòng/phút. Thủy phân hỗn hợp ở 50°C theo chế độ tối ưu:

- Endo-glucanase: 31,5 CMCase/g bã mía;

- Exo-glucanase: 53,61 FPU/g bã mía;

- β -glucosidase: 20,47 CBU/g bã mía.

Bổ sung Na_2SiF_6 0,0225g/150ml dịch thủy phân.

Thủy phân ở 50°C trong 40,5 giờ.

Xác định hàm lượng phenol trong dịch trước và sau xử lý với laccase. Mẫu không xử lý hóa-nhiệt và không xử lý laccase được tiến hành song song làm mẫu đối chứng. Hiệu quả xử lý phenol đánh giá bằng % lượng phenol bị loại bỏ so với phenol có trong mẫu trước khi xử lý laccase.

Mật độ tế bào nấm men được đưa vào dịch thủy phân là 10^6 CFU/ml. Các điều kiện khác của quá trình lên men: nhiệt độ

37°C, pH 4,8; thời gian 72 giờ, bổ sung các chất dinh dưỡng Urê 0,4g/l; KH_2PO_4 3g/l; MgSO_4 3g/l. Hiệu suất thu hồi ethanol được đánh giá bằng % ethanol thu nhận được so với ethanol chuyển hóa lý thuyết từ lượng cellulose trong mẫu ban đầu.

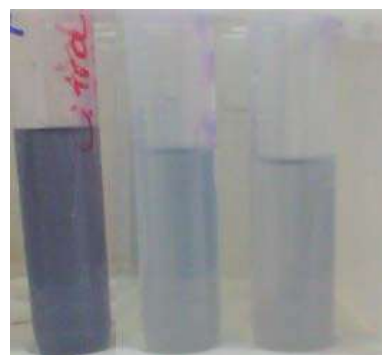
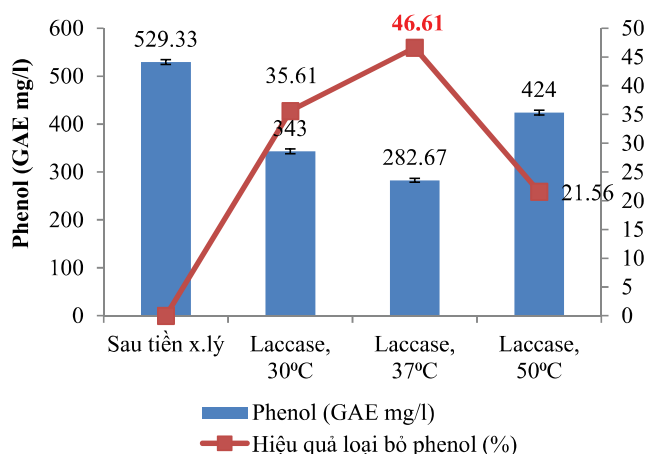
Hiệu quả khử độc của laccase được đánh giá thông qua khả năng khử phenol, lượng CO_2 sinh ra và hiệu suất thu hồi ethanol từ quá trình lên men các mẫu với chủng nấm men *S. cerevisiae* 4182.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới khả năng loại bỏ phenol của laccase

Kết quả phân tích hàm lượng phenol cũng cho thấy hàm lượng phenol trong dịch tiền xử lý hóa nhiệt rất cao 529,33mg/l (Hình 1). Đây là kết quả tác động tới cấu trúc lignin của NaOH trong quá trình tiền xử lý, giúp phân giải lignin tạo thành phenol hòa tan trong dịch tiền xử lý. Phenol là chất có độc tính đối với tế bào và vì thế có thể ức chế hoạt động của nấm men, cần thiết phải loại bỏ chất ức chế quá trình lên men ethanol sau này.

Kết quả các thí nghiệm sử dụng laccase loại bỏ phenol trong dịch tiền xử lý được trình bày trong Hình 1.



Hình 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới khả năng loại bỏ phenol của laccase

1. Mẫu trước xử lý, 2. Mẫu xử lý với 60 IU laccase/g bã mía

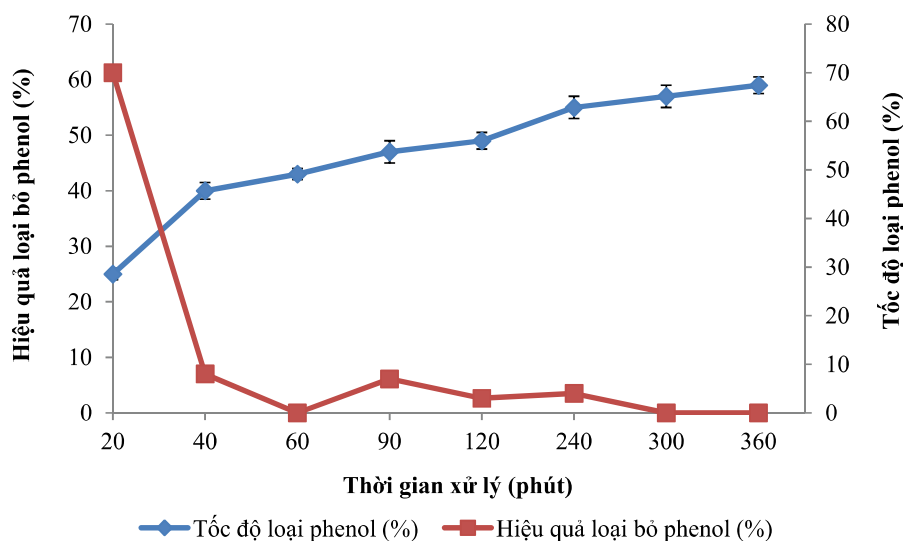
Trong thí nghiệm này laccase được đưa vào dịch tiền xử lý với nồng độ 60 (IU/g bã mía), tiến hành phản ứng trong thời gian 2 giờ, lắc 150 vòng/phút, nhiệt độ thay đổi $30 \div 50^\circ\text{C}$. Hàm lượng phenol được xác định trước và sau khi xử lý laccase.

Kết quả thí nghiệm này cho thấy laccase ở nhiệt độ 37°C có khả năng loại phenol tốt hơn và bền hơn ở 50°C (nhiệt độ hoạt động tối ưu của laccase là 40°C). Các giả thuyết đã đưa ra về cơ chế hoạt động của laccase khi tác dụng vào các tiểu phần phenol của lignin là làm oxy hóa của Ca , cắt các liên kết $\text{Ca-C}\beta$ và liên kết aryl-aryl. Laccase khử một phân tử oxy tạo thành hai phân tử nước khi thực hiện oxy hóa các hợp chất thơm như dẫn suất của polyphenol, methoxyl và các amin

thơm. Quá trình oxy hóa một điện tử này dẫn đến việc hình thành gốc tự do ở vị trí oxy trung tâm, các gốc tự do sau đó, được chuyển thành quinon. Quinon và các gốc tự do có thể tiếp tục bị polyme hóa, kết quả là trong dịch sau thủy phân hàm lượng chất ức chế giảm xuống. Sử dụng enzym laccase ở 37°C được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Ảnh hưởng của thời gian tới khả năng khử phenol của laccase

Laccase được bổ sung với nồng độ 60 (IU/g bã mía), nhiệt độ xử lý ở 37°C , tốc độ lắc 150 vòng/phút. Hàm lượng phenol trong mẫu trước và sau xử lý với laccase được phân tích ở các thời điểm khác nhau từ $0 \div 360$ phút, kết quả biểu diễn trên Hình 2



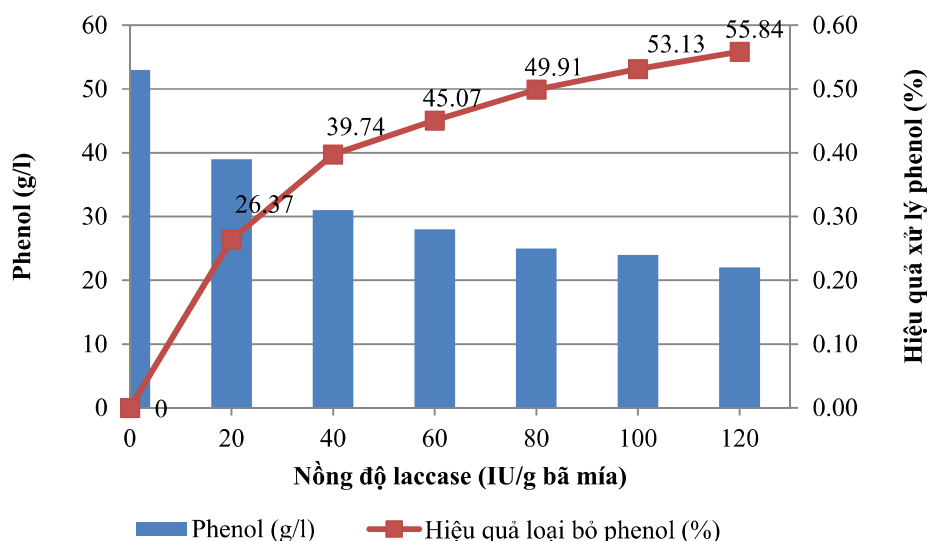
Hình 2. Ảnh hưởng của thời gian xử lý nhiệt tới hiệu quả loại bỏ phenol trong dịch thủy phân

Kết quả Hình 2 cho thấy thời gian xử lý dịch tiền thủy phân bằng laccase càng dài hiệu quả xử lý phenol càng cao, đạt tới 50%, tuy nhiên tốc độ phản ứng loại phenol đạt cao nhất trong 60 phút đầu tiên là 1.72 lần, sang đến 90 phút tiếp theo tốc độ giảm nhanh mà hiệu quả loại phenol, hiệu quả loại bỏ phenol không cao (Hình 2). Do đó, thời gian xử

lý laccase được chọn là 60 phút cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.3. Ảnh hưởng của nồng độ laccase tới khả năng loại bỏ phenol trong dịch thủy phân

Enzyme laccase được bổ sung ở các nồng độ $0 \div 120$ (IU/g bã mía), thời gian 60 phút và nhiệt độ xử lý 37°C . Kết quả được chỉ ra trong Hình 3.

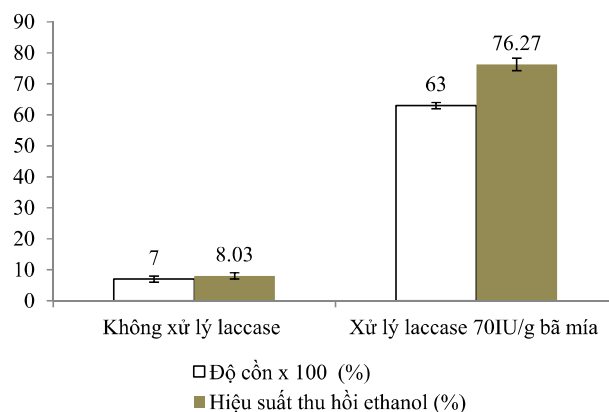


Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ laccase đến khả năng loại phenol trong dịch thủy phân

Kết quả Hình 3 cho thấy hiệu quả khử phenol tăng tỷ lệ thuận với nồng độ laccase, nhưng mức độ loại phenol tốt nhất trong khoảng 20 ÷ 80 (IU/g bã mía) tăng gấp 2 lần, nếu tăng nồng độ laccase lên cao hơn hiệu quả xử lý phenol thấp, ở nồng độ laccase 120 (IU/g bã mía) chỉ đạt 55,84% tăng 1,1 lần so với 80 (IU/g bã mía). Do đó, trong các nghiên cứu tiếp theo laccase có thể được sử dụng ở nồng độ 20 ÷ 80 (IU/g bã mía) để xử lý phenol. Ở nhiệt độ 37°C hoạt độ laccase bền nhưng vận tốc chỉ đạt tốc độ cực đại trong thời gian đầu khi nồng độ cơ chất cao. Do vậy, laccase được sử dụng ở 60 - 70 IU/g bã mía, nhiệt độ xử lý 37°C trong thời gian phản ứng 60 phút được sử dụng cho mục tiêu lên men ethanol.

3.4. Đánh giá khả năng lên men ethanol từ dịch tiền xử lý

Để chứng minh tác dụng của laccase trong loại bỏ chất ức chế cho quá trình lên men, dịch sau tiền xử lý nhiệt - NaOH xử lý với laccase được đem thủy phân nhờ hệ enzyme cellulose thủy phân lignocellulose: Celuclast 1,5L/betaglucosidase N188: 5U/30U/g bã mía, bổ sung 0.0225g Na₂SiF₆ thủy phân ở 50°C, pH 4,8 trong 48h. Dịch thu được có bổ sung các chất khoáng và nitơ đảm bảo dinh dưỡng được cho lên men ethanol với *S. cerevisiae* tỉ lệ 10⁶CFU/ml. Đánh giá hiệu quả xử lý chất ức chế thông qua hiệu suất thu hồi ethanol. Mẫu kiểm chứng được tiến hành song song và không sử dụng laccase, chi tiết được chỉ ra trong Hình 4.



Hình 4. Khả năng lên men dịch thủy phân 1% cellulose sau xử lý với laccase

Mẫu kiểm chứng (dịch tiền xử lý không được xử lý với laccase) lên men yếu (Hình 4). Như vậy, trong dịch tiền xử lý của mẫu kiểm chứng, sự lên men ethanol bởi nấm men bị ức chế. Các mẫu thí nghiệm khi được xử lý với laccase ở nồng độ tăng từ 20 - 80 IU/g bã mía, hiệu quả thu hồi ethanol từ bã mía thủy phân tăng. Nồng độ laccase 70 IU/g bã mía nằm trong khoảng tối ưu của nồng độ laccase cho xử lý phenol, do vậy đạt hiệu quả thu hồi ethanol lớn nhất nhờ tác dụng của enzyme xử lý phenol trong dịch thủy phân. Hiệu suất thu hồi ethanol đạt tới $76,27 \pm 2\%$ so với mẫu không khử độc bằng laccase, lên men rất yếu hiệu suất thu hồi thấp hơn đáng kể ($8,03 \pm 1\%$). Độ cồn khi không xử lý bằng enzyme laccase là 7 (%), khi có mặt của laccase độ cồn thu được cũng tăng lên 63 (%).

Các kết quả khảo sát cho thấy laccase có thể sử dụng để tách lignin và loại bỏ một phần chất ức chế dịch lên men, áp dụng cho “tiền xử lý sinh học” nguyên liệu lignocellulose và khử độc dịch tiền xử lý cho mục tiêu lên men bioethanol.

4. Kết luận

Đã tiến hành đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ tới khả năng loại bỏ phenol của laccase trong dịch tiền xử lý bằng nhiệt - NaOH (0,1g/g bã mía) ở 121°C trong thời gian 60 phút, hàm lượng phenol trong dịch tiền xử lý giảm cao nhất ở 37°C ở nồng độ laccase 60 (IU/g bã mía) đạt giá trị 282,67% (giảm 1,9 lần) so với phenol ban đầu.

Đã xác định được thời gian xử lý dịch tiền thủy phân bằng laccase xử lý phenol đạt cao nhất trong 60 phút đầu tiên. Nồng độ laccase để xử lý phenol tốt nhất nằm trong dải từ 20 ÷ 80 (IU/g bã mía) hiệu suất có thể đạt tới 50%.

Dịch sau thủy phân được bổ sung nấm men *S. cerevisiae* 4182 tỷ lệ 10^6 CFU/ml, hiệu suất thu hồi ethanol đạt $76,27 \pm 2\%$, mẫu không sử dụng laccase để loại bỏ phenol hiệu suất thu hồi thấp hơn đáng kể ($8,03 \pm 1\%$). Khi có mặt của enzyme laccase độ cồn thu được cũng tăng lên 63 (%).

Dịch tiền xử lý được sử dụng enzyme laccase làm tác nhân sinh học có khả năng loại bỏ được phenol đạt hiệu suất cao và được phục vụ cho mục đích lên men sản xuất ethanol.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Lê Thanh Mai, Nguyễn Thị Hiền, Phạm Thu Thủy, Nguyễn Thanh Hằng, Lê Thị Lan Chi (2009). *Các phương pháp phân tích ngành công nghệ lên men*. NXB Khoa học và Kỹ thuật.
- [2]. Ballerini, D, Desmarquest, J.P, Pourquie, J, Nativel, F, et Rebeller, M. (1994). *Ethanol production from lignocellulosics: Large scale experimentation and economics*. Bioresour Technol, 50, pp. 17 - 23.
- [3]. Ernesto J. del Rosario, Ph.D (2008). *Cellulosic Ethanol: Biofuel of the Future*. Institute of Chemistry and National Institute of Molecular Biology & Biotechnology, University of the Philippines Los Baños, Laguna.
- [4]. Food and Agriculture Organization of the United Nation (FAO) (2008). *State of food insecurity in the world*. Rome.
- [5]. K.K. Cheng, B.Y. Cai, J.A. Zhang, H.Z. Ling, Y.J. Zhou, J.P. Ge and J.M. Xu. (2008). *Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process*. Biochem. Eng. J. 38, pp. 105 - 109.
- [6]. Majcherzyk, A.; Johannes, C.; Hu'ttermann, A. (1999). *Oxidation of aromatic alcohols by laccase from Trametes versicolor mediated by the 2,2 ϕ -azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) cation radical and decation*. Appl. Microbiol. Biotechnol, 51, 267 - 276.
- [7]. Slinkard, K; Singleton, V.L. (1977). *Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods*. AJEV, 28; pp. 49 - 55.
- [8]. Jurado, M., Prieto, A., Martinez, A.T., Martinez, M.J. (2009). *Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol*. Bioresource Technology, 100, pp. 6378 - 6384.

BBT nhận bài: 24/10/2019; Phản biện
xong: 07/11/2019