

NGHIÊN CỨU TỐI ƯU HÓA QUÁ TRÌNH THỦY PHÂN CELLULOSE TÁCH TỪ RƠM RẠ THÀNH ĐƯỜNG TAN CỦA NẤM MỐC *ASPERGILLUS TERRIUS* ĐỂ SẢN XUẤT ETHANOL - NHIÊN LIỆU SINH HỌC

**Trần Đình Toại¹, Phạm Hồng Hải², Nguyễn Bá Kiên³,
Hoàng Thị Bích², Đỗ Trung Sỹ^{1,*}**

¹*Viện Hóa học*

²*Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên*

³*Viện Thổ nhưỡng Nông hóa*

*Liên hệ với tác giả: hai.inpc@yahoo.com;

Đến Tòa soạn ngày 17/5/2011; Chấp nhận đăng ngày: 20/2/2011

1. MỞ ĐẦU

Nhiên liệu sinh học đang là xu thế mới của thế giới trong việc tìm kiếm nguồn năng lượng thay thế cho nguồn năng lượng từ hydrocacbon đang dần cạn kiệt. Hiện tại, các phương pháp sản xuất nhiên liệu sinh học đa phần áp dụng công nghệ phân giải ở nhiệt độ cao, sau đó tạo phản ứng với hydro và trải qua quá trình tinh luyện trực tiếp để chiết xuất thành nhiên liệu sinh học [1, 2]. Quá trình này đòi hỏi thực hiện ở nhiệt độ, áp suất cao và có tác dụng của chất xúc tác nên giá thành sản phẩm sau khi ứng dụng vào sản xuất là khá cao. Chính vì vậy, nghiên cứu ứng dụng các vi sinh vật như một nguồn xúc tác sinh học để thủy phân các phế liệu nông nghiệp như rơm rạ đang là giải pháp mới trong việc phát triển nhiên liệu sinh học. Giải pháp này vừa không tiêu hao nguồn lương thực của con người vừa loại bỏ các phế phụ phẩm nông nghiệp một cách thân thiện với môi trường mà có thể hy vọng sẽ sản xuất được nhiên liệu sinh học với quy mô lớn, nhờ ưu điểm hiệu suất cao và giá thành giảm.

Trong khuôn khổ bài báo này, chúng tôi sử dụng quy hoạch thực nghiệm để tìm giá trị tối ưu các thành phần tham gia quá trình thủy phân cellulose sao cho đạt hiệu quả thủy phân cao nhất.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

- Rơm rạ khô sau thu hoạch được sấy khô, xay nghiền và lọc qua rây để đạt được kích thước khoảng 1 mm.

- Nấm mốc *Aspergillus terreus* AF67 (kí hiệu AF67): là chủng giống có khả năng phân hủy cellulose mạnh do khoa Sinh- trường Đại học Tổng hợp Belarus cung cấp (Đề tài hợp tác Việt -

Nga) đang được lưu giữ tại Phòng Công nghệ khai thác chế biến tài nguyên thiên nhiên, Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên.

2.2. Môi trường nuôi cấy

- Môi trường nuôi cấy nấm mốc: môi trường Crapeck
- Môi trường thay thế (MT2): cellulose 20 g; NaNO₃ 1g; KH₂PO₄ 1 g; MgSO₄.5H₂O 0,5 g, cao men 0,5 g, thạch 15 g, nước 1000 ml, pH 5. Khử trùng ở 1atm, 30 phút.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Tách cellulose từ rơm rạ (phương pháp Hypoclorit)

Sử dụng cellulose tách từ rơm rạ vì trong cellulose tinh thể lượng đường glucose có thể đạt đến 90%, các đường như xylose, arabinose còn lại không đáng kể và rất ít rhamnose. Như vậy, chỉ sử dụng cellulose sẽ thu được hầu như chỉ có glucose. Điều này sẽ thuận tiện cho giai đoạn lên men ethanol từ glucose.

Tách và chỉ sử dụng cellulose từ các thành phần hỗn hợp của nguyên liệu, coi như làm sạch cellulose, loại bỏ các tạp chất mà các tạp chất này là những chất ức chế rất mạnh hệ enzyme cellulose trong thủy phân cellulose, đó là hemicellulose lignin, silic cũng như các dư lượng chất trừ còn lại trong nguyên liệu [1, 2].

3.2. Xác định khả năng sinh enzyme cellulase bằng phương pháp axit dinitro salicylic DNS [3]

Dựa trên khả năng hydro hóa của enzyme cellulase để biến đổi cơ chất (CMC, rơm rạ) thành đường glucose. Glucose phản ứng tạo màu với thuốc thử DNS. Cường độ màu của hỗn hợp phản ứng tỉ lệ thuận với nồng độ đường glucose trong một phạm vi nhất định.

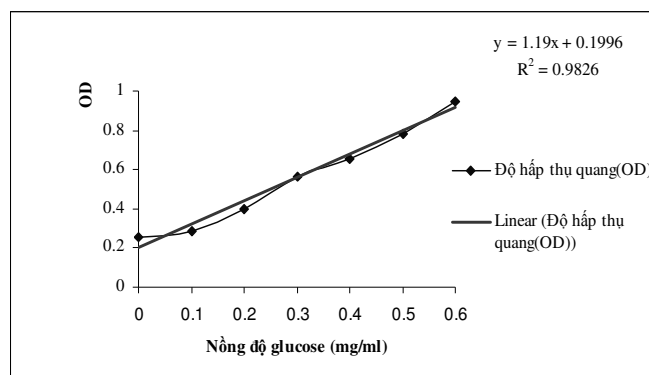
Sản phẩm sau phản ứng được xác định bằng phương pháp đo quang ở bước sóng 540 nm. Dựa theo đồ thị đường chuẩn của glucose tinh khiết với thuốc thử DNS ta sẽ dễ dàng tính được hàm lượng đường sinh ra trong mẫu thí nghiệm.

Các bước tiến hành

- Dụng đường chuẩn glucose: Đồ thị chuẩn được xây dựng từ mật độ quang OD của dung dịch glucose với các nồng độ 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 (mg/ml). Mật độ quang của dãy dung dịch chuẩn được đưa ra trong bảng 1 và mối tương quan giữa nồng độ glucose và độ hấp thụ quang được chỉ ra ở hình 1.

Bảng 1. Mật độ quang của dãy dung dịch chuẩn glucose

Nồng độ glucose (mg/ml)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
Độ hấp thụ (OD)	0,253	0,289	0,4	0,566	0,656	0,783	0,949



Hình 1. Đồ thị đường chuẩn glucose

- Xác định khả năng sinh enzyme cellulase ở các giai đoạn của quá trình lên men

Môi trường thay thế (MT2) có bổ sung 5% chủng giống vi sinh vật đã lên men 48 giờ. Nuôi cấy trên máy lắc 240 vòng/phút ở 35 °C. Tại các thời điểm khác nhau của quá trình lên men: 0 giờ, 24 giờ, 48 giờ... tiến hành hút dịch lên men, li tâm ở 10 000 vòng/phút trong 30 phút, hút dịch trong để đo lượng đường sinh ra.

Enzyme cellulase sinh ra sẽ thủy phân cellulose thành đường tan. Lượng đường sinh ra càng nhiều thì càng bắt màu đậm với thuốc thử DNS. Đo lượng đường sinh ra ở các thời điểm của quá trình lên men sẽ đánh giá được khả năng thủy phân cellulose của enzyme cellulase.

2.3. Phương pháp quy hoạch thực nghiệm [4, 5]

Trong quá trình thủy phân cellulose thì nồng độ glucose tạo thành phụ thuộc vào thành phần tham gia thủy phân: nồng độ cellulose, nồng độ enzyme cellulase, nhiệt độ, pH... Bằng cách giữ nguyên một số các thông số ảnh hưởng đến điều kiện nuôi cấy như nhiệt độ, pH, ... tiến hành tối ưu hóa theo 2 thông số là hàm lượng cellulose và enzyme trong khoảng thích hợp. Từ đó, sẽ tìm được hiệu suất tối ưu cho thủy phân cellulose trên cơ sở mô hình thực nghiệm thống kê mô tả tương hợp kết quả thực nghiệm.

Tiến hành thực hiện: Áp dụng phương pháp quy hoạch thực nghiệm ở trên cho quá trình thủy phân cellulose, bố trí các thí nghiệm với đối tượng mẫu là cellulose thay đổi từ 0,6 g đến 2,0 g và lượng enzyme cellulase thay đổi từ 4 ml đến 10 ml. Mỗi một thí nghiệm đều được tiến hành thủy phân tại cùng điều kiện giống nhau trong 100 ml dung dịch đệm citrat 0,5 M (pH = 5,0) và nhiệt độ ủ mẫu 45 °C (nhiệt độ thủy phân của enzyme cellulase). Tại các thời điểm 0 giờ, 24 giờ,... lấy một lượng mẫu nhất định ra phân tích hàm lượng đường glucose theo phương pháp DNS, mỗi mẫu lặp lại 2 lần.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tách cellulose từ rơm rạ



Hình 2. Cellulose sau quá trình xử lí

Cellulose sau quá trình xử lí có đặc điểm màu trắng đục, bông xốp và hiệu suất đạt 40 - 45% .

3.2. Khả năng sinh thủy phân cellulose của nấm mốc *Aspergillus terreus* AF67

- Cây 1 vòng que cấy bào tử nấm mốc AF67 đã được hoạt hóa vào 50 ml môi trường Crapeck trong bình tam giác 250 ml, lên men trên máy lắc 240 vòng/phút, ở 35 °C trong 48 giờ. Thu được dịch giống.

- Bổ sung 5% dịch giống vào bình tam giác 1000 ml có chứa sẵn 250 ml môi trường MT2. Nuôi cấy trên máy lắc ở 240 vòng/phút ở 35 °C. Tại các thời điểm khác nhau của quá trình lên men: 0 giờ, 24 giờ, 48 giờ ... tiến hành hút dịch lên men, li tâm ở 10 000 vòng/phút trong 30 phút, hút dịch trong và đo lượng đường sinh ra theo phương pháp DNS. Độ hấp thụ quang ở các giai đoạn khác nhau của quá trình lên men đo được ở bảng 2.

Bảng 2. Mật độ quang ở các giai đoạn của quá trình lên men

Thời gian (h)	0	24	48	72	96	120	144	168
Độ pha loãng	-	-	5 lần	10 lần	15 lần	10 lần	-	-
Mật độ quang (OD)	0,315	0,465	0,545	0,611	0,645	0,478	0,553	0,065

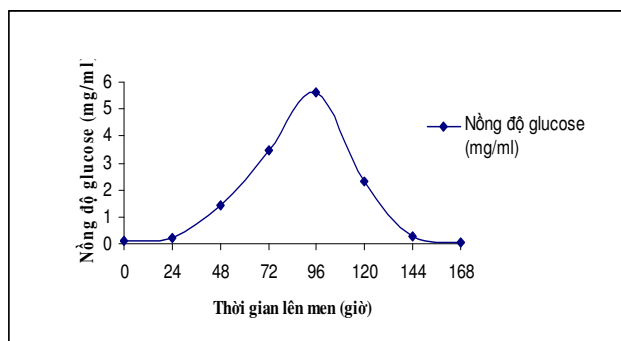
Dựa vào phương trình phương trình đường chuẩn glucose

$$y = 1,19x + 0,1996 \quad (R^2 = 0,9826)$$

trong đó: y là mật độ quang; x là hàm lượng glucose, suy ra nồng độ glucose ở các thời điểm của quá trình lên men.

Bảng 3. Nồng độ đường glucose ở các giai đoạn của quá trình lên men

Thời gian (h)	0	24	48	72	96	120	144	168
Nồng độ glucose (mg/ml)	0,096	0,223	1,45	3,457	5,61	2,33	0,297	0,065



Hình 3. Nồng độ đường glucose ở các giai đoạn của quá trình lên men

Kết quả trên cho thấy, nấm mốc AF67 có khả năng phân giải rơm rạ thành đường tan, và trong điều kiện lên men trên, khoảng thời gian 96 giờ thì lượng đường sinh ra nhiều nhất là 5,61 mg/ml.

3.3. Lên men thu dịch enzyme

Lên men 250 ml môi trường MT2 trong bình tam giác 1000 ml với điều kiện lên men không đổi là pH = 5, nhiệt độ 35 °C và 5% dịch men giống, lên men trong khoảng 96 giờ thì li tâm loại sinh khối, thu dịch trong là dịch enzyme thô. Sử dụng dịch enzyme thu được cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.4. Nghiên cứu tối ưu hóa quá trình thủy phân cellulose tạo thành glucose

Tiến hành biến đổi tỉ lệ giữa hàm lượng cellulose và enzyme cellulase thô thu được. Đo hàm lượng glucose và chọn giá trị lớn nhất của mỗi thí nghiệm, ta thu được kết quả ở bảng 4.

Bảng 4. Glucose thu được theo sự thay đổi của hàm lượng cellulose và enzyme cellulase

TN	z_1 (Cellulose, g)	z_2 (Enzyme, ml)	y (Glucose, mg/ml)
1	0,6	4,0	4,397
2	2,0	4,0	13,101
3	0,6	10,0	4,765
4	2,0	10,0	13,849
5	0,6	7,0	4,650
6	2,0	7,0	13,619
7	1,3	4,0	8,691
8	1,3	10,0	8,863
9	1,3	7,0	8,710
10	1,65	8,5	11,394
11	1,65	8,5	11,279
12	1,65	8,5	11,167

Thực hiện phương pháp tối ưu hóa thực nghiệm, mã hóa số liệu bảng 4 ta có bảng ma trận trực giao bậc hai 2 biến (bảng 5).

Bảng 5. Ma trận kế hoạch thực nghiệm và kết quả

TT	x_0	x_1	x_2	x_1x_2	x_1'	x_2'	y	\hat{y}
1	+1	-1	-1	+1	0,3333	0,3333	4,397	4,286
2	+1	+1	-1	-1	0,3333	0,3333	13,101	13,205
3	+1	-1	+1	-1	0,3333	0,3333	4,765	4,716
4	+1	+1	+1	+1	0,3333	0,3333	13,849	13,635
5	+1	-1	0	0	0,3333	-0,6667	4,650	4,501
6	+1	+1	0	0	0,3333	-0,6667	13,619	13,420
7	+1	0	-1	0	-0,6667	0,3333	8,691	8,746
8	+1	0	+1	0	-0,6667	0,3333	8,863	9,175
9	+1	0	0	0	-0,6667	-0,6667	8,710	8,961

Sử dụng phần mềm xử lý số liệu quy hoạch thực nghiệm bằng ngôn ngữ thuật toán FORTRAN [4] ta nhận được các kết quả sau:

Phương sai tái sinh xác định từ 3 thí nghiệm bổ sung ở $x_1 = 0,5$ và $x_2 = 0,5$ với y là: 11,394; 11,279 và 11,167.

$$\bar{y} = \frac{\sum_{u=1}^3 y_u}{3} = 11,28$$

$$s_{ts}^2 = \frac{\sum_{u=1}^3 (y_u - \bar{y})^2}{2} = 0,0129$$

Trong bảng 5 ta có:

$$x_j' = x_j^2 - \bar{x}_j^2 = x_j^2 - \frac{\sum_{i=1}^N x_{ji}^2}{N} \quad (1)$$

Ta tìm phương trình hồi quy

$$\hat{y} = b_0' + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + b_{11}x_1' + b_{22}x_2' \quad (2)$$

và dễ dàng đưa về dạng thông thường:

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 \quad (3)$$

với

$$b_0 = b'_0 - b_{11}\bar{x}_1^2 - b_{22}\bar{x}_2^2 \quad (4)$$

Các hệ số của phương trình (3.2) được xác định như sau

$$b_j = \frac{\sum_{i=1}^N x_{ji} y_i}{\sum_{i=1}^N x_{ji}^2} \quad (5)$$

và phương sai của các hệ số

$$s_{bj}^2 = \frac{s_{ts}^2}{\sum_{i=1}^N x_{ji}^2} \quad (6)$$

Theo kết quả tính toán ta có:

Hệ số b_j	$b'_0 = 8,961$	$b_1 = 4,459$	$b_2 = 0,215$	$b_{12} = 0,095$	$b_{11} = 0,307$	$b_{22} = 0,05$
sai số xác định S_{bj}	$S_{b0} = 0,0378$	$S_{b1} = S_{b2} = 0,0463$		$S_{b12} = 0,0567$	$S_{b11} = S_{b22} = 0,0802$	
Giá trị t_{bj}	$t_{b0} = 236,84$	$t_{b1} = 96,24$	$t_{b2} = 4,63$	$t_{b12} = 1,67$	$t_{b11} = 3,83$	$t_{b22} = 0,62$

Chuẩn số Student tra bảng:

$$t_p(f) = t_{0,05}(2) = 4,3$$

Chỉ những $t_{bj} > 4,3$ mới có nghĩa tức là:

$$b_0 = b'_0 = 8,961$$

$$b_1 = 4,459$$

$$b_2 = 0,215$$

và ta có phương trình hồi quy:

$$\hat{y} = 8,961 + 4,459x_1 + 0,215x_2 \quad (7)$$

Theo (7) tính các giá trị \hat{y}_i và đưa vào bảng.

Phương sai tương hợp:

$$s_{th}^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - l} \quad (8)$$

trong đó $N = 9$ và $l = 3$ (số hệ số có nghĩa của phương trình hồi quy).

$$s_{th}^2 = 0,0494$$

Ta tính

$$F = \frac{s_{th}^2}{s_{ts}^2} = \frac{0,0494}{0,0129} = 3,836$$

Giá trị tra bảng

$$F_p(f_1, f_2) = F_{0,05}(6, 2) = 19,2$$

$$F < F_p(f_1, f_2)$$

Vậy phương trình hồi quy tương hợp với kết quả thực nghiệm.

Chuyển phương trình (7) từ dạng biến mã hóa về biến thực trên cơ sở sử dụng công thức mã hóa

$$x_j = \frac{z_j - z_j^0}{\Delta z_j} \quad (9)$$

Ta được:

$$\hat{y} = 0,176 + 6,37z_1 + 0,072z_2 \quad (10)$$

Căn cứ vào (7) thì

$$\hat{y}_{\max} = 13,635$$

Ta có nhận xét sau: Hai yếu tố nồng độ cellulose và nồng độ enzyme đều ảnh hưởng đến hiệu suất quá trình thủy phân glucose, trong đó ảnh hưởng của nồng độ cellulose (yếu tố 1) mạnh hơn (theo giá trị hệ số thuộc yếu tố này so với hệ số yếu tố thứ 2).

Theo phương trình (7), cần làm tiếp thí nghiệm, theo hướng tăng x_1 và x_2 tức nồng độ cellulose và enzyme.

Kết quả thí nghiệm để chọn giá trị y cực đại như sau:

TN	z_1 (g cellulose)	z_2 (ml enzyme)	y (C_{Glucose} mg/ml)
1*	2,3	14	15,388
2*	2,5	15	15,867
3*	2,6	15	15,821

Ở thí nghiệm 2* ta nhận được hiệu suất cao nhất

$$y_{\max} = 15,867 \text{ mg/ml}$$

Chọn các số liệu: Từ quy hoạch thực nghiệm ở bảng 5 và thí nghiệm bổ sung để vẽ đồ thị ta có bảng 6.

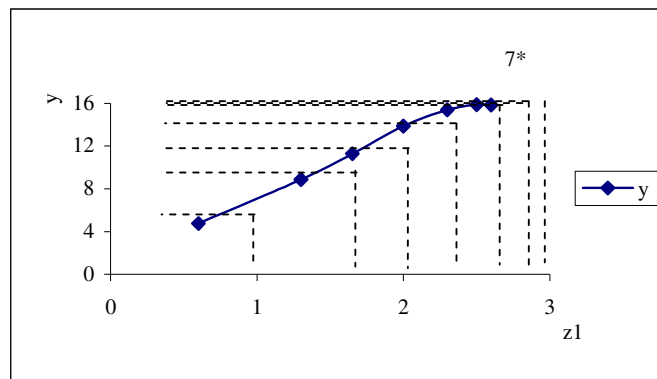
Bảng 6. Xác định giá trị tối ưu cho hàm lượng glucose nhận được

TT	z_1	z_2	y
1	0,6	10	4,765
2	1,3	10	8,863
3	1,65	8,5	11,279
4	2,0	10	13,849
5	2,3	14	15,388
6	2,5	15	15,867
(7*)	2,6	15	15.821

Ta chọn giá trị tối ưu là:

$$y_{\max} = 15,876$$

ở thí nghiệm số 6 trong bảng 6.



Hình 4. Đồ thị xác định giá trị tối ưu của glucose thu được từ quá trình thủy phân cellulose

4. KẾT LUẬN

Đã xác định được khả năng thủy phân cellulose của chủng *A.terrius* AF67 ở khoảng thời gian 96h cho hàm lượng enzyme cellulase cao nhất

Đã tối ưu hóa hàm lượng cellulose và nồng độ enzyme tham gia phản ứng. Hai yếu tố này đều ảnh hưởng đến hiệu suất quá trình thủy phân cellulose, trong đó ảnh hưởng của hàm lượng cellulose mạnh hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Benko Z., Andersson A., Szengyel Z., Gaspar M., Reczey K. and Stalbrand H. - Heat extraction of corn fiber hemicellulose, *Applied Biochemistry and Biotechnology* (1-2) (2007) 137-140.
2. Sun J. X. and Sun R. C. - Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse, *Journal Polymer Degradation and Stability* **84** (2) 331-339.
3. Miller G. L. - Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* **3** (1959) 426-428.
4. Phạm Hồng Hải, Ngô Kim Chi - Xử lý số liệu và quy hoạch thực nghiệm trong nghiên cứu hóa học, NXB Khoa học tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội, 2007.
5. Ахназарова С. Л., Кафаров В. В. - Оптимизация эксперимента в химии и химической технологии. Изд. "Высшая школа", Москва, 1978.

SUMMARY

OPTIMIZATION OF THE CELLULOSE (FROM RICE STUBBLE/STRAW) HYDROLYSIS INTO GLUCOSE USING FUNGI *ASPERGILLUS TERRIUS* IN ETHANOL-BIOFUEL PRODUCTION

The cellulose hydrolysis into glucose using *Aspergillus terrius* AF67 in ethanol-biofuel production was studied.

By using the design of experiments with main factors (the concentrations of cellulose and enzyme) a regression equation was found. Based on this equation, the influent evaluation of two above factors on hydrolysis yield was implemented and with some supplementary experiments, the maximal yield was found: $y_{\max} = 15.876$ mg/ml.

Keywords. *Aspergillus terrius* AF67