

NGHIÊN CỨU ENZYME LIPASE TỪ *CANDIDA RUGOSA* VÀ *PORCINE PANCREAS* XÚC TÁC PHẢN ỨNG TRANSESTER HÓA DẦU DỪA

Trần Thị Bé Lan¹, Nguyễn Phương Phi² và Phan Ngọc Hòa³

ABSTRACT

The objective of this study is to determine biocatalysis of the coconut oil's transesterification reaction with ethanol using commercially purified free Candida rugosa (LCR) and Porcine pancreas (LPP) lipase. Evaluating the key conditions parameters affecting lipase activity and stability bases on identifying ester index and yield. The best result has achieved when ester index and yield of LCR and LPP catalyzing are respectively 7.03(mg KOH/g), 0.81% in 35°C, the phosphate buffer pH 7.0, stirring 250 (ring/min), 6 h and 6.01(mg KOH/g), 0.73% in 35°C, the borate buffer pH 9.0, stirring 200 (ring/min), 5 h. Conversion in the best condition of reaction is identified to base on GC/FID analysed method; however, the cost is relatively expensive. The result shows that conversion of LCR catalyzing is 0.77% better than LPP catalyzing is 0.43%. From this studying result, free lipase enzymes for catalyzes transesterification of conditions is established (but yields is low); and the method to determine ester index in order to determine reaction's yield, is also relatively good.

Keywords: *Transesterification, biodiesel, coconut oil, lipase enzymes, Candida rugosa, Porcine pancreas*

Title: *Study on lipase enzymes for catalyzes transesterification of coconut oil*

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định xúc tác sinh học của phản ứng transester hóa dầu dừa với ethanol bằng cách sử dụng lipase Candida rugosa (LCR) và Porcine pancreas (LPP) thương mại được tinh chế ở dạng tự do. Các thông số điều kiện quan trọng ảnh hưởng đến hoạt động và tính bền của lipase được đánh giá dựa vào xác định chỉ số ester và hiệu suất thu hồi. Kết quả cho thấy kết quả tốt nhất khi chỉ số ester và hiệu suất thu hồi của phản ứng xúc tác LCR và LPP lần lượt là 7,03(mg KOH/g); 0,81% ở 35°C; đệm phosphat pH 7,0; khuấy 250 (vòng/phút); 6 h và 6,01(mg KOH/g); 0,73% ở 35°C; đệm borat pH 9,0; khuấy 200 (vòng/phút); 5 h. Độ chuyển hóa thực ở điều kiện tốt nhất của phản ứng được xác định dựa vào phân tích GC/FID; Tuy nhiên, chi phí thì tương đối cao. Kết quả cho thấy xúc tác LCR cho độ chuyển hóa là 0,77%, cao hơn LPP (0,43%). Từ kết quả của nghiên cứu này, điều kiện cho phản ứng transester hóa xúc tác enzyme lipase dạng tự do được thiết lập (nhưng hiệu suất thu hồi rất thấp) và phương pháp xác định chỉ số ester để xác định hiệu suất của phản ứng cũng tương đối tốt.

Từ khóa: *Transester hóa, biodiesel, dầu dừa, enzyme lipase, Candida rugosa, Porcine pancreas*

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, nguồn nhiên liệu hoá thạch đang dần cạn kiệt, giải pháp mà con người tìm đến để khắc phục chính là tìm nguồn năng lượng mới. Khác với các nguồn

¹ Trường Đại học Cần Thơ

² Công ty CP DV KHCN Sắc ký Hải Đăng

³ Đại học Bách Khoa TPHCM

năng lượng tái tạo khác, năng lượng sinh khối không những thay thế năng lượng hoá thạch mà còn góp phần xử lý ô nhiễm môi trường.

Dầu diesel sinh học (ester alkyl acid béo) được sản xuất bằng phản ứng transester hóa hỗn hợp các acid béo tự do (FFA) và triacylglyceride (TAG) với alcol được xúc tác acid hoặc base (xúc tác hóa học), hay enzyme lipase (xúc tác sinh học). Xúc tác hóa học không những độc hại mà còn cần nhiều giai đoạn xử lý mới thu được dầu diesel sinh học. Ngược lại xúc tác sinh học có thể ester hóa cả FFA và TAG trong một giai đoạn. Vì vậy, xúc tác enzyme lipase đang là tiềm năng cho sản xuất quy mô công nghiệp nhằm rút bớt giai đoạn, giảm chi phí, tính độc hại và ô nhiễm môi trường.

Đã có nhiều công trình nghiên cứu ứng dụng enzyme lipase tự do hay cố định trên những chất mang khác nhau làm xúc tác cho phản ứng transester hóa trên các nguồn dầu mỡ động-thực vật khác nhau hay dầu đã qua sử dụng. Tuy nhiên, cho đến nay vẫn chưa tìm thấy công trình nghiên cứu nào trên nguồn nguyên liệu dầu dừa Việt Nam đối với bất kỳ loại enzyme nào và trên tác nhân transester hóa là ethanol.

Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định xúc tác sinh học của phản ứng transester hóa dầu dừa với ethanol bằng cách sử dụng chế phẩm lipase *Candida rugosa* (LCR) và *Porcine pancreas* (LPP) thương mại được tinh chế ở dạng tự do.

2 NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Nguyên liệu - hóa chất - thiết bị

Enzyme lipase từ *Candida rugosa* Type VII (≥ 700 unit/mg solid) ký hiệu L1754 (LCR). Enzyme lipase từ *Porcine pancreas*, Type II, ký hiệu L3126 (LPP). Cả hai enzyme đều do hãng Sigma-Aldrich (Mỹ) cung cấp.

Dầu dừa được mua từ công ty sản xuất dầu dừa Tin Vui. Độ acid $\leq 0,24\%$, nồng độ nước $\leq 0,1\%$, acid lauric 49-51%.

Ethanol 99,7° (Trung Quốc) và một số hóa chất do hãng Merck (Darmstadt, Germany) cung cấp.

Thiết bị: Máy khuấy từ gia nhiệt (Heidolph MRHei-Standard dùng cho xúc tác LCR và IKA®RH-KT/C dùng cho xúc tác LPP), microburet có vạch chia độ nhỏ nhất là 0,01 mL với thể tích tối đa là 2 mL và một số thiết bị thông thường khác.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Các số liệu được tính toán, xử lý bằng phần mềm phân tích ANOVA và được trình bày dưới dạng bảng biểu và biểu đồ trên phần mềm Microsoft Excel.

8 g dầu dừa (chỉ số acid I_A (mg) KOH/g/dầu g; độ ẩm x%) với các bột lipase (1,5% trọng lượng dầu) đặt trong erlen 50 mL trên máy khuấy từ y (vòng/phút), ở áp suất khí quyển, nhiệt độ t (°C), thời gian t (h), khi đó một lượng ethanol xác định được thêm từ từ vào với tốc độ 1 giọt/giây. Sau phản ứng, sản phẩm được tách bằng cách ly tâm 3500 (vòng/phút), tách lấy lớp trên cùng là biodiesel (Wei *et al.*, 2004; Julio *et al.*, 2007 và Hong-yan *et al.*, 2009).

Giả thiết các khảo sát ban đầu khảo sát xúc tác LCR: chọn lượng LCR là 0,12 g; 1 g dung dịch đệm phosphat pH 7,0; tốc độ khuấy 375 (vòng/phút).

Khảo sát xúc tác LPP: chọn lượng LPP là 0,2 g; 1 g dung dịch đệm borat pH 9,0; tốc độ khuấy 300 (vòng/phút).

Thêm vào đó, tỷ lệ ethanol 99,7°: dầu cho cả 2 xúc tác là 6:1; nhiệt độ 40°C; thời gian 4 h, dần thay thế các điều kiện tốt nhất tương ứng tìm được cho các khảo sát kế tiếp. Hiệu suất thô của mỗi khảo sát được xác định bằng cách cân sản phẩm. Hiệu suất thu hồi tính trên 2 g sản phẩm của phản ứng tỉ lệ với chỉ số ester của sản phẩm biodiesel được xác định dựa vào phương pháp đo như sau:

Chỉ số ester = chỉ số xà phòng - chỉ số acid.

Chỉ số xà phòng tính được khi xà phòng 2 g sản phẩm biodiesel với 25 mL dung dịch KOH 0,5 N trong ethanol, ở 30 phút và chuẩn độ bằng dd HCl 0,5 N cho tới khi mất màu, dung dịch phenolphthalein 0,1% làm chỉ thị màu. Khi đó, 1mL dung dịch KOH 0,5 N tương ứng 28,05 mg KOH (Hà Duyên Tư, 2009).

Chỉ số xà phòng hóa = $[28,05 \times (a - b)]/c$

Trong đó:

a: số mL HCl 0,5 N đã dùng cho mẫu trắng;

b: số mL HCl 0,5 N đã dùng cho mẫu thử;

c: khối lượng chất thử tính bằng gram.

Chỉ số acid tính được khi 2,5 g mẫu biodiesel hòa tan trong 50 mL hỗn hợp ethanol 95°: diethyl ether (1:1) được trung hòa bằng dung dịch KOH 0,1 N với chỉ thị phenolphthalein 0,1%. Khi đó, chỉ số acid = $5,61 \times a/b$ (a số mL KOH 0,1N; b: khối lượng mẫu thử (g)) (Hà Duyên Tư, 2009).

Khi đó hiệu suất thu hồi được tính là:

$$\%H = m_{tt}/m_{tt} \text{ với } m_{tt} = (0,5 \times (a-b) \times M_{tb(\text{esterbio})})/10^3.$$

Đối chiếu với chỉ số ester cao nhất để chọn hiệu suất thu hồi cao nhất cho mỗi điều kiện khảo sát.

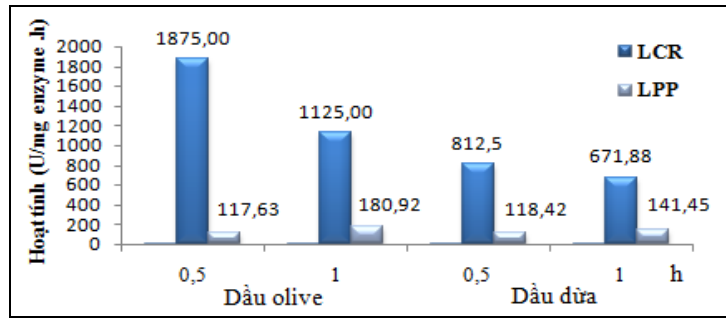
Sản phẩm được phân tích thành phần bằng GC/FID, quy trình phân tích tiến hành như sau: cân chính xác 10 μ L mẫu, thêm vào 40 μ L IS (100 ppm), 950 μ L *n*-heptan, lắc đều để yên 5 phút. Hút 1 μ L dung dịch này tiêm vào máy sắc ký và tiến hành sắc ký theo chế độ cài đặt cố định: tỷ lệ chia dòng 50:1, nhiệt độ buồng tiêm mẫu 210°C, nhiệt độ đầu dò 250°C với chế độ nhiệt thay đổi của lò cột. Thực hiện phép đo được ba lần/mẫu lấy kết quả trung bình (Lê Thị Thanh Hương, 2011).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả so sánh hoạt tính của LCR VÀ LPP trên dầu olive và dầu dừa

Chỉ số acid của dầu dừa nguyên liệu là: $I_A = 5,9 \text{ mg KOH/g} \approx 2,1\%$ acid béo tự do, lớn hơn rất nhiều so với nhà sản xuất ghi trên bao bì là $\leq 0,24\%$.

Mỗi enzyme có tính đặc hiệu về cơ chất khác nhau, khi thực hiện thủy phân trên 2 cơ chất là nhũ tương dầu dừa và dầu olive, ở điều kiện đệm phosphate pH 7,0 (LCR), borat pH 8,5 (LPP) và nhiệt độ tối ưu 40°C. Kết quả cho ở hình 1.



Hình 1: Biểu đồ thể hiện hoạt tính của LCR và LPP lên cơ chất dầu olive và dừa

Theo Hình 1, hoạt tính của LCR luôn cao hơn LPP ở 30 phút và 1 giờ khảo sát. Tuy nhiên, hoạt tính bị giảm dần theo thời gian.

3.2 Kết quả khảo sát điều kiện transester hóa dầu dừa

Độ ẩm của nguyên liệu cũng có ảnh hưởng đáng kể đến tốc độ của phản ứng transester hóa và có ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính của lipase. Kết quả đo ẩm dầu dừa bằng thiết bị đo ẩm MB45-OHAUS® cho là 0,47%.

Khảo sát tỷ lệ ethanol/dầu: cố định các yếu tố theo giả thiết ở trên và thay đổi tỷ lệ từ 3:1 đến 8:1. Mỗi giá trị cách nhau 1. Kết quả thu được như ở bảng 1.

Bảng 1: Kết quả khảo sát tỷ lệ EtOH 99,7°: dầu dừa

EtOH : dầu	LCR			LPP		
	%H S thô	Chỉ số ester	%HS thu hồi	%H S thô	Chỉ số ester	%HS thu hồi
3:1	8,17	3,81±1,6479	0,43	13,19	0,92±0,0737 ^a	0,15
4:1	15,31	2,66±0,4646	0,35	21,68	1,11±0,1852 ^b	0,19
5:1	20,45	3,55±0,9801	0,45	24,35	1,23±0,03 ^b	0,23
6:1	26,94	4,07±0,9031	0,56	39,62	1,23±0,128 ^b	0,29
7:1	32,67	1,48±0,7768	0,28	42,80	1,02±0,2868 ^{a,b}	0,26
8:1	35,73	0,89±0,7797	0,20	44,72	0,68±0,2666 ^a	0,20

* Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi những chữ cái giống nhau thì khác nhau không có ý nghĩa theo phân tích thống kê ANOVA ($\alpha = 0,05$).

Kết quả cho thấy ở tỷ lệ EtOH 99,7°: dầu dừa = 6:1 là cho hiệu suất thô, chỉ số ester và hiệu suất thu hồi của phản ứng cao nhất cho cả xúc tác LCR và LPP.

Khảo sát nhiệt độ: chọn cố định tỷ lệ EtOH 99,7°: dầu dừa = 6 : 1 cho tất cả khảo sát tiếp sau và các yếu tố khác theo giả thiết, thay đổi nhiệt độ từ 30°C đến 45°C, mỗi giá trị cách nhau 5°C. Kết quả thu được như trong bảng 2.

Bảng 2: Kết quả khảo sát xúc tác LCR và LPP theo nhiệt độ

t(°C)	LCR			LPP		
	HS thô (%)	Chỉ số ester	HS thu hồi (%)	HS thô (%)	Chỉ số ester	HS thu hồi (%)
30	28,52	1,79±0,1848 ^a	19,59	34,87	-0,36±0,2139 ^a	0,07
35	31,17	4,69±0,1101 ^b	51,26	36,23	2,71±0,1779 ^b	0,42
40	30,57	4,08±1,1650 ^b	44,57	29,89	0,25±0,1629 ^c	0,18
45	25,54	0,33±0,0231 ^c	3,64	28,65	-0,30±0,0231 ^a	0,13

* Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi những chữ cái giống nhau thì khác nhau không có ý nghĩa theo phân tích thống kê ANOVA ($\alpha = 0,05$).

Theo bảng 2, ở 35°C xúc tác LCR và LPP đều cho hiệu suất thô, chỉ số ester và hiệu suất thu hồi của phản ứng cao nhất.

Khảo sát pH: tiếp tục cố định nhiệt độ 35°C cho tất cả khảo sát tiếp sau và các yếu tố khác theo giả thiết, thay đổi từ 6,5 đến 8,0 đối với LCR (đệm phosphat), pH từ 7,5 đến 9,0 đối với LPP (đệm borat). Mỗi giá trị pH cách nhau 5. Kết quả thu được như trong bảng 3.

Bảng 3: Kết quả khảo sát xúc tác LCR và LPP theo pH

pH	LCR			pH	LPP		
	HS thô (%)	Chỉ số ester	HS thu hồi (%)		HS thô (%)	Chỉ số ester	HS thu hồi (%)
6,5	26,40	2,03±0,0289 ^a	0,25	7,5	36,30	0,28±0,1908 ^a	0,13
7,0	31,43	5,00±0,000 ^b	0,58	8,0	37,15	0,59±0,2458 ^a	0,20
7,5	29,68	4,05±0,500 ^c	0,50	8,5	37,23	2,52±0,1868 ^b	0,40
8,0	29,45	4,03±0,2524 ^c	0,51	9,0	38,27	3,04±0,1916 ^c	0,45

* Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi những chữ cái giống nhau thì khác nhau không có ý nghĩa theo phân tích thống kê ANOVA ($\alpha = 0,05$).

Theo bảng 3, xúc tác LCR ở pH 7,0 và LPP ở pH 9,0 thì cho hiệu suất thô, chỉ số ester và hiệu suất thu hồi của phản ứng cao nhất.

Khi khảo sát nồng độ EtOH: cố định các yếu tố tìm được và theo giả thiết, thay đổi nồng độ từ 99,7° đến 90°. Mỗi giá trị cách nhau 2° (xem 99,7°≈100°). Kết quả thu được như trong bảng 4.

Bảng 4: Kết quả khảo sát xúc tác LCR và LPP theo nồng độ EtOH

EtOH(°)	LCR			LPP		
	HS thô (%)	Chỉ số ester	HS thu hồi (%)	HS thô (%)	Chỉ số ester	HS thu hồi (%)
99,7	27,15	5,52±0,1514 ^a	0,60	33,96	3,15±0,0289 ^a	0,41
98,0	27,94	5,76±0,1617 ^a	0,65	38,77	3,56±0,1966 ^b	0,49
96,0	27,58	4,07±0,197 ^b	0,49	35,25	2,22±0,2413 ^c	0,36
94,0	31,53	4,43±0,1877 ^c	0,51	35,81	1,71±0,1735 ^d	0,28
92,0	24,22	2,95±0,1493 ^d	0,38	36,01	1,14±0,2107 ^e	0,21
90,0	23,43	2,18±0,000 ^e	0,29	33,96	0,39±0,000 ^f	0,15

* Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi những chữ cái giống nhau thì khác nhau không có ý nghĩa theo phân tích thống kê ANOVA ($\alpha = 0,05$).

Kết quả cho thấy đối với xúc tác LCR hiệu suất thô cao nhất ở EtOH 94°, nhưng chỉ số ester và hiệu suất thu hồi cao nhất lại ở EtOH 98°. Đối với xúc tác LPP thì cả 3 kết quả tốt nhất đều ở EtOH 98°.

Khi khảo sát tốc độ khuấy: cố định các yếu tố tìm được và theo giả thiết, thay đổi tốc độ khuấy từ 150 đến 400 (vòng/phút). Mỗi giá trị cách nhau 50 (vòng/phút). Kết quả thu được như trong bảng 5.

Bảng 5: Kết quả khảo sát xúc tác LCR và LPP theo tốc độ khuấy

Tốc độ khuấy (vòng/phút)	LCR			LPP		
	HS thô (%)	Chỉ số ester	HS thu hồi (%)	HS thô (%)	Chỉ số ester	HS thu hồi (%)
150	28,37	1,73±0,155 ^a	0,27	33,03	0,65±0,2829 ^a	0,17
200	28,26	4,06±0,1507 ^b	0,52	39,11	4,02±0,3453 ^b	0,53
250	33,17	5,64±0,2364 ^c	0,71	33,52	3,18±0,4901 ^c	0,46
300	25,34	5,46±0,225 ^c	0,68	34,36	3,51±0,3754 ^{b,c}	0,47
400	25,81	5,29±0,2714 ^c	0,64	31,48	0,33±0,2425 ^a	0,12

* Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi những chữ cái giống nhau thì khác nhau không có ý nghĩa theo phân tích thống kê ANOVA ($\alpha = 0,05$).

Kết quả cho thấy xúc tác LCR hiệu suất thô, chỉ số ester và hiệu suất thu hồi cao nhất lại ở 250 (vòng/phút) và xúc tác LPP thì tốt nhất ở 200 (vòng/phút).

Khi khảo sát hàm lượng đệm: cố định các yếu tố tìm được và theo giả thiết, thay đổi hàm lượng đệm từ 0,5 đến 3 (g). Mỗi giá trị cách nhau 0,5 (g). Kết quả thu được như trong bảng 6.

Bảng 6: Kết quả khảo sát xúc tác LCR và LPP theo hàm lượng đệm

m(g)	LCR			LPP		
	HS thô (%)	Chỉ số ester	HS thu hồi (%)	HS thô (%)	Chỉ số ester	HS thu hồi (%)
0,5	31,23	2,99±0,2479 ^a	0,39	29,12	-0,07±0,3509 ^a	0,07
1,0	34,78	4,01±0,1793 ^b	0,50	37,27	4,13±0,3009 ^{b,c}	0,52
1,5	38,93	5,48±0,1858 ^c	0,67	42,18	3,80±0,3522 ^b	0,50
2,0	47,12	5,93±0,0577 ^d	0,73	48,73	4,27±0,1039 ^c	0,56
2,5	50,18	3,81±0,2536 ^b	0,48	57,90	4,90±0,2691 ^d	0,59
3,0	0,00	0,00±0,00 ^c	0,00	0,00	0,00±0,000 ^a	0,00

* Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi những chữ cái giống nhau thì khác nhau không có ý nghĩa theo phân tích thống kê ANOVA ($\alpha = 0,05$).

Kết quả cho thấy đối với xúc tác LCR hiệu suất thô cao nhất ở 2,5 g, nhưng chỉ số ester và hiệu suất thu hồi cao nhất lại ở 2 g. Đối với xúc tác LPP thì cả 3 kết quả tốt nhất đều ở 2,5 g.

Khi khảo sát hàm dầu dừa: cố định các yếu tố tìm được và theo giả thiết, thay đổi hàm lượng dầu dừa từ 7 đến 9 (g). Mỗi giá trị cách nhau 0,5 (g). Kết quả thu được như trong bảng 7.

Bảng 7: Kết quả khảo sát xúc tác LCR và LPP theo hàm lượng dầu

m(g)	LCR			LPP		
	HS thô (%)	Chỉ số ester	HS thu hồi (%)	HS thô (%)	Chỉ số ester	HS thu hồi (%)
7,0	52,60	3,15±0,326 ^a	0,40	51,42	2,43±0,2194 ^a	0,32
7,5	52,96	4,12±0,00 ^b	0,51	52,12	2,10±0,1386 ^a	0,30
8,0	56,83	6,11±0,2488 ^c	0,71	56,69	4,66±0,1762 ^b	0,57
8,5	56,26	5,70±0,127 ^d	0,69	58,62	5,76±0,4826 ^b	0,66
9,0	56,78	5,98±0,1617 ^{c,d}	0,72	56,75	4,46±0,3051 ^c	0,52

* Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi những chữ cái giống nhau thì khác nhau không có ý nghĩa theo phân tích thống kê ANOVA ($\alpha = 0,05$).

Kết quả cho thấy đối với xúc tác LCR hiệu suất thô và chỉ số ester cao nhất ở 8 g, hiệu suất thu hồi ở 8 g \approx 9 g. Đối với xúc tác LPP thì cả 3 kết quả tốt nhất đều ở 8,5 g.

Khi khảo sát hàm lượng enzyme: cố định các yếu tố khác và thay đổi hàm lượng enzyme từ 0,1 đến 0,25 (g). Mỗi giá trị cách nhau 0,05 (g) và xúc tác LCR có thêm 0,12 g. Kết quả thu được như trong bảng 8.

Bảng 8: Kết quả khảo sát xúc tác LCR và LPP theo hàm lượng enzyme

m(g)	LCR			LPP		
	HS thô (%)	Chỉ số ester	HS thu hồi (%)	HS thô (%)	Chỉ số ester	HS thu hồi (%)
0,10	44,56	3,26 \pm 0,2201 ^a	0,39	41,09	1,66 \pm 0,138+	0,23
0,12	56,01	5,87 \pm 0,1617 ^b	0,68	-	-	-
0,15	57,69	5,90 \pm 0,0907 ^b	0,70	46,50	3,52 \pm 0,0404 ^b	0,44
0,20	56,83	5,43 \pm 0,1587 ^c	0,62	59,64	5,65 \pm 0,1206 ^c	0,67
0,25	56,26	5,01 \pm 0,193 ^d	0,57	59,42	4,25 \pm 0,0231 ^d	0,51
0,30	56,78	5,53 \pm 0,1905 ^c	0,65	58,50	4,75 \pm 0,1706 ^c	0,56

* Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi những chữ cái giống nhau thì khác nhau không có ý nghĩa theo phân tích thống kê ANOVA ($\alpha = 0,05$).

Kết quả cho thấy đối với xúc tác LCR hiệu suất thô và chỉ số ester cao nhất ở 8 g, hiệu suất thu hồi ở 8 g \approx 9 g. Đối với xúc tác LPP thì cả 3 kết quả tốt nhất đều ở 8,5 g.

Khi khảo sát thời gian: cố định tất cả các yếu tố tìm được và thay đổi thời gian từ 4 h đến 8 h. Mỗi giá trị cách nhau 1 h. Kết quả thu được như trong bảng 9.

Bảng 9: Kết quả khảo sát xúc tác LCR và LPP theo thời gian

t (h)	LCR			LPP		
	HS thô (%)	Chỉ số ester	HS thu hồi (%)	HS thô (%)	Chỉ số ester	HS thu hồi (%)
4	56,69	6,11 \pm 0,1097 ^a	0,70	58,54	5,24 \pm 0,3073 ^a	0,63
5	57,77	6,34 \pm 0,1706 ^a	0,74	62,55	6,01 \pm 0,0907 ^b	0,73
6	59,72	7,03 \pm 0,197 ^b	0,81	57,04	5,53 \pm 0,2139 ^a	0,68
7	58,21	6,06 \pm 0,1852 ^c	0,73	58,08	5,63 \pm 0,1206 ^{a,b}	0,67
8	58,29	6,45 \pm 0,2829 ^a	0,75	56,14	4,30 \pm 0,3341 ^c	0,52

* Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi những chữ cái giống nhau thì khác nhau không có ý nghĩa theo phân tích thống kê ANOVA ($\alpha = 0,05$).

Kết quả cho thấy đối với xúc tác LCR hiệu suất thô và chỉ số ester và hiệu suất thu hồi cao nhất ở 6 h. Đối với xúc tác LPP thì ở 5 h.

Khi khảo sát tăng quy mô: Cố định các yếu tố tối ưu khảo sát được và thay đổi hàm lượng hỗn hợp tham gia phản ứng theo tỷ lệ từ 1; 1,5 đến 2 lần (g). Kết quả thu được như trong bảng 10.

Bảng 10: Kết quả khảo sát xúc tác LCR và LPP theo quy mô

Lần tăng	LCR			LPP		
	HS thô (%)	Chỉ số ester	HS thu hồi (%)	HS thô (%)	Chỉ số ester	HS thu hồi (%)
1,0	59,74	6,61±0,2685 ^a	0,79	61,21	6,18±0,1447 ^a	0,74
1,5	55,68	8,43±0,2581 ^b	0,63	54,89	7,76±0,2721 ^b	0,61
2,0	56,49	8,94±0,2815 ^b	0,51	56,53	9,12±0,1328 ^c	0,52

* Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi những chữ cái giống nhau thì khác nhau không có ý nghĩa theo phân tích thống kê ANOVA ($\alpha = 0,05$).

Theo hình và bảng ta thấy hiệu suất phản ứng giảm dần khi tăng quy mô phản ứng từ 1;1,5 đến 2 lần. Tuy nhiên, hiệu suất thô của tăng 2 lần lại cao hơn so với tăng 1,5 lần.

3.3 Kết quả phân tích sản phẩm biodiesel

Phân tích mẫu dầu dừa bằng phương pháp GC theo AOAC 2010 (969.33) và các mẫu sản phẩm transester hóa bằng phương pháp GC/FID. Kết quả phân tích cho thấy tổng glycerol ở dạng glyceride trong mẫu trước phản ứng là 8,98%, glycerol tự do và glycerol tổng số (glycerol tự do + tổng glycerol dạng liên kết (tổng monoglyceride + tổng diglyceride + tổng triglyceride)) trong mẫu sau phản ứng với xúc tác LCR và LPP (Bảng 11).

Bảng 11: % glycerol tự do, liên kết và tổng số trong mẫu biodiesel

Enzyme	GC/FID			EN14214 giới hạn tối đa	
	Glycerol tự do	Tổng glycerol dạng liên kết	Glycerol tổng số	Glycerol tự do	Glycerol tổng số
LCR	0,19%	0,525%	0,719%	0,02%	0,25%
LPP	0,21%	0,505%	0,719%		

Thành phần phần trăm glycerol tự do cao chứng tỏ sản phẩm biodiesel hình thành nhiều. Sản phẩm biodiesel được xúc tác bởi LPP là 0,21% cao hơn so với LCR là 0,19%. Điều này trái ngược với nghiên cứu so sánh hoạt tính trên cơ chất dầu dừa của 2 loại enzyme đã được đề cập, nghĩa là khi so sánh khả năng hoạt động của enzyme bằng phương pháp chuẩn và cơ chất chuẩn sẽ không còn phù hợp nữa khi ứng dụng enzyme cho một phản ứng khác cụ thể là phản ứng transester hóa.

So sánh với tiêu chuẩn châu Âu cho thấy hàm lượng glycerol tự do và glycerol tổng số thực hiện ở điều kiện khảo sát chưa đạt chuẩn về chất lượng vì hàm lượng glycerol tổng số khá cao (0,719%) > (0,25%) của EN14214 (Funda *et al.*, 2007).

Và kết quả thành phần của các ethyl ester và các acid tự do có trong mẫu sản phẩm biodiesel được phân tích như bảng 12 và 13.

Bảng 12: Kết quả phân tích sản phẩm biodiesel xúc tác bởi LPP bằng phương pháp GC/FID

Hàm lượng acid béo tự do trong mẫu	%	Hàm lượng ethyl ester trong mẫu	%
Octanoic acid	0,1966	Octanoic acid,ethyl ester	0,119
Decanoic acid	0,1184	Decanoic acid,ethyl ester	0,056
Dodecanoic acid	0,4340	Dodecanoic acid,ethyl ester	0,181
Tetradecanoic acid	0,1302	Tetradecanoic acid,ethyl ester	0,070
Hexadecanoic acid	0,0360	-	-
Tổng	0,9152	Tổng	0,426

Bảng 13: Kết quả phân tích sản phẩm biodiesel xúc tác bởi LCR bằng phương pháp GC/FID

Hàm lượng acid béo tự do trong mẫu	%	Hàm lượng ethyl ester trong mẫu	%
Octanoic acid	0,112	Octanoic acid,ethyl ester	0,335
Decanoic acid	0,064	Decanoic acid,ethyl ester	0,140
Dodecanoic acid	0,224	Dodecanoic acid,ethyl ester	0,268
Tetradecanoic acid	0,024	Tetradecanoic acid,ethyl ester	0,028
Tổng	0,424	Tổng	0,771

Qua bảng 12 và 13 ta thấy lượng acid sinh ra cũng khá lớn gần như tương đương với lượng ethyl ester tương ứng với acid đó sinh ra. Và chỉ có chủ yếu một số acid như octanoic acid, decanoic acid, dodecanoic acid, tetradecanoic acid cùng với ester tương ứng được chuyển hóa.

Như vậy, độ chuyển hóa (%) theo phân tích GC/FID của 2 sản phẩm biodiesel được xúc tác bởi LCR và LPP ở điều kiện khảo sát tốt nhất lần lượt là: 0,426% và 0,771%. Khi đối chiếu với phương pháp chuẩn độ căn cứ vào ester thì hiệu suất là LCR = 0,81% và LPP = 0,73% nên độ chuyển hóa (%) thực tế là LCR = 0,62% và LPP = 0,31%. Thêm vào đó, phương pháp chuẩn độ cũng khá khả quan với độ lệch chuẩn (độ nhạy) có thể chấp nhận được là $SD_{LCR} = 0,1036$; $SD_{LPP} = 0,0813$.

4 KẾT LUẬN

Từ kết quả thu được của bài nghiên cứu này, một số kết luận có thể rút ra như sau:

- Thiết lập được điều kiện cho phản ứng transester hóa xúc tác enzyme lipase dạng tự do, nhưng hiệu suất thu hồi rất thấp.
- Phương pháp xác định chỉ số ester để xác định hiệu suất của phản ứng cũng tương đối tốt.
- So sánh với tiêu chuẩn EN 14214 châu Âu cho thấy sản phẩm chưa đạt chuẩn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Funda Yagiz, Dilek Kazan and A. Nilgun Akin (2007), Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites, *Chemical Engineering Journal* 134, 262–267.
- Hà Duyên Tư (2009), Phân tích hóa học thực phẩm, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- Hong-yan Zeng, Kai-bo Liao, Xin Deng, He Jiang and Fan Zhang (2009), Characterization of the lipase immobilized on Mg–Al hydrotalcite for biodiesel, *Biotechnology Institute, College of Chemical Engineering, Xiangtan University, Xiangtan 411105, Hunan, Chinese Academy of Sciences, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Kunming 650223, Yunnan, China, Process Biochemistry*, V. 4, No. 3, pp. 791–798.
- Julio C. Santos, Gisele F. M. Nunes, Ana B. R. Moreira, Victor H. Perez and Heizir F. de Castro (2007), Characterization of *Candida rugosa* Lipase Immobilized on Poly(N-methylolacrylamide), and Its Application in Butyl Butyrate Synthesis, *Chem. Eng. Technol, Engineering School of Lorena, University of São Paulo, Lorena, Brazil*.
- Lê Thị Thanh Hương (2011), Nghiên cứu tổng hợp biodiesel bằng phản ứng alcol phân tử mỡ cá da trơn ở ĐBSCL trên xúc tác acid và base, Luận án tiến sĩ kỹ thuật, Đại học Bách Khoa TP. HCM.
- Wei Du, Yuanyuan Xu, Dehua Liu and Jing Zeng (2004), Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 30, 125–129.