

TRÍCH LY VÀ PHÂN TÍCH THÀNH PHẦN CHẤT BÉO TRUNG TÍNH (NEUTRAL LIPIDS) TRONG BÙN HOẠT TÍNH

Huỳnh Liên Hương¹ và Hồ Quốc Phong¹

¹ Bộ môn Công nghệ Hóa học, Khoa Công nghệ, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 08/01/2013

Ngày chấp nhận: 19/06/2013

Title:

Isolation and analysis of Neutral lipids from activated sludge

Từ khóa:

Bùn hoạt tính, chất béo trung tính, trích ly

Keywords:

Activated sludge, neutral lipids, biodiesel

ABSTRACT

Sewage sludge with its high lipid content is a potential raw material for producing biodiesel. Activated sludge, which also contains large amount of phospholipids originated from cell membranes of microorganism, recently has attracted considerable interests as a potential source of raw material for biodiesel production. In this study, oil was firstly extracted from dry sludge which was obtained from Taipei municipal waste water treatment plant, dewaxed and degummed, and then titration and saponification were employed to separate saponifiable lipids from the unsaponifiables. Compositions of the neutral lipids obtained, as well as fatty acid profiles of the neutral lipids were investigated.

TÓM TẮT

Bùn hoạt tính với hàm lượng chất béo tích trữ cao là nguồn nguyên liệu thô tiềm năng cho việc sản xuất biodiesel. Ngoài ra, trong bùn hoạt tính cũng có chứa một lượng lớn các phospholipids từ màng tế bào của các vi sinh vật. Chính vì vậy, việc sử dụng các nguồn chất béo trích ly từ bùn hoạt tính làm nguồn nguyên liệu mới cho sản xuất biodiesel đã và đang thu hút nhiều sự quan tâm của các nhà khoa học trên thế giới. Trong nghiên cứu này, dầu /chất béo sẽ được trích ly từ bùn sau khi đã sấy khô. Bùn hoạt tính sử dụng cho nghiên cứu được lấy từ nhà máy xử lý nước thải dân dụng ở Taipei. Dầu sau khi trích ly sẽ được xử lý loại sáp và gum, sau đó chuẩn độ và xà phòng hóa để phân tách các thành phần xà phòng hóa và các thành phần không xà phòng hóa. Thành phần cơ bản của các chất béo trung tính cũng như thông tin về cấu trúc mạch cacbon của chúng sẽ được khảo sát.

1 GIỚI THIỆU

Cùng với sự phát triển mạnh mẽ của khoa học và kỹ thuật, nhân loại đang đứng trước nguy cơ cạn kiệt nguồn nhiên liệu khoáng sản. Chính vì thế, việc tìm kiếm các nguồn nguyên liệu thay thế có ý nghĩa vô cùng quan trọng. Gần đây, các nguồn năng lượng sinh học có

nguồn gốc từ các sinh khối, đặc biệt là biodiesel đã và đang thu hút nhiều sự quan tâm của hầu hết tất cả các nước trên thế giới bởi vì biodiesel có thể được sử dụng trực tiếp hoặc phối trộn với petro-diesel với bất kỳ tỉ lệ nào mà không cần đòi hỏi phải có sự thay đổi trong kết cấu của động cơ. Ngoài ra, biodiesel còn có

khả năng phân hủy sinh học, không độc hại và thân thiện với môi trường (Ma và Hana, 1999).

Biodiesel là hỗn hợp este của các axit béo với rượu đơn, thông thường là methanol. Biodiesel chủ yếu được tạo thành từ quá trình chuyển hóa este (transesterification) hay este hóa (esterification) giữa các rượu đơn (methanol) với dầu thực vật hay các mỡ động vật. Tuy nhiên, việc sử dụng các nguồn nguyên liệu đất liền có nguồn gốc thực phẩm trên là nguyên nhân chính dẫn đến giá thành của biodiesel còn khá cao so với các nhiên liệu truyền thống. Giá nguyên liệu cho sản xuất biodiesel từ các dầu động thực vật có thể chiếm đến trên 80% tổng chi phí của quá trình sản xuất (Ma và Hanna, 1999). Vì vậy, để gia tăng tính cạnh tranh cho biodiesel và để có thể nhân rộng, phát triển sản xuất đại trà biodiesel, việc tìm kiếm các nguồn nguyên liệu thay thế có giá thành thấp là một trong những mục tiêu quan trọng.

Bùn hoạt tính là chất thải ở dạng rắn hoặc bán rắn được tạo thành từ các quá trình xử lý sinh học nước thải. Những nghiên cứu trước đây cho thấy bùn hoạt tính có khả năng tích lũy chất béo lên đến khoảng 20% trọng lượng bùn (Dufreche *et al.*, 2007) và lượng chất béo trên có thể được tận dụng để chuyển hóa sang biodiesel.

Mục tiêu của nghiên cứu trên là trích ly và phân tích thành phần các chất béo trung tính trong bùn hoạt tính nhằm khảo sát và đánh giá khả năng sử dụng bùn hoạt tính làm nguồn nguyên liệu thay thế cho các nguồn nguyên liệu truyền thống trong sản xuất biodiesel.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên vật liệu và hóa chất

Bùn hoạt tính đã loại nước sơ bộ được thu gom từ nhà máy xử lý nước thải dân dụng ở thành phố Taipei, Đài Loan. Các mẫu chuẩn biodiesel (methyl esters của các axit béo) được cung cấp bởi Công ty hóa chất Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). Dung môi và hóa chất sử dụng trong trích ly và phân tích thuộc chuẩn HPLC hoặc chuẩn phân tích theo qui định trong hóa học.

2.2 Xử lý mẫu

Bùn hoạt tính sau khi đã được loại nước sơ bộ, thông thường vẫn còn chứa từ 80-90% lượng nước sẽ được tiếp tục phơi khô để loại bớt nước. Mẫu bùn khô sau đó sẽ được nghiền mịn bằng máy nghiền bi và nung trong lò sấy ở 105 °C, 24 h để loại trừ hầu hết nước trước khi tiến hành trích ly dầu.

2.3 Trích ly và làm tinh khiết dầu

Mẫu bùn sau khi được nghiền mịn và sấy khô sẽ được sử dụng để trích ly dầu bằng phương pháp soxhlet. Dung môi sử dụng là hexane trong 24h ở nhiệt độ sôi của hexane. Sau trích ly, dung môi sẽ được thu hồi bằng thiết bị cô quay và tái sử dụng. Dầu thô sau khi tách loại dung môi sẽ được loại sáp và gum trước khi tiến hành phân tích bằng phương pháp kết tủa acetone. Dầu bùn thô sẽ được hòa tan trong acetone ở 60°C cho đến khi thu được dung dịch trong suốt. Hỗn hợp sau đó được để nguội đến nhiệt độ phòng và làm lạnh ở 5 °C trong vòng 24 h. Sau 24 h, hỗn hợp sẽ được lọc lạnh trong điều kiện chân không để phân tách phần dung dịch và phần rắn kết tủa (chủ yếu là sáp và gum). Dầu sau khi loại sáp, gum và tách dung môi sẽ được lưu trữ ở -20°C.

2.4 Xác định thành phần lipid trung tính

Dầu bùn sau khi đã loại sáp và gum sẽ được chuẩn độ với dung dịch KOH trong ethanol (1N) nhằm loại các axit béo tự do (FFA). Sau chuẩn độ, các axit béo ở dạng muối với kali (FFA-K) sẽ được phân tách bằng phương pháp trích ly lỏng- lỏng. Diethyl ether và nước cất sẽ lần lượt cho vào phễu chiết. Phần dầu bùn không phản ứng sẽ hòa tan trong diethyl ether và phân tách với phần muối của axit béo trong pha nước. Axit béo trong pha nước sẽ được thu hồi và chuyển hóa sang dẫn xuất methyl este bằng cách cho phản ứng lần lượt với axit sulfuric đậm đặc và phản ứng với dung dịch boron trifluoride trong methanol (14-15%) ở 60°C.

Pha dầu trong hexane sau phân tách khỏi pha nước sẽ được loại trừ dung môi và xà phòng hóa bằng dung dịch KOH 9 N trong 24 h ở 60°C. Sau phản ứng, thành phần xà phòng

hóa và không xà phòng hóa cũng sẽ được phân tách bằng phương pháp trích ly lỏng-lỏng với diethyl ether và nước. Thành phần xà phòng hóa trong pha nước chủ yếu là muối của các glyceride trong dầu bunn với kali sẽ được thu hồi và chuyển hóa sang dẫn xuất methyl este cũng bằng cách cho phản ứng lần lượt với axit sulfuric đậm đặc và phản ứng với dung dịch boron trifluoride 14 - 15% trong methanol ở 60°C.

Thành phần mạch cacbon cấu trúc nên các axit béo cũng như của các glyceride trong mẫu dầu sẽ được phân tích gián tiếp thông qua dẫn xuất methyl este tương ứng của chúng bằng phương pháp sắc ký.

2.5 Phân tích bằng sắc ký bản mỏng và sắc ký khí

Sắc ký bản mỏng được sử dụng để định tính các thành phần cơ bản trong mẫu dầu trích ly từ bunn. Pha động sử dụng cho bản mỏng là hỗn hợp dung môi bao gồm hexane: ethyl acetate: acetic acid với tỉ lệ là 80:20: 1 (v / v / v). Các thành phần trong dầu sau khi phân tách sẽ được thể hiện trên bản mỏng bằng tác nhân hiện màu đặc trưng. Ferric chloride được sử dụng trong trường hợp này.

Dầu bunn và cấu trúc mạch cacbon của các axit béo tự do và các glyceride trong dầu bunn sẽ được xác định bằng phương pháp sắc ký khí.

Đối với dầu bunn, phân tích sắc ký được thực hiện trên máy sắc ký Shimadzu GC 2010 (sản xuất bởi Nhật Bản) với đầu dò FID; sử dụng cột sắc ký DB – 5HT (5% phenyl – methylpolysiloxane (15 m x 0.32 mm i.d., Aligent, CA, USA). Điều kiện nhiệt cho quá trình phân tích là: nhiệt độ đầu dò và đầu tiêm là 370°C. Nhiệt độ ban đầu của cột được cài đặt ở 80°C, sau đó gia nhiệt lên 180°C với tốc độ 15°C / phút, tiếp tục gia nhiệt đến 185°C với tốc độ 1°C / phút, đến 215°C với tốc độ 15°C / phút; 250°C với tốc độ 2°C / phút; 325°C với tốc độ 15°C / phút; 365°C với tốc độ

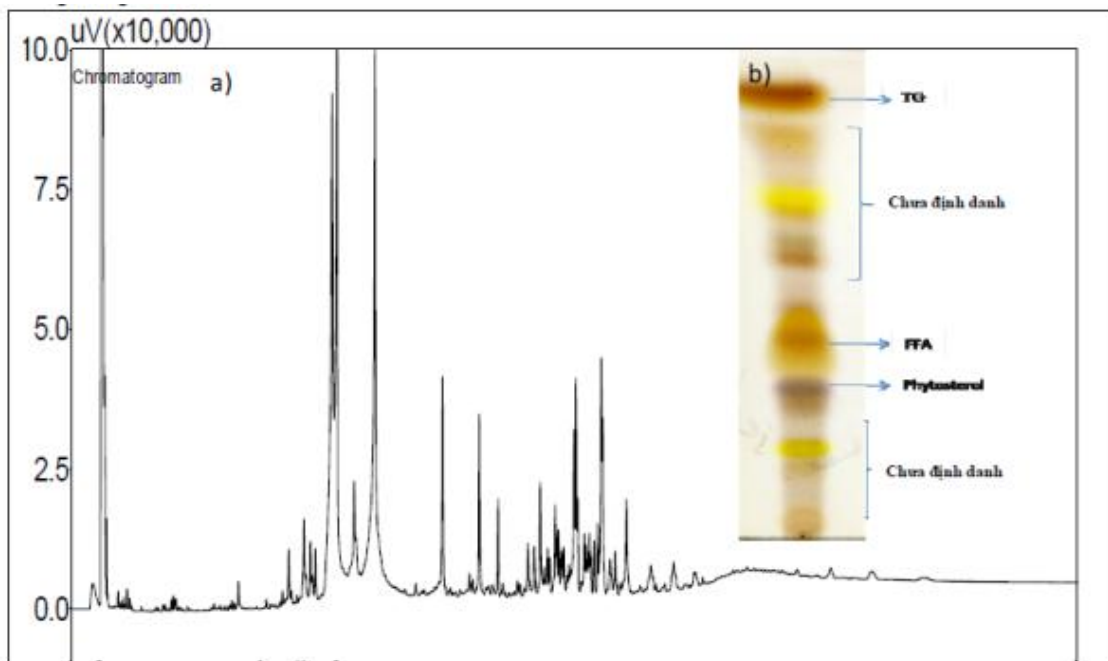
50°C / phút và giữ ở nhiệt độ trên trong 6,83 phút. Tổng thời gian phân tích là 51 phút.

Để xác định với cấu trúc mạch cacbon của các axit béo tự do và các glyceride, phân tích sắc ký được thực hiện trên máy sắc ký hiệu China 8700F (sản xuất bởi Đài Loan) với đầu dò FID; sử dụng cột sắc ký Rtx-2330 - 10% cyanopropylphenyl - 90% biscyanopropyl polysiloxane (30 m x 0.25 mm i.d., Supleco, Bellefonte, PA). Điều kiện nhiệt cho quá trình phân tích là: nhiệt độ đầu dò và đầu tiêm là 250°C. Nhiệt độ ban đầu của cột được cài đặt ở 150°C, giữ trong vòng 2 phút sau đó được gia nhiệt lên đến 245°C với tốc độ 5°C / phút và giữ ở 245°C trong vòng 10 phút.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Sắc ký bản mỏng và sắc ký khí của dầu bunn sau khi loại sáp và gum

Việc định tính các thành phần cơ bản trong mẫu dầu bunn đã loại sáp và gum được thực hiện thông qua sắc ký khí và sắc ký bản mỏng. Sắc ký bản mỏng và sắc ký khí cho phép nhận danh được một số thành phần cơ bản mà ta quan tâm trong điều kiện phân tích nhất định. Kết quả phân tích cho thấy có sự hiện diện của rất nhiều thành phần vi lượng bên cạnh các chất béo trung tính. Một số thành phần đặc thù có thể xác định được thông qua màu sắc đặc trưng như các phytosterols, các axit béo tự do hay các triglyceride trên bảng mỏng. Tuy nhiên có thể nhận thấy rằng việc phân tích và định danh từng chi tiết từng thành phần đòi hỏi nhiều thời gian và không cần thiết vì mục tiêu chính của nghiên cứu là tập trung vào các thành phần chất béo trung tính có khả năng chuyển hóa thành biodiesel. Từ kết quả phân tích có thể nhận thấy được có sự hiện diện của các chất béo trung tính trong mẫu dầu bunn. Đây chính là đối tượng mà ta quan tâm và để đánh giá được tính khả thi trong việc sử dụng các chất béo trên thì việc phân tích định lượng và cấu trúc mạch của các thành phần trên là cần thiết. Hình 1a và 1b thể hiện kết quả sắc ký khí (a) và sắc ký bản mỏng (b) của dầu bunn trích ly sau khi đã loại sáp và gum.



Hình 1: Kết quả sắc ký khí (a) và sắc ký bản mỏng (b) của dầu bùn trích ly sau khi đã loại sáp và gum

3.2 Thành phần cơ bản của các lipid trung tính

Bảng 1 trình bày thành phần cơ bản của chất béo trung tính trong dầu bùn trích ly bao gồm các axit béo tự do, các glyceride (monoglyceride, diglyceride, triglyceride) và các thành phần không bị xà phòng hóa. Kết quả định lượng cho thấy trên các thành phần béo trung tính chiếm trên 65% tổng các thành phần trong dầu bùn trích ly trong đó 50% là các axit béo tự do, 50% còn lại là các glyceride. Đây cũng là một trong những điểm khác biệt cơ bản giữa dầu bùn và các dầu thực vật, thông thường ở các dầu thực vật: 90% dầu là các glyceride, phần còn lại là các axit béo tự do và các thành phần mang hoạt tính khác. Sự hiện diện của chất béo trong bùn hoạt tính được giải thích là từ sự hấp thụ và tích lũy các chất béo của vi sinh vật trong giai đoạn xử lý sinh học của nước thải, từ các thành phần cấu tạo nên màng tế bào hoặc là các sản phẩm tạo thành từ các quá trình sinh tổng hợp trong tế bào vi sinh vật (Chipasa và Medrzycka, 2008; Seltmann và Holst, 2002). Ngoài ra, hàm lượng của các axit béo trong dầu chiếm khá cao có thể được giải thích dựa trên thuyết

chuyển hóa chất béo trong bùn sinh học của Dueholm *et al.* (2001) và Hwu *et al.* (1998): axit béo tự do là sản phẩm của quá trình thủy phân các glycerides bằng các enzyme ngoại bào chủ yếu là lipase tiết ra từ các vi sinh vật và các axit béo trên có khả năng phân hủy kém hơn các hợp chất hữu cơ khác như đường hoặc các amino axit do đó chúng có khuynh hướng tích lũy tăng dần trong suốt quá trình xử lý nước thải.

Bảng 1: Thành phần chất béo trung tính trong dầu bùn

Thành phần	Phần trăm khối lượng (wt. %)
Axit béo tự do	36.38 ± 1.31
Glyceride (Thành phần xà phòng hóa)	30.37 ± 0.47
Thành phần không xà phòng hóa	32.95 ± 0.85

3.3 Cấu trúc mạch cacbon của chất béo trung tính trong dầu bùn

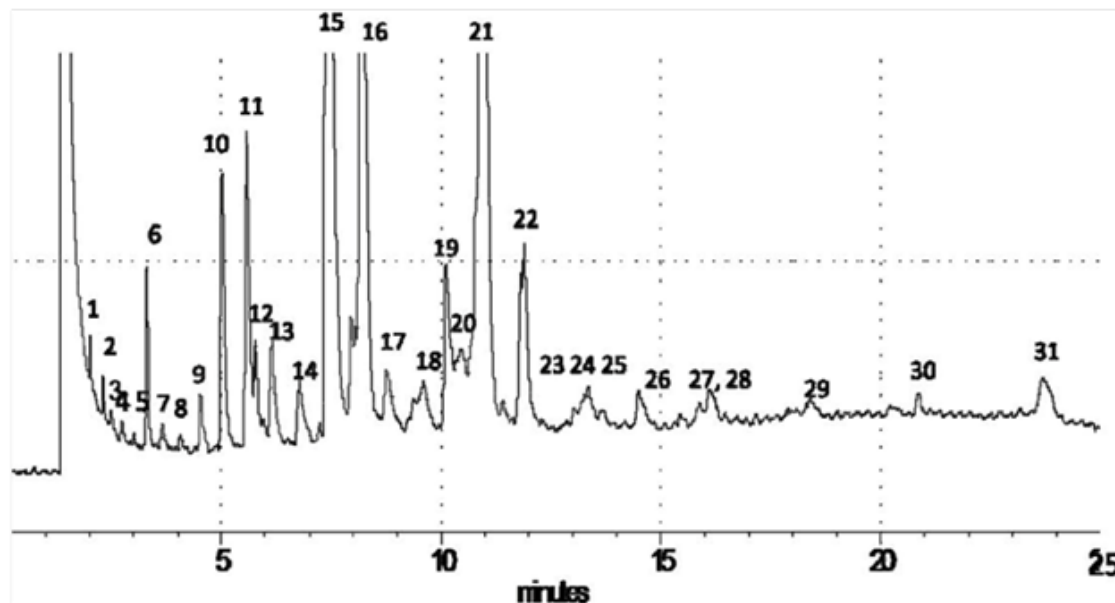
Kết quả sắc ký cấu trúc mạch cacbon của các thành phần trung tính trong dầu bùn bao gồm các axit béo tự do và các glyceride được minh họa trong Hình 2 và 3 và thể hiện chi tiết trong Bảng 2. Ít nhất 21 loại mạch carbon

ương ứng cấu trúc nên các axit béo tự do và các glyceride được xác định. Các axit béo tự do và glycerides trong dầu bùn có mạch cacbon từ C10 cho đến C20 với mức độ bão hòa khác nhau trong đó thành phần chiếm ưu thế là các axit béo hay các glyceride có mạch cacbon 16 C (palmitic C16:0 và palmitoleic axit C16:1) với hàm lượng tương ứng là 47% và 38% cho axit béo và glyceride. Tiếp theo là các thành phần có mạch cacbon 18 C (stearic và các đồng phân) với thành phần tương ứng là 33% và 32% cho axit béo và glyceride. Các thành phần có mạch cacbon khác hiện diện chủ yếu ở dạng vi lượng.

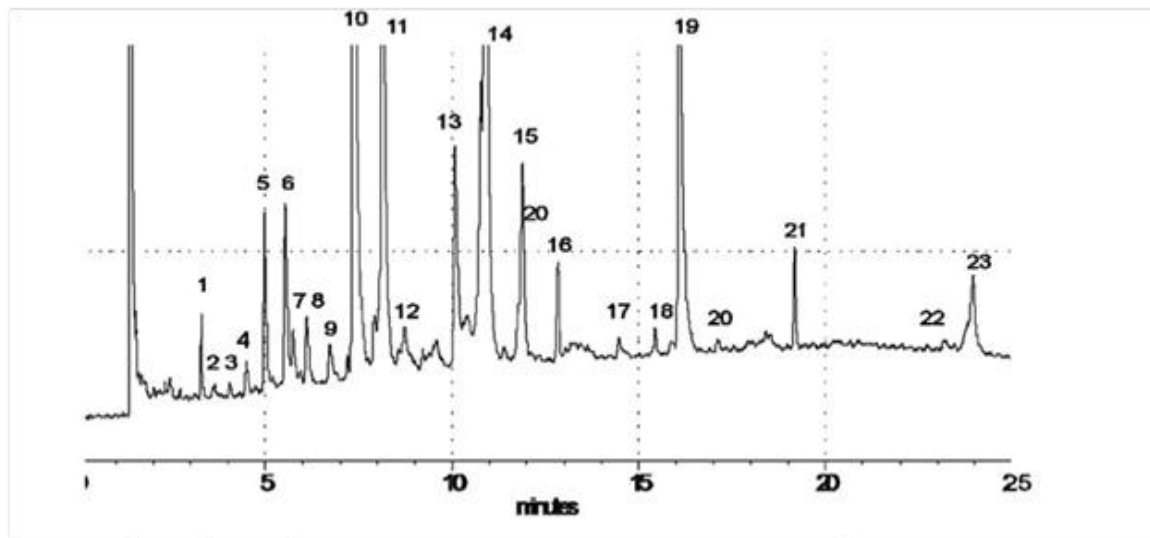
Sự đa dạng trong mạch cacbon của các chất béo trên được giải thích dựa trên nguồn gốc của nước thải được xử lý. Nguồn nước thải sử dụng ở đây có nguồn gốc từ nước thải dân dụng nên là sự tập hợp của nhiều nguồn chất thải có thành phần khác nhau. Sự chiếm ưu thế của các thành phần có mạch cacbon C16 và C18 được cho là xuất phát từ các dầu thực vật hay các mỡ động vật trong các thức ăn thừa, từ nước thải nấu ăn hoặc từ các sản phẩm chuyển hóa trong cơ thể (Quéméneur và Marty, 1994). Bên cạnh các thành phần chính, sự hiện diện

của các thành phần vi lượng trong dầu bùn là hoàn toàn hợp lý dựa trên thuyết đa dạng sinh học trong hệ bùn sinh học: “sự hiện diện của các chất béo trong bùn với mạch cacbon từ 12 đến 20C thậm chí lên đến 28C không phải là ngoại lệ mà là cần thiết cho hoạt động sống và sự tồn tại của các vi sinh vật trong bùn” (Seltman và Holst, 2002). Ngoài ra, qua kết quả phân tích ta cũng nhận thấy rằng các axit béo và các glyceride trong dầu bùn có mạch cacbon chủ yếu là mạch chẵn. Điều này là do quá trình phân hủy sinh học diễn ra trong bùn hoạt động theo cơ chế β - oxi hóa trong đó mạch cacbon sẽ bị cắt đứt 2C trong mỗi lần dẫn đến mạch cacbon của các chất béo trên sẽ ngắn đi 2C (Chipasa và Medrzycka, 2008).

Nhìn chung, các chất béo trung tính trong dầu bùn chủ yếu có mạch cacbon C16 và C18 bão hòa hoặc chưa bão hòa một nối đôi. Với cấu tạo trên, lipid trung tính trong dầu bùn được đánh giá cho sản phẩm biodiesel có độ nhớt hợp lý và mức độ oxi hóa thấp. Đây là một trong những ưu điểm của dầu bùn khi được lựa chọn làm nguồn nguyên liệu cho sản xuất biodiesel.



Hình 2: Đồ thị sắc ký cấu tạo mạch carbon của các axit béo tự do



Hình 3: Đồ thị sắc ký cấu tạo mạch carbon của các glycerides trong dầu bunn đã loại sáp và gum

Bảng 2: Thành phần mạch carbon cấu tạo nên các axit béo và glycerides trong dầu bunn sau 156 khi đã loại sáp và gum

Thành phần	Phần trăm diện tích (%)	
	Axit béo	Glyceride
Axit Capric (C10:0)	n.d.	0,22 ± 0,01
Axit Undecanoic (C11:0)	n.d.	0,13 ± 0,00
Axit Lauric (C12:0)	0,82 ± 0,00	0,80 ± 0,02
Axit Tridecanoic (C13:0)	0,09 ± 0,03	0,21 ± 0,00
Axit Myristic (C14:0)	1,94 ± 0,02	1,86 ± 0,11
Axit Myristoleic (C14:1)	1,00 ± 0,04	0,87 ± 0,02
Axit Pentadecanoic (C15:0)	1,05 ± 0,08	1,45 ± 0,09
Axit Palmitic (C16:0)	27,12 ± 0,00	21,79 ± 0,30
Axit Palmitoleic (C16:1)	19,83 ± 0,07	16,86 ± 0,16
Axit Heptadecanoic (C17:0)	0,85 ± 0,01	1,13 ± 0,01
Axit Stearic (C18:0)	2,95 ± 0,07	3,80 ± 0,11
Đồng phân của Axit Octadecenoic (C18:1)	26,80 ± 1,12	28,27 ± 0,89
Axit Linoleic (C18:2n6c)	3,08 ± 0,10	n.d.
Axit Cis-11-eicosenoic (C20:1)	0,17 ± 0,00	3,78 ± 0,07
Thành phần khác	14,3 ± 0,09	18,83 ± 1,09

n.d. : rất nhỏ, hầu như không có

4 KẾT LUẬN

Phân tích dầu trích ly từ bunn hoạt tính bằng hexane cho thấy trên 66% khối lượng dầu thu được là chất béo trung tính trong đó 50% là các axit béo tự do và 50% là các glyceride. Phân tích sắc ký cho thấy các chất béo trung tính có cấu trúc mạch cacbon từ C10 đến C20 trong đó các thành phần có mạch cacbon C16 và C18 là chủ yếu; các thành phần khác chỉ hiện diện dưới dạng vi lượng. Ngoài ra, các axit béo và các glyceride trong dầu bunn đa

phần ở dạng bão hòa hoặc chưa bão hòa có một nối đôi. Dựa trên cấu trúc mạch cacbon và mức độ chưa bão hòa của các chất béo trung tính trong dầu bunn có thể nhận xét rằng các dẫn xuất methyl este – biodiesel từ dầu bunn cho độ nhớt hợp lí và có mức độ oxi hóa thấp phù hợp với tiêu chuẩn quy định cho biodiesel. Từ đó có thể kết luận rằng dầu bunn là một trong những nguồn nguyên liệu tiềm năng thay thế cho các nguồn nguyên liệu truyền thống từ dầu/mỡ động thực vật cho quá trình sản xuất biodiesel.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chipasa, K. B. and Medrzycka, K. 2008. Characterization of the fate of lipids in activated sludge. *Journal of Environmental Science*. 20: 536-542.
2. Dueholm, T. E., Andreasen, K. H. and Nielsen, P. H. 2001. Transformation of lipids in activated sludge. *Water Science Technology*. 43: 165-172.
3. Dufreche, S., Hernandez, R., French, T., Sparks, D., Zappi, M. and Alley, E. 2007. Extraction of lipids from municipal wastewater plant microorganisms for production of biodiesel. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 84: 181-187.
4. Hwu, C.-S., Tseng, S.-K., Yuan, C.-Y., Kulik, Z. and Lettinga, G. 1998. Biosorption of long-chain fatty acids in UASB treatment process. *Water Research*. 32: 1571-1579.
5. Ma, F. and Hanna, M. A. 1999. Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*. 70: 1-15.
6. Quéméneur, M. and Marty, Y. 1994. Fatty acids and sterols in domestic wastewaters. *Water Research*. 28: 1217-1226.
7. Seltmann, G. and Holst, O., 2002. *The bacteria cell wall*, second ed. Springer-Verlag, Berlin. 283 pp.