

TỔNG HỢP VÀ ĐẶC TRƯNG XÚC TÁC ENZYMLIPASE CỐ ĐỊNH TRÊN NANO TỪ TÍNH ỨNG DỤNG CHO QUÁ TRÌNH CHUYỂN HÓA BIODIESEL TỪ DẦU ĐẬU NÀNH

PGS.TS Phạm Xuân Núi, KS. Nguyễn Ngọc Sơn, KS. Lê Thị Cúc
Đại học Mở - Địa chất

Tóm tắt

Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả đã tổng hợp các hạt nano từ tính chitosan- Fe_3O_4 bằng phương pháp đồng kết tủa sử dụng glutaraldehyde là tác nhân tạo liên kết ngang cho cố định hóa enzyme lipase. Enzyme lipase được cố định trên cơ sở tạo liên kết peptit thông qua cầu nối là glutaraldehyde với các hạt nano từ tính chitosan- Fe_3O_4 . Đặc trưng của hệ xúc tác được phân tích bằng các phương pháp nhiễu xạ tia X (XRD), hiển vi điện tử quét (SEM), hiển vi điện tử truyền qua (TEM) và phổ hồng ngoại (FT-IR). Qua đặc trưng của phương pháp cho thấy, enzyme lipase được cố định trên các hạt nano từ tính, các hạt có dạng vi cầu, với kích thước từ 12 - 15nm. Hệ xúc tác tổng hợp được sử dụng cho quá trình trao đổi ester hóa chéo thành methyl ester với độ chuyển hóa 93% trong 30 giờ phản ứng, ở nhiệt độ 40°C, sử dụng methanol cho quá trình phản ứng theo 3 giai đoạn và tỷ lệ mol dầu/methanol là 1:4.

1. Mở đầu

Trong công nghiệp sản xuất biodiesel, xúc tác đồng thể acid H_2SO_4 , bazơ gồm KOH, NaOH, kali alkoxide và natri alkoxide đã được sử dụng phổ biến cho quá trình transester hóa chéo dầu thực vật với methanol để tạo ra methyl ester của acid béo. Do gặp khó khăn trong việc thu hồi xúc tác đồng thể và xử lý nước thải nên chi phí sản xuất biodiesel tăng cao [1, 2]. Để khắc phục hạn chế này, công nghệ xúc tác dị thể đã được nghiên cứu, song ít được ứng dụng trong công nghiệp do giá thành cao, quy trình điều chế phức tạp, hiệu suất chưa cao và đặc biệt rất nhạy với nước và acid béo tự do trong dầu thực vật. Để tiến tới công nghệ xúc tác “xanh” - xúc tác sinh học sử dụng enzyme cho phản ứng ester hóa chéo dầu thực vật đã và đang được nghiên cứu [3, 4]. Sử dụng enzyme tự do để điều chế diesel sinh học thường bị cản trở do thiếu sự ổn định trong điều kiện phản ứng và những khó khăn trong quá trình tái sinh, thu hồi từ hỗn hợp phản ứng nên việc cố định hóa enzyme trên các hạt nano từ tính là phương pháp hiệu quả nhằm cải thiện tính ổn định của enzyme và thực hiện được quy trình tái sử dụng xúc tác [5 - 8].

Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả tổng hợp chất xúc tác enzyme lipase cố định hóa trên nano sắt bằng phương pháp hóa học sử dụng chitosan thông qua cầu nối glutaraldehyde và sử dụng cho phản ứng transester hóa chéo để sản xuất biodiesel.

2. Thực nghiệm

2.1. Nguyên liệu

Chitosan sử dụng từ nguồn Aldrich (CAS 9012-76-4); Candida rugosa lipase sử dụng từ hãng Sigma; Dầu đậu nành sử dụng từ Công ty CP Dầu thực vật Tường An có phân tử khối trung bình $876\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Glutaraldehyde ($\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$) với $500\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ trong dung dịch nước sử dụng từ Công ty Hóa chất Tianjin và các hóa chất $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (99%), $\text{FeCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (99%), NaOH (98%) có xuất xứ từ Trung Quốc.

2.2. Điều chế các vi cầu “microsphere” chitosan từ tính

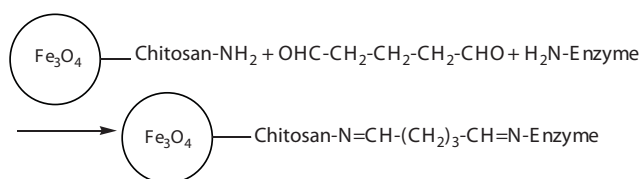
Các hạt nano từ tính Fe_3O_4 được tạo thành từ dung dịch các muối $\text{FeCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ và $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ với nồng độ thích hợp theo tỷ lệ mol $\text{Fe}^{2+}:\text{Fe}^{3+} = 2:1$. Dung dịch được khuấy 600 vòng/phút trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó nhỏ từ từ dung dịch NaOH 1M đến pH ≈ 10 thì dừng lại. Phản ứng được thực hiện trong 30 phút ở nhiệt độ 80°C. Lọc rửa hỗn hợp huyền phù thu được bằng nước cất đến pH = 7. Sau đó sấy khô ở nhiệt độ 80°C và giữ trong môi trường chân không thu được các hạt nano sắt từ.

Các vi cầu Fe_3O_4 -chitosan được tổng hợp bằng cách: Hòa tan 0,5g chitosan trong 50ml dung dịch acid acetic nồng độ 0,2M, khuấy mạnh hỗn hợp trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó thêm 3g hạt nano Fe_3O_4 vào hỗn hợp dung dịch, tiếp tục khuấy trong 1 giờ. Các vi cầu Fe_3O_4 -chitosan thu được có tính từ mạnh và được làm khô lạnh.

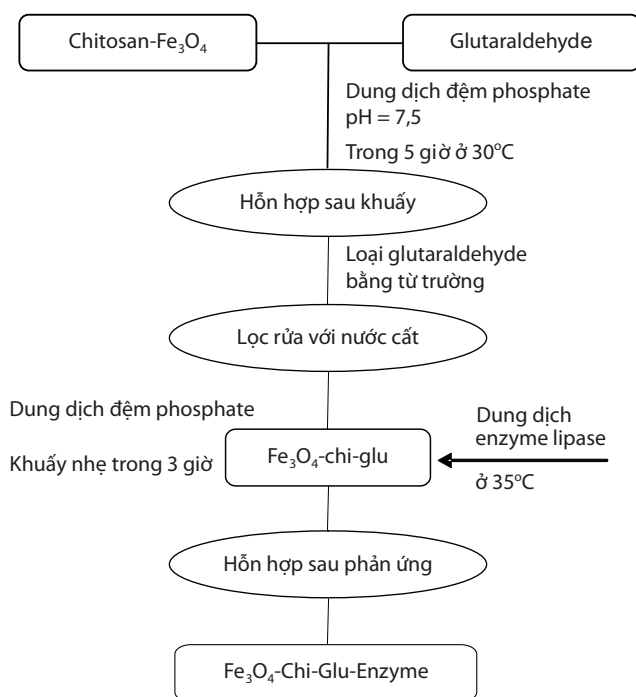
2.3. Cố định lipase lên hạt nano Fe_3O_4 -chitosan từ tính

Quá trình cố định lipase “*Candida rugosa*” lên nano Fe_3O_4 -chitosan được thực hiện thông qua cầu nối aldehyde (glutaraldehyde). Lipase có nhóm amin có thể tạo liên kết ngang với một đầu aldehyde của glutaraldehyde và đầu aldehyde còn lại sẽ liên kết với nhóm amin của chitosan- Fe_3O_4 (Hình 1).

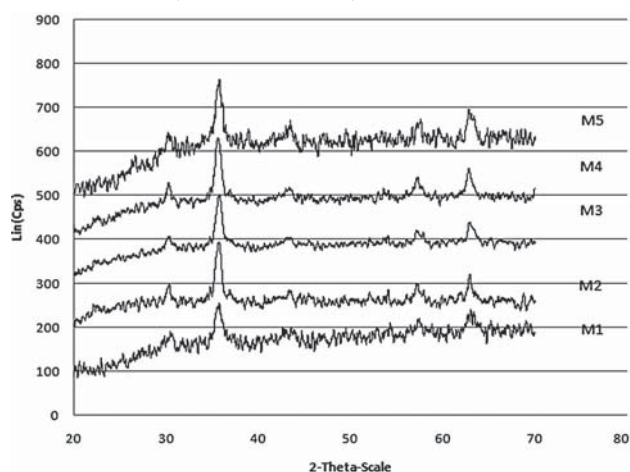
Tiến hành cố định hóa, sử dụng 2g chitosan- Fe_3O_4



Hình 1. Quá trình liên kết giữa lipase với Fe_3O_4 -chitosan



Hình 2. Quy trình cố định enzyme lên hạt nano từ tính



Hình 3. Phổ nhiễu xạ tia X của nano sắt từ (Fe_3O_4)

trộn với 20ml dung dịch glutaraldehyde 10% trong đệm phosphate với pH $\approx 7,5$. Phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ 30°C trong 5 giờ. Các hạt đã được hoạt hóa glutaraldehyde thu hồi bằng sự phân tách từ tính, sau đó tiến hành rửa nhiều lần bằng nước cất.

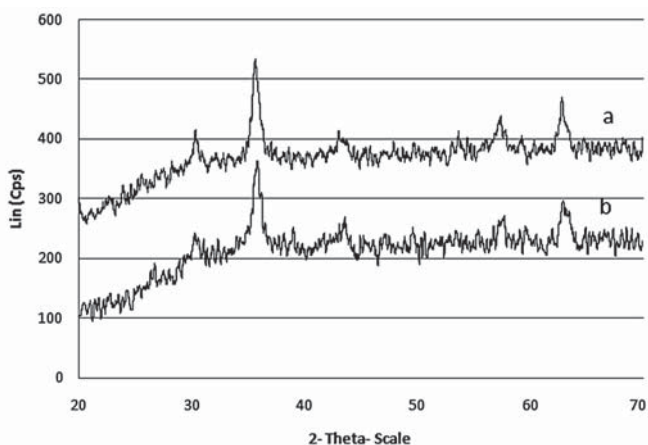
Sau khi hoạt hóa glutaraldehyde chất mang được trộn trong 20ml dung dịch lipase ($d = 2\text{g/l}$, 0,025M đệm phosphate, pH = 7,5). Hỗn hợp được lắc liên tục ở nhiệt độ 35°C trong 3 giờ. Sau khi hoàn thành phản ứng cố định hóa, kết tủa có từ tính được tách bằng việc ứng dụng trường từ bên ngoài. Rửa nhiều lần kết tủa thu được bằng đệm phosphate để loại bỏ lipase tự do. Sấy khô xúc tác thu được sau khi cố định lipase ở nhiệt độ 40°C và bảo quản ở nhiệt độ 4°C . Quy trình cố định enzyme lipase được thể hiện trên Hình 2.

2.4. Phương pháp đặc trưng xúc tác

Đặc trưng của xúc tác được xác định bằng phương pháp nhiễu xạ tia X (XRD) trên máy CPM-Bruker D8-Advance (Đức) góc quét từ $10 - 70^\circ$. Ảnh hiển vi điện tử quét (SEM) được thực hiện trên máy SEM-JEOL-JSM 5410 LVC (Nhật Bản) với độ phóng đại 200.000 lần. Ảnh hiển vi điện tử truyền qua (TEM) được thực hiện trên máy SEM 1010 của hãng Jeol với hiệu điện thế 100kV tại Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương. Phổ hồng ngoại (FT-IR) sử dụng để phân tích cấu trúc xúc tác được thực hiện tại Khoa Hóa - Đại học Sư phạm Hà Nội.

2.5. Đánh giá hoạt tính xúc tác

Hoạt tính của xúc tác được đánh giá thông qua phản ứng trao đổi ester hóa chéo dầu đậu nành bằng methanol với tỷ lệ methanol/dầu = 4:1. Phản ứng thực hiện trong 30 giờ ở nhiệt độ 40°C , sử dụng 2,7g xúc tác cố định lipase và 10ml *n*-hexane. Methanol đưa vào phản ứng theo 3 giai đoạn, mỗi giai đoạn cách nhau 30 phút. Sau 30 giờ phản



Hình 4. Phổ nhiễu xạ tia X của chitosan- Fe_3O_4 (a) và lipase cố định (b)

ứng, hỗn hợp được lọc và tách sản phẩm bằng từ tính bên ngoài. Độ chuyển hóa của dầu đậu nành thành methyl ester được xác định bằng phương pháp sắc ký GC/MS.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Đặc trưng của các hạt nano Fe_3O_4 từ tính

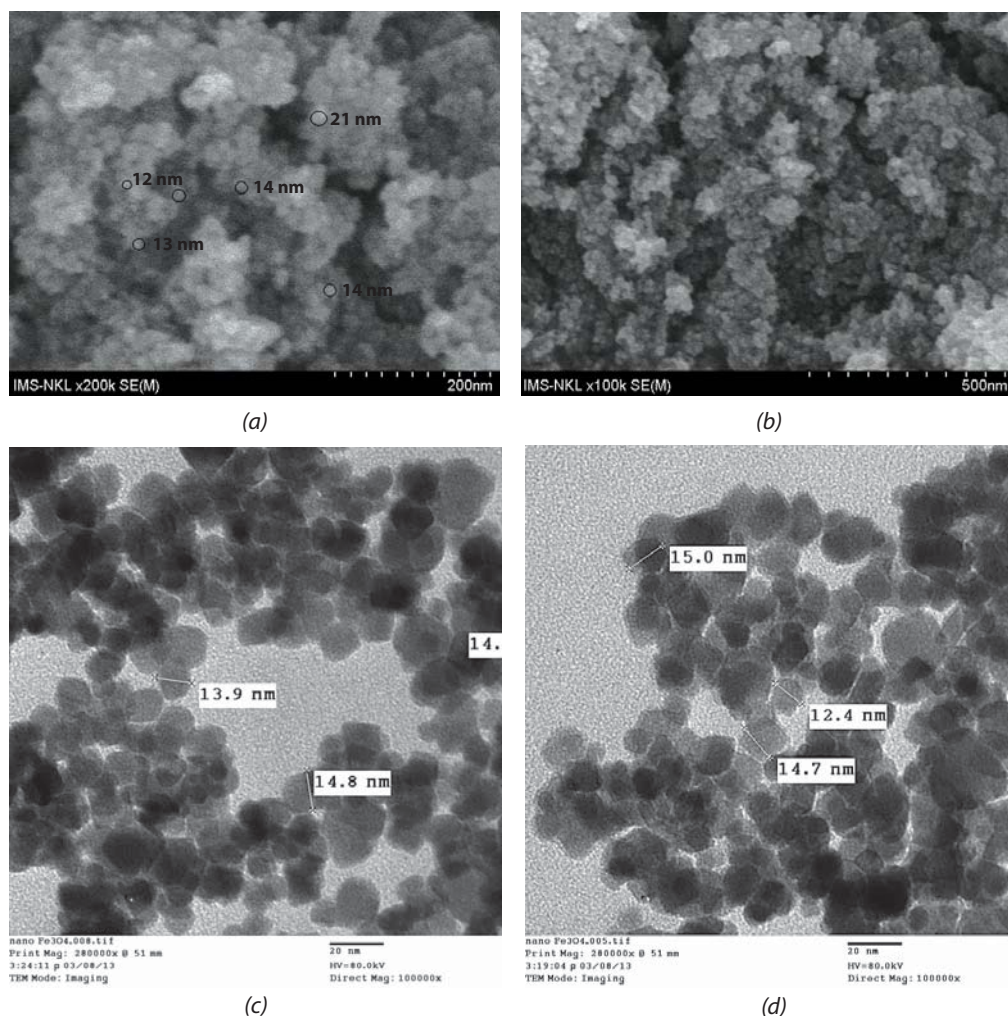
Phổ nhiễu xạ tia X của các hạt nano Fe_3O_4 hình thành với sự thay đổi nồng độ NaOH và ion $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ (Hình 3) cho thấy có 6 đỉnh (peak) đặc trưng của Fe_3O_4 xuất hiện tại các góc 2θ lần lượt $30,1^\circ$, $35,5^\circ$, $43,2^\circ$, $53,5^\circ$, 57° và $62,8^\circ$ tương ứng với các mặt phản xạ (200), (311), (400), (422), (511) và (440). Các đỉnh này cho thấy các hạt Fe_3O_4 dạng thuần khiết với cấu trúc spinel.

Đối với các hạt vi cấu chitosan- Fe_3O_4 và lipase cố định trên chất mang, phổ nhiễu xạ tia X cũng xuất hiện 6 peak đặc trưng (Hình 4). Điều này cho thấy quá trình phủ chitosan và việc cố định lipase không làm thay đổi pha của các hạt Fe_3O_4 . Như vậy, các hạt từ tính có thể đảm bảo các tính chất từ của chúng cho quá trình phân tách khi ứng dụng cho việc phân tách bio.

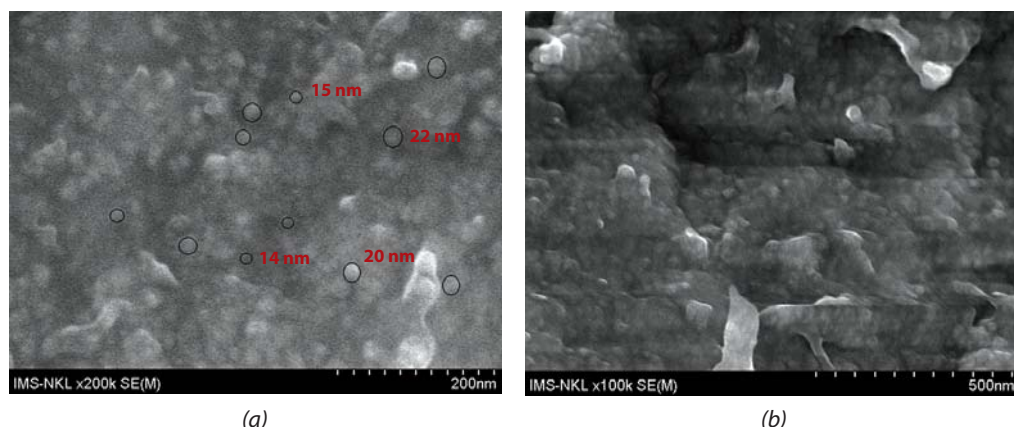
Sử dụng phương trình Debye-Scherrer, kích thước tương đối

Bảng 1. Kích thước hạt Fe_3O_4 khi thay đổi nồng độ NaOH và tỷ lệ ion $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$

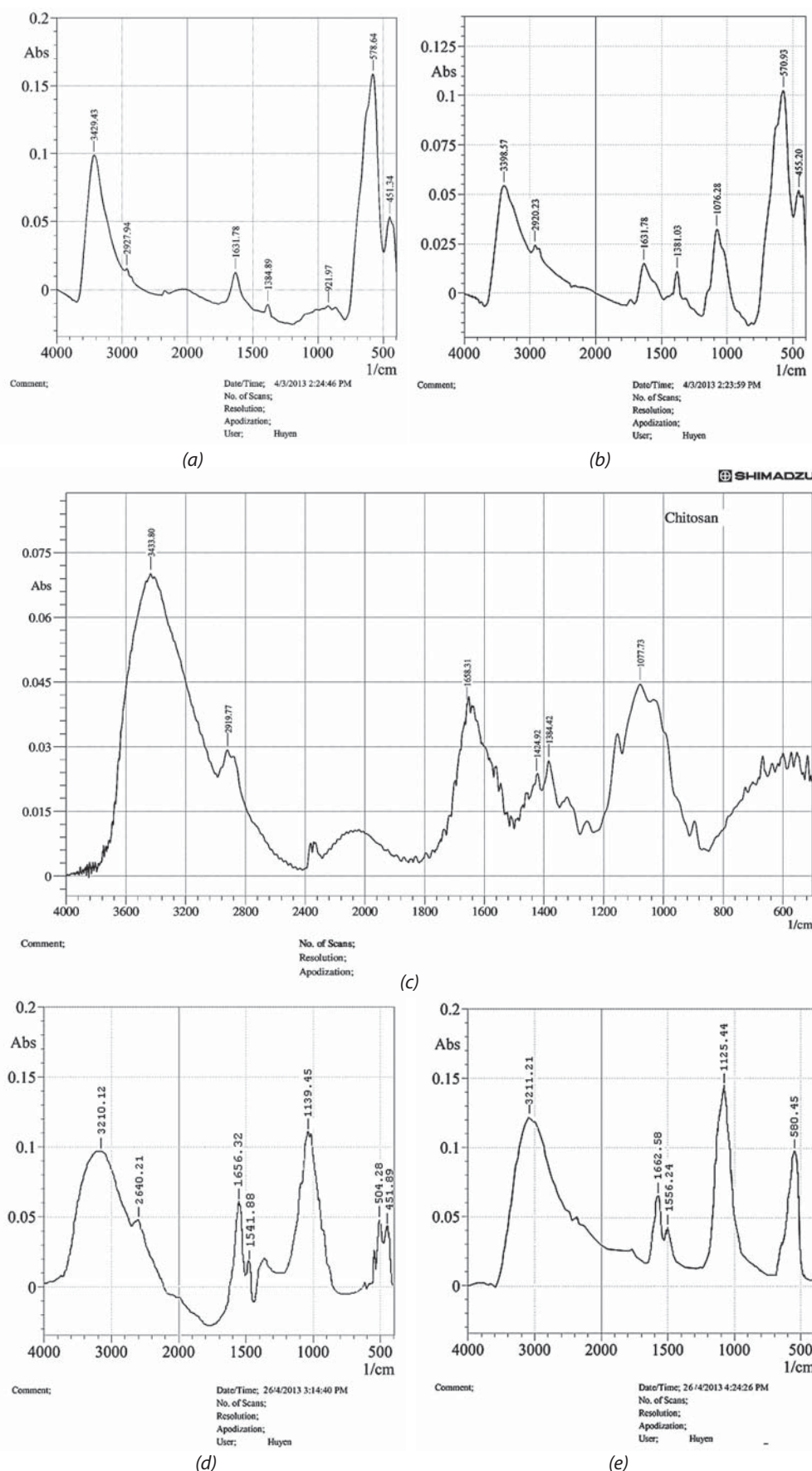
Mẫu	Nồng độ Fe^{2+}	Nồng độ Fe^{3+}	Nồng độ NaOH	Tỷ lệ mol NaOH	Kích thước hạt
M1	0,2	0,4	1,0	1/2/5	17,2
M2	0,2	0,4	1,5	1/2/7,5	17,0
M3	0,2	0,4	2,0	1/2/10	16,4
M4	0,3	0,6	1,0	1/2/3,3	14,5
M5	0,4	0,8	1,0	1/2/3,3	11,6



Hình 5. Ảnh SEM (a, b) và TEM (c, d) của Fe_3O_4



Hình 6. Ảnh SEM của vi cấu chitosan- Fe_3O_4 (a) và lipase cố định (b)



Hình 7. Phổ hồng ngoại FT-IR của các mẫu Fe_3O_4 (a), chitosan- Fe_3O_4 (b), chitosan (c), lipase tinh khiết (d), lipase cố định (e)

của hạt Fe_3O_4 được xác định với thay đổi nồng độ NaOH và tỷ lệ Fe^{3+}/Fe^{2+} (Bảng 1).

Như vậy, kích thước hạt nano từ tính Fe_3O_4 được xác định khoảng 11,6nm tương ứng với nồng độ NaOH 1M và tỷ lệ ion Fe^{2+}/Fe^{3+} là 1/2.

Ảnh SEM (Hình 5a, b) và TEM (Hình 5c, d) của mẫu M_5 cho thấy rất rõ các hạt Fe_3O_4 có kích thước nano mét, dạng hình cầu với đường kính trong khoảng 12 - 15nm. Kết quả này tương ứng với kết quả xác định bằng phương pháp gần đúng Debye-Scherrer. Đường kính các hạt là thông số quan trọng đối với vật liệu chất mang. Kích thước hạt nhỏ tương ứng với diện tích bề mặt và thể tích mao quản lớn. Điều này tạo thuận lợi cho sự liên kết giữa các nhóm chức với bề mặt chất mang và sản phẩm phản ứng sẽ ít bị giới hạn bởi sự khuếch tán.

Ảnh SEM (Hình 6a, b) với các mẫu vi cầu chitosan- Fe_3O_4 và lipase cố định cho thấy có sự phân tán đơn và màng mỏng chitosan đã được phủ hoàn toàn lên các hạt sắt từ, các hạt vẫn cố định dạng cầu, kích thước trung bình đạt từ 14 - 21nm. Ngoài ra, ảnh SEM cho thấy việc cố định lipase lên các hạt vi cầu chitosan từ tính đã không làm thay đổi kích thước cũng như đặc tính của hạt.

Như vậy, vai trò của chitosan không chỉ cung cấp nhóm chức sử dụng cho việc cố định lipase mà

còn biến tính các hạt nano từ tính Fe_3O_4 làm tăng tính ổn định của chất mang.

Phổ FT-IR của các hạt nano Fe_3O_4 (Hình 7a), chitosan- Fe_3O_4 (Hình 7b), polymer chitosan (Hình 7c), lipase tinh khiết (Hình 7d) và lipase cố định (Hình 7e) được thể hiện trên Hình 7. Với Hình 7a, peak hấp thụ của Fe_3O_4 tại dải 578cm^{-1} đặc trưng cho liên kết Fe-O. Các dao động đặc trưng tại dải 1.658cm^{-1} và 1.384cm^{-1} (Hình 7c) được xác định là các dao động của nhóm N-H và -C-O trong các phân tử polymer chitosan tương ứng [9, 10]. Hình 7b cho thấy ngoài các dao động đặc trưng cho polymer chitosan tại số sóng 1.381cm^{-1} và 1.631cm^{-1} còn xuất hiện thêm dao động mới tại 570cm^{-1} , dao động của liên kết Fe-O của phân tử Fe_3O_4 . Điều này khẳng định, chitosan đã được phủ lên các hạt nano sắt từ. So sánh với phổ hồng ngoại của lipase tinh khiết, lipase cố định và chitosan- Fe_3O_4 từ tính, có thể nhận thấy có sự xuất hiện dao động ở 1.662cm^{-1}

đặc trưng cho dao động của liên kết C=N. Đó là kết quả phản ứng giữa nhóm carbonyl của nhóm glutaraldehyde và nhóm amin [11]. Các dải hấp thụ của lipase cố định xuất hiện tại bước sóng 1.125 và 1.556cm^{-1} tương ứng với các bước sóng 1.139 và 1.541cm^{-1} trong phổ hồng ngoại của lipase tự do, chứng tỏ lipase đã được cố định lên các hạt cầu từ tính Fe_3O_4 .

3.2. Phản ứng điều chế methyl ester trên xúc tác lipase cố định trên nano Fe_3O_4 từ tính

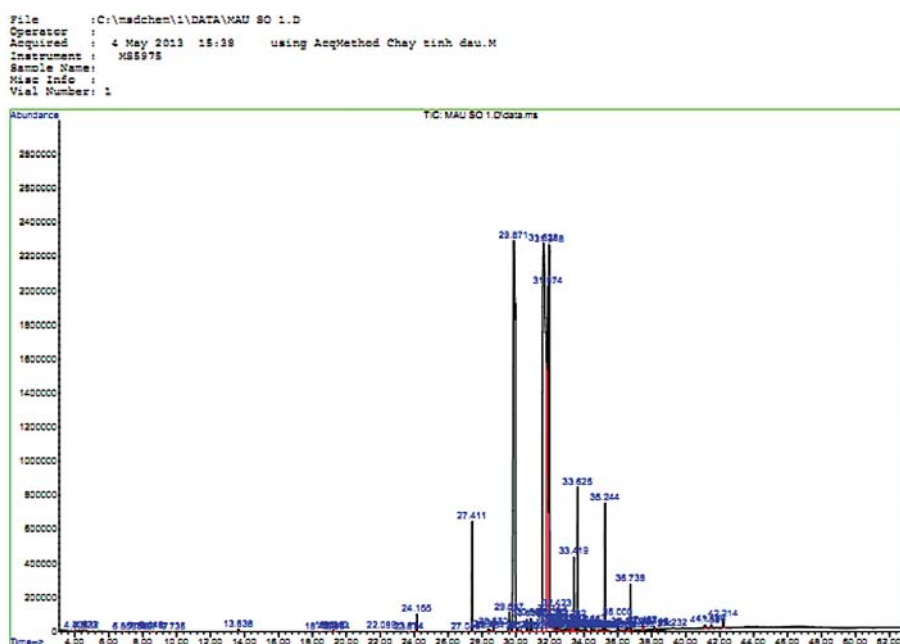
Xúc tác lipase cố định được sử dụng điều chế biodiesel qua phản ứng trao đổi ester hóa chéo dầu đậu nành bằng methanol với tỷ lệ mol dầu/methanol là 1/4, nhiệt độ phản ứng 40°C , thời gian thực hiện phản ứng trong 30 giờ. Biodiesel thu được có thành phần được trình bày ở Hình 8 và Bảng 2.

Như vậy, với bước đầu thực hiện phản ứng trao đổi

ester hóa chéo dầu đậu nành với methanol sử dụng tỷ lệ xúc tác/dầu là 2,8% khối lượng, độ chuyển hóa methyl ester thu được 93,42%. Theo kết quả nghiên cứu của Carla Cristina và cộng sự [12] khi thực hiện phản ứng trao đổi ester hóa chéo dầu đậu nành với xúc tác hydrotalcite thì nhiệt độ phản ứng thực hiện ở nhiệt độ 230°C , tỷ lệ mol methanol: dầu đậu nành = 13:1 trong 1 giờ và tỷ lệ xúc tác/dầu là 5% khối lượng, độ chuyển hóa thu được là 90%. Điều này cho thấy, xúc tác lipase cố định hiệu quả hơn xúc tác hydrotalcite khi sử dụng cho quá trình điều chế biodiesel.

4. Kết luận

Với mục đích tổng hợp hệ xúc tác "xanh" - lipase cố định trên nano từ tính Fe_3O_4 ứng dụng cho quá trình điều chế biodiesel, nhóm tác giả đã thu được các hạt Fe_3O_4 có kích thước nano trong khoảng 12 - 15nm. Việc cố định hóa lipase trên vi cầu chitosan- Fe_3O_4 từ tính được sử dụng cho quá trình trao đổi ester hóa chéo dầu thực vật để tạo nhiên liệu biodiesel. Các tính chất của các



Hình 8. Sắc ký đồ GC/MS của methyl ester từ phản ứng ester hóa chéo dầu đậu nành trên xúc tác lipase cố định

Bảng 2. Thành phần các chất có trong biodiesel

TT	Thời gian	Tên hợp chất (methyl ester với các acid tương ứng)	Tỷ lệ khối lượng (%)
1	29,817	Hexadecanoic acid (Acid palmitic)	28,9
2	31,628	9,12-Octadecadienoic acid (Acid linoleic)	45,55
3	31,948	Octadecanoic acid (Acid stearic)	10,17
4	35,244	Docosanoic acid	1,93
5	33,625	Methyl 18-methylnonadecanoic acid	2,18
6	33,419	11-Eicosenoic acid	1,47
7	31,874	cis-11-Octadecenoic	1,56
Tổng	Methyl ester		93,42

hạt vi cầu “microspheres” từ tính thay đổi không đáng kể sau khi phủ chitosan và liên kết lipase. Lipase cố định thể hiện độ ổn định và hoạt tính xúc tác khi thực hiện phản ứng ester hóa chéo dầu đậu nành bằng methanol theo 3 giai đoạn với tỷ lệ dầu/methanol là 1:4, nhiệt độ thực hiện phản ứng là 40°C trong 30 giờ để chuyển hóa dầu đậu nành thành methyl ester trên 93%.

Tài liệu tham khảo

1. Z.Helwani, MR.Othman, N.Aziz, W.J.N.Fernando, J.Kim. *Technologies for production of biodiesel focusing on green catalytic techniques: A review*. Fuel Processing Technology. 2009; 90(12): p. 1502 - 1514.
2. P.D.Patil, S.G.Deng. *Transesterification of Camelina sativa oil using heterogeneous metal oxide catalysts*. Energy Fuels. 2009; 23(9): p. 4619 - 4624.
3. S.V.Ranganathan, S.L.Narasimhan, K.Muthukumar. *An overview of enzymatic production of biodiesel*. Bioresource Technology. 2008; 99(10): p. 3975 - 3981.
4. Y.Watanabe, Y.Shimada, T.Samukawa, A.Sugihara, Y.Tominaga. *Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized Candida antarctica lipase*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2002; 17(3 - 5): p. 151 - 155.
5. J.Deng, Y.Peng, C.He, X.Long, P.Li, A.S.C.Chan. *Magnetic and conducting Fe₃O₄ - polypyrrole nanoparticles with core - shell structure*. Polymer International. 2003; 52(7): p. 182 - 187.
6. S.Huang, M.Liao, D.Chen. *Direct binding and characterization of lipase onto magnetic nanoparticles*. Biotechnology Progress. 2003; 19 (3): p. 1095 - 1100.
7. S.Y.Shaw, Y.Chen, J.Qu, L.Ho. *Preparation and characterization of Pseudomonas putida esterase immobilized on magnetic nanoparticles*. Enzyme and Microbial Technology. 2006; 39(5): p. 1089 - 1095.
8. W.Xie, N.Ma. *Enzymatic transesterification of soybean oil by using immobilized lipase on magnetic nanoparticles*. Biomass & Bioenergy. 2010; 34 (6): p. 890 - 896.
9. A.Zhu, L.Yuan, T.Liao. *Suspension of Fe₃O₄ nanoparticles stabilized by chitosan and o-carboxymethylchitosan*. International Journal of Pharmaceutics. 2008; 350(1 - 2): p. 361 - 368.
10. C.Pan, B.Hu, W.Li, Y.Sun, H.Ye, X.Zeng. *Novel and efficient method for immobilization and stabilization of b-Dgalactosidase by covalent attachment onto magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticles*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2009; 61(3 - 4): p. 208 - 215.
11. D.S.Jiang, S.Y.Long, J.Huang, H.Y.Xiao, J.Y.Zhou. *Immobilization of pycnoporus sanguineus laccase on magnetic chitosan microspheres*. Biochemical Engineering Journal. 2005; 25(1): p.15 - 23.
12. Carla Cristina C.M. Silva, Nielson F.P.Ribeiro, Mariana M.V.M Souza, Donato A.G.Aranda. *Biodiesel production from soybean oil and methanol using hydrotalcites as catalyst*. Fuel Processing Technology. 2010; 91: p. 205 - 210.

Synthesis and characterisation of lipase enzyme immobilised on magnetic nano particles for application in the transesterification of soybean oil to biodiesel

Pham Xuan Nui, Nguyen Ngoc Son, Le Thi Cuc
Hanoi University of Mining and Geology

Summary

In the study, magnetic chitosan microspheres were prepared by the chemical co-precipitation approach using glutaraldehyde as the cross-linking reagent for lipase immobilisation. The lipase enzyme is immobilised on the principle of creating peptides covalently linked via glutaraldehyde as a bridge with chitosan magnetic particles. The catalyst system has been characterised using the following analytical methods: X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared (FT-IR) spectra, and transmission electron microscopy (TEM). The analysis showed that the enzyme was immobilised onto the magnetic nanoparticles. The nanoparticles formed were spherical, uniform in size with average diameters from 12 - 15nm. Using the immobilised lipase, the conversion of soybean oil to fatty acid methyl esters reached 93%wt under the reaction temperature of 40°C and reaction duration of 30h, and methanol/oil amount-of-substance ratio of 4:1 with the three-step addition of methanol.