

## NGHIÊN CỨU ĐIỀU KIỆN THỦY PHÂN RONG LỤC *Chaetomorpha linum* BẰNG ENZYME VÀ ỨNG DỤNG TRONG SẢN XUẤT BIOETHANOL

Võ Thành Trung<sup>1\*</sup>, Lê Như Hậu<sup>1</sup>, Nguyễn Thanh Hằng<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam,  
\*vothanhtrung@nitra.vast.vn

<sup>2</sup>Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

**TÓM TẮT:** Rong *Chaetomorpha linum* có hàm lượng carbohydrate cao, có chứa nhiều loại polysacchrid, trong đó cellulose là polyme chiếm tỷ trọng lớn trong nguyên liệu. Vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng enzyme visocozyme L thủy phân *Chaetomorpha linum* và tìm được điều kiện thủy phân thích hợp với nồng độ enzyme: 0,85 ml/gam chất khô (hoạt độ là 42,5 UI/g); thời gian thủy phân 33 giờ; nhiệt độ thủy phân 50°C; pH dịch thủy phân 5,2. Kết quả thủy phân rong *Ch. linum* tạo ra dịch đường 50,3 g/l và tiến hành lên men với nấm men Red ethanol trong điều kiện pH 4,5; nhiệt độ 27°C; số vòng khuấy 50 rpm và mật độ tế bào nấm men là 10<sup>9</sup>/l với thời gian lên men 108 giờ. Kết quả lên men dịch thủy phân rong lục *Ch. linum* đã tạo ra 14,4 g/l ethanol.

*Từ khóa:* *Chaetomorpha linum*, enzyme, lên men, thủy phân.

### MỞ ĐẦU

Khi nhu cầu năng lượng thế giới tiếp tục tăng và nguồn tài nguyên nhiên liệu hóa thạch đang cạn kiệt, sinh khối thực vật biển đang nhận được sự quan tâm ngày càng lớn như là một nguồn sinh khối hấp dẫn cho các nghiên cứu sản xuất nhiên liệu và hóa chất. Nguyên liệu từ sinh khối thực vật biển có nhiều lợi thế hơn sinh khối thực vật trên mặt đất. Những đột phá gần đây trong việc chuyển đổi các dạng đường từ sinh khối rong biển thành nhiên liệu sinh học (ethanol sinh học) thông qua kỹ thuật chuyển hóa đã chứng minh tiềm năng sinh khối rong biển như một hứa hẹn. Đã có những nghiên cứu phương pháp canh tác, thu hoạch rong biển và các phương pháp xử lý, đường hóa và lên men bởi vi sinh vật từ rong biển để tạo ra nhiên liệu sinh học [4]. Kết quả nghiên cứu của Mitsunori et al. (2011) [5] cho thấy, rong *Ulva pertusa* có 43,5% là polysaccharid trong đó 15,2% cellulose và 28,3% polyme khác, các polysaccharid này đã được đường hóa bằng enzyme Meicelase tạo ra dịch đường 43g/l và lên men tạo ra 18,5 g/l ethanol [5]. Một kết quả nghiên cứu khác của Nadja et al. (2013) [7] cũng cho biết rong *Chaetomorpha linum* có 61,5% là polysaccharid trong đó 40% cellulose và 21,5% polyme khác; các polysaccharid này đã được đường hóa bằng enzyme cellulast 1,5L

tạo ra dịch đường 49 g/l và lên men tạo ra 18,1 g/l ethanol [7].

Trong bài báo này, chúng tôi đã chọn rong Lục, *Chaetomorpha linum*, là đối tượng nghiên cứu và tiến hành nghiên cứu điều kiện thủy phân rong bằng enzym và ứng dụng trong sản xuất ethanol, đây là loài rong được nhiều tác giả quan tâm, vì loài này có sinh khối lớn, thành phần polysaccharid cao và khi đường hóa sẽ tạo ra môi trường giàu glucan thích hợp cho lên men ethanol.

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu được sử dụng là rong Lục, *Chaetomorpha linum*, thuộc họ Cladophoraceae, bộ Cladophorales, lớp Ulvophyceae, ngành Chlorophyta [3].

Sinh khối *Ch. linum* nghiên cứu được thu tại xã Vĩnh Thái, Thành phố Nha Trang, tỉnh Khánh Hòa và được định danh tại Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang. Thời gian thu mẫu vào tháng 5-2014.

Enzyme visocozyme L được thu nhận từ *Aspergillus* sp.. Enzyme này có khả năng thủy phân các polysacchrid (cellulose, B-glucan, hemicellulose, xylan), và có hoạt độ 1000UI/g. Enzyme này mua từ Công ty hóa chất Sigma của Hoa kỳ.

Nấm men *Saccharomyces cerevisiae* có tên thương mại Ethanol Red® là một loại nấm men khô của hãng Fermentis (Pháp) được sử dụng trong sản xuất ethanol. Số lượng tế bào  $\geq 2,5 \times 10^{10}$  tế bào/g.

#### **Phương pháp thủy phân và lên men rong *Chaetomorpha linum***

**Xử lý sơ bộ:** sử dụng các biện pháp cơ học, lý học nhằm làm sạch nguyên liệu và tạo điều kiện cho quá trình thủy phân diễn ra dễ dàng. Rong tươi sau khi thu hoạch được phơi khô dưới ánh nắng mặt trời cho đến khi rong khô giòn. Sau khi phơi khô cho rong vào nước ngọt ngâm 20-30 phút, vừa ngâm vừa khuấy trộn nhằm rửa mặn và giảm bớt lượng tạp chất bám trên rong. Sau đó rong được vớt ra phơi nắng lần hai cho đến khi lượng ẩm còn 5-10%, rong được xay nhỏ chuẩn bị cho quá trình thủy phân.

**Tiền xử lý:** trước khi tiến hành thủy phân bằng enzyme, rong khô được phối trộn nước theo tỷ lệ 1:10, sau đó được tiền xử lý với axit  $H_2SO_4$  loãng có nồng độ 0,3% (v/v) trong 15 phút, nhiệt độ 121°C. Quá trình tiền xử lý nhằm tách một số liên kết giữa các loại polysaccharid và phá hủy một số cấu trúc polyphenol, và enzyme tiếp xúc trực tiếp với các polysaccharid để thủy phân diễn ra dễ dàng.

#### **Thủy phân enzyme**

Enzyme visocozyme L có hoạt độ 1000 UI/g được pha loãng 20 lần để sử dụng trong nghiên cứu.

Các thí nghiệm nghiên cứu sự thay đổi nồng độ enzyme với lượng enzyme pha loãng là 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 ml enzyme/gam chất khô tương ứng hoạt độ 0; 10; 20; 30; 40; 50 UI/g; sự thay đổi thời gian thủy phân là 6, 12, 24, 30 và 36 giờ, sự thay đổi pH là 3; 4; 4,5; 5; 5,5 và 6, sự thay đổi nhiệt độ 30, 40, 50, 55 và 60°C. Sau khi kết thúc khảo sát sơ bộ các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thủy phân, chúng tôi chọn yếu tố có ảnh hưởng lớn đến quá trình thủy phân để tiến hành tối ưu các điều kiện thủy phân.

Lập ma trận thực nghiệm: dùng 24 bình tam giác 50ml, cân cho vào mỗi bình 5g nguyên liệu có độ ẩm 10%. Bổ sung vào bình 50ml dung dịch 0,3 (% v/v) axit  $H_2SO_4$ . Dùng que thủy tinh

trộn đều rồi nút các bình bằng bông không thấm nước và hấp tiền xử lý tại 121°C trong 15 phút. Hấp xong để nguội bổ sung các nồng độ enzyme theo tỷ lệ 1 ml enzyme/1g nguyên liệu. Các bình tam giác được giữ trong điều kiện nhiệt độ 40 và 50°C, pH=4,5 và 5,5. Sau 24 và 40 giờ lấy ra xác định hàm lượng carbonhydrat của dịch thủy phân.

**Lên men:** sau khi nghiên cứu điều kiện thủy phân *Ch. linum*, chúng tôi thực hiện trên hệ thống lên men tự động Bioflo với thí nghiệm sau: sử dụng 500 g rong khô và 5 lít axit 0,3 (% v/v), xử lý ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút, sau đó tiến hành thủy phân với điều kiện đã được nghiên cứu và tiến hành lên men với điều kiện pH 4.5, nhiệt độ 27°C, số vòng khuấy 50 RPM, lượng nấm men  $10^9/1$  và thời gian lên men 108 giờ.

#### **Các phương pháp phân tích**

Nhiệt độ bằng máy đo cầm tay (EC 10, Hach, USA), pH bằng máy đo cầm tay ProPlus.

Xác định hàm lượng thành phần hóa học: protein, lipid, tro, độ ẩm, đường được xác định theo các phương pháp của (AOAC, 1990).

Xác định các polysacchrid: cellulose (AOAC, 1990), tinh bột [9], Agar [8], Ulvan [6].

Xác định hàm lượng đường tổng số bằng phương pháp Dubois (1951) [2].

Xác định ethanol và thành phần đường bằng HPLC (Shimadzu, Japan) trên cột Aminex hpx-87h với detector RID [5].

Phân tích xử lý số liệu trên phần mềm Excel 2003.

## **KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

### **Thành phần hóa học của rong *Ch. linum***

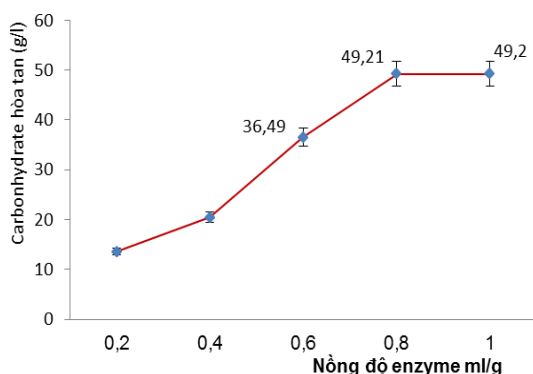
Theo số liệu ở bảng 1, thành phần hóa học của rong *Ch. linum* có độ ẩm 14,43%, tro 10,2%, protein 14,14%, đường tổng số 58,5%, cellulose 38,2%, tinh bột 3,8%, agar 4,5% và ulvan 11,8%. Thành phần hóa học rong *Ch. linum* của chúng tôi nghiên cứu có kết quả tương đồng với *Ch. linum* của Nadja et al. (2013) [7], theo các tác giả này, cellulose 40%, thành phần polysaccharid khác 21,5%.

Cellulose và tinh bột là hai loại polyme chiếm tỷ trọng lớn và chuyển hóa ra nhiều glucan cần thiết cho quá trình lên men ethanol, vì vậy, khi

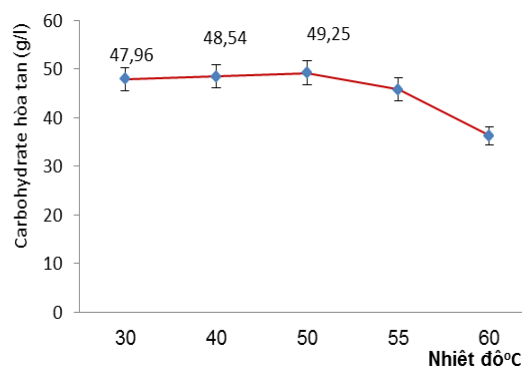
thủy phân *Ch. linum* chúng tôi sử dụng các enzyme có hoạt độ cellulase cao.

Bảng 1. Thành phần hóa học của rong *Chaetomorpha linum*

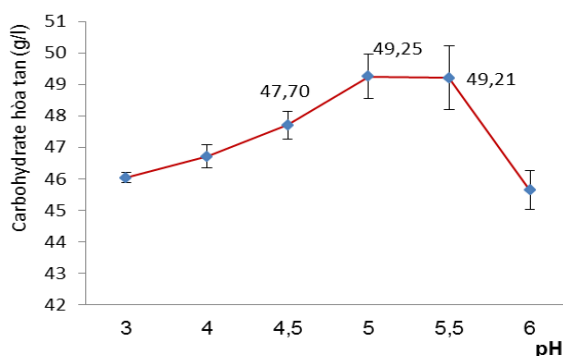
Loài rong Lục, tham khảo	Độ ẩm (%)	Tro (%)	Lipid (%)	Protein (%)	Đường tổng số (%)	Cellulose (%)	Tinh bột (%)	Agar (%)	Ulvan (%)
<i>Chaetomorpha linum</i>	14,43	10,2	2,11	14,14	58,5	38,2	3,8	4,5	11,8



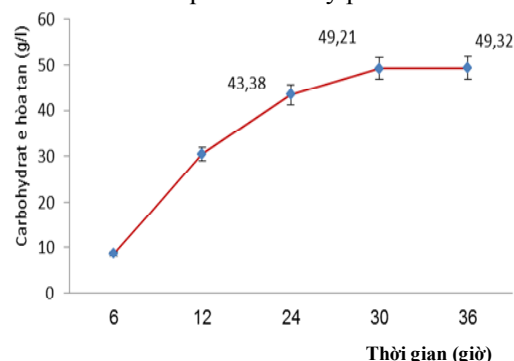
Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme đến quá trình thủy phân



Hình 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình thủy phân



Hình 3. Ảnh hưởng của pH đến quá trình thủy phân



Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình thủy phân

### Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ enzyme lên quá trình thủy phân rong *Ch. linum*

Chúng tôi sử dụng enzym visocozyme L với các nồng độ trong khoảng 0,2-1 ml/g chất khô để tiến hành thủy phân *Ch. linum* trong điều kiện cố định ba yếu tố: nhiệt độ 40°C, thời gian 36 giờ và pH=5. Kết quả nghiên cứu (hình 1) cho thấy, hàm lượng carbohydrat hòa tan tăng dần khi nồng độ enzyme tăng và ở nồng độ

enzyme > 0,8 ml/g hàm lượng carbohydrat không còn tăng nữa. Tại nồng độ enzyme 0,8 ml/g tạo ra carbohydrat hòa tan cao nhất 49,2 g/l.

### Khảo sát ảnh hưởng của pH đến quá trình thủy phân rong *Ch. linum*

Chúng tôi tiến hành thủy phân *Ch. linum* với pH thay đổi trong khoảng 3 đến 6 và cố định ba yếu tố gồm nhiệt độ 40°C, thời

gian 36 giờ và nồng độ enzym 0,8 ml/g. Kết quả ở hình 2 cho thấy, hàm lượng carbohydrat hòa tan tăng dần khi pH tăng dần từ 3 đến 5 nhưng lại giảm dần khi pH > 5,5. Tại pH 5 cho hàm lượng lượng carbohydrat hòa tan cao nhất 49,25 g/l.

#### Khảo sát ảnh hưởng nhiệt độ đến quá trình thủy phân rong *Ch. linum*

Chúng tôi tiến hành thủy phân với nhiệt độ thay đổi trong khoảng 30-60°C và cố định ba yếu tố pH=5,0; thời gian 36 giờ và nồng độ enzyme 0,8 ml/g. Kết quả nghiên cứu thu được (hình 3) cho thấy, hàm lượng carbohydrat hòa tan sau khi thủy phân tăng dần khi nhiệt độ tăng. Ở nhiệt độ 50°C, hàm lượng carbohydrat hòa tan tạo thành sau thủy phân đạt cao nhất 49,25 g/l. Khi tiếp tục tăng nhiệt độ trên 50°C thì hàm lượng lượng carbohydrat hòa tan có xu hướng giảm.

#### Khảo sát thời gian đến quá trình thủy phân rong *Ch. linum*

Chúng tôi tiến hành thủy phân với thời gian thủy phân thay đổi từ 6-36 giờ, trong điều kiện cố định ba yếu tố pH=5,0; nhiệt độ 50°C và nồng độ enzyme 0,8 ml/g. Kết quả (hình 4) cho thấy, hàm lượng carbohydrat hòa tan tăng dần theo thời gian thủy phân, tuy nhiên, sau 36 giờ trở đi, hàm lượng carbohydrat hòa tan tăng

chậm. Hàm lượng carbohydrat hòa tan đạt được cao nhất là 49,3 g/l sau khi thủy phân ở 36 giờ.

#### Tối ưu hóa điều kiện thủy phân rong *Ch. linum* để thu nhận dịch thủy phân có hàm lượng carbohydrat cao

Sau khi tiến hành các thí nghiệm thăm dò, chúng tôi chọn các yếu tố thời gian, nồng độ và pH để tối ưu hóa điều kiện thủy phân rong Lục bằng chế phẩm enzyme bằng phương pháp quy hoạch hóa thực nghiệm.

Bảng 2. Khoảng xác định của các yếu tố và mức thí nghiệm

Mức thí nghiệm	Nồng độ:		Thời gian: X3 [24-36] (giờ)
	X1 [0,6-1] (ml/g)	pH: X2 [4,5-5,5]	
Mức gốc	0,8	5	30
Khoảng biến đổi	0,2	0,5	6
Mức dưới	0,6	4,5	24
Mức trên	1	5,5	36

Chi tiêu cần tối ưu: hàm lượng carbohydrat dịch thủy phân có  $y \rightarrow \max$ .

Ma trận thực nghiệm được thiết lập theo phương pháp yếu tố đầy đủ với số thí nghiệm:  $N = 2^k = 2^3 = 8$ . Trong đó, N là số thí nghiệm; 2 là số mức thí nghiệm; 3 là số yếu tố ảnh hưởng.

Bảng 3. Ma trận thực nghiệm

Số thí nghiệm	X1: Nồng độ (ml/g)	X2: pH	X3: Thời gian (giờ)	Carbohydrate hòa tan (g/l)			
				Lần 1: Y1	Lần 2: Y2	Lần 3: Y3	Trung bình: Y
1	0,6	4,5	24	32,2	32,5	32,5	32,40
2	1	4,5	24	36,8	36,3	36,1	36,40
3	0,6	5,5	24	39,5	39,9	39,4	39,60
4	1	5,5	24	43,6	43,2	43,1	43,30
5	0,6	4,5	36	42,2	42,1	43,2	42,50
6	1	4,5	36	45,8	46,5	46,3	46,20
7	0,6	5,5	36	44,2	44,9	44,7	44,60
8	1	5,5	36	49,2	48,9	49,2	49,10

Từ ma trận thực nghiệm tính được phương trình hồi quy sau:

$Y = 41,76 + 1,98X_1 + 2,38X_2 + 3,83X_3$  và  $F$  lý thuyết = 0,00048 < 0,05. Vậy mô hình đã lập được là thích hợp.

#### Tối ưu hóa các điều kiện thủy phân theo phương pháp Box-wilson

Chọn bước nhảy của các biến số: từ phương trình hồi quy đã xây dựng được cho thấy hệ số của X3 có ảnh hưởng nhiều đến quá trình. Vì

vậy, chúng tôi chọn cho biến số bước nhảy thích hợp, khả thi trong thực nghiệm.

$$\Delta 3 = 0,3 \times \lambda 3 = 0,3 \times 10 = 3$$

Từ đây tính được bước nhảy của các biến còn lại theo công thức:

$$\Delta 2 = \frac{b2\lambda 2}{b3\lambda 3} \times \Delta 3; \Delta 1 = \frac{b1\lambda 1}{b3\lambda 3} \times \Delta 3$$

Bảng 4. Kết quả tính bước chuyển động ( $\Delta_j$ ) của các yếu tố

Các mức	Các yếu tố ảnh hưởng		
	X1(Nồng độ)	X2 (pH)	X3(Thời gian)
Mức cơ sở	0,8	5	30
Khoảng biến thiên ( $\lambda_j$ )	0,2	0,5	6
Hệ số $b_j$	1,98	2,38	3,8
$b_j \lambda_j$	0,396	1,19	22,8
Bước chuyển động ( $\Delta_j$ )	0,052	0,16	3
Làm tròn	0,05	0,2	3

Bảng 5. Tối ưu hóa điều kiện thủy phân rong *Ch. linum* theo Box-wilson

Số thí nghiệm	X1(ml/g)	X2(pH)	X3 (giờ)	Carbohydrate hòa tan(g/l)
1	0,8	5	30	49,1
<b>2</b>	<b>0,85</b>	<b>5,2</b>	<b>33</b>	<b>50,3</b>
3	0,9	5,4	36	49,5
4	1	5,6	39	47,1
5	1,05	5,8	42	46,6

Từ kết quả các bước chuyển động ở bảng 4, chúng tôi tiến hành thí nghiệm leo dốc và điểm xuất phát từ tâm thực nghiệm. Kết quả được chỉ ra ở bảng 5.

Từ kết quả nghiên cứu (bảng 5), chúng tôi nhận thấy rằng ở thí nghiệm 2 hàm lượng carbohydrat đạt cực đại. Ở các mức thí nghiệm khác của biến số, hàm lượng carbohydrat đều giảm. Như vậy, điều kiện thủy phân rong *Ch. linum* thu hàm lượng đường cao khi rong được thủy phân trong điều kiện: nồng độ enzyme: 0,85 ml/g; thời gian: 33 giờ; nhiệt độ: 50°C và pH=5,2.

Như vậy, theo nghiên cứu của chúng tôi, enzyme vicozyme L thủy phân rong *Ch. linum* tạo ra dịch đường 50,3 g/l. Cùng hướng nghiên cứu thủy phân sinh khối rong lục, các tác giả Nadja et al. (2013) đã sử dụng rong *Ch. linum* được thủy phân bằng enzyme celluclast 1,5L và đã tạo ra hàm lượng carbohydrat đạt 51-54 g/l với lượng enzyme thủy phân là 15-20 UI/g [7]. Theo công bố của Mitsunori et al. (2011) [5], sinh khối rong *Ulva pertusa* được thủy phân bằng enzyme meicelase có hoạt độ 17,2 UI/g để

tạo ra dịch đường glucose có nồng độ 43 g/l.

#### Quá trình lên men ethanol từ dịch thủy phân

Kết thúc quá trình thủy phân, chúng tôi tiến hành lên men dịch thủy phân với điều kiện lên men pH 4,5; nhiệt độ 27°C, số vòng khuấy 50 rpm, lượng nấm men 10<sup>9</sup>/l và thời gian lên men 108 giờ. Kết quả lên men này đã tạo ra độ cồn là 14,4 g/l. Như vậy, kết quả này cũng gần giống với kết quả lên men của Nadja et al. (2013) [7] lên men từ rong *Ch. linum* là 18,1 (g/l) và kết quả của Mitsunori et al. (2011) [5] lên men từ rong *Ulva pertusa* là 18,5 g.

#### KẾT LUẬN

Quá trình thủy phân sinh khối rong *Ch. linum* bằng chế phẩm enzyme viscozyme L tạo ra hàm lượng carbohydrate cao 50,3 g/l trong điều kiện nồng độ enzyme 0,85 ml/g (có hoạt độ 42,5 UI/g), nhiệt độ 50°C, thời gian 33 giờ, pH 5,2.

Quá trình lên men ethanol từ dịch thủy phân rong *Ch. linum* của chủng Red Ethanol tạo ra hàm lượng ethanol 14,4 g/l.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. AOAC, 1990. Official Methods of Analysis (16<sup>th</sup>ed.) Association of Official Analytical Chemists. Washington D.C.
2. Dubois M., Gilies K., Hammilton J. K., Robers P. A., Smith F. A., 1951. A colorimetric method for the determination of sugars related substances. Anal. Chem., 28: 350-356.
3. Phạm Hoàng Hộ, 1969. Rong biển Việt Nam (phần phía Nam). Trung tâm học liệu Sài Gòn, 558 tr.
4. Lee S. M., Lee J. H., 2011. The isolation and characterization of simultaneous saccharification and fermentation microorganisms for *Laminaria japonica* utilization. Bioresource Technology, 102: 5962-5967.
5. Mitsunori Y., Kanami N., Osamu A., Kiyohiko N., 2011. Production of high concentrations of bioethanol from seaweeds that contain easily hydrolyzable polysaccharides. Process Biochemistry, 46: 2111-2116.
6. MyoungLae C., Chen Y., Sang M. K., Sang G. Y., 2010. Molecular Characterization and Biological Activities of Watersoluble Sulfated Polysaccharides from *Enteromorpha prolifera*. Food Sci. Biotechnol., 19(2): 525-533.
7. Nadja S. J, Anders T., Frank L., Sune T. T., Christian R., Hans L., Anne B. B., 2013. Pretreatment of the macroalgae *Chaetomorpha linum* for the production of bioethanol - Comparison of five pretreatment technologies. Bioresource Technology, 140: 36-42.
8. Suthasinee Y., Soottawat B., Passakorn K., 2015. Physico-chemical and gel properties of agar from *Gracilaria tenuistipitata* from the lake of Songkhla, Thailand. Food Hydrocolloids, 51: 217-226.
9. Thianming Z., David S. J., Randy L., 2008. Comparison of Amylose Determination Methods and the Development of a Dual Wavelength Iodine Binding Technique, Cereal Chern., 85(1): 51-58.

**STUDY ON CONDITIONS OF HYDROLYSIS  
GREEN SEAWEED *Chaetomorpha linum* BY ENZYME AND  
APPLICATION OF INBIOETHANOL PRODUCTION**

**Vo Thanh Trung<sup>1</sup>, Le Nhu Hau<sup>1</sup>, Nguyen Thanh Hang<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Nha Trang Institute of Technology Research and Application, VAST

<sup>2</sup>School of Biotechnology and Food Technology, Ha Noi University of Science and Technology

**SUMMARY**

*Chaetomorpha linum* seaweed composes a high carbohydrate content, various types of polysaccharides, with 38% cellulose in material. In our paper, the material from *Ch. linum* was treated by enzyme L Visocozyme and we found optimized hydrolysis conditions, vis. enzyme concentration: 0.85 ml/g (42.5 IU/g), time: 33 hours, temperature: 50°C, and pH: 5.2. The hydrolysis results of *Ch. linum* were: 50.3 g/l sugar solution which were fermented with Red Ethanol yeast under the following conditions pH: 4.5, temperature: 27°C, rotation rates; 50 rpm, CFU yeast: 10<sup>9</sup>/l, and fermentation time: 108 hours. Ethanol product of fermentation process was 14.4 g/l.

*Keywords:* *Chaetomorpha linum*, enzyme, hydrolysis, fermentation.

*Ngày nhận bài:* 21-9-2015