

## ĐẶC TÍNH ENZYME LIPASE CỐ ĐỊNH TRÊN CHẤT MANG CHITOSAN-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> BẰNG LIÊN KẾT ĐỒNG HÓA TRỊ

Bùi Xuân Đông<sup>1,✉</sup>, Phạm Thị Mỹ<sup>2</sup>, Huỳnh Văn Anh Thi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng

<sup>2</sup>Trường Đại học Sư phạm, Đại học Đà Nẵng

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: xdbui@dut.udn.vn

Ngày nhận bài: 08.5.2017

Ngày nhận đăng: 02.4.2018

### TÓM TẮT

Enzyme là chất xúc tác cho các phản ứng hóa sinh trong quá trình trao đổi chất của tế bào. Enzyme có tính đặc hiệu cao trên cơ chất, chẳng hạn enzyme lipase là enzyme có khả năng xúc tác nhiều loại phản ứng như thủy phân, ester hóa, alcoholysis... Ngày nay, việc nghiên cứu và ứng dụng enzyme lipase cố định để xúc tác cho phản ứng chuyển vị ester trong sản xuất biodiesel rất được quan tâm. Nhu cầu sử dụng biodiesel ngày càng tăng và kéo theo nhu cầu về nguyên liệu phục vụ sản xuất biodiesel cũng tăng nên cần tìm kiếm nguồn nguyên liệu thay thế. Một trong những phương hướng khả thi là sử dụng nguồn chất béo phế liệu, đặc biệt là dầu và mỡ động vật từ các ngành chế biến cá và thịt để sản xuất biodiesel. Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu cố định enzyme lipase trên chất mang chitosan-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Chất mang là phức hợp các hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> được hấp phụ trên chitosan nên có từ tính. Enzyme liên kết với vi hạt thông qua cầu nối trung gian là glutaraldehyde. Enzyme tự do được sử dụng để cố định là enzyme lipase của Hãng Sigma-Aldrich (Đức) được chiết xuất từ tụy lợn. Sau khi chế tạo enzyme lipase cố định, chúng tôi đã xác định được một số đặc tính của enzyme như sau: pH tối ưu là 6,0; nhiệt độ tối ưu 40°C; hoạt độ enzyme đo được ở pH, nhiệt độ tối thích và thời gian phản ứng trong 3 h là 185 IU/mg; hiệu suất gắn lipase lên chất mang đạt 75,1%. Nhóm nghiên cứu đã thử nghiệm tổng hợp biodiesel từ lipid thu nhận từ nước thải nhà máy sản xuất chả cá surimi với xúc tác lipase cố định. Các đặc tính của biodiesel thu được đã được phân tích, đáp ứng cơ bản các yêu cầu kỹ thuật TCVN 7717: 2007. Nhóm nghiên cứu cũng đưa ra những luận giải về khả năng sử dụng nguyên liệu thay thế trong sản xuất biodiesel.

**Từ khóa:** Chitosan; chuyển vị ester; diesel sinh học; enzyme cố định; lipase

### MỞ ĐẦU

Enzyme cố định là enzyme được định vị vật lý vào một vài vùng xác định trên chất mang mà vẫn giữ được hoạt tính xúc tác và có thể sử dụng lặp lại nhiều lần (Kennedy, Cabral, 1985). Có thể nói “enzyme cố định là enzyme được định vị trên các chất mang không hòa tan được gắn với nhau bằng liên kết đồng hóa trị tạo nên đại phân tử enzyme không hòa tan” (Đặng Thị Thu *et al.*, 2012). Enzyme cố định có nhiều ưu điểm hơn hẳn enzyme tự do, có thể sử dụng lặp đi lặp lại nhiều lần trong một thời gian dài; enzyme không tan không lẫn vào trong sản phẩm nên không gây ảnh hưởng xấu đến màu sắc, mùi vị sản phẩm; có thể làm ngừng nhanh chóng phản ứng khi cần thiết bằng cách tách enzyme ra khỏi hỗn hợp phản ứng; enzyme cố định khá bền với nhiệt độ, pH, dung môi hữu cơ... Tuy nhiên, việc sử dụng enzyme cố định cũng có những hạn chế nhất định

như: sự chuyển khối bị hạn chế, có thể mất hoạt tính sau khi cố định; không có hiệu quả đối với cơ chất rắn, mất tính thích nghi hình thể... Những hạn chế trên là không đáng kể so với những lợi ích mà enzyme cố định đem lại. Do vậy, ngày càng có nhiều nghiên cứu mới cũng như các công nghệ mới để cố định enzyme (Đặng Thị Thu *et al.*, 2012).

Yếu tố quan trọng trong chế tạo enzyme cố định là lựa chọn chất mang. Các polymer có thể được sử dụng làm chất mang để cố định enzyme bởi chúng có các nhóm chức thích hợp và dễ biến đổi về mặt hóa học. Một trong những chất mang quan trọng nhất cho mục đích này là các polymer tự nhiên như agarose và chitosan (Yolanda *et al.*, 2015). Chitosan là một polymer sinh học có bản chất hóa học là polysaccharide mạch thẳng gồm các đơn vị D-glucosamine và N-acetyl-D-glucosamine liên kết với nhau thông qua kiểu liên kết  $\beta$ -(1,4)-glycoside.

Chitosan là một nguyên liệu tương đối rẻ, có tính trơ, ưa nước và tương thích về mặt sinh học nên là một vật liệu phù hợp cho việc cố định enzyme. Hơn nữa, sự có mặt của các nhóm amin ( $-NH_2$ ) của chitosan và enzyme dễ dàng tạo liên kết cộng hóa trị với cầu nối, ví dụ các gốc aldehyde (Do Hữu Nghi *et al.*, 2014). Tại Việt Nam, chitosan đã được sản xuất công nghiệp từ vỏ đầu tôm tại Công ty Cổ phần Việt Nam Foods (Cà Mau) và trở nên phổ biến.

Hiện nay, trên địa bàn thành phố Đà Nẵng có nhiều nhà máy chế biến sản phẩm cá surimi để phục vụ nhu cầu tiêu dùng trong nước và xuất khẩu. Trong quá trình sản xuất surimi do đòi hỏi về kỹ thuật nên lipid (dầu cá) phải được tách ra hoàn toàn từ sản phẩm. Như vậy, lượng lipid lớn sau khi bị loại bỏ sẽ đi vào hệ thống nước thải và nhanh chóng bị thủy phân và bị ôi hóa, nên không thể tận dụng làm thực phẩm hay thức ăn chăn nuôi. Một giải pháp khả thi là tận dụng lipid trong nước thải surimi để sản xuất biodiesel. Việc ứng dụng enzyme lipase cố định có thể tái sử dụng nhiều lần trong sản xuất biodiesel sẽ mang lại nhiều lợi thế về mặt chi phí. Bên cạnh đó, việc tận dụng lipase trong nước thải có thể góp phần giảm thiểu ô nhiễm môi trường.

Vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu này là cố định được lipase lên chất mang chitosan- $Fe_3O_4$  để ứng dụng thực hiện phản ứng chuyển vị ester trong sản xuất biodiesel từ lipid surimi. Sau khi lipase được cố định lên chất mang, các nghiên cứu thực nghiệm được chú trọng là xác định hiệu suất gắn enzyme, các đặc tính của enzyme như vùng pH hoạt động tối ưu, vùng nhiệt độ hoạt động tối ưu, thời gian phản ứng tối ưu. Nhóm nghiên cứu đã thử nghiệm sử dụng lipase cố định để thực hiện phản ứng chuyển vị ester trong sản xuất biodiesel từ lipid surimi.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Enzyme lipase tách chiết từ tụy lợn, do Hãng Sigma-Aldrich (Đức) sản xuất và thương mại hóa. Hoạt lực của enzyme do nhà sản xuất công bố là

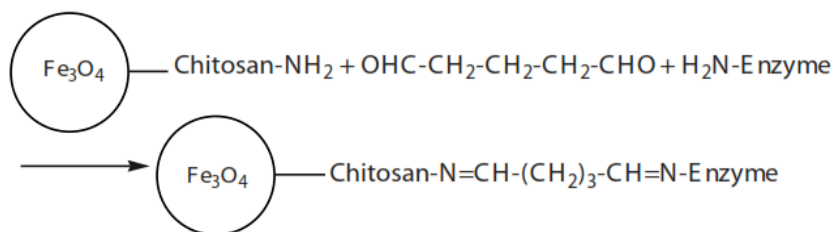
100÷400 IU/mg protein, enzyme xúc tác đặc hiệu cắt liên kết ester giữa các acid béo và glycerol của cơ chất là triacylglycerol.

### Chuẩn bị chất mang

Chitosan từ vỏ đầu tôm: Chitosan được tổng hợp bằng phương pháp hóa học tại Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học, Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng với độ deacetyl đạt 79%, độ nhớt 10,9 cP (Bui Xuan Dong *et al.*, 2013). Ở đây, chitosan được dùng để hấp phụ hạt nano sắt từ, đồng thời nhóm  $-NH_2$  của chitosan có khả năng tạo liên kết đồng hóa trị với nhóm  $-CHO$  của glutaraldehyde (chất tạo cầu nối giữa enzyme với chất mang). Chế tạo hạt nano sắt từ: Hạt nano sắt từ ( $Fe_3O_4$ ) được điều chế và kiểm tra cấu trúc tại Trung tâm Khoa học Vật liệu, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội: Hạt nano sắt từ  $Fe_3O_4$  được điều chế từ hỗn hợp muối sắt  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$  và  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  với nồng độ thích hợp theo tỷ lệ mol  $Fe^{2+} : Fe^{3+} = 2 : 1$ . Dung dịch được khuấy 600 rpm trong 30 min ở nhiệt độ phòng. Sau đó dung dịch NaOH 1M được nhỏ từ từ đến pH ~ 10 thì dừng lại. Phản ứng tiếp tục được thực hiện trong 30 min ở nhiệt độ 80°C. Lọc rửa hỗn hợp huyền phù thu được bằng nước cất đến pH 7,0. Sau đó sấy chân không ở nhiệt độ 60°C, P = 40 mbar trong 2 h. Hạt nano thu được được giữ trong môi trường chân không để sử dụng gắn enzyme (Phạm Xuân Núi *et al.*, 2013).

### Cố định lipase lên chất mang

Lipase cố định được chế tạo dựa trên nguyên lý như sau: Đầu tiên, hạt nano sắt từ  $Fe_3O_4$  được hấp phụ trên bề mặt chitosan, phức hợp tạo thành gọi là vi hạt chitosan- $Fe_3O_4$  (Hình 1). Sau đó, enzyme được gắn lên vi hạt thông qua cầu nối glutaraldehyde vì lipase có nhóm amin ( $-NH_2$ ) có thể tạo liên kết với một đầu chứa nhóm chức aldehyde ( $-CHO$ ) của glutaraldehyde và đầu chứa nhóm chức aldehyde còn lại của glutaraldehyde liên kết với nhóm amin của chitosan- $Fe_3O_4$  (Phạm Xuân Núi *et al.*, 2013), nguyên lý được mô tả trên hình 1.



**Hình 1.** Mô hình minh họa enzyme lipase cố định trên vi hạt “chitosan- $Fe_3O_4$ ”.

Từ nguyên lí trên, các mẫu lipase được chế tạo như sau (Phạm Xuân Núi *et al.*, 2013): Đầu tiên, các vi cầu Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-chitosan được tổng hợp bằng cách hòa tan 1g chitosan trong 100 mL dung dịch acetic acid nồng độ 0,2 M, khuấy mạnh hỗn hợp trong 30 min ở nhiệt độ phòng. Sau đó thêm 6 g hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> vào hỗn hợp dung dịch, tiếp tục khuấy trong 1 h. Các vi cầu Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-chitosan thu được có tính từ mạnh và được làm khô lạnh. Sau đó, sử dụng 2g chitosan-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> trộn với 20mL dung dịch glutaraldehyde 10% trong đệm phosphate, dung dịch đệm có pH 7,0 ÷ 7,5. Phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ 30°C trong 5 h. 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 20 mL dung dịch lipase (d = 2g/L, 0,025 M đệm phosphate, pH 7,5). Hỗn hợp được lắc liên tục ở nhiệt độ 35°C trong 3 h. Sau khi hoàn thành phản ứng cố định hóa, kết tủa có từ tính được tách bằng từ trường từ nam châm vĩnh cửu. Rửa 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. Sau khi chế tạo, hoạt tính lipase cố định được xác định ở pH 7,0, 37°C, thời gian phản ứng là 1 h với cơ chất là dầu oliu nhằm khảo cứu khả năng xúc tác và so sánh với hoạt tính lipase tự do ở cùng điều kiện phản ứng.

#### **Xác định hiệu suất cố định enzyme lipase lên chất mang**

Hiệu suất cố định (H<sub>cd</sub>) enzyme được xác định gián tiếp thông qua công thức (1):

$$(1) \quad H_{cd} = \frac{C_1 - C_2}{C_1} \times 100\%$$

Trong đó C<sub>1</sub> là nồng độ enzyme trong dung dịch lipase (d = 2 g/L, 0,025 M đệm phosphate, pH 7,5) trước khi trộn với chất mang chitosan-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> đã hoạt hóa; C<sub>2</sub> là nồng độ enzyme trong dung dịch lipase sau khi đã tách lipase cố định và dung dịch rửa lipase cố định. Ở đây, nồng độ protein-enzyme được xác định bằng phương pháp Bradford (Bradford, 1976).

#### **Xác định các đặc tính của lipase cố định**

Enzyme lipase cố định được khảo sát sự thay đổi hoạt độ dưới tác động của các yếu tố môi trường như: pH ở các mức 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5 và 8 (cố định τ = 1 h, 37°C) nhằm xác định pH tối thích; nhiệt độ ở các mức 30°C, 35°C; 40°C; 45°C; 50°C; 55°C; 60°C (cố định pH 6 và τ = 1 h) nhằm xác định nhiệt độ

phản ứng tối thích; thời gian phản ứng ở các thời điểm τ = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 h (cố định pH 6; 40°C) nhằm xác định thời gian phản ứng tối thích. Hoạt độ enzyme trong các thí nghiệm trên đây được xác định bằng phương pháp chuẩn độ Ota-Yamada với cơ chất là dầu oliu (Yamada *et al.*, 1962).

#### **Xác định độ bền và thử nghiệm sử dụng enzyme lipase cố định để tổng hợp biodiesel từ lipid surimi**

Độ bền enzyme cố định thường được thể hiện ở khả năng định vị cố định của enzyme trên chất mang dưới tác dụng của ngoại lực ví như lực khuấy đảo. Trong nghiên cứu này 100 mL enzyme lipase cố định trong đệm phosphate (pH 6) được điều chế với nồng độ enzyme là 150 µg/mL và được lắc trên máy lắc ngang ổn nhiệt (hiệu Grant GLS 400) ở nhiệt độ 40°C trong 24 h. Sau đó, enzyme được tách bằng nam châm, dịch được xác định nồng độ enzyme bằng phương pháp Bradford (Bradford, 1976), từ đó đánh giá lượng lipase bị rơi khỏi chất mang.

Enzyme lipase cố định được sử dụng để điều chế biodiesel thông qua việc xúc tác cho phản ứng ester hóa theo phương pháp của Koei *et al.*, (2011) với thông số phản ứng enzyme như sau: tỷ lệ mol lipid surimi/methanol - 1:4; tỷ lệ enzyme/lipid surimi - 2.8% (w/w); nhiệt độ phản ứng là 40°C; thời gian phản ứng 3 h; bổ sung 0.6% (w/w) nước cất theo khối lượng hỗn hợp phản ứng; phản ứng được thực hiện trên máy lắc ổn nhiệt. Mẫu lipid surimi được Nhà máy Bắc Đẩu Seafood (Đà Nẵng) cung cấp, nguồn nguyên liệu này được tách tuyển từ nước thải dây chuyền sản xuất surimi.

Sau khi thực hiện tách lipase cố định bằng từ tính và lọc, biodiesel thu được được phân tích thành phần và xác định hiệu suất chuyển hóa methyl ester tại Phòng thí nghiệm Xăng dầu - Công ty Xăng dầu Petrolimex Đà Nẵng sử dụng phương pháp đo các chỉ tiêu chất lượng của diesel sinh học theo TCVN 7717 : 2007.

#### **Phương pháp xử lý số liệu**

Các thí nghiệm được lặp lại tối thiểu 3 lần, kết quả đưa ra là trung bình hoặc có tính chất đại diện tốt nhất cho 3 lần thí nghiệm (Lê Đức Ngọc, 2011). Kết quả thí nghiệm và độ lệch chuẩn (SD) được xử lý và tính toán bằng chương trình Microsoft Excel 2010.

#### **KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

##### **Kết quả xác định hiệu suất gắn enzyme và hoạt tính lipase cố định**

Việc cố định enzyme lên chất mang polymer trong nghiên cứu công nghệ enzyme là cần thiết để ứng dụng trong công nghiệp và xử lý môi trường. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh enzyme lipase đã được cố định thành công với hiệu suất cao (Kennedy,

Cabral, 1985; Pham Xuan Nui *et al.*, 2013; Do Huu Nghi *et al.*, 2014; Yolanda *et al.*, 2015). Việc sử dụng chất mang là chitosan để gắn enzyme lipase thông qua cầu nối glutaraldehyde cũng đã được đề cập trong nghiên cứu của Yolanda *et al.*, (2015).

**Bảng 1.** Hiệu suất gắn và hoạt tính lipase cố định.

Thông số	Nồng độ protein-enzyme	Hoạt độ (AE)
$C_1$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	200 $\pm$ 0,3	-
$C_2$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	49,82 $\pm$ 0,5	-
Hiệu suất cố định enzyme, $H_{cd}$ (%)	75,1	-
Hoạt độ enzyme tự do, $AE_{tự\ do}$ (IU/mg)	-	250 $\pm$ 0,7
Hoạt độ enzyme cố định, $AE_{cố\ định}$ (IU/mg)	-	135 $\pm$ 0,4
$AE_{còn\ lại}$ (%)	-	54

Ghi chú: AE – là kí hiệu hoạt độ enzyme (activity of enzyme);  $\pm$  - xem công thức (1).

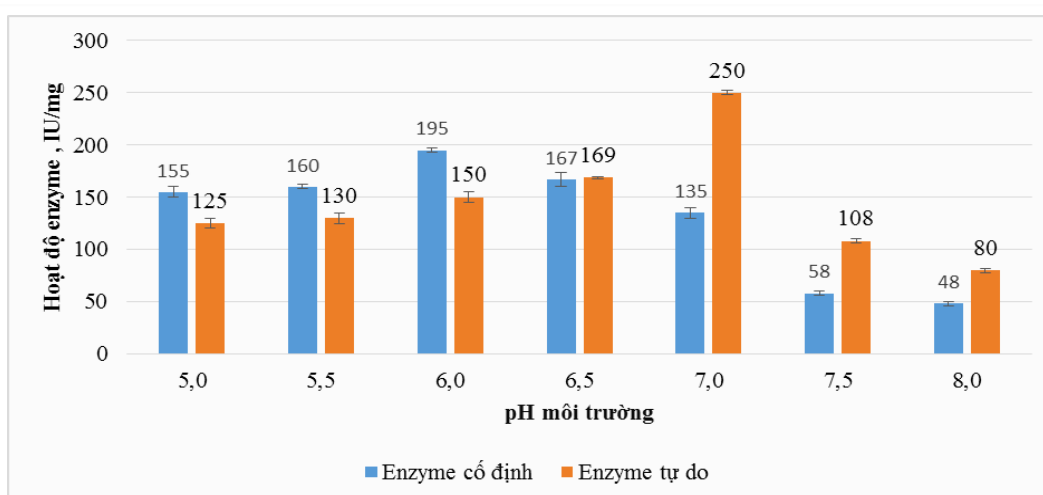
Kết quả ở bảng 1 cho thấy hiệu suất cố định enzyme ( $H_{cd}$ ) tính theo lượng protein là 75,1%, nhưng hoạt độ (AE) còn lại tương đối thấp (135 IU/mg đo ở pH 7, 37°C, thời gian phản ứng là 1 h) điều này có thể được giải thích do độc tính của glutaraldehyde đối với enzyme. Kết quả nghiên cứu tương ứng với nghiên cứu của Đỗ Hữu Nghi *et al.*, (2014) khi cố định enzyme lên hạt composite tạo bởi chitosan và cao lanh hoạt hóa.

#### Nghiên cứu xác định pH môi trường thích hợp cho lipase cố định hoạt động

Độ pH môi trường là một trong những yếu tố ảnh hưởng tới hoạt độ enzyme. Mỗi enzyme có một vùng pH hoạt động tối ưu, mà ở đó tốc độ phản ứng enzyme ở mức độ cao (Đặng Thị Thu *et al.*, 2012).

Trong nghiên cứu này, sự thay đổi hoạt độ enzyme tự do và enzyme cố định được khảo sát ở các mức pH khác nhau, thông số nhiệt độ được cố định ở 37°C, thời gian phản ứng 1 h. Kết quả khảo sát được thể hiện trên hình 2.

Đồ thị trên hình 2 cho thấy, enzyme cố định có hoạt độ tăng dần trong vùng pH từ 5 đến 6 và giảm dần trong vùng pH từ 6 đến 8, hoạt độ enzyme cố định đạt giá trị cực đại (195 IU/mg) tại pH 6. Đối với enzyme lipase tự do, hoạt độ enzyme tăng dần trong vùng pH từ 5 đến 7 và giảm trong vùng pH từ 7 đến 8, hoạt độ đạt giá trị cực đại (250 IU/mg) tại pH 7. Như vậy, pH tối ưu của lipase cố định có xu hướng chuyển dịch về vùng pH thấp hơn so với lipase tự do, điều này phù hợp với nghiên cứu của tác giả Shah và Gupta (2007).



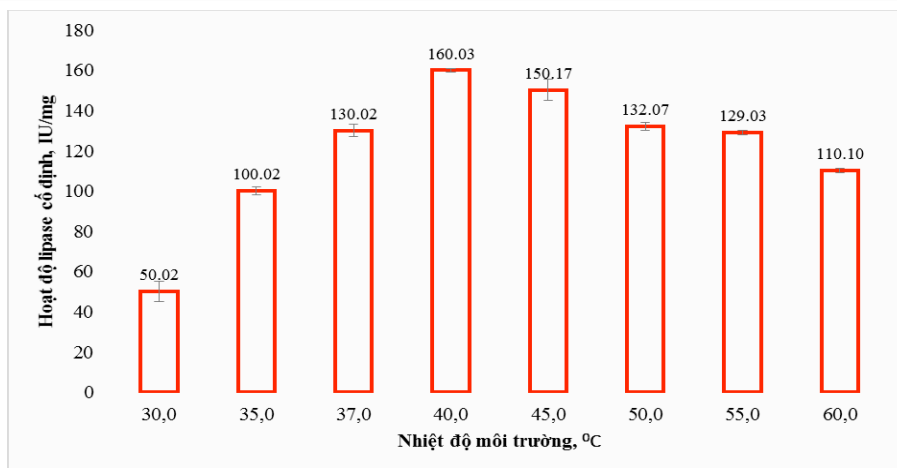
**Hình 2.** Ảnh hưởng của pH môi trường đến hoạt độ enzyme lipase cố định

### Nghiên cứu xác định nhiệt độ thích hợp cho lipase cố định hoạt động

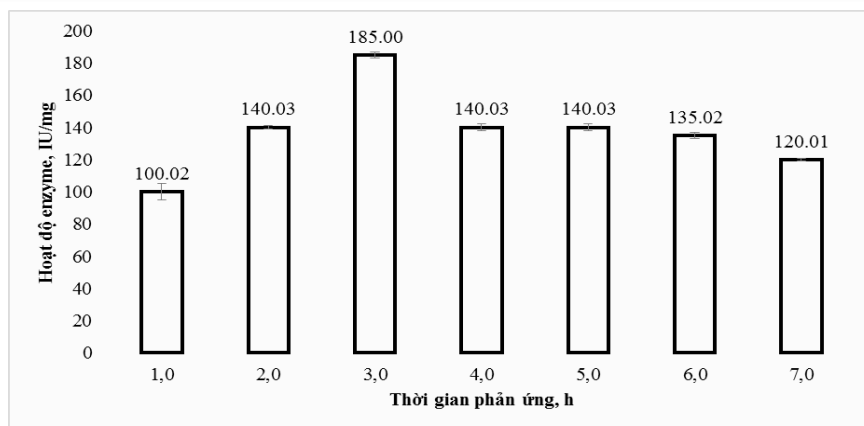
Trong phản ứng enzyme, nhiệt độ là một thông số quan trọng quyết định tốc độ phản ứng enzyme. Tuy nhiên, nhiệt độ cũng có thể làm bất hoạt enzyme hoặc làm biến tính enzyme (Đặng Thị Thu *et al.*, 2012). Vì vậy, xác định nhiệt độ tối thích cho phản ứng enzyme là công việc cần thiết. Hình 3 thể hiện

kết quả khảo sát ảnh hưởng nhiệt độ môi trường phản ứng lên hoạt độ enzyme lipase cố định.

Phân tích kết quả cho thấy, hoạt độ lipase cố định đạt mức cực đại (160 IU/mg) ở nhiệt độ 40°C. Hoạt độ lipase cố định tăng dần ở vùng nhiệt độ từ 30°C đến 40°C, và giảm dần từ 40°C đến 60°C, hiện tượng này có thể lý giải do ở nhiệt độ cao lipase kém bền nhiệt đã bắt đầu bị biến tính (Đặng Thị Thu *et al.*, 2012, Yolanda *et al.*, 2015).



Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường lên hoạt độ enzyme lipase cố định



Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian phản ứng lên hoạt độ enzyme lipase cố định

### Nghiên cứu xác định thời gian phản ứng thích hợp của lipase cố định

Theo phương pháp chuẩn độ của Ota-Yamada (1962), đối với enzyme tự do thời gian phản ứng tối ưu là 1 h, trường hợp này lipase tự do phân tán trong môi trường phản ứng rất đồng đều. Nhưng đối với lipase cố định khả năng phân tán kém hơn, nên

enzyme tiếp xúc với cơ chất kém hơn. Vì lẽ đó, việc xác định thời gian phản ứng tối thích của lipase cố định là công việc cần thiết. Việc khảo sát này được thực hiện ở 40°C và pH 6,0. Kết quả khảo sát được thể hiện trên hình 4.

Đồ thị hình 4 cho phép xác định được thời gian tối ưu của phản ứng enzyme là 3 h, đạt mức 185IU/mg. Từ mốc 0 h tới 3 h hoạt độ lipase tăng

dần, có thể giải thích do hiệu ứng của quá trình khuấy đảo làm cho cơ chất tiếp xúc tốt với enzyme. Nhưng sau thời điểm 3 h hoạt độ enzyme giảm dần, có thể do enzyme bị ức chế bởi sản phẩm tạo thành nhiều, án ngữ trung tâm hoạt động của enzyme, làm cho cơ chất khó tiếp xúc với trung tâm hoạt động của enzyme.

### Kết quả xác định độ bền và thử nghiệm sử dụng enzyme lipase cố định để tổng hợp biodiesel từ lipid surimi

Nghiên cứu này đã xác định được, lipase cố định có khả năng chịu lực lắc trong đệm phosphate. Cụ thể, sau 24 h lắc trên máy ôn nhiệt, ngưng lắc và tách lipase bằng nam châm, dịch còn lại đo được nồng độ protein-lipase là 3,5 µg/mL, lượng protein này khá nhỏ so với lượng lipase được cố định, ở mức 150

µg/mL. Chúng tỏ, phần lớp lipase cố định rất chắc chắn trên chất mang.

Kết quả so sánh các chỉ tiêu của biodiesel từ lipid surimi được điều chế với xúc tác lipase cố định với các chỉ tiêu biodiesel của châu Âu và Mỹ (EN 14214 và ASTM - D6751) và của Việt Nam (TCVN 7717:2007) được trình bày trong bảng 2.

Phân tích kết quả trong bảng 2 nhận thấy, biodiesel sản xuất từ lipid surimi bằng phương pháp enzyme đáp ứng cơ bản các yêu cầu kỹ thuật, nhưng chưa xác định được điểm chớp cháy và trị số cetane. Một số hạn chế nhận thấy trong mẫu biodiesel từ lipid surimi là chỉ số acid cao, ở mức 0,4 mg KOH/g. Điều này chứng minh, trong biodiesel vẫn còn acid béo tự do và quá trình chuyển vị ester chưa xảy ra hoàn toàn.

**Bảng 2.** So sánh các tính chất của biodiesel từ lipid surimi với các chỉ tiêu biodiesel gốc (B100) trong tiêu chuẩn quốc tế và TCVN.

Chỉ tiêu	Biodiesel EN-14214	Biodiesel ASTM – D6751	TCVN 7717 : 2007 - Biodiesel gốc	Biodiesel điều chế bằng lipase cố định
Trạng thái vật lý	-	-	-	Màu vàng nâu, trong
Hàm lượng este, %	96,5	-	96,5	94
Khối lượng riêng tại 15°C, kg/m <sup>3</sup>	860-900	-	860 – 900	880
Điểm chớp cháy (cốc kín), °C	120	130	130	-
Độ nhớt động học tại 40°C, mm <sup>2</sup> /s	3,5 – 5,0	-	1,9 – 6,0	4,4
Lưu huỳnh, mg/kg	10	15	-	-
Trị số cetane	51	45	47	-
Trị số iodine, g/100 g	0	-	120	110
Trị số acid (mg KOH/g)	-	-	-	0,4

### KẾT LUẬN

Enzyme lipase cố định trên vi hạt chitosan-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> đã được chế tạo thành công với hiệu suất gắn lipase lên chất mang đạt 75,1% so với lượng lipase tự do ban đầu. Enzyme lipase cố định có một số đặc tính như pH tối ưu là 6; nhiệt độ tối ưu 40°C; hoạt độ enzyme đo được ở điều kiện tối ưu và thời gian phản ứng 3 h là 185 IU/mg, kết quả ứng dụng để điều khiển phản ứng enzyme. Biodiesel đã được thử nghiệm tổng hợp từ lipid surimi với xúc tác lipase cố định đáp ứng cơ bản các yêu cầu kỹ thuật TCVN 7717 : 2007.

**Lời cảm ơn:** Nhóm nghiên cứu xin cảm ơn sự hỗ trợ về tài chính của Quỹ phát triển Khoa học và Công

nghệ, Đại học Đà Nẵng thông qua Đề tài Khoa học và Công nghệ Đ2015-02-115.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Chen JP, Chiu SH (1999) Preparation and characterization of urease immobilized onto porous chitosan beads for urea hydrolysis. *Bioprocess Eng* 21(4): 323-330.
- Bùi Xuân Đông, Trương Văn Thiên, Nguyễn Xuân Hoàng, Phạm Thị Kim Thảo (2013) Báo cáo tổng kết:

Ứng dụng phương pháp sinh học để tổng hợp chitin từ phế liệu chế biến thủy sản. Đề tài NCKH cấp ĐHQĐ, Mã số Đ2013-02-53.

Kennedy JF, Cabral JMS (1985) *In Immobilized Cells and Enzymes a Practical Approach*, ed. J. Woodward. IRL Press Ltd, Oxford and Washington, DC., p. 19.

Koei K, Yasuhiro O, Ryo T (2011) Application of a *Burkholderia cepacia* lipase-immobilized silica monolith to batch and continuous biodiesel production with a stoichiometric mixture of methanol and crude Jatropha oil. *Biotechnol Biofuels* 4: 42.

Metin AÜ (2013) Immobilization of laccase onto polyethyleneimine grafted chitosan films: Effect of system parameters. *Macromol Res* 21(10): 1145-1152.

Đỗ Hữu Nghị, Vũ Đình Giáp, Đỗ Hữu Trí, Trần Thị Như Hằng, Trần Thị Hồng Hà, Lê Mai Hương (2014) Cố định cellulase từ nấm *Tricoderma* sp. trên hạt composit tạo bởi chitosan và cao lanh hoạt hóa. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 52(5): 557-566.

Lê Đức Ngọc (2011) *Bài giảng Xử lý số liệu và kế hoạch*

hóa thực nghiệm. Trường ĐHKHTN- ĐHQG Hà Nội.

Phạm Xuân Núi, Nguyễn Ngọc Sơn, Lê Thị Cúc (2013) Tổng hợp và đặc trưng xúc tác enzyme lipase cố định trên nano từ tính ứng dụng cho quá trình chuyển hóa biodiesel từ dầu đậu nành. *Dầu khí* 11: 37-42.

Shah S, Gupta MN (2007) Lipase catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a solvent free system. *Process Biochem* 42: 409-414.

Đặng Thị Thu, Lê Ngọc Tú, Tô Kim Anh, Phạm Thu Thủy, Nguyễn Xuân Sâm (2012) *Công nghệ Enzyme*. NXB Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, 320 trang.

Yamada K, Ota U, Mochida H (1962) Quantitative determination of lipases. *Agri Biol Chem* 26: 636-640.

Yolanda O, José S, Hened S, Raúl GL, José LM, Edith MC, Gabriela de la C, Elda PS, Fernando JA, Maria AZ, Héctor F, Anna I (2015) Immobilization of *Aspergillus niger* lipase on chitosan-coated magnetic nanoparticles using two covalent-binding methods. *Bioprocess Biosyst Eng* 38(8): 1437-1445.

## CHARACTERIZATION OF LIPASE IMMOBILIZED ONTO CARRIER CHITOSAN-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> BY THE COVALENT COUPLING METHOD

Bui Xuan Dong<sup>1</sup>, Pham Thi My<sup>2</sup>, Huynh Van Anh Thi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>The University of Danang, University of Science and Technology

<sup>2</sup>The University of Danang, University of Education,

### SUMMARY

Enzymes are catalysts for biochemical reactions in the cell's metabolism. Enzymes are highly specific in their action on substrates. Lipase (triacylglycerol acylhydrolase) is a unique enzyme which can catalyze various types of reactions such as hydrolysis, esterification, alcoholysis... In recent days, studying and applying immobilized lipase in catalyzing transesterification of biodiesel production has been receiving much attention. The increased demand for biodiesel and the difficulties in obtaining enough quantities of raw materials for its production are stimulating the search for alternative feedstocks. Among the various possibilities, the utilization of residual fatty materials, in particular oils and animal fat residues from the meat and fish processing industries, are increasingly seen as viable options for biodiesel production. This paper presents the results of producing fixed lipase enzyme on microparticle chitosan-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Microparticle is a complex of nano particles Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> being absorbed on chitosan so it has magnetic property. Enzyme links to microparticle through an intermediate bridge – glutaraldehyde. Free enzyme which is used to fix is commercial lipase enzyme of Sigma (Germany) being extracted from pancreas of pig. Under the optimum conditions (pH 6, 40°C), after 3 hours reaction, immobilized enzyme activity measured 185 IU/mg and the productivity of attaching lipase to the carrier ratio was 75.1%. With immobilized lipase, the result of testing the biodiesel synthesized by lipid from wastewater of the surimi fish fillets manufacturing. The fuel properties of the biodiesel were further analyzed. The characterizations of the produced biodiesel showed that it met Vietnam standart (TCVN 7717:2007). Also discussed are the questions related to the viability of using this type of feedstocks in biodiesel production.

**Keywords:** Biodiesel; chitosan; immobilized enzyme, lipase, trans ester