



DOI:10.22144/ctu.jsi.2019.036

TỐI ƯU QUÁ TRÌNH NUÔI CẤY NẤM MỐC *Aspergillus niger* THU NHẬN ENZYME LIPASE VÀ ỨNG DỤNG TRONG TIỀN XỬ LÝ NƯỚC THẢI SỮA TỔNG HỢP

Đào Thị Mỹ Linh^{1*}, Nguyễn Thị Quỳnh Mai¹, Trần Thị Mỹ Thảo², Lý Thị Diễm Trang², Lê Thị Mỹ Trinh² và Võ Thị Thúy Vân²

¹Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh

²Sinh viên khóa 05DHSK khoa Công nghệ Sinh học

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Đào Thị Mỹ Linh (email: linhdtm@cntp.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 13/11/2018

Ngày nhận bài sửa: 15/02/2019

Ngày duyệt đăng: 12/04/2019

Title:

Optimization of lipase production from *Aspergillus niger* for applications in synthetic dairy wastewater treatment

Từ khóa:

Aspergillus niger, bề mặt đáp ứng (RSM), lipase, lipid, tiền xử lý

Keywords:

Aspergillus niger, lipase, lipid, pre-treatment, response surface methodology (RSM)

ABSTRACT

This study is aimed to optimize some significant factors affecting the bio-synthesis ability of lipase from *Aspergillus niger* by response surface methodology. The activity of lipase was then assessed its potential to remove lipid in synthetic dairy wastewater with enzyme concentration $0.1 \div 0.5\%$, w/v, temperature $30 \div 50^\circ\text{C}$, and fat concentration $200 \div 3.400$ mg/L. Biogas volume, COD, color were determined to evaluate the treatment potential. Results showed that lipase activity was 1.11 UI/mL with optimum conditions: moisture content of 59.42%, culture time of 92.34 hours, ratio of groundnut oil cake and bagasse of 7.13/2.87 (w/w). The enzyme was applied in dairy wastewater treatment. At the condition: enzyme concentrate of 0.2%, temperature of 40°C , and lipid concentration of 1000 mg/L, the performance of the anaerobic treatment was significantly improved, whereas the generated biogas volume is $1,668.78 \text{ cm}^3$, COD and color removal efficiency are 90.9% and 93.4%, respectively. Lipid removal efficiency was over 99% in both wastewater samples after 5 days.

TÓM TẮT

Nghiên cứu tối ưu bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) để tìm sự tương tác đồng thời của độ ẩm, thời gian và tỉ lệ cơ chất lên quá trình tổng hợp lipase từ *Aspergillus niger*, đánh giá khả năng thủy phân của lipase ở bước tiền xử lý lipid trong nước thải gồm: nồng độ enzyme $0,1 \div 0,5\%$ (w/v), nhiệt độ $30 \div 50^\circ\text{C}$ và nồng độ chất béo $200 \div 3.400$ mg/L. Theo dõi các chỉ số khí biogas, nhu cầu oxy hóa học, độ màu. Kết quả, hoạt tính lipase đạt 1,11 UI/mL với các điều kiện tối ưu độ ẩm 59,42%, thời gian 92,34 giờ, tỉ lệ bánh dầu và bã mía là 7,13/2,87 (w/w). Enzyme tiền xử lý lipid với các điều kiện nồng độ enzyme 0,2%, nhiệt độ 40°C và nồng độ chất béo là 1.000 mg/L. Nước thải được tiền xử lý giúp tăng hiệu quả đáng kể ở bước xử lý kỵ khí so với nước thải thô: khí biogas thu được $1.668,78 \text{ cm}^3$ so với $991,06 \text{ cm}^3$, hiệu quả loại bỏ COD là 90,9% so với 56,9%, độ màu là 93,4% so với 50,2%, loại bỏ lipid đạt trên 99% ở cả hai loại nước thải sau 5 ngày.

Trích dẫn: Đào Thị Mỹ Linh, Nguyễn Thị Quỳnh Mai, Trần Thị Mỹ Thảo, Lý Thị Diễm Trang, Lê Thị Mỹ Trinh và Võ Thị Thúy Vân, 2019. Tối ưu quá trình nuôi cấy nấm mốc *Aspergillus niger* thu nhận enzyme lipase và ứng dụng trong tiền xử lý nước thải sữa tổng hợp. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học)(1): 277-285.

1 GIỚI THIỆU

Lipase (ester triacylglycerol hydrolase, EC 3.1.1.3) là một enzyme quan trọng trong việc thủy phân chất béo, giải phóng các acid béo tự do và glycerol. Lipase có ở hầu hết mọi cơ thể sống, tế bào và có vai trò quan trọng trong quá trình trao đổi chất, hấp thu và chuyển hóa lipid (Vakhlu, 2006). Nghiên cứu lipase từ vi sinh vật đã tăng lên do tiềm năng thương mại lớn, nhu cầu của lipase trong thị trường công nghiệp enzyme toàn cầu đã tăng lên đáng kể. Trong tương lai, loại enzyme này sẽ đạt được tầm quan trọng tương đương với protease, loại enzyme hiện chiếm đến 25-40% doanh số bán enzyme công nghiệp (Hasan *et al.*, 2010). Lipase được ứng dụng nhiều trong ngành công nghiệp thực phẩm, tổng hợp các polymer sinh học nhờ xúc tác của lipase được ứng dụng làm màng bao kỹ nước. Trong ngành công nghiệp chất tẩy rửa, lipase giúp loại bỏ các vết dầu mỡ trên vải, tăng khả năng tẩy rửa của bột giặt, ngoài ra lipase còn được ứng dụng trong hóa học, y học. Do vậy, nhu cầu về enzyme lipase là rất lớn, song các chế phẩm lipase đang sử dụng phần lớn là nhập khẩu. Mặt khác, quá trình sinh tổng hợp enzyme lipase chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố như độ ẩm, thời gian nuôi cấy, cơ chất cảm ứng. Việc nghiên cứu về khả năng sinh tổng hợp, thu nhận lipase có hoạt tính cao ổn định từ vi sinh vật là cần thiết có thể sản xuất lipase nội địa với giá thành rẻ.

Trong thực tế, đã có nghiên cứu tìm ra các phương pháp xử lý nước thải ô nhiễm chất béo cao như phương pháp hóa lý sử dụng muối và các hệ thống tách dầu và nước. Tuy nhiên, chi phí cao, hiệu quả của việc loại bỏ COD (Chemical oxygen demand) hòa tan và chất béo phân hủy sinh học thấp. Hơn nữa, chất béo có thể đông lại ở nhiệt độ thấp hơn, gây ra tắc nghẽn và tạo mùi khó chịu (Cammarota *et al.*, 2001). Với phương pháp xử lý sinh học hiếu khí, chất thải có nồng độ chất béo cao sẽ dẫn đến sự hình thành các màng xung quanh các hạt bùn sinh học, cản trở việc truyền oxy và cơ chất tới các vi sinh vật trong bùn hoạt tính, kéo theo đó là sự gia tăng các nấm sợi, làm cấu trúc bông bùn lỏng lẻo, kết quả là bùn khó lắng làm giảm hiệu quả xử lý (Alberton *et al.*, 2010). Xử lý kỵ khí được đánh giá có nhiều ưu điểm trong xử lý nước thải do giảm tác động đến môi trường và giảm lượng bùn tạo ra trong quá trình xử lý, tuy nhiên với nước thải có chứa lượng chất béo cao thì xử lý kỵ khí gặp phải một số vấn đề như bùn khó lắng, hình thành lớp mỡ ở bề mặt của bể phản ứng, không phân giải hết chất béo, làm ức chế hoạt động xử lý của vi sinh vật kỵ khí, thời gian xử lý lâu. Để khắc phục nhược điểm này, việc ứng dụng enzyme lipase gần đây đã được nghiên cứu vì enzyme thân thiện và đáp ứng những quy định nghiêm ngặt về môi trường (Mendes *et al.*,

2006). Trước khi xử lý sinh học kỵ khí, sử dụng enzyme lipase sẽ làm biến đổi một phần chất béo, làm giảm các phản ứng sinh học và giảm các vấn đề ở các giai đoạn xử lý nước thải tiếp theo (Cammarota *et al.*, 2001).

Nghiên cứu nhằm tối ưu điều kiện nuôi cấy để thu nhận chế phẩm lipase từ việc tận dụng nguồn phụ phẩm bánh dầu và bã mía làm cơ chất. Các điều kiện tiền xử lý được khảo sát để tăng hiệu suất của quá trình xử lý nước thải tổng hợp từ sữa giàu chất béo.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu

Aspergillus niger được phân lập từ mẫu dứa mốc, được định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 28S ở phòng thí nghiệm Công ty Nam Khoa Thành phố Hồ Chí Minh.

Chế phẩm lipase ứng dụng trong tiền xử lý nước thải tổng hợp giàu chất béo thu được từ môi trường bán rắn nuôi cấy *Aspergillus niger* được tối ưu các yếu tố ảnh hưởng tới quá trình sinh tổng hợp lipase. Tiến hành trích ly lipase bằng dung môi NaCl (1%) + Triton X-100 (0,5%), ly tâm 5500 vòng/phút trong 15 phút, cô đặc enzyme bằng phương pháp tiếp tuyến với kích thước cột lọc 3 kDa, sấy phun với nồng độ maltodextrin 18%, nhiệt độ sấy đầu vào là 150°C.

Nước thải tổng hợp được dùng tiền xử lý bởi enzyme lipase là hỗn hợp các loại sữa tươi của Vinamilk. Trong 100 mL hỗn hợp sữa có 3,5 g chất béo (kết quả phân tích tại Quatest 3). Pha loãng hỗn hợp sữa với nước cất hai lần theo các tỷ lệ: (1:174,5) (1:34), (1:18,5), (1:12,5), (1:9,3) để đạt với hàm lượng chất béo tương ứng: 200, 1000, 1800, 2600, 3400 mg/L (Adulkar & Rathod, 2014).

Bùn hoạt tính được cung cấp từ Khoa Môi trường và Tài nguyên, Trường Đại học Bách Khoa Thành phố Hồ Chí Minh đảm bảo nồng độ vi sinh vật (g/L) trong bùn không nhỏ hơn 15,891 g/L.

2.2 Phương pháp bố trí

2.2.1 Tối ưu môi trường nuôi cấy *Aspergillus niger* sinh tổng hợp enzyme lipase

Quá trình tối ưu hóa được thực hiện bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) nhằm tìm sự tương tác đồng thời của các yếu tố tác động ảnh hưởng lên quá trình tổng hợp lipase của *Aspergillus niger* bằng cách sử dụng quy hoạch trực giao đối xứng cho 3 biến. Các yếu tố được lựa chọn khảo sát ảnh hưởng khả năng sinh enzyme lipase và được nghiên cứu tại 3 mức (Bảng 1) dựa trên kết quả nghiên cứu của Đào Thị Mỹ Linh và *ctv.* (2018). Ma trận thực nghiệm để tối ưu được thiết kế theo mô

hình Box-Behnken (Nguyễn Cảnh, 2016), với 15 thí nghiệm được thiết kế theo Bảng 2.

Tiến hành thực nghiệm, xây dựng phương trình quy hoạch thực nghiệm. Hàm đáp ứng lựa chọn là

hoạt tính enzyme lipase (Y, UI/mL) mô hình hóa được biểu diễn bằng phương trình bậc 2: $Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2$.

Bảng 1: Giá trị mã hóa và các mức của ma trận tối ưu

Yếu tố khảo sát		Đơn vị	Mức ảnh hưởng		
Tên yếu tố	Ký hiệu		-1	0	+1
Độ ẩm	X ₁	%	50	60	70
Thời gian	X ₂	giờ	72	96	120
Khối lượng cơ chất	X ₃	g	5	7,5	10

Phương trình là cơ sở để xác định các giá trị tối ưu của các yếu tố ảnh hưởng nói trên. Trong đó: x₁, x₂, x₃ lần lượt là các yếu tố độ ẩm, thời gian nuôi cấy, tỉ lệ cơ chất; b₁, b₂, b₃ là các hệ số bậc 1; b₁₁, b₂₂, b₃₃ là các hệ số bậc 2; b₁₂, b₂₃, b₁₃ là các hệ số tương tác của từng cặp yếu tố; x₁, x₂, x₃, x₁², x₂², x₃², x₁₂, x₁₃, x₂₃ là các biến độc lập.

Xử lý kết quả thực nghiệm bằng phần mềm Modde 5 phân tích các hệ số hồi quy, bề mặt đáp ứng và tối ưu hóa thuật toán hàm mong đợi. Xác định giá trị ảnh hưởng của từng yếu tố tới hoạt tính enzyme lipase đạt giá trị cao nhất.

2.2.2 Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến khả năng thủy phân chất béo trong nước thải sữa của chế phẩm lipase

Nước thải sữa được tiền xử lý bằng chế phẩm lipase với các nồng độ enzyme được khảo sát lần lượt là 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5% (w/v) phản ứng thủy phân được thực hiện khảo sát ở các nhiệt độ 30°C, 40°C, 50°C, pH 7, đặt trong máy lắc ổn nhiệt ở 120 rpm, trong 48 giờ (Leal *et al.*, 2006) với các nồng độ chất béo khảo sát là 200, 1000, 1800, 2600, 3400 mg/L. Chỉ tiêu theo dõi là lượng acid béo tự do sinh ra và phần trăm thủy phân lipid.

2.2.3 Xử lý kỵ khí nước thải

Mô hình xử lý kỵ khí, lấy 200 mL nước thải cho vào chai thủy tinh, bổ sung chế phẩm lipase và thực hiện quá trình thủy phân ở các điều kiện thích hợp. Bùn hoạt tính được thêm đạt tỉ lệ COD trong nước thải ban đầu và vi sinh vật trong bùn là 1:1 (Valladao *et al.*, 2007), điều chỉnh pH 6,8÷7,2 bằng NaHCO₃ (Cammarota *et al.*, 2001). Đậy nắp cao su có khoan lỗ để lắp ống thu khí sinh học. Dùng ống nghiệm đường kính 25 mm để thu khí sinh học. Đặt hệ thống ở điều kiện nhiệt độ phòng (từ 25÷30°C), khuấy trộn với tốc độ 50 rpm bằng máy khuấy từ, đảm bảo điều kiện kỵ khí trong thời gian thí nghiệm. Mẫu đối chứng được thực hiện tương tự chỉ khác ở nước thải tổng hợp ban đầu không được bổ sung chế phẩm lipase. Các chỉ tiêu theo dõi là: thể tích khí sinh học, pH, COD, độ màu trong thời gian 5 ngày, hàm lượng

chất béo (lipid) được xác định sau 14 ngày mẫu được gửi đi phân tích tại Quatest3.

2.3 Phương pháp phân tích

Xác định hoạt tính lipase bằng phương pháp chuẩn độ: dùng 5 mL cơ chất gồm 1,25 mL dầu olive và 3,75 mL gum arabic 7% (v/v), 2 mL đệm phosphat 0,01 M pH 7 và 1 mL dịch enzyme thô. Hỗn hợp được ủ 37°C và lắc với tốc độ 130 vòng/phút trong 30 phút. Ngừng phản ứng enzyme bằng cách thêm 15 mL hỗn hợp acetone và ethanol (1:1, v/v). Chuẩn độ bằng NaOH 0,05 M dùng phenolphthalein như chất chỉ thị ở pH 11 để xác định lượng acid béo tự do. Đối chứng tiến hành tương tự, enzyme cho vào sau khi đã cho hỗn hợp acetone:ethanol. Một đơn vị hoạt tính lipase được xác định là lượng enzyme tạo ra 1 μmol acid béo trong mỗi phút ở điều kiện pH 7 và 40°C (Fleuri *et al.*, 2014).

$$\text{Hoạt tính lipase (UI/mL)} = \frac{\Delta V_{NaOH} \cdot C_M NaOH \cdot 1000}{V_{enzyme} \cdot t}$$

Trong đó: ΔV_{NaOH}: hiệu thể tích NaOH mẫu và đối chứng (mL), C_{M NaOH}: nồng độ mol của NaOH, V_{enzyme}: lượng enzyme tham gia phản ứng (mL), t: thời gian phản ứng (phút), 1000: hệ số quy đổi đơn vị

Xác định lượng acid béo tự do: hút 2 mL nước thải được xử lý bằng enzyme cho vào bình tam giác 250 mL và thêm vào bình 10 mL hỗn hợp axeton và ethanol (1:1 v/v) để biến tính enzyme và dừng phản ứng. Hỗn hợp phản ứng được chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0,05 M đến pH 11, bằng máy đo pH (Mendes and Castro, 2005). Phần trăm thủy phân xác định tương tự thay dung dịch chuẩn độ là KOH 0,1 N. Sử dụng phenolphthalein làm chỉ thị để xác định chỉ số acid (Adulkar and Rathod, 2014), phần trăm thủy phân là tỉ lệ của chỉ số acid và chỉ số xà phòng hóa nhân với 100%.

Thể tích khí biogas đo bằng phương pháp di chuyển mực nước (Mobarak-Qamsari *et al.*, 2012). Xác định COD dùng phương pháp đun kín Xác định độ màu bằng phương pháp hấp thụ quang phổ (Eaton *et al.*, 1998). Phân tích VSS (volatile

suspended solid) cặn hữu cơ để xác định vi sinh vật trong bùn hoạt tính bằng phương pháp cân khối lượng sau khi lọc, sấy 103°C, nung 550°C (Nguyễn Trung Việt và ctv., 2011).

Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, số liệu thu nhận được tổng hợp bằng phần mềm Microsoft Excel 2010. Đánh giá sự khác biệt có ý nghĩa giữa các mẫu thí nghiệm được thực hiện bằng phương pháp thống kê Anova và kiểm định LSD với độ tin cậy 95% bằng phần mềm Statgraphics centurion XV, vẽ đồ thị bằng phần mềm OriginPro 8.5.1. Sử dụng phần mềm Modde 5 thực hiện bố trí ma trận tối ưu và xử lý kết quả.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Tối ưu môi trường nuôi cấy nấm mốc *Aspergillus niger* sinh tổng hợp enzyme lipase

Khảo sát tác động của từng yếu tố ảnh hưởng tới khả năng thu nhận enzyme lipase từ *Aspergillus*

niger như độ ẩm môi trường 40÷60%, thời gian nuôi cấy từ 24÷120 giờ, tỉ lệ cơ chất giữa bánh dầu đậu phộng và bã mía là: 10:0; 7,5:2,5; 2,5:7,5; 0:10 (w/w). Kết quả đã thu được ở độ ẩm 60%, thời gian 72 giờ, tỉ lệ cơ chất bánh dầu và bã mía là 7,5:2,5 (w/w), hoạt tính enzyme lipase cao nhất (Đào Thị Mỹ Linh và ctv., 2018). Nghiên cứu tiếp theo được thực hiện tối ưu nhằm tìm hiểu sự tác động đồng thời của cả 3 yếu tố với khoảng khảo sát được thu hẹp như: độ ẩm môi trường 50÷60%, thời gian nuôi cấy từ 72÷120 giờ, tỉ lệ bánh dầu đậu phộng 5÷10 g tới khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp của enzyme lipase từ *Aspergillus niger*. Kết quả thực nghiệm thu được và phân tích bằng phần mềm Modde 5 theo quy hoạch thực nghiệm bậc 2 để xác định sự ảnh hưởng qua lại của các yếu tố tới khả năng sinh tổng hợp enzyme lipase là hàm mục tiêu Y (UI/mL) được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2: Thiết kế thực nghiệm theo mô hình Box-Behnken và kết quả tối ưu

STT	X ₁	X ₂	X ₃	(X ₁)	(X ₂)	(X ₃)	Hoạt tính enzyme (UI/mL)	
							Y trung bình thực nghiệm	Y suy ra từ mô hình
1	-1	-1	0	50	72	7,5	0,889	0,883
2	1	-1	0	70	72	7,5	0,861	0,867
3	-1	1	0	50	120	7,5	0,834	0,828
4	1	1	0	70	120	7,5	0,778	0,784
5	-1	0	-1	50	96	5	0,508	0,520
6	1	0	-1	70	96	5	0,445	0,445
7	-1	0	1	50	96	10	0,084	0,084
8	1	0	1	70	96	10	0,111	0,099
9	0	-1	-1	60	72	5	0,556	0,550
10	0	1	-1	60	120	5	0,556	0,550
11	0	-1	1	60	72	10	0,222	0,228
12	0	1	1	60	120	10	0,084	0,090
13	0	0	0	60	96	7,5	1,084	1,093
14	0	0	0	60	96	7,5	1,111	1,093
15	0	0	0	60	96	7,5	1,084	1,093

Dựa trên kết quả xử lý số liệu, các tham số không có ý nghĩa ($p > 0,05$) được loại bỏ và phương trình hồi quy thực nghiệm đạt được như sau:

$$Y = 1,093 - 0,015X_1 - 0,035X_2 - 0,196 X_3 + 0,023 X_1X_3 - 0,035 X_2X_3 + 0,16X_1^2 - 0,093X_2^2 - 0,646X_3^2$$

Trong đó: Y là hoạt tính lipase (UI/mL), X₁ độ ẩm (%), X₂ thời gian (giờ), X₃ tỉ lệ cơ chất (g).

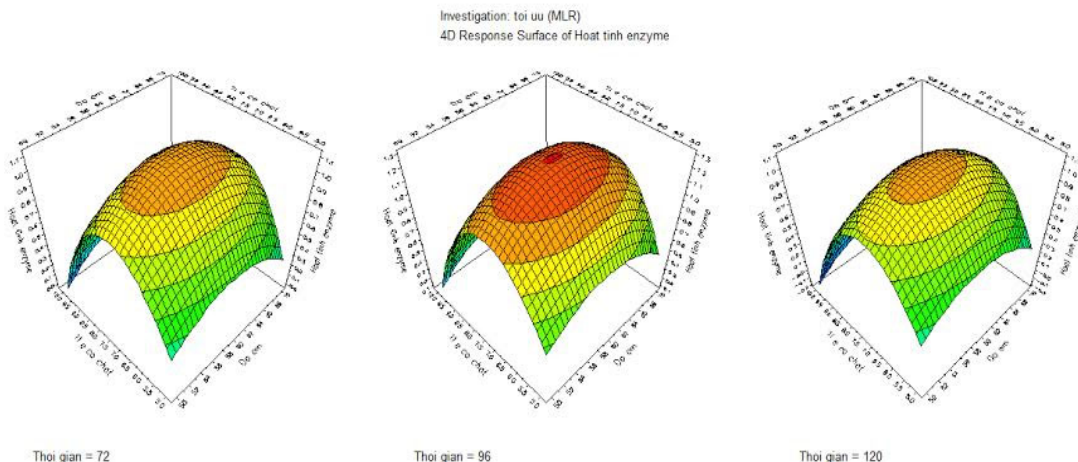
Phương trình hồi quy có sự tương thích với thực nghiệm và mô hình thống kê này có thể được sử dụng để dự đoán điều kiện tối ưu của quá trình lên men nấm mốc *Aspergillus niger*. Dựa trên các hệ số thu được từ phương trình hồi quy, pH (X3) là yếu tố

ảnh hưởng mạnh nhất với hệ số hồi quy -0,196 và ảnh hưởng yếu nhất là độ ẩm (X1) với hệ số hồi quy là -0,015. Ngoài ra, sự tương tác giữa các yếu tố cũng ảnh hưởng đáng kể đến hàm mục tiêu, đặc biệt là tương tác giữa độ ẩm – thời gian với hệ số hồi quy +0,16 và tương tác giữa thời gian – pH với hệ số hồi quy +0,646.

Kết quả xử lý số liệu cho thấy các yếu tố thí nghiệm có ảnh hưởng đến hiệu quả thu nhận lipase với độ tin cậy của mô hình là 0,999 cho thấy mô hình có độ tin cậy cao. Ngoài ra, tính hồi quy của mô hình rất tốt với p value là 0,000 (< 0,05) và mô hình hoàn toàn phù hợp với điều kiện nghiên cứu khi giá trị p value (lack of fit) là 0,79 (> 0,05) (Bảng 3).

Bảng 3: Kết quả kiểm tra tính tương thích của phương trình hồi qui

Source	Degree of freedom	Sum of squares	Mean squares	F value	P value
Residual	5	0,001062	0,0002124		
Lack of fit	3	0,000576002	0,000192001	0,79013	0,601
Pure error	2	0,000485998	0,000242999		
Corrected total	14	1,91574	0,136838		



Hình 1: Đồ thị minh họa sự phụ thuộc của hàm mục tiêu Y vào các yếu tố

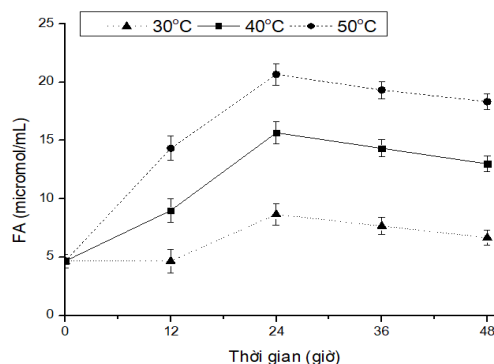
Hiệu quả thu nhận enzyme lipase có hoạt tính cao nhất được xác định thông qua tối ưu bằng phần mềm Modde 5.0. Kết quả tối ưu cho thấy, hoạt tính enzyme lipase thu được cao nhất là 1,11 UI/mL với các điều kiện lên men độ ẩm 59,42%, thời gian là 92,34 giờ, bánh dầu là 7,13 g được trộn vào 10 g hỗn hợp cơ chất (bánh dầu và bã mía).

3.2 Ảnh hưởng của các yếu tố nhiệt độ, nồng độ enzyme và nồng độ cơ chất tới khả năng thủy phân lipid của enzyme lipase

Theo dõi khả năng thủy phân chất béo của enzyme lipase trong 100 mL nước thải có nồng độ chất béo 1000 mg/L, thêm 0,1 g chế phẩm enzyme, khảo sát ở các nhiệt độ khác nhau. Từ kết quả Hình 2, ở nhiệt độ 40°C, lượng acid tự do được tạo ra nhiều hơn các nhiệt độ còn lại, do đây là nhiệt độ hoạt động tối ưu của enzyme nên lượng acid béo tạo thành nhiều hơn. Nhiệt độ thấp hơn 30°C hoặc cao hơn 50°C lượng acid béo sinh ra ít hơn. Kết quả phù hợp với nghiên cứu của Mobarak-Qamsari *et al.* (2012) nhiệt độ tối ưu để enzyme thủy phân là 30÷45°C, các khoảng nhiệt độ cao đều làm giảm hoặc ngừng hoạt động của enzyme.

Lượng acid tự do tăng nhanh trong 24 giờ đầu, sau đó giảm dần theo thời gian. Ban đầu lượng cơ chất có nhiều trong môi trường, enzyme tiếp xúc nhiều với cơ chất, phản ứng diễn ra nhanh, mạnh. Sau 24 giờ, lượng cơ chất vì vậy các acid béo tạo ra giảm. Ngoài ra, trong nước thải ban đầu có hệ vi sinh vật có thể sử dụng acid béo làm cơ chất đây có thể

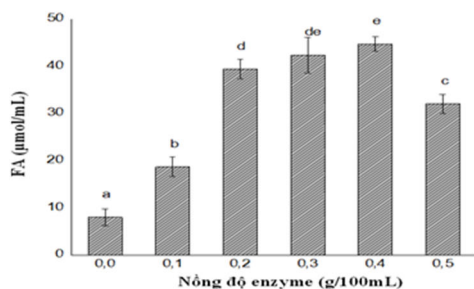
là nguyên nhân lượng acid béo tự do trong môi trường bắt đầu giảm sau 24 giờ. Kết quả nghiên cứu của Cammarota *et al.* (2001) nồng độ acid giảm sau 24h khi bổ sung lipase trong nước thải. Ở nghiệm thức đối chứng không bổ sung lipase thay vào đó cho natri azua (một chất diệt khuẩn) lượng acid béo tạo ra thấp hơn do hoạt động của hệ vi sinh có sẵn trong nước thải đã bị bất hoạt. Trong nghiên cứu nhiệt độ 40°C được sử dụng cho các khảo sát tiếp theo.



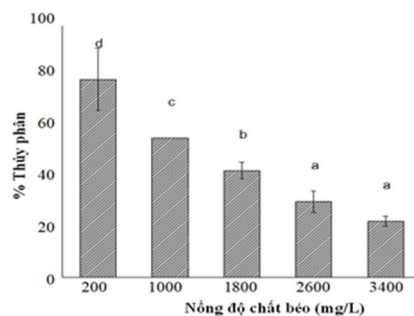
Hình 2: Sự thay đổi hàm lượng acid béo theo thời gian ở các nhiệt độ khác nhau

Lượng enzyme cần thiết để thực hiện phản ứng là một yếu tố kinh tế quyết định đối với các ứng dụng của nó. Theo dõi khả năng thủy phân của enzyme lipase đối với nước thải sữa có nồng độ chất béo 1.000 mg/L. Thêm bột chế phẩm enzyme với các nồng độ khảo sát trong 100 mL nước thải, chỉnh pH 7, ủ ở nhiệt độ 40°C, lắc 120 vòng/phút trong 24 giờ.

Kết quả Hình 3a cho thấy với nồng độ enzyme khác nhau hàm lượng acid béo tạo ra cũng khác nhau. Khi nước thải không được bổ sung enzyme, lượng acid béo tạo thành rất thấp là 8 $\mu\text{mol/L}$. Bổ sung với nồng độ enzyme tăng từ 0,1÷0,4% cho thấy sự gia tăng lượng acid béo, do enzyme tiếp xúc với cơ chất nhiều hơn, các phản ứng diễn ra nhanh hơn, tạo acid béo lớn hơn (Hình 3a). Tuy nhiên sự gia tăng này không tỉ lệ với tăng nồng độ enzyme. Khi nồng độ enzyme tăng từ 0,1% đến 0,2% lượng acid béo có sự khác biệt lớn tăng một lượng 20,67 $\mu\text{mol/L}$, ở các nồng độ enzyme 0,2%, 0,3%, 0,4% sự khác biệt của lượng acid béo là rất ít chỉ tăng chỉ từ 3÷6 $\mu\text{mol/L}$. Mặt khác khi nồng độ enzyme tăng đến 0,5% thì



lượng acid tạo ra giảm, có thể do hàm lượng enzyme tăng làm tăng độ nhớt của môi trường, khả năng tiếp xúc với cơ chất của enzyme giảm, tốc độ phản ứng diễn ra chậm, lượng acid tạo ra ít (Adulkar and Rathod, 2014). Theo Adulkar and Rathod (2014), hoạt tính enzyme sử dụng là 360.000 UI/g xử lý nước thải sữa có nồng độ chất béo là 2.000 mg/L, nồng độ enzyme 0,2% (w/v) được chọn là tối ưu. Nghiên cứu của Mobarak-Qamsari *et al.* (2012) cho thấy enzyme lipase hoạt tính 0,3 UI/mL, thủy phân nước thải sữa có nồng độ chất béo là 1.000 mg/L có nồng độ 10% (v/v) là tốt nhất. Vì vậy nồng độ enzyme là 0,2% vừa cho hiệu quả thủy phân tốt vừa khả thi về mặt kinh tế.



Hình 3: Khả năng thủy phân của lipase ở các nồng độ: enzyme (a) và chất béo (b)

Để đánh giá khả năng thủy phân của enzyme ở các nồng độ chất béo khác nhau. Tiến hành khảo sát khả năng thủy phân của 0,2 g enzyme lipase trong 100 mL nước thải ở các nồng độ chất béo khác nhau. Ủ ở 40°C, lắc 120 rpm sau 24h. Dựa vào kết quả Hình 3b cho thấy phần trăm thủy phân giảm khi nồng độ chất béo tăng. Có thể giải thích là nồng độ enzyme sử dụng ở các nghiệm thức không đổi với 0,2% (w/v), số lượng các acid béo được tạo ra sẽ giống nhau đối với tất cả nồng độ chất béo. Số lượng acid béo được hình thành là như nhau và chỉ số xà phòng lớn hơn cho nồng độ chất béo cao hơn. Do đó tỉ số giữa chỉ số acid và chỉ số xà phòng hóa hay phần trăm thủy phân giảm khi nồng độ nồng độ chất béo ban đầu được tăng lên. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu của Rosa *et al.* (2006), Leal *et al.* (2006), Valladão *et al.* (2007), lượng acid béo tăng khi nồng độ chất béo tăng. Với nồng độ chất béo 200 mg/L các chất béo gần như được thủy phân hoàn toàn với 78,57%. Khi nồng độ chất béo tăng gấp 5 lần là 1.000 mg/L, thì phần trăm thủy phân chỉ giảm một lượng nhỏ và đạt được 55,26%. Vì vậy chọn 1.000 mg/L là nồng độ thích hợp để đánh giá khả năng tiền xử lý bằng enzyme trong hệ thống kỵ khí. Mobarak-Qamsari *et al.* (2012) cũng sử dụng nước thải có hàm lượng chất béo là 1.000 mg/L để xử lý nước thải trong hệ thống xử lý kỵ khí.

3.3 Xử lý kỵ khí nước thải tổng hợp giàu chất béo

Nước thải sau quá trình xử lý đầu ra cần phải đạt chuẩn quy định theo QCVN 40:2011/BTNMT. Các thông số pH, độ màu, nồng độ lipid, COD... có liên quan trực tiếp đến lượng bùn hoạt tính và vận hành hệ thống xử lý nước thải, ảnh hưởng quan trọng trong quá trình xử lý nước thải bằng phương pháp sinh học. Các thông số đầu vào của nước thải có nồng độ chất béo là 1.000 mg/L được xác định cho quá trình xử lý thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4: Các thông số của nước thải tổng hợp

Thông số	Giá trị
pH	6,373 ± 0,006
Độ màu (Pt – Co)	8794 ± 48
Tỷ trọng (g/cm ³)	1,005 ± 0,002
Acid béo tự do (μmol/mL)	4,667 ± 0,557
Lipid (mg/L)	1.000
COD (mg/L)	6187 ± 185
Chỉ số xà phòng (mg KOH/g chất béo)	1,777 ± 0,162

3.3.1 Theo dõi các thông số của nước thải trong quá trình xử lý nước thải

Giá trị pH được kiểm soát ở các giai đoạn khác nhau của quá trình xử lý nước thải, kết quả thu được ở Bảng 5.

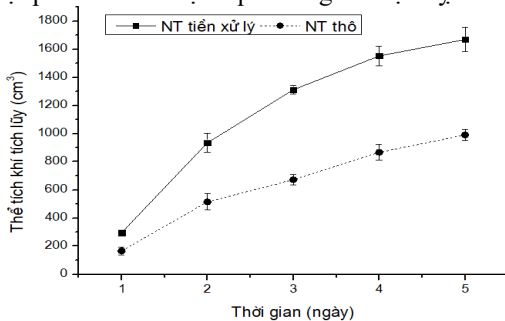
Bảng 5: Giá trị pH của các giai đoạn xử lý nước thải

Mẫu	pH của các giai đoạn xử lý		
	Nước thải đầu vào	Nước thải sau tiên xử lý	Kỵ khí sau 5 ngày
Nước thải thô	6,4 ± 0,006 ^c	5,4 ± 0,114 ^b	7,3 ± 0,017 ^c
Nước thải tiên xử lý	6,4 ± 0,006 ^c	4,1 ± 0,208 ^a	7,1 ± 0,053 ^d

Các ký tự ^(abcde) khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%

Sau khi nước thải được tiên xử lý bằng enzyme lipase, lượng chất béo có trong nước thải bị enzyme thủy phân thành các acid béo tự do làm giảm pH của nước thải từ 6,4 xuống còn 4,1. Vi khuẩn kỵ khí rất nhạy cảm với pH của môi trường, khi thêm bùn hoạt tính vào nước thải để thực hiện quá trình xử lý kỵ khí cần điều chỉnh pH của nước thải về 6,8÷7,2 bằng NaHCO₃ (Cammarota *et al.*, 2001). Nhìn chung, nước thải chế biến sữa ban đầu là trung tính hoặc hơi kiềm, nhưng có khuynh hướng trở nên acid nhanh chóng do sự thiếu hụt của oxy. Vì vậy, trong hầu hết các công nghệ sinh học xử lý nguồn nước thải này đều phải điều chỉnh pH. Điều này trở nên đặc biệt quan trọng khi sử dụng enzyme như là một tác nhân để tiên xử lý lipid trước khi xử lý kỵ khí ở bước tiếp theo. Tuy nhiên, dựa trên quá trình biến đổi pH của nước thải chế biến sữa, có thể đề nghị giảm bớt thời gian lưu trước quá trình xử lý enzyme và tăng cường sục khí để ổn định pH của nước thải trong khoảng trung tính.

Sau quá trình kỵ khí pH của cả hai loại nước thải đã tăng lên lớn hơn 7. Điều này chứng minh được vi sinh vật phát triển ổn định qua các giai đoạn kỵ khí

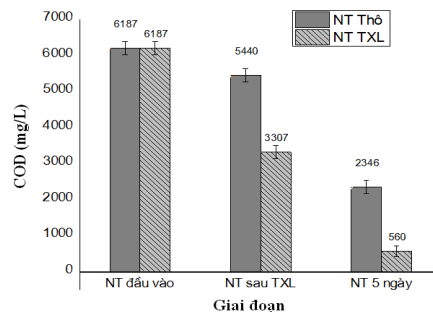


Hình 4: Đồ thị biểu diễn thể tích khí sinh học theo thời gian

Giá trị COD là một trong những chỉ tiêu đặc trưng dùng để kiểm tra ô nhiễm của nguồn nước thải. Giá trị COD của nước thải được theo dõi qua các giai đoạn trình bày trong Hình 5. Từ kết quả Hình 5, giá trị COD đầu vào là như nhau, nhưng sau 24 h

từ pha acid, các hydrocarbon bị thủy phân thành acid hữu cơ phân tử lượng thấp, đặc trưng của pha này là tạo thành acid, pH giảm thấp có thể dưới 5. Cuối pha acid hữu cơ và các chất hòa tan có chứa nito tiếp tục bị phân hủy tạo thành các hợp chất amon, amin, muối của acid carbonic. Cùng với một lượng nhỏ hỗn hợp khí CO₂, CH₄, N₂, H₂ pH của môi trường tăng lên chuyển sang trung tính hoặc kiềm. Tiếp tục qua pha kiềm là pha tạo khí CH₄, CO₂ pH chuyển hoàn toàn sang kiềm. Những amin tác dụng với CO₂ tạo thành muối cacbonat, tạo cho môi trường có tính đệm rất cao, giúp duy trì hoạt động ổn định của vi sinh vật (Lương Đức Thắm, 2009), giúp cho các đánh giá về COD, độ màu và khí sinh học của quá trình kỵ khí có hiệu quả.

Thể tích khí sinh học là sản phẩm cuối cùng của quá trình chuyển hóa các chất hữu cơ trong nước thải của vi sinh vật bùn hoạt tính, có khoảng 70÷80% metan và 20÷30% carbonic (Hoàng Văn Huệ, 2010). Tiến hành thu khí bằng phương pháp di chuyển của mực nước. Đo các mức nước di chuyển có được kết quả thể tích khí biogas sinh ra trong quá trình xử lý kỵ khí của nước thải thô và nước thải tiên xử lý trong 5 ngày (Hình 4). Từ kết quả cho thấy, thể tích khí sinh học thu được trong quá trình xử lý kỵ khí của nước thải thô ít hơn nước thải sữa được tiên xử lý. Thể tích khí thu được sau 5 ngày đối với nước thải thô là 991,063 cm³, nước thải tiên xử lý là 1.668,78 cm³ cao gấp 1,68 lần nước thải thô. Theo nghiên cứu của Valladao *et al.*, 2007 nước thải tiên xử lý bằng lipase có lượng khí biogas là 175 mL cao gấp 4,7 lần so với nước thải thô (37 mL) sau 4 ngày. Theo Mendes *et al.*, 2006 lượng khí sinh học sinh ra sau 24 giờ của nước thải thô đạt 209 mL thấp hơn so nước thải được tiên xử lý bằng enzyme là 437 mL.



Hình 5: Đồ thị biểu diễn giá trị COD ở các giai đoạn xử lý

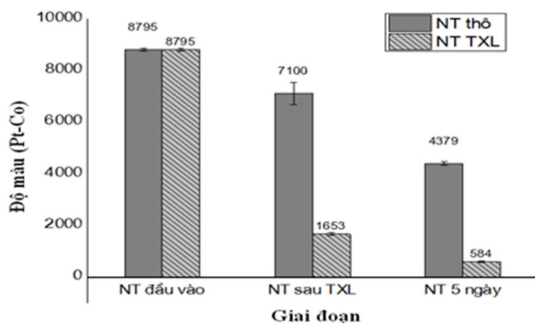
nước thải được bổ sung enzyme lipase có giá trị COD là 3307 mg/L, giảm 46,6%, cao gấp 3,9 lần so với nước thải thô COD chỉ giảm 12%. Việc giảm lượng COD có thể do vi sinh vật có sẵn trong nước thải ban đầu, chúng sử dụng các chất hữu cơ, các

acid béo làm cơ chất để tăng trưởng. Ở nước thải có sử dụng lipase đã thủy phân các chất béo thành những phân tử đơn giản, giúp cho vi sinh vật dễ dàng sử dụng hơn làm COD giảm nhiều. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Adulkar and Rathod. (2014) sau khi nước thải được tiền xử lý bằng lipase chỉ số COD đã giảm từ 42400 ppm xuống còn 11250 ppm với hiệu quả loại bỏ COD là 73,5%. Theo kết quả nghiên cứu của Alberton *et al.* (2010) nước thải đã được khử trùng không bổ sung enzyme thì giá trị COD không giảm trong quá trình xử lý. Ở ba điều kiện khác là nước thải khử trùng có bổ sung enzyme, nước thải không khử trùng không bổ sung enzyme và nước thải không khử trùng có bổ sung enzyme đều cho thấy giá trị COD giảm từ 1800 đến 2700 mg/L. Điều này đã chứng minh được hoạt động của vi sinh vật có sẵn và hoạt động thủy phân của enzyme có ảnh hưởng tích cực đến giảm COD trong nước thải.

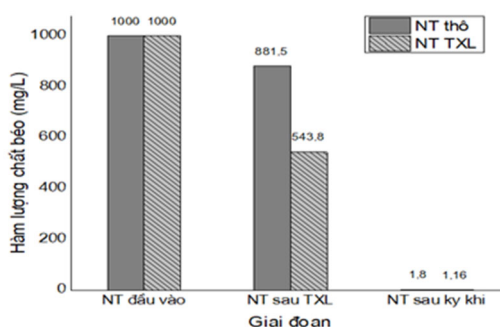
Hiệu quả loại bỏ COD toàn quá trình sau khi qua xử lý kỵ khí của hai loại nước thải có sự khác biệt đáng kể. Đối với nước thải thô giá trị COD sau 5 ngày xử lý kỵ khí là 2346 mg/L, hiệu quả đạt 62,1% so với 560 mg/L, so với hiệu quả 90,9% của nước

thải tiền xử lý cao gấp 1,45 lần. Có sự khác biệt đó là do sự hoạt động của vi sinh vật trong bùn hoạt tính ở nước thải tiền xử lý mạnh hơn với cơ chất đơn giản và không bị ức chế bởi hàm lượng chất béo cao như ở nước thải thô. Với kết quả của Mendes *et al.* (2006), Valladão *et al.* (2007) sau 12 và 92 giờ xử lý kỵ khí nước thải được tiền xử lý bằng enzyme loại bỏ được 80,9, 85% COD hiệu quả tăng 40,0%, 53% so với nước thải thô.

Giá trị độ màu sau khi tiền xử lý bằng enzyme, khả năng hấp thụ ánh sáng của hợp chất màu có trong dung dịch giảm nên độ màu của nước thải giảm. Kết quả được thể hiện trong Hình 6, độ màu của nước thải tiền xử lý đã giảm từ 8795 xuống 1653 Pt-Co đạt hiệu quả xử lý 81,2%, đối với nước thải thô chỉ đạt 19,3%. Hiệu quả loại bỏ độ màu toàn quá trình sau khi qua xử lý kỵ khí với nước thải tiền xử lý đạt 93,4% khi độ màu giảm từ 8795 xuống 584 Pt-Co. Đối với nước thải thô giảm từ 8795 xuống 4379 Pt-Co, chỉ đạt hiệu quả 50,2% thấp hơn 1,86 lần. Nghiên cứu của Mendes *et al.* (2006), loại bỏ 80,3% giá trị độ màu với nước thải được tiền xử lý bằng enzyme, đối với nước thải thô chỉ đạt 13,9%.



Hình 6: Đồ thị biểu diễn độ màu nước thải qua các giai đoạn xử lý



Hình 7: Đồ thị biểu diễn hàm lượng lipid qua các giai đoạn xử lý

Hàm lượng lipid được xác định để đánh giá hiệu quả loại bỏ nó trong quá trình xử lý. Dựa vào kết quả thu được ở Hình 7 cho thấy, cùng lượng chất béo đầu, nhưng sau 24 h nước thải thô có hàm lượng lipid là 881,5 mg/L, giảm 11,85%; nước thải có bổ sung enzyme lipase hàm lượng lipid là 543,8 mg/L, giảm 45,62% và cao gấp 3,85 lần so với nước thải thô. Với nước thải được tiền xử lý, enzyme lipase đã thủy phân các chất béo thành những phân tử nhỏ hơn như diglyceride monoglyceride, glycerol và các acid béo tự do nên làm giảm đáng kể lượng lipid so với nước thải ban đầu. Với nước thải không bổ sung enzyme, vẫn thấy hàm lượng chất béo giảm do vi sinh vật có sẵn trong nước thải ban đầu, chúng sử dụng các chất hữu cơ, các chất béo làm cơ chất để tăng trưởng

(Alberton *et al.*, 2010). Khi nước thải được đưa vào giai đoạn xử lý kỵ khí, sau 14 ngày hiệu quả loại bỏ lipid gần như hoàn toàn với hơn 99% ở cả hai loại nước thải.

4 KẾT LUẬN

Quá trình nuôi cấy nuôi cấy *Aspergillus niger* đã tối ưu được các yếu tố thời gian, độ ẩm và thành phần cơ chất ảnh hưởng tới khả năng sinh lipase có hoạt tính cao. Chế phẩm enzyme lipase được ứng dụng có tác động trong tiền xử lý kỵ khí làm giảm COD, giảm độ màu, thay đổi pH, thủy phân hoàn toàn lipid trong nước thải tổng hợp từ sữa ở quy mô thí nghiệm.

Do nghiên cứu mới dừng ở giai đoạn đầu, cần có những nghiên cứu tiếp theo về các thành phần trong nước thải có thể ảnh hưởng tới hoạt động của lipase nhằm xác định hiệu quả tiềm năng ứng dụng trong xử lý môi trường.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được hỗ trợ kinh phí và tạo điều kiện về cơ sở vật chất từ trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh cho đề tài NCKH số 108/HĐ-DCT/2017.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Alberton, D., Alexander Mitchell, D., Cordova, J., Peralta Zamora, P. and Krieger, N., 2010. Production of a fermented solid containing lipases of *Rhizopus microsporus* and its application in the pre-hydrolysis of a high-fat dairy wastewater. *Food Technology and Biotechnology*. 48(1): 28-35.

Adulkar, T. V. and Rathod, V. K., 2014. Ultrasound assisted enzymatic pre-treatment of high fat content dairy wastewater. *Ultrasonics Sonochemistry*. 21(3): 1083-1089.

Bộ Tài nguyên Môi trường, 2011. Thông tư 47/2011/TT-BTNMT, ngày 28/12/2011 về việc “Ban hành QCVN 40:2011/BTNMT - Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về nước thải công nghiệp”.

Cammarota, M., Teixeira, G. and Freire, D., 2001. Enzymatic pre-hydrolysis and anaerobic degradation of wastewaters with high fat contents. *Biotechnology Letters*. 23(19): 1591-1595.

Đào Thị Mỹ Linh, Trần Thị Mỹ Thảo, Lý Thị Diễm Trang, Lê Thị Mỹ Trinh, 2018. Khảo sát khả năng sinh tổng hợp lipase từ các chủng nấm mốc phân lập trong môi trường giàu lipid, Tạp chí Khoa học công nghệ và Thực phẩm. 16(1): 67-78.

Eaton, A. D., Clesceri, L. S., Greenberg, A. E., and Franson, M. A. H., 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20 Edition. Washington, DC: American Public Health Association, 541 pages.

Flouri, L. F., De Oliveira, M. C., Arcuri, M. D. L. C., Capoville, B. L., Pereira, M. S., Delgado, C. H. O. and Novelli, P. K., 2014. Production of fungal lipases using wheat bran and soybean bran and incorporation of sugarcane bagasse as a co-substrate in solid-state fermentation. *Food Science and Biotechnology*. 23(4): 1199-1205.

Hasan, F., Shah, A. A., Javed, S. and Hameed, A., 2010. Enzymes used in detergents: lipases. *African Journal of Biotechnology*. 9: 4836-4844.

Hoàng Văn Huệ, 2010. Công nghệ môi trường tập 1 - Xử lý nước. Nhà xuất bản Xây dựng. Hà Nội, 318 trang.

Mendes, A. A. and Castro, H. F. D., 2005. Effect on the enzymatic hydrolysis of lipids from dairy wastewater by replacing gum arabic emulsifier for sodium chloride. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 48(SPE): 135-142.

Mendes, A. A., Pereira, E. B. and De Castro, H. F., 2006. Effect of the enzymatic hydrolysis pretreatment of lipids-rich wastewater on the anaerobic biodigestion. *Biochemical Engineering Journal*. 32(3): 185-190.

Mobarak-Qamsari, E., Kasra-Kermanshahi, R., Nosrati, M. and Amani, T., 2012. Enzymatic pre-hydrolysis of high fat content dairy wastewater as a pretreatment for anaerobic digestion. *International Journal of Environmental Research*. 6(2): 475-480.

Nguyễn Cảnh, 2016. Quy hoạch thực nghiệm. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, 118 trang.

Nguyễn Trung Việt, Trần Thị Mỹ Diệu và Huỳnh Ngọc Phương Mai, 2011. Hóa học môi trường. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 268 trang.

Leal, M. C., Freire, D. M., Cammarota, M. C. and Sant'anna, G. L., 2006. Effect of enzymatic hydrolysis on anaerobic treatment of dairy wastewater. *Process Biochemistry*. 41(5): 1173-1178.

Lương Đức Thâm, 2009. Công nghệ xử lý nước thải bằng biện pháp sinh học, lần xuất bản 2. Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam, 339 trang.

Rosa, D. R., Cammarota, M. C. and Freire, D. M. G., 2006. Production and utilization of a novel solid enzymatic preparation produced by *Penicillium restrictum* in activated sludge systems treating wastewater with high levels of oil and grease. *Environmental Engineering Science*. 23(5): 814-823.

Valladao, A. B. G., Freire, D. M. G. and Cammarota, M. C., 2007. Enzymatic pre-hydrolysis applied to the anaerobic treatment of effluents from poultry slaughterhouses. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 60(4): 219-225.

Vakhlu, J., 2006. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electronic Journal of Biotechnology*. 9(1): 69-85.