

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG

**PHẠM THỊ NGỌC THÙY**

**NGHIÊN CỨU QUÁ TRÌNH LÊN MEN AXIT XITRIC  
TỪ BÃ DỨA TRÊN MÔI TRƯỜNG BÁN RẮN  
SỬ DỤNG *ASPERGILLUS NIGER***

**Chuyên ngành: Công nghệ Thực phẩm và Đồ uống**

**Mã số: 60 54 02**

**TÓM TẮT LUẬN VĂN THẠC SĨ KỸ THUẬT**

**Đà Nẵng – Năm 2012**

Công trình được hoàn thành tại  
**ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG**

Người hướng dẫn khoa học:  
**PGS.TS. TRƯỜNG THỊ MINH HẠNH**

Phản biện 1: .....

Phản biện 2: .....

Luận văn sẽ được bảo vệ tại Hội đồng chấm Luận văn  
tốt nghiệp thạc sĩ kỹ thuật họp tại Đại học Đà Nẵng vào  
ngày ..... tháng ..... năm 2012

Có thể tìm hiểu luận văn tại:

- Trung tâm Thông tin-Học liệu, Đại học Đà Nẵng
- Trung tâm Học liệu, Đại học Đà Nẵng

## MỞ ĐẦU

### 1. TÍNH CẤP THIẾT CỦA ĐỀ TÀI

Axit xitric được sử dụng rộng rãi trong nhiều ngành kinh tế quốc dân, đặc biệt là trong công nghiệp thực phẩm chiếm 70% sản lượng axit xitric. Nhu cầu axit xitric trên thế giới ngày càng tăng. Năm 1938, sản lượng axit xitric là 10.400 tấn/năm và 60 năm sau sản lượng axit xitric tăng gần gấp 60 lần [3]. Năm 2007, sản lượng axit xitric là khoảng 1.700.000 tấn/năm [24]. Điều này khẳng định vai trò và tầm quan trọng của axit xitric trong đời sống con người. Nhu cầu axit xitric ở Việt Nam hằng năm khoảng hơn 1000 tấn [3]. Mặc dù axit xitric có vai trò và tầm quan trọng trong đời sống con người, nhưng ở nước ta nó chưa được quan tâm nhiều. Phần lớn lượng axit xitric vẫn đang phải nhập khẩu với giá thành cao, chỉ có một số nhà máy hóa chất có dây chuyền sản xuất axit xitric với quy mô nhỏ và sản lượng chưa cao. Như vậy, vấn đề lên men axit xitric ở nước ta cần phải được đầu tư nghiên cứu nhiều hơn.

Lên men axit xitric sử dụng vi sinh vật có hai phương pháp là lên men chìm, lên men nổi (lên men bề mặt). Trong đó, lên men bề mặt trên môi trường bán rắn là phương pháp đơn giản để sản xuất axit xitric. Đối với những nước đang phát triển như nước ta thì phương pháp này tỏ ra hữu hiệu bởi nó không đòi hỏi trang thiết bị hiện đại, chi phí năng lượng, vốn đầu tư thấp và tận dụng được sức lao động dư thừa. Lên men bề mặt trên môi trường bán rắn thật sự là phương pháp thích hợp cho quá trình lên men axit xitric để tận dụng các nguồn phế liệu rắn của các ngành công-nông nghiệp ở nước ta hiện nay.

Nhiều loại vi sinh vật có thể lên men axit xitric như *Aspergillus* (*A.*) *niger*, *A.clavatus*, *Penicillium lutcum*, *Penicillium citrinum*,

*Mucor piriformis* và những loài *Mucor* khác. Tuy nhiên, *A.niger* một loại nấm sợi vẫn là vi sinh vật được lựa chọn để sản xuất axit xitric do có khả năng lên men nhiều loại nguyên liệu rẻ tiền và cho năng suất cao [15].

Nước ta là nước nhiệt đới với rất nhiều trái cây chủ đạo được trồng cho năng suất lớn và đem lại thu nhập cho quốc gia thông qua xuất khẩu như chuối, cam, bưởi, dưa,... Trong đó, dưa là loại trái cây được trồng khá dễ dàng và là một trong những sản phẩm được xuất khẩu khá nhiều, đặc biệt được ưa chuộng ở các nước công nghiệp phát triển. Năm 2000, nước ta xuất khẩu khoảng 5000 tấn dưa hộp. Năm 2001, xuất khẩu khoảng 6000 tấn dưa hộp và 1000 tấn nước dưa cô đặc. Năm 2002, xuất khẩu khoảng 10.000 tấn dưa hộp và 2000 tấn nước dưa cô đặc. Trong khi đó, quả dưa đưa vào chế biến có 25% là chính phẩm, còn lại 75% là phụ phẩm. Như vậy, lượng phụ phẩm dưa thải ra từ các nhà máy chế biến dưa không ngừng được tăng lên. Hàng năm lượng phụ phẩm ở các nông trường dưa và các cơ sở chế biến dưa thải ra hàng trăm ngàn tấn [6]. Phụ phẩm và phế thải rắn trong công nghiệp chế biến rau quả nói chung, chế biến dưa nói riêng đã góp phần gây ô nhiễm môi trường. Bã dưa ở nước ta từ trước đến nay chưa được sử dụng rộng rãi và triệt để. Tuy nhiên, lượng bã dưa còn chứa một lượng đường, tinh bột, protein, vitamin và một số chất khoáng,... thích hợp cho quá trình lên men axit xitric. Như vậy, tận dụng bã dưa làm nguồn nguyên liệu lên men axit xitric đó là một giải pháp để xử lý phế thải rắn gây ô nhiễm môi trường và mang lại lợi ích kinh tế.

Xuất phát từ tình hình nói trên chúng tôi tiến hành đề tài: **“Nghiên cứu quá trình lên men axit xitric từ bã dưa trên môi trường bán rắn sử dụng *Aspergillus niger*”**.

## 2. MỤC ĐÍCH NGHIÊN CỨU

Xây dựng một quy trình công nghệ lên men axit xitric bằng phương pháp lên men trên môi trường bán rắn từ nguồn phế liệu dứa.

## 3. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHẠM VI NGHIÊN CỨU

## 4. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Phương pháp vật lý

Phương pháp hóa học

Phương pháp vi sinh

Phương pháp lên men axit xitric

Phương pháp toán học

## 5. Ý NGHĨA KHOA HỌC CỦA ĐỀ TÀI

## 6. Ý NGHĨA THỰC TIỄN CỦA ĐỀ TÀI

- Việc tận dụng nguồn bã dứa cho lên men xitric làm đa dạng hóa nguồn nguyên liệu sản xuất axit xitric, nâng cao hiệu quả kinh tế trong sản xuất, hạ giá thành sản phẩm axit xitric và giảm lượng axit xitric ngoại nhập.

- Góp phần giải quyết vấn đề môi trường, tiết kiệm nguyên liệu, góp phần nâng cao giá trị kinh tế của cây dứa, tăng thu nhập cho nhà máy chế biến dứa và tăng thu nhập cho người trồng dứa.

## 7. CẤU TRÚC LUẬN VĂN

Ngoài phần mở đầu, kết luận, tài liệu tham khảo và phụ lục, trong luận văn gồm có các chương như sau :

Chương 1: Tổng quan

Chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Chương 3: Kết quả và thảo luận

## CHƯƠNG 1 TỔNG QUAN

### 1.1. TỔNG QUAN VỀ AXIT XITRIC

#### 1.1.1. Giới thiệu về axit xitric

#### 1.1.2. Cấu tạo của axit xitric

#### 1.1.3. Tính chất hóa lý của axit xitric

##### 1.1.3.1. Tính chất vật lý

##### 1.1.3.2. Tính chất hóa học

#### 1.1.4. Lịch sử phát triển axit xitric

#### 1.1.5. Ứng dụng của axit xitric

##### 1.1.5.1. Trong công nghiệp thực phẩm

##### 1.1.5.2. Trong công nghệ sinh học và công nghiệp dược phẩm

##### 1.1.5.3. Trong các ngành công nghiệp khác

#### 1.1.6. Tính an toàn của axit xitric

### 1.2. CÔNG NGHỆ LÊN MEN XITRIC

#### 1.2.1. Vi sinh vật sử dụng trong công nghệ lên men xitric

#### 1.2.2. Nấm mốc *Aspergillus niger*

##### 1.2.2.1. Vị trí phân loại

##### 1.2.2.2. Đặc điểm cơ bản về hình thái, sinh lý, sinh hóa của *A. niger*

##### 1.2.2.3. Khả năng ứng dụng của *A. niger*

##### 1.2.2.4. Tác hại của *A. niger* trong đời sống xã hội

#### 1.2.3. Cơ chế sinh tổng hợp axit xitric

#### 1.2.4. Các phương pháp lên men axit xitric

##### 1.2.4.1. Phương pháp lên men nổi (bề mặt)

##### 1.2.4.2. Phương pháp lên men chìm

#### 1.2.5. Các giai đoạn của quá trình lên men axit xitric và các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men bề mặt

##### 1.2.5.1. Chuẩn bị môi trường lên men

*1.2.5.2. Lên men axit xitric*

*1.2.5.3. Xử lý môi trường đã lên men thu axit xitric*

### **1.3. TỔNG QUAN VỀ NGUYÊN LIỆU DỨA**

**1.3.1. Nguồn gốc quả dứa**

**1.3.2. Đặc điểm sinh học của quả dứa**

**1.3.3. Thành phần hóa học của quả dứa**

**1.3.4. Các giống dứa và vùng trồng tại Việt Nam**

**1.3.5. Thời vụ trồng và thu hoạch dứa**

**1.3.6. Diện tích trồng và sản lượng dứa ở Việt Nam**

**1.3.7. Đánh giá nguồn phụ phẩm dứa ở nhà máy chế biến dứa xuất khẩu Nghệ An**

### **1.4. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU AXIT XITRIC Ở VIỆT NAM VÀ TRÊN THẾ GIỚI**

**1.4.1. Tình hình nghiên cứu axit xitric trên thế giới**

**1.4.2. Tình hình nghiên cứu axit xitric ở Việt Nam**

## **CHƯƠNG 2**

### **ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

#### **2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU**

**2.1.1. Bã dứa**

**2.1.2. Chúng vi sinh vật**

**2.1.3. Thiết bị và hóa chất**

*2.1.3.1. Thiết bị*

*2.1.3.2. Hóa chất*

#### **2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

**2.2.1. Phương pháp vật lý**

*2.2.1.1. Phương pháp xác định độ ẩm bã dứa và môi trường lên men*

*2.2.1.2. Phương pháp xác định pH của bã dứa và môi trường lên men*

**2.2.2. Phương pháp hóa học**

*2.2.2.1. Phương pháp xác định hàm lượng đường tổng*

*2.2.2.2. Phương pháp xác định hàm lượng nitơ tổng*

*2.2.2.3. Phương pháp xác định hàm lượng axit xitric trong bã dứa và hàm lượng axit xitric trong dịch lên men*

**2.2.3. Phương pháp vi sinh**

*2.2.3.1. Khảo sát thời gian nhân giống *A. niger**

*2.2.3.2. Khảo sát mật độ tế bào *A. niger**

**2.2.4. Phương pháp lên men axit xitric**

*2.2.4.1. Chuẩn bị môi trường lên men axit xitric*

*2.2.4.2. Tiến hành lên men axit xitric*

*2.2.4.3. Xử lý thu dịch sau lên men axit xitric*

**2.2.5. Phương pháp toán học**

## CHƯƠNG 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. KHẢO SÁT MỘT SỐ THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA BÃ DỨA

#### 3.1.1. Khảo sát hàm lượng đường tổng của bã dứa

Để xác định hàm lượng đường tổng, chúng tôi tiến hành xây dựng đường chuẩn đường D-glucoza được trình bày trong mục 2.1.1, phụ lục 2. Kết quả xây dựng đường chuẩn đường D-glucoza được trình bày ở Bảng 3.2, phụ lục 3 và được biểu diễn ở Hình 3.1.

Tiến hành xác định hàm lượng đường tổng trong bã dứa như đã trình bày trong cách tiến hành ở phần B, mục 2.2.2.1, chương 2. Từ kết quả đo OD, chúng tôi tính được hàm lượng đường tổng trong bã dứa là 23,25 (% chất khô), được trình bày ở mục 3.3, phụ lục 3.

#### 3.1.2. Khảo sát hàm lượng axit xitric của bã dứa

Chúng tôi tiến hành khảo sát hàm lượng axit xitric trong bã dứa theo quy trình được trình bày ở mục 2.2.2.3, chương 2.

Để xác định hàm lượng axit xitric trong bã dứa, chúng tôi tiến hành xây dựng đường chuẩn axit xitric được trình bày trong mục 2.3.1, phụ lục 2. Kết quả xây dựng đường chuẩn axit xitric được trình bày ở Bảng 3.3, phụ lục 3 và được biểu diễn ở Hình 3.2.

Tiến hành xác định hàm lượng axit xitric trong bã dứa như đã trình bày trong cách tiến hành ở phần B, mục 2.2.2.3, chương 2. Từ kết quả đo OD, chúng tôi tính được hàm lượng axit xitric trong bã dứa là 0,37(% chất khô), được trình bày ở mục 3.6, phụ lục 3.

#### 3.1.3. Đánh giá kết quả một số thành phần hóa học của bã dứa

Bã dứa thu từ nhà máy chế biến dứa xuất khẩu Nghệ An sau quá trình xử lý và tiến hành khảo sát một số thành phần hóa học như đường tổng, axit xitric và một số chỉ tiêu khác theo các phương pháp

đã được trình bày ở mục 2.2.1, chương 2, chúng tôi thu được các kết quả được trình bày ở Bảng 3.1.

**Bảng 3.1. Một số thành phần hóa học của bã dứa**

Thành phần	Hàm lượng (%)
Độ ẩm	81,27
pH	4,13
Đường tổng	23,25 (% chất khô)
Nitơ tổng	0,84 (% chất khô)
Axit xitric	0,37 (% chất khô)

### 3.2. CHUẨN BỊ GIỐNG NẤM MỐC *A. NIGER*

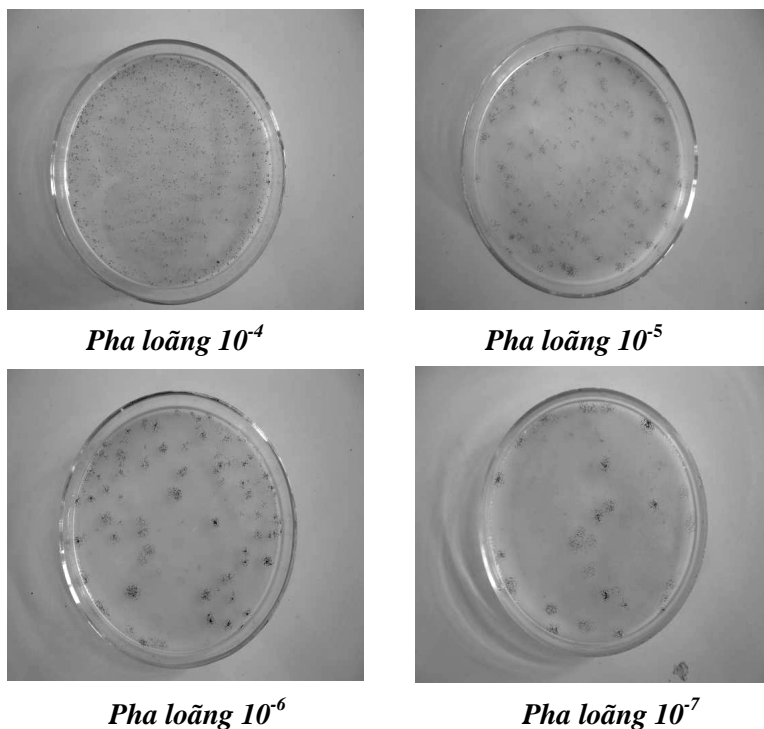
#### 3.2.1. Khảo sát thời gian nhân giống *A. niger*

Trong quá trình nhân giống, chúng tôi thấy rằng sau 24 giờ nuôi *A. niger* thấy trên bề mặt xuất hiện màng nấm sợi có màu trắng. Sau 48 giờ trên bề mặt thạch đã bắt đầu hình thành bào tử màu đen. Sau 72 giờ bào tử hình thành dày đặc trên bề mặt thạch. Sau 84 giờ xuất hiện bào tử hình thành ăn sâu vào bên trong thạch và sau 92 giờ một phần bào tử già đi đã rơi ra khỏi mặt thạch. Do đó, chúng tôi đã chọn thời gian thích hợp nhất cho quá trình nhân giống là 72 giờ. Với thời gian nhân giống là 72 giờ, kết quả phù hợp với nghiên cứu của S.Anwar và cộng sự [16].

Ống giống được giữ ở 3-5<sup>0</sup>C và cấy chuyên định kỳ mỗi tháng một lần nhằm đảm bảo tính chất không bị biến đổi để thuận lợi cho các nghiên cứu tiếp theo.

### 3.2.2. Khảo sát mật độ tế bào *A. niger*

Để đáp ứng yêu cầu mật độ tế bào giống nấm mốc trong quá trình lên men, mật độ giống phải đạt  $I \geq 7,5 \times 10^7$  CFU/ml [15]. Chúng tôi đã tiến hành khảo sát mật độ tế bào giống để bổ sung vào trong quá trình lên men bằng phương pháp xác định gián tiếp số lượng tế bào bằng cách đếm các khuẩn lạc phát triển trên môi trường thạch được trình bày ở mục 2.4, phụ lục 2. Mật độ khuẩn lạc nấm mốc *A. niger* ở các mức pha loãng khác nhau thể hiện ở Hình 3.5.



**Hình 3.5. Quá trình khảo sát mật độ tế bào *A. niger***

Qua 72 giờ kết thúc quá trình ủ ở  $30^{\circ}\text{C}$ , chúng tôi đếm số lượng khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch ở mức pha loãng  $10^{-6}$  trên 3 đĩa petri số khuẩn lạc theo thứ tự từng đĩa là: 71; 83; 89. Chúng tôi xác định

được mật độ tế bào nấm mốc *A. niger* trong môi trường nuôi cấy ở mức pha loãng  $10^{-6}$  là  $I = 8,1 \times 10^7$  CFU/ml. Kết quả này đảm bảo cho quá trình lên men đạt hiệu quả vì  $I \geq 7,5 \times 10^7$  CFU/ml [15].

### 3.2.3. Xác định mối tương quan giữa OD và mật độ tế bào *A. niger*

Trong quá trình nghiên cứu, chúng tôi tiến hành rất nhiều mẫu thí nghiệm lên men axit xitric và cần cày *A. niger* với tỷ lệ là  $2 \times 10^7$  tế bào/g bã dứa khô [15]. Tuy nhiên, theo thời gian thì mật độ tế bào giống sẽ thay đổi, để đảm bảo độ chính xác của các mẫu thí nghiệm chúng tôi phải kiểm tra lại mật độ tế bào giống bổ sung vào môi trường. Việc kiểm tra mật độ tế bào giống tốn rất nhiều thời gian, vì thế chúng tôi đã tiến hành xác định mối tương quan giữa độ đục (OD) và mật độ tế bào giống. Như vậy, khi tiến hành các thí nghiệm lên men chúng tôi không cần đếm mật độ tế bào giống bổ sung mà chỉ cần xác định OD, từ đó suy ra mật độ tế bào giống.

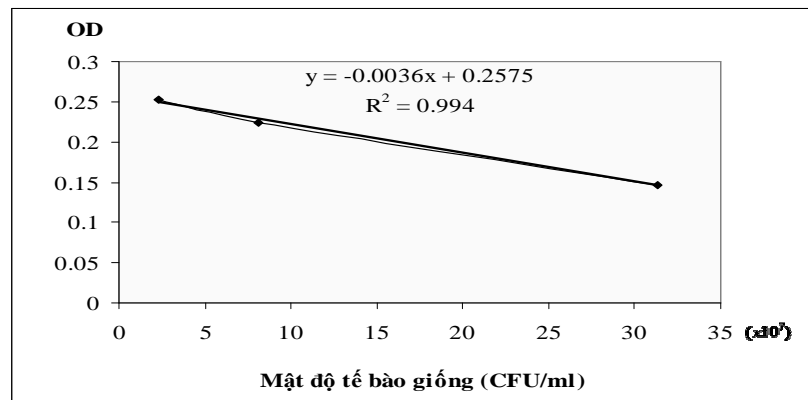
Sau khi tiến hành hút và cấy canh trường vào môi trường thạch, chúng tôi tiến hành đo OD ở bước sóng 620nm của từng mức độ pha loãng khác nhau. Kết quả của việc đo OD tương ứng với mật độ tế bào đếm được ở mỗi độ pha loãng khác nhau được trình bày ở mục 3.7, phụ lục 3 và Bảng 3.2.

Từ kết quả ở Bảng 3.2, chúng tôi tiến hành xây dựng đường chuẩn mật độ tế bào giống với trục tung là độ đục ( $\text{OD}_{620\text{nm}}$ ), trục hoành là mật độ tế bào giống. Tìm phương trình biểu diễn đường chuẩn dạng:  $y = a \cdot x + b$  với  $y = \text{OD}_{620\text{nm}}$ ;  $x =$  mật độ tế bào giống (CFU/ml) và hệ số tương quan  $R^2$  bằng phần mềm Excel.

Kết quả xây dựng đường chuẩn mật độ tế bào giống là:

$$y = -0,0036x + 0,2575 \quad (3.1)$$

Đường chuẩn mật độ tế bào giống được biểu diễn ở Hình 3.6.



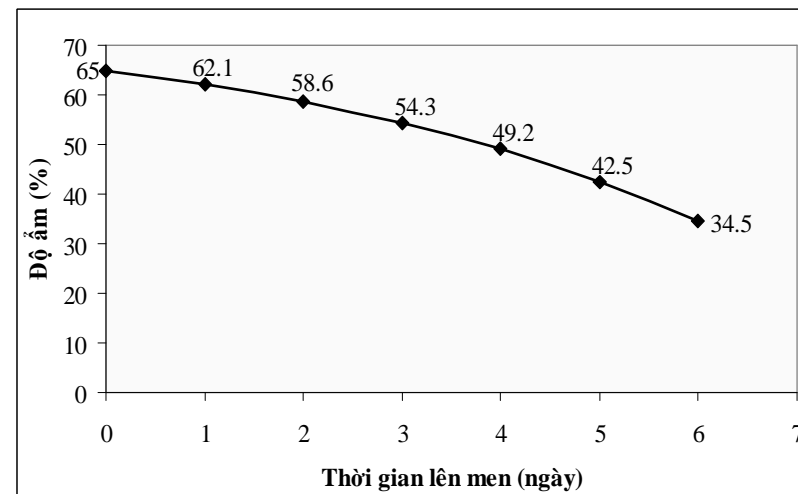
**Hình 3.6. Đồ thị đường chuẩn mật độ tế bào *A. niger***

Như vậy, từ phương trình (3.1) chúng ta có thể xác định được mật độ tế bào giống trước khi bổ sung vào quá trình lên men.

### 3.3. KHẢO SÁT SỰ THAY ĐỔI ẨM TRONG QUÁ TRÌNH LÊN MEN

Để khảo sát sự thoát ẩm trong quá trình lên men, chúng tôi tiến hành lên men 6 mẫu thí nghiệm với các điều kiện như nhau: cân 10g bã dứa có bổ sung sacaroza 12%;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,2%;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1%;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05%;  $\text{MnSO}_4$  0,01% và  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,001%; ethanol 2% (% so với khối lượng bã dứa). Độ ẩm môi trường lên men là 65%, pH ban đầu bằng 5,5, cấy *A. niger* với tỷ lệ  $2 \times 10^7$  tế bào/g bã dứa khô[15], nhiệt độ lên men  $30^\circ\text{C}$ . Thời gian lên men tương ứng với 6 mẫu thí nghiệm là A1 (1 ngày), A2 (2 ngày), A3 (3 ngày), A4 (4 ngày), A5 (5 ngày) và A6 (6 ngày).

Cứ sau mỗi ngày lên men, chúng tôi lấy một mẫu tương ứng với thời gian lên men đem xác định độ ẩm bằng phương pháp sấy đến trọng lượng không đổi như đã trình bày ở mục 2.2.1.1, chương 2. Kết quả tính toán độ ẩm thay đổi ( $W_2$ ) được trình bày ở Bảng 3.1, phụ lục 3 và thể hiện ở Hình 3.7.



**Hình 3.7. Sự thay đổi ẩm qua các ngày lên men**

Theo mục 2.2.1.1, chương 2, chúng tôi tính được lượng nước mất ở các mẫu qua các ngày lên men như ở Bảng 3.3.

**Bảng 3.3. Kết quả độ ẩm và lượng nước mất qua các ngày lên men**

Mẫu	Thời gian (ngày)	Trước lên men		Sau lên men		Lượng nước mất ở các mẫu, m (g)	Lượng nước mất trong 1 ngày (g)
		$m_1$ (g)	$W_1$ (%)	$m_2$ (g)	$W_2$ (%)		
A1	1	25	65	23,09	62,1	1,91	1,91
A2	2	25	65	21,14	58,6	3,86	1,93
A3	3	25	65	19,15	54,3	5,85	1,95
A4	4	25	65	17,22	49,2	7,78	1,94
A5	5	25	65	15,22	42,5	9,78	1,96
A6	6	25	65	13,36	34,5	11,64	1,94

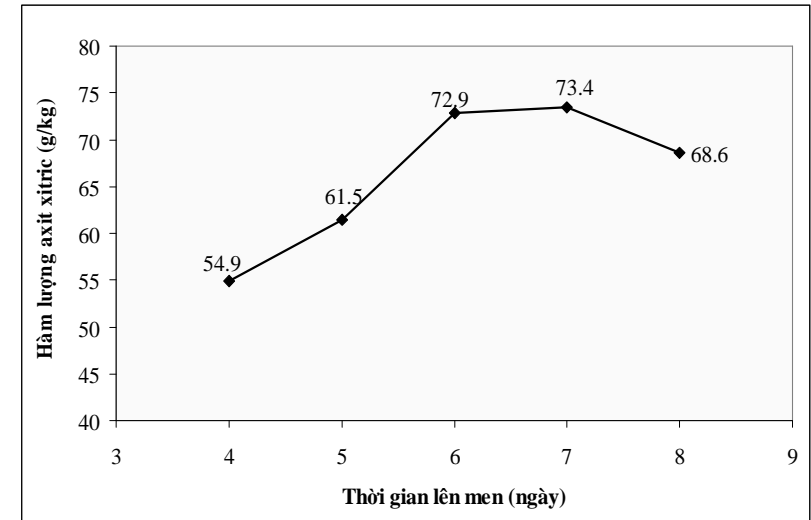
Theo số liệu trình bày ở Bảng 3.3 cho thấy lượng nước mất đi trong 1 ngày ở các mẫu thí nghiệm là giống nhau, chúng xê dịch từ 1,91 đến 1,96. Như vậy, sau mỗi ngày lên men mất đi một lượng nước như nhau. Để duy trì ở độ ẩm của môi trường lên men như độ ẩm ban đầu 65% thì chúng ta cần bổ sung một lượng nước chính bằng lượng nước mất đi và bổ sung một lượng nước như nhau sau mỗi ngày lên men, kết quả này phù hợp với báo cáo của De Lima [11].

Ở kết quả nghiên cứu này, khi lên men 10g bã dứa khô với độ ẩm ban đầu là 65% thì sau mỗi ngày lên men cần thêm 1,91-1,96g nước để duy trì độ ẩm ban đầu. Như vậy, khi tiến hành các thí nghiệm lên men cũng ở độ ẩm 65% thì chỉ cần biết khối lượng bã dứa cho lên men thì có thể tính được lượng nước cần bổ sung vào mỗi ngày trong suốt quá trình lên men.

### 3.4. NGHIÊN CỨU MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN HÀM LƯỢNG AXIT XITRIC TẠO THÀNH TRONG QUÁ TRÌNH LÊN MEN

#### 3.4.1. Ảnh hưởng của thời gian lên men đến hàm lượng axit xitric tạo thành

Các thí nghiệm được tiến hành với các điều kiện như sau: cố định hàm lượng bã dứa 40g; sacazoza 12%;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,2%;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1%;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05%;  $\text{MnSO}_4$  0,01% và  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,001%; ethanol 2% (% so với khối lượng bã dứa); độ ẩm môi trường lên men là 65%; pH ban đầu bằng 5,5; cây *A. niger* với tỷ lệ  $2 \times 10^7$  tế bào/g bã dứa khô [15]; nhiệt độ lên men 30°C. Khảo sát các mốc thời gian lên men là 4; 5; 6; 7; 8 ngày để theo dõi quá trình lên men. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở Bảng 3.4, phụ lục 3 và biểu diễn trên đồ thị Hình 3.8.



Hình 3.8. Ảnh hưởng của thời gian lên men đến hàm lượng axit xitric tạo thành

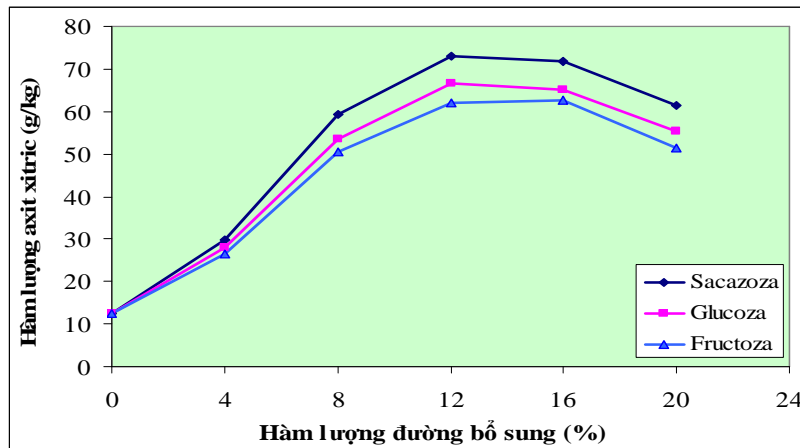
Kết quả nghiên cứu cho thấy, hàm lượng axit xitric tạo thành tăng dần từ những ngày đầu của quá trình lên men, từ ngày thứ 4 đến ngày thứ 6 hàm lượng axit xitric tăng lên rõ rệt, tăng từ 54,9 g/kg đến 72,9 g/kg. Ở ngày thứ 6 và thứ 7 hàm lượng axit xitric tạo thành cao nhất và đạt hàm lượng tương đương nhau là 72,9 g/kg và 73,4 g/kg. Sang ngày thứ 8 hàm lượng axit xitric tạo thành lại giảm xuống còn 68,6 g/kg.

Như vậy, hàm lượng axit xitric tạo thành trong quá trình lên men bởi *A. niger* là phụ thuộc rất nhiều vào thời gian lên men. Hàm lượng axit xitric đạt kết quả cao nhất vào những ngày lên men thứ 6 và thứ 7. Tuy nhiên, để rút ngắn thời gian lên men có hiệu quả kinh tế chúng tôi chọn thời gian lên men là 6 ngày với hàm lượng axit xitric tạo thành là 72,9g/kg.



### 3.4.2. Ảnh hưởng của loại đường và hàm lượng đường bổ sung đến hàm lượng axit xitric tạo thành

Các thí nghiệm được tiến hành với các điều kiện như sau: cố định hàm lượng bã dứa 40g;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,2%;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1%;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05%;  $\text{MnSO}_4$  0,01% và  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,001%; ethanol 2% (% so với khối lượng bã dứa); độ ẩm môi trường lên men là 65%; pH ban đầu bằng 5,5; cây *A. niger* với tỷ lệ  $2 \times 10^7$  tế bào/g bã dứa khô [15]; tiến hành lên men trong 6 ngày ở nhiệt độ 30°C. Hàm lượng đường bổ sung ở các thí nghiệm thay đổi từ 0; 4; 8; 12; 16 đến 20% (% so với khối lượng bã dứa). Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở Bảng 3.5, phụ lục 3 và biểu diễn trên đồ thị Hình 3.9.



Hình 3.9. Ảnh hưởng của loại đường và hàm lượng đường bổ sung đến hàm lượng axit xitric tạo thành

Kết quả nghiên cứu cho thấy, khi không bổ sung đường, *A. niger* chỉ sử dụng lượng đường có trong bã dứa thì hàm lượng axit xitric tạo thành rất thấp, chỉ 12,5g/kg. Khi có bổ sung hàm lượng đường từ 4 đến 12% thì hàm lượng axit xitric tạo thành đã tăng lên đáng kể. Khi bổ sung 12% sacarozơ đã cho hàm lượng axit xitric là 73g/kg; bổ

sung 12% glucoza đã cho 66,5g/kg và bổ sung 12% fructoza đã cho 62,1g/kg. Tiếp tục tăng hàm lượng đường lên 16% rồi 20% thì kết quả hàm lượng axit xitric tạo thành không những không tăng mà ngược lại còn giảm đi, chẳng hạn như khi bổ sung 20% sacarozơ, axit xitric tạo thành chỉ còn 61,5g/kg.

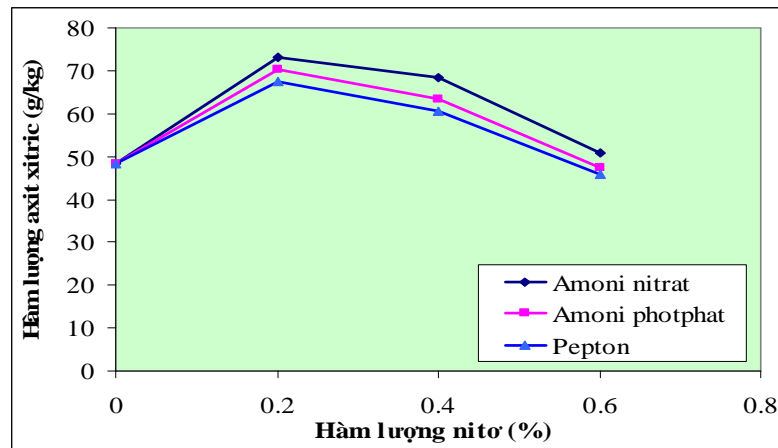
So sánh giữa 3 loại đường nghiên cứu thì đường sacarozơ cho kết quả axit xitric cao nhất rồi đến glucoza và cuối cùng là fructoza. Khi tăng hàm lượng đường bổ sung thì hàm lượng axit xitric tạo thành tăng lên đáng kể, đến khi hàm lượng đường bổ sung là 12 đến 16% thì cho hàm lượng axit xitric cao nhất và khi tiếp tục tăng hàm lượng đường lên 20% thì axit xitric tạo thành giảm. Điều này có nghĩa, lượng đường thấp thì không đủ nguồn cacbon cung cấp cho *A. niger* phát triển và khi hết đường thì hệ sợi nấm bắt đầu sử dụng đến axit xitric làm giảm hàm lượng axit xitric tạo thành. Còn khi nồng độ đường quá cao, quá trình lên men bị ức chế.

Như vậy, hàm lượng axit xitric tạo thành trong quá trình lên men bởi *A. niger* là phụ thuộc rất nhiều vào loại và nồng độ ban đầu của nguồn đường bổ sung. Hàm lượng axit xitric đạt kết quả cao nhất khi bổ sung hàm lượng sacarozơ từ 12 đến 16%. Tuy nhiên, tính đến hiệu quả kinh tế, chúng tôi chọn hàm lượng sacarozơ bổ sung là 12% với hàm lượng axit xitric tạo thành là 73g/kg sau 6 ngày lên men.

### 3.4.3. Ảnh hưởng của loại nitơ và hàm lượng nitơ bổ sung đến hàm lượng axit xitric tạo thành

Từ kết quả nghiên cứu ở mục 3.4.1 và 3.4.2, chúng tôi tiến hành lên men với các mẫu thí nghiệm cố định thời gian lên men 6 ngày, hàm lượng đường sacarozơ bổ sung 12%; 40g bã dứa;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1%;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05%;  $\text{MnSO}_4$  0,01% và  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,001%; ethanol 2% (% so với khối lượng bã dứa); độ ẩm môi trường lên men

là 65%; pH ban đầu bằng 5,5; cây *A. niger* với tỷ lệ  $2 \times 10^7$  tế bào/g bã dứa khô [15], nhiệt độ lên men  $30^\circ\text{C}$ . Khảo sát các hàm lượng nitơ bổ sung vào môi trường lên men là 0; 0,2; 0,4; 0,6%. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở bảng 3.6, phụ lục 3 và biểu diễn trên đồ thị Hình 3.10.



**Hình 3.10. Ảnh hưởng của loại nitơ và hàm lượng nitơ bổ sung đến hàm lượng axit xitric tạo thành**

Kết quả nghiên cứu cho thấy, khi không bổ sung hàm lượng nitơ vào môi trường lên men thì hàm lượng axit xitric tạo thành là 48,2g/kg. Bổ sung  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,2% hàm lượng axit xitric tạo thành đã tăng đến 73,1g/kg. Nhưng tiếp tục bổ sung hàm lượng  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  lên 0,4; 0,6 thì hàm lượng axit xitric không những không tăng mà ngược lại càng giảm dần, khi bổ sung  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,6% thì hàm lượng axit xitric giảm xuống chỉ còn 50,7g/kg. Khi bổ sung  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$  0,2% hàm lượng axit xitric tạo thành đạt 70,2g/kg, bổ sung pepton 0,2% hàm lượng axit xitric tạo thành thấp hơn, đạt 67,4g/kg. Tương tự như bổ sung hàm lượng  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , khi bổ sung hàm lượng  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$  và pepton lên 0,4; 0,6 thì hàm lượng axit xitric tạo thành cũng giảm dần.

Như vậy, qua nghiên cứu ảnh hưởng của loại nitơ và hàm lượng nitơ đến hàm lượng axit xitric tạo thành, chúng tôi nhận thấy không chỉ có hàm lượng nitơ mà còn tùy thuộc vào loại nitơ được bổ sung vào môi trường lên men đã làm thay đổi đến hàm lượng axit xitric tạo thành. Giữa loại nitơ vô cơ ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ ) và nitơ hữu cơ (pepton) như chúng tôi khảo sát thì muối nitơ vô cơ  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  cho kết quả hàm lượng axit xitric tạo thành cao hơn cả. Và việc thiếu, thừa nitơ trong quá trình lên men đều hạn chế sự tăng trưởng của *A. niger*. Do đó, việc tăng, giảm khác hơn  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,2%;  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$  0,2% hoặc pepton 0,2%, dẫn đến sự xáo trộn của *A. niger*, làm giảm khả năng tăng trưởng và dẫn đến giảm hàm lượng axit xitric tạo thành.

Qua nghiên cứu, chúng tôi chọn kết quả bổ sung hàm lượng  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,2% đạt hàm lượng axit xitric tạo thành là 73,1g/kg.

### 3.5. NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG ĐỒNG THỜI CỦA BA YẾU TỐ ĐẾN QUÁ TRÌNH LÊN MEN AXIT XITRIC

#### 3.5.1. Chọn điều kiện thí nghiệm

#### 3.5.2. Tính hệ số b

#### 3.5.3. Kiểm tra ý nghĩa của hệ số b trong phương trình (3.2)

Phương trình hồi qui có dạng:

$$\tilde{Y} = 74,225 + 1,0827x_1 - 0,761x_2 - 1,071x_3 \quad (3.5)$$

#### 3.5.4. Kiểm tra sự tương thích của phương trình (3.5) với thực nghiệm

#### 3.5.5. Tối ưu hóa thực nghiệm

Từ kết quả các bước chuyển động  $\delta_j$  ở Bảng 3.9, chúng tôi tổ chức thí nghiệm leo dốc, xuất phát từ tâm thực nghiệm theo hướng đã chọn. Kết quả được biểu diễn ở Bảng 3.10.

**Bảng 3.10. Kết quả thí nghiệm theo hướng dốc đứng**

Thí nghiệm	Các yếu tố ảnh hưởng			Hàm mục tiêu
	Z <sub>1</sub> (ngày)	Z <sub>2</sub> (%)	Z <sub>3</sub> (%)	Y
1 (TN tại tâm)	6	12	0,2	73,065
2	5,5	13	0,25	76,303
3	5	14	0,3	78,217
4	4,5	15	0,35	74,152
5	4	16	0,4	72,473

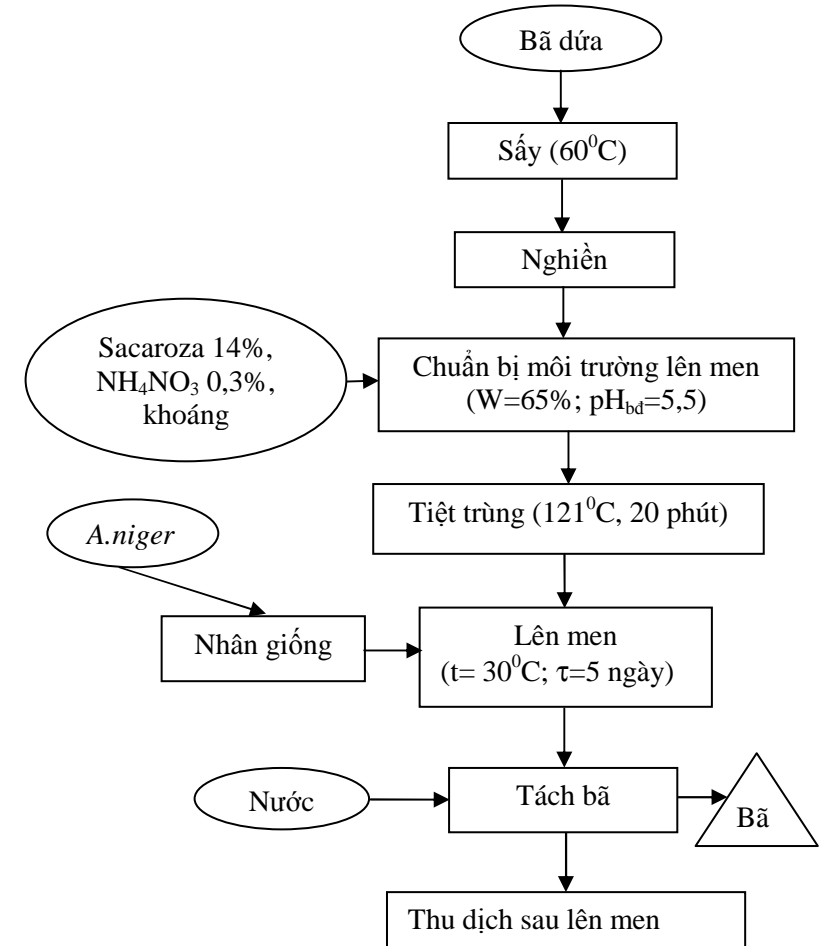
Qua các thí nghiệm leo dốc, kết quả nhận được ở thí nghiệm 3 là cao nhất với hàm lượng axit xitric tạo thành là 78,217 (g/kg), ứng với hàm lượng đường bổ sung là 14% sacarozơ, hàm lượng nitơ bổ sung là 0,3% NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> và thời gian lên men là 5 ngày.

Theo nghiên cứu của tác giả Kareem và các cộng sự, sau 5 ngày lên men vỏ dứa có bổ sung sacarozơ 15%, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0,25% đã cho hàm lượng axit xitric là 60,6g/kg vỏ dứa khô [15]. So sánh kết quả nghiên cứu của chúng tôi và của tác giả Kareem thì đã có sự chênh lệch, nghiên cứu của chúng tôi cho kết quả cao hơn. Nhưng so sánh với kết quả nghiên cứu của Tran CT, Sly LI, Mitchel DA đã sử dụng *Asper & illus foetidus* ACM3996 với sự hiện diện của 3% methanol, với độ ẩm 70% thu được 161g/kg bã dứa khô sau 4 ngày lên men [17] thì kết quả nghiên cứu của chúng tôi còn thấp. Có thể do nhiều yếu tố, trong đó có nguồn nguyên liệu khác nhau, việc sử dụng chủng vi sinh vật khác nhau và các điều kiện lên men khác nhau đã dẫn đến kết quả nghiên cứu không giống nhau. Kết quả ở nghiên cứu này là tương đối khá so với các kết quả nghiên cứu của Hang và Woodams (1984) lên men bã táo đạt 65g/kg; Hang và Woodams (1985) lên men

bã nho đạt 92g/kg; Shankaranand và Lonsane (1992) lên men cám lúa mì đạt 72g/kg [17]. Võ Thị Hạnh lên men bã mía đạt 80g/kg và bã khoai mì đạt 98g/kg [3].

### 3.6. ĐỀ XUẤT QUI TRÌNH CÔNG NGHỆ LÊN MEN AXIT XITRIC TỪ BÃ DỨA TRÊN MÔI TRƯỜNG BÁN RẮN SỬ DỤNG *A. NIGER* Ở QUI MÔ PTN

#### 3.6.1. Quy trình công nghệ lên men axit xitric quy mô PTN

**Hình 3.11. Quy trình công nghệ lên men axit**

### 3.6.2. Thuyết minh quy trình

**Bã dứa:** Thu từ nhà máy chế biến dứa xuất khẩu, nhà máy chế biến dứa cô đặc và các nhà máy chế biến hoa quả trong nước.

**Sấy:** Sấy ở nhiệt độ 60°C cho đến khi bã dứa đạt độ ẩm khoảng 14%, rồi sau đó tiến hành nghiền nhỏ.

**Nghiền:** Nghiền nhỏ với kích thước hạt khoảng 1-3 mm. Mục đích của việc nghiền là làm tăng độ xốp cho môi trường lên men, để thuận lợi cho quá trình hô hấp của nấm mốc *A. niger*.

Lượng bã dứa này được lưu trữ ở nhiệt độ thường và sử dụng làm nguyên liệu cho cả quá trình nghiên cứu.

#### Chuẩn bị môi trường lên men:

Bã dứa bổ sung các chất dinh dưỡng: sacaroza 14%,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,3%, ethanol 2%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1%;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05%;  $\text{MnSO}_4$  0,01% và  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,001%. Độ ẩm môi trường lên men là 65%, pH ban đầu bằng 5,5.

**Tiệt trùng:** môi trường lên men được tiệt trùng ở 121°C trong 20 phút, nhằm tiêu diệt các vi sinh vật gây ảnh hưởng đến quá trình lên men.

#### Nhân giống:

Để đáp ứng lượng giống nấm mốc cho lên men axit xtric thì cần phải tiến hành nhân giống. Đầu tiên tiến hành nhân giống trong phòng thí nghiệm sau đó tiến hành nhân giống trong sản xuất. Nhân giống trong phòng thí nghiệm là nuôi cấy *A. niger* thuần khiết trên môi trường chứa đầy đủ chất dinh dưỡng và được tiệt trùng. Nấm mốc *A. niger* thường nuôi trên môi trường thạch czapeck, raulin, sabouraud,... Nhân giống trong sản xuất, *A. niger* thường được nuôi trên môi trường từ các nguồn nguyên liệu giàu đường, rẻ tiền như ri đường, malt đại mạch, cám gạo,...

#### Lên men:

Môi trường lên men được phân phối trên các bình erlen, trên các khay,... được cấy *A. niger* (với tỷ lệ  $2 \times 10^7$  tế bào/g bã dứa) trong điều kiện vô trùng. Nhiệt độ lên men 30°C, thời gian lên men là 5 ngày. Trong quá trình lên men có sự thất thoát nước nên cần bổ sung nước để duy trì độ ẩm ban đầu.

**Tách bã:** Khi kết thúc quá trình lên men, trộn môi trường đã lên men với nước, tiến hành khuấy trộn, ép rồi lọc sạch bã thu dịch sau lên men.

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### 1. KẾT LUẬN

1) Đã xác định được một số thành phần hóa học của bã dứa ở nhà máy chế biến dứa xuất khẩu Nghệ An như sau:

Độ ẩm:	81,27%
pH:	4,13
Axit xitric:	3,7% (% chất khô)
Đường tổng:	23,25% (% chất khô)
Nitơ tổng:	0,84% (% chất khô)

2) Trong quá trình lên men độ ẩm của môi trường thay đổi đáng kể nên hằng ngày phải bổ sung lượng nước tương ứng để duy trì độ ẩm không đổi. Lượng nước bổ sung mỗi ngày đều bằng nhau trong suốt quá trình lên men.

3) Kết quả nghiên cứu đơn biến của một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men cho thấy thời gian lên men, hàm lượng đường và hàm lượng nitơ bổ sung có ảnh hưởng đáng kể đến quá trình lên men. Trong đó:

+ Trong 3 loại đường sacarozơ, glucoza và fructoza thì đường sacarozơ bổ sung tốt nhất cho quá trình lên men xitric.

+ Trong 3 loại nitơ  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$  và pepton thì  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  bổ sung tốt nhất cho quá trình lên men xitric.

4) Khi nghiên cứu ảnh hưởng đồng thời 3 yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men thời gian lên men, hàm lượng sacarozơ bổ sung và hàm lượng  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  bổ sung bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm,  $\text{TYT}2^3$  thì phương trình hồi quy thu được là:  

$$\tilde{Y} = 74,225 + 1,0827x_1 - 0,761x_2 - 1,071x_3$$

5) Khi tối ưu hóa thực nghiệm bằng phương pháp leo dốc thì kết quả thu được là 78,217 g/kg với các thông số lên men tối ưu là bổ sung 14% sacarozơ, 0,3%  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  và thời gian lên men là 5 ngày.

6) Đã đề xuất qui trình công nghệ lên men axit xitric từ bã dứa trên môi trường bán rắn sử dụng *Asperillus niger* ở qui mô PTN.

### 2. KIẾN NGHỊ

- Cần tiếp tục nghiên cứu quá trình lên men axit xitric từ bã dứa, tiếp tục nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng khác như tỷ lệ giống, pH, độ ẩm, kích thước hạt, bề dày môi trường, nồng độ oxy,... để mạnh dạn đề xuất qui trình công nghệ lên men axit xitric từ bã dứa trên môi trường bán rắn sử dụng *Asperillus niger* ở qui mô pilot.

- Mở rộng phạm vi nghiên cứu của đề tài trên nhiều nguồn phế liệu nông-công nghiệp rẻ tiền nhưng giàu đường, tinh bột hoặc xenluloza với các chủng *A. niger* bị đột biến để thu axit xitric cao nhất.

- Từ axit xitric tạo thành, tinh chế, kết tinh thu axit xitric tinh khiết và có thể ứng dụng vào nhiều ngành công nghiệp khác nhau.

- Nghiên cứu tận dụng bã thải của môi trường sau lên men để làm thức ăn gia súc.