

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG

NGUYỄN THỊ THANH TỊNH

**NGHIÊN CỨU QUÁ TRÌNH THỦY PHÂN – LÊN MEN AXIT
XITRIC TỪ BÃ ĐẬU NÀNH BẰNG
ASPERGILLUS ORYZAE VÀ *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.Trương 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 17 tháng 11 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 là axit hữu cơ có độ chua nhẹ, hoà tan nhiều trong nước. Vì vậy, cùng với những axit hữu cơ quan trọng khác, nó là một trong những axit có nhiều ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm như: sản xuất bánh kẹo, nước giải khát (E330)... Ngoài ra, axit xitric còn được sử dụng trong nhiều ngành công nghiệp khác như: mỹ phẩm, phim ảnh, y học và dược phẩm, trong sản xuất các chất tẩy rửa và đặc biệt trong ngành công nghiệp vật liệu mới như nhựa sinh học... Với những ứng dụng rộng rãi như trên nhưng hiện nay nước ta chủ yếu phải nhập khẩu axit xitric. Bên cạnh nhu cầu thực tế thiết thực nhưng những nghiên cứu về axit xitric trong nước vẫn còn hạn chế.

Sản xuất axit xitric bằng phương pháp lên men đạt hiệu quả kinh tế hơn so với tách chiết từ tự nhiên. Do vậy hiện nay nó chiếm 90% tổng lượng axit xitric được sản xuất. Thực trạng sản xuất axit xitric ở trong nước vẫn chưa cân xứng với tiềm năng ứng dụng trên. Trong khi đó nguồn nguyên liệu sản xuất axit xitric rất phong phú, đặc biệt nguồn nguyên liệu rẻ tiền từ phụ phẩm nông nghiệp, công nghiệp. Phụ phẩm từ ngành công nghiệp thực phẩm trong đó có ngành công nghiệp chế biến đậu nành như sữa đậu nành, bột đậu nành, đậu khuôn... rất phong phú. Sữa đậu nành Vinasoy, Vinamilk, Tribeco... hàng năm thải ra một lượng bã đậu nành rất lớn. Riêng nhà máy Vinasoy mỗi ngày thải ra gần 30 tấn bã đậu nành. Hiện tại, hướng giải quyết chủ yếu là bán cho người dân làm thức ăn gia súc. Lượng bã này vẫn còn giá trị dinh dưỡng hàm lượng xơ, protein

cao...thuận lợi cho quá trình lên men axit xitric. Do đó, chúng tôi chọn nguồn phế phẩm này để lên men axit xitric.

Tuy nhiên, bã đậu nành giàu xenluloza, protein...những hợp chất hữu cơ phức tạp. Vì vậy, giai đoạn thủy phân cơ chất sẽ quyết định chất lượng môi trường dinh dưỡng thích hợp cho nấm mốc *A.niger* lên men axit xitric. Có nhiều phương pháp thủy phân như thủy phân bằng axit, enzym... Bã đậu nành chứa đa dạng các chất dinh dưỡng nên tác nhân thủy phân từ hệ enzym của vi sinh vật là giải pháp tốt nhất. Chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài “*Nghiên cứu quá trình thủy phân - lên men axit xitric từ bã đậu nành bằng Aspergillus oryzae và Aspergillus niger*”.

2. MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

- Xác định một số thành phần hóa học (đường, protein, xenluloza...) trong bã đậu nành.
- Xác định phương pháp thủy phân bã đậu nành nhờ hệ enzym của *A.oryzae* tạo môi trường lên men axit xitric tốt nhất.
- Bước đầu đề xuất qui trình công nghệ lên men axit xitric từ bã đậu nành bằng *A.niger*.

3. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHẠM VI NGHIÊN CỨU

- Sử dụng bã đậu nành tại Công ty Vinasoy - Quảng Ngãi.
- Các chủng nấm mốc *A.niger* và *A.oryzae* từ phòng thí nghiệm Đại học Bách Khoa - Đà Nẵng và Đại học Khoa học tự nhiên – TP. Hồ Chí Minh.
- Thử nghiệm thủy phân bã đậu nành từ hệ enzym của nấm mốc *A.oryzae* và lên men axit xitric ở qui mô phòng thí nghiệm.

4. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

- Phương pháp vật lý và hóa lý:

Xác định pH: Sử dụng pH kế

Xác định độ ẩm: Sấy đến khối lượng không đổi

Xác định hàm lượng axit xitric: Phương pháp HPLC

- Phương pháp hoá sinh:

Xác định hàm lượng đường tổng và đường khử

Xác định hàm lượng xenluloza

Xác định hàm lượng protêin

Xác định hàm lượng photpho

- Các phương pháp thủy phân bã đậu nành: Đề suất ba qui trình thủy phân bã đậu nành.

- Phương pháp xử lý dịch sau lên men để định lượng axit xitric

- Phương pháp vi sinh:

Phương pháp nuôi cấy, nhân giống nấm mốc *A.niger* và *A.oryzae*.

Phương pháp xác định số tế bào vi sinh vật: Phương pháp đếm khuẩn lạc.

Xác định hoạt lực của enzym xenlulaza: Đo vòng thủy phân

- Phương pháp toán học:

Sử dụng phương pháp qui hoạch thực nghiệm

5. Ý NGHĨA KHOA HỌC VÀ THỰC TIỄN CỦA ĐỀ TÀI

- Kết quả nghiên cứu của đề tài sẽ cung cấp thông số kỹ thuật sản xuất axit xitric từ bã đậu nành. Đặc biệt chọn được phương thức thủy phân tốt nhất nhờ hệ enzym của nấm mốc *A.oryzae*.

- Là bước mới trong việc nghiên cứu thủy phân và lên men axit xitric bằng hai chủng nấm *A.oryzae* và *A.niger*.

- Giải quyết nguồn phụ phẩm trong nông nghiệp và trong công nghiệp thực phẩm.

- Sử dụng bã đậu nành lên men axit xitric đã 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 và giảm lượng axit xitric ngoại nhập.

- Từ những nghiên cứu sản xuất các chế phẩm sinh học từ bã đậu nành đã đạt được như riboflavin, lipit, fructouranosidaze, protêin đơn bào. Đề tài này được hứa hẹn sẽ thêm qui trình sản xuất axit xitric từ bã đậu nành lần đầu tiên ở Việt Nam.

- Giúp giải quyết vấn đề ô nhiễm môi trường chất thải rắn trong công nghiệp thực phẩm.

6. CẤU TRÚC CỦA 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 tài liệu

+ Chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

+ Chương 3: Kết quả nghiên cứu và thảo luận

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tổng quan về axit xitric

1.1.1. Giới thiệu về axit xitric

1.1.2. Cấu tạo và tính chất của axit xitric

1.2. Giới thiệu về bã đậu nành

1.2.1. Nguồn cung cấp phụ phẩm

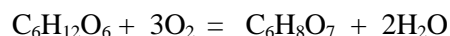
1.2.2. Thành phần dinh dưỡng

1.3. Quá trình thủy phân bã đậu nành

1.4. Quá trình lên men axit xitric

1.4.1. Cơ chế quá trình lên men axit xitric

Cơ chế phản ứng tân tạo axit xitric như phản ứng dưới đây:



Gluxit bị phân giải theo kiểu lên men rượu, nghĩa là tạo axit pyruvic và CH_3CHO rồi từ axit pyruvic và CH_3CHO lại được tổng hợp thành axit xitric.

1.4.2. Phương pháp lên men axit xitric

1.4.2.1. Lên men bề mặt

1.4.2.2. Lên men chìm

1.4.3. Vi sinh vật trong lên men axit xitric

1.4.3.1. Nấm mốc *Aspergillus niger*

1.4.3.2. Nấm men

1.4.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men xitric

1.4.4.1. Chủng nấm mốc

1.4.4.2. Môi trường lên men

1.4.4.3. pH môi trường lên men

1.4.4.4. Nhiệt độ lên men

1.4.4.5. Sự thoáng khí

1.4.5. Ứng dụng của axit xitric

1.5. Tổng quan về các công trình nghiên cứu ở Việt Nam và trên thế giới

1.5.1. Những nghiên cứu ở trên thế giới

Đối với bã đậu nành đã có các công trình nghiên cứu của Naoya Kasal và cộng sự (2004), đã nghiên cứu hoạt động enzym phân cắt bã đậu nành. Ngoài ra vào năm 2011, C.R. Rekha và G.Vijayalakshmi đã nghiên cứu bổ sung bã đậu nành đã thủy phân làm tăng tốc lên men bột bánh idli, một loại bánh đặc trưng ở Ấn Độ.

Trên thế giới, tác nhân lên men axit xitric được nghiên cứu và ứng dụng nhiều nhất là nấm mốc *A.niger*. Chẳng hạn như các nghiên cứu của Akihiko Sakurai và cộng sự thuộc ĐH Hokkaido và ĐH Waseda - Nhật Bản, đã nghiên cứu sản xuất axit xitric bằng nuôi cấy bề mặt chủng *A.niger*. Cũng cùng với mục đích như trên tại New Zealand, nhóm tác giả M.Y.Lu, I.S.Maddox và J.D. Brooks đã nghiên cứu sản xuất axit xitric bằng *A.niger* trong quá trình lên men rắn. Hay trên lĩnh vực rộng hơn nữa là nghiên cứu tổng hợp sản xuất axit hữu cơ bằng nấm *A.niger* của tác giả W.A. de Jongh thuộc ĐH Kỹ thuật - Đan Mạch vào năm 2006.

Nghiên cứu của T.Roukas và P.Kotzekidou thuộc ĐH Aristotelia - Hy Lạp về ảnh hưởng của một số kim loại vi lượng và chất kích thích đến sản xuất axit xitric từ chất thải của nhà máy bia bằng nấm mốc *A.niger*.

Tác giả Y.D.Hang và E.E.Woodams thuộc ĐH Cornell, USA nghiên cứu sản xuất axit xitric từ lõi ngô. Đối với phụ phẩm từ rau quả như chuối, vào năm 1991 tác giả G.Sassi và cộng sự thuộc Viện

nghiên cứu Torino và Trường ĐH Torino - Italy, đã nghiên cứu sản xuất axit xitric bằng nấm mốc *A.niger* với cơ chất là dịch chiết từ chuối một nguồn cơ chất giàu đường.

Năm 2006, G.Xie và T.P.West thuộc ĐH Dakota - USA, đã nghiên cứu sản xuất axit xitric trên môi trường bã hèm của quá trình sản xuất cồn từ ngô. Ba năm sau vào năm 2009, cũng theo hai tác giả này và trên cùng nguồn nguyên liệu cũng như chủng nấm mốc *A.niger* ATCC 9142 họ đã nghiên cứu khả năng sử dụng etanol để sản xuất axit xitric.

Năm 1998, T.Watanabe và cộng sự thuộc ĐH Nông nghiệp Punjab - Ấn Độ và ĐH Waseda - Nhật Bản, đã nghiên cứu sản xuất axit xitric từ cơ chất giàu xenluloza. Tạp chí Sinh học Châu Âu, 2010 đã giới thiệu nghiên cứu của nhóm tác giả Laboni Majumderr và cộng sự về sản xuất axit xitric bằng *A.niger* sử dụng cơ chất là rỉ đường và bí ngô.

Những nghiên cứu về chủng nấm mốc *A.niger* đột biến bởi tia gamma đã được nhiều nhà khoa học quan tâm như Anjuman Ara Begum và cộng sự thuộc Viện thực phẩm và chiếu xạ sinh học – Bangladesh - Ấn Độ đã nghiên cứu lên men axit xitric trong môi trường cacbonhydrat.

Vào năm 1995, S.K.Khare, Krishna Jha và A.P.Gandhi - Trung tâm ứng dụng và Chế biến đậu nành - Viện kỹ thuật Nông nghiệp Bhopal - Ấn Độ, đã nghiên cứu sản xuất axit xitric từ bã đậu nành lên men rắn bằng *A.niger*.

1.5.2. Những nghiên cứu ở Việt Nam

Tiềm năng nghiên cứu sản xuất axit xitric ở Việt Nam vẫn chưa được khai thác nhiều. Đặc biệt đối với nguồn nguyên liệu là bã đậu nành thì chưa có đề tài nghiên cứu nào.

Với nguyên liệu bã đậu nành, có rất ít nghiên cứu trong nước được công bố. Trong đó có nghiên cứu của TS. Lại Mai Hương, 2008 (ĐH Bách khoa TP. HCM) đã nghiên cứu thủy phân bã đậu nành tạo chế phẩm dinh dưỡng giàu chất xơ bổ sung vào bánh mì.

Vào năm 1997, Võ Thị Hạnh và Lê Bích Phượng đã nghiên cứu lên men axit xitric trên phế phẩm của nhà máy chế biến tinh bột sắn. Tác giả Ngô Kế Sương cùng với hai tác giả trên, vào năm 2003 nhóm ba tác giả này đã nghiên cứu “Những khó khăn và thuận lợi khi sử dụng phụ phế liệu của ngành mía đường để sản xuất axit xitric bằng phương pháp lên men bán rắn từ nấm mốc *A.niger* ở qui mô pilot”.

Từ thực tiễn nghiên cứu trong - ngoài nước và nhu cầu của xã hội. Do đó, chúng tôi mạnh dạn tiến hành thực hiện đề tài “*Nghiên cứu quá trình thủy phân – lên men axit xitric từ bã đậu nành bằng Aspergillus oryzae và Aspergillus niger*”.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Bã đậu nành được thu nhận tại Nhà máy Vinasoy – CTCP Đường Quảng Ngãi.

Nấm mốc *A.niger* và *A.oryzae*: Trường ĐH Bách Khoa - Đà Nẵng và ĐH Khoa học tự nhiên – TP. Hồ Chí Minh.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp vật lý và hóa lý

2.3.1.1. Xác định pH: Máy đo pH

2.3.1.2. Xác định độ ẩm: Sấy đến khối lượng không đổi

2.3.1.3. Xác định hàm lượng axit xitric: Phương pháp HPLC

2.3.2. Phương pháp hoá sinh

2.3.2.1. Xác định hàm lượng đường khử

2.3.2.2. Xác định hàm lượng đường tổng

2.3.2.3. Xác định hàm lượng xenluloza

2.3.2.4. Xác định hàm lượng protêin tổng số: Kjeldahl cải tiến

2.3.2.5. Phân tích photpho bằng phương pháp Vanadomolydat

2.3.3. Các phương pháp thủy phân bã đậu nành

2.3.4. Phương pháp xử lý dịch lên men để định lượng axit xitric

2.3.5. Phương pháp vi sinh

- Phương pháp nuôi cấy, nhân giống nấm mốc *A.niger*, *A.oryzae*

- Phương pháp xác định số tế bào vi sinh vật: Đếm khuẩn lạc

- Đánh giá khả năng sinh enzym xenlulaza: Đo vòng thủy phân

2.3.6. Phương pháp toán học

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát một số thành phần hóa học cơ bản của bã đậu nành

Bằng phương pháp sấy đến khối lượng không đổi, bã đậu nành khô phân tích có độ ẩm 10.12%. Giá trị pH của bã đậu nành chúng tôi đo được bằng 5.97. Kết quả phân tích một số thành phần nguyên liệu được thể hiện ở bảng 3.1.

Bảng 3.1. Kết quả một số thành phần hóa học của bã đậu nành

Thành phần hoá học của bã đậu nành (g/100g)				
Protêin	Xenluloza	Đường tổng	Đường khử	Photpho
6.46	79.37	3.82	0.12	0.092

Trong bã đậu nành hàm lượng protêin thô chúng tôi phân tích được 6.46 g/100g bã. Nguồn dinh dưỡng thứ hai không kém phần cần thiết là cacbohydrat. Hàm lượng xenluloza thô trong mẫu bã đậu nành phân tích được là 79.37g/100g. Ngoài ra, đường chiếm khoảng 3.82g/100g. Trong đó đường khử chiếm 0.12g/100g. Hàm lượng photpho trung bình 0.092g/100g.

Từ kết quả phân tích trên cho thấy rằng bã đậu nành là nguồn phế phẩm tiềm năng để ứng dụng trong lên men axit xitric.

3.2. Nuôi cấy và nhân giống *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*

3.2.1. Khảo sát chọn môi trường nuôi cấy

Để tìm môi trường nuôi cấy giữ giống và tăng sinh, chúng tôi tiến hành chọn từ ba môi trường thích hợp cho cả 2 chủng nấm mốc *A.niger* và *A.oryzae* như sau:

+ Môi trường Sabouraud (Sabouraud + 0.5% CMC)

+ Môi trường Czapek – Dox cải tiến

+ Môi trường thạch, khoai tây, glucose (PDA)

Chỉ tiêu đánh giá thông qua quan sát khả năng hình thành bào tử và thời gian sinh trưởng. Môi trường Sabouraud thể hiện nhiều tính chất ưu việt như thời gian hình thành bào tử nhanh hơn, bào tử mọc dày hơn. Đặc điểm của môi trường này đơn giản, chế độ thanh trùng mềm hơn 110°C 15 phút nên ít bị biến đổi đường.

Vì vậy, tôi đã chọn môi trường Sabouraud cho quá trình nhân giống. Bên cạnh đó nhằm mục đích kích thích sản sinh enzym thủy phân xenluloza, chúng tôi đã giảm hàm lượng protêin (0.5%) và bổ sung chất dẫn xuất của xenluloza là cacboxylmethyl xenluloza (0.5%).

3.2.2. Khảo sát quá trình nhân giống

Quá trình nhân giống tiến hành ở 32°C, trên máy lắc với tốc độ vòng 120 vòng/phút. Kết quả mật độ tế bào thu được ở bảng 3.2:

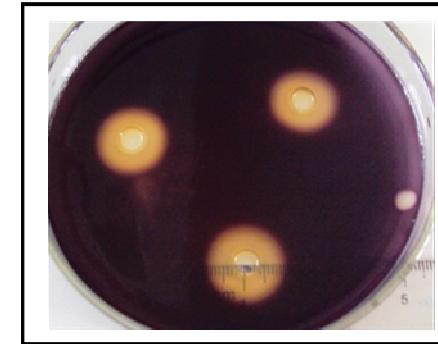
Bảng 3.2. Mật độ tế bào nấm mốc *A.niger* và *A.oryzae*

Nấm mốc	CFU/ml
<i>Aspergillus niger</i>	3×10^6
<i>Aspergillus oryzae</i>	2.1×10^7

Từ kết quả ở bảng 3.2, số tế bào nấm mốc *A.oryzae* là 2.1×10^7 cfu/ml. Chúng tôi duy trì điều kiện tăng sinh này để đạt được mật độ tế bào ổn định cho quá trình thủy phân. Mật độ *A.niger* là 3×10^6 cfu/ml. Theo Y.D.Hang và cộng sự (1998) cũng đã xác định mật độ tế bào *A.niger* phù hợp lên men axit xitric từ lõi ngô là 2×10^6 cfu/ml.

3.2.3. Đánh giá khả năng sinh enzym xenlulaza của nấm mốc *Aspergillus oryzae*

Sau khi nuôi tăng sinh nấm mốc *A.oryzae*, dịch thu được đem lọc và ty tâm 6000 vòng, 5 phút ở 4°C. Dịch enzym ngoại bào thu được nhỏ vào các giếng thạch có đường kính 5mm và ủ qua đêm ở 30°C. Kết quả thí nghiệm thể hiện ở hình 3.1:



Hình 3.1. Vòng thủy phân enzym xenlulaza của nấm mốc *Aspergillus oryzae*

Qua hình 3.1, chúng ta có thể thấy các vòng trắng chính là vùng đã được enzym xenlulaza thủy phân nên không bắt màu với dung dịch lugol. Đo đường kính trung bình của vòng thủy phân xenluloza như sau: $\Delta d = D - d = 21.7 - 5 = 16.7$ (mm)

3.3. Nghiên cứu lựa chọn phương pháp thủy phân và lên men axit xitric từ bã đậu nành

Thủy phân bã đậu nành bằng nấm mốc *A.oryzae* với hệ enzym phong phú, là tác nhân thích hợp chuyển đổi các hợp chất phức tạp thành chất đơn giản cho quá trình lên men. Trong thí nghiệm này chúng tôi nghiên cứu trên ba qui trình sau:

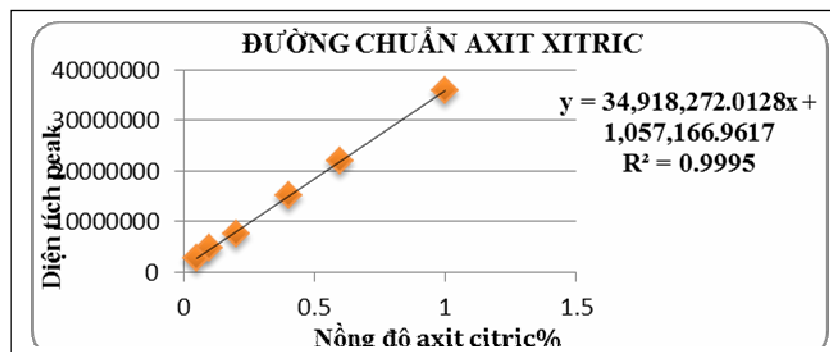
Qui trình 1: Bổ sung nấm mốc *A.oryzae* sau đó tiến hành thanh trùng canh trường trước khi lên men axit xitric.

Qui trình 2: Tiến hành tương tự qui trình 1 nhưng không có giai đoạn thanh trùng.

Qui trình 3: Bổ sung đồng thời ngay từ ban đầu hai chủng nấm mốc *A.oryzae* và *A.niger*.

Trong đó giai đoạn lên men chúng tôi cố định những điều kiện như sau:

Bố trí thí nghiệm ở nhiệt độ $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ và $\text{pH} = 3.4 - 4$. Bã đậu nành khô được bổ sung nước đến độ ẩm khoảng 80%. Tỷ lệ nấm mốc *A.niger* bổ sung vào quá trình lên men xitric là 5% (v/w) và thời gian lên men là 5 ngày. Quá trình thủy phân và lên men tiến hành trong máy lắc với tốc độ 120 vòng/phút. Ngoài ra, môi trường lên men cần bổ sung thêm 3% metanol, 3ml $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1% tạo điều kiện tổng hợp axit xitric. Dịch thu được sau lên men tiến hành phân tích lượng axit xitric tạo thành bằng máy HPLC với đường chuẩn axit xitric như sau:

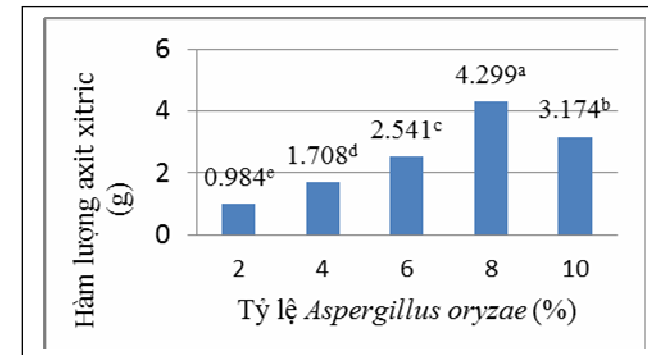


Hình 3.2. Đồ thị đường chuẩn axit xitric

Khảo sát thí nghiệm ảnh hưởng của nấm mốc *A.oryzae* với các tỷ lệ bổ sung 2%, 4%, 6%, 8% và 10% đến quá trình thủy phân – lên men axit xitric từ bã đậu nành.

3.3.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống *A.oryzae* bổ sung vào quá trình thủy phân theo qui trình 1 đến quá trình lên men axit xitric.

Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở hình 3.3 như sau:



Hình 3.3. Ảnh hưởng của tỷ lệ *Asp.oryzae* đến lượng axit xitric tạo thành theo qui trình 1

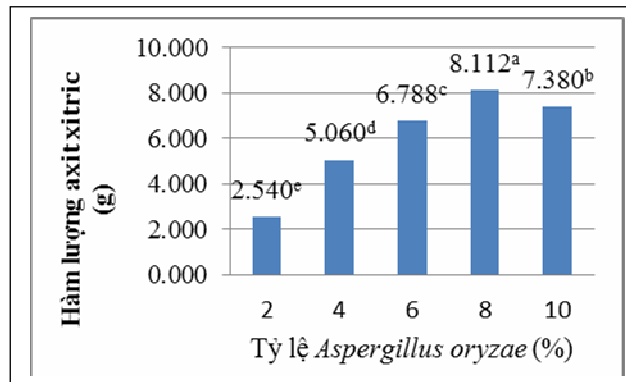
Kết quả xử lý thống kê theo anova 1 yếu tố cho thấy rằng các giá trị có chữ cái ở mũ giống nhau là không có sự sai khác ở mức ý nghĩa $\alpha = 0.05$.

Khi tỷ lệ *A.oryzae* bổ sung vào quá trình thủy phân càng tăng thì lượng axit xitric tạo ra càng nhiều. Tuy nhiên, tỷ lệ *A.oryzae* bổ sung lớn hơn 8%, cụ thể ở tỷ lệ 10% thì hàm lượng axit xitric không tăng mà lại giảm. Ở tỷ lệ *A.oryzae* thấp nhất là 2% thì lượng axit xitric là 0.984 ± 0.027 g/100g. Còn nghiệm thức bổ sung tỷ lệ *A.oryzae* 8% thì lượng axit xitric thu được là cao nhất 4.299 g/100g.

Khi tăng tỷ lệ *A.oryzae* lên 10% thì lượng axit không tiếp tục tăng mà lại giảm và đạt 3.174 ± 0.001 g/100g. Giai đoạn thanh trùng đã vô hoạt hệ enzym ngoại bào mà nấm mốc *A.oryzae* tiết ra, nên hiệu quả lên men xitric không cao.

3.3.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống *A.oryzae* bổ sung vào quá trình thủy phân theo qui trình 2 đến quá trình lên men axit xitric.

Trong qui trình 2, ở một giai đoạn nhất định có sự xảy ra đồng thời quá trình thủy phân và lên men. Kết quả thể hiện ở hình 3.4 như sau:



Hình 3.4. Ảnh hưởng của tỷ lệ *A.oryzae* đến lượng axit xitric tạo thành theo qui trình 2

Kết quả xử lý thống kê anova 1 yếu tố cho thấy các giá trị có chữ cái ở mũ giống nhau là không có sự sai khác ở mức ý nghĩa $\alpha = 0.05$.

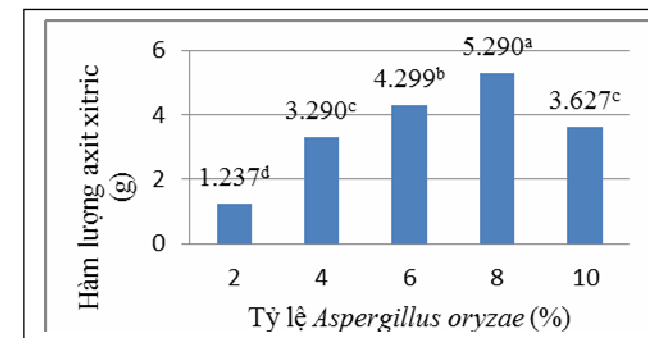
Ở thí nghiệm bổ sung *A.oryzae* thấp nhất là 2% chúng tôi xác định được lượng axit xitric tạo thành là 2.54 g/100g. Nghiệm thức cho hàm lượng axit xitric cao nhất khi bổ sung *A.oryzae* với tỷ lệ 8%

thì thu được axit xitric là 8.112 g/100g. Qua kết quả nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy hàm lượng axit xitric tăng dần từ 2.54 ÷ 8.112 g khi tăng tỷ lệ bổ sung *A.oryzae* từ 2 ÷ 8%. Trái lại, khi tăng tỷ lệ *A.oryzae* lên 10% thì hàm lượng axit xitric lại giảm và đạt 7.380 ± 0.043 g/100g.

Sau khi thủy phân, môi trường được tăng giá trị dinh dưỡng và tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình lên men axit xitric. Nấm mốc *A.oryzae* vẫn có khả năng lên men sinh axit xitric với hiệu quả lên men không cao bằng nấm mốc *A.niger*. Vì vậy, qui trình 2 là quá trình tích lũy axit xitric từ 2 chủng nấm mốc và là quá trình thủy phân – lên men đồng thời nên sản lượng axit xitric tăng cao rõ rệt.

3.3.3. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống *A.oryzae* bổ sung vào quá trình thủy phân theo qui trình 3 đến quá trình lên men axit xitric.

Kết quả thí nghiệm thể hiện ở hình 3.5 như sau:



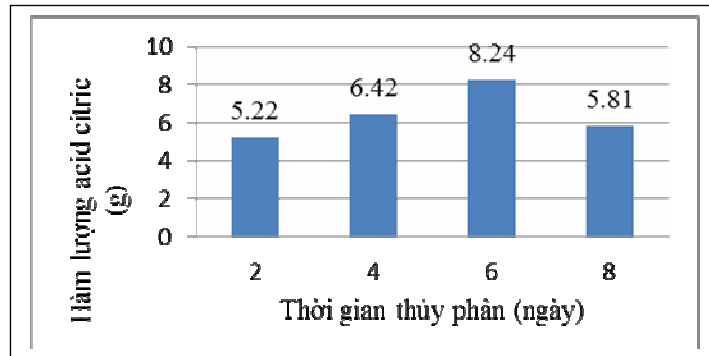
Hình 3.5. Ảnh hưởng của tỷ lệ *Asp.oryzae* đến lượng axit xitric tạo thành theo qui trình 3

Tiến hành xử lý thống kê anova 1 yếu tố, các giá trị có chữ cái ở mũ giống nhau là không có sự sai khác ở mức ý nghĩa $\alpha = 0.05$.

Kết quả thu được ở nghiệm thức bổ sung *A.oryzae* 2% lượng axit xitric tạo thành là 1.237 ± 0.002 g/100g. Ở tỷ lệ bổ sung *A.oryzae* 8% thì lượng axit xitric tạo thành cao nhất là 5.290 ± 0.369 g/100g. Cùng với xu hướng như qui trình 1 và 2, ở qui trình 3 khi tăng tỷ lệ *A.oryzae* thì hiệu quả của quá trình lên men cũng tăng. Nhưng khi tỷ lệ này tăng hơn 8%, cụ thể ở nghiệm thức bổ sung 10% *A.oryzae* hàm lượng axit xitric giảm và đạt 3.627 ± 0.178 g/100g.

3.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến quá trình lên men axit xitric

Khảo sát thời gian thủy phân bởi nấm mốc *A.oryzae* với các mức 2, 4, 6 và 8 ngày theo qui trình 2.



Hình 3.6. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến quá trình lên men

Khi kéo dài thời gian thủy phân từ 2 ÷ 6 ngày thì hàm lượng axit xitric tăng từ 5.22 ÷ 8.24 g. Nhưng ở nghiệm thức cuối cùng khi tăng thời gian thủy phân lên 8 ngày thì hàm lượng axit xitric giảm còn 5.81g. Do giá trị dinh dưỡng quá trình này tạo ra đã được sử dụng quá nhiều cho việc tăng sinh khối *A.oryzae*, một lượng tế bào

sinh ra cũng đồng nghĩa với việc sẽ có một lượng tế bào già hóa và chết, khiến cho môi trường sẽ cạn kiệt dinh dưỡng dần. Quá trình lên men kết thúc nhanh, hiệu quả lên men không cao.

3.5. Nghiên cứu ảnh hưởng đồng thời của 2 yếu tố tỷ lệ giống và thời gian bằng phương pháp qui hoạch thực nghiệm

Qui hoạch thực nghiệm trực giao cấp I TYT 2^2 với hai yếu tố ảnh hưởng: z_1 là tỷ lệ *A.oryzae* (%), z_2 là thời gian thủy phân (ngày). Phương trình hồi qui có dạng:

$$\hat{Y} = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2$$

Trong đó:

X_1 : Biến số mã hóa của biến thực z_1

X_2 : Biến số mã hóa của biến thực z_2

Y: Hàm mục tiêu

b_0, b_1, b_2, b_{12} : Các hệ số của phương trình hồi qui

Từ kết quả bố trí thí nghiệm chúng tôi thu được dữ liệu thể hiện ở bảng 3.3:

Bảng 3.3. Mã hóa các điều kiện thí nghiệm

Các yếu tố theo tỷ lệ xích tự nhiên			Các yếu tố trong hệ mã hóa			
Số thứ tự thí nghiệm	z ₁	z ₂	x ₁	x ₂	x ₁ x ₂	y
1	6	4	+	+	+	6.38
2	10	4	-	+	-	6.30
3	6	8	+	-	-	5.81
4	10	4	-	-	+	5.58
TT1	8	6	0	0	0	8.22
TT2	8	6	0	0	0	8.25
TT3	8	6	0	0	0	8.22

3.5.1. Xác định các hệ số hồi qui

Hệ số b trong phương trình hồi qui được tính như sau:

$$\begin{aligned} b_0 &= 6.02 & b_2 &= 0.32 \\ b_1 &= 0.08 & b_{12} &= -0.04 \end{aligned}$$

Vậy phương trình hồi qui có dạng:

$$\hat{Y} = 6.02 + 0.08X_1 + 0.32X_2 - 0.04X_1X_2$$

3.5.2. Kiểm tra mức ý nghĩa của các hệ số hồi qui

Tính t (thực nghiệm): $t_j = \frac{|b_j|}{S_{bj}}$

$$\text{Với } S_{bj} = \frac{S_{th}}{\sqrt{N}} \quad S_{th}^2 = \frac{\sum_{i=1}^m (Y_i^0 - \bar{Y}^0)^2}{m-1}$$

Để tính phương sai tái hiện ta làm thêm 3 thí nghiệm tại tâm (TT1, TT2, TT3). $S_{th} = 0.017$

$$S_{bj}^2 = \frac{S_{th}^2}{N} = \frac{0,0003}{4} = 7.5 \times 10^{-5}$$

$$S_{bj} = \sqrt{S_{bj}^2} = \sqrt{7.5 \times 10^{-5}} = 0.009$$

Các giá trị của t_j:

$$\begin{aligned} t_0 &= 694.84 & t_2 &= 37.24 \\ t_1 &= 8.95 & t_{12} &= 4.33 \end{aligned}$$

Tra bảng phân bố Student ta có: t_{α%,df} = 4.3 (Trong đó α = 0.05, df = m - 1 = 2)

Do các giá trị t₀; t₁; t₂; t₁₂ > t_{5%,1}. Vì vậy, các hệ số b₀; b₁; b₂; b₁₂ có ý nghĩa thống kê ở mức α = 5%

Vậy phương trình hồi qui là:

$$Y = 6.02 + 0.08X_1 + 0.32X_2 - 0.04X_1X_2 \quad (1)$$

3.5.3. Kiểm định sự tương thích của phương trình hồi qui với thực nghiệm

Sử dụng phân phối Fisher (F) để kiểm chứng như sau:

$$F_m = \frac{S_{du}^2}{S_{th}^2} \quad S_{du}^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y})^2}{N - k}$$

$$S_{du}^2 = 2.5 \times 10^{-5}. \text{ Và } F_m = 0.0833$$

Tra bảng phân bố Fisher ta có: F_b(α, f₁, f₂) = F(5%; 2; 2) = 19,2

Do F_m < F(5%; 2; 2)

Vậy phương trình hồi qui (1) phù hợp với thực nghiệm.

3.5.4. Tối ưu hóa các yếu tố để thu được hàm lượng axit xitric cao nhất

Khảo sát các hàm mục tiêu bằng phương pháp leo dốc (phương pháp Box-Wilson).

Bảng 3.4. Kết quả tính bước chuyển động δ_j của các yếu tố

Các chỉ tiêu	Z_1 (%)	Z_2 (ngày)
Mức cơ sở	8	6
Khoảng biến thiên (Δ_j)	2	2
Hệ số b_j	0.08	0.32
$b_j \Delta_j$	0.16	0.64
$ b_j \Delta_j $	0.16	0.64
Bước chuyển động (δ_j)	0.08	0.32
Làm tròn bước chuyển động (δ_j)	0.1	0.3

Thực hiện thí nghiệm leo dốc và thu được kết quả ở bảng 3.5

Bảng 3.5: Kết quả thí nghiệm theo hướng leo dốc

Thí nghiệm	Các yếu tố ảnh hưởng		Hàm mục tiêu
	Z_1 (%)	Z_2 (ngày)	Y_2
1 (TN tại tâm)	8	6	8.22
2	8.1	6.3	8.33
3	8.2	6.6	8.20
4	8.3	6.9	8.11

3.6. Đề xuất qui trình công nghệ thủy phân - lên men axit xitric ở qui mô phòng thí nghiệm

3.6.1. Qui trình công nghệ lên men axit xitric

3.6.2. Thuyết minh qui trình

3.6.2.1. Bã đậu nành

3.6.2.2. Phơi – Sấy khô

3.6.2.3. Thanh trùng

3.6.2.4. Thủy phân

3.6.2.5. Lên men

3.6.2.6. Tách bã

3.6.2.7. Lọc dịch sau lên men

3.6.2.8. Định lượng axit xitric

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. KẾT LUẬN

Dựa vào kết quả nghiên cứu chúng tôi rút ra một số kết luận như sau:

1. Đã xác định được một số tính chất và thành phần hóa học của bã đậu nành (g/100g) đã sấy khô ở công ty Vinasoy – Quảng Ngãi như sau:

Độ ẩm	: 10.12%	Xenluloza	: 79.37
pH	: 5.97	Đường tổng số	: 3.82
Protêin	: 6.46	Photpho	: 0.092
Đường khử	: 0.12		

2. Quá trình nhân giống đã chọn được môi trường nuôi cấy thích hợp. Đã khảo sát được khả năng sinh enzym xenlulaza của nấm mốc *A.oryzae*.

3. Kết quả nghiên cứu yếu tố đơn biến tỷ lệ *A.oryzae* ảnh hưởng đến quá trình thủy phân và lên men đồng thời theo qui trình 2 đã cho thấy khi bổ sung tỷ lệ *Asp.oryzae* 8% thu được lượng axit xitric cao nhất là 8.112g/100g bã.

4. Ngoài yếu tố tỷ lệ giống ảnh hưởng đến quá trình thủy phân thì thời gian cũng quyết định hiệu quả của quá trình này. Sau khi khảo sát thời gian thủy phân, chúng tôi nhận thấy với thời gian 6 ngày, hiệu quả quá trình lên men axit xitric cao nhất là 8.24g/100g bã.

5. Nghiên cứu ảnh hưởng đồng thời 2 yếu tố đến quá trình thủy phân đó là tỷ lệ *A.oryzae* và thời gian thủy phân bằng phương pháp qui hoạch thực nghiệm, TYT² thu được phương trình hồi qui như sau:

$$Y = 6.02 + 0.08X_1 + 0.32X_2 - 0.04X_1X_2$$

6. Khi thực hiện tối ưu hóa bằng phương pháp leo dốc, kết quả thu được hàm lượng axit xitric cao nhất là 8.33g/100g với điều kiện tỷ lệ giống *A.oryzae* là 8.1% và thời gian thủy phân là 6.3 ngày.

7. Đã đề xuất qui trình công nghệ thủy phân - lên men axit xitric từ bã đậu nành sử dụng nấm mốc *A.oryzae* thủy phân cơ chất và *A.niger* để lên men axit xitric.

Qua kết quả nghiên cứu cho thấy việc lên men xitric từ bã đậu nành càng tăng hiệu quả khi thực hiện giai đoạn thủy phân ban đầu bằng *A.oryzae*. Bên cạnh đó việc tận thu nguồn nguyên liệu này sẽ làm giảm thiểu các vấn đề xử lý chất thải trong công nghiệp thực phẩm và đồng thời sản xuất axit hữu cơ có tầm quan trọng, có giá trị cho ngành công nghiệp thực phẩm cũng như các ngành công nghiệp khác.

2. KIẾN NGHỊ

Sau khi thực hiện đề tài này, chúng tôi có một số kiến nghị như sau để đề tài được hoàn thiện chặt chẽ hơn và có hướng phát triển tiếp theo:

- Cần tiếp tục nghiên cứu quá trình thủy phân – lên men axit xitric từ bã đậu nành đặc biệt các yếu tố ảnh hưởng như nồng độ oxy, kim loại (Fe, Mn, Zn...).

- Đánh giá hiệu quả quá trình thủy phân thông qua các sản phẩm tạo thành.

- Sử dụng HPLC để phân tích một số axit hữu cơ quan trọng khác có trong dịch sau lên men.

- Từ dịch axit xitric thô tạo thành tiếp tục cô đặc và tinh thể hóa dịch lỏng.