

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG

PHẠM THỊ THÙY TRANG

NGHIÊN CỨU QUÁ TRÌNH LÊN MEN
AXIT GLUCONIC TỪ RỈ ĐƯỜNG
BẰNG *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. Đặng Minh Nhật

Phản biện 1: GS. TS. Đào Hùng Cường

Phản biện 2: PGS. TS. Lê Thị Liên Thanh

Luận văn được bảo vệ trước 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 gluconic là một axit hữu cơ yếu, được phát hiện lần đầu tiên vào năm 1870 bởi Hasiwetz và Habermann. Axit gluconic và các muối gluconat có trong tự nhiên khá phổ biến do nó được hình thành từ quá trình oxy hóa glucose. Vào thế kỷ thứ 18, axit này ít được biết đến, tuy nhiên ngày nay axit gluconic đang được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như công nghệ hóa học, thực phẩm, dược phẩm, dệt, luyện kim, thuộc da, vật liệu xây dựng và nhiều ngành công nghiệp khác. Hằng năm trên thế giới sản xuất khoảng 50.000-100.000 tấn axit gluconic và tổng tất cả các loại muối gluconat khoảng 65.000-100.000 tấn, trong đó gồm các loại muối như natri gluconat, kali gluconat, canxi gluconat hay este glucono- δ -lacton cũng là những phụ gia thực phẩm được chứng nhận an toàn khi sử dụng ở Mỹ và Châu Âu (theo Cục Quản Lý Thực Phẩm và Dược Phẩm Hoa Kỳ), được sử dụng làm chất điều vị, phụ gia trong sản xuất bánh nướng, sữa đậu nành, sữa chua, phomat, bánh mì.

Sản xuất axit gluconic bằng con đường vi sinh đã được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi trong nhiều thập kỷ qua, trong đó quá trình lên men bằng *Aspergillus niger* (*A. niger*) được nghiên cứu sử dụng nhiều nhất. *A. niger* rất phổ biến trong tự nhiên có thể tìm thấy trên lá khô, thảm thực vật mục nát, đất, cây trồng. *A. niger* có tốc độ sinh trưởng phát triển nhanh, dễ dàng phân lập ở các điều kiện thông thường, trong phòng thí nghiệm. Do khả năng sinh tổng hợp enzyme cao nên *A. niger* được dùng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm để thu nhận các chế phẩm enzyme như amylase, protease, pectinase, glucose oxydase,... và các axit hữu cơ như axit xitric, axit gluconic, axit fumaric,....

Trên thế giới, nghiên cứu sản xuất axit gluconic ngày càng được quan tâm mạnh mẽ, glucose được sử dụng là nguồn cacbon cho hầu hết các loài vi sinh vật sản xuất axit gluconic, tuy nhiên để tạo ra sản phẩm thương mại vừa đảm bảo chất lượng vừa đảm bảo hiệu quả kinh tế cao thì nguyên liệu đóng vai trò đặc biệt quan trọng, một trong những nguồn nguyên liệu đáp ứng các yếu tố trên chính là rỉ đường, với ưu điểm chứa 48-56% đường tổng số, đó là nguồn cacbon rẻ tiền, rỉ đường hiện nay là sự lựa chọn hàng đầu của các nhà nghiên cứu sản xuất axit gluconic.

Theo báo cáo của Hiệp hội mía đường Việt Nam cả nước có khoảng 40 nhà máy sản xuất đường, với tổng công suất 105.750 tấn mía/ngày, bình quân đạt khoảng 2.500 tấn mía/ngày/nhà máy, lượng rỉ đường tạo ra chiếm 3-5% trọng lượng ép, vì vậy tổng khối lượng rỉ đường của cả nước rất lớn, khoảng 3-5 tấn/ngày. Rỉ đường mía còn được dùng làm nguyên liệu trong công nghiệp lên men để sản xuất rượu, cồn, dung môi axeton, sinh khối nấm men, axit xitric, axit lactic và glyxerin,... một phần được dùng làm thức ăn gia súc.

Hiện nay, ở Việt Nam chưa có cơ sở nào sản xuất axit gluconic, tất cả axit gluconic hiện có đều phải nhập từ nước ngoài với giá thành cao. Vì vậy, việc sử dụng axit này trong các ngành công nghiệp ở nước ta sẽ gặp khó khăn về mặt giá thành cũng như chúng ta sẽ không chủ động được nguồn cung cấp.

Xuất phát từ những vấn đề trên, chúng tôi thực hiện đề tài "**Nghiên cứu quá trình lên men axit gluconic từ rỉ đường bằng *Aspergillus niger***", nhằm khảo sát các điều kiện lên men thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp axit gluconic.

Đề tài này có thể mở ra thêm một hướng triển vọng cho việc thu nhận axit gluconic từ phụ phẩm của quá trình sản xuất, nó không

chỉ có ý nghĩa về kinh tế mà còn mở ra khả năng giải quyết các vấn đề về chất lượng sản phẩm, các vấn đề về giải pháp kỹ thuật một cách hiệu quả

2. MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

- Xác định các thông số công nghệ tốt nhất như: tỉ lệ giống, thời gian lên men, hàm lượng nitơ bổ sung trong quá trình lên men.

- Đề xuất quy trình kỹ thuật lên men axit gluconic từ rỉ đường bằng chủng nấm mốc *A. niger*.

3. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHẠM VI NGHIÊN CỨU

- Sử dụng rỉ đường được thu nhận ở công ty Đường Kon Tum tại Km 2, xã Vinh Quang, Thành phố Kon Tum, tỉnh Kon Tum.

- Chủng nấm mốc *A. niger* tại phòng thí nghiệm khoa Hóa, trường Đại học Bách Khoa, Đại học Đà Nẵng.

- Nghiên cứu lên men axit gluconic từ rỉ đường bằng chủng nấm mốc *A. niger* ở qui mô phòng thí nghiệm (PTN).

4. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

- Phương pháp vật lý:

Xác định nồng độ chất khô bằng Bx kế

- Phương pháp hóa học:

Xác định hàm lượng đường khử bằng phương pháp Bectran

Xác định hàm lượng nitơ tổng bằng phương pháp kjehldal.

- Phương pháp hóa lý:

Xác định pH rỉ đường và pH của môi trường nuôi cấy trước và sau lên men

Xác định axit gluconic bằng máy sắc ký lỏng hiệu năng

- Phương pháp vi sinh:

Phương pháp hoạt hóa giống

Phương pháp lên men chìm.

- Phương pháp toán học:

Sử dụng quy hoạch thực nghiệm toàn phần 3 yếu tố để khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố thành phần đến hàm lượng axit gluconic.

Sử dụng phương pháp leo dốc để tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng.

5. Ý NGHĨA KHOA HỌC CỦA ĐỀ TÀI

- Xác định một số thành phần hóa học trong rỉ đường và hàm lượng axit gluconic bằng các phương pháp (PP) phân tích hiện đại.

- Xác định điều kiện lên men tốt nhất thu được hàm lượng axit gluconic cao nhất.

- Xây dựng được quy trình lên men gluconic từ rỉ đường ở quy mô PTN.

6. Ý NGHĨA THỰC TIỄN CỦA ĐỀ TÀI

- Nghiên cứu này đã giúp sử dụng phế phẩm của quá trình sản xuất đường tạo ra nguồn nguyên liệu chính sản xuất axit gluconic, mang lại lợi ích kinh tế cho các nhà sản xuất đường.

- Giảm lượng axit gluconic ngoại nhập, chủ động sản xuất.

- Mở rộng ứng dụng công nghệ sinh học trong công nghệ thực phẩm và một số lĩnh vực khác.

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. AXIT GLUCONIC

1.1.1. Giới thiệu về axit gluconic

Axit gluconic là một axit hữu cơ yếu, có tính sát khuẩn, không bay hơi, không độc, không có tính ăn mòn, có nguồn gốc từ β -D-glucose tạo thành bởi một phản ứng oxy hóa dưới xúc tác của enzym glucose oxidase. Axit gluconic có mặt tự nhiên trong các loại quả, mật ong, trà kombucha (nấm hồng trà) và rượu vang.

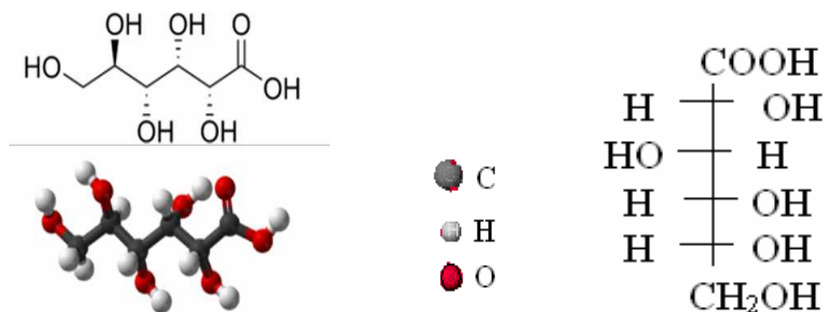
Trong công nghiệp thực phẩm axit gluconic được sử dụng như một chất điều vị, nó có khả năng tạo ra hương vị chua dịu nhẹ và được sử dụng như một phụ gia điều chỉnh vị chua (E574) dùng cho các sản phẩm như rượu vang, nước ép trái cây, sữa chua,....

Tên khoa học:

(2R,3S,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexanoic axit

1.1.2. Cấu tạo của axit gluconic

Axit gluconic là một hợp chất hữu cơ có công thức phân tử là $C_6H_{12}O_7$, công thức cấu tạo là:



Hình 1.1. Cấu tạo phân tử axit gluconic

Axit gluconic có cấu trúc hoá học bao gồm một chuỗi sáu cacbon với năm nhóm hydroxyl và kết thúc bằng một nhóm chức cacboxyl (-COOH). Trong dung dịch nước nồng độ 1/1000 axit cacboxylic ở pH gần trung tính, axit cacboxylic này tạo ra các ion gluconat và các muối của axit gluconic gọi chung là các gluconat. Khi hòa tan trong nước axit nhanh chóng chuyển sang trạng thái cân bằng động với vòng glucono- δ -lacton, làm cho dung dịch trở thành hỗn hợp của axit với glucono- δ -lacton.

1.1.3. Tính chất của axit gluconic và muối gluconat

1.1.4. Lịch sử phát triển axit gluconic

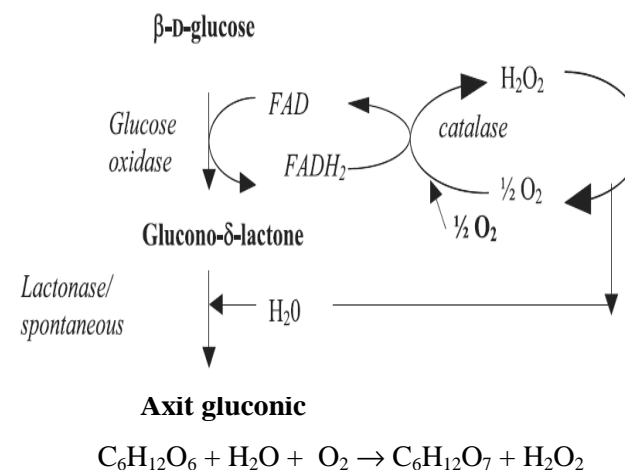
1.1.5. Ứng dụng của axit gluconic và muối gluconat

1.1.6. Sản xuất axit gluconic và muối gluconat

1.1.6.1. Sản xuất axit gluconic từ enzyme glucose oxidase

1.1.6.2. Sản xuất axit gluconic từ vi khuẩn

1.1.6.3. Sản xuất axit gluconic từ *A. niger* và *Penicillium luteum*



Hình 1.2. Sơ đồ chuyển hóa glucose thành axit gluconic bởi *A. niger*

1.2. CƠ SỞ QUÁ TRÌNH LÊN MEN AXIT GLUCONIC

1.2.1. Giới thiệu về *Aspergillus niger*

1.2.2. Các phương pháp lên men

1.2.2.1. Phương pháp lên men bề mặt

1.2.2.2. Phương pháp lên men bề sâu

1.2.3. Sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật trong điều kiện nuôi cấy tĩnh

1.2.3.1. Pha mở đầu (pha tiềm phát)

1.2.3.2. Pha logarit (pha lũy tiến)

1.2.3.3. Pha ổn định (pha cân bằng)

1.2.3.4. Pha tử vong

1.2.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men axit gluconic

1.2.4.1. Ảnh hưởng của cacbon

1.2.4.2. Ảnh hưởng của nitơ

1.2.4.3. Ảnh hưởng của thời gian

1.2.4.4. Ảnh hưởng của oxy

1.2.4.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ

1.2.4.6. Ảnh hưởng của PH

1.2.4.7. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống

1.3. NGUYÊN LIỆU RỈ ĐƯỜNG

1.3.1. Giới thiệu nguyên liệu rỉ đường

1.3.2. Mục đích của xử lý rỉ đường trước khi lên men

1.4. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU AXIT GLUCONIC Ở VIỆT NAM VÀ TRÊN THẾ GIỚI

1.4.1. Các công trình nghiên cứu trong nước

1.4.2. Các công trình nghiên cứu nước ngoài

CHƯƠNG 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Rỉ đường

Rỉ đường lấy từ công ty Đường Kon Tum và được xử lý trong phòng thí nghiệm trước khi lên men. Rỉ đường được pha loãng với tỷ lệ rỉ đường:nước là 2:1 kg/kg, tiến hành xử lý nhiệt ở 85-90°C trong thời gian 45-60 phút, ở điều kiện này hầu hết các tạp khuẩn đều bị tiêu diệt. Sau khi xử lý nhiệt tiến hành ly tâm nguyên liệu ở 8°C, tốc độ 5500 vòng/phút, thời gian 30 phút, tách các chất không hòa tan và các chất keo ra khỏi rỉ đường. Kết thúc quá trình xử lý rỉ đường được bảo quản ở 4°C.

2.1.2. Chủng vi sinh vật

Chủng nấm mốc *A. niger* được nuôi cấy và giữ giống tại PTN khoa Hóa, trường Đại học Bách Khoa, Đại học Đà Nẵng.

2.2. HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ

2.2.1. Hóa chất

2.2.2. Thiết bị

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3.1. Phương pháp vật lý

2.3.2. Phương pháp hóa lý

2.3.3. Phương pháp hóa học

2.3.4. Phương pháp vi sinh

2.3.5. Phương pháp toán học

CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. KHẢO SÁT THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA RỈ ĐƯỜNG

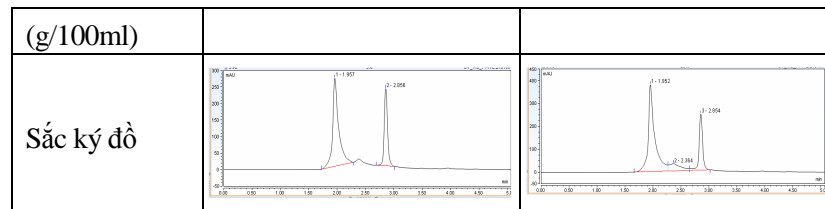
Bảng 3.1. Kết quả khảo sát thành phần hóa học của rỉ đường

Thành phần	Giá trị
Bx	84.41
pH	5.40
Protein	3.64 (% chất khô)
Đường khử	22.70 (% khối lượng)
Đường tổng	54.50 (% khối lượng)
Đường saccharose	30.21 (% khối lượng)

3.2. NGHIÊN CỨU LỰA CHỌN PHƯƠNG PHÁP LÊN MEN AXIT GLUCONIC

Bảng 3.2. Kết quả nghiên cứu lựa chọn phương pháp lên men axit gluconic

Thông số	Phương pháp cố định nấm mốc <i>A. niger</i>	Phương pháp không cố định nấm mốc <i>A. niger</i>
Chuẩn bị lên men	Xử lý xơ dừa, cố định nấm mốc 20 giờ trong điều kiện tĩnh	Hoạt hóa nấm mốc trên máy lắc 20 giờ
Xử lý sau lên men	Lọc ép chân không	Lọc tách bã
V _{dịch lên men} (ml/100ml)	50 ml	75 ml
Chiều cao peak (mAU)	266.95	380.26
Axit gluconic	2.53	3.59



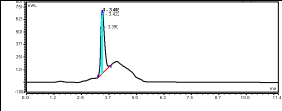
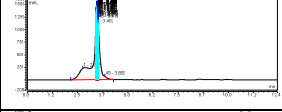
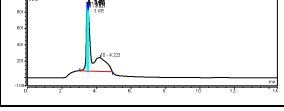
Như vậy, trong điều kiện cố định nấm mốc lên men axit gluconic trên máy lắc, do sự cản trở của chất mang oxy khó hòa tan, quá trình lên men diễn ra chậm, thời gian lên men kéo dài tạo sản phẩm phụ. Lên men trong môi trường lỏng trên máy lắc tạo điều kiện cho oxy tiếp xúc cơ chất, quá trình lên men diễn ra trong toàn bộ khối dịch lên men, thời gian lên men ngắn, hiệu suất lên men cao. Từ kết quả trên, chúng tôi lựa chọn phương pháp lên men trong môi trường lỏng trên máy lắc làm phương pháp nghiên cứu của mình.

3.3. NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG AXIT GLUCONIC BẰNG MÁY HPLC

3.3.1. Nghiên cứu xây dựng đường chuẩn HPLC cho axit gluconic

3.3.1.1. Nghiên cứu tỷ lệ pha động khi cố định pH mẫu phân tích 7.0

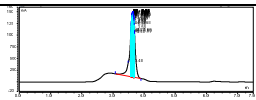
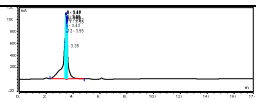
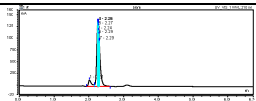
Bảng 3.3. Nghiên cứu tỷ lệ pha động khi cố định pH mẫu phân tích 7.0

Tên quy trình	Tỷ lệ pha động	pH mẫu phân tích	Đồ thị định tính
1	Acetonitrile:nước 3:7 (v/v)	pH = 7.0.	
2	Acetonitrile:nước 7:3 (v/v)	pH = 7.0.	
3	Acetonitrile 100%	pH = 7.0.	

Dựa vào kết quả phân tích cho thấy sắc ký đồ có hình dạng phức tạp. Khi sử dụng NaOH tinh khiết để điều chỉnh pH mẫu phân tích 7.0, lúc này mẫu phân tích tồn tại 3 hợp chất (axit gluconic, glucono- δ -lacton, muối gluconat), do đó trong dung dịch tồn tại hồ biến giữa 2 dạng đồng phân này. Thay đổi tỷ lệ pha động chỉ làm thay đổi sự chuyển hóa giữa các chất, chất nào tồn tại nhiều nhất cho hình dạng peak cao nhất. Kết quả sắc ký đồ tồn tại nhiều peak phức tạp.

3.3.1.2. Nghiên cứu tỷ lệ pha động khi cố định pH mẫu phân tích 2.5

Bảng 3.4. Nghiên cứu tỷ lệ pha động khi cố định pH mẫu phân tích 2.5

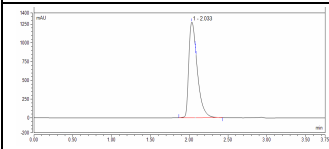
Tên quy trình	Tỷ lệ pha động	pH mẫu phân tích	Đồ thị định tính
1	Acetonitrile:nước 3:7 (v/v)	pH = 2.5	
2	Acetonitrile:nước 7:3 (v/v)	pH = 2.5	
3	Acetonitrile 100%	pH = 2.5	

Khi cố định pH mẫu phân tích 2.5 về mặt lý thuyết axit gluconic tồn tại ở dạng mạch thẳng. Tuy nhiên, do pha động có pH trung tính, hiệu quả pha loãng pha động ảnh hưởng lớn đến pH của mẫu khi đi qua cột làm tái xác lập cân bằng giữa 2 dạng đồng phân. Axit gluconic nhanh chóng chuyển sang trạng thái cân bằng với vòng glucono- δ -lacton. Khi thay đổi tỷ lệ pha động chỉ làm thay đổi tỷ lệ giữa axit gluconic và glucono- δ -lacton. Khi mẫu qua cột trên sắc ký đồ xuất hiện 2 peak tương đối rõ.

3.3.1.3. Nghiên cứu pH pha động khi cố định pH mẫu phân tích 2.5

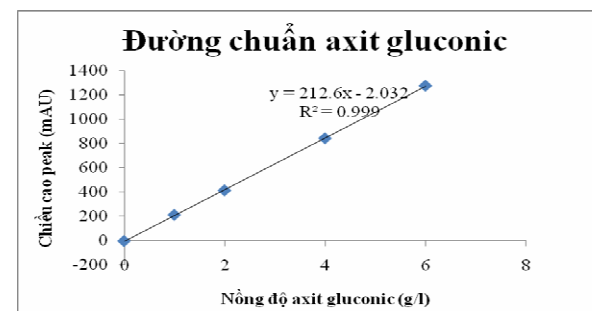
Chúng tôi tiến hành điều chỉnh pH pha động 2.5, bằng cách bổ sung H_3PO_4 vào nước của pha động tỷ lệ axit H_3PO_4 :nước (1:1000 v/v), tỷ lệ pha động acetonitrile:nước (3:7 v/v). Trong điều kiện này chỉ xuất hiện 1 peak duy nhất. Như vậy, trong môi trường H^+ glucono- δ -lacton mở vòng chuyển hóa về axit gluconic, lúc này dung dịch đi qua cột là axit gluconic đồng nhất, trên sắc ký đồ cho duy nhất 1 peak. Kết quả nghiên cứu thể hiện bảng 3.5.

Bảng 3.5. Nghiên cứu pH pha động khi cố định pH mẫu phân tích 2.5

Đồ thị định tính	Cơ chế chuyển hóa glucono- δ -lacton thành axit gluconic
	<chem>O=C1OC(O)C(O)C(O)C1O.O>>OC(O)C(O)C(O)C(O)C(=O)O</chem> D-glucono-1,5-lactone + H ₂ O → Gluconic axit

Như vậy, chúng tôi xây dựng được quy trình phân tích axit gluconic như sau pha tĩnh là cột C18, tốc độ dòng 0.5 ml/phút, bước sóng 210 nm, tỷ lệ pha động: acetonitrile:nước (3:7 v/v), pH_{nước} = 2.5.

3.3.1.4. Xây dựng đường chuẩn axit gluconic



Hình 3.1. Đường chuẩn axit gluconic

Phương trình đường chuẩn axit gluconic: $y = 212,6.x - 2,032$ (3.1)

Trong đó: y: Chiều cao peak (mAU)

x: Nồng độ axit gluconic (g/l)

3.3.2. Nghiên cứu xử lý dịch lên men và thu nhận axit gluconic

3.3.2.1. Nghiên cứu xử lý dịch lên men định lượng axit gluconic

Dịch sau lên men gồm axit gluconic tự do, canxi gluconat, nấm mốc, khoáng dư, các sản phẩm phụ khác. Kết thúc quá trình lên men, nâng nhiệt độ đến 90°C trong nồi cách thủy. Sau đó tiến hành lọc, loại bỏ bã, các tế bào chết thu hồi dịch. Dịch sau lọc kết tủa canxi gluconat bằng cồn 96°, sau đó lọc để thu kết tủa canxi gluconat, hòa tan kết tủa trên giấy lọc bằng H₂SO₄ 0.2 M, lọc tách bỏ CaSO₄, dung dịch axit gluconic thu được định lượng bằng máy HPLC.

3.3.2.2. Nghiên cứu kết tủa canxi gluconat bằng cồn 96°

Bảng 3.6. Khảo sát tỷ lệ cồn 96° thích hợp kết tủa canxi gluconat

Dịch lên men: cồn (v/v)	5:1	5:2	5:3	5:4	5:5	5:6	5:7
m _{canxi gluconat} (g/l)	26.0	30.4	34.7	38.5	39.0	40.2	40.2

Như vậy, kết tủa canxi gluconat bằng cồn 96° cho kết quả tốt nhất với tỷ lệ 5:6 (dịch sau lên men:cồn v/v), trong 10 giờ.

Bảng 3.7. Khảo sát thời gian kết tủa canxi gluconat bằng cồn 96°

Thời gian kết tủa (h)	2	4	6	8	10	12
m _{canxi gluconat} (g/l)	16,5	21.3	34,9	38.2	40.5	40.5

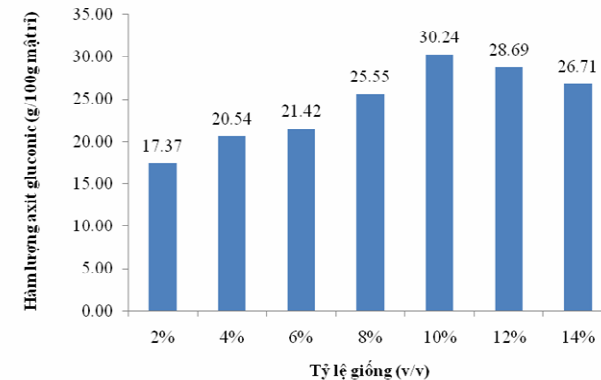
Sau 10 giờ kết tủa canxi gluconat bằng cồn 96°, chúng tôi thu được kết quả tối ưu 40,5 (g/l).

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

3.4.1. Xác định số lượng bào tử trước khi hoạt hóa giống

Chúng tôi sử dụng buồng đếm hồng cầu đếm bào tử nấm. Sau khi xác định mật độ bào tử nấm mốc đạt 10⁶-10⁷ bào tử/ml, chúng tôi tiến hành lắc liên tục trên máy lắc để đảm bảo huyền phù đồng nhất, sau đó giống được chuyển vào môi trường hoạt hóa.

3.4.2. Ảnh hưởng của tỉ lệ giống đến hàm lượng axit gluconic

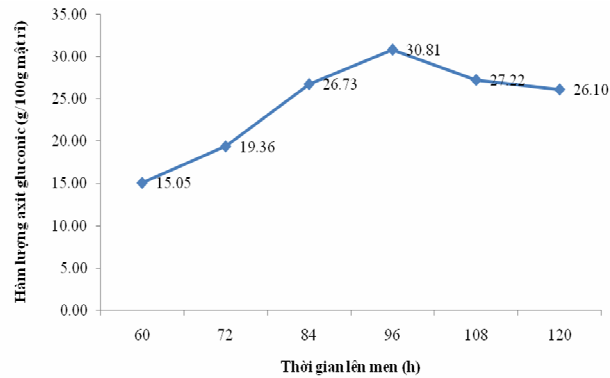


Hình 3.4. Ảnh hưởng tỉ lệ giống đến hàm lượng axit gluconic

Đồ thị hình 3.4 cho thấy ban đầu khi tỷ lệ giống tăng dần, hàm lượng axit gluconic sinh ra tăng. Tuy nhiên, khi tỷ lệ giống quá cao thì hàm lượng axit gluconic giảm. Khi tỷ lệ giống quá ít so với lượng cơ chất thì lượng enzyme sinh ra ít. Do đó, thời gian lên men kéo dài, tổn năng lượng, hiệu quả kinh tế không cao hoặc tạo ra sản phẩm phụ không mong muốn như rượu, andehyt,.... Ban đầu bổ sung một lượng giống quá cao, xảy ra sự cạnh tranh dinh dưỡng, làm tiêu hao một lượng lớn cơ chất cho quá trình tăng sinh khối. Do đó, hiệu quả chuyển hóa cơ chất thành axit gluconic không cao. Đồng thời, nguồn dinh dưỡng nghèo đi cũng dẫn đến lượng axit gluconic tạo thành

giảm. Kết quả tỷ lệ giống bổ sung là 10% với mật độ bào tử 10^6 - 10^7 bào tử/ml thu được kết quả tốt nhất là 30.24 g/100g mật rỉ.

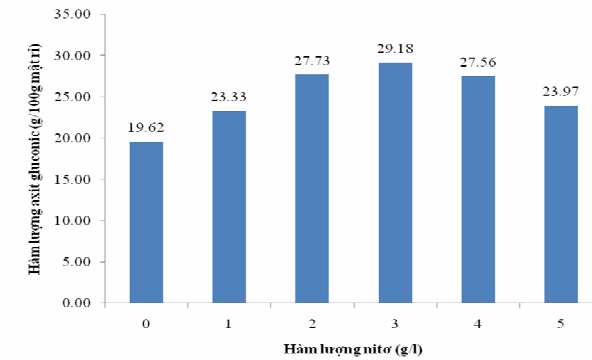
3.4.3. Ảnh hưởng của thời gian lên men đến hàm lượng axit gluconic



Hình 3.5. Ảnh hưởng thời gian lên men đến hàm lượng axit gluconic

Qua quan sát hình 3.5 cho thấy ban đầu khi thời gian lên men tăng, hàm lượng axit gluconic sinh ra tăng, khi thời gian lên men kéo dài hàm lượng axit gluconic giảm. Thời gian đầu nấm mốc sử dụng cơ chất để tăng sinh khối, đồng thời tiết enzyme để chuyển hóa các chất. Khi lượng tế bào càng lớn thì lượng enzyme tiết ra càng nhiều, lượng axit gluconic sinh ra càng tăng theo thời gian. Ở thời điểm 96 giờ quần thể vi sinh vật bước vào pha cân bằng hàm lượng axit gluconic sinh ra lớn nhất. Nếu tiếp tục kéo dài thời gian lên men, khi nguồn dinh dưỡng cạn kiệt cùng với sản phẩm axit gluconic tạo ra nhiều sẽ ức chế sự phát triển của vi sinh vật. Nấm mốc bắt đầu sử dụng sản phẩm sinh ra làm cơ chất, tạo ra các sản phẩm phụ gây tổn thất sản phẩm chính đồng thời gây khó khăn cho quá trình tinh sạch sản phẩm. Kết quả sau 96 giờ hàm lượng axit gluconic lớn nhất là 30.81 g/100g mật rỉ.

3.4.4. Ảnh hưởng của hàm lượng nitơ bổ sung đến hàm lượng axit gluconic



Hình 3.6. Ảnh hưởng hàm lượng nitơ bổ sung đến hàm lượng axit gluconic

Qua nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng nitơ bổ sung đến hàm lượng axit gluconic tạo thành, dựa vào đồ thị hình 3.6 cho thấy nguồn nitơ có sẵn trong nguyên liệu không đảm bảo cho quá trình sinh trưởng phát triển của vi sinh vật. Trong giai đoạn đầu khi hàm lượng nitơ bổ sung tăng hàm lượng axit tăng lên rõ rệt, đạt giá trị cao nhất 29.18 g/100g mật rỉ với hàm lượng $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 3 g/l. Tiếp tục tăng hàm lượng $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, khi hàm lượng nitơ quá cao dẫn đến lượng sinh khối tạo ra ngày càng nhiều, xảy ra hiện tượng cạnh tranh dinh dưỡng ảnh hưởng đến hiệu suất lên men. Hàm lượng axit gluconic sinh ra giảm dần và thấp nhất 23.97 g/100g mật rỉ khi hàm lượng $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 5 g/l. Kết quả hàm lượng axit gluconic tạo thành lớn nhất là 29.18 g/100g mật rỉ khi hàm lượng $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ bổ sung là 3 g/l,

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

3.5.1. Chọn yếu tố ảnh hưởng

3.5.2. Chọn điều kiện thí nghiệm

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3 \quad (3.2)$$

Bảng 3.8. Các điều kiện thí nghiệm

Yếu tố	Các mức			Khoảng biến thiên
	Mức dưới	Mức cơ sở	Mức trên	
	-1	0	+1	
Z ₁	8	10	12	2
Z ₂	84	96	108	12
Z ₃	2	3	4	1

3.5.3. Tổ chức và thực hiện các thí nghiệm

Bảng 3.9: Kết quả thí nghiệm quy hoạch nhân tố toàn phần 2³

Các nhân tố theo tỷ lệ xích tự nhiên				Các nhân tố trong hệ tọa độ không thứ nguyên							
TT	Z ₁	Z ₂	Z ₃	x ₁	x ₂	x ₃	x ₁ x ₂	x ₁ x ₃	x ₂ x ₃	x ₁ x ₂ x ₃	y
1	8	84	2	-	-	-	+	+	+	-	22.90
2	12	84	2	+	-	-	-	-	+	+	24.42
3	8	108	2	-	+	-	-	+	-	+	28.97
4	12	108	2	+	+	-	+	-	-	-	23.76
5	8	84	4	-	-	+	+	-	-	+	26.95
6	12	84	4	+	-	+	-	+	-	-	27.29
7	8	108	4	-	+	+	-	-	+	-	33.38
8	12	108	4	+	+	+	+	+	+	+	28.55
T1	10	96	3	0	0	0	0	0	0	0	33.69

T2	10	96	3	0	0	0	0	0	0	0	32.49
T3	10	96	3	0	0	0	0	0	0	0	33.31

3.5.4. Tính các hệ số hồi quy

Bảng 3.11. Giá trị các hệ số b trong phương trình hồi quy y

b ₀	27.03	b ₁₂	- 1.49
b ₁	- 1.02	b ₁₃	- 0.10
b ₂	1.64	b ₂₃	0.28
b ₃	2.02	b ₁₂₃	0.19

3.5.5. Kiểm định tính ý nghĩa của các hệ số hồi quy và sự tương thích của phương trình

Bảng 3.12. Giá trị các chuẩn Student thực nghiệm t_m

t ₀	124.713	t ₁₂	6.859
t ₁	4.728	t ₁₃	0.461
t ₂	7.550	t ₂₃	1.315
t ₃	9.302	t ₁₂₃	0.895

Tra bảng phân bố phân vị chuẩn Student (t_b) với mức ý nghĩa p = 0,05 bậc tự do f = 2 ta có: t_{0,05;2} = 4,3.

Do t₁₃, t₂₃, t₁₂₃ < t_{p(f)} nên hệ số b₁₃, b₂₃, b₁₂₃ không có ý nghĩa, ta loại ra khỏi phương trình, lúc này phương trình hồi quy có dạng:

$$y = 27.03 - 1.02x_1 + 1.64x_2 + 2.02x_3 - 1.49x_1x_2 \quad (3.9)$$

Bảng 3.13. Các giá trị để tính độ lệch dư

STN	y_u	\bar{y}_u	$ y_u - \bar{y}_u ^2$
1	22.90	24.68	3.17
2	24.42	25.68	1.59
3	28.97	27.39	2.50
4	23.76	25.34	2.50
5	26.95	28.15	1.42
6	27.29	26.10	1.42
7	33.38	31.99	1.94
8	28.55	29.94	1.94

Suy ra $F_b = F_{(0,05; 3; 2)} = 19.13$, do $F_m < F_b(f_1 f_2)$, phương trình thu được tương thích với thực nghiệm và phương trình này được sử dụng để tìm kiếm tối ưu. PTHQ (3.9) hoàn toàn tuyến tính nên ta có thể tìm điều kiện tối ưu bằng phương pháp leo dốc (phương pháp Box-Wilson).

3.5.6. Tối ưu hoá thực nghiệm

Bảng 3.14. Các điều kiện cần thiết để tiến hành thí nghiệm leo dốc

Các chỉ tiêu	$Z_1, \%$	Z_2, h	$Z_3, g/l$
Mức cơ sở	10	96	3
Khoảng biến thiên (λ_j)	2	12	1
Hệ số b_j	- 1.02	1.64	2.02
$b_j \lambda_j$	- 2.04	19.68	2.02
$ b_j \lambda_j $	2.04	19.68	2.02
Bước chuyển động (δ_j)	- 0.373	3.6	0.369
Làm tròn bước chuyển động (δ_j)	- 0.4	3.6	0.4

Bảng 3.15. Kết quả thí nghiệm theo hướng leo dốc

Thí nghiệm	Các yếu tố ảnh hưởng			Hàm mục tiêu	Ký hiệu mẫu
	$Z_1, \%$	$Z_2, \text{giờ}$	$Z_3, g/l$	Y	
1(TN tại tâm)	10	96	3	31.00	M12
2	9.6	99.6	3.4	33.91	M13
3	9.2	103.2	3.8	31.17	M14
4	8.8	106.8	4.2	28.88	M15
5	8.4	110.4	4.6	28.16	M16

Căn cứ vào kết quả qui hoạch thực nghiệm cho thấy rằng theo hướng leo dốc ở thí nghiệm thứ 2 cho kết quả tốt nhất với hàm lượng axit gluconic 33.91 g/100g mật rỉ cao nhất tương ứng với tỷ lệ giống bổ sung 9,6%, thời gian lên men là 99.6 giờ, hàm lượng $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 3.4 g/l.

3.5.7. Thí nghiệm kiểm chứng

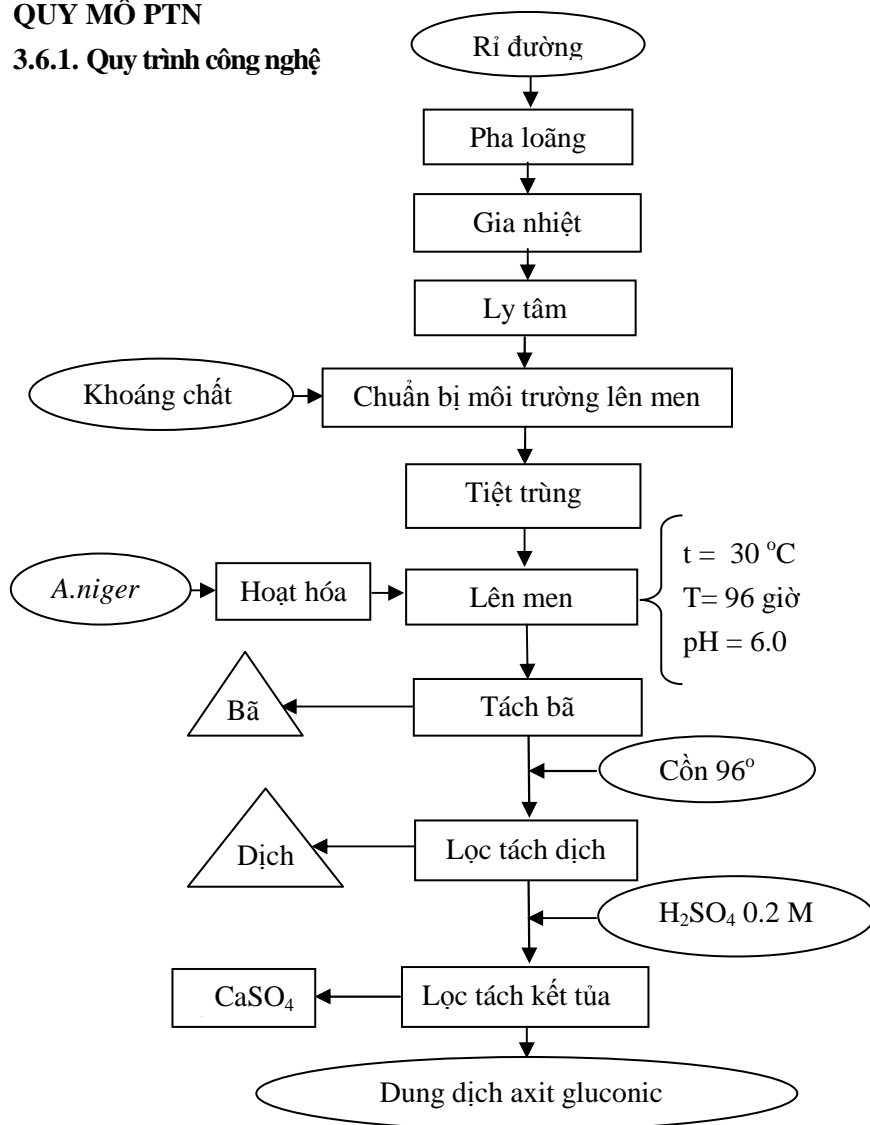
Kết quả thu được hàm lượng axit gluconic 33.62 g/100g mật rỉ, kết quả này gần thỏa mãn giá trị tối ưu.

3.5.8. Kết luận

Bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm chúng tôi đã xây dựng được phương trình động học mô tả mối tương quan của các yếu tố trong quá trình lên men đến hàm lượng axit gluconic.

3.6. ĐỀ XUẤT QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ LÊN MEN AXIT GLUCONIC TỪ RỈ ĐƯỜNG BẰNG *ASPERGILLUS NIGER* Ở QUY MÔ PTN

3.6.1. Quy trình công nghệ



Hình 3.15. Quy trình lên men axit gluconic

3.6.2. Thuyết minh quy trình

Rỉ đường: Được thu nhận từ các nhà máy sản xuất đường.

Pha loãng: Pha loãng rỉ đường:nước (2:1 kg/kg) nhằm thuận lợi cho quá trình ly tâm tách tạp chất, gia nhiệt tiêu diệt tạp khuẩn.

Gia nhiệt: Gia nhiệt 85-90°C, giữ ở nhiệt độ đó trong khoảng 45-60 phút, hầu hết các tạp khuẩn bị tiêu diệt, sau đó ly tâm.

Ly tâm: Nguyên liệu được ly tâm tách các chất không hòa tan trong mật rỉ. Nguyên liệu sau xử lý được bảo quản ở 4°C

Tiệt trùng: Mục đích của quá trình tiệt trùng môi trường là tiêu diệt các vi sinh vật ảnh hưởng đến quá trình lên men. Tiệt trùng môi trường ở nhiệt 121°C và thời gian 30 phút.

Lên men: Thành phần môi trường chuẩn bị với hàm lượng cơ chất mật rỉ 150 g/l, (NH₄)₂HPO₄ 3 g/l, KH₂PO₄ 0.5 g/l, MgSO₄.7H₂O 0,1 g/l, CaCO₃ 40 g/l. Điều chỉnh pH 6.0 bằng H₂SO₄ 2.0 M, tiến hành lên men ở nhiệt độ 30°C, thời gian lên men 96 giờ, theo dõi pH môi trường lên men 6 giờ một lần.

Giống: Giống sau khi hoạt hóa đảm bảo mật độ 10⁶-10⁷ bào tử/ml với tỉ lệ giống 10% (v/v). Môi trường lên men tiệt trùng xong để nguội về nhiệt độ môi trường thì tiến hành bổ sung giống.

Tách bã: Sau 96 giờ lên men tiến hành lọc sạch bã, thu hồi dịch canxi gluconat. Bổ sung còn kết tủa canxi gluconat.

Tách dịch: Sau khi kết tủa canxi gluconat bằng còn, lọc thu kết tủa loại bỏ dịch, rửa kết tủa trên giấy lọc bằng H₂SO₄ 0.2 M.

Tách kết tủa: Rửa kết tủa canxi gluconat trên giấy lọc bằng H₂SO₄ 0.2 M, tiến hành loại kết tủa CaSO₄, thu được axit gluconic.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. KẾT LUẬN

1) Ri đường ở nhà máy đường Kon Tum có chất lượng phù hợp với lên men axit gluconic có thành phần hóa học như sau:

Bx: 84.41

pH: 5.40

Protein: 3.64 (% chất khô)

Đường khử: 22.70 (% khối lượng)

Đường tổng: 54.50 (% khối lượng)

Đường saccarose: 30.21 (% khối lượng)

2) Đã xây dựng phương pháp xác định axit gluconic bằng máy HPLC (Dionex - Mỹ) với các thông số như sau: Sử dụng pha tĩnh là cột C18, tốc độ dòng 0,5 ml/phút, bước sóng phát hiện 210 nm, tỷ lệ pha động là acetonitrile:nước (3:7 v/v), tỷ lệ axit H₃PO₄:nước (1:1000 v/v), (pH_{nước} = 2.5), mẫu phân tích có pH = 2.5.

3) Sau khi nghiên cứu ảnh hưởng đồng thời 3 yếu tố đến hiệu suất thu hồi axit gluconic: tỷ lệ giống, gian lên men, hàm lượng nitơ bổ sung bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm, TYT2³ thì phương trình hồi quy thu được là:

$$y = 27.03 - 1.02x_1 + 1.64x_2 + 2.02x_3 - 1.49x_1x_2$$

4) Khi tối ưu hóa thực nghiệm bằng phương pháp leo dốc với các thông số lên men tối ưu: tỷ lệ giống 9.6%, thời gian lên men 99.6 giờ, lượng (NH₄)₂HPO₄ từ 3.4 g/l. Kết quả thu được từ thí nghiệm đối chứng hàm lượng axit gluconic đạt 33.62 g/100g mật ri.

5) Đã đề xuất qui trình lên men axit gluconic từ ri đường sử dụng *Aspergillus niger* ở qui mô PTN.

2. KIẾN NGHỊ

1) Nên tiếp tục nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng khác đến quá trình lên men: nhiệt độ lên men, nồng độ mật ri, nồng độ oxy,... Từ đó xây dựng phương trình tối ưu hóa các quá trình lên men để mạnh dạn đề xuất quy trình công nghệ lên men axit gluconic từ ri đường bằng chủng nấm mốc *A. niger* ở quy mô pilot.

2) Nghiên cứu xử lý màu của sản phẩm.

3) Nghiên cứu kết tinh sản phẩm để tạo sản phẩm dạng rắn.

4) Nghiên cứu tận dụng bã thải của môi trường sau lên men để làm thức ăn gia súc, phân bón vi sinh.