BỘ CÔNG NGHIỆP NHẸ

BỘ KHOA HỌC CÔNG NGHỆ VÀ MÔI TRƯỜNG

VIỆN CÔNG NGHIỆP THỰC THẨM

Tên đề tài : **NGHIÊN CỨU NÂNG CAO HIỆU SUẤT LÊN MEN VÀ THU HỒI ACID CITRIC TỪ DỊCH LÊN MEN CỦA Asp.Niger.**

Mã số : **KC - 08 -09**

Đề tài cấp Nhà nước quản lý thuộc chương trình công nghệ sinh học .

VIỆN CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM

Ngô Thị Mai

Hà nội 1995.

VIỆN TRƯỞNG VIỆN CNTP
VIỆN CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM
GS.I. Ngô Thị Mai

96-16-286
20/7/96

2682

20/7/96

Chủ nhiệm chương trình : **PTS . Nguyễn Thiện Luân**
Thứ trưởng Bộ Nông nghiệp
và Công nghiệp thực phẩm

Chủ nhiệm đề tài : **PTS . Nguyễn Thị Dự**

Cố vấn đề tài : **GS 1, PTS .Ngô Thị Mại**

Cộng tác viên : **GS 1 , PTS .Nguyễn Thị Huệ .**

KS. Nguyễn Thị Phương Trà
KS. Trần Thị Châu
KS. Nguyễn Thị Việt Anh
KS. Vũ Thị Thuận
KS. Trần Việt Lan
KS. Thái Thị Hảo
KS. Nguyễn Mỹ Hạnh
KS .Nguyễn Văn Long

MỤC LỤC

	trang :
I. Mở đầu	4
II. Tổng quan	6
1. Nghiên cứu về lên men	6
2. Nghiên cứu về phương pháp thu hồi	8
2.1 - Thu hồi bằng phương pháp hóa học cổ điển.	9
2.2 - Thu hồi bằng phương pháp trích ly với dung môi.	13
III. Phương pháp nghiên cứu và phân tích	16
1. Nguyên liệu	16
2. Giống vi sinh vật	16
3. Môi trường nuôi cấy và phương pháp thử nghiệm lên men.	16
4. Phương pháp nghiên cứu và thu hồi	17
5. Phương pháp phân tích	18
IV. Kết quả và bàn luận	19
A. Kết quả nghiên cứu trong khâu lên men	19
1. Trong điều kiện phòng thí nghiệm	19
1.1 - Lựa chọn các chủng giống	19
1.1.1 - Các chủng của Trung tâm công nghệ sinh học (ĐHBK Hà nội).	
1.1.2 - Các chủng của viện Công nghiệp thực phẩm.	21
1.2 - Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện thanh trùng môi trường.	27

Trang

1.3 - Nghiên cứu giải quyết vấn đề chìm của màng mốc trong điều kiện lên men bề mặt. 30

2. Trong điều kiện lên men quy mô 100-200 l/đợt. 37

2.1 - Cải tiến kỹ thuật thông gió 37

2.2 - Ảnh hưởng kết hợp của kỹ thuật thông gió và các giải pháp khác. 43

B. Nghiên cứu tách citric acid trong phòng thí nghiệm. 47

1. Tách citric acid ra khỏi dịch lên men 47

1.1 - Tách tạp chất trong dịch lên men 47

1.2 - Tách citric acid ra khỏi các acid phụ và tạp chất trong dịch lên men. 48

2. Thu hồi tinh thể citric acid từ citrat canxi 59

IV. Kết luận 70

V. Tài liệu tham khảo 72

I. MỞ ĐẦU.

Acid citric là một loại acid hữu cơ, không độc, được sử dụng trong nhiều ngành kinh tế quốc dân. 70% sản lượng acid citric sử dụng trong ngành công nghiệp thực phẩm trong sản xuất đồ uống, mứt, bánh kẹo, chất chống oxy hóa các loại dầu béo, bảo vệ thực phẩm. Từ giữa thế kỷ 19, nước Ý đã sản xuất Ca-Citrat từ dịch qủa chanh. Sản phẩm này đã được xuất sang Mỹ, Anh, Bỉ, Đức và các nước khác. Sau này acid citric được tổng hợp từ glycerol và các hóa chất khác và cuối cùng phương pháp lên men công nghiệp sản xuất acid citric đã được bắt đầu vào năm 1923. Tổng sản lượng toàn thế giới năm 1923 về acid citric là 10.000 tấn; trong đó hơn 80% sản lượng được sản xuất bằng phương pháp lên men. Năm 1970, tổng sản lượng acid citric trên toàn thế giới là 300.000 tấn. Con số này đã tăng lên 550.000 tấn vào năm 1990. Những phát hiện về khả năng thay thế polyphosphate của Na-Citrat trong thành phần các chất tẩy rửa, về việc sử dụng acid citric và các dẫn xuất của nó trong y học (tạo phức chất với dextran và sắt để trị bệnh thiếu sắt, điều trị bệnh không có khả năng hấp thụ sắt, trong qúa trình truyền máu, trong việc bảo quản máu tránh khỏi việc kết đông), trong việc sử lý các giếng khoan dầu khí khi các lỗ trên bề mặt cát bị lấp, bị bít bởi sắt, và trong ngành mỹ phẩm ... càng làm tăng nhu cầu về sản xuất acid citric.

Ở Việt Nam, nhu cầu về acid citric khoảng 500 - 1000 tấn/năm. Số lượng này hoàn toàn phải nhập bằng nhiều con đường khác nhau. Viện công nghiệp thực phẩm nay thuộc Bộ Công nghiệp nhẹ là một trong số những cơ quan tập trung nghiên cứu về lĩnh vực này và bước đầu đã công bố một số

kết qủa.

Trong những năm 70, KS Phạm Vĩnh Viễn và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu sản xuất acid citric từ bột sắn. Giai đoạn 1986 - 1990 GS,PTS Ngô Thị Mại và cộng sự đã nghiên cứu sản xuất acid citric từ rỉ đường mía, nhóm nghiên cứu này đã lựa chọn được chủng Asp. Niger, có khả năng tích tụ acid citric trong môi trường lên men là rỉ đường (14 ÷ 15 % đường) đạt 70 ÷ 80 g/l qui mô phòng thí nghiệm. Nghiên cứu sơ bộ về khả năng thu hồi tinh thể acid citric đã đạt hiệu xuất thu hồi 60 ÷ 62 %.

Với quan điểm, xác định rỉ đường, sản phẩm phụ của các nhà máy đường chưa được tận dụng hết, là nguyên liệu sẵn có phù hợp cho sản xuất acid citric. Trên nền tảng các kết qủa đã đạt được của nhóm nghiên cứu do GS, PTS Ngô Thị Mại lãnh đạo, giai đoạn 1986 - 1990 và khả năng cạnh tranh thị trường của sản phẩm này, chúng tôi nhận thấy rằng : để đưa ra sản xuất có hiệu qủa cần phải nâng cao hiệu xuất lên men và thu hồi acid citric. Đấy chính là nội dung nghiên cứu của đề tài nghiên cứu sẽ trình bày ở đây :

Mục tiêu của đề tài :

1/ Nâng cao hiệu xuất lên men acid citric. Đưa khả năng lên men đạt 70 ÷ 80 g/l trong phòng thí nghiệm lên : 90 - 95 g/l.

2/ Nâng cao hiệu xuất thu hồi acid citric từ rỉ đường mía lên men từ 60 ÷ 62% lên 70 ÷ 75 % ở qui mô phòng thí nghiệm.

3/ Đưa ra sản phẩm ở dạng dịch cô đặc và tinh thể, có độ tinh khiết cao, để sử dụng trong ngành công nghiệp thực phẩm. Độ tinh khiết sản phẩm đạt 95 - 99%.

II. TONG QUAN : Tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước.

1- Nghiên cứu về lên men.

Báo cáo của GS.PTS Ngô Thị Mại đề tài mã số 52D-03-08 với hơn 100 tài liệu tham khảo đã cho chúng ta một khái niệm rất đầy đủ về tình hình nghiên cứu trên thế giới, về lịch sử phát triển trong công nghệ sản xuất acid citric, về nhu cầu, khả năng ứng dụng của nó, về sơ đồ chuyển hóa tạo thành acid citric. Nhưng yếu tố về giống, thành phần môi trường, các điều kiện hóa lý ảnh hưởng đến qúa trình sinh tổng hợp theo phương pháp lên men bề mặt đã được đề cập khá chi tiết. Tập thể tác giả đề tài 52D-03-08 đã thu được một số kết qủa tốt trong nghiên cứu sản xuất acid citric từ rỉ đường mía Việt Nam. Từ rỉ đường mía, với môi trường chứa 15 % đường, khả năng sinh acid citric theo phương pháp lên men bề mặt đạt 70 ÷ 80 g/l. Cho đến thời điểm 1990 chưa có cơ sở nghiên cứu nào thông báo đạt được kết qủa như vậy trong điều kiện nghiên cứu ở Việt Nam. Vấn đề lựa chọn giống, thành phần môi trường, ảnh hưởng của các muối vô cơ, phương pháp sử lý nguyên liệu đã được nghiên cứu xem xét và tối ưu hóa. Vì vậy trong phần này chúng tôi chỉ bổ xung thêm nghiên cứu của một số tác giả về ảnh hưởng của một số chất lên qúa trình phát triển của màng mốc lên sự kìm hãm enzym Akonitaza - mà điều này có liên quan chặt chẽ với qúa trình sinh tổng hợp acid citric từ nấm mốc.

Neilson /1956/ đã chỉ ra rằng trong điều kiện tích tụ acid citric, enzym Akonitaza không có mặt trong môi trường. Bổ xung thêm Mn^{++} làm giảm acid citric đồng thời gây ra việc xuất hiện Akonitaza. Remakrishnan et al 1955 đã sử dụng ferrocyanide để sử lý môi trường từ mật rỉ củ cải đường. Ông quan sát thấy không xuất hiện Akonitaza trong qúa trình tích tụ citric acid. Szczodrak 1981 nhận thấy rằng hoạt tính của Akonitaza giảm mạnh trong qúa trình lên men, tích tụ citric acid và sự có mặt của enzym Akonitaza không xảy ra đồng thời. US pat N = 3940315 ; N =

3941656 chỉ ra mối liên quan giữa qúa trình tích tụ citric acid và $K_4 [Fe(CN)_6]$. $K_4 [Fe(CN)_6]$ được bổ xung thêm vào môi trường ở nhưng thời điểm đặc biệt sao cho trong giai đoạn lên men chính hàm lượng của nó trong môi trường lên men vào khoảng 0,5 ÷ 3,0 g/l, thông thường ở trong khoảng 0,8 - 1,5 g/l. Theo sáng chế này việc bổ xung $K_4 [Fe(CN)_6]$ xảy ra có liên quan đến sự phát triển của nấm mốc. Ý kiến tương tự về chất kìm chế phát triển khuẩn ty - $K_4 [Fe(CN)_6]$ được thông báo trong US pat N = 3741869, N = 3809612.

Chất này có thể bổ xung cùng với giống, sau khi tiếp giống hoặc trong qúa trình lên men tùy thuộc vào hiện trạng của giống khi soi kính hiển vi. Nếu như sự phát triển của nấm mốc chưa đủ bị kìm chế bởi chất này thì phải bổ xung thêm trong qúa trình lên men cho đến khi đạt hiệu qủa mong muốn. Tuy nhiên, việc nấm mốc bị kìm chế phát triển như thế nào chưa được nêu cụ thể.

US pat N = 3886041 cũng đưa ra ý kiến tương tự về ảnh hưởng của $K_4 [Fe(CN)_6]$. Sáng chế này còn chỉ ra việc bổ xung kết hợp với NaOH để duy trì pH = 1,9.

Ảnh hưởng của các loại rượu đã được chỉ ra ở báo cáo của GS Ngô Thị Mại. Vai trò của CH_3OH trong việc làm tăng khả năng tích tụ acid citric xuất hiện như là một hiện tượng phổ biến đối với các chủng Asp. Niger. Với nồng độ 1% - 3% nó có tác dụng kích thích qúa trình tổng hợp acid citric và làm giảm khả năng sinh bào tử.

Theo Chaudhary et al 1978 $CH_3(OH)$ bổ xung vào môi trường trước khi cấy giống có hiệu qủa hơn. Nếu bổ xung nó vào giờ thứ 24 hoặc muộn hơn sẽ không có hiệu qủa. Người ta cho rằng : CH_3OH có thể làm tăng khả năng chịu đựng của nấm mốc đối với môi trường có nồng độ cao ion kim loại như là :

Mn^{++} ; Fe^{++} .

Ảnh hưởng của nhiều hóa chất khác không có giá trị dinh dưỡng, trong việc nâng cao acid citric đã được kiểm tra. Các chất kiềm chế trao đổi chất như : CaF_2; NaF KF - Jap pat N = 7009830.

Bruchmann 1966 đã thông báo về các tác nhân oxy hóa : H_2O_2 , XanhMethylen. Bổ xung các chất này vào môi trường lên men cũng làm tăng khả năng tích tụ acid citric. Theo Czech pat N = 142338, bổ xung glycerol với hàm lượng nhất định làm tăng hàm lượng acid citric trong môi trường lên men 30 % so với đối chứng. Các chất dầu béo thực vật và nhiều chất khác đã được thông báo về mối liên quan của chúng đối với qúa trình lên men acid citric trong SU pat N = 525749 ; US pat N = 3189527 ; Czech pat N = 113640 and Millis et al 1963.

SU pat N = 1011684 A đã ghi nhận ảnh hưởng của dịch đường triết từ hoa húp lông lên qúa trình tích tụ acid citric trên môi trường lên men từ rỉ đường. Ảnh hưởng của KJ trên môi trường lên men acid citric từ phế thải sữa đã được công bố trong SU pat N = 1317025 A1.

2. Nghiên cứu về phương pháp thu hồi :

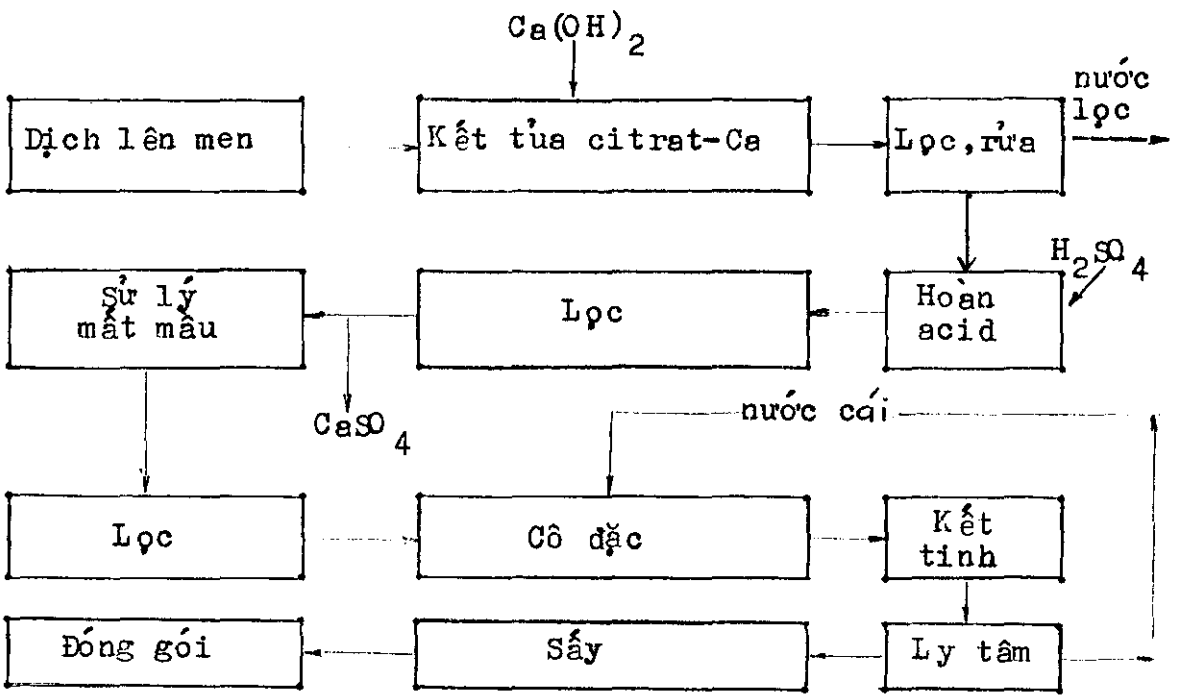
Dịch lên men sau khi đã tách tế bào vi sinh vật, ngoài sản phẩm chính là acid citric còn chứa một số sản phẩm phụ khác nhau. Các sản phẩm phụ này có sẵn trong nguyên liệu hoặc là sản phẩm của qúa trình trao đổi chất. Thành phần và hàm lượng của sản phẩm phụ này phụ thuộc vào chủng giống, nguyên liệu và phương pháp lên men. Người ta cho rằng khi sử dụng nguồn nguyên liệu là đường, rỉ đường, đối với các chủng nấm mốc sản phẩm phụ chủ yếu sinh ra trong qúa trình lên men là các acid hữu cơ như : oxalic, gluconic, malic ... phổ biến nhất là acid oxalic. Khi sử dụng các chủng nấm men nói chung, sản phẩm phụ tạo ra trong qúa trình len men chủ yếu lại là isocitric acid. Vì vậy căn cứ vào nguồn nguyên

liệu và chủng giống vi sinh vật để xác định sản phẩm phụ là gì ? sau đó mới lựa chọn phương pháp thu hồi thích hợp trong thực tếbằng cách lựa chọn các chung giống đặc biệt và điều khiển môi trường lên men có thể hạn chế việc tạo thành sản phẩm phụ trong qúa trình lên men. Có rất nhiều thông báo về phương pháp thu hồi khác nhau, song trên cơ sở về cơ chế phản ứng người ta tạm chia ra hai loại chính :

- Phương pháp hóa học cổ điển,
- Phương pháp trích ly bằng dung môi.

Trong sản xuất có thể dùng kết hợp giữa phương pháp hóa học cổ điển và phương pháp trích ly bằng dung môi. Mới đây người ta còn công bố về sử dụng phương pháp hóa lý đặc biệt để tách citric acid từ muối citrat - canxi. Tuy vậy tài liệu chi tiết về phương pháp này còn hạn chế.

2.1. Thu hồi bằng phương pháp hóa học cổ điển :

Đây là phương pháp mà người ta cho rằng rất phù hợp khi thu hồi acid citric từ môi trường lên men là rỉ đường / Lewis B. lock-wood 1979 /. Các bước chung nhất trong qúa trình thu hồi chỉ ra ở bảng 1.

Bảng 1 : Thu hồi acid citric bằng phương pháp cổ điển.