NGHIÊN CỨU CÁC ĐIỀU KIỆN TỐI ƯU CHO A. NIGER PHÂN GIẢI CELLULOSE CÓ TRONG PHẾ LIỆU DỨA

NGUYỄN ĐỨC LƯỢNG*
LÊ THỊ THANH MAI **

Nhằm giải quyết lượng chất thải không nhỏ ở nhà máy đồ hộp dứa, chúng tôi tiến hành nghiên cứu tìm điều kiện tối ưu để *A. niger* phân giải cellulose có trong phế liệu dứa, tạo sản phẩm hữu ích và làm sạch môi trường.

I. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

- Phế liệu dứa từ Công ty Thực phẩm Xuất khẩu Tân Bình

- Vi sinh vật: *Aspergillus niger* do bộ môn Công nghệ Sinh học – trường Đại học Bách khoa TP. Hồ Chí Minh cung cấp.

- Môi trường:

o Môi trường 1: môi trường thạch – malt, sử dụng để giữ giống nấm mốc

o Môi trường 2: môi trường nhân sinh khối (cám gạo: 75%; Trấu : 24%; $(NH_4)_2SO_4$: 1%)

o Môi trường 3: môi trường thử khả năng phân giải cellulose của nấm mốc (Agar : 2%; CMC : 0,5%; Pha trong dung dịch đệm Mc Livaine pH 5).

Phương pháp

- Phương pháp vi sinh vật: cấy chuyền và giữ giống trên thạch nghiêng; nhân sinh khối nấm mốc; tạo tiêu bản quan sát vi sinh vật dưới kính hiển vi.

- Phương pháp phối trộn mẫu và xác định điều kiện lên men tối ưu

Phế liệu dứa sau khi được nghiền nát, thu lấy phần bã đem sấy để làm giảm độ ẩm, có bổ sung hoặc không bổ sung thêm 10% cám để làm môi trường lên men.

■ Môi trường được bổ sung thêm nước cho đạt độ ẩm 64% sau đó phối trộn với vi sinh vật theo các tỉ lệ 1%, 3%, 6%, 9%, 12%.

■ Sử dụng tỉ lệ phối trộn vi sinh vật tối ưu, để xác định độ ẩm cho lên men tối ưu.

■ Sử dụng tỉ lệ phối trộn vi sinh vật tối ưu, độ ẩm tối ưu để xác định nhiệt độ cho lên men tối ưu.

■ Sử dụng tỉ lệ phối trộn vi sinh vật tối ưu, độ ẩm tối ưu và nhiệt độ nuôi cấy tối ưu để xác định thời gian lên men tối ưu.

* *PGS.TS. Chủ nhiệm Bộ môn CNSH trường Đại học Bách khoa TP.HCM*
** *Tiến sĩ, Phó ban Đào tạo Đại học Quốc gia TP.HCM*

Theo dõi mức độ giảm hàm lượng cellulose trong nguyên liệu để đánh giá các chỉ tiêu trên.

- Phương pháp sinh hóa

o Xác định enzyme ngoại bào

■ Nguyên tắc: Enzyme tác dụng lên cơ chất cellulose trong môi trường thạch, cơ chất bị phân hủy, độ đục của môi trường bị giảm, môi trường trở nên trong suốt. Độ lớn của phần môi trường trong suốt phản ánh hoạt động của enzyme.

■ Cách tiến hành: Cho vào mỗi đĩa petri 25ml môi trường 3. Khi môi trường đông lại đục trên mỗi đĩa petri một lỗ tròn có đường kính 8mm. Nhỏ vào mỗi lỗ 0,2ml dịch enzyme cần thử. Để yên ở 40^{0}C trong 24 giờ, sau đó cho vào mỗi đĩa 5ml dung dịch thuốc nhuộm lod, tráng đều khắp mặt thạch, để yên 5 phút. Gạn bỏ dung dịch thuốc nhuộm, xuất hiện vùng CMC bị phân giải trong suốt trên nền đỏ tím.

■ Kích thước vòng phân giải = (đường kính vùng phân giải – đường kính lỗ khoan).

o Các phương pháp thường dùng trong thí nghiệm hoá sinh [2, 3]

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Ảnh hưởng của tỉ lệ giống phối trộn đối với khả năng phân giải cellulose của *A. niger*

- Để khảo sát tỉ lệ vi sinh vật cần đưa vào phế liệu dứa chúng tôi sử dụng hỗn hợp gồm *A. niger* nuôi trên môi trường 2 với thành phần môi trường tối ưu đã khảo sát (Ammonium sulfate: 0,8%; Độ ẩm: 64%; Thời gian nuôi cấy: 52 giờ) để làm chế phẩm vi sinh vật đưa vào phế liệu dứa.

Chúng tôi khảo sát các nồng độ chế phẩm vi sinh vật như sau:

o Mẫu 1 (1%): 90g bã vỏ dứa + 10g cám + 1g chế phẩm

o Mẫu 2 (3%): 90g bã vỏ dứa + 10g cám + 3g chế phẩm

o Mẫu 3 (6%): 90g bã vỏ dứa + 10g cám + 6g chế phẩm

o Mẫu 4 (9%): 90g bã vỏ dứa + 10g cám + 9g chế phẩm

o Mẫu 5 (12%): 90g bã vỏ dứa + 10g cám + 12g chế phẩm

Theo dõi sự thay đổi hàm lượng cellulose ngay tại thời điểm ban đầu và sau 5 ngày ủ. Kết quả được trình bày ở Bảng số 1, Biểu đồ số 1.

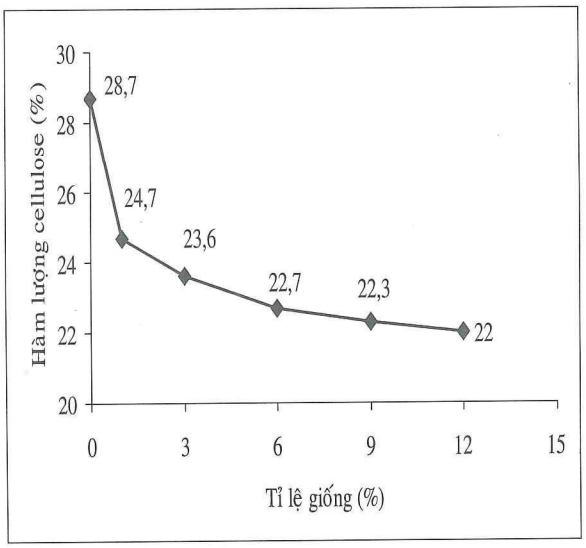
Bảng số 1.Hàm lượng cellulose có trong các mẫu phối trộn với các tỉ lệ giống khác nhau tại thời điểm ban đầu

Tỉ lệ giống	1%	3%	6%	9%	12%
Hàm lượng cellulose trung bình (%)	28,5	28,7	28,8	28,9	28,9

Kết quả cho thấy trong các mẫu ban đầu có hàm lượng cellulose không chênh lệch nhiều so với hàm lượng cellulose có trong bã vỏ dứa, vì vậy khi khảo sát sự thay đổi

hàm lượng cellulose theo nồng độ chế phẩm vi sinh vật chúng tôi so sánh với hàm lượng cellulose có trong bã vỏ dứa (28,7%).

Phế liệu dứa sau khi được ủ 5 ngày với chế phẩm vi sinh vật được thu nhận và đem sấy khô trước khi xác định hàm lượng cellulose.

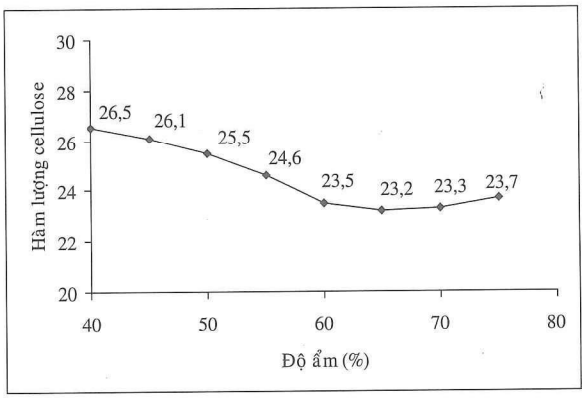


Biểu đồ số 1. Ảnh hưởng của tỉ lệ giống đến hàm lượng cellulose còn lại trong mẫu thí nghiệm sau 5 ngày ủ

Kết quả thí nghiệm cho thấy nếu gia tăng tỉ lệ giống trong một chừng mực nào đó thì hàm lượng cellulose trong mẫu thí nghiệm cũng giảm dần. Chúng tôi chọn tỉ lệ giống để ủ phế liệu dứa là 6% vì với các tỉ lệ giống cao hơn nữa vẫn có sự giảm hàm lượng cellulose nhưng sự chênh lệch là không đáng kể.

2. Ảnh hưởng của độ ẩm đối với khả năng phân giải cellulose của *A. niger*

Chúng tôi sử dụng môi trường gồm có 90g bã vỏ dứa, 10g cám và 6g chế phẩm vi sinh vật để khảo sát các độ ẩm khác nhau từ 40% đến 75%. Theo dõi sự thay đổi hàm lượng cellulose sau 5 ngày ủ. Kết quả được trình bày ở Biểu đồ số 2.

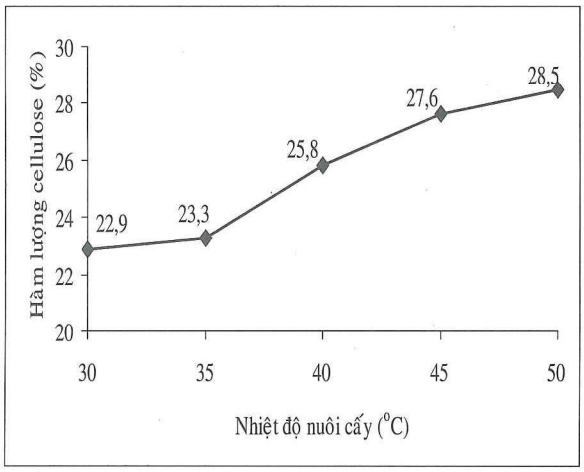


Biểu đồ số 2.Ảnh hưởng của độ ẩm môi trường đến hàm lượng cellulose còn lại trong mẫu thí nghiệm sau 5 ngày ủ

Kết quả cho thấy *A. niger* có khả năng thủy phân cellulose tốt nhất trong môi trường có độ ẩm khoảng 60% – 70%.

3.Ảnh hưởng của nhiệt độ đối với khả năng phân giải cellulose của *A. niger*

Chúng tôi sử dụng môi trường gồm 90g bã vỏ dứa, 10g cám và 6g chế phẩm vi sinh vật, độ ẩm 65% để khảo sát nhiệt độ lên men khác nhau từ 30°C đến 50°C. Theo dõi sự thay đổi hàm lượng cellulose sau 5 ngày ủ. Kết quả được trình bày ở Biểu đồ số 3.

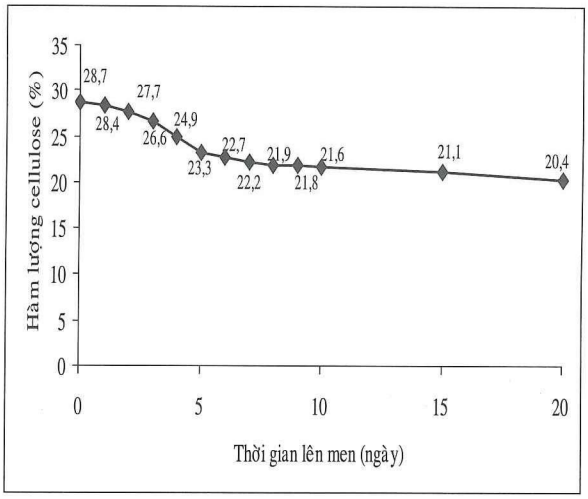


Biểu đồ số 3.Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến hàm lượng cellulose còn lại trong mẫu thí nghiệm sau 5 ngày ủ

Nhiệt độ có ảnh hưởng rất lớn đến sinh trưởng và phát triển của *A. niger*. Quan sát bằng mắt thường chúng tôi thấy rằng ở khoảng nhiệt độ 30°C-35°C nấm mốc phát triển rất tốt, mạng lưới khuẩn ty của nấm phát triển chằng chịt khắp môi trường làm cho môi trường kết chặt lại. Ở 40°C nấm mốc phát triển yếu hơn, khuẩn ty lan rất chậm trong môi trường. Ở nhiệt độ cao hơn, nấm mốc phát triển rất yếu môi trường rời rạc, ở 50°C nấm mốc hầu như không phát triển. Do đó khả năng thủy phân cellulose cũng bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ. Chúng tôi thấy rằng *A. niger* sinh trưởng, phát triển và thủy phân cellulose tốt nhất ở 30°C. Hàm lượng cellulose ở cơ chất khi nuôi cấy *A. niger* ở nhiệt độ này tương đương với hàm lượng cellulose có trong cơ chất khi nuôi cấy *A. niger* ở điều kiện nhiệt độ phòng (nhiệt độ phòng thời gian này dao động trong khoảng 30°C-35°C).

4. Ảnh hưởng của thời gian lên men đối với khả năng phân giải cellulose của A. niger

Môi trường được sử dụng gồm: 90g bã vỏ dứa, 10g cám và 6g chế phẩm vi sinh vật, độ ẩm 65%, lên men ở nhiệt độ phòng để theo dõi sự thay đổi hàm lượng cellulose sau các thời gian lên men khác nhau. Kết quả được trình bày ở Biểu đồ số 4.



Biểu đồ số 4.Ảnh hưởng của thời gian lên men đến hàm lượng cellulose còn lại trong mẫu thí nghiệm

Kết quả thí nghiệm cho thấy hàm lượng cellulose trong mẫu thí nghiệm giảm dần nhanh trong 7 ngày đầu, sau đó tốc độ giảm càng thấp dần. Trong hai ngày đầu do nấm mốc sử dụng các chất dinh dưỡng hòa tan có sẵn trong môi trường để thực hiện quá trình nẩy mầm, hình thành sợi nấm, enzyme mới bắt đầu được tổng hợp nên cơ chất cellulose chưa thay đổi nhiều. Thời gian tiếp theo từ ngày thứ ba đến ngày thứ năm là thời kỳ phát triển mạnh mẽ của hệ sợi nấm. Sợi nấm phát triển rất nhanh khắp môi trường, nhiệt độ tăng nhanh có thể lên tới 40°C-45°C. Đây là thời gian hàm lượng cellulose được tiêu hao nhiều và nhanh chóng. Chuyển sang giai đoạn tiếp theo thì bào tử đã hình thành nhiều, nhiệt độ khối môi trường và độ ẩm giảm dần. Trong giai đoạn này quá trình trao đổi chất yếu dần, lượng enzyme giảm do đó mức độ giảm chất dinh dưỡng chậm lại.

Kết luận

Điều kiện tối ưu để *A. niger* phân giải cellulose có trong phế liệu dứa là: Chuyển *A. niger* vào bã vỏ dứa theo tỉ lệ giữa bã vỏ dứa: *A. niger* là 100:6. Thêm nước đạt độ ẩm là 65%. Trộn đều và ủ ở 30°C trong 7 ngày. Sau đó trộn thêm cám, urê và mật rỉ theo tỉ lệ (% so với bã vỏ dứa): cám: 40%, urê: 5% và mật rỉ: 1%. Tiếp tục ủ ở 30°C trong 7 ngày.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1.Nguyễn Đức Lượng, Lê Thị Thanh Mai và tập thể: "Nghiên cứu xử lý phế liệu nhà máy đồ hộp dứa để sản xuất enzyme bromelin, phân sinh học và thức ăn gia súc". Đề tài nghiệm thu cấp Thành phố. Nghiệm thu năm 2004.

2.Nguyễn Lân Dũng và cộng tác viên: "Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học", năm 1978.

3.Nguyễn Đức Lượng, Cao Cường: "Thí nghiệm Hóa Sinh học". NXB ĐHQG TPHCM, năm 2003.

4.Nguyễn Văn Mùi, Thực hành Hoá Sinh học. Nhà Xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, năm 2001.

5.Nguyễn Đức Lượng: Vi sinh vật học công nghiệp. NXB ĐHQG TPHCM, năm 2002.

6.Helmut Uhlig: "Industrial enzymes and their applications". John Wiley and Sons, Inc, Newyork, năm 2000.

7.World Journal of Microbiology and Biotechnology. ISSN 0959-3993-GBR, DA, 1998. Vol. 14, No 3 pp.399-404 BIBL-25 ref.

TÓM TẮT

Điều kiện tối ưu để A. niger phân giải cellulose có trong phế liệu dứa là: Chuyển A. niger vào bã vỏ dứa theo tỉ lệ giữa bã vỏ dứa: A. niger là 100:6. Thêm nước đạt độ ẩm là 65%. Trộn đều và ủ ở 30°C trong 7 ngày. Sau đó trộn thêm cám, urê và mật rỉ theo tỉ lệ (% so với bã vỏ dứa): cám: 40%, urê: 5% và mật rỉ: 1%. Tiếp tục ủ ở 30°C trong 7 ngày.

SUMMARY

The optimal conditions that A. niger can hydrolize cellulose in wasted pineapple are:

- A. niger/pineapple peel (w/w): 100/6.
- Moisture: 65%.
- Mix and incubate at 30°C, in 7 days.
- Put mash, urea and molasses (% pineapple peel): 40:5:1
- Incubate at 30°C, in 7 days.