

TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH  
KHOA CHĂN NUÔI THÝ Y



# SẢN XUẤT THẠCH DỪA TỪ VI KHUẨN

*Acetobacter xylinum*

Giảng viên hướng dẫn : PGS. TS. NGUYỄN NGỌC HẢI

Sinh viên : Nguyễn Xuân Viên

Lớp : DH08TA

MSSV : 08161251

Thủ Đức ngày 28 tháng 02 năm 2010

## I. Giới thiệu chung về cây Dừa -Thạch Dừa.

Từ xưa đến nay cây Dừa rất quen thuộc đối nhiều nước trên thế giới như: Philippin, Indonesia, Ấn Độ, Việt Nam, ... cây dừa đã đem lại nhiều nguồn lợi, đặc biệt là từ các sản phẩm của nó như: gỗ dừa, kẹo dừa, bánh tráng, vông dừa, đồ mỹ nghệ hay làm nhiên liệu, ... Tuy nhiên, lượng nước dừa hàng năm chỉ sử dụng một ít vào giải khát, lượng còn lại thải ra ngoài đặc biệt là từ các nhà máy cơm dừa nạo sấy, vì thế cũng là nguyên nhân gây ô nhiễm môi trường trầm trọng. Do đó, việc tận dụng nước dừa già vào sản xuất là nhu cầu cấp thiết để giải quyết môi trường và làm tăng giá trị sử dụng của cây. Trong số các thành tựu đạt được, thì công nghệ sản xuất Thạch Dừa là một hướng giải quyết hiệu quả và trên vọng cả 2 vấn đề trên.



- Thạch dừa ( Nata de coco ) là một loại thức ăn phổ biến được tạo ra từ sự lên men vi khuẩn *Acetobacter xylinum*. Đây là một trong số các loại thực phẩm thương mại đầu tiên ứng dụng từ cellulose vi khuẩn. Sản phẩm thạch dừa là một món ăn trắng miệng dai, trong suốt và ăn rất ngon, có bản chất hóa học là polysaccharide nên không có giá trị dinh dưỡng cao nhưng có đặc tính kích thích nhu động ruột làm cho việc điều hòa bài tiết được tốt hơn. Chế phẩm từ dừa này có tác dụng phòng ngừa ung thư và có thể giữ cho da được mịn màng.

-Thạch dừa - loại thực phẩm chứa ít năng lượng và có giá trị cảm quan cao là phương thuốc thần diệu để giảm nguy cơ bệnh béo phì. Nhờ sự lên men của vi khuẩn *Acetobacter xylinum* trên nước dừa già tạo ra sản phẩm có hàm lượng chất xơ cao rất tốt cho hệ tiêu hóa giúp cơ thể chống bệnh ung thư ruột kết.

- Dừa là cây thuộc họ *Palmas*, bộ *Spadiciflorales*. Cây dừa thường ra hoa từ năm 7 – 12 tuổi sau khi trồng. Từ thụ phấn đến khi trái chín là 12 -13 tháng. Khi chín trái dừa nặng 1.2 – 2 kg.



Trái Dừa

## II. Thạch dừa.

- Bản chất của thạch dừa là một màng nhày có cấu trúc là *hemicellulose*. Do thạch dừa có bản chất là polysaccharide ngoại bào nên có khả năng ứng dụng vào nhiều lĩnh vực khác nhau. Cho đến nay, việc ứng dụng thạch dừa mới chỉ dừng lại ở những nghiên cứu chế biến thành những sản phẩm kẹo, jelly, các sản phẩm giải khát.
- Hàm ẩm của thạch dừa là một mạng polymer sinh học, có khả năng giữ nước rất lớn. Miếng thạch dừa sau khi sấy ở  $90^{\circ}\text{C}$  thì mỏng như tờ giấy, bề mặt láng bóng và rất dai chắc. Kết quả xác định hàm ẩm của thạch dừa là 99%, thể hiện rõ bản chất háo nước của thạch dừa ( do chuỗi polymer của mạng thạch dừa

- chứa các nhóm –OH nên rất dễ dàng tạo liên kết hidro với nước).
- Cấu trúc mạng polysaccharide của thạch dừa: Thạch dừa có cấu trúc mạng là các polysaccharide, chúng sắp xếp không theo trật tự, không theo quy luật, chúng đan xen vào nhau rất chằng chịt theo mọi phía. Do trong quá trình lên men, các vi khuẩn *Acetobacter xylinum* đã chuyển động hỗn loạn không theo quy luật. Đó là nguyên nhân tạo nên tính dai và chắc về mọi phía của miếng thạch. Bên cạnh đó, mạng luôn luôn ngậm một lượng nước đáng kể (99%). Thành phần *monosaccharide* chính của thạch dừa là *socboza* nằm ở dạng L-*socboza*, thường chứa trong vi khuẩn lên men dịch trái cây. Công thức cấu tạo của L-*socboza* là:  $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CO}-\text{HOCH}-\text{HCOH}-\text{HOCH}-\text{CH}_2\text{OH}$ .

## 1. Vi sinh vật trong sản xuất thạch dừa

### a. Đặc điểm giống vi khuẩn *Acetobacter*

□ Giống vi khuẩn *Acetobacter* thuộc họ *Pseudomonadidae*, phân bố rộng rãi trong tự nhiên và có thể phân lập được các vi khuẩn này từ không khí, đất, nước, lương thực, thực phẩm, dấm, rượu, bia, hoa quả... Có khoảng 20 loài thuộc giống *Acetobacter* đã được phân lập và mô tả, trong đó có nhiều loài có ý nghĩa kinh tế.

#### ➤ Vi khuẩn *Acetobacter* :

- Dạng hình que, tùy điều kiện nuôi cấy ( $t^\circ$ , thành phần môi trường nuôi cấy) mà các vi khuẩn *acetobacter* có thể sinh ra các tế bào có hình thái khác biệt dạng kéo dài hoặc phình to ra.
- Kích thước thay đổi tùy loài (0.3-0.6 x 1.0-8.0 $\mu\text{m}$ ).
- Có thể di động (có tiên mao đơn hoặc chu mao), hoặc không di động (không có tiên mao).
- Không sinh nha bào tử.
- Hiếu khí bắt buộc.
- Chịu được độ acid cao.
- Vi khuẩn *Acetobacter* có khả năng đồng hoá nhiều nguồn thức ăn

cacbon khác nhau nhưng không sử dụng được tinh bột.

- Tế bào đứng riêng lẻ hoặc kết thành từng chuỗi.
- Có khả năng tạo thành váng trên môi trường lỏng, khả năng tạo thành váng thay đổi tùy loại:
  1. *Acetobacter xylinum*: tạo thành váng cellulose khá dày và chắc.
  2. *Acetobacter orleanoe*: tạo thành váng mỏng nhưng chắc.
  3. *Acetobacter pasteurianum*: tạo thành váng khô và nhẵn nheo.
  4. *Acetobacter suboxydans*: tạo thành váng mỏng dễ tan rã.
  5. *Acetobacter curvum*: sinh acid acetic với nồng độ cao nhưng tạo thành váng không chắc chắn.
- *Acetobacter* có khả năng đồng hoá muối  $(\text{NH}_4)^+$  và phân giải pepton. Một số loài đòi hỏi một số acid amin nhất định như acid pantothenic và các chất khoáng K, Mg, Ca, Fe, P, S ... ở dạng muối vô cơ, hữu cơ hoặc hợp chất hữu cơ. Do đó bia, dịch tự phân nấm men, nước mạch nha, nước trái cây... là nguồn dinh dưỡng rất tốt cho sự phát triển của vi khuẩn *Actobacter*.
- Ngoài khả năng oxy hoá ethanol thành acid acetic, một số loài *Acetobacter* còn tổng hợp được vit B<sub>1</sub>, vit B<sub>2</sub>, oxy hoá sorbit thành đường sorbose .
- 

#### b. Phân loại vi khuẩn *Acetobacter*

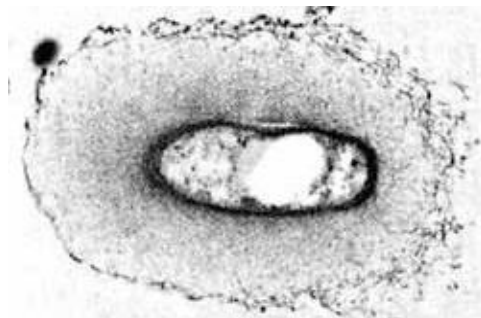
##### ❖ Theo bảng phân loại *Acetobacter* của J-Frateur-1950

Sau đây là một số loài quan trọng nhất:

1. *Acetobacter xylinum*: Trục khuẩn không di động, tạo thành váng nhẵn và khá dày. Váng có chứa hemicellulose nên khi gặp  $\text{H}_2\text{SO}_4$  và thuốc nhuộm Iod sẽ bắt màu xanh. Có thể tích lũy 4.5% acid acetic trong môi trường. Thường gặp loài vi khuẩn này cùng với nấm men

trong “nấm chè”, còn gọi là “thủy hoài sâm”, một loại sản phẩm giải khát bổ dưỡng theo cách làm của người Trung Hoa. Đó là một loại nước chua có vị thơm dùng để pha nước giải khát trong các gia đình người Trung Hoa, trên mặt nước có một vầng vi sinh vật dày được nuôi sống bằng nước chè và đường.

2. *Acetobacter schutzenbachi*: Trục khuẩn khá dài, tạo thành vầng dày, và không bền vững, có khả năng tích lũy trong môi trường đến 11.5% acid acetic do đó thường được sử dụng để làm giấm theo phương pháp nhanh (phương pháp của Đức).
3. *Acetobacter suboxydans*: Tạo thành vầng mỏng, dễ vỡ ra, có khả năng chuyển hoá glucose thành acid gluconic hay sorbic thành sorbose. Loại vi khuẩn này muốn phát triển bình thường cần được cung cấp một số chất sinh trưởng như acid para aminopenzoic, acid panthoteric, acid nicotinic.
4. *Acetobacter orleansen*: Trục khuẩn dài trung bình không di động. Gặp điều kiện nhiệt độ cao có thể sinh ra các tế bào dị hình kéo dài hoặc phình to ra. Tạo ra vầng rất dày trên môi trường dịch thể. Có thể phát triển được có nồng độ rượu cao (10%-12%) và làm tích lũy đến



Vi khuẩn *Acetobacter xylinum*



9.5% acid acetic. Thường được dùng trong công nghiệp chuyển rượu vang thành giấm (phương pháp của Pháp). Phát triển thích hợp ở nhiệt độ 25-30°C.

5. *Acetobacter aceti*: Trục khuẩn ngắn, không di động, thường xếp thành từng chuỗi dài. Váng của vi khuẩn bắt đầu màu vàng khi nhuộm bằng thuốc nhuộm Iod, chúng có thể phát triển trong môi trường có nồng độ rượu khá cao 11% và có thể tích lũy đến 6% acid acetic trong môi trường, phát triển thích hợp nhất ở nhiệt độ 34°C.
6. *Acetobacter pasteurianum*: Hình dạng tương tự như loại trên nhưng váng vi khuẩn có dạng khô và nhẵn nheo, váng bắt màu xanh khi nhuộm với thuốc Iod.

c. **Giống vi khuẩn *Acetobacter xylinum***

❖ **Đặc điểm:**

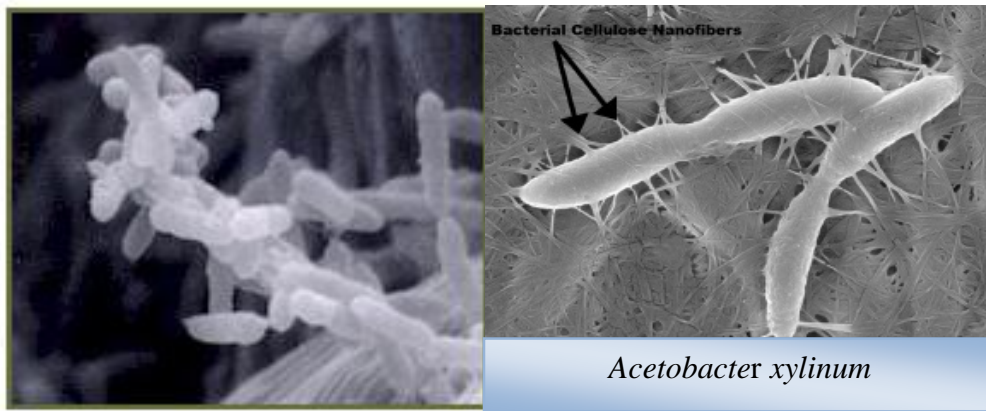
Chủng *Acetobacter xylinum* này có nguồn từ Philippin. *Acetobacter xylinum* thuộc nhóm vi khuẩn acetic. Theo hệ thống phân loại của nhà khoa học Bergey thì *Acetobacter xylinum* thuộc: lớp *Schizomycetes*,

bộ *Pseudomonadales*,

họ *Pseudomonadidae*.

- *Acetobacter xylinum* là loại vi khuẩn dài khoảng 2µm, đứng riêng lẻ hoặc xếp thành chuỗi, có khả năng tạo váng hemicellulose khá dày, bắt màu với thuốc nhuộm Iod và H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

- *Acetobacter xylinum* sinh trưởng ở pH < 5. t° = 28-32°C và có thể tích lũy 4.5% acid acetic. Acid acetic là sản phẩm sinh ra trong quá trình hoạt động của vi khuẩn, nhưng khi chúng vượt quá mức cho phép, chúng sẽ quay ngược trở lại làm ức chế hoạt động của vi khuẩn.



### ❖ Tính chất

-*Acetobacter xylinum* hấp thụ đường glucose từ môi trường nuôi cấy.

Trong tế bào vi khuẩn, glucose này sẽ kết hợp với acid béo tạo thành một tiền chất nằm trên màng tế bào. Kế đó nó được thoát ra ngoài tế bào cùng với một enzyme. Enzyme này có thể polyme hoá glucose thành cellulose.

-*Acetobacter xylinum* tạo nên lớp cellulose dày là do môi trường nuôi cấy nước dừa có bổ sung các chất dinh dưỡng cần thiết. Cellulose là những polisaccharide không tan trong nước mà tan trong môi trường kiềm.

-*Acetobacter xylinum* sống thích hợp ở nhiệt độ 28-32°C. Ở nhiệt độ này quá trình hình thành các sản phẩm trong đó có thạch dừa là tốt nhất.

### III. 3 bước trong sản xuất Thạch Dừa

#### Bước 1: Chuẩn bị môi trường:

- Nước dừa già được thu nhận ở các nhà máy sản xuất cơm dừa nạo sấy. Dùng vải lọc để loại bỏ tạp chất.
- Bổ sung dinh dưỡng: SA,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , đường glucose là nguồn cung cấp Nitơ, khoáng... tạo môi trường tối ưu cho quá trình sinh tổng hợp sản phẩm. Môi trường sau khi bổ sung dinh dưỡng được thanh trùng bằng cách đun sôi khoảng 10- 15 phút để tiêu diệt các vi sinh vật có trong môi trường. Sau đó



làm nguội.

- Dùng acid acetic 40% chỉnh về pH = 3 - 3,5, chỉnh nhiệt độ đến 28-31°C .

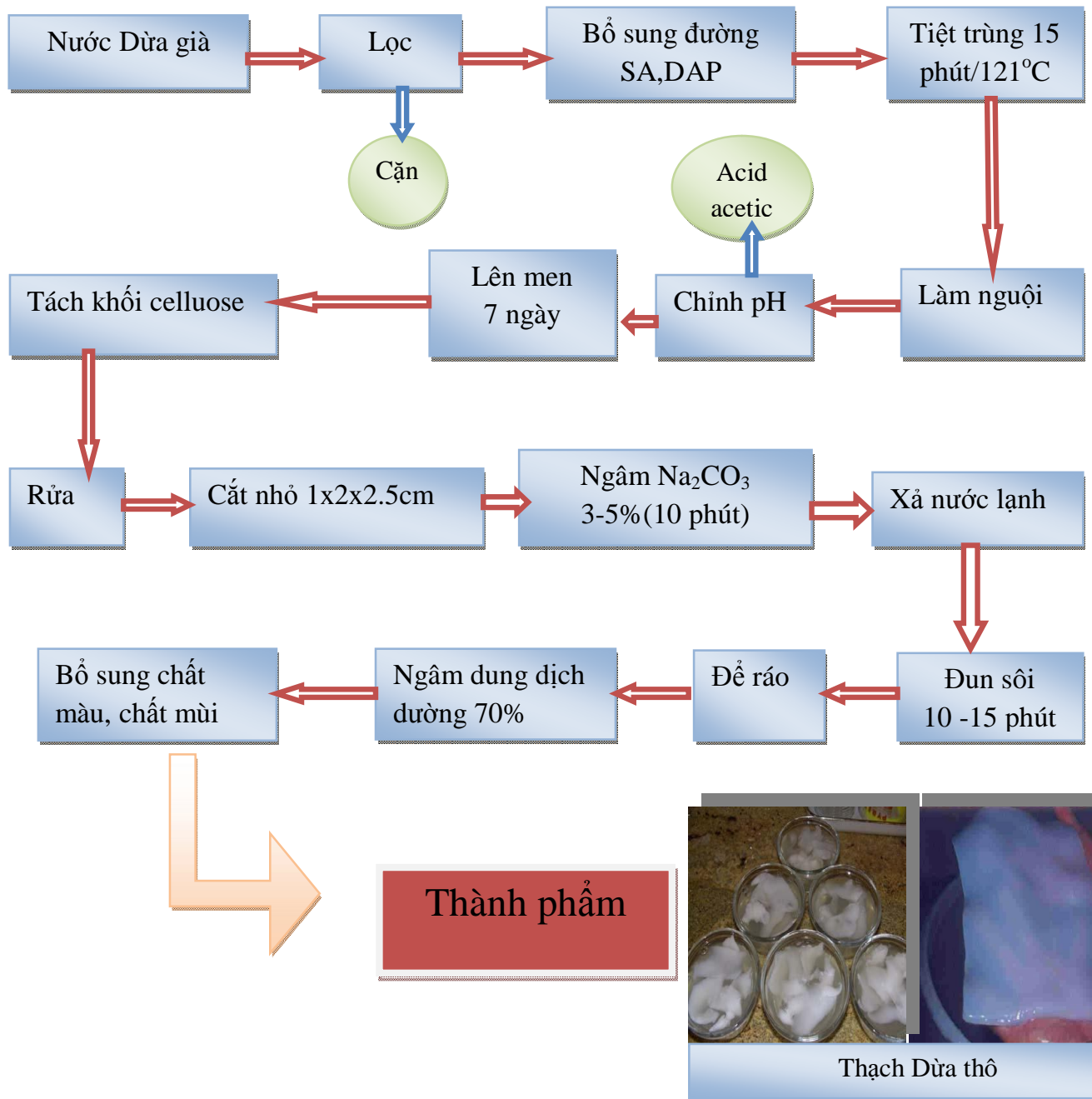
**Bước 2:** *Lên men.*

Đổ môi trường vào các dụng cụ, cấy giống theo tỷ lệ 1:10. Đậy thau, chậu bằng vải mỏng hoặc giấy báo. Giữ nhiệt độ phòng ở 28-31°C trong vòng 48h. Trong thời gian này tránh khuấy động môi trường để tránh ảnh hưởng đến lớp thạch đang hình thành.

**Bước 3:** *Thu nhận và hoàn thiện sản phẩm.*

- Dùng vợt để vớt khối cellulose ra khỏi dịch lên men. Sau đó rửa khối cellulose bằng nước lạnh.
- Dùng máy cắt để cắt khối cellulose tạo các miếng nhỏ, đều đặn.
- Ngâm sản phẩm trong dung dịch Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 3-5% trong 10' để trung hoà acid acetic còn sót bên trong thạch. Sau đó xả lại bằng nước lạnh.
- Đun sôi để làm trong sản phẩm và tạo độ dai bằng cách bổ sung chất tạo dai.
- Ngâm đường tạo độ ngọt và tăng độ trong cho sản phẩm.
- Bổ sung màu, mùi để hoàn thiện giá trị cảm quan.

**QUI TRÌNH CÓ THỂ TÓM TẮC BẰNG SƠ ĐỒ SAU**



Với: SA: Sunphat amon

DPA: Dihydro phosphate amon

### ❖ Cơ chế tạo thành sản phẩm:

- Ở điều kiện tối ưu, 1lit nước dừa (chứa khoảng 110g saccharose) sẽ tạo thành khoảng 483g thạch dừa thô, chưa qua xử lý với độ ẩm khoảng 96-98%.
- Đầu tiên các tế bào vi khuẩn sẽ tiết ra chất nhầy bao bọc xung quanh chúng, tiếp đó là sự hình thành các sợi cellulose được polime hoá từ các đơn phân glucose ở vị trí  $\alpha$ -1,6 dưới tác dụng của enzym có trong bao nhầy. Các sợi này ngày càng dày lên và được kết nối với nhau tạo thành lớp cellulose bên trong bao nhầy. Lớp cellulose này sau đó được thoát ra khỏi tế bào hoàn toàn.

Dung dịch môi trường ban đầu có dạng huyền phù mịn, chuyển sang dạng rời rạc, sau đó kết lại thành khối lớn hơn dạng gel chứa các tế bào vi khuẩn trong đó. Bộ khung của gel là mạng lưới cellulose với thành phần chủ yếu là nước. Nó được hình thành ở mức tối đa chỉ 30 phút sau khi có sự tiếp xúc giữa vi khuẩn *Acetobacterium xylium* với glucose và oxy.

### ❖ Một số biến động trong quá trình lên men

Sự thay đổi pH trong quá trình lên men : Một trong những điều kiện quan trọng để có được sự hoạt động sống của VSV là độ acid của môi trường. *Acetobacter xylinum* là một loài chịu acid nên môi trường được điều chỉnh về pH 3.5-4 bằng acid acetic nồng độ 40%. Các quá trình đồng hóa và dị hóa của vi sinh vật có liên quan đến việc tạo thành các acid hữu cơ như là sản phẩm trung gian và những sản phẩm cuối cùng của sự trao đổi chất. Nếu nguồn C không được vi khuẩn sử dụng hết thì có thể có sự tích lũy acid hữu cơ tương ứng trong dịch nuôi cấy. Sự tích lũy và tỷ lệ acid hữu cơ phụ thuộc vào từng chủng trong mỗi loài vi khuẩn , vào thành phần của môi trường , vào sự thông khí và các nhân tố khác. Đối với *Acetobacter xylinum* việc lên men đi liền với hình thành các acid dicarboxylic không bay hơi (acid malic, fumaric, succinic), các ketoacid (acid oxaloacetic, pyruvic) như là các sản phẩm trung gian và các

acid mono carboxylic bay hơi (acid propionic, acetic, đôi khi cả acid formic) như là các sản phẩm cuối cùng.

### ❖ Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men

#### 1. Ảnh hưởng của $(NH_4)_2SO_4$

Tỉ lệ thành phần dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy có ý nghĩa quyết định đối với sự sinh trưởng và phát triển của *A. xylinum*. Nhân tố  $(NH_4)_2SO_4$  là một trong những nhân tố ảnh hưởng lớn đến sự phát triển của *A. xylinum*.  $(NH_4)_2SO_4$  là nhân tố quan trọng cung cấp nguồn nitơ cho tế bào phát triển  $(NH_4)_2PO_4$  vừa là nguồn cung cấp nitơ, vừa là nguồn cung cấp phospho cho quá trình sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn *Acetobacter xylinum*. Sự ảnh hưởng của  $(NH_4)_2PO_4$  tương tự như ảnh hưởng của  $(NH_4)_2SO_4$

#### 2. Ảnh hưởng của các loại đường

Trạng thái thạch dừa tạo thành chịu ảnh hưởng nhiều của đường. *Acetobacter xylinum* có thể sử dụng glucose, sucrose, lactose, maltose, dextrin và galactose do đó ứng với mỗi loại đường khác nhau mà ta sử dụng sẽ cho ra thạch dừa có trạng thái khác nhau.

Trong điều kiện tối ưu pH = 5.0 , T = 28-31°C , 1 lít nước được bổ sung 100g đường , 5g  $(NH_4)_2HPO_4$ , 8 ml acid acetic băng thu được 483g thạch dừa thô.

Đường	Độ dày – Trạng thái	Khối lượng thạch dừa sau 15 ngày lên men (g)
<b>Glucose</b>	<b>Dày – chắc</b>	<b>198.50</b>
<b>Sucrose</b>	<b>Dày – chắc</b>	<b>193.79</b>
Lactose	Màng mỏng – mềm	84.50
Maltose	Màng mỏng – mềm	86.35
Dextrin	Màng mỏng – mềm	81.20
Galactose	Màng mỏng – mềm	50.45
Không bổ sung đường	Màng mỏng – mềm	50.00

(Nguồn : Adapted from Lapuz et al. (1967) and Ramos (1977))

Dựa vào bảng nghiên cứu trên ta thấy khi sử dụng glucose cho quá trình lên men sẽ cho khối lượng thạch dừa cao nhất và trạng thái thạch dừa thu được cũng rất tốt. Tuy nhiên khi người ta làm thí nghiệm sử dụng sucrose ở các nồng độ khác nhau cho quá trình lên men thì người ta thấy rằng sucrose ở nồng độ 10% sẽ cho khối lượng thạch dừa cao nhất. Trong thực tế sản xuất người ta thường sử dụng sucrose do giá thành rẻ và cho năng suất khá cao.

**✚ Sau một thời gian lên men, yêu cầu đối với thạch Dừa cần phải đạt được:**

- ✓ Độ dày (1.5-3 cm).
- ✓ Màu sắc : trắng ngà.
- ✓ Cấu trúc : dai, chắc.



- ✓ Mùi vị : mang mùi trái cây tùy thuộc vào từng loại sản phẩm.



✚ MỘT SỐ SẢN PHẨM SAU KHI CHẾ BIẾN





Như vậy, việc sản Thạch Dừa từ vi khuẩn *Acetobacter xylinum* đã giải quyết được cả 2 vấn đề: góp phần bảo vệ môi trường xử lý các phế thải của các nhà máy chế biến cơm dừa nạo sấy, tăng giá trị của cây dừa nói chung và nước dừa nói riêng. Với sản phẩm này đã đem lại nhiều lợi nhuận cho nhiều hộ nông dân đặc biệt là các công ty chế biến và sản xuất Thạch Dừa với qui mô lớn. Đồng thời đã tận dụng được nguồn nhân công già quyết việc làm cho nông dân địa phương và góp phần đưa ra thị trường những sản phẩm mới làm đa dạng hóa thị trường hơn.

Và vi khuẩn *Acetobacter xylinum* cũng là đối tượng nghiên cứu của các nhà khoa học về đề tài về ứng dụng *Acetobacter xylinum* vào chế tạo nên màng sinh học Bacterial Cellulose (BC). Màng BC vừa có cấu trúc và đặc tính cơ học rất giống với cellulose của thực vật nhưng có thêm một số tính chất hoá lý đặc biệt như: độ bền cơ học, đường kính sợi nhỏ, độ tinh khiết cao, tính đàn hồi lớn, khả năng thấm hút nước nhanh, khả năng polymer hoá lớn. Nhờ những đặc tính độc đáo trên mà màng BC đã được xem là một nguồn polyme sinh học mới, thu hút được sự chú ý của nhiều nhà khoa học trên thế giới và hiện được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực. Trong công nghiệp giấy màng BC được dùng để sản xuất giấy điện tử chất lượng cao. Trong công nghệ môi trường đã sử dụng màng BC làm màng phân tách để xử lý nước (Brown 1989, Choi et.al 2004) và biến đổi độ nhớt của nước (Brown 1989, Jonas và Fonah 1998). Màng này còn dùng làm chất mang đặc biệt cho pin và tế bào năng lượng (Brown 1989). Trong công nghệ thực phẩm người ta đã sử dụng vi khuẩn *Acetobacter xylinum* nuôi trên môi trường nước dừa tạo màng BC để sản xuất thạch dừa nói chung và làm màng nối mạch máu, trị bỏng.../.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Đức Lượng – “ Cơ Sở Vi Sinh Vật Công Nghiệp “- Tập 3 – NXB Đại Học Quốc Gia TP. HCM.
2. Nguyễn Văn Uyển – “ Công Nghệ Sinh Học Và Một Số Ứng Dụng Tại Việt Nam “– Tập 1 – NXB Nông Nghiệp , 1994
3. Kiều Hữu Ảnh – “ Vi Sinh Vật Công Nghiệp “- NXB Khoa Học Và Kỹ thuật.
4. Webside:  
[http://www tailieu.vn](http://www.tailieu.vn)  
[http:// vietsciences.free.fr](http://vietsciences.free.fr) và [http:// vietsciences.net](http://vietsciences.net) Nguyễn Lân Dũng  
[http:// www google.com.vn](http://www.google.com.vn)