

B A O C A O T O N G K E T

NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT DƯỠNG MẬT TINH BỘT
THEO PHƯƠNG PHÁP ENZYME.

MA SỐ : 18 - 01 - 04 - 07

CHƯƠNG TRÌNH CÔNG NGHỆ SINH HỌC

TRUNG TÂM THÔNG TIN TIỂU MÔ
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ QUỐC GIA

KHO LƯU TÀI
CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU

CHỦ NHIỆM ĐỀ TÀI

CƠ QUAN THỰC HIỆN ĐỀ TÀI



CƠ QUAN QUẢN LÝ ĐỀ TÀI



Nguyễn Ngọc Kính

CƠ QUAN CHỦ TRÌ CHƯƠNG TRÌNH

Đoàn giáo dục và đào tạo



PHÓ VỤ TRƯỞNG
KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT

Trần Đình Châu

BỘ CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM

- 1 -

B A O G A O

Kết quả nghiên cứu sản xuất

Đường - Bột tinh bột theo

phương pháp Enzym

0
0) 0

Hồ số : 10.01.04.07

Hoàng hương gửi

Nguyễn Minh Đức

Nguyễn Minh Hạnh

Nguyễn Bích Liên

Mai Thu Hiền

/-/à nội ngày tháng năm 1966

VIỆN TRƯỞNG VIỆN CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM

M U C L U C

	Trang
Tổng quan	2
Đối tượng và phương pháp nghiên cứu	7
Kết quả nghiên cứu	8
1.1. Tuyển lựa giống	8
1.2. Xác định các điều kiện nuôi cấy để thu nhận GA của chủng Asp 70	10
1.3. Một số đặc tính của glucosylase của Asp 70	14
2. Xác định điều kiện kỹ thuật sản xuất glucose bột	18
2.1. Quá trình thủy phân trước	18
2.2. Các điều kiện hoạt động của chủng Asp 70	20
2.3. Quan hệ giữa nồng độ men và độ thủy phân theo thời gian	22
2.4. Xác định điều kiện làm sạch	25
2.5. Kết tinh	27
3. Kết quả thực nghiệm sản xuất glucose bột	29
Quy trình công nghệ	30
Chế độ nhân giống, tỷ lệ giống và ảnh hưởng hoạt lực của giống đến hoạt lực của men GA	31
Kết quả quá trình thủy phân tinh bột	32
Quy trình làm sạch	32
Chu kỳ sản xuất	33
Phân chất sản phẩm	34
Hiệu suất thu hồi	34
Triển vọng khả năng ứng dụng của đề tài	35
4. Kết quả thí nghiệm sản xuất các loại mật tinh bột (glucose nước)	35
Maltedextrine	35
Sirop glucose có DE 38	38
Kết quả đưa vào nấu kẹo	39
Sirop glucose có DE 60-70	40
Một số kết luận chung của đề tài, triển vọng và khả năng áp dụng đề tài	41
Tài liệu tham khảo	43

TỔNG QUAN

Đường GLUCOSE được dùng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm, trong y tế, trong kĩ nghệ rượu, bia, kĩ nghệ đồ hộp và trong sản xuất ra một số các sản phẩm chủ yếu trong công nghiệp lên men.

Trong lịch sử nghiên cứu về men, GLUCOAMYLASE mới được phát hiện từ 10-15 năm nay và là một vấn đề được nhiều nhà nghiên cứu trên thế giới quan tâm đến. Đây là một loại men thủy phân tinh bột trực tiếp đến glucose và được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp đường bột. Hiện nay việc sản xuất glucose bằng cách dùng men glucoamylase đã được sử dụng rộng rãi, thay thế dần cho phương pháp thủy phân bằng acide.

Những năm gần đây kĩ thuật sản xuất glucose có nhiều thay đổi. Sự tiến bộ trong kĩ thuật sản xuất glucose do hai lý do chính :

- Nhu cầu glucose ngày một tăng
- Trên thị trường, trong công nghiệp thực phẩm, y tế đòi hỏi glucose chất lượng ngày một cao.

Dựa vào tác nhân xúc tác trong quá trình thủy phân, tinh bột, ta có hai phương pháp chính sản xuất glucose :

1. Phương pháp acide: dùng acide để thủy phân tinh bột. Phương pháp này được áp dụng từ năm 1920. Dưới tác dụng xúc tác của acide, tinh bột được thủy phân thành alfa-D-Glucose, kết tinh dưới dạng ngậm nước (hydrate với điều kiện nhiệt độ dưới 50°C . Còn trong điều kiện nhiệt độ $50^{\circ}\text{C} - 60^{\circ}\text{C}$) glucose kết tinh dưới dạng glucose không ngậm nước (anhydret).

2. Phương pháp enzym: dùng enzym để thủy phân tinh bột. Quá trình sản xuất glucose theo phương pháp enzym chia làm hai giai đoạn:

- giai đoạn hồ hóa và làm loãng bằng α -amylase
- giai đoạn đường hóa bằng glucoamylase: sản phẩm thu được là đường glucose.

Glucoamylase dùng để sản xuất glucose không có trans-glucoamidase vì khi dùng glucoamidase có lẫn trans-glucoamidase sẽ sinh ra các sản phẩm như: dextrine polymere làm giảm hiệu suất của glucose.

Hiện nay đa số các phòng thí nghiệm và cơ sở sản xuất dùng glucoamylase của nấm mốc chủ yếu là của các chủng *Aspergillus niger*, *Rhizopus*, *Awaneri*...

Một số nơi nghiên cứu glucoamylase từ các chủng *Endomyces* và *Endemicase*. Glucoamylase nguồn gốc từ nấm mốc có tính bền nhiệt cao, nhưng có thể lẫn trans-glucoamidase, loại men có nguồn gốc từ nấm men không chứa men lạ, nhưng không bền với nhiệt và đến nay các nhà nghiên cứu chưa tìm ra chủng nào có hoạt lực cao để có thể đưa ra áp dụng cho sản xuất.

Ngoài hai phương pháp kể trên, người ta còn kết hợp hai phương pháp acide và enzym gọi là phương pháp acide-enzym: phương pháp này, giai đoạn đầu dùng acide, giai đoạn 2 dùng enzym.

Việc thủy phân bằng acide thực hiện đến DE quy định (8 - 12%) sau đó trung hòa và tiếp tục quá trình thủy phân bằng enzym cho đến khi đạt được DE : 97 - 98%.

Theo tài liệu của F. Chirbaus, Postdam Kebuik, CHDC Đức thì phương pháp sản xuất đường glucose bằng phương pháp enzym có những ưu nhược điểm sau :

- 1- Hiệu suất đường hóa cao hơn. Phương pháp acide hiệu suất 87%, phương pháp enzym là 98%.
- 2- Thời gian kết tinh ngắn hơn, kết tinh tốt hơn và khâu vị ngon hơn.
- 3- Đầu tư vào thiết bị ít hơn, thiết bị ít phức tạp vì

không cần thiết chống acide.

4- Hàm độ đường và độ tinh khiết cao hơn (phương pháp acide, glucose chiếm 22%, phương pháp enzym: 98%).

Ở nước ta, hiện nay trong ngành đường mới chỉ sản xuất glucose theo phương pháp acide và sản xuất đường nha bằng nấm mốc. Việc sản xuất theo phương pháp men chưa có nơi nào nghiên cứu hoàn chỉnh.

Để mở rộng nghiên cứu sử dụng men thủy phân tinh bột vào công nghiệp sản xuất đường, bước đầu chúng tôi đặt vấn đề nghiên cứu ứng dụng men glucosidaza có trong nấm mốc nuôi trên môi trường rắn bằng phương pháp bề mặt để sản xuất sirop glucose và glucose bột.

Với mục đích này Viện chúng tôi đã đặt vấn đề nghiên cứu sử dụng men glucosidaza trong việc sản xuất glucose bột và sirop glucose có chứa hàm lượng glucose khác nhau tùy theo yêu cầu của ngành công nghiệp.

- Sirop glucose với DE : 60-70 trong đó hàm lượng glucose chiếm 40 - 45% được dùng trong y học, công nghiệp đồ hộp, làm mứt...

- Sirop glucose với DE : 35 - 40 (glucose chiếm 15-20%) được dùng trong công nghiệp sản xuất bánh kẹo.

Hiêng với vấn đề dùng sirop glucose để sản xuất kẹo là một vấn đề trước mắt cần nghiên cứu thêm. Mặt khác công nghệ bánh kẹo phát triển đòi hỏi một lượng lớn glucose, mặc dù sản xuất từ nấm mốc chưa đáp ứng được yêu cầu kỹ thuật làm kẹo vì hàm lượng glucose và dextrine có trong đường nha còn thấp. Ngoài ra lại còn tốn 1 lượng lớn nấm mốc để nảy men. Nếu dùng sirop glucose sản xuất từ nấm mốc để đạt được hiệu quả kinh tế lớn và tiết kiệm được thức và hạ giá thành sản phẩm.

Glucose bột là sản phẩm thủy phân hoàn toàn tinh bột được dùng rộng rãi trong y học, chăn nuôi và công nghiệp thực phẩm. Glucose bột có thành phần phân tích như sau (dùng tiên cho người và gia súc) :

Glucose	96%
Chỉ số acide	1,1 cc/g
Đào	0,1%
α D	52° - 53°

Ngoài ra glucose bột còn được dùng rộng rãi dưới dạng viên, gluco-calcium, gluco-C...

Sản xuất glucose theo phương pháp enzym hiện nay được coi là một phương pháp tiến bộ và được quan tâm từ những năm 1970. Hai enzym chính được sử dụng là *amylase* (sản xuất từ 1920) và *glucoamylase* (viết tắt là GA) (sản xuất từ 1964-1965). Hai enzym này được một số nước sử dụng như các sản phẩm công nghiệp. Ở nước ta các enzym này đã được quan tâm nghiên cứu trong các phòng thí nghiệm nhằm lựa chọn 1 công nghệ thích hợp từ nguyên liệu thích hợp, có sẵn trong nước, phù hợp với trang thiết bị của ta.

Về α -s của nấm mốc có Lê Ngọc Tú, Lê Văn Chử (trường ĐHK); α -s của vi khuẩn/Đỗ Thị Giang (viện CNTP) nghiên cứu.

Nguyễn

G-A của nấm mốc có/Lân Dũng (trường ĐHTH), Nguyễn Bảo Toàn và cộng sự (Viện CNTP), GA của men có Lê Ngọc Tú (trường ĐHK) nghiên cứu, Phạm Thị Chanh (Viện CNTP) và Nguyễn Văn Lạc (Viện KHTN).

Việc nghiên cứu ứng dụng các men này vào công nghệ sản xuất đường tinh bột đã được áp dụng ở nhiều nước song việc nghiên cứu lựa chọn một công nghệ thích hợp từ nguyên liệu trong nước phù hợp với trang bị kĩ thuật của ta hiện nay là một vấn đề phải giải quyết nhiều mặt.

Từ năm 1961 Viện CNTP được giao nhiệm vụ nghiên cứu sản xuất glucose theo phương pháp enzym. Việc nghiên cứu đã được xác định với các nội dung sau :

- Chọn chủng VSV có khả năng sinh tổng hợp GA cao
- Từ chủng VSV lựa chọn được xác định các điều kiện nuôi để thu nhận GA
- Xác định một số đặc tính của chủng VSV được lựa chọn
- Xác định công nghệ sản xuất glucose
- Thực nghiệm và sản phẩm đưa ra ứng dụng trong thực phẩm và y tế.

Hiện nay ở nước ta chưa có nơi nào sản xuất GA dưới dạng chế phẩm công nghiệp. Việc nghiên cứu đòi hỏi phải nghiên cứu, áp dụng dần từng bước nhằm hoàn chỉnh một quy trình sản xuất glucose từ 2 loại chế phẩm α -a và GA sản xuất trong nước.

Alfa-amylaza và glucoamylaza (GA) có một số tính chất:

- Alfa-amylaza (α -a): phá vỡ các liên kết α -1,4 glucozit tạo thành các dextrine có trọng lượng phân tử nhỏ làm cho độ nhớt tinh bột giảm nhanh và sau dextrine mới phân hủy dần để chuyển thành maltose, isomaltose và dextrane (tốc độ tạo thành dextrose rất chậm).

- Amyloglucosidaza còn được gọi là glucoamylaza (GA) : sự phân cắt các polysaccarit của tinh bột bằng glucoamylaza sẽ dẫn đến một kết quả chủ yếu khác. Loại men này có thể xâm nhập vào các khâu cuối cùng không chuyển hóa được bằng alfa, beta amylaza. Trong khi các men amylaza chỉ phân cắt được các liên kết α -1,4 thì glucoamylaza không những tác dụng được cả với các liên kết α -1,6 mà ngay cả các liên kết

1,6 và liên tiếp tạo thành các phân tử glucose. Sự thủy phân amylose và amylopectin bởi glucoamylaza bắt đầu ở đầu cuối không khử và tiếp tục phân nhỏ cả chuỗi đến khi chúng hoàn toàn bị thủy phân thành glucose (theo "Starch chemistry and technology" - 1965).

Tóm lại, quá trình thủy phân tinh bột sẽ tạo thành glucose được diễn ra như sau :

Men alfa-amylaza phân hủy tinh bột từ đầu làm cho độ nhớt giảm nhanh về sau dextrine mới bị phân hủy dần dần chuyển thành maltose isomaltose và dextrose. Dextrose ở đây được tạo thành do phản ứng của α -1,4 glucosidaza lên maltose, isomaltose và do men α -1,6 glucosidaza tác dụng lên các dextrine phân tử lớn. Vì vậy kết hợp sử dụng men alfa-amylaza và glucoamylaza các polysaccarit sẽ diễn ra với tốc độ nhanh.

Sử phân hủy.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Căn cứ vào tính chất của men và dựa vào yêu cầu của thành phẩm chúng tôi đặt vấn đề như sau :

1- Các chủng nấm mốc mang thí nghiệm được giữ trong ống nghiệm nuôi trong môi trường nước khoai tây, thạch và glucose. Khi mang thí nghiệm được nuôi trên môi trường cám gạo hoặc ngô mảnh bằng phương pháp nuôi bề mặt trong các bình tam giác (thí nghiệm nhỏ) và trên các mảnh (thí nghiệm lớn) cho đến thời điểm sinh tổng hợp men cao nhất, sau đó sấy khô đến độ ẩm 8 - 10%.

- 2- Thí nghiệm được tiến hành tiến 2 quy mô :
- bình lên men, dung tích 0,5 lít,
 - thùng lên men, dung tích 1 m³.

3- Xác định hoạt lực của nấm mốc, chúng tôi áp dụng phương pháp sau : chiết men ở 30°C trong 60 phút, cho tác dụng với tinh bột 2%, pH : 4,5 ; nhiệt độ 40°C trong 30 phút. Sau đó cho dung dịch đường mới được tạo thành phản ứng với dung dịch Fehling. Chuẩn độ dung dịch Fehling còn lại bằng dung dịch glucose 1%. Một đơn vị hoạt lực được định nghĩa như sau : là lượng men trong 1 giờ tạo thành 1 mg glucose.

4- Hoạt lực alfa-amylase : 1 đơn vị hoạt lực alfa-amylase là lượng men dùng để thủy phân 1 mg tinh bột đến dextrine trong thời gian 1 phút.

Hoạt lực glucoamylase là lượng men tạo thành 1 mg glucose trong 1 giờ ở nhiệt độ 45°C và pH 4,5.

Theo dõi quá trình xúc tác của men trên cơ chất bằng sắc ký giấy (dựa theo "Handbook of chromatography" của Gunter Zweig và Joseph Sherman xuất bản năm 1972) và phương pháp xác định DE theo tài liệu của Wray năm 1973. Trị số DE được biểu thị bằng chất khử trực tiếp tính ra dextrose so với hàm lượng chất khô. Trị số này được tính như sau :

$$DE = \frac{CG}{CS} \times 100$$

trong đó : CG : lượng chất khử tính ra glucose

CS : lượng chất khô chứa trong cùng 1 đơn vị thể tích.

- Xác định thành phần đường khử bằng phương pháp Steinhoff.

- Kiểm tra chất lượng thành phần dựa theo phương pháp của Wray Junk BA, Harry Pennoast trong Handbook of sugar xuất bản năm 1973.

Trong các thí nghiệm chúng tôi dùng alfa-amylase của *Bac subtilis* dưới dạng dung dịch và dạng bột.

Glucoamylase của chủng *Asp niger* 70 được thu nhận bằng phương pháp nuôi cấy bề mặt.

KẾT QUẢ NGHIỆM CỤU

1.1. Tuyển lựa giống : Vấn đề được đặt ra là chọn giống nấm mốc thích hợp có hoạt lực cao, pH thích hợp không mang mầm