

Xác định các điều kiện thích hợp cho quá trình thủy phân tinh bột thành nguyên liệu sản xuất Isomalto Oligosaccharides (IMO)

ĐỖ TRỌNG HƯNG, VŨ THỊ THUẬN, NGUYỄN HOÀNG PHI, LƯƠNG THỊ NHƯ HOA, NGUYỄN THÙY LINH

Viện Công nghiệp Thực phẩm

TÓM TẮT

Quá trình thủy phân tinh bột thành nguyên liệu để sản xuất isomalto oligosaccharides (IMO) được thực hiện bằng hai giai đoạn dịch hóa và đường hóa. Giai đoạn dịch hóa bằng enzym α -amylase (Clearflow AA - Genecor) với điều kiện thích hợp: Nồng độ enzym: 0,02% (so với tinh bột); nồng độ tinh bột 25%; thời gian 20 phút; nhiệt độ 90°C; pH 6 - 6,5. Giai đoạn đường hóa bằng enzym β -amylase (Optimal BBA - Genecor) với các điều kiện thích hợp: Nồng độ enzym 0,05% (so với tinh bột); thời gian 2 giờ; nhiệt độ 55°C; pH 6 - 6,5. Kết quả quá trình thủy phân tạo thành dịch tinh bột thủy phân có giá trị DE 30 là nguyên liệu thích hợp cho quá trình sản xuất IMO.

I. MỞ ĐẦU

Isomalto-oligosaccharides là oligosaccharit chức năng có năng lượng thấp chống béo phì, có tác dụng kích thích sự phát triển vi khuẩn đường ruột có lợi, ngăn chặn sự phát triển vi khuẩn gây bệnh, phòng chống bệnh răng miệng, tăng cường hệ thống miễn dịch, tăng cường hấp thu khoáng chất, chống oxy hóa,...

Enzym xúc tác chuyển hóa maltooligosaccharides thành IMO là transglucosidase. Hoạt lực của enzym này thích hợp với dịch tinh bột có mức độ thủy phân (DE) cao. Trong quá trình sản xuất IMO, quá trình dịch hóa và đường hóa tạo cơ chất thích hợp có ảnh hưởng rất lớn đến phản ứng của transglucosidase trong quá trình chuyển hóa tạo IMO. Do vậy việc xác định các điều kiện thích hợp cho quá trình thủy phân tinh bột để tạo ra nguyên liệu cho quá trình sản xuất IMO bằng enzym có ý nghĩa quan

trọng, tăng hiệu quả chuyển hóa và giảm giá thành sản phẩm

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu và hóa chất:

2.1.1. Nguyên liệu: Tinh bột sắn (hàm lượng tinh bột > 85-86%) - Việt Nam, enzym dịch hóa Clearflow AA (α -amylaza), enzym đường hóa optimal BBA (β -amylaza) - Genecor, thiết bị và dụng cụ phòng thí nghiệm

2.1.2. Hóa chất: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$, NaOH, HCl, KOH, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, xanh metylen, dung môi, nước cất cho HPLC, chất chuẩn glucoza, oligosaccharides,...

2.2. Phương pháp phân tích

- Xác định nồng độ chất khô hòa tan (OBx) bằng chiết quang kế Atago (Nhật)
- Xác định pH bằng pH meter Orion (Mỹ)
- Xác định độ nhớt của dịch thủy phân bằng máy đo độ nhớt Brookfield (Đức)
- Xác định DE (đường khử) theo phương pháp phân tích Lane-Eynon
- Xác định thành phần các loại đường glucoza, maltooligosacarit bằng phương pháp HPLC: Cột Inertsil-NH₂ 5 μm , 250x4,6mm ID (GL Science - Nhật Bản), tốc độ dòng 1ml/phút, pha động: Acetonitril : H₂O = 75 : 25,

Bảng 3.1. Xác định nồng độ enzym α -amylase thích hợp

TT	Nồng độ enzym (%)	Nồng độ chất khô hòa tan (Bx)	Độ nhớt (cp)	DE dịch hóa	DE đường hóa
1	0,01	17	25	7,7	17,2
2	0,02	18,5	19	11,8	29,1
3	0,03	19	17	13,3	29,3
4	0,04	19	15	15,2	29,4
5	0,05	19	14	16,5	29,6

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của nồng độ tinh bột trong quá trình dịch hóa

TT	Nồng độ tinh bột (%)	Nồng độ chất khô hòa tan (Bx)	Độ nhớt (cp)	DE dịch hóa	DE đường hóa
1	10	9	10	9,4	18,5
2	15	14	12	10	22,4
3	20	18,5	18	11,7	28,7
4	25	22	20	12,5	29,3
5	30	27	28	12,6	27,5
6	35	31	49	10,4	21,2

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của thời gian trong quá trình dịch hóa

TT	Thời gian (phút)	Nồng độ chất khô hòa tan (Bx)	Độ nhớt (cp)	DE dịch hóa
1	5	19	28	7,9
2	10	21	22	9,9
3	15	21	21	10,7
4	20	21,5	20	12,5
5	25	21,5	20	12,7
6	30	22	20	12,6

detector RI. Hàm lượng IMO được xác định bằng công thức sau:

$$H = T - (G + M)$$

Trong đó: H - Hàm lượng IMO (%), T - hàm lượng đường tổng (%), G - Hàm lượng glucoza (%), M - Hàm lượng maltooligosacarit (%)

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Nghiên cứu xác định các điều kiện thích hợp cho quá trình dịch hóa tinh bột

3.1.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ enzyme trong quá trình dịch hóa

Trong điều kiện nồng độ cơ chất thích hợp, vận tốc phản ứng phụ thuộc tuyến tính với nồng độ enzyme. Vì vậy cần xác định được nồng độ enzyme thích hợp để đạt được mức độ dịch hóa (DE) phù hợp cho quá trình đường hóa sau này.

Thí nghiệm được tiến hành với các nồng độ enzyme α -amylase khác nhau từ 0,01- 0,1% (so với trọng lượng bột), nồng độ tinh bột 20%, nhiệt độ 90°C, thời gian 30 phút, pH 6,5.

Quá trình đường hóa: β -amylase 0,05% (so với hàm lượng chất khô trong dịch), thời gian 3 giờ, nhiệt độ 55°C, pH 6,5.

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ trong quá trình dịch hóa

TT	Nhiệt độ (°C)	Nồng độ chất khô hòa tan (Bx)	Độ nhớt (cp)	DE dịch hóa
1	80	20	28	10,4
2	85	21	22	12,2
3	90	21,5	19	12,5
4	95	21,5	19	11,6
5	100	22	17	8,7

Qua bảng 3.1 cho thấy ở nồng độ enzyme dịch hóa < 0,02% (so với tinh bột), kết quả DE đường hóa đạt thấp hơn so với các mẫu thí nghiệm có nồng độ enzyme 0,02 - 0,05%, cho kết quả DE đường hóa đạt cao nhất và

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của mức độ thủy phân tinh bột đến quá trình chuyển hóa tạo IMO

TT	DE tinh bột thủy phân	DE sau phản ứng	Độ nhớt (cp)	Hàm lượng glucose (%)	Hàm lượng Maltooligosaccharides (%)	Hàm lượng IMO (%)
1	25	32,2	16	4,3	26,4	69,3
2	30	38,6	15	5,8	12,1	82,1
3	35	41,9	14	7,5	9,1	83,4
4	40	48,7	13	10,4	6,0	83,7

tăng không đáng kể. Do vậy chọn nồng độ enzyme dịch hóa là 0,02% là phù hợp nhất, độ nhớt giảm dễ lọc đạt 19 cp, DE dịch hóa đạt 11,8 và DE đường hóa đạt 29,1

3.1.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ tinh bột trong quá trình dịch hóa

Mỗi một loại enzyme đều hoạt động

thích hợp trong một khoảng nồng độ tinh bột nhất định. Thí nghiệm được tiến hành với các nồng độ tinh bột khác nhau. Kết quả dựa giá trị DE để đánh giá mức độ thủy phân

Điều kiện dịch hóa: Nồng độ enzyme dịch hóa: 0,02% (so với tinh bột), thời gian dịch hóa: 30 phút, pH 6,5, nhiệt độ dịch hóa: 90°C

Điều kiện đường hóa: nồng độ enzyme β -amylase: 0,05% (so với hàm lượng tinh bột ban đầu), thời gian 3 giờ, pH 6,5; nhiệt độ: 55°C

Kết quả được thể hiện qua bảng 3.2

Qua bảng 3.2 cho thấy với nồng độ tinh bột 20-25% thì giá trị DE dịch hóa là thích hợp cho giai đoạn đường hóa. Với nồng độ bột cao hơn 30%, mặc dù giá trị DE dịch hóa cao hơn một chút nhưng sau khi đường hóa lại

giảm xuống, điều này có thể giải thích ở nồng độ tinh bột cao dẫn đến độ nhớt cao gây ức chế hoạt động của enzyme. Trong sản xuất tính đến hiệu quả kinh tế thì nồng độ tinh bột tốt nhất là 25%

3.1.3. Xác định ảnh hưởng của thời gian thích hợp trong quá trình dịch hóa

Việc xác định được thời gian dịch hóa ngắn nhất mà đảm bảo được yêu cầu, cho phép tiết kiệm được chi phí trong sản xuất.

Điều kiện dịch hóa: Nồng độ enzyme dịch hóa: 0,02% (so với tinh bột), nồng độ tinh bột: 25%, thời gian dịch hóa được khảo sát từ 5 - 30 phút, pH 6,5, nhiệt độ dịch hóa: 90°C. Kết quả được thể hiện qua bảng 3.3

Qua bảng 3.3 cho thấy thời gian dịch hóa thích hợp nhất là 20 phút và nếu tăng thêm thời gian dịch hóa thì

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của nồng độ enzym trong quá trình đường hóa tạo dịch tinh bột thủy phân có DE 30

TT	Nồng độ enzym (%)	Độ nhớt (cp)	Nồng độ chất khô hòa tan (Bx)	DE
1	0,01	17	21	22,9
2	0,03	15	21,5	28,2
3	0,05	15	22	30,0
4	0,07	15	22	33,1
5	0,09	14	22,5	41,3

giá trị DE dịch hóa tăng không đáng kể, do vậy để tiết kiệm năng lượng, chọn thời gian dịch hóa 20 phút để nghiên cứu tiếp theo.

3.1.4. Nghiên cứu xác định nhiệt độ thích hợp cho quá trình dịch hóa

Theo tài liệu khuyến cáo của nhà sản xuất enzym Genecor cho rằng enzym α -amylase hoạt động trong khoảng nhiệt độ 80-95°C, so với enzym dịch hóa truyền thống khác thì đây là một lợi thế trong sản xuất công nghiệp, tiết kiệm năng lượng và không ảnh hưởng đến màu sắc của dịch đường.

Điều kiện dịch hóa: Nồng độ enzym dịch hóa: 0,02% (so với tinh bột), nồng độ tinh bột: 25%, thời gian: 20 phút, nhiệt độ dịch hóa được khảo sát từ 80 - 100°C, pH 6,5. Kết

quả được thể hiện qua bảng 3.4.

Do enzym có bản chất của protein nên ở nhiệt độ quá cao, protein bị biến tính, làm hoạt tính của enzym giảm. Qua bảng 3.4 cho thấy ở nhiệt độ 90°C là nhiệt độ tốt nhất cho quá trình dịch hóa, DE dịch hóa đạt cao nhất, còn ở nhiệt độ $\geq 90^\circ\text{C}$ tốc độ thủy phân của enzym giảm hẳn, bởi gần tới ngưỡng của nhiệt độ bất hoạt enzym. Do vậy nhiệt độ dịch hóa được chọn là 90°C.

3.2. Nghiên cứu xác định điều kiện thích hợp cho quá trình đường hóa tạo nguyên liệu thích hợp cho quá trình chuyển hóa tạo IMO

3.2.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của mức độ thủy phân tinh bột (DE) đến

quá trình chuyển hóa tinh bột thủy phân thành IMO

Dịch tinh bột sau khi được dịch hóa theo các thông số đã nghiên cứu ở trên, tiến hành đường hóa bằng β -amylase tạo ra các giá trị DE khác nhau. Tiến hành bổ sung enzym transglucosidase L 2000 của hãng Genecor với nồng độ enzym: 0,5%; thời gian phản ứng: 5 giờ; nhiệt độ: 60°C. Kết quả được thể hiện qua bảng 3.5.

Qua bảng trên cho thấy, mức độ thủy phân tinh bột trước khi chuyển sang giai đoạn chuyển hóa tạo IMO bằng transglucosidaza là rất quan trọng, ảnh hưởng đến khả năng hoạt động của enzym và khả năng thu hồi IMO bằng phương pháp sấy phun. Nếu thấp hơn 30 thì không thích hợp cho hoạt động của enzym, nếu DE cao hơn thì hàm lượng IMO tăng không đáng kể và hàm lượng glucoza tăng lên, do đó sẽ khó sấy phun để thu hồi sản phẩm sau này. Do vậy ta lựa chọn giá trị DE của dịch là 30 để nghiên cứu tiếp theo

3.2.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ enzym trong quá trình đường hóa tạo dịch tinh bột thủy phân có DE 30

Mục đích của thí nghiệm là xác định lượng enzym thích hợp đủ để xúc tác phản ứng thủy phân đạt hiệu quả cao nhất, tạo sản phẩm mong muốn. Dịch tinh bột được dịch hóa theo các thông số đã nghiên cứu ở trên. Thí nghiệm được tiến hành với nồng độ enzym β -amylase từ 0,01-0,09% (so với nồng độ tinh bột ban đầu), nhiệt độ 55°C, pH 6,5, thời gian đường hóa 3 giờ. Kết quả được thể hiện qua bảng 3.6.

Qua bảng 3.6 cho thấy với nồng độ enzym 0,05% (so với nồng độ tinh bột ban đầu) kết quả đường hóa đạt giá trị DE theo yêu cầu. Do vậy chọn nồng độ enzym 0,05% để nghiên cứu tiếp theo.

3.2.3. Nghiên cứu xác định thời gian thích hợp trong quá trình đường hóa tạo dịch tinh bột thủy phân có DE 30

Nghiên cứu xác định thời gian đường hóa tối thiểu đạt tiêu chuẩn chất lượng sản phẩm là một thông số kỹ thuật cần thiết, vì nếu kéo dài thời gian đường hóa gây lãng phí năng lượng. Dịch tinh bột được dịch hóa

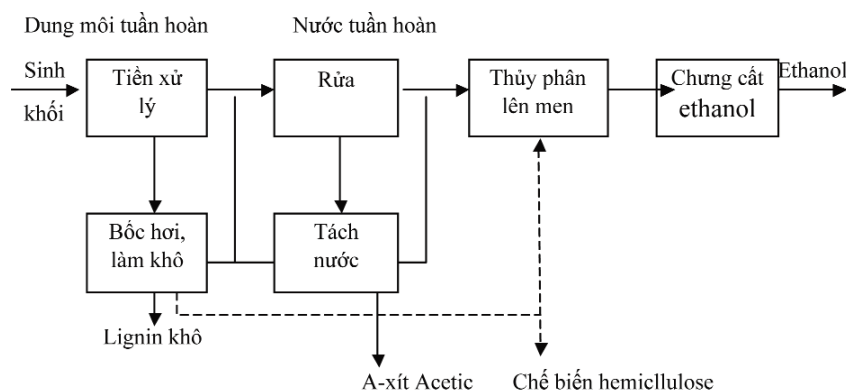
(Xem tiếp trang 48)

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình đường hóa tạo dịch tinh bột thủy phân có DE 30

Thời gian (giờ)	Độ nhớt (cp)	Nồng độ chất khô hòa tan (Bx)	DE
1	16	22,5	27,2
2	15	22,5	30,0
3	15	22,5	30,0
4	12	23,0	32,2
5	12	23,0	33,7

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình đường hóa tạo dịch tinh bột thủy phân có DE 30

TT	Nhiệt độ (°C)	Độ nhớt (cp)	Nồng độ chất khô hòa tan (Bx)	DE
1	45	18	22	20,6
2	50	15	22,5	29,3
3	55	13	22,5	30,0
4	60	16	22	25,5
5	65	16	21	20,1



Hình 1. Sơ đồ công nghệ sản xuất ethanol từ sinh khối của Công ty Chempolis

lò hơi hoặc sử dụng cho các mục đích khác theo sơ đồ nguyên lý trình bày trong hình 1.

Theo công nghệ này, rơm, rạ, bã mía,... được cắt ngắn theo kích thước phù hợp được ngâm trong dung môi đặc hiệu theo tỷ lệ nhất định. Cellulose có trong sinh khối được tách riêng nhờ tác dụng của dung môi đặc hiệu có độ sạch cao sẽ dễ dàng được thủy phân bằng enzyme thành các đường có khả năng lên men cung cấp cho quá trình lên men chuyển hóa thành ethanol. Vì cellulose đã được làm sạch cho nên hiệu quả sử dụng enzyme

trong quá trình thủy phân cũng được nâng lên rõ rệt giúp giảm chi phí sản xuất một cách đáng kể. Lượng dịch còn lại sau khi tách cellulose bao gồm dung môi, lignin, hemicellulose sẽ được đưa sang thiết bị bốc hơi thu hồi dung môi để sử dụng lại. Đây chính là điểm khác biệt của giải pháp do Công ty Chempolis đưa ra so với các công nghệ sử dụng a-xít sunphuric đó là lượng chất thải ra môi trường rất thấp và không phải tốn chi phí cho hóa chất để trung hòa. Hỗn hợp bùn gồm Lignin và hemicellulose sau khi đã thu hồi dung môi được sấy khô, đóng viên sử

dụng để đốt lò hơi hoặc máy phát điện cung cấp cho nhà máy. Về nguyên tắc, công nghệ này cũng cho phép tách hemicellulose ra khỏi lignin để làm nguyên liệu lên men hoặc chế biến thành các sản phẩm khác. Trong quá trình rửa cellulose và bốc hơi thu hồi dung môi, công nghệ của Chempolis còn thu được các sản phẩm trung gian khác như Furfural và a-xít Acetic.

Đánh giá toàn bộ công nghệ của Chempolis có thể thấy toàn bộ vật chất có trong sinh khối sẽ được sử dụng; Lượng dung môi đặc hiệu sử dụng trong quá trình cũng được tuần hoàn tái sử dụng; Việc sử dụng bùn lignin để làm nhiên liệu đảm bảo dây chuyền không cần hoặc sử dụng rất ít năng lượng cung cấp từ bên ngoài đồng thời lượng chất thải của quá trình vô cùng nhỏ; lượng enzyme sử dụng trong toàn bộ quá trình cũng được giảm xuống mức thấp nhất.

Như vậy, ngành công nghiệp sản xuất nhiên liệu sinh học sẽ phát triển bền vững nhờ việc áp dụng các công nghệ mới theo hướng thân thiện với môi trường, sử dụng các nguồn sinh khối rẻ tiền làm nguyên liệu để sản xuất nhiên liệu. ❖

Xác định các điều kiện thích hợp... (Tiếp theo trang 41)

theo các thông số đã nghiên cứu ở trên, DE dịch hóa đạt 12,5.

Điều kiện thí nghiệm đường hóa: nồng độ enzyme 0,05%, nhiệt độ 55°C, pH 6,5, thời gian đường hóa được khảo sát từ 1 - 5 giờ. Kết quả được thể hiện qua bảng 3.7.

Kết quả bảng trên cho thấy, giá trị DE tăng theo thời gian đường hóa, thời gian thích hợp nhất là 2 giờ, nếu kéo dài thời gian đường hóa thì giá trị DE tăng lên nhưng không thích hợp làm nguyên liệu tạo IMO sau này và hao tổn năng lượng. Vì vậy để tiết kiệm chi phí cho sản xuất, ta nên chọn thời gian đường hóa là 2 giờ

3.2.4. Nghiên cứu xác định nhiệt độ thích hợp trong quá trình đường hóa tạo dịch tinh bột thủy phân có DE 30

Nhiệt độ cũng là một yếu tố ảnh hưởng mạnh đến hoạt tính xúc tác của enzyme. Ở nhiệt độ cao phản ứng của enzyme diễn ra càng mạnh, tuy nhiên ở những enzyme kém bền nhiệt thì sẽ làm giảm hoạt lực enzyme rất nhanh chóng khi nhiệt độ phản ứng tăng cao. Mặt khác ưu điểm của loại enzyme kém bền nhiệt là có thể vô hoạt khi nâng nhiệt độ cao, do đó nhiệt độ là yếu tố công nghệ thường được sử dụng để điều tiết phản ứng của enzyme theo chiều hướng mong muốn. Trong thí nghiệm này điều kiện được tiến hành như sau: nồng độ enzyme 0,05%, nhiệt độ được khảo sát từ 40

- 65°C, pH 6,0 - 6,5, thời gian 2 giờ. Kết quả được thể hiện qua bảng 3.8.

Kết quả bảng 3.8 dễ dàng nhận thấy khi nhiệt độ tăng từ 45 - 55°C thì giá trị DE đường hóa tăng lên, sau đó tăng tiếp nhiệt độ > 55°C thì giá trị DE giảm dần. Điều đó chứng tỏ hoạt lực của enzyme mạnh nhất ở nhiệt độ 55°C và bị vô hoạt ở nhiệt độ cao (75°C trong 15 phút). Như vậy đường hóa ở nhiệt độ 55°C là nhiệt độ thích hợp nhất.

IV. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Duan et al. (2010). Grain compositions containing prebiotic Iso-malto-oligosaccharides and methods of making and using same. United State Patent Application publication: US 2010/0056472 A1
2. Qinlu Lin, Huaxi Xiao, Jian Zhao, Lihui Li, Fengxiang Yu, Xing Liu & Xiangxu Cheng (2011). Production of isomalto-oligosaccharide syrup from rice starch using an one-step conversion method. International Journal of Food Science and Technology, 46, 1194-1200
3. Seema Patel, Arun Goyal (2010). Functional oligosaccharides: production, properties and applications. World J. Microbiol. Biotechnol., DOI: 10.1007/s11274-010-0558-5
4. Teruo Nakakuki (2002). Present status and future of functional oligosaccharides development in Japan. Pure Appl. Chem., Vol. 74, No. 7, p. 1245-1251
5. Vercauteren et al. (2000). Method for the production of isomalto-oligosaccharide rich syrups. United State Patent: 6,025,168.