

B.KH&CN
VCNTP

B.KH&CN
VCNTP

B.KH&CN
VCNTP

BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
VIỆN CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM
301 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội

BÁO CÁO TỔNG KẾT KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT

Đề tài cấp nhà nước

**NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ ENZYM
TRONG CHẾ BIẾN
MỘT SỐ NÔNG SẢN THỰC PHẨM
MÃ SỐ: KC 04-07**

Chủ nhiệm đề tài cấp nhà nước: PGS. TS. Ngô Tiến Hiển

Hà Nội, 10 - 2004

Bản quyền:

Đơn xin sao chép toàn bộ hoặc từng phần tài liệu này phải gửi đến Viện trưởng Viện Công nghiệp thực phẩm, trừ trong trường hợp sử dụng với mục đích nghiên cứu.

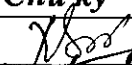
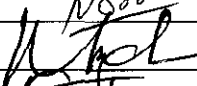
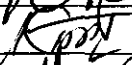
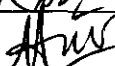
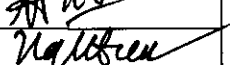
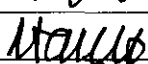
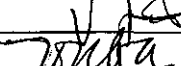
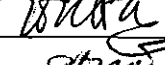
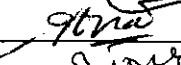
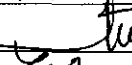
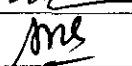
5407
817105

DANH SÁCH TÁC GIẢ CỦA ĐỀ TÀI KH & CN CẤP NHÀ NƯỚC

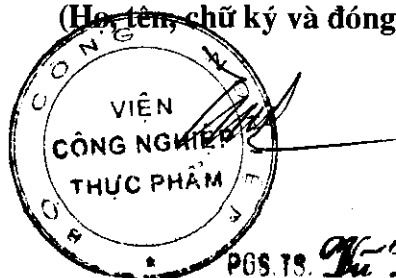
(Danh sách những cá nhân đã đóng góp sáng tạo chủ yếu cho Đề tài
được sắp xếp theo thứ tự đã thỏa thuận)

(Kèm theo Quyết định số 13/ 2004/ QĐ-BKHCN ngày 25/5/2004
của Bộ trưởng Bộ khoa học và công nghệ)

1. Tên Đề tài: **Nghiên cứu ứng dụng công nghệ enzyme trong chế biến một số nông sản thực phẩm. Mã số: KC 04-07**
2. Thuộc Chương trình: **Khoa học công nghệ cấp Nhà nước: "Nghiên cứu khoa học và phát triển công nghệ Sinh học, giai đoạn 2001-2005".**
Mã số: KC 04
3. Thời gian thực hiện: **3 năm từ tháng 10 năm 2001 đến tháng 10 năm 2004**
4. Cơ quan chủ trì: **Viện Công nghiệp thực phẩm**
5. Bộ chủ quản: **Bộ Khoa học và Công nghệ**
6. Danh sách tác giả là Chủ nhiệm đề tài nhánh đã có đóng góp sáng tạo, chủ yếu cho đề tài, được ghi theo thuyết minh, thứ tự nội dung nhiệm vụ và kết quả đề tài.

TT	Học hàm, học vị, họ và tên	Chữ ký
1	TS. Nguyễn Thị Xuân Sâm	
2	TS. Nguyễn Văn Cách	
3	TS. Tô Kim Anh	
4	TS. Trương Nam Hải	
5	PGS. TS. Ngô Tiến Hiển	
6	TS. Nguyễn Thị Minh Hạnh	
7	ThS. Trần Chí Châu	
8	TS. Trịnh Thị Kim Vân	
9	PGS. TS. Trương Thị Hòa	
10	TS. Phan Tố Nga	
11	TS. Lê Việt Nga	
12	TS. Nguyễn Văn Chung	
13	PGS. TS. Đặng Thị Thu	
14	PGS. TS. Vũ Thị Đào	
15	ThS. Đặng Hồng Ánh	
16	ThS. Nguyễn Thúy Hương	

Thủ trưởng cơ quan chủ trì đề tài
Viện trưởng Viện Công nghiệp thực phẩm
(Họ tên, chữ ký và đóng dấu)



PGS. TS. Vũ Thị Đào

BÀI TÓM TẮT

Mục tiêu của đề tài: "*Nghiên cứu ứng dụng công nghệ enzym trong chế biến một số nông sản thực phẩm*" là nhằm nâng cao giá trị chế biến nông sản thực phẩm bằng công nghệ enzym, tạo ra sản phẩm mới có hiệu quả kinh tế, xã hội, khoa học, công nghệ và môi trường.

Phương pháp nghiên cứu: Để thực hiện đề tài, chúng tôi ứng dụng các công nghệ enzym, vi sinh vật và lên men, các phương pháp kỹ thuật gen, hoá học, hoá lý, hoá sinh, hoá phân tích, toán học thống kê... Đó là các phương pháp hiện đại, truyền thống và thông dụng. Đối tượng nghiên cứu của đề tài là các enzym sinh tổng hợp từ vi sinh vật tự nhiên, chủng tái tổ hợp và enzym thương phẩm trong chế biến tinh bột, quả tươi, dầu béo, hạt tiêu, thịt, cá...

Kết quả nổi bật và tính mới của đề tài là:

- 1- Đã tuyển chọn được 13 chủng vi sinh vật tự nhiên mới, đã tạo ra 2 chủng tái tổ hợp ADN, 1 chủng nấm men lai bằng phương pháp Nakatomi. Đã sử dụng các chủng để sinh tổng hợp β -glucosidaza, β -galactosidaza, collagenaza, lipaza, dùng trong lên men nước quả, rượu vang và các ứng dụng chế biến nông sản thực phẩm khác.
- 2- Đã sinh tổng hợp, thu nhận, tinh chế 9 chế phẩm enzym, tạo ra 27 mẫu sản phẩm hàng hoá, xây dựng 22 quy trình công nghệ, 5 mô hình thiết bị, 3 tiêu chuẩn chất lượng sản phẩm, công bố 46 công trình, có 4 Hồ sơ đăng ký Bảo hộ sáng chế và giải pháp hữu ích tại Cục Sở hữu trí tuệ, ký 10 hợp đồng chuyển giao công nghệ, đào tạo 4 Thạc sỹ và 8 Tiến sỹ.
- 3- Đã nghiên cứu hoàn thiện quy trình công nghệ và xây dựng mô hình thiết bị sau đây:
 - + Ứng dụng enzym α -amilaza (Termamyl 120L), amiloglucosidaza (AMG), glucoisomeraza (sweetzym T) để sản xuất sirô fructoza quy mô 2.000 kg/ ngày.
 - + Đã sử dụng 1 số enzym pectinaza để nâng cao hiệu suất trích ly dịch quả, sản xuất nước quả trong, nước quả cô đặc, nước quả lên men và lên men rượu vang.
 - + Đã sử dụng pectinaza (LipozimTM) sản xuất thành công hỗn hợp dầu béo không no và viên nang Hypochol đạt tiêu chuẩn chất lượng theo tiêu chuẩn Dược điển VN III.
 - + Đã sử dụng Termamyl 120L thuỷ phân tinh bột, nâng cao hiệu suất trích ly 8,12% và nâng cao hàm lượng các cấu tử tinh dầu hạt tiêu. Đây là sản phẩm mới đầu tiên ở Việt Nam, hiện đang được triển khai hợp tác sản xuất quy mô 1.000 tấn nguyên liệu/ năm.
4. Sản phẩm rượu vang chất lượng cao đã đạt sản lượng 146.830 lít, vượt trội so với kế hoạch dự kiến ban đầu là 5.000 lít từ các hợp đồng chuyển giao công nghệ (cho Hải Dương, Bắc Giang, Biên Hoà, Quảng Ninh).
5. Đã ký 10 hợp đồng nguyên tắc và chuyển giao công nghệ trị giá 1.353 triệu đồng.

Những kết quả nổi bật trên đây sẽ được trình bày trong Báo cáo Tổng kết khoa học và kỹ thuật, Báo cáo Tóm tắt tổng kết khoa học và kỹ thuật, Báo cáo Thống kê và các báo cáo khác.

TT	MỤC LỤC	Trang
	MỞ ĐẦU	1
I.	TỔNG QUAN	2
1.1.	Enzym β -glucosidaza	2
1.2.	β -galactosidaza	2
1.3.	Colagenaza.	3
1.4.	Nghiên cứu công nghệ và thiết bị chế biến nông sản thực phẩm bằng enzym	4
1.5.	Các enzym tham gia trong quá trình chuyển hoá tinh bột thành fructoza.	5
1.6.	Hoàn thiện công nghệ xử lý nước quả bằng enzym.	7
1.7.	Fructooligosacarit	8
1.8.	Ứng dụng enzym trong sản xuất đồ uống mới	9
1.9.	Ứng dụng α -amylaza trong sản xuất tinh dầu hạt tiêu	10
1.10.	Lipaza	11
1.11.	Ứng dụng enzym trong sản xuất rượu vang	12
II.	NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP	14
2.1.	Chủng vi sinh vật	14
2.2.	Nguyên vật liệu	14
2.3	Enzym	14
2.4.	Phương pháp vi sinh	15
2.5.	Phương pháp công nghệ	15
2.6.	Phương pháp kỹ thuật gen	16
2.7.	Phương pháp hoá lý, hoá sinh, hoá phân tích	17

2.8.	Phương pháp toán học	18
2.9.	Phương pháp kiểm nghiệm	19
2.10.	Phương pháp thử độc tính	19
2.11.	Phương pháp cảm quan	19
2.12.	Thiết bị	19
III.	KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN	21
3.1.	Nghiên cứu thu nhận β -glucosidaza và ứng dụng để tăng hương đồ uống	21
3.1.1.	<i>Tuyển chọn chủng nấm mốc có khả năng sinh tổng hợp β-glucosidaza</i>	21
3.1.2.	<i>Tìm điều kiện tối ưu để sản xuất enzym β-glucosidaza từ A. niger PBC</i>	22
3.1.3.	<i>Xây dựng quy trình thu nhận chế phẩm β-glucosidaza từ A. niger PBC</i>	22
3.1.4.	<i>Nghiên cứu ứng dụng chế phẩm β-glucosidaza để tăng hương cho rượu vang và khử đắng necta mơ.</i>	25
3.2.	Nghiên cứu phân lập và tạo chủng giống bằng kỹ thuật di truyền để sinh tổng hợp Enzym β -galactosidaza có hiệu suất cao.	26
3.2.1.	<i>Phân lập gen mã hoá β-galactosidaza bằng kỹ thuật PCR</i>	26
3.2.2.	<i>Nghiên cứu tạo chủng tái tổ hợp gen mã hóa sinh tổng hợp β-galactosidaza</i>	27
3.2.3.	<i>Nghiên cứu xác định các điều kiện công nghệ sản xuất chế phẩm β-galactosidaza</i>	29
3.2.4.	<i>Ứng dụng chế phẩm enzym β-galactosidaza tái tổ hợp</i>	31
3.3.	Nghiên cứu phân lập, tuyển chọn và tạo chủng giống sinh tổng hợp enzym collagenaza và ứng dụng trong thực phẩm.	32
3.3.1.	<i>Phân lập gen mã hóa sinh tổng hợp collagenaza bằng kỹ thuật PCR</i>	32
3.3.2.	<i>Tìm điều kiện tối ưu để các chủng tái tổ hợp sản xuất enzym hiệu suất cao</i>	34
3.3.3.	<i>Xây dựng quy trình thu nhận chế phẩm collagenaza từ chủng Bacillus subtilis FS-2 tự nhiên</i>	36

3.3.4.	<i>Quy trình tinh chế enzym collagenaza và đặc tính enzym</i>	37
3.3.5.	<i>Nghiên cứu ổn định và bảo quản chế phẩm enzym collagenaza</i>	39
3.3.6.	<i>Nghiên cứu ứng dụng các chế phẩm enzym vào sản xuất</i>	40
3.4.	<i>Công nghệ và thiết bị chế biến nông sản bằng enzym</i>	43
3.5.	<i>Hoàn thiện công nghệ và xây dựng mô hình thiết bị sản xuất siro fructoza từ tinh bột dùng phương pháp enzym glucoisomeraza cố định</i>	44
3.5.1.	<i>Nghiên cứu hoàn thiện các điều kiện công nghệ cho quá trình chuyển hoá tinh bột thành glucoza làm nguyên liệu cho sản xuất sirô fructoza</i>	44
3.5.2.	<i>Nghiên cứu ứng dụng enzym glucoisomeraza cố định để chuyển hoá glucoza thành fructoza</i>	45
3.5.3.	<i>Nghiên cứu các phương pháp làm sạch dịch sirô fructoza 42%</i>	49
3.5.4.	<i>Nghiên cứu thu hồi và bảo quản sirô fructoza 42%</i>	49
3.5.5.	<i>Xây dựng mô hình dây truyền công nghệ và thiết bị sản xuất fructoza 42%.</i>	50
3.5.6.	<i>Ứng dụng sirô fructoza 42 % trong một số sản phẩm</i>	53
3.6.	<i>Hoàn thiện công nghệ xử lý nước quả để sản xuất nước quả trong, nước quả cô đặc sử dụng enzym pectinaza.</i>	56
3.6.1.	<i>Nghiên cứu ứng dụng enzym pectinaza trong trích ly dịch quả ở nhiệt độ thấp:</i>	56
3.6. 2.	<i>Nghiên cứu quá trình làm trong dịch quả ở nhiệt độ thấp</i>	62
3.6.3.	<i>Nghiên cứu sử dụng nước quả đã xử lý enzym để sản xuất nước quả trong, nước quả cô đặc và lên men rượu vang</i>	64
3.6.4.	<i>Nghiên cứu điều kiện thanh trùng bảo quản sản phẩm</i>	71
3.6.5.	<i>Xây dựng mô hình</i>	72
3.6.6.	<i>Chuyển giao công nghệ</i>	73
3.7.	<i>Nghiên cứu công nghệ sản xuất đường chức năng fructo-oligosaccharit bằng công nghệ đa enzym và ứng dụng trong sản xuất thức ăn trẻ em, bánh kẹo và thực phẩm chức năng.</i>	74
3.7.1.	<i>Nghiên cứu lựa chọn và xử lý nguyên liệu, lựa chọn hệ enzym và thiết bị</i>	74

3.7.2.	<i>Nghiên cứu quy trình công nghệ sản xuất đường FOS có độ tinh khiết cao bằng phương pháp enzym.</i>	74
3.7.3.	<i>Nghiên cứu sử dụng đường FOS trong sản xuất bột dinh dưỡng trẻ em và bánh kẹo chức năng</i>	79
3.7.4.	<i>Nghiên cứu thử nghiệm trên cơ thể người để đánh giá giá trị của sản phẩm đường FOS</i>	87
3.8.	<i>Nghiên cứu công nghệ và thiết bị sản xuất đồ uống mới từ hạt nảy mầm, từ rau và nước quả lên men có độ cồn thấp.</i>	89
3.8.1.	<i>Nghiên cứu sản xuất nước uống từ hạt đậu tương nảy mầm và malt đại mạch</i>	89
3.8.2.	<i>Nghiên cứu sản xuất nước uống từ hỗn hợp rau để tạo ra đồ uống mới giàu dinh dưỡng vitamin và muối khoáng.</i>	98
3.8.3.	<i>Nghiên cứu sản xuất nước quả lên men có độ cồn thấp</i>	102
3.9.	<i>Hoàn thiện công nghệ và thiết bị sản xuất tinh dầu và nhựa dầu hạt tiêu xuất khẩu có sử dụng α- amylaza (Termamyl 120L)</i>	110
3.9.1.	<i>Nghiên cứu ứng dụng chế phẩm α- amylaza NOVO Đan Mạch để phân huỷ tinh bột trong hạt hồ tiêu nhằm nâng cao hiệu suất chưng cất.</i>	110
3.9.2.	<i>Làm sạch bã thải trong quá trình sản xuất</i>	112
3.9.3.	<i>Thiết kế xây dựng mô hình dây chuyền công nghệ sản xuất nhựa dầu hạt tiêu xuất khẩu, đạt tiêu chuẩn chất lượng cao</i>	113
3.9.4.	<i>Xác định hiệu quả kinh tế và chuyển giao công nghệ cho doanh nghiệp tại địa phương có vùng nguyên liệu.</i>	115
3.10.	<i>Nghiên cứu ứng dụng enzym lipaza để sản xuất axit béo không no từ dầu thực vật.</i>	116
3.10.1.	<i>Xử lý nguyên liệu trước khi thủy phân</i>	116
3.10.2.	<i>Ứng dụng lipaza cố định để thủy phân dầu ở các điều kiện tối ưu.</i>	117
3.10.3.	<i>Nghiên cứu bảo quản sản phẩm hỗn hợp axit béo không no và Hypochol</i>	118
3.10.4.	<i>Phân tích chất lượng sản phẩm và xây dựng tiêu chuẩn nguyên liệu và sản phẩm</i>	120
3.10.5.	<i>Lựa chọn và thiết kế chế tạo thiết bị thủy phân để sản xuất axit béo</i>	122
3.10.6.	<i>Ứng dụng thử các sản phẩm vào thực phẩm và dược phẩm</i>	123

3.10.7.	<i>Nghiên cứu thu hồi và tái sử dụng enzym</i>	124
3.10.8.	<i>Nghiên cứu sinh tổng hợp thu hồi cố định và ứng dụng lipaza.</i>	126
3.11.	Hoàn thiện công nghệ và thiết bị sản xuất rượu vang chất lượng cao	135
3.11.1.	<i>Nghiên cứu tạo giống nấm men mới bằng kỹ thuật lai ghép tế bào</i>	135
3.11.2.	<i>Ứng dụng enzym pectinaza, pectinex-3XL</i>	137
3.11.3.	<i>Lên men malolactic, làm trong cường bức để rút ngắn thời gian tàng trữ</i>	138
3.11.4.	<i>Ứng dụng kỹ thuật cố định tế bào Leuconostoc oenos LF01</i>	142
3.11.5.	<i>Nghiên cứu hoàn thiện công nghệ lên men rượu vang chất lượng cao và chuyển giao công nghệ cho sản xuất</i>	144
IV.	TỔNG QUÁT HOÁ VÀ ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ THU ĐƯỢC	149
V	KẾT LUẬN	151
5.1.	Nghiên cứu thu nhận chế phẩm β -glucosidaza và ứng dụng trong khai thác hương liệu nhằm tăng hương cho một số loại đồ uống.	151
5.2.	Nghiên cứu phân lập, tuyển chọn và tạo chủng giống bằng kỹ thuật di truyền để sinh tổng hợp enzym β -galactozidaza có hiệu suất cao.	152
5.3.	Nghiên cứu phân lập, tuyển chọn và tạo chủng giống sinh tổng hợp enzym Collagenaza và ứng dụng trong thực phẩm.	152
5.4.	Công nghệ và thiết bị chế biến nông sản bằng enzym.	153
5.5.	Hoàn thiện công nghệ và xây dựng mô hình thiết bị sản xuất siro Fructoza từ tinh bột bằng enzym glucoizomeraza cố định.	154
5.6.	Hoàn thiện công nghệ và xây dựng mô hình thiết bị sản xuất nước quả trong và cô đặc bằng enzym pectinaza.	155
5.7.	Nghiên cứu công nghệ sản xuất đường chức năng fructooligosacharit (FOS) bằng công nghệ đa enzym và ứng dụng trong sản xuất thức ăn trẻ em, bánh kẹo và thực phẩm chức năng.	156

5.8.	Nghiên cứu công nghệ và thiết bị sản xuất đồ uống mới từ hạt nảy mầm, rau và nước quả lên men có độ cồn thấp	156
5.9.	Hoàn thiện công nghệ và thiết bị sản xuất tinh dầu và nhựa hạt tiêu xuất khẩu có sử dụng α -amylaza.	157
5.10.	Nghiên cứu ứng dụng enzym Lipaza để sản xuất axit béo không no và sử dụng trong công nghiệp thực phẩm và dược phẩm.	158
5.11.	Hoàn thiện công nghệ và thiết bị sản xuất rượu vang chất lượng cao.	159
	LỜI CẢM ƠN	160
	TÀI LIỆU THAM KHẢO	161
	PHỤ LỤC	166

DANH MỤC CÁC HÌNH

TT	Tên hình	Trang
Hình 1.	Ảnh hưởng của môi trường khoáng đến hoạt độ enzym β -glucosidaza	22
Hình 2.	Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến quá trình sinh tổng hợp β -glucosidaza	22
Hình 3.	Xây dựng qui trình công nghệ tinh sạch β - glucosidaza từ <i>Aniger</i> PBC.	24
Hình 4.	Ảnh hưởng của chế độ chần mớ tới hoạt độ enzym trong nhân hạt	24
Hình 5.	Ảnh hưởng nồng độ cồn tới hiệu suất thu hồi enzym	24
Hình 6.	Sản phẩm phản ứng cắt vectơ pET-22b(+) và sản phẩm PCR nhân gel lacZ	26
Hình 7.	Sản phẩm PCR nhân đoạn gen <i>lacZ</i> trên gel agarosa 0,8%	27
Hình 8.	ADN plasmid được tách từ các thể biến nạp trên gel agarosa 0,8%	27
Hình 9.	ADN plasmid dòng số 4, 5, 6, 7 trên gel agarosa 0,8%.	28
Hình 10.	Định tính sự biểu hiện gen <i>lacZ</i> trong <i>E. coli</i> BL21 trên môi trường thạch đĩa LB đặc chứa IPTG và X-Gal.	28
Hình 11.	Protein tổng số của dòng <i>E. coli</i> BL21 tái tổ hợp mang gen <i>lacZ</i>	28
Hình 12.	Sản phẩm của công đoạn tinh sạch protein trên gel polyacrylamit 12%	29
Hình 13.	Sự biến đổi hoạt lực enzym của chủng trong quá trình lên men sinh tổng hợp β -galactosidaza từ chủng nấm mốc tự nhiên <i>Aspergillus</i>	30
Hình 14.	Sản phẩm ADN được xử lý bằng enzym hạn chế	32
Hình 15.	Sản phẩm cắt ADN plasmid tách từ ngân hàng gen <i>B. subtilis</i> bằng hai enzym hạn chế <i>HindIII</i> và <i>EcoRI</i> trên gel agarosa 0.8%	33

Hình 16.	Dòng tế bào <i>E. coli</i> tái tổ hợp có khả năng thủy phân collagen	34
Hình 17.	Plasmid tách từ <i>pUCCol</i> trên gel agarosa 0.8%	34
Hình 18.	100% dòng biến nạp lần 2 đều có hoạt tính thủy phân collagen	35
Hình 19.	Kết quả xử lý ADN plasmid bằng các enzym hạn chế	35
Hình 20.	Sơ đồ các enzym hạn chế	36
Hình 21.	Hình 21a. Khuẩn lạc FS-2, Hình 21b. Tế bào FS-2	36
Hình 22.	Sự tổng hợp enzym phụ thuộc polypepton từ gelatin	37
Hình 23.	Động thái tạo thành collagenaza từ <i>B. subtilis</i> FS-2.	37
Hình 24.	Sơ đồ quy trình tinh chế collagenaza từ <i>B. subtilis</i> FS-2.	38
Hình 25.	Điện di đồ của collagenase tinh khiết từ FS2	38
Hình 26.	Quy trình thu hồi chế phẩm collagenaza kỹ thuật.	38
Hình 27.	Tính thủy phân đặc hiệu của collagenaza	40
Hình 28.	Sơ đồ quy trình tạo sản phẩm thịt bò bằng collagenaza.	41
Hình 29.	Mô hình thiết bị dây chuyền sản xuất sirô fructoza	52
Hình 30.	Quy trình công nghệ sản xuất siro fructoza từ tinh bột sắn bằng enzym glucoisomeraza	55
Hình 31.	Sơ đồ quy trình công nghệ sản xuất nước quả trong	65
Hình 32.	Quy trình công nghệ sản xuất nước quả cô đặc từ dịch quả đã xử lý enzym	71
Hình 33.	Ảnh hưởng của pH đến hoạt lực của enzym	75
Hình 34.	Ảnh hưởng của pH đến sự ổn định hoạt lực của enzym	75
Hình 35.	Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt lực của enzym	75
Hình 36.	Đồ phổ HPLC của mẫu trước phản ứng GOD-CAT	77
Hình 37.	Đồ phổ HPLC của mẫu sau phản ứng GOD-CAT	77

Hình 38.	Xác định quy trình sản xuất bột dinh dưỡng trẻ em có bổ sung FOS	80
Hình 39.	Quy trình sản xuất bánh bích quy sử dụng đường FOS	83
Hình 40.	Quy trình sản xuất kẹo cứng sử dụng đường FOS	86
Hình 41.	Sự thay đổi hàm lượng chất ức chế trypsin trong quá trình nảy mầm	91
Hình 42.	Sự thay đổi thành phần stachyoza, rafinoza và chiều dài rễ đậu tương trong quá trình nảy mầm	92
Hình 43.	Quy trình sản xuất đồ uống từ đậu tương nảy mầm	93
Hình 44.	Quy trình công nghệ sản xuất nước uống từ rau	102
Hình 45.	Khuẩn lạc của nấm men LE1, nấm men LE2, thể đơn bội LE2-8, thể petite LE1-r7, nấm men con lai H2 ¹ và nấm men con lai LE15	104
Hình 46.	Các gen M-dsARN và L-dsARN của các chủng nấm men	106
Hình 47.	Quy trình công nghệ sản xuất nước quả lên men có độ cồn thấp	107
Hình 48.	Sơ đồ quy trình công nghệ sản xuất nhựa dầu hồ tiêu sử dụng enzym α -amylaza.	113
Hình 49.	Mô hình thiết bị quy mô xưởng thực nghiệm.	114
Hình 50.	Sự biến đổi chất lượng hỗn hợp axit béo và Hypochol theo thời gian bảo quản	119
Hình 51.	Quy trình công nghệ thủy phân dầu thực vật bằng enzym.	119
Hình 52.	Quy trình công nghệ sản xuất viên nang Hypochol.	122
Hình 53.	Thiết bị thủy phân thực nghiệm dầu béo	125
Hình 54.	Sắc ký đồ tinh sạch lipaza	130
Hình 55.	Hoạt độ lipaza của chủng <i>Bacillus</i> đặc hiệu cho từng cơ chất	132
Hình 56.	Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt độ lipaza	132
Hình 57.	Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính lipaza.	133

Hình 58.	Ảnh hưởng của nồng độ enzym pectinase-3XL đến hàm lượng pectin có trong dịch quả	138
Hình 59.	Ảnh hưởng của nồng độ đường tới OD của chủng LF01	140
Hình 60.	Sơ đồ quy trình công nghệ lên men malolactic nhờ vi khuẩn cố định trong Ca-alginat.	143
Hình 61.	Ảnh hưởng của tỷ lệ men giống đến tốc độ lên men	145
Hình 62.	Ảnh hưởng của pH đến quá trình lên men của chủng Y-7043	146
Hình 63	Quy trình sản xuất vang quả.	148

DANH MỤC CÁC BẢNG

TT	Tên bảng	Trang
Bảng 1.	Ảnh hưởng của nồng độ amonsulfat đến hiệu suất thu hồi β -glucosidaza	22
Bảng 2.	Ảnh hưởng của nồng độ cồn đến khả năng thu hồi β -glucosidaza	23
Bảng 3.	Hiệu suất thu hồi và mức độ làm sạch β - glucosidaza	23
Bảng 4.	Ảnh hưởng của nhiệt độ sấy phun tới hoạt độ enzym	25
Bảng 5.	Ảnh hưởng của nồng độ enzym và thời gian xử lý tới khả năng thuỷ phân amygdalin necta mơ.	25
Bảng 6.	Ảnh hưởng của nồng độ enzym tới khả năng thuỷ phân amygdalin	26
Bảng 7.	Sự biến đổi hàm lượng đường lactoza trong sữa khi xử lý enzym β - galactosidaza tái tổ hợp từ <i>E. coli</i> ATCC 11105	31
Bảng 8.	Tóm tắt các tính chất của collagennaza từ <i>B.subtilis</i>	39
Bảng 9.	Biến đổi hàm lượng NH_2 khi thuỷ phân gân bò bằng collagenaza FS-2.	41
Bảng 10.	Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất đối với quá trình thuỷ phân tinh bột	44
Bảng 11.	Xác định tỷ lệ Termamyl 120L thích hợp nhất cho quá trình dịch hoá	45
Bảng 12.	Xác định tỷ lệ AMG thích hợp nhất cho quá trình đường hoá	45
Bảng 13.	Xác định tốc độ dòng chảy thích hợp	47
Bảng 14	Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất đến hiệu suất chuyển hoá	48
Bảng 15.	Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt lực và độ ổn định của enzym	49
Bảng 16.	Ảnh hưởng của tỉ lệ than hoạt tính tới chất lượng dịch đường	49
Bảng 17.	Ảnh hưởng của bao bì và thời gian bảo quản tới chất lượng siro fructoza 42%.	50

Bảng 18.	Xác định đường kính cột đồng phân mô hình phòng thí nghiệm.	50
Bảng 19.	Các điều kiện kỹ thuật của quá trình chuyển hoá glucoza thành fructoza	52
Bảng 20.	Xác định tốc độ dòng chảy thích hợp chuyển hoá glucoza thành fructoza	52
Bảng 21.	Mô hình cột đồng phân với các công suất thiết kế khác nhau.	53
Bảng 22.	Xác định tỷ lệ mật ong thích hợp cho việc tạo hương	54
Bảng 23.	Ước tính giá thành 1.000 sản phẩm	54
Bảng 24.	Thành phần hoá học một số loại quả ở các độ chín kỹ thuật	56
Bảng 25.	Các tính chất công nghệ của một số loại quả ở các độ chín kỹ thuật	57
Bảng 26.	Thông số xử lý quả bằng hoá chất trước khi ép	60
Bảng 27.	Thông số xử lý quả bằng nhiệt trước khi ép	60
Bảng 28.	Trích ly dịch quả bằng các loại enzym hoạt động ở nhiệt độ thấp	62
Bảng 29.	Đánh giá tỉ lệ SS/A cho sản phẩm nước quả	66
Bảng 30.	Tỉ lệ SS/A phù hợp cho các loại sản phẩm nước quả	66
Bảng 31.	Công thức phối chế cho sản phẩm nước quả trong	67
Bảng 32.	Điểm cảm quan cho các công thức phối chế nước quả	68
Bảng 33.	Công thức tính toán trong quá trình cô đặc	69
Bảng 34.	Xác định áp suất chân không và nhiệt độ cho quá trình cô đặc dịch quả	70
Bảng 35.	Điểm cảm quan sản phẩm nước dứa cô đặc	70
Bảng 36.	Thời gian nâng nhiệt ở các nhiệt độ khác nhau	71
Bảng 37.	Thời gian hạ nhiệt ở các nhiệt độ thanh trùng khác nhau	71
Bảng 38.	Kết quả kiểm tra vi sinh vật các mẫu nước quả đóng chai 250 ml	72
Bảng 39.	Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt động của hệ enzym FTS- GOD/ CAT	78

Bảng 40.	Ảnh hưởng của nồng độ đường đến hoạt động của hệ enzym FTS- GqOD - CAT	78
Bảng 41.	Thành phần đường của dịch sau phản ứng hệ 3 enzym bằng phương pháp đồng thời	78
Bảng 42.	Ảnh hưởng của lượng đường FOS bổ sung vào nguyên liệu ban đầu trước khi ép nổ.	81
Bảng 43.	Thành phần của bột dinh dưỡng trẻ em	82
Bảng 44.	Kết quả đánh giá cảm quan bột dinh dưỡng trẻ em	82
Bảng 45.	Ảnh hưởng của lượng đường FOS bổ sung đến quá trình sản xuất bánh bích quy	83
Bảng 46.	Thành phần của bánh bích quy	84
Bảng 47.	Kết quả đánh giá cảm quan bánh bích quy	84
Bảng 48.	Ảnh hưởng của lượng đường FOS bổ sung đến quá trình sản xuất kẹo cứng	86
Bảng 49.	Thành phần của hai loại kẹo	86
Bảng 50.	Kết quả đánh giá cảm quan của hai loại kẹo	87
Bảng 51.	Ảnh hưởng của thời gian đến hàm lượng các chất dinh dưỡng của hạt đậu tương nảy mầm.	89
Bảng 52.	Ảnh hưởng của nhiệt độ tới thành phần dinh dưỡng đậu tương trong quá trình nảy mầm	90
Bảng 53.	Ảnh hưởng của chế độ thanh trùng đến chất lượng sản phẩm.	93
Bảng 54.	Thành phần dinh dưỡng của nước uống đậu tương nảy mầm tự nhiên và hương hoa quả.	94
Bảng 55.	Sơ bộ tính toán giá thành theo 1000 lít nước uống đậu tương nảy mầm	95
Bảng 56.	Thành phần dinh dưỡng của một số loại quả.	96
Bảng 57.	Hoạt lực lên men trong bình Eihorn của các chủng nấm men.	96
Bảng 58.	Kết quả phân tích chất lượng sản phẩm đồ uống từ đại mạch.	97
Bảng 59.	Chi phí cho 1.000 lít đồ uống từ hạt đại mạch.	98
Bảng 60.	Hiệu suất thu hồi dịch ép cà rốt.	98

Bảng 61.	Hiệu suất thu hồi dịch ép củ cải.	99
Bảng 62.	Thất thoát Vitamin C khi chần rau.	100
Bảng 63.	Kết quả thu hồi dịch ép rau.	100
Bảng 64.	Điểm cảm quan về màu sắc của hai mẫu sản phẩm.	102
Bảng 65.	Chỉ tiêu lý hoá và cảm quan của dịch lên men bởi 3 chủng nấm men LE1, LE1 và K1- V1116.	103
Bảng 66.	So sánh chỉ tiêu hoá lý, vi sinh và cảm quan của dịch lên men của các nguồn nấm men khác nhau trên môi trường nước quả sulfít hoá.	105
Bảng 67.	Sự biến đổi chất lượng sản phẩm của mẫu cider không bổ sung SO ₂ và benzoat natri.	108
Bảng 68.	Đánh giá cảm quan sản phẩm bảo quản bằng benzoat natri.	108
Bảng 69.	Đánh giá cảm quan sản phẩm bảo quản bằng SO ₂ .	108
Bảng 70.	Chỉ tiêu hoá lý và cảm quan của các mẫu cider thành phẩm.	109
Bảng 71.	Ảnh hưởng của enzym α -amylaza đến hiệu suất chưng cất tinh dầu.	110
Bảng 72.	Sự thay đổi tính chất của nước chưng dưới tác dụng của α -amylaza	111
Bảng 73.	Sự thay đổi của nhựa trích ly theo tỷ lệ sử dụng enzym.	112
Bảng 74.	So sánh chất lượng nhựa giữa mẫu dùng enzym và mẫu không dùng enzym	113
Bảng 75.	Sự thay đổi hàm lượng một số cấu tử chính trong tinh dầu hồ tiêu chưng cất khi sử dụng enzym.	113
Bảng 76.	Kết quả sản xuất thử nghiệm nhựa dầu hồ tiêu	115
Bảng 77.	Chỉ tiêu chất lượng của dầu đậu tương thô và tinh chế	116
Bảng 78.	Ảnh hưởng của tỉ lệ phụ gia tới chỉ số axit của dầu đậu tương thuỷ phân	116
Bảng 79.	Ảnh hưởng tốc độ chảy của dầu đến quá trình thuỷ phân	117
Bảng 80.	Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình thuỷ phân	117
Bảng 81.	Ảnh hưởng của thời gian sử dụng Lipozim ^{1M} đến hoạt lực của nó	118

Bảng 82:	Thành phần axit béo của dầu hypochol và nang mềm hypochol	120
Bảng 83:	Bố trí thí nghiệm và kết quả xác định độc tính cấp	120
Bảng 84:	Ước tính giá thành sản phẩm của 100 kg dầu đậu tương thuỷ phân theo phương pháp enzym	124
Bảng 85:	Khả năng hoạt hoá Lipozim ^{1M} sau khi thuỷ phân	124
Bảng 86:	Ảnh hưởng của thời gian nuôi đến sinh tổng hợp lipaza	126
Bảng 87:	Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến quá trình sinh tổng hợp lipaza	126
Bảng 88:	Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến sinh tổng hợp lipaza	127
Bảng 89:	Ảnh hưởng của nồng độ axit palmitic đến hoạt độ lipaza	127
Bảng 90:	Các mức thí nghiệm	128
Bảng 91:	Kết quả tối ưu theo Box - Wilson	129
Bảng 92:	Kết quả lipaza ở các nồng độ etanol khác nhau	129
Bảng 93:	Kết quả tách làm sạch lipaza	130
Bảng 94:	Ảnh hưởng của nồng độ HCl hoạt hoá Nylon-6 đến khả năng cố định lipaza	131
Bảng 95:	Ảnh hưởng của nồng độ glutaraldehyt đến khả năng cố định lipaza	131
Bảng 96:	Ảnh hưởng tỷ lệ dầu: Nước đến khả năng thuỷ phân	133
Bảng 97:	Kết quả đánh giá chất lượng phomat bằng điểm phương pháp cảm quan	134
Bảng 98:	Khả năng tạo bào tử (%) của các chủng nấm men rượu vang	135
Bảng 99:	Ảnh hưởng của thời gian nuôi đến OD của 4 chủng vi khuẩn trên môi trường PL10JR	139
Bảng 100:	HĐML tương đối của sinh khối các loại vi khuẩn sau 3 ngày nuôi trong bình tam giác 500 ml	139
Bảng 101:	Ảnh hưởng của nồng độ cồn đến OD của LF- 01	140
Bảng 102:	Ảnh hưởng của nồng độ axit D,L- malic tới OD của LF- 01	141

Bảng 103.	Ảnh hưởng của nhiệt độ tới sự phát triển của LF- 01	141
Bảng 104.	Dư lượng axit D, L-malic (g /l) sau thời gian phản ứng tại pH khác nhau	142
Bảng 105.	Dư lượng axit D,L- malic sau thời gian phản ứng tại các nhiệt độ khác nhau của các hạt cố định LF01	142
Bảng 106.	Thành phần vang trước và sau khi phản ứng với LF01 cố định trong hạt Ca-alginat	143
Bảng 107.	Các chỉ tiêu chất lượng của sản phẩm.	144
Bảng 108.	Đặt thí nghiệm cho lên men có bổ sung	147
Bảng 109.	Ảnh hưởng của lên men bổ sung sirô nho đến nồng độ cồn của rượu vang.	147
Bảng 110.	Các chỉ tiêu chất lượng sản phẩm chủ yếu của rượu vang	148
Bảng 111	Đánh giá chất lượng rượu vang sản xuất thực nghiệm quy mô 5.000 lít.	148

BẢNG CHỮ VIẾT TẮT

<u>STT</u>	<u>Chữ viết tắt</u>	<u>Chữ viết đầy đủ</u>
1	ADN	Axit deoxiribonucleic
2	AMG	Glucozamlase
3	AOAC	Association of official Analitical Chemists
4	ARN	Axit ribonucleic
5	BSA	Albumin huyết thanh bò
6	CAT	Catalaza
7	CNH	Công nghiệp hoá
8	CNTP	Công nghiệp thực phẩm
9	CMC	Cacboxymetyl cenllulose
10	DE	Dextrose Equivalent
11	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
12	EC 5.3.1.5	D-xylose-keto-isomerase
13	ELISA	Enzyme Linked Immunosorbant Assay
14	EDTA	Etylene diamine tetra acetic acid
15	F	Fructose
16	FOS	Fructooligosacarit
17	FTS	Fructosyltransferase
18	GC	Sắc ký khí
19	GOD	Glucooxydase
20	H _A	Hàm lượng chất khô của dịch quả ban đầu
21	H _C	Hàm lượng chất khô của dịch quả cô đặc
22	HDLC	Cholesterol trong lipoprotein có tỷ trọng cao
23	HĐH	Hiện đại hoá
24	HPLC	Sắc ký lỏng cao áp
25	kb	kilo base
26	KHCN	Khoa học công nghệ
27	LB	Luria- Betani medium
28	HĐML	Hoạt độ malolactic
29	OD	Optical Density

30	PCR	Polymerase Chain Reaction
31	PET	Bao bì chai chai nhựa trong
32	PVPP	Polyidon
33	$Q_{\text{Đường}}$	Tốc độ sử dụng đường
34	$Q_{\text{Cón}}$	Tốc độ sinh cón
35	RAPD	Random Amplified Polymorphism DAN
36	SO_2	Anhydric sulfure
37	SPC	Collagen
38	SS/A	Tỷ lệ đường/ axit
39	T	Transmittance
40	TBBT	Tinh bột biến tính
41	TCVN	Tiêu chuẩn Việt Nam
42	VSV	Vi sinh vật
43	-oza	Tận cùng tên đường
44	-aza	Tận cùng tên enzym
45	Enzym và hoá chất	Viết theo Từ điển Sinh học Anh- Việt, Việt- Anh NXB KHKT, Hà Nội, 1995

THUYẾT MINH ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC & PHÁT TRIỂN CÔNG NGHỆ

I. Thông tin chung về đề tài

1. Tên đề tài <i>Nghiên cứu ứng dụng công nghệ enzym trong chế biến một số nông sản, thực phẩm.</i>	2. Mã số: KC.04.07
3. Thời gian thực hiện: 36 tháng (Từ tháng 9/2001 đến tháng 9/2004)	4. Cấp quản lý NN : x Bộ, Tỉnh CS
5. Kinh phí Tổng số: 3.200.000.000,0 đồng cho 3 năm Trong đó, từ Ngân sách SNKH: 3.000.000.000,0 đồng	
6. Thuộc Chương trình Nghiên cứu khoa học và phát triển Công nghệ sinh học. Mã số: KC.04	
7. Chủ nhiệm đề tài : Họ và tên: Ngô Tiến Hiển Học hàm/học vị: Tiến sỹ sinh học Chức danh khoa học: Nghiên cứu viên cao cấp Điện thoại: (CQ)/ 8585107 và 8584318 Fax: 8584554 Mobile: 0903.419434 E-mail: hien@firi.ac.vn Địa chỉ cơ quan: Viện Công nghiệp thực phẩm, 301 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội Địa chỉ nhà riêng: 309-310, D1, Văn Chương, Đống Đa, Hà Nội	
8. Cơ quan chủ trì đề tài Tên tổ chức KH&CN: Viện Công nghiệp thực phẩm Điện thoại: 858 4318 và 858 5107 Fax: 858 4554 E-mail: hien@firi.ac.vn Địa chỉ: 301 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội	

II. Nội dung KH&CN của đề tài

9	Mục tiêu của đề tài	Nâng cao giá trị chế biến nông sản và thực phẩm bằng các công nghệ mới có hiệu quả kinh tế cao - Áp dụng công nghệ enzym, công nghệ vi sinh vào chế biến nông sản và thực phẩm - Ứng dụng công nghệ sạch, bảo vệ môi trường, tạo sản phẩm đảm bảo theo tiêu chuẩn vệ sinh an toàn thực phẩm - Tạo sản phẩm mới cho xuất khẩu, giảm nhập khẩu, tiết kiệm ngoại tệ và đáp ứng nhu cầu thị trường trong nước. - Giải quyết chế biến nguồn nguyên liệu nông sản thực phẩm trong nước. - Tạo thêm nhiều công ăn việc làm và nâng cao thu nhập cho người lao động
----------	----------------------------	---

12	Nội dung nghiên cứu (liệt kê và mô tả những nội dung cần nghiên cứu, nêu bật được những nội dung mới và phù hợp để giải quyết vấn đề đặt ra, kể cả những dự kiến hoạt động phối hợp để chuyển giao kết quả nghiên cứu đến người sử dụng)
	12.1. Nghiên cứu thu nhận chế phẩm β-glucosidaza và ứng dụng trong việc khai thác hương liệu nhằm tăng hương cho một số loại đồ uống - Phân lập gen, tách dòng gen mã hoá, tạo chủng mới sản xuất β-glucosidaza bằng kỹ thuật PCR - Tìm điều kiện tối ưu để các chủng tái tổ hợp sản xuất enzyme với hiệu suất cao - Xây dựng qui trình thu nhận chế phẩm β-glucosidaza - Nghiên cứu ứng dụng chế phẩm enzyme β-glucosidaza trong việc khai thác hương liệu và tăng hương cho một số loại đồ uống mới 12.2. Nghiên cứu phân lập tuyển chọn và tạo chủng giống bằng kỹ thuật di truyền để sinh tổng hợp enzyme β-galactosidaza có hiệu suất cao - Phân lập gen mã hoá β-galactosidaza bằng kỹ thuật PCR - Nghiên cứu tách dòng gen mã hoá của enzyme β-galactosidaza, biểu hiện các gen sinh tổng hợp enzyme trong các chủng sản xuất, tạo ra các chủng tái tổ hợp sản xuất β-galactosidaza - Nghiên cứu xác định các điều kiện công nghệ thích hợp sản xuất chế phẩm β-galactosidaza - Triển khai ứng dụng ở quy mô xưởng thực nghiệm cho sản phẩm sữa. 12.3. Nghiên cứu phân lập tuyển chọn và tạo chủng giống sinh tổng hợp enzyme collagenaza và ứng dụng trong thực phẩm - Phân lập gen collagenaza bằng kỹ thuật PCR - Tìm điều kiện tối ưu để các chủng tái tổ hợp sản xuất enzyme với hiệu suất cao. - Xây dựng qui trình thu nhận chế phẩm collagenaza - Tinh chế và xác định các đặc tính của các chế phẩm enzyme tinh khiết - Nghiên cứu các điều kiện bảo quản chế phẩm enzyme - Nghiên cứu ứng dụng các chế phẩm enzyme vào sản xuất. 12.4.. Công nghệ và thiết bị chế biến nông sản bằng enzyme - Xác định quy trình công nghệ, điều kiện kỹ thuật thích hợp sản xuất một số sản phẩm mới bằng công nghệ enzyme. - Lựa chọn thiết bị, xây dựng mô hình thiết bị cho các loại sản phẩm của đề tài. - Chuyển giao công nghệ cho sản xuất. 12.5. Hoàn thiện công nghệ và xây dựng mô hình thiết bị sản xuất siro fructoza từ tinh bột bằng phương pháp enzyme glucoisomeraza cố định - Nghiên cứu hoàn thiện công nghệ nâng cao hơn nữa chất lượng glucoza tinh thể, sản phẩm của dự án “Hoàn thiện công nghệ sản xuất glucoza tinh thể bằng phương pháp enzyme” làm nguyên liệu cho sản xuất siro fructoza. - Nghiên cứu ứng dụng enzyme glucoisomeraza cố định để chuyển hoá glucoza thành fructoza. - Nghiên cứu các phương pháp làm sạch dịch siro fructoza 42% - Nghiên cứu thu hồi và bảo quản dịch siro fructoza - Xây dựng mô hình dây chuyền công nghệ và thiết bị phù hợp để sản xuất siro fructoza 42% bắt đầu từ nguyên liệu tinh bột cho đến khâu bảo quản sản phẩm quy mô vừa và nhỏ - Sản xuất và ứng dụng thử nghiệm siro fructoza 42% vào một số sản phẩm thực phẩm, đồ uống. 12.6. Hoàn thiện công nghệ và xây dựng mô hình thiết bị sản xuất nước quả trong và có đặc bằng phương pháp sử dụng enzyme pectinaza, đặc biệt là các enzyme hoạt động ở nhiệt độ thấp. - Nghiên cứu ứng dụng enzyme pectinaza hoạt động ở nhiệt độ thấp cho quá trình trích ly nhằm: Nâng cao hiệu suất trích ly dịch quả từ một số loại quả sau: Dứa, nho, mơ, mận,

- Nghiên cứu ứng dụng enzyme pectinase hoạt động ở nhiệt độ thấp cho quá trình làm trong nhằm: Giảm độ nhớt, tránh hiện tượng tạo màu nâu, tăng tốc độ lọc, loại bỏ các tác nhân gây đục, tạo sản phẩm có độ trong ổn định, song không gây ảnh hưởng xấu đến mùi vị dịch quả
- Sử dụng nước quả đã xử lý để sản xuất nước quả trong, nước quả cô đặc và dùng nước quả đã xử lý enzyme cho lên men rượu vang
- Nghiên cứu các điều kiện bảo quản sản phẩm.
- Xây dựng mô hình sản xuất quy mô công nghiệp
- Chuyển giao công nghệ cho các cơ sở sản xuất

12.7. Nghiên cứu công nghệ sản xuất đường chức năng fructo-oligosaccharit (FOS) bằng công nghệ đa enzyme và ứng dụng trong sản xuất thức ăn trẻ em, bánh kẹo và thực phẩm chức năng

- Nghiên cứu lựa chọn và xử lý nguyên liệu, lựa chọn hệ enzyme và thiết bị.
- Nghiên cứu quy trình công nghệ sản xuất đường FOS có độ tinh khiết cao bằng phương pháp áp dụng công nghệ đa enzyme.
- Nghiên cứu sử dụng đường FOS trong sản xuất bột dinh dưỡng trẻ em và bánh kẹo chức năng
- Thử nghiệm về hoạt tính sinh học (tính chức năng) của các sản phẩm trên cơ thể người.
- Xây dựng mô hình và chuyển giao công nghệ đến các cơ sở sản xuất.

12.8. Nghiên cứu công nghệ và thiết bị sản xuất đồ uống mới từ hạt nảy mầm, từ rau và nước quả lên men có độ cồn thấp

1. *Nghiên cứu sản xuất nước uống từ hạt nảy mầm có tác dụng chống lão hoá và loãng xương, tăng cường tiêu hoá và chống béo phì.*
 - Nghiên cứu tối ưu hoá quá trình công nghệ và thiết bị nảy mầm đậu tương.
 - Nghiên cứu sử dụng enzyme để khử thành phần phân dinh dưỡng antitripxin, histamin và mùi ngái nhằm nâng cao chất lượng dịch chiết đậu tương nảy mầm.
 - Nghiên cứu công nghệ sử dụng enzyme sản xuất nước uống từ đậu tương, hạt vàng, lúa mì và ngô nảy mầm.
 - Xác định các yếu tố công nghệ và thiết bị tối ưu cho quá trình lên men bằng hỗn hợp nấm men và vi khuẩn lactic nhằm tạo ra nước uống có độ cồn thấp, hương vị độc đáo.
 - Nghiên cứu hoàn thiện sản phẩm và điều kiện bảo quản hợp lý.
2. *Nghiên cứu sản xuất nước uống từ hỗn hợp rau để tạo nên đồ uống mới đầy đủ dinh dưỡng, giàu vitamin và muối khoáng*
 - Tối ưu hoá quá trình thu nhận dịch chiết giàu chất dinh dưỡng, vitamin, muối khoáng từ rau bằng công nghệ enzyme.
 - Hoàn thiện công nghệ và sản phẩm đồ uống từ rau.
3. *Nghiên cứu sản xuất nước quả lên men độ cồn thấp*
 - Nghiên cứu quá trình lên men dịch quả đã xử lý bằng enzyme để tạo ra nước quả lên men có độ cồn thấp
 - Hoàn thiện công nghệ và thiết bị sản xuất nước quả lên men có độ cồn thấp
 - Nghiên cứu bảo quản sản phẩm.
 - Xây dựng mô hình và chuyển giao công nghệ cho cơ sở sản xuất.

12.9. Hoàn thiện công nghệ và thiết bị sản xuất tinh dầu và nhựa dầu hạt tiêu xuất khẩu có sử dụng α -amylase

- Nghiên cứu ứng dụng chế phẩm enzyme α -amylase NOVO-Đan mạch để phân huỷ tinh bột trong nguyên liệu hạt tiêu nâng cao hiệu suất chưng cất tinh dầu và trích ly nhựa dầu hạt tiêu.
- Làm sạch bã thải trong quá trình sản xuất.
- Thiết kế xây dựng mô hình dây chuyền công nghệ sản xuất nhựa dầu hạt tiêu xuất khẩu đạt tiêu chuẩn tương đương sản phẩm cùng loại trên thị trường thế giới.
- Xác định hiệu quả kinh tế, chuyển giao công nghệ cho doanh nghiệp tại địa phương có vùng nguyên liệu và phát triển thị trường.

12.10. Hoàn thiện công nghệ và thiết bị sản xuất axit béo không no bằng enzyme lipase

và sử dụng trong công nghiệp thực phẩm và dược phẩm

- Xử lý nguyên liệu trước khi thủy phân.
- Ứng dụng enzym lipaza cố định để thủy phân dầu, nâng cao hiệu suất thu hồi axit béo, xác định chế độ thủy phân tối ưu: Tỷ lệ enzym, nhiệt độ, thời gian, tốc độ□
- Nghiên cứu bảo quản sản phẩm
- Phân tích chất lượng sản phẩm, xây dựng tiêu chuẩn nguyên liệu và sản phẩm
- Lựa chọn và thiết kế chế tạo thiết bị thủy phân phù hợp để sản xuất axit béo
- Ứng dụng thử các sản phẩm vào: Thực phẩm và dược phẩm
- Nghiên cứu thu hồi và ứng dụng phụ phẩm trong quá trình thủy phân (glycerin)

12.11. Hoàn thiện công nghệ và thiết bị sản xuất rượu vang chất lượng cao

- Nghiên cứu tạo giống nấm men mới bằng kỹ thuật lai ghép tế bào trần để có giống nấm men lên men nhanh, chịu được nồng độ cồn cao, tạo ít axit axetic và tạo nhiều hương thơm đặc trưng;
- Ứng dụng các loại enzym pectinaza, cellulaza, hemicellulaza, glucanaza và β -glucosidaza để tăng hiệu suất thu hồi dịch quả, tăng khả năng chiết xuất chất màu, tăng độ trong dịch quả và tăng hương thơm cho rượu vang;
- Lên men malolactic, làm trong cưỡng bức để rút ngắn thời gian tàng trữ ;
- Ứng dụng kỹ thuật cố định tế bào để rút ngắn thời gian lên men và chu kỳ sản xuất
- Nghiên cứu hoàn thiện công nghệ lên men rượu vang đạt nồng độ cồn cao, không dùng cồn để pha chế. Bổ sung enzym trong quá trình lên men để tạo rượu vang có độ trong ổn định.

14	Tiến độ thực hiện			
TT	Các nội dung, công việc thực hiện chủ yếu (Các mốc đánh giá chủ yếu)	Sản phẩm phải đạt	Thời gian (BĐ-KT)	Người, cơ quan thực hiện
1	2	3	4	5
14.1.	Thu nhận chế phẩm enzym β-glucosidaza			
1	Nghiên cứu thu nhận β glucosidaza cao và đặc tính của chúng từ một số chủng vi sinh vật	- Xác định được điều kiện nuôi tối ưu thu nhận β-glucosidaza. - Xây dựng được qui trình tách chiết và tinh chế β-glucosidaza. - Xác định các đặc tính của enzym	10/2001-9/2002	Viện CN Sinh học - CN Thực phẩm- ĐH Bách khoa (V. CNSH-TP)
2	Xác định thành phần heterozit của một số nguồn bã hoa (nhài, bưởi) và một số đồ uống, rượu vang. Nghiên cứu tìm các điều kiện thủy phân thích hợp cho các chế phẩm β -glucosidaza.	Thiết lập mối tương quan giữa các yếu tố của quá trình thủy phân cơ chất heterozit bằng enzym thu được tổ hợp hương hài hoà có khả năng ứng dụng	10/2002-9/2003	- V.CNSH-TP - Viện CNTP
3	Thử nghiệm ở mức pilot		10/2003-	- nt

			9/2004	- XN Bánh kẹo Hà nội
14.2	Thu nhận chế phẩm enzym β-galactosidaza			
1	Tách chiết ADN genom của 3 loài: <i>Rhizobium meliloti</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> và <i>Aspergillus niger</i>	Nhận được ADN genom có độ tinh khiết và phân tử lượng cao.	9/2001 - 9/2002	Viện CNSH, Trung tâm KHTN&CNQG
2	Phân lập gen β -galactosidaza từ <i>Rhizobium meliloti</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i>	Nhận được gen β -galactosidaza	9/2002 - 3/2003	Viện CNSH, Trung tâm KHTN&CNQG
3	Thiết kế vectơ biểu hiện các gen trên trong <i>P.pastoris</i>	Nhận được vectơ biểu hiện gen β -galactosidaza trong <i>P. pastoris</i>	3/2003 - 9/2003	Viện CNSH, Trung tâm KHTN&CNQG
4	Nghiên cứu sự biểu hiện của các gen trên trong <i>P. pastoris</i>	Xác định được điều kiện tối ưu để biểu hiện các gen trên trong <i>P. pastoris</i>	9/2003 - 3/2004	Viện CNSH, Trung tâm KHTN&CNQG
5	Nghiên cứu kỹ thuật tách chiết các enzym tổng hợp được.	Xác định được phương pháp tối ưu để tách chiết enzym β -galactosidaza tinh sạch	9/2003 - 6/2004	Viện CNSH, Trung tâm KHTN&CNQG
6	Ứng dụng β -galactosidaza trong chế biến sữa	Thông số kỹ thuật sử dụng enzym	6/2004 - 9/2004	Công ty sữa Việt nam
14.3	Thu nhận chế phẩm enzym collagenaza			
1	Tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng tổng hợp collagenaza. Định tên vi sinh vật và đăng ký chủng.	Chủng có khả năng sinh tổng hợp collagenaza	9-12/2001	V. CNSH-TP
2	Nâng cao khả năng tổng hợp enzym của nguồn gen tuyển chọn nhờ kỹ thuật tái tổ hợp ADN	Các cơ sở để tạo chủng tái tổ hợp	9/2001 - 9/2003	- V. CNSH-TP - Viện CNSH, TTKHTN & CNQG
3	- Tối ưu hoá các điều kiện ảnh hưởng tới quá trình sinh tổng hợp enzym. - Tinh chế và xác định các đặc tính của chế phẩm collagenaza - Bảo quản chế phẩm enzym	Quy trình thu nhận collagenaza	9/2003 - 6/2004	Viện CNSH-TP, ĐHBK Hà nội;
4	Nghiên cứu ứng dụng collagenaza vào sản xuất thực phẩm	Kết quả nghiên cứu thử nghiệm bước đầu	6/2004 - 9/2004	- Viện CNSH-TP - BV Bạch mai - Viện CNTP

14.4	Nghiên cứu công nghệ và thiết bị chế biến nông sản bằng enzym			
	- Nghiên cứu công nghệ bị chế biến nông sản bằng enzym - Nghiên cứu lựa chọn dây chuyền thiết bị chế biến nông sản	- Có 8 quy trình công nghệ, tạo 8 sản phẩm mới - Có 5 mô hình thiết bị chế biến nông sản quy mô công nghiệp	2001-2004	Viện CNTP
14.5	Sản xuất siro fructoza 42%			
1	Nghiên cứu xử lý tinh bột và nâng cao chất lượng glucoza	Có glucoza đủ tiêu chuẩn chất lượng để tiến hành sản xuất fructoza	9/2001-12/2001	Viện CNTP
2	Nghiên cứu ứng dụng enzym glucoisomeraza để chuyển hoá glucoza thành fructoza	Chọn được loại enzym thích hợp để chuyển hoá glucoza thành fructoza	1/2002-6/2002	Viện CNTP
3	Nghiên cứu xác định các điều kiện kỹ thuật tối ưu cho công nghệ chuyển hoá	Có được các thông số kỹ thuật để sản xuất fructoza 42%	7/2002-12/2002	Viện CNTP
4	Nghiên cứu công nghệ làm sạch dịch siro fructoza	Có được dịch siro fructoza sạch	1-6/2003	Viện CNTP
5	Nghiên cứu khả năng thu hồi và bảo quản siro fructoza	Tìm được phương pháp hiệu quả nhất	7-12/2003	Viện CNTP
6	Nghiên cứu lựa chọn dây chuyền thiết bị để sản xuất siro fructoza	Có được mô hình dây chuyền thiết bị	7-12/2003	Viện CNTP
14.6	Hoàn thiện công nghệ xử lý nước quả để sản xuất nước quả trong, nước quả cô đặc			
1	Nghiên cứu phân tích chất lượng của một số nguyên liệu: dứa, nho, mơ, mận, dâu, táo mèo	Có được các số liệu phân tích thành phần của một số loại nguyên liệu	9-12/2001	Viện CNTP
2	Xác định các thông số kỹ thuật thích hợp cho quá trình trích ly, sử dụng các loại enzym hoạt động ở nhiệt độ thấp của Đan Mạch, Đức, Mỹ Nâng cao hiệu suất trích ly và thu hồi dịch quả	- Xác định được các thông số thích hợp cho quá trình trích ly dịch quả - Hiệu suất trích ly tăng từ 5-30% tùy loại quả	12/2001-3/2002	Viện CNTP
3	Xác định các thông số kỹ thuật thích hợp cho quá trình làm trong dịch quả, sử dụng các loại enzym hoạt động ở nhiệt độ thấp của Đan Mạch, Đức, Mỹ	- Xác định được các thông số thích hợp cho quá trình làm trong dịch quả - Dịch quả có độ trong ổn định	4-12/2002	Viện CNTP
4	Nghiên cứu công nghệ chế biến nước quả trong và nước	Có qui trình công nghệ hoàn chỉnh	1-12/2003	Viện CNTP

	quả cô đặc			
5	Xây dựng mô hình chế biến nước quả trong và nước quả cô đặc	Có dây chuyền sản xuất thử nghiệm	1-9/2004	Viện CNTP
14.7	Sản xuất đường fructooligosacarit			
1	Nghiên cứu qui trình công nghệ sản xuất đường chức năng FOS có độ tinh khiết cao bằng phương pháp đa enzym.	Đưa ra được sản phẩm đường FOS có độ tinh khiết cao (> 75 %)	10/2001 - 12/2002	Viện CNTP
2	Nghiên cứu sử dụng đường FOS trong sản xuất thức ăn trẻ em	Đưa ra được quy trình sản xuất bột dinh dưỡng trẻ em	12/2002 - 7/2003	Viện CNTP
3	Nghiên cứu sử dụng đường FOS trong sản xuất bánh kẹo, chống sâu răng, chống béo phì và cho người mắc bệnh tiểu đường	Đưa ra được quy trình công nghệ.	12/2002 - 7/2003	Viện CNTP
4	Thử nghiệm trên cơ thể người để đánh giá giá trị của sản phẩm.	Lấy được các thông số đánh giá và ý kiến người tiêu dùng.	7/2003 - 5/2004	Viện CNTP
14.8	Sản xuất đồ uống mới			
1	Nghiên cứu quy trình và thiết bị thích hợp cho sản xuất đậu tương và ngô nảy mầm	Xác định công nghệ và thiết bị phù hợp sản xuất đậu tương và ngô nảy mầm	9/2001 - 12/2001	Viện CNTP
2	Nghiên cứu công nghệ thu hồi dịch chiết đậu tương và ngô nảy mầm.	Xác định được qui trình công nghệ thu hồi các chất dinh dưỡng	12/2001 - 6/2002	Viện CNTP
3	- Nghiên cứu công nghệ sản xuất nước uống từ đậu tương nảy mầm - Nghiên cứu tuyển chọn chủng nấm men, công nghệ và thiết bị lên men cố định tế bào nấm men nhằm tạo ra 1 loại đồ uống có độ cồn thấp có hương vị độc đáo và ổn định - Sử dụng nấm men lên men dịch quả trong đã xử lý bằng enzym để tạo nước quả lên men có độ cồn thấp - Sử dụng enzym trong chế biến đồ uống giàu dinh dưỡng từ rau	- Đưa ra công nghệ sản xuất nước uống đậu tương nảy mầm - Tuyển chọn được các chủng nấm men và vi khuẩn lactic. - Xác định các thông số kỹ thuật của công nghệ và thiết bị lên men cố định tế bào. - Xác định được thông số kỹ thuật cho quá trình lên men - Xác định được thông số kỹ thuật của công nghệ và thiết bị	1/2003 — 5/2003	Viện CNTP
4	Nghiên cứu sản xuất thực nghiệm 2 loại đồ uống mới	Dự kiến sản xuất khoảng 15.000 lít đồ	1/2003 - 5/2003	Viện CNTP

	từ hạt nảy mầm và nước quả lên men có độ cồn thấp.	uống mới các loại nhằm tiếp cận thị trường.		
5	Chuyển giao công nghệ các loại đồ uống mới	Chuyển giao được công nghệ mới cho các đối tác có nhu cầu.	6/2003 - 1/2004	Viện CNTP
14.9	<i>Nghiên cứu ứng dụng chế phẩm enzyme α-amylaza nâng cao hiệu suất chưng cất tinh dầu và trích ly nhựa dầu hồ tiêu xuất khẩu</i>			
1	Nghiên cứu ứng dụng chế phẩm enzyme α -amylaza vào quá trình chưng cất và trích ly nhựa dầu hồ tiêu	Nâng cao được hiệu suất trích ly	01/2002 - 06/2002	Viện CNTP
2	Nghiên cứu enzyme α -amylaza trong quá trình làm sạch bã thải	Xác định thông số kỹ thuật làm sạch bã thải và nước thải	07/2002 — 12/2002	Viện CNTP
3	Xây dựng dây chuyền công nghệ sản xuất nhựa dầu hồ tiêu 20kg sản phẩm /ngày	Xây dựng được mô hình thiết bị	01/2003 - 12/2003	Viện CNTP
4	Sản xuất và bán sản phẩm. Giới thiệu và chuyển giao công nghệ	Sản phẩm thực nghiệm. Chuyển giao công nghệ cho các cơ sở sản xuất	01/2004 - 9/2004	Viện CNTP
14.10	<i>Nghiên cứu ứng dụng enzyme lipaza để sản xuất axit béo không no từ dầu thực vật</i>			
1	Xử lý nguyên liệu trước khi thủy phân	Xác định chế độ xử lý nguyên liệu phù hợp	9 — 12/ 2001	Viện CNTP
2	Hoàn thiện công nghệ: Xác định các điều kiện tối ưu để nâng cao hiệu suất thủy phân dầu thành axit béo, tái sử dụng enzyme và thu hồi glycerin	Chọn được công nghệ tối ưu, hiệu suất thủy phân cao, thu hồi sản phẩm phụ, tái sử dụng enzyme.	11/ 2001 — 11/ 2002	Viện CNTP
3	Phân tích chất lượng sản phẩm, xây dựng tiêu chuẩn nguyên liệu và sản phẩm	Xây dựng được tiêu chuẩn nguyên liệu và sản phẩm cho thực phẩm và dược phẩm.	12/ 2002 — 6/ 2003	Viện CNTP
4	Nghiên cứu bảo quản sản phẩm axit béo và các sản phẩm từ dầu thủy phân	Xác định được thời gian và điều kiện bảo quản sản phẩm	6/ 2003 — 6/ 2004	Viện CNTP
5	Lựa chọn thiết bị thủy phân	Xây dựng mô hình thiết bị	3 - 6/ 2004	Viện CNTP
6	Ứng dụng thử các sản phẩm vào: Thực phẩm và Dược phẩm	Chất lượng sản phẩm đạt tiêu chuẩn có thể ứng dụng cho thực phẩm và dược phẩm	6-9/2004	Viện CNTP
14.11	<i>Sản xuất vang trái cây chất lượng cao</i>			
1	Sưu tập , phân lập tuyển chọn lai tạo giống nấm men với các đặc tính quý. Nghiên	Có giống nấm men lên men nhanh chịu cồn cao, sinh nhiều	9- 12/2001	Viện CNTP

	cứu sản xuất nước quả cho lên men rượu vang bằng enzym	hương thơm, có qui trình chế biến nước quả chất lượng cao		
2	Tiến hành lên men vang ở phòng thí nghiệm nhờ nấm men và vi khuẩn tự do hoặc cố định	Có qui trình lên vang chất lượng cao nhưng ngắn ngày	1-12/2002	Viện CNTP
3	Nghiên cứu công nghệ bổ sung enzym trong quá trình lên men rượu vang.	Tạo độ trong cho rượu vang	1-6/2003	Viện CNTP
4	Tiến hành lên men ở thùng lên men 3000-5000 lít và chuyển giao công nghệ	Có qui trình và mô hình thiết bị sản xuất vang ngắn ngày.	7/2003 - 3/2004	Viện CNTP
Tổng kết, nghiệm thu đề tài			11/2004	

Kết quả của đề tài

15. Dạng kết quả dự kiến của đề tài

I	II	III
♦ Mẫu (model, maket) ♦ Sản phẩm (x) ♦ Vật liệu ♦ Thiết bị, máy móc ♦ Dây chuyền công nghệ (x) ♦ Giống cây trồng ♦ Giống gia súc ♦ Giống vi sinh vật (x)	♦ Quy trình công nghệ (x) ♦ Phương pháp ♦ Tiêu chuẩn ♦ Quy phạm	♦ Sơ đồ ♦ Bảng số liệu ♦ Báo cáo phân tích ♦ Tài liệu dự báo ♦ Đề án, quy hoạch triển khai ♦ Luận chứng kinh tế-kỹ thuật, nghiên cứu khả thi ♦ Chương trình máy tính ♦ Khác (bài báo, đào tạo NCS, SV...) (x)

16	Yêu cầu khoa học đối với sản phẩm tạo ra (đối với sản phẩm loại III)					
TT	Tên sản phẩm		Yêu cầu khoa học			Chú thích
1	2		3			4
1	Đào tạo Nghiên cứu sinh		Đào tạo 5 NCS			
2	Đào tạo Thạc sĩ		Đào tạo 10 thạc sĩ			
3	Đào tạo kỹ sư		Đào tạo 30 kỹ sư			
4	Bài báo chuyên môn		Có 30 bài báo giá trị khoa học cao			
17.1	Thu nhận chế phẩm enzym β -glucosidaza					
	Chủng vi sinh cao sản β -glucosidaza	U/ml dịch nuôi cấy	0,05	Chưa có	0,1	1
17.2	Thu nhận chế phẩm enzym β -galactosidaza					
	Chủng vi sinh cao sản β -galactosidaza	U/ml dịch nuôi cấy	5	Chưa có	10	2

17.3	Thu nhận chế phẩm enzym collagenaza					
	Chủng vi sinh vật sinh tổng hợp collagenaza	Chủng		Chưa có	Có	1
17.4	Siro fructoza 42%					
	Màu sắc:		Vàng sáng, trong	Chưa có	Vàng sáng, trong	
	Mùi vị:		Vị ngọt, không mùi		Vị ngọt, không mùi	
	Chất khô :	%	70		70	
	Trong đó:					
	Fructoza:	%	42		42	
	Glucosa :	%	55		55	
	Độ ẩm:	%	30		30	
	Tro:	%	0,3		0,3	
17.5	Nước quả tươi					
1	Nước quả trong:					
	- Dịch quả nguyên chất:	%	20	15	20	
	- Đường:	%	10-12	10-12	10-12	
	- pH:	mg%	3-4	3-4	3-4	
	- Vitamin C:		20	-	20	
2	Nước quả cô đặc					
	- Nồng độ chất khô:	°Bx	60	55	60	
	- Đường:	%	50	50	50	
	- axit:	%	1,2	1,2	1,2	
	- Vitamin C:	mg%	100	-	100	
3	Nước quả dùng cho lên men rượu vang			Chưa có		
	- Dịch quả nguyên chất	°Bx	18		18	
	- Đường	%	13		13	
17.6	Sản xuất đường fructooligosacarit					
1	Sản phẩm đường FOS			Chưa có		
	Tổng đường FOS	%	75		75	1000
	Đường sacaroza	%	13		13	
	Đường glucoza	%	12		12	
2	Sản phẩm bánh bích quy chức năng			Chưa có		500
	Protein	%	6.3		6.3	
	Lipid	%	3.9		3.9	
	Gluxit	%	68.5 —		68.5 —	
	Đường FOS	%	65.5 — 5-8		65.5 — 5-8	
3	Sản phẩm kẹo chức năng			Chưa có		500
	Protein	%	2.5		2.5	
	Lipid	%	4.9		4.9	
	Gluxit	%	70 — 75		70 — 75	
	Đường FOS	%	5 -10		5 -10	
4	Sản phẩm bột dinh dưỡng trẻ em có sử			Chưa có		1000

	dụng đường FOS.					
	Protein	%	12.5		12.5	
	Lipid	%	4.5		4.5	
	Gluxit	%	65		65	
	Đường FOS	%	5-10		5-10	
17.7	Sản xuất đồ uống mới					
1	<i>Newsoyvitam</i>			Chưa có	Chưa có	
	Nước	%	85-90			
	Protein	%	1-2			
	Lipit	%	0,5-1			
	Hydrat cacbon	%	8-10			
	Canxi	µg/l	5-10			
2	<i>Newcovitan</i>			Chưa có	Chưa có	
	Nước	%	85-90			
	Protein	%	1-2			
	Lipit	%	0,5-1			
	Hydrat cacbon	%	2-5			
	Cồn	%	1,5-2,5			
	Axit lactic	g/l	3-5			
3	<i>Nước uống từ rau</i>			Chưa có	Chưa có	
	- Chất béo tổng	g	0			
	- Chất béo bão hoà	g	0			
	- Colesterol	mg	0			
	- NaCl	g/l	9			
	- Axit xitric	g/l	0,6			
	- Sacaroza	g/l	12			
	- K	mg/100	180,7			
	- Na	g	288,2			
	- Ca	mg/100	15,2			
	- Fe	g	0,41			
	- β- caroten	mg/100	14,0			
	- Hydrat cacbon	g	1,23			
		mg/100				
		g				
		mg/kg				
		%				
4	<i>Nước quả lên men độ cồn thấp</i>			Chưa có		
	- Cồn	%v/v	5-5,6		5-5,6	
	- Đường sót	g/l	20-30		20-30	
	- axit (theo axit lactic)	g/l	2,7-3,1		2,7-3,1	
	- Aldehyt	g/l	0,034-		0,034-	
	- Etylaxetat	g/l	0,037		0,037	
	- Metanol	%v/v	0,009-		0,009-	
	- Propanol	g/l	0,011		0,011	
	- Izobutanol	g/l	0,0011-		0,0011-	
	- Izoamylic	g/l	0,0026		0,0026	
			0,004-		0,004-	
			0,030		0,030	
			0,010-		0,010-	
			0,012		0,012	
			0,029-		0,029-	
			0,037		0,037	

17.8	Quy trình công nghệ sản xuất nhựa dầu hồ tiêu					
1	Nhựa dầu hồ tiêu Hàm lượng piperin Ion kim loại	% phần triệu	45 < 30	Chưa có	45 < 30	50 kg
2	Tinh dầu hồ tiêu Chỉ số khúc xạ (n_d^{20}) Chỉ số quay cực		1.4795— .4880 (-1) - (-23)	Chưa có	1.4795 — 1.4880 (-1)-(-23)	20 lit
17.9	Sản xuất axit béo không no					
1	Hỗn hợp axit béo không no dạng lỏng. - ẩm - Chỉ số axit - Tạp chất - Peroxyt	% mg KOH % % I_2	0,05 >100 0 0,02 — 0,03	Chưa có	0,05 >100 0 0,02 — 0,03	
2	Viên nang: - Trọng lượng - Độ rã - Thời gian bảo quản	mg Phút Tháng	170 — 200 7 24	Chưa có	170 — 200 7 24	
17.10	Sản xuất rượu vang chất lượng cao					
1	Nấm men rượu Khả năng chịu cồn	%	15-17	13-15	17-20	01
2	Vi khuẩn Leuconostoc Khả năng chịu cồn	%	13-15	Chưa có	13-15	01
3	Quy trình lên men vang ngắn ngày	bản				01
4	Rượu vang chất lượng cao - Hàm lượng ethanol (đo ở 20°C) - Đường khử - Axit chuẩn - pH - SO_2 - Độ trong - Vị Chỉ tiêu vi sinh - Tổng số vi khuẩn hiếu khí không lớn hơn - E. coli - Cl. Perfringens - St. aureus - nấm men, mốc	%v/v % g/l mg/l KL/ml TS/ml TS/ml TS/10ml TS/ml	13-14 1-2 4,0-4,5 3,5-4,5 30 Trong suốt Chát 100 không có không có không có	13-14 1-2 4,0-4,5 3,5-4,5 30 Trong suốt Chát 100 không có không có không có	13-14 1-2 4,0-4,5 3,5-4,5 30 Trong suốt Chát 100 không có không có không có	5000 lít

Kinh phí thực hiện đề tài và nguồn kinh phí (giải trình chi tiết xin xem phụ lục kèm theo)

Đơn vị tính: Triệu đồng

23	Kinh phí thực hiện đề tài phân theo các khoản chi (3 năm)						
TT	Nguồn kinh phí	Tổng số	Trong đó				
			Thuê khoán chuyên môn	Nguyên,vật liệu, năng lượng	Thiết bị, máy móc	Xây dựng, sửa chữa nhỏ	Chi khác
1	2	3	4	5	6	7	8
	Tổng kinh phí	3200	1120	1.200	375,68	150,4	353,92
	Trong đó:						
1	Ngân sách SNKH	3000	1.120	1.200	275,68	100,4	303,92
2	Các nguồn vốn khác						
	- Tự có						
	- Khác (vốn huy động, ...)	200			100	50	50

**BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
VIỆN CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM
301 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội**

**BÁO CÁO TỔNG KẾT
KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT**

**Đề tài cấp Nhà nước
NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG
CÔNG NGHỆ ENZYM
TRONG CHẾ BIẾN
MỘT SỐ NÔNG SẢN THỰC PHẨM
MÃ SỐ: KC 04-07**

Chủ nhiệm đề tài cấp nhà nước: PGS. TS. Ngô Tiến Hiến

Hà Nội, 10 - 2004

Tài liệu này được chuẩn bị trên cơ sở kết quả thực hiện đề tài cấp Nhà nước, Mã số: KC 04 - 07

MỞ ĐẦU

Ngày nay, công nghệ enzym trên thế giới và khu vực được ưu tiên phát triển ở trình độ cao ngang tầm cùng với các lĩnh vực công nghệ tiên tiến khác. Quá trình sinh tổng hợp enzym với xuất siêu cao chủ yếu là nhờ các chủng vi sinh vật tái tổ hợp ADN và khai thác tiềm năng từ các chủng giống và nguồn gen thiên nhiên. Enzym được sản xuất ở quy mô công nghiệp, bằng các thiết bị hiện đại, liên tục, tự động hóa, sử dụng những thành tựu của công nghệ thông tin để điều khiển các quá trình sản xuất. Đã có nhiều thành tựu về quá trình tối ưu sinh tổng hợp, thu hồi, làm sạch, nâng cao nồng độ, hoạt tính, chất lượng enzym và mở rộng khả năng ứng dụng trong sản xuất và đời sống, đem lại nhiều quả kinh tế, xã hội, khoa học, công nghệ và môi trường. Để đáp ứng các yêu cầu công nghệ, những thế hệ thiết bị mới ra đời và ngày càng hoàn thiện. ứng dụng công nghệ enzym được mở rộng, tạo ra các sản phẩm mới đáp ứng yêu cầu ngày càng cao của thị trường. Ở nước ta, trong những năm gần đây, đã có nhiều cơ quan nghiên cứu khoa học và công nghệ, giáo dục và đào tạo, nhiều cơ sở sản xuất quan tâm nghiên cứu, phát triển công nghệ enzym. Đã có một số kết quả nghiên cứu về khoa học cơ bản và ứng dụng công nghệ enzym trong sản xuất. Đóng góp vào sự nghiệp đó, đề tài nghiên cứu ứng dụng công nghệ enzym trong chế biến một số nông sản thực phẩm giải quyết được một số nội dung sau đây:

1. Phân lập, sưu tập, tuyển chọn, xác định trên một số vi sinh vật tự nhiên và tạo một số chủng nấm men lai, chủng vi khuẩn mới tái tổ hợp ADN mang gen mã hoá sinh tổng hợp enzym suất cao, nghiên cứu tối ưu hoá quá trình sinh tổng hợp, thu nhận, làm sạch, nâng cao hoạt tính và ứng dụng enzym trong chế biến nông sản thực phẩm sau đây: β - glucosidaza, β - galactosidaza, collagenaza, α -amilaza, glucoamilaza, glucoisomeraza, pectinaza, fructosiltransferaza và lipaza.

2. Các sản phẩm mới của đề tài là các chế phẩm enzym có hoạt tính cao, các quy trình công nghệ, mô hình thiết bị, đào tạo và chuyển giao công nghệ cho sản xuất, các báo cáo khoa học, các sản phẩm hàng hoá mới được sản xuất bằng công nghệ enzym: Sirô fructoza, các loại nước quả tươi, các sản phẩm đồ uống mới từ hạt nảy mầm, từ rau và nước quả tươi, đường chức năng, dầu thực vật giàu axit béo không no và rượu vang.

Chúng tôi hi vọng rằng: Những kết quả về khoa học và công nghệ của đề tài, sẽ góp phần nâng cao quả nghiên cứu, đào tạo và ứng dụng công nghệ enzym trong chế biến ngày càng nhiều nông sản và thực phẩm.

I. TỔNG QUAN

1.1. Enzym β - glucosidaza: (EC.3.2.1.21) còn có tên xenlobiaza và gentiobiaza, là enzym thuỷ phân các liên kết 1,4- β -D-glucosid ở tận cùng đầu không khử của chuỗi glucosit để giải phóng ra β -D-glucosa. β - glucosidaza đóng vai trò quan trọng trong quá trình thuỷ phân các heterosit, giải phóng gốc monotecpen khỏi gốc đường làm tăng đáng kể các cấu tử thơm trong quá trình lên men sản xuất rượu vang và dịch quả [22 và 63]. β - glucosidaza còn có khả năng phân cắt liên kết trong các chất gây đắng có bản chất là các glucosit (amigdalín) trong một số loại quả tươi chủ yếu là họ citrus. β -glucosidaza có thể được sinh tổng hợp bởi nhiều loại vi sinh vật khác nhau bao gồm vi khuẩn, nấm men, nấm mốc và xạ khuẩn và cũng được thu nhận từ thực vật. Chế phẩm β - glucosidaza từ *A.kawachii* được tách bằng đệm axetat pH 5,0 với 3 enzym chitinaza, yatalaza và zymolyasa. Kết tủa bằng amonsunfat, điện di trên gel polyacrylamit SDS sẽ thu được chế phẩm tinh khiết [27]. Còn β - glucosidaza của *A.niger* được tách chiết bằng đệm axetat pH 5,0 sau đó được kết tủa bằng amonsunfat 90% độ bão hoà và được tinh chế tiếp tục bằng sắc ký trao đổi ion [35]. Người ta bảo quản enzym dưới dạng bột bằng phương pháp đông khô để loại bỏ hơn 95% nước ra khỏi protein enzym, do đó đây là một phương pháp bảo quản rất đáng quan tâm bởi những tiện ích của nó.

1.2. β - galactosidaza (E.C. 3.2.1.23) còn gọi là β -D-galactoside và β -galactohydrolaza, là enzym thuỷ phân lactoza thành hai đường glucoza và galactoza, xúc tác phản ứng thuỷ phân các liên kết β -D-galactosit từ đầu không khử của các hợp chất hydrocacbon, glycoprotein, hoặc galactolipit [39 và 65]. Enzym β - galactosidaza có mặt trong nhiều tổ chức của động vật, thực vật và vi sinh vật. β - galactosidaza của *Saccharomyces lactis* chỉ có một tiểu đơn vị với khối lượng phân tử 124 kDa, có thể hoạt động được ở 4 °C. β - galactosidaza của vi khuẩn có khối lượng phân tử khá lớn (trên 100 kDa), thường hoạt động tối ưu ở 37 °C, trong điều kiện môi trường pH 6,0-8,0. Việc nghiên cứu tạo chủng vi sinh có khả năng tổng hợp cao β - galactosidaza bằng kỹ thuật tái tổ hợp ADN là một trong những hướng nghiên cứu nhằm giải quyết những hạn chế trong sản xuất và tinh sạch β - galactosidaza công nghiệp hiện nay. β -galactosidaza là một trong những enzym có nhiều ứng dụng nhất trong nhiều ngành công nghiệp cũng như trong nghiên cứu sinh học phân tử. Trong công nghiệp thực phẩm, β - galactosidaza được bổ sung vào quá trình lên men bơ sữa để tránh sự kết tinh

lactoza và tăng độ ngọt của sản phẩm. Trong công nghiệp dược, chúng được sử dụng làm thuốc trợ tiêu hoá cho những người thiếu khả năng hấp thụ lactoza. Đường lactoza là một thành phần rất quan trọng trong sữa 4,5-5,0%. Tuy nhiên, khả năng hấp thụ và chuyển hoá đường lactoza ở người thay đổi theo tuổi tác và có sự dao động đáng kể giữa các cộng đồng dân cư khác nhau trên thế giới. Trẻ sơ sinh có khả năng đồng hoá rất tốt lactoza nhờ hệ enzym β -galactosidaza được tổng hợp trên thành ruột non; Tuy nhiên, năng lực sinh tổng hợp enzym này sẽ bị mất dần khi trẻ qua tuổi cai sữa. Kết quả là ở đại đa số người trưởng thành và người già khi sử dụng nhiều sản phẩm sữa, do bị suy giảm hay không còn năng lực đồng hoá lactoza, thường bị xuất hiện các triệu chứng như: đau bụng, đầy hơi, đi ngoài dữ dội. Ngoài ra, trong công nghệ chế biến sữa, lượng đường lactoza cao còn ảnh hưởng xấu đến một số chỉ tiêu chất lượng sản phẩm như làm sẫm màu hoặc có thể tái kết tinh đường khi bảo quản sản phẩm. Do vậy, bổ sung enzym β -galactosidaza trong chế phẩm sữa là cần thiết.

1.3. Collagenaza. Collagenaza xúc tác quá trình thuỷ phân collagen tự nhiên hoặc ở dạng biến tính. Collagenaza có nguồn gốc từ nhiều loài vi khuẩn khác nhau. hoặc gelatin. Collagenaza thường được sử dụng trong y tế, công nghiệp dược, công nghiệp thực phẩm thuộc da [40]. Collagenaza có tầm quan trọng đặc biệt khi phân tách các mô quá nhiều sợi phân lập các tế bào đảo Langerhan của tuyến tụy, phân lập các tế bào cơ tim, khi tế bào gan, tế bào khối, chẩn đoán các tế bào ung thư phổi. Các tế bào từ mô xương, mô sụn, tuyến giáp trạng, mô buồng trứng, mô dạ con, mô biểu bì, màng, các tế bào thần kinh, các tế bào khác và thuỷ phân các liên kết peptit [64]. Một số vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp collagenaza. Tuy nhiên, đa số các vi sinh vật sinh tổng hợp collagenaza đã được phát hiện lại là các vi sinh vật gây bệnh hoặc sinh độc tố như *Clostridium*, *Vibrio* hay *Pseudomonas*). Việc tìm kiếm nguồn collagenaza an toàn và khai thác sử dụng chúng là rất có ý nghĩa về mặt khoa học và ứng dụng. Collagenaza của *Clostridium histolyticum* là đại diện collagenaza vi sinh vật [67] và [68]. Các nghiên cứu về collagenaza của *C. histolyticum* được tiếp tục bởi nhiều tác giả khác nhau như Gallop và cộng sự [19], Gilles và cộng sự [20], Yoshida và các tác giả khác. Cho tới năm 1962 và nhiều năm sau đó, hầu hết các nghiên cứu tập trung vào tính chất collagenaza của *C. histolyticum*. Đa số các enzym hoạt động ở pH khoảng trung tính hoặc hơi kiềm (pH 7 - 8). Nhiệt độ hoạt động thích hợp của các collagenaza thường là dưới 40°C [69] và [70]. Hầu hết các collagenaza có tính đặc cao đối với collagen. Cấu trúc phân tử của collagen và tương tác của nó với các cấu tử khác của mô liên kết là yếu

tổ quan trọng ảnh hưởng đến đặc tính cấu trúc của thịt và sản phẩm thịt. Số các liên kết chéo trong collagen tăng lên cùng với tuổi của động vật và vì thế làm tăng độ cứng của thịt. Một trong những biện pháp làm tăng độ mềm của thịt là phân giải cấu trúc xoắn collagen, làm đứt mạch protein để đạt được cấu trúc và độ mềm mong muốn của sản phẩm mà không kèm theo sự phân giải các sợi myozin. Khả năng sử dụng collagenaza trong việc làm mềm và nâng cao chất lượng thịt đã được thử nghiệm và công bố trong một số công trình gần đây[17]. Enzym này đặc biệt quả trong trường hợp nâng cao khả năng khai thác và tận dụng thịt có nhiều collagen như thịt bò cấp thấp, các sản phẩm cao cấp như xúc xích hoặc bít tết, nâng cao giá trị gia tăng của nguyên liệu. Collagenaza cũng được ứng dụng rất rộng rãi trong y học như để chữa các vết bỏng, vùng mô bị thoái hoá.

1.4. Nghiên cứu công nghệ và thiết bị chế biến nông sản thực phẩm bằng enzym.

Công nghệ enzym, vi sinh, lên men và kỹ thuật gen là một phần của công nghệ sinh học đang được ưu tiên đầu tư phát triển ở nước ta. Sử dụng các công nghệ trên trong chế biến nông sản thực phẩm đang là nhu cầu cấp thiết để tạo đầu ra cho sản xuất nông nghiệp, nâng cao giá trị nông sản chế biến, thay đổi cơ cấu nông nghiệp, góp phần công nghiệp hoá, hiện đại hoá nông nghiệp và nông thôn. Để tạo ra các chế phẩm enzym cần thiết phải phân lập, tuyển chọn các chủng tự nhiên và tạo các chủng giống mới bằng phương pháp tái tổ hợp ADN mang gen mã hoá sinh tổng hợp enzym suất cao. Yêu cầu ứng dụng công nghệ enzym cần đảm bảo quả kinh tế xã hội, khoa học công nghệ và vệ sinh an toàn thực phẩm. Trong đề tài nghiên cứu này, chúng tôi quan tâm đến nghiên cứu khoa học cơ bản để phát hiện các chủng giống vi sinh vật có nguồn gốc tự nhiên và tạo ra các chủng giống mới bằng phương pháp kỹ thuật gen. áp dụng công nghệ enzym thay hoá chất trong sản xuất cũng là áp dụng công nghệ sản xuất sạch hơn, giảm tiêu hao nguyên vật liệu, năng lượng, điện nước nhờ các quá trình thu hồi và tái sử dụng, giảm thiểu ô nhiễm môi trường. Việc sử dụng các chế phẩm enzym thương mại nhập khẩu và nghiên cứu ứng dụng enzym trong sản xuất và chế biến một số nông sản thực phẩm cũng là đáp ứng nhu cầu cấp bách của sản xuất. Hiện nay ở nước ta, một số ngành sản xuất như rượu bia, sữa, chế biến rau quả, sản xuất đường bột...đã áp dụng công nghệ enzym, vi sinh, lên men đã đạt trình độ quốc tế và khu vực. Tuy nhiên, nhiều doanh nghiệp vừa và nhỏ sử dụng công nghệ và thiết bị chế tạo trong nước do khả năng đầu tư còn hạn hẹp, đặt ra nhiều vấn đề khoa học và công nghệ cần nghiên cứu và giải quyết. Những nội dung nghiên cứu cơ bản trong đề tài này tập trung

phân lập một số chủng vi sinh vật có nguồn gốc tự nhiên và tạo chủng mới tái tổ hợp gen, nghiên cứu sinh tổng hợp, thu hồi và ứng dụng enzym β - glucosidaza, β -galactosidaza, collagenaza, fructosiltransferaza (FTS), lipaza dùng trong chế biến sữa, thịt, nước quả, rượu vang. Một số nghiên cứu, ứng dụng enzym thương phẩm như α -amilaza, glucoisomeraza, pectinaza và lipaza trong sản xuất sirô fructoza, chế biến nước quả tươi sản xuất đồ uống mới từ hạt đậu tương, hạt đại mạch nảy mầm, đồ uống lên men có độ cồn thấp, nâng cao suất thu hồi tinh dầu hạt tiêu, các sản phẩm giàu axit béo không no và rượu vang chất lượng cao. Để gắn nghiên cứu hoàn thiện công nghệ và chuyển giao công nghệ cho sản xuất, để đáp ứng khả năng đầu tư của các cơ sở sản xuất vừa và nhỏ đề tài quan tâm tới việc xây dựng các mô hình thiết bị tại viện nghiên cứu và cơ sở sản xuất. Đó là các mô hình thiết bị sản xuất nước quả, tinh dầu hạt tiêu, dầu thực vật giàu axit béo không no, đồ uống mới từ hạt nảy mầm được xây dựng ở qui mô xưởng thực nghiệm. Các mô hình sản xuất sirô fructoza, nước quả trong, nước quả đục, nước quả cô đặc và rượu vang chất lượng cao được xây dựng tại các cơ sở sản xuất qui mô công nghiệp. Bằng cách tiếp cận đó, một số doanh nghiệp có kết quả trong nghiên cứu đã được áp dụng sản xuất thông qua các hoạt động kinh tế chuyển giao công nghệ, đào tạo thử nghiệm, phối hợp nghiên cứu và ứng dụng sản xuất.

1.5. Các enzym tham gia trong quá trình chuyển hoá tinh bột thành fructoza.

Sirô fructoza là một loại đường quen thuộc trên thị trường thế giới. Sirô fructoza có lượng calo ít hơn đường kính từ 30-50%. Với độ ngọt của sirô fructoza 42% tương đương với đường kính nên thường được sử dụng thay thế đường kính trong các sản phẩm như: sữa đặc, kem, các loại mứt quả đóng hộp, nước uống ít calo, sirô đặc có hương, thức ăn tráng miệng, bánh ngọt. Giá thành sirô fructoza lại thấp hơn đường kính rất nhiều, ở Mỹ rẻ hơn đường kính từ 30 đến 40%, ở Nhật là 50-60%. Sản lượng sirô fructoza trên thế giới ngày một tăng lên không ngừng. Sirô fructoza là sản phẩm được sản xuất từ tinh bột bằng phương pháp enzym lần đầu tại Mỹ thông qua hai công đoạn chính: Thủy phân tinh bột thành glucoza và đồng phân hóa để chuyển glucoza thành fructoza [30] và [59]. Trong quá trình sản xuất fructoza người ta sử dụng 3 loại enzym: α -amilaza trong quá trình dịch hoá, glucoamilaza trong quá trình đường hoá và glucoisomeraza trong quá trình đồng phân hoá để chuyển hoá glucoza thành fructoza. Dây chuyền công nghệ và thiết bị để sản xuất sirô fructoza 42% bao gồm từ xử lý nguyên liệu tinh bột cho đến khâu bảo quản sản phẩm. Theo danh pháp quốc tế, α -amilaza gọi là α -1,4 glucan - 4 glucanhydrolaza (EC 3.2.1.1), có khả năng phân cắt các

liên kết α -1,4 glucosit trong phân tử polysaccharit một cách ngẫu nhiên không theo trật tự nào. Do đó α -amilaza có thể thủy phân được amiloza, amilopectin, glycogen và các sản phẩm trung gian của quá trình thủy phân. *Bacillus* có khả năng sinh tổng hợp α -amilaza chịu nhiệt, suất cao nhất và có ý nghĩa trong công nghiệp. Đó là *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*. Tất cả các α -amilaza đều có khả năng phân hủy nhanh chóng phân tử tinh bột, làm thay đổi màu của iốt và giảm độ nhớt của tinh bột một cách nhanh chóng. Các sản phẩm thủy phân của α -amilaza là maltoza, oligosaccharid, maltotriosa và các dextrin phân tử thấp. Glucoamilaza còn gọi là α -1,4 glucan glucohydrolaza, amiloglucosidaza, gamma-amilaza. Glucoamilaza có khả năng thủy phân liên kết α -1,4 glucosit của phân tử tinh bột, cắt từng đơn vị glucoza của phân tử tinh bột. Ngoài ra, glucoamilaza còn có khả năng phân cắt mỗi liên kết α -1,6 và α -1,3 glucosit nhưng với tốc độ chậm hơn. Glucoamilaza được sinh tổng hợp từ các chủng nấm mốc *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori* hay *Rhizopus*. Cơ chất của glucoamilaza là sản phẩm dịch thủy phân tinh bột của α -amilaza. Glucoisomeraza được gọi là D-xyloza-keto-isomeraza (EC 5.3.1.5) có tác dụng xúc tác phản ứng chuyển hoá glucoza thành fructoza. Dưới tác dụng của glucoisomeraza nhóm andehit (-CHO) trong phân tử glucoza chuyển thành nhóm (C=O) trong phân tử fructoza [42 và 57]. Glucoisomeraza còn được gọi là D-xyloza isomeraza vì người ta đã tìm ra một số vi sinh vật có khả năng tổng hợp enzym trên môi trường đòi hỏi phải có xyloza là nguồn hydratcacbon. Enzym này không có khả năng chuyển hoá D-glucoza thành D-fructoza và cả D-xyloza thành D-xyluloza. Glucoisomeraza được thu nhận chủ yếu từ vi sinh vật, phổ biến nhất là các chủng vi khuẩn *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. stearothermophiles* [50]. D-fructoza là một monosaccarit rất phổ biến trong tự nhiên, thường gặp trong các quả chín, mật hoa, mật ong và là thành phần cấu tạo của polysaccharit thực vật như insulin.



Fructoza tinh khiết ở dạng tinh thể có màu trắng, vị ngọt gấp 1,7 lần độ ngọt của saccaroza. Do sự có mặt của nhiều nhóm hydroxyl trong phân tử nên fructoza dễ tan trong nước và không tan trong các dung môi hữu cơ. Tính chất hoá học quan trọng của fructoza là những tính chất của nhóm chức xeton.

1.6. Hoàn thiện công nghệ xử lý nước quả bằng enzym.

Thủ Tướng Chính phủ đã có Quyết định số : 28/2002/ QĐ- TTg ngày 06/ 02/ 2002 về Quy hoạch tổng thể phát triển ngành Rượu Bia Nước giải khát Việt Nam đến năm 2010, trong đó chế biến nước quả đạt 124 triệu lít/ năm 2005 và 280 triệu lít/ năm 2010 [1]. Nước quả tươi có rất nhiều ưu điểm, nó mang hương vị tự nhiên, lại cung cấp một lượng lớn glucit, các vitamin, các chất khoáng cần thiết cho cơ thể, có tác dụng chữa bệnh, chống ngộ độc, chống ung thư... Song đa số các loại quả chỉ có theo mùa, theo vùng, nên việc sử dụng nước quả tươi một cách thường xuyên khó có thể đáp ứng được. Điều này đòi hỏi các nhà nghiên cứu và sản xuất thực phẩm cần tiến hành sản xuất theo quy mô công nghiệp để tạo ra các loại sản phẩm nước quả có hàm lượng các chất dinh dưỡng cao, có khả năng bảo quản tốt trong nhiều tháng nhằm đáp ứng sử dụng trái vụ và nhu cầu ngày càng tăng trên thị trường về mặt hàng nước quả tự nhiên.

Sử dụng các chế phẩm enzym có thể coi là một trong các phương hướng tiến bộ có triển vọng nhất của sản xuất nước quả các loại, rượu vang và thức uống không cồn.

Trong công nghiệp thực phẩm, pectinaza thường được sử dụng để sản xuất các loại sản phẩm như: rượu vang, nước quả, nước uống không cồn, nước quả cô đặc, mứt nhừ, mứt đông, cà phê...

Có thể phân chia các chế phẩm enzym pectinaza thành 6 nhóm chức năng.

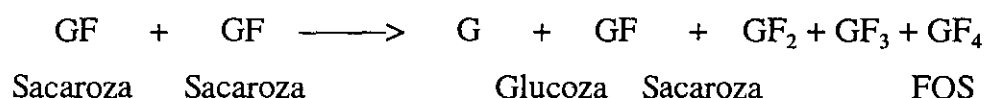
- Sản xuất nước quả không trong, tăng suất trích ly và thu hồi.
- Sản xuất nước quả trong không chứa pectin để tăng suất trích ly và thu hồi, đảm bảo thủy phân hoàn toàn các protein và pectin.
- Gây rữa mô quả làm tăng suất thu hồi và tăng độ đồng hoá của nước quả với thịt quả.
- Sản xuất bán thành phẩm rượu vang, dịch quả trong suốt tăng suất thu hồi và tăng khả năng trích ly của bán thành phẩm đó.
- Ngăn cản quá trình oxy hoá và cản trở sự phát triển của vi sinh vật hiếu khí trong nước quả, trong rượu vang và trong đồ uống không cồn.
- Xúc tác quá trình hoàn nguyên của sirô đường trong sản xuất sirô thương phẩm và thức uống không cồn.

Người ta thấy rằng, muốn nhanh chóng thu được nước quả trong và không bị đục trở lại trong suốt thời gian bảo quản thì phương pháp đơn giản và quả nhất là sử

dụng các chế phẩm enzym pectinaza và xenlulaza. Bởi lẽ, các enzym này có tác dụng phá huỷ một phần hoặc toàn hệ keo.

Nước quả cô đặc có nồng độ chất khô cao nên giá trị dinh dưỡng cao, thời gian cất giữ lâu, chi phí bao gói, vận chuyển và bảo quản giảm. Phương pháp cô đặc ở nhiệt độ cao được phổ biến trong sản xuất nước quả cô đặc. Tuy nhiên để sản phẩm có chất lượng cao, giữ được các thành phần quý (màu, hương vị tự nhiên và vitamin) cần thiết điều chỉnh nhiệt độ sôi của dung dịch dưới 100 °C bằng cách điều chỉnh áp suất nhỏ hơn áp suất khí quyển. Người ta tạo độ chân không trong thiết bị cô đặc để hạ nhiệt độ sôi của sản phẩm.

1.7. Fructooligosacarit: Là một loại đường thường dùng trong thực phẩm chức năng, được tập trung nghiên cứu nhiều trong những năm gần đây, có nhiều đặc tính sinh học có lợi cho sức khỏe như chống sâu răng, chống bệnh tiểu đường, không gây béo phì, có khả năng kích thích hoạt động của hệ tiêu hoá v.v... Đường fructooligosacarit (FOS) được nghiên cứu và sản xuất bằng công nghệ đa enzym. FOS dùng trong sản xuất thức ăn trẻ em, bánh kẹo chức năng và các thực phẩm khác. Sản phẩm có hương vị thơm ngon, lại có nhiều hoạt tính sinh học có lợi cho cơ thể con người. Fructooligosacarit là những oligoza mà trong phân tử của chúng có một gốc glucoza gắn kết với một vài gốc fructoza. FOS được hình thành dưới tác dụng của enzym chuyển hoá fructoza thành kestoza, nystoza và fructosylnystoza có độ ngọt cao so với sacaroza tương ứng là 31%, 32% và 16%. Còn độ ngọt tổng của hỗn hợp ba đường này (FOS) chỉ bằng 30% độ ngọt của sacaroza. Đường FOS hút ẩm mạnh, nên khó bảo quản ở trạng thái tinh thể trong thời gian dài. Độ bền nhiệt của FOS cao hơn sacaroza [21]. Đường FOS không bị hoặc rất ít bị thủy phân bởi hệ enzym đường ruột, nên khi ăn lượng đường trong máu không bị biến động và gây ức chế sự gia tăng của glucoza và chất béo trong máu [21] và [58]. FOS có vai trò khá tích cực trong việc phòng và chữa bệnh tiểu đường. Cũng như các loại enzym khác, nguồn cung cấp enzym chuyển hoá sacaroza trong công nghiệp chế biến FOS chủ yếu là từ vi sinh vật. Quá trình chuyển hóa sacaroza thành FOS phổ thông dưới tác dụng của FTS có thể biểu diễn một cách tổng quát như sau:



Sản phẩm thu được chứa một lượng glucoza nhất định. Đường glucoza xuất hiện trong phản ứng không những làm giảm độ tinh khiết của FOS mà còn ức chế hoạt tính của enzym FTS. Vì chất ức chế này mà ta chỉ thu được dịch đường phổ thông có nồng

độ FOS không quá 55 % còn lại hơn 45 % là sacaroza và glucoza. Vì thế muốn thu được FOS có độ tinh khiết cao, người ta đã chọn hệ enzym fructosiltransferaza (FTS), glucooxydaza (GOD) và catalaza (CAT) cố định trên chất mang như Canxi alginat và hạt trao đổi ion rồi được nhồi vào cột phản ứng. Với công nghệ này Yun, J. W. đã sản xuất liên tục được FOS có độ tinh khiết cao hơn 90 %. FTS là tên gọi chung cho các enzym có hoạt tính xúc tác quá trình chuyển dịch gốc fructoza trong sản xuất FOS.

1.8. Ứng dụng enzym trong sản xuất đồ uống mới:

Sự phát triển của khoa học và công nghệ đã nâng cao nhận thức của con người về tầm quan trọng của rau quả trong việc giữ gìn sức khỏe, làm cho con người khỏe đẹp hơn, sống lâu hơn. Nước quả tươi có rất nhiều ưu điểm, nó mang hương vị tự nhiên, lại cung cấp một lượng lớn glucit, các vitamin, các chất khoáng cần thiết cho cơ thể và ngoài ra còn có tác dụng chữa bệnh, chống ngộ độc, chống ung thư. Nước ta là nước nhiệt đới có hoa quả quanh năm. Vì vậy việc sản xuất các loại nước quả cô đặc nhằm xuất khẩu và tiêu thụ trên thị trường nội địa là cần thiết và cấp bách.

Sản xuất rau quả tại nước ta trong 5 năm triển khai chương trình phát triển rau quả và hoa cây cảnh giai đoạn 1999-2010 được coi là có nhiều thành công do diện tích và sản lượng tăng nhanh, chủng loại phong phú. Việc thu hái, lựa chọn, bảo quản vẫn tiến hành thủ công gây tổn thất sau thu hoạch lên tới 20 - 25%. Sản phẩm chưa có sức cạnh tranh trong xuất khẩu, công nghệ và thiết bị không đồng bộ, chất lượng sản phẩm thấp, chưa có sức cạnh tranh trên thị trường thế giới. Công nghệ bao bì và đóng gói chưa hoàn chỉnh. Nước uống từ rau quả có rất nhiều dạng và có thể phân loại thành: nước rau, quả tự nhiên, necta quả, nước quả cô đặc, sirô quả, squash quả, nước quả lên men, bột quả giải khát, nước quả giải khát [7]. Sử dụng các chế phẩm enzym có thể coi là một trong các phương hướng tiến bộ có triển vọng nhất của sản xuất nước quả, rượu vang và thức uống không cồn [8]. Pectin trong quả gây không ít phiền toái tới công nghệ chế biến nước quả. Protopectin giữ dịch ở lại trong bã suốt quá trình ép làm giảm sản lượng dịch quả. Pectin hoà tan đi vào dịch làm cho độ nhớt tăng lên, cản trở quá trình lọc, ảnh hưởng tới độ trong của dịch quả. Độ nhớt cao gây khó khăn cho việc cô đặc dịch quả. Pectin hoà tan có thể tạo ra các cấu tạo bền khiến cho dịch quả bị đục trở lại sau khi đã được lọc trong. Trong hệ enzym pectinaza phân giải pectin có nhiều enzym khác nhau: Pectinesteraza, polygalacturonaza, protopectinaza, transeliminaza [4]. Quá trình làm trong dịch quả dưới tác dụng của enzym pectinaza có thể chia thành 3 giai đoạn, “bất ổn định hóa”, kết lắng, và kết thúc sự phân giải pectin [8]. Sản xuất

nước quả cô đặc có chất lượng cao giữ được các thành phần quý (màu, vị tự nhiên, lượng vitamin). Cần điều chỉnh nhiệt độ sôi của dung dịch nhỏ hơn 100 °C bằng cách điều chỉnh áp suất nhỏ hơn áp suất khí quyển. Tùy theo dạng nguyên liệu được chế biến và tính chất sản phẩm, nước quả được bảo quản bằng những phương pháp sau đây: Thanh trùng nhiệt, rót nóng, vô trùng (aseptic), bằng khí CO₂, lọc thanh trùng và bằng hoá chất bảo quản. Hiện nay, sản lượng rau quả các loại là 18 triệu tấn/ năm, trong đó 8 triệu tấn rau và 8 triệu tấn quả tiêu thụ nội địa và 2 triệu tấn xuất khẩu. Rau tươi không bảo quản được dài ngày, việc chế biến các sản phẩm đồ uống từ rau, hạt ngũ cốc nảy mầm là sản phẩm mới có nhu cầu bức xúc trong chế biến rau quả.

Nước ta chưa có cơ sở sản xuất nước rau, với hơn 70 loại rau khác nhau, nếu mặt hàng này được sản xuất sẽ đáp ứng một phần nhu cầu của xã hội. Các loại rau có thể dùng cho sản xuất nước rau hỗn hợp bao gồm: Cà chua *Lycopersicum esculentum* Milf, cà rốt (*Daucus carota*), cần tây (*Apium graveolens* L), xà lách (*Lactuca sativa* Carcapitata L), củ cải trắng (*Beta Vulgaris*), rau dền (*Amranthus*), cải soong (*Nasturtium officinale*), cải xanh (*Brassica juncea*), rau muống (*Ipomea aquatica*), rau cần nước (*Oenanthe stolonifera*), rau ngót...

Ở châu Âu, châu Úc và châu Mỹ, cider là loại nước táo lên men có độ cồn thấp rất được ưa chuộng. Cũng như rượu vang, loại đồ uống lên men này đã được biết đến từ vài nghìn năm trước Công nguyên và hiện được tiêu thụ hàng tỷ lít/ năm [5, 52 và 60]. Thành phần chính (%) của các loại cider thương phẩm là: Axit tổng (tính theo axit lactic) 0,40-5,69; Độ ngọt 1,56-5,58; Độ rượu 0,5-8,4; Tannin 0,028- 0,171 [55]. Người ta đã tìm ra 66 hợp chất bay hơi có trong các loại cider thương phẩm. Bên cạnh các yếu tố về chất lượng nguyên liệu quả, công nghệ và điều kiện trang thiết bị sản xuất, các vi sinh vật luôn đóng vai trò quan trọng trong quá trình lên men và bảo quản cider để ổn định và nâng cao chất lượng của sản phẩm. Nấm men cần có khả năng lên men nhanh, sinh trưởng tốt, khả năng chống chịu SO₂ và khả năng lên men dịch quả có pH thấp, chịu áp suất cao của CO₂ có các khả năng cạnh tranh tốt, có khả năng sinh tổng hợp zymoxin để hạn chế sự nhiễm tạp của vi sinh vật trong quá trình lên men [2].

1.9. Ứng dụng α -amilaza trong sản xuất tinh dầu hạt tiêu :

Nhựa dầu hồ tiêu là sản phẩm bao gồm phần tinh dầu thơm bay hơi và phần nhựa có các hoạt chất có vị cay, các chất màu, được chiết xuất bằng dung môi hữu cơ như cồn công nghiệp, axeton, rượu metylic, cacbon dioxit lỏng. suất thu hồi nhựa dầu 7,5-8,5%, Giá trung bình nhựa dầu hồ tiêu trên thế giới vào thời điểm đầu năm 2004 là

vào khoảng 50 USD/ kg tùy thuộc hàm lượng piperin và hàm lượng tinh dầu trong nhựa. Nước ta chưa có cơ sở nào sản xuất nhựa dầu hồ tiêu. Nghiên cứu nâng cao chất lượng nhựa dầu hồ tiêu, áp dụng các chế phẩm enzym nhằm đạt suất cao có ý nghĩa tạo tiền đề cho sự phát triển một sản phẩm mới của nước ta. Để khắc phục ảnh hưởng của tinh bột bị hồ hóa trong quá trình trích ly dầu hồ tiêu, làm cản trở việc chiết xuất tinh dầu, người ta có thể áp dụng kỹ thuật áp suất cao bằng CO₂ lỏng, thường làm tăng giá thành sản phẩm và đầu tư công nghệ và thiết bị ban đầu. Vì vậy sử dụng enzym α -amilaza nhằm thủy phân phần lớn lượng tinh bột trong hồ tiêu (42%) trong quá trình chung cất nhằm nâng cao suất chung cất tinh dầu và xuất trích ly nhựa dầu hồ tiêu sẽ góp phần nâng cao quả kinh tế, khoa học và công nghệ.

1.10. Lipaza:

Lipaza(EC 3.1.1.3) là enzym xúc tác thủy phân triglyxerit thành di, mono glyxerit hoặc glyxerol và các axit béo. Lipaza là enzym được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm, công nghiệp hoá học, công nghiệp mỹ phẩm, công nghiệp da, trong y dược và các ngành công nghiệp khác [11]. Nấm men *Candida rugosa* được dùng trong công nghệ sinh tổng hợp lipaza. Đối với lipaza từ *Candida rugosa*, M. A. Pernas và cộng sự [38] đã tiến hành tinh sạch qua cột DEAE - Sephacel đạt độ tinh sạch suất thu hồi là 4,9%, khối lượng phân tử là 60 kDa (2000). Enzym cố định là enzym được gắn với chất mang như hạt polyamid (Nylon-6) cùng với xenluloza, agaroza, axit alginic, chitin, collagen, keratin và các dẫn xuất của chúng. Trong công nghiệp chế biến sữa, người ta thay thế các axit béo no bởi các axit béo không no để làm tăng hương vị, làm tăng độ chín, đặc biệt trong lên men phomat.

Trong dầu thực vật những axit béo no thường sử dụng để sản xuất xà phòng, chất tẩy rửa, sản xuất nến. Axit béo không no là những axit béo không tổng hợp được, những axit này được bổ sung vào thực phẩm hoặc dùng dưới dạng thuốc. Khi thiếu axit không no dễ bị bệnh xơ vữa động mạch, gây tai biến mạch máu não, huyết áp cao, gây tàn phế và tử vong ở người lớn tuổi [9]. Dầu thực vật chứa nhiều axit béo không no: C_{18:1}; C_{18:2}; C_{18:3}. Hỗn hợp axit béo không thay thế này còn gọi là vitamin F. Vitamin F rất cần thiết đối với sức khỏe, nhất là đối với những người có bệnh cao huyết áp. ở Nga, Mỹ, úc, Bulgaria họ đều quan tâm đến công nghệ thủy phân dầu để tách hỗn hợp axit béo, ứng dụng trong công nghiệp dược và công nghiệp khác.

Ở Việt Nam chưa có cơ sở nào tách axit béo từ dầu thực vật. Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 đã hợp tác Viện Công nghiệp Thực phẩm nghiên cứu công nghệ

thủy phân dầu thực vật để tách hỗn hợp axit béo không no không thay thế, từ các loại dầu đậu tương, bằng phương pháp axit đã cho kết quả tốt [6]. Với trình độ công nghệ cao hơn, sạch hơn, thủy phân dầu thực vật bằng công nghệ enzym nhằm mục đích thu được hỗn hợp axit béo tinh khiết hơn, chắc chắn sẽ có những đóng góp mới cho khoa học, công nghệ và sản xuất axit béo không no từ dầu thực vật.

1.11. Ứng dụng enzym trong sản xuất rượu vang :

Rượu vang là sản phẩm lên men không chưng cất từ dịch quả. Đây là một loại đồ uống có giá trị dinh dưỡng cao, thành phần chính là cồn với nồng độ vừa phải 10 - 14% (v/v), các axit amin không thay thế như : Lysin, treonin, leucin, isoleucin, valin, arginin, histidin, phenylalanin, các vitamin B₂, PP, P, các khoáng chất: Na, Ca, Mg, Fe, Mn, các chất tạo vị chua chất như: Axit lactic, malic, xitric, tartric, các polyphenol, các chất màu tự nhiên. Sản lượng và tiêu thụ rượu vang trên thế giới đạt 27,9 tỷ lít/ năm 2000. Tổng sản lượng vang của Việt Nam ước tính 20.500.000 lít/ năm 2002. Hiện nay trên thế giới đã có hàng trăm loại rượu vang, đặc trưng cho mỗi vùng nguyên liệu và mỗi quốc gia. Việt Nam nằm trong vùng khí hậu nhiệt đới, hoa trái bốn mùa, nhiều về số lượng và phong phú về chủng loại. Kỹ thuật sản xuất rượu vang ở nước ta còn rất mới mẻ, sản xuất với quy mô nhỏ, công nghệ chưa hoàn chỉnh, thiết bị còn thô sơ. Việc đầu tư nghiên cứu hoàn thiện công nghệ và thiết bị sản xuất rượu vang là rất cần thiết. Các quá trình cơ bản trong sản xuất rượu vang: Nghiền và ép quả, lên men dịch quả, lắng trong và tàng trữ sản phẩm. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men rượu là nhiệt độ, nồng độ rượu, pH, oxi, nồng độ đường, tỷ lệ men giống, các chất chứa nitơ. Rượu vang còn chứa các sản phẩm phụ khác như: Rượu bậc cao, glycerin, aldehyt, axit, chất thơm và các thành phần dịch quả, như: Polyphenol, mono, di và polysacarit, axit béo, axit amin tạo nên hương vị đặc trưng của vang. Con người biết tới và yêu thích rượu vang là do nó mang lại cảm giác kích thích, sảng khoái và tác dụng tăng cường sức khỏe. Trong rượu vang nho có chứa các hợp chất resveratrol, quercetin, và catechin, các hợp chất polyphenol (anthocyanin, leuco-anthocyanin) có tác dụng được lý học như là các tác nhân chống oxy hoá, chống viêm và chống đông máu, kìm hãm sự keo tụ của các sợi tơ máu, làm thuyên giảm các căn bệnh có liên quan tới động mạch vành, tĩnh mạch tim, chứng rối loạn lipid trong máu và bệnh đông máu. Rượu vang còn làm giảm tỷ lệ tử vong ở phụ nữ, chữa bệnh tiểu đường loại II, diệt khuẩn.

Lên men malolactic là một quá trình quan trọng bậc nhất trong giai đoạn lên men phụ của rượu vang và sâm panh [32 và 41]. Bản chất enzym của quá trình lên men

malolactic của *Leuconostoc oenos* là một protein có tác dụng xúc tác phân giải axit L-malic thành axit L-lactic và CO₂. Sự biến đổi chất lượng của vang sau quá trình lên men malolactic đã được chỉ ra là giảm độ chua của vang [48], tăng tính ổn định sinh học [49 và 50], tăng tổ hợp thơm của vang [47] và rút ngắn thời gian tàng trữ. Lên men một giai đoạn có nghĩa là người ta cấy nấm men và vi khuẩn đồng thời trong quá trình lên men rượu. Lên men hai giai đoạn là sau khi kết thúc lên men rượu bởi nấm men, bắt đầu thực hiện giai đoạn lên men phụ (lên men malolactic). Trên thị trường có rất nhiều loại chế phẩm malolactic như *Leuconostoc oenos* GM là loại đông lạnh. 80% lượng vi khuẩn sẽ mất sự sống nếu cấy trực tiếp vào vang nhưng nếu cho cấy trước trong nước nho chứa 0,5% nước chiết nấm men ở pH 4 - 5, thì khả năng sống tốt hơn nhiều. Mật độ tế bào ban đầu là 10⁶ tế bào/ ml có thể lên tới 10⁹ tế bào/ ml sau 6 ngày nuôi cấy. Các tế bào *L. oenos* được cố định trong alginat có thể duy trì hoạt động làm giảm axit malic ngay cả ở độ cồn cao, độ pH thấp và nồng độ SO₂ cao. Để đạt được độ trong cần thiết, ổn định về mặt hoá lý, người ta thường bổ sung có chủ định các chất có khả năng hấp phụ, trợ lắng, các chất này có thể kết tủa một phần các thành phần hoà tan có mặt trong rượu vang. Những biến đổi trong quá trình làm trong là: Sự loại bỏ tannin và các hợp chất polyphenol, hấp phụ protein, loại bỏ các hợp chất monophenol và polyphenol phân tử nhỏ, loại bỏ các mùi không mong đợi, loại bỏ các hạt keo và các kết tủa mới. Các tác nhân làm trong bao gồm các chất protein (casein, albumin, isinglass và gelatin), đất hoạt tính (các dạng bentonit và các loại đất khác), các polyme với các thành phần pyridon (nilon và PVPP) và các chất keo có khả năng hoà tan hạn chế [53 và 54]. Bentonit được sử dụng rộng rãi để hấp phụ các thành phần có bản chất là protein của rượu vang. Các nguyên liệu như: Polyglyxin, polyamit (nilon) và polyvinyl polypyridon (PVPP) là các sản phẩm tổng hợp, để lắng lọc các hợp chất polyphenol, với hàm lượng 80 g/hl có thể loại bỏ các chất màu [53 và 54].

II. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP.

2.1. Chủng vi sinh vật :

- Nấm mốc *A. niger* PBC (do Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ thực phẩm, Trường ĐHBK Hà Nội cung cấp.)
- Chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 α [end A1 rec A1 hsd R17 sup E44 gyp A96 thi-1 relA1 lac U169 (ϕ 80 *lacZ*M15)] được sử dụng làm thể nhận trong thí nghiệm biến nạp với *B. subtilis* FS-2.
- Chủng vi khuẩn *B. subtilis* FS-2 mang gen mã hoá collagenaza do Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ thực phẩm, Trường ĐHBK Hà Nội cung cấp.
- Plasmid pUC 18 dùng để tách dòng các đoạn gen của genom *B. subtilis* FS-2.
- *Candida rugosa* nhận từ Bảo tàng giống vi sinh vật Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Đại học Bách khoa Hà Nội.
- Chủng *Bacillus* sp. nhận từ Phòng Công nghệ gen động vật, Viện Công nghệ sinh học, TTKHCN Quốc gia
- Chủng giống nấm men FCFD₁₁, FCFD₂₄ và FCFD₂₉ từ Viện Công nghiệp thực phẩm.
- Một số chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* có nguồn gốc từ Cộng hoà Séc, Đức, Nhật, Thái an, Cộng hoà Pháp và Bộ sưu tập giống của Bộ môn Thực phẩm - Viện công nghiệp thực phẩm.

2.2. Nguyên vật liệu

- Đậu tương (Việt nam)
- Đất trợ lọc: Sigma, Mỹ.
- Than hoạt tính: Sigma, Mỹ.
- Bản mỏng sắc ký TLC silicagel 60 F₂₅₄: Merck, Đức.
- Glucoza, fructoza tiêu chuẩn: Trung Quốc.
- Nystoza, kestozơ tiêu chuẩn: Fluka, Nhật Bản.
- N-propynol, ethylaxetat, diphenylamin, anilin, axit photphoric, dinitrihypophotphat, axit xitric, pepton, magnesulphat, kalihypophotphat của Công ty hoá chất Y dược, Thượng Hải, Trung Quốc.

2.3 Enzym:

- Enzym dùng để xúc tác phản ứng thuỷ phân lipid là Lipozim^{IM} (lipaza cố định của hãng Novo Đan Mạch) được sinh tổng hợp và thu nhận từ *Aspergillus niger*, *Mucor miehei*, *Rhizopus arrhizus*, *Penicillium roqueforti*. Lipozim^{IM} là enzym được cố định trên chất mang là dẫn suất của xenluloza.

- α -amilaza: Chế phẩm enzym *Termamil 120L* do Hãng NOVO, Đan Mạch sản xuất từ chủng *Bacillus licheniformis* [44].
- Glucoamilaza: Chế phẩm *AMG* do Hãng NOVO, Đan Mạch sản xuất từ chủng *Aspergillus niger* bằng phương pháp chìm.
- Glucoisomeraza: Chế phẩm *Sweetzyme T* do hãng NOVO, Đan Mạch sản xuất từ chủng *Streptomyces muricus*, được sử dụng trong quá trình đồng phân [42].
- Fructosyltransferaza (FTS) từ trường đại học Giang Nam Trung Quốc
- Glucooxydaza (GOD) (EC 1.1.3.4) từ *Aspergillus niger* (Công ty hoá chất Sigma, Mỹ)
- Catalaza (CAT) (EC 1.11.1.6) từ gan bò (Công ty hoá chất Sigma, Mỹ).
- Chế phẩm Pectinex Ultra SP-L, Pectinex 3XL, Celluclast hãng NOVO, Đan Mạch.
- Chế phẩm Rohapect MA PLUS, Rohapect D5S, Rohapect PTE, Rohapect B1L, Rohapect DA6L của CHLB Đức.

2.4. Phương pháp vi sinh:

- Sơ tuyển năng lực lên men rượu bằng phương pháp bình Einhorn Smith.
- Phương pháp vòng thuỷ phân phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng phân giải collagen;
- Xác định khả năng sinh tổng hợp zymoxin bằng phương pháp định tính Bevan.
- Xác định tổng số vi khuẩn hiếu khí theo TCVN 5165-1990 .
- Phân lập theo phương pháp pha loãng, nuôi cấy trên môi trường khoai tây.
- Xử lý sinh khối: Sinh khối thu được sau lên men được rửa sạch bằng nước cất và dung dịch đệm McIlvaine (muối photphat natri - axit citric) 0,1 M pH5.
- Kiểm tra vi sinh vật gây hư hỏng vi sinh vật hiếu khí, *E. coli*, vi khuẩn lactic, nấm men, nấm mốc, *Clostridium perfringens*, *S. aureus*
- Xác định năng lực lên men (dựa trên tốc độ sinh CO₂) theo phương pháp cân bình.

2.5. Phương pháp công nghệ:

- β -glucosidaza từ canh trường nuôi *A. niger* PBC, được kết tủa bằng amon sunfat và etanol. Tinh chế bằng sắc ký lọc gel Sephadex G-75, bằng sắc ký trao đổi ion DEAE xeluloza A-50.
- Nghiên cứu khả năng phân giải collagen, myofibrin, gân bò và thịt bò cấp thấp bằng chế phẩm enzym nghiên cứu ở các mẫu protein nghiên cứu với enzym, sau các khoảng thời gian khác nhau, điện di phân tách sản phẩm. Phân tích hàm lượng -NH₂ giải phóng trong các mẫu thí nghiệm bằng phương pháp Ninhydrin.

- Nghiên cứu sử dụng collagenaza trong sản xuất nước mắm: Thăm dò khả năng phân giải da cá của collagenaza và FS-2 sau 4 tháng ủ chượp, bổ sung đánh giá lượng dịch thu được và tốc độ chảy của dịch so với đối chứng không bổ sung enzym.
- Phương pháp tách tinh chế lipaza bằng sắc ký trao đổi ion DEAE xenluloza [38]
- Cô đặc zymoxin bằng phương pháp sấy chân không và màng siêu lọc có kích thước lỗ khác nhau: 100 kDa, 5kDa của hãng Satorius (Đức).
- Nước rau được cô bằng nồi cô chân không 80 lit kiểu RVA3-7-9.
- Các kỹ thuật tinh chế enzym bằng cách sử dụng phối hợp các biện pháp siêu lọc, sắc ký trao đổi ion và sắc ký lọc gel. Kiểm tra độ tinh khiết của enzym sau quá trình tinh chế bằng cách điện di trên PAGE 15%;
- Than hoạt tính có tác dụng tẩy màu cho dịch đường và hấp thụ tạp chất trong dung dịch đường.
- Nhựa trao đổi ion có tác dụng loại đi các cation và anion trong dịch đường.
- Sử dụng công nghệ chưng cất tinh dầu kết hợp trích ly nhựa từ bã đã chưng cất được sấy khô. Trong quá trình chưng cất, bổ sung chế phẩm α -amilaza Termamil của Hãng NOVO, Đan Mạch để đường hóa tinh bột trong hạt tiêu, giải phóng tinh dầu và hợp chất piperin.
- Phương pháp thuỷ phân liên tục trên cột được nhồi Lipozim^{IM}. Nhiệt độ hoạt động thích hợp từ 30 - 70°C. pH không ảnh hưởng đến hoạt động của enzym.
- Phương pháp đóng nang: dùng phương pháp nhỏ giọt, tại Trung tâm Khoa học và Công nghệ, trường Đại học Dược Hà Nội .
- Chiết tách enzym: Sau khi phá vỡ tế bào, hỗn dịch được ngâm 3 giờ ở nhiệt độ 4°C. Cuối cùng enzym thô được tách ra từ hỗn dịch bằng cách lọc chân không, hoặc li tâm lạnh. Enzym thô sau đó được đem phân tích hoạt lực. Quá trình tuyển chọn giống sẽ căn cứ vào hoạt lực của enzym.

2.6. Phương pháp kỹ thuật gen:

- Tách chiết ADN hệ gen của vi khuẩn *E. coli* ATCC 11105. Nhân gen *LacZ* mã hoá β -galactosidaza bằng kỹ thuật PCR. Đưa gen *LacZ* vào vectơ pET-22b(+). Biến nạp ADN plasmid vào tế bào *E. coli* BL21 bằng xung điện. Tách chiết ADN plasmid từ vi khuẩn *E. coli*. Xử lý ADN plasmid bằng hai enzym hạn chế *NcoI* và *XhoI*. Định tính sự biểu hiện của gen trên môi trường đặc. Biểu hiện β -galactosidaza trong môi trường lỏng.

- Xác định quan hệ di truyền giữa nấm men con lai và nấm men bố mẹ theo phương pháp nhân gen- khuếch đại ADN đa hình ngẫu nhiên RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA).
- Phương pháp kiểm tra sự có mặt của gen M- dsARN và gen L- dsARN của nấm men sinh tổng hợp zymoxin bằng điện di trên gel agarosa.
- Phương pháp đột biến tế bào bằng ethidium bromit .
- Phương pháp lai hiếm Nakatomi dùng lai ghép nấm men LE1 và LE2.

2.7. Phương pháp hoá lý, hoá sinh, hoá phân tích:

- Thành phần các loại đường được xác định chính xác bằng sắc ký lỏng cao áp (HPLC).
- Phân tích đường khử theo phương pháp DNS.
- Phân tích đạm theo phương pháp Kjeldahl.
- Phân tích béo theo phương pháp chiết bằng máy Soxhlet.
- Xác định đường khử : bằng phương pháp Lane- Eynon.
- Xác định đường fructoza: Bằng phương pháp Cistein- cabazon và đo trên máy UV - 1601 PC.
- Sản phẩm chuyển hoá từ đường bột được phân tích bằng máy sắc ký lỏng cao áp HPLC.
- Xác định hàm lượng glucoza dư trong dịch lên men theo 2 phương pháp: Dùng máy đo glucoza Precision và phương pháp Graxianop (chuẩn độ bằng kali ferixyanua).
- Độ cồn (% v/v) trong dịch lên men được xác định dựa vào điểm sôi của cồn trên máy Dujardin-Salleron của Pháp.
- Rượu bậc cao và các ester: Isoamilic, isoaxetat, etylaxetat, aldehyt, axeton được xác định bằng sắc ký khí (GC).
- Hàm lượng đường glucoza, lactoza, cồn trong mẫu nghiên cứu được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp, sắc ký lớp mỏng Nelson Somogyl. Hàm lượng nitơ tổng số xác định bằng phương pháp Kjeldahl. Độ axit của dịch được tính theo độ Therner. Xác định hoạt độ lipaza bằng chuẩn độ [62].
- Xác định hàm lượng protein bằng phương pháp Lowry.
- Xác định hàm lượng nhóm -NH₂ tự do bằng phương pháp Ninhydrin của Rosen.
- Điện di trên gel polyacrylamit theo phương pháp của Laemmli.
- Sắc ký lọc gel trên Sephadex-G75 theo phương pháp của Andrew.
- Xác định độ trong của dịch và khả năng lắng của nấm men bằng phương pháp so màu trên máy so màu (Thermo Spectronic, Mỹ).

- Xác định thành phần hoá học của dịch quả bằng máy sắc ký lỏng cao áp HPLC (Shimazu, Nhật Bản) và máy sắc ký khí GC (Shimazu, Nhật Bản).
- Phân tích hàm lượng SO₂ trong dịch quả theo TCVN 6328-1997.
- Xác định hàm lượng protein hòa tan theo AOAC
- Xác định hàm lượng đạm amin tự do theo phương pháp Ninhydrin
- Xác định hàm lượng chất béo bằng phương pháp Soxhlet theo AOAC
- Xác định hàm lượng hydratcacbon theo AOAC
- Xác định hàm lượng maltoza và glucoza theo AOAC
- Xác định hàm lượng vitamin C bằng phương pháp thử iot
- Xác định hàm lượng pectin bằng phương pháp Canxi pectat.
- Định lượng axit D,L-malic: Dựa theo phương pháp của Alan E. Goodban và J. Benjamin Stark [12].
- Định lượng nồng độ aldehyt, este và cồn bậc cao theo phương pháp sắc ký khí Shimadzu LZC8A của Nhật.
- Xác định thành phần axit béo của dầu tinh chế và hỗn hợp axit béo bằng máy sắc ký khí HP-5890 của hãng Hewlett Packard. Cột dài 30m. Đường kính 0,32mm. Nhiệt độ buồng bơm mẫu 240⁰C. Khí mang là He. Xác định chỉ số axit của dầu và hỗn hợp axit béo theo TCVN [10]. Xác định hàm ẩm của dầu và hỗn hợp axit béo theo TCVN [10]. Xác định chỉ số peroxit theo TCVN [10].
- Xác định hoạt lực enzym: Đơn vị hoạt lực lipaza tính bằng số ml NaOH và KOH 0,1N dùng để trung hòa lượng axit béo giải phóng ra dưới tác dụng của lipaza trong 1g dầu [3]. Đánh giá hoạt lực enzym Lipozim^{IM} thông qua chỉ số axit của dầu và hỗn hợp axit béo sau khi thủy phân. Hỗn hợp axit béo có chỉ số axit càng cao thì hoạt lực Lipozim^{IM} càng đạt cao.
- Phá vỡ tế bào : Sử dụng 3 phương pháp là nghiền bi, đồng hoá siêu tốc và siêu âm. Cả 3 phương pháp trên đều dùng dung dịch đệm McIlvaine (muối photphat natri- axit xitric) 0,1M pH= 5.
- Hoạt lực của enzym FTS, GOT, CAT được xác định theo phương pháp của Hidaka cải tiến. Xác định thành phần đường (định tính) bằng sắc ký bản mỏng
- Xác định nồng độ chất khô hoà tan bằng chiết quang kế (Refractometer).
- Xác định độ trong của dịch bằng cách đo độ truyền quang T (transmittance) ở bước sóng 590 nm.

2.8. Phương pháp toán học:

- Phương pháp quy hoạch toán học bậc 1 xử lý dữ liệu về điều kiện lên men tối ưu.

- Sử dụng phương pháp qui hoạch thực nghiệm Box - Wilson.

2.9. Phương pháp kiểm nghiệm:

- Kiểm nghiệm tính an toàn của chế phẩm enzym collagenaza Tính an toàn của chế phẩm enzym collagenaza từ *B. subtilis* FS-2 được kiểm nghiệm theo phương pháp thường quy trên động vật thử nghiệm chuột lang trắng và chuột nhắt.
- Thử nghiệm hoạt tính phân giải protein gây dị ứng. Xử lý gliadin và α - casein với collagenaza. Cơ chất và sản phẩm phản ứng được phân tách trên SDS-PAGE 12,5% và được gửi đi thử nghiệm với huyết thanh của bệnh nhân dị ứng với gliadin và α - casein trong phản ứng ELISA.

2.10. Phương pháp thử độc tính

- Thử độc tính cấp LD₅₀ theo tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam III trên chuột nhắt trắng: đưa liều 25-50 ml/ kg cho vào dạ dày qua ống thông và xác định liều chết 50% (LD₅₀).

2.11. Phương pháp cảm quan

Chỉ tiêu cảm quan của dịch lên men được hội đồng cảm quan gồm 5 thành viên là chuyên gia cảm quan đánh giá theo phương pháp cho điểm đối với rượu nhẹ có ga, TCVN 3215-79.

2.12. Thiết bị :

- Kính hiển vi huỳnh quang Nikon E 800 (camera Fujix Digital HC-300Zi), Japan.
- Tủ nuôi lắc ổn nhiệt 1575R SL Shel Lab -Sheldon manufacturing inc, USA.
- Tủ ẩm B12 Heraeus - Kendo Laboratory Products.
- Thiết bị lên men chìm 5 lít New brunswish fermentor, USA.
- Máy ly tâm eppendorf 1K15-Sigma laborzentrifuger, Germany;
- Máy ly tâm nhiệt độ thấp Allegra TM 64R Centrifuge-Beckman, Germany; và máy ly tâm thường EBA 20-Hettich zentrifuger, Germany.
- Máy so màu quang phổ Ultrospec® 2000 UV/Visible Spectrophotometer Amersham pharmacia biotech, Germany.
- Thiết bị sắc ký cột Pharmacia Biotech, Sweden.
- Thiết bị sắc ký HPLC HP Agilent 1100 Series.
- Cột sắc ký trao đổi ion : ϕ 4,5cm x 50cm Thượng Hải, Trung Quốc.
- Hệ thống thiết bị sắc ký lỏng cao áp HPLC, Nhật Bản
- Máy so màu Genesis, Mỹ.
- Dây chuyền sản xuất bột dinh dưỡng trẻ em tại Viện Công nghiệp thực phẩm
- Dây chuyền sản xuất bánh bích quy và kẹo tại Công ty thực phẩm Hà Tây

- Dạy chuyên sản xuất bánh bích quy và kẹo tại Cơ sở sản xuất bánh kẹo Phúc Long
- Mô hình thiết bị chế biến nước quả tươi: Nồi hơi 100 kg/ h, máy lọc khung bản, máy xé, máy chà, máy ép thuỷ lực, máy đồng hoá siêu tốc, máy ly tâm, máy đồng hoá áp suất cao, máy ghép mí, thiết bị bài khí, thiết bị chân, chà, ép, ly tâm, thiết bị cô đặc chân không, máy dập nút chai thủy tinh và thanh trùng sản phẩm .
- Thiết bị thuỷ phân dầu phòng thí nghiệm là cột phản ứng bằng thủy tinh có đường kính trong là 1,5cm, chiều cao cột 25 cm, gồm 2 vỏ để có thể điều chỉnh nhiệt độ của phản ứng bằng máy điều nhiệt. Dầu đưa vào cột cũng được gia nhiệt trong cột 2 vỏ khác. Thiết bị thuỷ phân dầu quy mô thực nghiệm được thiết kế và chế tạo bằng inox đường kính trong là 160mm, đường kính ngoài 250mm, chiều cao cột 1600mm, năng suất thuỷ phân 1kg/ giờ.
- Mô hình thiết bị chưng cất và trích ly tinh dầu và nhựa dầu hạt tiêu tại Viện Công nghiệp thực phẩm có công suất 50 kg nguyên liệu/ mẻ.
- Thiết bị sản xuất sirô fructoza, sản xuất rượu vang bao gồm các thiết bị khai thác tận dụng thiết bị sẵn có, thiết bị sản xuất bia dư thừa về mùa đông và các thiết bị thiết kế và chế tạo mới của doanh nghiệp ,

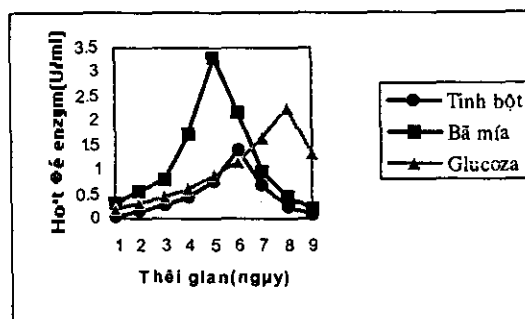
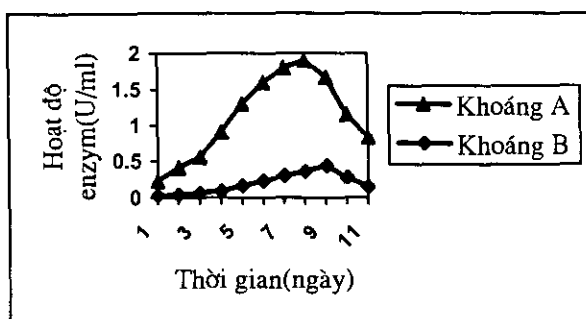
III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Nghiên cứu thu nhận β - glucosidaza và ứng dụng để tăng hương độ uống.

3.1.1. Tuyển chọn chủng nấm mốc có khả năng sinh tổng hợp β - glucosidaza.

β - glucosidaza là một trong những enzym tham gia trong phức hệ phân huỷ xenluloza. Để sơ tuyển các chủng vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp β - glucosidaza cao, hoạt độ phân huỷ xenluloza của các chủng được đánh giá theo hoạt độ CMC-aza khuếch tán trên môi trường thạch đĩa CMC. Có 12 chủng thử nghiệm được cung cấp từ Bộ sưu tập giống của Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Đại học Bách khoa Hà Nội. Các chủng giống này được cấy truyền từ môi trường giữ môi trường trung gian cám gạo: Cám 90%, trấu 10%, hàm ẩm 60%, hấp tiệt trùng 1 atm/ 1 giờ, tỷ lệ giống 1 ống giống/ 4 bình/ 25 g môi trường, nuôi 30 °C/ trong 5-7 ngày. 0,2 ml dịch chiết enzym 3% được nhỏ vào lỗ thạch CMC đường kính 1 cm để đo đường kính vòng phân giải xenluloza. Kết quả phân tích cho thấy tất cả các chủng thử nghiệm đều có hoạt tính phân huỷ xenluloza, tuy nhiên trong đó có 4 chủng cho hoạt tính CMCAza cao hơn cả là *Phanerochaete chrysosporium* BK1 (có nguồn gốc từ Hungari), *Aspergillus niger* PBC (Phillipin), *Aspergillus niger* QM và *Trichoderma viride* 90 (Pháp). Hoạt tính phân huỷ CMC phản ánh sự tác động hiệp đồng của phức hệ xenlulaza (C_1 , C_x và β - glucosidaza). Do vậy dựa vào kết quả này ta cũng chưa thể kết luận chủng có hoạt tính CMC cao nhất cũng sẽ cho hoạt tính β - glucosidaza cao nhất. Để lựa chọn chủng có khả năng sinh tổng hợp β - glucosidaza cao cho các mục đích nghiên cứu tiếp theo của đề tài, 4 chủng trên được nuôi cấy trên môi trường dịch thể có bổ sung thêm nguồn cacbon là bã mía, glucoza, cao nấm men và muối khoáng. Chủng gốc sau khi được hoạt hoá và cấy vào môi trường theo tỷ lệ 5%, môi trường được điều chỉnh pH 5,5. Các chủng được nuôi trong các bình tam giác 250 ml ở nhiệt độ 30°C trên máy lắc tốc độ 200 vòng/ phút. Sau 5 ngày mẫu được lấy ra ly tâm loại sinh khối (10.000 vòng/ phút, - 4°C/ 10 phút). Dịch nổi được đem đi xác định hoạt độ β - glucosidaza. Từ kết quả phân tích hoạt độ β - glucosidaza của 4 chủng nghiên cứu cho thấy chủng *Aspergillus niger* PBC cho khả năng sinh tổng hợp β - glucosidaza cao nhất, đường kính vòng phân giải đạt 0,62 cm cao hơn các chủng khác đạt 0,36 cm đến 0,54 cm, hoạt độ enzym đạt 3,65 U/ml cao hơn các chủng khác đạt 2,73 U/ml đến 3,11 U/ml. *Aspergillus niger* PBC được chọn để thu nhận enzym và nghiên cứu tiếp theo.

3.1.2. Tìm điều kiện tối ưu để sản xuất enzyme β -glucosidaza từ *A. niger* PBC.



Hình 1. Ảnh hưởng của môi trường khoáng đến hoạt độ enzyme β -glucosidaza **Hình 2.** Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến quá trình sinh tổng hợp β -glucosidaza

Xác định nguồn nitơ: Chúng nghiên cứu được nuôi thử với hai dịch khoáng A và B (khoáng A sử dụng nguồn nitơ là muối amon còn khoáng B thay bằng muối nitrat), nguồn cacbon là glucoza (10%), pH đầu 5,5, lượng giống 10%, nhiệt độ nuôi 30 °C và tốc độ lắc 200 vòng/ phút. Mẫu được lấy ra hàng ngày để xác định hoạt độ. Kết quả cho thấy nguồn nitơ amon là thích hợp hơn (**Hình 1**).

Xác định nguồn cacbon: Với nguồn bã mía, sinh khối ở dạng hạt rất ít, chủ yếu dưới dạng dịch, hoạt độ enzyme thu được khá cao (3,3 U/ ml), thời gian thu enzyme rút xuống còn 5 ngày (**Hình 2**).

3.1.3. Xây dựng quy trình thu nhận chế phẩm β -glucosidaza từ *A. niger* PBC

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ amon sulfat đến hiệu suất thu hồi β -glucosidaza

Nồng độ (NH ₄) ₂ SO ₄ độ bão hoà (%)	Protein tổng sau tủa (mg)	Hoạt độ tổng		Hoạt độ riêng sau tủa (U/ mg)	Hiệu suất thu hồi (%)
		Trước tủa (U)	Sau tủa (U)		
65	302.9	693	266.6	0.88	38.4
70	322.2	693	312.5	0.97	45.1
75	354.8	693	450.7	1.27	65.0
80	477.4	693	<u>530.0</u>	1.11	76.4
85	556.9	693	479.0	0.85	69.1

Kết quả thí nghiệm cho thấy hiệu suất thu hồi enzyme đạt cao nhất ở nồng độ muối 80% độ bão hoà. Do đó chúng được chọn làm tác nhân kết tủa cho các thí nghiệm tiếp theo (**Bảng 1 và 2**).

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ cồn đến khả năng thu hồi β -glucosidaza

Nồng độ ethanol (% v/v)	Protein tổng sau tủa (mg)	Hoạt độ tổng		Hoạt độ riêng sau tủa (U/ mg)	Hiệu suất thu hồi (%)
		trước tủa (U)	sau tủa (U)		
65	363.6	693	440.0	1.21	63.5
70	370.6	693	478.1	1.29	69.0
75	371.8	693	580.0	1.56	83.7
80	442.2	693	614.6	1.39	88.7
85	519.3	693	555.7	1.07	80.2

Tinh chế β -glucosidaza trên các cột sắc ký: Chế phẩm enzym thu được sau kết tủa cồn ở 75% được hoà tan trong đệm axetat 0,05M, pH 4, 8 theo tỷ lệ 1: 3 và cho qua cột lọc Sephadex G-75. Các phân đoạn có hoạt tính β -glucosidaza cao thu được sau sắc ký lọc gel Sephadex G-75 được tập trung lại và cho qua cột sắc ký trao đổi ion DEAE xenluloza A-50 (**Bảng 3**).

Bảng 3. Hiệu suất thu hồi và mức độ làm sạch β -glucosidaza

Các bước tinh sạch	Protein tổng (mg)	Hoạt độ		Mức độ tinh sạch (lần)	Hiệu suất thu hồi (%)
		Tổng (U)	Riêng (U/ mgPr)		
Dịch enzym thô	3818,0	2100	0,55	1,0	100,0
Sau tủa cồn 75%	1126,7	1757,7	1,56	2,83	83,7
Sau sắc ký Sephadex G75	66,6	1283,1	19,25	35,0	73,0
Sau sắc ký DEAE xenluloza A50	11,7	513,2	44,05	80,0	40,0

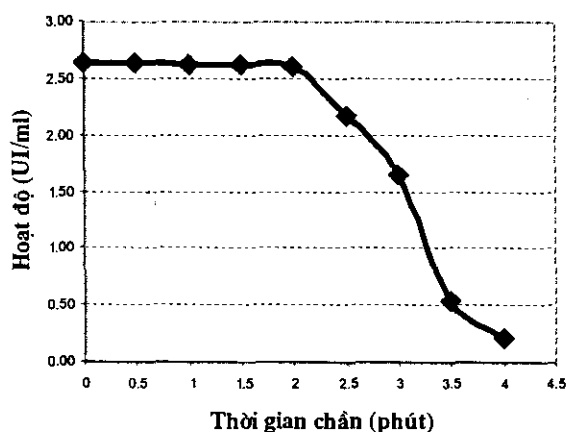
Hình 3. Xây dựng qui trình công nghệ tinh sạch β -glucosidaza từ *A. niger* PBC

Dịch lên men $\rightarrow$ Kết tủa cồn $\rightarrow$ Ly tâm 10.000 v/ ph trong 20 phút, ở 4 °C $\rightarrow$ Thu tủa $\rightarrow$ Hoà tủa trở lại trong đệm axetat 0,05M, pH4,8 $\rightarrow$ Sắc ký Sephadex G-75 $\rightarrow$ Sắc ký DEAE xenluloza A- 50 $\rightarrow$ Chế phẩm $\rightarrow$ β - glucosidaza tinh sạch

Nghiên cứu bảo quản chế phẩm β -glucosidaza từ *A.niger* PBC: Dịch enzym sau kết tủa cồn được bổ sung một số chất rồi đem đi bảo quản ở tủ lạnh (4°C). Mẫu được lấy ra định kỳ và đem xác định hoạt độ. Từ kết quả phân tích ta thấy khi bổ sung benzoat natri vào thì hoạt tính β - glucosidaza sau 50 ngày bảo quản còn tới 83,7%. Với CMC, tinh bột, xenlobioza và $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, kết quả cho thấy hoạt tính enzym còn giữ được tương đối cao, sau 50 ngày bảo quản còn tới 87%.

Nghiên cứu thu nhận enzym từ nhân hạt mơ: Nhân hạt xay thô, đồng hoá siêu tốc 11.000v/phút, trích ly bằng đệm xitrat 0,1M; pH5,4 ở 30 °C trong 8 giờ. Hàm lượng enzym trong nhân hạt đạt khoảng 528 U/ g nhân hạt.

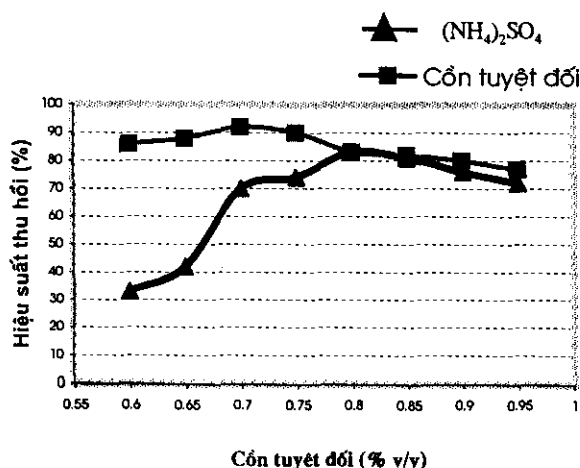
Hình 4. Ảnh hưởng của chế độ chần mơ tới hoạt độ enzym trong nhân hạt



Ảnh hưởng của thời gian chần:

Thí nghiệm được tiến hành với 500g quả được chần trong một lít nước sôi (100°C), thời gian từ 0 đến 4 phút. Kết quả phân tích cho thấy hoạt tính của enzym trong nhân hạt hầu như không thay đổi khi thời gian chần kéo dài không quá 2 phút (Hình 4)

Hình 5. Ảnh hưởng nồng độ cồn tới hiệu suất thu hồi enzym



Tách chiết enzym khỏi nhân hạt:

Hai tác nhân kết tủa là amon sunfat và cồn tuyệt đối. Qua biểu đồ cho thấy: Kết tủa phân đoạn với tác nhân là cồn cho hiệu suất thu hồi cao hơn so với dùng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, nồng độ cồn là 70%, hiệu suất thu hồi 92% (Hình 5).

Thu nhận enzym: Chế phẩm enzym sau kết tủa còn được hòa tan trong đệm xitrat pH 6,2 và được sấy phun ở các chế độ nhiệt độ khác nhau. Nhiệt độ sấy càng thấp thì hoạt độ enzym càng ổn định, khi nhiệt độ sấy tăng lên 60⁰C hoạt độ tổng chỉ còn lại 85% so với ban đầu. Tuy nhiên, chế phẩm thu được khi sấy ở nhiệt độ thấp 40⁰C sẽ còn một lượng ẩm khá lớn (>14%) rất khó khăn cho quá trình bảo quản sau này. Vì vậy, nhiệt độ sấy 50⁰C được lựa chọn cho quy trình thu nhận chế phẩm (**Bảng 4**).

Bảng 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ sấy tới hoạt độ enzym

Nhiệt độ sấy (⁰ C)	Hoạt độ tổng trước sấy (UI)	Hoạt độ tổng sau sấy (UI)	Hoạt độ bị giảm (%)	Hàm ẩm W(%)
40	2000	1880	6	16,0
50	2000	1820	9	12,0
60	2000	1700	15	8,5

3.1.4. Nghiên cứu ứng dụng chế phẩm β - glucosidaza để tăng hương cho rượu vang và khử đắng necta mơ.

Tăng hương rượu vang: Bổ sung β -glucosidaza vào các công đoạn khác nhau khi tiến hành lên men rượu gần như không ảnh hưởng đến quá trình lên men của nấm men, các chỉ tiêu đánh giá về vị, độ trong, nồng độ cồn và hàm lượng axit có trong rượu thành phẩm đều tương tự nhau (độ cồn dao động trong khoảng hẹp 13,4 - 13,6% v/ v). Tuy nhiên kết quả phân tích cảm quan cho thấy hương thơm của rượu vang thành phẩm được cải thiện nhất khi enzym được bổ sung ở công đoạn lên men phụ.

Khử đắng necta mơ: Kết quả phân tích cho thấy sau 3 giờ thì toàn bộ các mẫu có nồng độ enzym trên 2,94 U/ lit đều không còn chất gây đắng amygdalin (**Bảng 5**).

Bảng 5. Ảnh hưởng của nồng độ enzym và thời gian xử lý tới khả năng thủy phân amygdalin necta mơ

Nồng độ E (U/ lit)	0	1,47	2.94	4.41	5.88	7.35
Thời gian (giờ)						
1	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	-	-	-
4	+	-	-	-	-	-

Ghi chú: (+) Có vị đắng và (-) Không có vị đắng.

Từ kết quả phân tích ta chọn được nồng độ enzym thích hợp cho khử đắng nectamơ là 5.88U/ lit trong thời gian 2 giờ (**Bảng 6**).

Bảng 6. Ảnh hưởng của nồng độ enzym tới khả năng thuỷ phân amygdalin

Lượng enzym (U/l)	0	1.47	2.94	4.41	5.88	7.35	8.82
Sau 2 giờ xử lý	+	+	+	+	-	-	-

Ghi chú: (+) Có vị đắng và (-) Không có vị đắng.

3.2. Nghiên cứu phân lập và tạo chủng giống bằng kỹ thuật di truyền để sinh tổng hợp enzym β - galactosidaza có hiệu suất cao

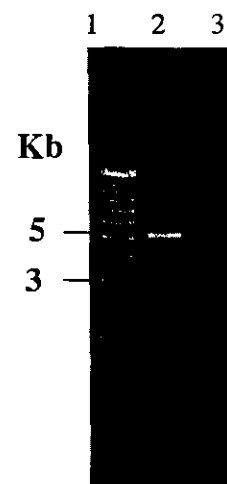
3.2.1. Phân lập gen mã hoá β -galactosidaza bằng kỹ thuật PCR

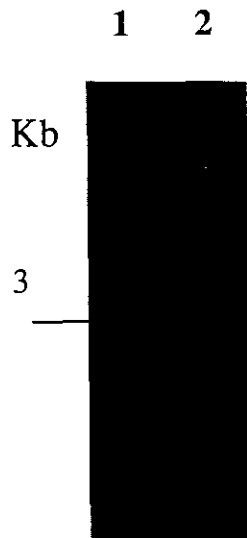
Quy trình thiết kế vector biểu hiện pET-22bLacZ để biểu hiện trong chủng biểu hiện *E. coli* BL21 như sau: Đoạn gen *LacZ* sau khi được nhân lên bằng kỹ thuật PCR từ ADN hệ gen của *E. coli* ATCC11105 được xử lý bằng hai enzym hạn chế *XhoI* và *NcoI*. ADN plasmid pET-22b(+) cũng được xử lý bằng 2 enzym này để tạo đầu tương thích. Sau đó hai sản phẩm của phản ứng cắt được nối lại với nhau bằng ADN ligaza để tạo thành vector biểu hiện pET-22bLacZ.

Vector biểu hiện pET-22b *LacZ* được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21 để tạo chủng vi khuẩn tái tổ hợp mang vector pET-22bLacZ có khả năng tổng hợp cao β -galactosidaza. *E. coli* BL21 là chủng đã bị đột biến mất gen *lon* và *ompT* mã hoá cho proteinaza [70], vì thế các protein ngoại lai sau khi được tổng hợp sẽ không bị phân huỷ bởi proteinaza của cơ thể chủ (**Hình 6 và 7**).

Hình 6. Sản phẩm phản ứng cắt vector pET-22b(+) và sản phẩm PCR nhân đoạn gen lacZ

Đường chạy số 1: Thang ADN chuẩn
Đường chạy số 2: Vector pET-22b cắt bằng enzym hạn chế *NcoI* và *XhoI*.
Đường chạy số 3: Sản phẩm PCR



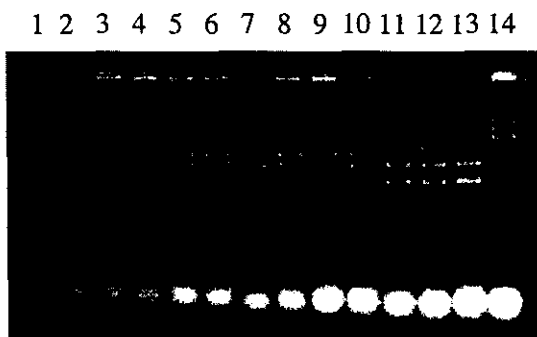


Hình 7. Sản phẩm PCR nhân đoạn gen *lacZ* trên gel agarosa 0,8%

Đường chạy số 1: Thang ADN chuẩn
Đường chạy số 2: Sản phẩm PCR

3.2.2. Nghiên cứu tạo chủng vi khuẩn tái tổ hợp mang gen mã hóa sinh tổng hợp β -galactosidaza

Chọn thể biến nạp mang vector biểu hiện *pET-22bLacZ*:



Hình 8. ADN plasmid được tách từ các thể biến nạp trên gel agarosa 0,8%

Đường chạy Đ/C: pET-22b(+)

Đường chạy 1-13: Plasmid từ các vòng khuẩn lạc tái tổ hợp khác nhau

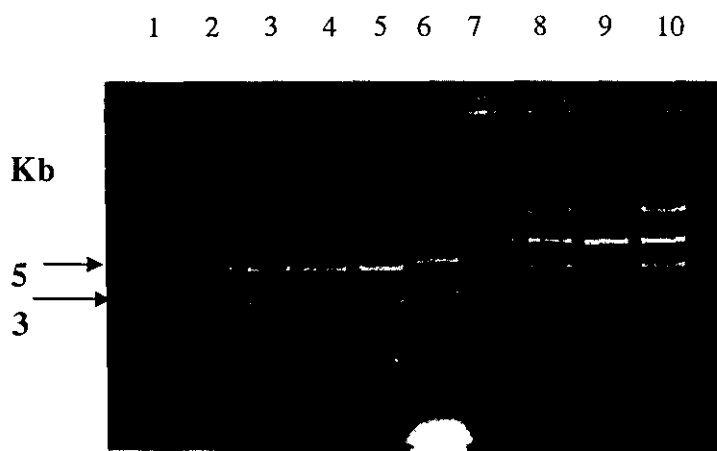
Vectơ pET-22bLacZ được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* BL21 bằng phương pháp xung điện. Sau đó các thể biến nạp được cấy trải trên môi trường chọn lọc thạch đĩa LB chứa Amp, X-gal, IPTG có kháng sinh Amp và ủ ở 37 °C qua đêm. Trên đĩa xuất hiện hai

loại khuẩn lạc, khuẩn lạc màu xanh và khuẩn lạc màu trắng. Đây là những khuẩn lạc gồm các thể biến nạp có chứa vectơ vì những tế bào không mang vectơ đã bị áp lực chọn lọc ampicillin đào thải. Chọn ngẫu nhiên một số

khuẩn lạc tách plasmid để kiểm tra. ADN plasmid được tách từ các khuẩn lạc đơn và được kiểm tra bằng điện di trên gel agarosa 0,8% (**Hình 8**).

Kiểm tra thể biến nạp chứa vectơ biểu hiện: Để kiểm tra xem các ADN plasmid tách từ các khuẩn lạc số 4, 5, 6, 7 có chứa gen *lacZ*, chúng tôi tiến hành cắt các plasmid này lại bằng hai enzym hạn chế *NcoI* và *XhoI*. Đây là hai enzym đã được dùng để cắt và đưa gen *lacZ* vào vectơ pET-22b(+) để tạo vectơ biểu hiện pET-22bLacZ. kết quả kiểm tra cho thấy các plasmid này có thêm một đoạn chèn dài gần 3

Kb tương đương với kích thước của gen *lacZ*. Như vậy chúng tôi đã đưa được gen *lacZ* vào vectơ pET-22b (Hình 9).



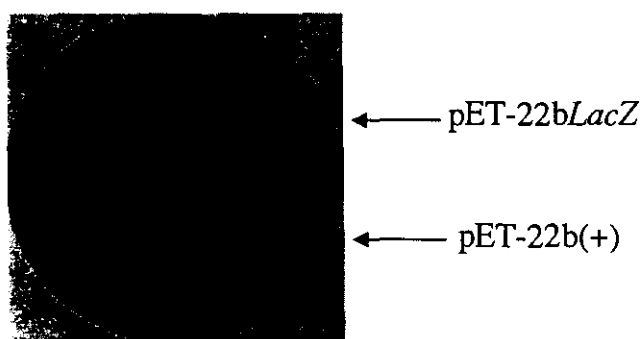
Hình 9. ADN plasmid dòng số 4, 5, 6, 7 trên gel agarosa 0,8%.

Đường chạy số 1: Thang ADN chuẩn

Đường chạy số 2-5: ADN plasmid dòng số 4, 5, 6, 7 được cắt bằng *NcoI* và *XhoI*

Đường chạy số 6: ADN plasmid gốc

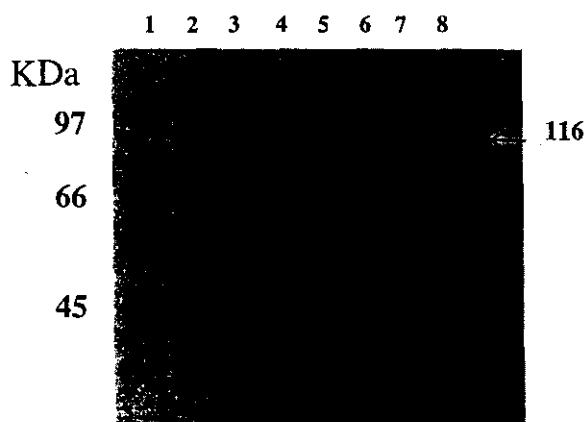
Đường chạy số 7-10: ADN plasmid tách từ các khuẩn lạc 4, 5, 6, 7.



Hình 10. Định tính sự biểu hiện gen *lacZ* trong *E. coli* BL21 trên môi trường thạch đĩa LB đặc chứa IPTG và X-Gal.

Khả năng biểu hiện β -galactosidaza trên môi trường thạch đĩa: Để định tính sự biểu hiện β -galactosidaza trong vi khuẩn *E. coli* BL21, chúng tôi chọn hai dòng tế bào mang pET-22b*LacZ* có màu xanh và dòng tế bào đối chứng mang pET-22b(+) có màu trắng cấy vạch lên môi trường thạch LB chứa Amp.

Biểu hiện gen *lacZ* trong môi trường lỏng: Kết quả điện di hình 7 cho thấy các mẫu protein từ *E. coli* BL21 mang pET-22b*LacZ* sau 1^h, 2^h, 3^h, 4^h và 5^h cảm ứng đã xuất hiện thêm một băng protein là 116 kDa (Hình 11).



Hình 11. Protein tổng số của dòng *E. coli* BL21 tái tổ hợp mang gen *lacZ*

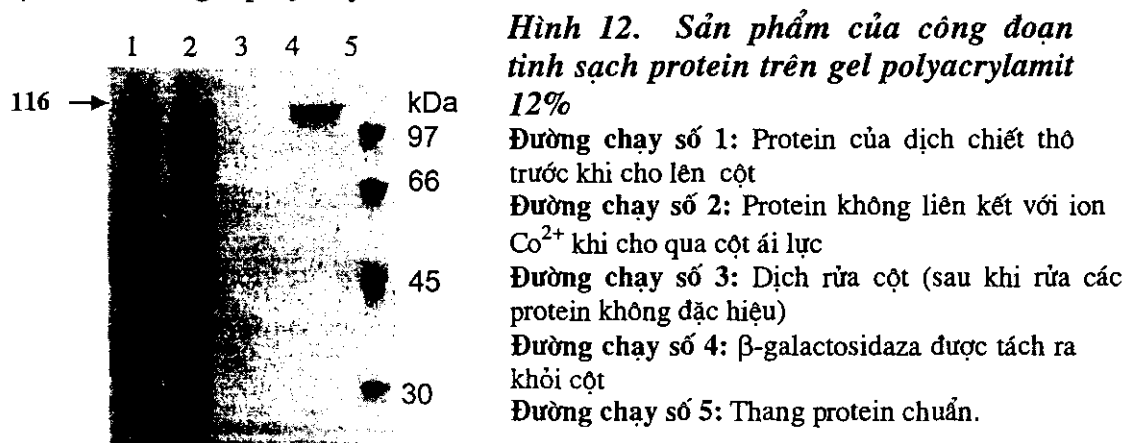
Đường chạy số 1: Thang protein chuẩn

Đường chạy số 2: *E. coli* BL21 chứa pET-22b(+) được cảm ứng trong 5h.

Đường chạy số 3 - 8: *E. coli* BL21 mang pET-22b*LacZ* được cảm ứng trong 0^h, 1^h, 2^h, 3^h, 4^h và 5^h

Tinh sạch β -galactosidaza bằng phương pháp sắc kí ái lực: Như ta đã biết vectơ pET- 22b(+) đã được thiết kế sẵn một trình tự mã hoá cho sáu axit amin. Histidin nằm liền nhau ngay trước vùng đa nối để thuận lợi cho việc tinh sạch protein tái tổ hợp về sau. Khi ta đưa đoạn gen ngoại lai vào vùng đa nối thì trình tự trên sẽ được phiên mã và dịch mã cùng với gen ngoại lai, vì vậy protein được tổng hợp sẽ là một protein tái tổ hợp có sáu gốc histidin ở phía đầu C.

Phương pháp tinh sạch bằng cột Talon dựa vào liên kết ái lực giữa ion coban (Co^{2+}) với vòng imidazol của histidin. Khi các histidin ở gần nhau thì liên kết giữa chúng với ion coban càng mạnh. Protein tái tổ hợp trong vectơ pET-22b(+) có đuôi His-tag với sáu histidin liên tục sẽ liên kết rất đặc hiệu với ion coban. Các phân đoạn protein tái tổ hợp được thu lại ở dạng tinh sạch. Kết quả sản phẩm protein tinh sạch được kiểm trên gel polyacrylamit 10% (Hình 12).



Từ ảnh điện di ta thấy ở đường chạy số 4 là β -galactosidaza tinh sạch chỉ có một băng protein có kích thước khá lớn khoảng 116 kD. Điều đó chứng tỏ cột Talon có ái lực đặc hiệu với β -galactosidaza có thêm đuôi là 6 histidin. Bằng phương pháp Bradford, chúng tôi tính được nồng độ β -galactosidaza trong dịch tinh sạch là: 0,0424 mg/ml hay $9,12 \times 10^{-8}$ M. Sau khi xác định được nồng độ β -galactosidaza tinh sạch, chúng tôi tiếp tục nghiên cứu ứng dụng enzym này. Sinh tổng hợp β -galactosidaza từ chủng vi khuẩn tái tổ hợp *E. coli* ATCC 11105. Dựa vào đường chuẩn BSA ta có thể định lượng được β -galactosidaza. Đo OD 595 nm ta được lượng enzym tinh sạch là 0.05 mg/ ml.

3.2.3. Nghiên cứu xác định các điều kiện công nghệ sản xuất chế phẩm β -galactosidaza

Hai chủng vi khuẩn trên được lựa chọn làm đối tượng cho phần nghiên cứu sau.

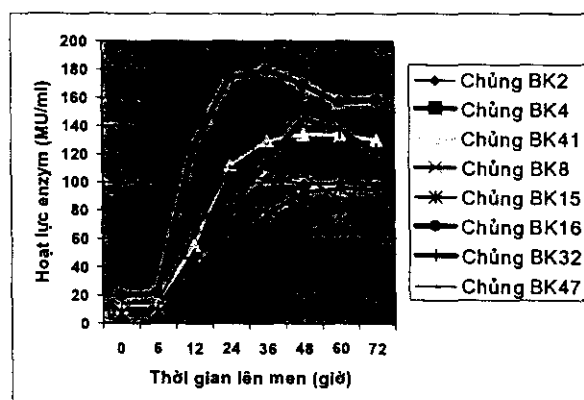
Đồng thời, thử nghiệm kiểm tra hoạt lực enzyme tự do trong dịch lên men, ở dịch nghiền sinh khối vi khuẩn đã cho thấy ở tất cả các chủng kiểm tra hoạt lực enzyme nội bào cao hơn nhiều so với enzyme ngoại bào và hoạt lực enzyme tăng khi kéo dài thời gian xử lý siêu âm. Từ kết quả trên cho phép rút ra kết luận enzyme β -galactosidaza là enzyme nội bào liên kết trong tế bào chất. Một số thực nghiệm xử lý tạo biến chủng siêu tổng hợp bằng tia cực tím đã được triển khai. Tuy nhiên chưa có được kết quả mong đợi.

Đề tài đã triển khai các thí nghiệm và xử lý theo phương pháp quy hoạch thực nghiệm đã xác định được hàm tối ưu là:

$$Y = 5317,65 + 126,85.X_1 - 488,72.X_2 + 74,47.X_3.$$

Trong đó: Y là hoạt độ enzyme tích tụ ; X_1 là hàm lượng lactoza bổ xung vào dịch thải phomat g/l; X_2 là hàm lượng pepton + NH_4NO_3 (tỉ lệ 3:1,41), g/l N tổng; X_3 là pH môi trường.

Theo kết luận trên, hoạt độ enzyme β -galactosidaza có thể đạt giá trị cực đại 7.456 MU/ ml, tương ứng với chế độ lên men sử dụng dịch thải phomat, có bổ xung 15,4 g/l lactoza, bổ xung pepton và NH_4NO_3 (theo tỉ lệ 3:1,41) để đạt hàm lượng nitơ tổng số 3,022 g/l và điều chỉnh pH về giá trị pH 7, tỉ lệ cấp giống 5%, nhiệt độ lên men 30 °C và kết thúc quá trình sau thời gian lên men là 36 giờ (**Hình 13**).



Hình 13. Sự biến đổi hoạt lực enzyme của chủng trong quá trình lên men

Sinh tổng hợp β -galactosidaza từ chủng nấm mốc tự nhiên *Aspergillus aculeatus* BK-M4 và *P. implicatum* BK-M12: Đã phân lập được 10 chủng nấm mốc khác nhau phản ứng dương tính với môi trường X-Gal. Tiếp tục tuyển chọn phân lập lại thu được 6 chủng, ký hiệu là M_4 , M_6 , M_7 , M_8 , M_9 và M_{12} phản ứng rõ nét với chỉ thị. Kết quả nghiên cứu thu được cho thấy có 4 chủng nấm mốc M_4 , M_6 , M_9 và M_{12} sinh

tổng hợp enzym β -galactosidaza bền nhiệt hai chủng M_4 và M_{12} vẫn thể hiện hoạt tính sau thời gian phản ứng là 8 giờ, trong đó chủng M_{12} có hoạt lực cao hơn. Kết quả nghiên cứu hình thái và đặc điểm sinh lý và áp dụng chỉ tiêu phân loại Raper đã cho phép phân loại định tên cho hai chủng là:

- + Chủng nấm mốc M_4 định tên là *Aspergillus aculeatus* BK- M_4 .
- + Chủng nấm mốc M_{12} định tên là *Penicillium implicatum* BK- M_{12} .

Từ 1 lít dịch lên men với hoạt độ enzym 6.420 MU/ ml đã thu được 5,2 g sinh khối đông khô với hoạt độ 1.012.MU/ mg, bổ xung vào chế phẩm sinh khối đông khô 0,5 g/ 500 ml sữa (tương ứng nồng độ enzym xấp xỉ 2.000 MU/ ml). Giữ hỗn hợp phản ứng ở 30 °C, trong 1 giờ. Tiến hành xác định hàm lượng đường lactoza và glucoza tại hai thời điểm trước và sau khi xử lý. Kết quả thu được cho thấy hàm lượng đường lactoza đã giảm đáng kể.

3.2.4. Ứng dụng chế phẩm enzym β -galactosidaza tái tổ hợp.

β -galactosidaza tái tổ hợp có nguồn gốc từ vi khuẩn *E. coli* ATCC 11105 (do nhóm tác giả Viện Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam tạo ra) được sử dụng để xử lý sữa tươi trong thời gian 30 phút ở 30°C, với nồng độ enzym khác nhau: 1, 2, 4, 6, 8 và 10 lần nồng độ cơ sở tương ứng với nồng độ cơ chất trong sữa tươi (mỗi đơn vị nồng độ cơ sở tương ứng với 1 μ mol lactoza trong sữa) đã thu được kết quả (Bảng 7).

Bảng 7. Sự biến đổi hàm lượng đường lactoza trong sữa khi xử lý enzym β -galactosidaza tái tổ hợp từ *E. coli* ATCC 11105

Nồng độ enzym	x	2X	4X	6X	8X	10X
Hàm lượng lactoza còn lại sau xử lý (%)	69,73	60,07	38,67	28,80	12,60	7,93

Như vậy có thể ghi nhận hiệu quả tích cực đối với khả năng sử dụng enzym β -galactosidaza tái tổ hợp để làm giảm hàm lượng đường lactoza trong sữa. Tuy nhiên, để ứng dụng công nghệ này vào sản xuất, cần được tiếp tục nghiên cứu.

3.3. Nghiên cứu phân lập, tuyển chọn và tạo chủng giống sinh tổng hợp enzym collagenaza và ứng dụng trong thực phẩm.

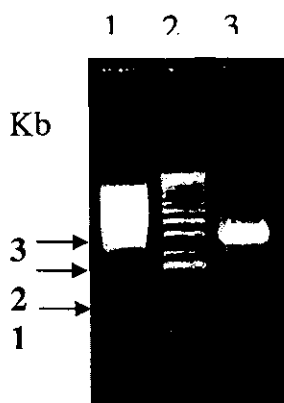
3.3.1. Phân lập gen mã hóa sinh tổng hợp collagenaza bằng kỹ thuật PCR.

Tách chiết và làm sạch ADN hệ gen của *B. subtilis* FS-2: Tế bào vi khuẩn được nuôi cấy huyền phù qua đêm ở giai đoạn ổn định. Màng tế bào *B. subtilis* được phá vỡ bằng lysozym. ADN hệ gen và các chất nội bào được giải phóng ra khỏi tế bào. EDTA và proteinaza K làm bất hoạt, loại bỏ một số protein của vi khuẩn. Phenol/chloroform làm sạch các protein đã bị biến tính có trong mẫu. ADN hệ gen không bị biến tính và được rửa bằng cồn tuyệt đối. Kết quả tách chiết và làm sạch ADN hệ gen được kiểm tra bằng điện di trên gel agarosa 0,8%.

Xây dựng ngân hàng gen của *B. subtilis* FS- 2 và thiết kế vector *pUC18* mang các đoạn gen của *B. subtilis* FS-2 bằng kỹ thuật PCR.

Xử lý vector *pUC 18* bằng *Bam*HI: Hỗn hợp phản ứng ADN plasmid và enzym sau khi trộn được ủ ở 37 °C trong hai giờ để phản ứng xảy ra hoàn toàn. Sau phản ứng sản phẩm ADN plasmid được cho qua cột để tinh sạch ADN nhằm loại bỏ những mẫu vụn, hoá chất thừa.

Xử lý ADN hệ gen bằng enzym *Sau*3AI: ADN hệ gen của *B. subtilis* được cắt bằng enzym *Sau*3AI sao cho các đoạn gen có kích thước khoảng 3- 8 Kb. Sau đó, các đoạn gen này được tinh sạch lại qua cột tinh sạch ADN và được kiểm tra bằng điện di trên gel agarosa 0.8% (*Hình 14*).



Hình 14. Sản phẩm ADN được xử lý bằng enzym hạn chế

Đường chạy1: Hệ gen *B. subtilis* FS-2 cắt bằng *Sau*3AI, thu đoạn từ 3-8 kb

Đường chạy2: Thang ADN chuẩn

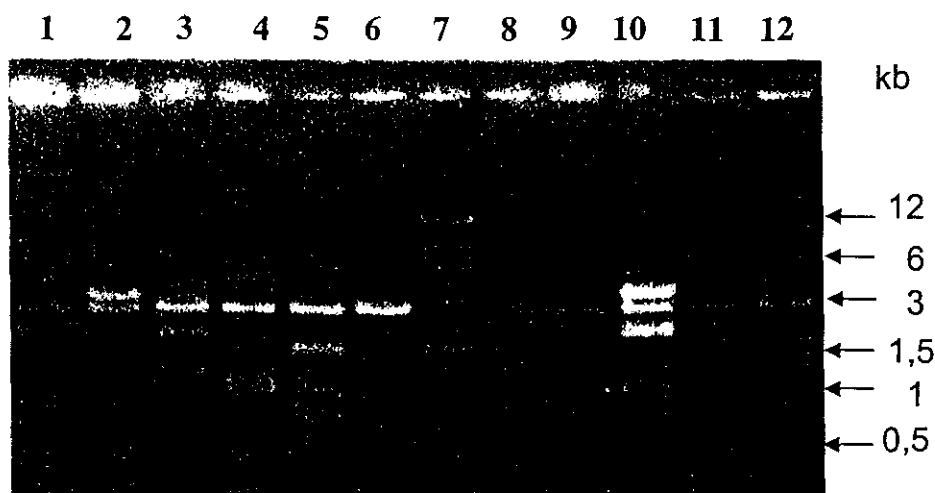
Đường chạy3: ADN plasmid *pUC18* bị cắt bằng *Bam* HI

Đưa các đoạn gen của *B. subtilis* FS-2 vào *pUC18*: Các đoạn gen của *B. subtilis* FS-2 có kích thước 3- 8 Kb được nối với *pUC18* bằng ADN ligaza. Phản ứng

ghép nối được tiến hành ở nhiệt độ 16 °C. Sau đó sản phẩm nối ghép gen được biến nạp vào *E. coli* DH5 α . Phương pháp biến nạp xung điện được sử dụng nhằm tăng hiệu suất của quá trình biến nạp. Sản phẩm biến nạp được cấy trải trên môi trường LB có chứa Amp , IPTG và Xgal.

Kiểm tra chất lượng ngân hàng gen: Plasmid từ các thể biến nạp khác nhau được tách chiết để kiểm tra kích thước của các đoạn gen. Chọn ngẫu nhiên một số khuẩn lạc trắng và khuẩn lạc xanh nuôi cấy trong môi trường LB + Amp ở nhiệt độ 37°C qua đêm. Kết quả chúng tôi thu được các ADN plasmid tách từ các khuẩn lạc màu trắng có các đoạn gen chèn vào. Tuy nhiên để chắc chắn hơn nữa chúng tôi xử lý các plasmid tách từ các thể biến nạp bằng các enzym hạn chế để kiểm tra kích thước của đoạn gen được chèn vào vectơ. Các plasmid được cắt kiểm tra bằng hai enzym hạn chế *EcoRI* và *HindIII*. Sản phẩm sau phản ứng cắt được điện di kiểm tra trên gel agarosa 0,8% (Hình 15).

Kết quả điện di trên **hình 15** cho thấy, các ADN plasmid tách từ các khuẩn lạc màu trắng có chứa các đoạn ADN ngẫu nhiên khác nhau. Như vậy, chúng tôi đã tạo được ngân hàng gen của *B. subtilis* FS-2 trong *E. coli* DH5 α có chứa nhiều đoạn gen với kích thước khác nhau.

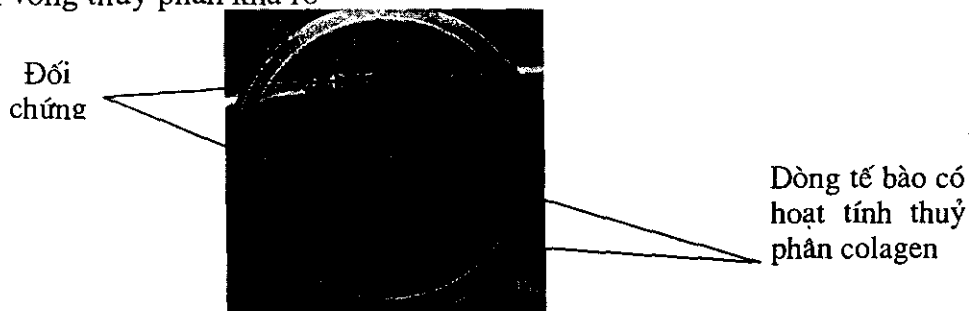


Hình 15. Sản phẩm cắt ADN plasmid tách từ ngân hàng gen *B. subtilis* bằng hai enzym hạn chế *HindIII* và *EcoRI* trên gel agarosa 0.8%
Đường chạy 1 và 6: pUC 18;
Đường chạy 2-5 và 8-12: ADN plasmid tách từ khuẩn lạc trắng
Đ/C 7: Thang ADN chuẩn

Sàng lọc dòng tế bào *E. coli* tái tổ hợp:

Chúng tôi tiến hành cấy vạch riêng từng khuẩn lạc lên môi trường thạch đĩa có bổ sung 0,3% collagen không tan, ủ ở nhiệt độ 30°C qua đêm, đặt trong tủ lạnh 2 ngày sau đó quan sát. Những dòng có khả năng thủy phân collagen thì xung quanh khuẩn lạc sẽ xuất hiện vòng thủy phân. Chúng tôi đã chọn được 1 dòng mong đợi.

Kết quả **hình 16** cho thấy dòng đối chứng: *E. coli* DH5 α / *pUC18* không có vòng thủy phân. Dòng *E. coli* DH5 α + *pUC 18* + đoạn gen ngoại lai của *B. subtilis* FS-2 xuất hiện vòng thủy phân khá rõ



Hình 16. Dòng tế bào *E. coli* tái tổ hợp có khả năng thủy phân collagen

3.3.2. Tìm điều kiện tối ưu để các chủng tái tổ hợp sản xuất enzyme hiệu suất cao:

Sau khi khảo sát điều kiện để biểu hiện gen, chúng tôi đã xác định điều kiện tối ưu để tạo được lượng lớn collagenaza theo quy trình sau: Nuôi cấy tế bào *E. coli* BL21 mang gen *lipA* ở 37°C, qua đêm, trong môi trường LB bổ sung ampicillin 100 μ g/ ml. Hoà loãng 100 lần dịch nuôi cấy qua đêm trong môi trường LB có chứa Amp. Nuôi lắc tiếp ở 37°C trong khoảng thời gian 2- 3 giờ. Bổ sung IPTG đến nồng độ cuối cùng 1mM nuôi cấy tiếp ở 37°C trong 3 giờ. Thu nhận tế bào bằng li tâm. Hòa tế bào vào đệm phosphat 20mM, pH7,4 để phá tế bào và thu enzyme.

Kiểm tra đoạn gen của thể biến nạp mã hoá hoạt tính thủy phân collagen:

Như được chỉ ra trên **hình 17**, plasmid được tách từ dòng có khả năng thủy phân collagen có kích thước cao hơn rất nhiều so với *pUC18*. Như vậy plasmid trong dòng có khả năng thủy phân collagen chắc chắn chứa một đoạn gen mã hoá cho enzyme phân cắt collagen. Chúng tôi đặt tên cho plasmid này là *pUCCol*.

1 2

Hình 17. Plasmid tách từ *pUCCol* trên gel agarosa 0,8%

Đường 1: ADN plasmid tách từ dòng biến nạp có hoạt tính thủy phân
Đường 2: *pUC18*

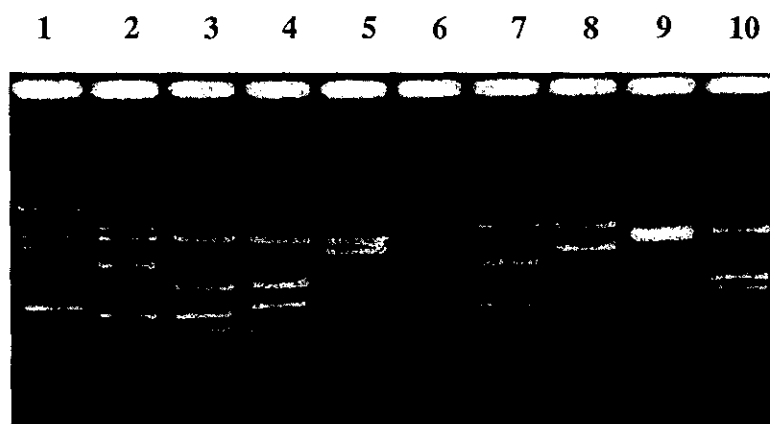


Để khẳng định gen được chèn trong *pUCCol* mang gen mã hoá cho collagenaza, chúng tôi đã tách lại plasmid này và biến nạp lại vào trong tế bào *E.coli* DH5 α . **Kết quả cho thấy: 100% các dòng tế bào biến nạp lại có khả năng thuỷ phân collagen (Hình 18).** Đoạn gen của *B. subtilis* FS-2 được chèn vào trong *pUCCol* là khá lớn nên không thể đọc trình tự trực tiếp đoạn gen từ *pUCCol*. Vì vậy, để tìm hiểu sâu về đoạn gen đó và định ra được vùng gen mã hoá cho collagenaza, trước hết chúng tôi phải lập sơ đồ của một số enzym hạn chế trên đoạn gen. *pUCCol* được cắt bằng nhiều enzym hạn chế a

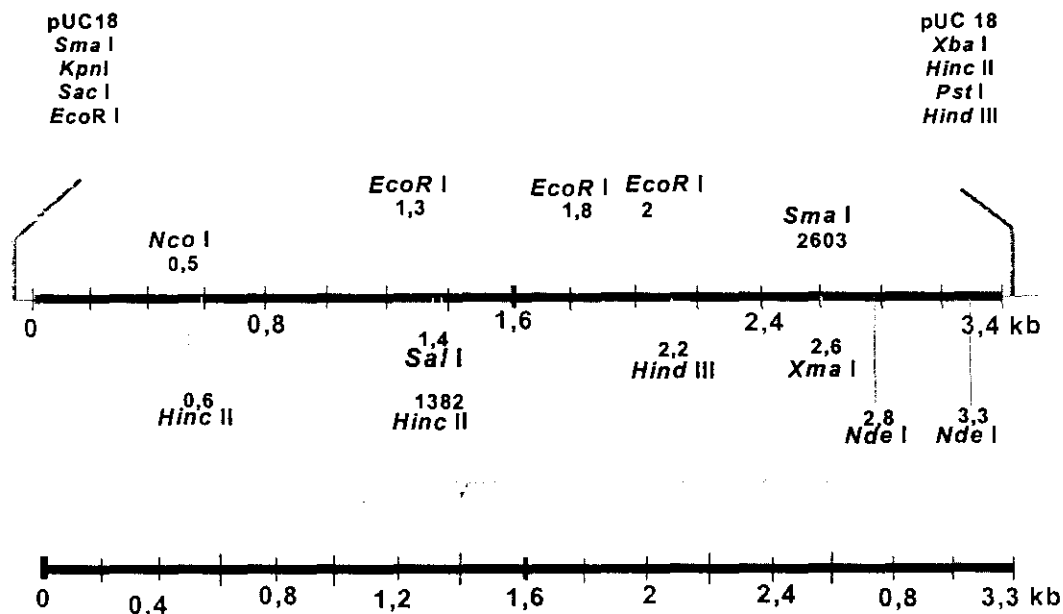


Hình 18. 100% dòng biến nạp lần 2 đều có hoạt tính thuỷ phân collagen

khác nhau *Kpn* I, *Hind* III, *Hinc* II, *Kpn* I; *Sma* I, *Hinc* II, *Hind* III; *Sma* I, *Hind* III; *Nco* I, *Hind* III; *Sma* I, *Nco* I; *Nde* I, *Sma* I; *Eco* RI và từ kết quả này chúng tôi đã lập được sơ đồ một số enzym hạn chế trên đoạn gen. Từ sơ đồ enzym hạn chế, chúng tôi đã tách dòng các đoạn nhỏ của đoạn gen này và đọc trình tự gen (**Hình 19 và 20**).



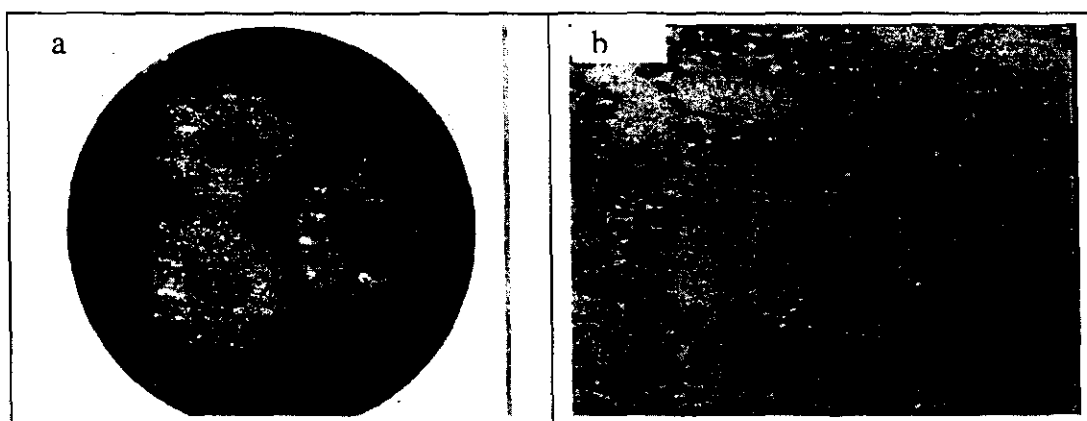
Hình 19. Kết quả xử lý ADN plasmid bằng các enzym hạn chế
Đường chạy 1 : ADN plasmid xử lý bằng *Kpn* I, *Hind* III
Đường chạy 2 : ADN plasmid xử lý bằng *Kpn* I, *Hinc* II
Đường chạy 3 : ADN plasmid xử lý bằng *Sma* I, *Hinc* II
Đường chạy 4 : ADN plasmid xử lý bằng *Eco*RI, *Hind* III
Đường chạy 5 : ADN plasmid xử lý bằng *Sma* I, *Hind* III
Đường chạy 6 : Thang ADN chuẩn
Đường chạy 7 : ADN plasmid xử lý bằng *Nco* I, *Hin*II I đối chứng
Đường chạy 8 : ADN plasmid xử lý bằng *Sma* I, *Nco* I



Hình 20. Sơ đồ các enzym hạn chế

3.3.3. Xây dựng quy trình thu nhận chế phẩm collagenaza từ chủng *Bacillus subtilis* FS-2 tự nhiên.

3.3.3.1. Phân lập vi khuẩn có nguồn gốc tự nhiên sinh tổng hợp collagenaza: Đã khảo sát 26 mẫu thực phẩm lên men truyền thống. Từ 11/ 26 mẫu dương tính cho phép nhận được các khuẩn lạc có vòng thủy phân. 53 khuẩn lạc có tạo vòng thủy phân trên đĩa thạch collagen. Chỉ có 8/ 53 chủng thể hiện hoạt tính collagenaza. Các khuẩn lạc tạo vòng thủy phân còn lại có thể chứa các vi khuẩn có hoạt tính gelatinaza. Chủng FS2 được chọn để nghiên cứu tiếp do có hoạt tính phân giải collagen cao (**Hình 21a**).



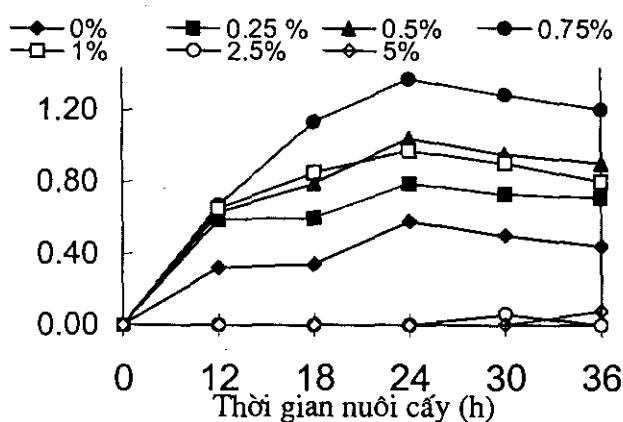
Hình 21a. Khuẩn lạc FS-2

Hình 21b. Tế bào FS-2

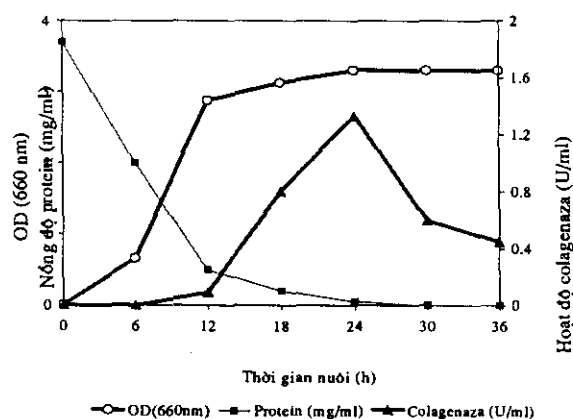
Định tên vi khuẩn: FS-2 là trực khuẩn mảnh, dài 3 μ m, có màu chất nhuộm Gram thay đổi theo tuổi của canh trường, là vi khuẩn Gram dương khi nuôi 24 giờ trên môi trường NA và chuyển sang Gram âm khi canh trường già (**Hình 21b**). FS-2 được định tên bằng kit định tên API 50 CHB của Biomérieux, Pháp. Kết quả khảo sát các đặc tính hình thái và phân loại của FS-2 là *Bacillus subtilis* với độ phù hợp tới 99,9% và có khả năng sinh tổng hợp collagenaza cao. Đây là một trong số ít các vi khuẩn sinh tổng hợp collagenaza được biết chắc là an toàn trong chế biến thực phẩm.

3.3.3.2. Quy trình sinh tổng hợp và thu nhận collagenaza.

- Ảnh hưởng của cơ chất lên sự sinh trưởng của vi khuẩn: Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các cơ chất (hình 22) cho thấy một trong các cơ chất nghiên cứu: Collagen, casein, gelatin cùng với glucoza 1% đều có thể dùng để chuẩn bị canh trường nhân giống cho các thí nghiệm tiếp theo.
- Collagenaza được tổng hợp theo nguyên tắc cảm ứng với các cơ chất gelatin, polypepton, collagen và dịch thủy phân từ gelatin (hình 22).
- Môi trường thích hợp cho tổng hợp enzym chứa polypepton 0,75% và NaCl 1% (hình 22). Việc thu nhận enzym tại giữa pha bão hoà trên canh trường gián đoạn (hình 23).



Hình 22. Sự tổng hợp enzym phụ thuộc polypepton từ gelatin



Hình 23. Động thái tạo thành collagenaza từ *B. subtilis* FS-2.

3.3.4. Quy trình tinh chế enzym collagenaza và đặc tính enzym.

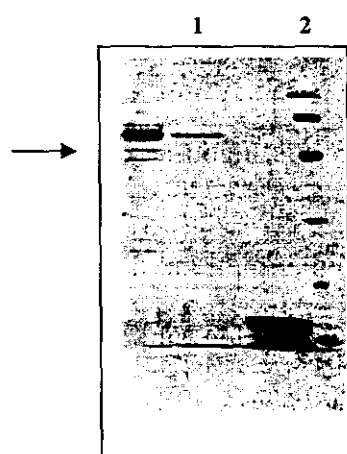
3.3.4.1. Xây dựng quy trình thu nhận chế phẩm enzym tinh khiết: Collagenaza từ canh trường *B. subtilis* FS-2 được tinh chế theo quy trình nhiều bước liên tiếp (**Hình 24**).

Dịch lên men *B. subtilis* FS-2 → Ly tâm → Siêu lọc YM -10 → DEAE Sepharoza
CL-6B → CM-xenluloza → Butyl-Toypearl 650M → SephadexG-75 → Đông khô

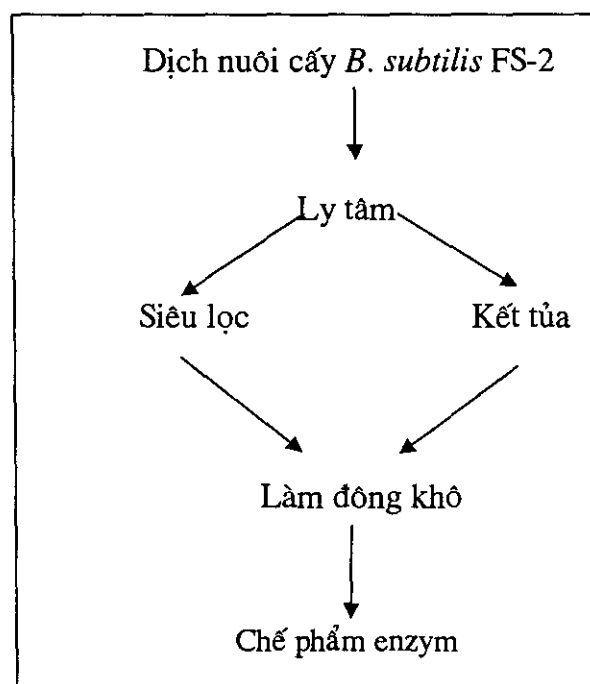
Hình 24. Sơ đồ quy trình tinh chế collagenaza từ *B. subtilis* FS-2

Bằng cách liên tiếp phân tách qua các bước tinh chế như đã mô tả ở trên, collagenaza được tinh chế và phân tách hoàn toàn khỏi các protein khác. Enzym thu được không thể hiện hoạt tính caseinaza. Collagenaza được tinh chế và theo quy trình trên hoạt độ riêng tăng 16,5 lần nhưng hiệu suất thu hồi thấp (1,9%).

Độ tinh khiết của collagenaza tinh chế được kiểm tra bằng điện di trên PAGE 15%. Điện di đồ của collagenaza thu nhận theo quy trình 1 cho thấy enzym thu được là một protein thuần nhất (hình 25).



Hình 25. Điện di đồ của collagenaza tinh khiết từ FS2
Đường chạy 1: collagenaza của FS-2.
Đường chạy 2: protein marker



Hình 26. Quy trình thu hồi chế phẩm collagenaza kỹ thuật

3.3.4.2 Xây dựng quy trình thu nhận chế phẩm enzym kỹ thuật: Với mục tiêu sử dụng khác nhau, collagenaza được nghiên cứu thu hồi dưới dạng chế phẩm kỹ thuật. Chúng tôi thử nghiệm song song hai biện pháp thu hồi chế phẩm kỹ thuật theo sơ đồ trên hình 26 (quy trình A và quy trình B). Với quy trình này, collagenaza được thu hồi với hiệu suất 50-59%, hoạt độ riêng tăng 11,6 lần (hình 26).

3.3.4.3 Nghiên cứu tính chất enzym tinh khiết: Phân tóm tắt các tính chất của collagenaza từ *B. subtilis* FS-2 được trình bày trong bảng 8.

Bảng 8. Tóm tắt các tính chất của collagenaza từ *B. subtilis* FS-2.

TT	Tính chất	Giá trị
1	Nhiệt độ tối ưu	50°C
2	Độ ổn định nhiệt	60°C (mất 15% hoạt độ), 65 °C (mất 35% hoạt độ)
3	pH tối thích	9
	Độ ổn định pH	pH 5 - 10
4	KLPT	125 kDa
5	Cơ chất đặc hiệu	colagen, gelatin

3.3.5. Nghiên cứu ổn định và bảo quản chế phẩm enzym collagenaza

3.3.5.1. Chế độ sấy: Enzym thu được đem sấy chân không ở 32⁰C, hoặc sấy đông khô ở chế độ -78 ⁰C, độ chân không 15 mT. Enzym được bổ sung các chất ổn định ở các nồng độ và thời điểm khác nhau sau khi kết tủa và sấy sơ bộ đến độ ẩm 3-4%.

3.3.5.2. Bảo quản với chất ổn định là CaCl₂ và đệm Tris- HCl 50 mM: Ở nồng độ 35% (w/ w), CaCl₂ ổn định hoạt tính của collagenaza hiệu quả nhất, ở nồng độ Ca⁺⁺ cao hơn thì khả năng hút nước của chế phẩm cũng tăng lên, nhưng chế phẩm có thể bị mất hoạt tính. Còn ở nồng độ thấp hơn cũng có thể cho kết quả bảo quản tốt, nhưng không đạt giá trị cao, do nồng độ ion Ca⁺⁺ chưa đủ cho việc ổn định và nâng cao hoạt tính của enzym.

3.3.5.3. Bảo quản với chất ổn định là tinh bột biến tính (TBBT): Sự có mặt của TBBT trong chế phẩm collagenaza làm tăng khả năng ổn định của chế phẩm enzym đã giúp cho việc loại bỏ nước có trong enzym và làm cho hoạt độ của enzym tăng lên đáng kể. Với các nồng độ khác nhau của TBBT bổ sung cũng cho khả năng ổn định khác nhau, nhưng đều làm cho hoạt độ enzym tăng lên đáng kể theo thời gian. Nồng độ TBBT càng cao thì khả năng loại nước ra khỏi enzym càng tốt, giúp cho hoạt tính của enzym cũng tăng theo. Tuy nhiên ở nồng độ TBBT là 35% (w/w) thì hoạt độ enzym tăng lên một cách rõ rệt và đều theo thời gian. Hiện tượng này có thể duy trì được hàm lượng nước thiết yếu cần cho cấu trúc của phân tử collagenaza.

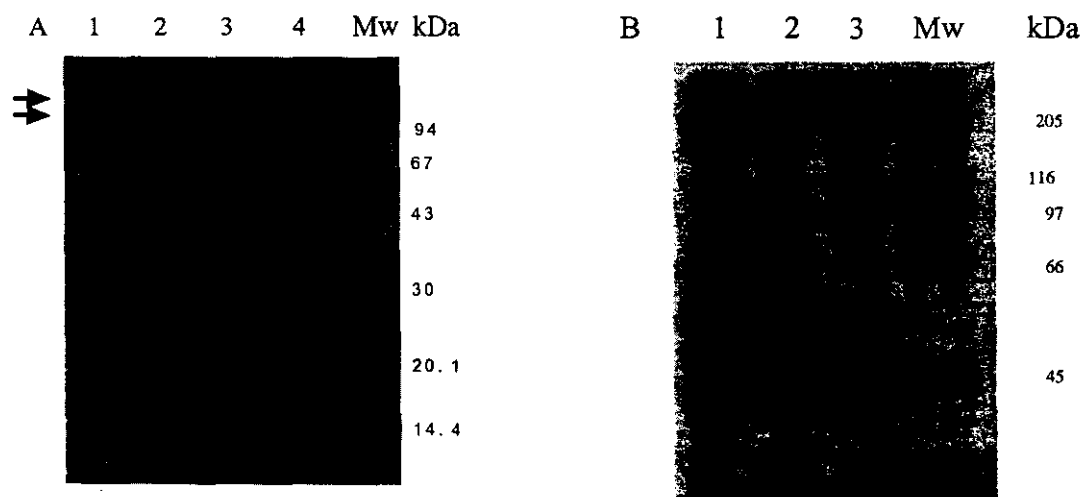
3.3.5.4. Bảo quản với chất ổn định là chitosan và polyvidon 25: Với chất bảo quản là chitosan và polyvidon 25 thì hiệu suất bảo quản cũng tăng theo thời gian. Tuy nhiên hiệu quả bảo quản enzym bằng các chất này không thực sự hiệu quả.

3.3.5.5. Bảo quản với glycerol: Chế phẩm enzyme được bổ sung vào glycerol dưới hai dạng. Hỗn hợp được bảo quản ở trong các ống nghiệm có nắp đậy kín ở 0 °C. Các kết quả kiểm tra cho thấy nồng độ glycerol 70% cho kết quả bảo quản ổn định. Trong số các chất ổn định trên, TBBT cho khả năng ổn định tốt nhất ở nồng độ 35%.

3.3.6. Nghiên cứu ứng dụng các chế phẩm enzyme vào sản xuất

3.3.6.1. Kiểm định tính an toàn của chế phẩm enzyme: Chế phẩm enzyme kỹ thuật collagenaza từ FS-2 được kiểm định tính an toàn trên động vật thử nghiệm chuột lang và chuột nhắt theo đường tiêu hoá (Trung tâm Kiểm định sinh phẩm quốc gia). Kết quả kiểm định đã khẳng định tính an toàn của chế phẩm enzyme từ *B. subtilis* FS-2). Như vậy chế phẩm có thể được cho phép sử dụng cho thực phẩm.

3.3.6.2. Thử nghiệm khả năng phân giải collagen: Kết quả thuỷ phân collagen (SPC) bằng collagenaza FS-2 được biểu diễn trên 12.5% SDS-PAGE (**Hình 27A**). Chuỗi α - và β của collagen được chỉ bằng mũi tên. Collagenaza FS-2 thuỷ phân collagen (đường 3) sau 6 h nhanh hơn các collagenaza kiểm chứng khác (đường 2 và đường 4). Kết quả này chứng minh khả năng thuỷ phân collagen của collagenaza FS 2.



Hình 27. Tính thuỷ phân đặc hiệu của collagenaza

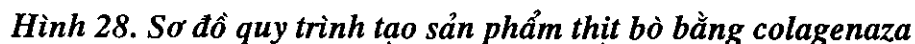
A: Sản phẩm thuỷ phân collagen bằng collagenaza CN2 (đường 2), FS2 (đường 3) M2-4, (đường 4) trên SDS-PAGE 12.5% (Nagano et al., 2001)[40].

B: Myofibrillar (đường 1) và myofibrillar thuỷ phân với collagenaza FS-2 30 phút (đường 2), 60 phút (đường 3) trên SDS-PAGE 15%.

Tính thuỷ phân đặc hiệu của collagenaza được chứng minh khi collagenaza không thuỷ phân myofibrillar sau 30 và 60 min ủ với collagenaza (**Hình 27B**). Đường chạy 1

3.3.6.3. Sử dụng collagenaza làm mềm thịt: Kết quả phân tích mẫu thịt bò cấp thấp (thịt vai) được xử lý với enzym cũng cho thấy sau thời gian xử lý 30-120 phút, hàm lượng nhóm $-NH_2$ của mẫu thử nghiệm tăng hơn so với mẫu đối chứng từ 167-1.687 %. Như vậy, việc thuỷ phân mở đường collagen của collagenaza được hỗ trợ bởi các proteaza khác có mặt trong chế phẩm, làm giá trị thịt tăng cao so với mẫu không xử lý. Kết quả đánh giá cảm quan so sánh cho thấy có sự khác biệt về độ mềm của mẫu. Phân giải gân bò bằng collagenaza từ FS-2 cho thấy sau 30-120 phút ủ với enzym, hàm lượng nhóm $-NH_2$ của mẫu thử nghiệm tăng hơn so với mẫu đối chứng 200-1.200%. Điều này khẳng định khả năng sử dụng collagenaza từ FS-2 cho thuỷ phân collagen làm mềm thịt.

Mẫu	α - NH ₂ (mg/g)		
	30 min	60 min	90 min
Kiểm chứng	0,02	0,02	0,02
Mẫu α - NH ₂	0,04	0,08	0,24
mẫu (%)	200	400	1200



3.3.6.4. Thử nghiệm khả năng phân giải collagen da cá của enzym và FS2

Kết quả cho thấy khả năng phân giải da cá của vi khuẩn *B. subtilis* FS-2 trong chượp cá không cao. So với mẫu đối chứng hàm lượng axit amin tăng không đáng kể (hình 18A) và da cá cũng không bị thay đổi nhiều. Bề mặt da vẫn còn những lớp nhầy bên ngoài. Hiện tượng này có thể được giải thích là do nồng độ muối quá cao trong chượp cá đã ức chế khả năng sinh tổng hợp collagenaza trong chượp. ở mẫu có bổ sung collagenaza hàm lượng axit amin tăng lên đáng kể so với mẫu đối chứng. Rõ ràng, collagenaza đã hoạt động tốt trong môi trường có nồng độ muối cao. Điều này mở ra khả năng sử dụng collagenaza vào khâu lọc để giảm bớt khó khăn đồng thời rút ngắn thời gian sản xuất nước mắm. Sau khi bổ sung, collagenaza hoạt động tốt sau khoảng thời gian 24- 48 giờ. Vậy trong sản xuất nước mắm muốn đạt hiệu quả xử lý cao ta có thể kết hợp cả 2 phương pháp: Bổ sung *B. subtilis* FS-2 vào giai đoạn đầu của công đoạn muối cá và ở giai đoạn cuối của quá trình này thì bổ sung collagenaza (hình 27B).

Khả năng phân giải da cá của vi khuẩn *B. subtilis* FS-2 trong chượp cá không cao. So với với mẫu đối chứng hàm lượng axit amin tăng không đáng kể và da cá cũng không bị biến đổi nhiều. Dung dịch enzym collagenaza của FS-2 bổ sung vào da cá cho thấy mẫu da cá mất đi các cấu trúc sợi ngang, dần nở lớn mất sắc tố và dần bị mỏng đi, trong suốt.

3.3.6.5. Khả năng sử dụng collagenaza trong phân giải một số protein dị ứng:

Gliadin và α_s - casein được sử dụng trong thí nghiệm phân giải bởi collagenaza của *B. subtilis* FS-2 với vai trò các cơ chất protein có khả năng gây dị ứng để thử nghiệm khả năng làm giảm tính gây dị ứng của enzym. Các hỗn hợp phản ứng trong đệm photphat natri 0,1 M, pH 7, với tỷ lệ enzym/ cơ chất là 1/ 100 được ủ ở 37 °C trong 24 giờ trên máy lắc ngang. Mẫu đối chứng là một hỗn hợp tương tự khi thay dung dịch enzym bằng dung dịch đệm. Sản phẩm phản ứng được phân tích trên SDS-PAGE nồng độ 12,5%. Sau 24 giờ xử lý với enzym không thể hiện trên điện di đồ các băng protein của gliadin và α_s - casein. Collagenaza có khả năng biến đổi cấu trúc các protein này, phân giải các cơ chất dị ứng và tái kết hợp tạo thành hợp chất có khối lượng phân tử cao hơn mà không phân giải tới axit amin sau 24 giờ thí nghiệm. Các sản phẩm phân giải gliadin và α_s - casein bởi collagenaza từ *B. subtilis* FS-2 được gửi thử nghiệm với huyết thanh của các bệnh nhân dị ứng với sản phẩm sữa và bột mỳ trong phản ứng ELISA.

Theo đánh giá nếu giá trị đo được của phản ứng miễn dịch ELISA cho giá trị nhỏ hơn 0,05 (đo tại bước sóng 490 nm) thì sản phẩm thử nghiệm không có tính dị ứng. Kết quả thử nghiệm ELISA với sản phẩm phân giải bởi collagenaza sau 24 giờ của cả gliadin và α_s -casein đều cho giá trị nhỏ hơn 0,05 trong khi thử nghiệm với gliadin và α_s -casein ở mẫu đối chứng tại 0 giờ và 24 giờ cho kết quả lớn hơn 2,0. Như vậy sau khi được xử lý 24 giờ với collagenaza của *B. subtilis* FS-2, các sản phẩm phân giải của protein dị ứng nghiên cứu không còn thể hiện tính gây dị ứng.

Kết quả thí nghiệm đã chứng minh khả năng sử dụng collagenaza thu được từ *B. subtilis* FS-2 trong việc cải thiện tính chất gây dị ứng của một số thực phẩm gây dị ứng nghiên cứu thông qua khả năng phân cắt hạn chế đặc hiệu của bản thân collagenaza. Chúng tôi tiến hành thử nghiệm sản xuất một số sản phẩm từ thịt bò cấp thấp chứa nhiều collagen (xúc xích từ thịt vai, thịt cổ, bí tết thịt vai), xử lý với collagenaza của FS-2 trong 60 phút ở nhiệt độ 11°C. Kết quả thực nghiệm cho thấy có sự khác biệt về hàm lượng $-NH_2$ của mẫu xử lý so với đối chứng (tăng tương ứng là 7,5 và 17%).

3.4. Công nghệ và thiết bị chế biến nông sản bằng enzym

Đã xây dựng được 22 qui trình công nghệ sinh tổng hợp, thu hồi, tách chiết, bảo quản và ứng dụng enzym trong chế biến nông sản thực phẩm: β -glucosidaza, β -galactosidaza, collagenaza, fructosyltransferaza và lipaza từ chủng vi sinh vật tự nhiên, chủng tái tổ hợp ADN và ứng dụng của chúng.

Đã xây dựng được 5 mô hình thiết bị ứng dụng enzym ở qui mô xưởng thực nghiệm và sản xuất công nghiệp: Sản xuất sirô fructoza 42%, qui mô công nghiệp, sản lượng 2 tấn/ ngày tại Công ty Cổ phần thực phẩm Minh Dương, Hà Tây; Sử dụng enzym pectinaza trong sản xuất nước quả tươi, nước quả trong và nước quả cô đặc tại Công ty Cổ phần thực phẩm Bắc Giang, Công ty Thực phẩm Đồng Giao và nước quả lên men Cider; Sử dụng α -amylaza Termamyl để nâng cao hiệu suất trích ly và tinh chế dầu hạt tiêu; Sử dụng enzym lipaza sản xuất dầu béo và viên nang mềm Hypochol giàu axit béo không no. Đã nghiên cứu hoàn thiện công nghệ và mô hình thiết bị lên men rượu vang chất lượng cao và chuyển giao công nghệ cho sản xuất công nghiệp tại Công ty Đường Biên Hoà, Công ty Bia Quảng Ninh và Công ty Bia Habada, Bắc Giang.

Đã hoàn thiện các quy trình công nghệ và thiết bị sản xuất đồ uống mới từ hạt đậu tương, hạt đại mạch nảy mầm, nước rau và nước quả lên men có độ rượu thấp.

3.5. Hoàn thiện công nghệ và xây dựng mô hình thiết bị sản xuất siro Fructoza từ tinh bột dùng phương pháp enzym glucoisomeraza cố định

3.5.1. Nghiên cứu hoàn thiện các điều kiện công nghệ cho quá trình chuyển hoá tinh bột thành glucoza làm nguyên liệu cho sản xuất sirô fructoza

Để có thể sử dụng sirô glucoza làm nguyên liệu cho sản xuất sirô fructoza, sirô glucoza phải có hàm lượng glucoza cao nhằm tăng khả năng hoạt động của enzym cố định. Vì vậy cần tiến hành nghiên cứu xác định một số thông số kỹ thuật cho phù hợp với công nghệ như: Nồng độ dịch tinh bột (gọi là sữa bột), tỷ lệ enzym dịch hoá và enzym đường hoá. Hiện tại trên thị trường có các chế phẩm enzym thuỷ phân tinh bột có hoạt lực cao là Termamyl và AMG của hãng NOVO, Đan Mạch có thể dùng để nâng cao chất lượng sirô glucoza. Các thí nghiệm xác định các điều kiện tối ưu về công nghệ được tiến hành với các enzym này.

Xác định nồng độ dịch tinh bột: Enzym hoạt động tốt khi nồng độ cơ chất thích hợp. Thí nghiệm được tiến hành với các nồng độ dịch tinh bột khác nhau (**Bảng 10**).

Bảng 10. Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất đối với quá trình thuỷ phân tinh bột

STT	Nồng độ cơ chất (%)	DE dịch hoá	DE đường hoá
1	15	21,5	92,7
2	20	12,9	95,6
3	30	15,2	96,1
4	35	9,5	94,2

Như vậy nếu sử dụng enzym Termamyl 120L, nồng độ dịch tinh bột có thể nâng lên đến 30% và DE đường hoá đạt được cao 96,1%.

Xác định lượng enzym dịch hoá thích hợp nhất: Lượng enzym Termamyl 120L sử dụng cho quá trình dịch hoá được xác định ở điều kiện pH 6, nhiệt độ 95⁰C, thời gian dịch hoá 30 phút, nồng độ dịch bột 30% (**Bảng 11**). Enzym đường hoá là enzym glucoamilaza, khả năng hoạt động tốt nhất trên cơ chất là dextrin phân tử ngắn. Tốc độ thuỷ phân dextrin nhanh gấp 6 lần so với tốc độ thuỷ phân maltoza. Vì vậy, DE dịch hoá không nên quá cao ảnh hưởng tới thời gian đường hoá. Kết quả thu được cũng chỉ ra rằng với DE dịch hoá đạt 15,65 thì DE đường hoá là 96,5 và với DE dịch hoá đạt 18,59 thì DE đường hoá cũng chỉ đạt là 96,8, mà lượng enzym sử dụng lại nhiều hơn. Vì vậy, lượng enzym Termamyl dùng tốt nhất là 0,1% so với lượng tinh bột (**Bảng 11**).

Bảng 11. Xác định tỷ lệ Termamyl 120L thích hợp nhất cho quá trình dịch hoá

STT	Tỷ lệ enzym (%)	DE dịch hoá (%)	DE đường hoá (%)
1	0,04	8,02	87,4
2	0,06	10,86	91,2
3	0,08	12,89	96,4
4	0,10	15,65	96,5
5	0,12	18,59	96,8

Xác định tỷ lệ enzym thích hợp nhất cho quá trình đường hoá: AMG (amiloglucosidaza) là enzym được sử dụng cho quá trình đường hoá. Thí nghiệm được tiến hành xác định tỷ lệ AMG thích hợp, đủ để chuyển hoá tinh bột thành glucoza với hiệu suất cao nhất mà tiết kiệm được enzym (**Bảng 12**).

Bảng 12. Xác định tỷ lệ AMG thích hợp nhất cho quá trình đường hoá

STT	Tỷ lệ enzym AMG (%)	DE đường hoá
1	0,06	73,12
2	0,08	86,91
3	0,10	95,72
4	0,12	96,28
5	0,15	96,59

Trong điều kiện đường hoá với pH 4,5, DE dịch hoá 13, thời gian đường hoá 48 giờ, nhiệt độ 60 °C thì tỷ lệ enzym AMG thích hợp nhất là 0,1%. Ở tỷ lệ này DE đường hoá đạt >95% sau 48 giờ thuỷ phân.

3.5.2. Nghiên cứu ứng dụng enzym glucoisomeraza cố định để chuyển hoá glucoza thành fructoza.

Quá trình đồng phân sử dụng enzym cố định Sweetzym T là chế phẩm glucoisomeraza do hãng NOVO, Đan Mạch sản xuất. Quá trình đồng phân hoá được tiến hành với 1 hệ thống liên tục trong cột phản ứng có chứa hạt enzym glucoisomeraza cố định. Do vậy trước khi tiến hành đồng phân hoá cần chuẩn bị dịch đường glucoza và chuẩn bị cột đồng phân.

Chuẩn bị dịch đường để chuyển hoá: Một cột phản ứng chứa enzym Sweetzym T cố định được sử dụng trong thời gian dài nên một lượng lớn dịch đường chảy qua lớp enzym trong cột đồng phân theo thời gian tích tụ lại chất bẩn, mặc dù khối lượng ít nhưng có thể đưa đến giảm tuổi thọ của enzym cố định. Một vài loại chất bẩn có thể gây mất hoạt tính của enzym hoặc có thể chất bẩn dính bám vào hạt enzym, dần dần che phủ bề mặt hoạt động của enzym, để đạt được tuổi thọ enzym tốt nhất và nồng độ fructoza cao thì yêu cầu dịch đường sạch có độ tinh khiết cao, giá trị DE đường hoá cao, nồng độ sirô glucoza thích hợp.

Ion Mg^{++} , Ca^{++} trong dịch đường làm gia tăng hoạt tính và là chất ổn định cho enzym. Hàm lượng Mg^{++} được bổ sung vào dịch đường còn tùy thuộc vào sự hiện diện của Ca^{++} . Tại một hàm lượng 1 ppm Ca^{2+} hay thấp hơn trong dịch glucoza, gia tăng hàm lượng Mg^{2+} là 45 ppm (tức là 0,6 g $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ / 1 lít dịch).

Dịch đường định mức đến một lít đun sôi trong 10 phút. Cân 0,6 gam $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ cho vào khuấy đều và tiếp tục đun sôi cách thuỷ khoảng 10-15 phút. Sau đó để nguội và chỉnh pH bằng Na_2CO_3 hoặc $NaHCO_3$ tới pH 7,3- 7,5 (đo tại nhiệt độ phòng). Enzym glucoisomeraza ở dạng cố định dạng hạt khô, hình trụ, màu nâu kích thước 0,3-1 mm tỉ trọng 0,33 g/ ml. Vì những tính chất trên của enzym nên trước khi đưa vào cột cần ngâm enzym trong dịch đường khoảng 20-30 phút với mục đích cho các hạt enzym trương nở đều. Lượng enzym thích hợp với chiều dài cột thiết kế cho phòng thí nghiệm.

Chuẩn bị cột đồng phân (trong phòng thí nghiệm): Sweetzym T được sử dụng trong quá trình đồng phân ở dạng cố định. Cho nên chuẩn bị cột đồng phân là cần thiết. Hệ thống phản ứng đồng phân bao gồm cột đồng phân dài 40 cm, đường kính 2,2 cm đặt trong tủ ổn định nhiệt (mục đích để duy trì nhiệt độ trong suốt thời gian đồng phân). Phía trên cột đồng phân nối với bình chứa dịch đường bằng một đường ống dẫn. Phía dưới cũng dùng một ống dẫn nối cột đồng phân ra phía ngoài, thu nhận sản phẩm ở phía ngoài. Như vậy dịch đường theo ống dẫn phía trên chảy vào cột đồng phân, phân tử đường glucoza đi qua tầng lớp enzym cố định, tiếp xúc với enzym và được chuyển hoá thành fructoza. Sau đó đi ra ngoài theo ống dẫn phía dưới.

Ảnh hưởng của các yếu tố đến hiệu suất chuyển hoá: Phản ứng chuyển hoá D-glucoza thành D-fructoza dưới tác dụng của Sweetzym T phụ thuộc vào nhiều yếu tố như: Nồng độ enzym, bản chất và nồng độ cơ chất phản ứng (dịch đường glucoza), nhiệt độ, pH, các ion kim loại, tốc độ dòng chảy.

Ảnh hưởng tốc độ dòng chảy: Trong quá trình đồng phân dịch glucoza chảy qua cột đồng phân chứa enzym glucoisomeraza cố định được chuyển hoá thành fructoza. Khi tốc độ dòng chảy nhanh dẫn tới hiệu suất chuyển hoá kém, vì các phân tử glucoza chưa kịp phản ứng. Khi tốc độ dòng chảy chậm thì hiệu suất chuyển hoá cao nhưng năng suất thấp. Vì vậy cần xác định tốc độ dòng chảy thích hợp sao cho dịch thu được có hàm lượng đường fructoza cao (**Bảng 13**).

Nếu tăng tốc độ dòng thì hàm lượng fructoza tạo thành giảm, chứng tỏ tốc độ dòng cao nhiều phân tử đường glucoza chảy qua tầng lớp enzym cố định không được tiếp xúc hoặc thời gian tiếp xúc với enzym không đủ để thực hiện phản ứng chuyển hoá thành fructoza.

Tuy nhiên nếu duy trì tốc độ dòng quá thấp, hàm lượng fructoza thu được tuy cao nhưng năng suất chuyển hoá thấp thu được không cao, làm tăng giá thành siro sản phẩm. Như vậy duy trì tốc độ dòng chảy ở 8-15 ml/ phút là thích hợp nhất.

Bảng 13. Xác định tốc độ dòng chảy thích hợp

STT	Tốc độ dòng chảy (ml/phút)	Số đo trên máy ek (D°)	Hàm lượng Fructoza (%)
1	5	0,482	42,9
2	8	0,466	42,4
3	12	0,452	41,6
4	15	0,431	41,1
5	18	0,398	37,9
6	20	0,374	36,1
7	25	0,324	30,5

Ảnh hưởng của nồng độ dịch đường glucoza đến hiệu suất chuyển hoá: Để đạt được hiệu suất chuyển hoá cao cũng như vận tốc phản ứng lớn nhất, cần xác định khoảng nồng độ cơ chất thích hợp nhất .

Quá trình đồng phân với khối lượng enzym 30 gam, DE đường hoá: > 98%, đường kính cột đồng phân 2,5 cm, chiều dài cột: 40 cm, nhiệt độ đồng phân: 60 °C, pH 7,5, tốc độ dòng chảy 10 ml/ phút. Từ kết quả cho thấy: Nồng độ đường glucoza ảnh hưởng mạnh đến hiệu suất tạo thành fructoza (**Bảng 14**).

Bảng 14. Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất đến hiệu suất chuyển hoá

T	Nồng độ dịch đường (°Bx)	Số đo trên máy ek (D°)	Nồng độ fructoza (%)
1	30	0,398	42,3
2	36	0,446	42,2
3	40	0,53	43,1
4	45	0,467	42,5
5	50	0,402	38,3
6	55	0,351	30,9

Nồng độ đường tăng kéo theo vận tốc tạo thành fructoza cũng tăng. Vận tốc phản ứng tỉ lệ thuận với nồng độ chất tham gia phản ứng. Tuy nhiên nếu nồng độ đường quá cao ($> 50^{\circ}\text{Bx}$) dẫn đến làm giảm khả năng khuếch tán của các phân tử đường glucoza tới trung tâm hoạt động của enzym, hơn nữa nồng độ cơ chất quá đặc làm enzym hoạt động khó khăn nên giảm hoạt tính của enzym. Do đó nồng độ fructoza tạo thành sau quá trình chuyển hoá không cao. Ngược lại nếu nồng độ đường quá loãng sẽ không đạt tỷ lệ tốt nhất giữa enzym và cơ chất. Mặt khác còn làm gia tăng sự nhiễm khuẩn, ảnh hưởng đến pH đông phân (làm giảm pH). Qua nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ đường glucoza trong dung dịch đến sự tạo thành fructoza cho thấy: Để đạt được nồng độ fructoza (40- 42%) và môi trường tốt cho enzym hoạt động thì nồng độ dịch glucoza 40- 45°Bx là phù hợp nhất.

Ảnh hưởng của nhiệt độ trong cột phản ứng tới hoạt lực của enzym: Hoạt lực enzym được xác định bởi vận tốc của sự biến đổi glucoza thành fructoza trong thời gian nhất định. Độ ổn định phản ánh khả năng của enzym để giữ hoạt tính trong thời gian sản xuất là kết quả giữa hiệu quả của hoạt tính và độ ổn định của enzym. Nhiệt độ là yếu tố ảnh hưởng nhiều đến hoạt tính và độ ổn định cũng như tạo sản phẩm phụ. Nhiệt độ đông phân cao dẫn đến làm gia tăng vận tốc biến đổi glucoza thành fructoza. Đồng thời độ ổn định của enzym giảm vì nhiệt độ cao làm giảm tuổi thọ của enzym. Nhiệt độ đông phân thấp dẫn đến độ ổn định của enzym giữ được trong thời gian sản xuất dài hơn, tuy nhiên nồng độ fructoza tạo được không cao đồng thời nhiệt độ thấp dễ bị nhiễm vi sinh vật. Vì vậy nhiệt độ được duy trì ở 55- 60°C là thuận lợi nhất cho hoạt động của enzym (**Bảng 15**).

Bảng 15. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt lực và độ ổn định của enzym

t° Ngày	20	30	40	50	60
50	39,0	39,3	39,1	39,3	39,2
60	42,6	42,0	41,5	42,0	40,0
80	47,3	41,0	38,1	41,0	36,2

3.5.3. Nghiên cứu các phương pháp làm sạch dịch sirô fructoza 42%

Dịch đường thu hồi được sau quá trình chuyển hoá có màu vàng sẫm và chứa một số ion kim loại do đó cần làm sạch dịch. Làm sạch dịch đường fructoza được tiến hành bằng cách sử dụng than hoạt tính và nhựa trao đổi ion.

Tẩy màu dung dịch bằng than hoạt tính: Dung dịch đường fructoza thu hồi được sau quá trình chuyển hoá đem cô đặc đến 50 °Bx. Sau đó tẩy màu bằng than hoạt tính ở 80 °C trong thời gian 30 phút. Loại bỏ than bằng máy ép lọc khung bản, với tỉ lệ than hoạt tính là 0,7% và thời gian tẩy màu là 30 phút, ở nhiệt độ 80 °C. Dịch đường sau khi lọc có màu vàng nhạt, trong suốt được chuyển sang trao đổi ion.

Bảng 16. Ảnh hưởng của tỉ lệ than hoạt tính tới chất lượng dịch đường.

STT	Tỉ lệ than (%)	Màu dịch đường sau khi lọc	Độ trong của dịch sau khi lọc
1	0	Vàng sẫm	Trong
2	0,5	Vàng nhạt	Trong
3	0,7	Vàng nhạt đến trắng	Trong

Làm sạch dịch bằng nhựa trao đổi ion. Dịch đường ở 50 °Bx cho chảy qua hai cột chứa nhựa cation và anion, đường kính cột 2 cm, chiều dài lớp nhựa trao đổi ion là 60 cm, khối lượng trao đổi là 20 gam. Phải khống chế nhiệt độ dịch nằm trong khoảng 40-45°C, để giảm độ nhớt của dịch đảm bảo được tốc độ dòng chảy. Sirô fructoza thu được có màu vàng nhạt, trong, không mùi và độ ngọt cao.

3.5.4. Nghiên cứu thu hồi và bảo quản sirô fructoza 42%

Do tính chất của fructoza có khả năng hút ẩm lớn nên sirô fructoza 42% cần được bảo quản trong các thùng có gioăng kín, tránh sự xâm nhập của hơi nước. Để bảo quản sirô fructoza trong thời gian dài, cần tiến hành cô đặc một đến nồng độ 70 °Bx, sau đó theo dõi thời gian bảo quản sản phẩm (Bảng 17). Quá trình bảo quản được thực hiện trong lọ thuỷ tinh có nắp đậy kín và can nhựa để ở nhiệt độ môi trường, sau đó theo dõi chất lượng sirô fructoza 42%.

Bảng 17. Ảnh hưởng của bao bì và thời gian bảo quản tới chất lượng sirô fructoza 42%

Bao bì	Thời gian(Tháng)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Lọ thuỷ tinh trắng	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Can nhựa màu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Ghi chú: (+) Chất lượng ổn định, dịch giữ được chất lượng ban đầu, (-) dịch có thay đổi về chất lượng

Kết quả cho thấy đối với lọ thuỷ tinh trắng, sau 9 tháng bảo quản màu sắc của dịch bắt đầu có sự biến đổi dịch trở nên sẫm màu hơn, tuy nhiên độ ngọt của dịch không bị giảm. Còn đối với can nhựa, màu của dịch sau 11 tháng mới có hiện tượng sẫm màu. Vì vậy để bảo quản dịch tốt cần sử dụng bao bì có màu tối, nếu để lâu cần bổ sung chất ổn định màu.

3.5.5. Xây dựng mô hình dây truyền công nghệ và thiết bị sản xuất fructoza 42%.

Xác định kích thước cột đồng phân thích hợp (quy mô phòng thí nghiệm)

Trong quá trình chuyển hoá, chúng tôi cố định lượng enzym chuyển hoá, vì vậy cần chọn lựa cột đồng phân với đường kính, chiều dài cột sao cho phù hợp với lượng enzym cố định đó. Để đạt nồng độ fructoza cao chúng tôi tiến hành thí nghiệm trong cùng một điều kiện đồng phân nhưng đường kính cột thay đổi (**Bảng 18**).

Điều kiện đồng phân: Nồng độ glucoza: 40%; pH = 7,5; nhiệt độ: 60 °C; khối lượng enzym 30 gam, tốc độ dòng chảy 10 ml/ phút, chiều dài cột: 40cm. Từ kết quả bảng trên cho thấy: Với cùng một khối lượng enzym 30 gam và chiều dài cột bằng nhau thì độ dài của tầng lớp enzym phụ thuộc vào đường kính cột.

Đường kính cột càng lớn thì chiều dài tầng lớp enzym cột càng mỏng. Ngược lại đường kính cột càng nhỏ thì chiều dài tầng lớp enzym càng dày. Dịch glucoza chảy qua tầng lớp enzym dày thì xác suất các phân tử glucoza được chuyển hoá nhiều hơn là chảy qua tầng lớp enzym mỏng.

Bảng 18. Xác định đường kính cột đồng phân mô hình phòng thí nghiệm..

STT	Đường kính cột (cm)	Số đo trên máy ek (D ⁰)	Hàm lượng fructoza (%)
1	1,8	0,470	44,9
2	2,2	0,642	44,0
3	2,5	0,384	37,8

Như vậy với đường kính cột nhỏ, thì glucoza chảy qua tầng lớp enzym dày dẫn đến hiệu suất chuyển hoá thành fructoza cao. Ngược lại với đường kính cột to thì dịch glucoza chảy qua tầng lớp enzym mỏng, dẫn đến nồng độ fructoza tạo thành thấp. Tuy nhiên nếu đường kính cột quá nhỏ dễ gây khó khăn cho ta trong việc đưa enzym vào cột và lấy enzym ra khỏi cột. Do vậy trong quá trình chuyển hoá trong phòng thí nghiệm chúng tôi sử dụng cột đồng phân đường kính 2,2cm, chiều dài cột 40cm.

Enzym sử dụng để chuyển hoá glucoza thành fructoza là glucoisomeraza ở dạng cố định, do đó quá trình chuyển hoá diễn ra bên trong cột đồng phân. Khi triển khai sản xuất thử nghiệm chúng tôi sử dụng chế phẩm Sweetzym T có bán trên thị trường, chế phẩm Sweetzym T giá thành cao nhưng có hoạt lực cao và tuổi thọ enzym dài nếu đảm bảo được các điều kiện kỹ thuật trong sản xuất [5]. Thiết kế cột đồng phân là một bước quan trọng, vì để chuyển hoá glucoza thành fructoza có hàm lượng 42 % đòi hỏi cột đồng phân phải đảm bảo các điều kiện: Van đầu vào và van đầu ra có thể điều chỉnh được tốc độ dòng chảy, giữ được nhiệt độ ổn định, chiều cao cột phù hợp với nhà xưởng sản xuất, đường kính cột thích hợp với công suất thiết kế của mỗi nhà máy và có kính quan sát mức dịch trên đỉnh cột. Tùy thuộc vào các nhà máy với công suất khác nhau có thể thiết kế cột đồng phân cho phù hợp. Chúng tôi đã nghiên cứu thiết kế cột đồng phân cho nhà máy có công suất thiết kế 2 tấn sản phẩm/ ngày. Mô hình thiết kế này đã được áp dụng triển khai sản xuất thử tại Công ty Cổ phần thực phẩm Minh Dương, Hà Tây. Kích thước cột đồng phân với công suất thiết kế 2 tấn sản phẩm/ ngày: Đường kính cột 0,3 m, chiều cao cột 1,4 m, chiều cao lớp enzym 1,0 m, số lượng cột 2 chiếc, thùng chứa sản phẩm 30m³, lượng enzym đưa vào cột 22 kg.

Qua triển khai sản xuất thử chúng tôi thấy mô hình thiết kế cột đồng phân trên là rất phù hợp. Nếu chiều cao cột quá cao dẫn đến dịch đường lưu lại lâu trong cột đồng phân ảnh hưởng đến màu sắc của sản phẩm, ngoài ra đường kính cột nhỏ rất khó khăn trong việc đưa enzym vào và tháo enzym ra khỏi cột. Ngược lại, nếu chiều dài cột quá thấp và đường kính cột lớn thì dịch đường glucoza chảy qua lớp enzym mỏng do vậy các phân tử glucoza không đủ thời gian để chuyển hoá thành fructoza.

Để chuyển hoá từ glucoza thành fructoza đạt kết quả tốt đòi hỏi các điều kiện kỹ thuật của quá trình chuyển hoá phải hết sức nghiêm ngặt như độ tinh khiết cao của đường glucoza, độ sạch của dịch đường, pH đầu vào và nhiệt độ đồng phân. Vì vậy triển khai sản xuất sirô fructoza trên quy mô công nghiệp cần xác định các điều kiện kỹ thuật cho quá trình chuyển hoá glucoza thành fructoza. Qua xác định các điều kiện kỹ thuật trong phòng thí nghiệm chúng tôi thu được kết quả (**Bảng 19**).

Bảng 19. Các điều kiện kỹ thuật của quá trình chuyển hoá glucoza thành fructoza

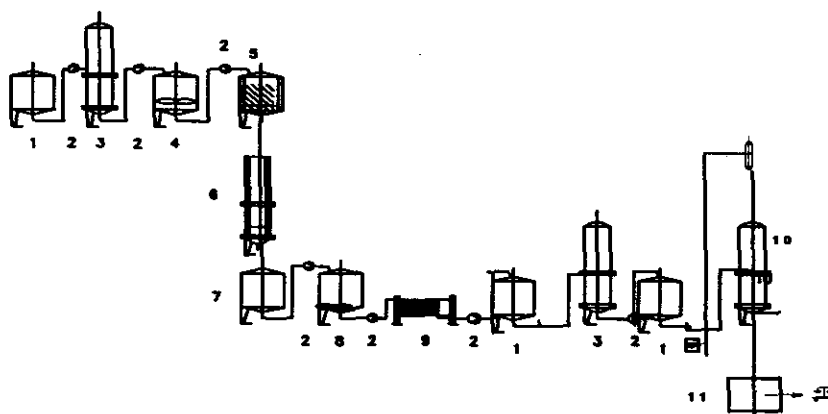
Điều kiện kỹ thuật	Kết quả
- Đường khử (DE)	> 95%
- pH đầu vào	7 - 8
- pH đầu ra	6,5- 7,5
- Nhiệt độ trong cột phản ứng	55- 65 ⁰ C (nhiệt độ tối ưu 60 ⁰ C)
- Nồng độ dịch đường glucoza	35-55% (tối ưu : 40%)

Nghiên cứu xác định tốc độ dòng chảy thích hợp trong quá trình chuyển hoá:

Tốc độ dòng chảy có ảnh hưởng lớn đến hàm lượng fructoza tạo thành. Khi tốc độ dòng chảy nhanh dẫn đến hiệu suất chuyển hoá kém. Khi tốc độ dòng chảy chậm thì hiệu suất chuyển hoá cao nhưng năng suất thấp. Vì vậy chúng tôi nghiên cứu điều chỉnh tốc độ dòng chảy thích hợp để có thể thu được hàm lượng fructoza 42%.

Qua sản xuất thử nghiệm chúng tôi áp dụng cột đồng phân do đề tài thiết kế và thu được kết quả tốt (Bảng 20 và hình 29).

Hình 29: Mô hình thiết bị dây chuyền sản xuất sirô fructoza



1. Thùng chứa trung gian
2. Bơm chuyển dịch
3. trao đổi ion

4. Nối trộn
5. Nối nấu;
6. Cột đồng phân

7. Thùng chứa
8. Nối tẩy mẫu
9. Ép lọc khung bản

10. Thiết bị có đặc
11. Thùng chứa sản phẩm
12. Cán đóng gói sản phẩm

Bảng 20. Xác định tốc độ dòng chảy thích hợp chuyển hoá glucoza thành fructoza

TT	Tốc độ dòng chảy (m ³ / giờ)	Hàm lượng fructoza (%)
1	0,3	45,2
2	0,6	43,5
3	0,1	42,0
4	1,5	33,6

Thiết kế thêm một số mô hình cột đồng phân quy mô công nghiệp: Qua sản xuất thử nghiệm trên quy mô công nghiệp, chúng tôi đã nghiên cứu tính toán thiết kế thêm một số mô hình cột đồng phân thích hợp có thể áp dụng với các nhà máy với công suất thiết kế khác nhau. Dưới đây là thông số kỹ thuật cơ bản của mô hình cột đồng phân (**Bảng 21**).

Bảng 21. Mô hình cột đồng phân với các công suất thiết kế khác nhau

TT	Công suất thiết kế của nhà máy	Số cột	Kích thước cột đồng phân	Tốc độ dòng chảy
1	1 tấn sản phẩm / ngày	2	- Đường kính cột: (D) 0.2 m - Chiều cao cột: (H): 1.0 m - Chiều cao lớp enzym: 0.7 m - Diện tích cột: 0.03 m²	Trung bình cho mỗi cột : 0.05 m ³ / giờ
2	2 tấn sản phẩm / ngày	4	- Đường kính cột: (D) 0.2 m - Chiều cao cột: (H): 1.0 m - Chiều cao lớp enzym: 0.7 m - Diện tích cột: 0.03 m²	Trung bình cho mỗi cột : 0.05 m ³ / giờ
3	3 tấn sản phẩm/ ngày	2	- Đường kính cột: (D) 0.3 m - Chiều cao cột: (H): 1.2 m - Chiều cao lớp enzym: 0.9- 1.0 m - Diện tích cột: 0.07 m²	Trung bình cho mỗi cột : 0.1 m ³ / giờ

Với mô hình cột đồng phân của đề tài thiết kế, nếu điều chỉnh tốc độ dòng chảy nhỏ hơn 0,1 m³/ giờ thì hiệu suất chuyển hoá cao nhưng tạo sản phẩm phụ ảnh hưởng đến hoạt lực của enzym và năng suất chuyển hoá thấp, do đó tính giá thành cho 1 kg sản phẩm tăng, ngoài ra khi dòng chảy với tốc độ thấp còn làm ức chế hoạt động của enzym. Ngược lại nếu tốc độ dòng chảy nhanh > 1,5 m³/ giờ, thời gian tiếp xúc giữa enzym và cơ chất ngắn, nhiều phân tử đường glucoza chảy qua lớp enzym chưa kịp phản ứng với enzym để tạo thành fructoza, hiệu suất chuyển hoá thấp.

Vậy tốc độ dòng chảy có thể duy trì trung bình khoảng 0,1 m³/ giờ đối với mô hình cột đồng phân công suất 2 tấn sản phẩm / ngày ở trên là thích hợp lý.

3.5.6. Ứng dụng sirô fructoza 42 % trong một số sản phẩm

Ứng dụng sirô Fructoza vào sản xuất nhân kẹo: Sirô fructoza 42% có độ ngọt tương đương với đường kính đã được ứng dụng để thay thế lượng đường kính trong sản xuất nhân kẹo cho công ty bánh kẹo Thăng long: Nhân dâu 1.500 kg và nhân dứa

500kg. Sản phẩm nhân kẹo sản xuất ra có vị ngọt dịu, mát, gây cảm giác hương thơm tự nhiên.

Ứng dụng sirô fructoza vào sản xuất mật ong nhân tạo: Sirô fructoza được bổ sung thêm một số thành phần của mật ong như phấn hoa, vitamin, khoáng chất. Để tạo hương mật ong chúng tôi đã tiến hành bổ sung một phần mật ong nhân (**Bảng 22**).

Bảng 22. Xác định tỷ lệ mật ong thích hợp cho việc tạo hương

Tỷ lệ thay thế (%)	Cảm quan
5	Hương không rõ ràng
10	Có hương mật ong nhân
15	Mùi hương rất rõ, khó phân biệt với mật ong thật

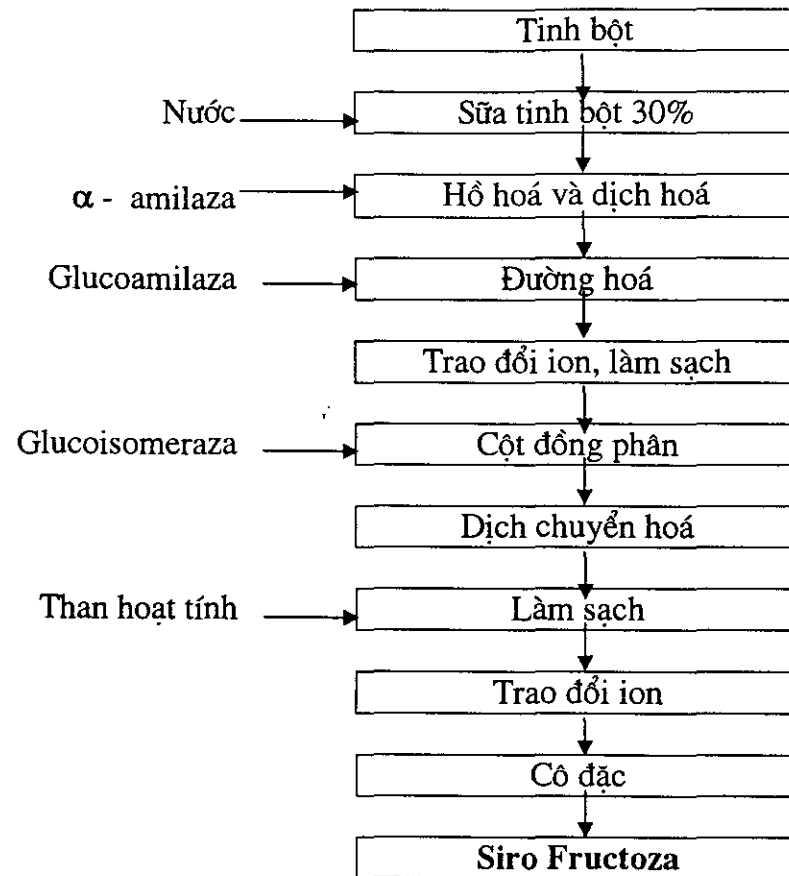
Kết quả thu được mở ra một hướng ứng dụng mới, trong chế biến thực phẩm những sản phẩm sử dụng mật ong đặc biệt là trong sản xuất nhân kẹo mật ong với giá thành thấp. Ước tính giá thành 1 kg sirô fructoza 42% nồng độ 70° Bx (độ ngọt của sản phẩm tương đương với độ ngọt của đường kính) là 5.800 đồng. Trong nhiều sản phẩm thực phẩm đặc biệt là đồ uống có thể sử dụng sirô fructoza 42% để thay thế đường kính mà giá thành sản phẩm không thay đổi (**Bảng 23**).

Bảng 23. Ước tính giá thành 1.000 kg sản phẩm

TT	Nguyên liệu	Đơn vị	Đơn giá (đồng)	Lượng dùng	Thành tiền (đồng)
1	Tinh bột	kg	3.500	1200	3850.000
2	Enzym TER	kg	110.000	0,86	89.700
3	Enzym AMG	kg	115.000	1	115.000
4	Enzym SweetzimT				100.000
5	Nước	M ³	6.500	60	390.000
6	Điện	KW	810	800	648.000
7	Nhân công	Người	25.000	20	500.000
8	Khấu hao thiết bị				200.000
	Tổng cộng				5.839.700

Chất lượng sản phẩm: Dung dịch dạng dịch lỏng, có màu vàng sáng, trong, vị ngọt dịu, không mùi, nồng độ chất khô: 70- 72°Bx, hàm lượng fructoza 40- 42%, hàm lượng glucoza 55- 54%, độ tro 0.3%.

Hình 30. Quy trình công nghệ sản xuất siro fructoza từ tinh bột sắn bằng enzym



3.6. Hoàn thiện công nghệ xử lý nước quả để sản xuất nước quả trong, nước quả cô đặc sử dụng enzym pectinaza.

3.6.1. Nghiên cứu ứng dụng enzym pectinaza trong trích ly dịch quả ở nhiệt độ thấp:

Thành phần hoá học của các loại quả rất đa dạng: Thành phần chính là glucit gồm glucoza, fructoza và saccaroza. Axit hữu cơ có trong hầu hết các loại, ngoài ra trong quả còn có các thành phần dinh dưỡng khác như vitamin, chất xơ. Tuy nhiên, thành phần của quả thay đổi theo độ chín của quả. Kết quả nghiên cứu được trình bày trong (Bảng 24).

Bảng 24. Thành phần hoá học một số loại quả ở các độ chín kỹ thuật

<i>Độ chín</i>	<i>Chỉ tiêu</i>	<i>Mận</i>	<i>Dứa</i>	<i>Đào</i>	<i>Táo</i>	<i>Dâu tằm</i>	<i>Nho</i>	<i>Lạc tiên</i>
Độ chín 70%	Độ chất khô (Bx)	9,5	14,0	9,0	8,5	6,0	8,0	11,0
	Đường (%)	6,9	8,5	7,5	7,8	4,0	8,0	8,0
	Axit (%)	1,1	0,5	0,6	0,4	0,7	0,6	3,4
Độ chín 80%	Độ chất khô (Bx)	10,5	18,0	10,5	10,0	8,0	10,0	13,0
	Đường (%)	8,5	12,5	8,7	9,4	4,5	9,3	8,7
	Axit (%)	1,15	0,6	0,6	0,6	0,8	0,7	3,6
Độ chín 90%	Độ chất khô (Bx)	12,0	20,5	12,0	12,0	9,0	11,5	15,0
	Đường (%)	10,5	14,5	9,5	10,5	5,0	9,7	9,2
	Axit (%)	1,15	0,6	0,6	0,6	0,8	0,7	3,6

Có thể nhận xét: Các loại quả có độ chín từ 70% trở lên có hàm lượng nước cao trên 75 %. Hàm lượng axit nằm trong khoảng 0,3-1,2%, tùy theo từng loại quả, đặc biệt hàm lượng axit của lạc tiên rất cao 3- 4%.

Bảng 25. Các tính chất công nghệ một số loại quả ở các độ chín kỹ thuật

	Chỉ tiêu	Mận	Dứa	Đào	Táo	Mơ	Dâu tằm	Nho	ổi	Lạc tiên
Độ chín 70%	Điểm CQ màu sắc	3,8	4,0	3,5	3,0	3,5	3,8	3,5	3,5	3,2
	Điểm CQ hương vị	3,6	4,0	3,3	3,0	3,7	3,8	3,5	3,7	3,2
	Hàm lượng nước (%)	79	82	86	80	83	82	77	78	65
	Đánh giá cảm quan	Kém	TB	Kém	Kém	Kém	Kém	Kém	Kém	Kém
Độ chín 80%	Điểm CQ màu sắc	4,8	4,4	4,2	3,8	4,0	4,0	4,2	4,0	4,0
	Điểm CQ hương vị	4,5	4,5	4,5	4,2	4,0	4,0	4,5	4,5	4,3
	Hàm lượng nước	85	85	88	85	87	85	80	82	70
	Đánh giá cảm quan	Tốt	Khá	TB	TB	TB	Tốt	Tốt	TB	Khá
Độ chín 90%	Điểm CQ màu sắc	4,3	4,4	4,2	3,8	4,2	4,0	4,2	4,0	4,0
	Điểm CQ hương vị	4,5	4,5	4,5	4,2	4,5	4,0	4,5	4,5	4,3
	Hàm lượng nước	88	89	89	90	89	87	83	85	75
	Đánh giá cảm quan	Khá	Tốt	Tốt	Tốt	Tốt	TB	Khá	Tốt	Tốt

Thành phần axit hữu cơ của quả chủ yếu là: Axit citric (dâu tằm, dứa), axit tataric (nhô), ngoài ra còn có một số loại axit khác như: Malic, succinic, lactic. Hàm lượng axit hữu cơ của quả thay đổi ít theo độ chín của quả. Tuy nhiên, đối với quả xanh thường có cảm giác vị của quả chua hơn là do tỉ lệ axit/ đường trong quả chưa cân đối.

Hàm lượng đường của quả thay đổi theo độ chín do hệ enzym trong quả thủy phân một số thành phần trong quả như: Tinh bột, protopectin, pectin, xenluloza, hemixenluloza thành đường đơn. Táo ta, ổi có hàm lượng pectin, cellulosa cao cần phải chú ý khi xử lý. Một số loại quả có hàm lượng vitamin C cao là: Ổi, đào, lạc tiên. Trên thực tế vì hàm lượng chất khô hoà tan và hàm lượng đường được tạo thành trong thời gian quả chín, nên độ chín của quả không chỉ ảnh hưởng đến hiệu suất trích ly, mà còn đến chất lượng, hương vị của dịch quả thu được.

Để lựa chọn được nguyên liệu thích hợp cho quá trình sản xuất nước quả trong và nước quả cô đặc, cần phân tích các tính chất lý hoá và công nghệ của nguyên liệu tại các độ chín khác nhau:

+ Quả có độ chín 70%: Hàm lượng đường dưới trung bình, vị chua ngọt chưa hài hoà, quả có độ mềm trung bình, hàm lượng nước trung bình, có hương vị khá đặc trưng, khả năng chế biến trung bình.

+ Quả có độ chín 80%: Hàm lượng đường trung bình, vị chua ngọt khá hài hoà, quả có độ mềm vừa, hàm lượng nước cao khoảng 70-75%, có hương vị khá đặc trưng, khả năng chế biến tốt.

+ Quả có độ chín 90%: Hàm lượng đường cao, vị ngọt, hương vị rất đặc trưng, quả mềm, hàm lượng nước cao, thậm chí khoảng hơn 85%, tuy nhiên khó chế biến.

Nhận xét và lựa chọn độ chín kỹ thuật cho từng loại quả:

Dâu tằm, Nho, Mận: Dịch chiết của các loại quả này được sử dụng để sản xuất rượu vang và sirô quả. Với mục đích như trên, cần chú trọng các tính chất: Màu sắc, vị chua, hàm lượng nước, khả năng ép và làm trong dịch quả, giảm thiểu sự nhiễm tạp vi sinh vật. Dựa trên các yêu cầu đó, kết luận lựa chọn loại dâu, mận và nho có độ chín 70-80%. Thoả mãn các yêu cầu về độ hài hòa chua ngọt khi sản xuất sirô cũng như hàm lượng axit yêu cầu trong rượu vang. Quả ở độ chín này có hàm lượng nước khá cao, đồng thời cũng cho màu sắc đẹp nhất, độ mềm của quả đạt yêu cầu về chế biến. Quả có độ chín 90% có vị ngọt, độ Bx và hàm lượng nước cao nhưng quả quá mềm nên dễ bị dập nát và dễ nhiễm tạp vi sinh vật.

Dứa: Dịch quả dứa được sử dụng để sản xuất nước quả cô đặc. Yêu cầu cho dịch quả trong sản xuất nước quả cô đặc là: Có độ axit cao, hàm lượng đường trung bình, màu sắc đẹp, hương thơm mạnh, do quá trình cô đặc sẽ làm giảm hương và màu của sản phẩm, đồng thời dịch quả cần có độ nhớt thấp, loại bỏ được phần lớn enzym ôxi hóa. Dứa quả nguyên liệu cho loại sản phẩm này có độ chín kỹ thuật từ 70% trở lên.

Đào và ổi: Mục đích sử dụng dịch quả đào và ổi là sản xuất nước quả trong. Để sản xuất nước quả trong, nên sử dụng đào và ổi có độ chín từ 80-90%. Sử dụng quả ở độ chín này sẽ cho lượng dịch quả nhiều nhất, chất lượng dịch quả tốt, màu sắc đẹp, có hương thơm và độ nhớt thấp.

Táo ta: Mục đích sử dụng dịch quả táo là sản xuất nước quả trong. Táo ta là loại quả có tính chất kỹ thuật khá phức tạp. Quả xanh có hàm lượng nước thấp, hàm lượng pectin và protopectin cao, nên độ nhớt rất cao. Hàm lượng axit tùy thuộc từng loại giống. Hàm lượng pectin và protopectin giảm dần khi quả chín, nhưng hàm lượng tinh bột lại có xu hướng tăng lên. Vì vậy, chọn nguyên liệu cho quá trình chế biến quả táo ta khá khó khăn. Tùy theo từng loại có thể chọn táo chín trên 80%.

Lạc tiên: Mục đích sử dụng dịch quả lạc tiên là sản xuất nước quả trong và đục. Lạc tiên có vỏ dày nên khá dễ bảo quản và không bị dập nát trong quá trình vận chuyển. Tuy nhiên, nếu sử dụng quả xanh thì khối thịt quả là một hỗn hợp rất nhớt do hàm lượng pectin trong quả cao. Vì vậy rất khó thu hồi dịch quả, đồng thời hương vị cũng kém, nên cần thu hái lạc tiên vào thời điểm thích hợp với độ chín là 80-90%.

Xử lý quả trước khi chiết rút dịch quả: Dịch quả là một hỗn hợp rất phức tạp và luôn luôn biến đổi. Trong dịch quả ngoài các thành phần hóa học thông thường như: Đường, axit, pectin, hemixenluloza, xenluloza, còn có các thành phần vi lượng nhưng rất quan trọng đối với chất lượng dịch quả là hệ chất màu và hương. Ngoài ra, còn có một hệ các chất có hoạt tính sinh học có ảnh hưởng lớn đến sự biến đổi của dịch quả là hệ enzym và các vitamin. Khi còn ở bên trong tế bào, thành phần dịch quả thay đổi do các phản ứng hoá học trong các quá trình sinh trưởng của quả. Khi dịch quả được chiết rút ra khỏi quả, tiếp xúc với không khí, các quá trình ôxi hóa diễn ra và biến đổi chất lượng dịch quả: Hương, vị, màu sắc. Ngoài ra, nếu bị nhiễm tạp trong quá trình chế biến dịch quả có thể bị hư hỏng.

Do vậy, quá trình sơ chế trước khi chiết rút dịch quả là vô cùng quan trọng. Mục đích của quá trình này là hạn chế tác dụng của các enzym ôxi hóa, chống các biến đổi có hại cho chất lượng dịch quả.

Dâu và nho: Trước khi chế biến dâu và nho thường được xử lý bằng các chất bisunfit. Có hai loại muối bisunfit thường được sử dụng là muối kali và natri. Nghiên cứu sử dụng muối bisunfit ở các nồng độ khác nhau (**Bảng 26**).

Mận, mơ, ổi, đào và táo ta: Các loại quả trên đều có thịt quả rắn, khó tách hạt nên cần nghiên cứu để tách riêng phần thịt quả trước khi ép thu hồi dịch.

Bảng 26. Thông số xử lý quả bằng hoá chất trước khi ép.

<i>Quả</i>	<i>Hoá chất</i>	<i>Nồng độ</i>	<i>Độ bền màu</i>
Dâu	Bisunfit	150 ppm	6 tháng
Nho	Bisunfit	150 ppm	6 tháng
Dứa	Ascorbic axit	0,2 %	3 tháng

Đồng thời quá trình xử lý nhiệt này sẽ có tác dụng vô hoạt các loại enzym ôxi hóa và các polyphenol có trong quả, giúp ngăn ngừa quá trình biến màu và hương của sản phẩm. Trong các phương pháp tách thịt quả, phương pháp thường được sử dụng nhất là dùng nhiệt (*Bảng 27*).

Bảng 27. Thông số xử lý quả bằng nhiệt trước khi ép

<i>Loại quả</i>	<i>Nhiệt độ (°C)</i>	<i>Thời gian (phút)</i>	<i>Khả năng tách thịt quả (%)</i>	<i>Màu sắc Hương vị</i>
Mận	85	10	85%	Mùi hơi nồng, màu sắc đẹp
Mơ	85	10	80%	Màu sắc đẹp, hương thơm
ổi	80	7	95%	Màu sắc đẹp, hương thơm
Đào	75	7	85%	Màu sắc đẹp, hương thơm
Táo	80	10	85%	Màu sắc đẹp, hương thơm

Nghiên cứu sử dụng enzym trích ly dịch quả: Khối thịt quả chứa một hàm lượng pectin tương đối lớn. Pectin trong thịt quả tồn tại ở hai dạng: Pectin hòa tan và không hòa tan (protopectin). Khi phá vỡ tế bào quả, pectin hoà tan được giải phóng, kết hợp với đường và axit trong dịch quả tạo thành hệ keo gây khó khăn cho việc chiết rút dịch quả, đồng thời làm tăng độ nhớt của dịch quả. Còn protopectin (pectin không hòa tan) là các phân tử pectin liên kết với các sợi xenluloza qua các mạch nhánh hemixenluloza, tạo thành vách ngăn tế bào. Sử dụng enzym pectinaza nhằm mục đích thủy phân pectin giảm độ nhớt của dịch quả, phá hủy các mô quả và nâng cao hiệu suất ép. Việc thủy phân pectin hòa tan và protopectin của màng tế bào không chỉ giúp thu được lượng dịch quả nhiều hơn, mà còn làm cho các chất tan và sắc tố cũng dễ dàng khuếch tán ra dịch. Những biến đổi trên là do enzym pectinaza đã tấn công vào phân tử pectin cắt chúng ra làm nhiều đoạn, mảnh tại các vị trí khác nhau. Trong phần này,

chúng tôi sử dụng một số loại enzyme của các hãng Đan Mạch và Đức là các loại enzyme đặc hiệu cho xử lý quả, có thành phần là hệ enzyme pectinaza, xenlulaza và hemixenlulaza thủy phân màng tế bào thực vật, làm tăng hiệu suất trích ly dịch quả của một số loại quả như: Dứa, mơ, mận, táo ta, dâu tằm, nho, ổi và đào. Ở đây, chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme, thời gian phản ứng và nhiệt độ xử lý đến hiệu suất trích ly dịch quả và một số tính chất khác của dịch quả của một số loại enzyme thương phẩm hoạt động ở cả nhiệt độ trung bình (20 - 30°C) và nhiệt độ thấp (10 - 20°C) là: Pectinex Ultra SPL; Rhohapect MA plus và Rhohapect D5S.

Nghiên cứu quá trình trích ly ở nhiệt độ trung bình : Chúng tôi đã tiến hành thí nghiệm đối với các loại quả: Dâu tằm, nho, mơ, mận, táo ta, đào, ổi và lạc tiên. Tiến hành khảo sát tỉ lệ enzyme thích hợp, nhiệt độ và thời gian xử lý thích hợp. Sau đó, chọn được các thông số phù hợp nhất cho quá trình xử lý dịch quả bằng ba loại enzyme. Ta nhận thấy: cả ba loại enzyme trong khoảng nhiệt độ hoạt động từ 25°C đến 30°C đều hoạt động tốt, nâng cao đáng kể hiệu suất trích ly của dịch quả. Nhiệt độ hoạt động này cũng phù hợp với điều kiện khí hậu và sản xuất ở nước ta vì khoảng nhiệt độ này chiếm thời gian chủ yếu trong năm.

Enzyme Pectinex Ultra SpL có tỉ lệ enzyme cần sử dụng cao nhất. Tuy nhiên, chế phẩm này có giá thành thấp, yêu cầu bảo quản đơn giản, hoạt độ duy trì tốt (có thể duy trì hoạt độ trong vòng một năm nếu bảo quản ở 4°C).

Hai loại enzyme còn lại có ưu điểm là tỉ lệ enzyme cần sử dụng rất thấp, tuy nhiên, giá thành cao hơn đồng thời thời gian duy trì hoạt lực enzyme cũng ngắn hơn (nếu bảo quản ở 4°C trong vòng một năm hoạt độ giảm 10%). Đối với enzyme Rhohapect D5S, thời gian xử lý của loại enzyme này đối với một số loại quả khá dài.

Tùy theo loại quả, điều kiện và sản lượng của cơ sở sản xuất, có thể chọn lựa loại enzyme phù hợp.

Nghiên cứu quá trình trích ly ở nhiệt độ thấp: Để sản xuất một số loại sản phẩm có chất lượng cao, cần giữ được một số tính chất tự nhiên của dịch quả như: Hương vị, màu sắc, hàm lượng vitamin C... trong quả. Để đạt được các yêu cầu này, cần chú ý rất nhiều công đoạn trong quá trình chế biến, đặc biệt là các yếu tố có thể gây ảnh hưởng đến chất lượng của dịch quả: Nhiệt độ quá trình chế biến, các kim loại ô nhiễm. Chúng tôi tiến hành khảo sát sử dụng enzyme trích ly ở nhiệt độ thấp nhằm mục đích đáp ứng nhiệt độ không khí thấp về mùa đông, hạ nhiệt độ của quá trình chế biến về mùa hè, sử dụng enzyme trích ly tối đa hương, màu và các vitamin trong dịch quả.

Kết quả cho thấy, sử dụng enzym hoạt động ở nhiệt độ thấp cần tiêu hao lượng enzym lớn hơn, tổn năng lượng và thời gian xử lý cũng kéo dài hơn so với quy trình xử lý ở nhiệt độ trung bình. Tuy vậy, chất lượng dịch quả thu được tốt hơn. Quy trình sử dụng enzym hoạt động ở nhiệt độ thấp sẽ chỉ thích hợp cho sản xuất các sản phẩm cao cấp yêu cầu chất lượng cảm quan cao.

3.6.2. Nghiên cứu quá trình làm trong dịch quả ở nhiệt độ thấp.

Dịch quả thu hồi được sau quá trình xử lý trích ly được đưa đi làm trong. Chúng tôi đã tiến hành khảo sát tỉ lệ enzym thích hợp, nhiệt độ, thời gian và pH thích hợp cho quá trình xử lý. Sau đó, chọn được các thông số phù hợp nhất cho quá trình xử lý dịch quả bằng ba loại enzym Pectinex 3XL, Rhohapect DA6L, Rhohapect B1L. Dịch quả sau khi được trích ly sẽ được bổ sung enzym làm trong. Các loại enzym làm trong được sử dụng là: Pectinex 3XL, Rhohapect DA6L, Rhohapect B1L.

Bảng 28. Trích ly dịch quả bằng các loại enzym hoạt động ở nhiệt độ thấp.

Loại quả	Loại enzym xử lý	Các thông số tối ưu cho quá trình	Mẫu	Hiệu suất trích ly (%)	Hàm lượng chất khô hoà tan (%)	Độ nhớt (cp)
Dâu tằm	Pectinex Ultra SPL	Tỉ lệ: 0,05% Nhiệt độ: 20 ⁰ C	ĐC	58,0	7,0	2,40
		Thời gian: 2h	Xử lý enzym	84,0	9,0	1,50
	Rhohapect MA plus	Tỉ lệ: 100 ppm	ĐC	56,0	7,0	2,45
		Nhiệt độ: 15 ⁰ C	Xử lý enzym	82,0	9,0	1,55
		Thời gian: 3h				
	Rhohapect D5S	Tỉ lệ: 100 ppm	ĐC	56,0	7,0	2,45
		Nhiệt độ: 20 ⁰ C	Xử lý enzym	82,0	9,5	1,55
		Thời gian: 4h				
	Nho	Pectinex Ultra SPL	Tỉ lệ: 0,05%	ĐC	57,0	11,0
Nhiệt độ: 20 ⁰ C			Xử lý enzym	85,0	12,0	1,20
Thời gian: 2h						
Rhohapect MA plus		Tỉ lệ: 60 ppm	ĐC	58,5	11,0	1,55
		Nhiệt độ: 20 ⁰ C	Xử lý enzym	86,0	12,0	1,20
		Thời gian: 3h				
Rhohapect D5S		Tỉ lệ: 60 ppm	ĐC	57,0	11,0	1,50
		Nhiệt độ: 20 ⁰ C	Xử lý enzym	85,0	12,0	1,20
		Thời gian: 3h				
Mơ	Pectinex	Tỉ lệ: 0,05%	ĐC	55,0	9,5	2,80
		Nhiệt độ: 20 ⁰ C	Xử lý enzym	80,0	10,5	2,05

	Ultra SPL	Thời gian: 2h				
	Rhopect MA plus *	Tỉ lệ: 100 ppm	ĐC	57,0	9,5	2,65
		Nhiệt độ: 10 ⁰ C	Xử lý enzym	81,0	10,5	2,00
		Thời gian: 4h				
	Rhopect D5S	Tỉ lệ: 60 ppm	ĐC	57,0	9,5	2,80
		Nhiệt độ: 20 ⁰ C	Xử lý enzym	81,0	10,5	2,05
		Thời gian: 3h				
Mận	Pectinex Ultra SPL	Tỉ lệ: 0,05%	ĐC	58,0	11,0	2,95
		Nhiệt độ: 20 ⁰ C	Xử lý enzym	87,0	12,0	1,45
		Thời gian: 2h				
	Rhopect MA plus*	Tỉ lệ: 100 ppm	ĐC	58,0	11,0	2,95
		Nhiệt độ: 10 ⁰ C	Xử lý enzym	86,0	12,0	1,45
		Thời gian: 2h				
	Rhopect D5S	Tỉ lệ: 60 ppm	ĐC	58,0	11,0	2,95
		Nhiệt độ: 20 ⁰ C	Xử lý enzym	85,0	12,0	1,45
		Thời gian: 3h				
Táo ta	Pectinex Ultra SPL	Tỉ lệ: 0,06%	ĐC	67,0	10,0	2,55
		Nhiệt độ: 20 ⁰ C	Xử lý enzym	85,0	11,5	1,65
		Thời gian: 2h				
	Rhopect MA plus	Tỉ lệ: 120 ppm	ĐC	65,0	10,5	2,55
		Nhiệt độ: 15 ⁰ C	Xử lý enzym	83,0	11,0	1,65
		Thời gian: 3h				
	Rhopect D5S	Tỉ lệ: 80 ppm	ĐC	65,0	10,0	2,55
		Nhiệt độ: 20 ⁰ C	Xử lý enzym	81,0	11,5	1,65
		Thời gian: 3h				
Đào	Pectinex Ultra SPL	Tỉ lệ: 0,05%	ĐC	60,0	10,0	2,25
		Nhiệt độ: 20 ⁰ C	Xử lý enzym	84,0	12,0	1,35
		Thời gian: 2h				
	Rhopect MA plus	Tỉ lệ: 120 ppm	ĐC	60,0	10,0	2,30
		Nhiệt độ: 10 ⁰ C	Xử lý enzym	82,0	12,0	1,40
		Thời gian: 2h				
	Rhopect D5S	Tỉ lệ: 60 ppm	ĐC	60,0	10,0	2,34
		Nhiệt độ: 20 ⁰ C	Xử lý enzym	83,0	12,0	1,40
		Thời gian: 3h				

Ổi	Pectinex Ultra SPL + Celluclast	Tỉ lệ: 0,05% PU + 0,07 %Cel	ĐC	58,0	10,0	2,60
		Nhiệt độ: 25°C	Xử lý enzym	82,0	11,5	1,25
		Thời gian: 2h				
	Rhoapect MA plus	Tỉ lệ: 150 ppm	ĐC	58,0	10,0	2,65
		Nhiệt độ: 25°C	Xử lý enzym	80,0	11,5	1,30
		Thời gian: 1h				
	Rhoapect D5S	Tỉ lệ: 80 ppm	ĐC	58,0	10,0	2,65
		Nhiệt độ: 25°C	Xử lý enzym	80,0	11,5	1,35
		Thời gian: 3h				
Lạc tiền	Pectinex Ultra SPL	Tỉ lệ: 0,04%	ĐC	58,0	15,0	-
		Nhiệt độ: 20°C	Xử lý enzym	74,0	16,5	1,40
		Thời gian: 2h				
	Rhoapect MA plus	Tỉ lệ: 100 ppm	ĐC	58,0	15,0	-
		Nhiệt độ: 10°C	Xử lý enzym	72,0	16,0	1,55
		Thời gian: 2h				
	Rhoapect D5S	Tỉ lệ: 80 ppm	ĐC	58,0	14,5	-
		Nhiệt độ: 20°C	Xử lý enzym	72,0	16,5	1,60
		Thời gian: 3h				

Ghi chú: * Không khuấy trộn

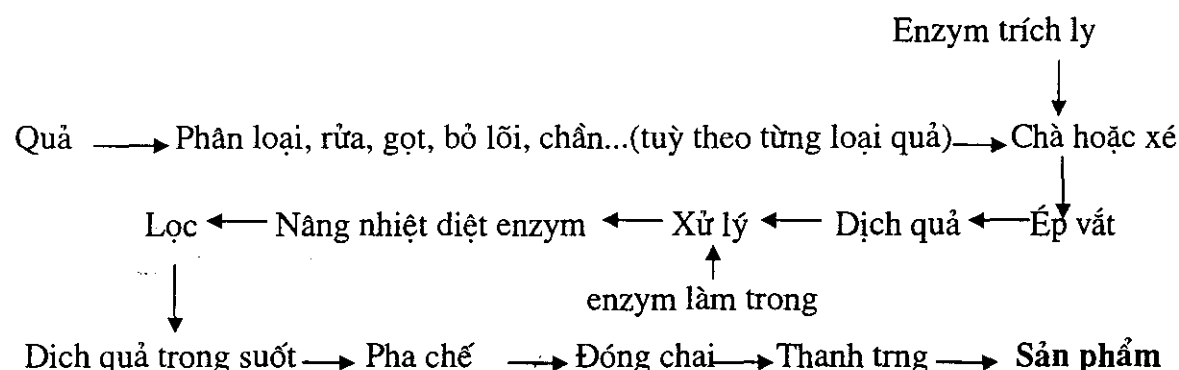
Kết quả cho thấy, sử dụng enzym hoạt động ở nhiệt độ thấp cần tiêu hao lượng enzym lớn hơn, tổn năng lượng và thời gian xử lý cũng kéo dài hơn so với quy trình xử lý ở nhiệt độ trung bình. Tuy vậy, chất lượng dịch quả thu được tốt hơn, đã giữ được hương, màu cho sản phẩm. Quy trình sử dụng enzym hoạt động ở nhiệt độ thấp sẽ chỉ thích hợp cho sản xuất các sản phẩm cao cấp, yêu cầu chất lượng cảm quan cao. Đây là một hướng xử lý công nghệ nhằm tránh quá trình biến đổi xấu chất lượng cảm quan của dịch quả trong quá trình chế biến.

3.6.3. Nghiên cứu sử dụng nước quả đã xử lý enzym để sản xuất nước quả trong, nước quả cô đặc và lên men rượu vang.

3.6.3.1. Nghiên cứu công nghệ chế biến nước quả trong.

Nghiên cứu sơ đồ quy trình công nghệ chế biến nước quả trong: Với mục đích giữ được độ ổn định của nước quả chế biến về các đặc tính cung cấp dinh dưỡng và

hương vị hấp dẫn chúng tôi tiến hành nghiên cứu công nghệ chế biến nước quả trong và nước quả cô đặc. Để thực hiện được mục đích này ngoài việc áp dụng công nghệ enzyme chúng ta cần sử dụng phối hợp với các biện pháp cơ học khác.



Hình 31. Sơ đồ quy trình công nghệ sản xuất nước quả trong

Tóm tắt quy trình sản xuất nước quả trong: Sau khi sơ chế (phân loại, rửa, gọt vỏ, bỏ lõi, chần) quả được chà hoặc xé sau đó, quả nghiền nát được chuyển tới thùng chứa và xử lý enzyme trích ly. Trộn đều enzyme trong dịch nghiền là rất quan trọng. Sau đó khối quả được đưa đi ép. Dịch ép đi qua sàng để loại bỏ chất rắn thô rồi được bơm qua thùng lắng trong. Trong thùng này dịch quả được xử lý enzyme làm trong rồi nâng nhiệt để diệt enzyme. Sau khi xử lý enzyme dịch sẽ được lọc qua máy lọc tấm bản. Vật liệu lọc là sợi bông được ép thành tấm. Dịch quả trong thu được sẽ được phối chế với các thành phần khác sau đó thanh trùng và đóng chai tạo sản phẩm nước quả trong.

Để sản xuất nước giải khát dạng trong, cần chú ý các yêu cầu kỹ thuật: Công thức phối chế, tỉ lệ pha loãng dịch nguyên chất, tỉ lệ đường/ axit (SS/ A), tỉ lệ bổ sung chất phụ gia hương, màu, loại bao bì sử dụng và chế độ thanh trùng.

Công thức phối chế:

+ Tỉ lệ pha loãng dịch nguyên chất: Đối với từng loại quả cần có công thức phối chế riêng. Phụ thuộc vào tính chất tự nhiên của quả. Chủ yếu là dựa vào hàm lượng axit và hương vị của quả.

+ Về tỉ lệ pha loãng: Có một số tỉ lệ pha loãng thông thường như sau: 25%, 33%, 50%, 75% và nguyên chất (100%).

Với các tỉ lệ pha loãng này, cần bổ sung thêm đường và axit để đạt được tỉ lệ (SS/ A) cho điểm cảm quan cao nhất.

Kết quả nghiên cứu tỉ lệ SS/ A cho thấy: Đối với các loại sản phẩm nước quả trên thị trường, tỉ lệ SS/ A thường nằm trong khoảng từ 30 đến 50. Phương pháp đánh giá cảm quan là phép thử so hàng, thành viên hội đồng đánh giá 6 người (**Bảng 29**).

Bảng 29. Đánh giá tỉ lệ SS/A cho sản phẩm nước quả

<i>Tỉ lệ SS/A</i>	<i>Điểm cảm quan</i>	<i>Nhận xét</i>
30	28	Vị hơi chua
35	18	Vị chua nhẹ, hài hòa, dễ uống
40	10	Vị chua ngọt hài hòa
45	16	Vị hơi ngọt
50	25	Vị ngọt

Mẫu có tỉ lệ SS/ A nằm trong khoảng 35 đến 45 là được ưa thích nhất. Các mẫu hơi chua hoặc hơi ngọt kém được ưa thích hơn. Đặc biệt trong các mẫu bị đánh giá chua và ngọt thì mẫu ngọt vẫn được ưa thích hơn mẫu chua. Vì vậy, chúng tôi quyết định chọn tỉ lệ SS/ A từ 35- 45 cho các mẫu nước quả phối chế. Lý do chọn khoảng tỉ lệ rộng như vậy là do ngoài tỉ lệ SS/ A, thành phần axit cũng có ảnh hưởng rất lớn đến cảm giác về vị của sản phẩm. Chúng tôi tiến hành nghiên cứu phối hợp tỉ lệ pha loãng, tỉ lệ SS/ A, cho từng loại quả với các chất điều vị là axit citric và đường saccaroza (**Bảng 30, 31 và 32**).

Bảng 30. Tỉ lệ SS/A phù hợp cho các loại sản phẩm nước quả

<i>Loại quả</i>	<i>Thông số tỉ lệ</i>	
Đào	Tỉ lệ dịch quả (%)	50-75
	Tỉ lệ SS/ A	40
Ổi	Tỉ lệ dịch quả (%)	50-75
	Tỉ lệ SS/ A	40
Lạc tiên	Tỉ lệ dịch quả (%)	15 - 20
	Tỉ lệ SS/ A	45
Táo	Tỉ lệ dịch quả (%)	50-75
	Tỉ lệ SS/ A	40

Từ các thông số tỉ lệ nói trên, chúng tôi đã xây dựng một số công thức phối chế sau đó tiến hành chấm điểm cảm quan theo TCVN 3216-1994 (Đồ hộp rau quả -

Phân tích cảm quan bằng phương pháp cho điểm). Sau khi phối chế, chúng tôi tiến hành chấm điểm sản phẩm theo TCVN 32616-1994.

Bảng 31. Công thức phối chế cho sản phẩm nước quả trong

<i>Quả</i>	<i>Dịch quả (kg)</i>	<i>Đường (kg)</i>	<i>Axit (kg)</i>	<i>Nước (kg)</i>	<i>Hương (kg)</i>
Đào - CT1	50	8,45	2,8	38,7	0,003
Đào - CT2	50	9,45	3,0	37,5	0,003
Đào - CT3	75	7,20	2,5	15,3	0,001
Đào - CT4	75	8,20	3,0	13,8	0,001
Ổi - CT1	50	9,25	2,8	37,95	0,003
Ổi - CT2	50	10,25	3,0	36,75	0,003
Ổi - CT3	75	8,40	2,9	13,7	0,001
Ổi - CT4	75	9,40	3,2	12,5	0,001
Lạc tiên - CT1	15	12,0	2,9	67,0	0,003
Lạc tiên - CT 2	15	13,0	3,2	68,8	0,003
Lạc tiên - CT3	20	12,5	2,9	64,8	0,0015
Lạc tiên - CT 4	20	13,5	3,2	63,6	0,0015
Táo - CT1	33	12,0	2,8	52,3	0,0035
Táo - CT2	33	12,5	3,0	51,2	0,0035
Táo - CT3	50	12,5	2,8	34,5	0,002
Táo - CT4	50	13,5	3,2	33,3	0,002

Kết quả thu được chọn các công thức pha chế như sau: Nước đào chọn công thức số 4; Nước ổi chọn công thức số 3; Nước lạc tiên chọn công thức số 4; Nước táo chọn công thức số 2. Bao bì sử dụng cho sản xuất nước quả trong: Khi sử dụng bao bì cho sản phẩm nước quả trong đóng hộp ngoài các yêu cầu chung cho bao bì thực phẩm như không độc hại, dễ sử dụng, kín. Cần chú ý các đặc điểm kỹ thuật như sau: Bao bì cần thể hiện được chất lượng về màu sắc và độ trong của sản phẩm, chịu được độ axit cao, không có các phản ứng với các thành phần như hương và màu của sản phẩm. Dựa trên các yêu cầu trên, chúng tôi đã nghiên cứu bảo quản và quyết định chọn bao bì chai thủy tinh, lon thiếc hoặc nhựa (PET) cho sản phẩm nước quả đóng hộp.

3.6.3.2. Nghiên cứu công nghệ chế biến nước quả cô đặc.

Dịch quả thu được thông thường chứa 80 - 85% hàm lượng nước, nên sau khi chế biến, đòi hỏi thể tích kho chứa và số lượng phương tiện vận chuyển lớn. Hơn nữa việc bảo quản và dự trữ dịch quả để sản xuất nước giải khát lúc trái thời vụ là rất khó khăn và tốn kém. Để khắc phục những vấn đề này, chúng tôi tiến hành thực hiện bảo quản dịch quả bằng phương pháp cô đặc.

Bảng 32. Điểm cảm quan cho các công thức phối chế nước quả

Quả	Màu sắc	Mùi vị	Hình thái
Đào - CT 1	4,0	4,2	4,5
Đào - CT2	4,2	4,2	4,2
Đào - CT3	4,5	4,5	4,9
Đào - CT4	4,7	4,8	4,9
Ổi - CT1	4,2	4,4	4,7
Ổi - CT2	4,2	4,5	4,7
Ổi - CT3	4,7	4,9	4,8
Ổi - CT4	4,5	4,5	4,8
Lạc tiên - CT1	3,8	4,0	4,2
Lạc tiên - CT2	4,0	4,0	4,2
Lạc tiên - CT3	4,8	4,5	4,7
Lạc tiên - CT4	4,8	4,8	4,9
Táo - CT1	4,2	4,7	4,5
Táo - CT2	4,2	4,9	4,5
Táo - CT3	4,3	4,7	4,2

Qua quá trình cô đặc hàm lượng chất khô của dịch quả tăng từ nồng độ chất khô ban đầu 5-20% lên 60-75%. Dịch quả được cô đặc đến độ khô nhất định ức chế được hoạt động của vi sinh vật. Đồng thời diện tích kho chứa giảm xuống khoảng 4 lần và dạng bán sản phẩm này là nguyên liệu ưu việt cho sản xuất hầu hết các thành phẩm từ quả như: Nước giải khát, kẹo nhân quả, mứt nhuyễn và các sản phẩm bánh cao cấp.

Phương pháp tính toán khi cô đặc: Từ dịch quả loãng (A) cần loại bỏ một lượng nước (B) để nhận được lượng nhất định dịch cô đặc (C), trong đó: $A = B + C$ (Bảng 34). Tỷ lệ cô đặc được tính bằng tỷ lệ giữa hàm lượng chất khô của dịch cô đặc (H_C) và hàm lượng chất khô của dịch quả ban đầu (H_A): $e = H_C : H_A$

Dựa trên thị hiếu người tiêu dùng cũng như trong thực tế sản xuất cho thấy loại dịch quả cô đặc có nồng độ khoảng 60 °Bx là loại quả được ưa thích nhất. Đồng thời, ở nồng độ 60 °Bx, 70 °Bx dịch quả có thể an toàn trước sự xâm nhập của vi sinh vật trong thời gian 6 tháng đến 12 tháng. Tuy nhiên, khi cô đặc dịch quả tới 70 °Bx sẽ hao tổn năng lượng hơn nhiều và xác suất chất lượng sản phẩm bị biến đổi xấu trong quá trình tiến hành cô đặc cũng cao hơn. Bởi vậy chúng tôi, quyết định chọn nồng độ của dịch quả cô đặc là 60 °Bx.

Bảng 33. Công thức tính toán trong quá trình cô đặc

Yếu tố cho trước	Yếu tố cần tìm	Công thức
Lượng dịch quả loãng để cô đặc (A)	B	$B = A \times \frac{e-1}{e}$
	C	$C = A \times \frac{1}{e}$
Lượng nước cần loại bỏ (B)	A	$A = B \times \frac{e}{e-1}$
	C	$A = B \times \frac{1}{e-1}$
Lượng dịch cô đặc (C)	A	$A = C \times e$
	B	$B = C \times (e-1)$

Xác định chế độ cô đặc: Dịch quả tự nhiên thu được thường có nồng độ 10-15 °Bx tùy theo chất lượng và loại quả. Phương pháp cô đặc chúng tôi sử dụng trong quá trình nghiên cứu là dùng nhiệt độ bay hơi nước trong môi trường chân không. Khi đun dịch quả lên đến nhiệt độ hóa hơi của nước thì nước sẽ bay hơi và thoát ra ngoài. Tuy nhiên, khi chịu tác dụng của nhiệt độ cao như vậy trong thời gian dài, dịch quả sẽ bị biến đổi theo chiều hướng xấu và kết quả là màu dịch quả sẫm đi, hương vị nồng, có mùi nấu.

Để khắc phục nhược điểm của phương pháp này, cần hạ thấp được nhiệt độ hóa hơi của nước bằng cách cô đặc dịch quả trong môi trường chân không, như vậy nhiệt độ của quá trình cô đặc sẽ giảm xuống đáng kể. Chúng tôi nghiên cứu chế độ cô đặc không phù hợp cho nước quả bằng cách thử nghiệm ảnh hưởng của các thông số (áp suất, nhiệt độ, chất chống oxy hóa) đến chất lượng dịch quả. Chúng tôi tiến hành nghiên cứu cô đặc dịch quả ở các độ chân không khác nhau, tức là cô đặc ở các nhiệt độ khác nhau (**Bảng 34**).

Qua kết quả thí nghiệm và tính toán sơ bộ về kinh tế, chúng tôi nhận thấy, nên chọn chế độ cô đặc ở nhiệt độ 60 °C và áp suất 80 hPa. Các thông số công nghệ này đảm bảo được các yêu cầu về chất lượng sản phẩm và hiệu quả kinh tế.

Bảng 34. Xác định áp suất chân không và nhiệt độ cho quá trình cô đặc dịch quả

T	Áp suất (hPa)	Nhiệt độ (°C)	Màu sắc	Hương vị
1	Không khí	100	Đen sẫm	Đắng, mùi nấu rõ.
2	300	90	Nâu sẫm	Hơi đắng, mùi nấu, không có hương vị đặc trưng của quả
3	200	80	Tối	Mùi nấu, vị hơi nồng, không đặc trưng
4	150	70	Vàng sẫm	Hơi nồng, có mùi quả nhưng chưa rõ
5	100	60	Vàng sẫm, màu tự nhiên	<i>Có hương của quả, vị đậm đà</i>
6	80	50	Màu đậm	Hương vị quả rõ, thơm đậm đà

*Ghi chú: 1 atm = 1013,25 hPa

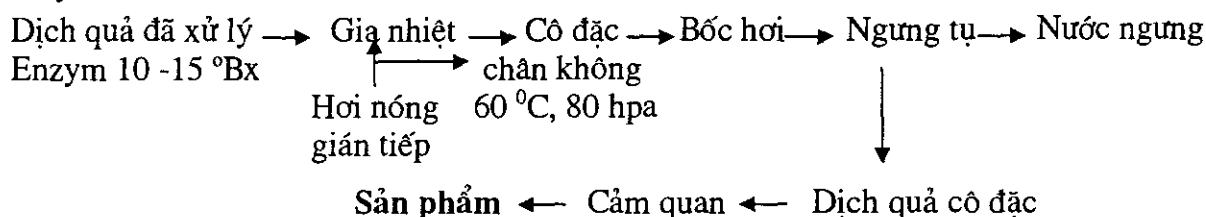
Sau khi cô đặc, chúng tôi tiến hành đánh giá cảm quan chất lượng các mẫu dịch quả cô đặc có sử dụng và không sử dụng enzym để xử lý (**Bảng 35**).

Bảng 35. Điểm cảm quan sản phẩm nước dứa cô đặc

Mẫu	Điểm đánh giá theo TCVN 3216-1994			
	Màu sắc	Mùi vị	Hình thái	Tổng
Nước dứa cô đặc xử lý enzym	4,5	4,7	4,6	13,8
Nước dứa cô đặc không xử lý enzym	2,0	3,5	3,0	8,5

Các tính chất có điểm tối đa là 5 điểm. Đánh giá chung có điểm tối đa là 20 điểm. Kết quả cho thấy chất lượng nước dứa cô đặc có qua xử lý enzym cho chất lượng tốt hơn rất nhiều so với chất lượng nước dứa cô đặc không qua xử lý enzym. Ngoài ra, trong quá trình cô đặc cần chú ý các khía cạnh về kỹ thuật và kinh tế trong sản xuất nước quả cô đặc: Lượng nước bay hơi kg/ h, sự biến đổi theo nhiệt độ của sản phẩm, nhiệt độ sôi, thời gian cô đặc, khả năng thu hồi chất thơm, đặc tính lưu biến, độ nhớt, kiểm tra vi sinh, giám sát sơ lược toàn bộ thiết bị, khu vực đặt thiết bị, thích nghi với các điều kiện của xưởng chế biến, tính chi phí hơi, điện, nước lạnh.

Hình 32. Quy trình công nghệ sản xuất nước quả cô đặc từ dịch quả đã xử lý enzym



3.6.4. Nghiên cứu điều kiện thanh trùng bảo quản sản phẩm:

Tiến hành thí nghiệm với nhiệt độ thanh trùng là 80 °C, 90 °C và 100 °C (**Bảng 36**).

Bảng 36. Thời gian nâng nhiệt ở các nhiệt độ khác nhau

Nhiệt độ thanh trùng (°C)	Thời gian nâng nhiệt (phút)
80	10
90	15
100	20

Đã tiến hành thí nghiệm với nhiệt độ là 80 °C, 90 °C, 100 °C (**Bảng 37**).

Bảng 37. Thời gian hạ nhiệt ở các nhiệt độ thanh trùng khác nhau

Nhiệt độ thanh trùng (°C)	Thời gian hạ nhiệt (phút)
80	15
90	20
100	25

Xác định công thức thanh trùng: Với mỗi nhiệt độ thanh trùng ta tiến hành thí nghiệm với 3 mẫu ở các chế độ thời gian giữ nhiệt khác nhau là 5; 10; 15 phút. Từ đó ta có các công thức thanh trùng như sau:

$$\begin{array}{ccc} \frac{10-5-15}{80} \text{ (M1)} & \frac{15-5-20}{90} \text{ (M4)} & \frac{20-5-25}{100} \text{ (M7)} \\ \frac{10-10-15}{80} \text{ (M2)} & \frac{15-10-20}{90} \text{ (M5)} & \frac{20-10-25}{100} \text{ (M8)} \\ \frac{10-15-15}{80} \text{ (M3)} & \frac{15-15-20}{90} \text{ (M6)} & \frac{20-15-25}{100} \text{ (M9)} \end{array}$$

Các mẫu sản phẩm được đưa đi kiểm tra cảm quan và vi sinh vật (**Bảng 38**). Kết quả kiểm tra cảm quan cho thấy tất cả các mẫu thanh trùng ở nhiệt độ 80 °C và 90 °C đều đạt yêu cầu, không có những biến đổi xấu về màu sắc, mùi vị sau khi thanh trùng.

Bảng 38. Kết quả kiểm tra vi sinh vật các mẫu nước quả đóng chai 250 ml

TT	Tên mẫu	Vi khuẩn (CFU/ g)	Chất lượng sản phẩm
1	M1	46	Màu sáng, không có mùi vị lạ hoặc vị nẫu chín.
2	M2	34	Màu sáng, không có mùi vị lạ hoặc vị nẫu chín.
3	M3	22	Màu sáng, không có mùi vị lạ hoặc vị nẫu chín.
4	M4	20	Màu sáng, không có mùi vị lạ hoặc vị nẫu chín.
5	M5	10	Màu sáng, không có mùi vị lạ hoặc vị nẫu chín.
6	M6	5	Màu sáng, không có mùi vị lạ hoặc vị nẫu chín.
7	M7	8	Màu đẹp , không có mùi vị lạ hoặc vị nẫu chín.
8	M8	2	Màu sáng, không có mùi vị lạ, có vị nẫu chín.
9	M9	0	Màu sáng, không có mùi vị lạ, có vị nẫu chín.

Các mẫu thanh trùng ở nhiệt độ 100 °C không có biến đổi về màu sắc nhưng có một chút vị nẫu chín. Kết quả kiểm tra vi sinh vật cho thấy tất cả các mẫu đều phù hợp với quy định 867/QĐ-BYT của Bộ y tế (tổng số vi khuẩn hiếu khí không quá 10² tế bào/g sản phẩm). Tuy nhiên, khi xét cả hai chỉ tiêu (cảm quan, vi sinh vật), mức độ an toàn cho sản phẩm trong quá trình bảo quản và hiệu quả kinh tế thì ta thấy mẫu M5 là an toàn và phù hợp nhất.

Vậy công thức thanh trùng là: $\frac{15-10-20}{90}$ (với chai 250 ml)

3.6.5. Xây dựng mô hình.

Mô hình thiết bị chế biến dịch quả tươi gồm 2 công đoạn chính.

1. Công đoạn sản xuất dịch quả bao gồm các thiết bị:

- + Xử lý nguyên liệu quả tươi rửa chọn phân loại nguyên liệu, gọt vỏ bỏ lõi nếu cần.
- + Thiết bị chần thanh trùng sơ bộ, diệt một số enzym.
- + Thiết bị chà xé thịt quả tạo điều kiện phá vỡ các mô, tế bào, để nâng cao hiệu suất trích ly.
- + Thiết bị ép thuỷ lực để trích ly dịch quả.
- + Thiết bị phản ứng enzym, nâng cao hiệu suất thu hồi dịch quả.
- + Thiết bị ly tâm tách các chất xơ, vỏ màng tế bào thu hồi dịch quả.
- + Thiết bị lắng trong, hoặc lọc trong dịch quả để tách các keo, kết tủa, thu hồi dịch quả trong và bổ sung đường, xử lý hoá chất cho phép hoặc bổ sung đường để bảo quản dịch quả.

2. Công đoạn chế biến dịch quả tươi.

- + Thiết bị pha chế dịch quả tới nồng độ thích hợp.
- + Thiết bị cô đặc chân không, nâng nhiệt bốc hơi, nâng cao nồng độ.
- + Thiết bị bài khí giảm thiểu các yếu tố gây ảnh hưởng, ôxy hoá, biến đổi màu, chất lượng sản phẩm.
- + Thiết bị đóng chai, lon, hộp.
- + Thiết bị thanh trùng và làm nguội.
- + Thiết bị bao bì, dán nhãn, đóng hộp, sọt nhựa, hộp giấy.

3.6.6. Chuyển giao công nghệ.

Sau khi nghiên cứu và tiến hành thực nghiệm tại Xưởng thực nghiệm Viện Công nghiệp thực phẩm chúng tôi đã tiến hành chuyển giao công nghệ cho một số cơ sở sản xuất.

- Chuyển giao công nghệ sản xuất nước quả trong, đục cho Công ty Cổ phần Thuốc lá và Thực phẩm Bắc giang: Nước táo, dưa và vải
- Chuyển giao công nghệ sản xuất nước dưa cô đặc cho Công ty Thực phẩm xuất khẩu Đồng Giao
- Hợp tác với Nhà máy Rượu Hà Nội trong xử lý dịch quả cho quá trình sản xuất rượu vang chất lượng cao. Trong cuộc thi Giải Vàng Quốc tế về chất lượng rượu vang, sản phẩm Rượu vang Hà Nội đã được giải khuyến khích.

3.7. Nghiên cứu công nghệ sản xuất đường chức năng fructo-oligosaccharit bằng công nghệ đa enzym và ứng dụng trong sản xuất thức ăn trẻ em, bánh kẹo và thực phẩm chức năng.

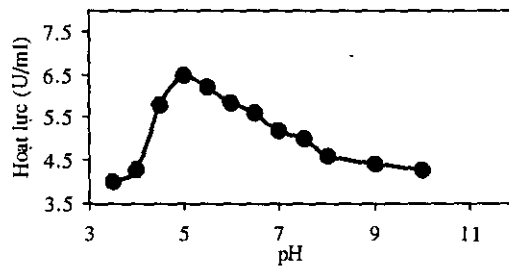
3.7.1. Nghiên cứu lựa chọn và xử lý nguyên liệu, lựa chọn hệ enzym và thiết bị.

Lựa chọn, xử lý nguyên liệu, hệ enzym và thiết bị: Chuyển hoá sacaroza thành đường FOS được chia ra hai phân đoạn: Phân đoạn phản ứng fructosiltransferaza (FTS) và phân đoạn phản ứng Glucooxydaza-Catalaza (GOD- CAT). Tại phân đoạn đầu, enzym FTS xúc tác lên đường sacaroza tạo ra đường FOS và đường glucoza. Tại phân đoạn sau, hệ 2 enzym GOD- CAT tác dụng lên đường glucoza và chuyển hoá chúng thành axit gluconic rồi thành muối gluconat natri và được loại ra khỏi dung dịch bằng kỹ thuật trao đổi ion. Để có được hiệu quả cao và sản xuất đường FOS cao độ, cả hai phân đoạn chuyển hoá trên cần được nghiên cứu tối ưu hoá. Có thể chọn hệ 3 enzym FTS- GOD- CAT nếu thực hiện đồng thời 2 quá trình trên.

Lựa chọn thiết bị: Đã tận dụng thiết bị quy mô phòng thí nghiệm, xưởng thực nghiệm để nghiên cứu sinh tổng hợp thu hồi enzym. Đã tận dụng dây chuyền sản xuất hiện có của cơ sở sản xuất để nghiên cứu ứng dụng, bổ sung FOS vào bột dinh dưỡng trẻ em, bánh bích quy và kẹo cứng.

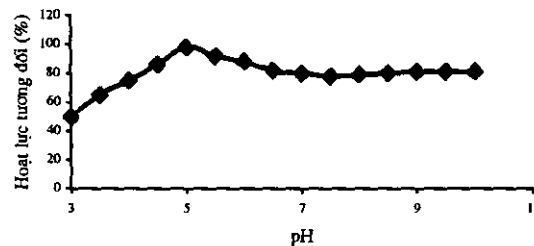
3.7.2. Nghiên cứu quy trình công nghệ sản xuất đường FOS có độ tinh khiết cao bằng phương pháp enzym.

Xác định pH môi trường và nhiệt độ tối ưu: Để xác định pH tối ưu cho hoạt động của enzym, thí nghiệm được tiến hành bằng cách xác định hoạt lực của các mẫu enzym trong điều kiện pH khác nhau từ 3 tới 10. Ta dễ dàng nhận thấy hoạt lực của enzym đạt giá trị cao nhất khi môi trường có pH 5,0. So sánh với các kết quả đã công bố thì kết quả này cũng phù hợp vì hầu hết các FTS đều có pH tối ưu cho hoạt động là từ 5.0 đến 6.8 như FTS của *Aspergillus japonicus* [15], *Aspergillus niger* ATCC 20611 [21], *Aureobasidium pullulas* [33]. Chỉ duy nhất có FTS từ *Aspergillus oryzae* [33] là có hoạt lực tối đa tại pH 8 (Hình 33 và 34).



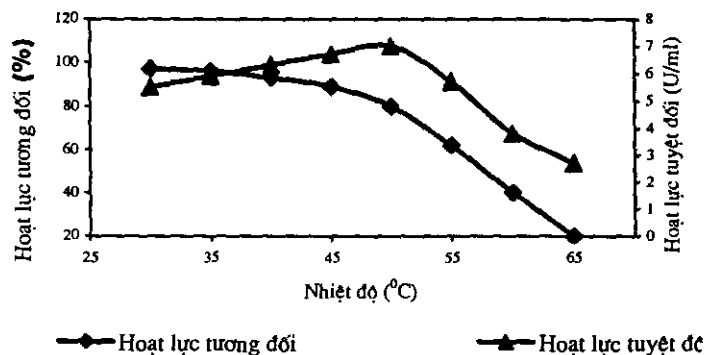
Hình 33. Ảnh hưởng của pH đến hoạt lực của enzym

Để xác định khoảng pH mà tại đó FTS ổn định (các đặc tính không bị thay đổi), thí nghiệm được tiến hành bằng cách ngâm các mẫu enzym vào những môi trường có pH khác nhau thay đổi trong khoảng 3 đến 10 trong thời gian 2 giờ. Sau đó hoạt lực của enzym được đem phân tích để xác định hoạt lực tương đối (tỷ lệ phần trăm hoạt lực của enzym sau và trước khi bị xử lý). Kết quả như hình 34 đã thể hiện. Ta thấy enzym FTS ổn định trong dải pH khá dài từ 4 đến 10.



Hình 34. Ảnh hưởng của pH đến sự ổn định hoạt lực của enzym

Enzym có hoạt lực cao nhất khi ở nhiệt độ 50 °C và enzym này tương đối ổn định trong dải nhiệt từ 35 °C đến 55 °C. Kết quả này cũng phù hợp với các công bố của Jiang Bo



Hình 35. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt lực của enzym

Tối ưu hoá các điều kiện chuyển saccharoza thành FOS: Qui hoạch toán học thực nghiệm là phương pháp được ứng dụng nhiều trong các lĩnh vực công nghệ sinh học, bởi phương pháp này có thể giảm số lần thí nghiệm tới mức tối thiểu mà vẫn cho kết quả chính xác. Trong phản ứng có enzym xúc tác. Hiệu suất của phản ứng bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố như nhiệt độ, pH, thời gian, nồng độ enzym, nồng độ cơ chất v.v, nên việc xác định điều kiện tối ưu cho quá trình là rất phức tạp. Việc sử dụng phương pháp qui hoạch toán học thực nghiệm Box-Willson sẽ giúp ta dễ dàng hơn trong quá trình thí nghiệm lặp lại. Các yếu tố cần tối ưu là nồng độ sacaroza (%), nồng độ enzym FTS (U/ g sacaroza), thời gian phản ứng (giờ), chỉ tiêu tối ưu là hàm lượng FOS tạo thành (%). Tất cả các thí nghiệm đều được tiến hành ở điều kiện nhiệt độ 50 °C và pH 5 thích hợp cho hoạt động của enzym. Mục đích của quá trình là tìm điều kiện phản ứng để thu được hiệu suất cao nhất và hàm lượng FOS cao nhất. Kết quả cho thấy: Hàm lượng FOS thu được cao nhất là 54,3%, nồng độ sacaroza 54%, nồng độ FTS 8U/ g sacaroza, thời gian 12 giờ, pH 5, nhiệt độ 50 °C.

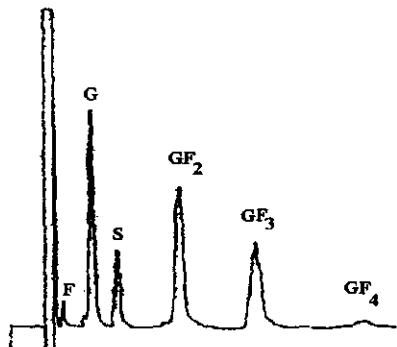
Tối ưu hoá các điều kiện chuyển đường glucoza bằng hệ enzym GOD/ CAT: Như chúng ta đã biết có rất nhiều phương pháp để nâng cao độ tinh khiết của FOS. Nhưng một trong những phương pháp dễ thực thi trong điều kiện Việt Nam là dùng enzym để chuyển hoá đường glucoza trong hỗn hợp FOS, nhờ đó nâng cao độ tinh khiết của sản phẩm.

Theo khuyến cáo của nhà sản xuất enzym, thì hệ enzym GOD - CAT có nhiệt độ và pH hoạt động tối thích tương ứng tại 30 °C và pH 5. Trong thí nghiệm này ba chỉ tiêu nồng độ enzym, thời gian phản ứng và tỷ lệ hai enzym GOD/ CAT được tối ưu hoá bằng phương pháp Box- Wilson. Kết hợp các kết quả phần trên ta có điều kiện tối ưu cho quá trình chuyển hoá đường glucoza là:

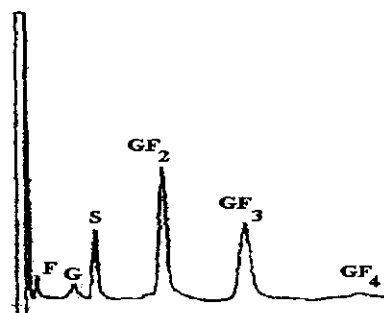
+ Nồng độ đường tổng: 32 %	+ Nhiệt độ: 30 °C
+ Nồng độ enzym GOD: 17 U/ g sacaroza	+ pH: 5
+ Tỷ lệ GOD/CAT: 0,085	+ Thời gian: 13 giờ

Áp dụng điều kiện tối ưu đã tìm được như trên để thực nghiệm, kết quả cho thấy sau khi loại bỏ glucoza bằng hệ GOD - CAT, độ tinh khiết của FOS đã được nâng từ 54,3% lên 78%. Kết quả phân tích hai mẫu đường trước và sau khi loại bỏ glucoza

bằng sắc ký lỏng cao áp cho ta biểu đồ quang phổ như hình 36 và 37. Qua hai đồ phổ ta dễ dàng nhận thấy pic đại diện cho đường glucoza trong đồ phổ khi phân tích FOS đã bị mất đi gần hết trong đồ phổ của FOS cao độ (*Hình 36 và 37*).



Hình 36. Đồ phổ HPLC của mẫu trước phản ứng GOD-CAT



Hình 37. Đồ phổ HPLC của mẫu sau phản ứng GOD-CAT

Nghiên cứu sản xuất FOS cao độ bằng phương pháp đồng thời: Sản xuất đường FOS sử dụng hệ enzym theo phương pháp nối tiếp, mặc dù có nhiều ưu điểm như có thể điều chỉnh điều kiện thích hợp cho hoạt động của từng enzym riêng rẽ, nhờ đó hiệu suất chuyển hoá cao hơn. Song nó đồng thời cũng có một số nhược điểm như thời gian phản ứng lâu hơn, cần nhiều thiết bị và tốn nhiều nhiên liệu hơn. Vì thế việc nghiên cứu sản xuất đường FOS cao độ bằng phương pháp đồng thời là cần thiết để so sánh lựa chọn công nghệ tối ưu.

Như ta đã biết hệ enzym GOD- CAT hoàn toàn bị bất hoạt khi ở trong nồng độ đường cao quá 40 % và không ổn định khi nhiệt độ cao hơn 40 °C. Trong khi đó enzym FTS lại hoạt động tốt nhất ở điều kiện nhiệt độ 50 °C và nồng độ đường cao đến 60%. Vì thế, thí nghiệm nghiên cứu tìm điều kiện thích hợp cho quá trình hoạt động của hệ 3 enzym trên được tiến hành với các mẫu khác nhau về nhiệt độ và nồng độ cơ chất nhưng có cùng pH 5, thời gian phản ứng 12 giờ, nồng độ enzym FTS là 8 U/ g, nồng độ enzym GOD là 20 U/ g và tỷ lệ GOD/ CAT là 0,085 (*Bảng 39 và 40*).

Bảng 39. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt động của hệ enzym

FTS - GOD/ CAT

Nhiệt độ (°C)	30	32	34	36	38	40
FOS(%)	58	61	62	62	57	52

Bảng 40. Ảnh hưởng của nồng độ đường đến hoạt động của hệ enzym

FTS - GOD - CAT

Nồng độ đường (%)	30	32	34	36	38	40
FOS (%)	52	53	63	62	57	52

Từ kết quả trên ta thấy nhiệt độ bằng 35 °C và nồng độ đường 35% là thích hợp nhất cho hệ 3 enzym trên hoạt động. Để khẳng định kết quả và xác định hiệu suất phản ứng, một thí nghiệm chuyển hoá đường FOS bằng hệ enzym FTS- GOD- CAT được tiến hành trên thiết bị có cánh khuấy và cấp khí với các điều kiện phản ứng như sau: Nồng độ đường 35%; nhiệt độ phản ứng 35 °C; pH 5; nồng độ enzym FTS 8 U/ g; Nồng độ enzym GOD 20 U/g; Tỷ lệ GOD/ CAT 0,085. Dịch sau phản ứng được đem phân tích thành phần trên hệ thống sắc ký lỏng cao áp (**Bảng 41**). Số liệu trên bảng cho thấy mặc dù lượng FOS tạo thành đã được nâng cao hơn so với mẫu chỉ dùng một enzym FTS. Song hàm lượng sacaroza còn dư lại vẫn rất cao (12,5%). Điều này là do hoạt lực của FTS bị hạn chế phần nào do điều kiện nồng độ đường và nhiệt độ xúc tác chưa ở mức tối ưu. Hơn nữa, điều kiện xúc tác của GOD- CAT cũng bị ảnh hưởng trong điều kiện nhiệt độ và nồng độ cơ chất cao hơn mức yêu cầu.

Bảng 41. Thành phần đường của dịch sau phản ứng hệ 3 enzym bằng phương pháp đồng thời

Thành phần đường	G	GF	GF ₂	GF ₃	GF ₄	Tổng FOS
Hàm lượng(%)	22,5	12,5	37,6	24,2	3.2	65

Từ kết quả nghiên cứu của hai phương pháp trên ta thấy phương pháp nối tiếp có ưu việt hơn so với phương pháp đồng thời.

Đã sơ bộ tính toán giá thành cho sản phẩm đường FOS 50 bao gồm: Đường kính trắng, enzym, điện, nguyên liệu, công lao động, chi khác. Giá thành 1 kg đường FOS 50

là: 130.720 đồng. Chi phí sản xuất 10 lít dịch đường FOS cao độ bao gồm: FOS 50, GOD + CAT, điện, công, phụ liệu, giá bao bì, chi khác. Giá thành tổng cho 1 chai sản phẩm là: 32.936,284 đồng.

3.7.3. Nghiên cứu sử dụng đường FOS trong sản xuất bột dinh dưỡng trẻ em và bánh kẹo chức năng.

Do đường FOS có nhiều đặc tính sinh học đáng quý, có hương vị và tính chất hoá lý tương tự như đường kính nên việc thay thế đường kính bằng đường FOS trong sản xuất các loại thực phẩm chứa đường như kẹo, bánh và bột dinh dưỡng trẻ em là hoàn toàn khả thi. Sản phẩm này sẽ có giá trị cao về mặt dinh dưỡng cũng như chức năng phòng ngừa bệnh tật, đồng thời hương vị cũng được cải thiện rất nhiều.

Trong nghiên cứu này, sản phẩm đường FOS thu nhận được từ kết quả phân trên được sử dụng trong sản xuất ba sản phẩm thực phẩm đó là bột dinh dưỡng trẻ em, bánh bích quy và kẹo cứng. Do giá thành và độ tinh khiết của đường FOS cao độ khá cao, nên chúng tôi chọn đường FOS thấp độ làm đối tượng nghiên cứu cho quá trình này. Nghiên cứu đầu tiên được tiến hành bằng cách xác định nhiệt độ sôi và nhiệt độ caramen hoá của dịch đường FOS thấp độ. Đã xác định nhiệt độ sôi của dịch đường FOS 50% (dịch đường FOS thu được từ phản ứng FTS sau khi chỉnh về nồng độ chất khô 50%) là 110 °C và nhiệt độ caramen hoá là 180 °C.

3.7.3.1. Nghiên cứu sử dụng đường FOS trong sản xuất bột dinh dưỡng trẻ em.

Nghiên cứu sản xuất bột dinh dưỡng trẻ em đã được thực hiện tại Viện Công nghiệp thực phẩm từ những năm 90 của thế kỷ trước. Kết quả nghiên cứu đã được chuyển giao đến nhiều cơ sở sản xuất và ngay tại Viện Công nghiệp thực phẩm chúng tôi cũng có một dây chuyền sản xuất theo công nghệ nấu, ép nổ, bao bì. Để đạt được mục đích là đưa sản phẩm đường FOS vào bột dinh dưỡng trẻ em nhằm nâng cao giá trị dinh dưỡng cũng như giá trị sinh học, chúng tôi đã tận dụng dây chuyền thiết bị có sẵn, cải tiến công nghệ cơ sở trong nghiên cứu sử dụng đường FOS vào sản xuất bột dinh dưỡng trẻ em. Đối tượng nghiên cứu của chúng tôi là bột dinh dưỡng loại ngọt. Trên cơ sở nghiên cứu quy trình có sẵn, để có thể thay thế một phần đường sacaroza bằng đường FOS ta phải chú ý các yếu tố sau:

- Đường FOS 50 là dung dịch có chứa 50% chất khô, trong khi đó hàm lượng chất khô của đường sacaroza là 95 - 98%.

- Nhiệt độ caramen hoá của đường FOS là 180 °C nên có thể tham gia trong quá trình nấu trên máy ép nổ giống như đường sacaroza (nhiệt độ đầu ra của máy ép nổ là 170 °C)

- Nấu chín nguyên liệu trên máy ép nổ: Khối nguyên liệu sau khi phối trộn đồng đều được đem ép nổ thành bông chín trên máy ép nổ cao áp. Yêu cầu của sản phẩm sau ép nổ là phải chín thơm, không cháy khét, không có hiện tượng rắn cứng của bột sống.

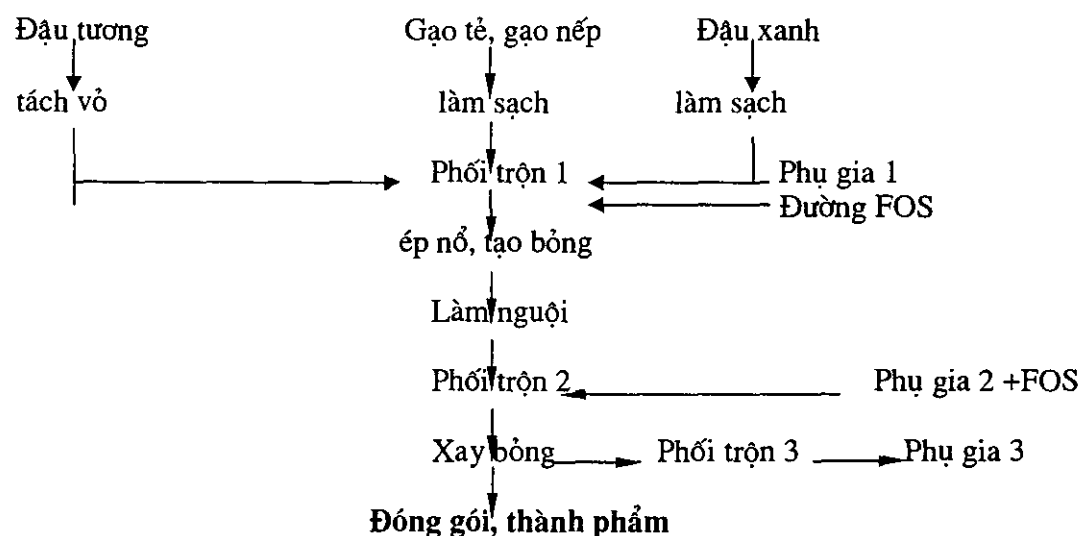
- Phối trộn lần hai và xay bông: Trong công đoạn phối trộn lần hai các chất bổ sung bền nhiệt không biến tính, không bay hơi được phối trộn với bông. Khối bông sau đó được sấy khô đến độ ẩm thích hợp rồi đem xay thành bột trên máy nghiền búa.

- Phối trộn lần 3 và hoàn thiện sản phẩm: Bột thu được sau xay nghiền đem phối trộn với các phụ gia, đóng gói vào túi hoặc hộp nhôm, dán nhãn, kiểm tra và nhập kho.

Ảnh hưởng của lượng đường FOS bổ sung vào nguyên liệu trước khi ép nổ:

Hàm lượng FOS nhiều nhất có thể bổ sung trong giai đoạn đầu trước khi nổ bông là 60g/kg. Nếu muốn sản phẩm có chứa 5% đường FOS, tức là có 50g/ kg ta phải bổ sung 200g/kg dịch FOS 50%.

Hình 38. Xác định quy trình sản xuất bột dinh dưỡng trẻ em có bổ sung FOS



Như vậy ta phải bổ sung thêm 140 g/ kg dịch FOS 50% nữa trong giai đoạn phối trộn lần hai của quy trình sản xuất cơ sở của Viện Công nghiệp thực phẩm. Điều này dễ dàng thực hiện bằng cách trộn đường FOS với bông sau khi nổ rồi đem sấy lại 15 phút ở nhiệt độ 80 °C. Đồng thời để đảm bảo cho độ ngọt của sản phẩm không thay đổi ta phải giảm lượng đường kính trong thực đơn cũ đi 40g/ kg tức là từ 100 g/ kg xuống 60 g/ kg. Bột dinh dưỡng có bổ sung đường chức năng FOS này được phân tích thành phần dinh dưỡng và đánh giá cảm quan (**Bảng 42 và 43**).

Việc bổ sung đường FOS thay thế đường kính trong sản xuất bột dinh dưỡng trẻ em là hoàn toàn dễ dàng và khả thi trong sản xuất lớn vì công nghệ sản xuất mặt hàng mới này không cần sự thay đổi lớn về thiết bị cũng như công nghệ mà sản phẩm thu được lại có hương vị thơm ngon hơn so với sản phẩm thông thường lại mang đặc tính chức năng giúp cho trẻ dễ tiêu hoá, ăn ngon miệng và còn phòng chống một số bệnh khác nữa như đặc tính của đường FOS đã giới thiệu (**Bảng 44**). Về mặt giá thành sản phẩm này sẽ đắt hơn so với mẫu đối chứng là 2.334 đ/ kg. Sự tăng giá này quá nhỏ so với giá thành bột dinh dưỡng bán trên thị trường loại trung bình là 35.000 đ/ g. Do đó, việc bổ sung đường FOS vào sản xuất bột dinh dưỡng để nâng cao chất lượng là hoàn toàn khả thi.

**Bảng 42. Ảnh hưởng của lượng đường FOS bổ sung vào nguyên liệu
ban đầu trước khi ép nổ.**

FOS (g/kg)	Độ ẩm (%)	Khả năng nổ	Đường kính hạt bông (cm)	Chất lượng bông theo cảm quan
30	15	Dễ	1,7	Hơi cháy, quá xốp.
40	16,5	Dễ	1,4	Bông trắng đẹp nhưng quá xốp
50	17,8	Nổ được	1,1	Bông trắng đẹp, xốp vừa phải
60	19,2	Nổ được	0,9	Bông trắng đẹp, xốp, thơm ngon
70	21,7	Kém	0,5	Bông có màu xám, hơi rắn
80	23,5	Rất khó	0,4	Bông màu xám, rắn và hơi sống

Bảng 43. Thành phần của bột dinh dưỡng trẻ em.

Các chỉ tiêu	Đơn vị tính	Bột dinh dưỡng thường	Bột dinh dưỡng FOS
Ấm	%	6	6
Đạm	%	12,5	12,0
Béo	%	4,5	4,0
Gluxit tổng	%	75,5	76,5
Đường FOS	%	0	5

Bảng 44. Kết quả đánh giá cảm quan bột dinh dưỡng trẻ em.

Các chỉ tiêu	Theo thang điểm 10	
	Bột thường	Bột có bổ sung FOS
Màu	9	9.5
Mùi	9	9
Vị	8	9
Hương	9	9
Trạng thái	9	8.5
Tổng thể	8.8	9

3.7.3.2. Nghiên cứu sử dụng đường FOS trong sản xuất bánh bích quy.

Bánh bích quy là sản phẩm được sản xuất từ hai nguyên liệu chính là bột mì và đường cùng với các chất bổ dưỡng như bơ, trứng, sữa... thông qua quá trình nướng, dưới tác dụng của nhiệt độ, sản phẩm thu được là một loại thực phẩm thơm ngon dễ tiêu hoá, giàu hydratcarbon, protein và lipit. Với đặc tính là sản phẩm khô, hàm lượng nước thấp nên bánh quy rất dễ bảo quản và thuận tiện cho việc chuyên chở cũng như tiêu dùng. Vì thế bánh quy từ bao đời nay luôn là sản phẩm được người tiêu dùng ưa thích. Các đối tượng sử dụng bánh quy rất đa dạng, từ trẻ em đến người già, từ người khoẻ đến người bệnh. Phạm vi sử dụng cũng rất rộng từ thành phố đến các vùng xa.

Vì đường FOS có các tính chất và hương vị gần giống như đường kính, nên hướng bổ sung đường FOS vào bánh bích quy như một chất thay thế đường kính. Cũng như trong sản xuất bột dinh dưỡng, mục tiêu của sản phẩm là phải chứa từ 5%-10% đường FOS. Đối tượng sử dụng sẽ là FOS 50 để giảm giá thành. Thiết bị sử dụng sẽ là các dây chuyền sản xuất bánh bích quy có sẵn của Công ty thực phẩm Hà Tây và cơ sở sản xuất bánh kẹo Phúc Long. Việc bổ sung dịch đường FOS tốt nhất là vào công đoạn trộn nhũ. Lượng đường FOS trộn vào sẽ dùng để thay thế đường kính, nên việc tính toán lượng FOS thay thế phải dựa trên các căn cứ sau:

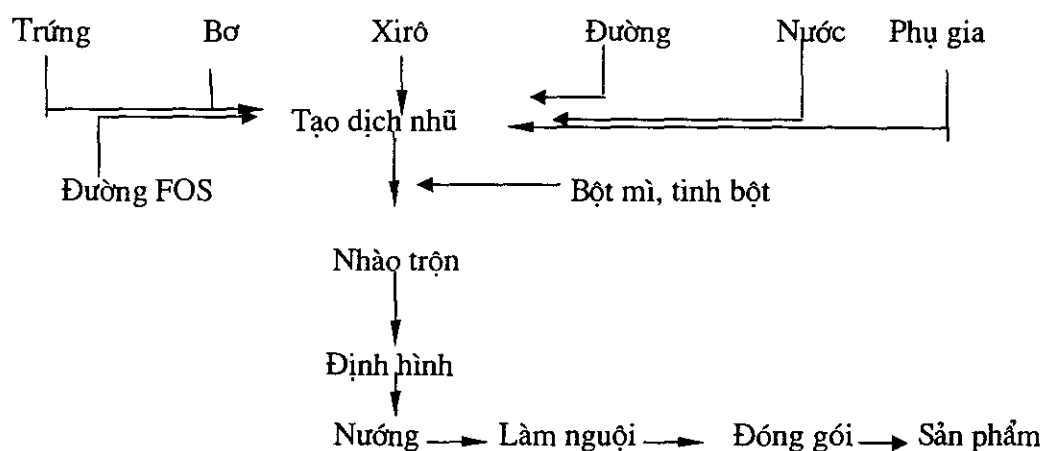
- Hàm lượng nước của dịch nhũ phải tương tự như quy trình cơ sở.
- Độ ngọt của sản phẩm về sau phải tương đương với đối chứng.
- Trên cơ sở ít thay đổi về công nghệ sản xuất bánh bích quy thông thường.
- Hình thức cũng như chất lượng phải tốt hơn hoặc tương đương với đối chứng.
- Giá thành phải không được quá cao, được khách hàng chấp nhận.

Chúng tôi làm thí nghiệm với các mẫu bổ sung các lượng FOS khác nhau, giữ nguyên các yếu tố và thành phần nguyên liệu như mẫu đối chứng. Các chỉ tiêu đánh giá là khả năng thực hiện, giá trị cảm quan, giá thành (**Bảng 45**).

Bảng 45. Ảnh hưởng của lượng đường FOS bổ sung đến quá trình sản xuất bánh bích quy

Lượng đường FOS bổ sung (g/kg)	Lượng đường kính bị thay thế (g/kg)	Khả năng thực hiện trên dây chuyền TB	Chênh lệch giá thành (đ/ kg)
160	64	Tốt	1643
200	80	Tốt	2054
240	96	Tốt	2465
280	112	Tốt	2876
320	128	Bị dính	3287

Từ kết quả trên ta thấy để đáp ứng được điều kiện công nghệ trên dây chuyền sản xuất bánh bích quy thông thường ta có thể bổ sung một lượng đường FOS lớn đến 280g/kg sản phẩm. Tuy nhiên do giá thành của sản phẩm sẽ cao và do nhu cầu của người tiêu dùng, ta vẫn có thể dùng đường FOS cao độ hoặc đường FOS thấp độ được cô đặc trước.



Hình 39. Quy trình sản xuất bánh bích quy sử dụng đường FOS

Sản phẩm bánh bích quy có bổ sung đường FOS, được đem phân tích thành phần dinh dưỡng và đánh giá chất lượng cảm quan, kết quả được thể hiện trên **bảng 46** và **47**. Từ các kết quả trên ta thấy việc sử dụng đường FOS vào sản xuất bánh bích quy công nghiệp là hoàn toàn khả thi. Sản phẩm mới này ngoài giá trị cải thiện chất lượng của bánh quy, còn có tác dụng cải thiện và phòng chống bệnh tật của đường FOS.

Bảng 46. Thành phần của bánh bích quy

Các chỉ tiêu	Đơn vị tính	Bánh quy thường	Bánh quy FOS
Âm	%	6,20	6,2
Đậm	%	6,80	6,8
Béo	%	3,90	3,92
Gluxit tổng	%	69,3	70,0
Đường FOS	%	0	7

Bảng 47. Kết quả đánh giá cảm quan bánh bích quy (Theo thang điểm 10)

Các chỉ tiêu	Bánh bích quy thường	Bánh bích quy FOS
Màu	9	9,5
Mùi	9	9
Vị	8	9
Hương	9	9
Trạng thái	9	9
Tổng thể	9	9,1

3.7.3.3. Nghiên cứu sử dụng đường FOS trong sản xuất kẹo.

Kẹo là một trong những sản phẩm chính, chiếm khối lượng bậc nhất trong công nghiệp chế biến đường. Phụ thuộc vào đặc tính như trạng thái, thành phần, mẫu mã và hương vị, kẹo được chia ra làm nhiều chủng loại như kẹo cứng, kẹo mềm, kẹo dai... Do đặc tính dễ bảo quản, thuận tiện sử dụng và hương vị thơm ngon nên kẹo đã được sản xuất và tiêu dùng rộng rãi từ bao đời nay trên khắp thế giới, cho mọi đối tượng. Để tăng cường giá trị của kẹo chúng tôi tiến hành nghiên cứu sử dụng đường chức năng FOS với mục đích giúp cho đông đảo người tiêu dùng được tiếp nhận sản phẩm đường chức năng FOS để cải thiện và tăng cường khả năng phòng chống bệnh tật. Thí nghiệm được thực hiện trên dây chuyền sản xuất có sẵn của Công ty thực phẩm Hà Tây và cơ sở sản xuất bánh kẹo Phúc Long. Cũng như hai sản phẩm bột dinh dưỡng trẻ em và bánh bích quy đã trình bày ở phần trước, đường FOS chọn để bổ sung vào sản phẩm kẹo là đường FOS 50 có độ thuần khiết thấp và nồng độ chất khô là 50%.

Dựa trên quy trình cơ sở của công nghệ sản xuất kẹo cứng thông thường. Các bước công nghệ được thực hiện cụ thể như sau:

- Phối trộn: Tiến hành ở điều kiện áp suất thường hoặc áp suất cao. Khối dịch sau khi đun phải đảm bảo các yêu cầu như sau:

- + Khối dịch không được có các hạt đường kính kết tinh.
- + Độ ẩm của khối dịch phải ổn định và không cao quá 16%.
- + Hàm lượng các đường thủy phân của sacaroza phải đạt mức thấp.

- Nấu kẹo hay cô kẹo: Quá trình này thường được thực hiện trong nồi cô chân không. Độ chân không tối ưu cho quá trình cô là 0,008 -0,0015 MPa.

- Làm nguội: Sau nấu chân không khối kẹo có nhiệt độ khoảng 115-125 °C.

Đã xác định được quy trình sản xuất kẹo cứng thông thường: Đã xác định điều kiện thích hợp cho việc phối hợp các chất màu, chất hương và tạo độ nhuyển vừa phải, làm nguội khối dịch xuống từ 40 - 80 °C phụ thuộc vào chủng loại sản phẩm, tác nhân thu nhiệt là nước lạnh có nhiệt độ từ 5 - 6 °C, thời gian hạ nhiệt thường khống chế ở 3 -5 phút. Kéo kẹo để tạo cho không khí bên ngoài được trộn lẫn vào khối kẹo làm cho kẹo xốp, giòn và có màu trắng hấp dẫn.

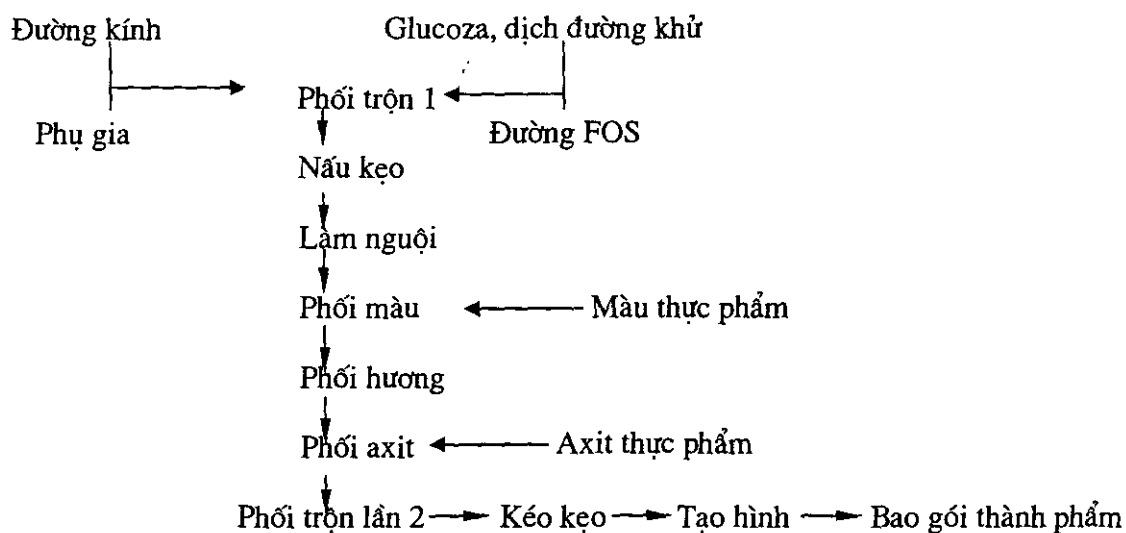
Chúng tôi nhận thấy đường FOS có thể bổ sung vào giai đoạn phối trộn và khác với hai sản phẩm bột dinh dưỡng trẻ em và bánh bích quy, đường FOS có thể bổ sung thay thế cả đường kính cũng như đường nha, vì đường FOS 50 ngoài hàm lượng FOS nguyên chất ra nó còn chứa cả đường khử glucoza và một phần fructoza, chọn tỷ lệ thay thế cho đường kính là 70% và đường nha là 30%.

Và như vậy quy trình công nghệ sản xuất kẹo cứng có bổ sung đường FOS đạt các chỉ tiêu chất lượng và được đánh giá là khả năng thực hiện trên dây chuyền hiện có và có sự thay đổi về giá thành (**Bảng 48**).

Kết quả nghiên cứu cho thấy việc thay thế đường kính và đường nha bằng đường FOS ở mức độ dưới 500 g/ kg trong sản xuất kẹo cứng hầu như không cần thay đổi gì về thiết bị và quy trình công nghệ đã được xác định (**Hình 40**).

Bảng 48. Ảnh hưởng của đường FOS bổ sung đến quá trình sản xuất kẹo cứng.

Lượng đường FOS bổ sung (g/ kg)	Lượng đường nha thay thế (g/ kg)	Lượng đường kính bị thay thế (g/ kg)	Khả năng thực hiện trên dây chuyền TB	Chênh lệch giá thành (đ/ kg)
100	30	14	Tốt	1306
200	60	28	Tốt	2178
300	90	42	Được	3268
400	120	56	Tạm được	4357
500	150	70	Cô lâu	5746



Hình 40. Quy trình sản xuất kẹo cứng sử dụng đường FOS

Để có được công thức thích hợp cho sản phẩm, cần khảo sát khả năng thích ứng chấp nhận của người tiêu dùng trên cơ sở thể hiện tính ưu việt của kẹo. Trong nghiên cứu này chúng tôi lựa chọn loại có giá thành ở mức chấp nhận được là loại kẹo bổ sung 200 g/ kg đường FOS. Đã phân tích so sánh thành dinh dưỡng và điểm cảm quan của sản phẩm kẹo cứng bổ sung 200 g/ kg đường FOS (Bảng 49 và 50).

Bảng 49. Thành phần của hai loại kẹo

Các chỉ tiêu	Đơn vị tính	Kẹo cứng thường	Kẹo cứng FOS
Ấm	%	6,20	6,2
Đạm	%	2,2	2,15
Béo	%	3,1	3,0
Gluxit tổng	%	80	82
Đường FOS	%	0	7,5

Bảng 50. Kết quả đánh giá cảm quan của hai loại kẹo

Theo thang điểm 10

Các chỉ tiêu	Bánh bích quy thường	Bánh bích quy FOS
Màu	9	9,5
Mùi	8,5	9
Vị	7,5	9
Hương	9	9
Trạng thái	9	9
Tổng thể	8,6	9,1

Như vậy ta thấy việc bổ sung đường FOS vào sản xuất kẹo thực tế cho kết quả rất tốt, ngoài những đặc tính có được nhờ hàm lượng đường FOS có chứa trong nó, giá trị cảm quan của kẹo còn được đánh giá rất cao bởi hương thơm, vị ngọt dịu, mát và có độ xốp. Trong số các chuyên gia của hội đồng cảm quan còn cho biết, vị ngọt mát của kẹo khi thay thế đường FOS có được là do bản chất đường FOS và hình như đường FOS còn có khả năng cải thiện vị ngọt của đường kính và các loại đường khác.

3.7.4. Nghiên cứu thử nghiệm trên cơ thể người để đánh giá giá trị của sản phẩm đường FOS.

Để xác định giá trị sinh học của đường FOS chúng tôi đã kết hợp với trung tâm dịch vụ y tế bác sỹ gia đình, 50 C Hàng Bài tiến hành thử nghiệm trên đối tượng bệnh nhân mắc bệnh đái tháo đường.

Cơ sở lựa chọn đối tượng thử: Bệnh đái tháo đường đang có xu hướng tăng lên theo thời gian và sự tăng trưởng kinh tế, đặc biệt ở các nước công nghiệp phát triển. Theo số liệu của tổ chức y tế thế giới, số người mắc bệnh đái tháo đường là 98,9 triệu/ năm 1994 và sẽ tăng lên 215 triệu/ năm 2010. Tại thành phố Hồ Chí Minh năm 1992 số bệnh nhân mắc bệnh tiểu đường chiếm 2,52% ở lứa tuổi trên 15. Cho tới nay bệnh đái tháo đường chưa có khả năng điều trị khỏi hẳn mà phải dùng thuốc và có chế độ ăn hợp lý lâu dài. Việc nghiên cứu tìm ra những thức ăn giúp cho bệnh nhân giảm bệnh mà không quá ảnh hưởng đến nhu cầu tối thiểu trong sự sống như cảm giác quá đói quá thèm ăn là cần thiết. Đường FOS cao độ của Viện Công nghiệp thực phẩm với tên thương hiệu là *Neosugar* dùng cho người bệnh đái tháo đường ăn có thể giúp họ giảm đi cảm giác thèm của ngọt và bảo đảm không ảnh hưởng đến sự tăng đường trong máu.

Phương pháp thử nghiệm: Sản phẩm thử nghiệm là đường FOS cao độ có thành phần: Đường FOS 78%, Sacaroza 13%, Glucoza 4%, Fructoza 5%, số người được thử nghiệm là 10, trong đó 3 người ở type I và 7 người ở type II. Thời gian thử nghiệm là 6 tháng (từ 10/ 2003 đến 3/ 2004). Cho bệnh nhân ăn ngày 2 lần, mỗi lần 20 ml. Giảm liều lượng thuốc hạ đường huyết từ 2 viên xuống 1 viên. Các chỉ tiêu theo dõi cho bệnh nhân là: Trọng lượng cơ thể, huyết áp và mạch, đường huyết và các triệu chứng lâm sàng khác.

Kết quả thử nghiệm: Cân nặng: 3 người type I sau 6 tháng có tăng 0,5-1 kg; 4 người type II có giảm 0,5-0,7 kg. Huyết áp và mạch không thay đổi. Đường huyết: 1 bệnh nhân đường huyết giảm từ 15 mmol/l xuống 8,8 mmol/l; 4 bệnh nhân giảm từ 2-3 mmol/l sau đợt điều trị. Cả 5 bệnh nhân trước phải dùng 2 viên Diamicron và chế độ ăn kiêng. Nhưng khi dùng đường FOS của Viện CNTP chỉ cần dùng 1 viên Diamicron.

Kết quả: Cả 10 trường hợp dùng đường FOS đều cho biết họ không thèm của ngọt, có cảm giác ăn ngon miệng, có 3 bệnh nhân cho biết tiêu hoá có tốt hơn.

Nhận xét và kiến nghị của trung tâm: Những bệnh nhân đái tháo đường ở type II khi dùng đường FOS có thể giảm thuốc hạ đường huyết từ 2 viên xuống 1 viên. Tất cả các bệnh nhân đái tháo đường sau khi ăn đường FOS đều không cảm thấy thèm của ngọt nữa. Loại đường FOS này nếu chuyển thành dạng viên nang thì thuận tiện hơn khi sử dụng.

3.8. Nghiên cứu công nghệ và thiết bị sản xuất đồ uống mới từ hạt nảy mầm từ rau và nước quả lên men có độ cồn thấp.

3.8.1. Nghiên cứu sản suất nước uống từ hạt đậu tương và đại mạch nảy mầm.

3.8.1.1. Nghiên cứu tối ưu hoá quy trình công nghệ và thiết bị nảy mầm đậu tương.

Ảnh hưởng của thời gian nảy mầm tới hàm lượng chất dinh dưỡng: Trong quá trình nảy mầm, xảy ra hàng loạt các thay đổi chất dinh dưỡng trong hạt đậu tương. Tiến hành nảy mầm đậu tương ở 30 °C. Phân tích các thành phần protein, đạm hòa tan, axit amin, glucit và lipit của hạt đậu tương trong các thời gian nảy mầm khác nhau. Kết quả phân tích được chỉ ra ở **Bảng 51**.

Bảng 51. Ảnh hưởng của thời gian nảy mầm đến hàm lượng các chất dinh dưỡng của hạt đậu tương nảy mầm.

<i>Thời gian (ngày)</i>	Hàm lượng						
Thành phần	0	1	2	3	4	5	6
Protein tổng số(%)	35,7	36,1	39,8	42,7	39,7	37,5	31,8
Đạm hòa tan (%)	11,5	11,7	15,9	21,5	19,5	17,9	14,6
Axit amin (mg/100g)	608	620	685	760	653	518	375
Lipit (%)	22,3	22,0	21,4	19,2	18,5	17,1	16,4
Gluxit (%)	24,5	23,5	22,7	21,4	20,1	19,0	18,3

Ngay sau ngày đầu tiên của quá trình nảy mầm hàm lượng các chất dự trữ trong hạt đậu tương như glucit, lipit đã bắt đầu giảm xuống. Hàm lượng các chất dự trữ này tiếp tục giảm mạnh trong những ngày tiếp theo của quá trình nảy mầm. Đến ngày thứ 6, hàm lượng lipit chỉ còn 16,4%, hàm lượng glucit còn 18,2% (so với ngày ban đầu tương ứng là 22,3% và 24,5%). Trong khi đó, hàm lượng protein tổng số, đạm hòa tan và các axit amin tăng lên đáng kể trong 3 ngày đầu của quá trình nảy mầm. Trong hạt đậu tương khi chưa nảy mầm hàm lượng protein tổng số chỉ đạt 35,7% nhưng sau khi nảy mầm được 3 ngày hàm lượng này tăng lên đến 42,7%. Tương tự hàm lượng đạm hòa tan tăng từ 11,5% lên 21,5% và axit amin tăng từ 608 lên 760 mg/ 100g.

- Hệ enzym α xúc tác phân giải glucit thành các monosacarit, disacarit và oligosacarit, còn hệ enzym lipaza thủy phân lipit thành glyxerin và axit béo dẫn đến hàm lượng glucit và lipit giảm mạnh trong toàn bộ quá trình nảy mầm.

Chính vì lẽ đó, để thu được hàm lượng protein, đạm hòa tan cũng như axit amin của hạt đậu tương nảy mầm một cách tối đa thì cần dừng quá trình nảy mầm sau thời gian là 3 ngày.

Xác định nhiệt độ thích hợp cho quá trình nảy mầm: Mặc dù thành phần các chất dinh dưỡng trong hạt đậu tương biến đổi mạnh theo thời gian nhưng nhiệt độ lại là nhân tố quyết định đến tốc độ của quá trình nảy mầm và do đó ảnh hưởng lớn đến hàm lượng protein, đạm hòa tan, các axit amin.

Tiến hành xác định hàm lượng của các thành phần trên trong hạt đậu tương khi nảy mầm ở các nhiệt độ khác nhau. Yếu tố nhiệt độ có ảnh hưởng lớn đến 3 thành phần là protein, đạm hòa tan và các axit amin tự do. Nhiệt độ quá cao hoặc quá thấp sẽ bất lợi đối với sự nảy mầm của đậu tương, thậm chí khi quan sát ở nhiệt độ 10 °C nhận thấy hạt không nảy mầm.

Bảng 52. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới thành phần dinh dưỡng của đậu tương trong quá trình nảy mầm.

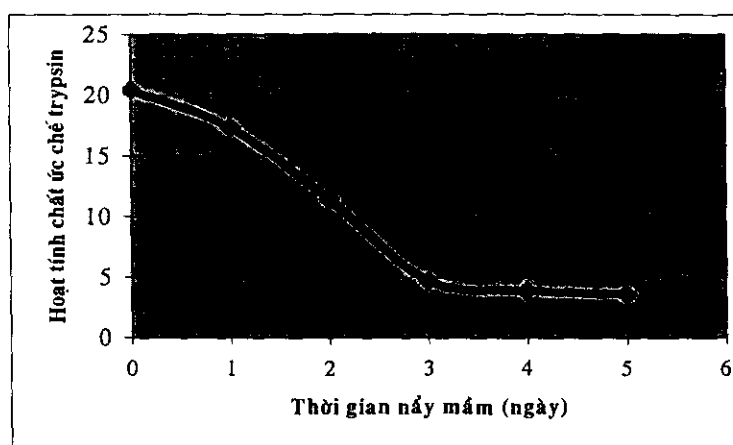
Nhiệt độ (°C)	Protein (%)	Axit amin tự do (mg/ 100 gr)	Đạm hòa tan (%)
10	35,7	625	11,9
15	37,0	658	15,5
20	40,4	687	19,3
25	45,8	854	22,7
30	42,7	760	21,5
35	38,0	748	18,1

Ở nhiệt độ 15 °C và 35 °C quá trình nảy mầm diễn ra chậm hàm lượng protein tương ứng chỉ đạt 37,0% và 38,0% trong khi đó ở nhiệt độ 25 °C hàm lượng này đạt tới 45,8%. Điều kiện thích hợp cho quá trình nảy mầm đậu tương là 25 °C trong 3 ngày.

3.8.1.2. Sử dụng enzym đậu tương nảy mầm để khử thành phần phản dinh dưỡng

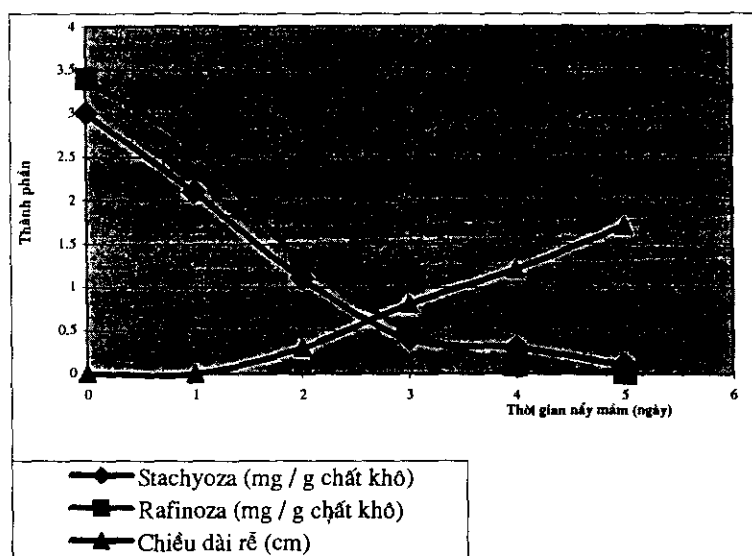
Sự thay đổi của thành phần ức chế trypsin trong quá trình nảy mầm: Mặc dù đậu tương có hàm lượng các chất dinh dưỡng cao nhất trong các loại ngũ cốc và cao hơn nhiều sản phẩm động vật khác như thịt, trứng, sữa nhưng việc sử dụng chúng lại bị thu hẹp do trong đậu tương có một lượng chất ức chế trypsin. Tác dụng kìm hãm của các chất ức chế trypsin là do chất này liên kết với trypsin tạo thành một hợp chất bền

vững không thuận nghịch. Có khá nhiều phương pháp làm giảm hàm lượng chất ức chế trypsin trong hạt đậu tương như biến hình bằng phương pháp xử lý nhiệt và thay đổi pH, thủy phân đậu tương bằng enzym proteaza, nảy mầm đậu tương. Nảy mầm đậu tương làm hoạt hoá các enzym hạt nảy mầm được xem là biện pháp có nhiều ưu điểm do ngoài việc nâng cao hàm lượng protein hòa tan, hàm lượng axit amin tự do, tổng hợp các vitamin E, A, C, D dẫn đến hàm lượng các chất phản dinh dưỡng cũng được giảm nhiều (**Hình 41**).



Hình 41. Sự thay đổi hàm lượng chất ức chế trypsin trong quá trình nảy mầm.

Sau 3 ngày, hàm lượng này vẫn tiếp tục giảm nhưng không đáng kể, cho đến ngày thứ 5 của quá trình nảy mầm chỉ số này còn lại là 3,6 IU/ g. Sử dụng đậu tương còn bị hạn chế do sự có mặt của các chất khó tiêu hóa như stachyoza, rafinoza. Stachyoza là một tetrasacarit và rafinoza là một trisacarit được đặc trưng bởi mối liên kết α -galactozid. Khi tiêu hóa, mối liên kết này không bị thủy phân vì trong ruột người không có enzym α -galactosidaza. Do vậy khi chúng ta ăn đậu tương hoặc sử dụng các sản phẩm thực phẩm có nguồn gốc đậu tương hay bị đầy hơi. Loại bỏ stachyoza và rafinoza không những nâng cao được khả năng tiêu hóa của những sản phẩm thực phẩm có nguồn gốc từ đậu tương mà còn làm tăng khả năng đáp ứng của đậu tương đối với nhu cầu sử dụng của con người. Nảy mầm đậu tương được xem là một trong những giải pháp làm giảm hàm lượng stachyoza và rafinoza xuống mức thấp nhất. Tiến hành phân tích các thành phần stachyoza và rafinoza cũng như chiều dài rễ của đậu tương trong quá trình nảy mầm. Kết quả thí nghiệm được trình bày (**Hình 42**).



Hình 42. Sự thay đổi thành phần stachyoza, rafinoza và chiều dài rễ đậu tương trong quá trình nảy mầm

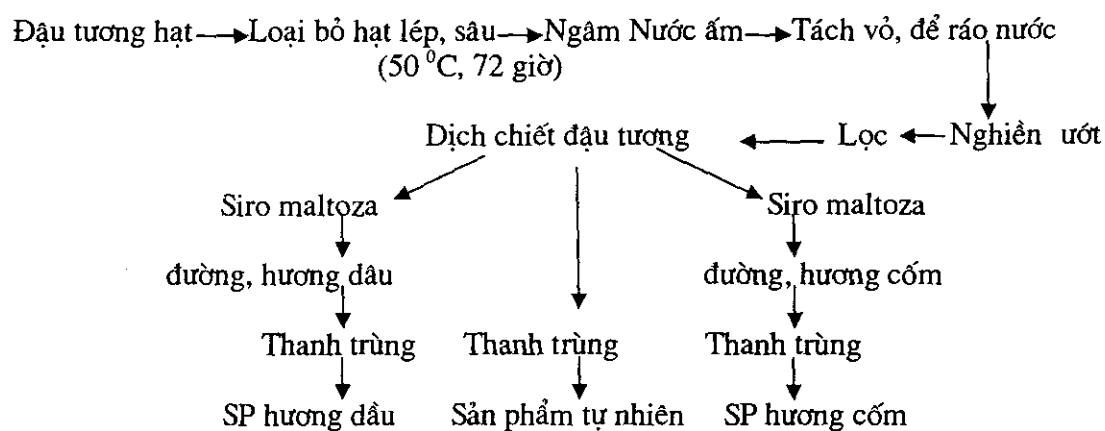
Tuy nhiên sau 5 ngày nảy mầm rễ của đậu tương lúc này dài đến 1,7 cm. Đây là nguyên nhân làm cho các thành phần như đạm hòa tan, đạm tổng và đạm amin tự do giảm mạnh do việc tiêu thụ đạm mạnh mẽ để hình thành cây non.

Chính vì vậy, để thu được thành phần dinh dưỡng của đậu tương đạt giá trị cao nhất đồng thời giảm đến tối thiểu các chất phản dinh dưỡng (chất ức chế trypsin, stachyoza và rafinoza) chúng tôi lựa chọn thời gian nảy mầm là 3 ngày.

3.8.1.3. Nghiên cứu công nghệ sử dụng enzym để sản xuất nước uống từ đậu tương nảy mầm ở quy mô thực nghiệm.

Xây dựng quy trình công nghệ: Nhằm mục đích sản xuất nước uống mới có giá trị dinh dưỡng cao, bằng phương pháp nghiền ướt, lọc và phối chế chúng tôi đã tạo được nước uống từ đậu tương nảy mầm. Để tăng giá trị dinh dưỡng cũng như đa dạng hóa sản phẩm, chúng tôi tiến hành bổ sung sacaroza vào dịch sữa sau khi nghiền, bổ sung hương hoa quả, siro maltoza... Quy trình sản xuất nước uống từ đậu tương nảy mầm đã được mô tả (Hình 43).

Nghiên cứu công nghệ thanh trùng nước uống đậu tương nảy mầm: Thanh trùng nước uống là công đoạn có ý nghĩa rất quan trọng trong bảo quản và phân phối sản phẩm vì sản phẩm nếu có thời hạn sử dụng kéo dài sẽ làm tăng thời gian lưu hành và tiêu thụ sản phẩm trên thị trường. Tiến hành thanh trùng sản phẩm ở các chế độ nhiệt và xác định quy trình công nghệ:



Hình 43. Quy trình công nghệ sản xuất nước uống từ đậu tương nảy mầm.

Bảng 53. Ảnh hưởng của chế độ thanh trùng đến chất lượng sản phẩm.

Nhiệt độ (°C)	Áp suất (kG/cm ²)	Thời gian (phút)	Chất lượng sản phẩm	
			Kết tủa (%)	Tốt (%)
105	0	10	56	44
		15	43	57
		20	41	49
110	0,5	10	45	55
		15	38	62
		20	37	63
114	0,7	10	28	72
		15	25	75
		20	20	80
121	1,0	10	7	93
		15	0	100
		20	0	100

Kết quả bảng 53 cho thấy khi thanh trùng ở cùng nhiệt độ nếu thời gian kéo dài thì sản phẩm thu được có chất lượng tốt hơn. Mặt khác với cùng một thời gian thanh trùng khi nhiệt độ càng cao thì chất lượng sản phẩm thu được cũng tốt hơn. Tuy nhiên

khi nhiệt độ quá cao, thời gian kéo dài sẽ ảnh hưởng đến chất lượng cảm quan của sản phẩm. Qua đó chúng tôi lựa chọn được chế độ thanh trùng là 121°C / thời gian 15 phút.

Đánh giá chất lượng và sơ bộ tính giá thành sản phẩm ở quy mô thực nghiệm:

Sản xuất nước uống từ đậu tương nảy mầm ở quy mô thực nghiệm. Sản phẩm sau quá trình sản xuất được đánh giá cảm quan cũng như phân tích các thành phần dinh dưỡng (**Bảng 54**).

Bảng 54. Thành phần dinh dưỡng của nước uống đậu tương nảy mầm tự nhiên và hương hoa quả

Thành phần	Nước uống đậu tương nảy mầm		
	Hương tự nhiên	Hương sữa cốm	Hương dâu
Màu sắc	Trắng đục	Trắng đục	Hồng nhạt
Mùi	Thơm đặc trưng, không ngái	Thơm đậm, mùi sữa và cốm đặc trưng	Thơm mát mùi dâu tươi
Vị	Ngọt mát	Ngọt mát	Ngọt mát
Năng lượng (kcal/200ml)	138	138	138
Protein (%)	3,6	3,6	3,6
Lipit (%)	1,67	1,67	1,67
Maltoza (%)	38	38	38
Sacaroza (%)	42	42	42
Glucosa (%)	25	25	25
Stachyoza (mg/l)	0,05	0,05	0,05
Rafinoza (mg/l)	0,04	0,04	0,04
I-Trypsin (IU/l)	0,39	0,39	0,39

Kết quả bảng 54 cho thấy sản phẩm nước uống từ đậu tương nảy mầm là sản phẩm có giá trị dinh dưỡng và sinh học cao. Bên cạnh đó sản phẩm cũng có màu sắc, hương vị hấp dẫn mang lại cảm giác thú vị cho người uống.

Sản xuất đồ uống mới từ đậu tương nảy mầm ở quy mô thực nghiệm chúng tôi đã sơ bộ tính toán giá thành sản phẩm (**Bảng 55**).

Bảng 55. Sơ bộ tính toán giá thành cho 1000 lít nước uống đậu tương nẩy mầm

TT	Hạng mục	Đơn vị	Số lượng	Đơn giá (đ)	Thành tiền (đ)
1	Đậu tương	kg	100	5.500	550.000
2	Đường kính	kg	80	6.300	504.000
3	Siro maltoza	kg	20	5.500	110.000
4	Hương liệu				20.000
5	Điện	kw	70	910	63.700
6	Nước	m ³	4	5.000	20.000
7	Hơi				20.000
8	Nhân công	công	24	15.000	360.000
9	Chi khác				30.000
10	Tổng cộng				1.648.000
Giá thành cho 1 lít sản phẩm					1.648

Rõ ràng với giá thành như đã sơ bộ tính toán ở trên thì sản phẩm đồ uống mới đậu tương nẩy mầm rất thích hợp với thị trường nội địa và đáp ứng được phần lớn về nhu cầu nước giải khát. Đồng thời với công nghệ không đòi hỏi những thiết bị phức tạp và hiện đại thì đây chính là công nghệ mang tính khả thi cao, có thể áp dụng được cho các xí nghiệp sản xuất có quy mô vừa và nhỏ.

Đồ uống mới từ đại mạch nẩy mầm: Để nâng cao hiệu suất trích ly cũng như chất lượng dịch đường chúng tôi sử dụng chế phẩm enzym Ceremix của hãng NOVO Đan Mạch. Đây là hỗn hợp của các enzym α -amilaza, β -glucanaza và proteaza nên rất phù hợp cho quy trình đường hóa với nguyên liệu bao gồm cả gạo và đại mạch.

Hai mẫu sử dụng 20% và 30% đại mạch khi có sự hỗ trợ của enzym Ceremix thu được kết quả về hàm lượng đạm amin, hàm lượng đường khử và hiệu suất trích ly xấp xỉ mẫu đối chứng. Tuy nhiên khi dùng đại mạch với tỷ lệ lớn sẽ nâng cao hiệu quả kinh tế nên chúng tôi lựa chọn tỷ lệ đại mạch sử dụng là 30%.

3.8.1.4. Xác định các yếu tố tối ưu về công nghệ và thiết bị cho quá trình lên men

Lựa chọn thành phần dịch quả bổ sung vào dịch đường lên men: Tập đoàn cây ăn quả ở nước ta rất phong phú với trên 29 họ và trên 129 loài thực vật với hàng trăm giống gồm cây ăn quả nhiệt đới (chuối, dứa, xoài, đu đủ), cây ăn quả á nhiệt đới (cam, quýt, vải) và cây ăn quả ôn đới (lê, mơ, mận). Các loại quả tươi trên thị trường

hiện nay rất đa dạng. Để lựa chọn được loại dịch quả bổ sung vào dịch đường lên men chúng tôi tiến hành phân tích thành phần một số loại quả hay được sử dụng trong sản xuất nước giải khát (**Bảng 56**).

Bảng 56. Thành phần dinh dưỡng một số loại quả

T T	Loại quả	Năng lượng (Kcal)	Thành phần chính (g/ 100 g)					
			Nước	Protein	Lipit	Gluxid	Xenluloza	Tro
1	Mận	20	93,6	0,6	0,2	4,2	0,7	0,5
2	Mơ	46	87,5	0,9	-	10,1	0,8	0,7
3	Dâu	27	92,0	0,6	-	7,0	-	0,4
4	Cam	37	88,3	0,9	-	8,9	1,4	0,5
5	Vải	43	88,2	0,7	-	9,4	1,1	0,4

Kết quả cho thấy trong 5 loại quả tươi tiến hành phân tích quả mơ được xem là loại quả có giá trị dinh dưỡng cao nhất.

Tuyển chọn chủng nấm men: Chọn chủng thích hợp cho quá trình lên men dịch đường (được sản xuất từ đại mạch nảy mầm, gạo, đại mạch) có bổ sung sirô mơ. Từ bộ sưu tập giống của Bộ môn Thực phẩm và Dinh dưỡng, Viện Công nghiệp thực phẩm, chúng tôi đã sơ tuyển được 3 chủng YCFD₁₁, YCFD₂₄ và YCFD₂₉ (Bảng 57).

Bảng 57. Hoạt lực lên men của các chủng nấm men trong bình Einhorn

Thời gian (phút) Chủng giống	Lượng CO ₂ tạo ra (ml)							
	120	150	180	210	240	270	300	330
YCFD ₁₁	0,4	1,0	1,8	2,6	3,5	4,8	5,0	
YCFD ₂₄	0,0	0,4	1,1	1,7	2,5	3,3	4,1	5,0
YCFD ₂₉	0,8	1,4	2,2	3,0	4,2	5,0		

Chủng nấm men YCFD₂₉ có hoạt lực lên men tốt nhất trên môi trường thí nghiệm. Sau thời gian là 270 phút lượng CO₂ tạo ra là 5,0 ml trong khi đó các chủng YCFD₁₁ và YCFD₂₄ chỉ tạo ra được tương ứng là 4,8 ml và 3,3 ml. Khi sử dụng sirô với các tỷ lệ khác nhau thì mật độ tế bào cực đại đạt được thể hiện sự khác nhau rõ rệt. Khi sử dụng sirô thay thế với tỷ lệ cao khả năng lên men của chủng nấm men kém triệt để hơn. Tuy nhiên với tỷ lệ sử dụng là 20%, quá trình lên men diễn ra khá triệt để.

3.8.1.5. Nghiên cứu hoàn thiện sản phẩm đồ uống mới từ hạt đại mạch nảy mầm

Xây dựng quy trình công nghệ ở quy mô thực nghiệm: Sau khi xây dựng xong quy trình công nghệ chúng tôi tiến hành nghiên cứu sản xuất ở quy mô thực nghiệm và tiến hành phân tích đánh giá chất lượng sản phẩm. Đã phân tích chất lượng của sản phẩm (**Bảng 58**).

Bảng 58. Kết quả phân tích chất lượng sản phẩm đồ uống từ đại mạch

TT	Chỉ tiêu	Đơn vị	Hàm lượng
1	Cồn	%V	2,12
2	Chất tan còn lại	%m	7,21
3	Chất tan ban đầu	%m	11,97
4	Đường khử	g/l	9,1
5	Đạm amin	mg/l	50,4
6	Đạm tổng	mg/l	324,2
7	Diaxetyl	mg/l	0,16
8	Axetaldehit	mg/l	9,2
9	Etylaxetat	mg/l	16,9
10	isoxetat	mg/l	0,5
11	n-propanol	mg/l	17,8
12	isobutanol	mg/l	16,7
13	ncol	mg/l	98,5
14	Điểm cảm quan	17,6	

Kết quả sơ bộ cho thấy giá thành sản phẩm hoàn toàn có khả năng áp dụng để sản xuất đồ uống mới có độ cồn thấp từ đại mạch nảy mầm ở quy mô vừa và nhỏ. Đây là thành công ban đầu để tạo ra đồ uống mới nhằm đa dạng hóa sản phẩm đồng thời tận dụng được nguyên liệu trong nước đặc biệt là đại mạch trồng tại các tỉnh miền núi phía bắc nhằm tận dụng quỹ đất và góp phần vào công cuộc xoá đói giảm nghèo.

Bảng 59. Chi phí cho sản xuất 1.000 lít đồ uống từ hạt đại mạch

TT	Nguyên liệu	Đơn giá	Số lượng	Thành tiền
1	Malt (kg)	6.800	60	408.000
2	Gạo (kg)	2.800	45	126.000
3	Đại mạch Việt Nam (kg)	3.000	45	135.000
4	Siro mơ (kg)	5.000	20	100.000
5	Enzym các loại			20.000
6	Điện (kw)	600/lít		600.000
7	Nước (m ³)	6.500/m ³	15	97.500
8	Bột trợ lọc (kg)	10.000	1,8	18.000
9	Tổng số			1.504.000
10	Bình quân cho 1 lít sản phẩm			1.504
(Một nghìn không trăm linh bốn đồng)				

3.8.2. Nghiên cứu sản xuất nước uống từ hỗn hợp rau để tạo ra đồ uống mới giàu dinh dưỡng vitamin và muối khoáng.

3.8.2.1. Tối ưu hoá quá trình thu nhận dịch chiết nước rau bằng công nghệ enzym:

Enzym thuỷ phân thành tế bào thực vật làm khâu ép dễ dàng hơn. Nhờ đó hiệu suất dịch trích ly tăng lên. Thí nghiệm sử dụng enzym tiến hành với củ cải và cà rốt. Nồng độ enzym thí nghiệm là 0,03%; 0,05%; 0,075% với cà rốt và 0,02%; 0,04%; 0,06% với củ cải. Thời gian thuỷ phân với cả 2 nguyên liệu là 30, 60, 90 và 120 phút. Nhiệt độ thuỷ phân là 45 °C được khuyến cáo là tốt nhất. Kết quả đã tăng hiệu suất thu hồi dịch chiết từ 2% đến 5% (**Bảng 60**)

Bảng 60. Hiệu suất thu hồi dịch ép cà rốt

Thời gian thuỷ phân (phút)	Nồng độ enzym (%)		
	0,03	0,05	0,075
30	49,0	49,5	50,5
60	50,0	50,5	51,0
90	50,7	50,5	51,5
120	51,2	51,5	51,0
Đối chứng chỉ đạt 46,5%			

Bảng 60 cho thấy nồng độ enzym phù hợp nhất cho cà rốt là 0,03-0,05%, thời gian 60 phút. Mặc dù có thể thu hồi dịch ép với hiệu suất cao hơn nhưng thời gian kéo quá dài, không kinh tế. So sánh với đối chứng, hiệu suất dịch ép khi sử dụng enzym tăng khoảng 4-5%. Tương tự ép cà rốt, nồng độ enzym phù hợp cho ép củ cải là 0,04-0,06%, thời gian tác dụng của enzym là 60 phút. So sánh với đối chứng, hiệu suất dịch ép tăng khoảng 6% (**Bảng 61**).

Bảng 61 Hiệu suất thu hồi dịch ép củ cải (%)

Thời gian thủy phân (phút)	Nồng độ enzym (%)		
	0,02	0,04	0,06
30	76,0	76,0	76,5
60	76,5	79,0	79,0
90	79,5	81,5	81,0
120	80,0	79,5	81,0
Đối chứng chỉ đạt 73%			

3.8.2.2. Nghiên cứu hoàn thiện công nghệ và sản phẩm đồ uống từ rau

Nghiên cứu lựa chọn các loại rau: Dựa trên thành phần dinh dưỡng, tính chất cũng như mùi vị của các loại rau, thí nghiệm đã chọn ra 3 loại rau chủ yếu là cà chua, cà rốt và cần tây. Ngoài ra còn phối hợp thêm các loại rau khác: Xà lách, cải trắng, rau dền, cải soong, rau muống, rau ngót, giá đỗ, cải xanh...

Làm sạch rau: Rau xanh trước khi sử dụng phải nhặt hết lá úa thối và rác lẫn trong rau. Với một số loại phải cắt rễ (rau cải, cà rốt, cần tây). Việc này cần làm để loại bỏ mùi vị không mong muốn cũng như tránh nguy cơ dẫn đến hư hỏng sản phẩm.

Sau khi nhặt sạch, ngâm rau để loại bỏ đất, cát, sau khi rửa sạch để rau ráo nước.. Kết quả cho thấy thời gian ngâm rửa kéo dài làm thất thoát nhiều vitamin C, nhất là đối với các loại rau dễ bị dập nát.

Chần rau: Chần rau để phá hủy enzym và diệt vi sinh vật là những nguyên nhân gây biến đổi chất lượng và hư hỏng sản phẩm. Ngoài ra chần rau còn thu nhỏ khối lượng để ép. Nước chần rau phải là nước sạch và sôi. Khi chần, đậy kín nồi để hạn chế bay hơi, giảm thất thoát vitamin C, B (**Bảng 62**).

Bảng 62. Thất thoát Vitamin C khi chần rau

Loại rau	Vitamin C (% so với nguyên liệu ban đầu)	
	Còn lại	Bị mất
Cà chua	71	29
Cà rốt	75	25
Cải xanh	71	29
Củ cải	75	25
Cần tây	73	27
Rau muống	71	29
Xà lách	68	32
Chân vịt (cải xôi)	65	35

Bảng 63. Kết quả thu hồi dịch ép rau (tính cho 1 kg nguyên liệu)

Loại rau	Có chân	
	Độ khô (%)	Dịch thu hồi (ml)
Cà chua	2	360
Cà rốt	5	460
Rau dền	2	620
Cải xanh	3	750
Củ cải	4,5	730
Cần tây	2,2	450
Rau muống	3,2	560
Xà lách	3,0	680
Chân vịt (cải xôi)	3,0	780

Ép: Trong thí nghiệm rau được ép bằng kích ép. **Bảng 63** cho thấy nồng độ chất khô hoà tan của dịch ép các loại rau khác nhau. Nhìn chung dịch ép có nồng độ chất khô thu được khoảng 3%.

Cô đặc dịch ép rau: Để chủ động trong sản xuất và hạ giá thành sản phẩm lúc trái vụ, nước rau nên cô đặc trong nồi cô chân không để hạn chế sự oxy hoá chất màu và vitamin.

Phối trộn: Nước uống phải có nồng độ chất khô ít nhất 5-6%. Mặt khác, để đảm bảo màu sắc và hương vị đặc trưng của nước uống từ rau, cần phải xem xét kỹ tỉ lệ của ba loại rau chủ yếu là *cà chua, cà rốt và cần tây*.

Nghiên cứu sử dụng chất phụ gia: NaCl: Đặc biệt vào mùa hè, mồ hôi ra nhiều cơ thể dễ bị mất muối. Để cân bằng điện giải, muối cần được bổ sung vào nước uống. Tuy nhiên khẩu vị mặn nhạt còn phụ thuộc vào từng người. Dựa trên cơ sở đó thí nghiệm đã chọn và bổ sung thêm muối với nồng độ 9 g/l. Ngoài muối ăn, thí nghiệm cần bổ sung đường sacaroza vào nước uống tạo vị hài hoà. Thí nghiệm đã tiến hành chọn 3 nồng độ: 8, 12 và 15 g/l. Qua đánh giá cảm quan đã lựa chọn được nồng độ 12 g/l là thích hợp nhất. Trong thành phần nước uống giải khát không thể thiếu axit xitric để tạo vị chua nhẹ, thí nghiệm đã chọn nồng độ 0,6 g/l là nồng độ dễ chấp nhận nhất trong số 3 nồng độ đã thí nghiệm là 0,4; 0,6; 0,8 g/l. Do trong quá trình công nghệ vitamin C bị thất thoát qua nhiều công đoạn, cần bổ sung lượng vitamin C nhiều hoặc ít tùy theo yêu cầu của người sử dụng. Thí nghiệm đã bổ sung 600 mg/l.

Đồng hoá: Nước rau sau khi cô đặc được tiến hành đồng hoá. Quá trình đồng hoá sẽ làm sản phẩm đồng nhất, mịn, tạo cảm giác đặc sánh hơn. Thí nghiệm theo dõi độ bền đồng hoá cho thấy ngay cả sau 3 tháng bảo quản lượng tách pha tuy có xảy ra nhưng không rõ. Như vậy so với tiêu chuẩn ngành Rau quả Việt Nam thì nước uống rau hỗn hợp hoàn toàn đạt yêu cầu.

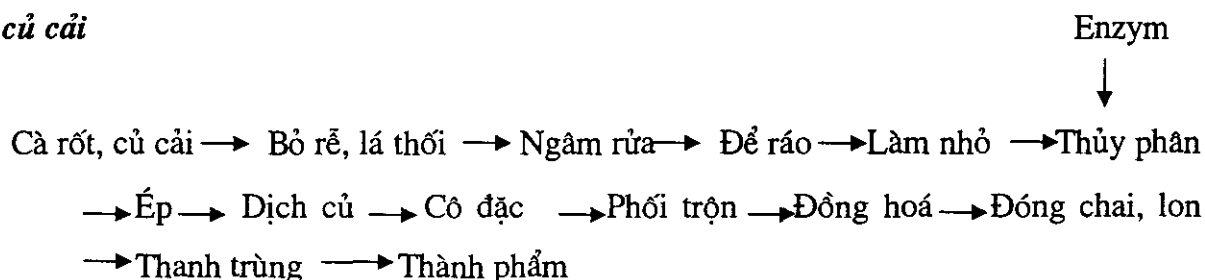
Thanh trùng và bảo quản: Nước rau được đóng trong chai thuỷ tinh, lon nhựa và lon nhôm. Tiến hành thanh trùng, theo dõi sau 3 và 6 tháng ở nhiệt độ phòng, bảo quản trong tủ lạnh (10°C) thấy đạt tiêu chuẩn vệ sinh. Có phiếu kết quả phân tích kèm theo. Các loại vi khuẩn chỉ định (*E. coli*, *Cl. perfringens*) đều không có.

Đánh giá cảm quan: Theo trình bày ở trên, đề tài đã lựa chọn được công thức nước uống rau cơ bản (cà chua, cà rốt, cần tây), 3 công thức cho mùa hè và 3 công thức cho mùa đông. Để đánh giá cảm quan thí nghiệm đã tiến hành so sánh mẫu số 1 (kí hiệu H₁) với mẫu nước rau của Mỹ (kí hiệu M). Dùng phép thử so sánh cặp đôi đánh giá các chỉ tiêu: màu sắc, hương, vị, độ mịn, nhờ thang điểm từ 1 đến 9. Số thành viên nếm thử là 7 (**Bảng 64**).

Bảng 64. Điểm cảm quan về màu sắc của 2 mẫu sản phẩm

Thành viên	Mẫu		Khác nhau
	H ₁	M	d = H ₁ – M
1	8	6	2
2	7	7,7	- 0,7
3	6	7	- 1
4	6,6	7,5	- 0,9
5	8	7	1
6	6	8	- 2
7	7	6	1
Tổng	48,6	49,2	- 0,6
Trung bình	6,9	7,02	- 0,85

Hình 44 . Quy trình công nghệ dùng enzym trong sản xuất nước uống từ cà rốt và củ cải



3.8.3. Nghiên cứu sản xuất nước quả lên men có độ cồn thấp.

3.8.3.1. Nghiên cứu quá trình lên men dịch quả đã xử lý bằng enzym.

Từ mười bốn chủng nấm men rượu của Suu tập giống Vi sinh vật công nghiệp, Viện Công nghiệp thực phẩm, Suu tập nấm men Lallemand Canada và nấm men suu tầm từ vùng sản xuất cider Australia, đã nghiên cứu sàng lọc, loại bỏ các chủng giống không đáp ứng các đặc tính của nấm men cider về khả năng lên men nhanh trên môi trường dịch quả Việt Nam, có pH thấp, khả năng chống chịu SO₂, lên men dưới áp suất của CO₂, lắng trong và lên men tạo hương thơm. Hai chủng nấm men LE1 và LE2 được đánh giá là hai chủng nấm men tốt nhất có khả năng lên men tạo sản phẩm cider với các chỉ tiêu lý hoá nằm trong khoảng tiêu chuẩn của các loại cider trên thế giới (Bảng 64). Chủng nấm men LE1 lên men rượu *S. cerevisiae* Y-7028 của Suu tập giống vi sinh vật công nghiệp, Viện Công nghiệp thực phẩm và chủng nấm men LE2 có nguồn gốc từ vùng sản xuất cider của Australia, đã định tên thuộc loài *S. cerevisiae*.

Nghiên cứu nâng cao chất lượng nấm men cider bằng phối trộn chủng giống.

Đã xác định hỗn hợp nấm men LE1+LE2 với tỷ lệ LE1/ LE2 bằng 25/ 27 có chất lượng cao nhất và cao hơn so với chất lượng hai chủng nấm men riêng lẻ LE1 và LE2

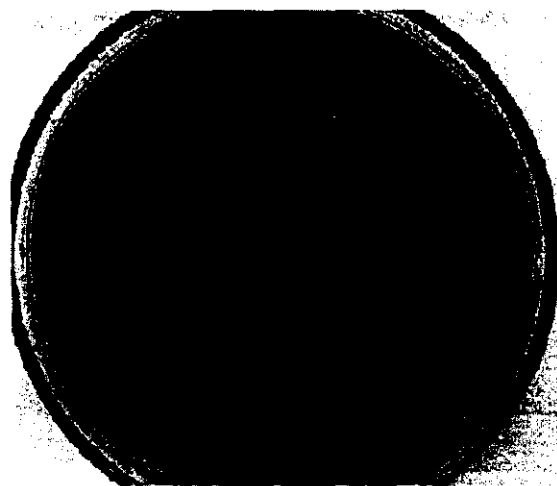
Sau đó, các thí nghiệm khảo sát biện pháp thích hợp để sấy khô chế phẩm hỗn hợp nấm men đã xác định: Biện pháp thích hợp để làm khô chế phẩm nấm men LE1+LE2 là sấy thăng hoa kết hợp hút chân không ở nhiệt độ 4 °C/ 24 giờ để tế bào nấm men LE1 và LE2 không bị vỡ do sốc lạnh và ngăn ngừa được sự tạp nhiễm của vi sinh vật có hại.

Bảng 65. Chỉ tiêu lý hoá và cảm quan của dịch lên men bởi 3 chủng nấm men LE1, LE2 và K1-V1116 [116]

Chỉ tiêu phân tích	Dịch lên men Của các chủng giống khảo sát			Các loại cider trên thế giới
	LE1	LE2	K1-V1116	
Rượu etylic(%v/v)	7,37	6,35	6,5	0,5-8,4
Đường sót (g/ l)	14,50	19,50	19,15	15,6 - 55,8
Axit tổng (g/ l)	3,20	3,53	3,67	1,40 - 5,69
Aldêhyt (mg/ l)	43	60	70	-
Etylaxetat (mg/ l)	37	23	11	15-35
Rượu metylic (%v/v)	0,00007	0,00006	0,00007	-
Propanol (mg/ l)	10	12	34	4-27
Izobutanol (mg/ l)	14	9	8	24 - 82
OD	0,489	0,089	0,902	-
Điểm cảm quan	15,26	18,12	9,28	-

Chú thích: (-) là không có số liệu.

Nâng cao chất lượng nấm men cider bằng lai tạo chủng giống: Phương pháp lai hiếm Nakatomi đã được lựa chọn để tiến hành lai tạo chủng nấm men mới từ 2 chủng nấm men bố mẹ LE1 và LE2 vì tính đơn giản, ít tốn kém và có hiệu quả cao thường được áp dụng trong lai tạo nấm men công nghiệp thực phẩm giữa một chủng nấm men đồng tản với một chủng nấm men dị tản như trường hợp chủng LE1 và LE2. Ngoài ra, khi lai hiếm Nakatomi, có xảy ra sự dung hợp nguyên sinh chất và nhân tế bào làm tổ hợp các gen mã hoá các đặc tính ưu việt từ nấm men bố và mẹ. Lai hiếm Nakatomi được tiến hành trong môi trường YPD lỏng. Sau 2 ngày lai, 2 dạng con lai H1¹ và H2¹ thu được có màu sắc khuẩn lạc trên đĩa DYE khác với khuẩn lạc nấm men bố mẹ (LE1 và LE2), khác với khuẩn lạc nấm men đơn bội LE2-8 và khuẩn lạc của thể petite LE1-r7. Chủng nấm men con lai H2¹ có khuẩn lạc xanh chóp hồng trên đĩa thạch DYE là dòng tế bào có tính di truyền ổn định hơn rất nhiều so với chủng nấm men con lai H1¹ có khuẩn lạc xanh chóp tím trên đĩa thạch DYE. Trên môi trường nhuộm màu DYE, khuẩn lạc của chủng LE15 có chóp màu hồng, thân và rìa màu xanh. Đây là sự pha trộn giữa màu xanh của nấm men LE1 và màu đỏ boocđô của nấm men LE2 (**Hình 45**).



Hình 45. Khuẩn lạc của nấm men LE1, nấm men LE2, thể đơn bội LE2-8, thể petite LE1-r7, nấm men con lai H2¹ và nấm men con lai LE15

Kiểm tra tính trạng chủng nấm men con lai H2¹.

Đã xác định khả năng tạo bào tử và phân tích giới tính bào tử của chủng nấm men con lai H2¹: Chủng H2¹ là chủng nấm men đồng tản có nang bào tử hình hoa thị chứa 4 bào tử con đặc trưng cho loài nấm men *S. cerevisiae*. Đã chọn dòng nấm men con lai H2¹. Trong số 96 dòng tế bào nấm men con lai H2¹, dòng tế bào LE15 được chọn có tốc độ lên men nhanh như chủng LE1, có khả năng sinh tổng hợp zymoxin mạnh như chủng LE2 và các đặc tính khác của nấm men cider.

Chủng nấm men con lai LE15 đã được xác định các đặc tính hình thái, sinh lý, sinh hoá như: có khả năng hô hấp bình thường, là nấm men đồng tản, có đặc tính di truyền ổn định, có khả năng đồng hoá nhiều loại đường, có hình dạng tế bào oval dài trên môi trường malt thạch giống với chủng LE1. Bào tử của chủng LE15 có dạng hoa thị đặc trưng của loài nấm men *S. cerevisiae*.

Chủng nấm men LE15 đã được sử dụng để lên men so sánh với chế phẩm hỗn hợp nấm men và 2 chủng nấm men bố mẹ LE1, LE2 (**Bảng 66**).

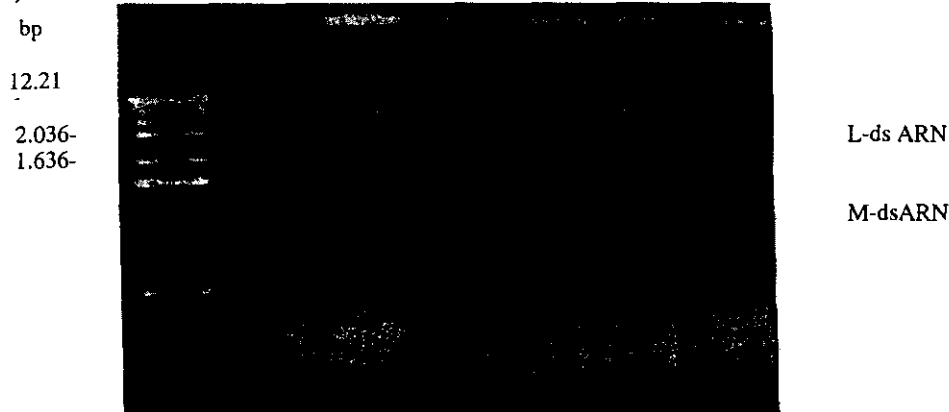
Bảng 66. So sánh chỉ tiêu hoá lý, vi sinh và cảm quan của dịch lên men của các nguồn nấm men khác nhau trên môi trường nước quả sunfit hoá

Chỉ tiêu đánh giá	Dịch lên men của các chủng giống			
	LE1	LE2	Chế phẩm LE1+LE2	Con lai LE15
Rượu etylic (% v/v)	7,37	6,35	6,8	7,14
Đường glucoza (g/l)	2,43	3,35	2,32	2,96
Đường fructoza (g/l)	16,78	11,48	18,89	16,22
Axit lactic (g/l)	4,35	2,42	3,56	3,98
Aldêhyt (mg/l)	43	60	55	50
Axeton (mg/l)	0	0	0	0
Axetat etyl (mg/l)	37	23	24	32
Rượu metylic (mg/l)	0,7	0,6	0,6	Vết
Propanol (mg/l)	10	12	10	9
Isobutanol (mg/l)	9	9	9,5	14
Rượu isoamilic (mg/l)	36	29	30	32
Nấm men đại ($\times 10^2$ tế bào/ml)	1,2	0	0	0
Vi khuẩn hiếu khí ($\times 10^2$ tế bào/ml)	0,035	1,3	0,035	0,030
Nấm mốc ($\times 10^2$ tế bào/ml)	0	0	0	0
Điểm cảm quan	15,26	18,12	18,40	19,76

Số liệu phân tích cho thấy: chất lượng cảm quan và vệ sinh an toàn của dịch lên men bởi chủng nấm men con lai LE15 cao hơn chất lượng dịch lên men bởi các nấm men còn lại. Bằng phương pháp điện di trên gel agarosa, dòng nấm men con lai LE15 đã được xác định có chứa gen sinh tổng hợp zymoxin của chủng nấm men LE2 sau quá

trình lai hiếm. *Nấm men LE2, nấm men con lai H2¹, nấm men con lai LE15, nấm men K1-V1116 và nấm men sinh tổng hợp zymoxin K2 chuẩn NCYC738.*

Đã tìm ra điểm mới: Chuyển gen sinh tổng hợp zymoxin K2 từ chủng nấm men bố mẹ sang nấm men con lai theo phương pháp lai hiếm Nakatomi có xác suất thành công rất cao khi 100% các tế bào nấm men con lai đều mang gen này M-ds ARN và L-ds ARN (*Hình 46*).

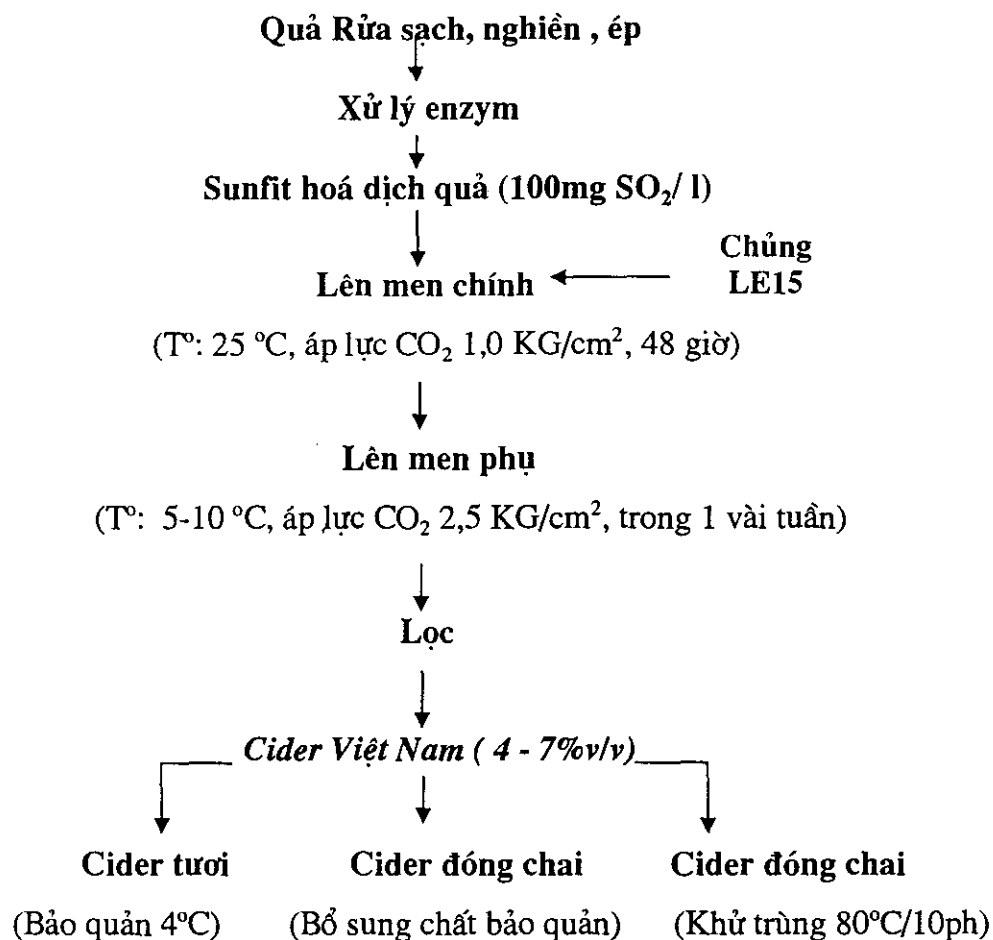


Hình 46. Các gen M-dsARN và L-dsARN của các chủng nấm men

3.8.3.2. Hoàn thiện công nghệ và thiết bị sản xuất nước quả lên men có độ cồn thấp

Bằng phương pháp phân lập, tỷ lệ vi sinh vật tạp nhiễm có sẵn trong dịch bẫy loại quả cao sản của Việt Nam đã được xác định là rất lớn ($\times 10^3$ tế bào/ ml). Đã chọn được nồng độ SO_2 dùng để sunphít hoá dịch quả với mức 100 mg/ l để diệt vi sinh vật hiệu quả, không ảnh hưởng tới màu sắc, hương vị của dịch quả và không ảnh hưởng đến tốc độ lên men của chủng LE15. Chủng LE15 được xác định có khả năng tiêu diệt 7 chủng nấm men chống chịu SO_2 với nồng độ 100 mg/ l thuộc về 4 loài nấm men có sẵn trong dịch quả nhưng không có khả năng tiêu diệt các chủng vi khuẩn và nấm mốc còn sót lại trong dịch quả sunphít hoá.

Đã xác định các thông số thích hợp cho xây dựng quy trình công nghệ thích hợp để sản xuất cider Việt Nam theo phương pháp hiện đại quy mô công nghiệp đã được xây dựng với các thông số thích hợp để hạn chế sự tạp nhiễm của các vi sinh vật tạp nhiễm, thuận lợi cho sự phát triển và sinh tổng hợp zymoxin của chủng nấm men LE15 trong quá trình lên men cider (*Hình 47*).



Hình 47. Quy trình công nghệ sản xuất nước quả lên men có độ cồn thấp

3.8.3.3. Nghiên cứu bảo quản sản phẩm.

Chất bảo quản được sử dụng bao gồm SO_2 và benzoat natri là những chất bảo quản thông dụng thường được sử dụng trong bảo quản cider và rượu vang. Thời gian kiểm tra mẫu vào 3,6 và 12 tháng sau khi đóng chai cider (**Bảng 67**).

Đã chọn được nồng độ SO_2 dùng để sunphít hoá dịch quả với mức 100 mg/ l để diệt vi sinh vật hiệu quả, không ảnh hưởng tới màu sắc, hương vị của dịch quả và không ảnh hưởng đến tốc độ lên men của chủng LE15. Chủng LE15 được xác định có khả năng tiêu diệt 7 chủng nấm men chống chịu SO_2 với nồng độ 100 mg/ l thuộc về 4 loài nấm men có sẵn trong dịch quả nhưng không có khả năng tiêu diệt các chủng vi khuẩn và nấm mốc còn sót lại trong dịch quả sunphít hoá. Benzoat natri và SO_2 được bổ sung vào mẫu cider lần lượt với các nồng độ: Benzoat natri: 0%; 0,05%; 0,1%; 0,15%; 0,20%. SO_2 : 0 ppm; 100 ppm; 150 ppm; 200 ppm; 250 ppm; và 300 ppm. Kết quả đánh giá cảm quan của sản phẩm sau 6 tháng. Chúng tôi đã lựa chọn nồng độ bảo quản bằng benzoat natri đạt tỷ lệ 0,1% (**Bảng 68 và 69**). Chúng tôi chọn nồng độ SO_2 200 ppm đủ đảm bảo không thay đổi hương vị của sản phẩm trong thời gian bảo quản là 12 tháng.

Bảng 67. Sự biến đổi chất lượng sản phẩm của mẫu cider không bổ sung SO₂ và benzoat natri.

Mẫu bảo quản	Độ chua a.axetic (g/l)	Đường sót (g/l)	Côn (%v/v)	OD	Cảm quan
Chưa bảo quản	3,2	16	5,5	0,46	Thơm ngon, chua dịu, cồn nhẹ
Sau 3 tháng			0,5	1,227	Thơm ngon, chua dịu, cồn nhẹ
Sau 6 tháng	10,3	2,5			Mùi chua, đục, vị chua gắt, có váng mỏng
Sau 12 tháng	7,5	0,25	0	1,655	Mùi hôi, rất đục, có váng dày trên bề mặt

Bảng 68. Đánh giá cảm quan sản phẩm bảo quản bằng benzoat natri

Đánh giá cảm quan		Mẫu				
		Tỷ lệ của benzoat natri trong mẫu (%)				
		0	0,05	0,1	0,15	0,2
Sau 3 tháng	3	Hôi, chua, gắt, cồn nhẹ	Thơm ít, chua, cồn nhẹ	Thơm ngon, chua dịu, cồn nhẹ	Thơm ngon, chua dịu, cồn nhẹ	Thơm ngon, chua dịu, cồn nhẹ
Sau 6 tháng	6	Hôi, chua, gắt	Không thơm, chua, cồn nhẹ	Thơm ngon, chua dịu, cồn nhẹ	Thơm ngon, chua dịu, cồn nhẹ	Thơm ngon, chua dịu, cồn nhẹ
Sau 9 tháng	9	Hôi, chua, gắt	Hôi, chua, gắt, cồn nhẹ	Thơm ngon, chua dịu, cồn nhẹ	Thơm ngon, chua dịu, cồn nhẹ	Thơm ngon, chua dịu, cồn nhẹ

Bảng 69. Đánh giá cảm quan sản phẩm bảo quản bằng SO₂

Đánh giá cảm quan	Mẫu					
	Tỷ lệ SO ₂ trong mẫu(ppm)					
	0	100	150	200	250	300
Sau 3 tháng	Hôi, chua, gắt, cồn nhẹ	Thơm ít, chua, cồn nhẹ	Thơm ít, chua, cồn nhẹ	Thơm, chua, cồn nhẹ	Hắc, chua dịu, cồn nhẹ	Hắc, chua dịu cồn nhẹ
Sau 6 tháng	Hôi, chua, gắt	Không thơm, chua, cồn nhẹ	Thơm ít, chua, cồn nhẹ	Thơm ngon, chua dịu, cồn nhẹ	Hắc, chua dịu, cồn nhẹ	Hắc chua dịu, cồn nhẹ
Sau 9 tháng	Hôi, chua gắt	Không thơm, chua, cồn nhẹ	Thơm ít, chua, cồn nhẹ	Thơm ngon, chua dịu, cồn nhẹ	Hắc, chua dịu, cồn nhẹ	Hắc, chua dịu cồn nhẹ

3.8.3.4. Xây dựng mô hình thiết bị.

Tiến hành thực nghiệm lên men cider quy mô 450 lít/ mẻ cho hỗn hợp dịch quả Việt Nam bằng chủng LE15. Sản phẩm được đóng chai thanh trùng hoặc bổ sung chất bảo quản và được dán nhãn sản phẩm thử nghiệm “Cider FIRI” để đưa ra thị trường thăm dò thị hiếu người tiêu dùng. Chỉ tiêu chất lượng các dạng sản phẩm “Cider FIRI” đã được phân tích để so sánh với chất lượng loại cider đóng chai nhãn hiệu Farnum Hill Farmhouse (Farnum Hill Ciders- New Hampshire - New York - Mỹ).

Chất lượng dịch lên men cider bằng chủng LE15 ở qui mô xưởng thực nghiệm không thay đổi so với chất lượng cider lên men bằng chủng này ở phòng thí nghiệm.

Các chỉ số hoá lý và vi sinh của cider FIRI tương đương với loại cider Farnum Hill Farmhouse thịnh hành tại Mỹ (**Bảng 70**).

Do vậy, quy trình công nghệ sản xuất cider lên men bằng chủng nấm men con lai LE15 được xây dựng ở trên được xác định có khả năng ứng dụng để sản xuất cider ở quy mô công nghiệp từ nguồn quả Việt Nam.

Bảng 70. Chỉ tiêu lý hoá và cảm quan của các mẫu cider thành phẩm

Các chỉ tiêu phân tích	Mẫu cider			
	Mẫu cider Mỹ (Farnum Hill Farmhouse)	Cider FIRI tươi	Cider FIRI đóng chai thanh trùng	Cider Việt nam bổ sung chất bảo quản
Rượu etylic (% v/v)	6,50	6,50	6,48	6,50
Đường sót (g/ l)	26,50	25,00	24,32	25,00
Axit tổng (lactic g/l)	3,62	3,00	2,88	3,42
Aldêhyt (mg/ l)	56	55	55	54
Axeton (mg/ l)	0	0	0	0
Axetat etyl (mg/ l)	25	23	24	24
Metylic (mg/ l)	Vết	Vết	Vết	Vết
Propanol (mg/ l)	14,0	12,00	11,20	12,00
Isobutanol (mg/ l)	9,02	9,2	9,0	9,0
Isoamilic (mg/ l)	25	30	29	30
Nấm men đại (x 10 ² tế bào/ml)	0	0	0	0
Vi khuẩn (x 10 ² tế bào/ ml)	0	0,030	0	0
Điểm cảm quan	16,96	19,88	16,56	19,72

3.9. Hoàn thiện công nghệ và thiết bị sản xuất tinh dầu và nhựa dầu hạt tiêu xuất khẩu có sử dụng α -amilaza (Termamyl 120L).

3.9.1. Nghiên cứu ứng dụng chế phẩm α -amilaza NOVO, Đan Mạch để phân huỷ bột trong hạt hồ tiêu nhằm nâng cao hiệu suất chưng cất.

Phân tích nguyên liệu: Đã phân tích chất lượng nguyên liệu hồ tiêu Quảng Trị có các thông số chất lượng như sau: Độ ẩm 12,0; Hàm lượng tinh bột 42,5 %; Hàm lượng tinh dầu bay hơi 2,6%; Hàm lượng nhựa 5,1%.

Vai trò của enzym α -amilaza: Để khắc phục sự kết dính nguyên liệu do tinh bột hồ hoá gây ra, dùng enzym α -amilaza để thuỷ phân tinh bột là rất cần thiết trong quá trình chưng cất tinh dầu bằng hơi nước bão hoà. Enzym α -amilaza công nghiệp có nhiều loại được sử dụng trên quy mô và mức độ khác nhau tùy thuộc nguyên liệu và điều kiện sản xuất.

Xử lý nguyên liệu: Trước khi đưa nguyên liệu vào chưng cất tinh dầu, bột tiêu xay được làm ẩm bằng 50% thể tích nước. Đo pH của dung dịch đạt điều kiện 6,4 và bổ sung một lượng enzym vào trộn đều để chưng cất ngay. Khi chưng cất tinh dầu không sử dụng enzym, khối nguyên liệu sôi cục bộ và có hiện tượng vón cục nếu đun không đều nguyên liệu bị khô và tinh dầu cất ra có mùi cháy khét. Khi sử dụng enzym tỷ lệ 0,2%, nguyên liệu sôi đều và tinh dầu ra trong suốt, không màu, hiệu suất chưng cất tăng 8,11% so với mẫu không enzym (**Bảng 71**).

Bảng 71. Ảnh hưởng của enzym α -amilaza đến hiệu suất chưng cất tinh dầu

Mẫu	Lượng enzym sử dụng (%/ nguyên liệu)	Lượng tinh dầu thu được (ml/ 100 g nguyên liệu)	Hiệu suất tinh dầu so với hàm lượng tuyệt đối (%)
1	0	2,4	90,00
2	0,1	2,5	94,31
3	0,2	2,6	98,11
4	0,5	2,6	98,11
5	1,0	2,6	98,12

Để thấy rõ hiệu quả của enzym, nước chưng được phân tích các chỉ số liên quan đến nồng độ đường tạo ra và độ nhớt của nó. Nước chưng đem phân tích là phần nước được lọc ra từ hỗn hợp nước và nguyên liệu sau khi chưng cất kết thúc. Độ khô được đo bằng đường kế và độ nhớt đo trên máy nhớt kế kiểu Engler (**Bảng 72**).

Bảng 72. Sự thay đổi tính chất của nước chung dưới tác dụng của α -amilaza

TT	Tính chất	Mẫu không dùng enzym	Mẫu dùng enzym (%)		
			0,1	0,2	0,5
1	Độ khô %	2,0	2,5	4,5	5,0
2	Hàm lượng đường khử	1,8	2,3	4,1	4,6
3	Độ nhớt	1,3	1,25	1,15	1,10

Từ bảng 72 cho thấy hàm lượng chất khô đo được trong nước chung càng tăng chứng tỏ tinh bột bị thủy phân càng nhiều và độ nhớt của nước chung giảm theo tỷ lệ tương ứng, ảnh hưởng của tinh bột bị hồ hoá đến quá trình chung cất cũng giảm theo. Tuy nhiên chỉ số được quan tâm chủ yếu trong trường hợp này là hiệu suất chung cất tinh dầu. Do đó tỷ lệ enzym cần dùng được chọn là 0,2% (**Bảng 71 và 72**).

So sánh chất lượng của tinh dầu thu được của mẫu sử dụng enzym và mẫu không dùng enzym bằng phương pháp phân tích sắc ký khí cho thấy với mẫu sử dụng enzym số cấu tử tinh dầu tăng từ 48 (sắc ký đồ số 03-D) lên 59 (sắc ký đồ số 02-D). Cấu tử số 4, Caryophylen oxit là cấu tử chính có thành phần cao nhất trong tinh dầu hồ tiêu, thuộc vùng chất thơm có nhiệt độ bay hơi thấp tăng hàm lượng từ 29,57% ở mẫu không sử dụng enzym lên 30,42% ở mẫu có sử dụng enzym. Limonen là cấu tử số 10 có hàm lượng 18,99%, tăng lên 19,2%. Cấu tử số 1 là α -Pinen tăng từ 4,17% lên 6,09%. Sự khác biệt về hàm lượng và số cấu tử được tạo ra bởi enzym có thể giải thích bằng sự phá vỡ liên kết glycosit giữa các cấu tử tinh dầu và các chất đường bột trong cấu tạo của hạt, tạo điều kiện giải phóng tinh dầu ở dạng tự do tốt hơn trong trường hợp không sử dụng enzym. Mặt khác, khối nguyên liệu trong quá trình chung cất không bị vón cục làm tăng khả năng thoát tinh dầu hơn do tăng khả năng tiếp xúc giữa tinh dầu và hơi nước. Qua kết quả phân tích có thể thấy chất lượng tinh dầu không bị ảnh hưởng bởi enzym. Đối với nhựa trích ly từ bã chung cất có sử dụng enzym cho thấy hàm lượng nhựa thu được sau khi trích ly thay đổi không đáng kể mặc dù khối lượng bã còn lại sau khi chung cất giảm đi do tinh bột trong nguyên liệu bị thủy phân thành dạng hoà tan, chứng tỏ sự thay đổi hàm lượng tinh bột trong bã chung cất không ảnh hưởng đến hiệu suất trích ly. Hàm lượng piperin trong nhựa tăng dần theo tỷ lệ sử dụng enzym (**Bảng 73**).

Bảng 73. Sự thay đổi của nhựa trích ly theo tỷ lệ sử dụng enzym

TT	Tỷ lệ enzym (%)	Khối lượng bã chung cất còn lại (% nguyên liệu)	Khối lượng nhựa thu được (% nguyên liệu)	Hàm lượng piperin trong nhựa (%)
1	0	57,8	5,04	52,6
2	0,2	43,4	5,05	54,6
3	0,4	41,8	5,14	54,8
4	0,5	40,6	5,16	54,8

3.9.2. Làm sạch bã thải trong quá trình sản xuất

Bã chung cất có sử dụng enzym được đem trích ly lấy nhựa phân tích cho thấy có những thay đổi đáng kể về hàm lượng chất chính trong nhựa, trong đó đáng kể là hàm lượng piperin tăng 2% so với mẫu không sử dụng enzym. Qua khối lượng bã chung cất thu được, một lần nữa chúng ta thấy vai trò của enzym đã thuỷ phân tinh bột và lượng chất tan này hoà tan trong nước chung làm giảm khối lượng bã từ 57,8% xuống 40,6%, giảm 17,2% so với đối chứng. Tuy vậy, những thành phần chính trong nhựa vẫn không bị biến đổi, không những thế, khối lượng nhựa thu được tăng lên và hàm lượng piperin trong nhựa cao hơn so với mẫu không sử dụng enzym. Điều này có thể giải thích bằng tác dụng của enzym làm phân huỷ tinh bột bị hồ hoá, tạo điều kiện cho dung môi trích ly (cồn) tiếp xúc với bề mặt hạt nguyên liệu tốt hơn, do đó đạt hiệu quả trích ly tốt hơn. Bảng 76 cho thấy chất lượng của nhựa thay đổi theo hướng có lợi, trong đó hàm lượng piperin và hàm lượng chất màu đều tăng, giảm tải lượng và bã thải, tăng hiệu suất thu hồi từ 5,04% lên 5,16%, nâng cao chất lượng sản phẩm, đặc biệt là hàm lượng piperin từ 52,6% lên 54,8%. Điều đó đã chứng minh ý nghĩa khoa học công nghệ, kinh tế và môi trường ứng dụng công nghệ enzym trong sản xuất tinh dầu hạt tiêu có mối quan hệ chặt chẽ với nhau và theo hướng có lợi cho sản phẩm và môi trường (**Bảng 74 và 75**).

Phân tích trên cho thấy thành phần quan trọng nhất của nhựa là piperin tăng 2%, các thành phần khác thay đổi không đáng kể. Quan sát thí nghiệm cho thấy ở mẫu dùng enzym, quá trình lọc và dịch trích ly thuận lợi hơn so với mẫu không dùng enzym, thời gian lọc mẫu ngắn hơn do độ nhớt của dịch trích ly nhỏ hơn. Đây là điểm thuận lợi về mặt công nghệ bởi trong quá trình sản xuất với quy mô lớn, dung dịch có độ nhớt nhỏ hơn sẽ dễ dàng xử lý hơn trong công nghệ, tránh tổn hao các chất hoà tan, giảm thời gian vận hành nên giảm tổn hao dung môi.

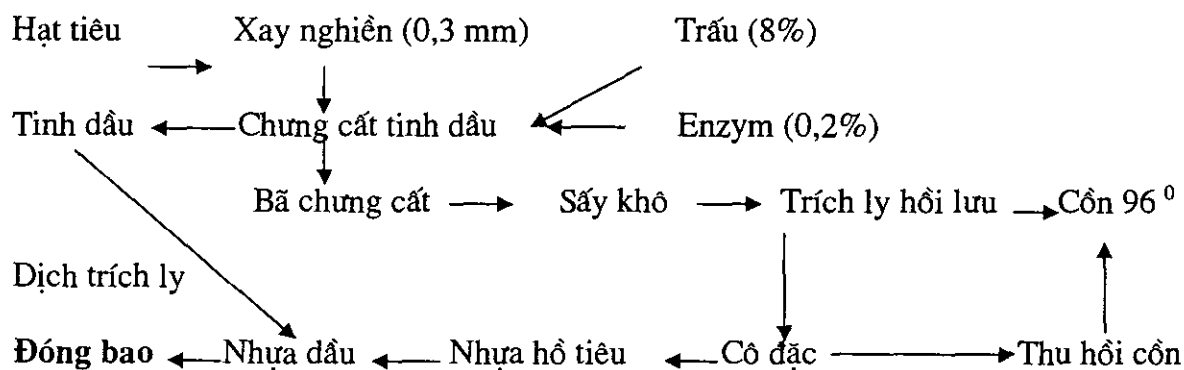
Bảng 74. So sánh chất lượng nhựa giữa mẫu dùng enzym và mẫu không dùng enzym

TT	Các thông số chính	Hàm lượng (%) và số đo	
		Nhựa của mẫu không dùng enzym	Nhựa của mẫu có dùng enzym
1	Piperin	52,6	54,6
2	Chất tan trong hexan	3,8	3,8
3	Chất bay hơi	1,8	1,8
4	Cường độ màu	0,34	0,38
5	Độ nhớt dịch trích ly	1,42	1,38

Bảng 75. Sự thay đổi hàm lượng một số cấu tử chính trong tinh dầu hồ tiêu chưng cất khi sử dụng enzym

TT	Tên cấu tử một số cấu tử chính	Hàm lượng (%)		Tăng, giảm hàm lượng (%) (2) - (1)
		Mẫu không dùng enzym (1)	Mẫu dùng enzym (2)	
1	α -Pinen	5.77	7.28	1.51
2	dl-Limonen	15.1	16.3	1.20
3	2- β -pinen	9.65	11.3	1.65
4	δ -3-Caren	23.1	22.5	(-) 0.60
5	Sabinen	3.49	6.91	3.42
7	Linalol	0.25	0.27	0.02
8	4- Terpineol	0.05	0.12	0.07
9	Caryophyllen oxit	0.33	0.48	0.15
	Spathulenol	0.01	0.17	0.16
	Glubulol	0.05	0.07	0.02

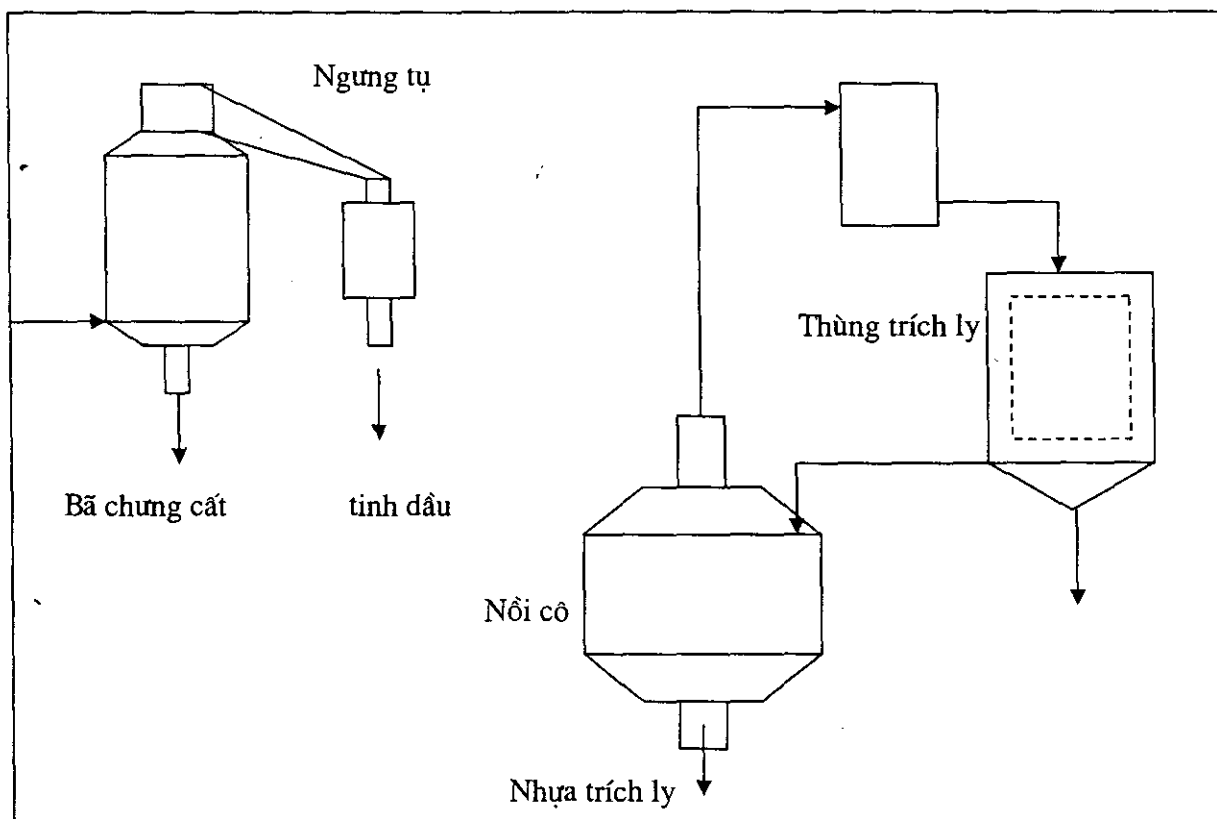
Hình 48. Sơ đồ quy trình công nghệ sản xuất nhựa dầu hồ tiêu sử dụng enzym α -amilaza



3.9.3. Thiết kế xây dựng mô hình dây chuyền công nghệ sản xuất nhựa dầu hạt tiêu xuất khẩu, đạt tiêu chuẩn chất lượng cao.

Hệ thống thiết bị chưng cất: Trên cơ sở quy trình công nghệ, hệ thống thiết bị thử nghiệm sản xuất nhựa dầu hồ tiêu được thiết kế và chế tạo theo công suất 10kg nhựa/ ngày. Về cấu tạo thiết bị theo nguyên tắc thiết bị chưng cất truyền thống bao gồm nồi chưng cất bằng hơi, một thùng ngưng tụ và bộ phân ly tinh dầu. Ở đây, thiết bị chưng cất được cải tiến để phù hợp với nguyên liệu là bột hồ tiêu xay (*Hình 49*).

Hình 49. Mô hình thiết bị quy mô xưởng thực nghiệm



Chi tiết cải tiến là bộ phận tháo bã đã chưng cất. Các thiết bị chưng cất kiểu truyền thống thường thiết kế theo các dạng: Dùng vỉ đỡ nguyên liệu, nạp và tháo nguyên liệu theo cách tháo rời nắp nồi có gắn với bộ phận vò vôi và dùng thiết kế kiểu giỏ để nạp và tháo dỡ nguyên liệu. Cả hai thiết kế trên đều phải tháo rời nắp nồi trong quá trình nạp nguyên liệu và tháo bã. Công việc này nếu thực hiện thủ công sẽ rất nặng nhọc và mất nhiều thời gian. Để thao tác an toàn và nhanh chóng, nồi chưng cất tinh dầu hồ tiêu được nghiên cứu cải tiến bộ phận tháo bã, không cần phải tháo rời phần nắp nồi chưng cất có vò vôi mà vẫn đảm bảo quy trình vận hành thích hợp.

Kết quả chưng cất và trích ly nhựa dầu hồ tiêu trên mô hình thiết bị thực nghiệm: Quá trình sản xuất thực nghiệm nhựa dầu hồ tiêu được tiến hành 3 đợt, mỗi đợt với khối lượng nguyên liệu 35- 48 kg (*Bảng 76*).

Bảng 76. Kết quả sản xuất thử nghiệm nhựa dầu hồ tiêu.

TT	Các thông số kỹ thuật	Đợt 1	Đợt 2	Đợt 3
	Công đoạn chưng cất tinh dầu			
1	Khối lượng nguyên liệu (kg)	48,5	35	42
2	Tỷ lệ enzym (% nguyên liệu)	0,2	0,2	0,2
3	Tỷ lệ trấu (%)	8,0	8,0	8,0
4	Áp lực hơi chưng cất (kg/cm ²)	2,5	2,5	2,5
5	Nhiệt độ nước ngưng (t ⁰ C)	27,5	28,0	27,0
6	Thời gian chưng cất (giờ)	10,5	8,5	10,0
7	Lượng tinh dầu thu được (ml)	1.355	1.020	1.240
	Công đoạn trích ly nhựa			
8	Chi phí dung môi cồn (lit)	180	160	180
9	Cồn thu hồi (%)	90	65	80
10	Thời gian trích ly (giờ)	4,0	4,0	4,0
11	Lượng nhựa thu được (kg)	4,8	3,2	4,1

3.9.4. Xác định hiệu quả kinh tế và chuyển giao công nghệ cho doanh nghiệp tại địa phương có vùng nguyên liệu.

- Ứng dụng enzym α -amilaza thủy phân 40% tinh bột trong hạt hồ tiêu đã tăng hiệu suất thu hồi tinh dầu 8%, có thể sử dụng các chủng loại nguyên liệu thô cấp thấp, không đủ tiêu chuẩn chất lượng xuất khẩu như hạt nhỏ, hạt lép, tỷ lệ tinh dầu thấp... góp phần nâng cao hiệu quả kinh tế, xã hội.

- Tinh dầu và nhựa dầu hạt tiêu lần đầu tiên được nghiên cứu theo hướng ứng dụng công nghệ enzym thành công và là sản phẩm đầu tiên được sản xuất trên mô hình tại Viện Công nghiệp thực phẩm và sản phẩm được giới thiệu trên thị trường Việt Nam.

- Sản phẩm có chất lượng tương đương với sản phẩm cùng loại trên thị trường thế giới nên có tiềm năng xuất khẩu đồng thời nâng cao giá trị nông sản thô chưa qua chế biến. Sản phẩm đạt tiêu chuẩn tinh dầu bay hơi 5%, piperin 45%, dư lượng cồn < 2,5%.

- Đã ký hợp đồng nguyên tắc giữa đơn vị chuyển giao công nghệ là Viện Công nghiệp thực Phẩm và đơn vị nhận chuyển giao công nghệ là công ty Tấn Hưng, Tân Kiên, Bình Chánh, thành phố Hồ Chí Minh với công suất 1.000 tấn nguyên liệu/ năm.

- Đã đăng ký tham gia dự án: “Xây dựng mô hình ứng dụng KHCN phục vụ phát triển nông thôn, miền núi”, phần chế biến sau thu hoạch hồ tiêu.

3.10. Nghiên cứu ứng dụng enzym lipaza để sản xuất axit béo không no từ dầu thực vật.

3.10.1. Xử lý nguyên liệu trước khi thủy phân

Kết quả phân tích về nguyên liệu: Nguyên liệu chính được dùng để sản xuất các axit béo là dầu đậu tương tinh chế. Dầu đậu tương thô, được tinh chế theo phương pháp gián đoạn bằng kiềm đặc, tẩy màu với than và đất hoạt tính tại Viện Công nghiệp thực phẩm đạt TCVN về dầu tinh chế. Các chỉ tiêu chất lượng chủ yếu đã được xác định (Bảng 77).

Bảng 77. Chỉ tiêu chất lượng của dầu đậu tương thô và tinh chế

STT	Chỉ tiêu phân tích	Đơn vị tính	Kết quả	
			Dầu đậu tương thô	Dầu đậu tương tinh chế
1	Chỉ số axit	mgKOH/ g	11,2	0,3
2	Chỉ số peroxyt	Meq O ₂ / kg	5,1	0,7
3	Hàm ẩm	%	1,00	0,01

Hoạt hóa enzym lipaza (Lipozim^{IM}) để làm tăng hoạt lực Lipozim^{IM} với các tỉ lệ phụ gia khác nhau: 6, 8, 10, 12, 14 và 16% (so với trọng lượng Lipozim^{IM}), để ổn định ở nhiệt độ 10 °C trong 10 giờ. Nhiệt độ thủy phân 35 °C, tốc độ chảy 20 g/ giờ (Bảng 78).

Bảng 78. Ảnh hưởng của tỉ lệ phụ gia tới chỉ số axit của dầu đậu tương thủy phân

TT	Tỷ lệ phụ gia (%)	Chỉ số axit (mg KOH/ g) của dầu đậu tương thủy phân	Nhận xét
1	6	102,857	Hoạt lực thủy phân của enzym thấp.
2	8	106,180	
3	10	113,900	
4	12	114,263	Hoạt lực thủy phân của enzym đạt yêu cầu
5	14	114,000	
6	16	113,163	Hoạt lực thủy phân của enzym giảm

Qua kết quả cho thấy tỷ lệ phụ gia 10-12% cho hoạt lực enzym cao nhất 113,9 - 114,263 mg KOH/ g. Dầu trước khi thủy phân cần được xử lý với phụ gia để tăng bề mặt tiếp xúc giữa dầu và enzym. Xử lý dầu với phụ gia ở các tỷ lệ 6, 8, 10, 12, 14% so với trọng lượng dầu. Cho lượng chất phụ gia vào dầu, khuấy bằng máy khuấy cơ học 10 phút với tốc độ 840 vòng/ phút ở nhiệt độ 40-50 °C. Sau đó dầu đã xử lý được đưa thủy phân trên cột. Nhiệt độ thủy phân 35 °C.

Qua bảng 78 cho thấy tỷ lệ chất phụ gia 10-12% cho hoạt lực enzym cao nhất. Vì thế tỷ lệ phụ gia được chọn là 10 -12%.

3.10.2. Ứng dụng lipaza cố định để thủy phân dầu ở các điều kiện tối ưu.

Nghiên cứu ảnh hưởng tốc độ chảy của dầu: Tốc độ chảy của dầu qua cột thủy phân quyết định rất nhiều đến khả năng xúc tác của enzym. Được thực hiện trong cùng một điều kiện: Nhiệt độ thủy phân 35 °C, enzym được hoạt hoá với 10-12% phụ gia và thời gian thủy phân 1 giờ, dầu được xử lý với 10% phụ gia. Tốc độ phản ứng thủy phân phụ thuộc tốc độ chảy của dầu và được điều chỉnh bởi một van (**Bảng 79**).

Bảng 79. Ảnh hưởng tốc độ chảy của dầu đến quá trình thủy phân

TT	Vận tốc chảy của dầu qua cột phản ứng (kg/ giờ)	Chỉ số axit của dầu thủy phân (mg KOH/ g)	Nhận xét
1	2,0	80,760	
2	1,8	90,927	
3	1,5	96,823	
4	1,2	113,440	Quá trình thủy phân tốt
5	1,0	114,130	
6	0,8	114,500	Chỉ số axit tăng không đáng kể

Nhận xét: Với tốc độ chảy của dầu 1,0-1,2 kg/ giờ chỉ số axit của dầu thủy phân đạt yêu cầu. Nếu tốc độ đó chậm hơn, chỉ số axit tăng không đáng kể. Vì vậy chúng tôi chọn tốc độ 1,0-1,2 kg/ giờ.

Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình thủy phân: Thí nghiệm thủy phân được thực hiện ở các nhiệt độ 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 °C; tốc độ chảy của dầu là 1kg/ giờ (**Bảng 80**).

Bảng 80. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình thủy phân

STT	Nhiệt độ thủy phân (°C)	Chỉ số axit của dầu đậu tương thủy phân (mg KOH/ gr)	Nhận xét
1	30	111,89	
2	35	114,52	Quá trình thủy phân tốt
3	40	115,43	
4	45	114,04	
5	50	113,32	
6	55	112,54	
7	60	110,68	
8	65	109,01	
9	70	108,07	

Nhận xét: Mặc dù Lipozim^{IM} là enzym bền nhiệt, có thể thủy phân dầu ở nhiệt độ 30-70 °C. Tuy nhiên nhiệt độ thủy phân tốt nhất được chọn là 35-45 °C. Vì nhiệt độ tăng khả năng thủy phân (thể hiện chỉ số axit của dầu thủy phân giảm).

Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian sử dụng enzym đến khả năng xúc tác của enzym: Dầu trước khi đưa vào cột được nhũ hoá với 10-12% phụ gia. Enzym được hoạt hoá với 10% phụ gia, tốc độ chảy của dầu qua cột là 1kg/ giờ. Thí nghiệm được thực hiện từ 10-300 giờ (**Bảng 81**).

Bảng 81. Ảnh hưởng của thời gian sử dụng Lipozim^{1M} đến hoạt lực của nó

Thời gian thủy phân (giờ)	Chỉ số axit (mg KOH/ g)	Thời gian thủy phân (giờ)	Chỉ số axit (mg KOH/ g)
10	116,86	160	92,81
20	116,09	170	90,01
30	115,47	180	88,12
40	114,89	190	85,49
50	113,87	200	80,91
60	110,49	210	80,43
70	108,64	220	79,57
80	105,41	230	79,08
90	102,94	240	78,25
100	99,24	250	76,32
110	97,58	260	75,46
120	96,03	270	75,01
130	94,98	280	73,88
140	93,43	290	72,05
150	93,21	300	70,54

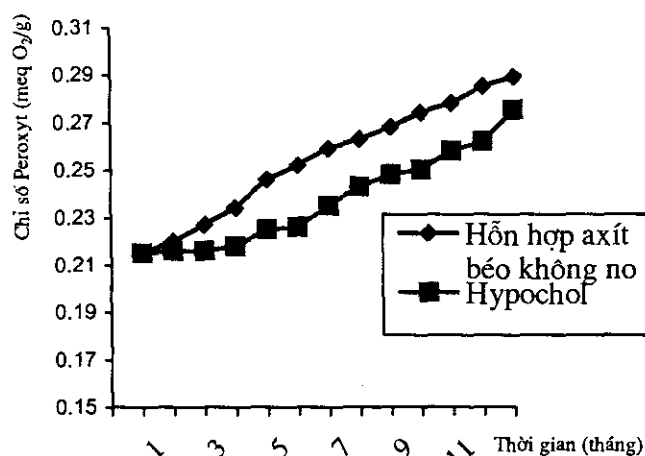
Nhận xét: Kết quả ở bảng 81 cho thấy khi thời gian thủy phân đến 100 giờ chỉ số axit của hỗn hợp axit béo đã giảm xuống nhỏ hơn 100 mg KOH/ g, Lipozim^{1M} cần được hoạt hoá lại để tăng khả năng xúc tác cho quá trình thủy phân.

Hoàn thiện công nghệ tách axit béo no ra khỏi hỗn hợp dầu thủy phân:

- Đã xác định nhiệt độ tách axit béo ra khỏi hỗn hợp dầu thủy phân: hHỗn hợp này được để trong một cốc thủy tinh, hạ nhiệt độ từ từ để hỗn hợp ở nhiệt độ từ 18-20 °C, trong 24 giờ. Ở nhiệt độ đó các axit béo no sẽ kết tinh tạo thành các tinh thể lơ lửng hoặc lắng xuống (tinh thể to) trong hỗn hợp dầu lỏng.
- Đã xác định phương pháp tách: Dùng giấy lọc hoặc vải lọc dầu để tách hỗn hợp axit béo có các tinh thể nói trên ra thành 2 phần: phần tinh thể và phần lỏng. Hỗn hợp trên cũng có thể được tách riêng ra bằng phương pháp ly tâm: ở nhiệt độ 18-20 °C, tốc độ ly tâm 3.000 vòng/ phút, trong thời gian 5 phút.

3.10.3. Nghiên cứu bảo quản sản phẩm hỗn hợp axit béo không no và Hypochol

Hỗn hợp axit béo sau khi thủy phân được đóng đầy trong chai thủy tinh nâu đầy nút kín, bảo quản ở nhiệt độ thường, còn sản phẩm Hypochol được đóng thành dạng

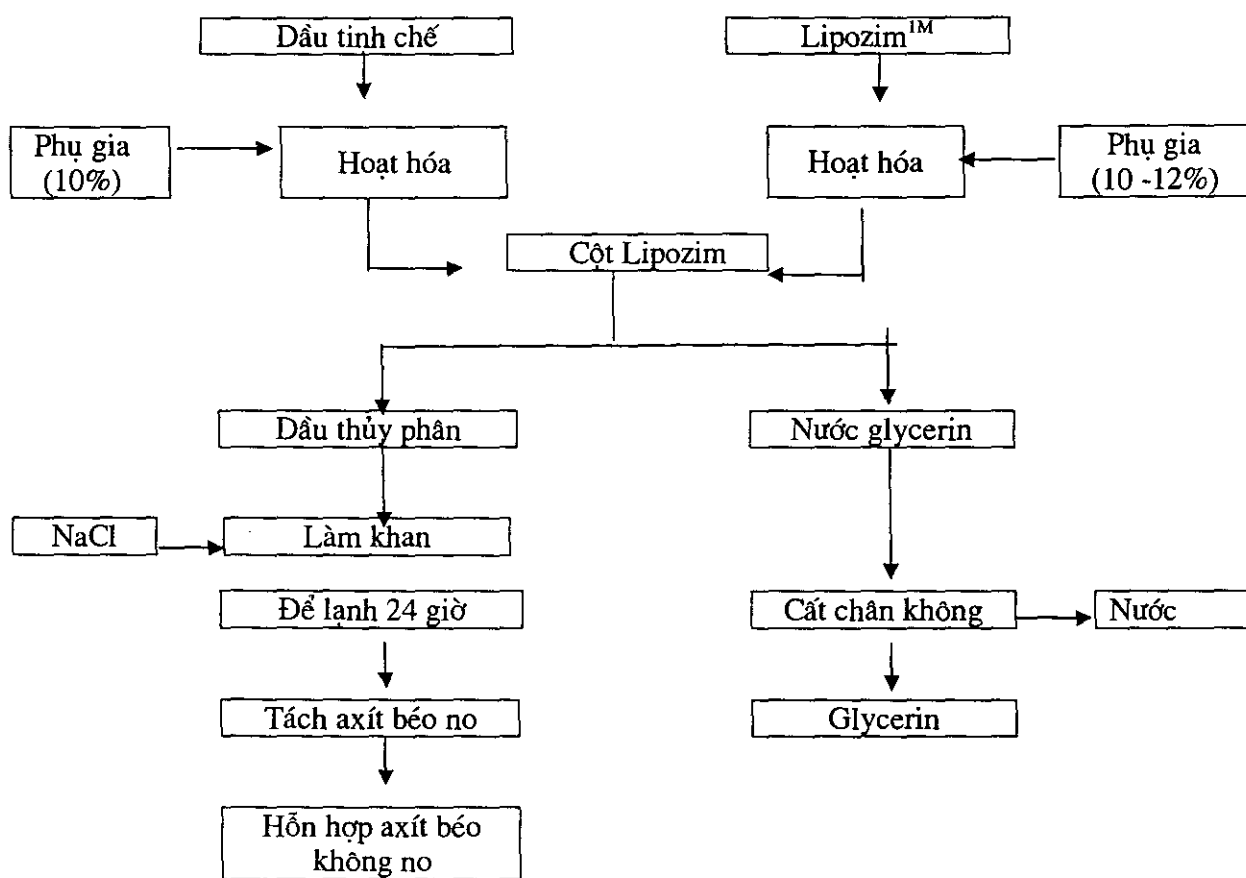


Hình 50. Sự biến đổi chất lượng hỗn hợp axit béo và Hypochole theo thời gian bảo quản

viên nang. Theo dõi sự biến đổi chất lượng của hỗn hợp axit béo và Hypochole qua phân tích chỉ số peroxyt. Chúng tôi phân tích chỉ số peroxyt theo định kỳ mỗi tháng một lần.

Nhận xét: Qua hình 50 chúng tôi thấy chỉ số peroxyt của hỗn hợp axit béo tăng theo thời gian bảo quản, tuy nhiên sự biến đổi này không đáng kể và vẫn

trong giới hạn cho phép ($< 10 \text{ meq O}_2/\text{kg}$). Qua theo dõi bảo quản thấy chỉ số peroxyt của dầu thủy phân vẫn dưới giới hạn cho phép sau 12 tháng bảo quản ở điều kiện thường. Từ các kết quả nghiên cứu chúng tôi rút ra quy trình công nghệ thủy phân bằng phương pháp enzyme như sau (Hình 51).



Hình 51. Quy trình công nghệ thủy phân dầu thực vật bằng enzyme

3.10.4. Phân tích chất lượng sản phẩm và xây dựng tiêu chuẩn nguyên liệu và sản phẩm.

Xác định thành phần axit béo bằng máy sắc ký khí: Đã phân tích và xác định tỷ lệ thành phẩm axit béo chưa no và no (Bảng 82).

Bảng 82. Thành phần axit béo của dầu hypochol và nang mềm hypochol

TT	Mẫu	Tỷ lệ các axit béo	Kết quả
1	Dầu Hypochol	Axit béo không no (axít oleic, linoleic) không dưới 70%	Đạt (78,3%)
		Axit béo no (axít palmitic, stearic) không quá 20%	Đạt (17,6%)
2	Nang mềm Hypochol	Axit béo chưa no (axít oleic, linoleic) không dưới 70%	Đạt (78,3%)
		Axit béo no (axít palmitic, stearic) không quá 20%	Đạt (17,6%)

Xác định độc tính cấp của hỗn hợp axit béo thủy phân và viên nang: Xác định độc tính cấp LD₅₀ sản phẩm hỗn hợp axit béo thủy phân và viên nang Hypochol được thực hiện tại 2 cơ sở Viện Kiểm nghiệm Bộ Y tế và Trung tâm Khoa học Công nghệ Dược thuộc trường Đại học Dược Hà Nội. Mỗi mẫu thử được thí nghiệm tiến hành trên 6 nhóm, mỗi nhóm 10 chuột (Bảng 83).

Bảng 83. Bố trí thí nghiệm và kết quả xác định độc tính cấp

Nhóm	Thể tích cho uống (ml/10g chuột)	Liều dùng (ml/kg chuột)	Số chuột thí nghiệm	Số chuột chết
1	0,5ml nước cất (đối chứng)	-	10	0
2	0,30ml mẫu thử	30	10	0
3	0,35ml mẫu thử	35	10	0
4	0,40ml mẫu thử	40	10	0
5	0,45ml mẫu thử	45	10	0
6	0,50ml mẫu thử	50	10	0

Tiến hành theo dõi chuột 5 ngày sau khi cho uống mẫu thử. Trên cả 12 mẫu thử nhận thấy Sau khi cho uống mẫu thử, chuột ở các nhóm hoạt động bình thường, không nhận thấy có biểu hiện ngộ độc nào (không có chuột nào chết trong thời gian theo dõi). Sáu mẫu hỗn hợp axit béo và sáu mẫu viên nang Hypochol được thử độc tính cấp trên chuột nhắt trắng cho uống tới mức liều 50ml/ kg chuột, mức liều cao nhất chuột có thể chịu đựng được, không nhận thấy biểu hiện ngộ độc nào trên chuột thí nghiệm.

Đã xây dựng tiêu chuẩn dầu Hypochol và xây dựng quy trình công nghệ sản xuất viên nang mềm: Dầu Hypochol là dầu có chứa hỗn hợp các axit béo thu được bằng thủy phân các triglycerid có trong dầu đậu tương.

Yêu cầu kỹ thuật dầu Hypochol:

Tính chất: chất lỏng trong suốt màu vàng sẫm, mùi đặc trưng khi để ở nhiệt độ $\leq 20^{\circ}\text{C}$.

Tỷ trọng ở nhiệt độ 20°C : 0,910 - 0,920.

Chỉ số khúc xạ: 0,910 - 0,920.

Chỉ số axit: không dưới 90mgKOH.

Chỉ số Iod: 110 - 120.

Chỉ số peroxyt: $\geq 10\text{meq O}_2/1000\text{g}$ dầu.

Định tính: Chế phẩm phải cho phản ứng định tính của các axit béo (axít palmitic, axít stearic, axít oleic, axít linoleic, axít linolenic).

Định lượng: Tỷ lệ các axit béo chưa no (axít oleic, axít linoleic) không ít hơn 70% và tỷ lệ các axit béo no (axít palmitic, axít stearic) không quá 20% trong tổng lượng các axit béo có trong dầu thuốc.

Yêu cầu kỹ thuật viên nang mềm Hypochol:

Công thức điều chế cho 1 viên nang

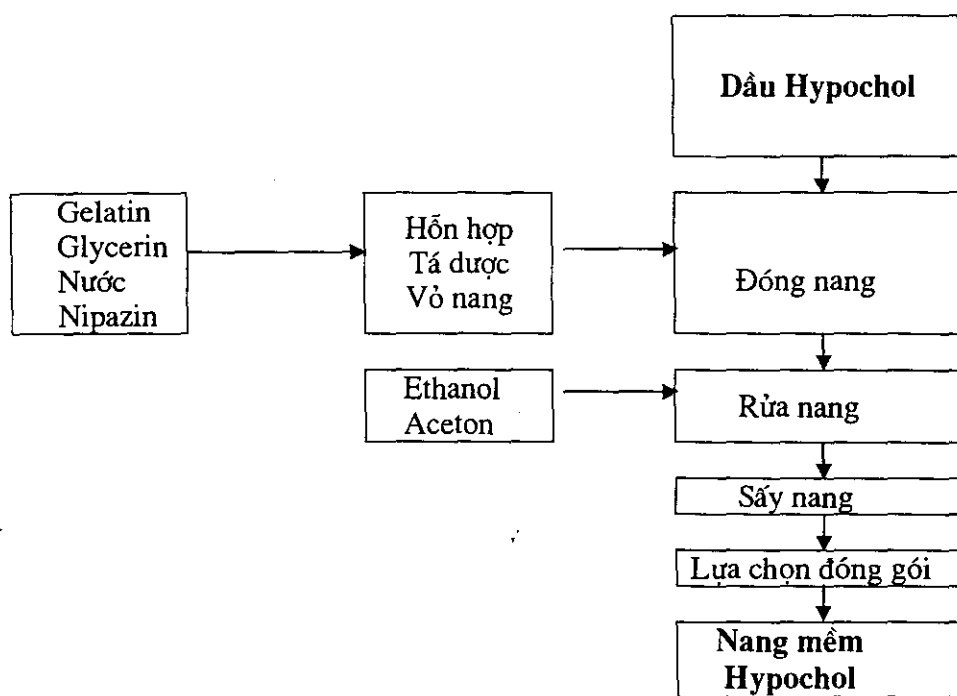
- Dầu Hypochol 500mg
- Tá dược vỏ nang (gelatin, glycerin, nipazin) vừa đủ 1 viên nang.

Nguyên liệu

- Dầu Hypochol: Đạt TCCS 04 - A - 001 – 03.
- Nipazin: Đạt BP 89.
- Gelatin: Đạt ĐĐVN III.
- Glycerin: Đạt ĐĐVN III.

Chất lượng thành phẩm.

- Hình thức: Viên nang mềm hình ovan, màu đồng nhất, khô toí, không dính nhau. Bên trong đựng dầu màu vàng sẫm.
- Độ đồng đều khối lượng dầu thuốc trong nang: $500\text{mg} \pm 7,5\%$.
- Độ tan rã không quá 30 phút
- Định tính và định lượng như đối với dầu Hypochol



Hình 52. Quy trình công nghệ sản xuất viên nang Hypochol

3.10.5. Lựa chọn và thiết kế chế tạo thiết bị thủy phân để sản xuất axit béo

- Thiết bị thủy phân phòng thí nghiệm là cột thủy tinh hai vỏ có đường kính trong là 1,5 cm, đường kính ngoài, chiều cao cột 25cm, có thể điều chỉnh nhiệt độ của phản ứng thủy phân bằng máy điều nhiệt. Dầu đưa vào cột cũng được gia nhiệt trong cột 2 vỏ khác. Năng suất của cột thủy phân 10 g/giờ.

Với mục tiêu nghiên cứu lựa chọn thiết kế chế tạo thiết bị thủy phân phù hợp với qui mô pilot để thủy phân dầu đậu tương, chúng tôi chọn thiết bị bằng inox 2 vỏ có kính quan sát. Để đạt được năng suất thủy phân mong muốn từ 0,8-1,5 kg/ giờ thì chúng tôi phải cân đối giữa đường kính bên trong và chiều cao của cột. Vì enzym lipaza đắt nên chúng tôi cũng cân nhắc để lựa chọn cột vừa phải, không quá lớn. Thiết bị thủy phân inox qui mô thực nghiệm được thiết kế theo các thông số sau:

- Chiều cao làm việc của cột thủy phân là 1000 mm. Phần 2 vỏ có chiều cao là 500 mm.
- Đường kính trong của cột thủy phân là 160 mm.
- Đường kính ngoài của cột thủy phân là 250 mm.
- Đáy cột hình côn có van inox đường kính 32 mm.
- Giữa thân cột và đáy có hệ thống mặt bích để tháo đáy vệ sinh được dễ dàng.
- Trên mặt bích trên có lưới 0,5 mm để giữ enzym.
- Kính quan sát chịu nhiệt đường kính là 100 mm.

- Năng suất thủy phân: 1kg /giờ

3.10.6. Ứng dụng thử các sản phẩm vào thực phẩm và dược phẩm.

Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng viên nang và ứng dụng trong điều trị rối loạn lipid máu: Hỗn hợp axit béo không no được chuyển Trung tâm Khoa học Công nghệ Dược - Trường Đại học Dược Hà Nội nghiên cứu sản xuất viên nang thuốc. Thành phần của viên Hypochol gồm: Hỗn hợp axit béo không no, vitamin B₆, vitamin E được đóng nang theo phương pháp nhỏ giọt với các chỉ tiêu sau:

- Nang hình ovan hoặc tròn trong đường kính 6mm màu vàng, có mùi đặc trưng.
- Trọng lượng từ 170-200mg với dung sai 10%.
- Độ bền cơ học: lăn ép nhẹ bằng tay không chảy dầu và để ở 37 °C trong 8 giờ nang không bị vỡ.
- Độ rã: 7 phút.
- Viên nang đóng hộp 100 viên/ hộp.
- Thuốc có thời hạn sử dụng 2 năm.
- Thành phần nang: gelatin, nước, chất bảo quản chống mốc.

Thuốc đã được thử độc tính tại Viện Dược liệu trên chuột trắng với liều LD₅₀. Thuốc Hypochol được GS. Phạm Tử Dương và các cộng sự của ông điều trị trên 72-120 bệnh nhân/ mỗi đợt tại Bệnh Viện Trung ương Quân đội 108. Liều lượng dùng của thuốc là 6 viên/ ngày, thời gian điều trị 2-3 tháng.

Kết quả điều trị cho thấy Hypochol có hiệu lực trong điều trị hội chứng rối loạn lipid máu: thuốc làm giảm 21,1% trị số triglycerit; 8,2% trị số cholesterol toàn phần và 6,3% trị số apoprotein B, làm tăng 10,8% trị số HDLC và 7,3% trị số apoprotein AL trong máu. So sánh với Maxepa của Pháp là thuốc tương tự chứa axit béo không no từ dầu cá Maxepa cho kết quả tương tự với cholesterol và HDLC, còn thấp với triglycerit (Maxepa giảm 38% triglycerit) nhưng Maxepa được dùng với thời gian dài hơn (2 năm).

Ước tính giá thành sản phẩm: Giá thành sản phẩm dầu đậu tương thủy phân theo phương pháp enzym được ước tính theo (**Bảng 84**).

**Bảng 84. Ước tính giá thành sản phẩm của 100kg dầu đậu tương
thủy phân theo phương pháp enzym**

STT	Các chi phí	Đơn vị	Số lượng	Đơn giá (đồng)	Thành tiền (đồng)
1	Dầu đậu tương tinh chế	kg	113	15.000	1.695.000
2	Lipozim ^{IM}	kg	0,282	12.600.000	3.553.200
3	Muối (NaCl)	kg	20	1.000	20.000
4	Điện	kw	400	1.000	400.000
5	Công lao động	công	30	20.000	600.000
6	Khấu hao máy				300.000
7	Chi khác				280.000
	Tổng chi				6.848.200
.	Giá sản phẩm	kg	100	120.000	12.000.000
	Lãi				5.151.800

Ghi chú: Dầu đậu tương sản xuất theo phương pháp hoá học: Giá bán sản phẩm: 12.000.000đồng/100kg; Lãi: 5.151.800 đồng/ 100kg.

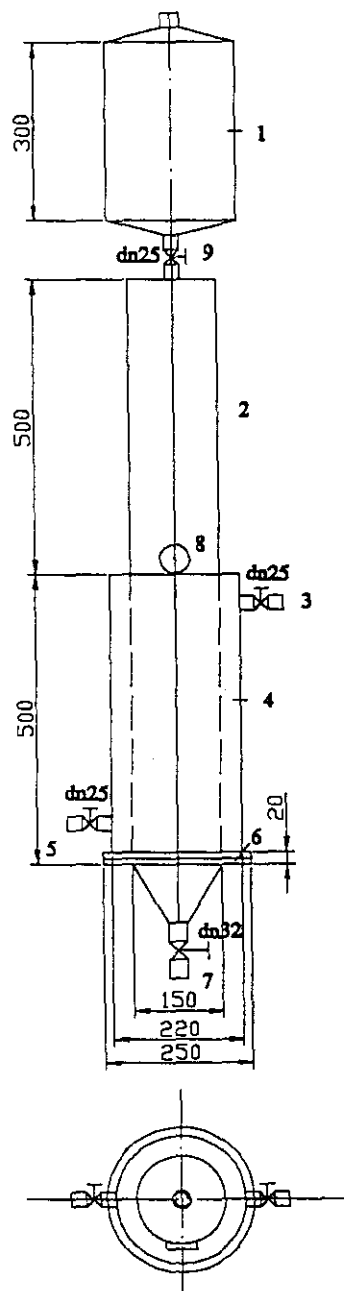
3.10.7. Nghiên cứu thu hồi và tái sử dụng enzym

Nghiên cứu tái sử dụng Lipozim^{IM} sau thủy phân: Lipozim^{IM} sau thời gian thủy phân hoạt lực bị giảm, chúng tôi nghiên cứu điều kiện hoạt hoá để tái sử dụng Lipozim^{IM}. Hai dung môi được chọn đều là dung môi hoà tan dầu thông thường: cồn 96% và ête etylic. Lipozim^{IM} sau thủy phân được rửa bằng hai loại dung môi trên. Enzym đã rửa được sử dụng để thủy phân dầu và xác định hoạt lực của nó (**Bảng 85**).

Bảng 85. Khả năng hoạt hoá Lipozim^{IM} sau khi thủy phân

Số TT	Dung môi dùng để rửa Lipozim ^{IM}	Số lần rửa	Chỉ số axit của dầu thủy phân khi dùng enzym thu hồi (mg KOH/ g)
1	Mẫu đối chứng không rửa	0	49,16
2	Rửa bằng cồn 96 ⁰	3 lần (mỗi lần 20ml)	80,50
3	Rửa bằng ête etylic	3 lần (mỗi lần 20ml)	70,85

Dung môi còn lẫn dầu sau khi rửa Lipozim^{IM}, chúng tôi cất để thu hồi dung môi. Tỷ lệ cồn hao hụt trong quá trình rửa là 20% so với lượng cồn đưa vào. Tỷ lệ ête etylic hao hụt là 30% so với lượng dung môi ban đầu dùng để rửa. Lipozim^{IM} sau khi rửa, hoạt lực thủy phân còn lại là 70,85- 80,5%. Qua kết quả trên đây cho thấy cồn là dung môi được chọn để hoạt hoá enzym Lipozim^{IM} là phù hợp và kinh tế nhất vì nó là dung môi không có hại và giá rẻ.



KÝ HIỆU	TÊN	VẬT LIỆU, KÍCH THƯỚC
1	Thùng trung gian chứa dầu	Inox 5 h: 300 φ 250
2	Cột thủy phân	Inox 5 h: 1000 φ 150
3	Van nước ra	dn 25
4	Khoang nước trao đổi nhiệt	Inox 5 h: 500 φ 150, 250
5	Van nước vào	Inox dn 25
6	Mặt bích	h: 20 φ 250
7	Van đáy	dn 32
8	Kính quan sát	Thủy tinh chịu nhiệt φ 100
9	Van tiếp liệu	Inox dn 25

Hình 53.

THIẾT BỊ THỦY PHÂN THỰC NGHIỆM

Người thiết kế CN	LÊ BÌNH HOÀNG	23/4/2003	
Người vẽ	TRINH NGỌC THĂNG	25/4/2003	
Người duyệt	VŨ THỊ ĐÀO	07/6/2003	

Tỷ lệ: 1:10

3.10. 8. Nghiên cứu sinh tổng hợp, thu hồi, cố định và ứng dụng lipaza.

3.10.8.1. Nghiên cứu điều kiện nuôi cấy tối ưu sinh tổng hợp lipaza.

Khảo sát ảnh hưởng của thời gian nuôi tới sinh tổng hợp lipaza từ Candida rugosa:

Chủng nấm men *Candida rugosa* được nuôi cấy trên môi trường MT2, với các điều kiện: Nhiệt độ nuôi 30 °C, tốc độ lắc 150 vòng/ phút. Khảo sát và xác định hoạt độ tại 6 thời điểm nuôi khác nhau: 24, 30, 36, 42, 48, 54 giờ (**Bảng 86**).

Bảng 86. Ảnh hưởng của thời gian nuôi đến sinh tổng hợp lipaza

Thời gian (giờ)	Hoạt độ lipaza (U/ ml)
24	2
30	5.2
36	7.5
42	8.33
48	6.9
54	3.9

Kết quả nghiên cứu cho thấy, chủng nghiên cứu có khả năng sinh tổng hợp lipaza ngay từ những giờ đầu nuôi cấy và đạt cực đại tại 42 giờ nuôi, cho hoạt lực 8,33 U/ ml.

Khảo sát ảnh hưởng của tốc độ lắc đến quá trình sinh tổng hợp lipaza: Thí nghiệm được tiến hành với 4 tốc độ lắc khác nhau: 100, 150, 200, 250 vòng/ phút trên môi trường sinh tổng hợp lipaza ở nhiệt độ 30 °C, thời gian nuôi 42 h (**Bảng 87**).

Bảng 87. Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến quá trình sinh tổng hợp lipaza

Tốc độ lắc (v/ ph)	Hoạt độ lipaza (U/ ml)
100	5
150	8,33
200	4
250	3

Khảo sát ảnh hưởng của nguồn cacbon đến sinh tổng hợp lipaza: Chúng tôi tiến hành khảo sát với 5 nguồn cacbon khác nhau trên môi trường sinh tổng hợp lipaza ở nhiệt độ 30°C, tốc độ lắc 150 vòng/ phút, cơ chất 1% dầu oliu, thời gian nuôi 42h.

Hoạt độ lipaza đạt được cao nhất trên nguồn cacbon là axit palmitic, các nguồn cacbon khác như glyxerol và galactosa cũng cho hoạt độ tương đối cao. Vậy nguồn cacbon thích hợp nhất cho sinh tổng hợp lipaza của chủng nghiên cứu là axit palmitic. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của tác giả E. Dalmau (2000) khi nghiên cứu ảnh hưởng của các nguồn cacbon khác nhau đến sinh tổng hợp lipaza của chủng *Candida rugosa* trong môi trường dịch thể lỏng (Bảng 88 và 89).

Bảng 88. Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến sinh tổng hợp lipaza

Nguồn cacbon (2 g/ l)	Hoạt độ lipaza (U/ ml)
Glucosa	8,67
Galactosa	12,30
Tween 80	6,67
<u>Axit Palmitic</u>	<u>18,00</u>
Glyxerol	12,67

Bảng 89. Ảnh hưởng của nồng độ axit palmitic

Nồng độ axit palmitic (g/ l)	Hoạt độ lipaza (U/ ml)
0,5	12,30
1,0	15,83
1,5	<u>17,67</u>
2,0	13,67
2,5	9,33
3,0	5,67

Từ kết quả trên ta thấy nồng độ axit palmitic cũng ảnh hưởng nhiều tới khả năng sinh tổng hợp lipaza. Nồng độ axit palmitic 1,5 g/ l cho hoạt độ enzym cao nhất là 17,67 (UI/ ml).

Tối ưu hoá điều kiện nuôi chìm *Candida rugosa*: Từ các điều kiện khảo sát được ở trên chúng tôi tiến hành tối ưu hoá bậc 1 điều kiện nuôi chủng *Candida rugosa* theo 3 yếu tố sau: X_1 là axit palmitic (g/ l), X_2 là số tế bào nấm men (tb/ ml) và X_3 là thời gian (giờ). Hàm mục tiêu Y là hoạt độ lipaza (U/ ml). Đã lập ma trận thí nghiệm kết quả và xử lý thống kê các kết quả thực nghiệm thu được. Đã kiểm tra độ đồng nhất của ma trận theo chuẩn Cochran. Đã xác định các hệ số của mô hình theo công thức. Đã kiểm tra sự có nghĩa của các hệ số.

Bảng 90. Các mức thí nghiệm

Mức thí nghiệm	X ₁	X ₂	X ₃
Mức gốc	1.5	4	42
Khoảng biến đổi	0.5	2	1
Mức trên	2	6	46
Mức dưới	1	2	38

Đã kiểm tra sự thích ứng của phương trình hồi quy theo chuẩn Fisher.

$$Stu^2 = \frac{\sum (ytt - ytn)^2}{N - B} \quad F_{tt} = \frac{\max(\bar{Sy}^2, Stu^2)}{\min(\bar{Sy}^2, Stu^2)}$$

$$S_{tt} = 3.93 / 4 = 0.98 \text{ và } F_{tt} = 0.98 / 0.38 = 2.58$$

$$F_b = 3.01 \text{ tra bảng với } f_1 = N - B = 4, f_2 = N (k - 1) = 8$$

Trong đó: N: số thí nghiệm, B: số hệ số có nghĩa, k: số lần lặp lại

$$F_{tt} \leq F_b \Rightarrow \text{Mô hình trên là thích ứng}$$

Tối ưu hoá theo Box - Wilson

$$\lambda_i = X^0 - \text{cận dưới} = \text{cận trên} - X^0$$

$$|b_1 \lambda_1| = 1,05 * 0,5 = 0.525$$

$$|b_2 \lambda_2| = 0,92 * 2 = 1.84$$

$$|b_3 \lambda_3| = 1,61 * 4 = 6.44 \Rightarrow \text{đạt giá trị lớn nhất nên ta chọn } X_3 \text{ làm } X_{cs}$$

Chọn bước nhảy của X₃ là Δ₃ = 2

$$\Delta_1 = (b_1 \lambda_1 / b_3 \lambda_3). \Delta_3 = 0,2$$

$$\Delta_2 = (b_2 \lambda_2 / b_3 \lambda_3). \Delta_3 = 0.6$$

Bảng 91. Kết quả tối ưu theo Box - Wilson

STT	X ₁	X ₂	X ₃	Hoạt độ
1	1	2	38	16.17
2	1.2	2.6	40	<u>18.67</u>
3	1.4	3.2	42	11.67
4	1.6	3.8	44	9.33
5	1.8	4.4	46	6.67

Từ kết quả trên cho thấy quá trình sinh tổng hợp enzym lipaza của chủng nấm men *Candida rugosa* đạt hiệu quả tốt nhất ở thí nghiệm thứ 2 với các điều kiện:

- Hàm lượng axit palmitic 1.2 g/l.
- Số tế bào nấm men $2,6.10^6$ tb/ ml canh trường.
- Thời gian nuôi 40 giờ.

3.10.8.2. Nghiên cứu thu nhận và tinh chế lipaza.

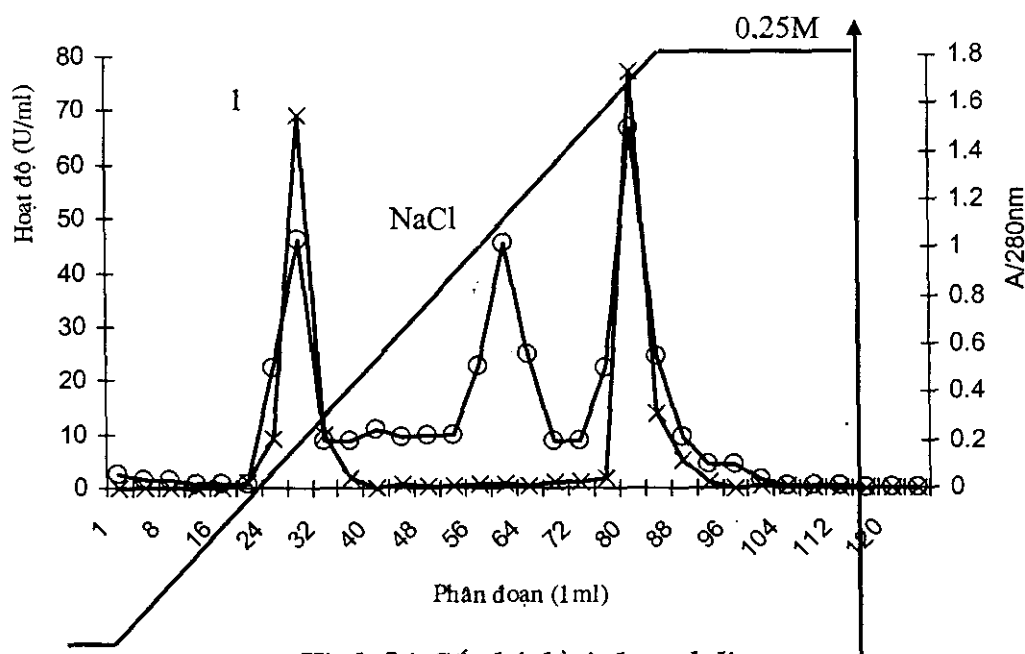
Khảo sát nồng độ etanol thích hợp kết tủa lipaza từ *Candida rugosa*: Tiến hành thí nghiệm kết tủa lipaza với các nồng độ khác nhau: 60, 70, 80, 90%, ly tâm lạnh, thu kết tủa cho bốc hơi dung môi ta thu được lipaza thô (**Bảng 92**).

Từ kết quả thu được ở trên ta nhận thấy các nồng độ cồn trong khoảng 0- 67% có cho ta kết tủa nhưng không có hoạt độ enzym, chỉ khi nồng độ cồn từ 67% trở lên là có hoạt độ và ở nồng độ cồn là 90% thì cho ta hoạt độ cao nhất. Qua thí nghiệm này cho thấy ở nồng độ cồn từ 67% trở xuống chỉ có protein tạp bị kết tủa vì vậy chúng ta có thể kết tủa phân đoạn để loại bỏ bớt protein tạp.

Bảng 92. Kết tủa lipaza ở các nồng độ etanol khác nhau

Nồng độ etanol (% v/ v)	Hoạt độ lipaza trước khi kết tủa (UI/ml)	Hoạt độ lipaza sau khi kết tủa cồn (UI/ml)	Hiệu suất thu hồi lipaza (%)
57	16.73	0	0
67	16.73	0	0
76	16.73	1.33	7.95
81	16.73	5.67	21.94
86	16.73	9.83	58.76
90	16.73	12.33	<u>73.7</u>
91	16.73	3.33	19.9

Tinh sạch lipaza bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion- DEAE-xenluloza: Dịch enzym sau rửa bằng etanol được lấy 15 ml cho vào cột đã được cân bằng trong đệm Tris- HCl 25mM pH 7,5; Tốc độ chạy là 1,5 ml/p. Dung dịch đẩy lipaza là NaCl với gradien nồng độ 0-0,25 M; mỗi phân đoạn thu 1ml/ ống (**Hình 54**).



Hình 54. Sắc ký đồ tinh sạch lipaza

Sắc ký đồ hình 53 cho thấy lipaza sau khi qua cột trao đổi ion DEAE- xenluloza xuất hiện 3 pick. Tiến hành xác định hoạt độ lipaza ở các phân đoạn thuộc các pick. Kết quả cho thấy chỉ có pick 1 và pick 3 có hoạt tính lipaza (69UI/ ml và 77UI/ ml). Điều này phù hợp với nghiên cứu của M.A. Pernas(2000) [69] đã công bố Lip 1 và Lip 3 có khối lượng phân tử 58 và 62 kDa (**Bảng 93**).

Bảng 93 .Kết quả tách làm sạch lipaza

Các bước làm sạch	Tổng thể tích (ml)	Proten tổng (mg)	Hoạt độ lipaza		Mức độ sạch (Lần)	Hiệu suất (%)
			Tổng (U)	Riêng (U/ mgPr)		
Dịch thô	200	340	1500	4,41	(1)	(100)
Sau kết tủa etanol	20	66,8	1245	18,64	4,22	83,00
DEAE - Xenluloza	8	10,08	556	55,16	12,50	37,06

Sắc ký đồ hình 54 và bảng 93 cho thấy lipaza sau các bước làm sạch liên tiếp: Kết tủa etanol, sắc ký trao đổi ion DEAE-xenluloza thu được chế phẩm có hoạt độ riêng 55,16 U/ mg protein, mức độ tinh sạch của lipaza là 12,5 lần, hiệu suất thu hồi là 37,06%.

3.10.8.3. Khảo sát các điều kiện thích hợp cố định lipaza trên Nylon-6

Bảng 94. Ảnh hưởng của nồng độ HCl hoạt hoá Nylon-6 đến khả năng cố định lipaza

Nồng độ HCl (N)	Tổng thể tích trước rửa (ml)	Hoạt độ còn lại trong nước rửa (U)	Hiệu suất cố định enzym (%)
Đối chứng (lipaza tan)	-	550	100
3,0	33,5	276,4	49,75
3,5	33,5	226,1	58,90
4,0	33,5	245,3	55,40
4,5	33,5	259,6	52,80

Bảng 94 cho thấy, với nồng độ HCl 3,5 N, hiệu suất cố định đạt 58,9% là cao nhất. Có thể với nồng độ HCl thấp chưa đủ khả năng hoạt hoá chất mang, còn với nồng độ cao làm thay đổi pH, ảnh hưởng đến khả năng liên kết lipaza vào chất mang. Kết quả này phù hợp với tài liệu công bố trước đây [23].

Ảnh hưởng của nồng độ glutaraldehyt đến khả năng cố định lipaza: Tiến hành cố định lipaza với các nồng độ glutaraldehyt khác nhau (8%,10%,12%) và các điều kiện: Tổng lượng hạt Nylon-6 đem xử lý 3g, nồng độ HCl 3,5 N, đệm Kali phosphat pH7,7 và tốc độ lắng 200 vòng/ phút (**Bảng 95**).

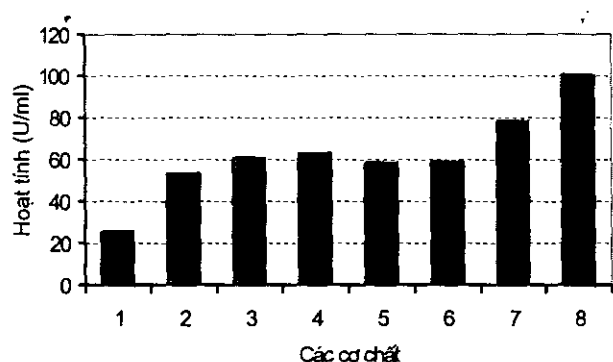
Bảng 95. Ảnh hưởng của nồng độ glutaraldehyt đến khả năng cố định lipaza

Nồng độ enzym (mg/ml)	Tổng thể tích nước rửa (ml)	Hoạt độ còn lại trong nước rửa	Hiệu suất cố định enzym (%)
0,5 (270U)	33,5	160,80	40,45
1 (550U)	33,5	224,45	59,20
1,5 (820U)	33,5	375,20	54,25
2 (1100U)	33,5	753,75	31,50

Khảo sát khả năng cố định lipaza trên Nylon-6 Với các nồng độ enzym khác nhau ta thấy với nồng độ enzym là 1mg/ml, hiệu suất cố định cao nhất (59,2%). Kết quả khảo sát này phù hợp với kết quả đã nghiên cứu trước đây [23].

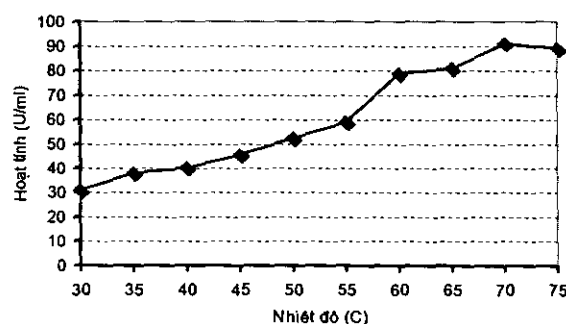
Đặc tính đặc hiệu cơ chất của lipaza từ *Bacillus* sp. Lipaza *Bacillus* có hoạt tính đặc hiệu với từng cơ chất. Hoạt tính đối với dầu olive thấp nhất chỉ đạt 26 U/ml, đối với dầu mè tinh luyện, dầu nành, Neptune, Meizan, Nakydaco đạt 53-63 U/ml, đối với dầu Tường An đạt 79 U/ml và đối với tributyrin đạt 101 U/ml (**Hình 55**).

Hình 55. Hoạt độ lipaza của *Bacillus* đặc hiệu cho từng cơ chất: 1: Dầu olive; 2:



Dầu mè (tinh luyện); 3: Dầu đậu nành (tinh luyện); 4: Dầu neptune (dầu cò + dầu hạt cải); 5: Dầu Meizan (dầu olein + dầu hạt cải + dầu nành); 6: Dầu Nakydaco (dầu olein dừa + dầu nành); 7: Dầu Tường An (dầu olein + dầu đậu nành + dầu Canola); 8: Tributyrin (1%).

Ảnh hưởng của nhiệt độ: Nhiệt độ tối ưu của lipaza chủng *Bacillus* chịu nhiệt này được xác định qua việc đo hoạt tính dịch nổi ở nhiệt độ phản ứng khác nhau từ 30 đến 75°C với cơ chất là dầu ăn tổng hợp nồng độ 5% và pH 8,0. Khi nhiệt độ tăng từ 30 đến 75°C thì hoạt tính lipaza cũng tăng theo với tốc độ đều từ 31 đến 91 đơn vị/ ml.

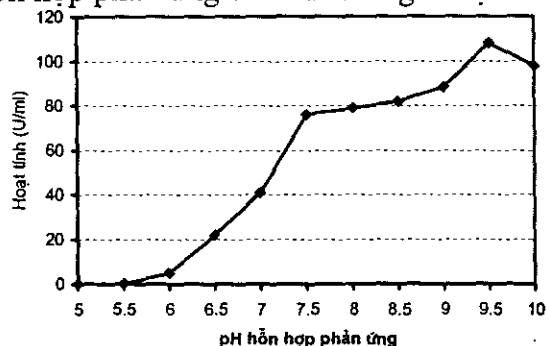


Hoạt tính đạt tối ưu ở nhiệt độ 70°C là 91 đơn vị/ ml (**Hình 56**). Sau nhiệt độ 70°C, hoạt tính lipaza có giảm chút ít (89 U/ ml ở nhiệt độ 75°C). Với biểu đồ nhiệt độ tối ưu này, lipaza *Bacillus* là lipaza ưa nhiệt.

Hình 56. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt độ lipaza

Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính lipaza: pH

hỗn hợp phản ứng có ảnh hưởng rõ rệt đến hoạt tính enzym vì nó liên quan đến mức độ ion



hóa cơ chất và độ bền của lipaza. Để tìm ra khoảng pH tối ưu cho hoạt tính lipaza, xuất phát từ một số thông tin về pH tối ưu của một số chủng *Bacillus*, chúng tôi dò tìm pH từ 7,0 dần về phía acid và kiềm.

Hình 57. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính lipaza.

Khảo sát khả năng thủy phân dầu với lipaza cố định: Trong công nghiệp dược người ta dùng sản xuất viên nang có chứa chất béo với chỉ số axit 80-100. Cũng như trọng khẩu phần thức ăn kiêng của những người bệnh nhiễm mỡ trong máu nếu sử dụng các loại dầu thực vật đã được thủy phân sơ bộ chỉ số axit tăng đến 80-100 thì làm giảm hàm lượng mỡ trong máu. Do vậy chúng tôi nghiên cứu khảo sát khả năng thủy phân dầu đậu nành của lipaza cố định.

Do lipaza chỉ có khả năng thủy phân dầu trên bề mặt liên pha. Vì vậy chúng tiến hành khảo sát sự thủy phân dầu bằng cách cho hỗn hợp dầu: Nước với các tỷ lệ khác nhau 1:1, 2:1, 1:2 chảy qua cột có chứa enzym cố định 2 lần với tốc độ chảy 15 giọt/phút ở nhiệt độ phòng và có bổ sung CaCl_2 5mM 2%. Sau đó xác định chỉ số axit của dầu sau khi thực hiện phản ứng thủy phân (**Bảng 96**).

Bảng 96. Ảnh hưởng tỷ lệ dầu: nước đến khả năng thủy phân

Tỷ lệ dầu: nước	Chỉ số axit	
	Lần 1	Lần 2
1:1	40,32	60,14
2:1	61,30	82,50
1:2	50,49	70,14

Kết quả cho thấy với tỷ lệ dầu: Nước là 2:1 khả năng thủy phân của lipaza là tốt

nhất cho chỉ số axit là 82,5. Nên chúng tôi sẽ sử dụng tỷ lệ này cho thủy phân với lượng dầu lớn hơn sau này.

Khảo sát khả năng sử dụng lipaza tan trong sản xuất phomat: Trong quá trình sản xuất phomat từ sữa tươi, ở giai đoạn lên men đông tụ người ta sử dụng renin và một số proteaza axit tính hoặc kiềm tính làm tác nhân đông tụ sữa, trong giai đoạn ủ chín có thể bổ sung lipaza nhằm làm tăng hương vị đặc trưng cho phomat.

Để khảo sát khả năng sử dụng lipaza trong quá trình sản xuất phomat, tiến hành thí nghiệm trên 2 mẫu. Mẫu TN: Sản xuất phomat có bổ sung 50% renin + 50% proteaza đông tụ sữa. Mẫu ĐC: Sản xuất phomat bổ sung 50% renin+ 50% proteaza +0,001% lipaza. Cả 2 mẫu được ủ chín ở nhiệt độ 4-10⁰ C trong 6 tuần. Sau đó đánh giá chất lượng bằng phương pháp cảm quan. Đánh giá chất lượng bằng phiếu cho điểm (thang điểm 10) theo các chỉ tiêu chất lượng phomat (**Bảng 97**).

Bảng 97. Kết quả đánh giá chất lượng phomat bằng điểm theo phương pháp cảm quan

Chỉ tiêu	Mẫu thí nghiệm (không có lipaza)	Mẫu đối chứng (có lipaza)
Màu sắc	1,14	2,21
Mùi kem	4,64	5,92
Mùi chua	5,85	4,57
Mùi ôi	3,28	1,71
Mùi bơ	3,64	5,00
Mùi lactic	4,00	5,50
Mùi lạ	1,00	0,35
Vị ngọt	4,07	5,78
Vị chua	5,57	5,35
Vị đắng	2,14	1,42
Vị mặn	7,78	6,85
Độ chắc	4,00	5,92
Độ tan	5,85	4,21
Độ mịn	5,78	5,28
Độ dính	5,28	5,42
Cảm giác béo	5,00	6,28
Chất lượng tổng hợp	6,42	7,85

3.11. Hoàn thiện công nghệ và thiết bị sản xuất rượu vang chất lượng cao.

3.11.1. Nghiên cứu tạo giống nấm men mới bằng kỹ thuật lai ghép tế bào.

Khảo sát khả năng tạo bào tử của các chủng nấm men *S. cerevisiae*: Nấm men sinh sản dưới hai hình thức: Nảy chồi và tạo bào tử. Tuy nhiên, trong điều kiện thuận lợi về dinh dưỡng và môi trường, phần lớn các chủng nấm men sinh sản bằng phương pháp nảy chồi. Chỉ trong điều kiện khó khăn như cạn kiệt nguồn dinh dưỡng, bị ức chế bởi các tác nhân như nhiệt độ (quá lạnh hoặc quá nóng), áp suất cao thì nấm men mới sử dụng đến hình thức tạo bào tử. Các chủng nấm men công nghiệp thường khó có khả năng tạo bào tử và chỉ tạo bào tử trong những trường hợp đặc biệt.

Tiến hành xác định khả năng tạo bào tử của 18 chủng nấm men rượu vang trên môi trường axetat và lactat tại các điều kiện nhiệt độ khác nhau, chúng tôi nhận thấy môi trường axetat là thích hợp hơn cho sự tạo thành bào tử khi ở nhiệt độ 25 °C. Các chủng FD5, FD101, FD13, FD377 có khả năng tạo bào tử cao nhất trong các chủng nghiên cứu là 3,1%, 2,3%, 1,7%, 1,4% tương ứng.

Bảng 98. Khả năng tạo bào tử (%) của các chủng nấm men rượu vang

TT	Tên giống	Môi trường nuôi cấy					
		Axetat			Lactat		
		12°C	25°C	30°C	12°C	25°C	30°C
1	FD1	0	1,1	0	0	0,5	0
2	FD2	0	0	0	0	0	0
3	FD3	0	0	0	0	0	0
4	FD4	0	0,2	0	0	0	0
5	FD5	0	3,1	0	0	0,9	0,1
6	FD7	0	0,8	0	0	0	0
7	FD8	0	0	0	0	0	0
8	FD9	0	0,4	0	0	0,1	0
9	FD10	0	0	0	0	0	0
10	FD11	0	0	0	0	0	0
11	FD12	0	0	0	0	0	0
12	FD13	0	1,7	0	0	0,2	0
13	FD14	0	0,3	0	0	0	0
14	FD101	0	2,3	0	0	0,7	0,4
15	FD102	0	0,5	0	0	0	0
16	FD103	0	0	0	0	0	0
17	FD325	0	0,2	0	0	0	0
18	FD377	0	1,4	0	0	0,3	0

Xác định khả năng lên men, tạo CO₂ trong bình Einhorn Smith của nấm men: Trong quá trình lên men, nấm men chuyển hoá đường thành cồn và CO₂. Lượng CO₂ tạo thành nhanh hay chậm thể hiện tốc độ lên men của chủng nấm men đó.

Trên các môi trường có nồng độ đường khác nhau thì khả năng tạo CO_2 của các chủng nấm men cũng khác nhau một cách rõ rệt. Trong khoảng nồng độ đường từ 18 - 22 $^{\circ}\text{Bx}$, năng lực lên men của các chủng nấm men không thay đổi nhiều, mặc dù thời gian giải phóng được 5ml CO_2 trong quá trình lên men của mỗi chủng nấm men khác nhau là khác nhau. Trong 18 chủng nghiên cứu, các chủng FD5, FD7, FD101, FD102 có tốc độ tạo CO_2 nhanh nhất từ 2 giờ 45 phút (FD101) đến 5 giờ 20 phút (FD12), trong khi đó các chủng còn lại chỉ số này còn chậm hơn dao động trong khoảng từ 3 giờ 15 phút đến 6 giờ (chủng FD377). Ở nồng độ đường cao hơn, nấm men hoạt động yếu dần, thể hiện qua việc CO_2 thoát ra chậm hơn. Nếu như ở nồng độ đường 22 $^{\circ}\text{Bx}$, chủng FD325 đẩy 5 ml CO_2 trong vòng 6 giờ 15 phút thì nồng độ đường 30 $^{\circ}\text{Bx}$ chỉ số này là 9 giờ 15 phút.

Nhưng điều đặc biệt là chủng FD2, FD5, FD7, FD12, FD101, FD102, vẫn thể hiện khả năng lên men mạnh mẽ trong các môi trường có nồng độ đường cao từ 26 đến 30 $^{\circ}\text{Bx}$, mặc dù tốc độ có giảm đi một chút khi so sánh với lên men trên môi trường có nồng độ 22 $^{\circ}\text{Bx}$. Cụ thể là chủng FD101 đã mất 5 giờ 15 phút để tạo ra 5ml CO_2 khi lên men ở 30 $^{\circ}\text{Bx}$ nhưng chỉ mất 2 giờ 45 phút trên môi trường 22 $^{\circ}\text{Bx}$.

Nồng độ đường ban đầu từ 18 đến 22 $^{\circ}\text{Bx}$, thì hiệu suất lên men tăng khi nồng độ đường ban đầu tăng, nhưng khi nồng độ đường tăng đến 26 $^{\circ}\text{Bx}$ thì chỉ có các chủng FD5, FD7, FD101, FD102 vẫn duy trì được hiệu suất lên men cao từ 91,0 đến 94,7%, còn đa số các chủng khác, hiệu suất lên men bị giảm một cách đáng kể. ở 30 $^{\circ}\text{Bx}$, ngay cả các chủng có hoạt tính mạnh nhất như FD5, FD101 cũng bị giảm năng lực lên men, bằng chứng là hiệu suất lên men giảm từ 94,7% xuống còn 92,0% (FD101), từ 93,0% xuống còn 88,2% (chủng FD5). Chủng FD101 đạt hàm lượng cồn cao nhất là 12,5%V ở 30 $^{\circ}\text{Bx}$, FD5 đạt 12,2%V, FD102 đạt 12,0%V và FD7 đạt 11,8%V.

Trên môi trường có nồng độ chất khô từ 18 -30 $^{\circ}\text{Bx}$ (tương đương với hàm lượng đường từ 150 g/l -250 g/l) thì hàm lượng cồn tạo thành cao nhất chỉ đạt đến 12,5% v/v (chủng FD101). Để nâng cao khả năng tạo bào tử của chủng nấm men, ngoài việc tìm ra môi trường thích hợp là môi trường axetat, chúng tôi còn phân lập, chọn lọc các bào tử qua nhiều thế hệ và đặc biệt hơn, chúng tôi đã sử dụng phương pháp tạo sốc nhiệt độ, có nghĩa là nuôi cấy nấm men ở nhiệt độ thấp đột ngột.

Các bào tử đơn sau quá trình phân lập và chọn lọc có khả năng tạo bào tử cao hơn so với thế hệ đầu. Sốc nhiệt độ làm tăng khả năng tạo bào tử của giống nấm men *S. cerevisiae* một cách đáng kể, đặc biệt là sốc ở nhiệt độ 5 $^{\circ}\text{C}$. Bảy cá thể có khả năng

tạo bào tử cao là FD5-2-4, FD5-2-17, FD13-1-7, FD101-1-5, FD101-1-68, FD377-3-8, FD377-3-32 được xác định dấu hiệu di truyền trước khi tiến hành lai ghép dựa vào khả năng bền vững hay nhạy cảm với một số kháng sinh như chloramphenicol hay erythromycin.

Theo phương pháp của Fowell [6], 10 cặp lai đã được tiến hành giữa FD101-1-5 và FD101-1-68 với 5 cá thể còn lại đã được xác định dấu hiệu di truyền. Sau đó, các cá thể lai được chọn lọc và kiểm tra dấu hiệu với chloramphenicol và erythromycin. Kết quả là đã thu nhận được 102 cá thể lai từ 466 đôi bào tử đơn nhưng chỉ có 3 cá thể lai điển hình thể hiện tính kháng chloramphenicol và erythromycin. Ba cá thể lai FD-H1, FD-H2 và FD-H3 thu nhận bằng phương pháp lai ghép bào tử được đánh giá năng lực lên men trên các loại môi trường dịch quả khác nhau như mơ, nho, vải, dứa. Đây là các loại quả thông dụng ở Việt Nam được sử dụng làm nguyên liệu để sản xuất rượu vang.

Như vậy, trong 3 cá thể lai thu nhận được bằng phương pháp lai ghép bào tử thì FD-H3 có khả năng tạo được hàm lượng cồn cao nhất, thay đổi từ 14,78 đến 14,82%V, tùy theo nguyên liệu sản xuất rượu vang là mơ, nho, vải hay dứa. So với FD 101-1-5 và FD 101-1-68 thì hàm lượng cồn tạo thành đã tăng từ 17-18%. Kết quả này cũng cho thấy khả năng áp dụng rộng rãi của FD-H3 vào trong thực tiễn sản xuất vì tính ổn định trên các nguồn nguyên liệu quả khác nhau.

3.11.2. Ứng dụng enzym pectinaza (pectinex-3XL).

Xử lý pectin trong dịch quả: Pectin là hợp chất cao phân tử thuộc loại polygalacturolit có trong thành tế bào, nguyên sinh chất và lớp gian bào. Trong dịch quả các chất pectin đóng vai trò quan trọng trong các quá trình trao đổi nước của sự chuyển hóa các chất và trong quá trình chín của quả.

Pectin tan được trong nước làm cho dịch quả có độ nhớt cao, độ bền keo lớn làm cho sản phẩm lên men rất khó lắng trong.

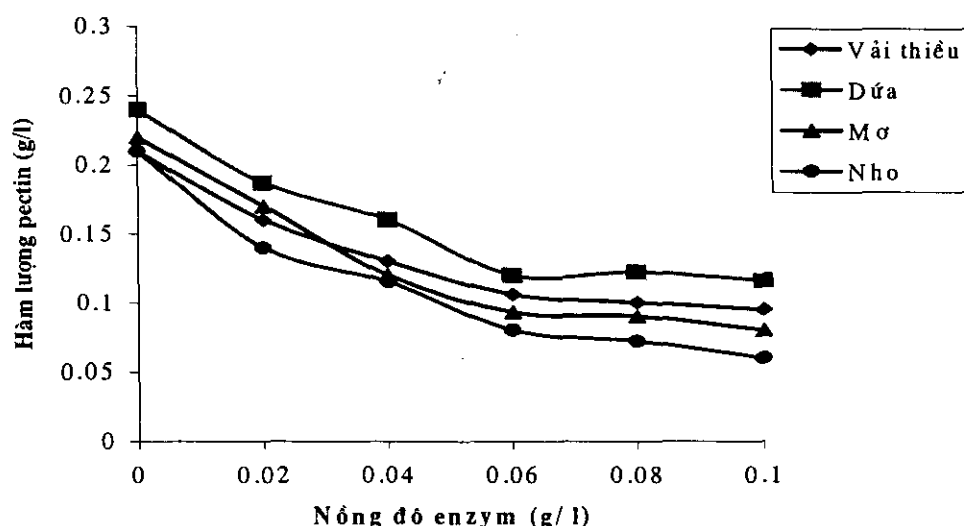
Để sản xuất rượu vang quả đạt chất lượng cao về giá trị cảm quan thì việc sử dụng enzym pectinaza để phân giải pectin trong dịch quả là cần thiết và được coi là biện pháp có hiệu quả nhất.

Có nhiều loại enzym pectinaza được sử dụng để phân giải pectin trong dịch quả và hiện đang được bán trên thị trường Việt Nam. Do yêu cầu chất lượng cảm quan (đặc biệt là màu sắc) của sản phẩm nên chúng tôi lựa chọn những loại enzym có khả năng phân giải pectin nhưng không có khả năng oxi hóa đối với sản phẩm. Qua khảo sát

chúng tôi lựa chọn enzyme Pectinex-3XL (của hãng NOVO, Đan Mạch) để tiến hành các thí nghiệm trên dịch ép thịt quả.

Dịch quả sau khi thu hồi bằng máy xay ly tâm được bổ sung enzyme với các tỷ lệ: 0,02g/l; 0,04g/l; 0,06g/l; 0,08g/l và 0,1g/l. Duy trì nhiệt độ 52 °C, thời gian 120 phút, sau đó làm nguội nhanh, tiến hành phân tích hàm lượng pectin có trong các mẫu thí nghiệm kết hợp với cảm quan. Kết quả thí nghiệm được thể hiện trong **hình 58**.

Hình 58. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme pectinex-3XL đến hàm lượng pectin có trong dịch quả



Kết quả hình 57 cho thấy: Enzyme Pectinex-3XL có khả năng phân giải tốt đối với pectin có trong dịch quả với hàm lượng phù hợp 0,06 g/l. Về cảm quan dịch quả được xử lý bằng enzyme pectinex có màu sắc sáng hơn, độ trong tốt hơn, mùi thơm đặc trưng hơn so với mẫu đối chứng (mẫu không sử dụng enzyme để phân giải pectin), độ nhớt của các mẫu thí nghiệm giảm rõ rệt.

3.11.3. Lên men malolactic, làm trong cưỡng bức để rút ngắn thời gian tàng trữ

Lựa chọn giống vi khuẩn có hoạt độ malolactic cao: Nuôi cấy cả 4 chủng giống vi khuẩn vào các bình tam giác 500 ml chứa môi trường PL10JR nuôi ở nhiệt độ 25 °C và theo dõi sự phát triển của chúng theo thời gian. Đo OD, xác định nồng độ sinh khối và HDMML tương đối của sinh khối vi khuẩn.

Chủng LF01 chỉ sau 3 ngày nuôi cấy trên môi trường lỏng OD đã đạt giá trị cực đại và giá trị cực đại này cũng cao hơn của 3 chủng còn lại. LF01 có nồng độ sinh khối cao nhất (4,99 g/l). Bên cạnh khả năng sinh trưởng và phát triển tốt chủng LF01 còn có HDMML tuyệt đối cao hơn các chủng khác, nếu coi HDMML của LF01 là 100,0 (%) thì của các chủng còn lại lần lượt là: 89,3; 90,5; và 85,2 (**Bảng 99**).

Bảng 99. Ảnh hưởng của thời gian nuôi đến OD của 4 chủng vi khuẩn trên môi trường PL10JR

Thời gian (ngày)	OD			
	LF01	LF02	LF03	LF04
0	0,080	0,090	0,060	0,080
1	0,5320	0,4972	0,4254	0,4370
2	0,8886	0,8103	0,7156	0,7985
3	1,1006	1,0097	0,8532	0,8671
4	0,9845	0,9103	1,0007	1,0054
5	0,7820	0,7268	0,8015	0,7950

Bảng 100. HĐML tương đối của sinh khối các loại vi khuẩn sau 3 ngày nuôi trong bình tam giác 500 ml

Chỉ tiêu phân tích	<i>Leuconostoc oenos</i>			
	LF01	LF02	LF03	LF04
Sinh khối ẩm (g/l)	4,99	4,3	3,88	4,104
OD (600 nm)	1,1006	1,0097	0,8532	0,8671
HĐML tuyệt đối (g/ g tế bào ẩm/ h)	0,240	0,214	0,217	0,204
HĐML tương đối (%)	100,0	89,3	90,5	85,2

Như vậy các kết quả trên đã cho thấy rằng chủng LF01 là tốt nhất trong số 4 chủng vi khuẩn, không những phát triển nhanh trên môi trường lỏng mà còn có HĐML cao nhất. Vì thế chọn chủng LF01 để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo. Ảnh hưởng của nồng độ cồn tới sinh trưởng của LF01: Do nồng độ cồn etylic trong vang thường là 12 -15% v/ v nên trong loạt thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của cồn tới sinh trưởng của chủng LF01 chúng tôi sử dụng môi trường cơ bản có bổ sung cồn theo nồng độ lần lượt là: 0, 5, 10, 12, 15 (% v/ v) (**Bảng 100**).

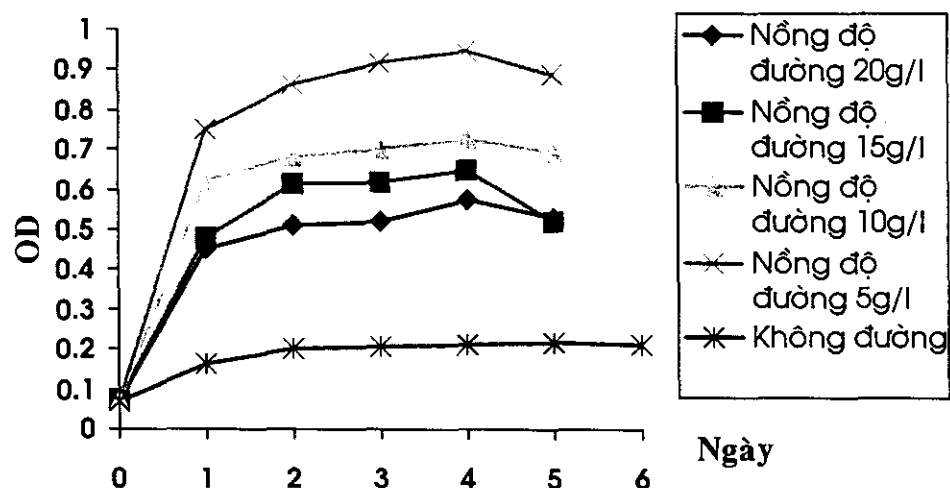
Các số liệu cho thấy tại nồng độ cồn thấp (0 - 5% v/ v) giá trị OD của LF01 đều đạt cực đại sau 4 ngày nuôi cấy, còn tại các nồng độ cồn cao (10; 12; 15% v/ v) thì giá trị OD và sinh khối sau 5 ngày mới đạt cực đại. Như vậy rõ ràng nồng độ cồn cao đã kéo dài giai đoạn tiềm phát của vi khuẩn. Hơn thế, giá trị OD cực đại ở nồng độ cồn thấp cao hơn rất nhiều so với nồng độ cồn cao (OD 1,0330 ở 5% v/v và 0,6415 ở 10% v/ v). Rõ ràng là nồng độ cồn không những làm cho vi khuẩn phát triển chậm mà còn ức chế khả năng phát triển tối đa của chúng. Độ cồn có tác dụng ức chế khả năng tạo sinh khối của LF01. Vì vậy muốn thu sinh khối tốt nhất thì trong môi trường dinh dưỡng không nên có cồn với nồng độ vượt quá 5% v/ v (**Bảng 101**).

Bảng 101. Ảnh hưởng của nồng độ cồn đến OD của LF 01

Thời gian (ngày)	Nồng độ cồn (% v/ v)				
	0	5	10	12	15
0	0,0600	0,0400	0,0300	0,0400	0,0250
1	0,8145	0,7785	0,3455	0,2525	0,2390
2	1,0020	0,9455	0,5650	0,4050	0,3700
3	1,0190	1,0090	0,6010	0,5011	0,4445
4	1,1030	1,0330	0,6230	0,5710	0,4650
5	0,9841	0,9581	0,6415	0,5910	0,4930
6			0,5650	0,5240	0,4425

Ảnh hưởng của chủng loại và nồng độ đường: Đường nho chủ yếu là fructoza và glucoza, trong đó glucoza chiếm 56,67-65,60 g/ l và fructoza 48,52-58,87 g/ l. Vì thế chúng tôi đã khảo sát ảnh hưởng của nồng độ đường cũng như ảnh hưởng của từng loại đường hoặc hỗn hợp hai loại đường trên tới sự phát triển của LF01 nhằm tìm ra một môi trường có thành phần và nồng độ đường phù hợp nhất cho việc thu sinh khối của chủng này. Khi môi trường chỉ có riêng rẽ từng loại đường thì OD sau 5 ngày mới đạt cực đại. Ngược lại khi có cả hai loại đường thì chỉ sau 4 ngày đã đạt cực đại và đạt cao hơn hẳn các trường hợp khác. Như vậy môi trường đường hỗn hợp có ảnh hưởng kích thích sinh trưởng của chủng vi khuẩn này cả về thời gian và khả năng phát triển tối đa.

Hình 59. Ảnh hưởng của nồng độ đường tới OD của chủng LF01



Như vậy môi trường thích hợp nhất cho sự sinh trưởng của LF01 là môi trường có hỗn hợp hai loại đường glucoza và fructoza với nồng độ không quá 10 g/ l.

Ảnh hưởng của axit D, L-malic: Chúng ta đã biết axit malic là một chất cảm ứng cho quá trình tạo enzym malolactic của vi khuẩn *Leuconostoc oenos*, vì vậy đây là

một thành phần cần thiết trong môi trường dinh dưỡng, tuy nhiên cần khảo sát để tìm được nồng độ thích hợp của axit malic trong môi trường để không gây ức chế quá trình sinh trưởng của vi khuẩn. Có thể thấy rằng để thu sinh khối vi khuẩn tốt nhất nên chọn nồng độ axit malic trong môi trường không quá 10 g/l.

Bảng 102. Ảnh hưởng của nồng độ axit D,L- malic tới OD của LF 01

Thời gian (ngày)	Không có axit malic	D,L- Malic 5 g/l	D,L -Malic 10 g/l	D,L- Malic 20 g/l
0	0.0200	0.0200	0.0250	0.0100
1	0.5655	0.5310	0.4500	0.2625
2	0.6900	0.6525	0.6750	0.3765
3	0.7590	0.7500	0.7552	0.4103
4	0.8010	0.8250	0.8137	0.4500
5	0.8624	0.8526	0.8250	0.4800
6	0.7951	0.8025	0.8325	0.4950
7			0.8475	0.5130
8			0.8501	0.5295

Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy: Nhiệt độ nuôi cấy ảnh hưởng khá lớn đến sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn thể hiện ở giá trị cực đại của OD. Tại nhiệt độ 25 °C sự phát triển của vi khuẩn là tốt nhất. Vì vậy có thể chọn nhiệt độ 25 °C làm nhiệt độ nuôi cấy thu sinh khối cũng như thực hiện quá trình lên men malolactic (**Bảng 103**).

Bảng 103. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới sự phát triển của LF- 01

Thời gian (ngày)	15 °C	20 °C	25 °C	30°C
0	0.082	0.082	0.082	0.082
1	0.342	0.438	0.600	0.6735
2	0.468	0.579	0.6765	0.789
3	0.615	0.7815	0.885	0.849
4	0.798	0.840	0.8865	0.855
5	0.7965	0.7935	0.8400	0.843
6	0.7395	0.7845	0.834	0.840

3.11.4. Ứng dụng kỹ thuật cố định tế bào *Leuconostoc oenos* LF01.

Phương pháp lên men malolactic nhờ tế bào vi khuẩn cố định trong hạt Ca-alginat có nhiều ưu điểm như giúp cho quá trình lên men malolactic không ảnh hưởng đến giai đoạn làm trong của vang do các tế bào được nhốt trong các hạt gel và dễ dàng tách ra khỏi dịch sau khi quá trình được hoàn thành, đặc biệt khả năng tái sử dụng của các hạt tế bào cố định sẽ mang lại hiệu quả kinh tế do giảm bớt công đoạn nhân giống vi khuẩn.

Vì pH của vang thường không cao hơn 4,5 nên chúng tôi không khảo sát tiếp các giá trị pH cao hơn. Trong thí nghiệm của chúng tôi, HĐML tuyệt đối tương ứng là 0,0631; 0,0594; 0,0570 và 0,0561 g D,L- malic/ g tế bào ẩm/ h. Như vậy trong khoảng pH nghiên cứu thì pH 4,5 cho HĐML cao nhất (**Bảng 104**).

Bảng 104. Dư lượng axit D, L-malic (g /l) sau thời gian phản ứng tại pH khác nhau

Thời gian phản ứng(ngày)	pH			
	3,1	3,5	4,0	4,5
0	24	24	24	24
1	7,18	6,9	6,17	5,06
2	6,85	5,47	4,56	4,39
3	6,72	5,06	4,29	4,39
4	6,38	5,16	4,39	4,49

Ảnh hưởng của nhiệt độ lên men đến HĐML của các hạt cố định: Điều đáng mừng là lên men malolactic của LF01 hoạt động tốt trong khoảng nhiệt độ khá rộng, từ 16-35°C, điều này không gây cản trở cho việc thực hiện quá trình lên men malolactic tại những nước có khí hậu thay đổi nhiều như nước ta.

Bảng 105. Dư lượng axit D,L-malic sau thời gian phản ứng tại các nhiệt độ khác nhau của các hạt cố định LF01

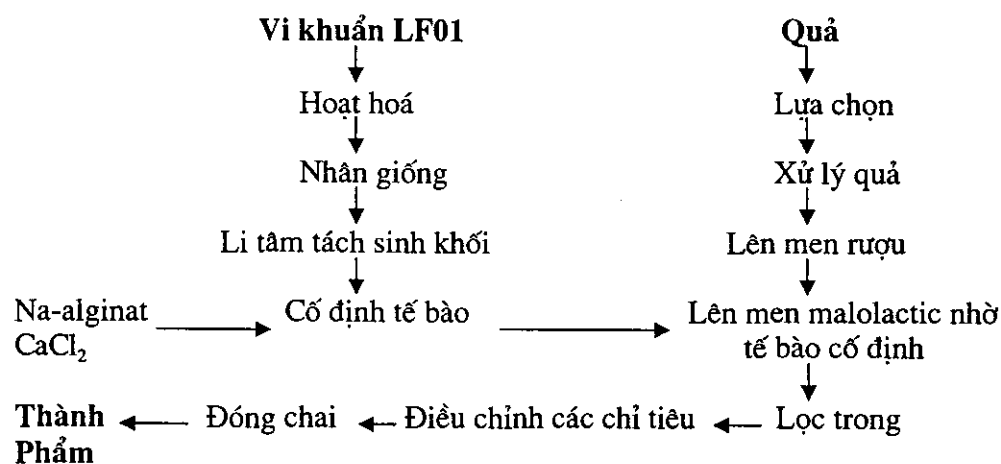
Thời gian phản ứng (h)	Nhiệt độ phản ứng (°C)		
	16	25	35
0	18,14	18,14	18,14
16	7,515	5,50	7,006
24	6,676	4,15	5,595
Độ trong của dịch	trong	trong	trong
Tế bào vi khuẩn	không có	không có	không có

Lên men malolactic nhờ các tế bào *L. oenos* LF01 cố định trong hạt *Ca-alginat*: Chúng tôi đã thí nghiệm theo hai cách: Cách thứ nhất cho 50 gam hạt xúc tác vào 50 ml vang sau lên men rượu đã lọc trong, giữ ở 25 °C trong 16 giờ rồi phân tích sự thay đổi nồng độ của hai axit hữu cơ chính là D,L-malic và axit lactic. Cách thứ hai cho 800 g hạt cố định LF01 (HĐML trung bình khoảng 0,05 g/ g tế bào ẩm/ h) vào bình 1200 lít của Bioflo rồi bơm vang non (chứa 2,75g/ l D,L-malic) vào bình để chuyển hoá axit D,L-malic theo phương pháp lên men liên tục; nhiệt độ lên men 25 °C, nồng độ tế bào ẩm trong hạt là 5%, 5 giờ đầu tiên không bổ sung, sau đó bổ sung vang non với tốc độ 2,65 ml/ ph (theo tính toán tốc độ thích hợp dựa trên tổng lượng tế bào tham gia phản ứng, nồng độ axit D,L-malic trong vang non và thời gian tiếp xúc dự kiến là 5 giờ). Phân tích vào các thời điểm 0, 5, 10, 16, 24, 48, 72, 96 (**Bảng 106**).

Bảng 106. Thành phần vang trước và sau khi phản ứng với LF01 cố định trong hạt *Ca-alginat*

Các chỉ tiêu phân tích	Trước phản ứng	Sau phản ứng
Cồn (%)	11,8	12,0
Axit D,L-malic (g/ l)	4,0	không
Axit lactic	1,0	3,95
pH	3,89	4,05
Vị của vang	chua gắt	chua dịu

Số liệu bảng 107 chỉ ra rằng hạt cố định LF01 phản ứng rất tốt theo kiểu lên men liên tục đối với axit D,L-malic trong vang non: Chỉ sau 16 giờ tiếp xúc vang non đã không còn dấu vết của axit malic, vị dịu.



Hình 60. Sơ đồ quy trình công nghệ lên men malolactic nhờ vi khuẩn cố định trong *Ca-alginat*

Với điều kiện hiện nay ở Việt Nam thì công nghệ cố định tế bào vẫn chưa thực sự dễ dàng áp dụng trong sản xuất đại trà vì thế chúng tôi tiếp tục nghiên cứu công nghệ lên men malolactic nhờ tế bào tự do để có thể áp dụng vào thực nghiệm ở quy mô pilot.

3.11.5. Nghiên cứu hoàn thiện công nghệ lên men rượu vang chất lượng cao và chuyển giao công nghệ cho sản xuất

Do có những đặc điểm ưu việt, chủng nấm men FD-H3 (FD 101-1-68 x FD 377-3-32) đã được ứng dụng trong sản xuất rượu vang vải tại xưởng thực nghiệm, Viện công nghiệp thực phẩm, Công ty Bia HABADA (Bắc Giang) và Công ty Bia-Nước giải khát Hải Dương với các điều kiện công nghệ tối ưu đã được xác định ở trên. Bảng 3.15 trình bày các thông số kỹ thuật và chỉ tiêu hoá lý, vi sinh vật kết hợp với đánh giá cảm quan của sản phẩm rượu vang vải tại 3 cơ sở này. Kết quả thực nghiệm tại Công ty Bia HABADA (Bắc Giang) và Công ty Bia, Nước giải khát Hải Dương đã khẳng định những đặc tính ưu việt của chủng nấm men rượu vang FD-H3. Chủng FD-3, đã hoàn toàn thay thế chủng nấm men rượu vang cũ mà trước đây Công ty Bia nước giải khát Hải Dương sử dụng. Chủng này chỉ lên men tạo được từ 6- 8%v cồn. Do vậy phải bổ xung độ cồn vào để nâng độ rượu trong sản phẩm lên đến hàm lượng mong muốn. Với chủng nấm men FD-H3, hàm lượng rượu trong sản phẩm được hình thành hoàn toàn là do quá trình lên men nên khi uống có độ êm dịu, hấp dẫn, quyến rũ. Đối với Công ty Bia HABADA, công nghệ hiện đại và chủng nấm men FD-H3 đã tạo nên rượu vang HABADA chất lượng cao, sản lượng tăng và có mặt ở nhiều tỉnh vùng Đông Bắc.

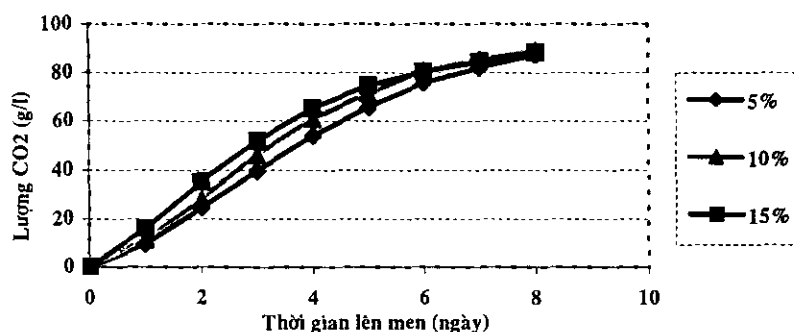
Bảng 107. Các chỉ tiêu chất lượng của sản phẩm

TT	Các chỉ tiêu	Đơn vị	Chất lượng sản phẩm của công ty		
			Viện CNTP	Công ty HABADA	Công ty Bia NGK Hải Dương
1	Thời gian lên men	ngày	9	10	9
2	Nhiệt độ lên men	°C	22	20	20
3	Hàm lượng đường ban đầu	g/l	260	260	260
4	Tỷ lệ tiếp giống	Tế bào/ml	15x10 ⁶	14x10 ⁶	15x10 ⁶
5	Hàm lượng đường sót	g/l	5,5	7,4	6,3
6	Hiệu suất lên men	%	96,6	95,2	95,7
7	Hàm lượng cồn	%V	14,83	14,65	14,77
8	Hàm lượng axit (tính theo axit lactic)	g/l	5,5	5,3	5,5
9	Độ trong (sau 30 ngày)	OD _{600nm}	0,119	0,138	0,125

Công nghệ lên men bổ sung dịch đường nâng cao độ rượu và chất lượng rượu vang: Năng lực lên men của 14 chủng nghiên cứu được đánh giá dựa trên thời gian tạo ra 5 ml CO₂. Theo dõi thời gian tạo 5 ml CO₂ trong bình Einhorn.

5 chủng: 7061, 7043, M, V và 28 có thời gian tạo ra 5 ml CO₂ là nhanh nhất. Vì vậy, đã được chọn để tiếp tục nghiên cứu khả năng lên men cồn và hương vị.

Khả năng tạo cồn và sinh hương của 5 chủng chọn lựa: Theo dõi tốc độ lên men của 5 chủng 7028, 7061, 7043, M và V phân tích độ cồn, độ đường và axit sau lên men cho thấy chủng 7028 lên men mạnh, giai đoạn tiềm phát ngắn, có khả năng sinh cồn cao nhất tuy nhiên có vị hơi đắng. Chủng 7043 tuy độ rượu kém hơn chủng 7028 nhưng sản phẩm rượu sau lên men có mùi thơm đặc trưng, độ ngọt và độ chua hài hoà và không có vị đắng. Chủng 7043 được lựa chọn cho những nghiên cứu tiếp theo.



Hình 61. Ảnh hưởng của tỷ lệ men giống đến tốc độ lên men

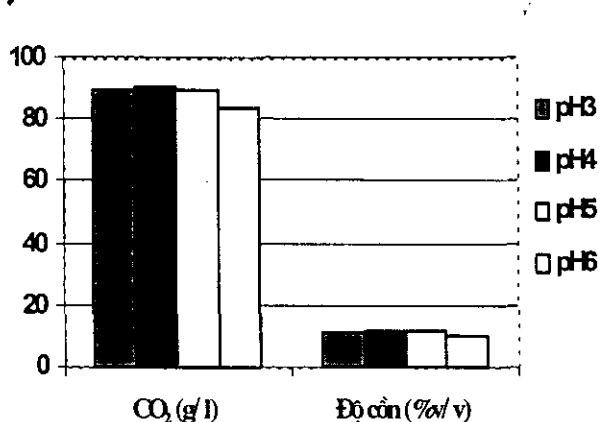
Từ kết quả trên (hình 61) nhận thấy: Tỷ lệ giống 15% giai đoạn tiềm phát được rút ngắn, quá trình lên men nhanh, lượng cồn tạo ra nhiều hơn. Song lên men nhanh rượu vang kém thơm. Tỷ lệ giống 5% và 10% rượu vang có mùi, vị tốt. Tuy nhiên với tỷ lệ men giống 10% tốc độ lên men nhanh hơn cũng phần nào hạn chế được nhiễm trùng. Do vậy, điều kiện tiếp giống 10% là tối ưu nhất.

Ảnh hưởng của nồng độ đường đến quá trình lên men: Ảnh hưởng của nồng độ đường đến quá trình lên men được tiến hành trong bình tam giác 500ml có chứa 300ml dịch nho nồng độ: 18%, 20%, 22% và 25%. Tiếp 10% giống đã được hoạt hoá bằng môi trường nhân giống (3) trong 24 giờ. Lên men ở nhiệt độ 28 °C. Khi tăng nồng độ dịch nho từ 18% - 22%, độ cồn trong rượu tăng tỷ lệ thuận với nồng độ dịch nho. Tuy nhiên xét về mặt hiệu suất lên men, khi nồng độ chất khô của dịch đường tăng thì hiệu suất lên men giảm. Điều này có thể giải thích nồng độ đường cao đã gây ức chế đến trao đổi chất qua màng tế bào nấm men. Nồng độ đường trong dịch nho là 22%

cho độ rượu cao, rượu có hương thơm, chua dịu, vị hài hoà. Vì vậy nồng độ dịch nho được lựa chọn là 22%.

Ảnh hưởng của pH đến quá trình lên men: Thí nghiệm được tiến hành trong bình tam giác dung tích 500 ml. Mỗi bình chứa 300 ml dịch nho 20 °Bx, pH lần lượt thay đổi là: 3, 4, 5 và 6. Giống được hoạt hoá trong môi trường nhân giống (3) trong 24 giờ. Tiếp giống 10%, lên men ở nhiệt độ 28 °C. Tốc độ lên men được đánh giá dựa trên sự giảm trọng lượng bình theo thời gian. Phân tích độ cồn, đường sót axit sau lên men (Hình 62).

Nghiên cứu động học của quá trình lên men rượu của chủng 7043:



Hình 62. Ảnh hưởng của pH đến quá trình lên men của chủng Y-7043

Từ những nghiên cứu trên điều kiện tối ưu nhất cho quá trình lên men rượu vang được xác định như sau:

- Tỷ lệ giống: 10%
- Nồng độ chất khô : 22%
- Tỷ lệ dịch nho: 60%
- pH dịch lên men: 4
- Nhiệt độ lên men: 25°C

Thí nghiệm được tiến hành trong bình tam giác 500 ml. Tiếp 10% giống đã được hoạt hoá trong môi trường nhân giống (3) và nuôi cấy lắc trong 24 giờ. Lên men ở nhiệt độ 25 °C.

Lên men bổ sung: Kết quả bảng 108 cho thấy chủng Y- 7043 khi lên men ở 25°C tại thời điểm 24 giờ tốc độ sinh CO₂ đạt cực đại (1.3 g/l/giờ) và tốc độ sử dụng đường khử đạt cũng đạt cực đại (4.17 g/l/giờ), tốc độ sinh cồn đạt cực đại (0,25 độ/giờ) tại thời điểm 33 giờ. Điều đó cho thấy quá trình lên men diễn ra mạnh nhất trước khi nguồn cơ chất cacbon cạn kiệt.

Để tiến hành lên men bổ sung, trước tiên chúng tôi xác định thời điểm “ổn định tương đối” (queasy- steady- state) mà chúng tôi muốn duy trì đối với sự lên men. Để xác định thời điểm “ổn định tương đối” mà ở đó sự lên men có thể cho độ rượu cao nhất, chúng tôi chọn ra 3 thời điểm ở gần thời điểm Q_{cồn} maximum. Tiến hành lên men bổ sung tương ứng với trạng thái Q_{cồn} lựa chọn. Khi kết thúc quá trình lên men, dựa vào kết quả phân tích độ cồn của rượu thu được mà xác định chế độ bổ sung dịch cho phù hợp. Dịch lên men được bổ sung dịch với tốc độ không đổi. Chúng tôi chọn ra Q_{cồn} tại

24, 30 và 36 giờ có các giá trị gần với $Q_{\text{cồn}}$ maximum là 0,25 (độ/ giờ). Ở thời điểm này hệ lên men có các giá trị $Q_{\text{đường}}$ tương ứng là 4.17, 3.7 và 1.7 (g/l giờ).

Thí nghiệm lên men bổ sung được tiến hành trong bình 2 lít, có chứa 1,5 lít dịch lên men. Nhiệt độ lên men 25 °C, pH 4, sirô nho có nồng độ đường là 480 g/l. Khoảng thời gian giữa 2 lần tiếp dịch là 6 giờ (**Bảng 108 và 109**).

Bảng 108. Đặt thí nghiệm cho lên men có bổ sung

<i>Các chỉ số lên men bổ sung</i>	<i>Bình 1</i>	<i>Bình 2</i>	<i>Bình 3</i>
Thể tích dịch ban đầu, (lit)	1.5	1.5	1.5
Thời điểm bắt đầu bổ sung	24 giờ	30 giờ	36 giờ
Trạng thái ổn định tương đối với $Q_{\text{đường}}$ (g/l/ giờ)	1,7	3,7	4,17
Tốc độ tiếp dịch ban đầu (l/giờ)	0,005	0,012	0,013
Thể tích dịch tiếp lần 1, ΔV_1 (lit)	0,032	0,069	0,078
Thể tích dịch tiếp lần 2, ΔV_2 (lit)	0,032	0,069	0,078
Thể tích dịch tiếp lần 3, ΔV_3 (lit)	0,032	0,069	0,078
Thể tích dịch tiếp lần 4, ΔV_4 (lit)	0,032	0,069	0,078
Thể tích dịch tiếp lần 5, ΔV_5 (lit)	0,032	0,069	0,078
Thể tích dịch tiếp lần 6, ΔV_6 (lit)	0,032	0,069	0,078
Tổng thể tích dịch bổ sung (lit)	0,192	0,414	0,468

Bảng 109. Ảnh hưởng của lên men bổ sung sirô nho đến nồng cồn của rượu vang

Thời điểm sau khi lên men bổ sung bắt đầu (giờ)	Nồng độ cồn (%v/v)					
	Lần thí nghiệm thứ nhất			Lần thí nghiệm thứ hai		
	<i>Bình 1</i>	<i>Bình 2</i>	<i>Bình 3</i>	<i>Bình 1</i>	<i>Bình 2</i>	<i>Bình 3</i>
0	11.28	11.14	11.12	11.17	10.85	10.95
6	11.05	10.26	11.04	10.49	11.19	11.33
12	10.24	10.08	9.63	9.15	10.46	9.89
18	11.28	10.86	10.76	9.91	11.70	10.73
24	12.72	12.41	11.82	11.01	13.00	12.54
30	13.56	14.07	13.00	11.43	14.02	12.95
36	13.88	14.21	13.56	11.11	14.22	12.68

Kết quả bảng 110 cho thấy: Trong 2 đợt thí nghiệm độ cồn ở bình 2 (bổ sung dịch quả sau 30 giờ lên men) luôn đạt giá trị cao nhất (14.21 - 4,22% v/ v). Nếu lên men theo mẻ ở độ cồn trong rượu chỉ đạt cao nhất là 12,57% v/ v thì phương pháp lên men bổ sung cho phép tăng độ cồn lên 14,22 % v/ v. Vậy thời điểm bổ sung thích hợp nhất là sau 30 giờ lên men (Bảng 110).

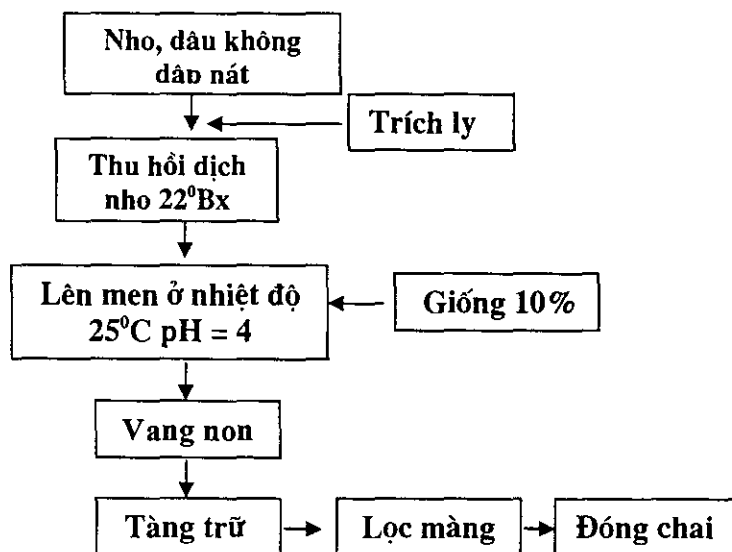
Bảng 110. Các chỉ tiêu chất lượng chủ yếu của sản phẩm rượu vang

Mẫu lên men	Cồn (% v/v)	Đường dư (g/l)	Axit tổng (g/l) theo a. lactic	Màu sắc OD ($\lambda = 420\text{nm}$)	Cảm quan
Bổ sung	14,2	9,2	4,82	0,2	Hương thơm, vị hài hoà
Không bổ sung	12,57	6,6	4,43	0,18	Hương thơm, vị hài hoà

Bảng 111. Đánh giá chất lượng rượu vang sản xuất thực nghiệm quy mô 5000 lít

Các chỉ tiêu	Vang dâu	Vang nho
Hàm lượng cồn (% v/v)	14,2	14,9
Hàm lượng đường (g/l)	9,2	9,2
Axit tổng (g/l) (tính theo a. lactic)	4,8	4,91
Aldehyt (mg/l)	26	24
Etylaxetat (mg/l)	45	50
Màu sắc	Màu đỏ hơi sẫm	Màu vàng sáng
Độ trong ($\lambda = 510\text{ nm}$)	ABS = 1,18	ABS = 0,58
Cảm quan	Hương thơm, vị hài hoà	Hương thơm, vị hài hoà, chất rõ.

Thực nghiệm được tiến hành với hai loại dịch quả là dịch dâu và dịch nho. Dịch nho (hoặc dịch dâu) sau ép pha về 22 °Bx, pH 4, tỷ lệ giống tiếp 10%, lên men ở 25 °C, sau 30 giờ lên men bổ sung dịch quả. Sau khi kết thúc lên men, tách men. Rượu sau khi lên men chính được phân tích các chỉ số về độ cồn, hàm lượng đường dư, axit tổng và cảm quan (**Bảng 111**).



Hình 63. Quy trình sản xuất vang quả

IV. TỔNG QUÁT HOÁ VÀ ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ THU ĐƯỢC

Báo cáo tổng kết khoa học và kỹ thuật đề tài cấp Nhà nước: "*Nghiên cứu ứng dụng công nghệ enzym trong chế biến một số nông sản thực phẩm*", mã số: KC04-07 được xây dựng trên cơ sở tóm tắt 16 báo cáo tổng kết của 16 đề tài nhánh, với tổng số 917 trang, 241 bảng, 169 hình, 498 tài liệu tham khảo và các phụ lục kèm theo.

Sau 3 năm thực hiện, với sự cố gắng lao động cần cù và sáng tạo của 16 Phó giáo sư, Tiến sỹ, Thạc sỹ, Chủ nhiệm đề tài và đề tài nhánh, các cộng tác viên là nghiên cứu viên, kỹ sư, cử nhân và kỹ thuật viên đã đạt được một số kết quả sau đây:

1. Đã sử dụng kết hợp các phương pháp truyền thống và hiện đại, các phương pháp kỹ thuật gen, công nghệ vi sinh, enzym, lên men, các phương pháp hoá học, toán học, thử độc tính, đánh giá cảm quan, xây dựng tiêu chuẩn, đã đem lại các kết quả có độ tin cậy cao.

2. Đề tài đã thu được các kết quả vừa có tính chất nghiên cứu cơ bản, vừa có kết quả nghiên cứu ứng dụng. Đã xây dựng 22 quy trình công nghệ, xây dựng 5 mô hình thiết bị sản xuất thử nghiệm, tiếp cận, tư vấn đầu tư, ký 10 hợp đồng nguyên tắc và hợp đồng chuyển giao công nghệ trị giá 1.353 triệu đồng cho sản xuất.

Một số sản phẩm mới tạo ra ở quy mô sản xuất công nghiệp ổn định về công nghệ được các doanh nghiệp đón nhận như: Siro fructoza, nước quả trong, cô đặc, tinh dầu hạt tiêu, dầu béo giàu axit béo không no, rượu vang chất lượng cao.

3. Trong quá trình thực hiện đề tài, có 8 Tiến sỹ và 4 Thạc sỹ đã và sẽ bảo vệ thành công luận án tốt nghiệp mà nội dung luận án là nội dung hoặc là một phần nội dung của đề tài. Trong đó có nghiên cứu sinh làm luận án Tiến sỹ kỹ thuật là người nước ngoài, 5 người được Hội đồng chấm luận án Tiến sỹ và Thạc sỹ cấp Nhà nước đánh giá xuất sắc. Đã công bố 47 công trình khoa học trong đó có 14 công trình công bố ở nước ngoài và Hội thảo Quốc tế và khu vực. Có 4 Hồ sơ đăng ký Bảo hộ sáng chế và giải pháp hữu ích tại Cục Sở hữu trí tuệ, Bộ Khoa học và công nghệ.

4. Thành công lớn nhất của đề tài là đã hoàn thành các nội dung, tạo ra các sản phẩm có chất lượng, các kết quả nổi bật là: Tuyển chọn 16 chủng vi sinh vật, bao gồm 13 chủng có nguồn gốc tự nhiên và 2 chủng tái tổ hợp ADN, 1 chủng nấm men lai. Các chủng vi sinh vật có khả năng khác nhau: Sinh tổng hợp 9 loại enzym và đã ứng dụng enzym để tạo ra 27 mẫu sản phẩm hàng hoá mới. Đặc biệt là công nghệ sản xuất rượu vang chất lượng cao đạt độ rượu trên 14% thay thế công nghệ rượu vang phải bổ sung cồn, với sản lượng

rượu vang trên 146.830 lít và các sản phẩm khác được doanh nghiệp đón nhận. Đã chuyển giao công nghệ sản xuất đường fructoza 2.000 kg/ ngày. Đề tài có nội dung là vượt mức yêu cầu ghi trong thuyết minh như sinh tổng hợp và ứng dụng lipaza. Đề tài có những sản phẩm mới lần đầu được sản xuất đó là: Enzym tinh khiết, siro fructoza, đồ uống từ đậu tương, đại mạch nảy mầm, từ rau, nước quả lên men, viên nang Hypochol, tinh dầu hạt tiêu. Về chất lượng sản phẩm đã đạt được các chỉ tiêu chất lượng và vệ sinh an toàn thực phẩm.

5. Những nội dung cần tiếp tục nghiên cứu hoàn thiện: Một số sản phẩm từ chủng vi sinh vật tái tổ hợp ADN mã hoá sinh tổng hợp enzym β - galactosidaza, collagenaza, cần tiếp tục nghiên cứu nâng cao hiệu quả và bảo đảm vệ sinh an toàn thực phẩm. Đồ uống mới từ hạt nảy mầm, từ rau, nước quả lên men cần tiếp tục nghiên cứu hoàn thiện công nghệ, xác định hiệu quả kinh tế, tiếp cận sản xuất, giới thiệu công nghệ và chuyển giao công nghệ.

Kiến nghị:

Đề nghị Hội đồng khoa học công nghệ cấp Nhà nước, Bộ khoa học công nghệ, Bộ chủ quản, Cơ quan chủ trì đề tài và đề tài nhánh:

1. Cho phép các chủ nhiệm đề tài nhánh được chuyển giao công nghệ cho sản xuất các sản phẩm nào đã hoàn thiện công nghệ, đã được ký hợp đồng nguyên tắc và hợp đồng chuyển giao công nghệ.

2. Tạo điều kiện thuận lợi để các chủ nhiệm đề tài nhánh tiếp tục hoàn thiện công nghệ, xác định hiệu quả kinh tế, tiếp cận sản xuất tham gia Dự án sản xuất thử nghiệm và chuyển giao công nghệ cho sản xuất.

PHẦN V. KẾT LUẬN

5.1. Nghiên cứu thu nhận chế phẩm β -glucosidaza và ứng dụng trong khai thác hương liệu nhằm tăng hương cho một số loại đồ uống:

5.1.1. Phân lập và tuyển chọn chủng vi sinh vật: Từ 12 chủng nấm mốc có nguồn gốc từ nước ngoài đã tuyển chọn chủng *Apergillus niger* PBC sinh tổng hợp β -glucosidaza với hiệu suất cao nhất.

5.1.2. Đã tìm được điều kiện tối ưu sinh tổng hợp và thu nhận enzyme có hiệu suất cao: Đã dùng chủng chọn *A. niger* PBC, dùng hệ thống lên men 2 lít với các thông số chính: Glucoza (2 g/ l), bã mía (8 g/ l), cao nấm men (0,5), vỏ cam (0,5), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,5), $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0,2), MgSO_4 (0,2), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,1), $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,001), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,001), tốc độ khuấy 100 vòng/ phút, độ sục khí 60% độ bão hoà, lượng giống 5%, ở 30 °C và pH đầu = 5,5. Sau 4 ngày đạt 3,5 U/ ml.

5.1.3. Đã xây dựng quy trình công nghệ thu nhận β -glucosidaza từ nấm mốc *A. niger* PBC: Sử dụng phối hợp kết tủa cồn 75%, sắc ký lọc gel Sephadex G-75 và sắc ký trao đổi ion DEAE xenluloza A-50 đã thu được chế phẩm β -glucosidaza có hoạt độ riêng đạt 44,05 U/ mg với độ tinh sạch gấp 80 lần và hiệu suất thu hồi đạt 40%. Đã xác định được một số đặc tính của chế phẩm β -glucosidaza từ *A. niger* PBC: Nhiệt độ 60 °C, pH = 4-5 không bị ảnh hưởng bởi một số các ion kim loại, có phổ cơ chất rộng bị ức chế bởi glucoza (hoạt độ giảm 70% khi hàm lượng đường 15g/ l), hoạt độ tăng khi có mặt của etanol (tăng 30% khi nồng độ etanol là 14%). Hỗn hợp CMC và benzoat natri (tỷ lệ 1:2) được chọn bảo quản chế phẩm enzyme. Sau gần 2 tháng bảo quản hoạt độ enzyme còn giữ được tới 95%.

Đã xây dựng được quy trình tách chiết β -glucosidaza từ nhân hạt mơ: Nhân hạt xay thô, đồng hoá siêu tốc 11.000 vòng/ phút, trích ly bằng đệm xitrat 0,1M; pH 5,4 ở 30 °C trong 8 giờ. Hàm lượng enzyme trong nhân hạt đạt khoảng 528 U/ g nhân hạt. Enzyme thu nhận bằng cồn 70% đạt hiệu suất thu hồi 92%. Khi kết hợp sắc ký lọc gel Sephadex G75 và G150 cho chế phẩm có độ tinh sạch gấp 45 lần chế phẩm ban đầu. Đã xác định được chế độ chần mơ thích hợp đảm bảo cho độ bền của chế phẩm enzyme và chất lượng cảm quan của dịch quả: 100 °C trong 2 phút. Enzyme hoạt động trong khoảng nhiệt độ 35-60°C, bền ở nhiệt độ dưới 60 °C, pH 4,8 - 6,4.

5.1.4. Nghiên cứu ứng dụng chế phẩm enzyme β -glucosidaza: Đã đạt được kết quả khử đắng cho các sản phẩm mơ, nước quả trong: Lượng enzyme 2,94U/ l dịch trong 4

giờ ở 50 °C và Necta mơ: 5,88 U/ l dịch trong 2 giờ ở 50 °C. Hương thơm của rượu vang thành phẩm được cải thiện khi enzym được bổ sung vào công đoạn lên men phụ rượu vang với tỷ lệ 60 U/ lit dịch lên men.

5.2. Nghiên cứu phân lập, tuyển chọn và tạo chủng giống bằng kỹ thuật di truyền để sinh tổng hợp enzym β -galactosidaza có hiệu suất cao:

5.2.1. Đã phân lập hệ gen *LacZ* từ *E. coli* ATCC 11105, đã thiết kế vector pET *LacZ* và đã nhân lên bằng kỹ thuật PCR.

5.2.2. Đã biến nạp gen *LacZ* vào *E. coli* BL21 để tạo chủng tái tổ hợp mang vector pET 22b *LacZ* mã hoá sinh tổng hợp β -galactosidaza cao. Đã tinh sạch β -galactosidaza bằng phương pháp sắc ký ái lực, xuất hiện một băng protein duy nhất 116kD và nồng độ enzym đạt 0,0424 - 0,05 mg/ ml.

5.2.3. Đã nghiên cứu xác định điều kiện công nghệ tối ưu sản xuất chế phẩm β -galactosidaza từ các chủng vi sinh vật như: Vi khuẩn tự nhiên *Sphingomonas paucimobilis* BK16, nấm mốc *A. aculeatus* BK-M₄ và *P. implicatum* BK- M₁₂. Phương trình toán học tối ưu hoá cho quá trình lên men sử dụng chủng *S. paucimobilis* BK-16 là: $Y = 5317,65 + 126,85.X_1 - 488,72.X_2 + 74,47.X_3$. Trong đó, Y là hoạt độ enzym (U/ ml), X₁ là hàm lượng lactoza bổ sung vào dịch thải phomat (g/l), X₂ là hàm lượng pepton + NH₄NO₃, X₃ là pH.

Đã xây dựng được quy trình công nghệ lên men, tách, tinh chế thu nhận chế phẩm enzym β -galactosidaza. Đã sử dụng chủng vi khuẩn *S. paucimobilis* BK16, lên men hiếu khí trên môi trường dịch thải phomat bổ xung thêm lactoza 15,4g/ l, pepton và NH₄NO₃ với nitơ tổng số 3,0g/ l, pH 7, tỉ lệ cấp giống 5%, nhiệt độ lên men 30°C và kết thúc quá trình sau thời gian lên men là 36 giờ. Hiệu quả tích tụ enzym trong thực tế đạt 6.420 MU/ ml.

5.2.4. Đã nghiên cứu ứng dụng β - galactosidaza trong sản xuất sữa, làm giảm hàm lượng lactoza trong sữa từ 69,73% xuống 7,93%.

5.3. Nghiên cứu phân lập, tuyển chọn và tạo chủng giống sinh tổng hợp enzym Collagenaza và ứng dụng trong thực phẩm.

5.3.1. Phân lập gen mã hóa sinh tổng hợp collagenaza bằng kỹ thuật PCR: Tách chiết và làm sạch ADN của *B. subtilis* FS-2 và kiểm tra trên gel điện di agarosa 0,8%. Đã thiết lập ngân hàng gen của *B. subtilis* FS-2, thiết kế vector pUC 18 mang các đoạn gen của *B. subtilis* FS-2 và nhân lên bằng kỹ thuật PCR. Đã xử lý vector pUC 18 bằng BamHI, đã xử lý ADN genom bằng enzym Sau 3AI. Đã đưa các đoạn gen của *B.*

subtilis FS-2 vào pUC18: Sau đó sản phẩm nối ghép gen được biến nạp vào *E. coli* DH5 α và xử lý các plasmid tách từ các thể biến nạp bằng các enzym hạn chế để kiểm tra kích thước của đoạn gen được chèn vào vectơ. Đã tạo được ngân hàng gen của *B. subtilis* FS-2 trong *E. coli* DH5 α .

5.3.2. Tìm điều kiện tối ưu để các chủng tái tổ hợp sản xuất enzym hiệu suất cao: Để khẳng định gen được chèn trong pUCCol mang gen mã hoá cho collagenaza, chúng tôi đã tách lại plasmid này và biến nạp lại vào trong tế bào *E. coli* DH5 α . Kết quả cho thấy: 100% các dòng tế bào biến nạp có khả năng thuỷ phân collagen.

5.3.3. Xây dựng quy trình thu nhận chế phẩm collagenaza:

Phân lập vi khuẩn có nguồn gốc tự nhiên sinh tổng hợp collagenaza: Từ 26 mẫu thực phẩm lên men truyền thống, đã phân lập 53 khuẩn lạc có tạo vòng thuỷ phân trên đĩa thạch collagen. Chỉ có 8/ 53 chủng thể hiện hoạt tính collagenaza. FS-2 được định tên bằng kit định tên. FS-2 là *Bacillus subtilis* với độ phù hợp tới 99,9%.

5.3.4. Đã xác định 1 quy trình thu nhận chế phẩm enzym tinh khiết và 2 quy trình thu nhận collagenaza kỹ thuật.

5.3.5. Nghiên cứu ổn định và bảo quản chế phẩm enzym collagenaza.

Trong số các chất ổn định là: CaCl₂ + đệm Tris-HCl 50 mM, tinh bột biến tính (TBBT), chitosan và polyvidon 25, glycerol, TBBT nồng độ 35% cho khả năng ổn định tốt nhất.

5.3.6. Nghiên cứu ứng dụng các chế phẩm enzym vào sản xuất.

Đã kiểm định tính an toàn chế phẩm enzym và đã thử nghiệm sản xuất một số sản phẩm từ thịt bò cấp thấp để làm mềm thịt. Sau xử lý 30-120 phút, hàm lượng nhóm -NH₂ của mẫu thử nghiệm tăng hơn so với mẫu đối chứng từ 167 đến 1.687 %. Chế phẩm enzym và FS-2 phân giải da cá làm tăng hàm lượng axit amin đáng kể so với mẫu đối chứng. Phân giải một số protein dị ứng: Kết quả thử nghiệm ELISA với sản phẩm phân giải bởi collagenaza sau 24 giờ, hàm lượng của cả gliadin và α_1 -casein đều cho giá trị nhỏ hơn 40 lần so với mẫu đối chứng.

5.4. Công nghệ và thiết bị chế biến nông sản bằng enzym.

5.4.1. Đã xây dựng được 22 qui trình công nghệ sinh tổng hợp, thu nhận, bảo quản và ứng dụng enzym: β -glucosidaza, β -galactosidaza, collagenaza, lipaza, fructosyltransferaza, từ các chủng vi sinh vật tự nhiên và chủng mới tái tổ hợp được

dùng trong chế biến nông sản thực phẩm như: Đồ uống mới từ hạt đậu tương nảy mầm, nước rau và nước quả lên men có độ cồn thấp.

5.4.2. Đã xây dựng 5 mô hình thiết bị, ứng dụng enzym ở qui mô xưởng thực nghiệm và sản xuất công nghiệp.

5.4.3. Đã chuyển giao công nghệ cho sản xuất qui mô công nghiệp.

- Sản xuất sirô fructoza sản lượng 2 tấn/ ngày tại Công ty Cổ phần Thực phẩm Minh Dương, Hà Tây.

- Sản xuất rượu vang vải tại xưởng thực nghiệm, Viện Công nghiệp thực phẩm, Công ty HABADA (Bắc Giang) và Công ty Bia, Nước giải khát Hải Dương với các điều kiện công nghệ tối ưu. Chuyển giao công nghệ sản xuất rượu vang cho Công ty Cổ phần Bia và Nước giải khát Hạ Long.

- Chuyển giao công nghệ xây dựng mô hình sản nước quả tươi tại Công ty Cổ phần thuốc lá và thực phẩm Bắc Giang và Công ty Thực phẩm xuất khẩu Đồng Giao.

- Sản xuất tinh dầu và nhựa dầu hạt tiêu: Đã ký hợp đồng nguyên tắc giữa đơn vị chuyển giao công nghệ là Viện Công Nghiệp Thực Phẩm và đơn vị nhận chuyển giao công nghệ là Công ty Tấn Hưng, Tân Kiên, Bình Chánh, thành phố Hồ Chí Minh với công suất 1.000 tấn nguyên liệu/ năm. Đã đăng ký tham gia Dự án: “Xây dựng mô hình khoa học công nghệ phục vụ phát triển nông thôn miền núi” về nội dung chế biến hạt tiêu bằng công nghệ enzym.

5.5. Hoàn thiện công nghệ và xây dựng mô hình thiết bị sản xuất sirô fructoza từ tinh bột bằng enzym glucoisomerase cố định:

5.5.1. Đã xác định được các điều kiện kỹ thuật cần thiết để chuyển hoá tinh bột thành glucoza cho hiệu suất cao (96,1%), nồng độ sữa bột thích hợp nhất là 30%. Giai đoạn dịch hoá: Sử dụng Termamyl (alpha-amilaza) theo tỷ lệ: 0,1%. Giai đoạn đường hoá: Sử dụng AMG (glucoamilaza) với tỷ lệ: 0,1%.

5.5.2. Nghiên cứu sử dụng enzym glucoisomerase chuyển hoá glucoza thành fructoza: Đã xác định điều kiện đồng hoá trong quy mô phòng thí nghiệm. Khối lượng enzym Sweetzym T: 30 gam/ cột, cột có đường kính 2,2 cm, cao 40cm, nồng độ dịch đường glucoza 40%, nhiệt độ chuyển hoá 60 °C, pH 7,5 và tốc độ phản ứng 10 ml/ phút

5.5.3. Đã xác định được phương pháp làm sạch dịch sirô fructoza: Dùng than hoạt tính theo tỷ lệ 0,7%, dùng cột trao đổi ion cation và anion.

5.5.4. Đã xác định điều kiện thu hồi và bảo quản dịch sirô fructoza: Cô đặc đến nồng độ 70⁰Bx sau đó bảo quản trong bao bì kín và sẫm màu kéo dài thời gian bảo quản trên 12 tháng.

5.5.5. Đã triển khai thiết kế xây dựng mô hình cột đồng phân trên quy mô công nghiệp với công suất thiết kế 2 tấn sản phẩm/ ngày. Đã thiết kế và chế tạo cột đồng phân có đường kính cột 0,25 m, chiều cao cột 1,3 m, chiều cao lớp enzym 0,9 m, số lượng cột 2 chiếc, thùng chứa sản phẩm 30m³ lượng enzym đưa vào cột 22 kg, tốc độ dòng chảy có thể duy trì trung bình khoảng 0,1 m³/ giờ.

5.5.6. Đã ứng dụng sirô fructoza 42% vào sản xuất 2 tấn nhân kẹo cứng nhân dâu, nhân dứa ở Công ty Bánh kẹo Thăng Long và sản xuất mật ong nhân tạo sử dụng sirô fructoza có hương, vị giống mật ong được người tiêu dùng ưa chuộng. Đề tài đã nghiên cứu hoàn thiện được quy trình công nghệ sản xuất siro fructoza từ tinh bột trên quy mô công nghiệp. Triển khai xây dựng mô hình sản xuất thử nghiệm tại Công ty Cổ phần thực phẩm Minh Dương, Hà Tây. Kết quả thu được sản phẩm sirô fructoza 42% có độ ngọt thanh, vị mát, màu vàng sáng, có thể thay thế đường kính trong các sản phẩm như nước giải khát, bánh kẹo các loại.

5.6. Hoàn thiện công nghệ và xây dựng mô hình thiết bị sản xuất nước quả trong và cô đặc bằng enzym pectinaza.

5.6.1. Đã nghiên cứu ứng dụng enzym hoạt động ở nhiệt độ thấp trong quá trình trích ly dịch quả: Đã xác định độ chín kỹ thuật thích hợp của từng loại quả cho từng loại sản phẩm. Đã lựa chọn công nghệ thích hợp xử lý từng loại quả bằng các enzym khác nhau ở nhiệt độ trung bình (20- 30⁰C) và thấp (10- 20⁰C). Chất lượng sản phẩm dịch chiết xử lý enzym ở nhiệt độ thấp đạt cao hơn.

5.6.2. Đã nghiên cứu ứng dụng emzym hoạt động ở nhiệt độ thấp cho quá trình làm trong dịch quả: Đã giữ được hương và màu sản phẩm và không kéo dài thời gian xử lý sản phẩm và cho từng loại quả. Tỷ lệ sử dụng Pectinex 3XL từ 0,05-0,12%, Rhoaspect AD 6L từ 60 đến 150 ppm và Rhohapec B1LL từ 80-120 ppm ở 20⁰C tùy theo loại quả.

5.6.3. Đã nghiên cứu sử dụng nước quả đã xử lý và xây dựng quy trình công nghệ sản xuất nước quả trong và nước quả cô đặc.

5.6.4. Đã nghiên cứu các điều kiện bảo quản sản phẩm ở nhiệt độ, nồng độ, bao bì thích hợp.

5.6.5. Đã xây dựng được mô hình chế biến nước quả trong và nước quả cô đặc tại xưởng thực nghiệm Viện Công nghiệp thực phẩm.

5.6.6. Đã chuyển giao công nghệ sản xuất nước quả trong, nước quả đục và nước quả cô đặc cho Công ty Cổ phần thuốc lá và thực phẩm Bắc Giang và Công ty Thực phẩm xuất khẩu Đồng Giao.

5.7. Nghiên cứu công nghệ sản xuất đường chức năng fructooligosacharit (FOS) bằng công nghệ đa enzym và ứng dụng trong sản xuất thức ăn trẻ em, bánh kẹo và thực phẩm chức năng.

5.7.1. Đã nghiên cứu lựa chọn hệ enzym, thiết bị và công nghệ xử lý nguyên liệu sản xuất đường chức năng fructooligosacharit. Đường sacaroza được chọn là nguyên liệu đầu vào. Đã nghiên cứu sinh tổng hợp enzym fructosiltransferaza (FTS). Đã tận dụng các thiết bị hiện có của phòng thí nghiệm, xưởng thực nghiệm Viện Công nghiệp thực phẩm và doanh nghiệp để xây dựng mô hình sản xuất thử nghiệm.

5.7.2. Nghiên cứu qui trình công nghệ sản xuất đường FOS có độ tinh khiết cao bằng phương pháp đa enzym. Công nghệ sản xuất đường FOS chia làm 2 phân đoạn: Phân đoạn đầu sử dụng enzym (FTS) 8 U/ g xúc tác thủy phân sacaroza 54%, pH 5, ở 50°C/ 12 giờ. Phân đoạn sau là phản ứng glucooxydaza/ catalaza (GOT/ CAT) với nồng độ đường tổng 32%, GOT 17 U/ g, tỷ lệ GOT/ CAT 0,085, ở 30°C đã nâng cao độ tinh khiết của FOS từ 54,3% lên 78% cao hơn so với công nghệ dùng 3 hệ enzym FTS-GOT-CAT đạt 65% khi hai phân đoạn trên xảy ra đồng thời.

5.7.3. Đã xác định 3 quy trình công nghệ sản xuất bột dinh dưỡng trẻ em, bánh bích qui và kẹo cứng có sử dụng đường FOS.

5.7.4. Đã nghiên cứu thử nghiệm sử dụng đường FOS trên người tại Trung tâm Dịch vụ y tế bác sỹ gia đình, tại 50C Hàng Bài, Hà Nội có kết quả tích cực trong điều trị 10 bệnh nhân tiểu đường.

5.7.5. Đã xây dựng được mô hình thiết bị sản xuất bột dinh dưỡng, bánh qui, kẹo cứng trên cơ sở thiết bị hiện có của Viện Công nghiệp thực phẩm và doanh nghiệp. Doanh nghiệp đã có nhu cầu sản xuất và ký hợp đồng nguyên tắc, xác nhận kết quả và đề nghị chuyển giao công nghệ.

5.8. Nghiên cứu công nghệ và thiết bị sản xuất đồ uống mới từ hạt nảy mầm, rau và nước quả lên men có độ cồn thấp

5.8.1. Nước uống từ hạt nảy mầm:

- Đã nghiên cứu tối ưu hoá quá trình công nghệ nảy mầm đậu tương ở 25 °C, trong 3 ngày. Đã xác định enzym có vai trò khử các chất ức chế trypsin từ 20,4 IU/ ml xuống còn 4,7 IU/ ml, hàm lượng chất phản dinh dưỡng stachyosa và raffinosa giảm từ 3,0-3,4 mg/ g xuống còn 0,4-0,5 mg/g, các thành phần khác như protein hòa tan, axit amin và vitamin đều ở mức cao nhất. Đã xây dựng được quy trình công nghệ sản xuất đồ uống từ hạt đậu tương nảy mầm có hương đậu và hương cốm.

- Đã xây dựng được quy trình công nghệ sản xuất đồ uống mới lên men từ đại mạch nảy mầm và lựa chọn được điều kiện công nghệ thích hợp cho quá trình lên men: Công thức nguyên liệu 40% đại mạch nảy mầm, 30% đại mạch, 30% gạo. Tỷ lệ sirô mớ bổ sung 20%. Nhiệt độ lên men chính 14°C. Tỷ lệ tiếp giống 12-14 triệu tế bào/ ml. Chất khô ban đầu 12°Bx. Thời gian lên men chính 3- 4 ngày. Đã lựa chọn được chủng nấm men cho quy trình lên men là *Saccharomyces cerevisiae* YCFD₂₉. Đã nghiên cứu chế độ thanh trùng ở nhiệt độ 121°C, áp lực 1 kg/ cm², thời gian 15 phút.

5.8. 2. Nghiên cứu sản xuất nước uống từ hỗn hợp rau:

- Đã khảo sát giá trị dinh dưỡng các loại rau, sử dụng enzym pectinaza nâng cao 6% dịch chiết ép từ rau.

- Đã nghiên cứu hoàn thiện công nghệ, xây dựng quy trình sản xuất nước rau, đã chọn 6 công thức rau theo mùa vụ (mùa hè và mùa đông). Đã chọn bao bì chai, lon và chế độ thanh trùng thích hợp để bảo quản 6 tháng.

5.8.3. Nghiên cứu sản xuất nước quả lên men có độ cồn thấp:

- Đã ứng dụng công nghệ enzym để nâng cao hiệu suất thu hồi dịch quả.

- Đã nghiên cứu lai ghép tế bào nấm men LE₁ và LE₂ để tạo ra nấm men lai LE₁₅ có đặc tính chung của cha mẹ, hiệu suất lên men cao, tạo hương thơm, sinh zymoxin ức chế vi khuẩn và sử dụng LE₁₅ để lên men nước quả tươi có độ cồn thấp.

- Đã nghiên cứu hoàn thiện công nghệ sunphit hoá dịch quả bằng SO₂ 100 mg/l, lên men chính ở 25°C, áp lực CO₂ 1kg/ cm², lên men phụ ở 5-10°C, áp lực 2,5 kg/ cm².

- Đã xây dựng quy trình công nghệ và mô hình thiết bị sản xuất nước quả lên men có độ cồn thấp tại xưởng thực nghiệm, công suất 450 lít/ mẻ. Sản phẩm có chất lượng tốt.

5.9. Hoàn thiện công nghệ và thiết bị sản xuất tinh dầu và nhựa hạt tiêu xuất khẩu có sử dụng α -amilaza

5.9.1. Đã nghiên cứu sử dụng chế phẩm α -amilaza (Termamyl) NOVO, Đan Mạch để thủy phân tinh bột trong nguyên liệu hạt tiêu: Đã xác định hồ tiêu Quảng

Trị có hàm ẩm 12%, tinh bột 142,5%, dầu bay hơi 2,6% và nhựa dầu 5,1%. Sử dụng 0,2% α -amilaza đã tăng hiệu suất thủy phân tinh bột, tăng hiệu suất thu hồi tinh dầu 8,11%, tăng khối lượng nhựa và hàm lượng piperin trong nhựa.

5.9.2. Đã nghiên cứu làm sạch bã thải: Sử dụng α -amilaza đã làm giảm tỷ lệ bã thải (17,2%) góp phần làm sạch môi trường và nâng cao hiệu quả sản xuất.

5.9.3. Đã xây dựng quy trình công nghệ và mô hình dây chuyền thiết bị chưng cất tinh dầu và trích ly nhựa dầu hồ tiêu, đạt tiêu chuẩn chất lượng sản phẩm cao.

5.9.4. Đã xác định được hiệu quả kinh tế của công nghệ và sản phẩm tinh dầu và nhựa dầu hạt tiêu. Đã ký hợp đồng nguyên tắc chuyển giao công nghệ cho Công ty Tấn Hưng, Tân Kiên, Bình Chánh, Thành phố Hồ Chí Minh với công suất 1.000 tấn nguyên liệu/ năm và đăng ký tham gia Dự án: Ứng dụng khoa học công nghệ phục vụ phát triển kinh tế xã hội nông thôn và miền núi.

5.10. Nghiên cứu ứng dụng enzym Lipaza để sản xuất axit béo không no và sử dụng trong công nghiệp thực phẩm và dược phẩm

5.10.1. Đã nghiên cứu xử lý nguyên liệu: Đã phân tích chất lượng dầu đậu tương thô. Đã chọn tỷ lệ phụ gia 10-12% để hoạt hoá lipozim^{IM} và xử lý nguyên liệu tăng bề mặt tiếp xúc của dầu.

5.10.2. Ứng dụng lipaza cố định để thủy phân dầu: Đã ứng dụng lipozim^{IM} cố định để thủy phân dầu ở các điều kiện tối ưu: Nhiệt độ 35-45 °C, tốc độ dòng chảy 1,0-1,2 kg/ giờ, sau 100 giờ cần hoạt hoá tái sử dụng enzym.

5.10.3. Nghiên cứu bảo quản sản phẩm: Đã xác định thời gian bảo quản sản phẩm axit béo 12 tháng và viên nang 24 tháng ở nhiệt độ thường.

5.10.4. Xây dựng tiêu chuẩn: Đã xây dựng tiêu chuẩn chất lượng nguyên liệu, sản phẩm dầu và viên nang mềm Hypochol. Đã xác định độc tính cấp tại Viện kiểm nghiệm, Bộ Y tế và Trung tâm Khoa học công nghệ Dược Hà Nội.

5.10.5. Đã xây dựng quy trình công nghệ, thiết kế chế tạo thiết bị và xây dựng mô hình sản xuất axit béo và viên nang Hypochol quy mô 1 kg/ h.

5.10.6. Đã sử dụng thử viên nang có hiệu quả tốt trong điều trị bệnh nhân có hội chứng rối loạn lipid máu.

5.10.7. Nghiên cứu thu hồi enzym: Lipozim^{IM} được tái sử dụng sau khi được làm sạch bằng cồn 96% và ete etylic.

5.10.8. Đã nghiên cứu sinh tổng hợp và ứng dụng lipaza: Đã khảo sát các điều kiện nuôi cấy nấm men *Candida rugosa*: Thời gian 48 giờ, tốc độ lắc 150 vòng/ phút, thành phần môi trường nuôi cấy chìm có axit palmitic 1,2 g/l, số lượng tế bào nấm men $2,6.10^6$ / ml, nuôi 40 giờ. Đã kết tủa enzym bằng cồn 90% (v/v). Đã làm sạch lipaza bằng sắc ký trao đổi ion DEAE xenluloza và cố định enzym trên Nylon- 6. Ứng dụng lipaza đã nâng cao giá trị cảm quan sản phẩm lên men phomat.

5.11. Hoàn thiện công nghệ và thiết bị sản xuất rượu vang chất lượng cao.

5.11.1. Nghiên cứu chủng nấm men mới bằng kỹ thuật lai ghép tế bào: Từ 18 chủng nấm men, đã chọn các chủng sinh bào tử, hoạt lực lên men rượu cao, tạo độ rượu cao, CO₂ cao để lai ghép, tạo và chọn chủng lai FD-H₃.

5.11.2. Đã sử dụng pectinaza (pectinex 3XL) 0,06 gr/ lít để xử lý dịch ép thịt quả.

5.11.3. Đã lựa chọn chủng *Leuconostoc oenos* LF01 trong lên men malolactic trong quá trình lên men phụ rượu vang.

5.11.4. Đã nghiên cứu cố định tế bào LF01 trên hạt Ca-alginat với các điều kiện tối ưu : pH 4,5, nhiệt độ 25°C; lên men rượu vang đạt độ cồn 12%.

5.11.5. Đã nghiên cứu hoàn thiện công nghệ, xây dựng mô hình, thiết bị và chuyển giao công nghệ sản xuất rượu vang.

- Đã xây dựng các quy trình công nghệ lên men malolactic, quy trình công nghệ lên men rượu vang bổ sung dịch đường, nâng cao độ rượu, không bổ sung cồn và xây dựng mô hình thiết bị quy mô thực nghiệm và tại một số doanh nghiệp.

- Đã chuyển giao công nghệ sản xuất rượu vang cho một số công ty: Công ty Bia Habada Bắc Giang, Công ty Bia, rượu, nước giải khát Hải Dương, Công ty Bia Quảng Ninh, Công ty Đường Biên Hoà.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành gửi tới Bộ khoa học và công nghệ, các Bộ Ngành chủ quản, các Vụ chuyên ngành, các Viện, các Trường, các Doanh nghiệp, Ban chủ nhiệm chương trình KC- 04, các chuyên gia, các nhà khoa học, các Chủ nhiệm đề tài nhánh, các cộng tác viên đã quan tâm quản lý chặt chẽ, giúp đỡ tận tình, hợp tác toàn diện, tạo điều kiện thuận lợi thực hiện đề tài.

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn:

- Viện Công nghiệp thực phẩm, Bộ Công nghiệp.
- Viện Công nghệ thực phẩm và Công nghệ sinh học, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội.
- Viện Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học và công nghệ Việt Nam
- Viện nghiên cứu Rượu Bia, nước giải khát, Tổng Công ty Rượu Bia nước giải khát Việt Nam.
- Công ty Cổ phần Thực phẩm Minh Dương, Hà Tây
- Công ty Cổ phần Thuốc lá và thực phẩm Bắc Giang.
- Công ty Cổ phần Thực phẩm xuất khẩu Đồng Giao, Ninh Bình.
- Công ty Cổ phần Đường Biên Hoà- Thành phố Biên Hoà, Tỉnh Đồng Nai.
- Công ty Rượu Hà Nội
- Công ty Cổ phần Bia Hải Dương.
- Công ty Bia nước giải khát HABADA, Bắc Giang.
- Công ty Cổ phần Bia và nước giải khát Quảng Ninh.
- Công ty TNHH Việt Năng, Hà Nội.
- Công ty Tấn Hưng, Thành phố Hồ Chí Minh
- Công ty Thực phẩm Hà Tây.
- Công ty Bánh kẹo Phúc Long, Hà Nội
- Công ty Cổ phần Sữa Hanoimilk...

Đã hợp tác bình đẳng, lao động sáng tạo, khai thác tiềm năng sẵn có về nguồn nhân lực, cơ sở vật chất, tạo điều kiện thuận lợi trong công tác nghiên cứu khoa học và chuyển giao công nghệ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

- 1 Chính phủ (6/02/2002), Quyết định của Thủ Tướng Chính phủ về Quy hoạch tổng thể phát triển ngành Rượu-Bia-Nước giải khát Việt Nam đến năm 2010, số 28/2002/QĐ-TTg.
- 2 Cục Sở hữu công nghiệp Việt Nam (1999). Patent Canada số 1049429: Cider making.
- 3 Hà Duyên Tư (1996). Quản lý và kiểm tra chất lượng sản phẩm. Trường ĐHBK Hà Nội.
- 4 Lê Ngọc Tú và các cộng sự (1997). Hoá sinh công nghiệp, NXB khoa học và kỹ thuật, tr. 11.
- 5 Nguyễn Đức Lượng. (1996). Công nghệ vi sinh vật. Cơ sở Vi sinh vật công nghiệp, ĐHBK Thành phố Hồ Chí Minh, tập 1, tr. 184.
- 6 Phạm Tử Dương. (1995). Nghiên cứu về hypochol chiết xuất từ dầu đậu nành để điều trị hội chứng rối loạn lipid máu. Báo cáo đề tài cấp Bộ Quốc phòng, Hà Nội.
- 7 Quách Đĩnh. (1997). Để nước rau, quả giải khát trở thành mặt hàng chủ lực của ngành rau quả Việt Nam, Tạp chí Rau- hoa- quả, số1, tr. 8.
- 8 Quách Đĩnh, Nguyễn Văn Thoa và Nguyễn Văn Tiếp. (1982). Sử dụng chế phẩm enzym trong công nghiệp thực phẩm (tài liệu dịch), NXB khoa học và kỹ thuật, tr. 20.
- 9 Tăng cholesterol máu- bệnh thời đại. (1998). NXB Y học Hà Nội.
- 10 Tiêu chuẩn Nhà nước. (1980). Phương pháp thử dầu thực vật TCVN 2625-78; TCVN 2642-78.

Tiếng Anh

- 11 Abel H. & Marie D. J. (2000). Purification & characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. Enzyme & Microbial Technology, Vol. 26, pp.412 - 430.
- 12 Alan E.G. & Stark.J.B. (1957). Rapid method for determination of malic acid. Analytical Chemistry, Vol. 29, No.2, pp.283 - 287.
- 13 Antonio S., Pau F. & Alicia S. (1999). Characterization of the lipase & esterase mutiple from in an enzyme preparation from a *Candia rugosa* pilot-plant scale fed-batch fermentation. Enzyme & Microbial Technology, Vol. 25, pp. 214 - 223.
- 14 Bond M.D. & Van Wart H.E. (1984). Characterization of the individual collagenases from *Clostridium histolyticum*. Biochemistry, Vol. 23, pp. 3085-3091.

- 15 Chen W.C. (1995). Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus* in batch & fed batch cultures. *Biotechnol. Lett.*, Vol.17, pp. 1291-1924.
- 16 Coulthard C.E., Michaelis R., Short W.f., Skrimshire G.E.H., St & Fast A.F.B., Birkinshaw J.H. & Raistrick H. (1945). Fructooligosaccharides - Safety & Benefit. *Biochem J.* Vol. 39, pp. 24 - 39.
- 17 Cronlund A.L. & Woychik J.H. (1987). Solubilisation of collagen in restructured beef with collagenase & α -amylase. *J. Food Sci.*, Vol. 52, pp. 857- 860.
- 18 Fowell R.R; Moorse M. E. (1960). Factor controlling the sporulation of yeast. *Reprinted from nature*, Vol. 170, p. 578.
- 19 Gallop P.M., Seifter S. & Meilman E. (1957). Study on collagen. *J. Biol. Chem.* Vol. 227, pp. 891- 906.
- 20 Gilles A.M. & Keil B. (1976). Cleavage of β -casein by collagenases from *Achromobacter iophagus* & *Clostridium histolyticum*. *FEBS letters*. Vol. 6, pp. 369- 372.
- 21 Gross D. (1962). Non- reducing oligosaccharides. *Methods in Carbohydrate Chemistry*. Whistler R.L & Wolman M.L. Academic press, New York, Vol. 1.
- 22 Gunata Y. Z., Claude L. B., Claude T., & Robert E. C. (1990). Hydrolysis of Grape Monoterpenyl β -D-Glucosides by Various β -Glucosidases. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 38, pp.1232 -1236.
- 23 Henick-Kling T. & Acree T.E. (1998). Modification of wine flavor by malolactic fermentation. International workshop held in Verona on April 17th 1998 organized by Lallemand, pp.17 - 22.
- 24 Hidaka H., Hirayama M. & Sumi N. (1988). A fructooligosaccharides producing Enzyme β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* TTCC 20611. *Agric. Biol. Chem.*, Vol. 52, pp.1181 - 1187.
- 25 Ingram L. (1976). Adaptation of membrane lipids to alcohol. *J. Bacteriol.*, Vol. 125, pp. 670 - 678.
- 26 Joseph M. & Joseph H. D. (1978). Purification & Characterization of a Marine Bacterial Collagenase. *Biochemistry*, Vol. 17, p.14.
- 27 Iwashita K., Todoroki K., Kimura H., Shimor H. & Kiyoshi I. (1998). Purification & Characterization of Extracellular & Cell Wall Bound β -Glucosidases from *Aspergillus kawachii*. *Biosci. Biotech. Biochem.* , Vol. 62, No.10.
- 28 Jean PirJean Piere Larpent. (1991). *Biotechnologie des levures*, Masson, Paris, Milan, Barcelone, Bonn.
- 29 Jiang B. (1992). Production of fructooligosaccharides with immobilized

Aspergillus niger . Ph. D thesis. Wuxi University of Light Industry.

- 30 Jhon E. L. & Clinton. (1986). High fructose corn syrup. Biotechnology December, Vol. 31, No. 12, pp. 860 - 873.
- 31 Kirk O. Encyclopedia of Chemical Technology, Vol. 4, pp. 543- 715.
- 32 Kunkee R.E. (1978). Induction of malolactic fermentation with starter cultures: A California prospective. International workshop held in Verona on April 17th 1998 organized by Lallemand, pp. 69-70.
- 33 Kurakabe M. & et. al. (1996). Effect of pH on transfructosylation & hydrolysis by β - fructofuranosidase from *Aspergillus oryzae*. Appl. Microbiol., Vol. 45, pp. 236 - 239.
- 34 Lodder J. (1970). The Yeast. North-Holl &, Amsterdam.
- 35 Marie-Paule Le Traon-Masson & Patrice Pellerin. (1998). Purification & characterization of two β -D-glucosidases from an *Aspergillus niger* enzyme preparation. Enzyme & Microbiol Technology, Vol. 22, pp. 374 - 382.
- 36 Marija Abramie, Ivana Leseie & Ljubinka Vitale. (1999). Purification & properties of extracellular lipase *Streptomyces rimosus*. Enzyme & Micro-Technology, Vol. 25, pp. 522 - 529.
- 37 Masushita O., Yoshihara K., Katayama S., Minami J. & Okabe A. (1994). Purification & characterization of a *Clostridium perfringens* 120-Kilodalton collagenase & Nucleotide Sequence of the Corresponding Gene. Journal of Bacteriology, pp. 149-156.
- 38 Mathew J. H., Irmgard K. & Kumar D. M. (1999) . Enzymatic fractionation of evening primrose oil by rape lipase Enrichment of gamma-linolenic acid. Biotechnology Letter, pp.629 - 632.
- 39 Michael D. B. & Harold E. V. W. Characterization of the individual Collagenase from *Clostridium*.
- 40 Nagano H. & Kim Anh To. (2000). Purification of collagenase & Specificity of its Related Enzyme from *Bacillus subtilis* FS-2. Bioci. Biotechnol. Biochem., pp. 182-183
- 41 Naouri P., Chagnaud P., Arnaud A., Galzy P. & Mathieu J. (1991). A new technology for Malolactic bioconversion in wine. Journal of wine research, Vol. 2, No.1, pp. 5 - 20.
- 42 Novo - Sweetzyme. Useful operating hints
- 43 Novo enzyme at work. (1989). pp. 12-13
- 44 Novo Nordisk Termamyl 120L. Product sheet, enzyme - business
- 45 NoVo's hand book of pracial biotechnology Vol. 27.
- 46 Paul B. (1999). Le vin et les vin au restarant, Espace Clichy-38, rue Mozart-92587 Clichy Cedex, France,

- 47 Pilone G.J. & Kunkee R.E. (1965). Sensory characterization of wines fermented with several malolactic strains of bacteria. *Am. J. Enol. Vitic.* Vol.16, pp. 224- 230.
- 48 Pilone G.J. & Kunkee R.E. (1966). Chemical characterization of wines fermented with various malolactic bacteria. *Appl. Microbiol.*, Vol.14, pp. 608 - 615.
- 49 Rankine B.C, Fornachon B.C, Bridson D.A. & Celli K.M. (1970). Malolactic Fermentation in Australian Dry Red Wine. *J. Sci. Food Agri.*, Vol. 21, pp. 471- 476.
- 50 Rankine B.C. (1972). Influence of yeast strains & malolactic fermentation on composition & quality of table wines. *Am. J. Enol. Vitic*, Vol. 23, pp. 152- 158.
- 51 Raper K. B & Fennell D. I. (1965). The genus *Aspergillus*. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 686 - 695.
- 52 Rauhut D. & Riegelhofer M. (2002). Study of the nutrient requirement of commercial wine yeasts to improve wine & sparkling wine quality, The rising power of yeasts in science & industry. Symposium Book, Neitherland, p. 125.
- 53 Rihereau-Gayon P., Glories Y., Maujean A. & Dubourdieu D. (2000). The chemistry of wine & stabilization & treatments. *Handbook of Enology*, Vol. 2, John Wiley & Sons Ltd.
- 54 Roger B. B., Vernon L.S., Linda F.B. & Ralph E. K. (1998). Principles & practices of winemaking. An Aspen publication Asen Publisher, Inc.Gaithersburg, Maryland.
- 55 Sanches M.N (2000). Biodiversity of yeasts from tropical fruits, The rising power of yeasts in science & industry. Symposium Book, Neitherland, p. 276.
- 56 Saxena R. K., Davisdson W. S., Anita S. & Bhoopander G. (2003). Purification & characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. *Process Biochemistry*, Vol. 39, pp. 239 - 247.
- 57 The Amylase Research Society Japan. (1988). *Handbook of Amylasae & Related Enzymes*, Pergamon, Japan.
- 58 Tokunaga T., Oku T. & Hosaya N. (1986). Influence of chronic intake of new sweetener fructooligosaccharide (neosugar) on growth & gastrointestinal function of the rat. *J. Nutri. Sci. Vitaminol.*, Vol. 32, pp. 111 - 121.
- 59 Van Beynum G. M. A. & J. A. (1989). *Starch Conversion Technology*. pp. 33-58.
- 60 Walter M., Stephania C., Mara G., Daniela B. & Luciano P. (1997). Yeast Killer systems, *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 10, No.3, pp. 369 - 400.
- 61 Wiley B.J & Simmons E. G. (1973). New species & a new genus of *Plectomycetes* with *Aspergillus* states. *Mycologia* , Vol. 65, pp. 934- 938.

- 62 Xui- Gong Gao, Shu- Gui Cao & Ke Chang Zhang. (2000). Production, properties & application to nonaqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated *Pseudomonas* strain. *Enzyme & Microbial Technology*, Vol. 27, pp. 74 - 84.
- 63 Yannick Gueguen, Patrick Chemardin, Guilhem Janbon, Alain Arnaud, & Pierre Galzy. (1996). A very efficient β -Glucosidase Catalyst for the Hydrolysis of Flavor Precursors of Wines & Fruit Juices. *J. Agric. Food Chem.*, p. 44.
- 64 Yhakoda, Y I., Nagate A., Utssumi K., Aoshima M. & Ohyashiki K. (2002). Increased collagenase activity in maccrophages from bronchial lavage as a diagnostic marker if non-small cell lung cancer.
- 65 Yoshikiyo S., Izaki K., Matsubara Y., Suzuki K., Kofima H. & Kamio Y. (1995). Molecular cloning & Sequence analysis of the giene encoding the collagenase from *Cytophage* sp. L43-1 strain.
- 66 Yun J.W. (1992). Production of panatinose by immobilized cells of *Erwinia raphontici*. *Korean J. Biotechnol.. Bioeng.* , Vol. 7, pp 79 – 83.
- 67 Enzyme structure database.
<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/e...es/ec/ec04/ec24/ec0003 index.html>.
- 68 Enzyme structure database.
<http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/www bget.ec:3.4.24.3>
- 69 Enzyme structure database.
<http://www.expasy.ch/cgi-bin get-enzyme-entry 3.4.24.3>
- 70 Enzyme structure database.
[http://srs.ebi.ac.uk/srs5bin/cgi-b...tz-e+\[BRENDA-EC number: '3.24.4.3'\]](http://srs.ebi.ac.uk/srs5bin/cgi-b...tz-e+[BRENDA-EC number: '3.24.4.3'])

PHỤ LỤC

BẢNG KÊ CÁC DANH MỤC*

- 1. Danh mục các chủng vi sinh vật.**
- 2. Danh mục các enzym.**
- 3. Danh mục các sản phẩm hàng hoá.**
- 4. Danh mục các quy trình công nghệ.**
- 5. Danh mục các mô hình thiết bị.**
- 6. Danh mục các tiêu chuẩn.**
- 7. Danh mục các hợp đồng.**
- 8. Danh mục Tiến sỹ và Thạc sỹ đã được đào tạo.**
- 9. Danh mục các công trình công bố.**

***GHI CHÚ:** Tham khảo các văn bản chi tiết và toàn văn
tại phụ lục báo cáo thống kê

DANH MỤC CÁC CHỦNG VI SINH VẬT

1. *Aspergillus niger* PBC
2. *Sphingomonas paucimobilis* BK16.
3. *Aeromonas sorbia* BK41.
4. *Aspergillus aculeatus* BK M4
- 5- *Penicillium implicatum* BK M12
6. *Bacillus subtilis* FS-2
7. *E.coli* BL21
8. *E.coli* DH5 α
9. *Aspergillus flavipes* VVTP 84
10. *Candida rugosa*
11. *Saccharomyces cerevisiae* LE1, LE2, LE15
12. *Saccharomyces cerevisiae* FD-H₃
13. *Saccharomyces cerevisiae* 7043
14. *Leuconostoc oenos*
15. β -glucosidaza từ *A. niger* PBC
16. β -glucosidaza từ nhân hạt mơ

DANH MỤC CÁC ENZYM

1. β -glucosidaza từ *A. niger* PBC
2. β -glucosidaza từ nhân hạt mơ
3. β -galactosidaza từ chủng vi khuẩn tự nhiên *Sphingomonas paucimobilis* BK 16
4. β -galactosidaza từ chủng tái tổ hợp *E.coli* BL21
5. Chế phẩm Collagenaza kỹ thuật và tinh khiết
6. Chế phẩm Collagenaza từ chủng tái tổ hợp *E.coli* DH5 α
7. Lipaza cố định từ *Candida rugosa*
8. Lipaza tan từ *Bacillus* sp
9. Lipaza cố định từ *Candida rugosa*

DANH MỤC CÁC SẢN PHẨM HÀNG HOÁ

1. Nước mơ có sử dụng β -glucosidaza.
2. Rượu vang có sử dụng β -glucosidaza.
3. Xiro Fructoza, nhân kẹo, mật ong nhân tạo.
4. Nước quả trong có sử dụng enzym.
5. Nước quả đục có sử dụng enzym.
6. Nước quả cô đặc có sử dụng enzym.
7. Enzym Fructosiltransferaza (FTS).
8. Đường FOS 50.
9. Bột dinh dưỡng trẻ em có đường FOS 50.
10. Bánh bích quy có đường FOS 50.
11. Kẹo cứng có Đường FOS 50.
12. Đồ uống mới từ đại mạch nảy mầm.
13. Đồ uống mới từ đậu tương nảy mầm.
14. 6 công thức đồ uống mới từ rau.
15. Nước quả lên men có độ cồn thấp Sider.
16. Tinh dầu và nhựa dầu hồ tiêu.
17. Rượu vang chất lượng cao.

DANH MỤC CÁC QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ

1. Quy trình công nghệ tách và làm sạch β -glucosidaza từ *A. niger* PBC.
2. Quy trình công nghệ tách chiết và tinh chế β -glucosidaza từ nhân hạt mơ.
3. Quy trình công nghệ lên men sinh tổng hợp β -galactosidaza.
4. Quy trình tách và làm sạch β -galactosidaza.
5. Quy trình công nghệ sinh tổng hợp collagenaza từ *B. subtilis* FS-2.
6. Quy trình thu nhận tinh chế collagenaza từ *B. subtilis* FS-2.
7. Quy trình công nghệ thu hồi chế phẩm collagenaza kỹ thuật.
8. Quy trình công nghệ ứng dụng collagenaza tạo sản phẩm xúc xích và bitet (bò, lợn).
9. Quy trình công nghệ sản xuất sirô fructoza từ tinh bột sắn bằng enzym glucoisomeraza cố định.
10. Quy trình công nghệ sản xuất nước quả trong và nước quả cô đặc.
11. Quy trình công nghệ sản xuất bột dinh dưỡng trẻ em có bổ sung fructooligosacarit (FOS).
12. Quy trình công nghệ sản xuất bánh bích quy có sử dụng đường FOS.
13. Quy trình công nghệ sản xuất kẹo cứng có sử dụng đường FOS.
14. Quy trình công nghệ sản xuất nước uống từ đậu tương nảy mầm.
15. Quy trình công nghệ sản xuất đồ uống từ đại mạch nảy mầm.
16. Quy trình công nghệ sản xuất nước uống từ rau
17. Quy trình công nghệ sản xuất nước quả lên men có độ cồn thấp.
18. Quy trình công nghệ sản xuất nhựa dầu hồ tiêu sử dụng enzym α -amylaza.
19. Quy trình công nghệ thủy phân dầu đậu tương.
20. Quy trình công nghệ sản xuất viên nang hypochol.
21. Quy trình lên men malolactic bởi *Leuconostoc uenos*.
22. Quy trình công nghệ sản xuất vang quả.

DANH MỤC CÁC MÔ HÌNH THIẾT BỊ

- 1. Cột Đồng phân inox sản xuất fructoza 2 tấn/ ngày.**
- 2. Hệ thống thiết bị sản xuất nước quả trong tại Công ty Cổ phần Thuốc lá và thực phẩm Bắc Giang.**
- 3. Thiết bị sản xuất Cider quy mô xưởng thực nghiệm 450 lít/ ngày.**
- 4. Mô hình thiết bị sản xuất tinh dầu và nhựa dầu hồ tiêu bằng α -amylaza quy mô xưởng thực nghiệm.**
- 5. Cột thuỷ phân inox sản xuất axit béo không no và viên nang Hypochol 1 kg/ h.**
- 6. Mô hình thiết bị lên men rượu vang tại Công ty CP Đường Biên Hoà, Công ty CP Bia nước giải khát Quảng Ninh, Công ty Bia HABADA, Bắc Giang, Công ty Bia rượu nước giải khát Hải Dương.**

DANH MỤC CÁC TIÊU CHUẨN

- 1. Tiêu chuẩn viên nang mềm hypchol.**
- 2. Tiêu chuẩn dầu hypochol.**
- 3. Tiêu chuẩn rượu vang Hà Nội.**

DANH MỤC CÁC HỢP ĐỒNG

1. Hợp đồng nguyên tắc ứng dụng enzym β - glucosidaza với Công ty TNHH Việt Năng, Hà Nội.
2. Hợp đồng chuyển giao công nghệ sản xuất sirô fructoza cho Công ty Cổ phần Thực phẩm Minh Dương, Hà Tây.
3. Hợp đồng gia công ép và làm trong dịch quả với Công ty Bia rượu Hà Nội.
4. Hợp đồng thực hiện các nội dung dự án: Xây dựng mô hình sản xuất và chế biến rau, củ, quả ... với Sở Khoa học, công nghệ và môi trường Bắc Giang.
5. Hợp đồng chuyển giao công nghệ sản xuất nước quả trong nước quả cô đặc với Công ty Thực phẩm xuất khẩu Đồng Giao, Ninh Bình.
6. Hợp đồng chuyển giao công nghệ sản xuất nhựa dầu hồ tiêu cho Công ty Tấn Hưng, Bình Chánh, thành phố Hồ Chí Minh.
7. Hợp đồng nguyên tắc cung cấp dầu hypochol cho Công ty TNHH 204.
8. Hợp đồng Kinh tế mua bán rượu vang trái cây với Công ty Cổ phần đường Biên Hoà.
9. Hợp đồng chuyển giao công nghệ sản xuất rượu vang trái cây, vang nếp cẩm cho Công ty Cổ phần đường Biên Hoà
10. Hợp đồng chuyển giao công nghệ về sản xuất rượu vang và nước quả cho Công ty Cổ phần bia nước giải khát Quảng Ninh

BÁO CÁO THỐNG KÊ
KẾT QUẢ ĐÀO TẠO SAU ĐẠI HỌC, ĐỀ TÀI KC 04-07

Đào tạo thạc sỹ

TT	HỌ VÀ TÊN NCS	TÊN ĐỀ TÀI
1	ThS. Nguyễn Tú Anh	Hoạt tính enzym β -galactosidaza từ vi khuẩn và khả năng ứng dụng trong công nghiệp chế biến sữa. Đã bảo vệ luận án thạc sỹ năm 2002. Hội đồng chấm luận án đánh giá kết quả xuất sắc.
2	ThS. Hoàng Lan	Nghiên cứu tách dòng và biểu hiện gen mã hoá enzym pyrano-oxydaza từ <i>Transmetes multicolor</i> vào <i>Escherichia coli</i> . Đã bảo vệ luận án thạc sỹ năm 2004. Hội đồng chấm luận án đánh giá kết quả xuất sắc.
3	ThS. Ngô Hồng Phong	Nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men và tăng trữ nhằm nâng cao chất lượng vang nho Việt Nam. Đã bảo vệ thành công luận án thạc sỹ.
4	ThS. Vũ Hương Anh	Phân lập và tuyển chọn các chủng nấm mốc có hoạt tính enzym β -galactosidaza và thăm dò khả năng ứng dụng trong công nghiệp sữa. Đã bảo vệ thành công luận án thạc sỹ.

Đào tạo tiến sỹ

TT	HỌ VÀ TÊN NCS	TÊN ĐỀ TÀI
1	TS. Lê Việt Nga	Nghiên cứu nâng cao chất lượng chủng nấm men và ứng dụng trong công nghệ lên men nước quả có độ cồn thấp. Đã bảo vệ luận án Tiến sỹ. Hội đồng chấm luận án tiến sỹ cấp Nhà nước đánh giá xuất sắc.
2	TS. Trịnh Thị Kim Vân	Nghiên cứu hoàn thiện công nghệ ứng dụng enzym Fructosiltransferaza trong sản xuất đường chức năng fructooligosacarit. Đã bảo vệ luận án Tiến sỹ. Hội đồng chấm luận án tiến sỹ cấp Nhà nước đánh giá xuất sắc.
3	TS. Hoàng Thị Lệ Hằng	Nghiên cứu nâng cao chất lượng nước mơ và nước ổi bằng phương pháp sử dụng chế phẩm enzyme. Đã bảo vệ luận án Tiến sỹ. Hội đồng chấm luận án tiến sỹ cấp Nhà nước đánh giá xuất sắc.
4	ThS. Đàm Lam Thanh	Nghiên cứu hoàn thiện công nghệ ứng dụng enzym để sản xuất nước quả trong và nước quả cô đặc. Đang tiếp tục nghiên cứu.
5	ThS. Đặng Hồng Ánh	Nghiên cứu một số giải pháp nâng cao chất lượng rượu vang Việt Nam. Đang tiếp tục nghiên cứu.
6	TS. Barbara Psick	Nghiên cứu hoạt tính β -galactosidaza bền nhiệt từ nấm mốc. Đang tiếp tục nghiên cứu.
7	ThS. Nguyễn Thị Hải Hoà	Nghiên cứu thu nhận và ứng dụng enzym β -galactosidaza có hoạt tính galactosyl hoá cao từ vi sinh vật. Đang tiếp tục nghiên cứu.
8	ThS. Nguyễn Thu Hà	Nghiên cứu ứng dụng enzym β -galactosidaza của vi khuẩn <i>Bifridobacterium</i> trong chế biến sữa. Đang tiếp tục nghiên cứu.

DANH MỤC NHỮNG CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

TIẾNG VIỆT.

- 1. Tô Kim Anh, Lê Văn Nhung, Đặng Thị Thu,** Tinh chế và xác định tính chất của collagenaza từ *Bacillus subtilis* FS-2, Tuyển tập báo cáo khoa học Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc, Hà Nội, 732-745.
- 2. Đặng Hồng Ánh** "*Nghiên cứu lên men malolactic nhờ Leuconostoc oenos cố định trong gen Ca-alginat*", Hội thảo phát triển năng lực nghiên cứu thực phẩm và ứng dụng enzym trong công nghiệp thực phẩm.
- 3. Nguyễn Văn Chung,** *Ứng dụng chế phẩm α -amylaza trong chưng cất tinh dầu và tách piperine tinh thể từ hạt tiêu (Pipernigrum-L),* Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc, Hà Nội 1999, Tr. 731-734.
- 4. Trương Nam Hải,** "*Biểu hiện gen LacZ mã hoá β -galactosidaza của vi khuẩn Eschrichia Coli ATCC 11105 trong E.coli BL21*", Hội thảo phát triển năng lực nghiên cứu thực phẩm và ứng dụng enzym trong công nghiệp thực phẩm .
- 5. Nguyễn Thị Minh Hạnh,** "*Ứng dụng enzym trong sản xuất maltooligosaccharid giàu matotriose từ tinh bột*", Hội thảo phát triển năng lực nghiên cứu thực phẩm và ứng dụng enzym trong công nghiệp thực phẩm.
- 6. Nguyễn Thị Minh Hạnh, Nguyễn Thị Bích Liên, Ngô thị Vân, Phan Thị Khánh Hoà,** 2003, Hoàn thiện công nghệ sản xuất fructoza từ tinh bột trên quy mô công nghiệp, Báo cáo khoa học, Proceedings, Hội nghị sinh học toàn quốc, Hà Nội, Trang 576- 578.
- 7. Nguyễn Thị Minh Hạnh, Nguyễn Thị Bích Liên, Ngô Thị Vân,** Nghiên cứu sử dụng enzym glucoisomeraza để sản xuất siro fructoza. Các công trình nghiên cứu công nghệ sinh học và công nghiệp thực phẩm. trang 166-171. Nhà xuất bản khoa học kỹ thuật 2000.

8. **Hoàng thị Lê Hằng, Nguyễn Thị Xuân Hiền, Nguyễn Thị Hiền (2004),** "Nghiên cứu sử dụng hệ enzym pectinaza trong quá trình thu nhận dịch quả ổi", *Tạp chí đồ uống Việt Nam (12+13)*, tr. 63-66.
9. **Hoàng Thị Lê Hằng, Nguyễn Thị Hiền, Giang Thế Bính (2001),** "Nghiên cứu sử dụng chế phẩm enzym trong quá trình sử lý quả mơ để nâng cao hiệu suất chiết và chất lượng nước quả mơ", *Tuyển tập Công trình khoa học- Trường Đại học Bách khoa Hà Nội*, tr. 182-187.
10. **Nguyễn Thị Xuân Hiền, Hoàng Thị Lê Hằng,(2003),** *Nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học trong quá trình chế biến sản phẩm nước quả và rau quả muối*, Báo cáo đề tài trọng điểm cấp bộ NN&PTNT.
11. **Lê Việt Nga, Ngô Tiến Hiến, Nguyễn Thị Hiền,2001,**Nhận dạng và định tên chủng nấm men *Zygosaccharomyces baly* trong quá trình lên men nước quả có độ cồn thấp tại Việt Nam, Hội nghị Khoa học lần thứ 9, Phân ban CNSH và CNTP, Trường ĐHBK Hà Nội, Năm 2001, Trang 63-67.
12. **Ngô tiến Hiến và các cộng tác viên,** Nghiên ứng dụng công nghệ enzym trong công nghiệp thực phẩm, Báo cáo khoa học, Proceedings, Hội nghị sinh học toàn quốc, Hà Nội, Trang 450 - 457.
13. **Ngô Tiến Hiến,** Áp dụng tiến bộ kỹ thuật trong chế biến nông sản thực phẩm, Hội thảo Quốc gia, Hà Nội, 2001.
14. **Ngô Tiến Hiến,** 2001, Phát triển sưu tập gen giống Vi sinh vật Công nghiệp, Hội thảo những thành tựu KH-CN ngành Công nghiệp giai đoạn 1996-2000, Bộ Công nghiệp, Năm 2001.
15. **Trương Thị Hoà, Nguyễn Thu Hà, Trương Hương Lan, Tần Thị Minh Hà, Lại Quốc Phong,** 2003, Nghiên cứu tạo sản phẩm đồ uống muối từ đậu tương nảy mầm, Báo cáo khoa học, Proceedings, Hội nghị sinh học toàn quốc, Hà Nội, Trang 503-506.
16. **Nguyễn Thị Hồng và Ngô Tiến Hiến, 2002,** Nghiên cứu, phân lập, tuyển chọn chủng *Endomycopsis* trong sản xuất rượu cảm đặc sản, Công nghiệp, số 16/ 2002, trang 36-37.

17. Nguyễn Thị Hồng và Ngô Tiến Hiên, 2002, Nghiên cứu chế độ thủy phân tối ưu tinh bột gạo cẩm trong sản xuất rượu vang Cẩm, Công nghiệp, số 22/2002, trang 43-44.
18. Tran Van Lai, Chu Doan Thanh, Nguyen Thi Xuan Hien, Hoang Thi Le Hang, Le Thi Bich Thu, 2003, Improvement of post-harvest technology for prolonging shelf life and maintaining quality of lychee fruit, *Asean Food Science and Technology*, Vol (1), pages 424-427.
19. Hiroko Nagano, Tô Kim Anh, Tân liên Hà, 2001. Some characteristics of unique enzyme like collagenaza of *Bacillus subtilis* from traditional fermented foods, Tuyển tập báo cáo Hội nghị khoa học trường Đại học Bách khoa, tháng 10-2001.
20. Lê Việt Nga, Ngô Tiến Hiên, Nguyễn Thị Hiên, 2001, Phân loại và định tên một số chủng Nấm men có liên quan trong quá trình sản xuất nước quả có độ rượu thấp, Hội thảo Sinh học Quốc tế, Hà Nội, 2001, Tập2, Trang 315-322.
21. Lê Việt Nga, Ngô Tiến Hiên, Nguyễn Thị Hiên, 2003, Nghiên cứu thâm dò khả năng sản xuất Sider từ nguyên liệu quả Việt Nam, Báo cáo khoa học, Proceedings, Hội nghị sinh học toàn quốc, Hà Nội, Trang 607-614.
22. Lê Việt Nga, Nguyễn Thuý Hương, Nguyễn Thị Hoa (8/2001), *Nghiên cứu công nghệ sản xuất nước quả lên men có độ rượu thấp* - Đề mục 3 của Báo cáo khoa học đề tài độc lập cấp Nhà nước đã nghiên cứu nghiệp thu đạt xuất sắc: "Nghiên cứu bảo quản và chế biến quả tươi quy mô nhỏ thích hợp với đặc điểm kinh tế vương đôi ở nước ta bằng phương pháp công nghệ sinh học", Chủ nhiệm đề tài Trần Thị Châu, Viện Công nghiệp thực phẩm, Hà nội, tr. 130-151.
23. Nguyễn Thị Xuân Hiên, Hoàng Thị Lệ Hằng và các cộng sự (2003), nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học trong quá trình chế biến sản phẩm nước quả và rau quả muối, Báo cáo đề tài trọng điểm cấp bộ NN&PTNT.
24. Vũ Nguyên Thành, Nguyễn Thị Hương Giang, Đinh Mỹ Hằng, Đào Anh Hải, Dương Anh Tuấn, Trần Minh Đức, Trần Tô Châu, 2003, Đặc

tính Sinh học của nấm men sinh zymocin, Báo cáo khoa học, Proceedings, Hội nghị sinh học toàn quốc, Hà Nội, Trang 114-118.

25. Lê Thị Thu Hồng, Nguyễn Thị Thanh Lịch, Nguyễn Văn Đạt, Trương Nam Hải, 2003, Ứng dụng phương pháp biến đổi gen có định hướng để nâng cao hoạt tính enzym, Báo cáo khoa học, Proceedings, Hội nghị sinh học toàn quốc, Hà Nội, Trang 1091- 1095.

26. Phạm Thuý Hồng, Trần Ngọc Tân, Đỗ Thị Huyền, Lê Gia Hy, Trương Nam Hải, 2003, Biểu hiện gen Ácylase của vi khuẩn *Escherichia coli* ATCC 11105 trong vi khuẩn *Escherichia coli* BL21, Báo cáo khoa học, Proceedings, Hội nghị sinh học toàn quốc, Hà Nội, Trang 1195- 1198.

27. Nguyễn Thuý Hương, Ngô Mạnh Tiến, Nguyễn Thị Lộc, Đỗ Thị Loan, Đặng Hoà Bình, Vũ Quỳnh Hương, Đỗ Thị Loan, Lê Quan Ninh, Ngô Tiến Hiển, Ngô Tự Thành, 2003, Nghiên cứu quá trình lên men liên tục sản xuất cồn từ rỉ đường mía nhờ chủng nấm men *Saccharomyces Cerevisiae* Y-7028, Báo cáo khoa học, Proceedings, Hội nghị sinh học toàn quốc, Hà Nội, Trang 85-88.

28. Nguyễn Thuý Hương, Trần Thị Châu, Đỗ Hoàng Quyên, Lê Việt Nga, Ngô Mạnh Tiến, Nguyễn Thị Lộc, Đỗ Thị Loan, Đặng Hoà Bình, Đỗ Thị Loan, Đặng Thu Hương, Vũ Quỳnh Hương, Ngô tiến Hiển, 2003, Nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng rượu vang quả, Báo cáo khoa học, Proceedings, Hội nghị sinh học toàn quốc, Hà Nội, Trang 300-303.

29. Nguyễn Thuý Hương, "Ứng dụng enzym trong sản xuất viên súp có độ đậm cao từ Albumin huyết thanh bò", Hội thảo phát triển năng lực nghiên cứu thực phẩm và ứng dụng enzym trong công nghiệp thực phẩm.

30. Nguyễn Thị Xuân Sâm, Đỗ Biên Cương, 2003, Tách tinh chế và một số đặc tính của β -glucosidase từ *Aspergillus niger* PBC, Báo cáo khoa học, Proceedings, Hội nghị sinh học toàn quốc, Hà Nội, Trang 476 - 480.

31. Quyền Đình Thi, Nguyễn Thị thảo, Đặng thị Thu, 2002, "Nghiên cứu sinh tổng hợp và xác định một số đặc tính của lipaza từ vi khuẩn *Bacillus*", Tạp chí khoa học và công nghệ, tập 40, trang 191-198.

32. **Đặng Thị Thu**, 2002, "*Tối ưu hoá điều kiện sinh tổng hợp lipaza từ nấm men Candida rugosa*", Tuyển tập báo khoa học hội thảo bảo vệ môi trường và xử lý tài nguyên thiên nhiên, Hà Nội-8/ 2002 trang 390-395.

33. **Trịnh Thị Kim Vân, Trương Thị Hoà, Ngô Tiến Hiển, Lê Đình Hùng, Hoàng Đình Hoà**, 2003, Tinh chế và xác định một số đặc tính của enzym frutotsyltransferaza từ *aspergillus flavipes* VVTP 84, Báo cáo khoa học, Proceedings, Hội nghị sinh học toàn quốc, Hà Nội, Trang 564-568.

TIẾNG ANH

34. **To Kim Anh, Nagano Hiroko**, 2003. A safe collagenaza from *Bacillus subtilis* FS-2 as potential tenderizer for collagen-rich beef. The procceding of the 8th Asean Food Conference, Hanoi, 11/2003,p637.

35. **To Kim Anh, Nagano Hiroko**, 2001. Purification of collagenase and specificity of its related enzyme from *Bacillus subtilis* FS-2. Biosici. Biotechnol. Biochem., 64(1), 181-183.

36. **To Kim Anh, Tanaka Tadayoshi, Hiroko Nagano**, 2001. Isolation of a collagenase producing *bacterium* from traditional fermented food and its enzyme production. J. of Home economic of Japan. Vol. 48. N. 12., 1997, 1083-1088.

37. **Tran Thi Minh Ha, Truong Thi Hoa, Nguyen Thi Hien**, 2003, Production of wheat-based fermented beverage by mixed yeast-bacterial fermentation, *Asean Food Science and Technology*, Vol (2), pages 693-698.

38. **Hoang Thi Le Hang, Nguyen Bich Ngoc, Nguyen Thi Hien**, (2003) "Study some suitable conditions for production some kinds of apricot juice", *Asean Food Science and Technology*, Vol (1), pages 932-935.

39. **Nguyen Thi Hien, Tu Viet phu, Hoang Thi Le Hang, Tran Duy Long** (2003),

"Extraction, puryfication and characterization of β -glucosidase enzyme from apricot kernel and applying this enzyme in treattment of fruit juice", *Asean food Science and Technology*, Vol (1), pages 84-88.

40. **Nguyen Thi Xuan Hien, Hoang Thi Le Hang**, (2003), "Application of enzymes petinase in Guava juice extraction", *Asean Food Science and Technology*, Vol (1), pages 307-310.
41. **Le Quang Hoa, To Kim Anh, Dang Thi Thu**, 2003, From genomics to metabolomics: A breakthrough in food biotechnology?, *Asean Food Science and Technology*, Vol (1), pages 94-100.
42. **Truong Thi Hoa, Truong Huong Lan, Nguyen Thu Ha, Tran Thi Minh Ha, Lai Quoc Phong**, 2003, Research on production of functional cake from germinated soybean, *Asean Food Science and Technology*, Vol (1), pages 349-352.
43. **Le Viet Nga, Ngo Tuen Hien, Nguyen Thi Hien, Phan To Nga, Youg Sook Yoo**, 2002 Detection and characterization Zymnocin of Killer- Wine Yeast used in fruit juice fermentation, Symposium on Environmental Protection and Sustainable Exploitation of Natural Resources, Hanoi, August 4-5, 2002, P, 640-649.
44. **Dang Thi Thu, Ha Duyen Tu, Phung Thi thuy, Nguyen Sy Le Thanh, Vu Te Xien**, 2003, Optimization of the culture for extracellular milk-clotting enzyme from *Aspergillus awamory* 18, *Asean Food Science and Technology*, Vol (1), pages 558-562.
45. **Le Viet Nga, Ngo Tien Hien, Nguyen Thi Hien, Pham Thi Hong**, 2003, Improvement of yeast quality for use in fruit juice fermentation in Vietnam, *Asean Food Science and Technology*, Vol (2), pages 613-618,
46. **Nguyen Thi Xuan Sam, Dang Thi Thu**, 2003, Production of β -glucozidase by *Aspergillus niger* PBC using sugar cane bagasse, *Asean Food Science and Technology*, Vol (1), pages 110.
47. **Trinh Thi Kim Van, Hoang Dinh Hoa, Truong Thi Hoa, Le Dinh Hung**, 2003, Strain selection and determination of frutosyltransferase fermentation, *Asean Food Science and Technology*, Vol (2), pages 685-689.