

ẢNH HƯỞNG CỦA XỬ LÝ SIÊU ÂM TỚI QUÁ TRÌNH THU NHẬN CHẾ PHẨM GIÀU PROTEIN TRONG BÃ NẤM MEN BIA

Phạm Thị Thuỳ Dương, Nguyễn Đức Vạn Bửu, Vũ Thị Hương*

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

*Email: huongvt@hufi.edu.vn

Ngày nhận bài: 06/01/2020; Ngày chấp nhận đăng: 30/3/2020

TÓM TẮT

Bã nấm men là phụ phẩm của ngành công nghiệp sản xuất bia, được tách ra trong quá trình lên men chính và lên men phụ. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định sự ảnh hưởng và tối ưu hoá một số yếu tố siêu âm tới quá trình chiết xuất nấm men từ bã nấm men bia. Các yếu tố đó là: tỷ lệ nấm men, thời gian siêu âm, mật độ năng lượng siêu âm. Kết quả cho thấy, điều kiện thích hợp là: tỷ lệ nấm men 46,90%, thời gian siêu âm 7,23 phút, mật độ năng lượng 2,29 W/g cho lượng protein cao nhất đạt 79,48 mg/g và hiệu suất đạt giá trị cao nhất là 71,03%. Kết quả nghiên cứu này bước đầu cung cấp các thông tin về các yếu tố ảnh hưởng trong quá trình sản xuất chế phẩm giàu protein trong bã nấm men bia, nâng cao hiệu quả kinh tế và giảm ô nhiễm môi trường của quá trình sản xuất bia.

Từ khóa: Chế phẩm giàu protein, siêu âm, bã nấm men bia, protein, hiệu suất chiết xuất.

1. MỞ ĐẦU

Hàng năm, ngành công nghiệp bia ở nước ta thải ra một lượng rất lớn bã nấm men bia - một phế liệu của sản xuất, thường nằm tại đáy các thùng lên men bia sau quá trình lên men chính và lên men phụ. Trung bình sản xuất 100 lít bia sẽ thu được 2 lít bã nấm men bia với độ ẩm khoảng 88% [1]. Theo thống kê của Hiệp hội Bia - Rượu - Nước giải khát Việt Nam, năm 2018 cả nước có trên 110 doanh nghiệp sản xuất bia với tổng sản lượng đạt trên 4,2 tỷ lít/năm, tương ứng với khoảng 84 triệu tấn bã nấm men thải ra. Một phần nhỏ lượng bã nấm men này được bán cho các hộ chăn nuôi sử dụng làm thức ăn cho gia súc, còn phần lớn bị thải ra môi trường gây ô nhiễm môi trường trầm trọng. Một bài toán cần giải quyết là phải tạo ra một sản phẩm có giá trị cao từ nguồn phế phẩm to lớn này. Sản xuất chế phẩm giàu protein chính là một trong những lời giải cho bài toán trên.

Chế phẩm giàu protein thành phần dinh dưỡng cao nhất từ nội bào của tế bào nấm men, bao gồm tế bào chất, nhân tế bào và thường rất giàu acid amin, vitamin (vitamin B, glutathione), carbohydrate và muối. Bản chất của quá trình sản xuất này là quá trình thủy phân nấm men để tạo thành một hỗn hợp bao gồm các peptide, acid amin, vitamin và các thành phần tế bào nấm men khác sau khi loại bỏ các thành phần không hòa tan được gọi là chiết xuất nấm men [2]. Việc sản xuất chế phẩm giàu protein từ bã nấm men bia góp phần tái sử dụng nguồn phế phẩm ngành bia đem lại hiệu quả kinh tế, giảm thiểu nguy cơ gây ô nhiễm môi trường.

Hiện nay, việc sản xuất chế phẩm giàu protein thường sử dụng các phương pháp như tự phân, co nguyên sinh và thủy phân. Phương pháp tự phân có ưu điểm là sản phẩm hấp dẫn, tự nhiên nhưng hiệu suất của quá trình này thường thấp, khó tách pha rắn-lỏng, sản phẩm có thể bị nhiễm vi sinh vật khác [3].

Phương pháp thủy phân được thực hiện bởi acid hoặc protein là phương pháp hiệu quả nhất cho hòa tan của nấm men. Thủy phân bằng dung dịch acid đã được dùng rộng rãi với quy mô lớn do có ưu điểm hiệu suất thủy phân cao, thời gian sản xuất nhanh, sản phẩm giàu acid amin và dễ bảo quản. Tuy nhiên, sản phẩm có hàm lượng muối cao và xác suất gây ung thư lớn [4]). Ngoài phương pháp thủy phân nấm men bằng acid còn thủy phân bằng các chế phẩm protein có nguồn gốc của vi khuẩn, nấm men, thực vật hoặc động vật. Phương pháp này có ưu điểm là không làm biến đổi thành phần acid amin ban đầu nhưng chi phí sử dụng protein cao dẫn đến giá thành cao [4].

Phương pháp cuối cùng được sử dụng để sản xuất chiết xuất nấm men là phương pháp cơ nguyên sinh. Những tác nhân gây cơ nguyên sinh này còn có tác dụng diệt khuẩn nên còn làm giảm sức tăng trưởng của những vi khuẩn tạp nhiễm vào dung dịch và có thể gây ra những hậu quả như tăng độ keo của dung dịch gây cản trở quá trình lọc và làm thay đổi hương vị của sản phẩm. Ngoài ra, có thể gây cơ nguyên sinh bằng các biện pháp cơ học như nghiền, đồng hóa, sử dụng sóng siêu âm, áp suất cao, nhiệt độ... Phổ biến nhất là nghiền bằng hạt thủy tinh nhưng phương pháp này liên quan đến điều kiện khắc nghiệt, có thể dẫn đến biến tính protein và giảm năng suất. Sóng siêu âm là biện pháp cơ học gây nên cơ nguyên sinh tế bào nấm men. Phương pháp trích ly bằng siêu âm dùng năng lượng của sóng siêu âm hỗ trợ phá vỡ tế bào để tăng hiệu quả trích ly. Năng lượng siêu âm làm tăng dao động ở bề mặt, điều này có thể làm ảnh hưởng đến lớp ranh giới khuếch tán và tạo ra sự co giãn ở bề mặt vật liệu và từ đó ảnh hưởng đến quá trình truyền khối. Esclapez và cộng sự cho rằng, phương pháp siêu âm là một trong những phương pháp đầy triển vọng của quá trình trích ly [5]. Baldyga và cộng sự (2012) khi nghiên cứu sự phân rã tế bào nấm men bằng sóng siêu âm đã thu được kết quả là lượng protein giải phóng ra hiệu quả nhất khi sử dụng siêu âm ở tần số $f = 20$ kHz, thời gian siêu âm là 5 phút [6]. Như vậy, chiết xuất protein bằng sóng siêu âm có nhiều ưu điểm như thời gian chiết xuất ngắn, dễ thực hiện, sản phẩm hấp dẫn, tự nhiên và không gây ô nhiễm môi trường. Mục đích của nghiên cứu này là tìm ra điều kiện tối ưu để sản xuất chế phẩm giàu protein với hiệu suất cao nhất. Để tìm ra được các điều kiện tối ưu này cần phải tiến hành khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ nấm men, thời gian xử lý siêu âm, mật độ năng lượng siêu âm đến quá trình sản xuất chế phẩm giàu protein từ bã nấm men bia. Sau đó, tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) - thiết kế cấu trúc có tâm (Central Composite Design - CCD).

2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu

Bã nấm men bia (*S. carlsbergensis*) sử dụng trong nghiên cứu này được Nhà máy Bia Sài Gòn-Bình Dương cung cấp. Bã nấm men được thu hồi ở đáy các thùng lên men, được chứa trong can 10 lít và bảo quản bằng thùng đựng đá trong suốt thời gian vận chuyển (khoảng 2 giờ). Quá trình làm sạch được thực hiện theo quy trình xử lý của tác giả Lê Văn Việt Mẫn và cộng sự khi nghiên cứu quá trình tự phân bã nấm men bia để thu nhận chế phẩm invertase, cụ thể như sau: Đầu tiên bã nấm men được trộn đều với nước vô khuẩn theo tỷ lệ 1/3 (w/w), để yên ở điều kiện lạnh cho nấm men tự lắng. Sau 1 giờ lắng, gạn bỏ phần nước phía trên, thu nhận phần nấm men lắng phía dưới. Tiến hành rửa nấm men bằng nước muối NaCl 0,5% với tỷ lệ nấm men/nước muối là 1/3 (w/w) để loại bỏ các chất nhớt, chất đường có trong dịch nấm men [7]. Nấm men sau khi rửa được cho vào các chai nhựa dung tích 500 mL, đậy kín nắp, bảo quản ở nhiệt độ 0-5 °C để tiến hành các thí nghiệm. Thời gian sử dụng mẫu cho mỗi đợt không quá 5 ngày. Bã nấm men được trộn với nước cất vô trùng để tạo thành hỗn hợp huyền phù. Ở mỗi nghiệm thức, 100 g huyền phù chứa trong cốc thủy tinh 250 mL được xử lý siêu âm bằng thiết bị Sonics 750-Watt (Sonics, Đức) công suất tối đa 750 W, tần số 20 kHz với

đầu phát siêu âm được nhúng ngập 2 cm trong huyền phù. Tỷ lệ nấm men trong huyền phù và chế độ siêu âm được điều chỉnh theo kế hoạch thực nghiệm.

Thiết bị: máy siêu âm Sonics 750-Watt (Sonics, Đức), máy hấp thu quang phổ V730 (Jasco, Nhật Bản), máy ly tâm Z 206A (Hermale, Đức), thiết bị sấy phun SD-06 (Labplant, Anh), máy cô quay chân RVO 400SD (BOECO, Đức).

Các dụng cụ: Bình tam giác, bình định mức, nhiệt kế, pipet...

Hoá chất: NaCl, Na₂CO₃, NaOH, CuSO₄.5H₂O, KNaC₄H₄O₆.4H₂O, albumin, folin.

2.2. Bố trí thí nghiệm

Trong nghiên cứu này, các yếu tố được nghiên cứu bằng phương pháp đơn yếu tố. Cụ thể, các yếu tố được lần lượt khảo sát độc lập. Khi một yếu tố được khảo sát thì các yếu tố còn lại sẽ được cố định ở một mức đã được lựa chọn. Tất cả các thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần, kết quả thí nghiệm là trung bình của 3 lần thực nghiệm. Chỉ tiêu đánh giá protein tổng số, hiệu suất thu hồi. Các yếu tố được khảo sát là: tỷ lệ nấm men (40, 50, 60, 70, 80% (w/w)), thời gian siêu âm (3-9 phút, bước nhảy 2 phút), mật độ năng lượng siêu âm (1,875-3W/g, bước nhảy 0,375 W/g). Các thí nghiệm được thực hiện tại nhiệt độ phòng.

Sau đó, thực hiện tối ưu hoá các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sản xuất chế phẩm giàu protein từ *S.carlsbergensis* bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) - thiết kế cấu trúc có tâm CCD, sử dụng phần mềm thống kê JMP 10.

2.3. Phương pháp phân tích

2.3.1. Phương pháp tính lượng protein

Lượng protein được tính toán theo phương pháp Lowry [8], cụ thể như sau: Lấy 1 mL mẫu cho vào một ống nghiệm sạch, thêm vào đó 2 mL dung dịch C (là hỗn hợp của hai dung dịch A (2 g Na₂CO₃ hòa tan trong NaOH 0,1 N thành 100 mL) và B (0,5 g CuSO₄.5H₂O hòa tan trong dung dịch muối kali natri tartrate 1% thành 100 mL) được pha theo tỷ lệ 49:1. Lắc đều và để yên ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Sau đó thêm vào 0,4 mL thuốc thử Folin, lắc đều và để yên trong 15 phút. Thêm 2 mL nước cất, lắc đều và đo độ hấp thụ ở bước sóng 750 nm bằng máy quang phổ V730 (Jasco, Nhật Bản). Độ hấp thụ của dịch chiết xuất ở bước sóng 750 nm tỷ lệ thuận với nồng độ protein trong một phạm vi nhất định. Dựa vào mức độ hấp thụ quang học của protein chuẩn (albumin) có thể xác định được hàm lượng protein trong mẫu.

2.3.2. Phương pháp xác định hiệu suất thu hồi protein

Quá trình siêu âm tạo ra một áp lực lớn xuyên qua dung môi và tác động đến tế bào nấm men làm giải phóng protein và các hợp chất có bên trong thành tế bào nấm men. Hiệu suất thu hồi protein càng cao thì quá trình siêu âm càng hiệu quả và hiệu suất được tính toán theo công thức (1) [9].

$$H = \frac{\text{Lượng protein trong chiết xuất nấm men} \times \text{khối lượng chiết xuất nấm men sau ly tâm}}{\text{Lượng protein của hỗn hợp nấm men lý thuyết} \times \text{khối lượng nấm men trước ly tâm}} \times 100\% \quad (1)$$

Trong đó: Lượng protein lý thuyết được xác định bằng phương pháp Kjeldahl.

Lượng protein trong chiết xuất nấm men xác định bằng phương pháp Lowry.

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

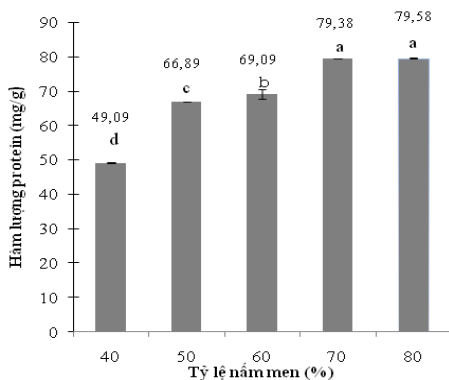
Tất cả các thí nghiệm được bố trí lặp lại 3 lần để đảm bảo tiến hành phân tích ANOVA. Số liệu được phân tích ANOVA bằng phần mềm xử lý số liệu thống kê chuyên dụng JMP 10.

Kiểm định Student's được thực hiện để đánh giá mức độ khác biệt có ý nghĩa giữa các giá trị với mức ý nghĩa $p < 0,05$.

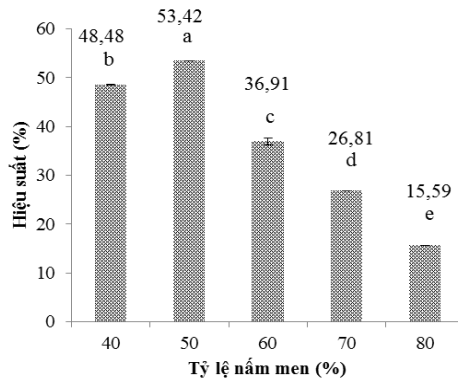
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ nấm men đến lượng protein và hiệu suất chiết xuất

Hiệu quả của quá trình siêu âm phụ thuộc rất lớn vào tỷ lệ nấm men và dung môi. Nhìn chung, tỷ lệ dung môi lớn có thể hòa tan, chiết xuất được các thành phần hiệu quả hơn, dẫn tới tăng cường sản lượng khai thác [10]. Tuy nhiên, điều này sẽ gây ra sự lãng phí dung môi cũng như lãng phí các chi phí liên quan. Mặt khác, tỷ lệ dung môi nhỏ dẫn đến sản lượng khai thác thấp hơn [11]. Do đó, sự lựa chọn tỷ lệ nấm men là rất quan trọng. Trong nghiên cứu này, quá trình xử lý siêu âm với tỷ lệ nấm men thay đổi từ 40 đến 80% về khối lượng. Dung môi sử dụng là nước cất, thời gian xử lý siêu âm được cố định trong 5 phút và mật độ năng lượng cố định là 2,000 W/g. Ảnh hưởng của tỷ lệ nấm men đến lượng protein và hiệu suất chiết xuất được thể hiện lần lượt ở Hình 1 và Hình 2.



Hình 1. Ảnh hưởng của tỷ lệ nấm men đến lượng protein thu được



Hình 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ nấm men đến hiệu suất chiết xuất

(Các mẫu tự khác nhau biểu diễn sự sai khác có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%)

Ảnh hưởng của tỷ lệ nấm men trong dịch xử lý siêu âm đến lượng protein có sự khác biệt giữa các mức từ 40% đến 60%, nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa giữa tỷ lệ 70% và 80%. Lượng protein thu được cao nhất tại tỷ lệ 80% (79,53 mg/g) và thấp nhất ở 40% (49,09 mg/g). Như vậy, tỷ lệ nấm men càng cao thì lượng protein thu được càng lớn. Nguyên nhân của hiện tượng này là khi tăng tỷ lệ nấm men thì mật độ tế bào nấm men trong dung dịch xử lý siêu âm tăng. Khi đó, lượng tế bào nấm men bị phá hủy bởi sóng siêu âm nhiều hơn, lượng protein cũng tăng lên, nhưng khi mật độ tế bào nấm men trong dung dịch xử lý siêu âm tăng lên quá cao thì khả năng phá vỡ tế bào nấm men của sóng siêu âm bị hạn chế.

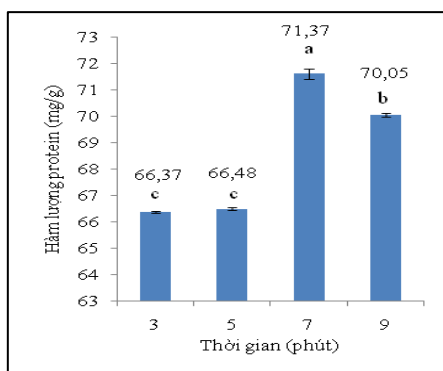
Bên cạnh đó, tỷ lệ nấm men cũng ảnh hưởng rất nhiều đến hiệu suất chiết xuất nấm men, sự ảnh hưởng này có ý nghĩa với $p < 0,05$. Khi tỷ lệ nấm men tăng từ 40% lên 50%, hiệu suất chiết xuất tăng từ 48,48% lên 53,42% và khối lượng dịch chiết thu được tăng từ 71,89 g lên 72,67 g. Tuy nhiên, khi tăng tỷ lệ nấm men lên 80%, hiệu suất chiết xuất lại giảm dần, lần lượt xuống còn 36,91%, 26,81% và 15,59% tương ứng với khối lượng dịch chiết thu được là 58,34 g, 43,03 g và 28,54 g. Điều này xảy ra là do khi tăng tỷ lệ nấm men thì tỷ lệ nước bổ sung giảm đi, khối lượng dịch chiết xuất thu được sau ly tâm giảm dần, nên dẫn đến hàm lượng protein thu được sẽ ít hơn.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, ở tỷ lệ nấm men 80% lượng protein cao nhất nhưng hiệu suất chiết xuất lại nhỏ nhất. Hiện tượng này có thể lý giải là do khi tỷ lệ nấm men tăng sẽ làm

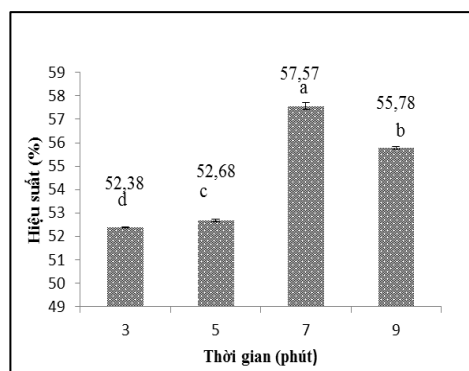
hạn chế sự bốc hơi chất lỏng, giảm sự hình thành các bong bóng khí, hiện tượng sủi bóng chỉ xảy ra xung quanh đầu dò của thiết bị siêu âm dẫn tới hiệu quả siêu âm bị giảm [12]. Với mục tiêu là hiệu suất chiết xuất cao nhất, tỷ lệ nấm men 50% được lựa chọn để tiến hành khảo sát quá trình tiếp theo.

3.2. Ảnh hưởng của thời gian siêu âm đến lượng protein và hiệu suất chiết xuất

Thời gian siêu âm cũng đóng vai trò nhất định trong toàn bộ quá trình chiết xuất protein, nó không chỉ ảnh hưởng đến hiệu suất trích ly mà còn ảnh hưởng đến chi phí, đặc biệt là chất lượng của dịch chiết [8]. Các mốc thời gian 3, 5, 7 và 9 phút được lựa chọn để khảo sát. Các yếu tố cố định là tỷ lệ nấm men 50%, mật độ năng lượng siêu âm 2,00 W/g. Ảnh hưởng của thời gian siêu âm đến khả năng thu hồi lượng protein và hiệu suất chiết xuất ở Hình 3.



Hình 3. Ảnh hưởng của thời gian xử lý siêu âm đến lượng protein



Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian xử lý siêu âm đến hiệu suất thu hồi

(Các mẫu tự khác nhau biểu diễn sự sai khác có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%)

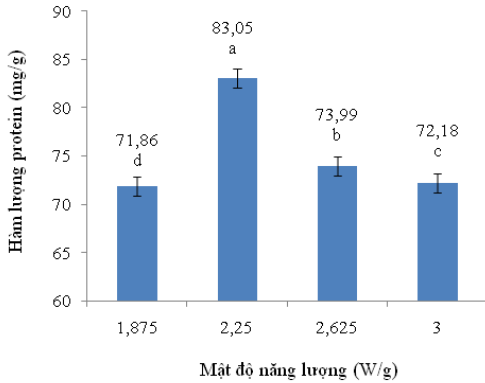
Ảnh hưởng của thời gian siêu âm (phút) đến hàm lượng và hiệu suất thu hồi protein được thể hiện ở Hình 3 và 4. Kết quả phân tích phương sai (ANOVA) cho thấy có sự khác biệt về mặt thống kê ($p < 0,05$) giữa các nghiệm thức đối với lượng protein và hiệu suất chiết xuất. Điều này chứng tỏ sự thay đổi thời gian siêu âm ảnh hưởng rõ rệt đến quá trình phá vỡ tế bào nấm men để thu hồi dịch chiết nấm men bia.

Khi thời gian siêu âm tăng từ 3 phút lên 7 phút thì lượng protein và hiệu suất chiết xuất tăng. Sau đó, khi tiếp tục tăng thời gian xử lý siêu âm lớn hơn 7 phút thì lượng protein thu hồi giảm xuống. Nguyên nhân của hiện tượng trên là do khi tăng thời gian xử lý siêu âm thì thời gian để sóng siêu âm tác động đến tế bào nấm men càng nhiều và kết quả là số lượng tế bào nấm men bị phá hủy nhiều hơn. Do đó, lượng protein và hiệu suất chiết xuất tăng lên. Tuy nhiên, khi thời gian xử lý siêu âm được tăng lên lớn hơn 7 phút thì lượng protein và hiệu suất thu hồi lại bị giảm xuống do thời gian siêu âm dài làm tăng nhiệt độ của dung dịch siêu âm dẫn đến biến tính của protein và đông tụ của thành phần nội bào, làm cho protein không thoát ra được [13]. Như vậy, việc kéo dài thời gian xử lý siêu âm không chỉ góp phần làm tăng khả năng phá hủy tế bào nấm men mà còn có tác động đến cấu trúc protein của chiết xuất nấm men làm cho lượng protein và hiệu suất thu hồi giảm xuống. Khi gây co nguyên sinh bằng nhiệt độ thì điều kiện thích hợp là pH 5,5 ở nhiệt độ 58 °C trong thời gian 40-48 giờ và thu được hiệu suất khoảng 56%. Kết quả tương tự thu được với cùng một điều kiện như trên nếu bổ sung isopropanol với nồng độ 0,5% (v/v) và giữ nhiệt độ hơi thấp trong 5 giờ đầu [14]. Bên cạnh đó, khi sử dụng phương pháp tự phân, điều kiện cần thiết để quá trình diễn ra tối ưu là nhiệt độ 35-65 °C, pH 8-10 trong thời gian 4-10 giờ. Như vậy, việc sử dụng sóng siêu âm để phá vỡ tế bào thu nhận protein đã làm giảm được thời gian xử lý rất lớn với phương pháp gây co nguyên sinh bằng nhiệt độ và gây co nguyên sinh bằng nhiệt độ kết hợp dung môi. Kết quả

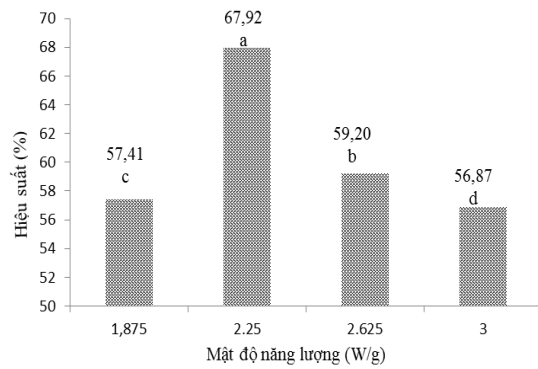
thu được cũng cho thấy, hiệu suất thu hồi protein khi chiết xuất bằng sóng siêu âm cao (57,57%) hơn nhiều so với quá trình tự phân trong 24 giờ ở nhiệt độ 50 °C (48,70%) của Hansan *et al* (2008) khi nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ tự phân đến quá trình thu nhận chế phẩm giàu protein từ bã nấm men bia [15]. Chính vì vậy, thời gian xử lý siêu âm là 7 phút được lựa chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

3.3. Khảo sát ảnh hưởng của mật độ năng lượng siêu âm

Thí nghiệm này khảo sát ảnh hưởng của mật độ năng lượng siêu âm lần lượt là 1,875 W/g; 2,25 W/g; 2,625 W/g và 3,000 W/g. Tỷ lệ nấm men, thời gian siêu âm là kết quả tối ưu của thí nghiệm trước, lần lượt là 50% và 7 phút.



Hình 5. Ảnh hưởng của mật độ năng lượng siêu âm đến lượng protein



Hình 6. Ảnh hưởng của mật độ năng lượng siêu âm đến hiệu suất chiết xuất

(Các mẫu tự khác nhau biểu diễn sự sai khác có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%)

Ảnh hưởng của mật độ năng lượng siêu âm đến quá trình chiết xuất nấm men bia được thể hiện ở Hình 5 và 6. Kết quả phân tích phương sai (ANOVA) cho thấy có sự khác biệt về mặt thống kê ($p < 0,05$) giữa các nghiệm thức đối với lượng protein và hiệu suất thu hồi. Điều này chứng tỏ rằng mật độ năng lượng siêu âm có ảnh hưởng rõ đến quá trình phá vỡ tế bào nấm men để thu hồi protein.

Khi tăng mật độ năng lượng siêu âm từ 1,875 W/g lên 2,250 W/g thì lượng protein tăng từ 71,86 mg/g đến 83,05 mg/g. Khi tiếp tục tăng mật độ năng lượng xử lý siêu âm lên 2,625 W/g và 3,000 W/g, lượng protein giảm xuống so với xử lý siêu âm ở mật độ năng lượng 2,25 W/g. Nguyên nhân của hiện tượng trên là khi tăng mật độ năng lượng siêu âm, khả năng phá hủy tế bào nấm men của sóng siêu âm tăng lên làm cho lượng protein trong tế bào nấm men thoát ra nhiều hơn. Tuy nhiên, khi mật độ năng lượng xử lý siêu âm được tăng lên cao ($>2,25$ W/g) thì khả năng phá hủy tế bào nấm men của sóng siêu âm là rất lớn, lúc này sóng siêu âm không chỉ phá vỡ tế bào nấm men mà nó còn tác động đến cấu trúc protein. Siêu âm tạo ra các bong bóng khí, khi các bong bóng khí vỡ tạo ra nhiệt độ, áp suất cao và các gốc H^+ và OH^- tại vị trí đó trong khoảng thời gian ngắn. Protein có thể bị mất ổn định ở giao diện không khí- chất lỏng, các gốc tự do OH^- tạo ra các oxit hoạt tính khác nhau như H_2O và O_2^- [16]. Các phản ứng oxy hóa nhiều gốc khác nhau trong protein tạo ra các gốc protein, sau đó các phản ứng oxy hóa, phản ứng chuỗi, phản ứng chéo và phản ứng phân hủy xảy ra có thể làm giảm tính ổn định của protein. Kết quả là lượng protein bị giảm xuống và hiệu suất thu hồi giảm. Kết quả thu được từ thí nghiệm cũng gần với kết quả thí nghiệm của Marques *et al.* (2006) khi nghiên cứu công suất tối ưu để sản xuất enzyme invertase từ nấm men là 200 W/100 g mẫu [17]. Vì vậy, mật độ năng lượng siêu âm là 2,25 W/g mẫu (225 W/100 g mẫu) được lựa chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

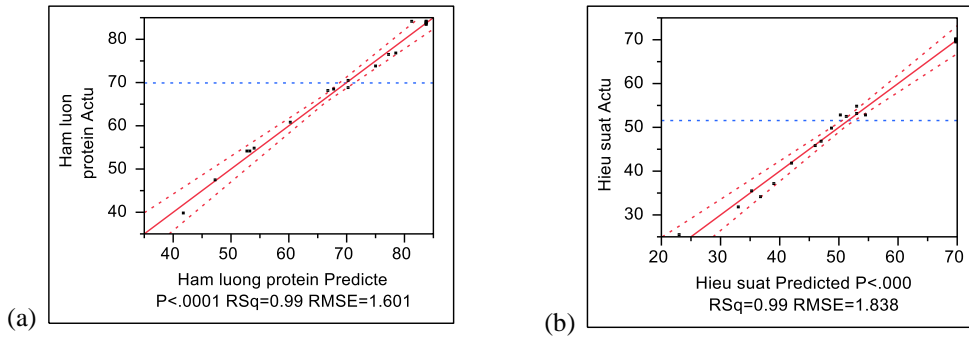
3.4. Tối ưu hóa một số yếu tố siêu âm đến quá trình sản xuất chế phẩm giàu protein trong bã nấm men bia

Ở thí nghiệm này, tỷ lệ nấm men (X_1) 40-60%, thời gian siêu âm (X_2) 5-9 phút và mật độ năng lượng siêu âm (X_3) 1,875-2,625 W/g mẫu được khảo sát đồng thời nhằm mục đích xây dựng một mô hình toán học mô tả mối quan hệ giữa các yếu tố ảnh hưởng tới lượng protein và hiệu suất thu hồi protein và tìm ra điều kiện của quá trình xử lý siêu âm để lượng protein (Y_1) và hiệu suất thu hồi protein (Y_2) là cao nhất. Các mức của yếu tố thí nghiệm được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Các mức của yếu tố trong thí nghiệm tối ưu hóa

ĐVTN	Dạng thức	Mã hóa			Giá trị	
		X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2
1	a00	33,182	7,00	2,250	39,78	46,77
2	---	40	5,00	1,875	47,33	41,64
3	--+	40	5,00	2,625	54,04	52,21
4	-+-	40	9,00	1,875	54,54	53,14
5	-++	40	9,00	2,625	54,04	52,68
6	0a0	50	3,64	2,25,0	60,64	45,74
7	00a	50	7,00	1,619	67,9	49,55
8	0	50	7,00	2,250	83,75	69,68
9	0	50	7,00	2,250	83,84	69,92
10	0	50	7,00	2,250	83,9	69,99
11	0	50	7,00	2,250	83,44	69,62
12	0	50	7,00	2,250	83,26	69,43
13	0	50	7,00	2,250	83,72	69,72
14	00A	50	7,00	2,881	70,18	54,61
15	0A0	50	10,36	2,250	68,21	52,83
16	+-	60	5,00	1,875	68,8	35,33
17	++	60	5,00	2,625	73,69	37,11
18	+-	60	9,00	1,875	76,61	34,1
19	+++	60	9,00	2,625	76,25	31,61
20	A00	66,818	7,00	2,250	84,16	25,4

Để xác định có sự tương tác giữa các yếu tố tỷ lệ nấm men, thời gian và mật độ năng lượng siêu âm, các dữ liệu thực nghiệm đã được thông kê phân tích bằng cách sử dụng JMP 10 và kết quả thu được (Hình 7 và Bảng 1) cho thấy có sự tương tác, ảnh hưởng qua lại giữa tỷ lệ nấm men, thời gian và mật độ năng lượng siêu âm.



Hình 7. Tương quan của lượng protein (a) và hiệu suất (b)

Lượng protein được thể hiện trong Hình 7 và Bảng 2 với hệ số tương quan $R^2 = 0,993$ cho thấy lượng protein lý thuyết và thực nghiệm có sự tương thích với nhau và có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Với $R^2_{\text{hiệu chỉnh}} = 0,987$ sai khác khác nhỏ khoảng 0,006 so với R^2 nên phương trình hồi quy có độ chính xác khá cao. Ở đây, giá trị P của mô hình nhỏ hơn so với 0,0001 (Bảng 2), điều đó chỉ ra rằng mô hình phù hợp để sử dụng trong thí nghiệm này. Từ giá trị p của mỗi mô hình, có thể kết luận rằng tất cả các biến nghiên cứu độc lập (X_1, X_2, X_3) và bậc hai ba yếu tố (X_1^2, X_2^2, X_3^2) có ảnh hưởng đáng kể đến lượng protein. Các phân tích cho thấy có sự tương tác đáng kể giữa thời gian và mật độ năng lượng ($p < 0,05$) và không có sự tương tác giữa tỷ lệ với thời gian và tỷ lệ với mật độ năng lượng.

Bảng 2. Hệ số hồi quy và ý nghĩa của mô hình bậc hai của thí nghiệm tối ưu hóa chế độ xử lý siêu âm với các chỉ tiêu theo dõi

Thông số	Chỉ tiêu theo dõi			
	Hàm lượng protein (Y_1)		Hiệu suất chiết xuất (Y_2)	
	Hệ số hồi quy	Giá trị p	Hệ số hồi quy	Giá trị p
Hằng số	83,68	<0,0001*	69,80	<0,0001*
Bậc 1				
X_1	11,72	<0,0001*	-7,14	<0,0001*
X_2	2,22	0,0005*	1,26	0,0301*
X_3	1,07	0,0335*	1,31	0,0249*
Tương tác				
$X_1.X_2$	0,40	0,5014	-2,34	0,0049*
$X_1.X_3$	-0,21	0,7185	-1,35	0,0641
$X_2.X_3$	-1,56	0,0205*	-1,91	0,0147*
Bậc 2				
X_1^2	-7,85	<0,0001*	-12,35	<0,0001*
X_2^2	-6,98	<0,0001	-7,68	<0,0001*
X_3^2	-5,35	<0,0001	-6,69	<0,0001*
Hệ số				
R^2	0,993		0,991	
R^2 hiệu chỉnh	0,987		0,984	

Hiệu suất chiết xuất có sự tương quan chặt chẽ giữa lý thuyết với thực nghiệm ($R^2 = 0,99$). Mô hình thí nghiệm đưa ra là phù hợp, có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Thông qua Bảng 2 từ các giá trị P của mô hình kết quả cho thấy, các biến độc lập (X_1, X_2, X_3) bậc hai các yếu tố (X_1^2, X_2^2, X_3^2) có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả chiết xuất protein và có sự tương tác giữa tỷ lệ với thời gian. Trong các yếu tố ảnh hưởng tới hiệu quả của quá trình sản xuất chế phẩm giàu protein, tỷ lệ nấm men là yếu tố ảnh hưởng nhiều nhất.

Từ Bảng 2, phương trình hồi quy bậc hai được thiết lập thể hiện mức độ ảnh hưởng của từng yếu tố khảo sát và sự tương tác giữa chúng đến từng hàm mục tiêu như sau:

Lượng protein:

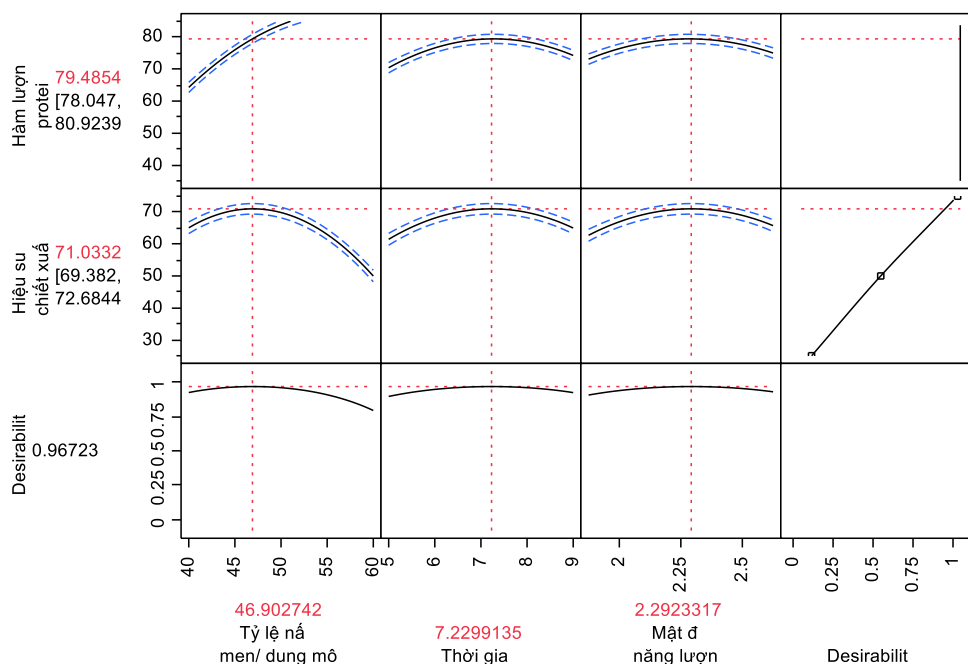
$$Y_1 = 83,68 + 11,72 X_1 + 2,12 X_2 + 1,07 X_3 - 1,56 X_2 \cdot X_3 - 7,84 X_1^2 - 6,98 X_2^2 - 5,35 X_3^2$$

Hiệu suất chiết xuất nấm men:

$$Y_2 = 69,80 - 7,14 X_1 + 1,26 X_2 + 1,31 X_3 - 2,34 X_1 \cdot X_2 - 1,91 X_2 \cdot X_3 - 12,35 X_1^2 - 7,68 X_2^2 - 6,69 X_3^2$$

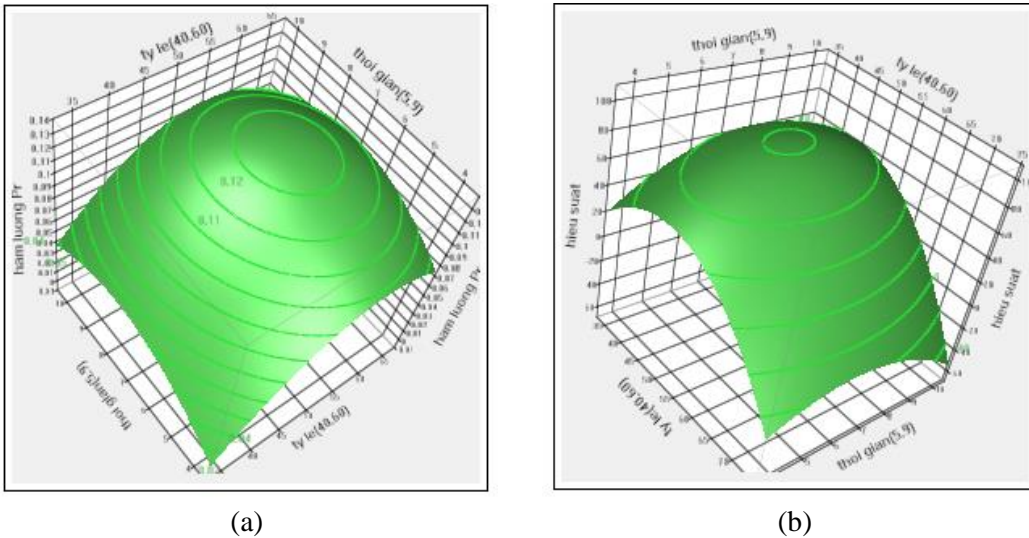
Trong đó: Y_1, Y_2 lần lượt là lượng protein (mg/g) và hiệu quả chiết xuất nấm men (%); X_1 : tỷ lệ nấm men (%); X_2 : thời gian (phút), X_3 : mật độ năng lượng (W/g).

Nhìn chung, lượng protein và hiệu suất chiết xuất nấm men tăng dần cùng với sự gia tăng của các biến tỷ lệ nấm men (X_1), mật độ năng lượng siêu âm (X_2) và thời gian xử lý siêu âm (X_3) đến một giá trị tới hạn; tuy nhiên, sau đó giảm xuống khi các biến tăng quá mức tới hạn này.



Hình 8. Giá trị tối ưu dự đoán

Qua xử lý thống kê cho thấy hiệu suất đạt giá trị cao nhất là 71,03%, lượng protein chỉ đạt giá trị 79,48 mg/g khi tỷ lệ nấm men là 46,90%, thời gian siêu âm là 7,23 phút và siêu âm ở mật độ năng lượng 2,29 W/g.



Hình 9. Bề mặt đáp ứng thể hiện ảnh hưởng của các yếu tố đến lượng protein (a) và hiệu suất chiết xuất (b).

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy, các yếu tố tỷ lệ nấm men, thời gian siêu âm, mật độ năng lượng siêu âm đều ảnh hưởng lớn đến hàm lượng protein và hiệu quả chiết xuất protein từ tế bào nấm men. Sau khi tối ưu hoá các yếu tố ảnh hưởng, quá trình sản xuất chế phẩm giàu protein đạt kết quả tối ưu nhất ở tỷ lệ nấm men là 46,94%, thời gian siêu âm là 7,23 phút và siêu âm ở mật độ năng lượng 2,29 W/g. Khi đó, hiệu suất đạt giá trị cao nhất là 71,03%, lượng protein đạt giá trị 79,55 mg/g. Dựa vào kết quả nghiên cứu này, có thể tiếp tục nghiên cứu xác định phương pháp khử đắng và cách phối chế để sử dụng chế phẩm này làm gia vị thay thế bột ngọt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Halasz A., Lasztity R. - Use of yeast biomass in food product, CRC Press, Boca Raton (1991) p.312.
2. Satake K. - Tận dụng men dư thừa trong các nhà máy bia, Hội thảo Công nghệ xử lý chất thải và tận dụng nấm men trong ngành sản xuất bia, TP. Hồ Chí Minh 13/3/2002, 11-16.
3. Bayarjargal M., Munkhbat E., Ariunsaikhan T., Odonchimeg M., Uurzaikh T., Gan-Erdene T., and Regdel D. - Utilization of spent brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* for the production of yeast enzymatic hydrolysate, Mongolian Journal of Chemistry **12** (38) (2011) 88-91.
4. Nagowithana T. - Yeast-derived flavors and flavor enhancers and their propable mode of action, Food Technology **46** (1992) 138-144.
5. Esclapez M.D., García-Pérez J.V., Mulet A., and Cárcel J. - Ultrasound-assisted extraction of natural products, Food Engineering Reviews **3** (2011) 108-120.
6. Bałdyga J., Jasińska M., Dziegielewska M., and Żochowska M. - Disruption of yeast cells with ultrasound, 14th European Conference on Mixing, Warsaw, Poland (2012).
7. Lê Văn Việt Mẫn, Trần Thắm Minh Hoàng, Nguyễn Ngọc Tuyết Sương - Nghiên cứu quá trình tự phân bã nấm men bia để thu nhận chế phẩm invertase, Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ **9** (12) (2006) 49-55.

8. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., - Protein measurement with the Folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry* **193** (1951) 265-275.
9. Kalum - Method for producing a yeast extract, Patents WO2008077890A1, WIPO (2008).
10. Li H., Chen B., Yao S. - Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* Oliv. (*E. ulmoides*), *Ultrasonics Sonochemistry* **12** (4) (2005) 295-300.
11. Valachovic P., Pechova A., Mason T.J. - Towards the industrial production of medicinal tincture by ultrasound assisted extraction, *Ultrasonics Sonochemistry* **8** (2) (2001) 111-117.
12. Show K.Y., Mao T., Lee D.J. - Optimization of sludge disruption by sonication, *Water Research* **41** (20) (2007) 4741-4747.
13. Guerrero S., Lopez-Malo A., Alzamora S.M. - Effect of ultrasound on the survival of *Saccharomyces cerevisiae*: influence of temperature, pH and amplitude, *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **2** (1) (2001) 31-39.
14. Rakin M., Vukasinovic M., Siler-Marinkovic S., and Maksimovic, M. - Contribution of lactic acid fermentation to improved nutritive quality vegetable juices enriched with brewer's yeast autolysate, *Food Chemistry* **100** (2) (2007) 599-602.
15. Hasan Tanguler, Huseyin Erten - Utilisation of spent brewer's yeast for yeast extract production by autolysis: The effect of temperature, *Food and Bioproducts Processing* **86** (4) (2008) 317-321.
16. Mason T.J, Joyce E. - Sonication used as a biocide. A review: Ultrasound a greener alternative to chemical biocides? *Chemistry Today* **26** (6) (2008) 22-26.
17. Marques L. L. M., Buzato J. B., Celligoi M. A. P. C - Effect of raffinose and ultrasound pulses on invertase release by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in loofa (*Luffa cylindrica*) sponge, *Brazilian Archives of Biology and Technology* **49** (6) (2006) 873-880.

ABSTRACT

EFFECTS OF ULTRASOUND ON PRODUCTION OF PROTEIN-RICH EXTRACTS FROM SPENT BREWER'S YEAST

Pham Thi Thuy Duong, Nguyen Duc Van Buu, Vu Thi Huong*

Ho Chi Minh City University of Food Industry

*Email: huongvt@hufi.edu.vn

Spent brewer's yeast, separated during the primary and secondary fermentation, is a by-product of the brewing industry. This study is carried out to determine and optimize the effects of factors when using the ultrasonic for extracting yeast from the spent. The investigated categories were the yeast ratio, ultrasonic applying time, ultrasonic power density and the results, respectively, are 46.90%, 7.23 minutes and 2.29W/g, of those index met the highest protein content of 79.48mg/g and productivity of 71.03%. This investigating result aims to provide the primary information for producing protein-rich product from spent brewery yeast help to improve economic efficiency and reduce the environmental problem in beer processing.

Keywords: Protein-rich extract, ultrasound, spent brewer's yeast, protein, extraction efficiency.