

TỐI ƯU HÓA QUY TRÌNH SẢN XUẤT PHÂN BÓN DẠNG LỎNG TỪ BÃ MEN BIA SỬ DỤNG CHẾ PHẨM ENZYME ALCALASE THƯƠNG MẠI

Dinh Thị Kim Hoa^{1*}, Lưu Hồng Sơn¹, Tạ Thị Lương^{1,2}, Lê Minh Châu¹, Dương Ngọc Dương¹, Trần Văn Chí¹, Vi Đại Lâm¹, Nguyễn Thị Tình¹, Nguyễn Văn Duy¹, Ngô Xuân Bình¹

¹ Trường Đại học Nông Lâm - Đại học Thái Nguyên

² Đại học Queensland

*Email: Dinhthikimhoa@tuaf.edu.vn

Thông tin bài viết

Ngày nhận bài:
11/5/2020

Ngày duyệt đăng:
12/8/2020

Từ khóa:

Enzyme Alcalase, phân bón, bã men, tối ưu, Box- Behnken

Tóm tắt

Mục đích của nghiên cứu là khảo sát đơn yếu tố ảnh hưởng của tỷ lệ phối trộn thích hợp giữa enzyme (E) và chế phẩm vi sinh vật có ích (EM), tỉ lệ nước bổ sung, nhiệt độ ủ, thời gian ủ tới quá trình thủy phân bã men bia bằng chế phẩm enzyme alcalase. Các thí nghiệm đơn nhân tố thu được kết quả tỉ lệ enzyme và chế phẩm EM bổ sung là EM 2% + E 1,5%, tỉ lệ nguyên liệu/nước là 1/3, nhiệt độ thủy phân là 45°C và thời gian là 8h giờ. Trên cơ sở khảo sát từng yếu tố ảnh hưởng đến điều kiện thủy phân, cho thấy các thông số tỷ lệ phối trộn giữa enzyme và EM, tỷ lệ nước bổ sung, nhiệt độ và thời gian thủy phân là những yếu tố ảnh hưởng mạnh đến quá trình thủy phân. Bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm Box- Behnken đã tìm được điều kiện tối ưu quá trình thủy phân bã men bia là tỷ lệ phối trộn giữa enzyme và EM là EM 2% + E 1,5%, tỉ lệ nước bổ sung: 1/3, nhiệt độ thủy phân là 45°C và trong thời gian là 8 giờ. Kết quả thực nghiệm cho kết quả có độ tương thích cao với mô hình.

1. MỞ ĐẦU

Quá trình sản xuất bia thải ra rất nhiều loại phế liệu: Phế liệu hạt, mầm malt, bã malt, cặn protein, nấm men bia và CO₂. Ngoài CO₂ là nguồn phế liệu có thể tái sử dụng để tăng chất lượng bia thì bã malt, mầm malt và nấm men bia là nguồn phế liệu có ý nghĩa quan trọng trong thực phẩm và thức ăn gia súc cả về số lượng và giá trị dinh dưỡng. Bã nấm men bia là một phế phẩm của sản xuất, được nằm lại trong các thùng lên men và các hầm chứa sau khi lên men chính và lên men phụ. Men bia có giá trị dinh dưỡng cao và chữa bệnh tốt. Bã men bia (hay còn gọi là nấm men bia) thuộc loài *Saccharomyces cereviside*, có hoạt tính enzyme invertase (EC 1.2.4). Enzyme này thường tập

trung chủ yếu ở trong lớp không gian chứa tế bào nấm men [3], [4]. Ở Việt Nam nói chung và nhà máy sản xuất bia ở Thái Nguyên nói riêng, bã men bia chưa được sử dụng một cách có hiệu quả mà chỉ thải ra môi trường bên ngoài, điều này gây ô nhiễm môi trường vì chất thải men bia có hàm lượng COD rất cao. Việc đưa ra dạng phân bón dạng lỏng từ thủy phân bã men bia có ý nghĩa rất lớn. Việc thủy phân bã men bia chịu ảnh hưởng bởi tỉ lệ phối trộn EM + E thích hợp, tỉ lệ nước bổ sung, nhiệt độ ủ và thời gian thủy phân. Vì vậy mục đích của nghiên cứu là nhằm tối ưu hóa quá trình thủy phân protein hòa tan từ bã men bia tại trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên, tỉnh Thái Nguyên.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Bã men bia (hay còn gọi là nấm men bia) thuộc loài *Saccharomyces cerevisiae*, được lấy tại nhà máy bia Vicoba, 158 Minh Cầu, Thành phố Thái Nguyên, tỉnh Thái Nguyên. Nguyên liệu được phân loại sau đó đem đi sấy ở nhiệt độ 80°C đến độ ẩm < 10%, tiến hành bảo quản trong túi nhựa polyetylen (PE) đặt trong hộp nhựa kín, lưu trữ ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng và ẩm.

Dung môi được sử dụng trong nghiên cứu là nước cất (dạng tinh khiết - Việt Nam)

2.2. Bố trí thí nghiệm

Protein hòa tan được thủy phân từ bã men bia bằng việc bổ sung nước với tỷ lệ nguyên liệu/nước là 1/2, 1/3, 1/4; tỉ lệ phối trộn EM và E là 1% - 1,5%; 1,5% - 1,5%; 2% - 1,5%; 1,5% - 1%; 1,5% - 2%; nhiệt độ ủ lần lượt là 35°C, 45°C, 55°C; thời gian thủy phân lần lượt là 7 giờ, 8 giờ, 9 giờ. Sau khi tiến hành khảo sát các đơn nhân tố, chúng tôi lựa chọn 3 yếu tố là các yếu tố ảnh hưởng lớn nhất đến việc thủy phân bã men bia để đánh giá khả năng ảnh hưởng của chúng, chúng tôi sử dụng phương pháp bề mặt chỉ tiêu theo thiết kế thí nghiệm của Box - Behnken với 3 yếu tố, 3 cấp độ.

Xác định hàm lượng protein hòa tan

Hàm lượng protein hòa tan trong dịch thủy phân được xác định bằng phương pháp Lowry [6]. Phương pháp dựa trên cơ sở phức chất đồng protein khử hỗn hợp photphomolipden - photphovonphramat (thuốc thử Folin - ciocalteu) tạo phức chất màu xanh da trời có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 660nm. Cường độ màu của hỗn hợp phản ứng tỉ lệ thuận với nồng độ protein trong một phạm vi nhất định. Dựa vào mức độ hấp thụ quang học của protein chuẩn, ta có thể xác định được hàm lượng protein trong mẫu nghiên cứu.

Xây dựng đường đồ thị chuẩn

Sử dụng albumin huyết thanh bò (BSA) làm chất chuẩn để xây dựng đường chuẩn thể hiện mối quan hệ giữa độ hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 660 nm và nồng độ protein. Cân 0,01g (10 mg - albumin huyết thanh bò) hoà tan trong 10ml nước, ta được dung dịch gốc

có nồng độ là 1 mg/ml. Sau đó pha loãng dung dịch gốc bằng nước cất với các nồng độ 20, 40, 60, 80, 100, 120 µg/ml để tiến hành xây dựng đồ thị chuẩn. Lấy chính xác 0,5ml dung dịch BSA ở nồng độ pha loãng như trên cho vào ống nghiệm, thêm vào mỗi ống 2ml dung dịch C (là hỗn hợp của Dung dịch A: 4g NaOH (0,1M) và 20g Na₂CO₃ (2%) pha trong 1000ml nước cất và dung dịch B: 0,5g CuSO₄.5H₂O (0,5%) pha trong dung dịch Natri Xitrat (1%) hoặc trong dung dịch Natri, Kali Tactorat 1% theo tỉ lệ theo tỉ lệ 49:1) để ở nhiệt độ phòng 10 phút, sau đó cho 0,25ml thuốc thử folin (1N) đem so màu với bước sóng 660nm.

Mẫu đối chứng: lấy 0,5 ml nước cất cho vào ống nghiệm, thêm vào đó 2ml dung dịch C và các bước tiếp theo được tiến hành như mẫu thí nghiệm.

Qua 3 lần lặp lại thí nghiệm có thể xây dựng đường hồi quy. Kết quả được xử lý theo phương pháp thống kê thông thường. Vẽ đồ thị chuẩn biểu diễn sự phụ thuộc của OD với hàm lượng protein.

Mẫu thí nghiệm: lấy chính xác 0,5ml dịch chứa protein với hàm lượng thích hợp cho vào ống nghiệm, thêm vào đó 2ml dung dịch C, lắc đều để yên trong 10 phút. Sau đó thêm vào hỗn hợp trong ống nghiệm 0,25ml thuốc thử Folin đã pha loãng 2 lần, lắc đều và để yên trong 30 phút, màu vàng của hỗn hợp chuyển sang màu xanh da trời và đạt đến cường độ màu cực đại. Đem so màu của hỗn hợp trên máy đo quang ở bước sóng 660 nm. Xác định được trị số mật độ quang học (OD) của dung dịch nghiên cứu. Đo trên máy 3 lần lặp lại và lấy trị số trung bình. Dựa vào đồ thị chuẩn, có thể xác định được hàm lượng protein trong mẫu nghiên cứu.

2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu sẽ được xử lý, phân tích phương sai 1 nhân tố (One - way ANOVA) dùng phần mềm SPSS 20.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ phối trộn giữa EM và enzyme

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của tỉ lệ phối trộn enzyme Alcalase và chế phẩm EM BESTOT N02 tới chất lượng phân bón dạng nước được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của tỉ lệ phối trộn enzyme và EM

CT	Tỷ lệ phối trộn (%)	Hàm lượng pro hòa tan (mg/ml)
1	1% +1,5%	71,55 ^a
2	1,5% +1,5%	77,30 ^c
3	2% + 1,5%	82,11^e
4	1,5% + 1%	77,41 ^d
3	1,5% + 2%	74,41 ^b

Ghi chú: Các chữ trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,05$

Bảng 1 cho thấy việc phối trộn enzyme và EM ảnh hưởng rõ rệt tới hiệu quả thủy phân bã men bia cũng như tới chỉ tiêu chất rắn hòa tan của quả cây dưa lưới AB. Việc phối trộn hai loại enzyme và EM cho thấy hàm lượng protein hòa tan thu được cao hơn hẳn so với việc dùng từng yếu tố xúc tác đơn lẻ. Ta dễ thấy với CT3 kết quả đạt được vượt trội hơn cả so với bốn công thức còn lại (81,11mg/ml). Ngược lại CT1 cho kết quả thấp nhất trong 5 CT (71,55mg/ml). Điều này cho ta thấy tỉ lệ phối trộn chế phẩm EM và enzyme ở

CT3 (EM 2% + 1,5% E) là thích hợp nhất so với các công thức phối trộn khác. Từ tất cả những nhận xét trên chúng tôi lựa chọn công thức phối trộn EM 2% + 1,5% E để cố định cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.2. Ảnh hưởng của tỉ lệ nước bổ sung

Sau khi lựa chọn được loại cũng như tỉ lệ sử dụng enzyme và chế phẩm sinh học EM cho mục đích thủy phân bã men bia thành, ta tiến hành nghiên cứu tìm tỉ lệ nước bổ sung thích hợp thông qua hàm lượng protein hòa tan. Kết quả thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả ảnh hưởng của tỉ lệ nước bổ sung.

CT	Tỉ lệ nước m _{bmb}	Hàm lượng pro hòa tan (mg/ml)
1	1:2	78,87 ^b
2	1:3	82,59^c
3	1:4	77,22 ^a

Ghi chú: Các chữ trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,05$

Dựa vào kết quả ở bảng 2, khi thay đổi tỉ lệ nước bổ sung thì hiệu quả thủy phân của enzyme và chế phẩm EM cũng thay đổi và đều khác nhau giữa cả 3 công thức nghiên cứu. Hàm lượng protein hòa tan thu được cao nhất ở CT 2 là 82,59 (mg/ml) và thấp nhất với CT3 là 77,22 (mg/ml). Từ kết quả nghiên cứu trên, ta lựa chọn CT2, với tỉ lệ bổ sung nguyên liệu/nước là 1/3 để xây dựng quy trình sản xuất phân bón dạng nước từ nguồn nguyên liệu bã men bia.

3.3. Ảnh hưởng của thời gian ủ

Bã men bia được tiến hành thủy phân với các thông số về tỉ lệ phối trộn enzyme và EM, tỉ lệ nước bổ sung đã được tối ưu ở các thí nghiệm 1 và 2 trong các khoảng thời gian 7h, 8h, 9h. Sau đó tiến hành phân tích hàm lượng protein hòa tan. Kết quả thu được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian ủ

CT	Thời gian (giờ)	Hàm lượng pro hòa tan (mg/ml)
1	7	79,17 ^a
2	8	83,41^b
3	9	83,09 ^b

Ghi chú: Các chữ trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,05$

Qua bảng 3, thời gian thủy phân có ảnh hưởng tới hàm lượng protein hòa tan. Nhìn chung khi tăng thời

gian thủy phân, hàm lượng protein hòa tan thu được tăng. Hàm lượng protein hòa tan thu được ở CT2 và

CT3 cao hơn so với CT1, nhưng giữa CT2 và CT3 lại không có sự khác biệt ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$, mặc dù CT2 thời gian thủy phân dài hơn CT3 là 1 giờ. Điều này có thể giải thích là do trong thời gian 8 giờ lượng cơ chất đã được enzyme thủy phân triệt để. Từ nhận xét trên, để giảm thời gian sản xuất, tiết kiệm được chi phí, ta lựa chọn thời gian thủy phân bã men bia để sản xuất phân bón dạng nước là 8 giờ.

3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Để xác định được nhiệt độ ủ chế phẩm EM và thủy phân bã men bia phù hợp, tiến hành thủy phân nguyên liệu trong điều kiện cố định các yếu tố công nghệ đã xác định được ở các thí nghiệm 1,2 và 3 trong các nhiệt độ khác nhau lần lượt là: 35°C, 45°C, 55°C. Sau 8h tiến hành đo hàm lượng protein hòa tan, thu được kết quả thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ

CT	Thời gian (giờ)	Hàm lượng pro hòa tan (mg/ml)
1	35	79,47 ^a
2	45	83,46 ^b
3	55	83,23 ^b

Ghi chú: Các chữ trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,05$

Dựa vào kết quả bảng 4 ta thấy nhiệt độ cũng là một yếu tố ảnh hưởng tới hiệu quả thủy phân của enzyme và EM. Khi tăng nhiệt độ thủy phân từ 35°C tới 45°C thì hàm lượng protein hòa tan thu được tăng, tuy nhiên nếu tiếp tục tăng nhiệt độ lên tới 55°C thì hàm lượng protein hòa tan thu được thay đổi không đáng kể, không có sự sai khác biệt với công thức ở nhiệt độ 55°C, hàm lượng protein hòa tan thu được nằm ở khoảng 83 mg/ml. Điều này có thể cho ta thấy, nhiệt độ tối ưu cho sự thủy phân của enzyme Alcalase nằm trong khoảng 45 °C, kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của tác giả Normah I. và cộng sự công bố năm 2005 [5]. Từ kết quả trên, chúng tôi lựa chọn nhiệt độ tối ưu cho quá trình thủy phân phân bón dạng nước từ nguồn nguyên liệu bã men bia là 45 °C.

3.5. Tối ưu hóa quá trình thủy phân

Chúng tôi sử dụng phương pháp bề mặt chỉ tiêu theo thiết kế thí nghiệm của Box- Behnken với ba biến ba cấp độ. Các số liệu thu được từ dịch thủy phân bã men bia được xử lý trên phần mềm Design- Expert 7.0 (Stat-Ease Inc, Minneapolis, USA) ANOVA được dùng để đánh giá kết quả thu được. Tiến hành giải bài toán tối ưu theo phương pháp “hàm mong đợi”. Sử dụng phần mềm Design-Expert 7.0 để tiến hành tối ưu hóa nhằm xác định được giá trị của ba yếu tố mà tại đó hàm lượng protein hòa tan là cao nhất [5]. Áp dụng phương pháp phân tích hồi quy các số liệu thực nghiệm, thu được mô hình đa thức bậc hai thể hiện hàm lượng protein hòa tan:

$$Y = + 83.44 + 0.15 * A + 0.38 * B + 0.74 * C - 1.08 * A * B - 0.20 * A * C - 0.30 * B * C - 3.26 * A^2 - 1.67 B^2 - 0.85 * C^2$$

Trong đó Y là hàm lượng protein hòa tan trong dịch thủy phân thu được.

Bảng 5. Ma trận thực nghiệm Box-Behnken ba yếu tố thủy phân bã men bia

TN	Biến thực			Hàm lượng pro hòa tan (mg/ml)
	A (Tỷ lệ nước bổ sung)	B (nhiệt độ)	C (thời gian)	
1	2	35	8	77,64
2	4	35	8	79,17
3	2	55	8	80,02
4	4	55	8	77,22
5	2	45	7	77,83
6	4	45	7	79,47
7	2	45	9	79,59
8	4	45	9	80,45
9	3	35	7	79,17
10	3	55	7	81,09
11	3	35	9	81,36

TN	Biến thực			Hàm lượng pro hòa tan (mg/ml)
	A (Tỷ lệ nước bổ sung)	B (nhiệt độ)	C (thời gian)	
12	3	55	9	82,18
13	3	45	8	83,35
14	3	45	8	83,47
15	3	45	8	83,45
16	3	45	8	83,46
17	3	45	8	83,45

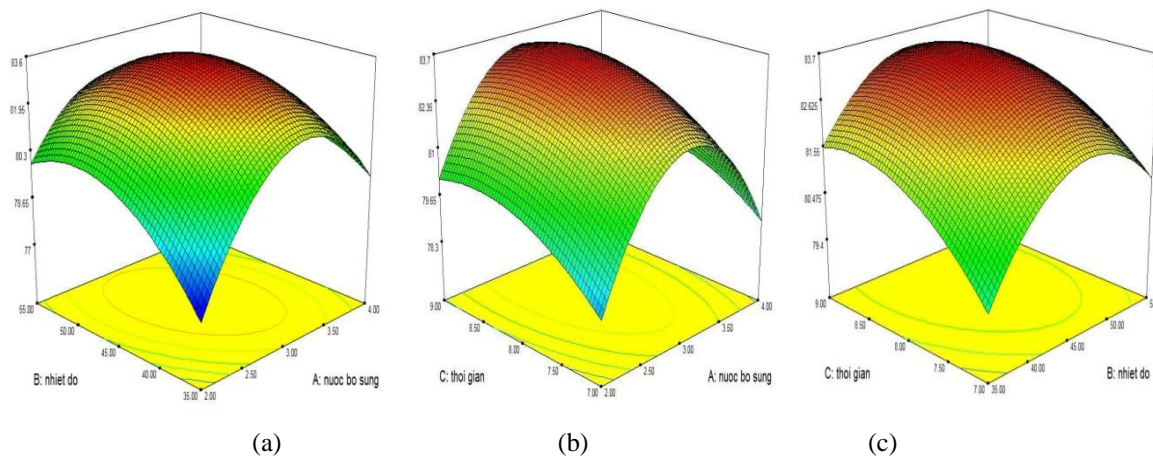
Để đánh giá mô hình chúng tôi sử dụng phân tích ANOVA. Kết quả phân tích ANOVA được thể hiện qua bảng sau:

Bảng 6. Phân tích phương sai ANOVA của mô hình thủy phân bã men bia.

Nguồn	SS	DF	MS	Chuẩn F	Giá trị p
Model	75,18	9	8,35	24,28	0,0002
A	0,19	1	0,19	0,55	0,4825
B	1,16	1	1,16	3,38	0,1086
C	4,35	1	4,35	12,65	0,0093
AB	4,69	1	4,69	13,63	0,0077
AC	0,15	1	0,15	0,44	0,5274
BC	0,37	1	0,37	1,08	0,3329
A ²	44,62	1	44,62	129,71	<0,0001
B ²	11,75	1	11,75	34,15	0,0006
C ²	3,03	1	3,03	8,80	0,0209
Residual	2,41	7	0,34		
Lack of Fit	2,40	3	0,80	330,33	0,0591
Sai số	9.680E-003	4	2.420E-003		
SS tổng số	77,69	16			

SS: Tổng phương sai; **DF:** Bậc tự do; **MS:** Trung bình phương sai; **Chuẩn F:** Chuẩn Fisher; **Residual:** Phần dư; **“Lack of Fit”:** Chuẩn đánh giá độ không tương thích của mô hình với thực nghiệm.

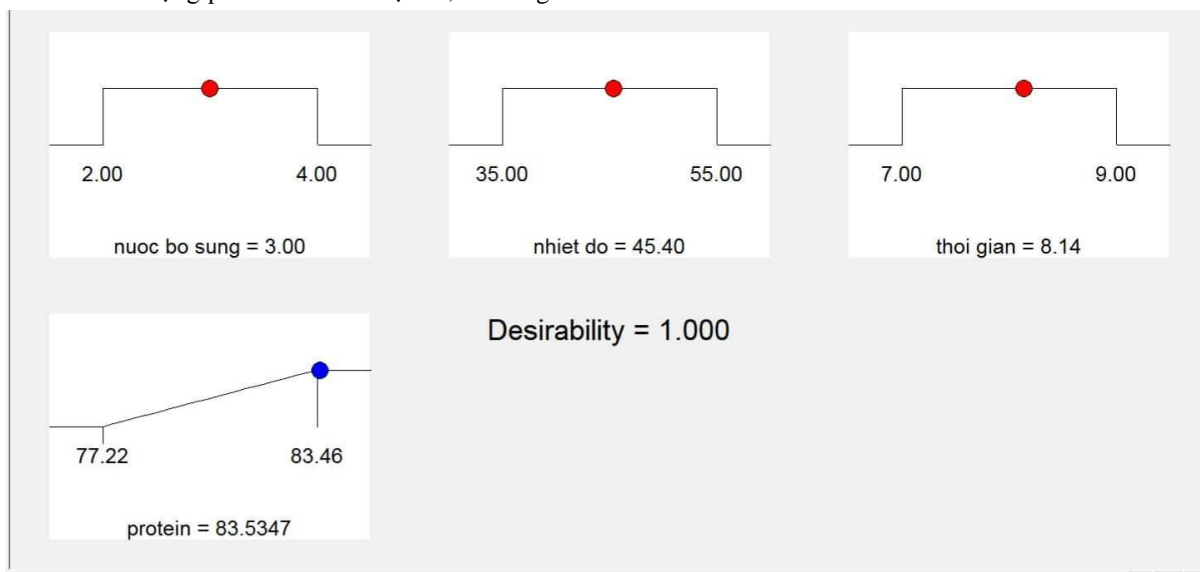
Từ kết quả phân tích ANOVA ta thấy giá trị xác suất của mô hình P-value = 0,0002 < 0,05 do đó mô hình được lựa chọn để giải thích cho kết quả của thí nghiệm, Lack of fit test có ý nghĩa đối với mô hình.



Hình 1. Bề mặt đáp ứng hàm lượng protein hòa tan.

- a) Mô hình tương tác giữa tỷ lệ nước bổ sung và nhiệt độ.
- b) Mô hình tương tác giữa tỷ lệ nước bổ sung và thời gian.
- c) Mô hình tương tác giữa nhiệt độ và thời gian.

Phương án tốt nhất được dự đoán tỷ lệ nước bổ sung là 3, nhiệt độ là 45,40°C, thời gian là 8,14 giờ. Kết quả kiểm tra bằng thực nghiệm cho kết quả tương ứng khi đó hàm lượng protein hòa tan đạt 83,5347 mg/ml.



Hình 2. Hàm kỳ vọng và điều kiện tối ưu ở hàm lượng protein hòa tan

4. Kết luận

Điều kiện thủy phân để thu hàm lượng protein hòa tan được xác định như sau: Nhiệt độ ủ là 45°C, tỷ lệ nguyên liệu và nước bổ sung là 3, thời gian thủy phân là 8 giờ. Chúng tôi sử dụng phương pháp bề mặt chỉ tiêu theo thiết kế thí nghiệm của Box- Behnken với ba biến ba cấp độ cho phương án tốt nhất được dự đoán nhiệt độ ủ 45,40°C, tỷ lệ nước bổ sung là 3, thời gian thủy phân là 8,14 giờ. Khi đó hàm lượng protein hòa tan đạt 83,5347 mg/ml. Kết quả kiểm tra bằng thực nghiệm có độ tương thích cao. Kết quả của chúng tôi

chỉ ra tiềm năng sử dụng bã men bia trong sản xuất phân bón dạng lỏng trong nông nghiệp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyen Trong Can (1998), Enzym technology, Publisher: Agricultural Ho Chi Minh city.
2. Nguyen Huu Chan (1996), Enzymes and biological catalysts. Publisher: medicine , Hanoi
3. Hoang Dinh Hoa (2002), Technology for malt and beer production. Publisher: Science and Technology, Hanoi
4. Ketnawa S., Chaiwut, P., Rawdkuen, Extraction of bromelain from pineapple peels, Food

5. Science and Technology International 17 (4) (2011) 395-402. (*Nemipterus japonicus*) hydrolysate by Alcalase, Journal of Muscle Foods 16, 2 (2005) 87.
6. Normah I., Normah I., Jamilah B., Saari N., and Yaakob B (2005), *Optimization of hydrolysis conditions for the production of threadfin bream*
7. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J. Biol. Chem. **193**, 265-275.

Optimization of the production process of liquid fertilizer from beer fermentation residue by using commercial alcalase enzyme

Dinh Thi Kim Hoa, Luu Hong Son, Ta Thi Luong, Le Minh Chau, Duong Ngoc Duong, Tran Van Chi, Vi Dai Lam, Nguyen Thi Tinh, Nguyen Van Duy, Ngo Xuan Binh

Article info

Received:

11/5/2020

Accepted:

12/8/2020

Keywords:

Enzyme Alcalase,
fertilizer, yeast residue,
optimization, Box-
Behnken

Abstract

The aim of the research is to investigate factors that affect the hydrolysis of beer fermentation residues by using commercial alcalase enzyme. These factors are the appropriate mixture ratio between enzyme and Effective Microorganisms (EM), the ratio of supplemental water, the temperature and the time of the incubation process. The single-factor experiments revealed that the amount of soluble protein achieved was highest when these factors were EM 2% + E 1.5%, 1/3, 45°C, 8 hours correspondingly. On the basis of investigating each factor affecting the hydrolysis conditions, that the study showed that the mixture ratio of enzymes and EM, the ratio of supplemental water, the incubation temperature, and the hydrolysis time were strongly influencing factors to the hydrolysis process. By applying Box- Behnken experiment design model, the optimal condition for the hydrolysis process of beer fermentation residues was found, of which the mixture ratio of enzyme and EM was EM 2% + E 1.5%, the ratio of supplemental water was 1/3, the incubation temperature was 45°C and the incubation time was 8 hours.
