NGHIÊN CỨU QUÁ TRÌNH TỰ PHÂN BÃ NẤM MEN BIA ĐỂ THU NHẬN CHẾ PHẨM INVERTASE

Lê Văn Việt Mẫn, Trần Thắm Minh Hoàng, Nguyễn Ngọc Tuyết Sương
Trường Đại Học Bách Khoa, ĐHQG-HCM
(Bài nhận ngày 03 tháng 08 năm 2005, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 13 tháng 11 năm 2006)

***TÓM TẮT**: Nghiên cứu này khảo sát quá trình tự phân bã nấm men bia để thu nhận chế phẩm invertase. Đầu tiên, chúng tôi sử dụng phương pháp thực nghiệm thay đổi giá trị của một yếu tố và cố định các giá trị của những yếu tố còn lại để xác định điều kiện thích hợp cho quá trình tự phân nấm men nhằm mục đích thu nhận invertase. Kết quả thu được như sau: tỉ lệ khối lượng giữa nấm men/dung môi (dung dịch đệm acetate): 1/6, nhiệt độ tự phân: 50°C, pH ban đầu: 5,5 và thời gian tự phân: 50 giờ. Khi đó hoạt tính invertase thu được là 94,7 đơn vị hoạt tính/g chất khô nấm men. Tiếp theo, chúng tôi tối ưu hóa hai yếu tố nhiệt độ và pH ban đầu của quá trình tự phân bã nấm men bia bằng phương pháp trực giao bậc hai cấu trúc có tâm. Kết quả cho thấy giá trị nhiệt độ và pH tối ưu của quá trình tự phân bã nấm men bia để thu nhận invertase lần lượt là 45°C và 5,5. Khi đó, tổng hoạt tính và hoạt tính riêng của enzyme invertase thu được trong dịch tự phân là 120,9 đơn vị hoạt tính/g chất khô nấm men và 0,7 đơn vị hoạt tính/mg protein.*

1. GIỚI THIỆU

Nấm men bia thuộc loài *Saccharomyces cerevisiae*, có hoạt tính enzyme invertase (EC 3.2.1.26). Enzyme này thường tập trung chủ yếu trong lớp không gian chu chất của tế bào nấm men [3,4]. Ngành công nghiệp sản xuất bia hàng năm thải ra một lượng rất lớn bã nấm men bia. Trung bình sản xuất 100 lít bia sẽ thu được 2 lít bã nấm men với độ ẩm 88%. Hiện nay, bã nấm men bia được sử dụng để sản xuất bột chiết nấm men (yeast extract) hoặc làm thức ăn gia súc [5].

Sản xuất chế phẩm invertase từ bã nấm men bia là một hướng nghiên cứu mới tại Việt Nam. Trong công nghiệp thực phẩm như sản xuất nước giải khát, kẹo... chế phẩm invertase thường được sử dụng để thủy phân đường sucrose tạo sản phẩm đường nghịch đảo [3].

Dung dịch đường nghịch đảo có độ ngọt cao hơn và ít bị hiện tượng tái kết tinh đường hơn so với dịch đường sucrose [3].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát quá trình tự phân bã nấm men bia để thu nhận chế phẩm invertase thô. Chúng tôi sử dụng phương pháp qui hoạch thực nghiệm trực giao bậc hai, cấu trúc có tâm để xác định các điều kiện tối ưu của quá trình tự phân nấm men nhằm mục đích thu nhận invertase [2].

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1.Nguyên liệu

Bã nấm men bia *Saccharomyces cerevisiae* được sử dụng trong nghiên cứu này do nhà máy bia Hòa Bình (402 – 404 Tùng Thiện Vương, quận 8, Thành phố Hồ Chí Minh) cung cấp.

2.2.Phương pháp nghiên cứu

Qui trình công nghệ: Bã nấm men bia → Rửa với nước vô khuẩn và nước muối → Tách cặn → Tự phân → Ly tâm tách cặn không tan → Chế phẩm invertase thô

Trong quá trình tự phân nấm men, hệ enzyme tự phân có sẵn trong tế bào nấm men được hoạt hóa. Chúng xúc tác phản ứng phân giải các chất có trong thành tế bào nấm men và giải phóng enzyme invertase ra ngoài tế bào. Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định các thông số

kỹ thuật tối ưu của quá trình tự phân bã nấm men bia để thu nhận invertase có hoạt tính cao nhất.

Trước khi thực hiện quá trình tự phân, bã nấm men bia dạng sệt thu được từ nhà máy bia được đem phối trộn với nước vô khuẩn theo tỉ lệ nấm men/nước là 1/3 (w/w), rồi để lắng trong 1 giờ và gạn bỏ phần nước bên trên. Tiếp tục phối trộn sinh khối nấm men với dung dịch nước muối NaCl (0,5%) theo tỉ lệ 1/3 (w/w). Sau 1 giờ, gạn nước và tiến hành ly tâm (3000 vòng/phút) để thu nhận sinh khối nấm men. Tiếp theo, sinh khối nấm men được phối trộn với dung dịch đệm để thực hiện quá trình tự phân. Sau quá trình tự phân, mẫu được ly tâm (7000 vòng/phút) để tách bỏ phần không tan, phần dịch lỏng thu được là chế phẩm invertase thô.

Phương pháp qui hoạch thực nghiệm: chúng tôi sử dụng phương pháp trực giao bậc hai, cấu trúc có tâm để xác định các thông số kỹ thuật tối ưu của quá trình tự phân. Các hệ số hồi qui được kiểm tra bằng tiêu chuẩn Student, sự tương thích của phương trình hồi qui với thực nghiệm được kiểm tra bằng tiêu chuẩn Fisher [2].

2.3. Các phương pháp phân tích [1]

Lượng sinh khối nấm men được xác định bằng phương pháp sấy khô đến khối lượng không đổi và được biểu diễn bằng số g chất khô nấm men.

Hàm lượng đường khử được xác định bằng phương pháp so màu quang phổ, sử dụng thuốc thử 3, 5 DiNitroSalycylic acid (DNS).

Lượng protein hòa tan được xác định bằng phương pháp Lowry.

Phương pháp xác định hoạt tính invertase: cho vào erlen 4ml dung dịch đệm acetate pH 4,5; 4,6 ml nước cất và 0,4ml dịch chứa enzyme. Thêm vào 1ml dung dịch đường sucrose nồng độ 20g/l. Cho phản ứng enzyme xảy ra chính xác trong 15 phút. Sau đó xác định lượng lượng đường khử tạo thành bằng phương pháp DNS, từ đó suy ra số mol sucrose đã bị thủy phân.

Một đơn vị hoạt tính invertase là lượng enzyme cần thiết để thủy phân 1 micromol đường sucrose trong 1 phút ở điều kiện pH 4,5 và nhiệt độ 30°C.

3. KẾT QUẢ THỰC NGHIỆM

3.1.Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tự phân bã nấm men bia

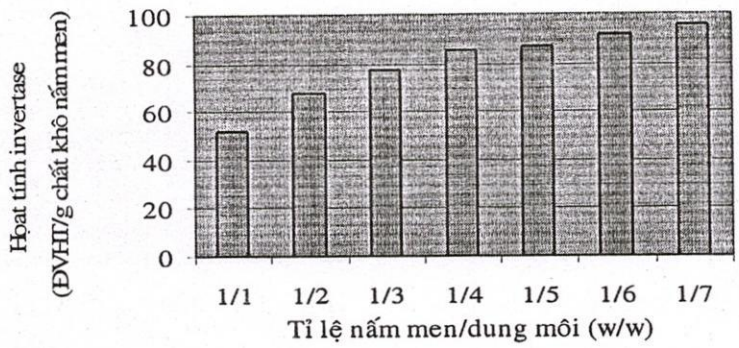
3.1.1.Tỉ lệ nấm men và dung môi (w/w)

Thực hiện quá trình tự phân với tỉ lệ nấm men/dung môi (w/w) thay đổi từ 1/1 đến 1/7. Để ổn định giá trị pH trong quá trình tự phân, dung môi được chọn là dung dịch đệm acetate.

Trong các mẫu thí nghiệm này, nhiệt độ, pH ban đầu và thời gian tự phân lần lượt là 50°C, 4,5 và 50 giờ. Kết quả được trình bày trong hình 1.

Theo hình 1, nếu ta tăng tỉ lệ dung môi sử dụng trong quá trình tự phân bã nấm men bia thì hoạt tính invertase thu được trong dịch tự phân sẽ tăng theo. Có lẽ do tăng lượng dung môi sử dụng nên khả năng khuếch tán của enzyme invertase từ lớp không gian chu chất ra bên ngoài màng tế bào sẽ dễ dàng hơn.

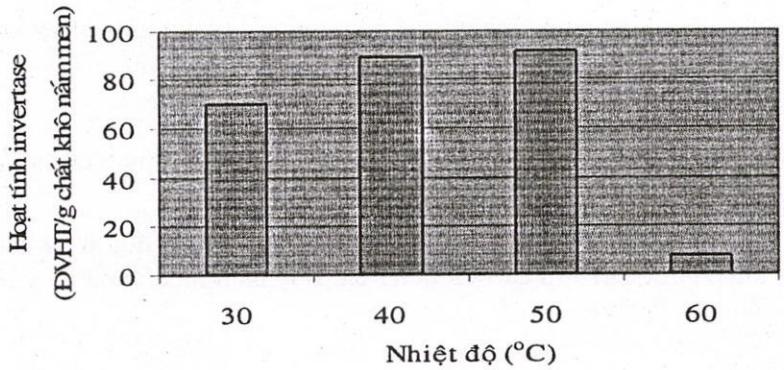
Tuy nhiên, nếu tỉ lệ dung môi sử dụng trong quá trình tự phân quá cao sẽ pha loãng nồng độ enzyme invertase trong dịch tự phân thu được. Khi đó quá trình tách nước và tinh sạch chế phẩm enzyme sẽ khó khăn hơn và tốn kém nhiều chi phí. So với tỉ lệ nấm men/dung môi là 1/6 (w/w) thì hoạt tính invertase thu được ở tỉ lệ 1/7 (w/w) chỉ tăng thêm 3%. Còn khi so sánh với tỉ lệ 1/5 (w/w), hoạt tính invertase thu được ở tỉ lệ sinh khối nấm men/dung môi 1/6 (w/w) tăng 5%. Vì vậy, để thuận lợi cho bước tinh sạch enzyme, chúng tôi chọn tỉ lệ nấm men/dung môi là 1/6 (w/w). Khi đó, hoạt tính invertase thu được trong dịch tự phân là 91.0 đơn vị hoạt tính/g chất khô nấm men.



Hình 1. Ảnh hưởng của tỉ lệ nấm men/dung môi (w/w) đến hoạt tính invertase thu nhận từ bã nấm men bia.

3.1.2.Nhiệt độ tự phân

Tiếp theo, chúng tôi khảo sát sự ảnh hưởng của nhiệt độ tự phân đến hoạt tính chế phẩm invertase thu được. Bốn giá trị nhiệt độ được khảo sát là 30, 40, 50 và 60°C. Sinh khối nấm men được phối trộn với dung dịch đệm acetate pH 4,5 theo tỉ lệ 1/6 (w/w), thời gian tự phân được chọn là 50 giờ.



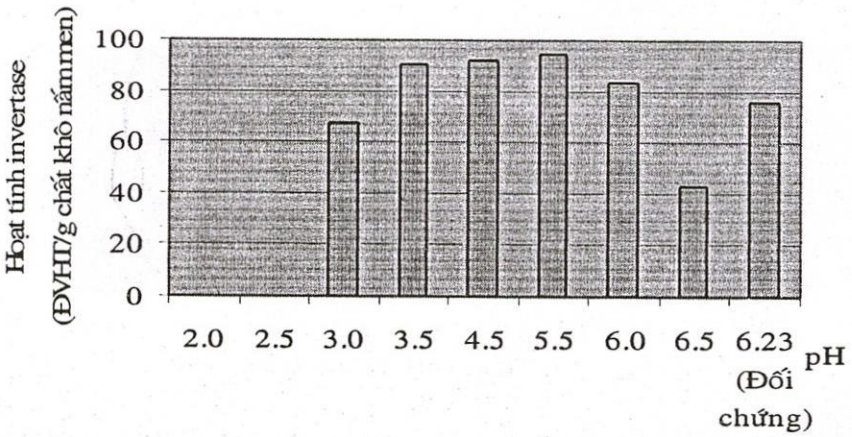
Hình 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ tự phân đến hoạt tính invertase thu được từ bã nấm men bia

Kết quả thực nghiệm trong hình 2 cho thấy khi ta tăng nhiệt độ tự phân từ 30 đến 50°C, hoạt tính invertase thu được trong dịch tự phân cũng tăng dần và đạt giá trị cực đại là 92.0 đơn vị hoạt tính/g chất khô nấm men ở 50°C. Khi nhiệt độ tự phân nấm men tăng đến 60°C, hoạt tính invertase thu được giảm mạnh và chỉ bằng 8,5% so với giá trị cực đại. Có lẽ khi nhiệt độ quá trình tự phân quá cao sẽ làm vô hoạt các enzyme tự phân và enzyme invertase trong nấm men.

Như vậy, nhiệt độ thích hợp để tự phân bã nấm men bia thu nhận invertase là 50°C.

3.1.3. pH ban đầu của mẫu nấm men tự phân

Tương tự như nhiệt độ, pH cũng là một yếu tố ảnh hưởng lớn đến hoạt tính của các enzyme tự phân, do đó ảnh hưởng đến mức độ phá vỡ màng tế bào nấm men và khả năng giải phóng invertase từ lớp không gian chu chất ra bên ngoài tế bào. Chúng tôi thay đổi giá trị pH ban đầu của mẫu nấm men tự phân từ 2,0 đến 6,5 bằng cách sử dụng dung dịch đệm acetate. Mẫu đối chứng sử dụng nước cất là dung môi (Sau khi phối trộn sinh khối nấm men với nước cất theo tỉ lệ qui định, pH ban đầu của mẫu đối chứng là 6,23). Các thông số khác của quá trình tự phân được giữ cố định: tỉ lệ nấm men/dung môi: 1/6 w/w, nhiệt độ tự phân: 50°C, thời gian tự phân: 50 giờ.



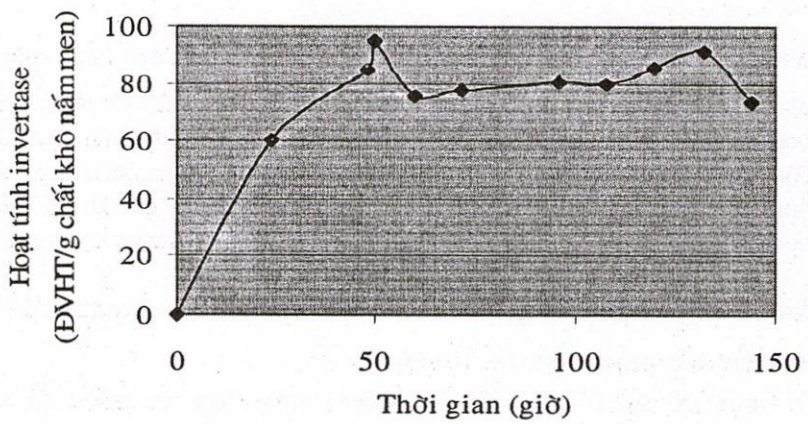
Hình 3. Ảnh hưởng giá trị pH ban đầu của mẫu bã nấm men bia tự phân đến hoạt độ chế phẩm invertase thu được

Theo kết quả trong hình 3, ở pH 2,0 và 2,5 chúng tôi không tìm thấy hoạt tính invertase trong dịch tự phân. Có lẽ, giá trị pH quá thấp đã ức chế hoạt tính các enzyme tự phân và invertase của nấm men bia. Trong khoảng pH tự phân từ 3,0 đến 5,5, hoạt tính invertase tăng dần và đạt giá trị cực đại là 94,7 đơn vị hoạt tính/g chất khô khi pH tự phân là 5,5. Ở khoảng pH tự phân 6 – 6,5, hoạt tính invertase giảm xuống một cách rõ rệt. Có lẽ giá trị 5,5 là pH tối thích cho sự xúc tác của các enzyme tự phân của nấm men để giải phóng invertase ra bên ngoài tế bào.

3.1.4.Thời gian tự phân

Trong thực tế sản xuất, thời gian tự phân là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến chi phí năng lượng của quá trình và năng suất hoạt động của thiết bị tự phân.

Chúng tôi tiến hành tự phân nấm men với thời gian tự phân thay đổi từ 24 đến 144 giờ. Các thông số kỹ thuật khác được chọn từ các kết quả trên: tỉ lệ nấm men/dung môi 1/6 (w/w), nhiệt độ và pH tự phân lần lượt là 50°C và 5,5.



Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian tự phân đến hoạt tính chế phẩm invertase thu nhận từ bã nấm men bia

Từ kết quả trên hình 4, ta nhận thấy trong khoảng thời gian đầu của quá trình tự phân, hoạt tính invertase thu được tăng nhanh và đạt giá trị cực đại 94,7 đơn vị hoạt tính/g chất khô nấm men sau 50 giờ tự phân đầu tiên. Nếu ta kéo dài thêm thời gian tự phân, hoạt tính của chế phẩm invertase không tăng thêm nữa, ngược lại bị giảm nhẹ. Có lẽ khi thời gian tự phân quá dài sẽ

tạo điều kiện cho enzyme protease có sẵn trong tế bào nấm men được giải phóng nhiều hơn và thủy phân một số phân tử invertase có trong dịch tự phân.

3.2.Tối ưu hoá điều kiện tự phân bã nấm men bia để thu nhận chế phẩm invertase bằng phương pháp trực giao bậc hai cấu trúc có tâm (2 yếu tố)

Trong thực tế, hoạt tính chế phẩm invertase thu được không chỉ bị ảnh hưởng bởi từng yếu tố riêng lẻ mà còn bị ảnh hưởng bởi sự tương tác giữa các yếu tố với nhau. Vì thế nếu chỉ dựa trên các nghiên cứu rời rạc để đưa ra giá trị tối ưu cho các thông số kỹ thuật của quá trình tự phân bã nấm men bia để thu nhận chế phẩm invertase thì kết quả sẽ không đạt độ chính xác cao.

Chúng tôi tiến hành qui hoạch thực nghiệm, chọn 2 yếu tố có ảnh hưởng nhiều nhất đến hoạt tính invertase là nhiệt độ và pH ban đầu của mẫu nấm men tự phân. Chúng tôi sử dụng phương pháp trực giao bậc 2, cấu trúc có tâm để đưa ra phương trình hồi qui biểu diễn mối quan hệ định lượng giữa hoạt tính invertase với 2 yếu tố sẽ khảo sát.

Các thí nghiệm được tiến hành như bảng 1, trong đó:

- X_1 là nhiệt độ tự phân (khoảng khảo sát: 45 – 55°C, mức tâm: 50°C, bước nhảy: 5°C).
- X_2 là pH ban đầu của mẫu nấm men tự phân (khoảng khảo sát: 5,0 – 6,0, mức tâm 5,5, bước nhảy 0,5).
- Y là hoạt tính invertase (đơn vị hoạt tính/g chất khô nấm men)

Số thí nghiệm trong phần tối ưu hóa là 9, trong đó có một thí nghiệm ở tâm phương án (thí nghiệm số 9). Chúng tôi thực hiện thêm 3 thí nghiệm khác ở tâm để kiểm tra ý nghĩa các hệ số của phương trình hồi qui.

Bảng 1. Ma trận qui hoạch thực nghiệm theo phương pháp qui hoạch trực giao bậc 2, hai yếu tố (phương án cấu trúc có tâm) và kết quả

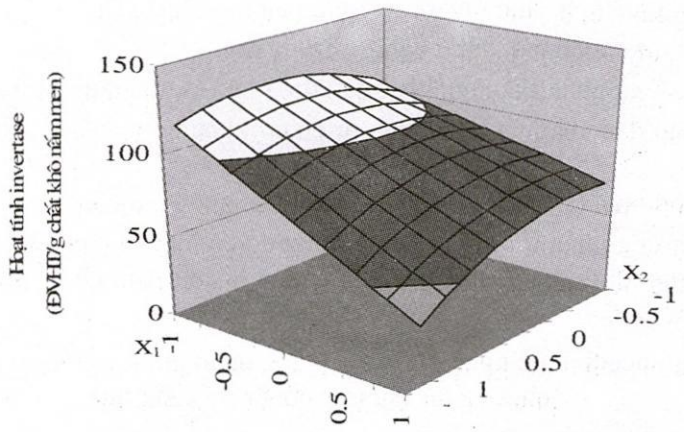
Thí nghiệm số	X_1 (Nhiệt độ, °C)	X_2 (pH)	Hoạt tính invertase (đơn vị hoạt tính/g chất khô nấm khô)
1	45	5,0	105,1
2	45	6,0	109,8
3	45	5,5	119,7
4	55	5,0	68,1
5	55	6,0	29,2
6	55	5,5	65,1
7	50	5,0	96,3
8	50	6,0	86,0
9	50	5,5	100,0
Ba thí nghiệm ở tâm			
10	50	5,5	109,1
11	50	5,5	109,1
12	50	5,5	102,3

Sau khi tính toán kiểm tra ý nghĩa của các hệ số trong phương trình hồi qui và kiểm tra sự tương thích của phương trình hồi qui với thực nghiệm, chúng tôi thu được phương trình sau:

$$Y = 94.9856 - 28.7155X_1 - 7.427X_2 - 10.9352X_1X_2 - 12.4925X_2^2$$

Dựa vào mặt phẳng trong hình 5, chúng tôi nhận thấy khi X_1 càng giảm thì hoạt tính invertase thu được trong dịch tự phân sẽ càng tăng. Ứng với giá trị nhỏ nhất của X_1 trong vùng khảo sát (X_1 = -1), mối quan hệ giữa Y và X_2 là một đường cong có điểm cực đại. Từ hình vẽ, chúng tôi nhận thấy giá trị Y sẽ đạt cực đại khi X_2 nằm trong khoảng từ -0,25 đến 0,25. Trong khoảng này, sự thay đổi giá trị X_2 không làm thay đổi đáng kể giá trị Y.

Trên cơ sở đó, chúng tôi chọn giá trị X_1 và X_2 tối ưu lần lượt là -1 và 0. Các giá trị này tương ứng với nhiệt độ và pH ban đầu của mẫu tự phân lần lượt là 45°C và 5,5. Trong điều kiện này, chúng tôi thực hiện thí nghiệm với quy mô 5kg bã nấm men bia. Kết quả cho thấy hoạt tính tổng của enzyme invertase thu được là 120,9 đơn vị hoạt tính/g chất khô nấm men. Giá trị này tăng 27,7% so với kết quả thu được ở phần 3.1 không sử dụng phương pháp qui hoạch thực nghiệm trực giao bậc 2. Hoạt tính riêng của enzyme invertase trong dịch tự phân thu được là 0,7 đơn vị hoạt tính/mg protein.



Hình 5. Đồ thị biểu diễn mối quan hệ của X_1 (nhiệt độ tự phân, °C), X_2 (pH ban đầu của mẫu tự phân) và Y (hoạt tính invertase, ĐVHT/g chất khô nấm men)

4. KẾT LUẬN

Quá trình tự phân bã nấm men bia là giai đoạn quan trọng trong qui trình công nghệ thu nhận chế phẩm invertase. Nó quyết định đến giá trị hiệu suất thu hồi enzyme từ bã nấm men. Sử dụng phương pháp qui hoạch thực nghiệm trực giao bậc hai, cấu trúc có tâm, chúng tôi đã xác định được các thông số công nghệ tối ưu cho quá trình tự phân bã nấm men bia để thu nhận chế phẩm invertase như sau: tỉ lệ nấm men/dung môi: 1/6 (w/w), nhiệt độ tự phân: 45°C, pH ban đầu: 5,5 và thời gian tự phân: 50 giờ. Trong điều kiện này, tổng hoạt tính và hoạt tính riêng của chế phẩm invertase thu được lần lượt là 120,9 đơn vị hoạt tính/g chất khô nấm men và 0,7 đơn vị hoạt tính/mg protein.

STUDY OF BREWER YEAST AUTOLYSIS FOR INVERTASE EXTRACTION

Le Van Viet Man, Tran Tham Minh Hoang, Nguyen Ngoc Tuyet Suong
University of Technology, VNU-HCM

***ABSTRACT**: This research focussed on brewer yeast autolysis for invertase extraction. Firstly, classical method was used for determination of autolytic conditions of brewer yeast. One parameter was varied while the others were fixed. The results were as follows: ratio of*

yeast and solven (acetate buffer): 1/6 (w/w), autolytic temperature: 50°C, initial pH: 5.5 and autolytic time: 50 hours. In these conditions, the recovery invertase activity was 94.7 activity units/gram of yeast dry matter. Then, the central composite design method was used to optimize the temperature and initial pH factors of brewer yeast autolysis for invertase extraction. Our results showed that optimal temperature and pH for yeast autolysis were 45°C and 5.5 respectively. The obtained invertase activity in the autolysate was 120.9 units/gram of yeast dry matter; the specific activity of the crude invertase was 0.7 units/mg protein.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Helrich K., *Official methods of analysis of Association of official Analytical Chemist*, AOAC publisher, Virgina (1992)

[2]. Goupy J., *La methode des plans d'experiences*, Bordas, Paris (1988)

[3]. Gratreva I. M., *Công nghệ enzyme*, Agropromizdat, Mạc tư khoa (1987) – tiếng Nga

[4]. Kunz W., *Technology malting & brewing*, VLB publisher, Berlin (1999)

[5]. Halász A., *Use of yeast biomass in food product*, CRC Press (1991)