

NGHIÊN CỨU TRÍCH LY VÀ THỦY PHÂN PROTEIN TỪ BÃ RƯỢU GẠO CÔNG NGHIỆP ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG TRONG THỰC PHẨM

Đỗ Thị Thanh Hương¹, Nguyễn Gia Long¹,
Chu Kỳ Sơn¹, Nguyễn Tiến Thành¹

TÓM TẮT

Bã rượu gạo từ nhà máy sản xuất cồn thực phẩm có hàm lượng protein cao 70 - 80% chất khô; tuy nhiên, hiện nay loại bã này chỉ được sử dụng cho chăn nuôi là chủ yếu, gây lãng phí nguồn protein thực vật này. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã nghiên cứu trích ly và thủy phân thành phần protein trong nguồn bã rượu này để chuyển chúng sang dạng dễ ứng dụng trong các sản phẩm thực phẩm. Kết quả cho thấy NaOH 0,5M kết hợp với chất khử NaHSO₃ 0,05M, ở nhiệt độ 70°C, sau 2 giờ cho phép đạt hiệu quả trích ly tốt nhất là 78%. Với chế phẩm protease Alcalase 2,4L Novozyme, quá trình thủy phân protein sau khi trích ly được lựa chọn ở điều kiện 60°C, tại pH 7,5 trong 4 h với nồng độ enzyme 0,8% cho phép thu hồi 89,79% protein từ bã rượu ban đầu vào dịch thủy phân dưới dạng các sản phẩm có kích thước < 10 kDa. Nhờ vậy, khả năng ứng dụng nguồn protein từ bã rượu gạo vào trong các sản phẩm thực phẩm được nâng cao.

Từ khóa: Protein gạo, bã rượu gạo, thủy phân, enzyme, peptide

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Rượu và các đồ uống có cồn luôn chiếm một vị trí đáng kể trong ngành công nghiệp thực phẩm tại Việt Nam. Tính đến 2017, tổng sản lượng cồn công nghiệp đạt hơn 70 triệu lít/năm. Hầu hết các nhà máy cồn thực phẩm đều sử dụng gạo làm nguyên liệu chính. Gạo được nghiền, dịch hóa, đường hóa bởi các enzyme và lên men bởi nấm men để tạo dịch giấm chín trước, sau đó được trải qua trình chưng cất thu nhận cồn. Phần chất rắn trong dịch còn lại sau chưng cất cồn được thu nhận bằng ly tâm, sấy khô được gọi là bã rượu và hiện nay thường sử dụng cho chăn nuôi. Theo ước tính thực tế, các nhà máy sản xuất cồn với nồng độ 14% (v/v) sẽ tạo ra lượng bã rượu bằng khoảng 30% nguyên liệu. Như vậy mỗi năm, các nhà máy sản xuất cồn tại Việt Nam sẽ tạo ra khoảng 47.000 tấn bã rượu ướt (độ ẩm 80%) hoặc 12.000 tấn bã rượu khô (độ ẩm 10%).

Trong quá trình sản xuất cồn từ nguyên liệu gạo, tinh bột hầu hết đã bị phân giải chỉ còn chiếm 10%, trong đó protein > 70% chất khô (Taranu, Nguyen *et al.*, 2019). Protein từ gạo cũng như từ nhiều protein thực vật khác đang được quan tâm bởi các đặc tính chức năng tốt của chúng (Li, Liang *et al.*, 2020). Tuy nhiên, ở Việt Nam, bã rượu gạo mới chỉ được sử dụng làm thức ăn chăn nuôi, gây lãng phí nguồn protein.

Trên thế giới có ít các nghiên cứu quan tâm tới bã rượu gạo và protein từ bã rượu gạo do nguyên liệu này đặc thù cho một số nước. Thay vào đó, nguồn bã rượu từ nguyên liệu ngô, lúa mì được quan tâm hơn. Protein trong nguồn bã rượu này đã được chỉ ra thấp hơn nhiều so với bã rượu gạo (chỉ khoảng

30 - 40%) (Liu 2011). Một số ít nghiên cứu đã ứng dụng bã rượu khô từ các nguồn nguyên liệu này vào một số sản phẩm bánh, tuy nhiên do còn hạn chế do bã rượu khô có thể ảnh hưởng tới cảm quan sản phẩm (Singha, Muthukumarappan *et al.*, 2018). Với bã rượu gạo cũng gây ảnh hưởng cảm quan không tốt nếu bổ sung tỷ lệ lớn vào sản phẩm bánh (kết quả chưa được công bố).

Do vậy trong nghiên cứu này, chúng tôi hướng tới mục tiêu chuyển hoá thành phần protein trong bã rượu gạo sang dạng dễ dàng cho ứng dụng hơn thông qua việc nghiên cứu trích ly thành phần này và thủy phân chúng thành dạng sản phẩm ngắn hơn như các peptide mạch ngắn. Tính chất của sản phẩm thủy phân được đánh giá để chỉ ra tiềm năng ứng dụng.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Đối tượng trong nghiên cứu này là bã rượu gạo khô của một công ty cồn thực phẩm tại miền Bắc. Bã rượu gạo này được sấy có độ ẩm dưới 15% đã được nghiền sơ bộ giữ trong các túi cách ẩm, tủ mát để sử dụng cho các thí nghiệm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đánh giá khả năng tiêu hoá *in vitro* của bã rượu gạo khô

Bã rượu khô có cấu trúc cứng, khả năng ứng dụng trực tiếp cho thực phẩm phụ thuộc nhiều vào khả năng tiêu hoá của. Trong phần này, chúng tôi đã đánh giá khả năng tiêu hoá của bã rượu ban đầu hoặc bã rượu sau khi được tiền xử lý bằng 1 số phương án

¹ Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm - Đại học Bách Khoa Hà Nội

khả thi cho chế biến thực phẩm. Các phương án tiên xử lý bao gồm được thể hiện trên bảng Phương án nghiên cứu và nhiệt được áp dụng để tiên xử lý bã rượu như mô tả dưới đây:

- Nghiền khô: Bã rượu được xay, nghiền thành kích thước < 0,01 mm.

- Nghiền ướt: Bã rượu được hoà với nước theo tỷ lệ 1/3 (w/w), sau đó được nghiền bằng máy nghiền mẫu IKA T10 (tốc độ 15000 vòng/phút, trong 2 phút).

- Xử lý nhiệt: Bã rượu được nghiền khô và đem phối nước với tỉ lệ 1/5 (w/w) và đun ở 100°C trong 20 phút.

Sau khi được xử lý như trên, mẫu tiếp tục được đem đi đánh giá khả năng tiêu hoá *in vitro* theo phương pháp INFOGEST 2.0 (Brodkorb, Egger *et al.* 2019) với 3 giai đoạn chính. Phối trộn mẫu cần đánh giá với dịch SSF (Simulated Salivary Fluid - dịch nước bọt mô phỏng) được giữ ở nhiệt độ 37°C) với tỷ lệ 1 : 1 (w/w) trong ống fancel tạo thành khối trộn lẫn. Ủ mẫu ở nhiệt độ 37°C trong 2 phút (giai đoạn miệng). Sau đó phối trộn tiếp mẫu này theo tỷ lệ 1 : 1 với dịch SGF (Simulated Gastric Fluid - dịch dạ dày mô phỏng) đã ủ ở nhiệt độ 37°C và pepsin với sao cho hoạt độ trong dịch sau phối trộn là 2000 U/ml. Chính pH dịch về 3 bằng HCl 6M. Ủ tiếp trong thời gian 2h (giai đoạn dạ dày). Tiếp tục bổ sung thêm dịch SIF (Simulated Intestinal Fluid - dịch ruột mô phỏng) theo tỷ lệ 1 : 1 với mẫu và trypsin sao cho hoạt độ trypsin trong dịch sau phối trộn đạt 100 U/ml.

Chính pH về 7 bằng NaOH 1M, ủ mẫu ở nhiệt độ 37°C có lắc trong 2 h.

Sau quá trình này, dịch được ly tâm ở 10000 vòng/phút, 20°C, trong 10 phút để tách cặn và thu dịch nổi. Phần dịch nổi được gạn và đem xác định lượng nito amin tự do (free amino nitrogen, FAN). Phần cặn còn lại được sấy ở nhiệt độ 50°C trong 24 h, đem cân khối lượng và xác định độ ẩm. Khả năng tiêu hoá *in vitro* được tính dựa trên khối lượng bã rắn (tính theo chất khô) đã giảm so với bã rượu ban đầu (theo %).

2.2.2. Trích ly protein từ bã rượu gạo

Tham khảo từ nghiên cứu của các nhóm tác giả Cookman và cộng tác viên năm 2009, kết hợp với các nghiên cứu sơ bộ của nhóm (kết quả chưa công bố), quy trình trích ly bã rượu được thực hiện như sau: bã rượu phối trộn với dung dịch NaOH 1M hoặc hỗn hợp NaOH 0,5M - NaHSO₃ 0,05M theo tỷ lệ bã rượu: dung môi = 1 : 10 ở nhiệt độ 70°C trong 2 giờ. Ly tâm hỗn hợp sau xử lý ở 10000 vòng/phút trong 10 phút. Bã rắn thu được sau ly tâm được đem sấy ở 50°C trong 24 giờ. Đem cân xác định khối lượng và

độ ẩm bã này. Hiệu quả trích ly (tỷ lệ trích ly) được tính là % giảm khối lượng của bã (theo chất khô) so với khối lượng bã rượu ban đầu.

Tiếp theo, nồng độ NaOH, NaHSO₃ và thời gian lần lượt được tối ưu cho hiệu quả trích ly tốt nhất. Để tối ưu nồng độ NaOH, nồng độ NaHSO₃ được cố định tại 0,05M để kết hợp với NaOH có nồng độ trong dải 0,1 - 2M. Tương tự, NaOH được cố định tại 0,5M để kết hợp với NaHSO₃ trong dải nồng độ từ 0,05M - 0,2M. Thời gian trích ly được khảo sát từ 1 - 6 giờ.

2.2.3. Thủy phân dịch trích ly bằng enzyme

Dịch sau khi trích ly sẽ được phân giải bằng protease thương mại tạo dịch chứa peptide và axit amin. Từ các chế phẩm enzyme protease thương mại (Bảng 1), chế phẩm phù hợp nhất được chọn lựa. Dịch trích ly được chỉnh về pH tối ưu tương ứng với các protease bằng HCl 6M, kết hợp với pha loãng 2 lần so với sau quá trình trích ly bằng nước khử ion (ứng với tỷ lệ bã rượu:dịch = 1 : 20). Sau đó, các chế phẩm protease được bổ sung vào các dịch này với lượng 0,8% theo khối lượng bã và ủ ở các nhiệt độ tối ưu tương ứng (Bảng 1) trong thời gian 4 h có khuấy trộn. Đun sôi cách thủy 5 phút để vô hoạt các enzyme, tiến hành ly tâm 10000 vòng/phút để thu dịch nổi, đem xác định hàm lượng FAN.

Sau khi đã chọn lựa được enzyme, nồng độ chế phẩm và với thời gian thủy phân dịch trích ly tiếp tục được khảo sát để tối ưu hơn điều kiện thủy phân dịch trích ly bã rượu. Tại mỗi điều kiện thí nghiệm này, sau quá trình thủy phân mẫu dịch nổi được thu nhận để xác định FAN theo phương pháp được mô tả ở dưới. Tỷ lệ hàm lượng peptide mạch ngắn (thể hiện qua giá trị FAN).

Bảng 1. Điều kiện tối ưu của các chế phẩm enzyme protease thương mại

Enzyme	pH	Nhiệt độ (°C)
Alcalase 2.4L (Novozyme)	7,5	60
Alphalase (Genecor)	6,5	58
Fermgen (Dupont)	4,3	32
Neutralse (Novozyme)	6,0	40

2.2.4. Tạo dịch thủy phân ở quy mô phòng thí nghiệm

Sau khi chọn lựa được chế độ trích ly, chế độ thủy phân, thí nghiệm tạo dịch thủy phân ở quy mô PTN với 50 g bã rượu gạo được thực hiện (quy trình được mô tả trong phần kết quả). Dịch peptide sau thủy phân ngoài việc được đánh giá cảm quan (màu sắc, mùi, vị), kích thước trung bình của sản phẩm peptide trong dịch bằng phương pháp điện

di biến tính. Bên cạnh đó, dịch thủy phân được sấy phun trên hệ thống sấy phun Buchi 290 (Thụy sỹ) để thu nhận dạng bột peptide. Bột peptide được xác định hàm lượng ẩm và protein tổng bằng phương pháp Kejldahl.

2.2.4. Các phương pháp phân tích hóa lý

Độ ẩm của các mẫu khô được xác định bằng máy đo độ ẩm nhanh MA15 (Satorius). Hàm lượng nito amin tự do (free amino nitrogen FAN) được xác định theo phương pháp 9.10.1 của EBC. Protein trong các mẫu được xác định bằng phương pháp vô cơ và cất đạm Kejldahl theo TCVN 4328-1:2007. Hàm lượng tinh bột được xác thông qua hàm lượng đường khử khi bị thủy phân với HCl 2% ở 100oC trong 2 h. Đường khử được xác định bằng phương pháp tạo phức chất màu với thuốc thử 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller 1959). Hàm lượng xơ tổng được xác định theo phương pháp sử dụng túi Alkom (AOCS Ba 6a - 05). Phương pháp điện di biến tính Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) (sử dụng gel tách có nồng độ polyacrylamide 18%) được sử dụng xác định khối lượng của các sản phẩm protein hay peptide được thực hiện theo quy trình MAN0007891 của Life Technology.

2.2.5. Phương pháp toán học xử lý số liệu

Các thí nghiệm được thực hiện độc lập 3 lần, số liệu được xử lý trên phần mềm Excel của Microsoft Office và được mô tả bằng giá trị trung bình và độ lệch chuẩn.

2.3. Thiết bị, thời gian và địa điểm nghiên cứu

Các thí nghiệm được thực hiện trên các thiết bị thuộc Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, Đại học Bách khoa Hà Nội trong năm 2019 đến 2020.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đánh giá khả năng tiêu hoá *in vitro* của bã rượu gạo

Kết quả phân tích bã rượu gạo sử dụng trong nghiên cứu này cho thấy tính theo chất khô, hàm lượng protein, chất xơ và tinh bột sót còn lại trong bã rượu lần lượt là: 79,28 ± 0,52 %, 4,20 ± 0,34%, 8,72 ± 0,09% tương đồng với các kết quả đã được các tác giả trước công bố (Taranu, Nguyen *et al.*, 2019). Với các phương pháp xử lý bã rượu khác nhau, khả năng tiêu hoá *in vitro* đã được đánh giá (Bảng 2).

Bã rượu khô không qua biện pháp xử lý nào có tỷ lệ tiêu hoá *in vitro* thấp nhất đạt 14,70%. Các mẫu xử lý khác như xử lý nhiệt 100°C/2 giờ, nghiền ướt

và nghiền khô có tỷ lệ tiêu hoá *in vitro* tăng lên so với mẫu không xử lý nhưng chỉ đạt 34 - 36 %. Có thể thấy việc nghiền nhỏ (hay đun sôi trong 2 giờ) có tác động tích cực tới khả năng tiêu hoá *in vitro* của bã rượu nhờ làm nhỏ bã rượu để tăng tiếp xúc và bị phân giải bởi các enzyme trypsin hay pepsin trong dịch giả dạ dày SGF và giả ruột SIF. Hàm lượng FAN, thể hiện lượng peptide và các axit amin (có gốc amin tự do) từ quá trình phân giải protein bởi các enzyme này, cũng có sự tăng lên tương ứng với tỷ lệ tiêu hoá và đạt 0,27 - 0,30 g/L ở các phương án xử lý bã rượu (Bảng 2).

Bảng 2. Đánh giá khả năng tiêu hoá *in vitro* của bã rượu gạo

Phương pháp xử lý	Tỷ lệ bã tiêu hoá <i>in vitro</i> (%)	FAN trong dịch (g/L)
Không xử lý (đối chứng)	14,70 ± 0,73	0,17 ± 0,01
Xử lý nhiệt 100°C/2 h	34,10 ± 1,71	0,27 ± 0,01
Nghiền ướt	34,90 ± 1,75	0,30 ± 0,02
Nghiền mịn < 0,01 mm	35,50 ± 1,78	0,30 ± 0,01

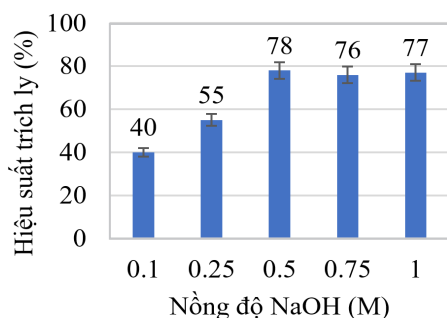
Như vậy, chỉ có khoảng 1/3 lượng bã rượu được tiêu hoá *in vitro*, có thể là do trong quá trình sản xuất cồn, các thành phần trong gạo (chủ yếu còn lại là protein) bị trải qua nhiều quá trình xử lý nhiệt độ cao (dịch hoá gạo với chế enzyme α- amylase thương mại như Termamyl ở 100°C), chưng cất ở nhiệt độ sôi trong thời gian dài và sấy thu nhận bã rượu khô. Tương ứng, 2/3 lượng bã rượu (khoảng 64%) không được tiêu hoá kéo theo sự lãng phí protein trong bã này. Do vậy, các biện pháp xử lý bã mức độ triệt để hơn như trích ly và thủy phân protein để có thể chuyển hoá protein sang dạng dễ sử dụng hơn là cần thiết, như mô tả trong các nội dung tiếp theo.

3.2. Trích ly protein từ bã rượu

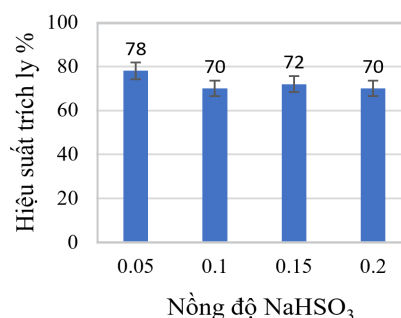
Trước khi sử dụng hoá chất, nước được sử dụng để trích ly bã rượu gạo. Trong đó, bã rượu được nghiền ướt với nước, kết hợp với xử lý nhiệt độ cao (Bảng 3). Tuy nhiên, hiệu quả trích ly chỉ đạt khoảng 5%. Rõ ràng, việc chỉ sử dụng nghiền, xử lý nhiệt là chưa đủ nên hiệu quả thấp hơn so với có sử dụng các enzyme tiêu hoá như thí nghiệm trước.

Bảng 3. Phương án trích ly bằng nước kết hợp với nhiệt độ

Phương án xử lý	Hiệu quả trích ly (%)
121°C/ 15p	5,01 ± 0,06
Nghiền + 121°C/ 15p	5,23 ± 0,10



Hình 1. Hiệu suất trích ly bã rượu khi sử dụng NaOH các nồng độ khác nhau kết hợp với NaHSO₃ 0,05M tại 70°C sau 2 giờ. Nồng độ chất khô 10%



Hình 2. Hiệu suất trích ly bã rượu khi sử dụng NaHSO₃ các nồng độ khác nhau kết hợp với NaOH 0,5M tại 70°C sau 2 giờ. Nồng độ chất khô 10%

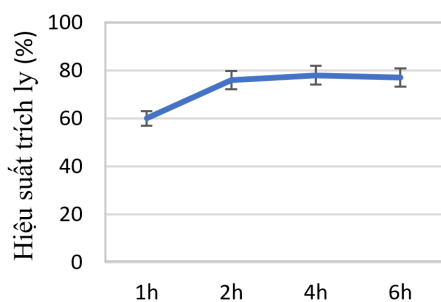
Do vậy, chúng tôi đã tiến hành trích ly bã rượu khô bằng kiềm và cho kết quả tốt hơn (Hình 1 và 2). Theo các công bố về thành phần protein trong gạo chủ yếu là glutelin chiếm tỷ trọng 75 - 90% protein tổng (Kawakatsu and Takaiwa 2019), nên trong trường hợp này khi sử dụng NaOH với sự có mặt của NaHSO₃, hiệu quả trích ly lớn hơn so với sử dụng nước. Khi thay đổi nồng độ NaOH từ 0,1M đến 1M, hiệu suất trích ly tăng từ 40% đến 78% (Hình 1). Glutelin có khả năng hòa tan tốt trong kiềm (Cookman and Glatz 2009) nên khi tăng nồng độ kiềm NaOH thì tỷ lệ trích ly tăng lên. Ở nồng độ NaOH 0,5M cho hiệu quả trích ly đạt bão hòa (78%). Theo nhiều nghiên cứu, việc sử dụng chất khử sẽ phá vỡ liên kết disulfur làm tăng khả năng hòa tan vào dung môi của protein (Cookman and Glatz 2009, Chatzifragkou, Prabhakumari et al. 2016), tuy nhiên trong thí nghiệm này khi nồng độ NaOH được cố định tại 0,5M, việc tăng nồng độ chất khử NaHSO₃ từ 0,05M đến 0,2M không làm tăng hiệu quả trích ly (Hình 2). Có thể chất khử chỉ cần ở một mức nhỏ để phá vỡ các cầu disulfur.

Để đánh giá ảnh hưởng của thời gian đến hiệu suất trích ly, bã rượu được xử lý với hỗn hợp dung dịch NaOH 0,5M, NaHSO₃ 0,05M ở 70°C trong thời gian từ 1 giờ đến 6 giờ khuấy trộn liên tục. Tuy nhiên, việc kéo dài thời gian từ 2 giờ đến 6 giờ không

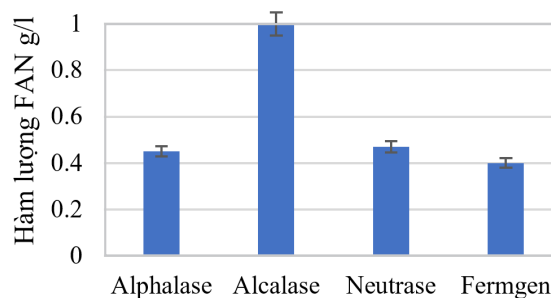
làm tăng hiệu quả trích ly (Hình 3). Vì vậy chọn thời gian thích hợp cho trích ly là 2 giờ.

3.3. Thủy phân dịch trích ly bằng enzyme

- Lựa chọn enzyme thủy phân: Dịch trích ly bã rượu với điều kiện đã chọn NaOH 0,5M + NaHSO₃ 0,05M trong 2 h ở nhiệt độ 70°C được xử lý và thủy phân với 4 loại chế phẩm protease thương mại (Bảng 1). Kết quả cho thấy, enzyme Alcalase 2,4L tạo lượng FAN cao nhất trong 4 enzyme khảo sát (đạt khoảng 1 g/L và cao >2 lần so với khi sử dụng các enzyme còn lại chỉ đạt khoảng 0,4 g/L) (Hình 4). Bản chất enzyme Alcalase 2,4L (Novozyme) là một endo - protease thuộc loại serine, nó có khả năng thủy phân hầu hết các liên kết peptide một cách ngẫu nhiên trong chuỗi protein. Giá trị pH tối ưu của các chế phẩm enzyme Alphasase, Neutrased trong khoảng 6,0 - 6,5, của Ferngen là 4,3 gần với giá trị pI của protein từ gạo (pH 4.8) (Ju, Hettiarachchy et al., 2001). Do vậy, tại pH tối ưu cho các enzyme này, protein của gạo có xu hướng hòa tan kém hơn, kéo theo hiệu quả thủy phân protein bởi các enzyme này kém hơn so với Alcalase có pH tối ưu vùng kiềm pH 7,5 cũng là vùng pH mà glutelin hòa tan tốt hơn. Thêm vào đó việc dùng Alcalase cũng giúp tốn ít axit để điều chỉnh pH của dịch trích ly hơn so với các enzyme khác. Vì thế, chúng tôi chọn enzyme Alcalase để thủy phân cho các thí nghiệm còn lại của nghiên cứu này.



Hình 3. Hiệu suất trích ly theo thời gian



Hình 4. Hàm lượng FAN của dịch thủy phân bằng các chế phẩm enzyme thương mại

- Khảo sát nồng độ enzyme thủy phân: Cố định nhiệt độ 60°C, pH 7,5, thời gian thủy phân 4 giờ và thay đổi nồng độ enzyme 0,2 - 2,0% trong các mẫu thí nghiệm thủy phân. Chúng tôi thu được kết quả về hàm lượng FAN tạo ra như ở bảng 4. Có thể thấy rằng, từ nồng độ enzyme 0,8% trở lên, hàm lượng FAN tạo ra đạt 0,99 g/L và không tiếp tục tăng lên (Bảng 4).

Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ Alcalase đến hiệu quả thủy phân

Nồng độ (%)	FAN (g/L)
0,2	0,69 ± 0,05
0,4	0,73 ± 0,04
0,8	0,99 ± 0,05
1,2	1,00 ± 0,05
1,6	0,99 ± 0,04
2,0	0,97 ± 0,05

- Ảnh hưởng của thời gian tới hiệu quả thủy phân: Bảng 5 thể hiện kết quả thủy phân bằng Alcalase dịch trích ly theo thời gian với điều kiện 0,8% nồng độ enzyme, nhiệt độ 60°C. Sau 4 giờ trở đi, hàm lượng FAN trong dịch thủy phân tăng không đáng kể nên chọn thời gian thủy phân là 4 giờ.

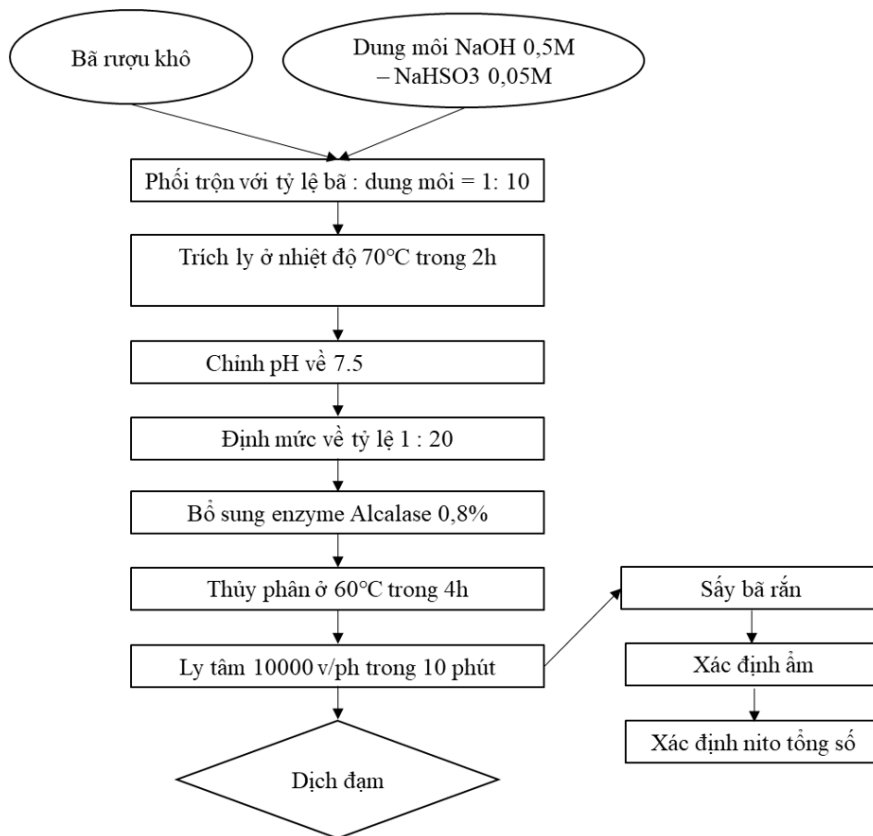
Bảng 5. Ảnh hưởng của thời gian đến hiệu quả thủy phân

Thời gian (giờ)	FAN (g/l)
1	0,79 ± 0,04
2	0,88 ± 0,05
3	0,92 ± 0,05
4	1,02 ± 0,03
5	1,00 ± 0,04
6	1,03 ± 0,05

3.4. Tạo dịch thủy phân ở quy mô PTN

Sử dụng các điều kiện đã lựa chọn, dịch thủy phân bã rượu được tạo ra ở quy mô phòng thí nghiệm 50 g bã rượu theo quy trình trên hình 5.

Quy trình trên được thử nghiệm ở quy mô 50 g bã trong thể tích 500 ml dịch trích ly. Bã sau quá trình thủy phân được đem sấy và xác định protein tổng bằng phương pháp Kjeldahl. Tương tự dịch thủy phân cũng được sấy phun thành dạng bột (Hình 6) sau đó được xác định protein tổng và độ ẩm. Kết hợp với các kết quả protein và độ ẩm bã rượu gạo ban đầu, các số liệu được mô tả trên bảng 6.



Hình 5. Quy trình tạo dịch thủy phân từ bã rượu quy mô phòng thí nghiệm

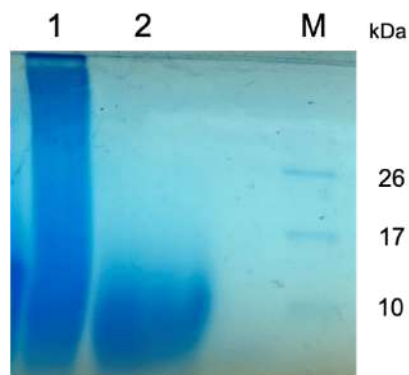
Bảng 6. Các chỉ tiêu của bã trước và sau quá trình trích ly và thủy phân

Chỉ tiêu	Bã rượu ban đầu	Bã rắn còn lại sau thủy phân	Dịch thủy phân	Bột sấy phun
Khối lượng (g)	50,00	10,79	1000*	44 ***
Độ ẩm (%)	13,00	4,58	--	14,70
Hàm lượng protein (% theo chất khô)	79,28	34,20	30,97 (g/L)** (4,96 g/L N)	73,33
Khối lượng phần protein tổng (g)	34,49	3,52	30,97**	27,52
Hiệu suất thu protein tổng (%)	100	10,21	89,79**	79,81
Cảm quan	-	-	Dịch màu vàng cánh dán, vị mặn	Bột mịn màu trắng, vị mặn (Hình 6)

Ghi chú: *Thể tích ml; **Tính toán dựa trên lượng protein trong bã ban đầu so với lượng protein còn lại trong bã rắn sau thủy phân; *** Bao gồm cả các muối tạo ra do quá trình trung hoà dịch.



Hình 6. Bột peptide thu được sau sấy phun dịch thủy phân



Hình 7. Điện di biến tính SDS-PAGE mẫu dịch trích ly (Làn 1) và sau thủy phân (Làn 2). M: thang protein chuẩn (EZ-Run™ Rec, Fisher BioReagents)

Theo các kết quả thu được từ bảng 6, bã rắn còn lại sau thủy phân đạt 10,79 g với độ ẩm 4,58%. Bã này có hàm lượng protein 34,20%, tương ứng với lượng protein là 3,52 g. Điều này có nghĩa 30,97 g protein đã được trích ly vào dịch, tương ứng với hiệu suất trích ly protein là 89,79%. Theo tính toán như vậy thì dịch thủy phân có chứa 4,96 g/L N tổng. Khi sấy phun, từ 1 lít dịch thủy phân thu nhận được 44 g bột có hàm lượng N tính theo protein 73,33% (độ ẩm 14,70%), tương ứng với hiệu suất thu hồi protein đạt 79,81%.

Hiệu quả thủy phân protein của Alcalase được thể hiện thêm trên kết quả chạy điện di biến tính (Hình 7). Trong đó, với mẫu dịch trích ly trước thủy phân (làn 1 hình 7) xuất hiện vệt mờ (smear) kéo dọc trên cả làn chạy và không có vạch rõ nét nào chứng tỏ các protein trong dịch trích ly đã bị đứt gãy hoặc phân hủy thành các sản phẩm có phân bố rộng về kích thước trong quá trình sản xuất cồn hoặc quá trình trích ly bằng kiềm. Tuy nhiên, với mẫu dịch sau thủy phân bằng Alcalase, các sản phẩm tập trung

hơn ở vùng kích thước < 10 kDa chứng tỏ đã có sự thủy phân các protein kích thước dài hơn về sản phẩm ngắn hơn (làn 2, Hình 7). Hiện nay đang có nhiều nghiên cứu chứng minh rằng các peptide có kích thước nhỏ hơn 10 kDa thường có hoạt tính sinh học cao, đặc biệt là hoạt tính chống tăng huyết áp và kháng khuẩn (Li, Liang *et al.*, 2020).

Về đặc điểm cảm quan, dịch sau thủy phân có màu vàng cánh gián, vị mặn do NaCl tạo thành khi hiệu chỉnh pH bằng HCl, phù hợp cho việc ứng dụng vào các dịch nước chấm, nước mắm cần bổ sung đậm. Bên cạnh đó, màu sắc và mùi vị của dịch thủy phân có thể xử lý thêm để phù hợp với nhiều sản phẩm. Nồng độ đậm của dịch có thể được tăng lên, kết hợp với loại muối bằng phương pháp lọc màng, nhờ vậy có thể mở rộng khả năng ứng dụng của dịch trong nhiều sản phẩm khác. Bột sấy có màu sáng trắng ngà vàng mịn chứa các peptide dưới 10 kDa (hàm lượng 73,33% quy theo protein) dễ tiêu hoá có thể dễ dàng bổ sung vào nhiều sản phẩm thực phẩm dạng bột khác nhau để tăng độ đậm.

IV. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã lựa chọn được điều kiện thích hợp để trích ly và thủy phân protein từ bã rượu gồm 2 giai đoạn: trích ly bằng NaOH 0,5M - NaHSO₃ 0,05M, 70°C, thời gian 2 giờ và thủy phân bằng chế phẩm protease Alcalse 2,4L (Novozyme) 0,8% ở 60°C, pH 7,5, thời gian 4 giờ. Hiệu suất thu nhận protein tổng sau trích ly và thủy phân đạt 89,79% với sản phẩm chủ yếu là các peptide có kích thước < 10 kDa dễ tiêu hoá hơn, nhờ vậy nâng cao khả năng ứng dụng nguồn protein từ bã rượu gạo vào trong các sản phẩm thực phẩm.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Đại học Bách khoa Hà Nội qua đề tài cấp cơ sở T2018 - PC - 009.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Brodkorb, A., L. Egger, M. Alming, P. Alvito, R. Assunção, S. Ballance, T. Bohn, C. Bourliou-Lacanal, R. Boutrou, F. Carrière, A. Clemente, M. Corredig, D. Dupont, C. Dufour, C. Edwards, M. Golding, S. Karakaya, B. Kirkhus, S. Le Feunteun, U. Lesmes, A. Macierzanka, A. R. Mackie, C. Martins, S. Marze, D. J. McClements, O. Ménard, M. Minekus, R. Portmann, C. N. Santos, I. Souchon, R. P. Singh, G. E. Vegarud, M. S. J. Wickham, W. Weitschies and I. Recio, 2019. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4): 991-1014.

Chatzifragkou, A., P. C. Prabhakumari, O. Kosik, A. Lovegrove, P. R. Shewry and D. Charalampopoulos, 2016. Extractability and characteristics of proteins deriving from wheat DDGS. *Food. Chem.*, 198: 12-19.

Cookman, D. J. and C. E. Glatz, 2009. Extraction of protein from distiller's grain. *Bioresource Technology*, 100(6): 2012-2017.

Ju, Z. Y., N. S. Hettiarachchy and N. Rath, 2001. Extraction, denaturation and hydrophobic Properties of Rice Flour Proteins. *Journal of Food Science*, 66(2): 229-232.

Kawakatsu, T. and F. Takaiwa, 2019. 4 - Rice proteins and essential amino acids. *Rice (Fourth Edition)*. J. Bao, AACC International Press: 109-130.

Li, H., M. Liang, Z. Wang, Y. Zhang, Q. Wu and L. Yang, 2020. Rice Protein Exerts Endogenous Antioxidant Capacity Via Methionine Sulfoxide Reductase and the Nrf2 Antioxidant System Independent of Age. *J Med Food.*, 23 (6): 565-574.

Liu, K., 2011. Chemical Composition of Distillers Grains, a Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(5): 1508-1526.

Miller, G. L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3): 426-428.

Singha, P., K. Muthukumarappan and P. Krishnan, 2018. Influence of processing conditions on apparent viscosity and system parameters during extrusion of distiller's dried grains-based snacks. *Food Sci Nutr.*, 6(1): 101-110.

Taranu, I., T.-T. Nguyen, K.-D. Pham, M. A. Gras, G. C. Pistol, D. E. Marin, C. Rotar, M. Haneanu, P.-H. Ho, T.-M. Le, T. T.-H. Bui, D.-V. Mai and S. Chu-Ky, 2019. Rice and Cassava Distillers Dried Grains in Vietnam: Nutritional Values and Effects of Their Dietary Inclusion on Blood Chemical Parameters and Immune Responses of Growing Pigs. *Waste and Biomass Valorization*, 10(11): 3373-3382.

Extraction and hydrolysis of protein from industrial rice-based dried distiller's grain toward food application

Do Thi Thanh Huong, Nguyen Gia Long,
Chu Ky Son, Nguyen Tien Thanh

Abstracts

Dried distiller's grain (DDG) from alcohol factories based on rice as raw material composes of 70 - 80% dry matter of protein; however this valuable plant protein sources are mainly used for livestock at present. In this study, the extraction and hydrolysis of protein from this source was investigated to convert this protein source into digestible forms such as peptide and amino acid for food application. The results showed that 0.5M NaOH solution combined with 0.05M NaHSO₃ yielded in an extraction of 78% after 2 hours at 70°C. The hydrolysis of extracted protein was performed at 60°C, pH 7.5 for 4 hours with enzyme concentration of 0.8% dry matter of DDG of Alcalase 2,4L Novozyme and resulted mostly in low molecular products (<10 kDa) with recovery yield of 89.79%. In this digestible form, the potential application in food production of rice based DDG protein is therefore enhanced.

Keywords: Rice protein, rice-based dried distiller's grain, hydrolysis, enzyme, peptide

Ngày nhận bài: 10/01/2021
Ngày phản biện: 21/01/2021

Người phản biện: GS. TS. Nguyễn Thị Hiền
Ngày duyệt đăng: 29/01/2021