

Nghiên cứu gốc

NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG PROTEASE THƯƠNG PHẨM ĐỂ CHIẾT XUẤT PROTEIN THỦY PHÂN TỪ BÃ SỮA GẠO

Trần Hoàng Quyên^{1,✉}, Lê Viết Hùng², Nguyễn Minh Châu¹,
Vũ Đức Mạnh¹, Lê Văn Bắc¹, Phạm Linh Khoa¹

¹ Viện Công nghiệp thực phẩm

² Công ty cổ phần mía đường Lam Sơn

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xác định các thông số tối ưu cho quá trình chiết xuất protein từ bã sữa gạo đã làm sạch tinh bột và carbohydrate bằng enzyme protease thương phẩm

Phương pháp: Nghiên cứu được thực hiện trên cơ sở khảo sát lựa chọn 9 loại enzyme thương phẩm của công ty Amano-Nhật Bản để tiến hành tối ưu hóa điều kiện enzyme hóa nhằm chiết xuất protein từ bã sữa gạo bằng phương pháp thiết kế bề mặt RSM, mô hình I-optimal. Sản phẩm của nghiên cứu được phân tích SDS-PAGE để đánh giá thành phần protein.

Kết quả: Đã lựa chọn được enzyme protin “Amano” SD-AY10 của công ty Amano-Nhật Bản có hiệu suất chiết xuất protein và mức độ thủy phân DH cao nhất trong các enzyme được đánh giá. Quá trình tối ưu hóa điều kiện thủy phân bằng SD-AY10 cho hiệu suất chiết xuất protein từ bã sữa gạo đạt 90,1%, điều kiện tối ưu là: nồng độ enzyme :1.2%E S, nồng độ muối (NH₄)₂SO₄ 2.5%, pH 8, tại 60°C trong 120 phút thủy phân, khối lượng protein trong dịch thủy phân đạt 19,1%DS. Kết quả phân tích SDS-PAGE cho thấy sản phẩm có hàm lượng peptide phân tử lượng chủ yếu dưới 100 kDa, chứng tỏ sản phẩm có tính chức năng và chất lượng dinh dưỡng cao, phù hợp ứng dụng trong sản xuất các sản phẩm thực phẩm, mỹ phẩm, dược phẩm sử dụng cho con người.

Kết luận: Kết quả nghiên cứu giúp đa dạng hóa sản phẩm từ phụ phẩm nông nghiệp, đặc biệt là từ gạo, hỗ trợ phát triển cho ngành công nghiệp chế biến và sản xuất thực phẩm bền vững.

Từ khóa: Protein thủy phân, bã sữa gạo, protease, protin “Amano” SD-AY10, tối ưu hóa

STUDYING THE PRODUCTION OF RICH IN PROTEIN HYDROLYSATE FROM RICE MILK RESIDUE USING COMMERCIAL PROTEASE

ABSTRACT

Aims: To determine the optimal parameters for the process of extracting protein from rice milk residue, which has starch and carbohydrates removed, using commercial protease enzymes.

Methods: The study was conducted based on the selection of nine types of commercial enzymes from Amano-Japan, and then the optimization of enzymatic conditions was carried out to extract protein from rice milk residue using the Response Surface Methodology (RSM) with an I-optimal model. The product of the research was analyzed using SDS-PAGE to assess the protein composition.

✉ Tác giả liên hệ: Trần Hoàng Quyên
Email: quyenth@firi.vn
Doi: 10.56283/1859-0381/684

Nhận bài: 5/12/2023 Chính sửa: 14/12/2023
Chấp nhận đăng: 15/12/2024
Công bố online: 29/2/2024

Results: The enzyme "Protein Amano" SD-AY10 from Amano-Japan was chosen because it was the best at extracting proteins and had the highest degree of hydrolysis of all the enzymes that were tested. The optimization process using SD-AY10 achieved a protein extraction yield of 90.1% from rice milk residue under the conditions of 1.2% enzyme concentration, 2.5% NH_4SO_4 concentration, pH 8 temperature, 60°C time, and 120 minutes of hydrolysis. This led to an extraction yield of 90.1%, close to the calculated maximum of 91.37%, and the protein content in the hydrolysate reached 19.1% dry substance. The SDS-PAGE analysis showed that the product had peptides with molecular weights below one hundred kDa. This means that it has high nutritional and functional quality and can be used to make food, cosmetics, and medicines for people to eat.

Conclusion: The result contributes to the diversification of products derived from agricultural by-products, particularly those from rice, supporting the development of sustainable food processing and production industries.

Key word: rice protein hydrolysate, rice milk residue, protease, protein "Amano" SD-AY10, response surface methodology

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bã sữa gạo, sản phẩm phụ của công nghiệp sản xuất sữa gạo, là nguồn phụ phẩm giàu dinh dưỡng, các hoạt chất sinh học gốc phenolic, chất xơ, vitamin, chất khoáng và đặc biệt là protein. Tái sử dụng nguồn phụ phẩm này giúp tận dụng nguồn tài nguyên, giảm ô nhiễm môi trường, tăng giá trị thương mại cho nguyên liệu gốc cũng như đa dạng hóa sản phẩm từ gạo phục vụ đời sống con người. Theo nhu cầu sử dụng sản phẩm thực phẩm thân thiện với môi trường, tốt cho sức khỏe của người tiêu dùng tăng tịnh tiến từ năm 2018 đến nay, sản phẩm sữa thực vật, bao gồm sữa gạo đang có đà tăng trưởng vượt bậc, với tỷ lệ tăng trưởng hàng năm dự báo đạt 9,9%, giá trị ròng của sản phẩm tăng từ 19,8 tỷ USD năm 2023 dự kiến tăng 47,22 tỷ USD năm 2033 [1]. Sản lượng sản phẩm sữa gạo đòi hỏi nhu cầu tái sử dụng, đa dạng hóa sản phẩm từ nguồn phụ phẩm từ sữa gạo, tăng giá trị thương mại của nguyên liệu gốc, đa dạng hóa sản phẩm từ gạo như chất xơ, dầu gạo và đặc biệt là

protein từ gạo phục vụ cho con người. Protein từ gạo, với chỉ số tiêu hóa tương đương 93% so với protein của trứng, cao hơn lúa mì và yến mạch, giàu axit amin thiết yếu và các hợp chất chống oxy hóa, không chứa gluten, là nguồn protein thay thế có nhiều tiềm năng ứng dụng trong sản xuất thực phẩm, thực phẩm chức năng, dược phẩm cho con người, gồm cả người già, trẻ nhỏ, người bị dị ứng gluten, lactose và người bị béo phì [2-3]. Công nghệ enzyme, với nhiều ưu điểm như thân thiện với môi trường, ít tác động đến chất lượng hoạt chất cần chiết xuất, tính đặc hiệu cao, hệ thống chiết xuất linh hoạt, dễ lắp đặt, sử dụng, là phương pháp hiệu quả và tiềm năng trong ứng dụng chiết xuất protein từ bã sữa gạo. Một số nghiên cứu đáng chú ý về phương pháp này như nghiên cứu của Charoen và cộng sự (2017) sử dụng enzyme Alcalase 2.4L và flavyzyme sản xuất protein thủy phân từ cám gạo. Bột protein cám gạo sau thủy phân có chỉ số chống oxy hóa DPPH cao, cải thiện độ

hòa tan, nhũ hóa, tạo bọt và tăng khả năng tiêu hóa và hấp thu của protein so với protein gạo nguyên bản [4]. Hamada và cộng sự (1999) sử dụng protease kết hợp Na_2SO_3 trích ly protein từ cám gạo cải thiện hiệu suất trích ly từ 74% lên 81% [5]. Thêm vào đó, hàm lượng peptide phân tử lượng từ 11-68 kDa tăng đáng kể so với mẫu đối chứng không sử dụng enzyme và mẫu thí nghiệm không bổ sung muối chứng tỏ kết hợp enzyme và muối Na_2SO_3 tăng hiệu suất trích ly và nâng cao chất lượng sản phẩm protein gạo thu nhận được. Hanmoungjai và cộng sự (2002) sử dụng hệ enzyme cellulase gồm Celluclast 1,5L, hemicellulase, Viscozyme L, sau đó là Alcalase 0,6L và papainase cho thấy Alcalase và papainase giúp tăng hiệu suất trích ly protein từ nguyên liệu ban đầu [6]. Morita và cộng sự (1993) và Tang và cộng sự (2002) ghi nhận sự cải thiện hiệu suất trích ly và chất lượng

dinh dưỡng của protein cám gạo khi sử dụng kết hợp siêu âm và xử lý enzyme gồm amylase và protease [7-8]. Tại Việt Nam, nghiên cứu của Hậu và cộng sự (2017) [9] thử nghiệm trên bã cám gạo tách dầu và nghiên cứu của Hùng và cộng sự (2022) [10] thử nghiệm trên bã sữa gạo của công ty Lasuco bằng enzyme protease neutrane thương phẩm (Trung Quốc) nhằm thu hồi protein gạo. Hiệu suất thu hồi protein của các thí nghiệm đạt từ 42 đến 70%. Sản phẩm bột protein gạo của các thử nghiệm được đánh giá có tính tan, độ tạo bọt và khả năng tạo nhũ tương tốt hơn sản phẩm thương mại của Trung Quốc. Các công bố trên cho thấy ứng dụng enzyme thương phẩm và muối trong chiết xuất protein từ bã sữa gạo là hướng nghiên cứu có triển vọng nâng cao hiệu suất thu nhận protein từ nguyên liệu ban đầu, cải thiện chất lượng và tính chức năng của protein thủy phân từ bã sữa gạo.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu

Bảng 1: Các enzyme thương phẩm sử dụng trong nghiên cứu

Tên enzyme	Hãng sản xuất	Điều kiện khuyến nghị của nhà sản xuất
Protease a “ amano” 2sd	Amano	pH 6, nhiệt độ 50°C
Protease M "amano" SD	Amano	pH 6, nhiệt độ 50°C
Protease P "amano" 6SD	Amano	pH 7, nhiệt độ 40°C
Prote AX	Amano	pH 5, nhiệt độ 50°C
Prote AXH	Amano	pH 5, nhiệt độ 50°C
Protin SD-AY10	Amano	pH 7, nhiệt độ 50°C
Protin SD-NY10	Amano	pH 7, nhiệt độ 50°C
Thermoase PC10F	Amano	pH 5, nhiệt độ 50°C
Protease AN Amano 100SD	Amano	pH 5, nhiệt độ 50°C

Bã sữa gạo lúc được thu nhận từ Công ty cổ phần mía đường Lam Sơn (Lasuco). Bã sữa gạo lúc chứa 11,54%

protein, 23,3% tinh bột và 12,15% cellulose. được làm sạch tinh bột và carbohydrate theo quy trình tiền xử lý

nguyên liệu trình bày ở mục 2.2. Dịch thủy phân bã sữa gạo sau quá trình tiền xử lý được điều chỉnh đến pH 3,8, khuấy trong 30 phút sau đó ly tâm thu bã giàu protein tại điều kiện 4.500 vòng/phút trong 30 phút, rửa bã 2 lần bằng nước cất với tỷ lệ bã sữa gạo/nước rửa = 1/2 và ly tâm thu bã ở cùng điều kiện.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp công nghệ

Quy trình chiết xuất protein từ bã sữa gạo

Quy trình làm sạch tinh bột và carbohydrate bã sữa gạo lúc: Bã sữa gạo được hòa vào nước tinh lọc ($V/m = 1,8$) và khuấy đều sau đó thực hiện quá trình thủy phân bằng ba enzyme khác nhau: enzyme amylase Kleistase E5CC (Amano) với nồng độ enzyme 0,75% ES, pH 6,5, nhiệt độ 50°C, 100 phút; enzyme cellulase A3"Amano" với nồng độ enzyme 1,25% ES, pH 7,5, nhiệt độ 60°C, 90 phút; và enzyme glucoamylase Gluczyme NLPC-Amano với nồng độ enzyme 1,25% ES, pH 4,5, nhiệt độ 50°C, 120 phút. Sau giai đoạn thủy phân, khối dịch được đun sôi ở 100°C trong 5 phút để diệt enzyme. Bã sữa gạo đã làm sạch tinh bột và carbohydrate được lưu trữ ở 5°C trước khi sử dụng. Hàm lượng protein tổng số trong bã và dịch sau thủy phân lần lượt là 21,12% DS và 2,3% DS.

Quy trình thực nghiệm: Các enzyme protease sử dụng trong nghiên cứu được cung cấp bởi công ty Amano – Nhật Bản và liệt kê ở Bảng 1. Điều kiện enzyme hóa nhằm chiết xuất protein từ bã sữa gạo đã làm sạch tinh bột và carbohydrate gồm pH, nhiệt độ enzyme hóa, nồng độ ban đầu dựa trên khuyến nghị của nhà sản xuất. 20 g bã sữa gạo đã làm sạch tinh bột và carbohydrate được điều chỉnh nhiệt độ đến nhiệt độ phòng, bổ sung enzyme protease thương phẩm theo bộ

Enzyme sử dụng trong nghiên cứu: được cung cấp bởi công ty Amano (Nhật Bản). Chi tiết về các enzyme sử dụng trong nghiên cứu được trình bày ở Bảng 1. Hóa chất khác sử dụng trong nghiên cứu đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích, được mua từ Anh, Đức, Hàn Quốc, Trung Quốc và Việt Nam.

trí thí nghiệm sau đó khuấy trộn. Hỗn hợp sau đó được điều chỉnh đến pH theo yêu cầu thí nghiệm bằng NaOH 1N hoặc HCl 1N, nâng nhiệt đến nhiệt độ yêu cầu và chuyển vào bể ổn nhiệt để thực hiện enzyme hóa. Khi kết thúc thời gian enzyme hóa, mẫu thí nghiệm được nâng đến 100°C trong 10 phút để vô hoạt enzyme sau đó làm lạnh xuống nhiệt độ thường. Mẫu thí nghiệm sau đó được ly tâm tách dịch tại điều kiện 4000 vòng/phút/30 phút tại nhiệt độ phòng. Dịch thủy phân và bã được tàng trữ tại -50C cho đến khi được phân tích, đánh giá.

Quy trình chiết xuất protein bã sữa gạo theo kết quả nghiên cứu của Hùng và cộng sự (2022) [10]. Bã sữa gạo được hòa nước với tỷ lệ $m/v=1/4$, khuấy tan, sau đó chỉnh pH đến 6,91 bằng HCl 1 N hoặc NaOH 1N. Khối dịch được bổ sung enzyme NP-2000, là enzyme protease trung tính, sau đó nâng nhiệt lên 50°C, chuyển khối dịch vào bể ủ để tiến hành quá trình enzyme hóa. Sau 60 phút, khối dịch được nâng lên 100 °C giữ trong 10 phút để diệt enzyme sau đó ly tâm thu dịch. Dịch thủy phân và bã được tàng trữ tại -5°C cho đến khi được phân tích, đánh giá.

Khảo sát ảnh hưởng của enzyme protease thương phẩm đến hiệu suất chiết xuất protein từ bã sữa gạo

Mẫu thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của enzyme protease thương phẩm đến quá trình chiết xuất protein từ bã sữa gạo được thực hiện trong 60 phút tại nhiệt độ và pH tối ưu theo khuyến nghị của nhà sản xuất. Chỉ tiêu đánh giá thí nghiệm gồm mức độ thủy phân DH, hàm lượng protein trong dịch thủy phân thu được

sau enzyme hóa và hiệu suất chiết xuất protein. Các điều kiện tối thích khuyến nghị của enzyme được lựa chọn sẽ được sử dụng làm cơ sở cho các thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của các điều kiện enzyme hóa đến hiệu suất chiết xuất protein từ bã sữa gạo đã làm sạch tinh bột và carbohydrate.

Khảo sát ảnh hưởng của enzyme protease và muối vô cơ đến hiệu suất chiết xuất protein từ bã sữa gạo

Nồng độ muối vô cơ sử dụng trong thí nghiệm dựa trên kết quả nghiên cứu của Hamada và cộng sự (1999) [5], Jiang và cộng sự (2021) [11] và Mẫn và cộng sự (2016) [12], gồm NaCl, NH₄SO₄ và Na₂SO₃. Mẫu thí nghiệm được chuẩn bị như quy trình 2.2.1. Muối vô cơ được thêm vào hỗn dịch với nồng độ thí nghiệm là 1% và được khuấy trộn hòa tan hoàn toàn. Enzyme protease đã được

lựa chọn sau đó được bổ sung vào hỗn dịch và tiến hành quá trình enzyme hóa. Các chỉ tiêu đánh giá thí nghiệm gồm mức độ thủy phân DH, hàm lượng protein trong dịch thủy phân thu được sau enzyme hóa và hiệu suất chiết xuất protein. Từ kết quả thu được, loại muối vô cơ được lựa chọn sẽ được sử dụng trong các thí nghiệm tiếp theo.

Nghiên cứu ảnh hưởng của các điều kiện enzyme hóa đến hiệu suất chiết xuất protein từ bã sữa gạo

Điều kiện enzyme hóa cố định được sử dụng trong các thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của điều kiện enzyme hóa đến hiệu suất chiết xuất protein từ gạo dựa trên khuyến nghị của nhà sản xuất và kết quả lựa chọn enzyme protease phù hợp sử dụng trong nghiên cứu. Nồng độ enzyme được khảo sát từ 0,5%ES đến 2%ES, dải pH được khảo sát từ 3-10; tốc

độ đảo trộn từ 150 đến 300 vòng/phút. Nhiệt độ enzyme hóa từ 40°C đến 70°C, nồng độ muối vô cơ từ 1% đến 4% và thời gian enzyme hóa từ 60 phút đến 180 phút. Kết thúc khảo sát sơ bộ, từ hiệu suất chiết xuất protein gạo, tâm thí nghiệm và khoảng thí nghiệm được lựa chọn để tiến hành tối ưu hóa.

Tối ưu hóa điều kiện enzyme hóa sử dụng chiết xuất protein từ bã sữa gạo

Mô hình tối ưu điều kiện enzyme hóa bằng protease thương phẩm chiết xuất protein từ bã sữa gạo đã làm sạch tinh bột và carbohydrate được thực hiện sử dụng phương pháp thiết kế bề mặt RSM, mô hình I-optimal được xây dựng bằng phần mềm Desigh Expert 13 cho 6 yếu tố ảnh hưởng gồm nồng độ enzyme protease, pH, nhiệt độ enzyme hóa, nồng độ muối vô cơ và thời gian enzyme hóa và hàm đáp ứng là hiệu suất chiết xuất

protein gạo. Từ ma trận thực nghiệm được xây dựng, có 38 thí nghiệm được thiết lập và kết quả của mỗi thí nghiệm được tính theo mô hình phương trình bậc 2 nhằm xác định mức độ ảnh hưởng tương ứng đối với hàm đáp ứng là hiệu suất chiết xuất protein gạo cũng như đánh giá mức độ ảnh hưởng của các yếu tố ảnh hưởng và tương tác của chúng trong quá trình enzyme hóa.

2.2.2. Phương pháp phân tích

Phương pháp xác định mức độ thủy phân DH (%)

Mức độ thủy phân DH được xác định theo phương pháp của Nielsen và cộng sự (2001)[13]. 0.4ml mẫu được bổ sung 3ml dung dịch OPA (7.62g di Na tetraborate + 200mg SDS + 176 mg DTT

+ 160mg OPA) sau đó trộn đều bằng máy vortex. Mẫu thí nghiệm được ủ 2 phút ở nhiệt độ phòng sau đó đo mật độ quang tại 340 nm. Mức độ thủy phân DH được xác định theo công thức:

$$H (\%) = \frac{h \times 100}{h_{\text{tot}}} \quad \text{SerineNH}_2 = \frac{(\text{OD mẫu} - \text{OD blank})}{(\text{OD Standard} - \text{ODblank})} * 0.9516 * 0.1 * 100$$

$h = (\text{serine-NH}_2 - \beta) / \alpha$ megv/g protein mẫu thí nghiệm; $\alpha = 0,970$ và $\beta = 0,342$ đối với protein thực vật; $h_{\text{tot}} = 7,8$ đối

với protein thực vật; X: Khối lượng mẫu phân tích (g); P: hàm lượng protein có trong mẫu phân tích (%).

Phương pháp xác định hàm lượng protein

Hàm lượng protein trong mẫu bã sữa gạo trước và sau thí nghiệm được xác định bằng phương pháp Kjeldahl theo quy trình của Hamada và cộng sự (1999)[5] với hệ số $n = 5.95$. Hàm lượng protein trong dịch thủy phân bã sữa gạo trước và sau thí nghiệm được xác định bằng phương pháp Bradford theo quy trình của Jones và cộng sự (1989) [14]. Hiệu suất chiết xuất protein H (%) được tính theo công thức sau: $H (\%) = (\text{Pd} -$

$\text{Pe}) / \text{Ps} * 100$. Trong đó Pd là hàm lượng protein trong dịch sau thí nghiệm (%); Pe là hàm lượng protein của enzyme sử dụng thí nghiệm (%); và Ps là hàm lượng protein ban đầu của mẫu phân tích (%).

Phương pháp xác định độ ẩm

Độ ẩm của mẫu thí nghiệm được xác định bằng thiết bị phân tích ẩm nhanh Ohaus MB120.

Phương pháp điện di SDS-PAGE xác định cấu hình protein

Cấu hình protein mẫu thí nghiệm được xác định bằng phương pháp điện di polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) theo quy trình của Amagliani và cộng sự (2017) [15]. 25 μ l mẫu thí nghiệm được trộn với buffer gồm 0,3M Tris-HCl, 5% SDS, 50% glycerol và 100mM DTT. Sau khi trộn đều bằng thiết bị vortex, mẫu được gia nhiệt 4 phút tại 100 °C trong 5 phút sau đó ly

tâm tại điều kiện 10.000 rpm trong 30 giây. Mẫu sau khi chuẩn bị được chuyển lên thiết bị điện di Bio-Rad mini Protean 3 system với thuốc nhuộm là Coomassie Brilliant Blue R-250. Chất mồi có khối lượng phân tử từ 10 đến 100 kDa được chạy đồng thời cùng mẫu phân tích trên cùng bản gel để xác định cấu hình trọng lượng phân tử của protein mẫu thí nghiệm.

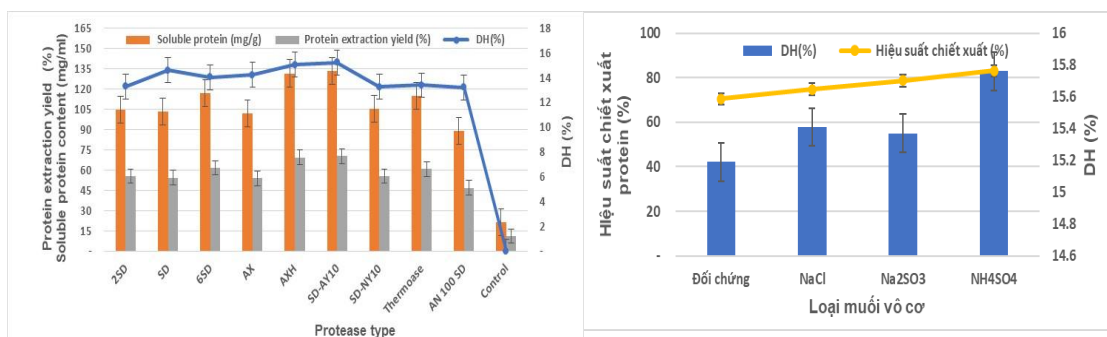
2.4. Phương pháp thống kê

Kết quả thí nghiệm được tính toán giá trị trung bình, độ lệch chuẩn bằng phần mềm Microsoft Excel 365. Kết quả xử lý thống kê One way ANOVA và so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức

trong cùng một thí nghiệm sử dụng phần mềm SPSS v 29, phép thử Duncan ($p < 0.05$). Các số liệu tối ưu hóa và mô hình tối ưu hóa được xây dựng và xử lý bằng phần mềm Design-Expert v13.

III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của loại enzyme protease và muối vô cơ đến hiệu suất chiết xuất protein từ bã sữa gạo



Hình 1. Biểu đồ chỉ ảnh hưởng của loại enzyme protease và muối vô cơ tới hiệu suất chiết xuất protein

Mục đích của nghiên cứu này là khảo sát khả năng phân giải liên kết giữa protein và các cấu phần khác trong bã sữa gạo đã loại tinh bột và carbohydrate. Thí nghiệm được tiến hành trên 9 enzyme protease thương mại của Amano enzyme. Kết quả thí nghiệm được đánh giá qua hiệu suất chiết xuất protein và mức độ thủy phân DH, được trình bày ở Hình 1A.

Kết quả nghiên cứu thu được cho thấy giá trị DH và hiệu suất chiết xuất protein bã sữa gạo trong mẫu thí nghiệm thay đổi tùy theo loại enzyme protease được khảo sát trong 60 phút tại điều kiện thủy phân protease khuyến nghị của nhà sản xuất. Mức độ thủy phân có giá trị cao nhất tại các mẫu thí nghiệm lần lượt là SD-AY10 > AXH > SD trong khi hiệu suất chiết xuất protein có giá trị cao nhất tại các mẫu thí nghiệm sử dụng enzyme lần lượt là SD-AY10 > AXH > 6SD. Nguyên nhân chính có thể do tính đặc hiệu của enzyme và sự tạo thành peptide trong dịch thủy phân có thể gây ức chế ngược enzyme protease. Từ các kết quả thu được, enzyme protin “Amano” SD-AY10 được lựa chọn sử dụng trong các nghiên cứu tiếp theo. Một số nghiên cứu

đáng chú ý về ứng dụng muối vô cơ trong chiết xuất protein này gồm nghiên cứu của Hamada và cộng sự (1999) [5], Gerzhova và cộng sự (2016) [16] và Toàn và cộng sự (2017)[11] cho thấy sự có mặt của hợp chất cải thiện hiệu suất chiết xuất protein.

Từ các nghiên cứu được công bố, nghiên cứu tiến hành khảo sát ảnh hưởng của muối vô cơ đối với hiệu suất chiết xuất protein gạo gồm $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl và Na_2SO_3 với nồng độ ban đầu 1%. Kết quả được trình bày ở Hình 1B. Từ kết quả thu được, hiệu suất trích ly protein tăng khi môi trường thủy phân bổ sung muối vô cơ với giá trị lần lượt là $\text{NaCl} < \text{Na}_2\text{CO}_3 < \text{NH}_4\text{SO}_4$. Mức độ thủy phân DH tăng khi môi trường enzyme hóa bổ sung muối vô cơ so với mẫu đối chứng, trong đó, NH_4SO_4 cho giá trị cao nhất trong các mẫu thí nghiệm. Kết quả này tương đồng với các công bố của Hamada và cộng sự (1999), Zhao và cộng sự (2021) và Toàn và cộng sự (2017) [5, 12, 17]. Nguyên nhân có thể do sự có mặt của muối vô cơ tại nồng độ khảo sát làm thay đổi hằng số điện môi của dung dịch và mức độ tương tác điện từ trên bề mặt protein nguyên liệu, kích thích phản

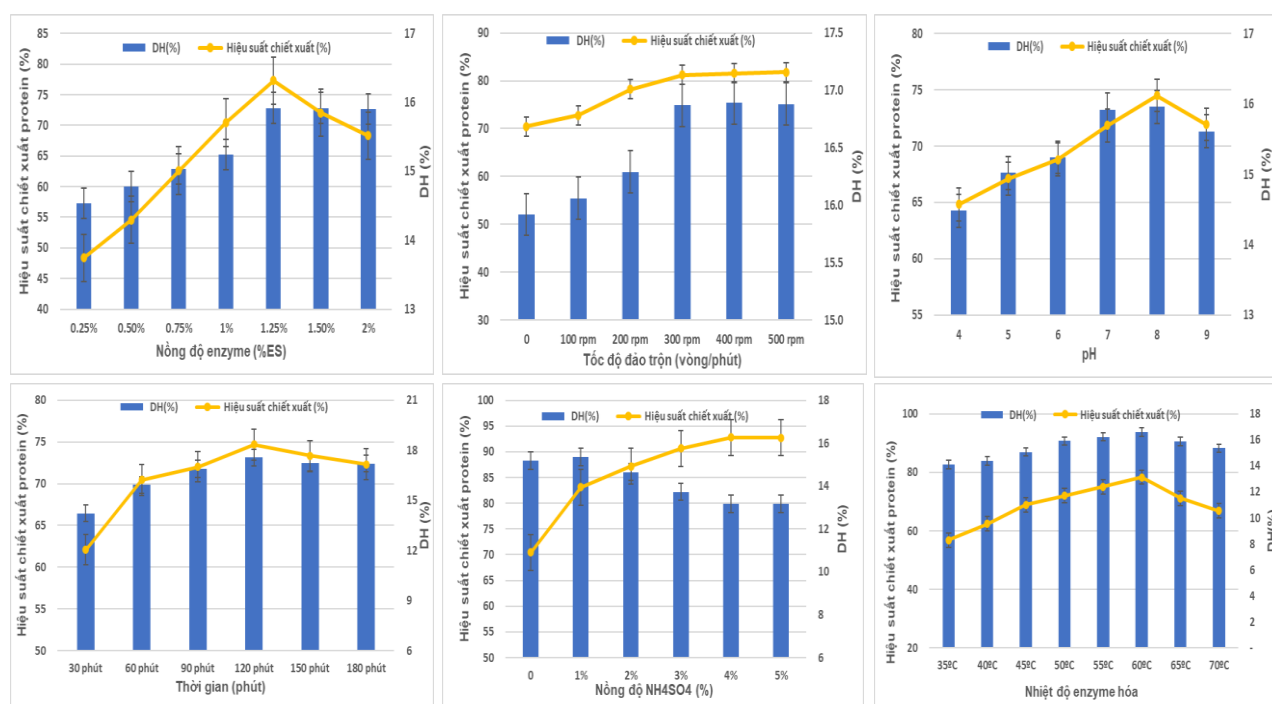
ứng thủy phân cũng như tăng hiệu suất trích xuất protein. Từ kết quả thu được,

3.2. Ảnh hưởng của các điều kiện enzyme hóa đến hiệu suất chiết xuất protein từ bã sữ

Với mục đích tối ưu hóa điều kiện thủy phân bằng protease nhằm chiết xuất protein từ bã sữ gạo, các thí nghiệm đơn tuyến được tiến hành nhằm xác định tâm thí nghiệm và khoảng thí nghiệm sử dụng trong mô hình tối ưu. Các yếu tố

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

ảnh hưởng được khảo sát gồm: pH, nhiệt độ, nồng độ enzyme, thời gian thủy phân, tốc độ khuấy và nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bổ sung. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở Hình 2.



Hình 2: Biểu đồ chỉ ảnh hưởng của điều kiện enzyme hóa tới hiệu suất chiết xuất protein

Từ kết quả thu được, enzyme SD-AY10 cho thấy có thể hoạt động ổn định tại dải pH từ trung tính đến hơi kiềm (7-9), nhiệt độ từ 50-70°C và trong môi trường bổ sung đến 5% muối vô cơ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Kết quả này tương đồng với khuyến nghị về enzyme protin "Amano" SD-AY10 do công ty Amano- Nhật Bản cung cấp: là enzyme kiềm tính có nguồn gốc từ *Bacillus licheniformis*, ổn định trong môi trường từ trung tính đến kiềm, có khả năng hoạt động ổn định trong môi trường có các chất tạo chelate như EDTA hoặc polyphosphoric acid. Hiệu suất chiết xuất protein và mức độ thủy

phân DH của các mẫu thí nghiệm cho thấy các chỉ số này thay đổi có ý nghĩa khi pH môi trường tăng từ 4-8, nồng độ enzyme tăng từ 0,25%ES đến 1,25%ES, thời gian thủy phân tăng từ 30 phút đến 120 phút và nồng độ muối vô cơ bổ sung tăng từ 0-4%. Kết quả nghiên cứu tương đồng với công bố khoa học của một số tác giả khác nghiên cứu chiết xuất protein trên nguyên liệu giàu protein hoặc protein từ gạo, cám gạo như Hamada và cộng sự (2017), Toàn và cộng sự (2017) và Zhao và cộng sự (2021) [5,12,17]. Khi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bổ sung vào môi trường enzyme hóa tăng từ 1

đến 5%, mức độ thủy phân DH của enzyme giảm tuyến tính do muối vô cơ gây bất lợi đến hoạt động của enzyme. Tuy nhiên, sự có mặt của muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tạo môi trường salting-out, thúc đẩy tốc độ và mức độ hòa tan của protein trong nguyên liệu ra môi trường thủy phân, do đó hiệu suất chiết

xuất protein vẫn tăng tuyến tính theo nồng độ bổ sung của muối này. Từ các kết quả khảo sát, tâm thí nghiệm và khoảng thí nghiệm được lựa chọn để tiến hành tối ưu hóa điều kiện enzyme hóa chiết xuất protein gạo bởi enzyme SD-AY10 (Bảng 1).

Bảng 1. Các yếu tố ảnh hưởng

Các yếu tố	Khoảng biến thiên	
	Mức trên	Mức dưới
Nồng độ enzyme (%ES)	1	1,5
pH	7	9
Nhiệt độ ($^{\circ}\text{C}$)	55	65
Tốc độ đảo trộn (vòng/phút)	200	400
Nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bổ sung (%)	2	3
Thời gian (phút)	90	150

3.3. Tối ưu hóa điều kiện enzyme hóa bằng protease đến hiệu suất chiết xuất protein từ bã sữa gạo

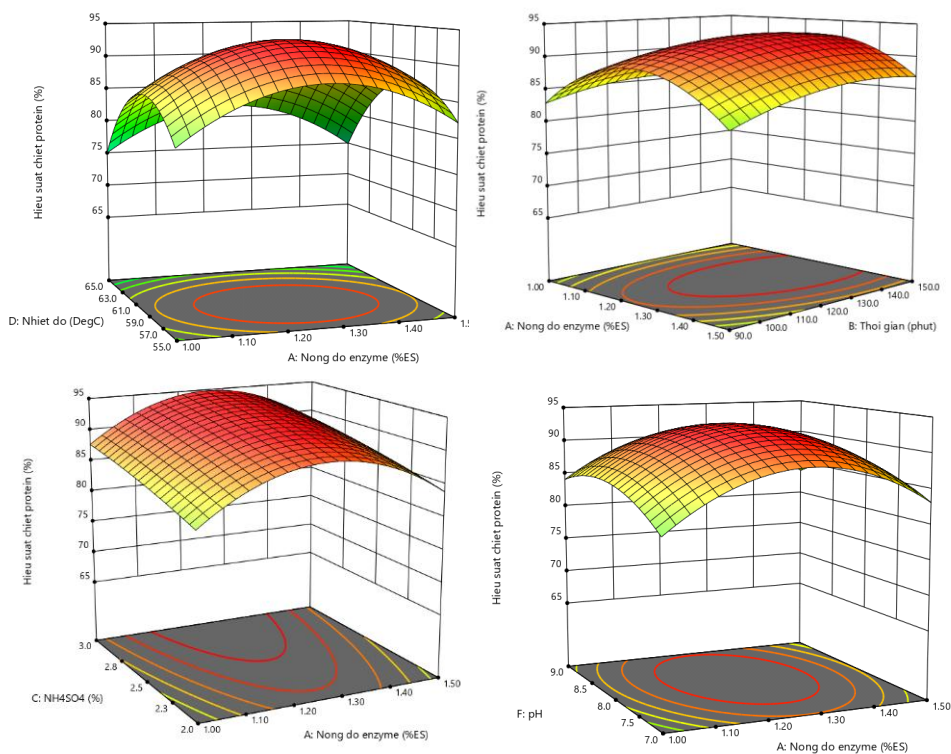
Tối ưu hóa điều kiện chiết xuất protein từ bã sữa gạo đã làm sạch tinh bột và carbohydrate sử dụng enzyme protease thương phẩm protin “Amano” SD-AY10 của Amano- Nhật Bản được xây dựng bằng phương pháp đáp ứng bề mặt, mô hình I-optimal sử dụng phần mềm Design-Expert 13. Các yếu tố ảnh hưởng sử dụng trong mô hình gồm: nhiệt độ, nồng độ enzyme, pH, tốc độ đảo trộn, nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và thời gian, hàm đáp ứng là hiệu suất chiết xuất

protein. Ma trận thí nghiệm gồm 38 thí nghiệm có kết quả thực nghiệm tiệm cận với kết quả mô hình dự đoán. Hiệu suất chiết xuất protein thay đổi đáng kể tùy vào các điều kiện thí nghiệm, từ 66% đến 91% chứng tỏ các yếu tố ảnh hưởng có ảnh hưởng đáng kể đến hàm đáp ứng này. Bảng phân tích hồi quy Anova đánh giá mối tương quan giữa các yếu tố ảnh hưởng và hàm đáp ứng được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Phân tích phương sai Anova của mô hình chiết xuất protein từ bã sữa gạo

Mô hình	F-value	p-value	Hệ số hồi quy
	34,21	< 0.0001	92.96
A-Nồng độ enzyme	1,82	0,21	0,46
B-Thời gian	20,44	0,00	1,59
C- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	52,81	< 0,0001	2,32
D-Nhiệt độ	93,98	< 0,0001	- 3,13
E-Tốc độ khuấy	54,56	< 0,0001	2,54
F-pH	7,98	0,02	0,92
AB	2,42	0,15	0,76
AC	0,08	0,79	- 0,11

AD	1,33	0,28	- 0,50
AE	0,14	0,71	0,17
AF	1,97	0,19	- 0,67
BC	4,10	0,07	- 0,87
BD	0,67	0,43	- 0,37
BE	0,15	0,71	- 0,18
BF	1,16	0,31	- 0,55
CD	4,87	0,05	- 0,86
CE	5,87	0,04	- 0,99
CF	0,27	0,61	0,21
DE	0,65	0,44	- 0,33
DF	0,81	0,39	- 0,38
EF	0,95	0,35	- 0,40
A ²	95,68	< 0,0001	- 6,79
B ²	10,71	0,01	- 1,99
C ²	0,54	0,48	- 0,47
D ²	140,15	< 0,0001	- 7,98
E ²	1,74	0,22	- 0,87
F ²	20,01	0,00	- 3,19
R ²	0,9893		



Hình 4: Sự tương quan giữa các yếu tố ảnh hưởng và hàm đáp ứng mô hình chiết xuất protein bã sữa gạo

Theo Bảng 3, kết quả phân tích phương sai Anova mô hình chiết xuất protein từ bã sữa gạo cho thấy giá trị p của mô hình < 0,001, giá trị F = 34.21 chứng tỏ mô hình có ý nghĩa thống kê. Trong điều kiện thực hiện tối ưu hóa, các yếu tố ảnh hưởng gồm thời gian, nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, nhiệt độ, tốc độ đảo trộn, pH, giá trị bậc 2 của nồng độ enzyme, thời gian, nhiệt độ, pH và tương tác giữa nồng độ NH_4SO_4 và tốc độ đảo trộn có ảnh hưởng có ý nghĩa đối với hiệu suất chiết xuất protein. Đối với hệ số hồi quy, nhiệt độ có ảnh hưởng âm trong khi các yếu tố ảnh hưởng khác gồm nồng độ enzyme, thời gian enzyme hóa, nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, tốc độ khuấy và pH đều có ảnh hưởng dương đối với hàm đáp ứng. Hệ số xác định R^2 có giá trị là 0,9898 thể hiện có 98,98% số liệu phù hợp với dữ liệu của mô hình dự đoán.

Biểu đồ biểu đạt mối tương quan giữa các yếu tố ảnh hưởng và hàm đáp ứng được trình bày ở Hình 4. Biểu đồ biểu thị sự tương quan và mức độ ảnh hưởng của các yếu tố ảnh hưởng đến hàm đáp ứng cho thấy hàm đáp ứng hiệu suất chiết xuất protein chịu ảnh hưởng lớn tương tác giữa nồng độ enzyme với pH, nhiệt độ thủy phân và thời gian enzyme hóa. Trong dải pH từ 7-9, hàm đáp ứng có giá trị cao nhất trong dải pH từ 7,5 đến 8,5. Nguyên nhân có thể do tính đặc hiệu của enzyme SD-AY10 là enzyme protease kiềm tính, thúc đẩy khả

năng hòa tan của protein trong nguyên liệu ra môi trường trích ly. Đối với thời gian enzyme hóa, biểu đồ tương quan cho thấy hàm đáp ứng tăng nhẹ khi thời gian tăng từ 100 phút đến 150 phút. Hàm đáp ứng tăng tuyến tính theo nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tăng từ 2 đến 3% do tạo hiệu ứng salting-out, thay đổi hằng số điện môi theo hướng thúc đẩy sự hòa tan protein vào dung dịch thủy phân. Tại dải nhiệt độ từ 55 đến 60°C, hiệu suất chiết xuất protein đạt giá trị cao nhất chứng tỏ dải nhiệt độ này tối thích cho hoạt động phân giải liên kết giữa protein và các cơ chất khác trong nguyên liệu, giải phóng protein ra dịch thủy phân. Các kết quả này phù hợp với các kết quả đã công bố của nhiều tác giả nghiên cứu về chiết xuất protein bằng enzyme protease thương phẩm trên một số loại cơ chất như khô dừa, cám gạo, bã gạo, phụ phẩm thủy sản [5,13,16,17,18].

Phương trình hồi quy bậc 2 biểu thị mức độ ảnh hưởng mối tương quan giữa các yếu tố ảnh hưởng và hàm đáp ứng : hiệu suất chiết xuất protein như sau:

$$\begin{aligned} \text{Hiệu suất chiết xuất protein (\%)} = & +92.96+0.4634A+1.59B+2.32C- \\ & 3.13D+2.54E+0.9232F+0.7599AB- \\ & 0.1146AC-0.5039AD+0.1709AE- \\ & 0.6655AF-0.8707BC-0.3735BD- \\ & 0.1751BE-0.5532BF-0.8640CD- \\ & 0.9904CE+0.2101CF-0.3265DE- \\ & 0.3807DF-0.3970EF-6.79A^2-1.99B^2- \\ & 0.4724C^2-7.98D^2-0.8739E^2-3.19F \end{aligned}$$

Bảng 3. So sánh điều kiện enzyme hóa của 2 loại mô hình đưa ra.

Điều kiện enzyme hóa	Mô hình đề xuất	Thực nghiệm
Nồng độ enzym SD-AY10 (%ES)	1,247	1,25
Thời gian enzym hóa (phút)	117,171	120
Nồng độ NH_4SO_4 (%)	2,984	3
Nhiệt độ ($^{\circ}\text{C}$)	60,646	60
Tốc độ đảo trộn (vòng/phút)	210,462	200
pH	7,925	8
Hiệu suất chiết xuất protein (%)	91,763	90,18 ± 0,04

Từ kết quả thực nghiệm trên điều kiện chiết xuất protein từ bã sữa gạo mô hình tối ưu đề xuất, nhóm nghiên cứu đã tiến hành 3 mẻ thực nghiệm quy mô 500g nguyên liệu/mẻ. Kết quả thực nghiệm cho hiệu suất chiết xuất protein trung bình đạt 90,18%, khối lượng protein trong dung dịch đạt 19,11%DS.

3.4. Đánh giá thành phần protein trong sản phẩm protein thủy phân từ bã sữa gạo

Thành phần của dịch thủy phân protein gạo thu nhận từ nghiên cứu được đánh giá cấu hình theo phương pháp điện di SDS-PAGE sử dụng gel Sephadex G-100, marker có dải từ 10 đến 100kDa. Sản phẩm của đề tài được

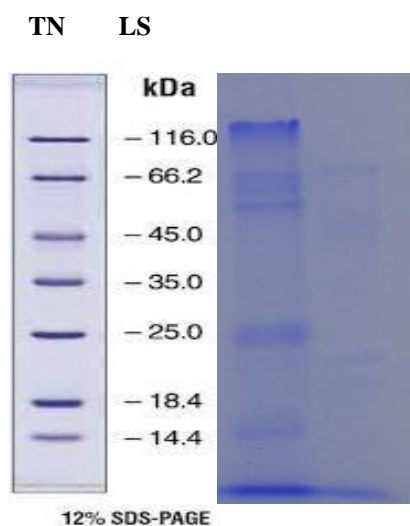
Kết quả phân tích điện di SDS trên mẫu dịch gạo thủy phân từ nghiên cứu (TN) và quy trình sản xuất của Lasuco (LS) cho thấy cả hai mẫu protein thủy phân đều có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 116 kDa đến 14,4 kDa. Mẫu TN có hàm lượng protein là 19,1%, với hiệu suất chiết xuất protein đạt 90,1%, trong khi mẫu Lasuco (LS) chứa 4,88% protein, với hiệu suất chiết xuất là 42,2%. Mẫu TN chủ yếu bao gồm các protein có kích thước 14,4 kDa, 25 kDa, từ 50 đến 66,2 kDa và 116 kDa. Ngược lại, mẫu LS chủ yếu chứa protein có kích thước 18,4 kDa và từ 50 đến 66,2 kDa. Những kết quả này chứng minh rằng quy trình chiết xuất protein được tối ưu hóa trong nghiên cứu tạo ra lượng lớn protein có trọng lượng phân tử thấp, có tiềm năng ứng dụng trong nhiều ngành công nghiệp phục vụ con người.

IV. KẾT LUẬN

Ứng dụng enzyme thương mại protin “Amano” SD-AY10 của công ty Amano-Nhật bản trong chiết xuất protein từ bã sữa gạo đã làm sạch tinh bột và carbohydrate mang lại hiệu suất chiết xuất đạt 90,1%, hàm lượng protein trong

Kết quả này tiệm cận với số liệu mà mô hình dự đoán. Sự sai biệt giữa số liệu thực tế và số liệu của mô hình do điều kiện thiết bị thực tế, thao tác và ảnh hưởng thực tế có khác biệt của enzyme SD-AY10 khi ứng dụng thủy phân bã sữa gạo, chiết xuất protein.

so sánh với dịch thủy phân protein gạo được sản xuất theo quy trình của Hùng và cộng sự (2022)[10] trên cùng loại nguyên liệu. Kết quả đánh giá được trình bày ở Hình 5:



Hình 5. Hình điện di SDS-PAGE mẫu dịch protein gạo thủy phân.

TN: Mẫu thí nghiệm LS: mẫu theo quy trình LASUCO

dịch thủy phân đạt 19,1% tại điều kiện tối ưu: nồng độ enzyme SD-AY10 1,25% ES, nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3%, nhiệt độ thủy phân 60°C, tốc độ đảo trộn 200 vòng/phút, pH 8 và thời gian enzyme hóa là 120 phút. Phân tích SDS-page của

sản phẩm cho thấy hàm lượng peptide phân tử lượng dưới 100 kDa cao, chứng tỏ sản phẩm có chất lượng và tính chức năng cao, phù hợp với các ứng dụng trong ngành sản xuất thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm. Kết quả của nghiên

cứ cũng đồng thời mở ra cơ hội cho việc phát triển các sản phẩm phụ trợ khác từ nguồn nguyên liệu lúa, gạo, hỗ trợ sự phát triển của ngành công nghiệp tái chế và sản xuất thực phẩm bền vững.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này là một phần công việc của Dự án Hợp tác nghiên cứu mã số 2023-1(Reference number”5F75Ra1212) giữa Công ty Amano Enzyme Inc., Nhật Bản và Viện Công nghiệp Thực phẩm, Bộ Công thương, kinh phí tài trợ nghiên cứu bởi Amano Enzyme Inc., Nhật Bản.

Tài liệu tham khảo

1. Futuremarketinsights.com. Plant-based Milk Market. 2024.
2. Roy T, et al. Rice protein: Emerging insights of extraction, structural characteristics, functionality, and application in the food industry. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2023;105581.
3. Zheng L, et al. Reconstituted rice protein: The raw materials, techniques and challenges. *Trends in Food Science & Technology*, 2023.
4. Charoen R, et al. Production of rice bran protein hydrolysates from traditional Thai rice bran (Plai-Ngahm-Prachinburi). *Int Food Res J*. 2017;24:2304-2311.
5. Hamada JS. Use of proteases to enhance solubilization of rice bran proteins. *Journal of Food Biochemistry*, 1999;23:307-321.
6. Hanmoungjai P, Pyle DL, and Niranjan K. Enzyme-assisted water extraction of oil and protein from rice bran. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*. 2002;77(7):771-776.
7. Morita T and Kiriyama S. Mass production method for rice protein isolate and nutritional evaluation. *Journal of food science*. 1993; 58(6):1393-1396.
8. Tang S, Hettiarachchy NS, and Shellhammer TH. Protein extraction from heat-stabilized defatted rice bran. 1. Physical processing and enzyme treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002;50(25):7444-7448.
9. Vo HT, et al. Optimization of Protein Hydrolysate Production from Defatted Rice Bran and Refining Process. 2017.
10. Lê Việt Hùng and H.Q. Tuấn, Nghiên cứu thu hồi protein trong bã gạo của quá trình sản xuất sữa gạo tại nhà máy Lavina food Công ty cổ phần mía đường Lam Sơn. Viện Công nghệ sinh học và công nghệ thực phẩm. 2022, Đại học Bách Khoa Hà Nội: Đại học Bách Khoa Hà Nội.
11. Jiang Y, et al. Effects of salting-in/out-assisted extractions on structural, physicochemical and functional properties of *Tenebrio molitor* larvae protein isolates. *Food chemistry*. 2021;338:128158.
12. Pham T, et al. Effects of pH and Salt Concentration on Functional Properties of Pumpkin Seed Protein Fractions. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2017;41.
13. Nielsen, PM, D. Petersen, and C. Dambmann, Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *Journal of Food Science*. 2001; 66(5):642-646.
14. Jones CG, Daniel Hare J, and Compton SJ. Measuring plant protein with the Bradford assay : 1. Evaluation and standard method. *J Chem Ecol*. 1989;15(3):979-992.
15. Amagliani L, et al. Composition and protein profile analysis of rice protein ingredients. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2017;59:18-26.
16. Gerzhova A, et al. Study of total dry matter and protein extraction from canola meal as affected by the pH, salt addition and use of zeta-potential/turbidimetry analysis to optimize the extraction conditions. *Food chemistry*. 2016;201:243-252.
17. Zhao Q, et al. Enzymatic hydrolysis of rice dreg protein: effects of enzyme type on the functional properties and antioxidant activities of recovered proteins. *Food chemistry*. 2012;134 3:1360-1367.
18. Charoen R, Tipkanon S, and Savedboworn W. Production of rice bran protein hydrolysates from traditional Thai rice bran (Plai-Ngahm-Prachinburi). 2017.