NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG ENZYM TRONG SẢN XUẤT BIA

Nguyễn Thị Cẩm Vi
Khoa Khoa Học Ứng Dụng, Trường Đại học Tôn Đức Thắng

TÓM TẮT

Bia là một loại thức uống phổ biến trên thế giới. Để giảm giá thành sản phẩm, các công ty bia ở Việt Nam đang tìm cách nâng cao lượng thế liệu gạo nhưng vẫn đảm bảo chất lượng dịch nha. Nghiên cứu này khảo sát ứng dụng chế phẩm enzyme trong quá trình nấu để nâng cao lượng thế liệu gạo. Kết quả thí nghiệm đã xác định được các thô ng số tối ưu sau: tỷ lệ gạo 45%, nồng độ Termamyl 0,1%, nồng độ Neutrase 0,6%, thời tại nhiệt độ đạm hóa 22 phút. Dịch nha thu được có chất lượng đáp ứng được yêu cầu của quá trình lên men.

1. MỞ ĐẦU

Malt là nguyên liệu chính trong công nghệ sản xuất bia, tuy nhiên do phải nhập từ nước ngoài nên giá thành rất cao.Để giảm giá thành sản phẩm, hầu hết các nhà máy bia của nước ta và trên thế giới đã sử dụng một lượng nguyên liệu thay thế (chủ yếu là gạo) khá lớn, từ 20% trở lên.Khi sử dụng tỷ lệ thế liệu cao thì lượng enzym trong malt không đủ thủy phân các hợp chất cao phân tử như tinh bột, protein trong malt và thế liệu, cần phải bổ sung thêm các chế phẩm enzym. Chúng tôi thực hiện nghiên cứu ứng dụng các chế phẩm enzym amylase và proteasetrong quá trình nấu nhằm nâng cao tỷ lệ thế liệu gạo nhưng vẫn đảm bảo chất lượng dịch nha.

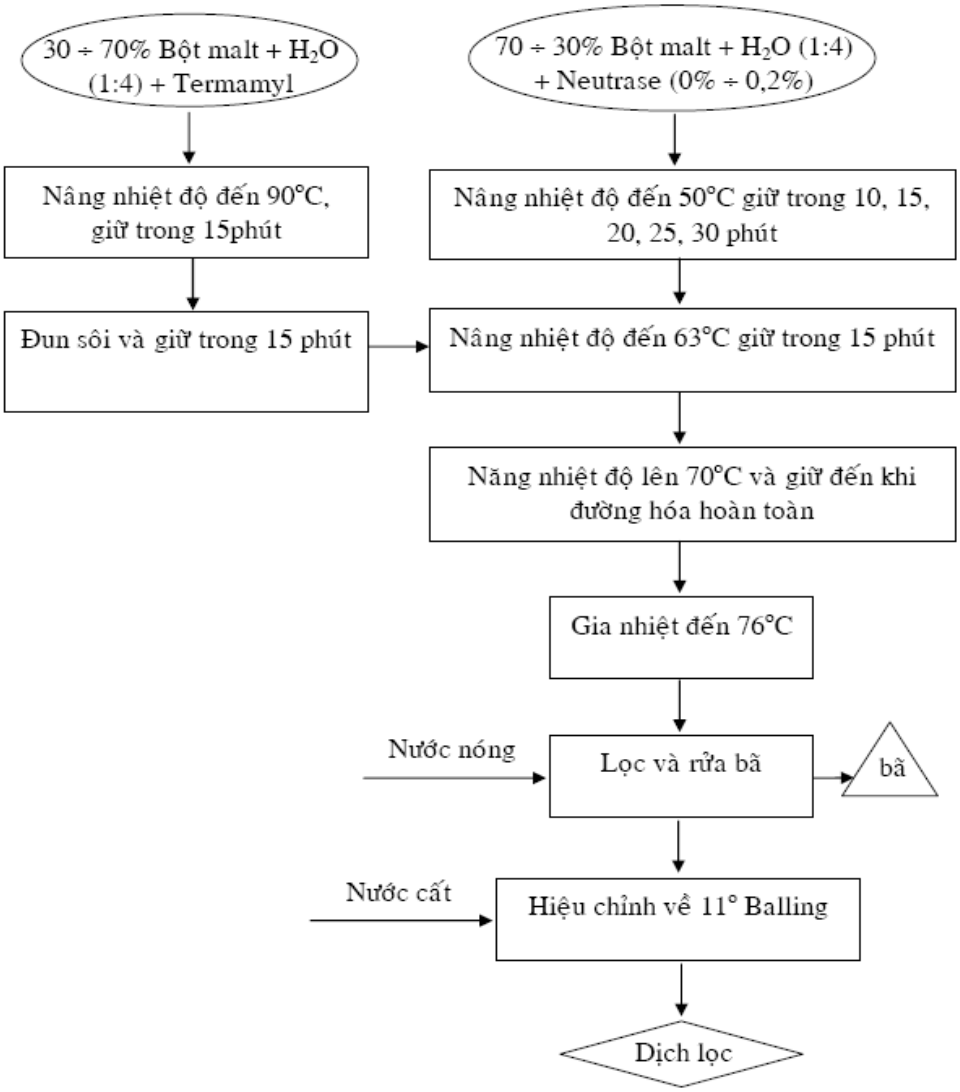
2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu

- Malt, Gạo, Houblon cao và viên.
- Chế phẩm enzym: Termamyl 120L (chứa α - amylase) và Neutrase 0,5L (chứa protease)
- Hoá chất: Ninhydrin (Merck), DNS (Merck), Glycine, Tatrat Na – K, Glucose, Fructose, Maltose, NaOH, …

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Sơ đồ nấu dịch nha từ hỗn hợp malt – gạo có sử dụng kết hợp chế phẩm Neutrase 0.5L và Termamyl 120L



2.2.2 Các phương pháp phân tích:
- Phương pháp DNS xác định hàm lượng đường khử.
- Phương pháp Ninhydrin xác định hàm lượng acid amin.
- Xác định thời gian đường hóa, độ trích ly.
- Phương pháp phân tích phương sai một yếu tố, phương pháp tối ưu hóa quy hoạch thực nghiệm.

3. KẾT QUẢ

3.1 Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình nấu dịch nha khi sử dụng kết hợp chế phẩm Termamyl và Neutrase:

Trong phần này chúng tôi tiến hành khảo sát các yếu tố: thay đổi tỷ lệ thế liệu, thay đổi nồng độ enzym, thay đổi thời gian dừng tại nhiệt độ tối ưu, dựa vào phương pháp

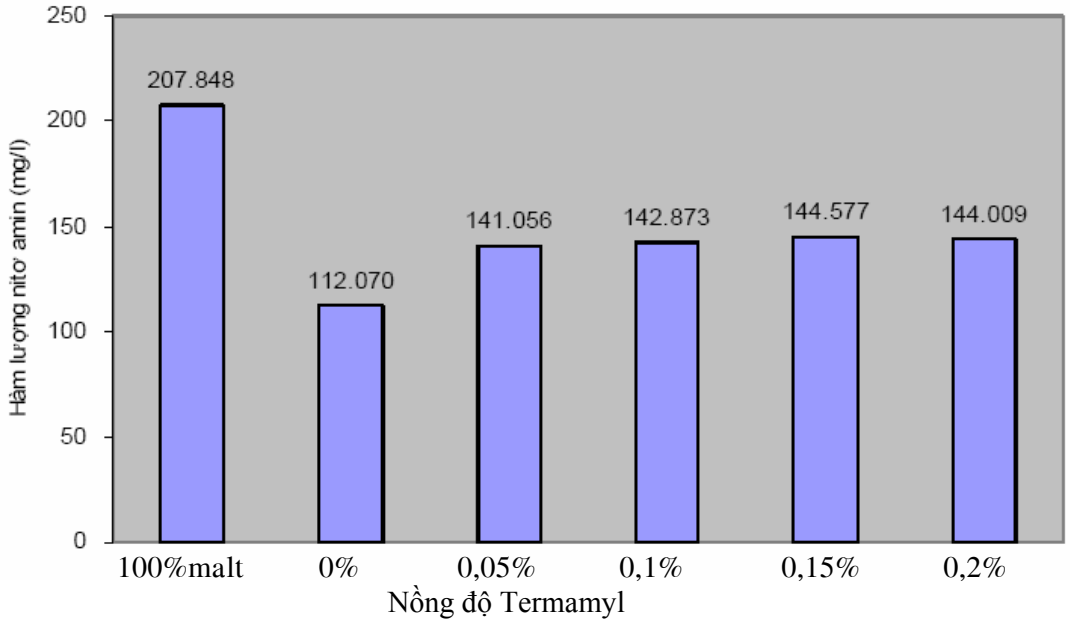
phân tích phương sai một yếu tố để đánh giá yếu tố nào ảnh hưởng nhiều đến chất lượng dịch nha. Tiến hành tối ưu hóa các yếu tố để tìm ra nồng độ sử dụng enzym thích hợp, tỷ lệ thế liệu cao và chất lượng dịch nha đạt yêu cầu.

3.1.1. Khảo sát sự ảnh hưởng của nồng độ Termamyl lên chất lượng dịch nha:

Chúng tôi cố định nồng độ Neutrase 0.2% và thay đổi nồng độ chế phẩm enzyme Termamyl từ 0.05% ÷ 0.2% để xem chất lượng dịch nha thay đổi như thế nào.

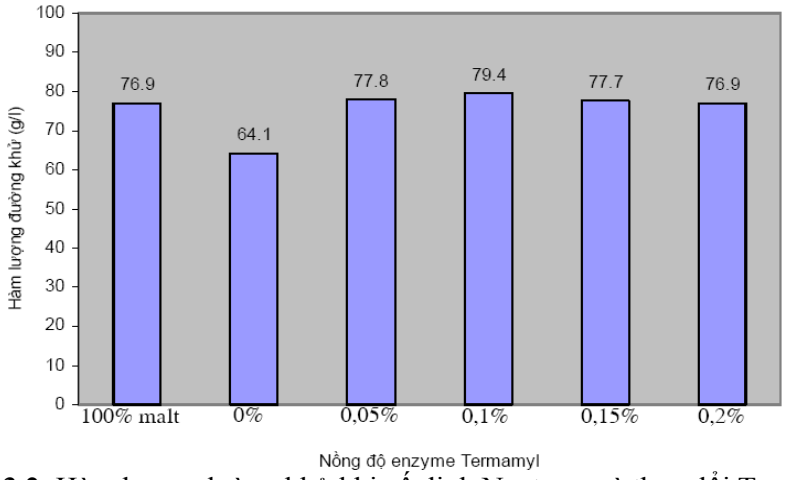
Bảng 3.1: Kết quả chỉ tiêu hóa lý của dịch nha khi sử dụng kết hợp chế phẩm Termamyl và chế phẩm Neutrase:

Chỉ tiêu / Mẫu	Thời gian đường hóa (ph)	Độ trích ly (%)	Hàm lượng nitơ amin (mg/l)	Hàm lượng đường khử (g/l)	pH
100% malt	5 ph	72.84%	207.848	76.9	5.82
60% malt+ 40% gạo	25ph	71.29%	112.070	64.1	5.95
Neutrase+0.05%Termamyl	15ph	73.75%	141.056	77.8	5.88
Neutrase+0.1% Termamyl	10ph	73.75%	142.873	79.4	5.89
Neutrase+0.15%Termamyl	10ph	76.21%	144.577	77.7	5.90
Neutrase+0.2% Termamyl	8ph	73.13%	144.009	76.9	5.88



Hình 3.1: Hàm lượng nitơ amin khi cố định Neutrase và thay đổi Termamyl

Hàm lượng nitơ amin tại các mẫu có sử dụng chế phẩm enzyme là như nhau. So với mẫu không sử dụng chế phẩm enzyme thì hàm lượng nitơ amin trong mẫu có sử dụng chế phẩm tăng 21%, thời gian đường hóa giảm 10 phút, nhưng so với mẫu 100% malt vẫn chưa đạt được sự tiệm cận, dù tăng nồng độ Termamyl đến mức tối đa vẫn không cải thiện được hàm lượng nitơ amin. Kết quả thể hiện rõ trên hình 3.1



Hình 3.2: Hàm lượng đường khử khi cố định Neutrase và thay đổi Termamyl

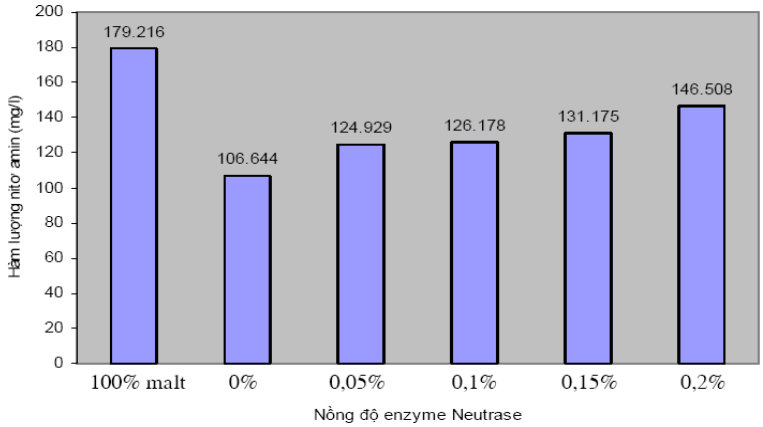
Đối với hàm lượng đường khử thì hiệu quả sử dụng Termamyl được nhận thấy rõ rệt, ngay từ nồng độ thấp nhất (0.05% Termamyl) lượng đường khử đã tăng cao, có phần trội hơn cả mẫu 100% (77.8 g/l > 76.9 g/l). Tuy nhiên khi tiếp tục tăng nồng độ Termamyl thì hàm lượng đường khử thay đổi không đáng kể, chỉ có thời gian đường hóa giảm. Qua đó sơ bộ có thể thấy việc thay đổi nồng độ Termamyl không ảnh hưởng nhiều đến quá trình nấu. Kết quả phân tích phương sai 1 yếu tố một lần nữa khẳng định điều này là đúng. Do đó chúng tôi quyết định khảo sát thêm việc kết hợp 2 loại chế phẩm này khi cố định nồng độ Termamyl là 0.1% và bắt đầu thay đổi nồng độ Neutrase để xem chất lượng dịch nha sẽ thay đổi ra sao hàm lượng nitơ amin có được cải thiện không, 2 loại chế phẩm này ảnh hưởng như thế nào lên chất lượng dịch nha.

3.1.2. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ Neutrase lên chất lượng dịch nha:

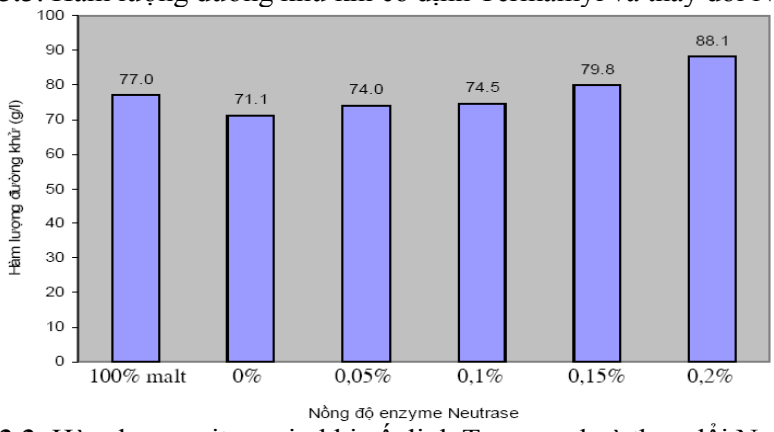
Bảng 3.2: Kết quả các chỉ tiêu hóa lý của dịch nha khi thay đổi nồng độ Neutrase - cố định nồng độ Termamyl.

Chỉ tiêu / Mẫu	Thời gian đường hóa (pH)	Độ trích ly (%)	Hàm lượng nitơ amin (mg/l)	Hàm lượng đường khử (g/l)	pH
100% malt	6 ph	72.84%	179.216	77.0	5.80
60% malt+ 40% gạo	25 ph	72.21%	106.644	71.1	5.85
0,1%Termamyl+0.05%Neutrase	15 ph	72.21%	124.929	74.0	5.88
0,1%Termamyl+0.1%Neutrase	9 ph	72.21%	126.178	74.5	5.89

0,1%Termamyl+0.15%Neutrase	8 ph	70.68%	131.175	79.8	5.86
0,1%Termamyl+0.2% Neutrase	6 ph	70.68%	146.508	88.1	5.88



Hình 3.3: Hàm lượng đường khử khi cố định Termamyl và thay đổi Neutrase



Hình 3.3: Hàm lượng nitơ amin khi cố định Termamyl và thay đổi Neutrase

Việc kết hợp hai chế phẩm enzyme này làm cho chất lượng dịch nha được cải thiện đáng kể. Do toàn bộ lượng malt đều trải qua giai đoạn đạm hóa tránh được sự thất thoát hàm lượng nitơ amin khi phải dùng malt lót. Thời gian đường hóa giảm 19 phút, hàm lượng nitơ amin tăng 27.21%, hàm lượng đường khử tăng 19.3% so với mẫu không có chế phẩm enzyme còn độ trích ly thì giảm nhẹ không đáng kể. Như vậy mẫu 0.1% Termamyl + 0.2% Neutrase có hàm lượng đường khử khá cao, cao hơn cả mẫu 100% malt, nhưng hàm lượng Nitơ amin của mẫu này vẫn còn thấp so với mẫu 100% malt.

Từ kết quả phân tích phương sai một yếu tố theo số liệu bảng 3.6 chúng tôi kết luận hàm lượng Nitơ amin và hàm lượng đường khử trong dịch nha phụ thuộc vào nồng độ chế phẩm Neutrase.

3.1.3. Khảo sát ảnh hưởng của dịch nha khi thay đổi tỉ lệ thế liệu:

Lấy kết quả từ thí nghiệm 3.1.2, mẫu 0.1% Termamyl + 0.2% Neutrase cho chất lượng dịch nha tốt nhất. Từ đó chúng tôi chọn cố định hai nồng độ này và tiến hành thay đổi tỉ lệ thế liệu từ 30% ÷ 70% để xem chất lượng dịch nha thay đổi thế nào.
Theo kết quả phân tích phương sai một yếu tố (bảng 3.6) chúng tôi kết luận rằng tỉ lệ thế liệu có ảnh hưởng đến chất lượng dịch nha.

Bảng 3.3: Kết quả chỉ tiêu hóa lý của dịch nha khi thay đổi tỉ lệ thế liệu

Chỉ tiêu / Mẫu	Thời gian đường hóa (pH)	Độ trích ly (%)	Hàm lượng nitơ amin (mg/l)	Hàm lượng đường khử (g/l)	pH
100% malt	6 ph	72.84%	187.507	76.5	5.80
70% malt	10 ph	70.68%	179.443	81.9	5.85
60% malt	12 ph	72.21%	148.779	79.2	5.88
50% malt	14 ph	73.13%	116.752	72.7	5.89
40% malt	25 ph	69.14%	93.129	68.3	5.86
30% malt	Không đường hóa hoàn toàn	69.45%	71.891	67.4	5.88

Khi tăng dần tỉ lệ thế liệu từ 30% - 70% sẽ làm hàm lượng nitơ amin giảm rõ rệt. Từ mẫu có lượng thế liệu thấp nhất đến mẫu có lượng thế liệu cao nhất giảm 60% (bảng 3.3). Nguyên nhân do trong gạo hàm lượng protein thấp hơn nhiều so với malt nên hàm lượng gạo càng nhiều thì hàm lượng protein hòa tan và acid amin càng giảm.
Còn đối với thành phần đường thì sự sụt giảm không đáng kể. Theo lý thuyết đường được tạo ra do phản ứng thủy phân tinh bột dưới tác động của enzyme amylase:

$(C_6H_{10}O_5)n + nH_2O = nC_6H_{12}O_6$

Lượng tinh bột trong gạo nhiều hơn trong malt, vậy thì ở các mẫu có tỉ lệ gạo thay thế càng cao thì hàm lượng đường tạo ra phải càng nhiều. Nhưng kết quả thực tế thì ngược lại, hàm lượng đường khử có chiều hướng giảm, từ 81.9 g/l giảm còn 67.4 g/l. Sỡ dĩ có hiện tượng này là do lượng enzyme trong malt và của chế phẩm Termamyl bổ sung không đủ để thủy phân hết lượng tinh bột để tạo thành các dextrin và đường lên men. Ở mẫu 70% gạo thay thế thì không thể đường hóa hoàn toàn do hàm lượng tinh bột quá nhiều nhưng lượng enzym ít.

3.1.4. Khảo sát chất lượng dịch nha khi thay đổi thời gian dừng tại nhiệt độ đạm hóa:

Tuy ở nồng độ 0.2% Neutrase lượng nitơ amin tạo thành là cao nhất nhưng vẫn chưa đạt được sự tiệm cận với mẫu 100% malt. Do đó chúng tôi tiến hành khảo sát tiếp yếu tố thời gian dừng tại giai đoạn đạm hóa để kiểm tra lượng đạm amin thay đổi ra sao.
Theo kết quả phân tích phương sai một yếu tố được trình bày ở bảng 3.6 thì thời gian dừng tại nhiệt độ đạm hóa có ảnh hưởng đến thành phần dịch đường, trong đó hai chỉ tiêu quan trọng là hàm lượng nitơ amin và hàm lượng đường khử đều tăng theo thời gian.

Bảng 3.4: Kết quả chỉ tiêu hóa lý của dịch nha khi thay đổi thời gian dừng tại nhiệt độ đạm hóa:

Chỉ tiêu / Mẫu	Thời gian đường hóa (ph)	Độ trích ly (%)	Hàm lượng nitơ amin (mg/l)	Hàm lượng đường khử (g/l)	pH
100% malt	6 ph	72.84%	187.507	76.5	5.80
10 ph	12 ph	70.68%	146.310	79.6	5.85
15 ph	10 ph	67.60%	151.190	80.1	5.88
20 ph	10 ph	69.14%	166.786	83.9	5,89
25 ph	10 ph	70.68%	172.976	86.0	5,86
30 ph	8 ph	70.68%	179.762	88.0	5,88

3.1.5 Kết quả phân tích phương sai một yếu tố:

Bảng 3.5:Hàm lượng nitơ amin khi cố định nồng độ Neutrase thay đổi nồng độ Termamyl

Maãu Noàng ñoä Termamyl	**1**	**2**	**3**
0.05	141.975	141.956	141.938
0.1	142.101	142.441	142.078
0.15	143.804	143.123	143.104
0.2	143.141	143.123	143.163

Ap dụng phương pháp phân tích phương sai một yếu tố, ta có kết quả sau:

SUMMARY

Groups	***Count***	***Sum***	***Average***	***Variance***
Row 1	3	425.8687	141.9562	0.000345
Row 2	3	426.6201	142.2067	0.041374
Row 3	3	430.0308	143.3436	0.159116
Row 4	3	429.4273	143.1424	0.000416

- ANOVA

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Between Groups	4.202467	3	1.400822	3.8424	0.000139	4.066181
Within Groups	0.4025	8	0.050313			
Total	4.604967	11				

- **Kết quả:**
- ***F < F crit*** nên nồng độ chế phẩm Termamyl không ảnh hưởng đến hàm lượng nitơ amin trong dịch nha.
- Tính toán tương tự ta có kết quả sau:

Bảng 3.6: Kết quả phân tích phương sai một yếu tố

Yếu tố	Ảnh hưởng đến	F	F *crit*	So sánh	Kết luận
Nồng độ Termamyl	Hàm lượng nitơ amin	3.84	4.07	F < F crit	Không ảnh hưởng
	Hàm lượng đường khử	3.85	4.07	F < F crit	Không ảnh hưởng
Nồng độ Neutrase	Hàm lượng nitơ amin	1325.22	4.07	F > F crit	Có ảnh hưởng
	Hàm lượng đường khử	644.76	4.07	F > F crit	Có ảnh hưởng
Tỷ lệ thế liệu	Hàm lượng nitơ amin	7617.62	3.48	F > F crit	Có ảnh hưởng
	Hàm lượng đường khử	1470	3.48	F > F crit	Có ảnh hưởng
Thời gian dừng tại nhiệt độ đạm hóa	Hàm lượng nitơ amin	1234.85	3.48	F > F crit	Có ảnh hưởng
	Hàm lượng đường khử	504.21	3.48	F > F crit	Có ảnh hưởng

3.2. Tối ưu hoá thực nghiệm theo đường dốc nhất:

Từ các kết quả khảo sát trên chúng tôi nhận thấy, nồng độ chế phẩm enzyme Neutrase, tỉ lệ thế liệu, thời gian dừng tại nhiệt độ đạm hóa có ảnh hưởng nhiều đến chất lượng dịch nha. Chúng tôi tiến hành tối ưu hoá ba yếu tố này để tìm ra phương án hiệu quả nhất cho quá trình nấu dịch nha, đem đến dịch nha có chất lượng tốt nhất.

Bảng 3.8: Kết quả thí nghiệm tối ưu

STT thí nghieäm	**Z_1 (kg)**	**Z_2 (ml/kg)**	**Z_3(ph)**	**y**
1	30	0.05	10	149.10
2	70	0.25	10	79.46
3	30	0.25	10	160.34
4	70	0.05	10	67.18
5	30	0.05	30	16.47
6	70	0.25	30	79.20
7	30	0.25	30	197.67
8	70	0.05	30	68.35
TN ở tâm 1	50	0.15	20	142.51

TN ở tâm 2	50	0.15	20	139.66
TN ở tâm 3	50	0.15	20	138.24

Tối ưu hóa quá trình nấu với 3 yếu tố ảnh hưởng là:
Z_1: tỉ lệ thí liệu
Z_2: Nồng độ enzim Neutrase
Z_3: Thời gian đường hóa
Số lần thí nghiệm: $N = 2^3 = 8$
Theo các biến số đã chọn thì phương trình hồi qui có dạng như sau:
$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3$
y: là đại lượng cần tối ưu (hàm lượng đạm amin)

Các hệ số

b_0	b_1	b_2	b_3	b_{12}	b_{13}	b_{23}	b_{123}
120.7	47.2	- 8.4	- 6.7	- 2.7	- 6.5	2.6	2.9

Thí nghiệm ở tâm

y_{01}	y_{02}	y_{03}	S_{th}^2	S_{th}	S_{bj}	t_{crit}
142.51	139.66	138.24	4.71	2.17	0.77	4.30

Các giá trị tính toán

	0	1	2	3	12	13	23	123
$b_{tính}$	120.72	- 47.17	8.45	6.70	- 2.66	- 6.48	2.57	- 2.92
t	157.28	61.46	11.00	8.73	3.47	8.44	3.35	3.81
$b_{nhận}$	120.72	- 47.17	8.45	6.70		- 6.48		

Phương trình hồi quy: $y^{\wedge} = 120{,}72 - 47{,}18x_1 + 8{,}45x_2 + 6{,}70x_3 - 6{,}48x_{13}$
Kiểm định mô hình

$S_{dư}^2$	F	p-value	F_{crit}
59.30	12.58	0.07	19.16

Từ bảng kết quả trên theo tiêu chuẩn Fisher, $F < F_{crit}$ nên phương trình hồi quy tìm được tương thích với thực nghiệm với mức ý nghĩa 95%.

TỐI ƯU HÓA THỰC NGHIỆM THEO ĐƯỜNG DỐC NHẤT

Các giá trị ở tâm phương án

Mức biến thiên	Z_1(kg)	Z_2(ml/kg)	Z_3(ph)
Mức thấp (+)	30	0.05	10

Mức cao (-)	70	0.25	30
Tâm phương án (Z_0)	50	0.15	20
Khoảng biến thiên	20	0.10	10

Tính hệ số K:

K_1	K_2	K_3
943.48	0.84	67.02

Chọn K_{max} để tính bước chuyển động của các yếu tố

δ_1	δ_2	δ_3
1	0.000895	0.071037

Chọn bước chuyển động

δ_1	δ_2	δ_3
5	0,01	2

Kết quả thực nghiệm tối ưu hóa theo đường dốc nhất

Kết quả tính tối ưu

	x_1	x_2	x_3	y
Tâm phương án	50	0.15	20	145
Hệ số b_j	- 47.1738	8.4464	6.7022	
Khoảng biến thiên	20	0.10	10	
Hệ số K	1072.162	0.282307	0	
Bước làm tròn	5	0.01	2	
TN 9	45	0.16	22	179.53
TN10	40	0.17	24	186.22
TN 11	35	0.18	26	190.76
TN 12	30	0.19	28	216.93

Từ kết quả TN 9, 10, 11, 12 chúng tôi chọn được điểm tối ưu với các thông số:

- Tỷ lệ gạo thay thế: 45%
- Nồng độ enzyme Neutrase: 0,16%
- Nồng độ enzyme Termamyl: 0,1%
- Thời gian dừng tại nhiệt độ tối ưu: 22 phút

Tại các thông số trên, chất lượng dicịch nha tương đối tốt (hàm lượng nitơ amin đạt 179,53 mg/l, hàm lượng đường khử đạt 78.9 g/l) phù hợp với yêu cầu dịch nha dung để lên men.

4. KẾT LUẬN

Trên cơ sở ma trận thực nghiệm, chúng tôi tìm được các thông số tối ưu cho quá trình nấu, chất lượng dịch nha thu được tốt đảm bảo cho quá trình lên men:

• Tỉ lệ gạo thay thế cao nhất : 45%

• Nồng độ enzyme Neutrase : 0.16%
• Nồng độ enzyme Termamyl : 0.1%
• Thời gian dừng tại nhiệt độ đạm hoá : 22 phút

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Bùi Ái, *Công nghệ lên men ứng dụng trong công nghệ thực phẩm*, NXB Đại học Quốc Gia Tp. HCM, **2003**.
[2]. Bùi Ai - Anh Thơ, *Kỹ thuật sản xuất bia*, Liên Hiệp Khoa học sản xuất công nghệ mới, **1990**.
[3]. Hà Duyên Tư (Chủ biên), *Quản lý và kiểm tra chất lượng thực phẩm*, Đại học Bách Khoa Hà Nội, **1996**.
[4]. Hồ Sưởng, *Công nghệ sản xuất bia*, NXB Khoa học kĩ thuật, Hà Nội, **1992**.
[5]. Nguyễn Đức Lượng (Chủ biên), *Công nghệ enzyme*, NXB Đại học Quốc Gia Tp.HCM, **2004**.
[6]. Nguyễn Cảnh, *Quy hoạch thực nghiệm*, Trường Đại học Quốc Gia Tp.HCM
[7]. Ngô Hồng Thư, *Kiểm nghiệm thực phẩm bằng phương pháp cảm quan*, NXB Khoa học kỹ thuật, **1989**.
[8]. Nguyễn Đình Thưởng – Nguyễn Thanh Hằng, *Công nghệ sản xuất và kiểm tra cồn etylic*, NXB Khoa học kỹ thuật, Hà Nội, **2000**.
[9]. Pgs,Pts Hoàng Đình Hoà, *công nghệ sản xuất malt và bia*, NXB Khoa học kỹ thuật, Hà Nội, **2002.**
[10]. Phạm Văn Sổ –Bùi Thị Như Thuận, *Kiểm nghiệm lương thực thực phẩm*, Nhà xuất bản khoa học và kĩ thuật, Hà Nội, **1975**.
[11]. Trương Thị Kim Thu, *Bài giảng tin học trong hoá học*, Trường Đại học bán công Tôn Đức Thắng.
[12]. Nguyễn Văn Mùi, *Thực hành hoá sinh học*, NXB Khoa học kĩ thuật.
[13]. Pgs,Ts Nguyễn Đức Lương – Nguyễn Chúc – Lê Văn Việt Mẫn, *Thực tập vi sinh vật học thực phẩm*, Trường Đại học Bách Khoa Tp.HCM.
[14]. *Tài liệu hướng dẫn kiểm tra các chỉ tiêu hóa lý của bia*, Công ty Bia Sài Gòn.
[15]. Wolfgang Kunze, *Technology Brewing and Malting*, Translated by Dr.Trevor Wainwright, London.
[6]. Các trang web:
www.vba.com.vn
www.novozymes.com
www.clubdoze.com/talks/malting.html

ABSTRACT

Beer is a popular beverage on over the world. Nowaday, in Viet Nam, all of company are trying to increase rice adjunct ratio in mashing. In this paper, we used α-amylase and protease enzymes in mashing to increase wort quality from mixture of malt and rice. Our results showed optimum characteristics: rice ratio 45%, Termamyl concentration 0,1%, Neutrase concentration 0,16%, protein hydrolasing time 22 minutes and wort quality is suitable for fermentation.