ẢNH HƯỞNG CỦA CHẾ ĐỘ CHẦN ĐẾN HOẠT ĐỘ CỦA ENZYME GÂY BIẾN MẦU TRONG QUẢ NHÃN LỒNG HƯNG YÊN

Nguyễn Thị Hạnh[1], Đinh Lê Khanh[2], Nguyễn Văn Hưng[1]

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu nhằm xác định ảnh hưởng của chế độ chần đến hoạt độ của enzyme polyphenoloxydase (PPO) và enzyme peroxidase (POD) gây hóa nâu quả nhãn lồng Hưng Yên (*Dimocarpus longan*) để từ đó xác định chế độ tiền xử lý thích hợp trước các công đoạn chế biến tiếp theo. Quả nhãn lồng Hưng Yên sau khi được thu hái ở độ chín thích hợp tiến hành chần ở các nhiệt độ 85°C, 90°C và 95°C trong thời gian 9 phút. Sau khi lựa chọn được thời gian và nhiệt độ thích hợp, đã tiến hành chần nhãn trong dung dịch axit citric ở pH 2,0-3,5 hoặc dung dịch $NaHSO_3$ nồng độ 0,1-0,3% và theo dõi sự thay đổi hoạt độ của 2 enzyme PPO và POD theo thời gian chần. Mẫu đối chứng là mẫu chần trong nước thường ở cùng nhiệt độ. Kết quả nghiên cứu cho thấy chần trong dung dịch axit citric có pH3 ở 90°C trong 5 phút làm mất hoạt tính của enzyme PPO và POD. Đặc biệt, nếu sử dụng tác nhân chần $NaHSO_3$ ở nồng độ 0,1% chỉ cần chần nhãn từ 3-4 phút cho kết quả tương tự.

Từ khóa: *Nhãn lồng, axit xitric, bisulfit natri ($NaHSO_3$), polyphenoloxydase, peroxidase.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây nhãn (*Dimocarpus longan*) thuộc họ Bồ hòn (Sapindaceae), là cây ăn quả được trồng phổ biến ở các nước cận nhiệt đới và nhiệt đới, đặc biệt là ở các nước thuộc khu vực châu Á. Ở Việt Nam, nhãn được trồng rộng khắp cả nước, một số tỉnh lựa chọn cây nhãn là cây ăn quả chủ lực như Bắc Giang, Hưng Yên, Tiền Giang,... với diện tích trồng và sản lượng lớn. Nhãn lồng Hưng Yên có quả to hơn các giống nhãn khác, khối lượng trung bình đạt 11-12 gam/quả, quả to khoảng 14-15 gam/quả. Quả chín ăn giòn và ngọt đậm.

Quả nhãn trong quá trình sơ chế biến và bảo quản để bị hóa nâu trong không khí. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra nguyên nhân do hoạt động của một số enzyme oxi hóa khử trong cùi nhãn, điển hình là enzyme polyphenoloxydase (PPO) và enzyme peroxidase (POD). Yueming Jiang và cộng sự (2002) đã cho rằng xử lý nhiệt kết hợp chiếu xạ có thể giữ được màu sắc của vỏ quả nhãn. Athiwat Chumyam cùng cộng sự (2014) đã khảo sát hiệu quả khử trùng của clo dioxide (ClO_2) ở các nồng độ khác nhau để giảm sự hóa nâu của vỏ quả nhãn và chỉ ra phương pháp này có hiệu quả trong việc kéo dài thời gian bảo quản nhãn từ 1 đến 5 ngày [2, 4, 6, 10].

Một số nghiên cứu gần đây đã cho thấy hoạt độ của enzyme PPO và POD phụ thuộc rất lớn vào điều kiện pH và nhiệt độ. Ở điều kiện pH thấp, các enzyme rất dễ bị vô hoạt ở nhiệt độ cao trong thời gian ngắn. Có rất nhiều phương pháp được sử dụng để vô hoạt các enzyme này như sử dụng chất oxi hóa $NaClO_2$, SO_2, chiếu xạ, sử dụng áp suất cao, sử dụng axit để thay đổi pH,... Trong các phương pháp trên thì sử dụng SO_2 và axit để thay đổi pH môi trường kết hợp với nhiệt độ cao là một phương pháp hiệu quả và dễ áp dụng [1, 7, 9].

Trong phạm vi nghiên cứu này đã nghiên cứu ảnh hưởng nhiệt độ, thời gian và tác nhân chần đến hoạt độ của 2 enzyme PPO và POD hóa nâu trong cùi nhãn. Quả nhãn sau thu hoạch được chần trong dung dịch axit xitric ở pH 2,0-3,5; dung dịch $NaHSO_3$ 0,1-0,3% ở nhiệt độ 90°C và theo dõi sự thay đổi hoạt độ enzyme trong khoảng thời gian nhất định. Kết quả của nghiên cứu này đã xác định chế độ thích hợp để tiền xử lý quả nhãn làm định hướng cho các nghiên cứu tiếp theo.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu nghiên cứu

Nguyên liệu nhãn (*Dimocarpus longan*) thuộc giống nhãn lồng được trồng và thu hoạch tại huyện

[1] Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội
[2] Viện Nghiên cứu Rau quả
Email: hanh.nguyenthi@hust.edu.vn

... Thu hoạch: Quả nhãn được lấy mẫu vào chính ... tháng 8 năm 2018 đạt 160 - 170 ngày ... Khi đầu quả, khối lượng trung bình đạt 11-... quả.

Nhãn được thu hái nhẹ nhàng vào buổi sáng khi ... khô ráo, sau đó được buộc thành chùm và ... quả vào trong thùng xốp đục lỗ và vận chuyển về ... thí nghiệm. Quả được bố trí thí nghiệm trong ngày.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm

2.2.1.1. Nghiên cứu lựa chọn nhiệt độ và thời gian chần

Quả nhãn được tách cành, rửa sạch và để ráo, định lượng 1 kg/mẫu, sau đó đem chần trong nước sạch với tỉ lệ nguyên liệu : nước = 1:3 ở các nhiệt độ 85°C, 90°C và 95°C. Theo dõi nhiệt độ của cùi nhãn trong 9 phút kể từ khi bắt đầu chần, tần suất 1 phút/lần. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi công thức lặp lại 3 lần và ở cùng một thời điểm.

Quả nhãn sau khi chần ở các nhiệt độ khác nhau với các khoảng thời gian khác nhau được đem đi tách cùi và xác định hoạt độ enzyme PPO và POD. Sau đó tỷ lệ hoạt độ enzyme còn lại so với hoạt độ enzyme ban đầu (%).

2.2.1.2. Nghiên cứu lựa chọn tác nhân chần

Ảnh hưởng của dung dịch axit citric đến hoạt lực enzyme PPO và POD

Quả nhãn sau khi làm sạch được chần trong dung dịch axit citric có pH=2; pH=2,5; pH=3; pH=3,5 ở nhiệt độ 90°C và thời gian 5 phút. Sau đó tiến hành xác định hoạt độ enzyme PPO và POD. Mẫu đối chứng là mẫu nhãn được chần trong nước thường cùng điều kiện.

Ảnh hưởng của dung dịch $NaHSO_3$ đến hoạt lực enzyme PPO và POD

Sử dụng $NaHSO_3$ với nồng độ 0,1%; 0,2%; 0,3% bổ sung vào nước chần và tiến hành chần nhãn ở nhiệt độ 90°C và thời gian 5 phút. Sau đó tiến hành xác định hoạt độ enzyme PPO và POD. Mẫu đối chứng là mẫu nhãn được chần trong nước thường cùng điều kiện.

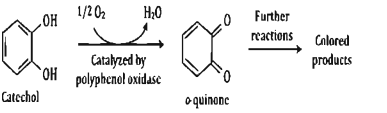
2.2.2. Phương pháp phân tích

Xác định nhiệt độ cùi nhãn bằng nhiệt kế đo tâm

Xác định hoạt độ enzyme polyphenoloxidase

Phương pháp trích ly và xác định hoạt độ enzyme PPO được thực hiện dựa theo phương pháp của Athiwat Chumyam cùng cộng sự (2013) [3].

Lấy 2 g thịt quả nghiền nhỏ trong 20 ml dung dịch đệm phosphatkali pH=6,2 trong 5 phút. Sau đó ly tâm 5 phút ở 9000 g, 20°C và thu nhận phần dịch nổi là enzyme thô. Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng 2 ml gồm: 1,3 ml đệm phosphate kali pH=7,5; 0,2 ml catechol 0,2M và 0,5 ml enzyme thô. Hỗn hợp được giữ trong 5 phút ở 30°C sau đó độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 420nm bằng máy quang phổ. Mẫu kiểm chứng gồm 1,3 ml đệm phosphate kali pH = 7,5 và 0,2 ml catechol 0,2M.



Hình 1. Cơ chế phản ứng hóa nâu của enzyme PPO

Một đơn vị hoạt độ enzyme PPO (U=Abs/ml*phút) được xác định là lượng enzyme gây ra sự thay đổi 0,01 độ hấp thụ trong một đơn vị thời gian (1 phút), hoạt độ enzyme được tính theo công thức:

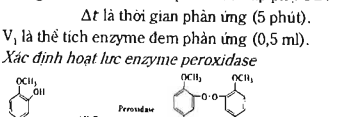
$$A = \frac{\Delta Abs}{0,01 * V_1 * \Delta t} (Abs/\ ml*phút)$$

Trong đó: ΔAbs là kết quả đo độ hấp phụ OD.

Δt là thời gian phản ứng (5 phút).

V_1 là thể tích enzyme đem phản ứng (0,5 ml).

Xác định hoạt lực enzyme peroxidase



Hình 2. Cơ chế phản ứng tạo tetraguiacol nâu tím của enzyme POD

Phương pháp trích ly và xác định hoạt độ enzyme POD tương tự PPO [3]. Tiến hành thu nhận enzyme thô. Sử dụng guaiacol làm chất nền. Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng 2,5 ml gồm: 2,3 ml đệm natri axetat pH= 6,0; 0,05 ml guaiacol 0,1%; 0,05 ml H_2O_2 0,1% và 0,1 ml enzyme thô. Ống chứa hỗn hợp phản ứng được ủ trong 5 phút ở trong bể ổn nhiệt 30°C và đo hấp thu được đo ở 470 nm. Mẫu kiểm chứng gồm

2,3 ml đệm natri axetat pH=6,0; 0,05 ml guaiacol 1%; 0,05 ml H_2O_2 0,1%.

Một đơn vị hoạt độ enzyme POD (Abs/ml*phút) được xác định bằng lượng enzyme gây ra sự thay đổi 0,01 độ hấp phụ trong một đơn vị thời gian, hoạt độ enzyme POD được tính theo công thức:

$$A = \frac{\Delta Abs}{0.01 * V_2 * \Delta t} (Abs/\ ml*phút)$$

Trong đó: ΔAbs là kết quả đo độ hấp phụ OD.

Δt là thời gian phản ứng (5 phút).

V_2 là thể tích enzyme đem phản ứng (1 ml).

2.2.3. Phương pháp xử lý số liệu

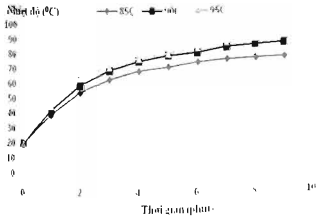
Kết quả thí nghiệm được phân tích ANOVA và kiểm định LSD (5%) bằng phần mềm thống kê SAS 610.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu lựa chọn nhiệt độ và thời gian chần

3.1.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian chần đến nhiệt độ cùi nhãn

Chần có tác dụng loại bỏ một phần vi sinh vật bám trên bề mặt quả nhãn, vô hoạt một số enzyme gây biến mầu của quả nhãn và nguyên liệu sau khi chần sẽ dễ tách vỏ, tách hạt hơn do liên kết giữa các phần của quả nhãn bị yếu đi dưới tác dụng của nhiệt độ. Tuy nhiên, nếu chần ở nhiệt độ quá cao trong thời gian quá dài sẽ làm cho quả bị quá nhiệt, mất chất dinh dưỡng (vitamin dễ dàng bị phân hủy, chất khô bị hao hụt...), cấu trúc quả bị mềm. Chính vì vậy việc lựa chọn nhiệt độ và thời gian chần thích hợp cho nguyên liệu là cần thiết.



Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ chần đến nhiệt độ cùi nhãn theo thời gian

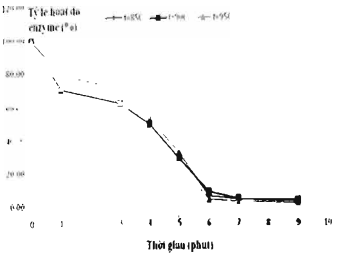
Để đánh giá sự biến đổi chất lượng của quả nhãn trong quá trình chần, đã tiến hành theo dõi sự thay đổi nhiệt độ của cùi nhãn theo thời gian ở các nhiệt độ chần khác nhau. Kết quả sự thay đổi nhiệt độ tâm của cùi nhãn khi chần được thể hiện trên hình 3.

Từ kết quả thu được trên hình 3 ta thấy rằng nhiệt độ môi trường chần càng cao thì nhiệt độ cùi nhãn tăng càng nhanh. Ở cùng một điều kiện nhiệt độ, nhiệt độ cùi nhãn tỷ lệ thuận với thời gian chần. Ở phút thứ 5, nhiệt độ cùi nhãn đều đạt trên 70°C, tuy nhiên có sự chênh lệch đáng kể giữa nhiệt độ cùi nhãn ở ba nhiệt độ chần: ở 85°C, nhiệt độ cùi đạt 72,4°C thấp hơn nhiều so với nhiệt độ cùi ở 90°C là 80,1°C và ở 95°C là 81,3°C. Tuy nhiên để lựa chọn được điều kiện chần thích hợp cần phải đánh giá được hoạt độ của 2 enzyme PPO và POD, đây là 2 enzyme ảnh hưởng đến sự biến đổi mầu của cùi nhãn. Cụ thể là, khi 2 enzyme này hoạt động càng mạnh thì tốc độ hóa nâu của cùi nhãn khi để trong không khí càng lớn.

3.1.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian chần đến hoạt độ enzyme PPO và POD

Quả nhãn sau khi chần ở các nhiệt độ và thời gian khác nhau được đem đi tách cùi và xác định hoạt độ enzyme PPO và POD để đánh giá mức độ vô hoạt các enzyme này dưới tác động của nhiệt độ. Kết quả nghiên cứu được thể hiện trên hình 4 và 5.

Kết quả thu được trên hình 4 và 5 cho thấy nhiệt độ càng cao thì mức độ enzyme PPO và POD bị vô hoạt càng lớn. Các enzyme gần như bị mất hoạt tính khi chần ở nhiệt độ từ 85°C đến 95°C từ phút thứ 6 trở đi và gần như bị vô hoạt trong 9 phút của quá trình chần.



Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ chần đến hoạt độ enzyme PPO theo thời gian

Ân Thi, Hưng Yên. Quả nhãn được lấy mẫu vào chính vụ thu hoạch tháng 8 năm 2018 đạt 160 - 170 ngày tuổi kể từ khi đậu quả, khối lượng trung bình đạt 11-12 gam/quả.

Nhãn được thu hái nhẹ nhàng vào buổi sáng khi thời tiết khô ráo, sau đó được buộc thành chùm và xếp quả vào trong thùng xốp đục lỗ và vận chuyển về phòng thí nghiệm. Quả được bố trí thí nghiệm trong ngày.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm

2.2.1.1. Nghiên cứu lựa chọn nhiệt độ và thời gian chần

Quả nhãn được tách cành, rửa sạch và để ráo, định lượng 1 kg/mẫu, sau đó đem chần trong nước sạch với tỉ lệ nguyên liệu : nước = 1:3 ở các nhiệt độ 85^{0}C, 90^{0}C và 95^{0}C. Theo dõi nhiệt độ của cùi nhãn trong 9 phút kể từ khi bắt đầu chần, tần suất 1 phút/lần. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi công thức lặp lại 3 lần và ở cùng một thời điểm.

Quả nhãn sau khi chần ở các nhiệt độ khác nhau với các khoảng thời gian khác nhau được đem đi tách cùi và xác định hoạt độ enzyme PPO và POD. Sau đó tỷ lệ hoạt độ enzyme còn lại so với hoạt độ enzyme ban đầu (%).

2.2.1.2. Nghiên cứu lựa chọn tác nhân chần

Ảnh hưởng của dung dịch axit citric đến hoạt lực enzyme PPO và POD

Quả nhãn sau khi làm sạch được chần trong dung dịch axit citric có pH=2; pH=2,5; pH=3; pH=3,5 ở nhiệt độ 90^{0}C và thời gian 5 phút. Sau đó tiến hành xác định hoạt độ enzyme PPO và POD. Mẫu đối chứng là mẫu nhãn được chần trong nước thường cùng điều kiện.

Ảnh hưởng của dung dịch $NaHSO_3$ đến hoạt lực enzyme PPO và POD

Sử dụng $NaHSO_3$ với nồng độ 0,1%; 0,2%; 0,3% bổ sung vào nước chần và tiến hành chần nhãn ở nhiệt độ 90^{0}C và thời gian 5 phút. Sau đó tiến hành xác định hoạt độ enzyme PPO và POD. Mẫu đối chứng là mẫu nhãn được chần trong nước thường cùng điều kiện.

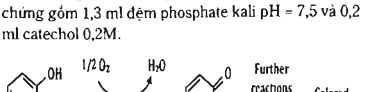
2.2.2. Phương pháp phân tích

Xác định nhiệt độ cùi nhãn bằng nhiệt kế đo tâm

Xác định hoạt độ enzyme polyphenoloxidase

Phương pháp trích ly và xác định hoạt độ enzyme PPO được thực hiện dựa theo phương pháp của Athiwat Chumyam cùng cộng sự (2013) [3].

Lấy 2 g thịt quả nghiền nhỏ trong 20 ml dung dịch đệm phosphatkali pH=6,2 trong 5 phút. Sau đó ly tâm 5 phút ở 9000 g, 20°C và thu nhận phần dịch nổi là enzyme thô. Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng 2 ml gồm: 1,3 ml đệm phosphate kali pH=7,5; 0,2 ml catechol 0,2M và 0,5 ml enzyme thô. Hỗn hợp được giữ trong 5 phút ở 30°C sau đó đo hấp thụ quang phổ ở bước sóng 420nm bằng máy quang phổ. Mẫu kiểm chứng gồm 1,3 ml đệm phosphate kali pH = 7,5 và 0,2 ml catechol 0,2M.



Hình 1. Cơ chế phản ứng hóa nâu của enzyme PPO

Một đơn vị hoạt độ enzyme PPO (U=Abs/ml*phút) được xác định là lượng enzyme gây ra sự thay đổi 0,01 độ hấp thụ trong một đơn vị thời gian (1 phút), hoạt độ enzyme được tính theo công thức:

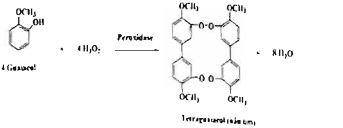
$$A = \frac{\Delta Abs}{0{,}01 * V_1 * \Delta t} (Abs/\ ml*phút)$$

Trong đó: ΔAbs là kết quả đo độ hấp phụ OD.

Δt là thời gian phản ứng (5 phút).

V_1 là thể tích enzyme đem phản ứng (0,5 ml).

Xác định hoạt lực enzyme peroxidase



Hình 2. Cơ chế phản ứng tạo tetraguaiacol nâu tím của enzyme POD

Phương pháp trích ly và xác định hoạt độ enzyme POD tương tự PPO [3]. Tiến hành thu nhận enzyme thô. Sử dụng guaiacol làm chất nền. Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng 2,5 ml gồm: 2,3 ml đệm natri axetat pH= 6,0; 0,05 ml guaiacol 0,1%; 0,05 ml H_2O_2 0,1% và 0,1 ml enzyme thô. Ống chưa hỗn hợp phản ứng được ủ trong 5 phút ở trong bể ổn nhiệt 30°C và độ hấp thu được đo ở 470 nm. Mẫu kiểm chứng gồm

có 2,3 ml đệm natri axetat pH=6,0; 0,05 ml guaiacol 0,1%; 0,05 ml H_2O_2 0,1%.

Một đơn vị hoạt độ enzyme POD (U=Abs/ml*phút) được xác định bằng lượng enzyme gây ra sự thay đổi 0,01 độ hấp phụ trong một đơn vị thời gian, hoạt độ enzyme POD được tính theo công thức:

$$A = \frac{\Delta Abs}{0,01 * V_2 * \Delta t} (Abs/ ml*phút)$$

Trong đó: ΔAbs là kết quả đo độ hấp phụ OD.

Δt là thời gian phản ứng (5 phút).

V_2 là thể tích enzyme đem phản ứng (0,1 ml).

2.2.3. Phương pháp xử lý số liệu

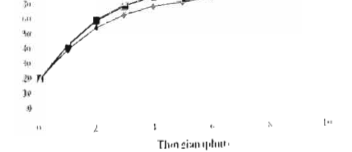
Kết quả thí nghiệm được phân tích ANOVA và kiểm định LSD (5%) bằng phần mềm thống kê SAS 610.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu lựa chọn nhiệt độ và thời gian chần

3.1.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian chần đến nhiệt độ cùi nhãn

Chần có tác dụng loại bỏ một phần vi sinh vật bám trên bề mặt quả nhãn, vô hoạt một số enzyme gây biến màu của quả nhãn và nguyên liệu sau khi chần sẽ dễ tách vỏ, tách hạt hơn do liên kết giữa các phần của quả nhãn bị yếu đi dưới tác dụng của nhiệt độ. Tuy nhiên, nếu chần ở nhiệt độ quá cao trong thời gian quá dài sẽ làm cho quả bị quá nhiệt, mất chất dinh dưỡng (vitamin dễ dàng bị phân hủy, chất khô bị hao hụt...), cấu trúc quả bị mềm. Chính vì vậy việc lựa chọn nhiệt độ và thời gian chần thích hợp cho nguyên liệu là cần thiết.



Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ chần đến nhiệt độ cùi nhãn theo thời gian

Để đánh giá sự biến đổi chất lượng của quả nhãn trong quá trình chần, đã tiến hành theo dõi sự thay đổi nhiệt độ của cùi nhãn theo thời gian ở các nhiệt độ chần khác nhau. Kết quả sự thay đổi nhiệt độ tâm của cùi nhãn khi chần được thể hiện trên hình 3.

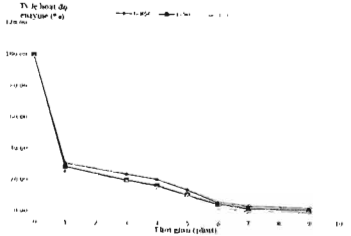
Từ kết quả thu được trên hình 3 ta thấy rằng nhiệt độ môi trường chần càng cao thì nhiệt độ cùi nhãn tăng càng nhanh. Ở cùng một điều kiện nhiệt độ, nhiệt độ cùi nhãn tỷ lệ thuận với thời gian chần. Ở phút thứ 5, nhiệt độ cùi nhãn đều đạt trên 70°C, tuy nhiên có sự chênh lệch đáng kể giữa nhiệt độ cùi nhãn ở ba nhiệt độ chần: ở 85°C, nhiệt độ cùi đạt 72,4°C thấp hơn nhiều so với nhiệt độ cùi ở 90°C là 80,1°C và ở 95°C là 81,3°C. Tuy nhiên để lựa chọn được điều kiện chần thích hợp cần phải đánh giá được hoạt độ của 2 enzyme PPO và POD, đây là 2 enzyme ảnh hưởng đến sự biến đổi màu của cùi nhãn. Cụ thể là, khi 2 enzyme này hoạt động càng mạnh thì tốc độ hóa nâu của cùi nhãn khi để trong không khí càng lớn.

3.1.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian chần đến hoạt độ enzyme PPO và POD

Quả nhãn sau khi chần ở các nhiệt độ và thời gian khác nhau được đem đi tách cùi và xác định hoạt độ enzyme PPO và POD để đánh giá mức độ vô hoạt các enzyme này dưới tác động của nhiệt độ. Kết quả nghiên cứu được thể hiện trên hình 4 và 5.

Kết quả thu được trên hình 4 và 5 cho thấy nhiệt độ càng cao thì mức độ enzyme PPO và POD bị vô hoạt càng lớn. Các enzyme gần như bị mất hoạt tính khi chần ở nhiệt độ từ 85°C đến 95°C từ phút thứ 6 trở đi và gần như bị vô hoạt trong 9 phút của quá trình chần.

Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ chần đến hoạt độ enzyme PPO theo thời gian



Hình 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ chần đến hoạt độ enzyme POD theo thời gian

Mức độ vô hoạt các enzyme này ở các nhiệt độ chần khác nhau có sự khác biệt không đáng kể. PPO và POD bị mất hoạt tính rất nhanh sau khoảng 1 phút sau chần (hoạt độ còn lại lần lượt là 70,45% và 28,96% ở 90°C so với ban đầu). Sau đó thì hoạt độ giảm dần, sau khi chần ở thời gian 5 phút ở 90°C thì hoạt độ PPO của củi nhãn còn lại là 28,76% và hoạt độ POD còn lại là khoảng 11,48% và sau 6 phút thì hoạt độ còn lại không đáng kể.

Nhiệt độ chần cao và thời gian chần dài có thể hạn chế sự biến màu do enzyme nhưng làm cho cấu trúc của củi nhãn bị nhũn, nhãn bị giảm thành phần hương đi rất nhiều và mất mát chất khô ra môi trường chần. Vì vậy với độ chần 90°C và thời gian chần 5 phút là hợp lý để hạn chế sự hoạt động của các enzyme oxy hóa khử cũng như giảm các tác động bất lợi của nhiệt tới chất lượng sản phẩm.

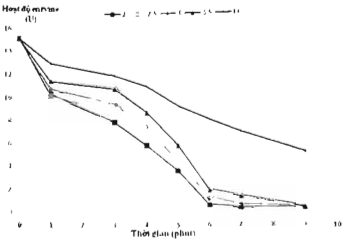
3.2. Nghiên cứu lựa chọn tác nhân chần

3.2.1. Ảnh hưởng của dung dịch axit citric đến hoạt độ enzyme PPO và POD

Enzyme PPO và POD nhạy cảm trong môi trường có pH thấp và có mặt các chất có tính oxi hóa khi kết hợp với gia nhiệt ở nhiệt độ cao. Vì vậy sử dụng axit citric để hạ pH của dung dịch chần nhằm tăng hiệu quả vô hoạt enzyme của quá trình chần. Cùng với tác dụng hạ pH của dung dịch chần, axit citric còn có khả năng kết hợp với nguyên tố ở trung tâm hoạt độ enzyme PPO và POD làm bất hoạt các enzyme này [5].

Quả nhãn sau khi làm sạch được chần trong dung dịch axit citric có pH=2; 2,5; 3 và 3,5 ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 5 phút. Sau đó được mang đi xác định hoạt độ enzyme PPO và POD. Mẫu đối chứng là mẫu nhãn được chần trong nước thường cùng điều kiện nhiệt độ.

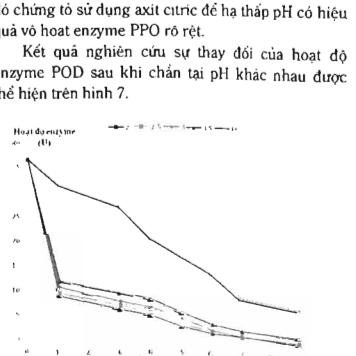
Kết quả nghiên cứu hoạt độ enzyme PPO trong cùi nhãn sau khi chần trong các môi trường có pH khác nhau được thể hiện trên hình 6.



Hình 6. Ảnh hưởng của dung dịch axit citric đến hoạt độ enzyme PPO trong thời gian

Kết quả trên hình 6 cho thấy trong cùng một điều kiện nhiệt độ, ở pH càng thấp thì enzyme càng dễ bị vô hoạt. Tuy nhiên sự khác biệt này không nhiều. Ở pH thấp và cùng điều kiện nhiệt độ chần thì hiệu quả vô hoạt enzyme lớn hơn rất nhiều so với mẫu kiểm chứng. Khi chần ở pH=3, trong 5 phút thì hoạt độ enzyme PPO trong cùi nhãn còn 4,36 U (còn lại 28,76%), trong khi đó ở mẫu kiểm chứng enzyme PPO trong cùi nhãn còn 9,24 U (còn lại 60,95%), điều đó chứng tỏ sử dụng axit citric để hạ thấp pH có hiệu quả vô hoạt enzyme PPO rõ rệt.

Kết quả nghiên cứu sự thay đổi của hoạt độ enzyme POD sau khi chần tại pH khác nhau được thể hiện trên hình 7.



Hình 7. Ảnh hưởng của dung dịch axit citric đến hoạt độ enzyme POD trong thời gian chần

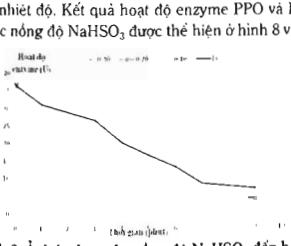
Từ dữ liệu trên hình 7 cho thấy hoạt độ enzyme POD của củ nhân khi chần ở các pH khác nhau cũng có xu hướng giảm tương tự như hoạt độ enzyme PPO. pH càng thấp thì khả năng vô hoạt enzyme càng cao. Đặc biệt enzyme POD nhạy cảm hơn so với enzyme PPO rất nhiều khi chần ở các điều kiện pH khác nhau. Khi chần ở pH=3, sau 1 phút, hoạt độ enzyme POD đã giảm từ 36,6 U xuống còn 10,6 U (còn lại 28,96%). Điều đó cho thấy, enzyme POD nhạy cảm với nhiệt độ hơn so với enzyme PPO. Hoạt độ enzyme POD khi chần trong môi trường axit giảm nhanh hơn rõ rệt so với mẫu kiểm chứng.

Như vậy, kết quả phân tích trên đồ thị hình 6 và 7 cho thấy rằng chần trong điều kiện pH=3 ở nhiệt độ 90°C trong 5 phút là hợp lý để vô hoạt enzyme hóa nâu trong củ nhân mà không ảnh hưởng đến chất lượng của củ nhân sau khi chần.

3.2.2. Ảnh hưởng của dung dịch $NaHSO_3$ đến hoạt độ enzyme PPO và POD

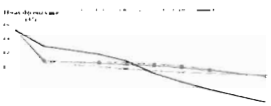
Sử dụng $NaHSO_3$ ở các nồng độ khác nhau bổ sung vào dung dịch chần để tăng khả năng vô hoạt các enzyme này. $NaHSO_3$ có khả năng ức chế hoạt động của enzyme, gốc HSO_3^- có thể phản ứng trực tiếp với các quinone để giảm sự hình thành hợp chất màu nâu [8].

Sử dụng $NaHSO_3$ với nồng độ 0,1%; 0,2% và 0,3% bổ sung vào dung dịch chần và tiến hành chần nhân ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 9 phút và đánh giá hiệu quả vô hoạt enzyme PPO và POD tương tự như thí nghiệm sử dụng axit citric. Mẫu kiểm chứng là mẫu nhân được chần trong nước thường cùng điều kiện nhiệt độ. Kết quả hoạt độ enzyme PPO và POD tại các nồng độ $NaHSO_3$ được thể hiện ở hình 8 và 9.



Hình 8. Ảnh hưởng của nồng độ $NaHSO_3$ đến hoạt độ enzyme POD trong thời gian chần

Kết quả thí nghiệm trên hình 8 chỉ ra rằng, hoạt độ enzyme POD cũng bị vô hoạt rất nhanh khi chần trong dung dịch $NaHSO_3$ với nồng độ khác nhau. Tuy nhiên hiệu quả vô hoạt enzyme POD ở các nồng độ $NaHSO_3$ khác nhau không có sự khác biệt nhiều. Hiệu quả vô hoạt enzyme của dung dịch $NaHSO_3$ có sự khác biệt rõ rệt so với mẫu kiểm chứng. Theo số liệu trên hình 8 cho thấy để giảm đi 82,51% hoạt tính enzyme POD chỉ cần chần trong $NaHSO_3$ 0,1% trong 1 phút.



Hình 9. Ảnh hưởng của nồng độ $NaHSO_3$ đến hoạt độ enzyme PPO trong thời gian chần

Kết quả thí nghiệm thể hiện ở hình 9 cho thấy, hoạt độ enzyme PPO cũng giảm đi khi chần trong dung dịch $NaHSO_3$ ở các nồng độ khác nhau, khác biệt hẳn so với mẫu kiểm chứng và có xu hướng giảm như hoạt độ enzyme PPO. Tuy nhiên, hoạt độ enzyme PPO trong củ nhân ở nồng độ khác nhau đó không có sự khác biệt nhiều. Enzyme PPO bị vô hoạt nhanh ở những phút đầu tiên sau khi chần, nếu tiếp tục chần hơn 4 phút thì hoạt độ enzyme này giảm đi không đáng kể. Vì vậy, nếu sử dụng $NaHSO_3$ để giảm hoạt độ enzyme PPO và POD trong củ nhân thì có thể sử dụng $NaHSO_3$ ở nồng độ 0,1% và rút ngắn thời gian chần từ 3-4 phút.

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu về đánh giá ảnh hưởng của chế độ chần đến hoạt độ của 2 enzyme PPO và POD gây biến màu của quả nhân đã cho thấy ảnh hưởng tích cực của nhiệt độ, thời gian và tác nhân chần đến hoạt động của 2 enzyme này. Kết quả đã chỉ ra khi chần nhân ở nhiệt độ 90°C trong 5 phút trong môi trường axit citric có pH 3 làm mất hoạt tính của enzyme PPO và POD. Đặc biệt, nếu sử dụng tác nhân chần $NaHSO_3$ ở nồng độ 0,1% chỉ cần chần nhân từ 3-4 phút có thể cho kết quả tương tự. Kết quả nghiên cứu làm tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo để phát triển các sản phẩm từ quả nhân lồng Hưng Yên.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Bách khoa Hà Nội (HUST) trong đề tài mã số T2018-PC-013.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Esma Hande Alici, Gulnur Arabaci (2016). *Determination of SOD, POD, PPO and CAT Enzyme Activities in Rumex obtusifolius L.*. Annual Research & Review in Biology, 11(3): 1-7.

2. J. Li, Y. Jiang, S. Miao (2009). *Changes in quality attributes of longan juice during storage in relation to effects of thermal processing.* Journal of Food Quality, *32(1): 48-57.*

3. Kobkiat Saengnil, Athiwat Chumyam, Bualuang Faiyue, Jamnong Uthaibutra (2014). *Use of chlorine dioxide fumigation to alleviate enzymatic browning of harvested 'Daw' longan pericarp during storage under ambient condition.* Postharvest Biology and Technology, 91: 49-56.

4. K. Saengnil, A. Chumyam, B. Faiyue, and J. Uthaibutra (2014). *Use of chlorine dioxide fumigation to alleviate enzymatic browning of harvested 'Daw' longan pericarp during storage under ambient conditions.* Postharvest Biology and Technology, 91: 49-56.

5. P. M. Lee, K-H. Lee, M. Ismail and A. Karim (1991). *Biochemical studies of cocoa bean polyphenol oxiase.* Journal of Science and Food Agriculture, 55(2): 251-260.

6. S. Zhang, H. Lin, M. Lin, Y. Lin, Y. Chen, H. Wang, Y.Lin, J.Shi (2019). *Lasiodiplodia theobromae (Pat.) Griff. & Maubl. reduced energy status and ATPase activity and its relation to disease development and pericarp browning of harvested longan fruit.* Food Chemistry, 275: 239-245.

7. Nguyễn Minh Chơn, Nguyễn Phương Thúy (2006). *Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ lên sự hóa nâu gây ra bởi enzyme peroxidase từ hột sen.* Tạp chí Nghiên cứu Khoa học, 6: 24-32.

8. T. A. Demet Kavrayan (2001). *Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from peppermint (menthapiperita).* Food Chemistry, 74(2): 147–154.

9. V. T. Pham, M. Herrero and J. I. Hormaza (2015). *Phenological growth stages of longan (Dimocarpus longan) according to the BBCH scale.* Scientia Horticulturae, 189: 201-207.

10. YuemingJiang, ZhaoqiZhang, D. CJoyce and SaicholKetsa (2002). *Postharvest biology and handling of longan fruit (Dimocarpus longan Lour.).* Postharvest Biology and Technology, 26(3): 241-252.

THE EFFECTS OF BLANCHING MODES TO ENZYME ACTIVITY CAUSES THE COLOR CHANGE OF HUNG YEN LONGAN

Nguyen Thi Hanh[1], Dinh Le Khanh[2] Nguyen Van Hung[1]

[1]Institute of Biology and Food Technology, School of Hanoi University of Science and Technology

[2] Fruit and Vegetable Research Institute

Email: hanh.nguyenthi@hust.edu.vn

Summary

The purpose of this research is determine the effect of blanching modes to activity of the enzyme polyphenoloxydase (PPO) and the enzyme peroxidase (POD) causing browning of Hung Yen longan (*Dimocarpus longan*) to determine the pre-treatment modes before processing. Hung Yen longans were harvested at suitable ripening, were blanched at 85°C, 90°C and 95°C for 9 minutes. After selecting the time and temperature, longans were blanched in citric acid solution at pH 2.0-3.5 or $NaHSO_3$ solution at 0.1-0.3% concentration and monitoring the activity change of two enzymes PPO and POD during blanching time. The control sample is a blanched in water at the same temperature. The study results showed that blanching in citric acid solution at pH 3, 90°C for 5 minutes deactivated the enzyme PPO and POD. Especially, the $NaHSO_3$ is used at 0.1% concentration, longans were only blanched for 3-4 minutes for the same results.

Keywords: *Longan, citric acid, bisulfit natri, polyphenoloxydase, peroxidase.*

Người phản biện: PGS.TS. Phạm Anh Tuấn

Ngày nhận bài: 6/3/2020

Ngày thông qua phản biện: 7/4/2020

Ngày duyệt đăng: 14/4/2020

ẢNH HƯỞNG QUÁ TRÌNH THỦY PHÂN ĐẾN HÀM LƯỢNG POLYPHENOL VÀ KHẢ NĂNG KHÁNG OXY HÓA CỦA DỊCH QUẢ LÊKIMA *(Pouteria campechiana)*

Trần Xuân Hiển[1], Huỳnh Liên Hương[2], Nguyễn Trung Thành[3]

TÓM TẮT

Các đặc tính dược liệu của quả lêkima (*Pouteria campechiana*) ở Việt Nam hiện nay vẫn chưa được nghiên cứu nhiều. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của quá trình thủy phân đến hàm lượng polyphenol tổng và hoạt tính kháng oxy hóa của dịch quả lêkima. Ảnh hưởng của điều kiện thủy phân lên hoạt tính sinh học của dịch quả bao gồm loại enzyme, nồng độ enzyme, nhiệt độ và thời gian thủy phân sẽ được khảo sát. Kết quả thực nghiệm cho thấy ở nồng độ enzyme pectinase 0,6 wt%, nồng độ enzyme cellulase 0,6 wt%, nhiệt độ thủy phân 60°C và thời gian 65 phút, dịch thủy phân đạt hàm lượng polyphenol tổng số (TPC) 8,239±0,07 mgGAE/g, khả năng loại gốc tự do (DPPH) là 78,73±2,71% và có giá trị IC50 đạt 7,818 mg/mL. Kết quả từ nghiên cứu này góp phần cung cấp dẫn liệu khoa học quý giá về quả lêkima đặc biệt cho ngành công nghệ thực phẩm.

Từ khóa: *Lêkima, polyphenol, thủy phân, khả năng chống oxy hóa, trung hòa gốc tự do DPPH.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lêkima (*Pouteria campechiana*) là loại cây ăn trái được trồng nhiều ở các nước Peru, Ecuador, Chile và Mexico và là một phần quan trọng trong chế độ dinh dưỡng của người Tây Ban Nha (Yahia & Guttierrez-Orozco, 2011; Duarte *et al.*, 2015). Ở Việt Nam, mùa thu hoạch lêkima bắt đầu từ tháng 7 đến tháng 11 (Đỗ Tất Lợi, 2012). Thịt quả có màu vàng cam, hương thơm đặc trưng và vị ngọt tự nhiên. Quả lêkima là một loại thực phẩm quý đã được sử dụng làm thực phẩm dinh dưỡng cũng như trong chữa trị một số bệnh tật trong dân gian từ lâu. Quả lêkima thường được ăn tươi, sử dụng dưới dạng bột đông lạnh hay bổ sung trong các sản phẩm kem, kẹo, mứt (Apostolidis *et al.*, 2009; Yahia & Guttierrez-Orozco, 2011). Thịt quả có chứa nhiều thành phần dinh dưỡng, đặc biệt là những thành phần chống oxy hóa cần thiết cho hoạt động của cơ thể nên quả lêkima giúp tăng tỷ lệ hồng cầu trong máu, kích thích hoạt động của hệ thần kinh, chống trầm cảm, giảm cholesterol và triglyceride trong máu, ngăn ngừa các bệnh tim mạch và béo phì, hạn chế các cơn nhồi máu cơ tim, tăng hiệu quả của hệ miễn nhiễm và tăng cường năng lượng rất tốt (Apostolidis *et al.*, 2009; Đỗ Tất Lợi, 2012). Tuy nhiên, những hiểu biết về hoạt tính sinh học của quả lêkima chưa được công bố một cách đầy đủ, đặc biệt là hoạt tính chống oxy hóa của nó. Tại Việt Nam, việc khảo sát polyphenol và hoạt chất kháng oxy hóa trên quả lêkima chưa có nhiều nghiên cứu. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của quá trình thủy phân đến hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa của dịch quả lêkima. Kết quả nghiên cứu sẽ cung cấp dữ liệu khoa học về điều kiện thủy phân dịch quả lêkima để thu được hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa cao nhất.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu và hóa chất

Quả lêkima được thu hoạch vào tháng 9-10, thu nhận trực tiếp vào buổi sáng (7 – 9 giờ) tại vườn ở xã Mỹ Khánh, huyện Phong Điền, thành phố Cần Thơ. Độ tuổi quả lêkima khi thu hoạch trong khoảng 120-125 ngày sau khi đậu quả (đã được theo dõi đánh dấu). Khối lượng quả dao động khoảng 200-250 gam (thu hoạch 20 quả/cây). Quả lêkima sau khi thu hoạch được bao gói bằng giấy xốp, đặt trong thùng carton vận chuyển về phòng thí nghiệm trong ngày và bảo quản ở điều kiện nhiệt độ phòng (30-32°C). Tiếp theo, quả được rửa sạch và cho vào thiết bị chà (Pulper Finisher), tách hạt, thu thịt quả nghiền (paste). Paste sau đó được trữ trong tủ đông (-18°C) cho các thí nghiệm thực hiện.

[1] Bộ môn Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học An Giang (ĐHQG TP. HCM)
[2] Bộ môn Công nghệ Hóa học, Trường Đại học Cần Thơ
[3] Phòng Đào tạo, Trường Đại học An Giang (ĐHQG TP. HCM)
Email: txhien@agu.edu.vn

Enzyme Pectinase và Cellulase (Denmark-Công ty Novoenzyme) và các hóa chất phân tích khác như acid gallic chuẩn (Sigma), thuốc thử Folin-Ciocalteu (Merck), 2,2-diphenyl-1- picrylhydrazyl (DPPH) (Merck) được cung cấp từ Công ty Hóa chất miền Nam, Chi nhánh Cần Thơ.

2.2. Chuẩn bị dịch thủy phân lêkima

Paste lêkima sau khi rã đông được bổ sung nước với tỉ lệ nguyên liệu: nước là 1:4 (w/v). Hỗn hợp được xử lý với sóng siêu âm trong 5 phút. Hỗn hợp sau khi tiền xử lý sẽ được thủy phân. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thủy phân như loại enzyme (pectinase, cellulase), nồng độ enzyme 0-1 wt%, nhiệt độ (40-65°C) và thời gian thủy phân (45-75 phút) được lần lượt khảo sát. Sau quá trình thủy phân, mẫu được vô hoạt enzyme ở 85°C trong 5 phút, ly tâm với tốc độ 2000 v/phút trong 5 phút. Phần dịch thu được sau quá trình thủy phân được sử dụng để xác định hàm lượng polyphenol tổng số (TPC) và hoạt tính kháng oxy hóa DPPH (giá trị IC50).

2.3. Hàm lượng phenolic tổng và hoạt tính kháng oxy hóa

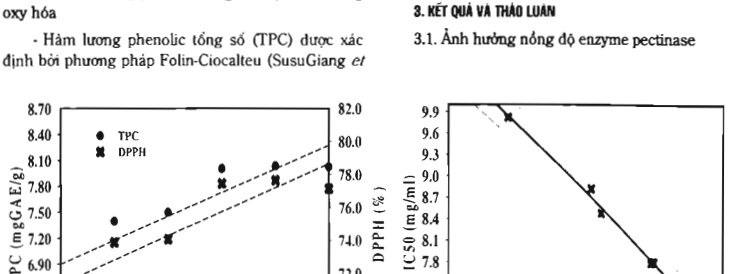
- Hàm lượng phenolic tổng số (TPC) được xác định bởi phương pháp Folin-Ciocalteu (SusuGiang *et al.*, 2013) bằng cách xây dựng đường chuẩn với acidgallic (GA). Hàm lượng TPC được biểu diễn theo miligam đương lượng acid gallic trên gam chất khô (mg GAE/g).

- Hoạt tính kháng oxy hóa được đánh giá dựa trên khả năng trung hòa gốc tự do thông qua phản ứng mất màu tím của dung dịch 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) trong methanol trên cơ sở phương pháp của Anshu *etal.* (2011) dựng đường chuẩn biểu diễn mối tương quan giữa % hoạt tính loại gốc tự do của DPPH và nồng độ mẫu khác nhau. Dựa vào phương trình đường chuẩn mối tương quan giữa phần trăm loại trừ gốc tự do của DPPH với các nồng độ khác nhau để xác định giá trị IC50.

Tất cả các thí nghiệm đều được thực hiện lặp lại ba lần. Kết quả thực nghiệm được phân tích bằng phần mềm Statgraphics Centurion 15.2.11.0. Phân tích phương sai ANOVA với kiểm định LSD được sử dụng để xác định sự khác biệt ý nghĩa ($p<0,05$) giữa các yếu tố và phần mềm Sigma Plot 10.0.54 được sử dụng để vẽ đồ thị.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng nồng độ enzyme pectinase



Hình 1. Ảnh hưởng nồng độ enzyme pectinase đến TPC (A) và tương quan giữa TPC-IC50 (B)

Polyphenol là nhóm chất kháng oxy hóa có khả năng ngăn chặn các chuỗi phản ứng dây chuyền bằng cách phản ứng trực tiếp với gốc tự do và tạo thành một gốc tự do mới bền hơn, hoặc cũng có thể tạo phức với các ion kim loại chuyển tiếp vốn là xúc tác cho quá trình tạo gốc tự do (Petti & Scully, 2009). Vì vậy, khảo sát hàm lượng polyphenol tổng số là một chỉ tiêu quan trọng nhằm đánh giá khả năng kháng oxy hóa của một nguyên liệu. Ảnh hưởng của hàm lượng pectinase lên hoạt tính sinh học của dịch quả thủy phân được khảo sát với nồng độ enzyme thay đổi từ 0-1,0 wt%. Các yếu tố khác của quá trình thủy

phân được cố định ở nhiệt độ 40°C, pH 5 trong thời gian 45 phút (nồng độ enzyme cellulase 0,2 wt%). Kết quả được trình bày ở hình 1.

Kết quả ở hình 1A cho thấy, khi thay đổi nồng độ emzyme pectinase thì TPC cũng thay đổi theo. Khi tăng hàm lượng pectinase, TPC của dịch quả có xu hướng tăng dần. TPC đạt cao nhất (8,027±0,06 mgGAE/g) khi 0,8 wt% pectinase được sử dụng và qua phân tích ANOVA cho thấy cũng không có sự khác biệt thống kê ($p< 0,05$) giữa tỷ lệ này với tỷ lệ 0,6 wt% (7,999 mgGAE/g) và tỷ lệ 1 wt% (8,018 mgGAE/g). Thực tế, thành tế bào của thực vật được cấu tạo chủ yếu bởi cellulose, hemicellulose, pectin, protein và các hợp chất phenolic liên kết với các polysaccharides thông qua liên kết hydro và các liên kết kỵ nước, vì vậy có thể sử dụng các enzyme như cellulases, pectinases và hemicellulases để thủy phân phá vỡ thành tế bào. Mặt khác, các enzyme trên cũng có thể được sử dụng nhằm tăng khả năng xâm nhập thành tế bào giúp phóng thích các hợp chất phenolic cũng như tăng hiệu suất trích ly các hợp chất mang hoạt tính sinh học (Miron *et al.*, 2013). Ngoài ra, sự gia tăng giá trị TPC có thể được giải thích theo cơ chế khác là do sự tác động trực tiếp của enzyme lên quá trình phá vỡ liên kết "ester" giữa các phenols và các polymer thành tế bào thực vật (Pinelo *et al.*, 2008). Trên thực tế, pectinase làm cho pectin bị thay thế hoặc bị phá vỡ, dẫn đến phá hủy thành tế bào và phóng thích các hợp chất phenolic (Fernández *et al.*, 2015). Tuy nhiên, khi nồng độ enzyme bão hòa với nồng độ cơ chất thì vận tốc phản ứng sẽ không thay đổi vì vậy khi tiếp tục tăng hàm lượng pectinase thì TPC của dịch quả vẫn không thay đổi (Nguyễn Nhật Minh Phương và ctv., 2011).

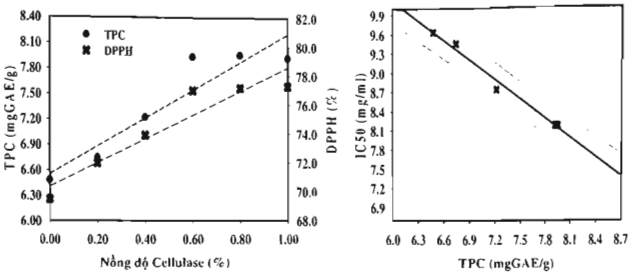
Ngoài giá trị TPC ra, phương pháp loại gốc tự do bằng DPPH được lựa chọn để đồng đánh giá khả năng kháng oxy hóa của dịch quả thủy phân vì DPPH là phương pháp khá đơn giản, cho kết quả nhanh có tính ổn định và là phương pháp phổ biến mang tính chất sàng lọc tác dụng kháng oxy hóa các chất kháng oxy hóa (BrandWilliams *et al.*, 2011). Kết quả từ hình 1A cũng cho thấy, khi thủy phân bằng enzyme pectinase với các nồng độ khác nhau thì khả năng kháng oxy hóa cũng thay đổi theo. Khi nồng độ pectinase tăng từ 0 đến 1wt% thì khả năng bắt gốc tự do của dịch thủy phân cũng tăng từ 69,96±2,36% lên 77,15±2,05%, tuy nhiên khi tiếp tục tăng nồng độ pectinase 0,8 - 1,0 wt% thì không có sự khác biệt ý nghĩa về khả năng kháng oxy hóa của dịch so với 0,6 wt% pectianse (77,47±2,68%). Đặc biệt, giá trị IC50 cho biết nồng độ mà tại đó pectinase có khả năng loại trừ 50% gốc tự do của DPPH, vì vậy IC50 thường được dùng để so sánh khả năng loại gốc tự do của các chất kháng oxy hóa; giá trị IC50 càng nhỏ, khả năng loại trừ gốc tự do của dịch quả lêkima thủy phân có khả năng loại gốc tự do càng mạnh. Kết quả phân tích hàm lượng TPC và DPPH ở các nghiệm thức nhận thấy có mối tương quan nghịch giữa hàm lương TPC và khả năng loại gốc tự do thông qua giá trị IC50 với R^2=0,993 (Hình 1B). Khi hàm lượng TPC ở các nồng độ pectinase khảo sát càng cao, hoạt tính kháng oxy hóa càng mạnh thì khả năng loại gốc tự do của DPPH càng cao, nghĩa là IC50 càng nhỏ (Miliauskas *et al.*, 2004), giá trị IC50 giảm từ 9,519 mg/mL xuống 7,833 mg/mL tương ứng, khi thay đổi hàm lượng pectinase từ 0-6 wt%. Từ kết quả trên, nồng độ tối ưu cho quá trình thủy phân dịch quả lêkima bằng enzyme pectinase là 0,6 wt%.

3.2. Ảnh hưởng nồng độ enzyme cellulase

Tương tự như pectinase, ảnh hưởng của hàm lượng cellulase lên TPC và hoạt tính kháng oxy hóa của dịch chiết cũng được khảo sát ở các mức nồng độ khác nhau từ 0-1 wt%. Các yếu tố khác được cố định như pH 5, nhiệt độ thủy phân 40°C và thời gian thủy phân 45 phút (nồng độ enzyme pectinase 0,6 wt%). Kết quả được trình bày trong hình 2A và 2B.

Theo hình 2A cho thấy, hàm lượng TPC tăng khi tăng nồng độ emzyme cellulase, ở nồng độ cellulase 0,6 wt% cho hàm lượng TPC cao hơn đáng kể so với nồng độ 0,2 wt% và 0,4 wt% ($p<0,05$) là 7,938±0,06 mgGAE/g và không sự khác biệt về mặt thống kê khi nồng độ enzyme sử dụng tiếp tục tăng. Khác với pectinase, cellulase tác động đến thành phần cellulose ở lớp tế bào lamella chính và giữa của các tế bào thực vật. Lớp lamella chính được cấu tạo bởi một cấu trúc vững chắc các cellulose liên kết với các hemicellulose, pectin và glycoprotein. Cellulase giúp xúc tiến sự phân hủy cellulose thành glucose và cellobiose (Choudhari & Ananthanaraya, 2007). Trên thực tế, cellulose thúc đẩy quá trình thủy phân các liên kết endo-1, 4-ß-d-glycosid trong cellulose, cũng như chuyển hóa cello-oligosacarit cellotriose thành cellohexaose. Vì vậy, xử lý enzyme làm tăng khả năng phá hủy thành tế bào, tăng khả năng hòa tan và giải phóng các hợp chất có hoạt tính sinh học (Sharma *et al.*, 2014; Neidhart *et al.*, 2002). Điều này

hoàn toàn phù hợp với kết quả thu được, khi thay đổi nồng độ cellulase thì khả năng kháng oxy hóa dịch quả cũng thay đổi, nồng độ cellulase tăng từ 0 đến 1 wt% thì khả năng bắt gốc tự do của dịch thủy phân cũng tăng theo, từ 69,48±0,33% lên 77,27±2,27% và cũng không có sự khác biệt khi phân tích ANOVA ở tỷ lệ enzyme cellulase sử dụng từ 0,6-1 wt%.



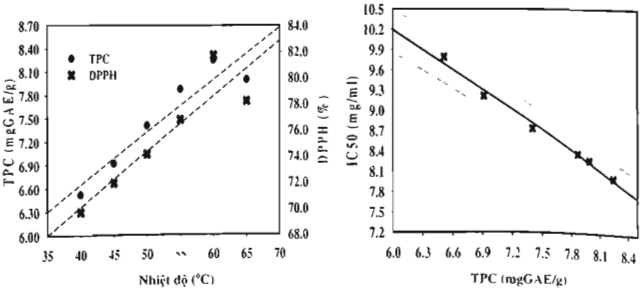
(A) (B)

Hình 2. Ảnh hưởng nồng độ enzyme cellulase (A) đến TPC (A) và tương quan giữa TPC-IC50 (B)

Mặt khác dựa vào hình 2B cũng cho thấy giữa hàm lượng TPC và giá trị IC50 cũng có mối tương quan nghịch, giá trị IC50 giảm từ 9,636 mg/mL xuống 8,169 mg/mL, với giá trị R^2 của phương trình hồi quy khá cao (0,987). Dựa vào các kết quả phân tích trên, nồng độ enzyme cellulase 0,6 wt% được lựa chọn cho bước nghiên cứu tiếp theo.

3.3. Ảnh hưởng nhiệt độ thủy phân

Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân đến TPC và khả năng kháng oxy hóa của dịch quả lêkima được khảo sát với nhiệt độ thay đổi từ 40-65^{0}C trong 45 phút, pH 5, nồng độ enzyme pectanse 0,6 wt%, nồng độ enzyme cellulase 0,6 wt%. Hoạt tính sinh học của dịch quả lêkima và kết quả kháng oxy hóa được trình bày trong hình 3.



(A) (B)

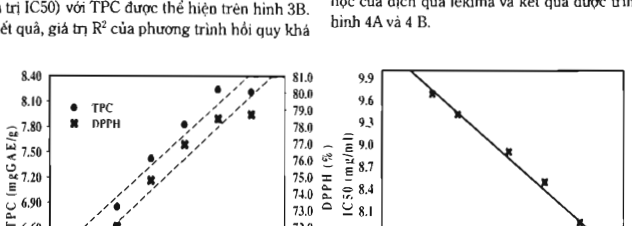
Hình 3. Ảnh hưởng nhiệt độ thủy phân đến TPC (A) và tương quan giữa TPC-IC50 (B)

Hình 3A thể hiện ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân đến hàm lượng TPC và hoạt tính kháng oxy hóa của dịch quả lêkima. Kết quả cho thấy, khi tăng nhiệt độ thủy phân từ 40 lên 60^{0}C, hàm lượng TPC và

DPPH tăng lên đáng kể ($p<0,05$), từ 6,518±0,05 - 8,251±0,05 (mgGAE/g) và 69,74±3,24 - 81,73±2,91 (%), tuy nhiên nếu tiếp tục tăng lên 65°C thì TPC và DPPH lại có khuynh hướng giảm (7,997 mgGAE/g và 78,23%). Điều này có thể được lý giải là khi tăng nhiệt độ, khả năng phân cắt của các phân tử peptide ra môi trường thủy phân tốt hơn và vì vậy thu nhận được nhiều các chất hoạt tính chống oxy hóa hơn (polyphenol nhiều hơn), do vậy hoạt tính chống oxy hóa cũng tăng lên. Sự đóng góp của các hợp chất polyphenol đến khả năng kháng oxy hóa của các loại thực phẩm được xác định từ mối tương quan giữa TPC và khả năng chống oxy hóa (Komes *et al.*, 2010; Vaquero *et al.*, 2010). Trong nghiên cứu này, mối tương quan giữa hoạt tính kháng oxy hóa (thể hiện qua giá trị IC50) với TPC được thể hiện trên hình 3B. Theo kết quả, giá trị R^2 của phương trình hồi quy khá cao (0,987), đã cho phép khẳng định các hợp chất polyphenol đóng góp chính vào khả năng chống oxy hóa cho dịch lêkima. Từ những kết quả đạt được, chọn nhiệt độ thủy phân 60°C cho những thí nghiệm tiếp theo.

3.4. Ảnh hưởng thời gian thủy phân

Việc lựa chọn thời gian thủy phân thích hợp là bước cuối cùng trong chuỗi thí nghiệm và thời gian thủy phân cũng là một nhân tố quan trọng ảnh hưởng đến quá trình thủy phân. Quá trình thủy phân được thực hiện ở một số thông số cố định: pH 5, nồng độ enzyme pectianse 0,6 wt%, nồng độ enzyme cellulase 0,6 wt%, nhiệt độ thủy phân 60°C. Với thời gian thủy phân thay đổi từ 45-75 phút. Hoạt tính sinh học của dịch quả lêkima và kết quả được trình bày ở hình 4A và 4 B.



(A) (B)

Hình 4. Ảnh hưởng thời gian thủy phân đến TPC (A) và tương quan giữa TPC-IC50 (B)

Theo hình 4A, hàm lượng TPC và DPPH tăng đáng kể theo thời gian và đạt đến đỉnh điểm tương ứng với thời gian 65 phút (8,239±0,07 mgGAE/g và 78,73±2,71%). Khi thời gian tăng từ 45 đến 70 phút thì TPC tăng 1,652 mgGAE/g. Thời gian thủy phân dài thì mức độ thủy phân tốt dẫn đến hoạt tính sinh học của dịch thủy phân tăng. Tuy nhiên khi mức độ thủy phân càng sâu sắc thì hoạt tính sinh học của dịch thủy phân có xu hướng giảm (78,47% ở 70 phút), không khác biệt thống kê so với thời gian 65 phút, nguyên nhân có thể là do sự suy thoái của các hợp chất phenolic do sự hiện diện của oxy trong môi trường thủy phân. Trong nghiên cứu này, mối tương quan giữa giá trị IC50 với TPC được thể hiện trên hình 4B, theo kết quả thống kê cho phương trình hồi quy có R^2= 0,988 khi giá trị IC50 giảm từ 9,686 mg/mL xuống 7,814 mg/mL, điều này có thể khẳng định các hợp chất polyphenol đóng vai trò chính vào khả năng kháng oxy hóa của dịch lêkima. Từ những kết quả đạt được, chọn thời gian thủy phân 65 phút là tối ưu nhất.

4. KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu có thể thấy rằng thủy phân lêkima dưới tác dụng của enzyme là phương pháp hiệu quả giúp tăng hàm lượng phenolic tổng số và do đó tăng khả năng kháng oxy hóa. Điều kiện tối ưu cho quá trình thủy phân là xử lý ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 65 phút với nồng độ enzyme pectianse 0,6 wt%/cellulase 0,6 wt%. Giá trị TPC và hoạt tính kháng oxy hóa của dịch thủy phân đạt cao

nhất là 8,239±0,07 mgGAE/g và 78,73±2,71% tương ứng với IC50 là 7,818 mg/mL. Kết quả của nghiên cứu góp phần cung cấp những dẫn liệu khoa học quý giá về quả lêkima, có ý nghĩa quan trọng trong việc sử dụng có hiệu quả quả lêkima.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Anshu Singh, Arindam Kuila, Geetanjali Yadav and Rintu Banerjee, 2011. Process Optimization for the Extraction of Polyphenols from Okara. Food Technol. Biotechnol. 49 (3) 322–328. ISSN 1330-9862.

2. Apostolidis E., Genovese MI., Lajolo FM., Pinto Mda S., Ranilla LG., and Shetty K., (2009). Evaluation of antihyperglycemia and antihpertension potential of native Peruvian fruits using in vitro models. Journal of Medicinal Food, 12:278-91.

3. Bolanho Beatriz Cervejeira, Adelaide Del Pino Beléia, 2011. Bioactive compounds and antioxidant potential of soy products. Alim. Nutr., Araraquara, 22(4): 539-546.

4. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E, Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Science and Technology. 28: 25-30.

5. Choudhari, S. M., & Ananthanarayan, L. (2007). Enzyme aided extraction of lycopene from tomato tissues. Food Chemistry, 102, 77–81. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.04.031

6. Duarte, Odilo, Paull, and Robert (2015). Exotic Fruits and Nuts of the New World. CABI, 117–123.

7. Đỗ Tất Lợi (2012). Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản Y học.

8. Fernández, K., Vega, M., & Aspé, E. (2015). An enzymatic extraction of proanthocyanidins from País grape seeds and skins. Food Chemistry, 168, 7–13. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.021

9. Jin D. and Russell J. M. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and antioxidant and anticancer properites. Molecules, 15: 7313-7352.

10. Komoes D., D. Horzić, A. Belseak, K. K. Ganić and I. Vulić, 2010. Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. Food Research International 43(1): 167-176.

11. Madhavi D. L., Deshpande S. S. and Salunkhe D. K., 1995. Food antioxidants: technological, toxicological and health perspectives. New York: Marcel Dekker, 490p.

12. Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., and Beek, T. A., 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food Chemistry, 85: 231–237.

13. Miron, T. L., Herrero, M., & Ibáñez, E. (2013). Enrichment of antioxidant compounds from lemon balm (Melissa officinalis) by pressurized liquid extraction and enzyme-assisted extraction. Journal of Chromatography A, 1288, 1–9. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.075

14. Neidhart, S., Reiter M., Mensah-Wilson, M., Stemmer, G., Braig, C., Sevinç, S. and Carle, R., 2002. Possibilities for improving quality of fruit juices and drinks from tropical fruits by homogenization and addition of pectin. In International Symposium Sustaining Food Security and Managing Natural Resources in Southeast Asia, Jan, pp. 8-11.

15. Nguyễn Nhật Minh Phương, Lý Nguyễn Bình, Châu Trần Diễm Ái và Chê Văn Hoàng, 2011. Tác động enzyme pectinase đến khả năng trích ly dịch quả và các điều kiện lên men đến chất lượng rượu vang xoài sau thời gian lên men chính. Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ, 20(a): 127-136.

16. Petti, S. and Scully, C., 2009. Polyphenols, oral health and disease: a review. Journal of Dentistry. 37: 413-423.

17. Pinelo, M., Tress, A. G., Pedersen, M., Arnous, A., & Meyer, A. S. (2007). Effect of cellulases, solvent type and particle size distribution on the extraction of chlorogenic acid and other phenols from spent coffee grounds. American Journal of Food Technology, 2, 641–651.

18. Sharma, H. P., Patel, H. and Sharma, S., 2014. Enzymatic extraction and clarification of juice from various fruits: A Review. Trends in Post Harvest Technology, 2(1): 01-14.

19. Susu Jiang, Weixi Cai and Baojun Xu (2013). Food Quality Improvement of Soy Milk Made from Short-Time Germinated Soybeans. Foods 2, 198-212.

20. Yahia *E.* M. and Gutterrez-Orozco F. (2011). Lucuma (*Pouteria lucuma*). Autonomous University of Queretaro, Mexico.

21. Vaquero M. R., L. T. Serravalle, M. M. De Nadra and A. S. De Saad, 2010. Antioxidant capacity and antibacteria activity of phenolic compounds from argentinean herbs infusions. Food Control 21(5):779-785.

EFFECTS OF ENZYMATIC HYDROLYSIS ON TOTAL POLYPHENOL CONTENTAND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *Pouteria campechiana*

Tran Xuan Hien, Huynh Lien Huong, Nguyen Trung Thanh

Summary

Phytochemistry and antioxidant properties of *Pouteria campechiana* has not been well studied in Vietnam. This study was conducted to evaluate the effect of enzymatic hydrolysis on total polyphenol content and antioxidant activity of *Pouteria campechiana* hydrolysate. Important parameters affecting hydrolysis process including type of enzyme (pectinase, cellulase), enzyme concentration, hydrolysis temperature and reaction time were investigated. Experimental results showed that at pectinase as well as cellulase concentration enzyme of 0.6 wt%, reaction temperature 60°C and duration of 65 minutes, highest TPC of 8.239 ± 0.07 mgGAE/g was obtained while DPPH test results indicated that antioxidant property of the hydrolysate was 78.73 ± 2.71% with an IC50 value of 7.944 mg/mL. The results of this study provides valuable nutrion information of *Pouteria campechiana*, especially for the food industry.

Keywords: *Pouteria campechiana, phenolics, hydrolysis, antioxidant activity, DPPH radical scavenging activity.*

Người phản biện: TS. Trần Thị Mai
Ngày nhận bài: 10/3/2020
Ngày thông qua phản biện: 10/4/2020
Ngày duyệt đăng: 17/4/2020