



VÔ HOẠT ENZYME LIPOXYGENASE TRONG CÁM GẠO BẰNG ENZYME BROMELAIN

Inactivating enzyme lipoxygenase in rice bran by enzyme bromelain

Lê Hoàng Phượng

lhphuong@vnkgu.edu.vn

Trung tâm Quản lý Thực hành – Thí nghiệm, Trường Đại học Kiên Giang
Đến tòa soạn: 16/06/2017; Chấp nhận đăng: 07/09/2017

Abstract. Rice bran is a by-product and main material for the animal feed production, this material is obtained from the outer layer of brown rice kernel during milling. It is rich in nutrients with 14÷16% of protein, 12÷23% fat, and 8÷10% crude fiber. It is also a good source of B vitamins and minerals. Spoilage was caused by oxidative rancidity involves a reaction between the lipid and molecular oxygen. The study was performed to seek the optimal conditions for the inactivation of lipoxygenase (LOX) of rice bran using bromelain. The effects of temperature, pH, time and concentration of bromelain on the inactivation of LOX were studied. The results showed that the bromelain had positive effect on LOX inactivation with optimal temperature of 47 °C and pH of 7.6.

Keywords: Bran rice; Lipoxygenase; LOX; Inactivation; Bromelain

Tóm tắt. Cám gạo là sản phẩm phụ của quá trình xay xát gạo, là nguồn nguyên liệu chính cho ngành chăn nuôi với hàm lượng các chất dinh dưỡng rất cao, bao gồm 14÷16% protein, 12÷23% chất béo, 8÷10% chất xơ hòa tan và giàu chất khoáng. Tuy nhiên, cám gạo rất dễ bị hư hỏng do lipid dễ bị oxy hóa. Nghiên cứu được thực hiện nhằm vô hoạt enzyme lipoxygenase (LOX), một enzyme oxy hóa chất béo có trong bản thân phụ phẩm cám bằng cách sử dụng enzyme bromelain. Ảnh hưởng của các yếu tố nhiệt độ, pH, hàm lượng bromelain và thời gian xử lý lên khả năng vô hoạt LOX được khảo sát. Kết quả cho thấy enzyme bromelain có tác dụng rất rõ rệt trong việc vô hoạt LOX. Nhiệt độ ở mức 47 °C và pH 7,6 là các thông số tối ưu cho quá trình vô hoạt LOX bằng bromelain.

Từ khóa: Cám gạo; Lipoxygenase; LOX; Vô hoạt; Bromelain

1. TỔNG QUAN

Cây lúa có vị trí đặc biệt quan trọng ở đồng bằng Cửu Long (ĐBSCL), đóng góp 50% sản lượng lúa và 90% sản lượng gạo xuất khẩu của cả nước. Với năng lực và tiềm năng lớn trong lĩnh vực nông nghiệp, Việt Nam đang khẳng định vị thế hàng đầu về xuất khẩu gạo. Trong quy trình sản xuất, bên cạnh sản phẩm chính là gạo còn có các sản phẩm phụ khác. Tại hội thảo “Sử dụng phụ phẩm từ sản xuất lúa gạo” do Viện Nghiên cứu lúa Quốc tế (IRRI) tổ chức tại TP Cần Thơ vào ngày 3-3-2015, PGS-TS Dương Văn Chín, Giám đốc Trung tâm Nghiên cứu Nông nghiệp Định Thành (thuộc Công ty Cổ phần Bảo vệ thực vật An Giang), cho biết, ĐBSCL mỗi năm sản xuất được 25 triệu tấn lúa, đồng nghĩa với việc có 25 triệu tấn rơm, 5 triệu tấn trấu, 2,6 triệu tấn cám. Rõ ràng, nguồn phụ phẩm của ngành chế biến gạo rất dồi dào, tiềm năng khai thác rất lớn. Trong đó, cám gạo là nguồn nguyên liệu chứa nhiều dưỡng chất sử dụng cho nhiều lĩnh vực như thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm [1]. Cám gạo chiếm đến khoảng 10% của tổng trọng lượng của gạo thô, bao gồm: vỏ bì, vỏ lụa, lớp cutin của nhân, tầng aleuron và phôi mầm. Cám gạo giàu vitamin, khoáng chất, các acid béo thiết yếu, chất xơ và sterol khác. Với 14÷16% protein, 12÷23% chất béo, 8÷10% chất xơ. Cám gạo cũng là nguồn giàu vitamin B và các chất khoáng như sắt, kali, magiê, mangan, clo [2]. Tuy nhiên, hư hỏng lớn nhất, cần quan tâm nhất là sự ôi hóa dầu do hoạt động của enzyme lipase và lipoxygenase (LOX) làm oxy hóa các acid béo chưa no (chưa bão hòa) như acid linoleic, acid linolenic để hình thành các hydroperoxide và tạo thành các hợp chất có nhóm cacbonyl có mùi ôi khét làm thay đổi mùi vị tự nhiên của cám gạo và có thể tạo thành các chất gây ung thư [3].

Nhiều nhà nghiên cứu đã khẳng định LOX là nguyên nhân gây ra sự tăng mùi ôi khét trong hạt đậu giống Anh và đang

tối ưu hóa những điều kiện cần thiết để ức chế LOX trong sản phẩm như đã nghiên cứu ức chế được 99% LOX ở 91 °C và còn lại 70% protein hòa tan [4] [5]. Bên cạnh đó, các nhà khoa học cũng đã nghiên cứu những phương pháp để vô hoạt LOX như thêm chất chống oxy hóa, điều chỉnh pH, dùng nhiệt [6]. LOX chịu trách nhiệm trong việc làm thay đổi hương thơm trong chuối, cỏ, đậu, quả chưa chín và hình thành amoniac cũng như một phần của thành phần chua. Đồng thời, khả năng chịu nhiệt của LOX ở trong những nguyên liệu khác nhau có thay đổi. Ví dụ, LOX trong đậu thì xử lý nhiệt ở 60 °C nhưng LOX trong măng tây thì bền nhiệt hơn [7] Do đó, những nghiên cứu từ trước đến nay thường bỏ trí ở đây nhiệt độ từ 50 °C trở lên với thời gian xử lý 10 phút.

Từ các nghiên cứu đã công bố, nhận thấy rằng: nguồn cám gạo trong nước rất lớn nhưng khó khăn ở vấn đề bảo quản. Có nhiều nghiên cứu xoay quanh các phương pháp bảo quản cám như ép đùn, dùng microwave nhưng vẫn chưa mang lại kết quả ưu việt. Do đó, cùng với sự phát triển của ngành Công nghệ sinh học, enzyme ngày càng được sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực. Trong phạm vi nghiên cứu này, tác giả đã sử dụng bromelain (EC 3.4.22.32) là một trong những enzyme được ứng dụng nhiều nhất, để vô hoạt LOX nhằm hạn chế sự hư hỏng cám gạo.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu

- Cám gạo được mua tại Nhà máy xay xát lúa Thành Công, huyện Phong Điền, thành phố Cần Thơ.

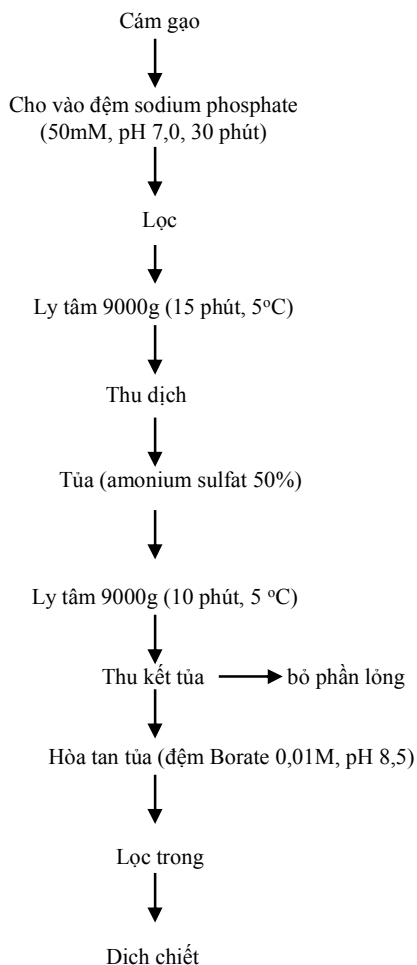
- Hóa chất: Enzyme bromelain (Merck), Na₂HPO₄, NaH₂PO₄ (Merck), NH₄NO₃, Na₂B₄O₅(OH)₄ (Merck), Acid linoleic (Merck), Acid boric (Trung Quốc), Acid HCl (Trung

Quốc), Ethanol nguyên chất (Trung Quốc), Acid ascorbic (Trung Quốc).

- Thiết bị: Máy quang phổ (U2800 Shimazu, Nhật Bản), máy đông khô (Thermo Scientific), máy ly tâm (Hermele Z323K, Đức), máy đồng hóa mẫu siêu âm (Ultrasonic Cleaner), bể điều nhiệt (Grant), máy khuấy từ (HB 502), micropipet 20÷200 μ L, 100÷1000 μ L và một số dụng cụ thông thường phòng thí nghiệm.

- Phương pháp nghiên cứu: Sử dụng enzyme bromelain thương mại, cùng một nguồn cám gạo trong suốt thí nghiệm ức chế hoạt động của enzyme lipoxygenase.

Quy trình trích ly enzyme lipoxygenase trong cám gạo



Hình 1. Sơ đồ quy trình trích ly dịch cám

Từ dịch trích ly, tác giả tiến hành bố trí thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ, pH, thời gian vô hoạt enzyme lipoxygenase và tỉ lệ enzyme bromelain sử dụng, đồng thời, sản xuất thử nghiệm và đánh giá chất lượng bột cám thu được thông qua các chỉ tiêu hoá lý.

Kết quả thí nghiệm được xử lý theo phần mềm Excel, SAS 9.1. Hoạt tính enzyme lipoxygenase được xác định theo phương pháp quang phổ.

Chỉ số peroxyde phân tích theo phương pháp AOAC.

Hàm lượng protein tổng xác định theo phương pháp Kjeldahl.

Hàm lượng khoáng tổng theo phương pháp AOAC.

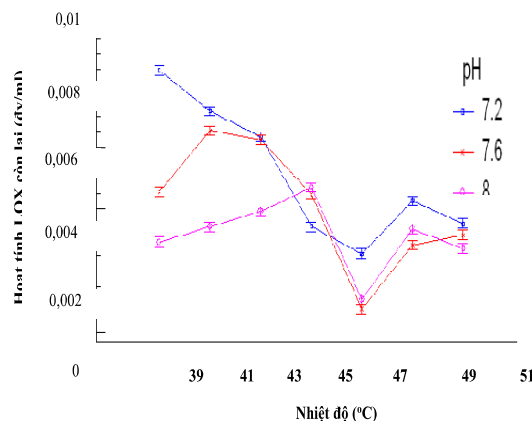
3. KẾT QUẢ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng nhiệt độ và pH đến khả năng ức chế lipoxygenase (LOX) của enzyme bromelain

Trong phản ứng enzyme, nhiệt độ và pH là hai yếu tố quan trọng. Ở mỗi công trình nghiên cứu người ta thường chọn một khoảng (dãy) nhiệt độ và pH để khảo sát.

Theo Nguyễn Đức Lượng, enzyme bromelain có biên độ pH rộng (3÷10) nhưng pH tối thích của enzyme là 5÷8 tùy thuộc vào cơ chất [8]. Bromelain ở thân cho hoạt tính cao nhất ở pH 6÷8. Nhiều nghiên cứu nước ngoài cũng đã có chỉ ra rằng bromelain thể hiện hoạt độ cao nhất ở khoảng nhiệt độ từ 35÷55°C với pH dung dịch đệm là 6,8÷7,8 [9], hay dãy nhiệt độ mà enzyme bromelain hoạt động tốt trong khoảng từ 45÷70 °C [10]. Nhưng ở 55°C enzyme này giảm 50% hoạt tính [8]. Do đó cần tìm nhiệt độ tối ưu của bromelain. Ở thí nghiệm 1, nhiệt độ môi trường được theo dõi ở khoảng từ 39÷51°C và dãy pH 7,2÷8,0. Đây là những dãy thông số có ảnh hưởng đến khả năng hoạt động của bromelain [9].

Ở pH 7,2 hoạt tính LOX còn lại là cao nhất, trong khi ở pH 8,0 hoạt tính LOX còn lại là thấp nhất. Các mức pH 7,2, pH 7,6 và pH 8,0 cho các giá trị hoạt tính LOX còn lại khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%. Nhiệt độ là yếu tố quan trọng trong phản ứng enzyme. Nhiệt độ 47°C cho hoạt tính LOX còn lại thấp nhất, nhiệt độ 41°C cho hoạt tính LOX còn lại cao nhất.

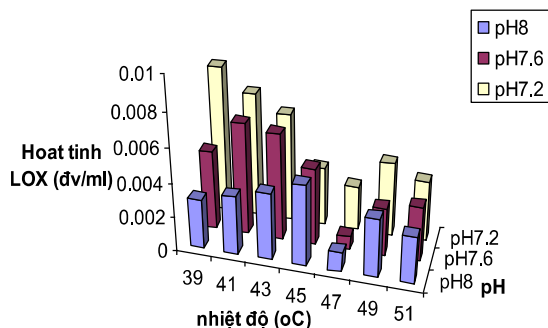


Hình 2. Sự tương tác giữa nhiệt độ và pH lên phản ứng vô hoạt enzyme lipoxygenase (LOX)

Theo Hình 2, hoạt tính còn lại của enzyme lipoxygenase cao trong khoảng nhiệt độ từ 39÷43 °C, đây là dãy giá trị trong dãy nhiệt độ của Waliszewski và Corzo đã khảo sát [9]. Ở nhiệt độ 45 °C xu hướng tác động có sự thay đổi. Ở nhiệt độ 47 °C, hoạt tính còn lại của LOX là thấp nhất. Nếu tăng nhiệt độ môi trường lên 49 °C thì hoạt tính còn lại của LOX tồn tại ở mức cao hơn. Điều này có nghĩa là hoạt tính của bromelain giảm. Và nếu tiếp tục tăng nhiệt lên 51 °C thì hoạt tính LOX còn lại giảm xuống. Do nhiệt đã tác động lên cả hai enzyme [8]. Vì vậy, ở 47 °C là nhiệt độ thích hợp cho quá trình vô hoạt LOX vì nếu nâng nhiệt, bromelain sẽ giảm hoạt tính (hay hoạt tính LOX còn lại cao). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của tác giả trước đó, enzyme LOX hoạt động mạnh trong khoảng nhiệt độ 15÷50 [11].

Ba mức pH khảo sát cho ba giá trị hoạt tính LOX còn lại khác nhau và sự khác biệt là có ý nghĩa thống kê. Mức pH 7,6 cho kết quả vô hoạt LOX tốt nhất (hoạt tính còn lại của LOX thấp nhất). Từ kết luận của các tác giả trước đã nêu ra khoảng pH của dung dịch đệm tối ưu cho enzyme bromelain thân là 6,8÷7,8, đồng thời, chứng minh LOX của dịch trích cám thô hoạt động thích hợp ở pH 8,5 và giảm dần đến giá trị pH 6,5 [9], [12]. Vì vậy, giá trị pH tối ưu để vô hoạt LOX

tim được trong nghiên cứu này (pH 7,6) là phù hợp với các kết quả trước đó. Tuy nhiên, phản ứng này xảy ra giữa hai enzyme nên yếu tố môi trường ảnh hưởng rất nhiều đến kết quả thu được. Chúng có tác động lẫn nhau, phụ thuộc vào cơ chất, nhiệt độ, pH. Mỗi liên hệ này đã được Nguyễn Đức Lượng nêu rõ: ở 5°C, enzyme bromelain cho hoạt tính tối đa trên casein trong khoảng pH 4÷10; trong khi ở pH 6,1, nhiệt độ 55°C thì enzyme bị mất 50% hoạt tính [8]. Điều này cho thấy mối quan hệ mật thiết giữa nhiệt độ và pH.

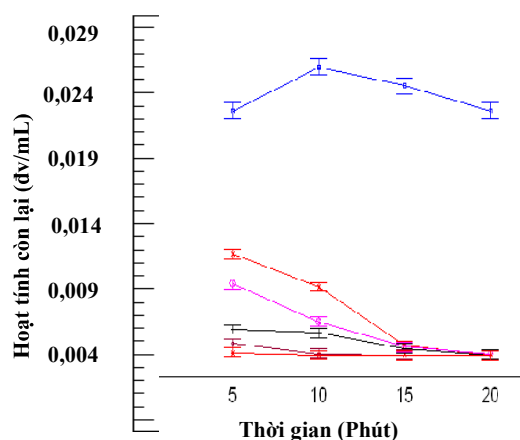


Hình 3. Ảnh hưởng của thời gian và tỉ lệ enzyme lên khả năng vô hoạt enzyme lipoxygenase (LOX) của enzyme bromelain

Dựa vào Hình 3 nhận thấy rằng, pH và nhiệt độ tác động đồng thời lên phản ứng thủy phân LOX của bromelain. Ở ba giá trị pH đều cho thấy sự khác biệt. Ở nhiệt độ 47°C và pH 7,6 thì cho thấy hiệu quả thủy phân LOX là tốt nhất hay hoạt tính LOX còn lại thấp nhất.

3.2 Ảnh hưởng tỉ lệ bromelain và thời gian xử lý đến khả năng vô hoạt lipoxygenase (LOX) của enzyme bromelain

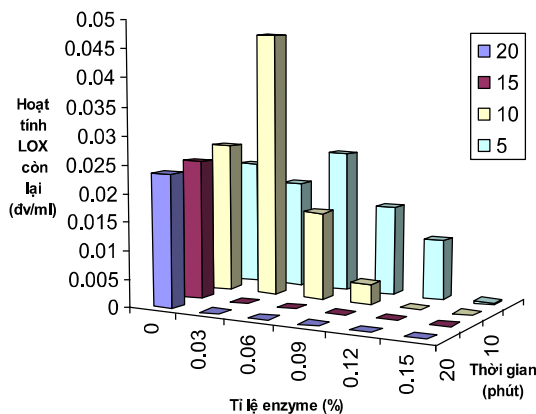
Thí nghiệm 1 đã tìm ra thông số nhiệt độ, pH tối ưu cho phản ứng enzyme. Hoạt tính LOX thu được giảm rõ khi cho enzyme bromelain vào dịch chiết: ở mức bromelain sử dụng là 0,003% hoạt tính còn lại của LOX thấp. Tăng tỉ lệ bromelain lên 0,015 % thì hoạt tính còn lại của LOX là thấp nhất. Thời gian vô hoạt tăng, hoạt tính LOX giảm nhưng không đều.



Hình 4. Ảnh hưởng tỉ lệ bromelain và thời gian xử lý lên khả năng vô hoạt lipoxygenase (LOX)

Ở mức thời gian xử lý là 5 và 10 phút, hoạt tính còn lại của LOX là giảm. Khi tăng thời gian xử lý lên 15 và 20 phút thì hoạt tính còn lại của LOX giảm tối đa và thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa.

Đồ thị ở Hình 4 cho thấy, hiệu quả vô hoạt LOX càng cao khi thời gian xử lý càng kéo dài. Kết quả này, theo những công trình nghiên cứu đã công bố, là rất hợp lý. Hình 4 cho thấy rằng enzyme bromelain có khả năng vô hoạt lipoxygenase. Cụ thể, hoạt tính LOX giảm rất nhanh khi bổ sung bromelain vào dịch chiết và khi tăng tỉ lệ bromelain lên càng cao thì hoạt tính LOX còn lại giảm dần và tiến về gần không (0). Điều này có nghĩa càng tăng nồng độ enzyme thì phản ứng enzyme càng xảy ra mạnh mẽ [8].



Hình 5. Ảnh hưởng của thời gian và tỉ lệ enzyme lên khả năng vô hoạt enzyme lipoxygenase (LOX) của enzyme bromelain

Kết quả thu được chỉ ra rằng, tỉ lệ enzyme xúc tác và thời gian để phản ứng xảy ra có sự tương tác với nhau. Thời gian càng dài, tỉ lệ enzyme sử dụng càng cao càng tạo điều kiện nâng cao hiệu quả phản ứng thủy phân. Khi đó, bromelain có thời gian cắt các mạch liên kết của LOX nên vô hoạt được enzyme này. Cũng qua hình 5, một lần nữa khẳng định rằng enzyme có hoạt lực xúc tác rất lớn (lượng enzyme dùng làm chất xúc tác rất ít) [13] và đồng thời, enzyme có tính đặc hiệu cao.

4. KẾT LUẬN

Qua quá trình tiến hành thí nghiệm các kết luận sau đây được rút ra:

- Thu được kết quả bước đầu của quá trình vô hoạt enzyme lipoxygenase trong cám gạo bằng enzyme bromelain thương mại.
- Từ các bố trí thí nghiệm, một lần nữa khẳng định mối tương tác giữa pH và nhiệt độ, nồng độ enzyme và thời gian thủy phân, đồng thời cũng thể hiện rõ sự ảnh hưởng của các yếu tố này lên phản ứng enzyme.
- Trong môi trường là dịch chiết từ cám, hoạt tính của bromelain mạnh nhất ở pH 7,6, nhiệt độ 47°C, nồng độ bromelain sử dụng từ 0÷0.015% trong khoảng thời gian từ 5÷20 phút.

Với những kết quả này, cám gạo có thể được xử lý an toàn và sử dụng làm nguyên liệu chế biến thành các sản phẩm thực phẩm tốt cho sức khỏe.

5. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Khalid Gul, Basharat Yousuf, A.K.Singh, PreetiSingh, and AliAbasWani, "Rice bran: Nutritional values and its emerging potential for development of functional food — A review," Bioactive Carbohydrates and dietary Fibre, vol. 6, pp. 24–30, 2015.
- [2] R. M. Saunder, "Rice bran: composition potential food sources,"

- Food Review International, vol. 1(3), pp. 465–495, 1985.
- [3] Fatemeh Malekian, Ramu M. Rao, Witoon Prinyawiwatkul, Wayne E. Marshall, Marlene Windhauser, and Mohammed Ahmedna, Lipase and Lipoxygenase Activity, Functionality, And Nutrient Losses in Rice Bran During Storage. Bulletin, 2000.
- [4] William et al., “Characterisation of lipoxygenase isoforms from olive callus cultures,” Phytochemistry, p. 2532–2538, 2008.
- [5] A. Brown, B.D., Wei, L.S., Steinberg, M.P. and Villota, “Minimizing protein insolubilization during thermal inactivation of lipoxygenase in soybean cotyledons,” J. Am. Oil Chem. Soc., vol. 59, no. 2, pp. 88–92, 1982.
- [6] O’Brien and O’Connor, “Significance of lipoxygenase in fruit and vegetables,” Food Enzymol., pp. 338–364, 1991.
- [7] J. R. Ganthavorn, C., Nagel, C.W. and Powers, “Thermal inactivation of asparagus lipoxygenase and peroxidase,” Journal of Food Science, vol. 56, no. 1, pp. 47–49, 1991.
- [8] Nguyễn Đức Lương, Công nghệ enzyme. 2004.
- [9] K. Waliszewski and C. Corzo, “Crude fruit-bromelain affinity to different protein substrates,” IFT Annu. Meet., 2004.
- [10] S. J. Bollag, D.M. and Edelman, “Protein methods,” Willey – LISS, inc. New York., 1991.
- [11] M. et. al. Fatemeh, “Lipase and lipoxygenase activity, functionality, and nutrient losses in rice bran during storage,” Bulletin, vol. 870, 2000.
- [12] M. R. Shastry, B.S. and Raghavendra Rao, “Studies on lipoxygenase from rice bran,” Cereal Chem., vol. 52, pp. 597–603, 1975.
- [13] Nguyễn Trọng Căn, Nguyễn Thị Hiền, Đỗ Thị Giang, và Trần Thị Luyến, Công nghệ Enzyme. 1998.

TIỂU SỬ TÁC GIẢ



Lê Hoàng Phương

Tốt nghiệp Thạc sĩ tại Trường Đại học Cần Thơ năm 2010 chuyên ngành Công nghệ Thực phẩm và Đồ uống. Hiện là nghiên cứu sinh của Trường Đại học Cần Thơ. Tác giả là Phó giám đốc Trung tâm Quản lý Thực hành - Thí nghiệm của Trường Đại học Kiên Giang. Lĩnh vực quan tâm và nghiên cứu: Chế biến thực phẩm và đồ uống từ nguyên liệu nông nghiệp, đặc biệt là những loại nông sản là thế mạnh của Đồng bằng Sông Cửu Long, nhằm góp phần nâng cao giá trị dinh dưỡng và kinh tế cho người dân.