Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ
website: sj.ctu.edu.vn

CÁC TÍNH CHẤT CƠ BẢN CỦA POLYPHENOL OXYDASE TRÍCH LY TỪ CỦ KHOAI LANG TRẮNG *(IPOMOEA BATATAS L.)*

Trần Thanh Trúc[1], Huỳnh Ngọc Tâm[1] và Nguyễn Văn Mười[1]
[1] *Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ*

Thông tin chung:
Ngày nhận: 26/9/2014
Ngày chấp nhận: 07/11/2014

Title:
Basic properties of enzyme polyphenol oxydase in white sweet potatoes (Ipomoea batatas L.)

Từ khóa:
Độ bền nhiệt, hoạt tính, khoai lang trắng, nhiệt độ, polyphenol oxydase, pH, ức chế

Keywords:
pH, polyphenol oxydase, inactivation, temperature, thermal stability, white sweet potatoes

ABSTRACT

The study was conducted to determine the basic properties of polyphenol oxidase (PPO) in the white sweet potato (Ipomoea batatas L.). The result showed that PPO reached the highest activity in 30°C and pH 8.0. Initial PPO activity was 256.92 U/g dry material. The K_m constant and V_{max} value were 27.4 mM and 7.55×10^{-3} OD/s on the substrate catechol, respectively. It is clear that sweet potato PPO belongs to the group of heat-stable enzyme. PPO activity of white sweet potato was maintained at 4°C and lost 80% of its activity at 80°C. Enzymatic inhibitor studies indicated that sodium bisulphite was the most potent inhibitor for white sweet potato PPO, followed by ascorbic acid, citric acid and sodium chloride.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu xác định các tính chất cơ bản của enzyme polyphenol oxydase (PPO) có trong khoai lang trắng (Ipomoea batatas L.). Kết quả khảo sát cho thấy, PPO có hoạt tính cao nhất ở 30°C tương ứng với giá trị pH bằng 8,0. Hoạt tính PPO ban đầu đạt 256,92 U/g (tính trên thành phần chất khô của nguyên liệu). Hằng số K_m = 27,4 mM và vận tốc phản ứng cực đại V_{max} = $7,55.10^{-3}$ OD/ giây trên cơ chất catechol. Kết quả khảo sát đã khẳng định PPO từ khoai lang trắng thuộc nhóm enzyme bền nhiệt. Hoạt tính PPO được duy trì ở 4°C, enzyme giảm gần 80% hoạt tính ban đầu ở 80°C. Khả năng ức chế PPO của sodium bisulfite là mạnh nhất, tiếp theo là acid ascorbic, acid citric và sodium chloride.

1 GIỚI THIỆU

Bên cạnh vấn đề an toàn thực phẩm, giá trị dinh dưỡng và cảm quan là những yêu cầu quan trọng trong quá trình chế biến và bảo quản. Phản ứng hóa nâu xảy ra phổ biến trong thực phẩm, đặc biệt là rau quả do quá trình chế biến hay tổn thương cơ học trong và sau quá trình thu hái. Tiến trình hóa nâu ở rau quả sau thu hoạch, cũng như trong chế biến và bảo quản thường không mong muốn, tác động trực tiếp đến chất lượng và giá trị cảm quan sản phẩm (Sapers và Miller, 1992; Watada *et al*., 1996; Moline *et al*., 1998). Khoai lang cũng thường gặp những vấn đề xảy ra trong thu hoạch, chế biến và tồn trữ, đặc biệt là sự hóa nâu và các biến đổi vật lý (Iyengar và McEvilly, 1992). Enzyme polyphenol oxydase (PPO) bên trong các mô của củ khoai lang, là tác nhân chủ yếu làm biến đổi màu của sản phẩm, sản phẩm sẽ bị chuyển sang màu nâu sậm. Sự hóa nâu thường làm giảm tính chất cảm quan do liên quan đến sự thay đổi trong màu sắc, hương vị hoặc làm mềm cấu trúc (Martinez và Whitaker, 1995). Hoạt tính của enzyme nói chung, PPO nói riêng chịu ảnh hưởng của các yếu tố như: nồng độ cơ chất, nồng độ

enzyme, nhiệt độ, pH, ion kim loại,… Trên cơ sở đó, mục tiêu của nghiên cứu này là xác định các tính chất cơ bản của enzyme polyphenol oxydase được trích ly từ củ khoai lang trắng.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu

Khoai lang trắng được thu nhận từ huyện Bình Tân (Vĩnh Long), bao gói bằng bao bì PE và bảo quản ở nhiệt độ thường (30 ± 2ºC), sau đó vận chuyển về phòng thí nghiệm, thời gian vận chuyển tối đa 1 ÷ 1,5 giờ.

2.2 Phương pháp chuẩn bị dịch trích PPO thô từ khoai lang trắng

Phương pháp trích ly PPO được tiến hành dựa trên phương pháp của Chikezie (2006). Khoai lang xử lý trong dung dịch sodium sulfite (10 g/L) với tỷ lệ mẫu: dịch ngâm là 1: 2 giữ lạnh trong thời gian 20 phút, sau đó vớt ráo và rửa lại bằng nước cất. Mẫu sau khi xử lý, nghiền trong cối sứ, bổ sung dung dịch đệm phosphate pH = 7 (tỷ lệ mẫu: dung dịch đệm là 1: 2) đồng nhất mẫu sau đó giữ lạnh mẫu trong thời gian 3 phút. Mẫu được lọc bằng thiết bị lọc chân không. Dịch lọc được ly tâm với tốc độ 1500 rpm trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ 4°C, thu dịch lọc chứa polyphenol oxidase thô.

2.3 Xác định hoạt tính của PPO

Hoạt tính của PPO (U/g) được xác định dựa vào phương pháp Ensimiger và Vamos–Vigyazo (1995, trích dẫn bởi Chikezie, 2006). Chuẩn bị dung dịch catechol có nồng độ 0,05 M. Mỗi ống nghiệm cho vào lần lượt 1 mL dung dịch catechol, 1 mL dung dịch đệm (pH = 7), 3 mL nước cất và 0,1 mL dịch trích enzyme PPO. Hỗn hợp này được nhanh chóng chuyển vào cuvette và đo quang phổ hấp thu ở bước sóng 410 nm sau mỗi 15 giây. Hoạt tính PPO tỷ lệ thuận với cường độ hấp thu cực đại của benzoquinones.

Một đơn vị enzyme (U) là lượng enzyme cần thiết cho phản ứng oxy hóa quinine để cường độ hấp thu benzoquinone tăng lên 0,001 đơn vị trong 1 giây ở điều kiện phản ứng 25ºC, pH = 7. Như vậy, một đơn vị enzyme U = 10^{-3}.OD/ giây. Hoạt tính của PPO được tính dựa trên thành phần chất khô của khoai lang, theo công thức:

$$A\ (\text{U/g chất khô nguyên liệu}) = \frac{a.V.100}{m(100-X)}$$

Với a: hoạt tính của PPO trong 1 mL dịch trích (U/mL); V: thể tích dịch trích thu được (mL) ứng với khối lượng khoai lang tươi (m, g), X là độ ẩm của khoai lang trong mẫu khảo sát (%) (Chikezie, 2006; Phan Thanh Bình *và ctv*., 2009).

Để so sánh sự thay đổi hoạt tính PPO ở các điều kiện khảo sát khác nhau, khái niệm hoạt tính tương đối được sử dụng (Manohan và Wai (2012). Theo Manohan và Wai (2012), giá trị hoạt tính PPO cao nhất trong chuỗi khảo sát là 100%, hoạt tính tương đối là tỷ số (%) giữa hoạt tính PPO của mẫu khảo sát với hoạt tính PPO tại giá trị pH (hay nhiệt độ) tối ưu trong cùng một thí nghiệm.

2.4 Phương pháp bố trí thí nghiệm

2.4.1 Xác định pH tối ưu cho hoạt động của PPO từ khoai lang trắng

Dịch trích PPO được thu nhận như mục 2.2 và xác định hoạt độ theo mục 2.3. Tuy nhiên tiến hành phản ứng bằng việc bổ sung 1 mL dung dịch đệm có giá trị pH khác nhau pH (6÷10). Dựa trên kết quả thống kê sự thay đổi hoạt độ PPO (hoạt tính tương đối), xác định pH tối thích cho hoạt động PPO tối ưu.

2.4.2 Xác định nhiệt độ tối ưu cho hoạt động của PPO

Dịch trích enzyme ủ ở các mức nhiệt độ từ 25 ÷ 55ºC trong 10 phút. Dựa trên kết quả thống kê sự thay đổi hoạt độ PPO (thể hiện ở hoạt tính tương đối), xác định nhiệt độ tối thích cho hoạt động PPO tối ưu.

2.4.3 Độ bền nhiệt của enzyme PPO từ khoai lang trắng

Dịch trích enzyme ủ ở các mức nhiệt độ từ 25 ÷ 55ºC trong 60 phút. Dựa trên kết quả thống kê sự thay đổi hoạt độ PPO (hoạt tính tương đối), xác định độ bền nhiệt cho hoạt động của PPO.

2.4.4 Xác định vận tốc phản ứng cực đại, hằng số tốc độ phản ứng và hoạt tính enzyme PPO ban đầu

Vận tốc phản ứng cực đại (V_{max}), hằng số tốc độ phản ứng (K_m) của PPO từ khoai lang trắng được xác định bằng cách cho phản ứng enzyme với cơ chất catechol ở các nồng độ từ 0,01 đến 0,1 M ở điều kiện nhiệt độ và pH tối thích đã được khảo sát ở mục 2.4.1 và 2.4.2. Ghi nhận giá trị độ hấp thu tương ứng của dịch trích PPO theo từng nồng độ catechol khảo sát (0,01 đến 0,1 M sau mỗi 15 giây phản ứng ở bước sóng 410 nm (Chikezie, 2006). Sử dụng phương trình Lineweaver – Burk từ các giá trị nghịch đảo 1/[S] và 1/V để xác định V_{max}, K_m cũng như hoạt tính ban đầu của PPO.

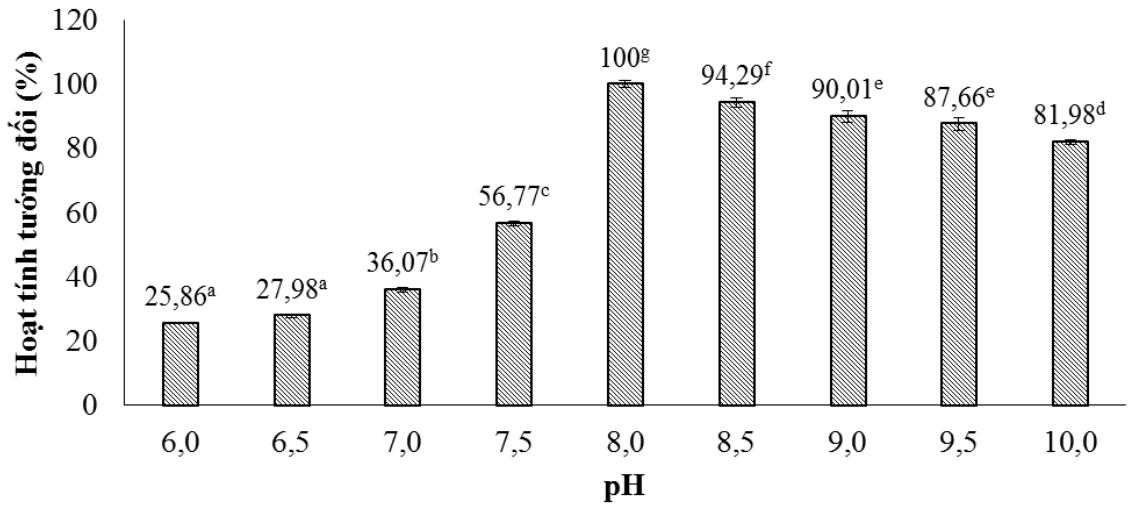
2.4.5 Ảnh hưởng của các phụ gia khác nhau đến hoạt tính của enzyme PPO

Dịch trích enzyme thô thu được cho vào các ống nghiệm, thêm các chất phụ gia (NaCl, $NaHSO_3$, acid citric, acid ascorbic) riêng lẻ ở các nồng độ khác nhau. Tiến hành xác định hoạt tính enzyme. Xác định tỷ lệ hoạt tính PPO còn lại sau quá trình xử lý, so sánh với mẫu PPO đối chứng (không xử lý).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Giá trị pH tối thích cho hoạt động của PPO trích ly từ khoai lang trắng

Thông số pH là giá trị quan trọng ảnh hưởng đến hoạt động của PPO. Nhìn chung, hoạt tính PPO thay đổi ở các điều kiện pH khác nhau. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của pH đến hiệu quả hoạt động của PPO trong khoai lang trắng cho thấy, hoạt tính PPO thể hiện cao nhất ở pH 8. Tến hành so sánh sự thay đổi hoạt tính PPO ở các điều kiện pH phản ứng khác nhau, so sánh với hoạt tính PPO ở pH 8, kết quả được thể hiện ở Hình 1.



Hình 1: Ảnh hưởng của pH đến hoạt động PPO trích ly từ khoai lang trắng

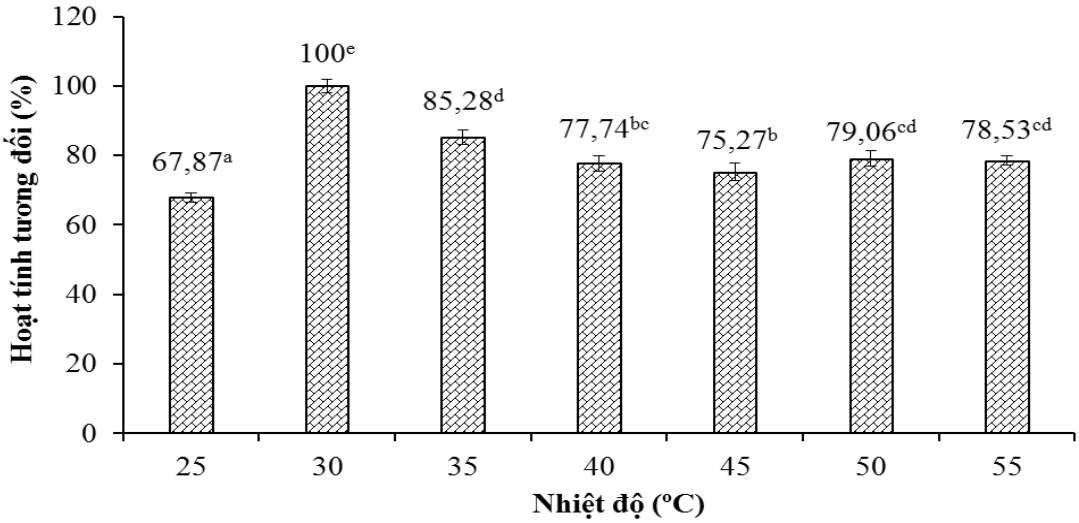
Qua Hình 1 cho thấy, hoạt tính tương đối PPO trong khoai lang trắng có xu hướng tăng từ trong khoảng pH từ 6,0 ÷ 8,0 và đạt giá trị cao nhất ở bằng 8,0 và sau đó giảm chậm dần khi giá trị pH tăng đến 10,0. Hoạt tính tương đối đạt giá trị thấp nhất ở pH bằng 6,0 trong các khoảng pH khảo sát. Ở các giá trị pH kiềm hoạt tính enzyme đạt trên 80% so với pH tối ưu. Giá trị pH môi trường làm thay đổi trạng thái ion hóa của các acid amin có tính acid hoặc trạng thái hoạt động cơ bản của enzyme. Điều này dẫn đến sự thay đổi cấu trúc bề mặt của enzyme, ngoài ra, sự thay đổi giá trị pH không chỉ ảnh hưởng đến khả năng hòa tan enzyme trong dung dịch đệm mà còn ảnh hưởng đến sự phân bố của enzyme, các hợp chất phenolic và các sản phẩm sau quá trình phản ứng (Lee *et al.*, 1991). Enzyme rất nhạy với pH của môi trường, mỗi enzyme đều có một số giá trị pH thích hợp cho sự hoạt động và tại đó tốc độ phản ứng xảy ra nhanh nhất. Ngoài ra, pH còn ảnh hưởng đến sự kết hợp giữa phần protein và phần phụ không phải protein (coenzyme) của enzyme, vì thế làm giảm hoạt tính enzyme tại những giá trị pH nằm ngoài khoảng giá trị pH tối thích (Lê Ngọc Tú, 2005).

Theo Alyward và Haisman (1969), pH tối thích cho hoạt động của PPO trong thực vật trong dãy từ 5,0 đến 7,0 và phụ thuộc vào mức độ tinh sạch enzyme, loại đệm sử dụng và cơ chất được sử dụng trong nghiên cứu. Kết quả thu được phù hợp với các khảo sát trước đó về pH tối ưu cho hoạt động của PPO. Giá trị pH tối thích cho hoạt động của enzyme PPO ở: dâu tây (pH = 4,5); táo (pH = 9,0); nho (pH = 6,0); ổi (pH = 7,0) và khoai tây (pH = 6,8) khi sử dụng catechol làm cơ chất (Marshall *et al*., 2000).

3.2 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt động của PPO từ khoai lang trắng

Kết quả ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính PPO từ dịch trích enzyme của khoai lang trắng cho thấy, hoạt tính PPO thu được ở nhiệt độ 30°C đạt cao nhất (100%), tỷ lệ thay đổi hoạt tính PPO do tác động của nhiệt độ phản ứng (so sánh với điều kiện xử lý nhiệt 30°C) được trình bày ở Hình 2.

Kết quả thực nghiệm ở Hình 2 cho thấy, khi nhiệt độ thấp hơn hay cao hơn so với nhiệt độ tối ưu (30°C) sẽ làm giảm hoạt tính enzyme (Mathewson, 1998). Điều đó đúng với thực tế khi tăng nhiệt độ lên 35ºC thì hoạt tính chỉ còn 85%. Khi tăng nhiệt độ xử lý PPO lớn hơn 35ºC thì hoạt tính chỉ còn khoảng từ 75,27 ÷ 79,06%. Nhiệt độ môi trường phản ứng tăng, không chỉ làm tăng tốc độ phản ứng mà còn thúc đẩy quá trình biến tính protein, các phân tử đóng vai trò trung tâm hoạt động PPO bị phá vỡ bởi nhiệt. Vì vậy, enzyme biến đổi tính chất và mất đi vai trò xúc tác quá trình chuyển hóa o-diphenol thành o-quinone (Alyward *et al*., 1969). Ở nhiệt độ thấp hơn (25ºC), các thành phần cấu tạo PPO có ít năng lượng để di chuyển, do đó tốc độ phản ứng chậm hơn, hoạt tính của enzyme PPO chỉ đạt 67,97%.

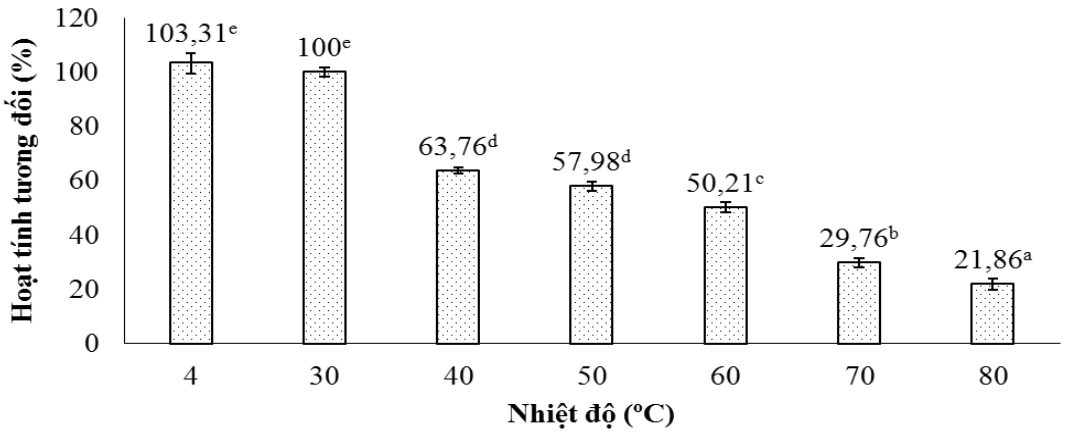


Hình 2: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính tương đối của PPO trích ly từ khoai lang trắng

Nhiệt độ tối ưu của PPO trên một số loại thực vật khác cũng được nghiên cứu, kết quả nghiên cứu cho thấy, phần lớn các enzyme PPO trích ly có nhiệt độ tối ưu trong khoảng 30°C đến 40°C (Martinez và Whitaker, 1995). Nghiên cứu gần đây của Lim (2011) nhiệt độ tối ưu cho enzyme PPO trên lá khoai lang là 45°C. Nhiệt độ tối ưu PPO ở các loại củ khác nhau như sắn, khoai môn và khoai lang có nhiệt độ tối ưu là 30°C (Marshall *et al*., 2000), nhiệt độ tối thích cho hoạt động của PPO từ một số loại quả, điển hình như táo, chuối và xoài có nhiệt độ tối ưu cũng được xác định ở 30°C. Khác hơn củ và một số quả, hoạt động của PPO từ hạt ca cao và hướng dương (Lee *et al.*, 1991) có nhiệt độ tối ưu ở 45°C ở các điều kiện khảo sát. Kết quả khảo sát cũng cho thấy, với nhiệt độ tối thích 30°C gần như cân bằng với nhiệt độ môi trường bên ngoài ở Việt Nam, đồng thời khi xử lý nhiệt đến 55°C, hoạt tính của PPO từ khoai lang trắng vẫn duy trì ở mức cao (gần 80% hoạt tính PPO vẫn được duy trì). Điều này cho thấy, khoai lang trắng chính là đối tượng cho hoạt động hóa nâu do tác động của PPO.

3.3 Xác định độ bền nhiệt của PPO thu nhận từ khoai lang trắng

Tiến hành đánh giá độ bền nhiệt của PPO từ khoai lang trắng bằng cách ủ PPO ở các khoảng nhiệt độ khác trong thời gian 60 phút. Sự thay đổi hoạt tính của PPO khi so sánh với hoạt tính PPO ở nhiệt độ tối ưu (trường hợp khảo sát là 30ºC) được thể hiện ở Hình 3. Hoạt tính của PPO trong dịch trích enzyme từ khoai lang trắng giảm khi nhiệt độ tăng từ 30ºC đến 80ºC trong thời gian xử lý là 60 phút. Khi tăng nhiệt độ đến 80ºC, hoạt tính PPO còn lại 21,86% so với khi xử lý ở nhiệt độ phòng. Đặc biệt, điều kiện nhiệt độ thấp (4ºC) là điều kiện thích hợp giúp duy trì hoạt động của PPO, hoạt tính PPO trong dịch trích được trữ ở 4ºC trong 1 giờ cao hơn (103,31%) cả ở chế độ nhiệt tối ưu cho hoạt động của PPO (30ºC). Kết quả khảo sát trên cũng xác định rằng enzyme PPO trong khoai lang trắng là tương đối bền với nhiệt. PPO hoạt động phụ thuộc vào nhiệt độ và cơ chất được sử dụng. Ở nhiệt độ cao hơn 60ºC, enzyme bắt đầu biến tính và bị vô hoạt khi nâng đến nhiệt độ cao hơn (Kavrayan *et al.*, 2001).



Hình 3: Khả năng bất hoạt bởi nhiệt của polyphenol oxidase từ củ khoai lang trắng

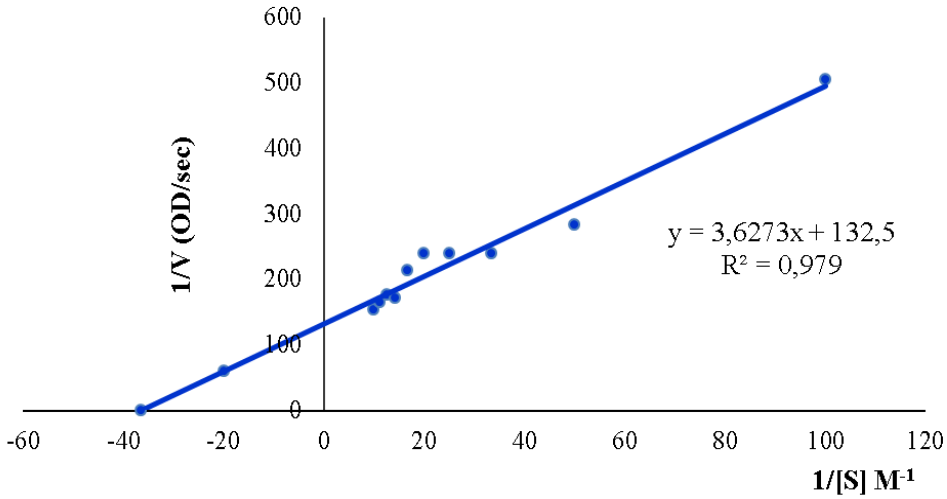
3.4 Xác định các thông số động học K_m và V_{max} của PPO trích ly từ khoai lang

Kết quả đo sự thay đổi mật độ quang OD (ở bước sóng 410 nm) trong phản ứng polyphenol oxidase của dịch trích enzyme từ khoai lang trắng để chuyển hóa catechol (cơ chất [S]) thành benzoquinon (sản phẩm) được ghi trong Bảng 1. Từ kết quả thu nhận, hằng số tốc độ phản ứng K_m và vận tốc phản ứng V_{max} được xác định theo phương pháp Lineweaver – Burk (Hình 4) như sau: từ các giá trị nghịch đảo 1/V (dòng 10) và 1/[S] (dòng 11) được ghi trong Bảng 1 lập đồ thị 1/V = f (1/[S]).

Bảng 1: Sự thay đổi mật độ quang A theo thời gian ủ của dịch trích PPO thô từ khoai lang trắng tương ứng với các nồng độ catechol khảo sát

TT	Thời gian (giây)	Nồng độ catechol (M)							
		0,1	**0,08**	**0,06**	**0,05**	**0,04**	**0,03**	**0,02**	**0,01**
1	15	0,293	0,255	0,214	0,189	0,191	0,191	0,159	0,088
2	30	0,294	0,256	0,219	0,192	0,198	0,198	0,173	0,097
3	45	0,287	0,250	0,213	0,186	0,187	0,187	0,159	0,089
4	60	0,281	0,246	0,200	0,181	0,179	0,179	0,152	0,088
5	75	0,276	0,241	0,194	0,176	0,172	0,172	0,147	0,082
6	90	0,272	0,238	0,190	0,172	0,167	0,167	0,140	0,078
7	105	0,269	0,235	0,184	0,169	0,162	0,162	0,135	0,076
8	120	0,265	0,232	0,179	0,166	0,157	0,157	0,131	0,074
9	V(OD/s)	0,007	0,006	0,005	0,0042	0,004	0,004	0,0035	0,002
10	1/V	154,209	177,017	213,042	239,465	239,031	239,031	282,77	505,527
11	1/[S]	10	12,5	16,67	20	25	33,33	50	100

Từ đồ thị Hình 4 cho thấy, các thông số động học của PPO như V_{max} và K_m được xác định thông qua phương trình tương quan y = 3,6273x + 132,5 hay (1/[V]) = 3,6273 (1/[S]) + 132,5 với hệ số tương quan R^2= 0,9791 có độ tin cậy ở mức chấp nhận.



Hình 4: Đồ thị xác định các thông số động học V_{max}, K_m của PPO trong củ khoai lang trắng

Qua kết quả phân tích, các thông số động học của PPO được xác định với hằng số K_m là 27,4.10^{-3} M và V_{max} có giá trị tương ứng là 7,55.10^{-3} OD/giây = 7,55 đơn vị (U). Đồng thời, hoạt tính PPO tương ứng trong 0,1 mL dịch trích được tính:

a = 7,55 (10^{-3} OD/giây) x (60 giây/1 phút) x 1000/0,1 mL dịch enzyme phản ứng = 4530 U/phút/mL.

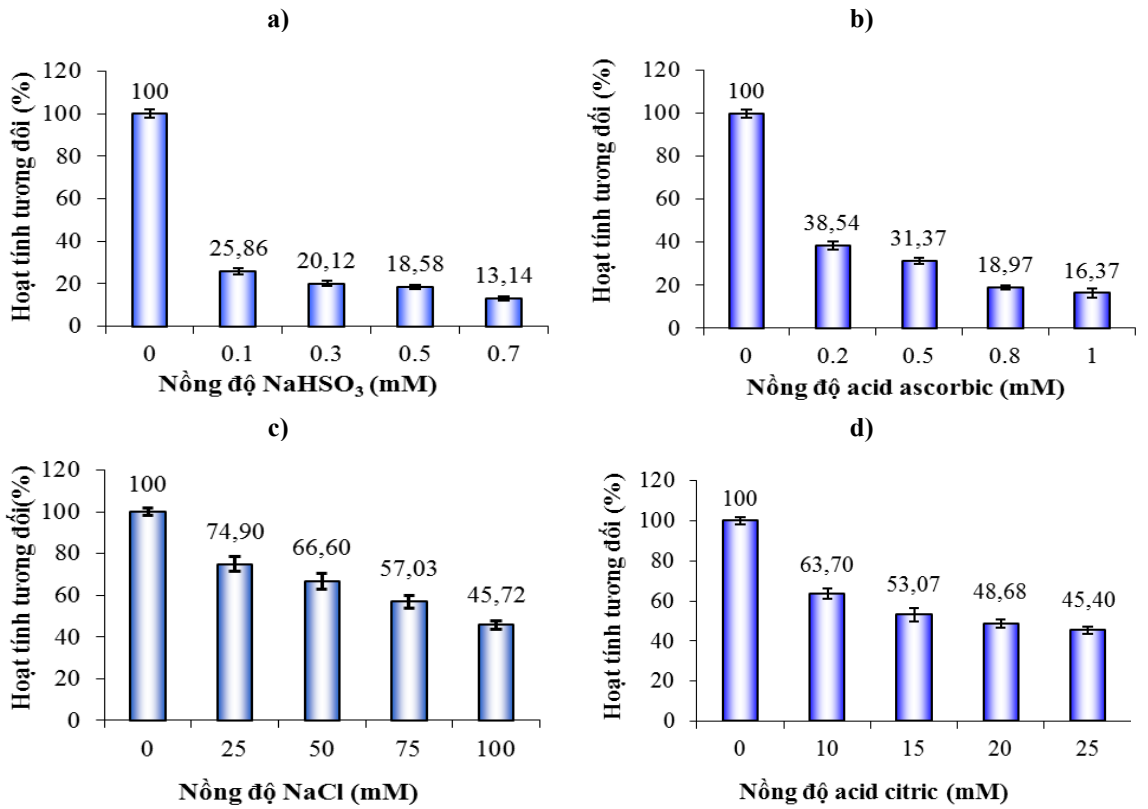
Với thể tích dịch trích V thu được là 54,5 mL, tương ứng với khối lượng mẫu ban đầu là 25,5 g và độ ẩm trung bình của khoai lang là 64,47% (dựa trên kết quả phân tích thành phần ẩm trong khoai lang trắng). Do đó, hoạt tính PPO thô trong khoai lang ban đầu đạt 256,92 (U/g chất khô nguyên liệu).

Nghiên cứu Manohan và Wai (2012) không xác định tổng lượng PPO có trong khoai lang mà chỉ khảo sát hoạt tính PPO trong 0,1 mL thể tích dịch trích, cho thấy giá trị PPO đo được là 3720 EU/phút/mL. Đồng thời giá trị K_m của khoai lang ở điều kiện khảo sát là 27,4 mM cao hơn nhiều lần so với giá trị K_m theo nghiên cứu của Manohan và Wai (2012) là 3,57 mM. Điều này là do sự khác biệt về điều kiện thổ nhưỡng, giống khoai lang, cách xử lý nguyên liệu sau thu hoạch và phương pháp trích ly PPO thô. Hằng số K_m được gọi hằng số Michelis Menten đặc trưng cho mỗi enzyme, hằng số tốc độ phản ứng cho ái lực của enzyme với cơ chất. Hằng số K_m trong nghiên cứu có giá trị tương đối lớn, vì thế ái lực của enzyme với cơ chất càng nhỏ, vận tốc của phản ứng càng nhỏ. Ngoài ra, hoạt tính của enzyme còn phụ thuộc rất lớn vào các yếu tố nhiệt độ và pH cũng như tác động của các thành phần đóng vai trò là chất hoạt hóa và ức chế lên hoạt động của khoai lang trắng. Các giá trị của K_m của PPO từ artisô (10,2 mM), lá trà (12,5 mM), hạt đậu tương (10,5 mM), táo (34 mM), cải bắp (682,5 mM); đào (3,5 mM) và mận (20 mM) (Marshall *et al*., 2000).

3.5 Ảnh hưởng của nồng độ các phụ gia đến hoạt tính của PPO

Việc sử dụng các loại phụ gia có tác dụng ức chế sự phát triển của vi sinh vật và ổn định hương vị và màu sắc đã được áp dụng. Kết quả khảo sát cho thấy, theo sự gia tăng của nồng độ chất ức chế, phần trăm ức chế PPO càng cao (Hình 5).

Sodium bisulfite có thể ức chế sự 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 (Kavrayan *et al*., 2001). Hoạt tính PPO giảm chỉ còn 25,86; 20,12; 18,58 và 13,14% tương ứng với nồng độ 0,1; 0,3; 0,5 và 0,7 mM so với mẫu đối chứng (không xử lý) (Hình 5a).



Hình 5: Ảnh hưởng của chất ức chế đến hoạt động của PPO từ khoai lang trắng

Hoạt tính enzyme PPO trong khoai lang sau khi xử lí với acid ascorbic giảm khi gia tăng nồng độ xử lí. Hoạt tính enzyme đạt 38,54% ở nồng độ 0,2 mM; trong khi đó khi sử dụng 1,0 mM ascorbic hoạt tính còn lại chỉ là 16,37%. Dựa trên kết quả thu được ở đồ thị hình 5b nhận thấy, hiệu quả ức chế của PPO có giá trị tới hạn, ứng với hai mức nồng độ acid ascorbic là 0,8 mM và 1 mM, hoạt tính PPO còn lại không có sự khác biệt.

Việc gia tăng nồng độ NaCl xử lý làm tăng khả năng ức chế sự hoạt động của enzmye PPO, hiệu quả ức chế lên đến 42,97% và 54,28% khi xử lý ở 75 mM lên đến 100 mM NaCl (Hình 5c). Hiệu quả ức chế thấp nhất khi xử lý với nồng độ 25 mM với hoạt tính enzyme còn lại đạt 74,90% so với ban đầu (không xử lý). Ion Cl^- là một tác nhân ức chế hóa nâu yếu, sự ức chế này phụ thuộc vào pH, ở giá trị pH thấp, tác dụng ức chế của halogen càng mạnh (Mayer và Harel, 1991).

Acid citric là một tác nhân ức chế của PPO bằng cách giảm pH và kết hợp với nguyên tố đồng tại trung tâm hoạt động enzyme (Lee *et al*., 1991). Từ kết quả Hình 5d chứng minh rằng, cũng như các loại phụ gia khác, acid citric cũng có tác dụng chống hóa nâu trên khoai lang. Tuy nhiên, hiệu quả ức chế lại tương đối thấp, chỉ ức chế được 54,6% ngay cả khi nồng độ acid citric sử dụng tăng đến 25 mM (Hình 5d).

So sánh hiệu quả ức chế hoạt động của PPO ở các mức nồng độ tối ưu của các chất ức chế sử dụng, kết quả thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2: Ảnh hưởng của phụ gia đến khả năng ức chế enzyme PPO trong khoai lang

Chất ức chế	NaCl (100 mM)	$NaHSO_3$ (0,7 mM)	Acid citric (25 mM)	Acid ascorbic (1,0 mM)
Hoạt tính bị ức chế (%)	54,28 ± 1,49	86,86 ± 2,25	54,60 ± 1,19	83,63 ± 1,57

Sodium bisulfite có khả năng ức chế cao nhất, tiếp theo là acid ascorbic, sodium chloride và acid citric là các chất ức chế yếu hơn. Các chất ức chế mạnh là sodium bisulfite và acid ascorbic, các hợp

chất này có khả năng làm giảm sự hình thành các hợp chất màu của phản ứng hóa nâu khá cao (khoảng trên 80% so với hoạt tính ban đầu) ở nồng độ rất thấp tương ứng là 0,7 mM ($NaHSO_3$) và 1,0 mM (acid ascorbic). Bên cạnh đó, việc sử dụng acid citric và sodium chloride cũng có tác dụng là giảm phản ứng hóa nâu (Kavrayan *et al.*, 2001). Tuy nhiên, khả năng ức chế của acid citric và sodium chloride là thấp ở nồng độ cao nhưng khả năng ức chế chỉ đạt khoảng 50% so với hoạt tính ban đầu.

4 KẾT LUẬN

Nghiên cứu xác định được một số tính chất cơ bản của PPO thu được từ khoai lang trắng. Trong đó, hoạt tính của enzyme thô ban đầu là 256,92 (U/g $_{\text{chất khô}}$) khi sử dụng catechol như là cơ chất. Nhiệt độ và pH tối thích cho hoạt động của PPO từ khoai lang trắng là 30ºC và pH = 8,0. Các thông số động học được xác định với hằng số tốc độ phản ứng $K_m = 27{,}5.10^{-3}$ M và vận tốc phản ứng cực đại $V_{max} = 7{,}55.10^{-3}$ OD/giây. Hoạt tính PPO được duy trì ổn định ở nhiệt độ 4ºC. Khi xử lý nhiệt hoạt tính PPO giảm dần, tuy nhiên hoạt tính còn lại trong PPO vẫn còn duy trì đến 20% ở nhiệt độ 80ºC. Bên cạnh đó, hoạt tính PPO trong khoai lang nhạy cảm với một số chất phụ gia gây ức chế, đặc biệt là sodium bisulfite, acid ascorbic có khả năng ức chế hoạt động PPO hơn 60% nồng độ sử dụng rất thấp, sodium chloride và acid citric có khả năng ức chế yếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alyward, F. and D.R. Haisian, 1969. Oxidation system in fruits and vegetables their relation to the quality of pressured products. *Advances in Food research,* 17: 1-76.
2. Chikezie, P.C., 2006. Extraction and Activity of Polyphenol Oxidase from Kolanuts (Cola nitida and Cola acuminate) and Cocoa (*Theobroma cacao*). *Journal of Agriculture and Food Sciences*, 4(2): 115-124.
3. Iyengar, R. and A.J. McEvilly, 1992. Anti-browning agents: alternatives to the use of sulfites in foods. *Trends Food Science Technology*, 3:60-64.
4. Kavrayan, D. and T. Aydemir, 2001. Partial purification and charaterization of polyphenol oxidase from pepermint (*Menthapeperita*). *Journal of Food Chemist ry*, 74: 147-154.
5. Lê Ngọc Tú, Lê Văn Chứ, Đặng Thị Thu, Phạm Quốc Thăng, Nguyễn Thị Thịnh, Bùi Đức Hợi, Lưu Duẫn và Lê Doãn Diên, 2005. *Hóa sinh công nghiệp*, NXB Khoa học Kỹ thuật Hà Nội. Hà Nội.
6. Lee, P.M., Lee, K. and M.I.A. Karim, 1991. Biochemical studies of cocoa bean polyphenol oxiase. *Journal of Science and Food Agriculture*, 55: 251-26.
7. Lim, M.Y., 2011. Characterrization of polyphenol oxidase frome sweet potato leaves. Thesis.Maylaysia: UCSI University.
8. Lineweaver, H. and D. Burk, 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of America Chemistry Society*, 56: 658-66.
9. Marshall, M.R., J. Kim, and C.I. Wei, 2000. Enzymatic browning in fruits, vegetable and seafoods. *Journal of Food and Agriculture Organization*, 41: 259-312.
10. Martinez, M.V. and J.R. Whitaker, 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Science Technology*, 6: 195-200.
11. Mathewson, P.R., 1988. *Enzymes*, Maarcel Dekker Inc., 20-35.
12. Mayer, A.A. and E. Harel, 1991. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry*, 18: 193-215.
13. Moline, H.E., Buta J.G. and I.M. Newmann, 1998. Prevention of browning of banana slices using natural products and their derivatives. *Journal of Food Quality*, 22: 499-511.
14. Monohan, D. and C.W. Wai, 2012. Characterization of Polyphenol oxidase in Sweet Potato (*Ipomoea Batatas L.*). *Journal for the advancement of Science and ARTs*, 3: 14-31.
15. Phan Thanh Bình, Nguyễn Văn Thường, Nguyễn Đình Tuyến, Đỗ Trung Sỹ, Hoàng Thị Bích và Trần Đình Toại, 2009. Nghiên cứu sự biến đổi hoạt tính của enzyme polyphenol oxidase trong quá trình lên men cacao. *Tạp chí Hóa học*, 47(6b): 281-285.
16. Saper, G.M. and R.L. Miler, 1992. Enzyme browning control in potato with ascorbic acid-2-phosphates, *Journal of Food Science*, 57: 1132-1135.
17. Watada, A.E., Ko, N.P. and D.A. Monott,1996. Factors affecting quality of fresh-cut horticultural products. *Postharvest Biology Technology*, 9:115-125.