

XÁC ĐỊNH HOẠT LỰC CỦA *ENZYME LIPOLITIC* TRONG BỘT LÒNG TRẮNG TRỨNG ĐÀ ĐIỀU NUÔI Ở TỈNH QUẢNG NAM - ĐÀ NẴNG

LÊ VĂN HOÀNG*, LÊ THỊ LIÊN THANH**,
BÙI THẾ VINH***, VƯƠNG BẢO THY***

Ngày nhận bài: 10/8/2019 - Ngày gửi phản biện: 15/8/2019

Tóm tắt

Xác định hoạt lực enzyme lipolitic trong bột lòng trắng trứng đà điều nói riêng và trứng gia cầm nói chung nhằm mục đích: hạn chế tối đa tác dụng của enzyme này trong việc chuyển hóa chất béo thành vị xà phòng và vị bị oxy hóa khác trong các sản phẩm thực phẩm có sử dụng lòng trắng trứng trong quá trình bảo quản.

- Nồng độ bột lòng trắng trứng nhỏ nhất cần thiết sử dụng để kiểm tra hoạt lực enzyme lipolitic trên môi trường (I) và (II) là 0,05g/ml.
- Giới hạn cho phép sự hiện diện của lipolitic trong bột lòng trắng trứng đà điều được xác định: không vượt quá khối lượng $2 \cdot 10^{-2}$ g lipolitic/g bột lòng trắng trứng (tức là từ 10^{-4} – 10^{-3} g lipolitic/g bột lòng trắng trứng).

Abstract

This study is aimed to determine the activity of lipolitic enzyme in the power produced from ostrich egg whites in particular and poultry eggs ones in general with the aim of: minimizing the effect of this enzyme in converting fat into soap state and other oxidized flavors in food products that use egg whites during storage.

- *The minimum concentration of egg white powder needed to test lipolitic enzyme activity on the cultured environment (I) and (II) is 0.05g / ml.*
- *The allowable limit of the presence of lipolitic in ostrich egg white powder is determined not to exceed the weight of $2 \cdot 10^{-2}$ g of lipolitic / g of egg white powder (i.e. 10^{-4} – 10^{-3} g of lipolitic / g egg white powder).*

* Giáo sư – Tiến sĩ khoa học, Trường Đại học Cửu Long

** Phó Giáo sư – Tiến sĩ, Trường Đại học Cửu Long

*** Tiến sĩ, Trường Đại học Cửu Long

1. Đặt vấn đề

Lòng trắng của các loại trứng gia cầm có giá trị dinh dưỡng không cao ngoài thành phần albumine (trung bình từ 9,7 - 11%), các thành phần dinh dưỡng khác có trị số hầu như không đáng kể. Thế nhưng, thành phần lòng trắng trứng lại mang những đặc tính công nghệ quý giá với tư cách là một phụ gia tự nhiên như: Khả năng nhũ hóa, chống kết tinh, tạo đông, kết dính, giữ khí, làm nở v. v... Các đặc tính này có ý nghĩa công nghệ cao khi sử dụng chế tác thực phẩm, đặc biệt trong kỹ nghệ sản xuất bánh và kẹo mềm (bakery).

Nuôi đà điều để cấp giống và tạo nguồn thịt mới du nhập vào Việt Nam khoảng 1 thập niên trở lại đây, đã được nhiều địa phương nuôi dưỡng, có nơi phát triển thành trang trại lớn.

Trứng đà điều (Ostrich egg) có khối lượng trung bình từ 1,2 – 1,5 kg/quả. Do vậy, sản xuất bột trứng từ lòng trắng trứng đà điều sẽ mang lại hiệu quả kinh tế cao hơn so với tiêu dùng thường nhật trên đối tượng là trứng đà điều không cho khả năng làm giống.

Tuy nhiên, lòng trắng trứng chứa phức hệ enzyme lipolitic (chủ yếu Lipase và Esterase) là nguyên nhân tạo vị bị oxy hóa cho dòng sản phẩm giàu chất béo. Để ứng dụng tốt nhiều lợi thế từ phụ gia tự nhiên này, cần phải khống chế sự hiện diện của enzyme lipolitic trong bột lòng trắng trứng nói chung và đà điều nói riêng nhằm hạn chế tối đa quá trình sinh học bất lợi nêu trên.

Xác định hoạt lực của lipolitic không chỉ trước mắt, kiểm tra sự hiện diện của phức hệ enzyme này từ nguồn bột trứng nhập ngoại mà trong tương lai gần, giúp các doanh nghiệp

sản xuất bột trứng ở Việt Nam có biện pháp công nghệ thích hợp nhằm giảm thiểu lượng enzyme này trong quá trình gia công kỹ thuật.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

* Bột lòng trắng trứng đà điều thực nghiệm sau sấy màng theo các thông số kỹ thuật:

- Chiều dày lớp lòng trắng trứng (d, mm): 1
- Nhiệt độ sấy (°C) : 64
- Thời gian sấy (phút) : 20
- Độ ẩm sản phẩm (W,%) : 6,7
- Thời gian bảo quản sản phẩm sau sấy (ngày) : 15

* Bột lòng trắng trứng gia cầm thương mại nhập từ Ấn Độ.

* Enzyme tinh khiết Lipase S 80000 và Esterase 30000 từ hãng Grist – Brocade – CH Pháp.

* Dung dịch hòa tan enzyme và bột trứng: ringer1/4 – CHLB Đức.

* Môi trường Tributyrin (I)

Thành phần của môi trường:

- Môi trường cơ bản (PCA, pH 7,0 ± 0,2): 1lit
- Tributyrin (hoặc glycerol tributyrat): 10 ml
- Phenol đỏ: 50 ml

Tributyrin (hoặc glycerol tributyrat) được sử dụng với tư cách là chất cảm ứng cho lipase. Tributyrin không tan trong nước và khi kết hợp với thạch trắng (agar) có trong môi trường sẽ tạo nên trạng thái nhũ hóa và làm đục môi trường. Khi có sự hiện diện của lipase, thành

phần triglycerid sẽ chuyển hóa thành glycerol và acid butyric. Các hợp phần chuyển hóa đều có tính tan, do đó sẽ làm cho **môi trường từ đục chuyển sang trong**. Mặt khác, phenol đỏ (có màu đỏ da cam ở pH = 8,2, màu vàng chanh ở pH = 6,4). Khi môi trường bị acid hóa bởi sự tạo thành acid butyric, màu của môi trường từ đỏ da cam chuyển thành vàng chanh. Sự chuyển màu và sự thay đổi trạng thái môi trường khẳng định sự có mặt của *lipase*. Vì vậy, môi trường này được xem là chỉ thị giúp nhận diện *lipase*.

* Môi trường Tween 80 (II)

Thành phần môi trường:

- Môi trường cơ bản (PCA, pH 7,0 ± 0,2): 1 lít
- CaCl₂ 1% : 10 ml
- Tween 80 : 17,5 ml
- Thạch trắng (agar) : 15 g

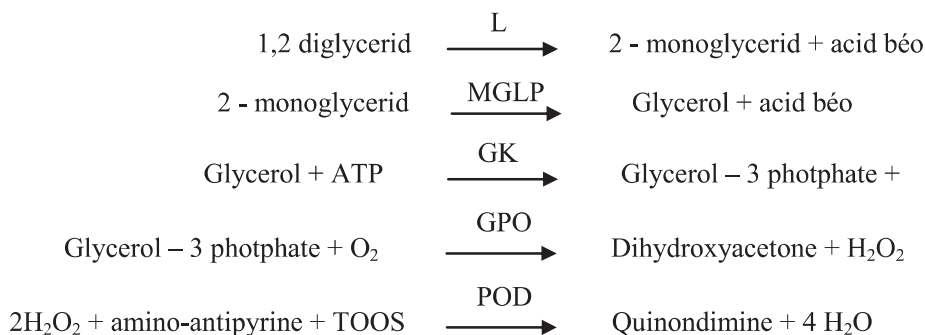
Tween 80 (còn gọi là monooleate sorbitol) là chất cảm ứng cho *esterase*. Các thành phần có trong môi trường Tween 80 hòa tan tốt nên môi trường luôn luôn trong. Khi có sự hiện diện của *esterase*, chúng sẽ chuyển hóa monooleate sorbitol tạo ra acid béo tự do. Acid tự do này sẽ kết hợp với canxi có trong môi trường tạo muối canxi clorua (CaCl₂) không tan nên làm cho **môi trường từ trong chuyển thành đục**. Sự chuyển đổi trạng thái môi trường khẳng định sự có mặt của *esterase*. Vì vậy môi trường Tween 80 được đánh giá là chỉ thị nhận diện *esterase*.

2 môi trường được thanh trùng ở 121°C, 20 phút.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp enzyme: xác định hoạt lực của *lipolitic*

* Nguyên tắc:



Tốc độ tạo thành quinondimine tự do tỷ lệ thuận với hoạt lực của *lipase* có trong mẫu thử.

Tên enzyme:

L: *Lipase*; MGLP: *Monoglycerid lipase*; GPO: *Glyceol - 3 photphatoxydase*; POD: *Peroxydase*; TOOS: N - ethyl - N - [2 - hydroxy - 3 - sulfopropyl] - m - toluidine

Tính toán:

$$\frac{U}{I} = \frac{A \text{ mẫu thử} - A \text{ mẫu trắng}}{A \text{ tiêu chuẩn} - A \text{ mẫu trắng}} \times n$$

Trong đó,

n: hoạt lực enzyme tính bằng đơn vị U/I của enzyme tiêu chuẩn được ghi trên lọ chứa enzyme tinh khiết

2.2.2. Phương pháp toán học: Tính khối lượng enzyme lipolitic

Khối lượng enzyme lipolitic (tính bằng gam) có trong 1 gam bột lòng trắng trứng được tính theo biểu thức:

$$C = \frac{B}{A} \quad (1)$$

Trong đó,

C: khối lượng enzyme lipolitic/ 1gam bột lòng trắng trứng đà điều (gam);

A: nồng độ nhỏ nhất của bột lòng trắng trứng thực nghiệm cho kết quả chuyển đổi trạng thái môi trường dương tính (+) trên hộp petri chứa môi trường (I) và (II) (gam);

B: dung dịch đệm chứa enzyme lipolitic tinh khiết có nồng độ và kết quả trên 2 môi

trường (I) và (II) như A.

3. Kết quả nghiên cứu

Để xác định hoạt lực lipolitic trong bột lòng trắng trứng đà điều và nhập ngoại, chúng tôi sử dụng dung dịch ringer 1/4 để chuẩn bị các nồng độ khác nhau từ enzyme tinh khiết và hòa tan mẫu lòng trắng thực nghiệm. Giới hạn thực nghiệm ứng với các nồng độ sau:

+ Enzyme tinh khiết (*lipase* S80000 và *esterase* 30000): 100; 50; 10; 5,0; 1,0; 0,5; 0,2; 0,1; 0,05; 0,01 (mg/ml).

+ Bột lòng trắng trứng đà điều và bột trứng nhập ngoại từ Ấn Độ: 0,8; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1; 0,05; 0,01; 0,005 (g/ml).

Tương ứng với nồng độ đã chuẩn bị (cả enzyme và bột trứng), tiến hành gieo cấy bằng phương pháp chấm điểm trên 2 môi trường đặc I và II đã được chuẩn bị sẵn trong hộp petri. Các hộp petri được nuôi trong tủ ẩm ở 30°C, 72 giờ. Kết quả được trình bày trong bảng 3.1.

Bảng 3.1. Sự thay đổi trạng thái và màu của môi trường (I) và (II) phụ thuộc vào nồng độ enzyme lipolitic tinh khiết

Nồng độ enzyme lipolitic tinh khiết (mg/ml)	Kết quả chuyển đổi trạng thái và màu của môi trường	
	Tributyryn (I)	Tween 80 (II)
100	Môi trường từ đục chuyển thành trong, màu vàng trong 24 giờ	Môi trường từ trong chuyển sang đục trong 24 giờ
50	Môi trường từ đục chuyển thành trong, màu vàng trong 24 giờ	Làm đục nhanh môi trường trong 24 giờ
10	Môi trường từ đục chuyển thành trong, màu vàng trong 48 giờ	Môi trường chuyển từ trong sang đục trong 48 giờ

5	Môi trường có màu vàng, xen lẫn vùng trong khá rõ	Môi trường đục xen lẫn những vùng trong
1	Môi trường màu vàng, nhiều vùng chuyển thành trong suốt sau 3 ngày nuôi cấy	Môi trường đục xen lẫn những vùng trong sau 3 ngày nuôi cấy
0,5	Môi trường có màu vàng với nhiều vùng trong	Môi trường xen lẫn 1 vài vùng đục
0,2	Môi trường có màu vàng xuất hiện một vài vùng trong	Môi trường xen lẫn 1 vài vùng đục nhẹ
0,1	Môi trường màu vàng, đục hoàn toàn	Môi trường giống đối chứng
0,05	Môi trường màu vàng, không có vùng trong	Môi trường trong giống đối chứng
0,01	Môi trường màu vàng, hoàn toàn đục	Môi trường trong giống đối chứng
Đối chứng	Môi trường có màu đỏ da cam và đục	Môi trường trong

Từ kết quả trong bảng 3.1 được thể hiện trên hình 3.1.



Hình 3.1. Sự chuyển đổi trạng thái của môi trường

(Trái): Môi trường Tributyrin (I) từ đục thành trong tương ứng với nồng độ 50 mg/ml trong 24 giờ

(Phải): Môi trường Tween 80 (II) từ trong thành đục tương ứng với nồng độ 50 mg/ml trong 24 giờ

Kết quả bảng 3.1 cho thấy:

Trên môi trường Tributyrin (I): Sự thay đổi trạng thái và màu của môi trường khá đặc trưng. Cường độ thay đổi tỷ lệ thuận với nồng độ của enzyme. Vì vậy, môi trường Tributyrin có thể đóng vai trò như chỉ thị để nhận diện *lipase*.

Trên môi trường Tween 80 (II): Qui luật và cường độ thay đổi trạng thái của môi trường Tween 80 có cùng kết quả tương tự như trên môi trường Tributyrin, chỉ khác là enzyme *esterase*. Vì thế, có thể sử dụng môi trường Tween 80 để kiểm tra sự hiện diện của *esterase*.

Trên cả 2 môi trường (I) và (II) nồng độ enzyme *lipolitic* thấp nhất cho kết quả rõ nét về sự chuyển đổi trạng thái lẫn màu của môi trường [kết quả dương tính (+)] nằm trong giới hạn từ 1 – 0,2mg/ml. Với liều lượng này cho thấy: cả 2 môi trường được chọn sử dụng vào

mục tiêu xác định cường lực enzyme *lipolitic* là khả thi mang tính ứng dụng cao.

Sử dụng kết quả thu được trong bảng 3.1 làm căn cứ để tính toán lượng enzyme *lipolitic* hiện diện trong bột lòng trắng trứng có thể cho phép là bao nhiêu thì không có khả năng gây ra phản ứng xà phòng hóa hoặc oxy hóa trực tiếp chất béo bởi enzyme này. Chúng tôi sử dụng bột lòng trắng trứng đã điều thực nghiệm và bột lòng trắng trứng gia cầm của Ấn Độ. Kết quả được trình bày trong bảng 3.2.

Bảng 3.2 Định lượng enzyme lipase trong bột lòng trắng trứng đã điều trên môi trường Tributyrin (I)

Nồng độ bột lòng trắng trứng đã điều (g/ml)	Kết quả trên môi trường Tributyrin (I)
0,8	Môi trường từ đục chuyển trong hoàn toàn (++++), màu vàng
0,6	Môi trường trong hoàn toàn (++++), màu vàng
0,5	Môi trường có màu vàng và trong (+++)
0,4	Môi trường có màu vàng và trong (+++)
0,3	Môi trường có màu vàng và trong (+++)
0,2	Môi trường trong (++) , màu vàng
0,1	Môi trường có màu vàng và trong (+)
0,05	Môi trường có màu vàng và bán trong (+)
0,01	Môi trường giữ nguyên như đối chứng
0,005	Môi trường giữ nguyên như đối chứng
0,001	Môi trường giữ nguyên như đối chứng
Đối chứng	Môi trường có màu đỏ da cam và đục

Điều kiện thí nghiệm:

+ Số lần lặp lại thực nghiệm trên cả 2 loại bột trứng : 10

+ Nuôi cấy trong cùng chế độ như khi tiến hành thực nghiệm trên enzyme tinh khiết (30°C, 72 giờ)

Biểu diễn kết quả:

- Chỉ trình bày kết quả thu được trên môi trường Tributyrin (I) bởi *lipase* được đánh giá là enzyme chủ đạo trong phản ứng sinh học tạo nên mùi, vị bị oxy hóa từ chất béo.

- Lượng enzyme *lipase* tính được từ bột lòng trắng trứng gia cầm Ấn Độ có cùng giá trị đại số với lượng enzyme từ bột lòng trắng trứng đà điều (bảng 3.2) nên không trình bày kết quả.

Kết quả từ bảng 3.2 cho thấy:

• Nồng độ bột lòng trắng trứng đà điều thấp nhất cho kết quả dương tính (+) trên môi trường Tributyrin (I) là 0,05g/ml.

• Kết quả nhận được tương tự khi cấy các dung dịch đệm chứa *lipase* S 80000 tinh khiết có nồng độ 1mg/ml trên môi trường (I).

2 kết quả thu được nêu trên có nghĩa: Trong 0,05g bột lòng trắng trứng đà điều chứa 1mg lipase.

• Từ công thức (1) và kết quả bảng 3.2, tính khối lượng lipase (C) [gam lipase/g bột lòng trắng trứng đà điều], kết quả:

$$C = \frac{1 \times 10^{-3}}{0,05} = 2 \times 10^{-2} \text{ g/g bột lòng trắng trứng}$$

• Kết quả tính toán trên cho phép khẳng định: Trong 1gam bột trứng nếu chứa 1×10^{-2} gam enzyme lipolitic sẽ gây ra vị xà phòng và

vị bị oxy hóa do sản phẩm giàu chất béo có sử dụng bột lòng trắng trứng.

• Ở nồng độ bột trứng sử dụng nhỏ nhất là 0,05 g/ml cho kết quả dương tính (+) về hoạt lực của lipolitic. Do đó, cho phép chúng ta lựa chọn nồng độ thích hợp để kiểm tra vừa giảm số lượng mẫu thử vừa tiết kiệm enzyme tinh khiết vốn rất đắt. Cụ thể chọn các nồng độ 0,8, 0,6, 0,4, 0,2, 0,1 và 0,01.

4. Kết luận

Bằng phương pháp enzyme kết quả thu được cho phép kết luận:

Khi sử dụng bột lòng trắng trứng đà điều vào sản xuất thực phẩm giàu chất béo thì hàm lượng enzyme *lipolitic* phải có giá trị nhỏ hơn 2×10^{-2} gam enzyme/1 gam bột lòng trắng trứng (tức là từ 10^{-4} – 10^{-3} gam enzyme/1 gam bột lòng trắng) sẽ đảm bảo chất lượng cho sản phẩm về phương diện mùi lẫn an toàn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. V. Duport – Dosage de l'activité lipolitique dans le poudre blanc d'oeuf. IUT d'Anger, France, 1997.
2. Grist-brocades – Détermination cinétique de l'activité lipasique par kit enzymatique, 1992.
3. R.Lecorq – Manuel l'identification médicales et de biologie clinique, ed. DOIN, 1971.
4. N.Marchal, J.L.Bourdon, C.I.Richard – Les milieux de culture pour l'isolement et l'entification biochimique des bactéries, ed. DOIN, 1987.
5. J.L.Thapon, C.M.Bourgeois – L'oeuf et les ovoproducts, collection sciences et techniques Agro-alimentaire, 1989.