

# ẢNH HƯỞNG CỦA pH VÀ NHIỆT ĐỘ LÊN SỰ HÓA NÂU GÂY RA BỞI ENZYME PEROXIDASE TỪ HỘT SEN

Nguyễn Minh Chơn và Nguyễn Phương Thúy<sup>1</sup>

## ABSTRACT

*Lotus seeds often change from white to brown color quickly after peeling. This browning reaction caused by two factors. The first factor is non-enzymatic reaction. The second factor is enzymatic reaction mainly caused by peroxidase enzyme (POD). To clarify the effects of enzyme on browning reaction, activity of POD was examined by its catalysis in the reaction between guaiacol and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to produce violet-brown tetraguaiacol. POD activity was examined by tetraguaiacol production based on absorbance increasing in every minute measured by a spectrophotometer at 470 nm. Enzyme solution was extracted at different pH levels from 3.5 to 8.5 and treated at 30<sup>o</sup>C to 80<sup>o</sup>C for 5 minutes. The results showed that POD enzyme from lotus seeds had the highest activity at 30<sup>o</sup>C and in the buffer with pH= 6. This enzyme was inactive at temperature over 70<sup>o</sup>C. Activity of lotus seed POD was quickly decreased at pH 3,5 and 8,5.*

**Keywords:** Lotus, browning reaction, peroxidase enzyme

**Title:** Effects of pH and temperature on browning caused by peroxidase enzyme of lotus seeds

## TÓM TẮT

*Hột sen thường hóa nâu nhanh chóng, sau khi được bóc vỏ. Phản ứng hóa nâu này do hai nguyên nhân cơ bản. Nguyên nhân thứ nhất không do enzyme gây ra. Nguyên nhân thứ hai là do enzyme peroxidase (POD). Để làm sáng tỏ ảnh hưởng gây hóa nâu do enzyme trên hột sen, hoạt tính tương đối của enzyme đã được khảo sát dựa theo nguyên tắc của phản ứng giữa guaiacol và H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> để tạo thành tetraguaiacol có màu nâu tím. Hoạt tính tương đối của enzyme được tính bằng tốc độ tạo thành tetraguaiacol thông qua sự gia tăng độ hấp thụ sau mỗi phút được đo bằng máy quang phổ ở bước sóng 470nm. Các dung dịch enzyme được trích ở các mức pH khác nhau từ 3,5 đến 8,5 và xử lý nhiệt từ 30<sup>o</sup>C đến 80<sup>o</sup>C trong 5 phút. Kết quả cho thấy enzyme POD trong hột sen hoạt động tốt nhất ở nhiệt độ 30<sup>o</sup>C và trong dung dịch đệm phosphate có pH= 6. Hệ enzyme này bất hoạt hoàn toàn ở nhiệt độ từ 70<sup>o</sup>C trở lên. Ở pH 3,5 và 8,5 hoạt động của enzyme rất yếu.*

**Từ khóa:** Sen, phản ứng hóa nâu, enzyme peroxidase

## 1 GIỚI THIỆU

Hiện nay, sen (*Nelumbo nucifera* GAERTN.) (Phạm Hoàng Hộ, 1999) được trồng hoặc mọc tự nhiên nhiều ở các tỉnh Đồng Tháp, An Giang, Sóc Trăng, Hậu giang và rải rác ở các tỉnh khác ở Đồng Bằng Sông Cửu Long. Ở tỉnh Đồng Tháp, sen được trồng chủ yếu để lấy hột. Ở Sóc Trăng sen còn được trồng để lấy củ. Đồng Tháp là tỉnh có diện tích trồng sen lấy hột nhiều nhất Việt Nam. Giá trị kinh tế đem lại từ việc trồng sen cao hơn hẳn so với trồng lúa và các loại hoa màu khác. Cây sen có thể phát triển được trên đất phèn và đất ngập nước nên rất có lợi cho việc tận dụng đất nông nghiệp. Hột sen được tiêu thụ mạnh ở Đài Loan với giá đôi lúc gấp đôi so với củ sen. Do lợi ít đem lại từ việc

<sup>1</sup>Bộ Môn Sinh Lý - Sinh Hóa, Khoa Nông Nghiệp & Sinh Học Ứng Dụng

trồng sen và do nhu cầu thị trường tiêu thụ hạt sen ngày càng nhiều đã đòi hỏi việc bảo quản và chế biến sản phẩm hạt sen ở mức độ cao hơn (Nguyen, 2001). Tuy nhiên, trong quá trình bảo quản và chế biến hạt sen, các sản phẩm hay bị hóa nâu nhanh chóng và giảm giá trị cảm quan. Sự hóa nâu từ các sản phẩm sinh học có thể gây ra do phản ứng Maillard, sự caramel hoá, sự oxy hoá acid ascorbic và nhóm nguyên nhân gây hóa nâu do enzyme, chủ yếu là enzyme peroxidase (POD) (Denis, 1998; Lê Ngọc Tú *et al.*, 2003). POD còn có thể có trong nhựa trái cây và gây hiện tượng hóa nâu vỏ trái. Để làm sáng tỏ ảnh hưởng gây hóa nâu do enzyme POD trên hạt sen, hoạt tính tương đối của enzyme này đã được xác định từ dịch trích enzyme của hạt sen nhằm đưa ra các giải pháp thích hợp để giảm hiện tượng hóa nâu trong quá trình bảo quản và chế biến các sản phẩm từ hạt sen.

## 2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM

### 2.1 Phương tiện thí nghiệm

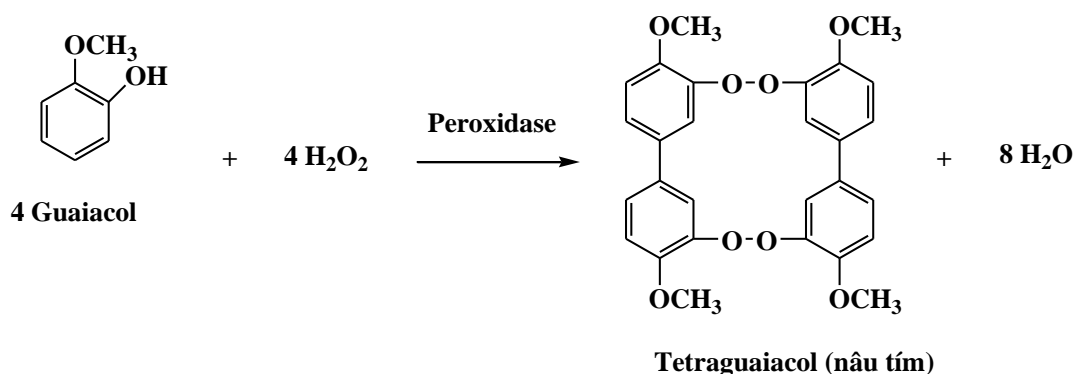
- Hạt sen thương phẩm được thu từ ruộng sen ở huyện Cao Lãnh của tỉnh Đồng Tháp.
- Các loại hóa chất cơ bản được dùng cho sinh trắc nghiệm phản ứng hóa nâu là  $H_2O_2$  và guaiacol. Dung dịch đệm pH từ 3,5 đến 5,5 được pha từ acid citric 0,1M và điều chỉnh bằng  $Na_2HPO_4$  0,1M. Dung dịch đệm pH từ 6 đến 8,5 được pha từ  $KH_2PO_4$  0,1M và điều chỉnh bằng  $K_2HPO_4$  0,1M. Nitor lỏng được dùng để nghiền hạt sen.
- Các dụng cụ chính dùng cho thí nghiệm là pH kế (pH meter TOA HM -12P), máy ly tâm lạnh và máy quang phổ (Thermospectronic Helios  $\alpha$ ).

### 2.2 Phương pháp thí nghiệm

Thí nghiệm được thực hiện tại Khoa Nông Nghiệp và Sinh Học Ứng Dụng, Trường Đại Học Cần Thơ từ tháng 6 năm 2004 đến tháng 6 năm 2005.

#### 2.2.1 Thí nghiệm 1: Xác định nồng độ pha loãng thích hợp của dịch trích enzyme từ hạt sen để khảo sát phản ứng hóa nâu bằng máy đo quang phổ

Enzyme POD được trích từ hạt sen đã bóc vỏ và loại bỏ tâm sen. Hạt sen được cắt nhỏ và nghiền mịn bằng nitor lỏng rồi trích bằng dung dịch đệm sau đó đem mẫu đi ly tâm và thu được dịch trích enzyme để dùng thử hoạt tính hóa nâu. Nhiệt độ cố định trong thí nghiệm này là  $30^{\circ}C$ , pH= 7. Tỷ lệ enzyme được pha loãng là 1:7, 1:8, 1:9 và 1:10. Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với 4 lần lặp lại. Tỷ lệ pha loãng thích hợp sẽ được chọn cho các thí nghiệm sau. Phản ứng được thực hiện bằng cách cho lần lượt vào ống nghiệm 2,8ml dung dịch đệm, sau đó cho thêm 50 $\mu$ l guaiacol 27mM và 50  $\mu$ l  $H_2O_2$  0,8%, 100 $\mu$ l dịch trích enzyme được cho vào sau cùng để quan sát phản ứng hóa nâu. Hoạt tính tương đối của enzyme hóa nâu POD được tính bằng tốc độ tạo thành sản phẩm tetraguaiacol có màu nâu tím thông qua sự gia tăng độ hấp thụ sau mỗi phút được đo bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 470nm. Hoạt tính tương đối của enzyme peroxidase được khảo sát theo phương trình sau (Viera *et al.*, 1998).



2.2.2 Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ lên hoạt tính tương đối của enzyme hóa nâu POD từ dịch trích hạt sen

Thí nghiệm nhằm xác định động thái hoạt động của enzyme hóa nâu POD dưới ảnh hưởng của nhiệt độ và pH. Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại với hai nhân tố là pH và nhiệt độ. Có 11 mức độ pH (pH: 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5) đã được dùng làm dung dịch đệm để trích và thử hoạt tính của enzyme POD. 6 mức độ nhiệt độ (30<sup>0</sup>C, 40<sup>0</sup>C, 50<sup>0</sup>C, 60<sup>0</sup>C, 70<sup>0</sup>C và 80<sup>0</sup>C) cũng đã được xử lý lên dịch trích enzyme trong 5 phút trước khi thử hoạt tính.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Xác định nồng độ pha loãng thích hợp của dịch trích enzyme từ hạt sen để khảo sát phản ứng hóa nâu bằng máy đo quang phổ

Bảng 1: Ảnh hưởng của nồng độ pha loãng dịch trích enzyme từ hạt sen lên phản ứng hóa nâu

Tỉ lệ pha loãng	Độ hấp thụ
1 : 7	0,449 a
1 : 8	0,384 b
1 : 9	0,342 b
1 : 10	0,218 c

\* Các chữ theo sau các số giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 1% trong phép thử Duncan.

Để có kết quả đo độ hấp thụ với độ chính xác cao theo định luật Lambert- Beer, người ta thường chọn điều kiện sao cho độ hấp thụ trong khoảng 0,1 đến 1, tốt nhất là từ 0,2 đến 0,5 (Nguyễn Văn Mùi, 2001). Kết quả của Bảng 1 cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về độ hấp thụ của dung dịch sau phản ứng được xúc tác bởi dịch trích enzyme. Tỉ lệ enzyme càng cao đã cho phản ứng tạo thành tetraguaiacol càng nhiều và có độ hấp thụ cao hơn. Các kết quả về độ hấp thụ của các nghiệm thức từ 0,449 đối với tỉ lệ pha loãng là 1:7 đến 0,218 đối với tỉ lệ pha loãng là 1:10 đều thỏa điều kiện của định luật Lambert-Beer. Như vậy, ta có thể chọn dịch trích enzyme với tỉ lệ pha loãng thấp nhất là 1:10 để sử dụng cho các thí nghiệm sau.

3.2 Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ lên hoạt tính tương đối của enzyme hóa nâu POD trong hạt sen

Hoạt tính tương đối của enzyme POD được tính bằng tốc độ tạo thành tetraguaiacol thông qua sự gia tăng độ hấp thụ (Abs.) sau mỗi phút được đo bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 470nm. Thí nghiệm được thực hiện dựa trên dịch

trích enzyme với tỉ lệ pha loãng là 1:10 nhằm xác định động thái hoạt động của enzyme POD dưới ảnh hưởng của các mức nhiệt độ và pH khác nhau. Kết quả phân tích thống kê trong Bảng 2 cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 0,1% về ảnh hưởng của pH, nhiệt độ và tương tác lên hoạt tính tương đối của enzyme. Điều này cho thấy hai yếu tố pH và nhiệt độ chi phối rất rõ lên hoạt tính tương đối của hệ enzyme hóa nâu.

**Bảng 2: Bảng phân tích phương sai ảnh hưởng của pH và nhiệt độ lên hoạt tính tương đối của enzyme POD trong hột sen**

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Độ ý nghĩa
pH	10	0,031	0,003	361,0975	***
Nhiệt độ	5	0,125	0,025	2891,4207	***
Tương tác	50	0,042	0,001	96,4731	***
Sai số	132	0,001	0,000		
Tổng cộng	197	0,198			

\*\*\* Khác biệt ở mức ý nghĩa 0,1% trong phép kiểm định F

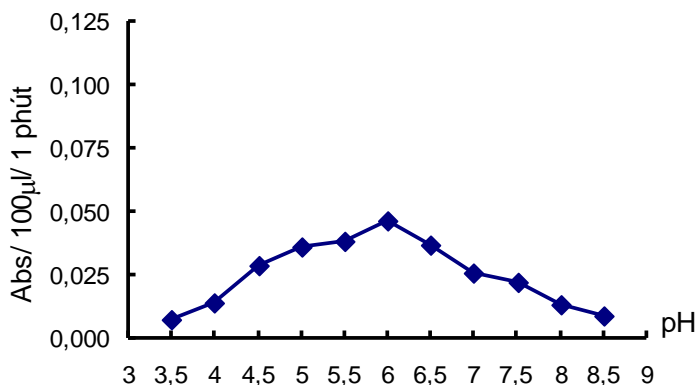
### 3.2.1 Ảnh hưởng của pH lên hoạt tính tương đối của enzyme POD trong hột sen

Kết quả từ Bảng 3 cho thấy hoạt tính tương đối của enzyme mạnh nhất ở pH 6,0 với độ hoạt động là 0,046Abs./100µl/1 phút. Nếu lấy pH 6,0 làm trung tâm thì khi pH giảm về phía acid hoặc tăng về phía kiềm thì hoạt tính tương đối của enzyme đều giảm như thể hiện trong Hình 1. Ở 30°C và pH 6 hoạt tính của enzyme mạnh nhất, dung dịch sau phản ứng có màu nâu rất rõ. Ở pH 3,5 và pH 8,5 hoạt tính tương đối của enzyme rất yếu, sản phẩm có màu nâu nhạt như trong Hình 2.

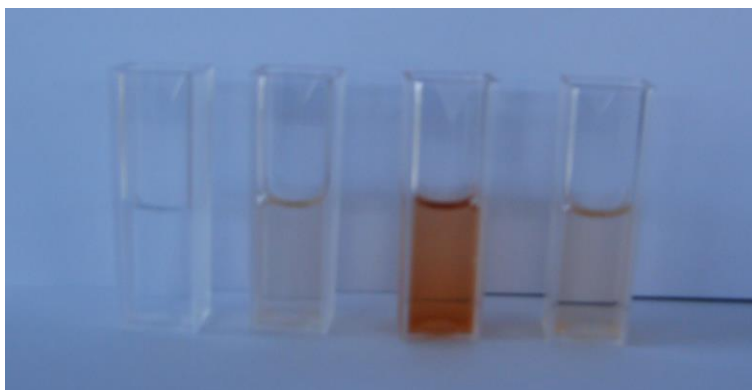
**Bảng 3: Ảnh hưởng của pH lên hoạt tính tương đối của enzyme hoá nâu POD (Abs./100 µl/1 phút) trong hột sen**

pH	Hoạt tính tương đối của enzyme POD
3,5	0,007 f
4,0	0,014 e
4,5	0,029 c
5,0	0,036 b
5,5	0,038 b
6,0	0,046 a
6,5	0,037 b
7,0	0,026 c
7,5	0,022 d
8,0	0,013 e
8,5	0,009 f

Các chữ theo sau các số giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 1% theo phép thử Duncan



**Hình 1: Động thái hoạt động của enzyme POD (Abs./100 µl/1 phút) trong hạt sen ở các mức pH**



**Hình 2: Dung dịch sau phản ứng khi enzyme được xử lý ở 30°C trong 5 phút với các mức pH khác nhau**

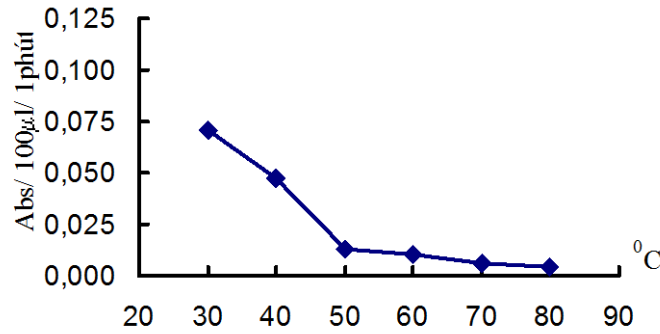
### 3.2.2 Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính tương đối của enzyme hoá nâu POD trong hạt sen

Kết quả trong Bảng 4 cho thấy hoạt tính tương đối của enzyme ở các nhiệt độ khác nhau có sự khác biệt ý nghĩa 1% về mặt thống kê. Ở 30°C hoạt tính tương đối của enzyme biểu hiện tốt nhất. Khi tăng nhiệt độ thì hoạt tính tương đối của enzyme giảm dần (Hình 3). Hoạt tính của enzyme giảm rõ rệt từ 50°C đến 70°C trở lên. Nhiệt độ lên đến 80°C và thời gian xử lý trong 5 phút thì hầu như enzyme không còn có khả năng xúc tác để tạo thành sản phẩm guaiacol có màu nâu như trong Hình 4.

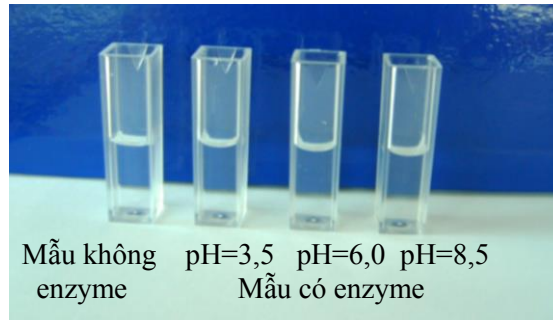
**Bảng 4: Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính tương đối của enzyme hoá nâu POD (Abs./100 µl/1 phút) trong hạt sen**

Nhiệt độ	Hoạt tính tương đối của enzyme POD
30°C	0,071 a
40°C	0,047 b
50°C	0,013 c
60°C	0,010 d
70°C	0,006 e
80°C	0,004 e

*Các chữ theo sau các số giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 1% theo phép thử Duncan*



**Hình 3: Động thái hoạt động của enzyme hoá nâu POD (Abs./100 µl/1 phút) trong hột sen ở các mức nhiệt độ khác nhau**



**Hình 4: Dung dịch sau phản ứng khi enzyme được xử lý ở 80°C trong 5 phút với các mức pH khác nhau**

### 3.2.3 Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ lên hoạt tính tương đối của enzyme hoá nâu POD trong hột sen

Sự biến đổi hoạt tính tương đối của hệ enzyme hóa nâu POD với các mức pH ở các nhiệt độ khác nhau được mô tả trong Bảng 5. Với cùng một chế độ pH, khi thay đổi nhiệt độ thì hoạt tính tương đối của enzyme cũng biến đổi theo và có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê. Nhìn chung, hoạt tính tương đối của enzyme biểu hiện tốt nhất ở 30°C đối với mọi chế độ pH, nhưng với pH thấp (3,5) hoặc pH cao (8,5) thì hoạt tính tương đối của enzyme ở nhiệt độ này cũng không cao.

Hình 5 cho thấy đường biểu diễn động thái hoạt động của hệ enzyme ở pH 3,5 gần như một đường thẳng, hoạt tính của enzyme tương ứng với nhiệt độ khảo sát từ 30°C đến 80°C đều rất yếu, sự gia tăng nhiệt độ không làm thay đổi hoạt tính của enzyme. Ở các mức pH cao hơn từ 4 đến 8,5, đường biểu diễn động thái hoạt động của enzyme theo một qui luật chung là có giá trị cao ở nhiệt độ 30°C, sau đó giảm dần đến 50°C và duy trì ở mức thấp từ 60 đến 80°C. Hoạt tính tương đối của enzyme mạnh nhất ở 30°C, khi tăng nhiệt độ thì hoạt tính tương đối của enzyme giảm ở tất cả các mức độ pH.

Động thái hoạt động của enzyme hoá nâu POD với các mức pH ở các nhiệt độ khác nhau trong dịch trích hột sen được thể hiện trong Hình 6. Nhìn chung các đường biểu diễn có dạng hình chuông với hoạt tính thể hiện mạnh nhất ở pH 6. Khi gia tăng nhiệt độ, đỉnh của hình chuông thấp dần thể hiện hoạt tính của enzyme giảm dần. Khi nhiệt độ lớn hơn 50°C, đỉnh của hình chuông giảm nhanh và đường biểu diễn gần như là một đường thẳng khi nhiệt độ đạt đến 80°C thể hiện sự mất hoạt tính của enzyme ở nhiệt độ này.

**Bảng 5: Sự biến đổi hoạt tính tương đối của enzyme hóa nâu POD với các mức pH ở các nhiệt độ khác nhau trong dịch trích hột sen**

Nhiệt độ \ pH	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0
30 <sup>0</sup> C	0,010 a	0,038 a	0,092 a	0,105 a	0,104 a	0,112 a
40 <sup>0</sup> C	0,008 b	0,013 b	0,042 b	0,060 b	0,066 b	0,104 a
50 <sup>0</sup> C	0,008 b	0,010 bc	0,013 c	0,020 c	0,024 c	0,029 b
60 <sup>0</sup> C	0,007 b	0,009 cd	0,011 c	0,017 c	0,017 cd	0,021 b
70 <sup>0</sup> C	0,007 b	0,008 cd	0,009 c	0,009 c	0,011 cd	0,007 c
80 <sup>0</sup> C	0,005 c	0,006 d	0,006 c	0,006 c	0,006 d	0,005 c

Nhiệt độ \ pH	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5
30 <sup>0</sup> C	0,104 a	0,076 a	0,067 a	0,043 a	0,033 a
40 <sup>0</sup> C	0,092 b	0,055 b	0,044 b	0,022 b	0,010 b
50 <sup>0</sup> C	0,010 c	0,010 c	0,010 c	0,005 c	0,005 c
60 <sup>0</sup> C	0,008 c	0,006 c	0,005 c	0,005 c	0,004 cd
70 <sup>0</sup> C	0,005 c	0,005 c	0,003 c	0,003 c	0,002 cd
80 <sup>0</sup> C	0,003 c	0,002 c	0,002 c	0,002 c	0,002 d

Các chữ theo sau các số giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 1% theo phép thử Duncan

## 4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

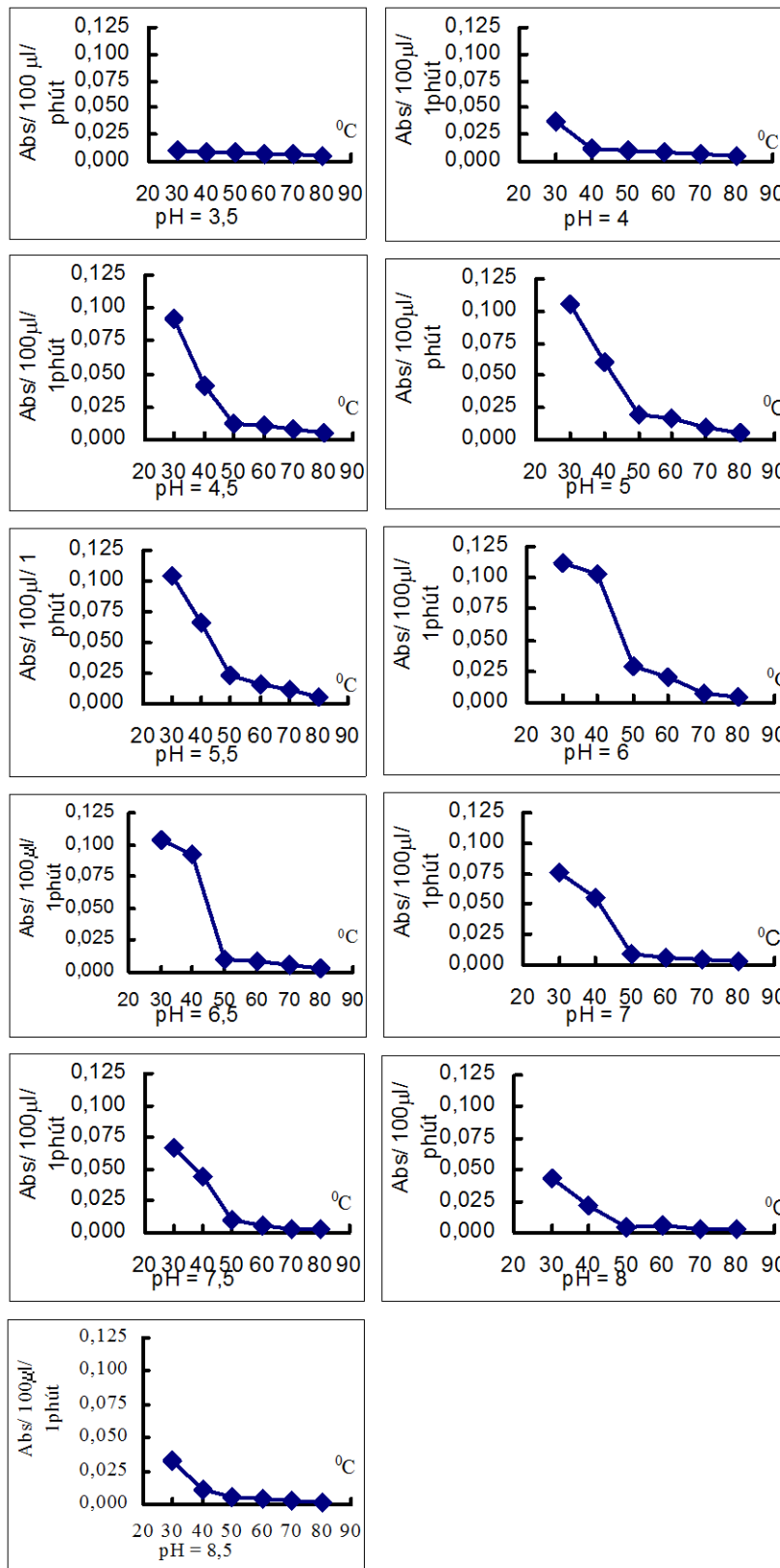
### 4.1 Kết luận

Từ kết quả thí nghiệm cho phép rút ra những kết luận sau:

- Tỷ lệ pha loãng dịch trích thô để khảo sát hoạt tính tương đối của enzyme hoá nâu trong hột sen là 1:10.
- Hoạt tính tương đối của enzyme hoá nâu trích từ hột sen hoạt động mạnh ở pH 6,0. Ở pH 3,5 và 8,5 hoạt động của enzyme rất yếu gần như bị bất hoạt.
- Enzyme POD trích từ hột sen hoạt động mạnh ở nhiệt độ 30<sup>0</sup>C. Ở nhiệt độ trên 70<sup>0</sup>C enzyme gần như vô hoạt.

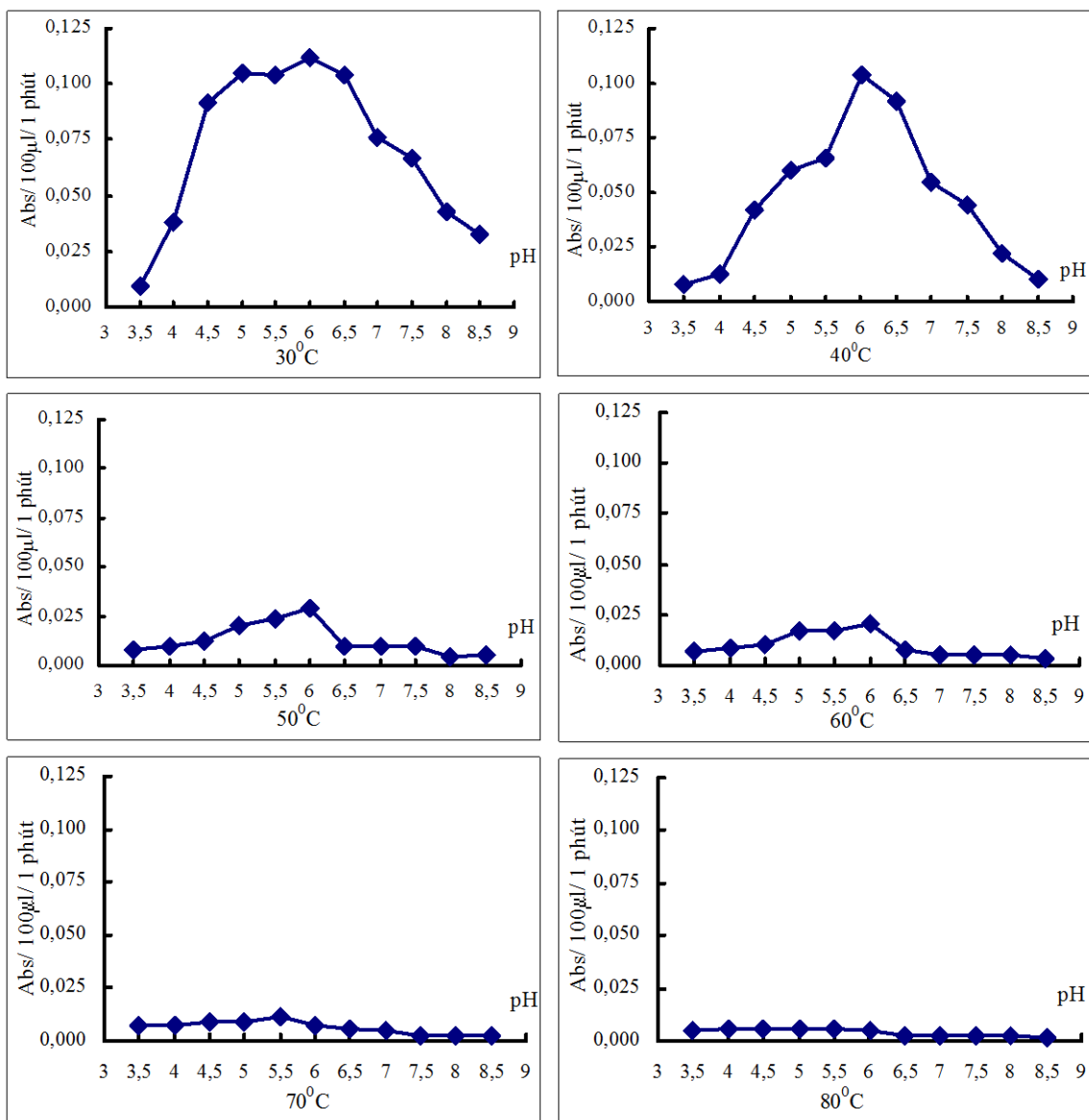
### 4.2 Đề nghị

- Có thể vô hoạt enzyme peroxidase từ dịch trích hột sen bằng dung dịch acid ở pH 3,5 và dung dịch kiềm ở pH 8,5 hoặc nhiệt độ từ 70<sup>0</sup>C trở lên. Khi xử lý nhiệt cần chú ý nhiệt độ tâm của mẫu để xử lý mẫu đạt đúng yêu cầu.
- Cần khảo sát ảnh hưởng của các thành phần có trong dịch trích enzyme của hột sen để làm rõ ảnh hưởng hóa nâu gây ra do enzyme và không do enzyme.



**Hình 5: Động thái hoạt động của enzyme hoá nâu POD với các mức pH ở các nhiệt độ khác nhau trong dịch trích hạt sen**





**Hình 6: Động thái hoạt động của enzyme hoá nâu POD ở các mức nhiệt độ với các mức pH khác nhau trong dịch trích hạt sen**

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Dennis D. Miller. 1998. Food chemistry, A laboratory Manual. A Wiley-Interscience Publication.  
 Lê Ngọc Tú. 2003. Hoá Học Thực Phẩm. Nhà Xuất Bản Khoa Học Kỹ Thuật Hà Nội.  
 Lillian Hoagland Meyer. 1964. Food Chemistry, Reinhold publishing corporation – New York and Charles E. Tuttle company- Tokyo.  
 Nguyễn Đình Triệu. 2001. Các Phương Pháp Phân Tích Vật Lý Và Hoá Lý. Nhà Xuất Bản Khoa Học Và Kỹ Thuật Hà Nội.  
 Nguyễn Đức Lượng và Cao Cường. 2003. Thí nghiệm Công Nghệ Sinh Học tập 1- Thí Nghiệm Hóa Sinh Học. Nhà Xuất Bản Đại Học Quốc Gia Thành Phố Hồ Chí Minh.  
 Nguyen Quoc Vong. 2001. Lotus for Export to Asia - An Agronomic and Physiological Study, RIRDC Publication No 01/03, RIRDC Project No DAN 125A.  
 Nguyễn Thị Trân Châu, Nguyễn Thị Hiền và Phùng Gia Tường. 1997. Thực Hành Hoá Sinh Học. Nhà Xuất Bản Giáo Dục 4-1997.  
 Nguyễn Văn Mùi. 2001. Thực Hành Hoá Sinh Học. Nhà xuất Bản Đại Học Quốc Gia Hà Nội.  
 Phạm Hoàng Hộ. 1999. Phân Loại Thực Vật tập 1. Nhà Xuất Bản Trẻ.  
 Viera, I. da C., and Fetiaello-Filho, O. 1998. Flow injection spectrophotometric determination of hydrogen peroxide using a crude extract of zucchini (*Cucurbita pepo*) as a source of peroxidase. The Analyst. 123: 1809-1812.