

ẢNH HƯỞNG CỦA ĐỘ CHÍN CÀ CHUA VÀ NỒNG ĐỘ NaCl ĐẾN QUÁ TRÌNH TRÍCH LY PECTIN METHYLESTERASE TỪ CÀ CHUA (*SOLANUM LYCOPERSICON* L.)

Nguyễn Văn Mười¹, Từ Minh Trung², Lê Vũ Lan Phương² và Trần Thanh Trúc¹

ABSTRACT

Effects of maturity stages of tomato and NaCl concentration on extracting tomato PME were investigated in order to determine the best extracting conditions which resulted in the highest productivity and activity. In addition, the most appropriate storage condition for remaining PME activity was examined. Consequently, 1.25M NaCl and breaker level of maturity were selected. Total activity was around 65,000 U per kg of fresh material. The enzyme activity was highest on the day after extracting, then it had a steady decrease during storing time. After a period of 21 days, 36% of PME activity was lost at a freezing storage temperature of -30°C, whereas 69% of that was drop at a cooling storage temperature of 4°C. Thus, freezing storage at -30°C was chosen.

Keywords: *tomato PME, maturity, NaCl concentration, activity, storage condition*

Title: *Effects of maturity stages of tomato and NaCl concentration on extraction of pectin methylesterase from tomato (solanum lycopersicon l.)*

TÓM TẮT

Việc nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình trích ly pectin methylesterase (PME) từ cà chua được thực hiện nhằm xác định điều kiện trích ly PME cho hiệu suất và hoạt tính cao. Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch muối NaCl và độ chín đến khả năng trích ly PME được khảo sát, đồng thời chế độ bảo quản PME thích hợp giúp duy trì hoạt tính của enzyme cũng được xác định. Kết quả nghiên cứu cho thấy ở nồng độ dung dịch muối NaCl 1,25M và độ chín khởi phát (breaker) cho hoạt tính PME cao nhất. Ước tính hoạt tính tổng PME đạt 6566 U cho 100g nguyên liệu cà tươi (tương đương khoảng 65000 U/kg nguyên liệu cà tươi). Quá trình tồn trữ PME tốt nhất ở nhiệt độ -30°C. Sau thời gian tồn trữ 21 ngày, PME giảm 36% hoạt tính ở nhiệt độ trữ đông -30°C và giảm đến 69% hoạt tính trong điều kiện bảo quản ở nhiệt độ 4°C.

Từ khóa: *PME cà chua, độ chín, nồng độ NaCl, hoạt tính, chế độ bảo quản*

1 TỔNG QUAN

Vấn đề trích ly và tinh chế pectin methylesterase (PME hay PE, EC.3.1.1.11) cũng như cấu trúc và tính chất của enzyme này từ lâu đã trở thành chủ đề nghiên cứu, thảo luận của nhiều nhà khoa học. PME tỏ ra là đối tượng nghiên cứu đáng quan tâm trong chế biến rau quả vì những đặc điểm có lợi và có hại của nó.

Nhiều nghiên cứu về PME đã cho thấy những ưu điểm của việc sử dụng enzyme này vào quá trình sản xuất thực phẩm. Vấn đề ứng dụng PME để cải thiện độ cứng

¹ Bộ môn Công nghệ Thực phẩm, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

² Sinh viên lớp Công nghệ Thực phẩm khóa 30, Trường Đại học Cần Thơ

của sản phẩm rau quả đã thu được nhiều kết quả khả quan. Bên cạnh đó, việc sử dụng chế phẩm enzyme pectinase (bao gồm PME, PG, cellulase...) tạo nên những tiến bộ trong chế biến bao gồm làm tăng hiệu suất thu hồi nước quả, làm trong và ổn định chất lượng nước quả hay ứng dụng trong công nghiệp chế biến ca cao và cà phê. Tuy nhiên, việc ứng dụng PME trong thực tế vẫn còn có những khó khăn nhất định, trong đó phải kể đến ảnh hưởng của nguồn nguyên liệu và điều kiện trích ly, tinh chế PME. Hai nguồn đối tượng phục vụ nghiên cứu và sản xuất PE, vi sinh vật và thực vật, đều có những đặc điểm riêng, có những yêu cầu khác nhau trong quá trình sản xuất và khả năng sử dụng cũng không giống nhau.

Các dạng tồn tại và các đặc điểm sinh hóa của PME từ các loại thực vật khác nhau (đu đủ, đào, cà chua, cam, chanh, táo, dâu tây, chuối, cà rốt,...) đã được nghiên cứu. Với những phát triển vượt bậc về mặt kỹ thuật sinh học, lựa chọn cà chua để trích ly PME phục vụ cho công nghiệp chế biến là hướng đi thích hợp. Nhiều nghiên cứu trên cà chua đã được tiến hành (Harriman, 1991; Giovane *et al.*, 1993; Wendy và Barrett, 2001; Fachin, 2002...) đều cho thấy cà chua là một nguồn PME thực vật có nhiều ưu điểm: hoạt tính khá mạnh, dễ trích ly, phương pháp đơn giản, nguyên liệu dồi dào và rẻ tiền. Vì vậy, vấn đề tối ưu hóa quá trình trích ly PME từ cà chua phục vụ nghiên cứu và sản xuất được đặt ra.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu cà chua

Cà chua giống Savior loại trái to, được thu mua tại ruộng ở xã Trung Hiếu, huyện Vũng Liêm, tỉnh Vĩnh Long nên có cùng điều kiện sinh trưởng, phát triển, cùng điều kiện ngoại cảnh (đất đai, dinh dưỡng, khí hậu, điều kiện chăm sóc,...). Thu hái, vận chuyển trong điều kiện thời tiết tốt (sáng sớm) và ủ chín tự nhiên trong phòng thí nghiệm.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Phương pháp chuẩn bị mẫu

Phân loại cà chua theo độ chín dựa trên tiêu chuẩn phân loại cà chua thương mại của USDA (1991). Theo đó cà được phân thành sáu độ chín: xanh thuần thực, khởi phát (breaker), chuyển chín (tương đương chín 1/3), hồng (tương đương chín 2/3), đỏ nhạt (chín 90%), chín đỏ (tương đương chín hoàn toàn). Tuy nhiên, giai đoạn giữa chín 90% và chín hoàn toàn là không rõ ràng vì giai đoạn này chuyển tiếp cho nhau khá nhanh. Một độ chín khác đáng quan tâm trong quá trình chín của cà chua là quá chín, vì vậy khảo sát thêm hoạt tính PME trên cà quá chín để so sánh với các độ chín khác là cần thiết. Nguyên liệu thô trong nghiên cứu này được chọn tại sáu độ chín: xanh thuần thực, khởi phát (breaker), chuyển chín (chín 1/3), hồng (chín 2/3), chín đỏ (chín hoàn toàn) và quá chín.

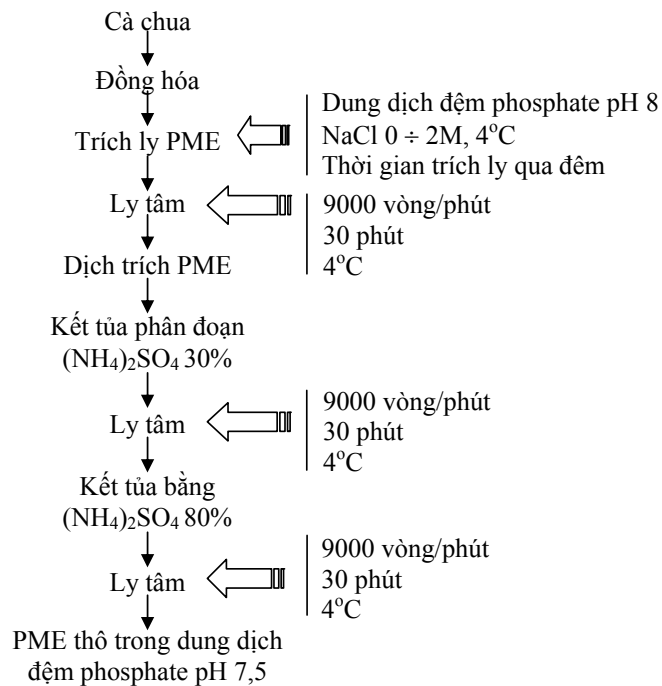
Cà chua được thu hái lúc đạt độ chín thuần thực, sau đó được ủ đến khi đạt sáu độ chín yêu cầu. Chọn cà có kích cỡ đồng đều, nguyên vẹn, loại ra những quả dập và có các biểu hiện hư hỏng. Tiến hành rửa bỏ tạp chất bên ngoài (cuống, lá).

Chuẩn bị mẫu puree cà: cân khối lượng mẫu tươi 150g, xắt nhỏ, trữ đông trong tủ đông ở nhiệt độ -30°C để sử dụng cho các thí nghiệm. Trước khi tiến hành thí

nghiệm, tan giá mẫu ở nhiệt độ phòng (30°C) rồi đồng hóa bằng máy xay sinh tố. Tiến hành trích ly PME từ puree cà dựa trên phương pháp Wicker có sửa đổi (mục 2.2.2). Trữ enzyme thô ở nhiệt độ mát (4°C) đối với thí nghiệm 1, 2 và ở các nhiệt độ tồn trữ khác nhau trong thí nghiệm 3.

2.2.2 Phương pháp trích ly PME từ cà chua

Qua một số thí nghiệm thăm dò cho thấy quá trình trích ly PME theo phương pháp Wicker (1992) vượt trội về hiệu quả trích ly cũng như độ tinh sạch của enzyme. Phương pháp này rất thích hợp cho việc trích ly PME từ thực vật. Tuy nhiên, có một số khó khăn về thiết bị, hóa chất và thời gian khi thực hiện phương pháp Wicker. Thí nghiệm thăm dò còn chỉ ra rằng hiệu quả trích ly và hoạt tính của PME vẫn được duy trì khi sử dụng phương pháp Wicker với một số thông số kỹ thuật được thay đổi. Quy trình trích ly theo phương pháp Wicker sửa đổi được tổng hợp ở (Hình 1).



Hình 1: Quy trình trích ly PME thô từ cà chua theo phương pháp Wicker (1992) có sửa đổi

2.2.3 Phương pháp đo hoạt tính PME

Hoạt tính của PME được xác định bằng phương pháp chuẩn độ liên tục gốc carboxyl giải phóng ra từ dung dịch pectin (Crelier *et al.*, 1995) bằng cách sử dụng thiết bị chuẩn độ tự động pH – Stat và dung dịch NaOH 0,01 N. Phép định lượng được thực hiện với dung dịch pectin tảo (30mL) nồng độ 3,5 mg/mL có chứa 0,117 M NaCl (pH 7,0) ở 22°C. Hoạt tính của enzyme PME được xác định thông qua việc ghi liên tục thể tích NaOH chuẩn dùng để trung hòa lượng carboxyl được giải phóng trong dung dịch, trong khoảng thời gian 5 phút ở nhiệt độ phản ứng là 30°C

(nhiệt độ phòng). Đơn vị hoạt tính của PME được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết để giải phóng ra 1 μ mol carboxyl trong một phút, theo các điều kiện phản ứng ở trên.

2.2.4 Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng việc sử dụng phần mềm Statgraphic Plus 4.0. Sử dụng phương pháp phân tích phương sai (ANOVA) để đưa ra kết luận về sự sai biệt giữa các giá trị trung bình các nghiệm thức. Các số trung bình được so sánh bằng phương pháp LSD.

2.3 Phương pháp bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí với bốn lần lặp lại, theo phương thức cố định các điều kiện, chỉ thay đổi một nhân tố khảo sát.

2.3.1 Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng nồng độ muối NaCl trong dịch trích ly đến khả năng trích ly PME từ cà chua

Nồng độ muối NaCl sử dụng (mol/L) được khảo sát ở 8 mức độ, từ 0,25M đến 2M.

Trích ly PME từ cà chua (độ chín hoàn toàn) với tám nồng độ muối NaCl (trong đệm phosphate 1/15M, pH 8,0) và mẫu đối chứng (chỉ trích ly bằng dung dịch đệm). Tiến hành đo hoạt tính bằng phương pháp chuẩn độ điện thế. Chọn nồng độ muối tối ưu để hiệu suất trích ly (U/ 100 g nguyên liệu cà chua) và hoạt tính riêng PME (U/mL dịch trích) cao nhất.

2.3.2 Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng mức độ chín của cà chua đến khả năng trích ly PME

Khảo sát thực hiện ở cả 6 mức độ chín, xác định theo tiêu chuẩn phân loại cà chua của USDA (1991) từ xanh (thuần thực), chín khởi phát (Breaker), chín 1/3 (chuyên chín), chín 2/3 (hồng), chín hoàn toàn (đỏ sáng và đỏ) và quá chín.

Trích ly PME ở sáu mức độ chín bằng phương pháp Wicker có sửa đổi (mục 2.2.2) thu được PME thô. Tiến hành đo hoạt tính bằng phương pháp chuẩn độ điện thế. Chọn lựa loại cà chua có độ chín phù hợp cho hiệu suất trích ly (U/ 100 g nguyên liệu cà chua) và hoạt tính riêng PME (U/mL dịch trích) cao nhất.

2.3.3 Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng nhiệt độ tồn trữ đến hoạt tính riêng của PME cà chua

Nhiệt độ tồn trữ PME cà chua được khảo sát ở hai mức độ: làm lạnh 4°C và lạnh đông -30°C.

PME cà chua thu được từ thí nghiệm 2 được tồn trữ ở đệm phosphate 1/15M, pH 7,5 với hai chế độ nhiệt: nhiệt độ mát (4°C) và nhiệt độ lạnh đông (-30°C). Khảo sát sự thay đổi hoạt tính enzyme theo thời gian tồn trữ tùy thuộc nhiệt độ tồn trữ. Hoạt tính xác định trong quá trình tồn trữ bằng phương pháp chuẩn độ điện thế. Chọn chế độ tồn trữ thích hợp để giữ hoạt tính riêng PME (U/mL) tốt nhất.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng nồng độ muối NaCl đến khả năng trích ly PME

Muối NaCl giữ vai trò đặc biệt quan trọng trong quá trình trích ly PME từ thực vật. Sự khác biệt về giống, loại và đặc tính nguyên liệu đòi hỏi phải có một nồng độ

NaCl trích ly tương ứng. Chính vì thế, việc khảo sát lại ảnh hưởng của nồng độ muối NaCl đến khả năng trích ly PME từ cà chua được trồng và thu hoạch từ vườn cà ở Vũng Liêm (Vĩnh Long) được thực hiện. Hiệu quả của quá trình trích ly PME theo nồng độ muối NaCl khác nhau (từ 0 ÷ 2M) được đánh giá dựa trên hoạt tính tổng (U/100g) và hoạt tính riêng (U/mL), kết quả được tổng kết ở (Bảng 1).

Bảng 1: Ảnh hưởng của nồng độ muối NaCl trong dung dịch trích ly đến hoạt tính của PME từ thịt quả cà chua

Nồng độ NaCl (M)	Hoạt tính riêng (U/mL)	Hoạt tính tổng (U/100g)
0	64,53 ^d ± 4,55	2604,36 ^d ± 184,99
0,25	115,73 ^{bc} ± 8,17	4730,13 ^{bc} ± 291,86
0,5	121,87 ^b ± 5,68	5138,67 ^b ± 88,16
0,75	122,93 ^b ± 6,47	5060,44 ^b ± 478,64
1	124,27 ^b ± 8,33	5248,0 ^b ± 391,70
1,25	150,93a ± 16,65	6339,2a ± 699,44
1,5	116,27 ^{bc} ± 15,27	5001,96 ^b ± 844,39
1,7	116,8 ^{bc} ± 14,47	4711,82 ^{bc} ± 449,86
2	99,2 ^c ± 8,65	4064,36 ^c ± 142,19

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%

Chữ số in đậm thể hiện hoạt tính PME cao nhất so với các mẫu còn lại

Từ kết quả ở bảng 1 cho thấy, quy luật biến đổi của hoạt tính tổng và hoạt tính riêng theo nồng độ dung dịch muối NaCl trích ly là như nhau. Hoạt tính cũng như hiệu suất trích ly PME từ cà chua gia tăng ứng với nồng độ muối NaCl sử dụng tăng dần theo dãy từ 0 M đến 1,25 M. Khi nồng độ NaCl sử dụng vượt quá 1,25 M, hiệu quả trích ly PME lại giảm. Có thể nói, 1,25 M là ngưỡng nồng độ tối thích của NaCl đối với quá trình trích ly PME từ cà chua. Giá trị này tương đồng với nghiên cứu trên cà của Pirovani de Rodríguez và Di Pentima (1986) tại nồng độ NaCl 0,5% (tương đương từ 1,25 ÷ 1,5M). Việc trích ly PE tùy thuộc vào cách enzyme này kết hợp với thành tế bào. Hultin và Levin (1963) nhận thấy hoàn toàn có thể trích ly PME bằng nước và bằng dung dịch muối cho hiệu quả gấp 10 lần bằng nước. Vì vậy, PME cho kết quả khả quan ở những nồng độ dung dịch muối trích ly cao. Trường hợp không sử dụng muối NaCl (mẫu đối chứng) cho hoạt tính PME thấp nhất nhưng vẫn có sự hiện diện của enzyme. Điều này có thể giải thích do dung dịch đậm trích ly chứa hai muối phosphate Na_2HPO_4 và KH_2PO_4 nồng độ 1/15 M cũng tạo được gradient nồng độ làm động lực cho sự khuếch tán protein, tương tự tác dụng của NaCl. Tuy nhiên, sử dụng muối NaCl nồng độ cao cũng là nguyên nhân làm giảm hoạt tính của PME. Điều này có thể do sự biến đổi cấu trúc của PME, đặc biệt là sự thay đổi điện tích ở trung tâm hoạt động do các ion Na^+ và Cl^- gây ra. Tác dụng của nồng độ muối cao cạnh tranh lớp áo nước bên ngoài enzyme làm cho cấu trúc xoắn sợi bị thay đổi, làm thay đổi điện tích và cấu trúc trung tâm hoạt động, dẫn đến trung tâm hoạt động của PME bị bất hoạt. Mặc khác nồng độ muối cao ứng với nồng độ Na^+ cao cũng là nguyên nhân gây nên sự bất hoạt PME do lượng dư các ion này vây quanh các nhóm carboxylate của pectin nằm kế cận với các nhóm ester cần thiết cho phản ứng thủy phân (Nguyễn Đức Lượng *et al.*, 2004).

Tóm lại, hiệu quả trích ly PME cũng như sự thay đổi hoạt tính của enzyme này chịu sự chi phối của nồng độ muối NaCl trong dung dịch trích ly. Trong trường hợp trích ly PME từ cà chua được mua tại Vũng Liêm (Vĩnh Long), hiệu quả trích ly cũng như hoạt tính của PME thu được cao nhất ở giá trị nồng độ muối NaCl sử dụng là 1,25M.

3.2 Ảnh hưởng của sự thay đổi độ chín của cà chua đến khả năng trích ly PME

Độ chín (hay mức độ thuần thực của quả) có ảnh hưởng rất lớn đến hàm lượng cũng như hoạt tính PME thực vật. Trong thí nghiệm này, sáu độ chín cà được khảo sát, lần lượt từ xanh thuần thực (mature), khởi phát (breaker), chín 1/3, chín 2/3, chín hoàn toàn và quá chín. Kết quả được đánh giá dựa trên sự thay đổi hoạt tính tổng và hoạt tính riêng của PME từ cà chua ở các mức độ chín khác nhau, tổng hợp ở (Bảng 2).

Bảng 2: Biến thiên hoạt tính PME trích ly theo độ chín

Mẫu	Độ chín	Hoạt tính riêng (U/mL)	Hoạt tính tổng (U/100g)
1	Xanh	113,9c ± 14,71	4771,7c ± 698,45
2	Khởi phát	150,8a ± 6,28	6566,13a ± 555,41
3	Chín 1/3	126,2bc ± 3,66	5516,2bc ± 207,07
4	Chín 2/3	136,8b ± 1,73	6391,07a ± 506,91
5	Chín hoàn toàn	132,4b ± 4,73	6197,73ab ± 290,02
6	Quá chín	128,6b ± 12,52	6069,73ab ± 657,14

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%

Chữ số in đậm thể hiện hoạt tính PME cao nhất so với các mẫu còn lại

Từ kết quả thí nghiệm ở bảng 2 có thể nhận thấy rằng, hoạt tính riêng của PME cao nhất tại độ chín khởi phát (breaker). Không có sự khác biệt nào giữa hoạt tính riêng PME ở các độ chín 1/3, 2/3, chín hoàn toàn và quá chín. Giai đoạn quả xanh thể hiện hoạt tính riêng PME thấp nhất. Đồng thời, có sự giảm nhẹ hoạt tính riêng ở độ chín 1/3 so với dãy độ chín tăng dần về sau. Ảnh hưởng của mức độ chín đến hoạt tính tổng PME cũng có qui luật tương tự như hoạt tính riêng.

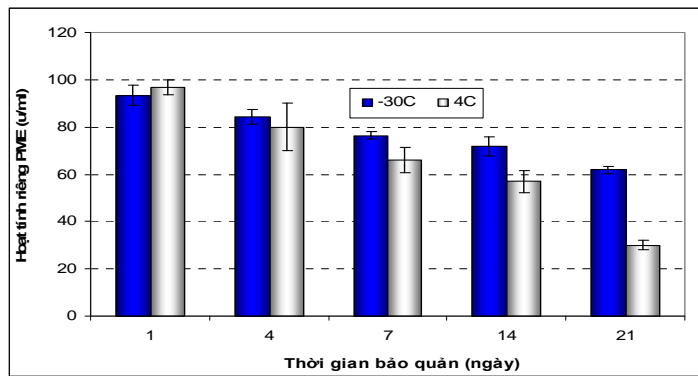
PME thể hiện hoạt tính riêng cao nhất ở giai đoạn chín khởi phát, nguyên nhân chính có lẽ phụ thuộc vào số lượng isozyme có mặt trong giai đoạn này. Về cơ bản có hai dạng PME cùng tồn tại ở giai đoạn đầu của quá trình chín cà chua là PME1 và PME2. Giai đoạn này, PME1 và PME2 đều tăng. Sự tích lũy PME1 và PME2 làm cho giai đoạn chuyển chín khởi phát (breaker) tích trữ một lượng lớn PME nên sự thể hiện hoạt tính cao nhất, phản ánh đúng sinh hóa quá trình chín tự nhiên của quả. Harriman *et al.* (1991) khi nghiên cứu trên cà (giống *Rutger*) cũng cho thấy rằng PME thể hiện hoạt tính ngay khi quả chưa thuần thực và tăng lên hai hay ba lần trong suốt quá trình chín. Hoạt tính tăng song song với hàm lượng PME. Tuy nhiên, khi vượt qua khỏi giai đoạn chuyển chín thì hoạt tính giảm, hàm lượng tiếp tục tăng (Harriman *et al.*, 1991). Giữa giai đoạn xanh thuần thực và chuyển màu, hàm lượng PE tăng gấp đôi. Tuy nhiên, có sự thay đổi về tỉ lệ PME1 và PME2 trong quá trình chín của quả. Trong quá trình chín, PME1 giảm xuống đồng thời với sự tích lũy dần PME2 đến khi trái cây có màu chín đặc trưng (Turker và cộng sự, 1982). Điều này có thể làm giảm nhẹ hoạt tính trong giai đoạn đầu quả chín (chín 1/3). Càng về sau do sự tích lũy của PME2 nên hoạt tính tăng nhẹ trở lại ở độ

chín 2/3. Điều này cũng lý giải cho giá trị hoạt tính tổng bằng nhau tại hai độ chín khởi phát (breaker) và 2/3. Trích ly PME từ thịt quả cà còn xanh thu phần lớn PME và ít enzyme PG. Các isozyme của PME đều có mặt trong cà còn xanh, trong khi đó PG không thể hiện hoạt tính cho đến khi quá trình chín trở nên mạnh mẽ (Pressey và Avants, 1982; trích dẫn bởi Wendy và Barrett, 2001). Điều này cũng được chỉ ra bởi Brummell và Harpster (2001). Đỉnh cao hoạt tính PME nằm trong vùng chín 1/3 (pink) là vùng quá trình chín được nhận thấy rõ ràng. Ở giai đoạn chuyển chín của nghiên cứu này, tuy hoạt tính PE không là cao nhất nhưng hoạt tính của một loạt các enzyme khác như PG, β -galactanase thể hiện ở mức thấp nhất. Một điểm có lợi khi chọn độ chín khởi phát cho trích ly PME là do lượng PG hoạt động ít. Đặc điểm này của PG thuận lợi cho việc tinh sạch (nếu có) hay sử dụng cho cải thiện cấu trúc. Khi quả chín hoàn toàn và quá chín, sự tích lũy các đơn vị polygalacturonide là chất ức chế PME nên làm giảm hoạt tính PME.

Như vậy, tổng kết thí nghiệm 1 và 2 cho thấy quá trình trích ly PME tốt nhất ở nồng độ dung dịch muối NaCl 1,25M và cà chua đạt độ chín khởi phát (breaker). Việc trích ly được PME có hoạt tính cao không chỉ dừng lại ở dạng PME thô mà còn có ý nghĩa trong việc sử dụng dài lâu. Việc tồn trữ PME và duy trì hoạt tính như ban đầu nhằm sử dụng cho các mục đích tinh sạch, nghiên cứu hay thương mại được đặt ra. Vì vậy, cần đề ra chế độ tồn trữ thích hợp nhằm làm giảm sự tổn thất hoạt tính ở mức thấp nhất.

3.3 Ảnh hưởng nhiệt độ tồn trữ đến hoạt tính riêng của PME cà chua

PME trích ly được chỉ là dạng thô có nhiều tạp chất (protein tạp, cellulase,...). Quá trình tủa phân đoạn bằng amonium sulfate kết hợp ly tâm không loại được hết các protein tạp, muối dùng cho trích ly, kết tủa,... Vì vậy việc xác định thời gian tồn trữ thích hợp được đặt ra trong thí nghiệm này. Sự tồn trữ PME thô ở hai chế độ nhiệt độ: bảo quản lạnh (4°C) và trữ đông (-30°C) được tiến hành. Trong thí nghiệm này, PME được trích ly dựa trên điều kiện tối ưu thí nghiệm 1 và 2 (nồng độ muối NaCl 1,25M và độ chín khởi phát - breaker). Kết quả thí nghiệm ghi nhận (Hình 2).



Hình 2: Ảnh hưởng nhiệt độ và thời gian tồn trữ đến hoạt tính riêng của PME cà chua

Kết quả ở hình 2 cho thấy có sự khác biệt về khả năng duy trì hoạt tính PME ở 2 chế độ tồn trữ. Hoạt tính PME nhìn chung thể hiện ở mức cao nhất sau một ngày trích ly và đều giảm dần theo thời gian ở hai chế độ tồn trữ. Tuy nhiên, ở 4°C, sự

suy giảm hoạt tính rõ rệt khi về cuối giai đoạn khảo sát (Hình 2). Theo đó chế độ tồn trữ tốt nhất là ở -30°C. Ngày bảo quản đầu tiên (ngày 1) của cả hai chế độ tồn trữ, hoạt tính PME tăng so với PME mới kết tủa (ngày 0) và đạt giá trị cực đại. Điều này có thể giải thích là do sự tái tạo lại hình dạng trung tâm hoạt động bị bất hoạt do tác dụng kết tủa ammonium sulfate gây ra. Tác dụng tủa của ammonium sulfate là thuận nghịch nên protein PME chỉ tạm thời mất hoạt tính. Trong môi trường dung dịch đệm 7,5 khá ổn định, protein PME có điều kiện trở về trạng thái tự nhiên. Thời điểm ngay sau khi kết tủa (ngày 0- khoảng 4 giờ khi thu nhận PME) vẫn chưa đủ cho các PME phục hồi lại cấu trúc ban đầu. Ngược lại, sau một ngày bảo quản (24 giờ sau khi thu nhận PME), PME có đủ thời gian để hồi phục lại cấu trúc ban đầu.

Trường hợp bảo quản lạnh đông PME, mặc dù hoạt tính của PME cũng tăng trong ngày thứ nhất nhưng có giá trị thấp hơn so với bảo quản lạnh. Điều này có thể là do sự chuyển đột ngột của môi trường đệm chứa PME từ dạng lỏng sang dạng tinh thể đá. Trong môi trường tinh thể đá bao quanh, enzyme PME ít có điều kiện thuận lợi để phục hồi về trạng thái tự nhiên. Hơn nữa, ở nhiệt độ -30°C, sự chuyển pha dung dịch đệm xảy ra nhanh chóng, PME không đủ thời gian để hồi phục. Trong khi đó, ở môi trường đệm bảo quản pH 7,5 và điều kiện nhiệt độ trên điểm đóng băng, các protein PME bảo quản lạnh sẽ dễ dàng duỗi trở về trạng thái ban đầu và hồi phục lớp áo nước bao quanh. Vì vậy, ở ngày thứ nhất bảo quản, PME bảo quản lạnh thể hiện hoạt tính cao hơn PME bảo quản lạnh đông.

Tuy nhiên, mức độ duy trì hoạt tính của PME trong điều kiện bảo quản lạnh đông tỏ ra hiệu quả hơn khi so sánh mẫu bảo quản lạnh. Sau 21 ngày tồn trữ ở chế độ mát 4°C, hoạt tính PE giảm 69% so với hoạt tính cao nhất của ngày thứ nhất. Mức độ giảm ở chế độ bảo quản lạnh đông ở cùng thời điểm vào khoảng 36% (Bảng 3).

Bảng 3: Độ giảm hoạt tính PME theo điều kiện bảo quản mát và lạnh đông

Nhiệt độ	4°C					-30°C					
	Ngày bảo quản	1	4	7	14	21	1	4	7	14	21
Hoạt tính (U/mL)		96,8	80,05	66,2	57	30	93,4	84,2	76,4	71,8	61,8
Độ giảm hoạt tính (%)		0	17,30	31,61	41,12	69,01	0	13,02	21,07	25,83	36,16

Chữ số in đậm thể hiện sự giảm hoạt tính PME cao nhất so với các mẫu còn lại

Sự giảm hoạt tính nhanh nhất của tồn trữ lạnh là ở giai đoạn 14 ÷ 21 ngày. Ở thời điểm này, hoạt tính của PME giảm một nửa so với thời điểm sau trích ly. Tuy nhiên, ở chế độ tồn trữ đông, mức độ giảm hoạt tính chậm hơn, không có sự giảm mạnh hoạt tính được nhận ra (Hình 2 và Bảng 3).

4 KẾT LUẬN

Khi khảo sát khả năng trích ly PME lần lượt tại 9 nồng độ dung dịch NaCl từ 0 ÷ 2M, hoạt tính riêng và hoạt tính tổng PME cao nhất tại nồng độ dịch trích 1,25M. Tại nồng độ 0M vẫn có sự khuếch tán PME vào dịch trích nhờ gradient nồng độ muối phosphate 1/15M. Trích ly PME ở 6 độ chín khác nhau từ mức độ xanh

(thuần thực), khởi phát (breaker), chín 1/3, chín 2/3, chín hoàn toàn và quá chín, hoạt tính PME đạt giá trị cao nhất ở độ chín khởi phát. Ước tính hoạt tính tổng PME đạt khoảng 65000 U/kg nguyên liệu cà chua tươi. Ở hai chế độ bảo quản: nhiệt độ lạnh đông -30°C và nhiệt độ lạnh 4°C , PME thể hiện hoạt tính cao nhất ở ngày tồn trữ đầu tiên và duy trì hoạt tính đến thời gian khảo sát 21 ngày. Sau 21 ngày bảo quản, hoạt tính PME giảm 36% ở nhiệt độ tồn trữ -30°C và giảm 69% ở chế độ 4°C .

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Brummell, D.A., Harpster, M.H, (2001), Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 47, 311-340.
- Duvetter T., (2007), Understanding the role of fungal pectin methylesterase in fruit texture engineering, *Docteraasproefschrift Nr. 729 aan de Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen van de KU. Leuven*.
- Fachin D., Van Loey AM, Ly Nguyen B, Verlent I, Indrawati, Hendrickx Me, (2002), Comparative study of the inactivation kinetics of pectinmethylesterase in tomato juice and purified form, *Biotechnology Progress* 18, 739-744.
- Giovane A., Lucio Quagliuolo, Luigi Servillo, Ciro Balestrieri, Bruna Laratta, Roberto Loiudice, Domenico Castaldo, (1993), Purification and characterization of three isozymes of pectin methylesterase from tomato fruit, *Journal of Food Biochemistry* 17 (5), 339–349.
- Harriman R. W., Denise M. Tieman, and Avtar K. Handa, (1991), Molecular Cloning of Tomato Pectin Methylesterase Gene and its Expression in Rutgers, Ripening Inhibitor, Nonripening, and Never Ripe Tomato Fruits, *Plant Physiol* (1991) 97, 80-87
- Nguyễn Đức Lượng, (2004), Công nghệ enzyme, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.
- Tucker GA, Robertson NG, Grierson D, (1982), Purification and changes in activities of tomato pectinesterase isoenzymes. *J Sci Food Agric* 33: 396-400.
- Van Linden V., (2007), Identification of fruit parameters responsible for impact-bruising of tomatoes, *Doctoraatsproefschrift nr. 732 aan de faculteit Bio ingenieurswetenschappen van de K.U.Leuven*, ISBN 978-90-8826-001-8.
- Wendy H. Ma and Diane M. Barrett, (2001) Effects of maturity and processing variables on heat penetration times, firmness, and drained weight of diced tomatoes (Halley Bos 3155 Cv), *Journal of Food Processing Preservation* 26 (2002) 75-89.
- Wendy H. Ma and Diane M. Barrett, (2001), Effects of raw materials and process variables on the heat penetration times, firmness, and pectic enzyme activity of diced tomatoes (Halley Bos 3155 Cv), *Journal of Food Processing Preservation* 25 (2001) 123-136.