

PHÁT TRIỂN HỆ THỐNG CHỈ THỊ SINH HỌC MÔ TẢ TƯƠNG QUAN NHIỆT ĐỘ - THỜI GIAN CHO QUÁ TRÌNH THANH TRÙNG NHIỆT

Châu Trần Diễm Ái¹, Iesel Van der Plancken, Tara Grauwet và Marc Hendrickx

ABSTRACT

The aim of this study was developing a biological (mainly on enzyme activity) single component TTI in the pasteurization range (60 to 100°C) to evaluate the impact of the thermal process. *Bacillus amyloliquefaciens* (BAA) were chosen to study and solvent engineering was applied to obtain the appropriate kinetic model. The effect of calcium ion on the enhancement of their thermal inactivation was observed. BAA (0.04 mg/mL in Tris HCl buffer pH 8.6, CaCl₂ 5 mM) under isothermal inactivation of BAA were described by first order kinetic model. The kinetic parameters estimated from the isothermal conditions are valid in dynamic condition. The one step non-linear regression was used to estimate the kinetic parameters of both Arrhenius model and TDT model. In this study, the BAA system could be validated in non-isothermal condition with z-value is 15.12°C. To evaluate better the impact of thermal process, other TTI component should be studied and combined with this BAA system.

Keywords: Time - temperature indicator, TTI, thermal process, *Bacillus amyloliquefaciens*, BAA, kinetic model

Title: Development of a time - temperature indicator (TTI) system for the quantification of safety and quality of thermal pasteurization processes

TÓM TẮT

Enzyme α -amylase từ *Bacillus Amyloliquefacien* (BAA) được chọn để nghiên cứu phát triển chỉ thị tương quan nhiệt độ và thời gian bằng phương pháp tích phân (TTI) dựa vào hoạt tính của enzyme (trong khoảng nhiệt độ thanh trùng 60-100 °C). Khi xử lý nhiệt, BAA ở nồng độ thấp bị vô hoạt. Độ bền nhiệt của BAA tăng lên khi có mặt của ion Ca²⁺ trong dung môi. Phương trình nhiệt động học đẳng nhiệt của BAA ở nồng độ 0.04mg/mL trong dung dịch đệm Tris/HCl, pH 8.6, CaCl₂ 5 mM được mô tả bằng phương trình phản ứng bậc nhất. Các thông số nhiệt động học của BAA ước lượng dưới chế độ xử lý đẳng nhiệt được kiểm chứng đúng dưới chế độ xử lý bất đẳng nhiệt. Phân tích hồi qui không tuyến tính một bước được dùng để ước lượng các thông số nhiệt động học trong các phương trình Arrhenius và TDT. Trong nghiên cứu, hệ thống chỉ thị một thành phần BAA được kiểm chứng đúng dưới chế độ xử lý bất đẳng nhiệt với z=15.12 °C. Để đánh giá tốt hơn ảnh hưởng của quá trình xử lý nhiệt lên sản phẩm, cần nghiên cứu kết hợp thêm một hệ thống chỉ thị tương tự với giá trị z khác.

Từ khóa: α -amylase, *Bacillus Amyloliquefacien*, tương quan nhiệt độ - thời gian, thanh trùng nhiệt, chỉ thị

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Sự phát triển của kỹ thuật quá trình nhiệt cùng với yêu cầu ngày càng phát triển của xã hội đối với chất lượng và an toàn thực phẩm đòi hỏi sự có mặt của kỹ thuật

¹ Khoa Nông nghiệp & Sinh học ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

đánh giá hiệu quả những tác động của quá trình xử lý nhiệt đến thực phẩm. Chỉ thị tương quan nhiệt độ và thời gian bằng phương pháp tích phân (TTI) được biết đến như là một phương pháp thích hợp để đánh giá tác động của quá trình xử lý nhiệt. TTI mô phỏng hoàn toàn hoặc gần như hoàn toàn ảnh hưởng của quá trình xử lý nhiệt lên sản phẩm thực phẩm. TTI dựa trên hoạt tính của enzyme cho thấy những ưu điểm so với các loại TTI khác dùng để đánh giá tác động của quá trình xử lý nhiệt lên sản phẩm. Mục tiêu của nghiên cứu là nhằm phát triển một hệ thống chỉ thị sinh học cho quá trình thanh trùng nhiệt dựa vào hoạt tính của enzyme (trong khoảng nhiệt độ 60-100°C).

Enzyme α -amylase từ *Bacillus amyloliquefaciens* (BAA) thuộc nhóm α -amylase và được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm. BAA đã và đang được nghiên cứu để phát triển TTI ứng dụng trong quá trình thanh trùng và tiệt trùng (Van Loey *et al.*, 1997). Ngoài ra dựa trên những kết quả khả quan về sự bền nhiệt của BAA, enzyme này đang được nghiên cứu để phát triển TTI nhiều thành phần (Tomazic và Klibanov, 1988; Lee *et al.*, 2006). Do đó trong nghiên cứu này, BAA được chọn làm đối tượng nghiên cứu để phát triển TTI trong quá trình thanh trùng nhiệt.

2 NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu

α -Amylase từ Bacillus amyloliquefaciens

Enzyme BAA (EC 3.2.1.1) được mua của công ty Sigma (Germany) dưới dạng bột khô. Ban đầu, BAA được pha trong dung dịch đệm 0.1 M Tris/HCl, pH 7.6 với nồng độ dung dịch mẫu gốc nồng độ 100 mg/ml và được lưu trữ ở nhiệt độ -80°C trong nhiều ống nghiệm. Các dung dịch pha loãng trong các dung môi thích hợp ở mỗi thí nghiệm được pha mới từ dung dịch gốc. Cơ chất Megazyme (Ireland) được mua dưới dạng bột, chứa 54.5 mg p-nitrophenyl maltoheptaoside (BPNPG7) không khử và 125 U α -glucosidase trong một lọ. Bột cơ chất Ceralpha được chuyển thành dung dịch trong 10 mL nước cất và được trữ ở -20 °C trong nhiều ống nghiệm nhỏ. Tác chất dừng phản ứng trong phương pháp đo hoạt độ enzyme là dung dịch tri-sodium phosphate solution 20% (w/v), pH 11. Các hóa chất khác đạt tiêu chuẩn phân tích.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Đo hoạt độ enzyme

Dung dịch enzyme α -amylase được pha loãng trong dung dịch đệm citrate 0.1M, pH 6.0 (tại pH tối ưu enzyme bền nhiệt α -glucosidase). Khoảng nồng độ làm việc cho phép của phương pháp xác định hoạt độ enzyme được ước lượng bằng cách lập đường chuẩn cho enzyme và xác định phần đường thẳng biểu thị tương quan nồng độ enzyme và hoạt độ enzyme đo được. 20 μ L of enzyme BAA được cho vào 20 μ L cơ chất. Hỗn hợp được ủ ở 40°C trong 10 phút, trong bể điều nhiệt. Sau đó, 300 μ L tác chất dừng phản ứng được thêm vào để dừng phản ứng. Hỗn hợp cuối cùng được giữ 15 phút trong nước đá nhằm ổn định độ hấp thụ ánh sáng của hỗn hợp. Độ hấp thụ ánh sáng của hỗn hợp được đo bằng quang phổ kế ở bước sóng 400 nm ở 25°C.

Hoạt độ của enzyme BAA được tính bằng lượng enzyme α -amylase cần thiết để giải phóng 1 micromole p-nitrophenol trong một phút từ p-nitrophenyl maltoheptaoside với sự hiện diện của một lượng vừa đủ α -glucosidase.

$$\text{Hoạt độ } \alpha\text{-amylase} = (\Delta A_{400\text{ nm}} * V) / (t * V_t * \epsilon_{mM}) \quad (1)$$

Trong đó: $\Delta A_{400\text{ nm}} = A - A_0$

V= thể tích cuvette đo mẫu; V_t = thể tích aliquot assayed

A, A_0 độ hấp thụ ánh sáng của hỗn hợp enzyme sau phản ứng và mẫu kiểm chứng

ϵ_{mM} : Hệ số hấp thụ phân tử của p-nitrophenol trong dung dịch 1% trisodium phosphate ở bước sóng 400nm và $\epsilon_{mM} = 18.1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Hoạt độ của enzyme sau khi xử lý nhiệt được biểu thị bằng tỉ lệ phần trăm so với hoạt độ của enzyme trước khi xử lý nhiệt.

BAA được thí nghiệm ở các nồng độ và điều kiện dung môi như trong bảng 1. Ảnh hưởng của ion Ca^{2+} đến độ bền nhiệt của BAA cũng được nghiên cứu.

Bảng 1: Các dung dịch enzyme trong thí nghiệm độ bền nhiệt của BAA

Dung dịch đệm	pH	Nồng độ BAA (mg/ml)	Phụ gia trong dung môi	Nhiệt độ T ^o C
0.1 M Tris/HCl	8.6	0.04	-	40 – 110
0.1 M Tris/HCl	8.6	0.4	-	40 – 120
0.1 M Tris/HCl	8.6	0.04	5 mM CaCl_2	40 – 110
0.1 M phosphate buffer	7.0	0.04	-	40 – 110

Xử lý đẳng nhiệt

BAA được pha loãng từ dung dịch BAA gốc (100 mg/ml BAA trong dung dịch đệm 0.1 M Tris/HCl, pH 7.6) trong các dung môi thích hợp như bảng 1. Các dung dịch mẫu BAA này được chứa trong các ống mao quản thủy tinh nhỏ, bịt kín (kích thước 1.15mm x 150mm, xuất xứ Hirschmann Laborgerate, Germany) để đảm bảo chế độ xử lý đẳng nhiệt. Xử lý đẳng nhiệt được thực hiện trong các bể điều nhiệt ở nhiệt độ thí nghiệm trong khoảng thời gian nhất định. Sau khi xử lý nhiệt, BAA trong ống mao dẫn được pha loãng và đo hoạt độ còn lại của enzyme.

Xử lý không đẳng nhiệt

Các ống thủy tinh kín có đường kính 1.2 cm chứa 1 mL dung dịch BAA được xử lý nhiệt trong các bể điều nhiệt. Nhiệt độ của dung dịch được đo bằng cặp nhiệt điện tại vị trí 2 cm cách đáy ống nghiệm. Đồ thị mô tả tương quan thời gian – nhiệt độ được ghi nhận với bước thời gian 2 giây suốt quá trình nâng nhiệt cho đến khi làm lạnh.

Phân tích kết quả

Tương quan thời gian – nhiệt độ trong quá trình phản ứng ức chế nhiệt enzyme và sự phụ thuộc của hằng số phản ứng vào nhiệt độ được mô tả bằng các phương trình khác nhau. Đối với thí nghiệm xử lý đẳng nhiệt, phương trình:

$$-dA/dt = k_T A^n \quad (2)$$

được sử dụng để mô tả sự thay đổi hoạt độ enzyme theo thời gian. Sự phụ thuộc theo nhiệt độ của hằng số tốc độ vô hoạt enzyme trong quá trình xử lý nhiệt được mô tả theo phương trình Arrhenius:

$$k_T = k_{T_{ref}} * \exp\left(\left(\frac{E_a}{R}\right) * \left(\frac{1}{T_{ref}} - \frac{1}{T}\right)\right) \quad (3)$$

hoặc phương trình “thời gian chết nhiệt” TDT:

$$D_T = D_{T_{ref}} * 10^{\frac{T_{ref}-T}{z}} \quad (4)$$

Phân tích không hồi qui một bước bằng phần mềm phân tích SAS (phiên bản 9.1, Cary, USA) để thiết lập các phương trình mô tả mối tương quan nhiệt độ - thời gian cũng như ước lượng các thông số động nhiệt học của quá trình vô hoạt của enzyme. Để phân tích chất lượng của các thông số nhiệt động học được ước lượng, đồ thị mô tả tương thích giữa hoạt độ xác định dựa trên phép đo quang phổ và hoạt độ tính được từ các thông số nhiệt động học vừa ước lượng được xây dựng. Đồ thị biểu diễn độ sai biệt giữa hoạt độ của BAA sau khi xử lý nhiệt trong chế độ xử lý đẳng nhiệt và bất đẳng nhiệt được thiết lập nhằm tìm các điểm bất thường mà phương trình động học không mô tả được.

Đối với chế độ xử lý nhiệt không đẳng nhiệt, sự thay đổi hoạt độ enzyme được mô tả bằng cách kết hợp các thông số nhiệt động học đã ước lượng trong chế độ xử lý đẳng nhiệt và một trong hai phương trình Arrhenius hoặc TDT. Trong đó, ảnh hưởng của nhiệt độ lên hằng số vô hoạt enzyme cũng được tính đến. Kết hợp hoạt tính của enzyme sau khi xử lý nhiệt và tương quan nhiệt độ thời gian ghi nhận bằng cặp nhiệt điện để ước lượng các thông số nhiệt động học của quá trình vô hoạt enzyme ở chế độ xử lý bất đẳng nhiệt. Trong trường hợp sự vô hoạt BAA tuân theo phương trình bậc nhất, các phương trình sau biểu diễn sự vô hoạt của BAA:

$$dA = -k_{T_{ref}} * \exp\left(\left(\frac{E_a}{R}\right) * \left(\frac{1}{T_{ref}} - \frac{1}{T}\right)\right) * A * dt \quad (5) \quad \text{hoặc} \quad dA = -\frac{\ln(10)}{D_{T_{ref}}} * 10^{\frac{T-T_{ref}}{z}} * A * dt \quad (6)$$

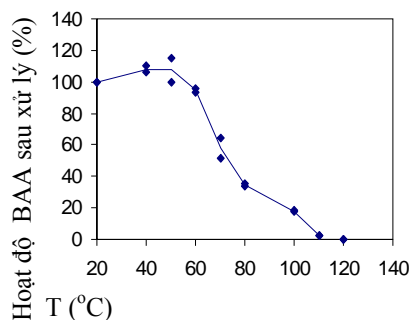
3 KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

Xác định khoảng làm việc cho phép của phương pháp xác định hoạt độ BAA

Khoảng làm việc cho phép của phương pháp đo hoạt độ BAA được thực hiện trong dung dịch đệm citrate pH 6.0, pH tối ưu cho hoạt động của BAA (Lee *et al.*, 2006) và cho hoạt động của enzyme bền nhiệt α -glucosidase nằm trong bộ cơ chất Ceralpha. Kết quả cho thấy trong khoảng nồng độ BAA từ 0 đến 0.005 mg/mL, với cùng một lượng 20 μ L cơ chất phản ứng, độ hấp thụ ánh sáng của dung dịch sau phản ứng tăng tuyến tính theo nồng độ enzyme ($R^2=0.9981$). Sự tin cậy của thí nghiệm được kiểm tra bằng 5 lần lặp lại thí nghiệm với nồng độ BAA 0.005 mg/mL và 0.0005 mg/mL, sai số giữa các lần lặp lại thí nghiệm nằm trong phạm vi cho phép ($Cv = 4.705\%$). Do đó, nồng độ BAA dùng để đo hoạt tính của BAA trong tất cả các thí nghiệm với dung môi pha loãng BAA và chế độ xử lý nhiệt khác nhau.

Độ bền nhiệt của BAA 0.4mg/mL trong dung dịch đệm 0.1M Tris/HCl, pH 8.6

Để có thể sử dụng BAA như một TTI trong quá trình thanh trùng nhiệt, BAA phải có khả năng bị vô hoạt không đảo ngược trong khoảng nhiệt độ thanh trùng đang nghiên cứu. Vì vậy độ bền nhiệt của BAA (nồng độ 0.4 mg/mL trong dung dịch đệm 0.1M Tris/HCl, pH 8.6) được kiểm tra trong khoảng nhiệt độ từ 40°C đến 120°C.



Hình 1: Độ bền nhiệt của BAA ở 0.4mg/mL trong dung dịch đệm 0.1M Tris/HCl, pH 8.6, t=10 phút

Hình 1 cho thấy BAA khá bền nhiệt trong khoảng nhiệt độ thí nghiệm. Hoạt độ của BAA giảm không đảo ngược khi nhiệt độ tăng. Sau thời gian thanh trùng 10 phút ở 100°C, hoạt độ của BAA còn lại hơn 15%. Hoạt độ của BAA giảm mạnh nhất trong khoảng nhiệt độ 60°C đến 100°C. Khi thanh trùng dung dịch BAA ở 120°C trong 10 phút, enzyme BAA hoàn toàn bị vô hoạt. Tuy nhiên, BAA bị vô hoạt theo hai bước khác nhau ở hai giai đoạn nhiệt độ khác nhau. Trong khoảng nhiệt độ từ 60°C đến 80°C, hoạt tính của BAA bị giảm mạnh, trong khoảng nhiệt độ từ 80°C đến 110°C, hoạt tính của BAA bị giảm ít hơn. Thử nghiệm cho thấy không có sự kết tụ enzyme, do đó kết quả của phép đo quang phổ không bị ảnh hưởng. Đặc tính vô hoạt không đảo ngược của BAA theo nhiệt độ cũng được nhận thấy giống như trong nghiên cứu của Tomazic *et al.* (1988). Trong nghiên cứu của Tomazic, sử dụng phương pháp so màu để đo hoạt độ của BAA, BAA bị vô hoạt không đảo ngược tại nhiệt độ 70°C (pH 5.0) và 90°C (pH 8.0).

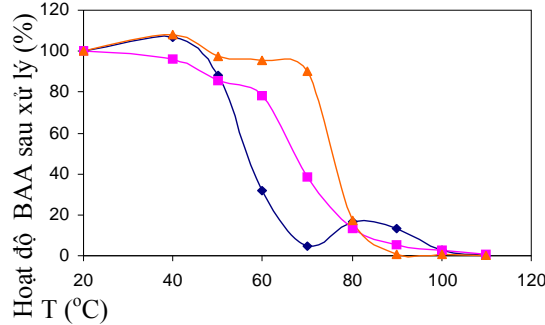
Trong một nghiên cứu khác của Lee *et al.* (2006) BAA cũng bị vô hoạt không đảo ngược trong khoảng nhiệt độ 30 đến 90°C. Thông thường, sự vô hoạt do nhiệt của enzyme BAA thường xảy ra kèm theo sự kết tụ enzyme, tùy theo nồng độ của enzyme và pH của dung môi hoặc dung dịch đệm (Tomazic và Klibanov, 1988; Duy và Fitter, 2005). Các tác giả trên cho rằng quá trình kết tụ enzyme xảy ra nhiều nhất ở trạng thái cấu trúc mở và xảy ra rất nhanh so với quá trình mở cấu trúc enzyme. Sự kết tụ enzyme được nhận thấy ở pH thấp dưới pH 6.5 (gần với điểm đẳng điện của BAA (pI của BAA nằm trong khoảng 5.09 tới 5.18 (Borgia và Campbell, 1978)) trong khi ở pH cao trên 8.0, không thấy có sự kết tụ.

Sự khá bền nhiệt của BAA cho phép thực hiện các nghiên cứu tiếp theo về tính chất động nhiệt học của quá trình vô hoạt. Tuy nhiên, các khảo sát về ảnh hưởng của sự thay đổi dung môi cũng được thực hiện để đạt được tương quan bậc nhất

của phương trình động nhiệt học của quá trình vô hoạt BAA trong thanh trùng nhiệt.

Khảo sát ảnh hưởng của thành phần và pH của dung môi đến độ bền nhiệt và đặc tính của quá trình vô hoạt BAA

Khi thay đổi dung môi của BAA theo bảng 1, kết quả cho thấy (Hình 2), khi xử lý nhiệt enzyme BAA ở nồng độ thấp (0.04 mg/mL) trong dung dịch đệm phosphate buffer (pH 7.0), BAA kém bền nhiệt nhất. Đồng thời sự quá trình vô hoạt diễn ra theo 2 giai đoạn rõ rệt. Tuy nhiên, sự tăng hoạt tính của BAA ở điều kiện này ở 80°C là không giải thích được.



Hình 2: Sự phụ thuộc của độ bền nhiệt của BAA đối với thành phần dung môi và pH 0.04 mg/mL trong đệm phosphate pH 7.0 (♦); 0.04 mg/mL trong đệm Tris HCl buffer pH 8.6 (■) và 0.04 mg/mL trong đệm Tris HCl pH 8.6, CaCl₂ 5 mM(▲)

BAA ở nồng độ 0.04 mg/mL trong Tris/HCl buffer (không bổ sung CaCl₂) cho thấy khả năng bị vô hoạt do nhiệt trong khoảng nhiệt độ rộng từ 40°C đến 110°C và hoạt độ BAA giảm mạnh nhất tại 60°C. Tại 110°C, hoạt độ của BAA ở điều kiện này hoàn toàn bị ức chế.

BAA ở nồng độ cao (0.4 mg/mL trong dung dịch đệm Tris/HCl pH 8.6) bền nhiệt hơn so với cả hai trường hợp BAA nồng độ thấp (0.04 mg/mL) dung dịch đệm phosphate và Tris/HCl buffer pH 8.6. Tuy nhiên, BAA ở nồng độ cao (0.4 mg/mL trong dung dịch đệm có bổ sung CaCl₂). Sự vô hoạt do nhiệt của BAA ở điều kiện này xảy ra mạnh nhất trong khoảng nhiệt độ 70°C to 90°C và xảy ra trong một giai đoạn duy nhất. Có nhiều nghiên cứu đã được thực hiện để tăng sự bền nhiệt của BAA. Các nguồn cung cấp gốc nOH được nghiên cứu và cho thấy khả năng làm tăng độ bền nhiệt của BAA (Samborska *et al.*, 2006). Trong các dung môi không phân cực này BAA bền nhiệt hơn và quá trình vô hoạt xảy ra theo phương trình động nhiệt học bậc nhất (Saraiva *et al.*, 1996). Ngoài ra, sự có mặt của ion calcium trong dung dịch làm tăng sự bền nhiệt của α -amylase (Saboury, 2002; Tanaka và Hoshino, 2002; Violet và Meunier, 1989; Lecker và Khan, 1996; Liebl *et al.*, 1997; Saboury, 2002; Tanaka và Hoshino, 2002).

Khảo sát đặc tính nhiệt động học của quá trình vô hoạt BAA (0.04 mg/mL) trong dung dịch đệm Tris/HCl có bổ sung CaCl₂ 5 mM ở chế độ thanh trùng.

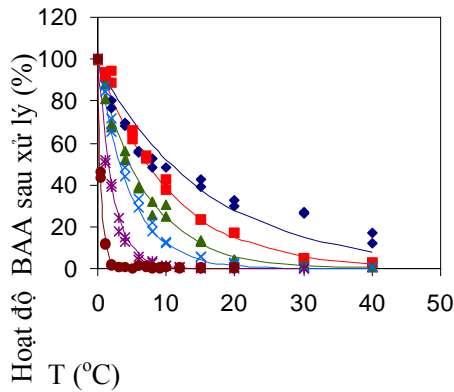
Quá trình vô hoạt BAA 0.4 mg/mL (trong Tris/HCl pH 8.6) xảy ra theo hai bước, do đó không thích hợp để phát triển thành TTI. BAA (0.04 mg/mL) trong dung dịch đệm Tris/HCl có bổ sung CaCl_2 5 mM có độ bền nhiệt cao. Theo khảo sát ban đầu quá trình vô hoạt BAA ở điều kiện này xảy ra theo một bước. Vì vậy thí nghiệm khảo sát đặc tính nhiệt động học của quá trình vô hoạt BAA (0.04 mg/mL) trong dung dịch đệm Tris/HCl có bổ sung CaCl_2 5 mM được thực hiện.

Khảo sát đặc tính nhiệt động học của quá trình vô hoạt BAA (0.04 mg/mL) trong dung dịch đệm 0.1 M Tris/HCl có bổ sung CaCl_2 5 mM ở chế độ thanh trùng đẳng nhiệt.

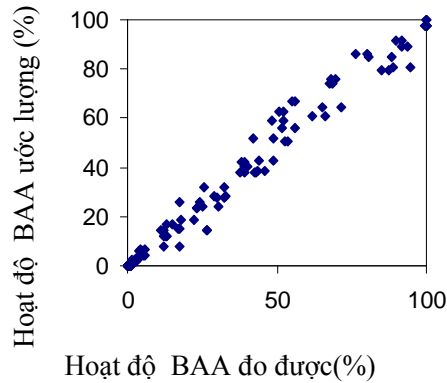
Quá trình vô hoạt của BAA ở điều kiện này được thực hiện ở khoảng nhiệt độ từ 72.5°C – 95°C. Sau khi xử lý nhiệt, BAA được đo hoạt độ bằng phương pháp quang phổ ở 25°C, bước sóng 400nm. Các phương trình động học mô tả các quá trình vô hoạt bậc 1, từng phần và song song được kiểm tra dựa trên kết quả hoạt độ BAA đo được bằng phương pháp quang phổ kết hợp các phương trình (1), (2), (3). Hoạt tính sau khi xử lý nhiệt của BAA ở điều kiện này được thể hiện trong hình 3. Trong đó hoạt độ của BAA giảm theo thời gian trong khoảng nhiệt độ 72.5 to 75°C. Hoạt độ của BAA giảm càng nhanh khi tăng nhiệt độ xử lý nhiệt. Kiểm tra phương trình nhiệt động học mô tả quá trình vô hoạt cho thấy phương trình phản ứng vô hoạt bậc nhất mô tả đúng nhất quá trình vô hoạt BAA (0.04 mg/mL trong dung dịch đệm 0.1 M Tris/HCl có bổ sung CaCl_2 5 mM) ở khoảng nhiệt độ thí nghiệm. Hình 4 thể hiện sự tương thích giữa hoạt tính enzyme đo được bằng phương pháp quang phổ và hoạt tính enzyme BAA ước lượng khi sử dụng phân tích hồi qui không tuyến tính đối với phương trình vô hoạt bậc nhất kết hợp phương trình Arrhenius. Hình 4 cho thấy có sự tương thích tốt giữa hai giá trị hoạt độ thu được với hệ số xác định bằng 0.985.

Các kết quả trên thống nhất với nghiên cứu của Van Loey *et al.* (1997) khi nghiên cứu động nhiệt học của sự vô hoạt enzyme BAA nồng độ 200 mg/mL (trong Tris, pH 8.6) ở nhiệt độ 77 đến 84°C. Sự vô hoạt theo phương trình bậc nhất của được nhận thấy ở nghiên cứu của Lee *et al.* (2006).

Các thông số nhiệt động học của quá trình vô hoạt BAA được ước lượng bằng phân tích hồi qui không tuyến tính. Giá trị hằng số tốc độ phản ứng k tăng theo nhiệt độ. Cả hai phương trình Arrhenius (3) và TDT (4) đều lần lượt mô tả tốt sự phụ thuộc vào nhiệt độ của hằng số tốc độ phản ứng vô hoạt và thời gian ức chế thập phân.



Hình 3: Sự vô hoạt đẳng nhiệt của BAA (0,04 mg/mL trong dung dịch đệm 0.1M Tris/HCl; pH 8.6; CaCl₂ 5mM) ở 72.5°C (◆), 75°C (■), 77.5°C (▲), 80°C (x), 85°C (*), 95°C (●)



Hình 4: Sự tương thích của phương trình vô hoạt bậc nhất của BAA kết hợp với phương trình Arrhenius (phân tích hồi qui không tuyến tính)

Hằng số tốc độ phản ứng tham chiếu, giá trị D_{ref} và năng lượng hoạt hóa cho phản ứng vô hoạt được ước lượng; k_{ref} (phút⁻¹) = 0.2071 ± 0.0045 ; D_{ref} (phút) = 11.32 ± 0.25 và E_a (J/mol) = 160130 ± 3092.3 . Trong đó nhiệt độ tham chiếu $T_{ref} = 80^\circ\text{C}$. Van Loey *et al.* (1997) đã tìm được giá trị $D_{80^\circ\text{C}} = 46.8 \pm 0.8$ (phút) khi xử lý đẳng nhiệt BAA (ở 200 mg/mL, trong dung dịch Tris, pH 8.6) trong khoảng nhiệt độ 77-84°C. Giá trị này cao hơn nhiều so với nghiên cứu hiện tại. Điều này có thể giải thích dựa trên sự bền nhiệt của BAA ở nồng độ cao. Giá trị z thu được $z = 15.12^\circ\text{C}$ cao hơn giá trị z thu được từ nghiên cứu của Van Loey *et al.* (1997) (7.6°C). Vì vậy giá trị D_T của BAA trong nghiên cứu này kém nhạy cảm với sự thay đổi của nhiệt độ hơn so với nghiên cứu của Van Loey. Các kết quả trên cho thấy, BAA có khả năng được vận dụng như là một TTI trong quá trình thanh trùng. Tuy nhiên, để ứng dụng trong thực tế, các thông số của phương trình nhiệt động học của quá trình vô hoạt BAA ước lượng ở điều kiện đẳng nhiệt phải được kiểm chứng dưới điều kiện bất đẳng nhiệt.

Khảo sát đặc tính nhiệt động học của quá trình vô hoạt BAA (0.04 mg/mL trong dung dịch đệm 0.1 M Tris/HCl, bổ sung CaCl₂ 5 mM) ở chế độ thanh trùng bất đẳng nhiệt.

Sự kiểm chứng đặc tính của quá trình vô hoạt BAA được thực hiện ở nhiệt độ 75°C, 80°C, 85°C. Kết quả cho thấy, tương quan nhiệt độ - thời gian của quá trình vô hoạt BAA dưới điều kiện bất đẳng nhiệt có đồ thị tương tự như ở chế độ đẳng nhiệt. Các thông số nhiệt động học k_{ref} và E_a ước lượng từ thí nghiệm trong điều kiện đẳng nhiệt kết hợp với tương quan nhiệt độ - thời gian đo được bằng cặp nhiệt điện được sử dụng để tính toán hoạt độ của BAA sau khi xử lý nhiệt ($T_{ref} = 80^\circ\text{C}$). So sánh các giá trị vừa tính được với các giá trị hoạt độ đo được bằng quang phổ kế. Kết quả cho thấy sự tương thích tốt giữa hai giá trị ($R^2 = 0.9745$). Vì vậy có thể kết luận phương trình nhiệt động học của quá trình vô hoạt BAA (0.04 mg/mL

trong dung dịch 0.1 M Tris/HCl, bổ sung CaCl₂ 5 mM) dưới điều kiện đẳng nhiệt được kiểm chứng đúng dưới điều kiện xử lý bất đẳng nhiệt.

Các thông số nhiệt động học của quá trình vô hoạt BAA được ước lượng dưới điều kiện xử lý không đẳng nhiệt bằng cách sử dụng phân tích hồi qui không tuyến tính (non-linear regression) kết hợp các phương trình Arrhenius và TDT. Nhiệt độ tham chiếu T_{ref}=80 °C. Kết quả ước lượng cho thấy, z (°C)= 14.2±1.3, D_{ref} (phút)= 10.73± 0.973; k_{ref} (phút⁻¹) = 0.219 ± 0.0113 (R²_{nlin}=0.9875); E_a (J/mol)= 167567±10298.5 (R²_{nlin}=0.9810). So với kết quả thu được dưới điều kiện xử lý đẳng nhiệt, các tham số nhiệt động lực học thu được ở điều kiện bất đẳng nhiệt không có sự khác biệt đáng kể (α=0.05).

Tùy theo thực phẩm, giá trị z của các đặc tính chất lượng nằm trong phạm vi rộng (từ thiamin dạng lỏng z= 25°C, chlorophyllase trong spinach (z=12.2°C), catalase trong spinach (z=8.3°C)...(Van Loey, 1996c; Ramaswamy và Marcotte, 2005). Tuy nhiên, ở khía cạnh an toàn thực phẩm, giá trị z của BAA trong điều kiện thí nghiệm nằm ngoài phạm vi giá trị z của vi sinh vật thường sử dụng để đánh giá hiệu quả của quá trình thanh trùng (z= 5 - 12°C). Vì vậy, dung dịch BAA cần được hiệu chỉnh thành phần và pH để có thể có đặc tính nhiệt động lực học cần thiết của TTI trong thực tế.

4 KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Trong nghiên cứu phát triển hệ thống chỉ thị sinh học cho quá trình thanh trùng, BAA (0.04 mg/mL trong dung dịch đệm 0.1 M Tris/HCl, bổ sung CaCl₂ 5 mM) cho thấy khả năng có thể ứng dụng để đánh giá ảnh hưởng của quá trình thanh trùng. BAA ở điều kiện này có đặc tính nhiệt động lực học của phản ứng vô hoạt theo phương trình của phản ứng bậc nhất. Các thông số nhiệt động lực học ước lượng dưới điều kiện đẳng nhiệt được kiểm chứng tốt dưới điều kiện không đẳng nhiệt. Giá trị z của BAA nằm trong khoảng giá trị thường gặp của các đặc tính chất lượng của thực phẩm. Tuy nhiên, nằm ngoài phạm vi của các vi sinh vật mục tiêu của quá trình thanh trùng. Do đó, để phát triển hoàn chỉnh một hệ thống TTI, đánh giá tốt quá trình thanh trùng, cần nghiên cứu hiệu chỉnh dung dịch enzyme để giá trị z nằm trong phạm vi sử dụng hoặc nghiên cứu phát triển hệ thống TTI đa thành phần.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Duy, C. and Fitter, J. (2005). Thermostability of irreversible unfolding alpha amylases analyzed by unfolding kinetics. *The Journal of Biological chemistry* 280(45): 37360-37365.
- Fellows, P. J. (2000). *Food Processing Technology - Principles and technique*. Cambridge, England, Woodhead Publishing Limited.
- Lee, S., Mouri Y., Minoda M., Oneda H. and Inouye K. (2006). Comparison of the Wild-Type a-Amylase and Its Variant Enzymes in *Bacillus amyloliquefaciens* in Activity and Thermal Stability, and Insights into Engineering the Thermal Stability of *Bacillus a-Amylase*. *Journal of Biochemistry* 139: 1007–1015.
- Ramaswamy, H. and Marcotte, M. (2005). *Food processing - Principles and Applications*. Boca Raton, CRC Press, Taylor and Francis Group.

- Saboury, A. A. (2002). Stability, activity and binding properties study of alpha-amylase upon interaction with Ca²⁺ and Co²⁺. *Biologia, Bratislava* 57(11): 211-228.
- Samborska, K.,Guiavarc'h, Y.,Van Loey, A. and Hendrickx, M. (2006). The thermal stability of *Aspergillus oryzae* alpha-amylase in presence of sugars and polyols. *Food Process Engineering* 29: 287-303.
- Tanaka, A. and Hoshino, E. (2002). Calcium-binding parameter of *Bacillus amyloliquefaciens* alpha amylase determined by inactivation kinetics. *Biochemical society* 364: 635-639.
- Tomazic, S. and Klivanov, A. M. (1988). Mechanisms of irreversible thermal inactivation of *Bacillus* alpha-amylase. *Biochemical Chemistry* 263(7): 3086-3091.
- Van Loey, A. (1996c). Enzymatic time temperature intergrators for the quantification of thermal processes in terms of food safety, Katholieke Universiteit Leuven. Doctoral physiology: 159.
- Van Loey, A.,Artawan, A.,Hendrickx, M.,Haentjens, T. and P., T. (1997). The development and use of an alpha-amylase-based Time-Temperature Integrator to evaluate in Pack-Pasteurisation Processes. *Lebensm - Wiss. u. -technology* 30: 94-100.
- Van Loey, A., Hendrickx, M., De Cordt, S., Haentjens, T. and Tobback, P. (January 1996). Quantitative evaluation of thermal processes using time-temperature integrators. *Trends in Food Science & Technology* 71: 16-26.
- Violet, M. and Meunier, J. C. (1989). Kinetic study of the irreversible thermal denaturation of *Bacillus licheniformis* a-amylase. *Biochemistry* 263: 665-670.