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

DOI:10.22144/ctu.jsi.2016.028

ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC ĐIỀU KIỆN NGÂM VÀ NẢY MẦM ĐẾN HOẠT TÍNH A-AMYLASE CỦA HAI GIỐNG LÚA IR50404 VÀ MỘT BỤI ĐỎ

Trần Huỳnh Như An, Triệu Ngọc Hân, Nguyễn Hồng Hạnh, Lê Nguyễn Đoan Duy và Nguyễn Công Hà

Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:
Ngày nhận: 05/08/2016
Ngày chấp nhận: 24/10/2016

Title:
Effect of soaking and germination conditions of pre-germinated brown rice to α-amylase activity of IR50404 and Mot Bui Do

Từ khóa:
Dịch cám, gạo lứt, gạo mầm, glutamic acid, IR50404, Một Bụi Đỏ

Keywords:
Brown rice, germinated brown rice, glutamic acid, IR50404, Mot Bui Do, rice bran extract

ABSTRACT

Study on changes of α-amylase activity (AA), starch, amylose, reduced sugar (RS) under different soaking conditions like pH values (3÷6), optimal pH added with various rice bran (RB) extract (3÷7%) as well as acid glutamic (GA) (0.2÷0.6%), then germinated at 37°C for 20 to 28 hours were done. The result showed that optimal pH for both IR50404 and Mot Bui Do (MBD) was 50°C and pH 5. Optimal pH for soaking of MBD in 6 hours was pH 4 while pH 3 for IR50404. Maximal AA of MBD was 60.42 (UI/g) and the highest RS as 37.31 (mg/g); Maximal AA of IR50404 was 58.38 (UI/g) and the highest RS as 37.74 (mg/g). Both MBD and IR50404 was affected by RB extract when the tendency of AA was decreased after increasing RB extract to 5%. Both MBD and IR50404 was also affected by GA. The tendency of AA was decreased slowly when increased GA. AA was just statistical difference when GA as 0.6%. The results indicated that each rice variety had different optimal pH, optimal pH which supplemented by 7% RB extract as well as 0.4% GA to soaking condition showed without any changes of AA.

TÓM TẮT

Nghiên cứu sự thay đổi thành phần tinh bột, amylose, đường khử (RS) và hoạt tính α-amylase (AA) tại các điều kiện ngâm khác nhau như pH 3÷6; pH tối thích có dịch cám (RB) 3÷7% hay acid glutamic (GA) 0,2÷0,6% cũng như nảy mầm ở 37°C, yếm khí trong 20÷28 giờ đã được thực hiện. Kết quả cho thấy, nhiệt độ 50°C và pH=5 là điều kiện thích hợp nhất của AA từ hai giống IR50404 và MBĐ. pH thích hợp của MBĐ khi ngâm trong 6 giờ là 4, IR50404 là 3. AA ở MBĐ cao nhất là 60,42 (UI/g) và RS cao nhất là 37,31 (mg/g); AA ở IR50404 cao nhất là 58,38 (UI/g) và RS cao nhất là 37,74 (mg/g). Ở cả 2 giống MBĐ và IR50404, AA khi ngâm ở pH tối ưu có bổ sung RB có xu hướng giảm sau đó tăng dần và đạt tương đương với hoạt tính ban đầu khi không bổ sung. Ở cả 2 giống MBĐ và IR50404, AA khi ngâm ở pH tối ưu có GA có xu hướng giảm dần khi tăng GA và khác biệt so với các nồng độ còn lại ở 0,6%. Như vậy, mỗi giống lúa có pH ngâm thích hợp khác nhau, có thể bổ sung RB 7%, bổ sung GA 0,4% mà AA là không có sự khác biệt ở 2 giống.

Trích dẫn: Trần Huỳnh Như An, Triệu Ngọc Hân, Nguyễn Hồng Hạnh, Lê Nguyễn Đoan Duy và Nguyễn Công Hà, 2016. Ảnh hưởng của các điều kiện ngâm và nảy mầm đến hoạt tính α-amylase của hai giống lúa IR50404 và Một Bụi Đỏ. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Số chuyên đề: Nông nghiệp (Tập 1): 105-112.

1 GIỚI THIỆU

Gạo lứt chứa nhiều các thành phần dinh dưỡng như chất xơ, axit phytic, vitamin A, vitamin E và axit γ-aminobutyric (GABA) hơn so với gạo trắng do sự hiện diện của lớp cám bên ngoài là nguồn chính cho các yếu tố dinh dưỡng đó (Ohtsubo *et al*., 2005). Gạo lứt nảy mầm làm gia tăng hàm lượng các thành phần chức năng của gạo lứt (Asma *et al*., 2011). Trong đó có các hợp chất chức năng tốt cho cơ thể con người như GABA, γ-oryzanol, tocotrienols và chất xơ, Kẽm, Sắt, Kali (Kayahara *et al*., 2000). Trong quá trình nảy mầm, một trong những enzyme như α-amylase được sinh tổng hợp làm cơ sở để thủy phân tinh bột (Kruger 1972; Briggs 1972), cung cấp năng lượng cho hàng loạt quá trình sinh hóa, trong đó có những chu trình sinh tổng hợp các hợp chất chức năng như GABA (Reddy *et al*., 1983).

Nghiên cứu gần đây cho thấy chỉ một số giống lúa được trồng ở vùng ĐBSCL như IR50404 hay MBĐ là có triển vọng trong việc sản xuất gạo mầm. Giống lúa IR50404 là giống lúa rất phổ biến ở Đồng bằng sông Cửu Long do nó có khả năng chịu phèn tốt, tốc độ phát triển nhanh, năng suất cao. Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu sơ bộ về quá trình nảy mầm sinh GABA của giống lúa này cho thấy nó có khả năng sinh tổng hợp GABA cao nhất trong điều kiện yếm khí 1-5% CO_2 (Lê Nguyễn Đoan Duy và Nguyễn Công Hà, 2014). Giống lúa MBĐ có nhiều đặc tính tốt như hạt chắc đều, ít bị gãy khi xay xát, tỷ lệ bạc bụng thấp, khi nấu cơm có mùi thơm, mềm xốp giàu dinh dưỡng nhưng năng suất lúa thấp. Giống lúa này cũng có khả năng sinh tổng hợp GABA nhiều, tốc độ tăng trưởng cao (Trung *và ctv.,* 2016). Có thể nói rằng, tốc độ tăng trưởng phải đi kèm với nhu cầu năng lượng tăng cao. Vì vậy, để tìm hiểu sự thay đổi của α-amylase, hàm lượng tinh bột, đường khử và amylose trong suốt quá trình ngâm và nảy mầm có tác động của một số yếu tố như pH, acid glutamic, dịch cám đã được thực hiện.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên vật liệu

Hai giống lúa IR 50404 và MBĐ được mua tại Viện Nghiên cứu Phát triển Đồng bằng sông Cửu Long tại thành phố Cần thơ. Đầu tiên, lúa sẽ được tách bỏ lớp vỏ trấu thu được gạo lứt. Phần gạo lứt được loại bỏ tạp chất và chứa trong các bao bì kín bảo quản trong tủ ở nhiệt độ 4^{o}C. Chúng được xát trấu nhưng vẫn giữ được phôi bằng thiết bị tách trấu Yanmar ST50 trước khi được sử dụng trong quá trình ngâm và nảy mầm.

2.2 Quá trình ngâm và nảy mầm

Gạo lứt được ngâm trong các dung dịch với tỷ lệ 1:3 (w/v) có pH khác nhau: đệm citrate pH 3, 4, 5, 6; dung dịch pH tối thích có bổ sung nồng độ dịch cám: 3, 5, 7% (v/v) và acid glutamic 0,2; 0,4; 0,6% (w/v) ở nhiệt độ phòng khoảng 6 giờ cho đến khi đạt trạng thái cân bằng ẩm thì vớt ra để ráo nước. Các mẫu trên sau khi vớt ra được để ráo, sau đó cho vào bao bì PE bảo quản ở tủ đông -20^{o}C. Gạo lứt được ngâm trong các dung dịch được chọn ở thí nghiệm trước. Gạo được vớt ra, sau đó bao trong một lớp khăn và đem đi ủ trong tủ ủ CO_2 SANYO MCO-5AC ở 37^{o}C. Sau 20, 24 và 28 giờ các mẫu lần lượt được lấy ra và cho vào bao bì kín bảo quản ở -20^{o}C để đảm bảo tính nhất quán cho toàn bộ mẫu.

2.3 Xác định hoạt độ của enzyme α-amylase (Lê Thanh Mai *và ctv*., 2009)

Chuẩn bị dịch chiết enzyme bằng cách cân 5 gram mẫu nghiền cứu đã nghiền nhỏ, cho vào bình nón dung tích 250 ml, bổ sung 10 ml dung dịch đệm và 90 ml nước cất. Giữ hỗn hợp ở nhiệt độ 30±2^o C trong thời gian 1 giờ. Lọc và thu hồi dịch chiết enzyme. Dung dịch tinh bột 1%: hoà tan 1 gram tinh bột với 50 ml nước cất trong bình định mức 100 ml, lắc đều. Đặt vào bếp cách thuỷ đang sôi, lắc liên tục cho đến khi tinh bột hoà tan hoàn toàn. Sau đó làm nguội bình và bổ sung 10 ml dung dịch đệm, bổ sung nước cất đến vạch. Cho vào 2 bình nón 50 ml, mỗi bình 10 ml dung dịch tinh bột 1% và ủ ở nhiệt độ thích hợp, giữ 10 phút. Thêm 5 ml dịch chiết enzyme vào bình 2. Khuấy từ trong 10 phút. Lấy từ mỗi bình 0.5 ml hỗn hợp cho vào 2 bình khác có chứa 50 ml dung dịch iod phân tích, lắc đều. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 656 nm bằng máy quang phổ (CECIL, UK).

2.4 Xác định hàm lượng tinh bột Phương pháp Bertrand (AOAC, 2010)

2 gram mẫu được nghiền nhỏ rồi cho vào 50 ml H_2O có bổ sung 5 ml HCl đậm đặc và đun sôi cách thuỷ trong khoảng 3 giờ. Làm nguội hỗn hợp trên sau đó trung hoà bằng NaOH. Hỗn hợp trên được kết tủa protein bằng dung dịch $Pb(CH_3COO)_2$ và loại bỏ chì dư ra khỏi dung dịch bằng Na_2SO_4 bão hoà. Lọc và định lượng glucose thu được bằng hỗn hợp 5 ml Fehling A và 5 ml Fehling B. Xác định lượng glucose hình thành rồi nhân với hệ số F=0.9 để xác định được hàm lượng tinh bột.

2.5 Hàm lượng amylose tổng được xác định theo phương pháp Chrastil (1987)

Tinh bột được trích ly bằng phương pháp ly tâm NaOH của Yamamoto *et al.* (1973). Cân 0,02 gram tinh bột đã chuẩn bị ở trên cho vào cốc thủy

tinh, cho 5 ml Ethanol 85%, lắc đều và đun ở nhiệt độ 70 ºC trong 30 phút để trích ly chất béo. Sau đó thêm 4 ml H_2O và 2 ml NaOH 1M lắc đều, tiếp tục đem gia nhiệt trong 15 phút. Sau khi gia nhiệt, ống nghiệm được làm nguội ở nhiệt độ phòng đến khoảng 30±2ºC. Lấy 0,1 ml dung dịch tinh bột hồ hóa cho vào ống nghiệm mới và thêm 5 ml acid tricloaxetic 0,5%. Tiếp theo, cho 0,05ml dung dịch Iốt (1,27 gram I_2 và 3,0 gram KI/L). Sau khi để 30 phút ở nhiệt độ 30±2ºC và đem mẫu đi đo bằng máy quang phổ ở bước sóng 620 nm (CECIL, UK). Hàm lượng amylose tổng được tính dựa vào đường cong chuẩn được xây dựng từ amylose và amylospectin chuẩn của khoai tây (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA). Tỷ lệ Amylose và Amylopectin là: 10:90, 20:80, 30:70, 50:50 và 80:20.

2.6 Xác định đường khử theo phương pháp DNS (Nguyễn Văn Mùi, 2001)

Cân 5 gram nguyên liệu đã nghiền nhỏ, thêm khoảng 50 ml nước cất vào bình tam giác 250 ml. Đem đun cách thủy ở 80ºC trong 15 phút, lắc đều trong khi đun để chiết tách đường. Sau đó để nguội đến nhiệt độ phòng. Kết tủa protein bằng 3 ml chì acetate 30% và loại chì dư ra khỏi hỗn hợp bằng 10 ml Na_2SO_4 bão hoà, lắc đều và để lắng 5 phút. Thêm nước cất vừa đủ đến 100 ml, lắc đều và lọc qua giấy lọc khô. Hút 3 ml dung dịch mẫu có chứa đường vào một ống nghiệm. Thêm vào 1 ml thuốc thử DNS. Sau đó, đặt vào trong nồi nước đang sôi trong 5 phút. Lấy mẫu ra và làm nguội về nhiệt độ phòng và đo độ hấp thu OD ở bước sóng 540 nm. Hàm lượng đường khử được tính toán dựa vào đồ thị đường cong của glucose chuẩn.

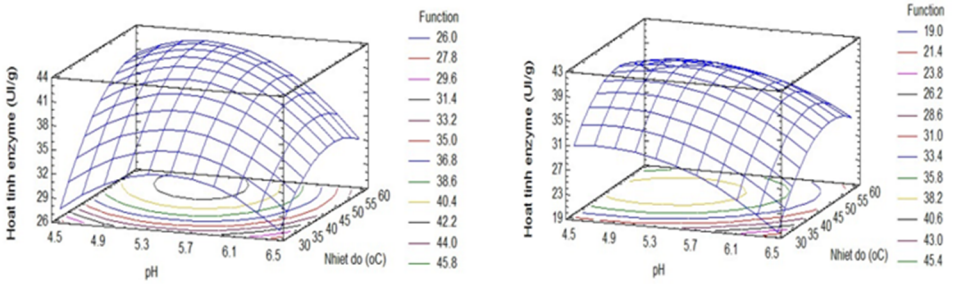
2.7 Phương pháp thu thập và xử lý số liệu

Thí nghiệm được thực hiện với 3 lần lặp lại. Kết quả được xử lý bằng phần mềm ứng dụng MS. Excel 2010. Tính toán thống kê, phân tích phương sai, kiểm định LSD bằng phần mềm Statgraphic 16.1.18.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Xác định nhiệt độ và pH tối ưu của α-amylase từ giống lúa IR50404 và MBĐ

Các yếu tố môi trường ảnh hưởng rất lớn đến hoạt động của hầu hết các enzyme. Đặc biệt, hoạt tính của α-amylase phụ thuộc rất nhiều vào nhiệt độ và pH của môi trường và những yếu tố khác (Reddy *et al*., 1983). Enzyme có thể duy trì cấu trúc bậc hai tối đa ở 60 °C và khi cao hơn nhiệt độ này nó bắt đầu bị mất cấu trúc bậc hai (Andersen *et al*., 2009). Tuy nhiên, ở nhiệt độ quá thấp hoạt động enzyme sẽ giảm nhưng không làm biến tính enzyme (khi nhiệt độ tăng trở lại thì hoạt động của enzyme trở lại bình thường), còn ở nhiệt độ cao nó sẽ bắt đầu biến tính dẫn đến làm mất khả năng xúc tác. Thêm vào đó, hầu hết các enzyme đều nhạy cảm với sự thay đổi pH của môi trường. Mỗi enzyme đều có một vùng pH mà tại đó khả năng xúc tác của enzyme là cực đại. Giá trị pH thấp hay cao ngoài điểm tối ưu sẽ dẫn đến làm giảm một phần hay hoàn toàn hoạt tính enzyme. Vì vậy, mục đích của thí nghiệm này là tìm ra nhiệt độ và pH tối thích cho hoạt động của α-amylase trích ly từ hai giống lúa khác nhau.



Hình 1: pH và nhiệt độ tối ưu của enzyme α-amylase hai giống lúa IR50404 (T) và MBĐ (P)

Kết quả Hình 1 cho thấy, ở các mức pH và nhiệt độ khác nhau thì hoạt tính của enzyme có sự khác biệt đáng kể. Kết quả trên cho thấy, ở pH 5 thì α-amylase được trích ly từ giống MBĐ thể hiện hoạt tính cao nhất là 40,01 (UI/g); tương tự đối với α-amylase được trích ly từ giống IR50404 là 39,77 (UI/g). Các mức nhiệt độ khác nhau (30; 40; 50; 60ºC) cũng có ảnh hưởng rõ rệt đến hoạt tính của enzyme α-amylase. Ở mức nhiệt độ 50ºC thì enzyme thể hiện hoạt tính cao nhất và có khác biệt đáng kể so với các mức nhiệt độ khác là 41,60 (UI/g) và 37,10 (UI/g). Như vậy, ở 50ºC và pH 5 thì hoạt tính enzyme ở cả hai giống MBĐ và IR50404 đều có hoạt tính cao nhất (Hình 1). Một nghiên cứu khác cho thấy nhiệt độ tối thích của α-amylase từ lúa khoảng 60-70ºC và pH tối thích là 5-5,5 (Singh *et al*., 2015). Ngoài ra, biên độ pH tối thích cho hoạt động của α-amylase từ đại mạch khác với α-amylase từ vi sinh vật hoặc từ lúa. pH tối thích cho hoạt động của α-amylase từ đại mạch nảy mầm và thóc nảy mầm là 5,3 và có thể hoạt động tốt trong khoảng pH 4,7-5,4 (Nguyễn Công Hà *và ctv*, 2014). Tùy vào nguồn gốc enzyme mà nó có khoảng pH thích hợp cho hoạt động của nó.

Như vậy, chọn 50°C và pH 5 là nhiệt độ và pH thích hợp nhất cho để khảo sát hoạt tính của α-amylase từ hai giống IR50404 và MBĐ cho các thí nghiệm sau.

3.2 Ảnh hưởng của dịch cám, pH và acid glutamic đến đến enzyme α-amylase và các hợp chất hóa học trong quá trình ngâm gạo lứt nguyên phôi

Ngâm gạo lứt để tạo điều kiện cho độ ẩm của gạo đạt trạng thái bão hòa, đảm bảo quá trình nảy mầm diễn ra tốt hơn. Trong hạt gạo lứt khô có sẵn một lượng nước ở dạng liên kết. Trong quá trình ngâm, nước từ bên ngoài thấm vào trong hạt sẽ hòa tan các chất dự trữ và hoạt hóa các enzyme xúc tác quá trình phân giải các hợp chất cao phân tử trong hạt thành những chất đơn giản, cung cấp cho hoạt động tăng trưởng của phôi để hình thành cây mầm. Phôi là nơi hút nước mạnh nhất. Tốc độ hút nước rất mạnh ở thời gian đầu do sự chênh lệch áp suất thẩm thấu rất lớn giữa môi trường bên ngoài và các tế bào bên trong hạt, đồng thời các chất keo háo nước trương nở rất mạnh, càng về sau sức hút nước của hạt càng giảm (Nguyễn Đức Lượng *và ctv.*, 2004). Theo Banchuen *et al*. (2010) ghi nhận, khi ngâm 3 giống lúa Thái Lan (Niaw Dam Peauk Dam, Sangyod Phatthalung và Chiang Phatthalung) trong nước cất từ 5 - 7 giờ sẽ đạt được trạng thái bão hòa. Nghiên cứu của Bello *et al*. (2004) and Wijngaard *et al*. (2005) cho thấy, ở giai đoạn đầu của quá trình ngâm gạo lứt từ 0 đến 3 giờ, độ ẩm tăng rất nhanh do chênh lệch giữa độ ẩm bên trong và bên ngoài hạt do sự hấp thu nước của phôi hạt, từ 3 đến 6 giờ độ ẩm của gạo bắt đầu tăng chậm dần và đạt điểm bão hòa do lúc này các phân tử tinh bột hút nước trương nở làm khoảng cách giữa các phân tử nhỏ lại nên hút nước chậm lại, và sau 6 giờ thì độ ẩm không thay đổi đáng kể. Theo Bamforth and Barclay (1993), khi ngâm lúa mạch ở nhiệt độ quá cao (từ 35°C trở lên) dẫn đến ức chế sự phát triển của rễ mầm và hủy hoại phôi hạt, kết quả làm giảm tỷ lệ nảy mầm. Nhiều nghiên cứu cũng cho thấy việc ngâm gạo trong nước 30°C trong nhiều giờ sẽ làm cho vi sinh vật phát triển nhanh chóng. Các kết quả nghiên cứu tương tự đã được ghi nhận bởi Dewar *et al*. (1997) cho thấy việc ngâm gạo trong thời gian dài sẽ dẫn đến tình trạng thiếu oxy, điều này sẽ gia tăng hoạt động của vi sinh vật vì hàm lượng oxy cần thiết cho hạt phát triển không được thõa mãn. Vì vậy, trong nghiên cứu này nhiệt độ phòng đã được chọn để ngâm hạt trong khoảng 6 giờ. Tuy nhiên, trong quá trình ngâm gạo lứt thì thành phần của dịch ngâm cũng ảnh hưởng đáng kể đến các hợp chất hoá học có trong gạo lứt, và nó cũng ảnh hưởng rất nhiều đến các hợp chất chức năng được sinh ra trong quá trình ủ. Do vậy, thí nghiệm khảo sát pH, nồng độ dịch cám và nồng độ acid glutamic thích hợp cho quá trình ngâm là rất cần thiết. Tiến hành thí nghiệm 1 nhân tố, 3 lần lặp lại trên 2 giống IR50404 và MBĐ.

Bảng 1: Thành phần nguyên liệu của IR50404 và Một Bụi Đỏ

Thành phần	Giống lúa	
	Một bụi đỏ	IR50404
α-amylase (UI/g)	47,85±0,17	42,57±0,78
Đường khử (mg/g)	6,05±0,08	11,96±0,10
Tinh bột (%)	85,89±1,22	82,69±1,29
Amylose (%)	17,20±0,26	19,54±0,52
Béo (%)	2,58±0,03	2,73±0,02
Protein tổng số (%)	8,46±0,02	10,21±0,01

3.2.1 Khảo sát ảnh hưởng của pH dịch ngâm ở nhiệt độ phòng trong 6 giờ đến các thành phần hoá học và enzyme α-amylase trên hai giống lúa IR50404 và Một Bụi Đỏ

Kết quả thống kê ở Bảng 2 cho thấy, ở pH 4 thì α-amylase trích ly từ giống MBĐ thể hiện hoạt tính cao nhất là 57,43 (UI/g), tăng 1,2 lần so với hoạt tính ban đầu, tương tự ở pH 3 thì enzyme được trích từ giống IR50404 thể hiện hoạt tính 60,96 (UI/g) là cao nhất, gấp 1,4 lần so với hoạt tính enzyme trong gạo khi chưa ngâm và có khác biệt ý nghĩa thống kê so với các pH còn lại. Bảng 2 cũng cho thấy, ở pH 4 thì hàm lượng đường khử ở giống MBĐ cao nhất là 29,22 (mg/g) tuy nhiên không có sự khác biệt ý nghĩa khi ngâm trong pH 3 và 4, đối với IR50404 ở pH 3 thì hàm lượng đường khử cao nhất là 36,26 và có khác biệt ý nghĩa thống kê so với các pH còn lại. Bảng 2 cho thấy, ở pH 6 thì hàm lượng tinh bột là cao nhất 78,83% đối giống MBĐ nhưng lại thấp hơn ban đầu khoảng 0,9 lần. Đối với giống IR50404, khi ngâm trong dung dịch có pH 6 thì hàm lượng tinh bột là cao nhất, tuy nhiên không có sự khác biệt khi ngâm trong dung dịch có pH 4 cũng như giá trị hàm lượng tinh bột ban đầu. Đối với các pH dịch ngâm còn lại thì có khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5%. Bảng 2 cho thấy, ở pH 6 thì amylose trong giống MBĐ là cao nhất 11,31% có khác biệt so với các dịch ngâm pH khác và giảm khoảng 0,7 lần so với hàm lượng ban đầu. Giống IR50404, hàm lượng amylose cao nhất là 12,70% ở dịch ngâm có pH 5 giảm khoảng 0,7 lần so với gạo trước khi ngâm, tuy nhiên không có khác biệt khi ngâm trong dung dịch có pH 4 và 6.

Bảng 2: Ảnh hưởng của pH dịch ngâm đến sự biến đổi một số thành phần hóa học và α-amylase

pH	Giống Một Bụi Đỏ				Giống IR50404			
	A	B	C	D	A	B	C	D
3	47,53^{a}	25,94^{ab}	75,13^{a}	8,11^{a}	60,96^{a}	36,26^{a}	73,26^{a}	8,97^{a}
4	57,43^{b}	29,22^{a}	73,08^{a}	13,91^{b}	54,05^{b}	31,56^{b}	77,50^{ab}	11,05^{b}
5	51,43^{c}	27,65^{a}	75,10^{a}	15,90^{c}	55,25^{b}	31,01^{b}	76,11^{a}	12,70^{b}
6	45,53^{a}	23,28^{b}	78,83^{b}	11,31^{d}	42,82^{c}	26,66^{c}	82,01^{b}	11,11^{b}

Ghi chú: A: Hoạt tính enzyme (UI/g); B: Hàm lượng đường khử (mg/g); C: Hàm lượng tinh bột (%); D: Hàm lượng amylose (%). Các chữ cái in thường a – d biểu hiện cho sự khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5%.

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dịch cám được bổ sung vào pH tối thích ở điều kiện nhiệt độ phòng trong thời gian đạt ẩm bão hoà đến các thành phần hoá học và α-amylase

Bảng 3: Ảnh hưởng của dịch cám đến sự biến đổi một số thành phần hóa học và α-amylase khi ngâm trong các dung dịch pH tối thích có bổ sung nồng độ dịch cám khác nhau

Dịch cám	Giống Một Bụi Đỏ				Giống IR50404			
	A	B	C	D	A	B	C	D
0%	57,45^{a}	29,22^{a}	73,08^{a}	13,91^{a}	55,25^{a}	32,01^{a}	76,11^{a}	12,69^{a}
3%	52,20^{b}	10,53^{b}	75,23^{a}	9,06^{b}	51,40^{b}	14,18^{b}	75,20^{a}	10,10^{b}
5%	56,20^{a}	12,76^{b}	74,81^{a}	12,18^{c}	56,04^{a}	19,40^{c}	72,59^{a}	14,43^{c}
7%	56,92^{a}	11,99^{b}	80,85^{b}	10,01^{b}	55,64^{a}	18,03^{c}	81,56^{b}	11,05^{b}

Ghi chú: A: Hoạt tính enzyme (UI/g); B: Hàm lượng đường khử (mg/g); C: Hàm lượng tinh bột (%); D: Hàm lượng amylose (%). Các chữ cái in thường a – d biểu hiện cho sự khác biệt có thống kê ở mức ý nghĩa 5%

Kết quả thống kê ở Bảng 3 cho thấy, khi bổ sung dịch cám có nồng độ khác nhau thì hoạt tính α-amylase trích ly từ hai giống lúa không có sự khác biệt ý nghĩa so với khi không bổ sung dịch cám trong quá trình ngâm, tuy nhiên kết quả cho thấy hoạt tính enzyme cũng tăng lên so với trước khi ngâm khoảng 1,2-1,3 lần. Bảng 3 cho thấy, hàm lượng đường khử trên cả hai giống có hàm lượng thấp hơn khi không bổ sung dịch cám và có khác biệt ý nghĩa thông kê, tuy nhiên hàm lượng đường khử vẫn tăng trong quá trình ngâm. Bảng 3 cho thấy, khi bổ sung 7% dung dịch cám vào các dung dịch pH tối ưu thì hàm lượng tinh bột cao nhất là 80,85% đối với MBĐ và 81,56% đối với IR50404, mặc dù vậy tinh bột vẫn thấp hơn so với ban đầu khoảng 0,9 - 1 lần. Bảng 3 cũng cho thấy, hàm lượng amylose cao nhất khi bổ sung 5% dung dịch cám là 10,18 và 14,43% đối với MBĐ và IR50404, tuy nhiên nó vẫn thấp hơn so với hàm lượng amylose trong gạo trước khi ngâm.

3.2.2 Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ acid glutamic được bổ sung vào dung dịch pH tối thích ở điều kiện nhiệt độ phòng trong thời gian đạt ẩm bão hoà đến các thành phần hoá học trên hai giống lúa IR50404 và Một Bụi Đỏ

Bảng 4: Sự biến đổi một số thành phần hóa học và enzyme α-amylase của hai giống IR50404 và Một Bụi Đỏ khi ngâm trong các dung dịch pH tối thích có bổ sung nồng độ acid glutamic khác nhau

Acid glutamic	Giống Một Bụi Đỏ				Giống IR50404			
	A	B	C	D	A	B	C	D
0%	57,45^{a}	29,22^{a}	73,01^{a}	13,91^{a}	55,25^{a}	32,01^{a}	76,11^{a}	12,70^{a}
0,2%	54,29^{a}	11,84^{b}	79,43^{b}	13,65^{ab}	53,24^{a}	17,27^{b}	76,70^{a}	9,41^{b}
0,4%	56,69^{a}	14,59^{c}	75,08^{a}	16,51^{c}	55,24^{a}	20,97^{c}	76,00^{a}	12,78^{a}
0,6%	44,10^{b}	10,30^{b}	81,07^{c}	12,35^{b}	46,11^{b}	15,54^{d}	81,41^{b}	10,97^{b}

Ghi chú: A: Hoạt tính enzyme (UI/g); B: Hàm lượng đường khử (mg/g); C: Hàm lượng tinh bột (%); D: Hàm lượng amylose (%). Các chữ cái in thường a – d biểu hiện cho sự khác biệt có thống kê ở mức ý nghĩa 5%

Bảng 4 cho thấy, khi bổ sung 0,4% acid glutamic vào dung dịch pH ngâm thì hoạt tính enzyme tăng lên khoảng 1,1 lần đối với MBĐ (56,69 UI/g) và 1,3 đối với IR50404 (55,24 UI/g) so với ban đầu, mặc dù vậy thì việc bổ sung acid glutamic cũng không có khác biệt ý nghĩa thống kê so với không bổ sung. Bảng 4 cho thấy, hàm lượng đường cao nhất đối với cả hai giống là khi không bổ sung acid glutamic vào dung dich pH ngâm, MBĐ là 29,22%, IR50404 là 32,01% và có khác biệt ý nghĩa so với các nồng độ bổ sung khác. Bảng 4 cho thấy, hàm lượng tinh bột cao nhất khi bổ sung 0,6% acid glutamic vào dung dịch pH ngâm

là 81,07% đối với MBĐ và 81,41% đối với IR50404, tuy vậy quá trình ngâm lại cho thấy hàm lượng tinh bột luôn giảm so với ban đầu. Bảng 4 cho thấy hàm lượng amylose cao nhất khi bổ sung 0,4% acid glutamic vào dung dịch pH ngâm đối với MBĐ (16,51%) và có khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê, đối với IR50404 thì hàm lượng amylose là 12,78% khi bổ sung 0,4% acid glutamic, tuy nhiên không có sự khác biệt ý nghĩa so với khi không bổ sung acid glutamic.

Quá trình ngâm gạo lứt để tạo điều kiện cho độ ẩm của gạo tăng lên khoảng 25-35% và chỉ với độ ẩm như vậy mới bảo đảm quá trình nảy mầm được tiến hành một cách bình thường, kéo theo đó, việc hoạt hóa của enzyme cũng diễn ra được tốt hơn. Trong quá trình ngâm hạt, hoạt tính enzyme sinh ra nhiều hơn so với ban đầu, vì thế có thể thủy phân lượng tinh bột có trong gạo làm hàm lượng tinh bột giảm. Một nghiên cứu khác đã khẳng định rằng, quá trình phân huỷ tinh bột tăng do hoạt động của enzyme α-amylase trong quá trình hô hấp trong suốt thời gian nảy mầm (Koller *et al*., 1962). Theo Hotz và Gibson (2007), hoạt tính α-amylase tăng trong quá trình ngâm để hạt ngũ cốc nảy mầm, nó thuỷ phân amylose và amylopectin thành các dextrin mạch ngắn và maltose, đồng thời cũng làm tăng năng lượng để cung cấp cho quá trình hô hấp cũng như nảy mầm và mật độ chất dinh dưỡng trong hạt. Một nghiên cứu khác về hàm lượng amylose trên hạt lúa miến cũng có kết quả tương tự, báo cáo chỉ ra rằng hàm lượng amylose ban đầu trong nguyên liệu khoảng 18,3-20,18%, sau quá trình ngâm trong nước cất 20 giờ với tỷ lệ 1:5 thì hàm lượng amylose giảm khoảng 0,97-0,99 lần còn 17,77-19,98%, điều này cũng tùy thuộc vào từng giống lúa và cách ngâm nguyên liệu (Afify *et al*., 2012).

3.3 Ảnh hưởng của quá trình ủ nảy mầm đến thành phần hóa học và enzyme α-amylase

Mẫu (AA) được ngâm ở pH tối ưu, sau đó ủ trong 28 giờ ở điều kiện yếm khí (thiết bị ủ kín). Kết quả từ Bảng 5 cho thấy, sau 28 giờ ủ hoạt tính enzyme và hàm lượng đường khử đều tăng lên đáng kể. Hàm lượng tinh bột và amylose giảm đáng kể. Cụ thể, đối với MBĐ, sau 28 giờ enzyme thể hiện hoạt tính cao nhất là 76,77 UI/g cao gấp 1,6 so với nguyên liệu ban đầu. Đối với IR50404 là 70,37 UI/g, tăng gấp 1,7 so với nguyên liệu ban đầu; hàm lượng đường khử cũng đạt cao nhất là 58,37 tăng 9,7 so với lượng đường ban đầu có trong MBĐ và trong IR50404 là 60,72 mg/g, tăng 5,1 so với ban đầu. Kết quả trên cũng phù hợp với hàm lượng tinh bột và amylose sau 28 giờ ủ khi giảm đáng kể (Bảng 5), cụ thể là sau 28 giờ hàm lượng tinh bột và amylose là 59,73% và 5,42% đối với MBĐ, 67,95% và 4,03% đối với IR50404 và giảm một cách đáng kể so với ban đầu; có khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê giữa các giờ ngâm.

Bảng 5: Hoạt tính enzyme α-amylase (UI/g), hàm lượng đường khử (mg/g), hàm lượng tinh bột (%) và hàm lượng amylose (%) của giống lúa Một Bụi Đỏ và IR50404 sau 20, 24 và 28 giờ ủ

Thời gian ủ (giờ)	Giống Một Bụi Đỏ											
	A			B			C			D		
	AA	BB	CC	AA	BB	CC	AA	BB	CC	AA	BB	CC
20	60,48^{a}	62,97^{a}	62,50^{a}	33,80^{a}	30,96^{a}	21,23^{a}	69,71^{a}	71,55^{a}	61,33^{a}	11,14^{a}	8,97^{a}	8,80^{a}
24	65,63^{b}	63,33^{a}	66,86^{b}	46,57^{b}	33,76^{ab}	33,29^{b}	63,08^{b}	64,13^{b}	59,69^{b}	8,11^{b}	7,33^{b}	7,15^{b}
28	76,77^{c}	73,05^{b}	70,20^{c}	58,37^{c}	38,20^{b}	39,05^{c}	59,73^{c}	58,04^{c}	57,18^{c}	5,42^{c}	5,68^{c}	4,56^{c}
Giống IR50404												
20	61,24^{a}	61,63^{a}	58,13^{a}	54,89^{a}	20,48^{a}	26,14^{a}	72,39^{a}	71,54^{a}	64,28^{a}	10,97^{a}	10,10^{a}	8,28^{a}
24	64,44^{b}	63,61^{a}	63,61^{a}	56,53^{a}	28,24^{b}	31,15^{b}	70,93^{b}	69,86^{b}	61,51^{b}	9,15^{b}	9,75^{b}	5,86^{b}
28	70,37^{c}	69,57^{b}	71,32^{b}	60,72^{b}	31,23^{b}	36,37^{c}	67,95^{c}	65,30^{c}	59,01^{c}	4,03^{c}	7,07^{c}	4,38^{c}

Ghi chú: AA: pH ngâm tối thích (pH=3 đối với IR50404 và pH=4 đối với MBĐ); BB: Dịch ngâm ở pH tối thích có bổ sung 7% dịch cám; CC: Dịch ngâm ở pH tối thích có bổ sung 0,6% acid glutamic. A: Hoạt tính enzyme (UI/g); B: Hàm lượng đường khử (mg/g); C: Hàm lượng tinh bột (%); D: Hàm lượng amylose (%). Các chữ cái in thường a – d biểu hiện cho sự khác biệt có thống kê ở mức ý nghĩa 5%

Đối với mẫu ngâm (BB) ở pH tối ưu có bổ sung dịch cám, hoạt tính α-amylase có xu hướng bị ức chế hoạt động đặc biệt ở thời điểm 28 giờ ủ. Cụ thể, sau 28 giờ hoạt tính enzyme cao nhất là 73,05 UI/g, chỉ cao gấp 1,5 so với nguyên liệu ban đầu; với MBĐ và với giống IR50404 hoạt tính cao nhất là 69,57 UI/g chỉ tăng gấp 1,6 lần so với ban đầu; hàm lượng đường khử cũng đạt cao nhất là 38,2 tăng 6,3 so với lượng đường ban đầu có trong MBĐ và 31,23_ mg/g cũng tăng nhưng chỉ 2,6 lần so với hàm lượng đường khử có trong IR50404 ban đầu. Kết quả trên cũng phù hợp với hàm lượng tinh bột và amylose sau 28 giờ ủ giảm đáng kể. Đối với mẫu ngâm (CC), ở pH tối ưu có bổ sung acid glutamic, sự biến đổi α-amylase đối với 2 giống là khác nhau. Hoạt tính enzyme của giống MBD thấp hơn so với mẫu (AA) sau 28 giờ ủ, trong khi điều này lại trái ngược so với giống IR50404, hoạt tính

enzyme của mẫu (CC) có bổ sung acid glutamic 0,6% còn cao hơn so với mẫu đối chứng (AA). Điều này cho thấy, acid glutamic có ảnh hưởng đến hoạt tính α-amylase theo xu hướng khác nhau tùy vào giống lúa.

Từ kết quả thống kê ở các bảng trên cho thấy, khi hạt được ngâm trong dung dịch có pH thích hợp rồi đem đi ủ ở nhiệt độ 37ºC trong tủ kín thì enzyme hoạt động tốt nhất, dẫn đến hàm lượng đường khử tăng mạnh, hàm lượng tinh bột và amylose cũng giảm theo. Khi hạt ngậm đủ nước, hàng loạt các phản ứng phức tạp xảy ra và hạt có thể nảy mầm. Do đó, thời gian ủ hạt ảnh hưởng đến hoạt tính α-amylase, lượng đường sinh ra, chất lượng cảm quan của hạt (Lữ Thị Ngọc Thúy, 2013). Theo Colmerares de Ruiz và Bressani (1990), hàm lượng đường khử đã tăng suốt thời gian nảy mầm. Những nghiên cứu khác cũng chỉ ra rằng, quá trình nảy mầm làm tăng đáng kể hàm lượng đường khử (Ohtsubo *et al*., 2005). Khi nảy mầm, hạt hô hấp mãnh liệt, tỏa ra nhiều năng lượng hơn và tổn thất chất khô rõ rệt hơn. Trong hạt giàu tinh bột, khi nảy mầm thì quá trình thủy phân tinh bột thành đường xảy ra rất mạnh. Quá trình chuyển tinh bột thành đường là do sự phục hồi α-amylase (Lê Ngọc Tú *và ctv.*, 2004). Hoạt tính của α-amylase sẽ thay đổi trong suốt quá trình nảy mầm của hạt gạo, hoạt tính α-amylase của hạt gạo chưa nảy mầm là rất thấp vì hạt đang ở trạng thái ngủ do đó enzyme không được kích hoạt. Trong quá trình nảy mầm từ 0 giờ đến 96 giờ thì hoạt tính của α-amylase ngày càng tăng. Trong quá trình nảy mầm, lượng tinh bột bị tiêu hao cho quá trình hô hấp và tổng hợp tế bào cây con. Bên cạnh đó, do sự thủy phân tinh bột nên tạo ra lượng đường nhiều hơn gấp mấy lần lượng đường ban đầu dẫn đến lượng tinh bột và amyloase giảm dần. Sự hoạt hóa nhóm α-amylase đã kéo theo những sự thay đổi lớn trong thành phần của hạt. Một phần tinh bột bị phân cắt thành dextrin và các loại đường đơn giản như maltose, glucose.

4 KẾT LUẬN

Hoạt tính α-amylase tăng đánh kể trong suốt quá trình ngâm và nảy mầm. Mỗi giống đều có pH tối ưu và khoảng pH thích hợp cho sự hình thành α-amylase là khác nhau. Sự biến đổi của đường khử, tinh bột hay amylose trên 2 giống đều phụ thuộc vào hoạt tính α-amylase trong hạt. Acid glutamic có ảnh hưởng đến hoạt tính α-amylase theo xu hướng khác nhau tùy vào giống lúa. Trong khi dịch cám có ảnh hưởng ức chế đến hoạt tính α-amylase giữa các giống là tương tự nhau. Có thể bổ sung dịch cám ở mức 7% trong khi bổ sung acid glutamic ở mức 0,4% mà hoạt động của α-amylase là không có sự khác biệt ở 2 giống.

LỜI CẢM TẠ

Nhóm nghiên cứu chân thành cảm ơn sự tài trợ về kinh phí nghiên cứu trong khuôn khổ đề tài cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo, mã số B2014-16-34.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Afify A. M. R., El-Beltagi H. S., El-Salam S. M., Omran A. A. 2012. Effect of Soaking, Cooking, Germination and Fermentation Processing on Proximate Analysis and Mineral Content of Three White Sorghum Varieties (Sorghum bicolorL. Moench). Not Bot Horti Agrobo, 40(2): 92-98.

Andersen C. B., Manno M., Rischel C., Thórólfsson M., Martorana V. 2009. Aggregation of a multidomain protein: a coagulation mechanism governs aggregation of a model IgG1 antibody under weak thermal stress. Protein Sci, 19: 279–290.

AOAC, 2010. Official methods of analysis (15thed.). Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC, USA

Asma S. N. M., Umar I. M., Ismail M. 2011. Physicochemical -properties of germinated brown rice (Oryza sativaL.) starch. African Journal of Biotechnology, Vol. 10(33), 6281-6291.

Bamforth C. W and Barclay A. H. P. 1993. Malting technology and the uses of malt, pp. 297-354. In A.W. MacGregor and R.S. Bhatty (eds). Barley Chemistry and Technology. American Association of Cereal Chemistry, St. Paul, MN.

Banchuen J., Paiboon T., Buncha O., Phaisan W.. and Piyarat S. 2010. Increasing the bio-active compounds contents by optimizing the germination conditions of Southern Thai Brown rice. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 32(3): 219-230.

Bello M., Tolaba M. P and Suarez C. 2004. Factors affecting water uptake of rice grain during soaking. Lebensm Wiss Technol, 37: 811-816.

Briggs D. E. 1972. Hormones and carbohydrate metabiolism in germinating cereal grains. Page 219 in: Biosynthesis and Its control in Plants. B. V Milborrow, ed. Proc. Phyto. Chem. Soc. Symp. Academic Press, London.

Chrastil J. 1987. Improved colorimetric determination of amylose in starches or flours. Carbohydrate Research, 159(1): 154-158.

Colmenares de Ruiz A. S., Bressani R. 1990. Effect of germination on the chemical composition and nutritive value of amaranth grain. Cereal Chem, 67(6):519–22.

Dewar J., Taylor J. R. N and Berjak P. 1997. Determination of improved steeping conditions for sorghum malting. Journal of Cereal Science, 26, 129-136.

Hotz C., Gibson R. S. 2007. Traditional food-processing and preparation practices to enhance

the bioavailability of micronutrients in plant-based diets. J Nutr, 137:1097-1100.

Kayahara H., Tsukahara K., Tatai T.. Flavor. 2000. Health and nutritional quality of pre-germinated brown rice. Proceedings of the 10th International Flavor Conference, pp.546–551, Paros, Greece, 2000.

Koller D., Mayber A. M., Mayber A. P., Klein S. 1962. Seed germination. Annu Rev Plant Physiol, 13:437–64.

Kruger J. E (1972). Changes in the α-amylase of hard spring wheat during germination. Cereal Chem., 49:391

Lê Ngọc Tú, La Văn Chứ, Đặng Thị Thu, Nguyễn Thị Thịnh, Bùi Đức Lợi, Lê Doãn Diên. 2004. Hoá Sinh Công Nghiệp. NXB Khoa học và Kỹ Thuật.

Lê Nguyễn Đoan Duy và Nguyễn Công Hà. 2014. Ảnh hưởng của điều kiện ngâm và nảy mầm đến hàm lượng γ –Aminobutyric acid (GABA) và một số thành phần dinh dưỡng khác của gạo mầm từ giống lúa IR50404. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, 25-30.

Lê Thanh Mai, Nguyễn Thị Hiền, Phạm Thu Thủy, Nguyễn Thanh Hằng và Lê Thị Lan Chi. 2009. Các phương pháp phân tích ngành Công nghệ lên men. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.

Lữ Thị Ngọc Thúy, 2014. Nghiên cứu quá trình nảy mầm từ gạo nếp than và gạo nếp trắng (CLN) CK92. Luận văn tốt nghiệp đại học ngành Công nghệ thực phẩm. Đại học Cần Thơ.

Nguyễn Công Hà, Lê Nguyễn Đoan Duy, Bùi Thị Quỳnh Hoa. 2014. Công nghệ sản xuất rượu bia và nước giải khát. NXB Đại học Cần Thơ.

Nguyễn Đức Lượng, Cao Cường, Nguyễn Ánh Tuyết, Lê Thủy Tiên, Tạ Thu Hằng, Huỳnh Ngọc Oanh, Nguyễn Thúy Hương, Phan Thị Huyền. 2004. Công nghệ enzyme. NXB Đại Học Quốc Gia TP.HCM.

Nguyễn Văn Mùi. 2001. Thực hành Hóa sinh học. NXB Đại học Quốc gia Hà Nội.

Ohtsubo K., Suzuki K., Yasui Y., Kasumi T. 2005. Bio-functional components in the processed pre-germinated brown rice by a twinscrew extruder. J. Food Compos. Anal, 18: 303-316.

Reddy L. V., Ching T. M, Metzger R. J. 1983. Alpha-amylase Acitivity in Wheat Kernels Matured and Germinated Under Different Temperature Conditions. Cereal Chem, 61(3):228-231.

Singh K., Shandilya M., Kundu S., Kayastha A. M. 2015. Heat, Acid and Chemically Induced Unfolding Pathways, Conformational Stability and Structure Function Relationship in Wheat α-amylase. PLoS ONE, 10(6):1-18.

Trung P. Q., Tien N. P., Duy L. N. D., Ha N. C. 2016. Changes of Chemical properties and Functional Compounds during the Germination of Various Brown Rice in Mekong Delta, Viet Nam. The 18th Food Innovation Asia Conference 2016 (FIAC 201 6) - Food Research and Innovation for Sustainable Global Prosperity, 16-18 June 2016. 223-230.

Wijngaard H. H., Ulmer H. M., Neumann M and Arendt E. K. 2005. The effect of steeping time on the final malt quality of buckwheat. J. Inst. Brew, 111: 275-281.

Yamamoto K., Sumie S and Toshio O. 1973. Properties of rice starch prepared by alkali method with various 23. Crosbie, G.B. The relationship between starch swelling conditions. Denpun Kagaku, 99–102.