



DOI:10.22144/ctu.jsi.2019.070

NGHIÊN CỨU THỦY PHÂN PROTEIN CÁM GẠO BẰNG ENZYME SỬ DỤNG TRONG NUÔI CẤY *Bacillus subtilis*

Nguyễn Thị Lệ Ngọc¹, Lê Nguyễn Đoàn Duy² và Nguyễn Công Hà^{1*}

¹Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

²Khoa Kỹ thuật Hóa học, Trường Đại học Bách Khoa Thành phố Hồ Chí Minh

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Công Hà (email: ncha@ctu.edu.vn)

ABSTRACT

Rice bran is one of large by-product from rice industry which consists of high content of protein. In order to improve the value from this protein source, the study on the hydrolysis of protein extracted from rice bran of rice variety IR 50404 using enzymatic method was done. Firstly, to find out the optimal conditions for papain and neutrase to hydrolyze rice bran protein substrate, the experiment was set up with substrate concentration (1.75-2.5%), enzyme concentration (50-150 U) and hydrolyzing time (60-240 min). The hydrolytic protein solution was then spray dried at 170°C used as culture medium for *Bacillus subtilis* (incubating for 72 hours, sampling time 4 hours apart). The results showed that papain and neutrase were the most effective hydrolysis at 2.5% and 2% of substrate content, 100 U and 125 U of enzyme concentration in the same time of 180 minutes for hydrolysis efficiency was 20.97% and 14.66%, respectively. The results also showed that the hydrolytic solution of rice bran protein by papain and neutrase had high nutritional properties in case of using for *Bacillus subtilis* cultivation similar to commercial pepton (the count of *Bacillus subtilis*: 1×10^8 cfu/mL and 8.6×10^7 cfu/mL, reaching the maximum after 24 hours of incubation). This research indicates that protein from rice bran by-product could be used as a good value composition for cultivation of bacteria.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 13/11/2018

Ngày nhận bài sửa: 14/02/2019

Ngày duyệt đăng: 12/04/2019

Title:

Enzymatic hydrolysis of rice bran protein for cultivation of *Bacillus subtilis*

Từ khóa:

Bacillus subtilis, cám gạo, pepton, protein, thủy phân

Keywords:

Bacillus subtilis, hydrolysis, pepton, protein, rice bran

TÓM TẮT

Cám gạo là một trong những nguồn phụ phẩm từ công nghiệp chế biến gạo với hàm lượng protein cao. Để nâng cao giá trị của nguồn phụ phẩm này, nghiên cứu thủy phân protein từ cám gạo của giống lúa IR 50404 và thử nghiệm trên nuôi cấy vi sinh vật đã được thực hiện. Trước tiên, tiến hành nghiên cứu xác định các điều kiện tối ưu về nồng độ cơ chất (1,75-2,5%), nồng độ enzyme sử dụng (50-150 U) và thời gian thủy phân (60-240 phút) khi sử dụng papain và neutrase trên cơ chất protein được chiết tách từ cám gạo. Sau đó, dịch thủy phân được sấy phun ở 170°C làm môi trường nuôi cấy *Bacillus subtilis* (thời gian ủ 72 giờ, 4 giờ thu mẫu một lần). Kết quả nghiên cứu cho thấy enzyme papain và neutrase lần lượt có hoạt động thủy phân hiệu quả nhất ở nồng độ cơ chất 2,5% và 2%, nồng độ enzyme sử dụng 100 U và 125 U trong cùng thời gian 180 phút cho hiệu suất thủy phân đạt 20,97% và 14,66%. Nghiên cứu cũng chỉ ra rằng, dịch thủy phân protein cám gạo bằng enzyme papain và neutrase đều có đặc tính dinh dưỡng tương đương pepton thương mại khi được sử dụng là môi trường nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus subtilis* (mật số 1×10^8 (cfu/mL) và $8,6 \times 10^7$ (cfu/mL), cùng đạt cực đại sau 24 giờ nuôi ủ). Protein từ cám gạo có thể sử dụng như thành phần dinh dưỡng có giá trị cho vi khuẩn.

Trích dẫn: Nguyễn Thị Lệ Ngọc, Lê Nguyễn Đoàn Duy và Nguyễn Công Hà, 2019. Nghiên cứu thủy phân protein cám gạo bằng enzyme sử dụng trong nuôi cấy *Bacillus subtilis*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học)(2): 267-275.

1 GIỚI THIỆU

Lúa (*Oryza sativa* L.), được trồng phổ biến nhất và có mặt tại hơn một trăm quốc gia, là lương thực chính cho hơn một nửa dân số thế giới. Cầm gạo là một trong những đồng sản phẩm nhiều nhất được sản xuất trong ngành công nghiệp chế biến lúa gạo, chiếm 10-12% tổng trọng lượng (Chiou *et al.*, 2013). Việt Nam là quốc gia có sản lượng lúa gạo xuất khẩu đứng hàng đầu thế giới nên có nguồn phụ thải nông nghiệp cầm gạo dồi dào. Cầm gạo có hàm lượng protein khoảng 12-20% có thể sử dụng như một nguồn protein tiềm năng với chất lượng cao, giá rẻ cho nguồn thực phẩm mới (Saunders, 1990). Protein cầm gạo được biết đến với khả năng ít gây dị ứng có thể hữu ích trong các khẩu phần thức ăn cho trẻ sơ sinh và có tác dụng chống ung thư (Betschart *et al.*, 1977; Kawamura and Muramoto, 1993 và Helm and Burks, 1996). Cầm gạo có chứa một lượng các chất dinh dưỡng và các hợp chất có hoạt tính sinh học, những thành phần có hoạt tính kháng khuẩn, chống ung thư, hoặc các hoạt tính tăng cường sức khỏe khác như: protein, chất xơ và chất hóa học có nguồn gốc thực vật với hoạt tính chống oxy hóa mạnh, chống tiêu đường, chống viêm đã được chứng minh ở cả thử nghiệm *in vitro* và *in vivo* (Hamada, 1997; Choi *et al.*, 2010; Islam *et al.*, 2011; Justo *et al.*, 2013; Boonloh *et al.*, 2014).

Các sản phẩm thủy phân protein cầm gạo là một nguồn giàu các peptide có hoạt tính sinh học (Boonla *et al.*, 2015). Tuy nhiên, các nghiên cứu về các điều kiện của enzyme sử dụng đối với cơ chất protein cầm gạo để đạt hiệu quả thủy phân tốt nhất và ảnh hưởng của sản phẩm thủy phân lên vi sinh vật vẫn chưa được quan tâm. Trong số các phương pháp thủy phân protein, phương pháp hóa học (sử dụng acid hoặc kiềm cao, ở nhiệt độ cao) cho thời gian thủy phân nhanh nhưng hầu hết các vitamin và một số acid amine bị phá hủy, sản phẩm có hàm lượng muối đáng kể, chi phí năng lượng và thiết bị cao do phải chịu nhiệt và chống acid ăn mòn, mức độ độc hại cao và gây ô nhiễm môi trường, có thể sinh ra độc tố (Nguyễn Đức Lượng và *ctv.*, 2004).

Nguồn enzyme từ các chế phẩm enzyme thương mại đã được sử dụng để thay thế cho các tác nhân hóa học và hiệu suất tối đa đạt 70%, nhiều loại enzyme được kết hợp với nhau để tăng hiệu suất thủy phân như: protease, cellulase, amylase. Phương pháp này ít làm biến đổi acid amine, sản phẩm an toàn và giá trị dinh dưỡng không giảm nhiều. Mặt khác, phương pháp vi sinh (sử dụng vi sinh vật) có hiệu suất thủy phân thấp, thời gian thủy phân kéo dài (thường 3-6 tháng). Vì vậy, phương pháp enzyme mà cụ thể là enzyme papain và neutrase đã được lựa chọn. Papain có nguồn gốc từ thực vật,

thủy phân protein thành các polypeptide và các acid amine, nó đóng vai trò vừa như endopeptidase vừa như exopeptidase. So với các protease có nguồn gốc động vật và vi sinh vật khác thì papain có khả năng thủy phân sâu hơn; tính đặc hiệu cơ chất của papain rất rộng. Neutrase là một protease trung tính thuộc vi khuẩn được sản xuất từ một giống vi khuẩn có chọn lọc *Bacillus amyloliquefaciens*, được dùng để nâng cao chất lượng sản phẩm protein từ động vật và thực vật; thủy phân protein trong quá trình tinh chế DNA từ tế bào động và thực vật (Nguyễn Đức Lượng và *ctv.*, 2004).

Bên cạnh đó, sản phẩm thủy phân sẽ được sử dụng để làm môi trường thử nghiệm cho sự sinh trưởng của vi sinh vật. Trong các vi sinh vật, *Bacillus subtilis* được chọn để tiến hành thí nghiệm, vì là vi sinh vật được sử dụng rộng rãi cho người, động vật cũng như trong xử lý môi trường, cho thấy đây là vi sinh vật an toàn cho việc sản xuất cũng như dùng trong công nghiệp thực phẩm (Denner and Gillanders, 1996 và Barredo, 2005).

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định các điều kiện tối ưu cho hoạt động thủy phân của enzyme papain và neutrase khi cơ chất là protein cầm gạo. Đồng thời, đánh giá sự ảnh hưởng của dịch thủy phân protein cầm gạo bằng hai enzyme này lên quá trình phát triển của *Bacillus subtilis*.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Cầm gạo của giống lúa IR50404 được thu nhận từ công ty TNHH chế biến lương thực Trường Thăng, huyện Thới Lai, thành phố Cần Thơ.

Các enzyme thương mại papain và neutrase (Trung Quốc); môi trường dinh dưỡng peptone thương mại (Trung Quốc) và môi trường nuôi cấy vi sinh vật nutrient broth, trypticase soy broth, agar (Đức); enzyme α -amylase và glucoamylase (Termamyl) được mua từ hãng Novozyme. Các hóa chất còn lại đều đạt độ tinh khiết được sử dụng cho phân tích, được cung cấp bởi công ty Cemaco Việt Nam chi nhánh Cần Thơ.

2.1 Thu nhận protein từ cầm gạo

Quá trình thu nhận protein cầm gạo được thực hiện qua 3 bước:

Loại dầu cầm gạo: cầm gạo được hòa trong dung môi n-hexan (w/v=1:3); đem làm lạnh đến nhiệt độ 25°C khuấy ở 200 rpm trong 1 giờ; ly tâm lạnh ở 6000 rpm, 5°C trong thời gian 5 phút; thu bã cầm. Sau đó lặp lại quy trình một lần nữa, thu bã cầm và để bay hơi dung môi qua đêm. Cầm gạo đã tách béo được xay, sàng lọc, đóng gói và bảo quản ở 5°C để

sử dụng cho thí nghiệm (Wang *et al.*, 1999 và cải tiến theo điều kiện thí nghiệm thực tế).

Thu nhận protein cám gạo: cám gạo đã tách béo được hòa tan trong nước cất (w/v=1:6) và điều chỉnh đến pH 10 bằng NaOH 1 N, ủ lắc ở 200 rpm trong 3 giờ; sau đó chỉnh về pH 7 bằng HCl 1 N, bổ sung enzyme α -amylase với tỷ lệ E/S (enzyme/cơ chất là dịch cám gạo đã tách béo) = 0,25%, ủ ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 20 phút; hỗn hợp sau khi ủ được ly tâm (6000 rpm, 5 phút) để thu dịch trong; đưa dịch trong sau ly tâm về pH 4 bằng HCl 1 N để thu kết tủa; ly tâm rửa tủa bằng nước cất; mẫu được làm khô bằng không khí lạnh, đóng gói và lưu trữ ở 5°C (Nguyễn Thị Mai Phương *và ctv*, 2015 và có một số thay đổi theo điều kiện thí nghiệm).

Xác định các chỉ số dinh dưỡng của cám gạo trước và sau tách béo, protein cám gạo:

- Độ ẩm: sử dụng phương pháp sấy đến khối lượng không đổi (AOAC 925.10, 2005).
- Protein tổng số: xác định bằng phương pháp Kjeldahl (AOAC 2001.11, 2005).
- Lipid: phương pháp Soxhlet (AOAC 945.16, 2005).
- Glucid tổng: phân tích theo phương pháp Lane-Eynon (AOAC 968.28-1969, 2000).
- Tro: phương pháp nung ở nhiệt độ cao (AOAC 923.03, 2005).

2.2 Ảnh hưởng của enzyme papain và neutrase đến hiệu quả thủy phân protein cám gạo

Xác định nồng độ cơ chất và thời gian thủy phân thích hợp của enzyme: protein cám gạo trong 10 mL dung dịch đệm phosphate ở pH tối ưu của từng enzyme (papain pH = 7,5; neutrase pH = 6,5) dung dịch cơ chất thay đổi với các nồng độ 1,75%, 2,0%, 2,25% và 2,5%. Các enzyme được ủ với dung dịch đệm phosphate có pH thích hợp trong 30 phút ở nhiệt độ tối ưu của enzyme sử dụng (papain T=55°C; neutrase T=50°C, tiếp theo cho 0,5 mL (8,5 U/0,5 mL) dung dịch enzyme vào dung dịch cơ chất. Tiến hành thủy phân theo thời gian từ 60-360 phút trên từng enzyme ở nhiệt độ tối ưu tương ứng. Vô hoạt enzyme, kết thúc quá trình phản ứng bằng 5 mL TCA 5%, ổn định dung dịch trong 30 phút, sau đó đem lọc và lấy dịch lọc đo hàm lượng tyrosin sinh ra (Anson, 1938).

Xác định hoạt tính enzyme sử dụng và thời gian thủy phân hiệu quả: nồng độ cơ chất tối ưu của từng enzyme ở thí nghiệm trước được sử dụng trong thí nghiệm này. Protein cám gạo được pha trộn với 10 ml dung dịch đệm phosphate ở pH tối ưu của từng enzyme (papain pH = 7,5; neutrase pH = 6,5), nồng

độ các enzyme bổ sung tuần tự là 50 U, 75 U, 100 U, 125 U và 150 U. Các enzyme và mẫu được ủ với dung dịch đệm phosphate có pH và nhiệt độ thích hợp đối với từng enzyme trong thời gian 30 phút, sau đó cho dung dịch enzyme vào dung dịch cơ chất, thời gian thủy phân được xác lập, khuấy đảo mẫu trong suốt quá trình thủy phân để các enzyme hoạt động tốt hơn. Các bình mẫu được thủy phân theo thời gian từ 60-300 phút với mỗi enzyme ở nhiệt độ tối ưu tương ứng. Vô hoạt enzyme, kết thúc quá trình phản ứng ổn định dung dịch, lọc và xác định hàm lượng tyrosin sinh ra (Anson, 1938).

2.3 Đánh giá sự phát triển *Bacillus subtilis* trên dịch thủy phân

Chuẩn bị chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis*: đĩa thạch chứa chủng vi khuẩn *B. subtilis* được nhận về từ Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học (Trường Đại học Cần Thơ) và nuôi tăng sinh trong môi trường TSB (Tryptic Soy Broth), ủ trên máy lắc 200 rpm trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng (28-30°C). Ly tâm dịch tăng sinh với tốc độ 10.000 rpm trong 5 phút ở 5°C, tiếp tục ly tâm rửa môi trường dinh dưỡng 3 lần bằng nước cất tiệt trùng. Pha vào ống chứa sinh khối 9 mL dung dịch nước muối sinh lý 0,85%, sau đó đồng nhất để tạo nguồn dung dịch vi khuẩn thuần.

Chuẩn bị môi trường thử nghiệm: dịch trích ly protein cám gạo, các dịch thủy phân được sấy phun ở 170°C, tốc độ bơm 16 vòng/phút. Sản phẩm bột sấy phun được xác định hàm lượng đạm tổng số (AOAC 2001.11, 2005) và hàm lượng đạm amin (Nielsen *et al.*, 2001).

Đánh giá sự phát triển *B. subtilis* trên dịch thủy phân: Cho vào mỗi bình một lượng môi trường thử nghiệm sao cho hàm lượng đạm hòa tan là như nhau giữa các nghiệm thức, sau đó thêm vào 27 mL nước cất, khuấy đều dung dịch và điều chỉnh về pH = 7 (sử dụng dung dịch NaOH 1 N và HCl 1 N) trước khi tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C, 15 phút. Khi môi trường đã nguội, tiếp tục chủng vào 3 mL dịch vi khuẩn có mật số là 3×10^6 cfu/mL và chặn miệng bình bằng nút bông không thấm, đem ủ trên máy lắc với 150 rpm ở nhiệt độ phòng và tiến hành thu dịch mẫu theo thời gian. Các thao tác được thực hiện trong tủ cấy vô trùng, dụng cụ đều được khử trùng.

Mật số vi khuẩn *B. subtilis* (cfu/mL) được xác định bằng phương pháp đếm khuẩn lạc (đếm gián tiếp) (TCVN 4884:2005).

2.4 Phương pháp thu nhận và xử lý số liệu

Các nghiệm thức được bố trí ngẫu nhiên với ba lần lặp lại. Các số liệu ghi nhận được nhập và xử lý trên phần mềm Microsoft Excel, Statgraphics Centurion 15.1 và SAS 9.1.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả phân tích một số thành phần hóa học trong cám gạo trước và sau tách béo được trình bày

trong Bảng 1 đã cho thấy tách béo cám gạo là một bước cần thiết trước trích ly và thủy phân protein cám gạo.

Bảng 1: Một số thành phần hóa học cơ bản của cám gạo và protein cám gạo

Thành phần (%)	Cám nguyên liệu	Cám gạo tách béo	Cơ chất protein cám
Tro	12,16±0,96	13,16±0,36	17,05±0,265
Độ ẩm	11,2±0,44	15,06±0,08	40,95±0,702
Đạm tổng số	13,42±0,15	17,13±0,05	33,12±0,894
Lipid	25,01±0,39	1,58±0,23	1,73±0,108
Glucid tổng	40,55±0,6	55,45±0,63	5,79±0,741

Ghi chú: Các giá trị trung bình của 3 lần lặp lại (tính theo cân bàn khô)

Kết quả thu được ở bảng 1 cho thấy cám của giống lúa IR50404 có hàm lượng protein đạt tới 13,42% cao hơn trong nghiên cứu trên cám từ Hà Tây (nay là Hà Nội) có hàm lượng 12,7% (Nguyễn Thị Mai Phương và *ctv.*, 2015) và phù hợp các chỉ số dinh dưỡng của cám được phân tích từ một số nghiên cứu khác với 12-22% chất béo, 11-17% protein, 6-14% chất xơ, độ ẩm 10-15% và 8-17% tro (Saunders, 1990; Hu *et al.*, 1996; Xu, 1998 và Chiou *et al.*, 2013)

Điều kiện thủy phân protein cám gạo thích hợp bằng enzyme papain và neutrase

Từ phần mềm SAS 9.1.3 Protable, xác định được V_{max} , K_m của enzyme papain và neutrase được thể hiện ở Bảng 2 với độ tin cậy R^2 lần lượt là 0,998 và 0,997.

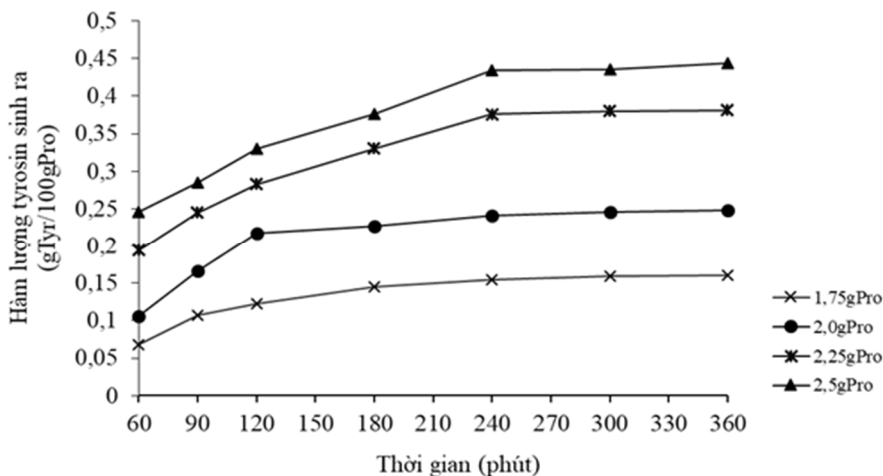
Bảng 2: Các thông số động học V_{max} , K_m của enzyme papain và neutrase

Enzyme	Thông số	
	V_{max} (μ M tyrosin/phút)	K_m (gPro)
Papain	1,826	0,845
Neutrase	1,651	1,371

Ghi chú: gPro là lượng (gam) cơ chất protein trích ly từ cám gạo; V_{max} : tốc độ phản ứng cực đại; K_m : Hằng số Michaelis Menten

Kết quả từ Bảng 2 cho thấy, hoạt tính xúc tác của neutrase trên cơ chất protein cám gạo thấp hơn papain (vì K_m neutrase > K_m papain) và ngược lại. Hằng số tốc độ phản ứng (K_m) của enzyme neutrase thủy phân protein xương heo được báo cáo bởi Pagán *et al.*, 2013 ở tỉ lệ E/S (1,5 g/100 g) là 0,036 gPro, và K_m của enzyme neutrase trên cơ chất thịt dè cá tra là 0,241 gPro, điều này chứng tỏ rằng khả năng thủy phân của enzyme neutrase đối với cơ chất protein cám gạo rất thấp và thấp hơn cả trên cơ chất protein xương heo. Một nghiên cứu khác cho thấy, enzyme papain còn được ứng dụng để phá vỡ màng tế bào vi sinh vật trích ly chất béo (Horst *et al.*, 2012). Như vậy, quá trình khảo sát động học của 2 enzyme cho thấy, với cơ chất protein cám gạo thì cả hai enzyme đều có khả năng thủy phân thấp và papain thủy phân hiệu quả hơn neutrase.

Xác định nồng độ cơ chất và thời gian thủy phân thích hợp của enzyme papain và enzyme neutrase

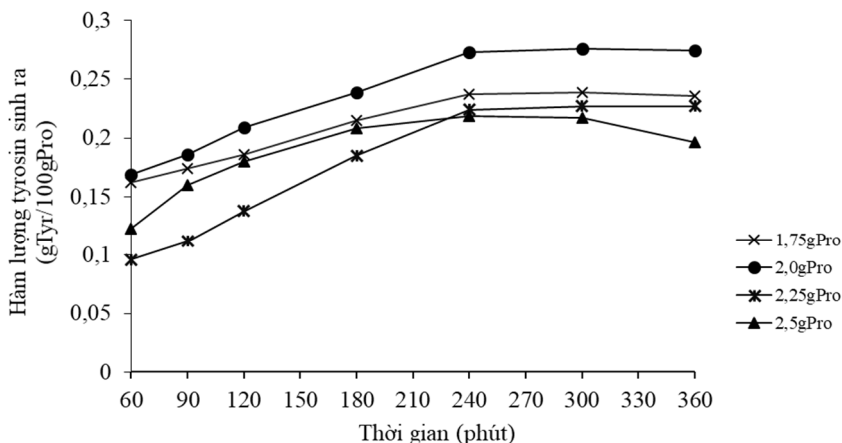


Hình 1: Đồ thị thể hiện sự thay đổi hàm lượng tyrosin theo thời gian thủy phân của enzyme papain ở các nồng độ cơ chất khác nhau

Từ kết quả Hình 1 cho thấy, tốc độ phản ứng thủy phân của enzyme papain tăng nhanh trong giai đoạn đầu. Theo thống kê, kiểm định LSD về ảnh hưởng của nồng độ cơ chất (1,75; 2,0; 2,25 và 2,5%) và thời gian thủy phân (60; 90; 120; 180; 210 và 240 phút) đến hàm lượng tyrosin sinh ra cho kết quả giữa các nghiệm thức có sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$), enzyme papain thủy phân hiệu quả nhất ở nồng độ

cơ chất 2,5 gPro và thời gian 240 phút với hàm lượng tyrosin sinh ra đạt 0,434 gTyr/100 gPro.

Một nghiên cứu trên cơ chất thịt dè cá tra cũng cho kết quả thời gian thủy phân thích hợp nhất ở 240 phút nhưng nồng độ cơ chất tối ưu thấp hơn nhiều và hàm lượng tyrosin sinh ra cao hơn gấp 2 lần ở các thời điểm phân tích đạt 0,727 gTyr/100 gPro (Tạ Hùng Cường, 2014).



Hình 2: Đồ thị thể hiện sự thay đổi hàm lượng tyrosin theo thời gian thủy phân của enzyme neurase ở các nồng độ cơ chất khác nhau

Kết quả thể hiện qua Hình 2 cho thấy hàm lượng tyrosin sinh ra (gTyr/100 gPro) trong quá trình thủy phân bằng enzyme neurase tăng đều theo thời gian từ 0÷240 phút. Theo kiểm định LSD về sự ảnh hưởng của nồng độ cơ chất (1,75; 2,0; 2,25 và 2,5%) và thời gian thủy phân (60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 và 360 phút) đến hàm lượng tyrosin sinh ra thì enzyme neurase thủy phân hiệu quả nhất ở nồng độ cơ chất 2% và thời gian 240 phút với hàm lượng tyrosin sinh ra đạt 0,241 gTyr/100 gPro thấp hơn so với nghiên cứu trên cơ chất thịt dè cá tra là 0,358 gTyr/100 gPro (Tạ Hùng Cường, 2014).

Từ các kết quả phân tích cho thấy ở các nồng độ cơ chất khác nhau thì hàm lượng tyrosin sinh ra khác nhau, lúc đầu khi tăng nồng độ cơ chất và thời gian thủy phân thì hàm lượng tyrosin sinh ra cũng tăng tuyến tính, nhưng khi nồng độ cơ chất càng cao thì hàm lượng tyrosin sinh ra theo thời gian tăng càng chậm đạt đến giai đoạn ổn định và sau đó có xu hướng giảm. Do ở nồng độ cơ chất càng cao, thì nồng độ của dung dịch càng cao, độ nhớt cao làm cho độ linh động của enzyme càng giảm, khả năng gắn kết của enzyme và cơ chất bị ức chế (Nguyễn Đức Lượng và *ctv.*, 2004 và Tạ Hùng Cường, 2014).

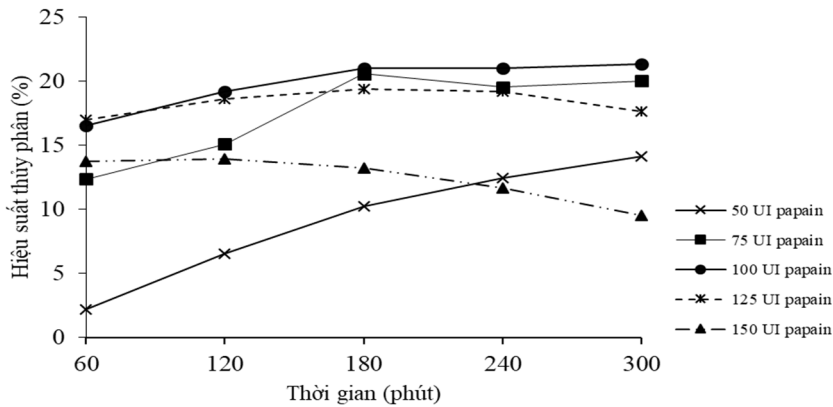
Tóm lại, dựa vào hàm lượng tyrosin sinh ra (gTyr/100 gPro) và K_m của cả 2 enzyme, cho thấy

mỗi enzyme có nồng độ cơ chất tối thích khác nhau, thời gian thủy phân khác nhau trong điều kiện xác định. Trên cơ chất protein cám gạo enzyme papain cho hiệu quả thủy phân tốt hơn neurase với hàm lượng tyrosin sinh ra là 0,434 cao hơn 0,241 (gTyr/100 gPro). Kết quả nghiên cứu này cũng tương tự với một báo cáo sử dụng enzyme flavourzyme ở điều kiện thủy phân tối ưu sau 6 giờ cho hàm lượng tyrosin sinh ra ở cơ chất thịt cá và protein thịt cá lần lượt là 0,39 và 0,40 gTyr/100 gPro (Nilsang *et al.*, 2005).

Xác định nồng độ enzyme và thời gian thủy phân protein cám gạo bằng enzyme papain và neurase

Hiệu suất thủy phân của enzyme có thể được tính bằng hàm lượng tyrosin tại thời điểm bất kỳ do enzyme thủy phân sinh ra trên hàm lượng tyrosin thủy phân hoàn toàn trong cùng một khối lượng cơ chất (Benjakul and Morrissey, 1997).

Hàm lượng tyrosin tổng được xác định bằng cách thủy phân hoàn toàn 1 gPro bằng acid HCl 6 N ở 100°C trong 36 giờ (Xian *et al.*, 2008) cho kết quả là 3,282 gTyr/100gPro cao hơn 2,335 gTyr/100gPro trên cơ chất thịt dè, phụ phẩm cá tra (Tạ Hùng Cường, 2015) và một nghiên cứu khác trên phụ phẩm cá nước ngọt 2,4 gTyr/100gPro (Ghaly *et al.*, 2013).

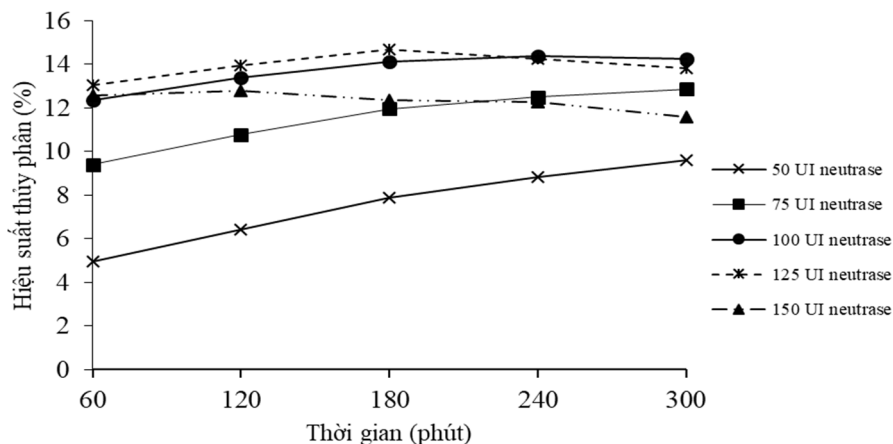


Hình 3: Hiệu suất thủy phân enzyme papain theo nồng độ enzyme và thời gian

Hình 3 cho thấy hiệu suất thủy phân của enzyme papain tăng dần theo thời gian thủy phân ở các nồng độ enzyme từ 50-100 U, đạt hiệu suất cao nhất ở nồng độ 100 U và khi tăng nồng độ lên đến 150 U thì hiệu suất giảm nhanh và thấp hơn cả 50 U tại thời điểm 300 phút. Hiệu suất tăng lên khá chậm chỉ vào khoảng 2,62% sau 120 phút thủy phân, kết quả này cũng tương tự với một nghiên cứu trên cùng cơ chất protein đậu nành là 1,2% và 1,54% ở 60 phút (Ahmadifard, 2016). Điều này phù hợp với khảo sát động học của enzyme do papain có hằng số động học trên cơ chất protein cám gạo lớn nên vận tốc phản ứng chậm. Thời gian thủy phân càng dài thì hiệu suất thủy phân càng giảm hay hàm lượng tyrosin sinh ra tăng càng chậm, do các sản phẩm tạo thành ngày càng nhiều, nồng độ chất tan tăng lên

quá cao làm giảm độ linh động của enzyme trong môi trường gây ức chế hoạt động thủy phân của enzyme (Tạ Hùng Cường, 2014).

Kết quả kiểm định LSD về ảnh hưởng của nồng độ enzyme (50, 75, 100, 125 và 150 U) và thời gian (60, 120, 180, 240 và 300 phút) đến hiệu suất thủy phân của papain cho thấy ở nồng độ enzyme 100 U và thời gian 180 phút có hiệu suất thủy phân cao nhất đạt 20,97%; hiệu suất thủy phân tăng theo thời gian và có sự khác biệt ý nghĩa ($p < 0,05$) giữa các nghiệm thức 60, 120 và 180 phút. Trên cơ chất là protein cám gạo enzyme papain cho hiệu suất thủy phân thấp hơn nhiều so với nghiên cứu trên cơ chất thịt dê đạt 41,803% (Tạ Hùng Cường, 2014) và phụ phẩm cá tra với 46,32% ở 240 phút (Lâm Văn Minh, 2016).



Hình 4: Hiệu suất thủy phân enzyme neutrase theo nồng độ enzyme và thời gian

Dựa vào Hình 4, hiệu suất thủy phân của enzyme neutrase tăng dần theo thời gian thủy phân ở các nồng độ enzyme từ 50-125 U, đạt hiệu suất cao nhất ở nồng độ 125 U và hiệu suất giảm nhanh gần bằng ở 50 U tại thời điểm 300 phút khi tăng nồng độ đến 150 U. Hiệu suất tăng lên khá chậm chỉ vào khoảng

0,9% sau 120 phút điều này phù hợp với khảo sát động học của enzyme do neutrase có hằng số động học trên cơ chất protein cám gạo lớn và lớn hơn cả papain nên vận tốc phản ứng chậm và thấp hơn papain. Kết quả kiểm định LSD về ảnh hưởng nồng độ enzyme và thời gian đến hiệu suất thủy phân cho thấy ở nồng độ enzyme 125 U và thời gian 180 phút

neutrased có hiệu suất thủy phân cao nhất đạt 14,66%. Trên cơ chất là protein cám gạo enzyme neutrased cho hiệu suất thủy phân thấp hơn nhiều so với nghiên cứu trên cơ chất thịt dè ở 240 phút đạt 17,87% (Tạ Hùng Cường, 2014) và cao hơn trên cơ

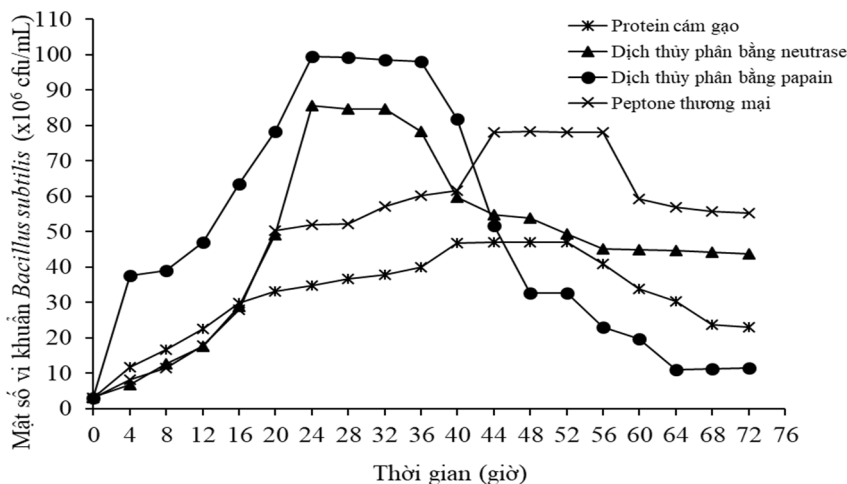
chất protein xương heo 12,14% ở thời gian 120 phút (Pagán *et al.*, 2013).

3.1 Đánh giá sự phát triển của vi khuẩn *Bacillus subtilis* trên dịch thủy phân

Bảng 3: Thành phần đạm tổng và đạm amin của các môi trường thử nghiệm

Mẫu	Protein tổng (mg)	Đạm amin tổng (mgN/g)
Protein cám gạo	135±0,122	79±0,874
Đạm thủy phân bằng papain	38,35±0,341	1096±0,665
Đạm thủy phân bằng neutrased	44,18±0,354	952±0,773
Pepton	50,05±0,356	703±0,552

Ghi chú: Các giá trị trung bình của 3 lần lặp lại (tính theo căn bản khô)



Hình 5: Sự thay đổi mật số của vi khuẩn *Bacillus subtilis* trên các môi trường nuôi cấy theo thời gian

Theo kết quả Hình 5 và kiểm định LSD cho thấy mật số *B. subtilis* ở các môi trường nuôi cấy là đạm peptone, đạm thủy phân bằng papain và bằng neutrased thì không khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) nhưng đều khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức protein cám gạo. Sự khác biệt này là do đạm amin trong protein cám là các acid amine, còn hầu hết trong sản phẩm đạm thủy phân và peptone là các peptide mạch ngắn ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng sử dụng của vi khuẩn. Mật số vi khuẩn thử nghiệm trên môi trường đạm thủy phân bằng papain đã đạt tới giá trị cực đại khi kết thúc giai đoạn ủ 24 giờ (1×10^8 (cfu/mL)). Bên cạnh đó, *B. subtilis* tăng vọt ở pha log, phát triển nhanh trong vòng 24 giờ đầu tiên và cân bằng trong khoảng 12 giờ tiếp theo, sau 36 giờ thì mật số vi khuẩn bắt đầu giảm mạnh và tốc độ chậm dần. Vào cuối giai đoạn ủ 72 giờ, mật số tối đa là $11,4 \times 10^6$ (cfu/mL).

Đối với môi trường nuôi cấy đạm thủy phân bằng neutrased được quan sát thấy mật số cũng đạt cực đại sau 24 giờ ($8,6 \times 10^7$ (cfu/mL)), cân bằng trong 8 giờ tiếp theo và giảm dần đến 72 giờ thì mật số vào khoảng $4,4 \times 10^7$ (cfu/mL).

Ở môi trường protein cám gạo có mật số vi khuẩn tăng khá đều và ít, bình quân mỗi 4 giờ tăng khoảng $2-3 \times 10^6$ cfu/mL và cao nhất khi ở 40 giờ nuôi cấy, ổn định đến 52 giờ và suy giảm còn $2,3 \times 10^7$ (cfu/mL) ở 72 giờ. Tốc độ tăng trưởng của vi khuẩn tương đối ổn định và rõ rệt theo từng giai đoạn khi nuôi cấy trong peptone thương mại, giai đoạn log mật số tăng nhanh (20 giờ đầu tiên), ở pha tiềm phát thì tăng dần đều và đạt cực đại ở thời điểm 44 giờ ($7,8 \times 10^7$ cfu/mL), duy trì mật số đến 56 giờ, sau đó giảm và đạt $5,5 \times 10^7$ (cfu/mL) vào cuối giai đoạn. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Taskin and Kurbanoglu, 2007 trên bột peptone lông gà thủy phân (2,69), peptone từ cá (2,61), tryptone peptone (2,37), và theo nghiên cứu của Gerhardt, 1981 protease peptone (2,05) với tốc độ tăng sinh khối được theo dõi bằng cách đo mật độ quang học tại 600 nm (OD_{600} nm)

Môi trường đạm thủy phân bằng papain cho mật số *B. subtilis* cao nhất gấp gần 1,3 lần so với môi trường peptone ở thời điểm đạt cực đại, tuy nhiên ở cuối giai đoạn thì mật số giảm xuống rất thấp và thấp hơn so với các môi trường còn lại. Tiếp theo là môi trường đạm thủy phân bằng neutrased có mật số cao

thứ hai $8,6 \times 10^7$ (cfu/mL), thấp hơn papain khoảng $1,6 \times 10^6$ (cfu/mL). Đặc biệt, ở 20 giờ nuôi cấy đầu tiên thì mật số gần bằng với môi trường peptone ở tất cả các thời điểm thu mẫu, nhưng 4 giờ tiếp theo thì tăng đạt cực đại và cao hơn cả môi trường peptone. Trong tất cả các nghiệm thức thì protein cám gạo có mật số vi khuẩn thấp nhất và sự sinh trưởng của vi khuẩn cũng khá chậm sau 40 giờ mới đạt được mật số $4,7 \times 10^7$ (cfu/mL).

Kết quả cho thấy, môi trường đậm thủy phân bằng papain có đặc tính dinh dưỡng cao hằng định khả năng có thể thay thế trong môi trường nuôi cấy vi khuẩn là khả thi (đạt cực đại 1×10^8 (cfu/mL) sau 24 giờ nuôi cấy). Đậm thủy phân bằng neutrase cho kết quả tương tự về mặt dinh dưỡng nhưng thấp hơn so với sản phẩm thủy phân bằng papain (đạt cực đại $8,6 \times 10^7$ (cfu/mL) sau 24 giờ). Protein cám gạo cũng có giá trị dinh dưỡng tuy nhiên không cao bằng các môi trường đậm thủy phân và peptone (sau 46 giờ đạt $4,7 \times 10^7$ (cfu/mL)).

4 KẾT LUẬN

Trên cơ sở chất protein cám gạo, kết quả nghiên cứu cho thấy papain có hiệu quả thủy phân tốt hơn neutrase, ở pH và nhiệt độ tối ưu enzyme papain thủy phân tốt nhất ở nồng độ cơ chất 2,5%, nồng độ enzyme sử dụng 100 U trong thời gian 180 phút đạt hiệu suất 20,97% và enzyme neutrase thủy phân tốt nhất ở nồng độ cơ chất 2,0%, nồng độ enzyme sử dụng 125 U trong thời gian 180 phút đạt hiệu suất 14,66%. Khi sử dụng protein cám gạo thủy phân bởi papain và neutrase cho thời gian nuôi cấy rút ngắn đáng kể (mật số 1×10^8 (cfu/mL) và $8,6 \times 10^7$ (cfu/mL), cùng đạt cực đại chỉ sau 24 giờ nuôi ủ), mật độ vi sinh vật cao hơn 1,9 và 1,6 lần so với môi trường peptone thương mại ở cùng thời điểm 24 giờ. Từ đó cho thấy việc sử dụng sản phẩm này cho ý nghĩa cao, đây là các môi trường có đặc tính dinh dưỡng cao hằng định khả năng có thể thay thế cho môi trường nuôi cấy vi khuẩn là khả thi. Protein cám gạo cũng có ý nghĩa về mặt giá trị dinh dưỡng tuy không cao bằng các môi trường đậm thủy phân và peptone (đạt cực đại sau 46 giờ với mật số $4,7 \times 10^7$ cfu/mL).

LỜI CẢM ƠN

Đề tài này được tài trợ bởi Dự án Nâng cấp Trường Đại học Cần Thơ VN14-P6 bằng nguồn vốn vay ODA từ chính phủ Nhật Bản. Chương trình A15.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ahmadifard, N., Murueta, J.H.C., Abedian-Kenari, A., Motamedzadegan, A. and Jamali, H., 2016. Comparison the effect of three commercial enzymes for enzymatic hydrolysis of two

substrates (rice bran protein concentrate and soy-bean protein) with SDS-PAGE. *Journal of Food Science and Technology*. 53(2): 1279-1284.

Anson, M.L., 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *The Journal of General Physiology*. 22(1): 79, accessed on 18 August 2017. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2213732/pdf/79.pdf>

AOAC, 2000. Total Sugars in Molasses as Invert Sugar. Method AOAC 968.28-1969. Lane-Eynon Constant Volume Volumetric Method. In: *Official Methods of Analysis*, 17th Edition, AOAC International Publisher Inc.. Gaithersburg.

AOAC, 2005. Solids (Total) and Moisture in Flour, Method AOAC 968.28. In: *Official Methods of Analysis*, 18th Edition, AOAC International Inc.. Gaithersburg.

AOAC, 2005. Ash of Flour (Direct Method), Method AOAC 923.03. In: *Official Methods of Analysis*, AOAC International Publisher Inc.. Gaithersburg.

AOAC, 2005. Oil in Cereal Adjuncts (Petroleum Ether), Method AOAC 945.16. In: *Official Methods of Analysis*, 18th Edition, AOAC International Publisher Inc.. Gaithersburg.

AOAC, 2005. Protein (Crude) in Animal Feed and Pet Food (Copper Catalyst), Method AOAC 2001.11. In: *Official Methods of Analysis*, 18th Edition, AOAC International Publisher Inc.. Gaithersburg.

Barredo, J. L., 2005. *Microbial enzymes and biotransformations*. New Jersey: Humana Press. Totowa, 319 pages.

Betschart, A.A., Fong, R.Y. and Saunders, R.M., 1977. Rice byproducts: Comparative extraction and precipitation of nitrogen from U.S. and Spanish bran and germ. *Journal of Food Science*. 42(4): 1088-1093.

Benjakul, S. and Morrissey, M.T., 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45(9): 3423-3430.

Bộ Khoa học và Công nghệ, 2005. Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 4884:2005 (ISO 4833 : 2003) về Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi - Phương pháp định lượng vi sinh vật trên đĩa thạch - Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30 độ C, ngày truy cập 05/08/2017. Địa chỉ: <https://vanbanphapluat.co/tcvn-4884-2005-ky-thuat-dem-khuan-lac-o-30-do-c>

Boonla, O., Kukongviriyapan, U., Pakdechote, P., Kukongviriyapan, V., Pannangpetch, P. and Thawornchinsombut, S., 2015. Peptides-derived from Thai rice bran improves endothelial function in 2K-1C renovascular hypertensive rats. *Nutrients*. 7(7): 5783-5799.

Boonloh, K., Kukongviriyapan, U., Pannangpetch, P., et al., 2015. Rice bran protein hydrolysates prevented interleukin-6 and high glucose-

- induced insulin resistance in HepG2 cells. *Food & Function*, 6(2), 566-573.
- Chiou, T.Y., Kobayashi, T., and Adachi, S., 2013. Characteristics and antioxidative activity of the acetone-soluble and-insoluble fractions of a defatted rice bran extract obtained by using an aqueous organic solvent under subcritical conditions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 77(3): 624-630.
- Choi, S.P., Kim, S.P., Kang, M.Y., Nam, S.H. and Friedman, M., 2010. Protective effects of black rice bran against chemically-induced inflammation of mouse skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(18): 10007-10015.
- Denner, W.H.B. and Gillanders, T.G.E., 1996. The legislative aspects of the industrial enzymes in the manufacture of food and food ingredients. In: Godfrey, T. and West, S. (Eds). *Industrial Enzymology*. The Macmillan Press Ltd. Inc., Basingstoke, pp. 397-411.
- Gerhardt, P., 1981. Diluents and biomass measurement. In: Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Costilow R.N., Nester, E.W., Wood W.A., Krieg, N.R. and Phillips G.B. (Eds.). *Manual of methods for general bacteriology*. American Society for Microbiology Inc.. Washington, D.C., pp. 504-507.
- Ghaly, A.E., Ramakrishnan, V.V., Brooks, M.S., Budge, S.M. and Dave, D., 2013. Fish Processing Wastes as a Potential Source of Proteins. *Amino Acids and Oils: A Critical Review*. *Journal of Microbial Biochemistry*. 5(4): 107-129.
- Hamada, J.S., 1997. Characterization of protein fractions of rice bran to devise effective methods of protein solubilization. *Cereal Chemistry*. 74(5): 662-668.
- Helm, R.M. and Burks, A.W., 1996. Hypoallergenicity of rice protein. *Cereal Foods World*. 41(11): 839-843.
- Hu, W., Wells, J.H., Shin, T.S. and Godber, J.S., 1996. Comparison of isopropanol and hexane for extraction of vitamin E and oryzanols from stabilized rice bran. *Journal of American Oil Chemists' Society*. 73(12): 1653-1656.
- Islam, M.S., Nagasaka, R., Ohara, K., Hosoya, T., Ozaki, H., Ushio, H. and Hori, M., 2011. Biological abilities of rice bran-derived antioxidant phytochemicals for medical therapy. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 11(14): 1847-1853.
- Horst, I., Parker, B.M., Dennis, J.S., Howe, C.J., Scott, S.A. and Smith, A.G., 2012. Treatment of *Phaeodactylum tricornutum* cells with papain facilitates lipid extraction. *Journal of Biotechnology*. 162(1): 40-49.
- Kawamura Y. and Muramoto, M., 1993. Antitumorogenic and immunoactive Protein and Peptide factors in foodstuff. 2. Antitumorogenic factors in rice bran. In: Waldron, K.W., Johnson, I.T. and Fenwick L.R., (Eds.). *Food and cancer prevention. Chemical and biological Aspects*. Cambridge: The Royal Society of chemistry Inc.. Royal, pp. 331-401.
- Justo, M.L., Candiracci, M., Dantas, A.P., et al., 2013. Rice bran enzymatic extract restores endothelial function and vascular contractility in obese rats by reducing vascular inflammation and oxidative stress. *Journal of Nutrient Biochemistry*. 24(8): 1453-1461.
- Lâm Văn Mễnh, 2016. Nghiên cứu khả năng thủy phân protein từ đầu và xương cá tra bằng bromelain, papain và neutrase. Luận văn cao học. Trường Đại học Cần Thơ. Thành phố Cần Thơ.
- Nielsen, P.M., Petersen, D. and Dambmann, C., 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*. 66(5), 642-646.
- Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M. and Assavanig, A., 2005. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *Journal of Food Engineering*. 70(4): 571-578.
- Nguyễn Đức Lượng, Cao Cường, Nguyễn Ánh Tuyết và ctv., 2004. Công nghệ enzyme, Nguyễn Đức Lượng chủ biên, Nhà xuất bản Đại học Quốc Gia Tp. Hồ Chí Minh. Thành phố Hồ Chí Minh, 160 trang.
- Nguyễn Thị Mai Phương, Võ Hoài Bắc, Trần Thị Nhung và Đỗ Hoàng Hiệp, 2015. Nghiên cứu thu nhận protein từ cám gạo. *Tạp chí Sinh học*. 37(4): 479-486.
- Pagán, J., Ibarz, A., Falguera, V. and Benítez, R., 2013. Enzymatic hydrolysis kinetics and nitrogen recovery in the protein hydrolysate production from pig bones. *Journal of Food Engineering*. 119(3): 655-659.
- Saunders, R.M., 1990. The properties of rice bran as a food stuff. *Cereal Foods World*. 35(7): 632-636.
- Tạ Hùng Cường, 2014. Nghiên cứu chế biến bột protein thủy phân từ thịt dè cá tra. Luận văn cao học. Trường Đại học Cần Thơ. Thành phố Cần Thơ.
- Taskin, M. and Kurbanoglu, E.B., 2011. Evaluation of waste chicken feathers as peptone source for bacterial growth. *Journal of Applied Microbiology*. 111(4): 826-834.
- Wang, M., Hettiarachchy, N.S., Qi, M., Burks, W. and Siebenmorgen, T., 1999. Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47(2): 411-416.
- Xian, Z.H.U., Chao, Z., Liang, Z. and Cheng, H., 2008. Amino acids production from fish proteins hydrolysis in subcritical water. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 16(3): 456-460.
- Xu, Z., 1998. Purification and Antioxidant Properties of Rice Bran γ -Oryzanol Components. Doctoral dissertation. Louisiana State University, LSU Historical Dissertations and Theses. 6642. USA.