



TRÍCH LY ENZYME BROMELAIN TỪ PHÉ PHẨM KHÓM CÀU ĐÚC-HẬU GIANG

Nguyễn Văn Thành¹, Nguyễn Minh Thủy², Lê Hà Ny³ và Lê Trung Hiếu⁴

¹ Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

² Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

³ Sinh viên Sinh học K35, Trường Đại học Cần Thơ

⁴ Sinh viên Công nghệ Sinh học K35, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 20/03/2013

Ngày chấp nhận: 30/10/2013

Title:

Extraction of bromelain from
"Cau Duc - Hau Giang"
pineapple wastes

Từ khóa:

Bromelain thân, kết tủa
sulfate ammonium, phế phẩm
khóm Cầu Đúc- Hậu Giang,
sấy chân không

Keywords:

Ammonium sulfate
precipitation, Cau Duc - Hau
Giang pineapple wastes, stem
bromelain, vacuum drying

ABSTRACT

Extraction of enzyme bromelain from non-used part of pineapple from agriculture and food processing industries can give a profit for adding value to these by products, on the other hand it can also minimize the environmental pollution. In this study, the factors affecting on bromelain extraction and preservation were explored. The results showed that among different part of pineapple wastes (stem, leave, fruit) stem was the most appropriate subject for enzyme production. The enzyme was precipitated by 70% ammonium sulfate saturation at 28°C with the protein yield 69.52%. Bromelain powder was obtained by vacuum drying for 24 hours with the moisture content of 1.87% and specific activity of 12.29 TU/mg. The enzymatic activity of the product was almost stabilised for twelve weeks when it was stored in glass bottles at 4°C.

TÓM TẮT

Tách chiết enzyme bromelain từ phế phẩm khóm trong công nghiệp chế biến thực phẩm để chuyển chúng từ phế phẩm thành sản phẩm có giá trị, mặt khác cũng nhằm làm giảm thiểu ô nhiễm môi trường. Với mục tiêu trên, trong nghiên cứu này các tác nhân ảnh hưởng đến trích ly và bảo quản enzyme bromelain đã được khảo sát. Kết quả nghiên cứu cho thấy trong số những phần phế phẩm (thân, lá, trái) thân khóm là nguồn cơ chất thích hợp để sản xuất enzyme bromelain. Chế phẩm bromelain được kết tủa với ammonium sulfate 70%, ở nhiệt độ 28°C, cho sản lượng 69,52% protein. Bột bromelain thu được bởi sấy chân không trong 24 giờ, độ ẩm đạt 1,87% và hoạt lực là 12,29 (TU/mg). Bột enzyme thu được nên bảo quản ở nhiệt độ lạnh (4°C) trong chai thủy tinh, có hoạt tính ổn định trong 12 tuần.

1 GIỚI THIỆU

Bromelain là tên gọi chung cho nhóm enzyme thực vật chứa nhóm sulfhydryl, có khả năng phân giải protein được thu nhận từ họ *Bromeliaceae*, đặc biệt là ở cây khóm (thân và trái). Bromelain có nhiều tác dụng trong y học và trong chế biến thực phẩm. Bromelain có mặt trong phụ phế phẩm của

khóm như: lõi, vỏ, thân, chồi và lá. Phần phụ phế phẩm này chiếm một tỷ lệ lớn của lượng khóm nguyên liệu đưa vào chế biến khoảng 70% (Lại Thị Ngọc Hà, 2009).

Theo thống kê năm 2009, Hậu Giang có 1.552 ha đất chuyên canh khóm, tập trung nhiều ở thành phố Vị Thanh và huyện Long Mỹ. Trong những

năm gần đây, khóm Cầu Đức đã có mặt trong hệ thống siêu thị đồng bằng sông Cửu Long và toàn quốc. Khóm Cầu Đức thuộc giống Queen, nguồn gốc Thái Lan, thuộc tiểu nhóm “Queen cổ điển”. Cây khóm Cầu Đức cao trên 1 mét, trọng lượng trái khoảng 1,5-2 kg, năng suất trung bình 20 tấn/ha. Cùng với sự phát triển của ngành sản xuất và chế biến khóm thì lượng phế phụ phẩm cũng tăng theo. Ở các nông trường trồng khóm, cây và lá khóm bị bỏ khô trên đất hoặc được vùi làm phân bón. Ở các nhà máy chế biến rau quả, phần lớn phụ phẩm khóm được đưa ra bãi rác gây ô nhiễm môi trường. Từ đây cho thấy rằng việc sản xuất khóm tạo ra một nguồn phế phụ phẩm rất lớn có chứa enzyme bromelain. Do vậy, mục tiêu nghiên cứu nhằm tách

chiết và tinh sạch enzyme bromelain từ phụ phẩm của khóm nhằm tận dụng phế phụ phẩm của khóm, nâng cao giá trị kinh tế của cây khóm, trích enzyme bromelain là cần thiết nhằm phục vụ hiệu quả cho quá trình chế biến thực phẩm và dược phẩm và đồng thời làm giảm được ô nhiễm môi trường.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương tiện nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại phòng thí nghiệm Sinh Hóa Thực phẩm, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ. Phụ phế phẩm thân, lá và trái khóm phế phẩm (Hình 1) được thu nhận từ xã Hòa Tiến, thành phố Vị Thanh, tỉnh Hậu Giang.



A



B



C

Hình 1: Nguyên liệu thí nghiệm: thân khóm (A), lá khóm (B) và trái khóm phế phẩm (C)

Hóa chất thí nghiệm

Aceton, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Coomassie brilliant blue G (Ấn Độ), Tris buffer, Hydroxide natri (NaOH) (Trung Quốc), Acid chlorhydric (HCl) (Trung Quốc), Casein (Trung Quốc), L- Tyrosine ($\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Ấn Độ)...

2.2 Nội dung và phương pháp nghiên cứu

2.2.1 *Thí nghiệm 1: Thử nghiệm sơ bộ trích ly enzyme bromelain từ các nguồn phụ phế phẩm (thân, lá và trái)*

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 1 nhân tố gồm ba nguồn nguyên liệu, được lặp lại 3 lần và tiến hành như sau:

- Thu nhận 100 g thân khóm, 100 g lá khóm và 100 g trái khóm phế phẩm tại các vườn khóm ở xã Hòa Tiến – Vị Thanh.

- Xử lý và thu dịch: thân khóm, lá khóm và trái khóm phế phẩm rửa sạch bụi bẩn, cắt thành miếng và xay nhuyễn, thu được dịch. Dịch thu được tiếp tục ly tâm lạnh ở 8°C , 7000 vòng/phút trong 15 phút). Loại bỏ các tạp chất bị tủa bám dưới đáy bình ly tâm và chỉ thu dịch trong.

- Xác định hoạt tính và hàm lượng protein từ dịch trong thu được bằng phương pháp Kunitz (1974) cải tiến và phương pháp Bradford (1976).

- Thí nghiệm được tiến hành riêng biệt đối với thân, lá và trái khóm phế phẩm và lặp lại 3 lần. Từ đó chọn ra nguồn nguyên liệu cho hiệu suất và hoạt tính tối ưu để sử dụng cho thí nghiệm tiếp theo.

Chỉ tiêu theo dõi

- Hoạt tính tổng của enzyme bromelain (TU) bằng phương pháp Kunitz cải tiến.

- Hàm lượng protein tổng số (mg) bằng phương pháp Bradford.

- Hoạt tính riêng (TU/mg protein).

2.2.2 *Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ ammonium sulfate (SA) và nhiệt độ kết tủa*

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 2 nhân tố và 3 lần lặp lại.

Nồng độ ammonium sulfate (SA): 60-80%, cách nhau 10%.

Nhiệt độ kết tủa: nhiệt độ thường (28°C) và nhiệt độ lạnh (4°C).

Thực hiện thí nghiệm: nguyên liệu được nghiền ép, lọc bỏ bã thu dịch lọc, ly tâm lạnh 15000 vòng/phút trong 15 phút ở nhiệt độ 8°C và thu dịch ly tâm. Sau đó, cho tác nhân kết tủa vào với các nồng độ như đã bố trí thí nghiệm. Sau khi kết tủa, tiến hành ly tâm lạnh hỗn hợp để thu tủa. Sấy khô tủa và thu hồi chế phẩm enzyme bromelain thô.

2.2.3 Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của các phương thức sấy

Sau khi chọn được nồng độ tác nhân kết tủa và nhiệt độ kết tủa từ thí nghiệm 1, thực hiện khảo sát ảnh hưởng của phương thức sấy đến hoạt tính riêng và hiệu suất thu hồi hoạt tính bromelain thô. Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với 1 nhân tố và 3 lần lặp lại.

Phương pháp sấy: sấy thăng hoa (-20°C), sấy phun (100°C), sấy chân không (30°C) và sấy bằng khí lạnh khô (4°C).

Từ 2 kg thân khóm ban đầu, ly tâm lấy dịch và kết tủa bằng ammonium sulfate 70%. Sau khi kết tủa, ly tâm lạnh hỗn hợp để loại bỏ dịch và thu tủa. Tủa thu được đưa vào quá trình sấy theo các phương pháp đã được đề cập ở trên và thu hồi enzyme bromelain thô.

2.2.4 Thí nghiệm 4: Khảo sát ảnh hưởng của điều kiện bảo quản chế phẩm enzyme bromelain thô

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với 2 nhân tố và 3 lần lặp lại.

Nhiệt độ bảo quản: nhiệt độ phòng (25°C), 4°C và -20°C.

Dụng cụ bảo quản: chai thủy tinh, bao PE ghép mí thường.

Cần mỗi mẫu khoảng 2 g bột cho vào túi PE và 2 g bột cho vào chai thủy tinh đủ để xác định hoạt tính trong 3 tháng (12 tuần). Bảo quản trong điều kiện tránh sáng ở các nhiệt độ và xác định hoạt tính enzyme sau hai tuần bảo quản.

Các chỉ tiêu theo dõi ở các thí nghiệm:

- Lượng enzyme bromelain thô thu được (mg/ml) (sử dụng cân điện tử độ chính xác 0,0001 g).
- Hoạt tính riêng của enzyme bằng phương pháp Kunitz (1974) cải tiến.
- Hiệu suất thu hồi enzyme bromelain (%).
- Hiệu suất thu hồi hoạt tính tổng enzyme bromelain (%).

Xử lý kết quả

Sử dụng chương trình thống kê Statgraphics.

3 KẾT QUẢ THẢO LUẬN

3.1 Chất lượng và khối lượng enzyme bromelain trích ly từ các nguồn phế phẩm khóm

Sự khác biệt hoạt tính và hàm lượng protein của enzyme bromelain từ các nguồn phế phẩm khóm được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1: Kết quả phân tích khối lượng và chất lượng bromelain từ các nguồn phế phẩm khóm

Nguồn phế phẩm khóm	Khối lượng (g)	Thể tích dịch chiết enzyme thô (ml)	Hoạt tính tổng (TU)	Hàm lượng protein tổng (mg)	Hoạt tính riêng (TU/mg)
Thân khóm	100	55	4787,1 ^c	360,43 ^c	13,38 ^c
Trái khóm phế phẩm	100	65	1191,4 ^b	119,80 ^b	9,95 ^b
Lá khóm	100	40	444,5 ^a	65,20 ^a	6,82 ^a

Số liệu trong bảng là trung bình ba lần lặp lại. Trong cùng một cột các số liệu đi kèm chữ cái giống nhau thì khác biệt không có nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%

Kết quả cho thấy thân khóm có hoạt tính tổng (4787,1 TU) và hoạt tính riêng (13,378 TU/mg) của enzyme bromelain là cao nhất, tiếp đó là ở trái (1191,4 TU; 9,948 TU/mg) và thấp nhất thể hiện ở lá (444,5 TU; 6,82 TU/mg). Kết quả nghiên cứu phù hợp với Larrauri *et al.* (2004) và Nguyễn Đức Lượng (2004) về hoạt tính đặc hiệu của bromelain trái và thân trên cơ chất casein, cho thấy bromelain thân cao hơn bromelain trái. Bên cạnh đó, lá khóm rất cứng và có gai, thích hợp cho quá trình ủ chua làm thức ăn cho gia súc hoặc làm phân bón. Theo

các nghiên cứu trước, bromelain có nhiều trong thân và trái hơn so với lá. Vì thế thân và trái có thể sử dụng để trích ly enzyme bromelain. Enzyme bromelain ở thân và trái có điểm khác nhau, có lẽ do được cấu thành từ hai nhóm protein khác nhau (Ota *et al.*, 1985). Theo Tran (2006), bromelain thân gồm hỗn hợp bốn loại cysteine-protease nên khác với bromelain trái chỉ có một loại duy nhất. Như vậy thân khóm là nguồn thích hợp cho trích ly enzyme bromelain thương mại có giá trị kinh tế cao.

3.2 Ảnh hưởng của nồng độ tác nhân kết tủa ammonium sulfate và nhiệt độ kết tủa đến chất lượng và khối lượng bột enzyme bromelain

3.2.1 Nồng độ tác nhân kết tủa

Sự kết tủa bromelain dưới tác dụng muối kiềm cho thấy ảnh hưởng của các nồng độ ammonium sulfate (từ 60÷80%) đến sự kết tủa enzyme bromelain (Bảng 2 và 3).

Khi nồng độ muối sử dụng càng cao, lượng kết tủa càng tăng và lượng protein trong kết tủa càng

tăng nhưng cũng đồng thời tăng sự hiện diện muối trong chế phẩm. Ở nghiệm thức 70% ammonium sulfate (SA) cho kết quả hoạt tính riêng và hiệu suất thu hồi hoạt tính tổng là tốt nhất (12,36 TU/mg và 72,59%, tương ứng) và có sự khác biệt ý nghĩa (độ tin cậy 95%) so với nghiệm thức 60% SA (hoạt tính riêng và hiệu suất thu hồi hoạt tính tổng là 11,83 TU/mg và 72,14%, tương ứng) và nghiệm thức 80% SA (11,35 TU/mg và 78,01%) ở nhiệt độ 28°C.

Bảng 2: Ảnh hưởng của nồng độ muối ammonium sulfate ở nhiệt độ 28°C đến sự kết tủa enzyme bromelain

Nồng độ (NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	HSTH hoạt tính tổng (%)	HSTH protein (%)	Hoạt tính riêng (TU/mg)	Khối lượng bột enzyme (g/0,5kg nguyên liệu)
60	68,33 ^a	54,89 ^a	11,83 ^{ab}	7,76 ^a
70	72,59 ^b	56,16 ^b	12,36 ^b	9,96 ^b
80	66,96 ^a	56,02 ^b	11,35 ^a	11,74 ^c

Số liệu trong bảng là trung bình ba lần lặp lại. Trong cùng một cột các số liệu có chữ cái giống nhau thì khác biệt không có nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%. HSTH: Hiệu suất thu hồi

Bảng 3: Ảnh hưởng của nồng độ muối ammonium sulfate ở nhiệt độ 4°C đến sự kết tủa enzyme bromelain

Nồng độ (NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	HSTH hoạt tính tổng (%)	HSTH protein (%)	Hoạt tính riêng (TU/mg)	Khối lượng bột enzyme (g/0,5 kg nguyên liệu)
60	72,14 ^a	45,37 ^a	15,00 ^b	8,29 ^a
70	82,59 ^b	59,53 ^b	13,09 ^a	10,07 ^b
80	78,01 ^{ab}	60,75 ^b	12,40 ^a	12,14 ^c

Số liệu trong bảng là trung bình ba lần lặp lại. Trong cùng một cột các số liệu có chữ cái giống nhau thì khác biệt không có nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% HSTH: Hiệu suất thu hồi

Khi thực hiện kết tủa ở 4°C thì hoạt tính riêng của nghiệm thức 70% ammonium sulfate (13,09 TU/mg) thấp hơn có ý nghĩa so với nghiệm thức 60% SA (15,00 TU/mg) nhưng không khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức 80% SA (12,40 TU/mg). Tuy nhiên, hiệu suất thu hồi hoạt tính tổng ở nghiệm thức 70% SA (82,59%) cao hơn nghiệm thức 60% SA (68,33%) và nghiệm thức 80% SA (78,01%). Kết quả đạt được như vậy có thể do ở nồng độ muối thấp, chưa đủ khả năng kết tủa nhiều protein. Khi tăng lượng muối tới nồng độ thích hợp làm kết tủa hầu hết các protein và trong đó có sự hiện diện của bromelain. Ở nồng độ muối cao hơn 70% bão hòa, lực điện tích tăng lên, số lượng ion kết hợp với protein nhiều, lực tĩnh điện được tạo thành sẽ làm cho phân tử protein bị xoáy, vụn và dẫn đến sự biến tính (Nguyễn Đình Huyền *et al.*, 1994). Như vậy, ở nồng độ muối ammonium sulfate 70% bão hòa là đủ để kết tủa hết bromelain có trong dịch thân khóm. Theo kết quả của Nguyễn

Đình Huyền *et al.* (1994), khi kết tủa bromelain trái bằng ammonium sulfate ở các nồng độ từ 30 đến 100% cũng đã kết luận nồng độ 70% ammonium sulfate cho hiệu suất thu hồi hoạt tính cao nhất. Dương Thị Hương Giang *et al.* (2002) đã nghiên cứu đánh giá các phương pháp trích ly bromelin từ nước khóm thô bằng acetone và ammonium sulfate đã kết luận rằng phương pháp trích ly bromelin bằng ammonium sulfate theo tỷ lệ 70% bão hòa thu nhận bromelain thô cho hiệu suất thu hồi khá cao 92% so với hoạt tính ban đầu. Từ kết quả thí nghiệm và công bố của các tác giả trên cho thấy kết tủa bromelin với 70% SA là thích hợp và có thể được áp dụng cho hoạt động khảo sát ở nghiệm thức tiếp theo.

3.2.2 Nhiệt độ kết tủa

Thực nghiệm cho thấy nhiệt độ ảnh hưởng quan trọng đến quá trình trích ly bromelain (Bảng 4).

Bảng 4: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự kết tủa enzyme bromelain

Nhiệt độ (°C)	HSTH hoạt tính tổng (%)	HSTH protein (%)	Hoạt tính riêng (TU/mg)	Hoạt tính TU/g enzyme
4	82,59 ^b	59,53 ^b	13,09 ^b	2751,65 ^b
28	72,59 ^a	56,16 ^a	12,36 ^a	2422,30 ^a

Số liệu trong bảng là trung bình ba lần lặp lại. Trong cùng một cột các số liệu có chữ cái giống nhau thì khác biệt không có nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%. HSTH: Hiệu suất thu hồi

Kết quả cho thấy khi kết tủa ở nhiệt độ 28°C thì hoạt tính riêng và hiệu suất thu hồi hoạt tính bromelain là 12,36 TU/mg và 72,59%, tương ứng, thấp hơn có ý nghĩa (độ tin cậy 95%) so với nghiệm thức kết tủa ở nhiệt độ 4°C (hoạt tính riêng và hiệu suất thu hồi hoạt tính bromelain tương ứng là 13,09 TU/mg và 82,59%). Như vậy khi thực hiện kết tủa ở 4°C với tác nhân tủa ammonium sulfate thì hoạt tính của enzyme luôn luôn tốt hơn nhiệt độ 28°C ở bất kỳ nồng độ muối nào. Ở nhiệt độ lạnh (4°C), quá trình kết tủa protein và khả năng hạn chế sự biến tính diễn ra tốt hơn. Kết quả thu được cũng tương tự kết quả nghiên cứu đã được công bố của Nguyễn Đình Huyền *et al.* (1994). Nhóm tác giả cũng cho thấy rằng muối ammonium sulfate sử dụng cho kết tủa bromelain cũng cho hoạt tính của chế phẩm trích ly ở nhiệt độ 4°C thường cao hơn ở nhiệt độ 27°C. Tuy nhiên, nhìn chung khi ly trích ở nhiệt độ phòng (28°C), hoạt tính tổng của enzyme giảm 10% so ly trích ở nhiệt độ 4°C và vẫn ở mức chấp nhận được. Mặt khác, từ thực nghiệm cho thấy quá trình kết tủa ở nhiệt độ 4°C diễn ra khó khăn, đòi hỏi phải có thiết bị làm lạnh nên rất tốn kém và thao tác phức tạp nên chi phí sản xuất cao. Như vậy, nhằm hoàn thiện phương pháp sử dụng muối ammonium sulfate làm tác nhân kết tủa bromelain từ thân khóm, có thể chọn nồng độ và nhiệt độ kết tủa tương ứng là 70%

và 28°C để thực hiện khảo sát cho thí nghiệm tiếp theo.

3.3 Ảnh hưởng của phương thức sấy đến hoạt tính riêng, hiệu suất thu hồi hoạt tính và khối lượng bột enzyme bromelain

Nhiệt độ sấy và thời gian sấy là hai yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hoạt tính của chế phẩm enzyme thô. Sấy ở nhiệt độ cao có thể làm mất hoạt tính của enzyme do protein bị biến tính. Tuy nhiên, khi sấy ở nhiệt độ thấp thì thời gian sấy kéo dài và trong thời gian này với sự hiện diện của ẩm độ cao thì sự tự phân của các protease sẽ diễn ra làm enzyme bị mất hoạt tính. Kết quả cho thấy khi sấy đông khô chế phẩm enzyme bromelain thô trong 12 giờ cho hiệu suất thu hồi hoạt tính và hoạt tính riêng của bột enzyme thô cao nhất (87,55% và 12,96 TU/mg, tương ứng) và thể hiện sự khác biệt ý nghĩa so với 3 nghiệm thức sấy còn lại (Bảng 5). Tuy nhiên, không có sự khác biệt ý nghĩa về hiệu suất thu hồi hoạt tính và hoạt tính riêng của bột enzyme thô giữa các phương thức: sấy chân không trong 24 giờ (72,02% và 12,23 TU/mg), sấy khí lạnh khô trong 48 giờ (69,52% và 12,29 TU/mg) và phương thức sấy phun với chất bảo vệ là mannitol 5% (Nguyễn Phú Thọ và Dương Thị Hương Giang, 2011) trong 1 giờ (40,82% và 11,51 TU/mg).

Bảng 5: Ảnh hưởng phương thức sấy đến hoạt tính enzyme bromelain

Phương thức sấy	HSTH hoạt tính tổng (%)	HSTH protein (%)	Hoạt tính riêng TU/mg	Độ ẩm (%)	Khối lượng bột enzyme (g/0,5 kg nguyên liệu)
Sấy phun* (100°C)	40,82 ^a	34,65 ^a	11,51 ^a	2,52 ^a	4,96 ^a
Sấy chân không (30°C)	72,02 ^b	57,50 ^b	12,23 ^b	1,87 ^a	6,03 ^b
Sấy khí lạnh khô (4°C)	69,52 ^b	55,08 ^b	12,29 ^b	3,57 ^b	6,28 ^c
Sấy đông khô (-20°C)	87,55 ^c	66,67 ^c	12,96 ^c	1,82 ^a	5,85 ^b

Số liệu trong bảng là trung bình ba lần lặp lại. Trong cùng một cột các số liệu có chữ cái giống nhau thì khác biệt không có nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%. HSTH: Hiệu suất thu hồi. * Mẫu enzyme kết tủa thu được từ 500 g mẫu thân khóm sau trích ly được xử lý bởi hòa tan vào trong 210 ml nước cất và thêm vào mannitol 5%, tiến hành sấy phun

Như vậy, hoạt tính enzyme ổn định nhất khi thực hiện sấy bằng phương pháp đông khô. Với phương pháp này, nước tách ra khỏi nguyên liệu bằng cách chuyển từ trạng thái rắn (đá) sang trạng thái khí mà không qua giai đoạn lỏng (nước) ở -40°C. Nhờ vậy nước được đưa ra khỏi enzyme mà

không làm hỏng enzyme. Nếu nhiệt độ thường dễ làm enzyme biến tính thì phương pháp đông khô giúp enzyme giữ được tính chất hóa lý và cả hoạt tính. Lại Thị Ngọc Hà (2009) so sánh hiệu quả của phương pháp sấy phun và sấy đông khô bromelain

cho kết quả hoạt tính được giữ lại sau hai quá trình này là 96% và 73%, tương ứng.

Sấy chân không cũng là một biện pháp làm khô tủa bromelain đến độ ẩm an toàn và có thể bảo quản trong thời gian dài. Tuy nhiên so với sấy đông khô, sấy chân không được tiến hành ở nhiệt độ cao hơn nhiều (30°C) nên hoạt tính của bromelain sau khi sấy thấp hơn. Tuy nhiên khi so sánh giữa sấy chân không với phương pháp sấy bằng khí lạnh khô ở nhiệt độ 4°C thì các giá trị thu nhận được không thể hiện sự khác biệt ý nghĩa (độ tin cậy 95%). Điều này có thể là do bromelain là một enzyme bền nhiệt trong khoảng nhiệt độ 50–60°C, nên ở nhiệt độ khoảng 30°C vẫn giữ được hoạt tính tương đối tốt như ở nhiệt độ lạnh (4°C). Khi sử dụng phương pháp sấy phun, hoạt tính enzyme biến tính khá nhiều do độ bền nhiệt của bromelain kém hơn papain. Ở 70°C, bromelain bị biến tính nhanh gấp 20 lần papain ở 75°C, tùy thuộc cơ chất mà nhiệt độ tối ưu khác nhau (Nguyễn Trọng Cần *et al.*, 1998).

Kết quả thể hiện đồng thời ở Bảng 5 cho thấy khối lượng bột enzyme thu được từ phương pháp sấy bằng không khí lạnh khô là cao nhất (6,28g) và thể hiện sự khác biệt ý nghĩa so với ba nghiệm thức sấy còn lại. Tuy nhiên, không có sự khác biệt ý nghĩa giữa nghiệm thức sấy chân không (6,03g) và nghiệm thức sấy đông khô (5,85g). Khối lượng bột enzyme thu được từ phương pháp sấy phun có khối lượng thấp nhất (4,96g). Điều này có liên quan đến độ ẩm của sản phẩm, sấy bằng không khí lạnh chế phẩm đạt độ ẩm 3,57%, cao hơn độ ẩm chế phẩm thu được từ phương pháp sấy chân không (1,78%) và sản phẩm sấy đông khô (1,82%). Chế phẩm bromelain thu được từ phương pháp sấy phun có khối lượng thấp nhất, có lẽ do trong quá trình sấy, enzyme bị thất thoát theo không khí nóng.

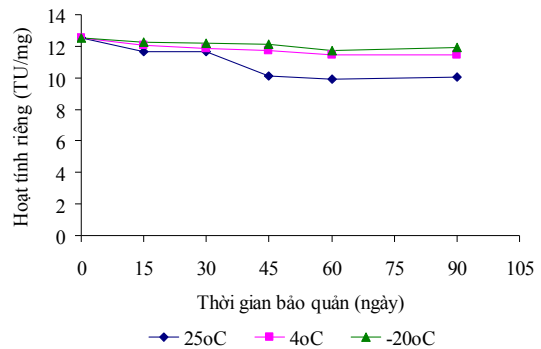
Ngoài ra, thời gian sấy từ các phương pháp sấy cũng khác nhau. Với cùng lượng mẫu như nhau, để sấy đến độ ẩm bảo quản an toàn của chế phẩm enzyme (<8%) thì phương pháp sấy chân không mất khoảng 24 giờ, trong khi sấy bằng khí lạnh khô phải mất 48 giờ (với yêu cầu thiết bị giữ lạnh 4°C), không khí phải có độ ẩm thấp và việc luân chuyển khó thực hiện. Với phương pháp sấy đông khô thì ngoài thời gian sấy tương đối ngắn (10 giờ), phương pháp này còn đòi hỏi mẫu trước khi đưa vào sấy phải được làm lạnh đông đến -20°C, vận hành thiết bị sấy đông khô cũng khá phức tạp và đắt tiền nên trong thực tế chưa được sử dụng rộng rãi. Với phương pháp sấy phun thì thời gian

sấy ngắn nhất (1 giờ), dễ sản xuất ở quy mô công nghiệp tuy nhiên lượng enzyme thất thoát lớn và dễ mất hoạt tính do sấy ở nhiệt độ cao. Như vậy, có thể chọn phương pháp chân không cho quá trình sấy bột enzyme bromelain thô cho thí nghiệm tiếp theo.

3.4 Ảnh hưởng của điều kiện bảo quản đến sự biến đổi chất lượng enzyme bromelain thô

Enzyme bromelain thô được bảo quản ở các nhiệt độ 25, 4, -20°C. Kết quả xác định hoạt tính riêng của enzyme cho thấy ở nhiệt độ 25°C, hoạt tính enzyme giảm nhanh nhất (19,9%) và giảm ít hơn đối với enzyme được bảo quản ở 4°C (8,25%) và giảm ít nhất khi được bảo quản ở -20°C (4,96%) trong bốn tháng bảo quản (Hình 2) có sự khác biệt ý nghĩa với độ tin cậy 95% giữa các nhiệt độ này. Enzyme bromelain được bảo quản trong chai thủy tinh và bao PE. Kết quả xác định hoạt tính riêng cho thấy enzyme bảo quản trong chai thủy tinh tốt hơn (hoạt tính 11,59 TU/mg) cao hơn (có ý nghĩa) so với hoạt tính enzyme chứa đựng trong bao PE (11,34 TU/mg) (Bảng 6).

Khảo sát hoạt tính enzyme bromelain thành phẩm cho thấy hoạt tính tổng và hoạt tính riêng của loại này cao hơn (2165,12 TU và 12,51 TU/mg) và thể hiện sự khác biệt ý nghĩa so với chế phẩm enzyme bromelain thương mại (1929,1 TU và 7,01 TU/mg) (Bảng 7).



Hình 2: Biến đổi tính đặc hiệu của bromelain theo nhiệt độ và thời gian bảo quản

Bảng 6: Ảnh hưởng của dụng cụ chứa đến hoạt tính enzyme trong quá trình bảo quản

Dụng cụ chứa	Hoạt tính (TU/mg)
Bao PE	11,34 ^a
Chai thủy tinh	11,59 ^b

Số liệu trong bảng là trung bình ba lần lặp lại. Trong cùng một cột các số liệu có chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%

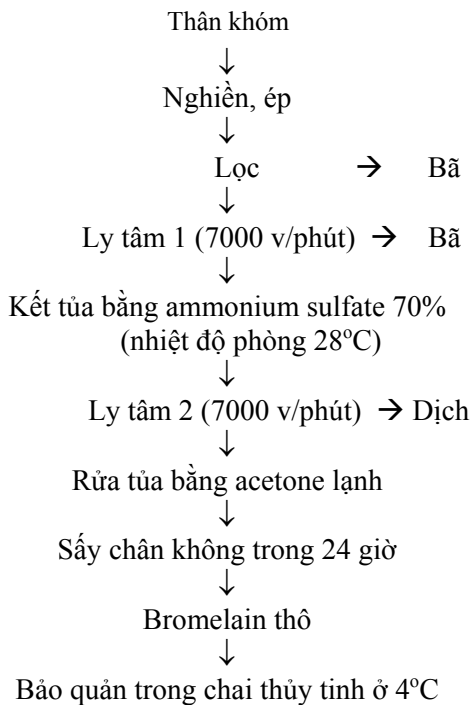
Bảng 7: So sánh hoạt tính của bột enzyme thành phẩm và bột enzyme thương mại

Loại bột bromelain	Hoạt tính tổng (TU)	Hoạt tính riêng (TU/mg)
Bột enzyme thành phẩm	2165,12 ^b	12,51 ^b
Bột enzyme thương mại (Merck)	1929,10 ^a	7,01 ^a

Số liệu trong bảng là trung bình ba lần lặp lại. Trong cùng một cột các số liệu có chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%

4 KẾT LUẬN

Kết quả thu nhận được từ nghiên cứu cho thấy thân khóm là nguồn nguyên liệu thích hợp để trích ly bột enzyme bromelain. Có thể thực hiện tốt quá trình kết tủa enzyme bromelain bằng ammonium sulfate 70% ở 28°C. Hiệu suất thu hồi enzyme tốt nhất với phương thức sấy chân không trong 24 giờ, chế phẩm có màu trắng ngà, hiệu suất thu hồi hoạt tính tổng là 69,52%, hoạt lực 12,29 (TU/mg) và độ ẩm 1,87%. Bột enzyme thành phẩm cần bảo quản trong chai thủy tinh ở nhiệt độ lạnh (khoảng 4°C). Quy trình trích ly chế phẩm enzyme bromelain theo phương pháp kết tủa bằng ammonium sulfate được đề nghị sau:



Hình 3: Quy trình trích ly enzyme bromelain từ thân khóm phế phẩm

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bradford M. M, 1976, A rapid and sensitive microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
2. Dương Thị Hương Giang, Lê Thanh Hùng, Võ Văn Song Toàn, Sonia Beeckmans, Edilbert Van Driessche và Trần Phước Đường, 2002. Đánh giá các phương pháp trích ly bromelin từ nước khóm thô, *Tạp chí Khoa học năm 2002*, Trường Đại học Cần Thơ.
3. Kunitz M, 1974. Determination of proteolytic activity by the casein digestion method. *Journal of General Physiology*, 30, 291.
4. Lại Thị Ngọc Hà, 2009. Nghiên cứu tách và tạo chế phẩm enzyme bromelain từ phế phụ phẩm dứa, *Tạp chí Khoa học và Phát triển năm 2009 - tập 7*, số 2:203-211, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội.
5. Larrauri J.A., Ruperez P. and Calixto F. S., 1997. Pineapple shell as a source of dietary fiber with associated polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 4028-4031.
6. Nguyễn Đình Huyền, Hà Ái Quốc, Lâm Thị Kim Châu, Lê Thị Thanh Mai, 1994. Nghiên cứu và sản xuất enzyme bromelain. Đề tài nghiệm thu cấp Bộ. Mã số B91-07-03.
7. Nguyễn Đức Lương, 2004. Công nghệ enzyme, NXB ĐHQG Thành phố Hồ Chí Minh.
8. Nguyễn Phú Thọ và Dương Thị Hương Giang, 2011. Nghiên cứu qui trình điều chế bột enzyme papain thô từ nhựa đu đủ. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*.
9. Nguyễn Trọng Cần, Nguyễn Thị Hiền, Đỗ Thị Giang, Trần Thị Luyến, 1998. *Giáo trình Công nghệ enzyme*, NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
10. Ota S., Muta E., Katahira Y., Okamoto Y., 1985. Reinvestigation of fractionation and some properties of the proteolytically active components of stem and fruit bromelains. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* 98: 219-228.
11. Tran A.V., 2006. Chemical analysis and pulping study of pineapple crown leaves, *Industrial crops and products*, 24: 66-74.