

KHẢO SÁT QUÁ TRÌNH TẠO CHẾ PHẨM BROMELAIN DẠNG BỘT TỪ PHỤ PHẨM DỨA

Đào Thị Mỹ Linh*, **Nguyễn Thị Quỳnh Mai,**
Đỗ Thị Hoàng Tuyền, Nguyễn Thị Như Phụng

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

*Email: *linhdtm@cntp.edu.vn*

Ngày nhận bài: 11/7/2017; Ngày chấp nhận đăng: 20/9/2017

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm thu chế phẩm bromelain dạng bột từ phụ phẩm dứa bằng phương pháp sấy phun. Kết quả cho thấy, chất trợ sấy phù hợp là sữa tách béo (skim milk) với nồng độ 10% (w/v), quá trình sấy thực hiện ở nhiệt độ không khí đầu vào 110 °C, nhiệt độ không khí đầu ra 60 °C, tốc độ bơm nhập liệu 288 mL/h (8 rpm). Tạo được chế phẩm bromelain có hoạt tính $1542,550 \pm 98,384$ (UI/g), thông số động học $K_m = 2,031$ mM và $V_{max} = 0,054$ mM/phút với cơ chất là casein, hoạt động thủy phân tốt nhất ở pH 7, nhiệt độ 40 °C. Chế phẩm thích hợp bảo quản ở 0 °C trong bao nhôm và có thể giữ được 50% hoạt tính sau 20 ngày.

Từ khóa: Enzyme, bromelain, lọc tiếp tuyến, phụ phẩm dứa, sấy phun.

1. MỞ ĐẦU

Hiện nay, việc sản xuất chế phẩm enzyme đã và đang phát triển mạnh mẽ trên quy mô công nghiệp. Các loại chế phẩm enzyme được bày bán trên thị trường với nhiều mức độ tinh khiết khác nhau theo tiêu chuẩn công nghiệp và ứng dụng. Một số loại chế phẩm phổ biến như amylase, protease, cellulose, lipase,...

Bromelain là tên gọi chung cho các enzyme phân giải protein chứa nhóm sulfhydryl được tách chiết chủ yếu từ các mô của thực vật thuộc họ bromeliaceae, tiêu biểu nhất là cây dứa. Hiện nay, ngoài hai loại bromelain thương mại được tách chiết từ thân (stem bromelain - SBM - EC 3.4.22.32) và từ trái (fruit bromelain - FBM - EC 3.4.22.33), bromelain còn được nghiên cứu tách chiết từ phụ phẩm như vỏ, lõi, lá, chồi ngọn của quả dứa [1, 2].

Ở Việt Nam, dứa được trồng khắp từ Bắc tới Nam trên diện tích khoảng 40 ngàn hecta, với sản lượng trên 500 ngàn tấn/năm, 90% diện tích tập trung ở phía Nam. Các tỉnh có diện tích trồng dứa lớn gồm Tiền Giang (14800 ha), Kiên Giang (10000 ha), Hậu Giang (gần 1600 ha), Long An (1000 ha) [3]. Cùng với đó là sự phát triển những nhà máy chế biến các sản phẩm từ quả dứa như Đồng Giao (Tam Điệp - Ninh Bình), KIVECO (Kiên Giang) và VEGETIG (Tiền Giang)... do vậy đã tạo ra một lượng phế phụ phẩm lớn, hiện nay chủ yếu được sử dụng là nguyên liệu để sản xuất phân bón hữu cơ, ủ chua làm thức ăn gia súc. Tuy nhiên nguồn phụ phẩm này còn chứa bromelain có hoạt tính [1, 2, 4, 5]. Nếu tận dụng, khai thác tốt enzyme từ các nguồn phụ phẩm này sẽ góp phần nâng cao giá trị kinh tế của cây dứa.

Do vậy, đề tài được thực hiện nhằm tạo chế phẩm bromelain dạng bột từ phụ phẩm dứa hướng đến ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực công nghiệp da giày, mỹ phẩm và đặc biệt trong công nghiệp thực phẩm.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Phụ phẩm gồm vỏ, chồi ngọn của quả dứa thu nhận từ các chợ trên địa bàn quận Tân Phú.

Bromelain thương mại (EC 3.4.22.32) CAS 9001-00-7 (Merck), $\geq 2,0$ mAnsonU/mg (cơ chất hemoglobine, pH 6, nhiệt độ 35,5 °C).

Các hóa chất chính sử dụng bao gồm coomassie brilliant blue G250, albumin, casein, tyrosine, cysteine của Merck (Đức). Trichloroacetic acid, sodium acetate, acid acetic, acid phosphoric của Himedia (Ấn Độ).

Các chất trợ sấy sử dụng gồm skim milk (sữa tách béo) của Merck, maltodextrin DE 10 của Himedia (Ấn Độ), lactose, beta-cyclodextrin của Trung Quốc, whey protein của Mỹ.

Sử dụng các thiết bị như máy đo pH InoLab pH 7110, cân điện tử TE-Sartorius, máy đo OD photoLab 6600 UV-VIS, thiết bị sấy phun Lab plant SD-06AG serial No.487, máy ly tâm HermLe Z206A.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chuẩn bị dung dịch enzyme bromelain cho sấy phun

Phụ phẩm dứa được thu mua mang về phòng thí nghiệm, tiến hành thu nhận enzyme ngay. Tiến hành rửa sạch phụ phẩm phối trộn chồi ngọn và vỏ tỷ lệ 1:4 (w/w). Cân phụ phẩm và bổ sung đệm phosphate pH 7 tỉ lệ 1:1 (w/v), xay nhuyễn bằng máy xay sinh tố trong 10 phút, sau đó lọc bằng vải màn và bông thấm nước, ly tâm ở 3720 RCF (5500 vòng/phút) trong 15 phút. Dịch nổi sau ly tâm được cô đặc bằng cách lọc tiếp tuyến với thiết bị lọc QuixStand System, sử dụng cột lọc cut-off 3 kDa, với tốc độ bơm nhập liệu 85 rpm và điều chỉnh sao cho áp suất trên bề mặt màng không quá 15 psi. Dịch lọc trên màng (đồng retentate) được sử dụng cho phần sấy phun tạo chế phẩm bromelain dạng bột.

2.2.2. Sấy phun thu chế phẩm bromelain

Quá trình sấy phun được khảo sát lần lượt các thông số:

Các chất trợ sấy gồm skim milk (sữa tách béo), maltodextrin, lactose, whey protein, beta-cyclodextrin ở các nồng độ 10 - 30% (w/v), thông số sấy cố định gồm nhiệt độ không khí đầu vào 110 °C, đầu ra 60 °C, tốc độ bơm nhập liệu 6 rpm (216 mL/h), áp suất 3 psi.

Tốc độ bơm nhập liệu 5 - 10 rpm (180 - 360 mL/h), thông số sấy cố định gồm nhiệt độ không khí đầu vào 110 °C, đầu ra 60 °C, áp suất 3 psi, chất trợ sấy lựa chọn theo khảo sát trước.

Khảo sát nhiệt độ không khí sấy đầu vào trong khoảng 100 - 170 °C, thông số cố định gồm nhiệt độ không khí đầu ra 60 °C, áp suất 3 psi, tốc độ nhập liệu và chất trợ sấy được lựa chọn theo các khảo sát trước.

Các khảo sát được đánh giá dựa trên hoạt tính enzyme bromelain chế phẩm (UI/g)

2.2.3. Đánh giá một số tính chất của bromelain chế phẩm

Thông số động học V_{max} và K_m : Pha dung dịch casein với nồng độ tăng dần từ 2,4 – 12 mM, bổ sung dung dịch bromelain có nồng độ 0,1g/20 mL đệm phosphate 7,2, ủ ở 30 °C trong 10 phút. Xác định lượng tyrosine tạo thành theo phương pháp Murachi [6], qua tính đó tính được lượng cơ chất thủy phân và vận tốc phản ứng của enzyme bromelain.

Nhiệt độ và pH hoạt động tốt nhất khảo sát sự thay đổi hoạt tính enzyme bromelain trong khoảng nhiệt độ 30 - 90 °C và khoảng pH 4-10.

Độ bền nhiệt ủ bromelain chế phẩm đã hòa tan trong đệm ở các nhiệt độ từ 30 - 90 °C trong khoảng thời gian 30 phút, 60 phút và 90 phút, xác định hoạt tính tương đối (%).

Bao bì và nhiệt độ bảo quản cân 1g bromelain chế phẩm và bảo quản trong chai thủy tinh, bao polyethylene (PE) và bao nhôm ở các nhiệt độ 0 °C, 10 °C và 30 °C, theo dõi sự thay đổi hoạt tính enzyme trong 20 ngày.

2.2.4. Phương pháp phân tích

- Xác định hàm lượng protein tổng bằng phương pháp Bradford

Dựa vào phản ứng màu của protein với thuốc thử Coomassie (Coomassie Brilliant Blue G-250) và khả năng hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 595 nm. Cường độ màu tỷ lệ với nồng độ protein trong dung dịch. Bovine serum albumin (BSA) được sử dụng xây dựng đường chuẩn có hàm lượng protein từ 10 – 50 mg/mL, dựa vào đường chuẩn protein suy ra hàm lượng protein trong dung dịch mẫu phân tích [7].

- Xác định hoạt tính enzyme theo phương pháp Murachi

Cân 0,1g chế phẩm bromelain vào 10 mL dung dịch đệm photphat 0,03 M pH 7,2. Bổ sung 5mL cơ chất casein 0,6% (w/v) (pha trong cùng loại đệm như trên có bổ sung 0,03 M L-cysteine HCL và 0,006 M EDTA). Phản ứng được thực hiện ở 35 °C trong 10 phút. Ngưng phản ứng bằng cách thêm 5mL TCA 5% giữ trong 30 phút. Lọc bỏ kết tủa thu dịch nổi đo độ hấp thụ ở bước sóng 280 nm. Thí nghiệm kiểm chứng (không có enzyme) ở điều kiện tương tự. Tyrosine được sử dụng làm đường chuẩn có nồng độ 18,1 – 90,5 µg/mL, dựa vào đường chuẩn tyrosine suy ra hàm lượng tyrosine có trong mẫu thủy phân.

Một đơn vị hoạt tính bromelain được định nghĩa là lượng enzyme tác dụng với cơ chất casein giải phóng ra 1 µg tyrosine trong một phút ở pH 7,2 tại 35 °C [6].

$$\text{Hoạt tính tương đối (\%)} = \frac{\text{Hoạt tính enzyme ở điều kiện khảo sát (UI/mL)}}{\text{Hoạt tính enzyme điều kiện chuẩn (UI/mL)}}$$

Xác định độ ẩm theo phương pháp sấy đến khối lượng không đổi sử dụng cân sấy ẩm Ohaus MB 45, dựa trên nguyên tắc bột chế phẩm có khối lượng m_1 sau đó cho vào sấy ở 105 °C đến khối lượng không đổi, xác định khối lượng m_2 . Độ ẩm của bột chế phẩm được tính theo công thức:

$$\% W = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100$$

Trong đó: m_1 : Khối lượng mẫu trước khi sấy; m_2 : khối lượng mẫu sau khi sấy.

- Phương pháp xử lý số liệu tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, thực hiện theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên. Kết quả thu được xử lý bằng phần mềm xử lý thống kê Statgraphics Centurion XVI.I.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Thu nhận chế phẩm enzyme bromelain bằng phương pháp sấy phun

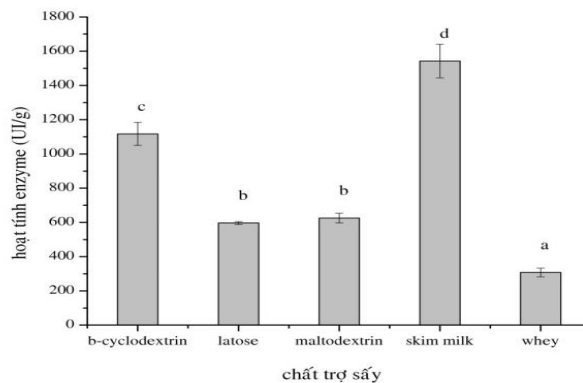
3.1.1. Khảo sát chất trợ sấy trong quá trình sấy phun thu bromelain chế phẩm

Sấy phun là công nghệ tiên tiến tạo nên các sản phẩm dạng bột chất lượng cao, thuận tiện trong quá trình sử dụng và bảo quản. Quá trình sấy phun thời gian sấy ngắn, dễ sản xuất ở quy mô công nghiệp [8], sấy phun cũng là một phương thức bao gói bằng cách bổ sung các

chất trợ sấy tùy thuộc theo mục đích sử dụng [9]. Chất trợ sấy nhằm giảm thiểu ảnh hưởng của nhiệt độ đối với các protein và giảm sự bám dính do sự có mặt của các loại đường phân tử thấp glucose, sucrose và một số acid hữu cơ có trong dịch sữa ảnh hưởng đến sự tạo bột chế phẩm [10] bên cạnh đó chất trợ sấy có vai trò bao gói enzyme, bảo vệ chúng khỏi tác động của nhiệt độ, pH và kéo dài thời gian bảo quản.

Dung dịch bromelain chuẩn bị cho quá trình sấy phun được cô đặc bằng phương pháp lọc tiếp tuyến cut-off 3 kDa có hoạt tính $109,209 \pm 9,239$ UI/mL và hàm lượng protein $0,885 \pm 0,023$ mg/mL.

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của chất trợ sấy tới hoạt tính enzyme bromelain được thể hiện ở Hình 3.1.

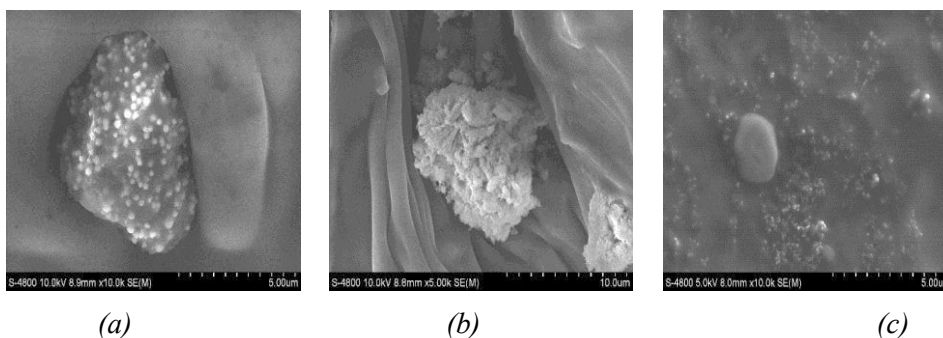


a, b, c là giá trị trung bình cột sự sai khác kí tự có ý nghĩa sai khác về mặt thống kê ($p < 0,05$)

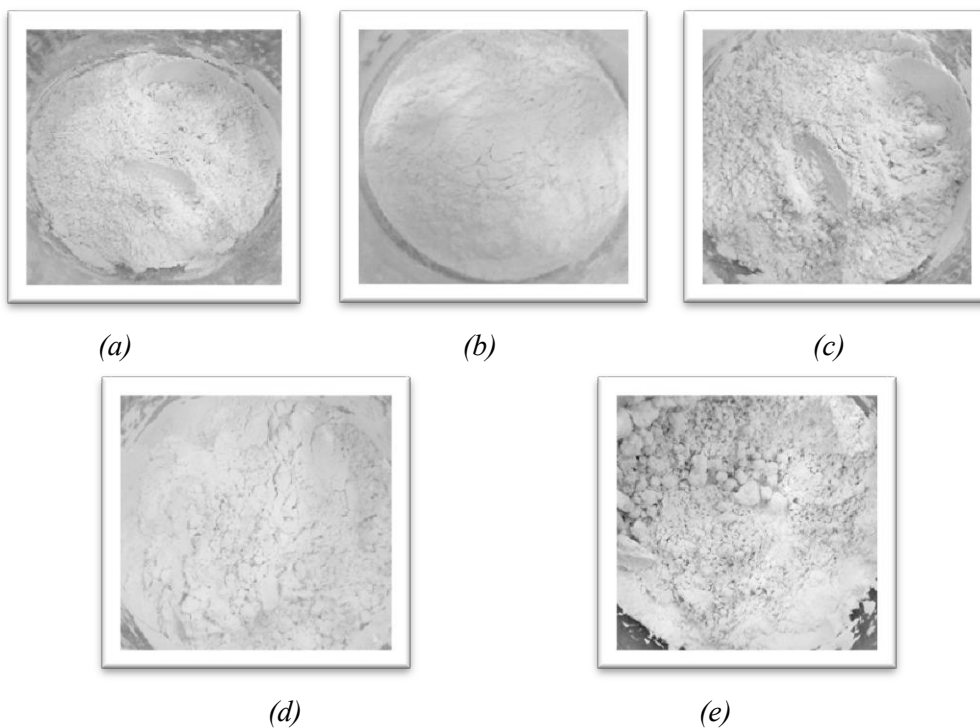
Hình 3.1. Ảnh hưởng của chất trợ sấy đến hoạt tính bromelain chế phẩm

Thí nghiệm trên cho thấy bromelain chế phẩm với chất trợ sấy sữa tách béo cho hoạt tính enzyme cao nhất $1542,550 \pm 98,384$ (UI/g), với chất trợ sấy whey protein cho kết quả hoạt tính thấp nhất $307,636 \pm 25,259$ (UI/g). Bên cạnh đó, bromelain chế phẩm trong nghiên cứu này hướng đến ứng dụng trong công nghệ thực phẩm, đặc biệt là sử dụng trong quy trình làm phomai nên có thể chọn skim milk làm chất trợ sấy phục vụ cho các thí nghiệm tiếp theo. Nghiên cứu của Amid (2015) thực hiện khảo sát chất trợ sấy gồm maltodextrin DE10, lactose, arabic gum, mannitol và sucrose cho thấy arabic gum ức chế hoạt động của bromelain nên chế phẩm sử dụng chất trợ sấy này bị mất hoạt tính nhiều nhất so với ban đầu [11]. Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Văn Thành và ctv (2013) sử dụng mannitol là chất trợ sấy với hiệu suất thu hồi hoạt tính enzyme đạt 40,82% [8]. Theo Zhao (2015) thì các chất như trehalose, lactose, sucrose, mantose, sorbitol, manitol đều có khả năng ổn định tốt hoạt tính enzyme. Tuy nhiên do các hợp chất polyol bảo vệ nói trên đều thuộc nhóm đường phân tử nhỏ (mono- hay disaccharide), dễ bị nóng chảy và bị caramel hóa khi xử lý ở nhiệt độ cao, giá thành cao nên khó ứng dụng vào công nghiệp [12]. Đối với việc bổ sung sữa tách béo làm chất trợ sấy bảo vệ enzyme là một thử nghiệm mới, thông thường sữa tách béo thường dùng bao gói một số nhóm vi khuẩn probiotics hỗ trợ quá trình sấy phun tạo chế phẩm sinh học [13, 14]. Trong nghiên cứu này, nghiệm thức sấy với sữa tách béo cho kết quả hoạt tính chế phẩm tốt nhất có thể giải thích do ngoài tác động bảo vệ của latose trong sữa tách béo thì với sự có mặt của protein sẽ có hiện tượng kết tụ nhờ calcium trong sữa qua quá trình tác động nhiệt tạo lớp bao bảo vệ enzyme [15, 16].

Bột chế phẩm bromelain thu được có cấu trúc hạt thể hiện qua hình chụp SEM (Hình 3.2), độ ẩm lần lượt sữa tách béo 4,80%, maltodextrin 3,99%, whey 4,93%, lactose 4,13%, beta-cyclodextrin 5,73% và độ mịn, màu sắc khác nhau (Hình 3.3).

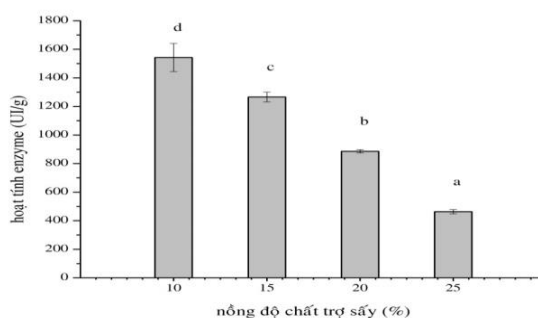


Hình 3.2. Ảnh chụp SEM của chế phẩm bromelain với các chất trợ sấy lần lượt là (a) maltodextrin, (b) lactose, (c) sữa tách béo



Hình 3.3. Chế phẩm bromelain với các chất trợ sấy lần lượt là (a) sữa tách béo, (b) maltodextrin, (c) whey protein, (d) lactose và (e) beta-cyclodextrin

3.1.2. Khảo sát nồng độ chất trợ sấy sữa tách béo trong quá trình sấy phun thu bromelain chế phẩm

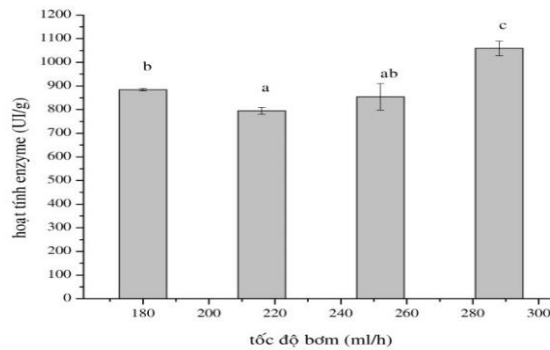


a, b, c, d là giá trị trung bình cột sự sai khác kí tự có ý nghĩa sai khác về mặt thống kê ($p < 0,05$)
 Hình 3.4. Ảnh hưởng của nồng độ chất trợ sấy sữa tách béo đến hoạt tính bromelain chế phẩm

Từ kết quả trên nhận thấy hoạt tính enzyme bromelain giảm dần khi tăng nồng độ chất trợ sấy từ 10 - 25% (w/v), riêng đối với nồng độ 30% không thể thực hiện quá trình sấy phun do dịch sấy có nồng độ chất tan và độ nhớt lớn vượt mức làm việc của thiết bị sấy phun. Có thể do khi nồng độ chất trợ sấy càng tăng, lượng enzyme trong 1 g chế phẩm càng giảm vì vậy hoạt tính enzyme trong 1 g giảm. Bên cạnh đó, việc tăng nồng độ chất trợ sấy gây hao phí nguyên liệu và không làm tăng hiệu quả quá trình sấy (được đánh giá bằng hoạt tính chế phẩm thu được). Do đó, chọn nồng độ chất trợ 10% (w/v) cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.1.3. Khảo sát tốc độ bơm nhập liệu đến quá trình sấy phun

Trong thí nghiệm này, hoạt tính chế phẩm thu được tăng dần khi tốc độ bơm nhập liệu tăng từ 180 - 288 mL/h (Hình 3.5), hoạt tính cao nhất khi sấy chế phẩm với tốc độ bơm nhập liệu 288 mL/h (8 rpm). Ở tốc độ bơm nhập liệu thấp, thời gian enzyme tiếp xúc với nhiệt độ sấy dài làm protein dễ bị biến tính, với tốc độ 288 mL/h thời gian tiếp xúc của enzyme với nhiệt độ trong buồng sấy vừa đủ làm khô và tạo hạt đồng thời sự biến tính protein xảy ra ở mức độ thấp nhất, ở các tốc độ bơm 324 và 360 mL/h thời gian dịch enzyme lưu trong buồng sấy quá ngắn dẫn đến chế phẩm thu được có độ ẩm cao, dính lại trong thành buồng sấy nhiều, khó thu hồi chế phẩm tạo ra ở dạng bột ướt nên khó sử dụng và bảo quản.



^{abc} là giá trị trung bình cột sự sai khác kí tự có ý nghĩa sai khác về mặt thống kê ($p < 0,05$)

Hình 3.5. Ảnh hưởng của tốc độ bơm nhập liệu đến hoạt tính bromelain chế phẩm

Tốc độ bơm nhập liệu có ảnh hưởng lớn đến lưu lượng dòng nhập liệu, năng suất thiết bị và cả nhiệt độ không khí đầu ra. Tốc độ bơm nhập liệu tăng đồng nghĩa với thời gian lưu của vật liệu sấy trong buồng sấy giảm, lượng hơi nước thoát ra từ dịch enzyme ít hơn làm độ ẩm tăng, phần hạt ẩm dính lại trong buồng sấy tăng dẫn đến hiệu suất thu hồi sản phẩm sau quá trình sấy phun giảm. Đã có nhiều nghiên cứu về sự ảnh hưởng của tốc độ bơm nhập liệu đến chất lượng sản phẩm tạo ra như nghiên cứu của Devakate *et al* (2009) thực hiện sấy phun tạo chế phẩm bromelain với tốc độ bơm nhập liệu 215 mL/h [17]. Nghiên cứu của Nguyễn Thị Hồng Minh (2011) cho thấy tốc độ 20 - 40 mL/phút thích hợp cho quá trình sấy phun dịch cà chua [18].

3.1.4. Khảo sát nhiệt độ không khí sấy trong quá trình sấy phun

Từ kết quả Bảng 3.1 cho thấy bromelain chế phẩm đạt hoạt tính cao nhất khi sấy ở nhiệt độ 110 °C (1542,550 UI/g) và hoạt tính thấp nhất khi sấy ở nhiệt độ 170 °C (1132,270 UI/g).

Theo Devakate *et al* (2009) khi nhiệt độ không khí sấy tăng, enzyme tiếp xúc với nhiệt độ cao sẽ bị biến tính, do đó sấy ở nhiệt độ thấp cho chế phẩm có hoạt tính cao hơn [17]. Bên cạnh đó, trong thí nghiệm này, độ ẩm của chế phẩm sấy thay đổi từ 6,30 đến 2,81%, nhiệt độ sấy cao, độ ẩm của bột enzyme giảm, tuy nhiên ở đây độ ẩm trong các quá trình sấy giảm không theo quy luật, có thể do thiết bị sấy phun hoạt động không ổn định. Nhiệt độ không khí sấy ảnh hưởng đến quá trình nước bốc hơi khỏi dung dịch, khi tốc độ nhập liệu không

thay đổi, càng tăng nhiệt độ sấy thì lượng nước bốc hơi khỏi dung dịch tăng, độ ẩm chế phẩm càng giảm [19].

Bảng 3.1: Ảnh hưởng của nhiệt độ không khí sấy tới quá trình sấy phun thu bromelain chế phẩm

| Nhiệt độ | Độ ẩm (%) | Hoạt tính (UI/g) | Hàm lượng protein | Hoạt tính riêng |
|----------|---------------------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 100 °C | 6,63±0,050 ^g | 1239,850±35,380 ^{ab} | 45,956±3,595 ^b | 27,132±2,939 ^b |
| 110 °C | 6,370±0,106 ^f | 1542,550±98,384 ^c | 15,763±0,437 ^a | 97,840±5,152 ^c |
| 120 °C | 6,010±0,036 ^e | 1286,060±81,986 ^{bc} | 49,872±0,505 ^b | 25,794±1,799 ^b |
| 130 °C | 5,693±0,068 ^d | 1189,090±19,813 ^{ab} | 46,702±3,871 ^b | 25,606±2,637 ^b |
| 140 °C | 5,473±0,104 ^{bc} | 1430,760±101,036 ^{dc} | 48,492±2,823 ^b | 29,562±2,602 ^b |
| 150 °C | 5,530±0,050 ^{cd} | 1389,850±82,081 ^{cd} | 47,709±0,845 ^b | 28,986±1,323 ^b |
| 160 °C | 5,330±0,160 ^b | 1375,450±32,221 ^{cd} | 67,774±1,168 ^b | 28,853±1,398 ^b |
| 170 °C | 2,813±0,185 ^a | 1132,270±53,252 ^a | 77,633±0,786 ^c | 16,709±0,839 ^a |

a, b, c, d, e, f là giá trị trung bình cột sự sai khác kí tự có ý nghĩa sai khác về mặt thống kê (p < 0,05)

3.2. Đánh giá sơ bộ hiệu quả quá trình tạo chế phẩm bromelain

Qua các công đoạn tách chiết, tạo chế phẩm bột bromelain, số lượng và hoạt tính enzyme được ghi nhận số liệu và thể hiện ở Bảng 3.2.

Bảng 3.2. Hiệu quả của quá trình tạo chế phẩm bromelain

| Các công đoạn | Số lượng | Hoạt tính enzyme (UI/mL) hoặc (UI/g) | Tổng hoạt tính (UI) | Hiệu suất thu hồi hoạt tính (%) |
|-------------------------------|----------|--------------------------------------|---------------------|---------------------------------|
| Phụ phẩm | 3 (kg) | | | |
| Dịch chiết thô | 3 (lit) | 77,399±4,457 | 232197 | 100 |
| Dịch sau lọc (màng lọc 3 kDa) | 1 (lit) | 109,209±9,239 | 109209 | 47,03 |
| Chế phẩm bromelain | 74 (g) | 1542,550±98,384 | 114148,7 | 49,16 |

Theo thực nghiệm, cứ khoảng 3 kg phụ phẩm thu được 1lit dịch dứa cô đặc, sau quá trình sấy phun ở nhiệt độ đầu vào 110 °C khoảng 3,47 h tạo được 74 g chế phẩm bromelain, có màu trắng ngả vàng nhạt (Hình 3.3a), độ ẩm 4,8%, hiệu suất thu hồi hoạt tính đạt 49,16%, hoạt tính riêng của bromelain đạt 1542,550 UI/g. Theo nghiên cứu của Nguyễn Văn Thành và ctv (2013) thu nhận enzyme bromelain từ chồi ngọn trái khóm sử dụng phương pháp sấy chân trong 9 h ở 35 °C cho thu nhận được bột bromelain có màu trắng, độ ẩm thấp hơn 8%, hiệu suất thu hồi hoạt tính enzyme 74,74%, hoạt tính riêng đạt 10,07 (U/mg), sấy đông khô trong 15 h hoạt tính enzyme duy trì được 85,73% so với ban đầu và hoạt tính riêng đạt 11,96 U/mg [4], Devakate *et al.* (2009) so sánh hiệu quả của phương pháp sấy sau khi tinh sạch bromelain, kết quả hoạt tính bromelain với sấy phun giữ được 78,2% và sấy đông khô giữ được 95% [17]. So với các kết quả nghiên cứu này chế phẩm bromelain thu nhận được có hoạt tính riêng và hiệu suất thu hồi hoạt tính thấp hơn, nguyên nhân thứ nhất do nguồn thu nhận từ phụ phẩm được sử dụng có tỷ lệ chồi ngọn chỉ chiếm 20%. Nguyên nhân thứ 2 là phương pháp sấy sử dụng, với sấy đông khô và sấy chân không có nhiệt độ sấy thấp hơn so với sấy phun, cơ chế tách nước nguyên liệu sấy cũng giúp cho việc giữ hoạt tính

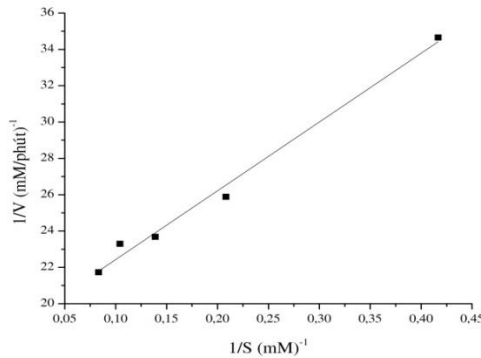
của enzyme tốt hơn. Nhưng chi phí năng lượng và thời gian nhiều hơn sẽ hạn chế ứng dụng trong quy mô công nghiệp [17].

Hoạt tính enzyme của chế phẩm là 1542,550 UI/g, so với chế phẩm thương mại được tách chiết từ thân có hoạt tính 5660,000 UI/g thì thấp hơn khoảng 3,67 lần, nhưng tính về giá trị kinh tế thì sản phẩm thương mại có giá 40.000 đồng/1g, chế phẩm bromelain tạo ra giá chỉ khoảng 7.700 đồng/1g (đánh giá ở quy mô phòng thí nghiệm). Vì vậy việc tận dụng nguồn phụ phẩm thu nhận enzyme vừa giải quyết được nguồn chất thải của quá trình chế biến dứa vừa tăng thêm giá trị kinh tế cho cây dứa.

3.3. Đánh giá một số tính chất của bromelain chế phẩm

3.3.1. Xác định thông số động học của bromelain chế phẩm

Dựa vào đồ thị tương quan giữa vận tốc thủy phân của enzyme và nồng độ cơ chất xây dựng được phương trình Lineweaver – Burk có dạng $y = 37,858x + 18,641$, từ đó tính được giá trị $V_{\max} = 0,054$ mM/phút và $K_m = 2,031$ mM.



Hình 3.6. Mối tương quan giữa 1/S và 1/V

Hằng số K_m đặc trưng cho ái lực của enzyme với cơ chất, K_m có trị số càng nhỏ thì ái lực của enzyme với cơ chất càng lớn, nghĩa là vận tốc của phản ứng do enzyme xúc tác càng lớn. Ý nghĩa thực tiễn của hằng số Michaelis ở chỗ nó chính là giá trị của nồng độ cơ chất khi tốc độ phản ứng bằng 1/2 tốc độ tối đa. Hằng số Michaelis là một hằng số rất quan trọng. Nó xác định ái lực của enzyme với cơ chất. K_m càng nhỏ thì ái lực này càng lớn, tốc độ phản ứng càng cao vì tốc độ tối đa V đạt ở giá trị nồng độ cơ chất càng thấp [20].

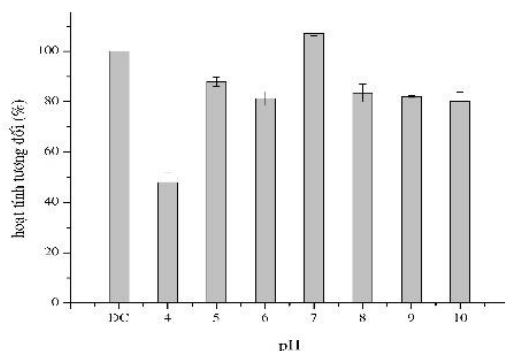
Nghiên cứu của Choi *et al* (1992) thực hiện thu nhận và tinh sạch bromelain trên giống dứa ở Hàn Quốc đã xác định hằng số K_m của bromelain trên cơ chất casein là $5,747 \times 10^{-4}$ và V_{\max} 131,58 μ g/phút [21]. Nghiên cứu của Hung *et al* (2002) hằng số K_m của chế phẩm bromelain thương mại từ thân dứa đối với thực hiện thủy phân chitosan đạt 0,88 mg/mL tối ưu ở 50 °C và pH 3 [22]. Nghiên cứu của Corzo (2012) thực hiện khảo sát thông số động học của dịch bromelain thô từ trái dứa trên một số cơ chất như azocasein, azoalbumin, casein, sodium caseinate và haemoglobin cho kết quả hằng số K_m đối với casein 0,138 mM, azoalbumin 0,026 mM, azocasein 0,037 mM, sodium caseinate 0,088 mM và haemoglobin 0,165 mM, cơ chất phù hợp với bromelain thu từ nghiên cứu này là azocasein [23].

3.3.2. Ảnh hưởng của pH đến hoạt động của bromelain chế phẩm

pH môi trường phản ứng ảnh hưởng lớn đến hoạt động xúc tác của enzyme vì nó ảnh hưởng đến mức độ ion hóa cơ chất, mức độ ion hóa enzyme, do đó ảnh hưởng đến sự tạo phức hợp enzyme-cơ chất. Ngoài ra, pH còn ảnh hưởng đến độ bền phân tử protein-enzyme.

Dựa vào kết quả Hình 3.7, hoạt tính bromelain chế phẩm đạt cao nhất khi hoạt động ở điều kiện pH 7 giữ hoạt tính tương đối được 106,978% và thấp nhất khi hoạt động ở pH 4 hoạt tính tương đối chỉ còn 47,989% so với điều kiện chuẩn.

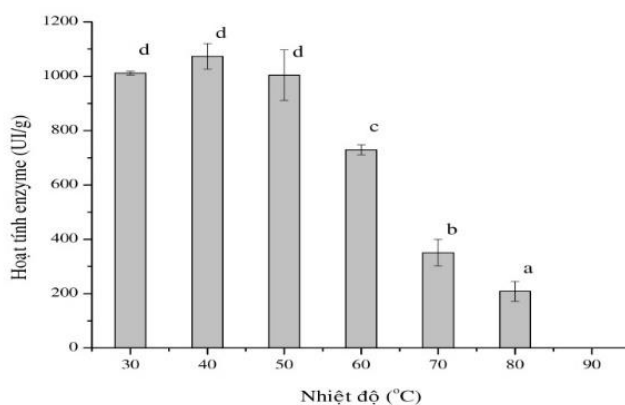
So sánh với một số nghiên cứu đã thực hiện như nghiên cứu của Martins *et al* (2014) khảo sát pH tối ưu của dịch bromelain thô và bromelain thu được từ phương pháp kết tủa bằng ethanol cho thấy ở dịch thô pH tối ưu là pH 7 và sau tủa ethanol là pH 8 [24]. Nghiên cứu của Lại Thị Ngọc Hà (2009) thực hiện thu bromelain từ chồi ngọn dứa cho thấy khoảng hoạt động của bromelain là 5,5 - 6,5 trong đó pH tối ưu là 6,5 [25].



Hình 3.7. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính tương đối của bromelain chế phẩm

3.3.3. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt động của bromelain chế phẩm

Dựa vào Hình 3.8, kết quả thu được chế phẩm hoạt động tốt nhất trong khoảng nhiệt độ 30-50 °C, từ 60-90 °C hoạt tính chế phẩm giảm dần theo nhiệt độ. So sánh với một số nghiên cứu như nghiên cứu của Lại Thị Ngọc Hà (2009) cho thấy enzyme bromelain thu từ chồi ngọn dứa có nhiệt độ hoạt động tối ưu là 55 °C [25]. Nghiên cứu của Ketnawa *et al* (2012) thực hiện trên hai giống dứa *Nang Lae* và *Phu Lae* cho thấy nhiệt độ hoạt động tối ưu của bromelain trong khoảng 50 - 60 °C [26]. Nghiên cứu của Amid (2015) thực hiện trên bromelain tái tổ hợp cho thấy hoạt tính enzyme cao nhất ở 45 °C và mất hoạt tính hoàn toàn ở 65 °C [11].

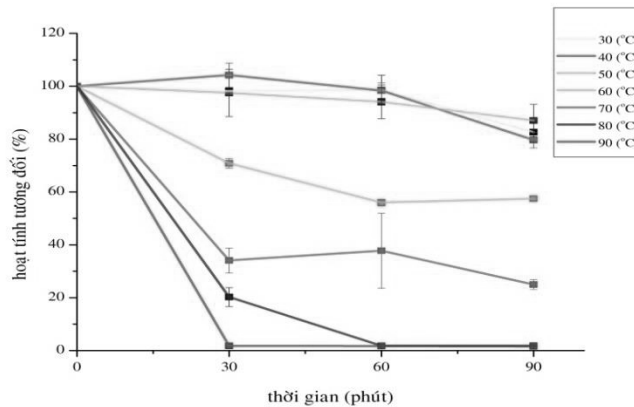


^{a, b, c} là giá trị trung bình cột sự sai khác kí tự có ý nghĩa sai khác về mặt thống kê ($p < 0,05$)

Hình 3.8. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính bromelain chế phẩm

3.3.4. Khảo sát độ bền nhiệt của chế phẩm enzyme bromelain

Kết quả Hình 3.9 cho thấy ở khoảng nhiệt độ 30 - 50 °C sau thời gian 30 và 60 phút, hoạt tính enzyme thay đổi không đáng kể so với ban đầu, sau 90 phút hoạt tính enzyme giảm nhưng không quá 30% so với ban đầu. Với khoảng nhiệt độ 60-90 °C, sau 30 phút, hoạt tính enzyme bắt đầu giảm và sau 90 phút đã giảm hơn 50% so với hoạt tính ban đầu. Ở nhiệt độ 90 °C, enzyme bị biến tính và mất hoạt tính hoàn toàn.

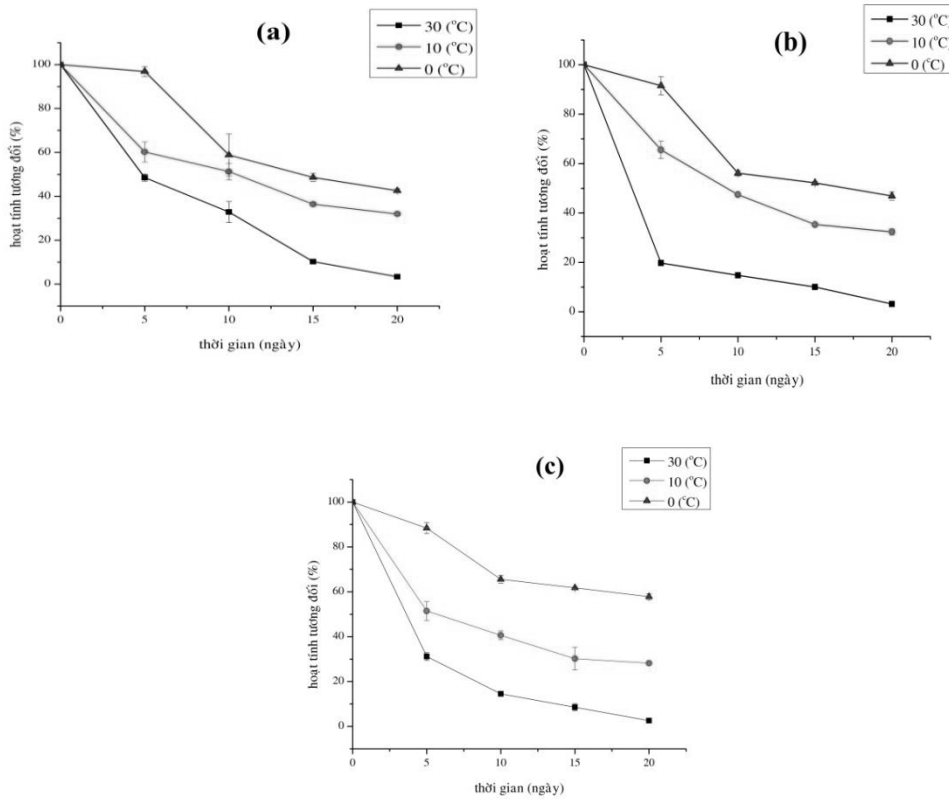


Hình 3.9. Sự thay đổi hoạt tính còn lại (%) của bromelain chế phẩm ở các nhiệt độ khác nhau theo thời gian

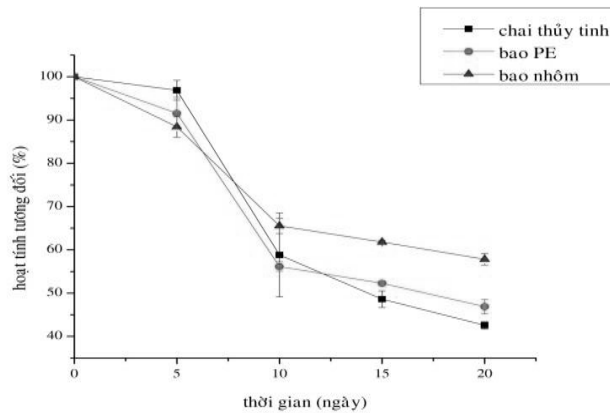
Một số nghiên cứu khảo sát độ bền nhiệt của bromelain có thể kể đến như nghiên cứu của Jutamongkon và Charoenrein (2010) khảo sát bền nhiệt đối với dịch bromelain thô từ quả dứa với khoảng nhiệt độ 40 - 80 °C trong 60 phút cho kết quả ở bromelain bảo toàn hoạt tính ở 40 °C trong 60 phút, ở 50 °C hoạt tính còn 83% so với ban đầu và ở 80 °C hoạt tính enzyme bị mất hoàn toàn sau 8 phút [27]. Nghiên cứu của Lại Thị Ngọc Hà (2009) cho rằng bromelain là enzyme không chịu nhiệt và mức giảm hoạt tính phụ thuộc vào nhiệt tồn trữ khi bromelain được ủ ở các nhiệt độ 30 °C, 40 °C và 50 °C trong 72 giờ.

3.3.5. Ảnh hưởng của điều kiện bảo quản đến sự biến đổi hoạt tính của chế phẩm bromelain

Dựa vào kết quả thể hiện ở Hình 3.10 cho thấy khi bảo quản bromelain chế phẩm trong chai thủy tinh, bao PE và bao nhôm hoạt tính enzyme đều giảm dần theo thời gian bảo quản. Khi bảo quản ở nhiệt độ 30 °C, hoạt tính tương đối bromelain chế phẩm giảm mạnh, sau 5 ngày hoạt tính đã giảm hơn 50% và đến ngày 20 hoạt tính tương đối enzyme chỉ còn dưới 5% so với ban đầu. Đối với bromelain chế phẩm bảo quản ở 4 °C hoạt tính tương đối của chế phẩm giảm dần nhưng với mức độ giảm thấp hơn so với bảo quản ở 30 °C, đến ngày 20 hoạt tính tương đối chỉ còn khoảng 30% so với ban đầu. Đối với nhiệt độ 0 °C sau 5 ngày hoạt tính tương đối enzyme còn khoảng 90% so với ban đầu nhưng qua ngày 10 hoạt tính bắt đầu giảm mạnh và sau ngày 20 hoạt tính tương đối chỉ còn 50% so với ban đầu.



Hình 3.10. Sự thay đổi hoạt tính tương đối (%) theo thời gian của bromelain chế phẩm bảo quản trong chai thủy tinh (a), bao PE (b) và bao nhôm (c)



Hình 3.11. Sự thay đổi hoạt tính tương đối (%) của bromelain chế phẩm bảo quản ở 0 °C trong chai thủy tinh, bao PE và bao nhôm

Kết quả Hình 3.11 cho thấy khi bảo quản bromelain chế phẩm trong chai thủy tinh sau 5 ngày hoạt tính tương đối không thay đổi nhiều nhưng sau ngày 10 hoạt tính bắt đầu giảm mạnh chỉ còn $58,813 \pm 9,6635\%$ so với ban đầu, đối với bromelain chế phẩm bảo quản trong bao PE sau 5 ngày hoạt tính tương đối giảm còn $91,538 \pm 3,670\%$ so với ban đầu nhưng sau ngày 10 hoạt tính bắt đầu giảm mạnh chỉ còn $56,135 \pm 1,065\%$ so với ban đầu, đối với bromelain chế phẩm bảo quản trong bao nhôm, hoạt tính enzyme có phần ổn định hơn, sau

ngày 20 hoạt tính còn $57,818 \pm 1,301\%$ so với ban đầu. Do đó, bromelain chế phẩm bảo quản trong bao nhôm ở $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ là thích hợp nhất.

Một số nghiên cứu về bảo quản enzyme bromelain có thể kể đến như nghiên cứu của Nguyễn Văn Thành (2013) về ảnh hưởng của điều kiện bảo quản đến sự biến đổi chất lượng enzyme bromelain thô cho thấy rằng khi bảo quản ở $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hoạt tính enzyme ít thay đổi và bảo quản bromelain trong chai thủy tinh tốt hơn so với bao PE. Nghiên cứu của Devakate *et al* (2009) thực hiện bảo quản chế phẩm bromelain sau sấy thăng hoa ở các nhiệt độ 4 ; 30 và $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ và nhận thấy hoạt tính enzyme bị mất 4% , 50% và 90% tương ứng với các nhiệt độ trên sau 4 ngày bảo quản. Nghiên cứu của Azura 2012 thực hiện so sánh hoạt tính chế phẩm enzyme bromelain tái tổ hợp (thu được bằng phương pháp sấy đông khô) và chế phẩm bromelain thương mại [28].

4. KẾT LUẬN

Như vậy, ở điều kiện sấy phun có nhiệt độ không khí đầu vào $110\text{ }^{\circ}\text{C}$, nhiệt độ không khí đầu ra $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, tốc độ bơm nhập liệu 288 mL/h (8 rpm) cho chế phẩm bromelain thu được có hoạt tính cao nhất là $1542,550 \pm 98,384\text{ UI/g}$. Khi sử dụng sản phẩm enzyme, độ bền hoạt tính enzyme là rất quan trọng. Tuy nhiên trong nghiên cứu này chế phẩm enzyme giảm 50% hoạt tính sau 20 ngày bảo quản, hiệu suất thu hồi hoạt tính enzyme còn thấp đạt $49,16\%$. Do đó, các nghiên cứu sâu hơn về quá trình sấy, vật liệu bảo quản, chất bảo quản nhằm tăng hiệu suất thu hồi, giữ hoạt tính enzyme trong thời gian dài để tăng giá trị kinh tế, đạt hiệu quả trong các lĩnh vực ứng dụng khác nhau.

LỜI CẢM ƠN

Trân trọng cảm ơn trường ĐH Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM đã hỗ trợ kinh phí giúp chúng tôi hoàn thành nghiên cứu này.

Chân thành cảm ơn Khoa Công nghệ Sinh học và Kỹ thuật Môi trường, TT Công nghệ Việt Đức, TT Thí nghiệm Thực hành và Thầy Trần Quốc Tuấn - Bộ môn Sinh hóa trường ĐH Khoa học Tự nhiên đã giúp đỡ chúng tôi hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Vibhuti B. R., Lakshminarasimaiah N., Ghosh B. - Extraction of bromelain from pineapple waste, International Journal of Scientific & Engineering Research **5** (6) (2014) 763-766.
2. Ketnawa S., Chaiwut, P., Rawdkuen, S. - Extraction of bromelain from pineapple peels, Food Science and Technology International **17** (4) (2011) 395-402.
3. V. Đức - Định hướng phát triển cây dứa Việt Nam, 2013, <http://cand.com.vn/Kinh-te/Dinh-huong-phat-trien-cay-dua-Viet-Nam-231310/>.
4. Nguyễn Văn Thành, Nguyễn Minh Thủy, Dương Thị Diễm Trang - Tận dụng phế phẩm khóm Cầu Đúc (Hậu Giang) cho quá trình trích ly enzyme bromelain, Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ **26** (2013) 162-170.
5. Saran C. R, Umesh H. H. - Extraction of bromelain from pineapple core and purification by RME and precipitation methods, Separation and Purification Technology **111** (2013) 190-197.

6. Murachi T. - Bromelain enzymes, *Methods Enzymol* **19** (1970) 273-284.
7. Bradford M. M. - A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry* **72** (1976) 248-254.
8. Nguyễn Minh Thủy, Nguyễn Văn Thành, Lê Hà Ny và Lê Trung Hiếu - Trích ly enzyme Bromelain từ phế phẩm khóm Cầu Đúc-Hậu Giang, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ* **28** (2013) 21-27.
9. Kashappa Goud H. Desai, Jin Park Hyun. - Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients, *Drying Technology* **23** (7) (2005) 1361-1394.
10. Cabral A. C. S., Said S., Oliveira W. P. - Retention of the enzymatic activity and product properties during spray drying of pineapple stem extract in presence of maltodextrin, *International Journal of Food Properties* **12** (3) (2009) 536-548.
11. Amid Azura. - Recombinant enzymes-from basic science to commercialization, Springer, 2015.
12. Zhao G., Zhang G. - Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying, *Journal of Applied Microbiology* **99** (2) (2005) 333-338.
13. Maciel G. M., Chaves K. S., Grosso C. R., Gigante M. L. - Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-5 by spray-drying using sweet whey and skim milk as encapsulating materials, *Journal of Dairy Science* **97** (4) (2014) 1991-1998.
14. Ananta E., Volkert M., Knorr D. - Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG, *International Dairy Journal* **15** (4) (2005) 399-409.
15. Song Huang, Yang Yi, Fu Nan, *et al.* - Calcium-aggregated milk: a potential new option for improving the viability of lactic acid bacteria under heat stress, *Food and Bioprocess Technology* **7** (11) (2014) 3147-3155.
16. Xufeng Zheng, Fu Nan, Huang Song, *et al.* - Exploring the protective effects of calcium-containing carrier against drying-induced cellular injuries of probiotics using single droplet drying technique, *Food Research International* **90** (2016) 226-234.
17. Devakate R. V., Patil V. V., Waje S. S., *et al.* - Purification and drying of bromelain, *Separation and Purification Technology* **64** (3) (2009) 259-264.
18. Nguyễn Thị Thùy Ninh, Nguyễn Thị Hồng Minh - Tối ưu hóa quá trình sấy phun dịch cà chua, *Tạp chí Khoa học và Phát triển* **9** (6) (2011) 1014 - 1020.
19. Dorota Witrowa-Rajchert Katarzyna Samborska, Andre Gonçalves. - Spray-drying of α -Amylase—The effect of process variables on the enzyme inactivation, *Drying Technology: An International Journal* **23** (4) (2005) 941-953.
20. Đặng Thị Thu, Lê Ngọc Tú, Tô Kim Anh, Phạm Xuân Thủy, Nguyễn Xuân Sâm - Công nghệ Enzyme, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 2012.
21. Cheong Choi, Son Gyu-Mok, Cho Young-Je, *et al.* - Purification and characteristics of bromelain from Korean pineapple, *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* **35** (1) (1992) 23-29.
22. Hung Tung-Hsin, Chang Ya-Min, Sung Hsien-Yi, *et al.* - Purification and characterization of hydrolase with chitinase and chitosanase activity from

- commercial stem bromelain, Journal of Agricultural and Food Chemistry **50** (16) (2002) 4666-4673.
23. Corzo C. A., Waliszewski, K. N., Welti-Chanes J. - Pineapple fruit bromelain affinity to different protein substrates, Food Chemistry **133** (3) (2012) 631-635.
 24. Martins C. Bianca, Rescolino Robson, Coelho Diego F., *et al.* - Characterization of bromelain from Ananas comosus agroindustrial residues purified by ethanol factional precipitation, Chemical Engineering Transactions **37** (2014) 781-786.
 25. Lại Thị Ngọc Hà - Nghiên cứu tách và tạo chế phẩm bromelain từ phế phẩm dứa, Tạp chí Khoa học và Phát triển **7** (2009) 203-211.
 26. Sunantha Ketnawa, Chaiwut Phanuphong, Rawdkuen Saroot. - Pineapple wastes: A potential source for bromelain extraction, Food and Bioproducts Processing **90** (3) (2012) 385-391.
 27. Rungtip Jutamongkon, Charoenrein Sanguansri. - Effect of temperature on the stability of fruit bromelain from smooth cayenne pineapple, Kasetsart Journal, Natural Sciences **44** (5) (2010) 943-948.
 28. Azura A., Nurul A. I. - Differential scanning calorimetry as tool in observing thermal and storage stability of recombinant bromelain, International Food Research Journal **19** (2) (2012) 727-731.

ABSTRACT

STUDY ON PRODUCTION OF BROMELAIN POWDER FROM PINEAPPLE WASTES

Dao Thi My Linh*, Nguyen Thi Quynh Mai,
Do Thi Hoang Tuyen, Nguyen Thi Nhu Phuong
Ho Chi Minh City University of Food Industry
*Email: linhdtm@cntp.edu.vn

This study was conducted to produce bromelain powders from pineapple wastes by spray drying. The results showed that the suitable carrier agent was skim milk at a concentration of 10% (w/v). To obtain the highest activity of bromelain enzyme, the drying process was carried out at inlet air temperature of 110 °C, outlet air temperature of 60 °C, feed flow rate of 288 mL/h (8 rpm). The obtained bromelain powder had activity of $1542,550 \pm 98,384$ (UI/g), dynamic parameters $K_m = 2,031$ mM and $V_{max} = 0,054$ mM/min with casein substrate, hydrolysis activity at pH 7 and 40 °C. Bromelain powder was stored at 0 °C in aluminum bags and can be kept 50% activity after 20 days.

Keywords: Enzyme, bromelain, membrane processing, pineapple wastes, spray drying.