



ỨNG DỤNG CHẾ PHẨM BROMELAIN THU NHẬN TỪ PHỤ PHẨM DỨA VÀO QUÁ TRÌNH ĐÔNG TỤ SỮA TẠO PHÔ MAI PROBIOTIC HƯƠNG LÁ DỨA

Nguyễn Thị Quỳnh Mai, Nguyễn Thị Ý Nhi*, Nguyễn Thị Mộng Tuyền, Đào Thị Mỹ Linh và Đỗ Thị Hiền

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm thành phố Hồ Chí Minh

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Thị Ý Nhi (nhinty1995@gmail.com)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 14/07/2017

Ngày nhận bài sửa: 20/10/2017

Ngày duyệt đăng: 27/02/2018

Title:

Application of bromelain enzyme obtained from pineapple waste in milk clotting process to produce Pandanus probiotic cheese

Từ khóa:

Đông tụ sữa, enzyme bromelain, phô mai probiotic hương lá dứa

Keywords:

Bromelain, milk clotting, Pandanus probiotic cheese

ABSTRACT

This study is aimed to use bromelain enzyme obtained from pineapple waste in milk clotting process to produce pandanus probiotic cheese. The results showed that suitable bromelain's concentration to clot milk is 0.025 g/mL at 70°C, 30 minutes; calcium chloride concentration is 0.25 g/L, padanus extract is 3 mL/35g clotting milk. Adding *Lactobacillus casei* with density of 10⁹ CFU/mL, 0.5% (v/v) were observed to be effective in maintaining probiotic concentration after 14 day storage. The yield of clotting process is 16.2%. The moisture, protein and lipid content of Pandanus probiotic cheese is 56.2% (w/w); 6.2% (w/w) and 25.2% (w/w), respectively. The probiotic cheese with proper fat content and novel flavour may contribute to the diversity of cheese market.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành với mục đích sử dụng chế phẩm bromelain thu nhận từ phụ phẩm dứa vào quá trình đông tụ sữa tạo phô mai probiotic hương lá dứa. Kết quả nghiên cứu cho thấy nồng độ chế phẩm bromelain thích hợp thực hiện quá trình đông tụ sữa là 0,025 g/mL ở điều kiện nhiệt độ 70°C trong thời gian 30 phút có bổ sung 0,25 g/L calcium chloride, dịch chiết lá dứa 3 mL/35 g sữa đông tụ. Bổ sung *Lactobacillus casei* có mật số 10⁹ CFU/mL với tỉ lệ 0,5% (v/v) cho kết quả khả quan trong việc duy trì mật số vi khuẩn *L. casei* theo thời gian bảo quản 14 ngày. Phô mai probiotic hương lá dứa có hiệu suất tạo phô mai được xác định là 16,2%, độ ẩm 56,2%, hàm lượng protein 6,2% (w/w), hàm lượng lipid 25,2% (w/w), được xếp loại phô mai có hàm lượng béo trung bình, tạo hương vị mới, góp phần đa dạng hóa sản phẩm phô mai.

Trích dẫn: Nguyễn Thị Quỳnh Mai, Nguyễn Thị Ý Nhi, Nguyễn Thị Mộng Tuyền, Đào Thị Mỹ Linh và Đỗ Thị Hiền, 2018. Ứng dụng chế phẩm bromelain thu nhận từ phụ phẩm dứa vào quá trình đông tụ sữa tạo phô mai probiotic hương lá dứa. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(1B): 20-27.

1 GIỚI THIỆU

Phô mai (cheese) là một thực phẩm giàu giá trị dinh dưỡng phù hợp với nhiều lứa tuổi, được nhiều người sử dụng và đang được sản xuất nhiều trên toàn thế giới. Trong công nghiệp sản xuất phô mai, quá trình đông tụ casein trong sữa bằng protease có

vai trò quan trọng. Ba loại protease thường được sử dụng là enzyme rennet có nguồn gốc từ động vật, protease từ vi sinh vật và chymosin biến đổi gen (Kumari *et al.*, 2012). Tuy nhiên, các tác nhân đông tụ sữa này không đủ để đáp ứng với nhu cầu sản xuất phô mai ngày càng tăng và bị hạn chế do gặp phải những vấn đề về sử dụng sản phẩm biến

đôi gen. Những năm gần đây, nhiều nghiên cứu đã quan tâm đến việc tìm kiếm một protease có nguồn gốc từ thực vật có thể thay thế ứng dụng trong quá trình đông tụ sữa tạo sản phẩm phô mai (Egito *et al.*, 2007; Bruno *et al.*, 2010; Kumari *et al.*, 2012; Mazorra-Manzano *et al.*, 2013; Nasr *et al.*, 2016).

Bromelain là protease thực vật được thu nhận từ dứa và sử dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm với nhiều mục đích khác nhau như làm mềm thịt, thủy phân gan bò, đông tụ sữa,... (Bruno *et al.*, 2010; Đặng Thị Thu và *ctv.*, 2012). Đối với nước ta, nguồn enzyme từ thực vật có triển vọng lớn vì nguồn nguyên liệu rất phong phú (dứa, đu đủ,...). Đặc biệt, trong quá trình chế biến dứa đóng hộp chỉ sử dụng khoảng 40÷50% thịt quả dứa, phần phụ phẩm còn lại chiếm một tỷ lệ lớn của lượng dứa nguyên liệu đưa vào chế biến khoảng 50÷60% (Ketnawa *et al.*, 2012). Nếu tận dụng được nguồn phế phẩm này thì vừa có thể giảm thiểu chất hữu cơ gây ô nhiễm môi trường vừa có thể thu được enzyme bromelain ứng dụng trong quá trình đông tụ sữa tạo phô mai.

Trong những năm qua, nhiều nghiên cứu cho thấy sự thành công trong việc bổ sung và duy trì mật số probiotic mà hạn chế thay đổi tính chất của sản phẩm thực phẩm (Buriti *et al.*, 2005). Phô mai được cho là một chất mang probiotics hiệu quả vì tạo một vùng đệm chống lại điều kiện acid cao trong suốt quá trình vận chuyển tới ruột non. Ngoài ra, phô mai tươi có hàm lượng ẩm cao, pH > 5, với nồng độ muối thấp và không chất bảo quản đã tạo một điều kiện tốt cho các chủng probiotic tồn tại và phát triển (Buriti *et al.*, 2005). Sử dụng phô mai probiotic mang lại lợi ích cho sức khỏe con người như cải thiện hệ miễn dịch, cải thiện sức khỏe răng miệng, đường ruột ở người (Cruz *et al.*, 2009). *Lactobacillus casei* là lợi khuẩn đã được chứng minh giúp tăng cường hệ miễn dịch khi hiện diện trong đường tiêu hóa (Isolauri *et al.*, 1991), giảm viêm đại tràng bằng cách đảo ngược hệ sinh thái vi sinh trong đường ruột, cạnh tranh với các vi khuẩn có hại hạn chế gây chấn thương đường ruột (Giralte *et al.*, 2008).

Bên cạnh đó, hiện nay có nhiều sản phẩm phô mai đa dạng về hương vị như vị truyền thống, vị chua biển nướng, vị gà quay, vị nấm, rau thơm và ớt chuông,... Nhằm góp phần đa dạng sản phẩm phô mai trên thị trường, dịch chiết từ lá dứa thơm (chứa một số chất tạo mùi thơm) được bổ sung vào phomai để tạo hương đặc trưng cho sản phẩm.

Do vậy, mục tiêu của nghiên cứu là ứng dụng chế phẩm bromelain thu nhận từ phụ phẩm dứa vào quá trình đông tụ sữa tạo sản phẩm phô mai probiotic hương lá dứa.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu

Phụ phẩm dứa (gồm có chồi và vỏ được phối trộn theo tỉ lệ 4:1) thu nhận ở chợ Sơn Kỳ trên địa bàn Quận Tân Phú, thành phố Hồ Chí Minh, thuộc nhóm dứa hoàng hậu (Queen).

Chế phẩm bromelain được thu nhận theo quy trình: trích ly dung dịch bromelain thô từ phụ phẩm dứa với dung dịch đệm phosphate pH = 7 với tỉ lệ 1:1, sau đó cô đặc bằng phương pháp lọc tiếp tuyến với cột lọc 3 kDa và sấy phun. Chế phẩm bromelain tạo thành có hoạt tính 1542,555 UI/g, được ứng dụng thử nghiệm trong quá trình đông tụ sữa tạo sản phẩm phô mai.

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

Chế phẩm rennet thương mại Junket rennet tablets của công ty Junket Folks, New York, Mỹ.

Sữa bò tươi nguyên chất thu mua ở hộ nuôi bò sữa xã Tân Thới Thượng, huyện Hóc Môn, thành phố Hồ Chí Minh.

Giống vi sinh vật: *Lactobacillus casei* (bộ sưu tập giống probiotic của Bộ môn Công nghệ sinh học, trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm thành phố Hồ Chí Minh) được phân lập từ hạt Kefir và định danh bằng phương pháp rDNA 16s ở công ty Nam Khoa, giữ giống trên môi trường MRS-agar ở 4°C và trong glycerol 10% ở nhiệt độ -18°C.

Lá dứa từ cây dứa thơm (*Pandanus amryllia*) có chứa một số chất gây mùi thơm (2-acetyl-1-pyrroline, 3-methyl-2(5H)-furanine) giống như trong gạo hương nếp (Đào Hùng Cường, 2010). Cách chuẩn bị dịch chiết từ lá dứa: Cân 100g lá dứa thơm xay nhuyễn với 100 mL nước cất; sau đó lọc qua vải màn, đem dịch thô đi ly tâm với tốc độ 5000 rpm trong 10 phút; thu dịch, bỏ cặn; tiếp tục đun cách thủy dịch chiết trong 10 phút, để nguội bổ sung tạo phô mai hương lá dứa.

2.2 Phương pháp bố trí thí nghiệm

Chuẩn bị 200 mL sữa được thanh trùng ở 80 °C trong 10 phút bằng thiết bị hấp khử trùng Tomy (cài đặt ở chế độ hấp thanh trùng), sau đó làm nguội đến 35°C. Bổ sung CaCl₂ ở các nồng độ 0,20; 0,25; 0,30; 0,35 (g/L), 1% chế phẩm bromelain với các nồng độ 0,025; 0,05; 0,075; 0,100 (g/mL), thời gian đông tụ được khảo sát là 10; 20; 30; 40 (phút) trong các điều kiện nhiệt độ 30; 50; 70; 90 (°C). Dùng dao cắt khối đông tụ thành miếng nhỏ, sau đó bất hoạt enzyme bằng cách gia nhiệt lên 90 °C trong 20 phút. Tách nhũ

thanh, bổ sung 0,5% sinh khối *L. casei* sau ly tâm (2×10^{12} CFU/mL) pha loãng thành các mật độ 10^6 ; 10^7 ; 10^8 ; 10^9 CFU/mL vào khối đông tụ thu được từ 200 mL sữa. Tạo khối phô mai và ngâm trong dung dịch muối NaCl 10% trong 40 phút. Sản phẩm tạo thành được bao gói trong giấy nhôm và bảo quản ở 4 °C để đánh giá tiếp các chỉ tiêu cảm quan theo phương pháp cho điểm thị hiếu và mật số *L. casei*.

Quy trình chế biến phô mai probiotic hương lá dứa bằng chế phẩm bromelain và bromelain thương mại được thực hiện theo các thông số chọn ở các thí nghiệm trên, riêng với chế phẩm rennet, quá trình đông tụ được thực hiện ở các thông số: 0,012 g rennet; pH 5,0 ÷ 5,5; CaCl₂ 0,25 g/L; nhiệt độ 30 °C; thời gian 30 phút (Lê Văn Việt Mẫn, 2010). Dịch chiết lá dứa được bổ sung 3 mL cho khối đông tụ thu được từ 200 mL sữa vào cùng lúc với *L. casei* sau quá trình đông tụ sữa. Thực hiện đánh giá cảm quan theo phương pháp cho điểm chất lượng, định lượng mật số *L. casei*, hiệu suất tạo thành phô mai, chỉ tiêu hóa lý và vi sinh của sản phẩm.

2.3 Phương pháp phân tích

Hàm lượng protein được xác định bằng phương pháp Bradford (Ketnawa *et al.* 2012). Dựa trên nguyên tắc các protein khi phản ứng với thuốc thử Coomassie brilliant blue G250 sẽ hình thành hợp chất màu có khả năng hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 595 nm. Cường độ màu tỷ lệ với nồng độ protein trong dung dịch.

Hoạt tính protease được xác định bằng phương pháp Murachi (Ketnawa *et al.* 2012). Một đơn vị hoạt tính enzyme được xác định là lượng enzyme tác dụng với cơ chất casein giải phóng ra 1 µg tyrosine trong 1 phút ở pH = 7,2 tại 35 °C.

Bảng 1: Ảnh hưởng của nồng độ chế phẩm bromelain đến cảm quan thị hiếu và mật số *L. casei* của sản phẩm phô mai

| Nghiệm thức | E ₁ | E ₂ | E ₃ | E ₄ |
|--|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Nồng độ chế phẩm bromelain (g/mL) | 0,025 | 0,050 | 0,075 | 0,100 |
| Mô tả cảm quan (vị) | Không đắng | Đắng hậu vị | Đắng | Đắng |
| Điểm cảm quan thị hiếu | 6,2 ± 1,4 ^c | 4,3 ± 1,9 ^b | 3,0 ± 1,8 ^a | 3,2 ± 1,7 ^a |
| Mật số <i>L. casei</i> (CFU/g) | 4,10 x 10 ¹² | 4,35 x 10 ¹² | 4,00 x 10 ¹² | 4,05 x 10 ¹² |

Các ký tự (^{abc}) khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%

Dựa vào kết quả ở Bảng 1 cho thấy có sự khác biệt lớn về điểm trung bình cảm quan giữa nghiệm thức có bổ sung 0,025 g/mL chế phẩm bromelain và 3 nghiệm thức còn lại. Điểm trung bình cảm quan cao nhất là 6,2 ứng với nghiệm thức E₁ (bổ sung enzyme có nồng độ 0,025 g/mL), sau đó là 4,3 ứng với nghiệm thức E₂ do có hậu vị đắng. Nghiệm thức E₃ và E₄ cảm nhận rõ vị đắng, nên

Mật số vi sinh vật được xác định bằng phương pháp đếm khuẩn lạc (Trần Linh Thuốc, 2011).

Đánh giá cảm quan theo phương pháp cho điểm thị hiếu (Hà Duyên Tư, 2006) với hội đồng cảm quan gồm 30 thành viên được chọn ngẫu nhiên không được huấn luyện đã từng sử dụng sản phẩm phô mai và phương pháp cảm quan cho điểm chất lượng theo TCVN 3215-79 với các chỉ tiêu màu sắc, mùi vị, cấu trúc theo trọng số 0,8 : 2,0 : 1,8 với hội đồng cảm quan gồm 5 thành viên đã qua huấn luyện. Thực hiện đánh giá cảm quan trong phòng thí nghiệm cảm quan của trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm thành phố Hồ Chí Minh.

Xác định chỉ tiêu hóa lý và vi sinh của sản phẩm cuối cùng: các mẫu được gửi đến cơ quan Quatest 3 và Công Ty TNHH DV KHCN Khuê Nam để phân tích.

Hiệu suất tạo phô mai tính theo công thức: $Y = \frac{a}{b} \times 100 (\%)$

Trong đó: Y: hiệu suất tạo phô mai; a: khối lượng phô mai; b: khối lượng sữa sử dụng để tạo phô mai.

Tất cả các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên, lặp lại 3 lần, số liệu thu nhận được xử lí bằng phần mềm thống kê Statgraphic centurion XVI và Microsoft Excel 2013.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng của nồng độ chế phẩm bromelain đến quá trình đông tụ sữa

Nồng độ chế phẩm bromelain có ảnh hưởng đến cảm quan của phô mai. Kết quả đánh giá cảm quan được thể hiện ở Bảng 1.

điểm cảm quan thu được thấp hơn tương ứng là 3,0 và 3,2. Vị đắng xuất hiện có thể do enzyme bromelain cắt phân tử casein tại vị trí tạo ra các amino acid gây đắng nên khi nồng độ bromelain càng cao thì càng xuất hiện vị đắng rõ rệt. Một nghiên cứu của Sa *et al.* (1972) trên đối tượng là enzyme Cardo, một enzyme thực vật tách chiết từ cây *Cynara cardunculus*, ứng dụng vào quy trình

làm phô mai cũng có khả năng định tương tự. Enzyme Cardo làm biến đổi k-casein khác so với rennet. Điều này có thể chỉ ra rằng enzyme phân cắt tại các liên kết peptide khác hoặc cắt tại nhiều vị trí khác nhau so với cách cắt của rennet. Đây có thể là nguyên nhân dẫn đến sự tồn thất protein và gây vị đắng cho sản phẩm. Egito *et al.* (2007) cũng nghiên cứu hoạt động đông tụ của enzyme chiết từ hạt albizia. Khi phân tích kết quả sắc ký k-casein sau thủy phân, nhóm tác giả đã khẳng định enzyme albizia hoạt động giống với enzyme Cardo. Enzyme bromelain cũng có thể hoạt động tương tự như hai enzyme nêu trên.

Dựa vào Bảng 1, mật số probiotic trong mẫu phô mai sau 24 giờ thay đổi không đáng kể với mật số bổ sung ban đầu (2×10^{12} CFU/mL). Điều này

chứng tỏ *L. casei* có tỉ lệ sống sót cao sau khi ngâm trong dung dịch muối 10%, 40 phút và việc bổ sung probiotic sau quá trình đông tụ là thích hợp, hạn chế sự thất thoát probiotic qua các công đoạn sản xuất. Một nghiên cứu của Fortin *et al.* (2011) cũng khẳng định bổ sung probiotic vào sữa trước khi thực hiện đông tụ sẽ làm tồn thất gần một nửa tế bào so với việc bổ sung sau quá trình đông tụ. Như vậy, nồng độ enzyme được chọn bổ sung vào quá trình đông tụ sữa là 0,025g/mL.

3.2 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình đông tụ sữa bằng chế phẩm bromelain

Nhiệt độ ảnh hưởng đến hoạt độ đông tụ sữa của bromelain chế phẩm và ảnh hưởng đến cảm quan của phô mai. Kết quả đánh giá cảm quan được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến điểm cảm quan thị hiếu và mật số *L. casei*

| Nhiệt độ (°C) | 30 | 50 | 70 | 90 |
|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------|----------------|
| Mô tả cảm quan (cấu trúc) | Khối đông tụ kém chặt chẽ | Khối đông tụ khá chặt chẽ | Khối đông tụ chặt chẽ | Không đông tụ |
| Điểm cảm quan thị hiếu | $3,8 \pm 1,0^a$ | $4,5 \pm 0,9^b$ | $6,5 \pm 0,9^c$ | Không khảo sát |
| Mật số <i>L. casei</i> (CFU/g) | $4,10 \times 10^{12}$ | $4,40 \times 10^{12}$ | $3,95 \times 10^{12}$ | Không khảo sát |

Các chữ cái khác nhau trong cùng một hàng biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức khảo sát theo kiểm định LSD ở mức độ tin cậy 95%

Dựa vào kết quả thể hiện ở Bảng 2 cho thấy mẫu đông tụ ở 70 °C có điểm trung bình cảm quan cao nhất là 6,5 và mẫu đông tụ ở 50 °C có điểm trung bình cao hơn mẫu ở 30 °C tương ứng 4,5 và 3,8. Mẫu 30 °C có cấu trúc kém chặt chẽ nên điểm cảm quan không cao. Mẫu đông tụ ở 50 °C có cấu trúc tương đối chắc và mẫu ở 70 °C cấu trúc chắc nên nhận được sự ưa thích của cảm quan viên. Nhiệt độ ảnh hưởng rất lớn đến hoạt động của chế phẩm bromelain trong quá trình đông tụ. Ở nhiệt độ 30 °C, hoạt tính của chế phẩm bromelain không cao nên khả năng phân giải casein kém dẫn đến cấu trúc không được chắc. Tại nhiệt độ 50 °C, hoạt tính chế phẩm bromelain bắt đầu tăng, hoạt động đông tụ tốt hơn so với ở nhiệt độ 30 °C. Tại 70 °C, chế phẩm bromelain hoạt động mạnh, phân giải casein tốt nên cấu trúc khối đông chắc. Khi nhiệt độ tăng

lên 90 °C thì chế phẩm bromelain mất hoàn toàn hoạt tính nên không xuất hiện đông tụ ở nhiệt độ này. Kết quả của thí nghiệm này phù hợp với nghiên cứu của Silvestre *et al.* (2012), nhóm tác giả này đã khẳng định hoạt tính riêng của dịch chiết bromelain từ vỏ dứa tăng đáng kể ở nhiệt độ 70 °C.

Tương tự thí nghiệm trước, mật số probiotic trong mẫu phô mai sau 24 giờ thay đổi không đáng kể với mật số bổ sung ban đầu (2×10^{12} CFU/mL) và nhiệt độ đông tụ được chọn là 70 °C.

3.3 Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình đông tụ sữa bằng chế phẩm bromelain

Thời gian đông tụ có ảnh hưởng đến sản phẩm của phô mai. Kết quả đánh giá thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3: Ảnh hưởng của thời gian đến điểm cảm quan thị hiếu và mật số *L. casei* trong phô mai

| Thời gian (phút) | 10 | 20 | 30 | 40 |
|--------------------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Mô tả cảm quan (cấu trúc) | Khối đông tụ kém chắc | Khối đông tụ tương đối chắc | Khối đông tụ chắc | Khối đông tụ kém chắc |
| Điểm cảm quan thị hiếu | $5,4 \pm 0,5^a$ | $5,8 \pm 0,4^b$ | $6,9 \pm 0,6^c$ | $5,5 \pm 0,5^a$ |
| Mật số <i>L. casei</i> (CFU/g) | $4,15 \times 10^{12}$ | $4,20 \times 10^{12}$ | $4,40 \times 10^{12}$ | $4,30 \times 10^{12}$ |

Các chữ cái khác nhau trong cùng một hàng biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức khảo sát theo kiểm định LSD ở mức độ tin cậy 95%

Dựa vào kết quả thể hiện ở Bảng 3 cho thấy ở cùng nhiệt độ 70 °C, mẫu phô mai được đông tụ trong thời gian 30 phút nhận được sự ưa thích của

các cảm quan viên vì có cấu trúc chặt chẽ (điểm cảm quan thị hiếu là 6,9). Với thời gian đông tụ 20 phút, phô mai có điểm cảm quan thấp hơn (5,8) do

có cấu trúc kém chặt chẽ hơn. Mẫu phô mai có thời gian đông tụ 10 phút và 40 phút có cấu trúc kém chặt chẽ, kết cấu dễ biến dạng điểm cảm quan tương ứng là 5,4 và 5,5. Kết quả này có thể là do thời gian đông tụ sữa ở mẫu 10 phút và 20 phút quá ngắn để enzyme thực hiện quá trình đông tụ hết casein có trong sữa. Ngược lại, đối với mẫu đông tụ trong 40 phút, thời gian thực hiện quá trình đông tụ quá lâu ở điều kiện nhiệt độ đông tụ 70 °C, có thể cấu trúc casein trong sữa bị tác động bởi nhiệt độ cao trong khoảng thời gian tương ứng. Tương tự như kết quả thí nghiệm từ nghiên cứu của Bruno *et al.* (2010) về hoạt động đông tụ sữa và thủy phân protein của enzyme từ *Bromelia hieronymi* cho

rằng hoạt động thủy phân casein bởi hieronymain ở pH 6,5 và nhiệt độ 45 °C tăng dần theo các khoảng thời gian khảo sát là 2, 5, 7, 10, 30, 60 và 90 phút. Mật số *L. casei* trong mẫu phô mai sau 24 giờ thay đổi không đáng kể với mật số bổ sung ban đầu (2×10^{12} CFU/mL). Vì vậy, thời gian đông tụ sữa trong quy trình sản xuất phô mai được chọn là 30 phút cho các khảo sát tiếp theo.

3.4 Biến động trong quá trình đông tụ sữa do ảnh hưởng của nồng độ calcium chloride

CaCl₂ đóng vai trò quan trọng trong quá trình đông tụ bằng chế phẩm bromelain. Kết quả đánh giá cảm quan được thể hiện ở Bảng 4.

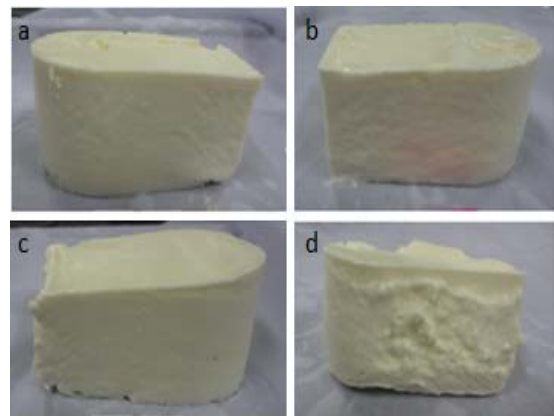
Bảng 4: Ảnh hưởng của nồng độ CaCl₂ bổ sung đến chất lượng sản phẩm phô mai

| Nồng độ CaCl ₂ (g/L) | 0,20 | 0,25 | 0,30 | 0,35 |
|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| Mô tả cảm quan (cấu trúc) | Khối đông tụ tương đối chặt chẽ | Khối đông tụ chặt chẽ | Khối đông tụ tương đối chặt chẽ | Khối đông tụ kém chặt chẽ |
| Điểm cảm quan thị hiếu | 5,3 ± 0,9 ^b | 7,2 ± 0,7 ^c | 5,1 ± 0,8 ^b | 3,8 ± 0,7 ^a |
| Mật số <i>L. casei</i> (CFU/g) | 1,99 x 10 ¹² | 1,51 x 10 ¹² | 1,53 x 10 ¹² | 1,00 x 10 ¹² |

Các chữ cái khác nhau trong cùng một hàng biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức khảo sát theo kiểm định LSD ở mức độ tin cậy 95%

Dựa vào Bảng 4 cho thấy nghiệm thức bổ sung CaCl₂ 0,25 g/L có cấu trúc chặt chẽ, có độ dẻo vừa phải khi tan trong miệng, nhận được sự ưa thích của các cảm quan viên nên có điểm trung bình cảm quan cao nhất (7,2). Với nồng độ CaCl₂ 0,20 g/L và 0,30 g/L sản phẩm phô mai có cấu trúc tương đối chắc, độ dẻo kém, điểm cảm không có sự khác biệt tương ứng là 5,3 và 5,1. Ở nghiệm thức bổ sung CaCl₂ 0,35 g/L không gây ấn tượng cho cảm quan viên do có cấu trúc không chắc, không có độ dẻo (Hình 1) nên điểm cảm quan thấp nhất (3,8). Bổ sung CaCl₂ vào sữa sẽ làm giảm thời gian đông tụ và tăng cường cấu trúc khối đông ở nồng độ thấp (Lucey and Fox, 1993). Ion Ca²⁺ có vai trò như một cầu nối trong cấu trúc của các micelle casein. Ngoài ra, việc bổ sung Ca²⁺ làm giảm pH của sữa bằng cách trao đổi Ca²⁺ với H⁺ gián tiếp làm tăng tỷ lệ enzyme phản ứng. Tuy nhiên, nếu bổ sung Ca²⁺ ở nồng độ cao sẽ làm giảm đáng kể kết cấu khối đông, có thể là vì quá nhiều Ca²⁺ ràng buộc gây trở ngại cho sự hình thành các liên kết thích hợp hoặc làm giảm sự hòa tan của k-casein. Ngoài ra, nếu bổ sung quá nhiều Ca²⁺ thì pH sữa giảm làm hòa tan 30% liên kết calcium-phosphate nội tại trong khối đông, làm lỏng khối đông (Lucey and Fox, 1993). Chính vì vậy, việc bổ sung CaCl₂ ở nồng độ 0,35 g/L làm cho khối đông không được chặt chẽ. Kết quả của thí nghiệm này cũng tương tự như nghiên cứu của Bruno *et al.* (2010) đã khẳng định nồng độ CaCl₂ cao (> 0,3 mol/L) thì hoạt động đông tụ thấp và kéo dài thời gian đông tụ. Theo Buriti *et al.* (2005) cũng chọn nồng độ CaCl₂

0,25 g/L ứng dụng trong quy trình sản xuất thử nghiệm phô mai Minas. Mật số *L. casei* trong mẫu phô mai sau 24 giờ thay đổi không đáng kể với mật số bổ sung ban đầu (2×10^{12} CFU/mL). Các khảo sát tiếp theo được bổ sung CaCl₂ với nồng độ 0,25 g/L.



Hình 1: Mẫu phô mai bổ sung CaCl₂ với các nồng độ

(a) 0,20 g/mL; (b) 0,25 g/mL; (c) 0,30 g/mL; (d) 0,35 g/mL

3.5 Đánh giá mật số L. casei bổ sung vào phô mai

Các sản phẩm bổ sung probiotic đạt yêu cầu phải có mật độ lợi khuẩn tối thiểu là 10⁶ CFU/g tính đến thời hạn sử dụng. Dịch sinh khối *L. casei* bổ sung vào khối đông tụ sữa có mật độ 10¹²

CFU/mL, để tiết kiệm lượng giống sử dụng, dịch sinh khối này được pha loãng để tạo mật độ ban đầu trong sản phẩm từ $10^6 - 10^9$ CFU/g. Sự thay

đổi mật độ theo thời gian bảo quản được thể hiện ở Bảng 5.

Bảng 5: Mật số probiotic trong mẫu phô mai theo thời gian bảo quản

| Thời gian | Mật số <i>L. casei</i> bổ sung ban đầu (CFU/mL) | 10^6 | 10^7 | 10^8 | 10^9 |
|-----------|---|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1 ngày | Mật số <i>L. casei</i> trong sản phẩm (CFU/g) | $5,6 \times 10^6$ | $2,8 \times 10^7$ | $4,1 \times 10^8$ | $3,6 \times 10^9$ |
| 14 ngày | | $4,1 \times 10^5$ | $3,85 \times 10^6$ | $4,05 \times 10^7$ | $3,85 \times 10^8$ |

Kết quả trên cho thấy mật số probiotic thay đổi không đáng kể sau 1 ngày bảo quản lạnh so với mật số bổ sung ban đầu. Tuy nhiên, có sự suy giảm đáng kể mật số probiotic sau 14 ngày bảo quản. Việc nghiên cứu bổ sung probiotic vào phô mai và đánh giá mật số probiotic trong thời gian bảo quản đã được nhiều tác giả nghiên cứu và công bố. Chaves and Gigante (2016) đã nghiên cứu về việc kết hợp bổ sung hai chủng probiotic *Lactobacillus acidophilus La5* và *Bifidobacterium Bb12* với tỉ lệ mỗi chủng là 0,5% vào phô mai Prato và so sánh hiệu quả với việc chỉ bổ sung một chủng probiotic 1% *L. acidophilus La5* hoặc 1% *Bifidobacterium Bb12* (mẫu đối chứng là mẫu chỉ có giống khởi động và không bổ sung probiotic) cùng với việc đánh giá mật số probiotic của từng mẫu theo thời gian bảo quản. Kết quả cho thấy mẫu bổ sung 1% *La5* lần lượt có mật số là $4,27 \times 10^8$ cfu/g và $2,39 \times 10^8$ CFU/g sau 1 ngày và 14 ngày bảo quản lạnh. Mẫu bổ sung 1% *Bb12* lần lượt có mật số là $7,94 \times 10^8$ CFU/g và $3,98 \times 10^8$ CFU/g. Trong khi mẫu bổ sung cả hai chủng probiotic trên thì cho kết quả

mật số $3,8 \times 10^8$ CFU/g *La5*; $4,17 \times 10^8$ CFU/g *Bb12* và $2,09 \times 10^8$ CFU/g *La5*; $2,29 \times 10^8$ CFU/g *Bb12* sau 1 ngày và 14 ngày bảo quản lạnh. Kết quả mật số probiotic sau 60 ngày bảo quản cao hơn 10^6 CFU/g, mật số *La5* và *Bb12* đạt $8,5 \times 10^6$ CFU/g. Nghiên cứu cũng cho rằng một số chủng probiotic như *Lactobacillus* và *Bifidobacterium* thường được bổ sung vào thực phẩm hoặc thực phẩm chức năng với liều lượng khoảng 10^9 CFU trong một khẩu phần ăn. Như vậy, để đảm bảo mật độ lợi khuẩn trong sản phẩm sau thời gian bảo quản, chọn nghiệm thức bổ sung *L. casei* có mật độ sinh khối ban đầu là 10^9 CFU/mL.

3.6 Tạo sản phẩm phô mai probiotic hương lá dứa

Sản phẩm phô mai probiotic hương lá dứa sử dụng tác nhân đông tụ là chế phẩm bromelain từ phụ phẩm dứa (PC) được tiến hành kiểm tra xác định các chỉ tiêu hóa lý và vi sinh vật. Kết quả được thể hiện trong Bảng 6.

Bảng 6: Chỉ tiêu hóa lý và vi sinh vật của sản phẩm phô mai probiotic hương lá dứa đông tụ bằng chế phẩm bromelain từ phụ phẩm dứa

| Tên chỉ tiêu | Kết quả | Phương pháp thử |
|-------------------------------|-----------------|---|
| Hàm lượng chất béo (%) (w/w) | 25,2 | FAO FNP 14/8 (P.10)-1986 |
| Hàm lượng protein (%) (w/w) | 6,2 | FAO FNP 14/7 (p.221)-1986 Phương pháp Kjeldahl |
| Hàm lượng ẩm (%) (w/w) | 56,2 | FAO FNP 14/7 (p.205)-1986 |
| <i>Staphylococci</i> | Không phát hiện | ISO 6888-3:2003 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | Không phát hiện | ISO 11290-2:2004 |

(Các chỉ tiêu lý hóa được phân tích tại Quatest 3 chỉ tiêu vi sinh được phân tích tại Công ty TNHH DV KHCN Khuê Nam)

Sau khi kiểm tra các chỉ tiêu hóa lý của phô mai có quá trình đông tụ sử dụng chế phẩm bromelain thì nhận thấy hàm lượng chất béo thu được là 25,2%, tiến hành đối chiếu với QCVN 5-3:2010 được xếp loại sản phẩm phô mai có hàm lượng chất béo trung bình, phù hợp với nhu cầu thị hiếu của người tiêu dùng Việt Nam. Trong khi đó, hàm lượng protein thu được cao hơn so với sản phẩm phô mai con bò cười trên thị trường tương ứng là 6,2% và 5,7%. Điều này có thể là do chất lượng nguồn sữa nguyên liệu và cream bổ sung của nghiên cứu này có hàm lượng protein cao. Bên cạnh đó, kết quả kiểm tra chỉ tiêu vi sinh vật trong

phô mai cho thấy không có sự hiện diện của *Staphylococci* và *L. monocytogenes*, đảm bảo yêu cầu về chỉ tiêu vi sinh đối với sản phẩm phô mai theo QCVN 5-3:2010.

Sản phẩm phô mai đối chứng được thực hiện như quy trình sử dụng chế phẩm bromelain, chỉ thay thế bằng chế phẩm bromelain thương mại và chế phẩm rennet vào quá trình đông tụ sữa. Thực hiện khảo sát đánh giá cảm quan 3 mẫu phô mai probiotic hương lá dứa trong một hội đồng có 5 cảm quan viên đã qua huấn luyện, sau khi xử lý số liệu thu được kết quả thể hiện trong Bảng 7.

Bảng 7: Đánh giá cảm quan cho điểm chất lượng của 3 mẫu phô mai probiotic hương lá dứa

| Mẫu | PC | PT | PR |
|--------------------------|-------|-------|-------|
| Tổng điểm có trọng lượng | 15,28 | 10,68 | 16,48 |
| Phân loại chất lượng | Khá | Kém | Khá |

PC: Chế phẩm bromelain, PT: chế phẩm bromelain thương mại, PR: chế phẩm rennet

Dựa vào Bảng 7, khi tiến hành đối chiếu so sánh với mục 4.8 của TCVN 3215-79 nhận thấy mẫu PC và PR được phân loại chất lượng đạt loại khá như nhau (15,28 và 16,48, tương ứng), còn mẫu PT đạt loại kém (10,68). Kết quả trên là do hoạt tính của bromelain thương mại cao hơn bromelain từ phụ phẩm dứa nên bromelain thương mại hoạt động phân cắt casein trong sữa mạnh hơn, giải phóng ra nhiều amino acid gây đắng làm biến đổi vị của phô mai. Do đó, khi tiến hành đánh giá cho điểm chất lượng, mẫu PT không nhận được sự đánh giá cao từ các cảm quan viên. Trong khi đó, mẫu PC và mẫu PR lại nhận được sự ưa thích của hội đồng cảm quan vì có cấu trúc chắc, độ dẻo, mịn và vị béo, mặn vừa phải đặc trưng của phô mai (Hình 2).

Năng suất tạo phô mai được xác định là 16,2% (tương ứng với độ ẩm phô mai được xác định là

56,2%). Nasr *et al.* (2016) nghiên cứu về đặc tính đông tụ sữa của enzyme được tách chiết từ hạt *Helianthus annuus*, kết quả cho thấy phô mai được đông tụ từ sữa bò sử dụng enzyme từ hạt *Helianthus annuus* cho năng suất cao hơn so với sử dụng rennet thương mại (25,4%; 17,8%, tương ứng), điều này cho kết quả ngược lại khi sử dụng nguồn sữa dê (16,15%; 19,65%, tương ứng), tuy nhiên nghiên cứu này không đề cập đến độ ẩm phô mai khi xác định năng suất phô mai. Trong khi đó, nghiên cứu của Mazorra-Manzano *et al.* (2013) về việc so sánh thuộc tính đông tụ sữa của ba dịch chiết từ thực vật cho thấy năng suất tạo phô mai của chymosin và ba dịch chiết thực vật từ kiwi, dứa, gừng lần lượt là 20,2; 17,8; 15,1; 15,4 (%), tương ứng với độ ẩm của phô mai lần lượt là 69,14; 67,71; 66,2; 62,24 (%). Từ kết quả và những nghiên cứu được so sánh trên cho thấy chế phẩm bromelain có tiềm năng là chất đông tụ sữa thay thế cho chymosin, rennet trong quá trình sản xuất phô mai.

Từ tất cả các kết quả và biện luận cho thấy mẫu phô mai được đông tụ bằng chế phẩm bromelain có chất lượng gần tương đương với mẫu phô mai được đông tụ bằng chế phẩm rennet thương mại. Điều này chứng tỏ chế phẩm bromelain từ phụ phẩm dứa có tiềm năng sử dụng như một enzyme đông tụ sữa trong công nghiệp sản xuất phô mai.



Hình 2: Phô mai probiotic hương lá dứa

(a) đông tụ bằng chế phẩm bromelain, (b) đông tụ bằng bromelain thương mại, (c) đông tụ bằng chế phẩm rennet

4 KẾT LUẬN

Quá trình tạo phô mai probiotic hương lá dứa được bổ sung chế phẩm bromelain từ phụ phẩm dứa vào quá trình đông tụ, tạo ra sản phẩm có hương vị mới, mang lại giá trị dinh dưỡng cho con người, góp phần đa dạng hóa sản phẩm. Phô mai có hàm lượng béo trung bình cho giá trị cảm quan tốt. Tuy nhiên, để hoàn thiện hơn quy trình sản xuất và phát triển sản phẩm cần tiếp tục đánh giá hiệu suất đông tụ phô mai, nghiên cứu thời gian, phương pháp bảo quản, đánh giá cảm quan trên số lượng mẫu lớn, đồng thời khảo sát ảnh hưởng của nồng độ muối đến mật số *L.casei*, tách chiết tinh dầu

hương lá dứa và tìm ra phương pháp lưu hương tốt hơn.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin gửi lời cảm ơn đến Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ chi phí thực hiện nghiên cứu này; chân thành cảm ơn Khoa Công nghệ Sinh học, Trung tâm Việt Đức, Trung tâm Thí nghiệm thực hành đã phối hợp thực hiện đề tài này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Buriti, F.C.A., Rocha, J.S.D., Assis, E.G., and Saad, S.M.I., 2005. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of

- Lactobacillus paracasei. LWT-Food Science and Technology. 38(2): 173-180.
- Bruno, M.A., Lazza, C.M., Errasti, M.E., López, L.M.I., Caffini, N.O., and Pardo, M.F., 2010. Milk clotting and proteolytic activity of an enzyme preparation from Bromelia hieronymi fruits. LWT-Food Science and Technology. 43(4): 695-701.
- Chaves, K.S., and Gigante, M.L., 2016. Prato cheese as suitable carrier for Lactobacillus acidophilus La5 and Bifidobacterium Bb12. International Dairy Journal. 52: 10-18.
- Cruz, A.G., Buriti, F.C.A., Souza, C.H.B., Faria J.A.F., and Saad, S.M.I., 2009. Probiotic cheese: Health benefits, technological and stability aspects. Trends in Food Science & Technology. 20(8): 344-354.
- Đào Hùng Cường và Nguyễn Thị Thanh Tú, 2010. Nghiên cứu và xác định thành phần hóa học của lá dứa thơm ở huyện Đại Lộc-Quảng Nam. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Trường Đại học Đà Nẵng. (36): 65-70.
- Đặng Thị Thu, Lê Ngọc Tú, Tô Kim Anh, Phạm Xuân Thủy và Nguyễn Xuân Sâm, 2012. Công nghệ Enzyme, NXB Khoa học và Kỹ thuật.
- Egito, A.S., Girardet, J-M, Laguna, L.E., et al., 2007. Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine κ -casein. International Dairy Journal. 17(7): 816-825.
- Giralt, J., Regadera, J.P., Verges, R., et al., 2008. Effects of probiotic Lactobacillus casei DN-114 001 in prevention of radiation-induced diarrhea: results from multicenter, randomized, placebo-controlled nutritional trial. International Journal of Radiation OncologyBiology Physics. 71(4): 1213-1219.
- Hà Duyên Tư, 2006. Kỹ thuật phân tích cảm quan thực phẩm. NXB Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.
- Isolauri, E., Rautanen, T., Juntunen M., Sillanaukee, P., and Koivula, T., 1991. A human Lactobacillus strain (Lactobacillus casei sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. Pediatrics. 88(1): 90-97.
- Fortin, M.H., Champagne, C.P., Gelais, D.S., Britten, M., Fustier, P., and Lacroix, M., 2011. Effect of time of inoculation, starter addition, oxygen level and salting on the viability of probiotic cultures during Cheddar cheese production. International dairy journal. 21(2): 75-82.
- Ketnawa, S., Chaiwut, P., and Rawdkuen, S., 2012. Pineapple wastes: A potential source for bromelain extraction. Food and bioproducts processing. 90(3): 385-391.
- Kumari, M., Sharma, A., and Jagannadham, M.V., 2012. Religiosin B, a milk-clotting serine protease from Ficus religiosa. Food chemistry. 131(4): 1295-1303.
- Lucey, J.A and Fox, P.F., 1993. Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture: a review. Journal of Dairy Science. 76(6): 1714-1724.
- Lê Văn Việt Mẫn, 2010. Giáo trình công nghệ sản xuất các sản phẩm từ sữa và thức uống pha chế, NXB Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.
- Mazorra-Manzano, M.A., Perea-Gutiérrez T.C., Lugo-Sánchez, M.E., and et al., 2013. Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts. Food chemistry. 141(3): 1902-1907.
- Nasr, A.I.A.M., Ahmed, I.A.M., and Hamid, O.I.A., 2016. Characterization of partially purified milk-clotting enzyme from sunflower (Helianthus annuus) seeds. Food Science and Nutrition. 4(5):733-741.
- Ban soạn thảo Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về vệ sinh an toàn thực phẩm đối với sữa và sản phẩm sữa, 2010. QCVN 5-3:2010/BYT, quy chuẩn kỹ thuật Quốc gia đối với các sản phẩm phomat.
- Silvestre, M.P.C., Carreira, R.L., Silva, M.R., Corgosinho, F.C., Monteiro, M.R.P., and Morais, H.A., 2012. Effect of pH and temperature on the activity of enzymatic extracts from pineapple peel. Food and Bioprocess Technology. 5(5): 1824-1831.
- Sa, F.V.D., and Barbosa, M., 1972. Cheese-making with a vegetable rennet from Cardo (Cynara cardunculus). Journal of Dairy Research. 39(3): 335-343.
- Trần Linh Thuốc, 2011. Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm, NXB Giáo dục Việt Nam.
- Ủy ban Khoa học và Kỹ thuật Nhà nước, 1979. Quyết định ban hành số: 722/QĐ, ngày 31/12/1979 về việc “ Ban hành tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 3215-79”.