

TẬN DỤNG PHẾ PHẨM KHÓM CÀ ĐÚC (HẬU GIANG) CHO QUÁ TRÌNH TRÍCH LY ENZYME BROMELAIN

Nguyễn Văn Thành¹, Nguyễn Minh Thủy² và Dương Thị Diễm Trang³

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

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

³Học viên Cao học Công nghệ Thực phẩm K17, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 18/01/2013

Ngày chấp nhận: 20/06/2013

Title:

Extraction of bromelain
enzyme from pineapple waste

Từ khóa:

Ammonium sulphate,
bromelain, chồi ngọn khóm,
Cà Đúc (Hậu giang), sấy
chân không

Keywords:

Ammonium sulphate,
bromelain, Cau Duc (Hau
Giang), pineapple peaked-
shoots, vacuum drying

ABSTRACT

This research aimed to study the effect of some factors such as: (i) precipitating agents (acetone, ethanol, ammonium sulfate); (ii) ammonium sulfate concentrations (60, 70, 80%) and precipitation temperatures (27°C and 4°C and (iii) drying methods (freeze-drying, vacuum drying and by H₂SO₄) on bromelain preparation extracted from pineapple peaked-shoots.

The research results showed that 82,86, 71,19 and 66,19% enzyme activity recovery when precipitated by acetone, ethanol and ammonium sulfate, respectively. The appropriate concentration of ammonium sulfate and temperature for bromelain precipitation were 80% (v/v) and 27 °C, respectively. Vacuum drying (at 35°C for 9 hours) was the most effective method for obtaining white bromelain powder with the moisture content below 8%; 74,74% activity recovery compared with the total activity in the crude extract.

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm mục đích khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố như: (i) ảnh hưởng của tác nhân tủa (acetone, ethanol, ammonium sulfate); (ii) ammonium sulfate (60, 70, 80%) và nhiệt độ kết tủa (27 °C và 4 °C) và (iii) phương pháp sấy (đông khô, chân không và bằng H₂SO₄) đến sản phẩm enzyme bromelain trích ly từ chồi ngọn khóm.

Kết quả nghiên cứu cho thấy hoạt tính enzyme bromelain của chồi ngọn khóm thu hồi khi tủa bằng acetone cho kết quả (82,86%) cao hơn hoạt tính enzyme thu hồi khi kết tủa bằng ethanol (79,19%) và ammonium sulfate (66,19%). Nồng độ ammonium sulfate 80% (w/v) bão hòa và nhiệt độ kết tủa 27 °C thích hợp cho kết tủa bromelain. Sấy chân không (35°C trong 9 giờ) cho hiệu quả thu nhận bột bromelain thành phẩm cao, sản phẩm có màu trắng, độ ẩm thấp hơn 8%, hiệu suất thu hồi hoạt tính enzyme 74,74%.

1 GIỚI THIỆU

Bromelain là tên gọi chung cho nhóm enzyme thực vật chứa nhóm sulfhydryl, có khả

năng phân giải protein và nhiều ứng dụng trong y học và thực phẩm. Trong y học, bromelain có thể ngăn chặn tăng huyết áp, tình

trạng máu vón cục, xơ vữa động mạch, các cơn đau tim và đột quỵ, trị viêm họng, giảm các triệu chứng dị ứng và can thiệp vào sự tăng trưởng của các tế bào ác tính, hữu hiệu trong việc chữa lành vết thương, giảm chứng phù và chứng viêm khớp và tăng cường hấp thu thuốc (Tochi *et al.*, 2008). Trong công nghiệp thực phẩm, bromelain được sử dụng như một tác nhân làm mềm thịt và làm đông tụ sữa (Rabelo *et al.*, 2004). Bromelain được thu nhận chủ yếu từ họ *Bromeliaceae* của cây khóm.

Bromelain có mặt trong phế phụ phẩm của dứa như lõi, chồi, vỏ và lá. Phần phế phụ phẩm này chiếm một tỷ lệ lớn của lượng dứa nguyên liệu đưa vào chế biến, khoảng 70% (Nguyễn Bá Mùi, 2002). Trên thế giới nhiều công trình nghiên cứu đã tiến hành chiết tách, tinh sạch bromelain từ phế phụ phẩm bằng nhiều cách khác nhau như kết tủa bằng amôn sulfat, sắc ký trao đổi ion, đông khô, sấy phun (Devakate *et al.*, 2009; Evens, 2006); tách bằng dùng màng ái lực cố định kim loại (immobilized metal affinity membrane) (Huali *et al.*, 2008), chiết hai pha lỏng-lỏng (Ravindra *et al.*, 2008), nhiều chế phẩm thương mại đã ra đời. Tuy nhiên, ở Việt Nam, một đất nước nhiệt đới có sản lượng dứa lớn, việc tách bromelain từ phế phụ phẩm tạo chế phẩm thương mại ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm chưa nhiều (Lại Thị Ngọc Hà, 2009).

Khóm Cầu Đúc được xem là mặt hàng đặc sản của Tỉnh Hậu Giang. Khóm được ăn tươi và chế biến thành nhiều sản phẩm như khóm đóng hộp, nước ép khóm, nước khóm cô đặc, mứt khóm... Tuy nhiên, phần thịt quả dùng trong chế biến chỉ chiếm khoảng 28,86%, còn lại là phế phụ phẩm của khóm chứa enzyme bromelain với các hoạt lực khác nhau (Lại Thị Ngọc Hà, 2009).

Cùng với sự phát triển của ngành sản xuất và chế biến thì lượng phế phụ phẩm từ khóm cũng tăng theo. Ở các nông trường trồng khóm, cây và lá khóm bị bỏ khô trên đất hoặc vùi làm phân bón. Ở các nhà máy chế biến rau quả, phần lớn phế phẩm khóm được đưa ra bãi rác, gây ô nhiễm môi trường. Tận dụng tối đa nguồn phế phẩm sẽ là hoạt động góp phần

giảm thiểu mối nguy ô nhiễm môi trường, nâng cao giá trị kinh tế của cây khóm và phục vụ hiệu quả cho hoạt động chế biến thực phẩm và công nghệ dược phẩm. Do vậy, mục tiêu của nghiên cứu là xây dựng quy trình trích ly và bảo quản bột enzyme bromelain thô cho quá trình sử dụng. Hoạt động này phần nào mang lại lợi ích và có giá trị ứng dụng thực tế trong thực phẩm, mỹ phẩm, nghiên cứu... và lợi nhuận cao cho sản xuất của địa phương.

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.

Chồi ngọn trái khóm (Hình 1) được thu nhận từ quá trình thu hoạch khóm của xã Hòa Tiến, Thành phố Vị Thanh, tỉnh Hậu Giang.



Hình 1: Nguyên liệu thí nghiệm (chồi ngọn trái khóm)

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 *Khảo sát ảnh hưởng của các tác nhân kết tủa ethanol, acetone, ammonium sulfate đến hiệu suất trích ly bromelain từ chồi ngọn của trái khóm*

Chồi khóm được nghiền ép để phá vỡ tế bào mô khóm, lọc bỏ bã và thu dịch chiết. Dịch chiết được ly tâm lạnh ở 4°C với tốc độ 5300 g (≈ 7000 RPM) trong 15 phút để loại bỏ cặn bã và thu dịch ly tâm. Kết tủa dịch trích với các tác nhân tủa acetone (tinh khiết), ethanol (99,8%), ammonium sulfate (70%), được bố trí lần lượt với tỷ lệ 2 acetone : 1 dịch trích (Heinicke và Gortner, 1957), 4 ethanol : 1 dịch trích (Lại Thị Ngọc Hà, 2009), và

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ với nồng độ 70% bão hòa (472 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ trong 1 lít dịch trích) (Nguyễn Đình Huyền và *ctv.*, 1994).

Từ 1,5 kg chồi ngọn của trái khóm sau khi nghiền ép thu được 750 ml dịch trích, thể tích này được chia thành 3 phần bằng nhau. Phần 1 (250 ml) cho từ từ 118 g muối ammonium sulfate (nồng độ 70% bão hòa) vào ở nhiệt độ phòng lạnh (27°C) sau đó ly tâm thu tủa, rửa tủa bằng acetone lạnh và sấy khô tủa bằng H_2SO_4 . Phần 2 (250 ml) được đưa vào làm lạnh đến nhiệt độ (0-4°C), sau đó cho 2 thể tích acetone (-20°C) vào. Đặt ở nhiệt độ -20°C trong 30 phút và ly tâm thu kết tủa và sấy khô tủa. Tương tự phần 2, phần 3 (250 ml) sau khi được làm lạnh đến nhiệt độ (0-4°C) thêm 4 thể tích ethanol (-20°C) vào khuấy đều, để ở nhiệt độ -20°C trong 2 giờ. (Theo nhóm tác giả Drauz *et al.* (2011) thì dịch trích và dung môi hữu cơ phải được làm lạnh và giữ ở nhiệt độ thấp (<0°C) trong suốt quá trình kết tủa). Sau khi có tủa xuất hiện, ly tâm thu tủa và sấy khô.

2.2.2 Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ ammonium sulfate và nhiệt độ kết tủa đến hiệu suất thu hồi hoạt tính enzyme bromelain

Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 2 nhân tố là nồng độ ammonium sulfate (SA) 60, 70, và 80% và nhiệt độ kết tủa là 27 và 4°C. Sấy khô tủa bằng H_2SO_4 trong bình hút ẩm ở 4°C.

2.2.3 Khảo sát ảnh hưởng của các phương pháp sấy đến hoạt tính của enzyme bromelain thô

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với các phương pháp sấy, bao gồm sấy đông khô (-40°C), sấy trong bình hút ẩm (5°C) và sấy chân không (35°C). Bột bromelain thô được trích ly bằng cách kết tủa với ammonium sulfate 80% bão hòa ở 27°C, thời gian cho muối vào 45 phút. Ly tâm thu tủa và sấy tủa bằng phương pháp sấy được đề cập.

– *Các chỉ tiêu theo dõi:* Lượng enzyme bromelain thô thu được (g) (sử dụng cân điện tử độ chính xác 0.0001), hoạt tính của enzyme

bromelain bằng phương pháp Kunitz (1974) cải tiến, xác định hàm lượng protein bằng phương pháp Bradford (1976) và tính hiệu suất thu hồi hoạt tính enzyme bromelain (%). So sánh hiệu quả kinh tế của các tác nhân kết tủa và phương pháp sấy.

– *Xử lý kết quả:* Kết quả được xử lý bằng chương trình thống kê Stagraphic 4.0.

3 KẾT QUẢ THẢO LUẬN

Kết quả thu được từ nghiên cứu sơ bộ ban đầu cho thấy ngọn là phần có hoạt lực protease cao nhất (khác biệt có ý nghĩa với vỏ và lõi trái khóm), hoạt lực trong chồi ngọn gấp 9,92 lần trong lõi trái và gấp 4,38 lần trong vỏ trái khóm. Kết quả tương tự với nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước về sự hiện diện của protease trong các bộ phận của trái khóm (Ravindra *et al.*, 2008; Lại Thị Ngọc Hà, 2009).

3.1 Ảnh hưởng của các tác nhân kết tủa đến kết quả thu nhận bromelain thô từ chồi ngọn

Enzyme bromelain thô được trích ly từ phần chồi ngọn của trái khóm bằng phương pháp kết tủa với tác nhân tủa thích hợp, nhằm chọn tác nhân tủa đơn giản, không độc hại và chi phí thấp. Các kết quả thu nhận enzyme bromelain thô từ các tác nhân kết tủa khác nhau được trình bày ở Bảng 1. Hoạt tính enzyme thu hồi được sau khi sấy khô của từng tác nhân tủa mang lại không giống nhau.

Kết quả thể hiện cho thấy hiệu suất thu hồi hoạt tính enzyme khi tủa bằng acetone đạt cao nhất (82,86%) so với ethanol (79,19%) và ammonium sulfate (66,52%). Theo Devakate *et al.* (2009) thì 80% hoạt tính enzyme và 34% protein thu hồi được khi kết tủa phân đoạn bromelain trái với phân đoạn 40-60% (w/v) ammonium sulfate ở nhiệt độ 4°C. Với phương pháp tủa phân đoạn có thể loại bỏ được phần protein tạp có trong dung dịch khóm do nồng độ ammonium sulfate thấp thì chỉ có một phần protein bị kết tủa. Mặt khác, nhiệt độ lạnh cũng có thể hạn chế được sự mất hoạt tính của bromelain khi kết tủa nên hiệu suất thu hồi hoạt tính của quá trình này khá cao.

Bảng 1: Ảnh hưởng của tác nhân rửa đến quá trình trích ly enzyme bromelain

Tác nhân rửa	HSTH hoạt tính enzyme (%)	Hoạt tính riêng (U/mg)	Khối lượng bột enzyme (g)	Chi phí sản xuất** 20000 TU (VNĐ)
Ammonium sulfate (SA)	66,53±1,48*	11,90±0,70	14,94±0,50	63.559
Acetone	82,87±1,28	14,15±0,08	13,13±0,15	124.888
Ethanol	79,60±2,16	13,16±1,04	12,71±0,36	118.893

Ghi chú: *STD (độ lệch chuẩn) của giá trị trung bình; **Chi phí sản xuất “tương đối” được tính toán dựa trên tổng chi phí thiết bị (điện năng tiêu thụ) và chi phí hóa chất

Hoạt tính riêng của enzyme do tác nhân rửa là dung môi hữu cơ (acetone và ethanol) cao hơn so với ammonium sulfate. Sự khác biệt này có thể do ở nhiệt độ thấp, sự kết hợp giữa dung môi hữu cơ và các phân tử nước trong enzyme làm tăng lực hút giữa các enzyme, các enzyme kết hợp lại với nhau có thể làm ổn định cấu trúc của chúng. Theo Heinicke and Gortner (1957); Su *et al.* (1967) nhiều dung môi hữu cơ như acetone và ethanol đã được sử dụng cho việc kết tủa bromelain. Mặt khác, dung môi hữu cơ sau khi kết tủa các protein có trong dung dịch, chúng bị đuổi ra khỏi tủa dễ dàng khi sấy do nhiệt độ bốc hơi của dung môi thấp, với ammonium sulfate chúng vẫn còn lẫn trong bột enzyme sau khi sấy và với sự hiện diện của ammonium sulfate trong chế phẩm gây ảnh hưởng đến khả năng thủy phân casein của bromelain.

Khối lượng bột enzyme bromelain thô thu được khi rửa bằng ammonium sulfate cao hơn khi rửa bằng acetone và ethanol, mặc dù cả ba tác nhân rửa được tiến hành với một lượng dịch trích ban đầu như nhau. Điều này là phù hợp bởi vì trong bột enzyme còn có sự hiện diện của muối ammonium sulfate, tuy nhiên hoạt tính riêng của enzyme bromelain thô thu được khi rửa bằng ammonium sulfate (11,90 U/mg) gần tương đương với bột enzyme rửa bằng ethanol (13,16 U/mg) và acetone (14,15 U/mg). Với tác nhân rửa là acetone và ethanol khi cho vào dung dịch có protein chúng làm giảm hàng số lưỡng điện, đồng thời làm tăng lực hấp dẫn giữa các phân tử protein có điện tích trái dấu và do đó gây ra kết tủa protein. Mặt khác, dung môi hữu cơ còn hòa tan nhiều trong nước, tương tác với nước, làm giảm lớp nước liên kết với các phân tử protein làm các phân tử protein tụ lại với nhau và tủa xuống. Tuy vậy, dung môi hữu cơ

cũng có thể hòa tan các protein trong những điều kiện thích hợp nên có thể làm giảm lượng tủa thu được cũng như là làm giảm khối lượng bột enzyme thô thu được. Trong khi đó muối ammonium sulfate ở nồng độ cao gây kết tủa protein rất tốt.

Khi tiến hành rửa bromelain bằng dung môi hữu cơ là acetone và ethanol có các bước tương tự nhau. Rửa bằng ammonium sulfate dễ tiến hành hơn vì thao tác đơn giản và có thể thực hiện ngay ở nhiệt độ phòng. Theo Đặng Thị Thu (2004) khi sử dụng dung môi hữu cơ để kết tủa bromelain thì phải tiến hành nhanh ở nhiệt độ lạnh để hạn chế sự mất hoạt tính của protein. Heinicker và Gotner (1957) cũng báo cáo khi dùng acetone để kết tủa bromelain thân và trái thì làm lạnh dịch trích đến nhiệt độ khoảng 0-4°C, còn acetone tinh khiết thì được giữ lạnh -20°C. Pessoa và Kilikian (2005) cho rằng khi thêm ethanol vào dễ dẫn đến sự biến tính enzyme bởi sự hình thành “pockets” của ethanol trong dung dịch. Đây là một trong những yếu điểm mà phương pháp này mang lại. Ngoài ra, rửa bằng dung môi hữu cơ thì tổng thể tích của dịch trích sau khi cho dung môi vào tăng lên rất nhiều so với lượng dịch trích ban đầu (rửa bằng acetone thể tích tăng lên 3 lần so với lượng dịch trích ban đầu, còn với ethanol thể tích tăng lên 5 lần), điều này gây khó khăn trong quá trình lấy tủa ra khỏi dung dịch đặc biệt là khi cần tiến hành kết tủa với quy mô lớn.

Tính toán chi phí để sản xuất ra cùng một lượng đơn vị hoạt tính protease như nhau với các tác nhân kết tủa khác nhau cũng được thực hiện. Về khía cạnh kinh tế, rõ ràng khi rửa bằng dung môi hữu cơ chi phí cao hơn rửa bằng ammonium sulfate (tác nhân rửa là acetone chi phí cao gấp 1,95 lần so với rửa bằng ammonium sulfate, ethanol thì cao gấp

1,90 lần). Điều này một lần nữa cho thấy được sự bất lợi nữa của phương pháp tủa bằng dung môi hữu cơ. Với những kết quả nhận được ở trên có thể thấy rằng sử dụng ammonium sulfate để kết tủa thu bromelain thô từ phần chồi ngọn của trái khóm với quy mô công nghiệp có ưu điểm hơn vì phương pháp này thực hiện đơn giản, không độc hại và chi phí thấp hơn nhiều so với hai tác nhân tủa còn lại.

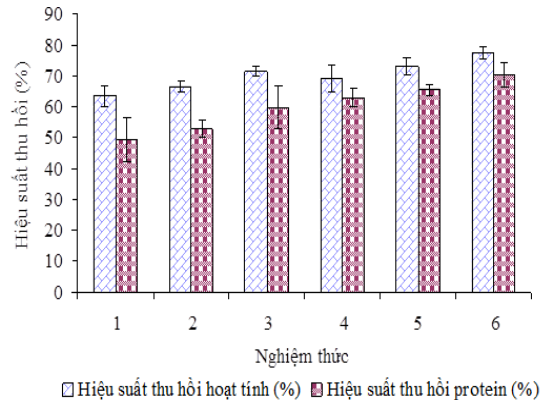
3.2 Ảnh hưởng của nồng độ ammonium sulfate và nhiệt độ kết tủa đến hoạt tính của enzyme bromelain thô

Ammonium sulfate (SA) có thể kết tủa hoàn toàn các protein hoà tan có trong dung dịch. Tuy nhiên, tùy từng loại protein mà chúng có thể bị kết tủa ở những nồng độ ammonium sulfate khác nhau trong đó có bromelain. Hiệu quả của các nồng độ ammonium sulfate (từ 60 - 80%) và nhiệt độ kết tủa (4°C và 27°C) đến hoạt tính và hàm lượng protein của bột enzyme được thể hiện ở Hình 2.

Như đã đề cập, nhiệt độ là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến quá trình trích ly bromelain, đặc biệt khi sử dụng tác nhân kết tủa acetone và ethanol. Tuy nhiên, khi kết tủa bromelain bằng ammonium sulfate thì nhiệt độ khi kết tủa cũng ảnh hưởng đến khả năng duy trì hoạt tính và hàm lượng protein trong dung dịch. Kết quả thu nhận được cho thấy khi kết tủa dịch chồi ngọn bằng ammonium sulfate ở nhiệt độ 4°C thì hoạt tính enzyme và hàm lượng protein được duy trì luôn luôn tốt hơn nhiệt độ 27°C ở bất kỳ nồng độ muối nào, do ở nhiệt độ lạnh (4°C) thì quá trình kết tủa protein và khả năng hạn chế sự biến tính diễn ra tốt hơn. Theo Nguyễn Đình Huyền và *ctv.* (1994) khi nghiên cứu về ảnh hưởng của nhiệt độ kết tủa đến quá trình trích ly bromelain từ trái khóm bằng ammonium sulfate cũng đã khẳng định rằng hoạt tính của chế phẩm trích ly ở nhiệt độ 4°C thường cao hơn ở nhiệt độ 27°C.

Đồng thời kết quả (Hình 2) cũng chỉ ra rằng khi nồng độ muối càng cao thì hiệu suất thu hồi hoạt tính và hiệu suất thu hồi hàm lượng protein càng cao. Ở nồng độ 80% ammonium sulfate cho kết quả thu hồi hoạt tính enzyme và

hàm lượng protein tốt nhất ở cả hai mức nhiệt độ là 4°C và 27°C và kết quả đạt cao nhất tại nồng độ 80% muối ở nhiệt độ 4°C. Tuy nhiên, qua thực nghiệm cho thấy quá trình kết tủa ở nhiệt độ 4°C khó thực hiện vì phải thiết kế và đầu tư phòng lạnh 4°C và phải có trang thiết bị ổn định nhiệt độ môi trường ở 4°C nên rất tốn kém.



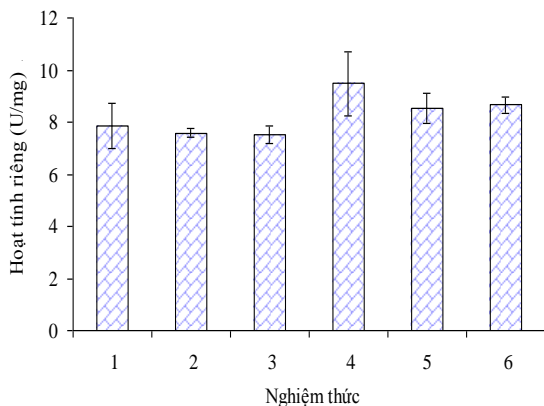
Hình 2: Hiệu suất thu hồi hoạt tính và hàm lượng protein khi kết tủa ở những nồng độ ammonium sulfate và nhiệt độ khác nhau

Ghi chú: Thí nghiệm 1: 60% SA và 27°C; Thí nghiệm 2: 70% SA và 27°C; Thí nghiệm 3: 80% SA và 27°C; Thí nghiệm 4: 60% SA và 4°C; Thí nghiệm 5: 70% SA và 4°C; Thí nghiệm 6: 80% SA và 4°C

Hiệu suất thu hồi hoạt tính enzyme khi tủa bằng ammonium sulfate ở nồng độ 80% bão hòa và nhiệt độ 27°C cho kết quả không có sự khác biệt ý nghĩa với các mẫu kết tủa ở nhiệt độ 4°C ở nồng độ 60 và 70% muối và là giá trị tốt nhất khi kết tủa ở nhiệt độ phòng (27°C). Tuy nhiên, theo Nguyễn Đình Huyền và *ctv.* (1994), khi kết tủa bromelain trái bằng ammonium sulfate ở các nồng độ từ 30 đến 100% đã kết luận rằng ở nồng độ 70% ammonium sulfate cho hiệu suất thu hồi hoạt tính cao nhất. Sự khác biệt kết quả này có thể do trong chồi ngọn trái khóm có chứa hàm lượng protein cao gấp nhiều lần so với các bộ phận khác trong trái khóm, vì vậy ở nồng độ muối thấp hơn 80% khả năng làm kết tủa toàn bộ protein có trong dung dịch chưa diễn ra hoàn toàn, ở nồng độ 80% hầu hết các protein đều bị kết tủa, trong đó có bromelain.

Khảo sát hoạt tính riêng của bột enzyme thu được khi kết tủa bromelain ở những nồng

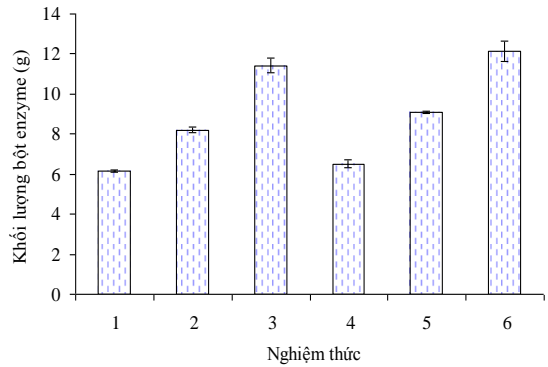
độ ammonium sulfate và nhiệt độ khác nhau kết quả thể hiện ở Hình 3 cho thấy hoạt tính riêng của mẫu kết tủa ở nồng độ 60% ammonium sulfate cao hơn các mẫu được kết tủa với các nồng độ muối còn lại ở cả nhiệt độ 27 và 4°C. Điều này có thể giải thích do ở nồng độ 60% muối thì phần lớn protein có trong dung dịch bị kết tủa là bromelain. Khi tăng nồng độ muối thì hàm lượng protein tạp bị kết tủa sẽ tăng nên làm giảm hoạt tính riêng của mẫu. Hoạt tính riêng của mẫu bromelain kết tủa ở nhiệt độ 4°C cao hơn các mẫu kết tủa ở nhiệt độ 27°C. Nhiệt độ càng cao thì khả năng phá vỡ các liên kết trong cấu trúc của enzyme càng nhiều, sự phá vỡ cấu trúc không gian của enzyme càng mạnh và làm tăng sự mất hoạt tính của enzyme. Nguyễn Đình Huyền và ctv. (1994) cho rằng sự kết tủa bromelain bằng ammonium sulfate ở nhiệt độ thấp là quá trình hoàn toàn thuận nghịch và có thể hạn chế tối đa sự mất hoạt tính của enzyme nhưng nhìn chung kết tủa ở nhiệt độ 27°C cũng không làm giảm đáng kể hoạt tính của enzyme bromelain.



Hình 3: Hoạt tính riêng enzyme khi kết tủa ở những nồng độ SA và nhiệt độ khác nhau

Nghiệm thức 1: 60% SA và 27°C ; Nghiệm thức 2: 70% SA và 27°C ; Nghiệm thức 3: 80% SA và 27°C ; Nghiệm thức 4 : 60% SA và 4°C ; Nghiệm thức 5 : 70% SA và 4°C ; Nghiệm thức 6: 80% SA và 4°C

Khối lượng bột enzyme thu được khi tủa với SA ở các nồng độ và nhiệt độ khác nhau thể hiện ở Hình 4.



Hình 4: Khối lượng bột enzyme thu được khi kết tủa ở các nồng độ chất tủa và nhiệt độ khác nhau

Ghi chú: Nghiệm thức 1: 60% SA và 27°C ; Nghiệm thức 2: 70% SA và 27°C ; Nghiệm thức 3: 80% SA và 27°C ; Nghiệm thức 4 : 60% SA và 4°C ; Nghiệm thức 5 : 70% SA và 4°C ; Nghiệm thức 6: 80% SA và 4°C

Khối lượng của bột enzyme thu được càng nhiều khi mẫu được kết tủa với nồng độ ammonium sulfate càng cao do muối ammonium sulfate ở nồng độ cao tác dụng gây kết tủa protein của chúng tăng lên. Theo báo cáo của Dixon và Webb (1975) thì trong dịch trích thô của enzyme vẫn còn chứa nhiều protein khác có trọng lượng phân tử khác nhau, những thành phần này có thể được tách ra bằng cách kết tủa với ammonium sulfate ở những phân đoạn khác nhau. Khối lượng bột enzyme thu được khi kết tủa ở nhiệt độ 4°C nhiều hơn khi kết tủa ở nhiệt độ 27°C do ở nhiệt độ 27°C khả năng bị biến tính của enzyme vẫn diễn ra làm ảnh hưởng đến hàm lượng protein có trong mẫu.

3.3 Ảnh hưởng của phương pháp sấy đến hoạt tính bột enzyme bromelain thô

Nhiệt độ 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 giảm hoạt tính của enzyme. Kết quả cũng cho thấy có sự khác biệt ý nghĩa về hiệu suất thu hồi hoạt tính enzyme giữa các mẫu sấy bằng phương pháp khác

nhau. Tuy nhiên, sự khác biệt không thể hiện rõ giữa mẫu sấy bằng phương pháp chân không và phương pháp sử dụng H₂SO₄ (Bảng 2).

Bảng 2: Ảnh hưởng của phương pháp sấy đến chất lượng, khối lượng và thời gian sấy bột enzyme bromelain thô

Phương pháp sấy	Hiệu suất thu hồi hoạt tính enzyme (%)	Hoạt tính riêng của enzyme (U/mg)	Khối lượng bột enzyme (g)	Độ ẩm (%)	Thời gian sấy (giờ)
Chân không	74,74±1,30*	10,07±0,29	12,23±0,23	7,91±0,14	9
Sấy bằng H ₂ SO ₄	76,32±1,89	9,88±0,17	11,41±0,33	6,80±0,39	17
Đông khô	85,73±2,26	11,96±0,86	11,01±0,33	4,87±0,62	15

Ghi chú: *STD (độ lệch chuẩn) của giá trị trung bình

Phương pháp sấy đông khô trong 15 giờ hoạt tính enzyme duy trì được 85,73% so với ban đầu và hoạt tính riêng của bột enzyme đạt 11,96 (U/mg). Sấy chân không ở 35°C trong 9 giờ thu được 74,74% hoạt tính so với ban đầu và hoạt tính riêng của bột đạt 10,07 (U/mg). Với phương pháp làm khô (sấy) bột enzyme bằng H₂SO₄ ở nhiệt độ 4-5°C trong 17 giờ thì 76,32% hoạt tính được thu hồi và hoạt tính riêng của enzyme đạt 9,88 (U/mg). Như vậy, hoạt tính của bromelain ổn định hơn khi sấy đông khô do sấy đông khô nhiệt độ của quá trình sấy thấp (-40 °C) nên protein duy trì được cấu trúc và hình thái trong suốt quá trình tách nước. Theo Trần Văn Phú (2001), sấy đông khô giữ lại chất lượng sản phẩm tốt hơn do đông khô làm mất hơi nước của sản phẩm bằng cách chuyển ẩm trực tiếp từ trạng thái rắn sang trạng thái hơi mà không qua trạng thái lỏng ở điều kiện áp suất thấp. Devakate *et al.* (2009) so sánh hiệu quả của sấy phun và sấy đông khô bromelain sau khi tinh sạch kết quả đã thu được 95% hoạt tính được giữ lại sau quá trình sấy đông khô và 78,2% đối với sấy phun.

Sấy chân không cũng là một phương pháp để làm khô tủa bromelain đến độ ẩm có thể bảo quản trong thời gian dài (7,9% căn bản ướt). So với sấy đông khô thì sấy chân không được tiến hành ở nhiệt độ cao hơn nhiều (35°C) nên hoạt tính của bromelain sau khi sấy thấp hơn nhưng so với phương pháp sấy bằng H₂SO₄ ở nhiệt độ 4°C thì kết quả khác biệt không ý nghĩa ở mức độ thống kê 5%. Điều

này do bromelain là enzyme bền nhiệt (nhiệt độ tối thích 55°C) nên ở nhiệt độ khoảng 35°C vẫn giữ được hoạt tính tương đối tốt như ở nhiệt độ lạnh (4°C).

Khối lượng bột enzyme thu được sau quá trình sấy đông khô ít hơn khi sấy chân không và sấy bằng H₂SO₄. Sau khi sấy đông khô bột enzyme có độ ẩm 4,87% căn bản ướt thấp hơn rất nhiều so với sấy chân không sản phẩm có độ ẩm 7,9%, sấy bằng H₂SO₄ độ ẩm của sản phẩm cuối đạt 6,80%. Sự khác biệt về độ ẩm đã gây ra sự khác biệt về khối lượng và ảnh hưởng đến sự ổn định của chế phẩm bromelain trong thời gian bảo quản. Để thực hiện quá trình sấy bột enzyme đến độ ẩm bảo quản an toàn (<8%), phương pháp sấy chân không chiếm thời gian ngắn nhất khoảng 9 giờ, trong khi sấy bằng H₂SO₄ phải mất 17 giờ và phải thay acid thường xuyên, còn khi sấy đông khô thì ngoài thời gian sấy tương đối dài (15 giờ) phương pháp này còn đòi hỏi mẫu trước khi đưa vào sấy phải được làm lạnh đông đến -20°C và thiết bị sấy đông khô quá trình vận hành phức tạp, đắt tiền nên trong thực tế chưa được sử dụng rộng rãi. Khảo sát hoạt tính thủy giải của bột enzyme thành phẩm và bột enzyme thương mại của Merck (Bảng 3) cho thấy hoạt tính tổng trong 1 g bột enzyme thành phẩm thấp hơn bột enzyme thương mại (Merck) nhưng hoạt tính riêng của enzyme thành phẩm cao hơn enzyme thương mại. Như vậy, nếu sử dụng enzyme thành phẩm để thủy phân protein thì hiệu quả thủy giải sẽ cao hơn enzyme thương mại (Merck).

Bảng 3: So sánh bột enzyme bromelain thành phẩm và bột enzyme thương mại

Loại bromelain	Hoạt tính trong 1 g enzyme (TU/g)	Hoạt tính riêng (TU/mg protein)
Bromelain thành phẩm	1705 ^a	15,48 ^a
Bromelain thương mại (Merck)	1950 ^b	10,55 ^b

Ghi chú: Số liệu là trung bình của 3 lần lặp lại. Trong cùng 1 cột những số có chữ giống nhau là không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% ($p \leq 0.05$)

4 KẾT LUẬN

Bromelain có hiện diện trong tất cả các phần phụ phế phẩm của khóm Cầu Đúc và có mặt nhiều nhất trong phần chồi ngọn của trái khóm.

Kết tủa bromelain chồi ngọn bằng acetone cho kết quả 82,86% hoạt tính enzyme được thu hồi. Kết tủa bằng ethanol 79,19% hoạt tính được duy trì so với ban đầu. Kết tủa bằng ammonium sulfate hiệu suất thu hồi hoạt tính enzyme đạt 66,19%.

Nồng độ ammonium sulfate và nhiệt độ kết tủa dịch chồi ngọn thích hợp là 80% (w/v) bão hòa và 27°C.

Thời gian cho ammonium sulfate vào dịch trích là 45 phút cho kết quả duy trì hoạt tính và hoạt tính riêng cao nhất.

Sấy chân không ở 35°C trong 9 giờ thu được bột bromelain thành phẩm có màu trắng, độ ẩm < 8%, hiệu suất thu hồi hoạt tính enzyme đạt 74,74%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Devakate R.V., V.V.Patil, S.S., T.Waje, B.N.Thorat. 2009. Purification and drying of bromelain. *In: Separation and purification Technology.* 64, 259–264.
- Dixon M. and Webb E.E. 1975. *Enzyme*, New York, Academic press.
- Drauz.K, Groger.G, May.O. 2011. *Enzyme catalysis in organic synthesis*. Willey-VCH.
- Đặng Thị Thu, Lê Ngọc Tú, Tô Kim Anh, Phạm Thu Thủy, Nguyễn Thị Xuân Sâm. 2004. Công nghệ enzyme. NXB Khoa học Kỹ thuật Hà Nội. 16, 230-231.
- Evens M. 2006. Extraction et formulation de la bromelain d’ananas. Travail de fin d’études DEA. Université catholique de Louvain.
- Heinicke R.M and Gortner W.A. 1957. Stem bromelain-A new protease preparation from pineapple 417 plants, *Econ. Bot.* 11, 225-234.
- Huali N., S. Li, Y. Zhou, T. Chen, Z. He, S. Su, H. Zhang, Y. Xue, L. Zhu. 2008. Purification of bromelain using immobilized metal affinity membranes. *Journal of Biotechnology* 136S, 402–459.
- Kunitz M. 1974. Determination of proteolytic activity by the casein digestion method. *J. Gen. Physiol.* 30, 291.
- 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.
- Nguyễn Bá Mùi. 2002. Nghiên cứu phụ phẩm dứa ủ chua làm thức ăn gia súc. Luận án tiến sĩ nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp, Hà Nội.
- 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.
- Pessoa Jr. A. and B.V. Kilikian. 2005. *Purificação de Produtos Biotecnológicos*, Manole, São Paulo, 403 1st edition.
- Rabelo A.P.B, Tambourgi E.B, Pessoa Jr.A. 2004. Bromelain partitioning in twophase aqueous systems containing PEO-PPO-PEO block copolymers, *J. Chromatogr.*, B 807, p. 61-68.

15. Ravindra Babu, B., Rastogi N.K. and Raghavaram K.S.M.S. 2008. Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 47, 83-89.
16. Soares, Paulo A.G., A.F.M. Vaz, M.T.S. Correia, A. Pessoa Jr, M. G. Carneiro-da-Cunha. 2012. Purification of bromelain from pineapple wastes by ethanol precipitation. *In: Separation and Purification Technology*. Elsevier.
17. Tochi B.N, Wang Z, Xu S-Y and Zhang W, 2008, Therapeutic application of pineapple protease (bromelain): Review, *Pakistan journal of nutrition*, 7(4): 523-520.
18. Trần Văn Phú. 2001. Tính toán và thiết kế hệ thống sấy, Nhà xuất bản Giáo dục.