

# NGHIÊN CỨU QUI TRÌNH ĐIỀU CHẾ BỘT ENZYME PAPAİN THÔ TỪ NHỰA ĐU ĐỦ

Nguyễn Phú Thọ và Dương Thị Hương Giang<sup>1</sup>

## ABSTRACT

*This research aimed at studying the preparation procedure of crude papain powder from fresh papaya latex. Suitable conditions for drying of the fresh papaya latex were spray-drying at 65°C within 10 hours, and the dried papaya latex obtained could be preserved for a period of 9 months at 5°C. Water was the best solvent for the extraction of enzyme papain from the dried latex with a ratio of 20ml water per gram dried latex. Different solutions such as 5% Sorbitol, 5% sucrose, 3% manitol, 3% or 4% maltodextrin could be used for the protection of papain activity during freeze-drying. In spray-drying the papain enzyme activity remained unchanged at the temperature of 100°C in the presence of 4% maltodextrin. The obtained crude papain enzyme powder could be preserved for a period of 6 months at 5°C.*

**Keywords:** *papaya latex, papain, maltodextrin, freeze-drying, spray-drying*

**Title:** *Studying the preparation procedure of crude papain powder from papaya latex*

## TÓM TẮT

*Đề tài nhằm nghiên cứu qui trình điều chế bột papain thô từ nhựa đu đủ. Kết quả nghiên cứu cho thấy có thể sấy phun nhựa đu đủ tươi ở nhiệt độ 65°C trong 10 giờ. Nhựa đu đủ khô có thể bảo quản ở 5°C trong 9 tháng. Nước cất là dung môi thích hợp để trích ly enzyme papain thô từ nhựa đu đủ khô với tỉ lệ 20ml nước trên 1g nhựa khô. Các dung dịch như 5% sorbitol, 5% sucrose, 3% manitol hay 4% maltodextrin có thể bảo vệ enzyme không mất hoạt tính trong quá trình đông khô. Trong điều kiện sấy phun enzyme papain bền về mặt hoạt tính ở nhiệt độ 100°C với sự hiện diện của maltodextrin 4% (w/v). Bột enzyme papain thô thành phẩm có thể bảo quản trong khoảng thời gian 6 tháng ở 5°C.*

**Từ khóa:** *nhựa đu đủ, papain, maltodextrin, đông khô, sấy phun*

## 1 GIỚI THIỆU

Papain (EC 3.4.22.2) là enzyme cystein protease được li trích từ nhựa cây đu đủ. Papain được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau như: Công nghiệp thực phẩm, dược phẩm, công nghệ hóa chất,...

Trong công nghiệp thực phẩm, papain được sử dụng để làm mềm thịt, cá trước khi đóng hộp, làm tăng giá trị cảm quan của thực phẩm. Theo Nielsen và Olsen (2002) thì papain có khả năng làm mềm thịt tốt hơn protease từ vi sinh vật. Trong sản xuất bia, papain được sử dụng để ngăn chặn hiện tượng vẩn đục của bia trong giai đoạn ổn định sản phẩm. So với các phương pháp xử lý cạnh khác thì việc sử dụng papain đơn giản, dễ thực hiện và có giá thành thấp. Ngoài ra, có thể sử dụng papain vào trong quá trình sản xuất nước mắm để rút ngắn thời gian lên men. Papain còn có thể ứng dụng làm đông tụ sữa và giảm độc tố (Đỗ Tất Lợi, 1986).

<sup>1</sup> Viện NC & PTCNSH, Trường Đại học Cần Thơ

Trong dược phẩm, người ta có thể sử dụng papain như là chất trợ tiêu hóa, thuốc tẩy giun, điều trị bệnh bỏng mắt, đục thủy tinh thể (Albert và Philippe, 1998).

Trong công nghiệp mỹ phẩm, nhờ khả năng thủy phân các tế bào chết mà papain được sử dụng như là chất làm sạch và trắng da, chất làm liền sẹo sinh học (Nguyễn An Tường, 2003).

Trong công nghiệp sản xuất chất tẩy rửa, kem đánh răng, papain được sử dụng như chất bổ sung để làm sạch các chất bẩn có nguồn gốc protein.

Theo Helmut (1998) thì những quốc gia sản xuất nhiều papain là Ấn Độ, Srilanka, Zaire, Uranda. Sản lượng papain thô hàng năm khoảng 500 tấn trị giá trên 15 triệu USD.

Ở Việt Nam, đặc biệt là vùng Đồng bằng Sông Cửu Long, cây đu đủ được trồng nhiều nhưng chủ yếu để lấy quả chín hoặc làm dưa. Việc sử dụng đu đủ như là nguồn enzyme vẫn còn hạn chế. Hiện nay trên thị trường vẫn có chế phẩm papain thương mại do các công ty lớn của nước ngoài sản xuất như Merck, Sigma nhưng giá thành khá cao. Vì vậy đề tài nhằm mục đích xây dựng quy trình đơn giản, ít tốn kém để sản xuất ra chế phẩm papain dạng bột, nhằm đáp ứng nhu cầu sử dụng enzyme trong nước, đồng thời làm tăng giá trị kinh tế từ cây đu đủ.

## 2 NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Nguyên liệu

+ *Nhựa đu đủ*

Nhựa được thu từ giống đu đủ (*Carica papaya L.*) trồng tại huyện Chợ Mới, An Giang. Nhựa đu đủ lấy ở quả xanh khoảng 10 tuần tuổi. Thu nhựa vào lúc sáng sớm. Dùng dao inox có đầu nhọn rạch dọc theo quả ở chỗ đường kính quả to nhất, các lát cắt cách nhau 3-5cm, không sâu quá 2cm. Hứng lấy nhựa chảy ra bằng cốc thủy tinh, sau khi lấy nhựa xong đậy kín và bảo quản lạnh ở nhiệt độ -20°C.

+ *Hóa chất*

Coomasie Brilliant Blue (CBB) G250 (Merck), Cystein (Sigma), Casein (Sigma), Trichloroacetic acid (TCA) (Prolabo), EDTA, Glucose (Trung Quốc), Sorbitol (Công nghiệp), Manitol (Merck), Sucrose (Biên Hòa), Maltodextrin (Công nghiệp), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> và Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck)

### 2.2 Phương pháp

#### 2.2.1 Xác định hàm lượng protein

Hàm lượng protein được xác định theo phương pháp Bradford (1996).

#### 2.2.2 Xác định hoạt tính papain

Hoạt tính enzyme papain được xác định dựa theo phương pháp Kunitz (1947) cải tiến, sử dụng casein làm cơ chất thủy phân và đã được điều chỉnh để có thể thực hiện trong ống eppendorf. Cho vào các ống eppendorf 600 µl 1% (w/v) casein + 40 µl Cystein 20mM + 140µl đệm phosphate (pH = 7,5) + 20µl enzyme. Ống đối chứng enzyme sử dụng enzyme bất hoạt. Ủ lắc 10 phút, 37°C. Ly tâm 13.000rpm,

10 phút. Ức chế phản ứng bằng 600 $\mu$ l TCA%. Dung dịch được đo độ hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 275nm trên quang phổ kế U-1500 (Hitachi, Japan)

Đơn vị hoạt tính papain: Một đơn vị hoạt tính của papain (Tyrosin Unit (TU)) là lượng enzyme cần thiết để thủy phân casein cho ra 1 $\mu$ g tyrosine trong 1 phút ở 37°C, pH =7,5.

Hoạt tính riêng: là số đơn vị hoạt tính của enzyme trên 1 mg protein (U/mg).

### 2.2.3 Xác định ẩm độ

Xác định ẩm độ theo phương pháp sấy đến khối lượng không đổi. Phần trăm độ ẩm X được tính bằng công thức:  $X=100*(G_1-G_2)/(G_1-G)$ . Trong đó:

$G_1$  là khối lượng của mẫu và cốc trước khi sấy.

$G_2$  là khối lượng của mẫu và cốc sau khi sấy.

G là khối lượng của cốc.

### 2.2.4 Sấy khô và bảo quản nhựa đu đủ

Nhựa đu đủ được trải mỏng đều trên các khay nhựa. Khối lượng nhựa trên mỗi khay là 1kg. Tiến hành sấy ở các nhiệt độ 35, 45, 55, 65, 75 và 85°C. Hoạt tính papain trong nhựa được xác định ở các thời điểm sấy 0, 2, 6, 10, 14, 18, 22, và 26 giờ .

Nhựa đu đủ sau khi sấy ở điều kiện thích hợp được bố trí bảo quản trong bọc nilon tránh ánh sáng ở các nhiệt độ 27°C, 5°C và -20°C. Xác định hoạt tính enzyme trong nhựa khô trong thời gian từ 1-9 tháng bảo quản.

### 2.2.5 Trích ly papain từ nhựa đu đủ khô

Enzyme papain trong nhựa đu đủ sấy khô được ly trích bằng nước cất và đệm phosphate 50mM, pH=7,0. Nước cất hoặc đệm được cho lần lượt vào các cốc chứa 1g nhựa khô với thể tích khác nhau 10, 20, 30, 40, 50 và 60ml. Khuấy đều trên máy khuấy từ trong 30 phút. Sau đó ly tâm ở 13.000vòng/phút, trong 10 phút, 4°C. Bỏ cặn, lấy dịch enzyme trong bên trên để xác định hoạt tính papain.

### 2.2.6 Ảnh hưởng của chất bảo quản lên hoạt tính papain trong quá trình đông khô

Papain được trích ly từ nhựa khô bằng nước cất với tỷ lệ nhựa khô: nước thích hợp. 5 cốc, mỗi cốc chứa 20ml dung dịch enzyme, được bổ sung các chất bảo vệ khác nhau là sorbitol 5%, sucrose 5%, manitol 3% và maltodextrin 4% (w/v), cốc đối chứng không có chất bảo vệ. Sau đó dung dịch papain được sấy đông khô. Kiểm tra hoạt tính enzyme sau khi sấy.

### 2.2.7 Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính papain trong quá trình sấy phun và bảo quản bột papain

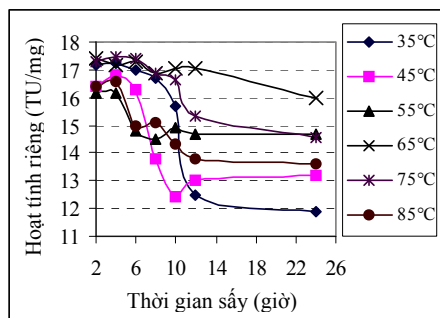
Nhựa khô được ly trích bằng nước cất với tỷ lệ nhựa khô: nước thích hợp. Dung dịch sau khi trích ly được bổ sung chất bảo vệ maltodextrin với nồng độ 4% (w/v). Mẫu đối chứng không có chất bảo vệ. Tiến hành sấy phun ở các nhiệt độ từ 100°C đến 170°C. Kiểm tra hoạt tính enzyme sau khi sấy.

Bột papain sau khi sấy phun ở 100°C được bố trí bảo quản trong bọc nylon tránh ánh sáng ở các nhiệt độ 27°C, 5°C và -20°C. Ghi nhận thay đổi hoạt tính enzyme theo thời gian bảo quản.

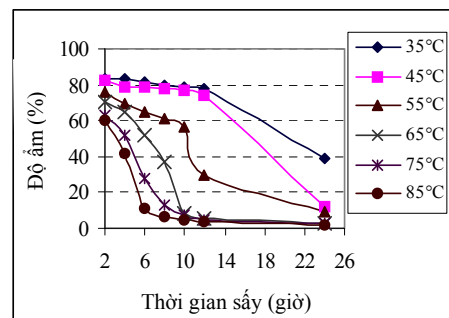
### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian lên quá trình sấy khô nhựa đu đủ

Nhiệt độ và thời gian sấy là hai nhân tố quyết định chất lượng của nhựa khô. Nhiệt độ cao có thể gây biến tính và làm mất hoạt tính enzyme. Ngược lại sấy ở nhiệt độ thấp ẩm độ của nhựa sẽ cao, khó bảo quản và enzyme cũng bị giảm hoạt tính do quá trình tự thủy phân trong nhựa ẩm theo thời gian. Kết quả khảo sát hoạt tính riêng của papain theo nhiệt độ và thời gian sấy (Hình 1) cho thấy hoạt tính của papain khá ổn định ở 65-75°C trong khoảng 10 giờ sấy. Ở nhiệt độ cao hay thấp hơn hoạt tính papain giảm mạnh theo thời gian. Khảo sát biến đổi ẩm độ của nhựa theo nhiệt độ và thời gian (Hình 2) cũng cho thấy ẩm độ của nhựa có thể đạt dưới 10% ở các nhiệt độ 65°C; 75°C trong thời gian sấy là 10 giờ. Như vậy kết hợp giữa hai nhân tố ẩm độ và hoạt tính papain trong nhựa khô có thể thấy điều kiện để sấy nhựa đu đủ là nhiệt độ trong khoảng 65-75°C, thời gian sấy 10 giờ là tốt nhất để độ ẩm nhựa thô dưới 10% và hoạt tính enzyme vẫn ổn định (chỉ giảm 3% so với ban đầu). Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Krishnaiah *et al.* (2002), mặc dù có khác nhau về phương pháp sấy, theo tác giả nhựa đu đủ có thể được sấy chân không trong khoảng nhiệt độ 65°C-80°C.



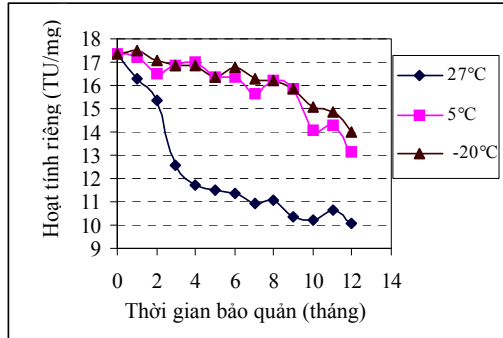
Hình 1: Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính riêng của papain trong nhựa đu đủ tươi theo thời gian sấy



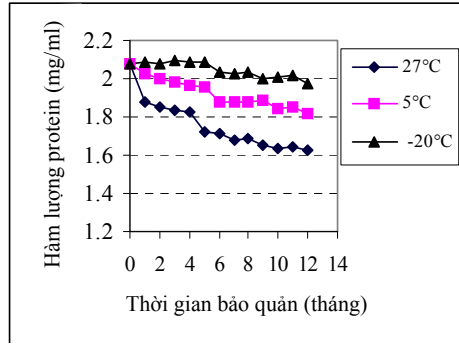
Hình 2: Biến đổi ẩm độ trong nhựa đu đủ tươi theo thời gian sấy

### 3.2 Điều kiện tồn trữ nhựa khô

Theo kết quả ở Hình 3 thì hoạt tính papain trong nhựa khô giảm nhanh (11%) sau 2 tháng bảo quản ở nhiệt độ 27°C. Với nhiệt độ 5°C và -20°C thì hoạt tính papain



Hình 3: Biến đổi hoạt tính riêng của papain trong nhựa khô theo thời gian bảo quản

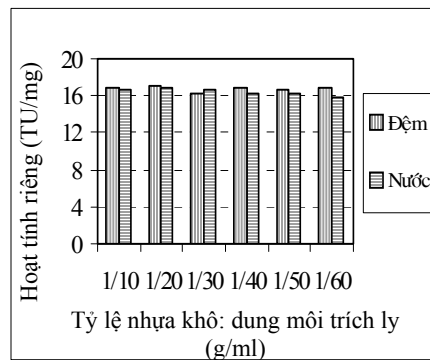


Hình 4: Biến đổi hàm lượng protein trong nhựa khô theo thời gian bảo quản

trong nhựa giảm chậm sau 9 tháng bảo quản và bắt đầu giảm nhanh ở tháng thứ 10. Về hàm lượng protein, kết quả khảo sát (Hình 4) cho thấy lượng protein trong nhựa khô giảm nhanh khi bảo quản ở nhiệt độ 27°C và 5°C. Ở -20°C thì hàm lượng protein giảm chậm. Có thể thấy ở nhiệt độ phòng và ngay cả ở 5°C các enzyme protease vẫn hoạt động và tác động lên protein/enzyme có trong nhựa. Nhiệt độ -20°C kìm hãm hoạt động của các protease tốt hơn. Như vậy nhựa đu đủ khô có thể bảo quản ở nhiệt độ 27°C chỉ trong hai tháng, còn ở nhiệt độ thấp hơn 5°C hay -20°C thời gian tồn trữ sẽ kéo dài hơn (9 tháng). Tương tự, theo Krishnaiah *et al.* (2002), sản phẩm nhựa đu đủ khô sau khi sấy chân không có thể bảo quản ở 5°C khoảng 6-12 tháng.

### 3.3 Trích ly papain từ nhựa đu đủ sấy khô

Enzyme thô papain có thể tách từ nhựa khô bằng các dung dịch đệm thích hợp. Nhằm mục đích tìm biện pháp đơn giản với dung môi trích ly không độc hại và ít tốn kém, papain từ nhựa đu đủ khô được trích ly bằng nước cất và dung dịch đệm phosphate 50mM, pH 7,0. Kết quả phân tích Anova (Hình 5) cho thấy hoạt tính papain không khác biệt có ý nghĩa ở mức độ thống kê 5% khi trích ly từ nhựa sấy



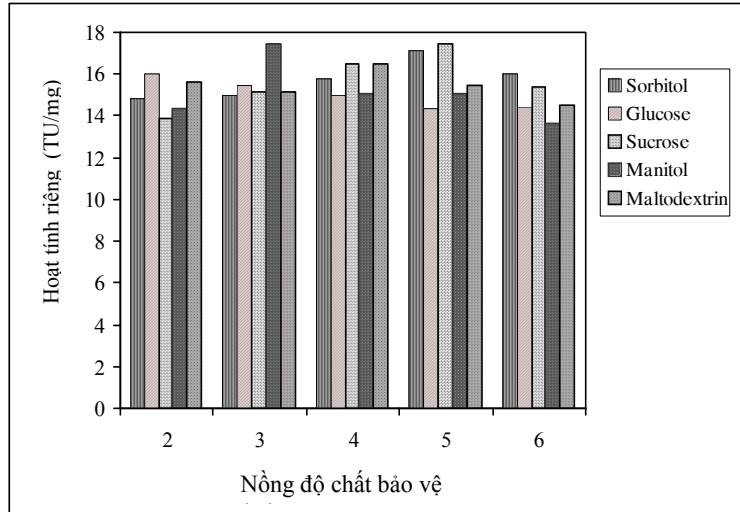
Hình 5: Biến đổi hoạt tính riêng papain theo tỉ lệ dung môi trích ly

khô bằng dung dịch đậm hay nước ở các tỉ lệ trích ly khác nhau.

Tuy nhiên, thực nghiệm cho thấy tỉ lệ nhựa khô: dung dịch trích ly tương ứng 1g:20ml là thích hợp nhất. Ở tỉ lệ trích ly thấp hơn dung dịch huyền phù khá đậm đặc, có độ nhớt cao, hiệu suất enzyme thu hồi thấp. Ở tỉ lệ trích ly cao hơn dung dịch enzyme nhận được với thể tích lớn thời gian sấy khô kéo dài hơn.

### 3.4 Ảnh hưởng của chất bảo vệ lên hoạt tính papain trong quá trình đông khô

Trong quá trình đông khô enzyme có thể mất hoạt tính và kém bền với thời gian.

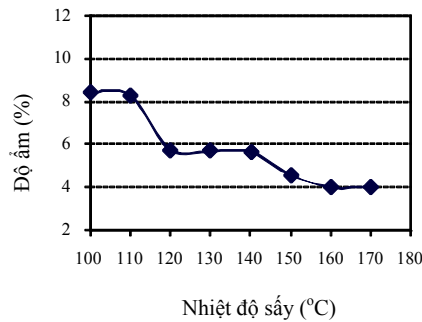
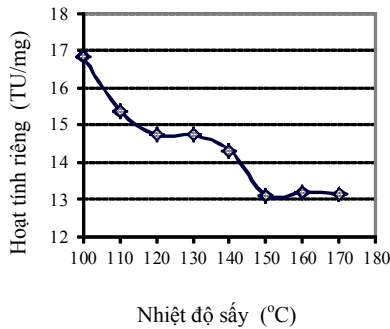


**Hình 6: Ảnh hưởng của các chất bảo quản khác nhau và nồng độ của chúng lên hoạt tính riêng của papain trong quá trình đông khô**

Một số nghiên cứu cho thấy các hợp chất polyol có khả năng bảo vệ rất tốt khi đông khô các hợp chất sinh học như protein, enzyme hay tế bào vi sinh vật (Zhao và Zhang, 2005). Khảo sát ảnh hưởng của các chất bảo vệ như sorbitol, glucose, sucrose, manitol và maltodextrin với các nồng độ khác nhau cho thấy các sản phẩm papain thô nhận được ở dạng bột khô và không bị hút ẩm trở lại, trừ glucose. Kết quả (Hình 6) cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa ở mức độ thống kê 5% giữa các chất bảo vệ khác nhau ở các nồng độ khác nhau. Hoạt tính riêng của papain là 17,16 TU/mg với sorbitol 5%, 17,48 TU/mg với sucrose 5%, 17,45 TU/mg với manitol 3% và 16,49 TU/mg với maltodextrin 4%, không có chất bảo vệ hoạt tính riêng là 14,45 TU/mg. Như vậy hoạt tính của papain ổn định tốt hơn trong quá trình đông khô có chất bảo vệ. Có khả năng các hợp chất polyol liên kết với enzyme thông qua tương tác hydro thay cho lớp áo nước bên ngoài phân tử enzyme, giúp ổn định cấu trúc, phân tử enzyme không bị biến tính khi mất nước trong quá trình sấy khô. So với kết quả nghiên cứu của Trần Anh Dũng (2006) thì mannitol 5% giúp ổn định hoạt tính tốt cho bromelain trích ty từ quả khóm (protease cùng nhóm với papain). Và theo Zhao và Zhang (2005) 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, thêm vào đó giá thành lại cao so với maltodextrin. Do

đó maltodextrin có thể được xem như là chất bảo vệ an toàn có nhiều ưu điểm như giá thành thấp, không bị caramel hóa, là một chất phụ gia thường được dùng trong công nghệ chế biến thực phẩm và có khả năng bảo vệ papain khá tốt trong quá trình đông khô.

**3.5 Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính papain trong quá trình sấy phun**



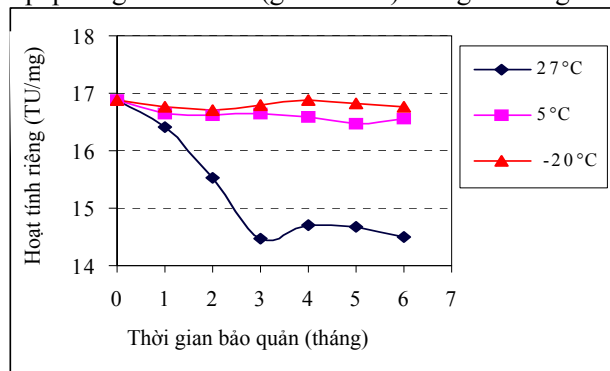
**Hình 7: Thay đổi hoạt tính đặc hiệu papain theo nhiệt độ trong quá trình sấy phun**

**Hình 8: Thay đổi độ ẩm sản phẩm theo nhiệt độ trong quá trình sấy phun**

Sấy phun cũng là một biện pháp để bảo quản sản phẩm trong thời gian lâu, so với đông khô sấy phun nhanh hơn và chi phí thấp hơn. Khảo sát hoạt tính của papain với chất bảo vệ là maltodextrin 4% ở các nhiệt độ sấy phun khác nhau (Hình 7) cho thấy hoạt tính enzyme ổn định (16,82 TU/mg) ở nhiệt độ 100°C (tương ứng với nhiệt độ đầu ra 80°C). Nhiệt độ này phù hợp với báo cáo của Piggott (2002). Theo tác giả sấy phun với nhiệt độ đầu ra 80°C có thể được áp dụng để sấy khô một số enzyme chịu nhiệt. Ở nhiệt độ sấy cao hơn 100°C hoạt tính giảm mạnh và bột chuyển màu sẫm. Xác định ẩm độ của bột papain sau khi sấy cho thấy ở nhiệt độ sấy 100°C hàm ẩm của bột đáp ứng đúng yêu cầu bảo quản là trong khoảng 8% (Hình 8).

**3.6 Điều kiện bảo quản bột papain sấy phun thành phẩm**

Bột papain sấy phun thành phẩm được bảo quản ở các nhiệt độ 27°C, 5°C và -20°C. Kết quả xác định hoạt tính riêng (Hình 9) trong bột cho thấy ở nhiệt độ 27°C hoạt tính papain giảm nhanh (giảm 15%) trong 3 tháng đầu tồn trữ. Ở 5°C



**Hình 9: Biến đổi hoạt tính đặc hiệu của papain trong bột thành phẩm theo nhiệt độ và thời gian**

và -20°C hoạt tính vẫn ổn định, không có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê giữa hai nhiệt độ này.

Khảo sát hoạt tính bột papain thành phẩm cho thấy (Bảng 1) hoạt tính riêng của papain thành phẩm khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức độ 5% so với chế phẩm papain thương mại của Merck. Tuy nhiên, số đơn vị hoạt tính papain trong 1mg bột thành phẩm lại cao hơn 4 lần so với bột papain thương mại. Như vậy nếu sử dụng cùng một lượng bột papain như nhau thì bột papain thành phẩm cho hiệu quả thủy phân cao hơn gấp 4 lần so với bột papain thương mại của Merck.

**Bảng 1: So sánh hoạt tính của bột papain thành phẩm với papain thương mại**

Bột papain	Hoạt tính* (TU/mg bột)	Hoạt tính riêng* (TU/mg protein)
Papain thành phẩm	15,83	16,82 <sup>a</sup>
Papain thương mại (Merck)	3,78	17,38 <sup>a</sup>

\* Trung bình ba lần lặp lại

Các ký tự giống nhau trong cùng một cột khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

#### 4 KẾT LUẬN

Đề tài bước đầu đã xây dựng được qui trình thu nhận bột enzyme papain thô từ nhựa đu đủ sấy khô. Do nhựa đu đủ tươi rất dễ bị mất hoạt tính enzyme papain ở nhiệt độ phòng, vì vậy cần thiết phải sấy khô nhựa và bảo quản lạnh (5°C) để có thể sử dụng trong thời gian lâu hơn. Enzyme papain thô có thể được trích ly từ nhựa đu đủ sấy khô đơn giản chỉ bằng nước cất với tỉ lệ 20ml nước trên 1g nhựa khô. Có thể sấy phun hoặc sấy đông khô dịch trích enzyme thô với các chất đường bảo quản khác nhau. Tuy nhiên về mặt kinh tế sấy phun dịch trích ly enzyme papain ở nhiệt độ 100°C với chất bảo vệ là 4% maltodextrin là tối ưu cho sản phẩm, do thời gian sấy phun ngắn hơn và chi phí thấp hơn. Về mặt chất lượng bột enzyme papain thô thành phẩm không thua kém bột thô papain thương mại của Merck trên thị trường. Bột enzyme thành phẩm cần được bảo quản ở nhiệt độ lạnh (khoảng 5°C). Trong tương lai cần nghiên cứu thêm việc ứng dụng sản phẩm này trong các lĩnh vực khác nhau như thực phẩm chức năng (trợ tiêu hóa cho người già và trẻ con), mỹ phẩm (kem tẩy tế bào chết), lên men bia (chống cặn lắng), chế biến thịt và thủy hải sản (làm mềm thịt), hay lên men nước mắm ngăn ngày...

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Albert, L. and D. M. Philippe, 1998. The cystein proteases from the of carica papaya Latex. *Drugs and the pharmaceutical Sciences*. Vol 84, chapter 6, 107 - 129 pharmaceutical Enzymes. University of Ghent. Belgium.
- Arnon, R., 1970. Papain. *Methods in Enzymology* Vol. 19, G. Perlmann and L. Lorand, Academic Press, NY, 226
- Balls, A. and H. Lineweaver, 1939. Isolation and Properties of Crystalline Papain. *J Biol Chem* 130, 669.
- Barrett, A. and D. Buttle, 1985. Names and Numbers of Papaya Proteinases. *Biochem J* 228.



- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Đỗ Tất Lợi, 1986. *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Hà Nội: Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật.
- Helmut, U., 1998. *Industrial enzymes and their applications*. John Wiley & Sons, Inc.147-150
- Krishnaiah D., B. Awang, S. Rosalam and A. Buhri, 2002. Commercialisation of papain enzyme from papaya. Omar, R., Ali Rahman, Z., Latif, M.T., Lihan, T. and Adam J.H. (Eds.): 244-250 *Proceedings of the Regional Symposium on Environment and Natural Resources (Vol. 1)* 10-11th April 2002, Hotel Renaissance Kuala Lumpur, Malaysia
- Kunitz M.,1947. Determination of proteolytic activity by the casein digestion method. *J. Gen. Physiol.* 30, 291
- Nguyễn An Tường, 2003. Rau củ quả với sức khỏe và sắc đẹp. *Khoa học phổ thông số 671*, Trang 32.
- Nielsen, P. M. and H. S. Olsen, 2002. Enzymic modification of food protein In *Enzymes in food technology*. Whitehurst, R. J, Ed. UK: Sheffield Academic Press Ltd.
- Piggott, R., 2002. Commercial enzyme production and genetic modification of source organisms In *Enzymes in food technology*. Whitehurst, R. J, Ed. UK: Sheffield Academic Press Ltd.
- Trần Anh Dũng, 2006. Nghiên cứu sản xuất bột bromelain tinh sạch từ phụ phẩm vỏ khóm. Luận văn tốt nghiệp ngành Công nghệ Sinh học. Đại học Cần Thơ.
- Zhao, G. And G. Zhang, 2005. Effect of protective agent, freezing temperature rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freezing-drying.