Bước đầu nghiên cứu tạo enzyme pectinase dạng bột từ *Aspergillus niger* và khảo sát một số đặc tính của chế phẩm

An initial study of powdered pectinase from *Aspergillus niger* and investigation of biochemical characterization of preparation

Đỗ Thị Hiền^{1*}, Huỳnh Phan Phương Trang¹

¹Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

*Tác giả liên hệ, Email: hiendt@cntp.edu.vn

THÔNG TIN	TÓM TẮT
<p>DOI:10.46223/HCMCOUJS.tech.vi.14.1.445.2019</p> <p>Ngày nhận: 14/11/2018 Ngày nhận lại: 21/12/2018 Duyệt đăng: 21/12/2018</p> <p><i>Từ khóa:</i> <i>Aspergillus niger</i>, đặc tính sinh hóa pectinase, pectinase, sấy phun</p> <p><i>Keywords:</i> <i>Aspergillus niger</i>, biochemical characterization pectinase, pectinase, spray drying</p>	<p>Enzyme pectinase dạng bột dễ vận chuyển và bảo quản. Vì vậy, nghiên cứu đã sử dụng enzyme pectinase hoạt tính 194UI/mL từ <i>Aspergillus niger</i> để tạo chế phẩm dạng bột bằng phương pháp sấy phun (nồng độ chất trợ sấy maltodextrin 10% (w/v), nhiệt độ sấy 130°C, tốc độ nhập liệu 288mL/h). Bên cạnh đó, nghiên cứu đã xác định được thông số động học của chế phẩm enzyme Km là 28,4mg/mL, pH tối ưu 5,0, nhiệt độ tối ưu 40°C, Cu²⁺ là chất hoạt hóa và Ag⁺ là chất kìm hãm hoạt động enzyme.</p> <p>ABSTRACT</p> <p>Powdered pectinase is easy to transport and store. Therefore, the study used pectinase enzyme 194UI/mL from <i>Aspergillus niger</i> to produce powdered enzyme preparation by spray drying (10% maltodextrin (w/v), drying temperature 130°C, input speed 288mL/h). In addition, the study determined the kinetic parameters of the enzyme preparation at Km 28,4mg/mL with pH and temperature optimum of 5,0 and 40°C, Cu²⁺ was found to activate and Ag⁺ was the inhibitor of enzyme activity.</p>

1. Đặt vấn đề

Enzyme pectinase được thu nhận chủ yếu nhờ vi nấm, trong đó *Aspergillus niger* được cho là có khả năng sinh nhiều enzyme pectinase khi nuôi cấy trong môi trường thích hợp. Pectinase từ *Aspergillus niger* là enzyme ngoại bào nên việc thu nhận sản phẩm khá thuận lợi và chế phẩm enzyme từ vi sinh vật này được FDA công nhận là an toàn khi ứng dụng trong công nghệ thực phẩm.

Sử dụng enzyme thu nhận từ *Aspergillus* spp. có khả năng cải thiện hiệu suất thu hồi, làm trong và làm giảm độ nhớt của dịch đu đủ (Nakkeeran, Umesh-Kumar, & Subramanian,

2011). Bên cạnh đó, Kant, Vohra, và Gupta (2013) đã sử dụng enzyme này để làm trong dịch ép ổi. Polygalactorunase thu nhận từ *Aspergillus niger* nuôi cấy trên nguồn cơ chất vỏ chuối có tác dụng làm trong dịch ép chuối (Barman, Sit, Badwaik, & Deka, 2015). Sử dụng Polygalactorunase từ *Neosartorya fisheri* làm trong dịch ép táo và dâu (Pan et al., 2015). Ngoài ra pectinase được xem như là một trong những chế phẩm enzyme quan trọng trong sản xuất rượu vang và nước trái cây lên men có độ cồn thấp (P. N. M. Nguyen, Che, Ly, & Chau, 2011). Trong sản xuất cà phê và ca cao, người ta dùng chế phẩm pectinase để hỗ trợ quá trình tách lớp keo ở trên bề mặt của hạt (Tran, Duong, & Le, 2012). Trong ngành công nghiệp giấy pectinase làm tăng hiệu quả khử lignin và làm sang màu bột giấy (Ahlawat, Mandhan, Dhiman, Kumar, & Sharma, 2008).

Sấy phun là công nghệ tạo sản phẩm dạng bột, thời gian sấy ngắn, dễ sản xuất ở quy mô công nghiệp. Sấy phun là hình thức bao gói có sử dụng chất trợ sấy (Desai & Park, 2005). Chất trợ sấy là yếu tố làm giảm ảnh hưởng của nhiệt độ đối với các protein trong quá trình sấy. Đồng thời, chất trợ sấy bảo vệ enzyme tránh khỏi tác động của nhiệt độ, pH khi sử dụng trong các điều kiện khác nhau (Cabral, Said, & Oliveira, 2009). Maltodextrin là chất trợ sấy được sử dụng phổ biến hiện nay và không làm ảnh hưởng đến tác nhân cần sấy, giá thành rẻ.

Nghiên cứu mong muốn sử dụng chế phẩm enzyme pectinase từ *Aspergillus niger* được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung vỏ cam - nguồn nguyên liệu giàu pectin, một phụ phẩm thường bị bỏ đi hoặc làm phân bón hữu cơ sau khi ép lấy nước. Để thuận tiện trong quá trình sử dụng và bảo quản, tiến hành tạo chế phẩm enzyme pectinase dạng bột bằng phương pháp sấy phun. Bên cạnh đó, để có hướng sử dụng chế phẩm enzyme dạng bột, nhóm nghiên cứu đã tiến hành xác định một số yếu tố: thông số động học, nhiệt độ, pH, các chất hoạt hóa và ức chế có ảnh hưởng đến hoạt động enzyme.

2. Đối tượng, vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu

Chế phẩm enzyme pectinase thu nhận từ *Aspergillus niger* (Huynh & Do, 2018).

Maltodextrin DE 10 của Himedia (Ấn Độ).

2.2. Phương pháp

2.2.1. Chuẩn bị chế phẩm enzyme (Huynh & Do, 2018)

Nuôi cấy *Aspergillus niger* trong môi trường lỏng với vỏ cam 80g/L (hàm lượng pectin 0,72g/L) - sử dụng vỏ cam trắng (phế phẩm nhà máy sản xuất nước ép cam), tỷ lệ vỏ cam:glucose là 4:2, nguồn nitrogen thích hợp là peptone 4% (w/v), tỷ lệ giống 2% (v/v) với mật độ giống 10^7 bào tử/mL, pH 5,0 và thời gian nuôi cấy 72 giờ.

Dịch nuôi cấy được ly tâm với tốc độ 4500 vòng/phút trong 15 phút, thu dịch enzyme và xác định hoạt tính theo Mohsen, Bazaraa, và Doukani (2009) là 194UI/mL.

2.2.2. Các phương pháp phân tích

- Xác định độ ẩm bằng cân sấy ẩm Ohaus MB 45.
- Phương pháp xác định hoạt tính enzyme pectinase (Mohsen et al., 2009).

Cho enzyme tác dụng với cơ chất pectin, sản phẩm tạo thành là acid galacturonic tạo màu với thuốc thử DNS (Dinitrosalicylic acid), đo mật độ quang ở bước sóng 575nm.

Hoạt tính enzyme pectinase đo bởi lượng đường khử được cắt ra từ pectin bằng phương pháp Dinitrosalicylic acid. Một đơn vị hoạt tính enzyme pectinase được đo bởi 1 μmol galacturonic acid giải phóng trong 1 phút trên 1mL. Sử dụng đường chuẩn D-galacturonic acid.

- Xác định hàm lượng protein bằng phương pháp Bradford dựa trên phản ứng của thuốc nhuộm Coomassie Blue G250 với protein (Walker, 1996).

2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ chất trợ sấy

Chuẩn bị 50mL dịch enzyme pectinase, bổ sung maltodextrin với nồng độ 10, 15, 20, 25, 30% vào, khuấy tan hoàn toàn maltodextrin. Các mẫu trên sẽ được sấy phun ở 140°C, tốc độ nhập liệu là 252mL/h. Xác định độ ẩm (%), hoạt tính enzyme (UI/g) và hàm lượng protein (mg/g).

2.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ sấy

Chuẩn bị 50mL dịch enzyme pectinase, bổ sung maltodextrin với nồng độ thích hợp thí nghiệm 2.3. Sấy phun enzyme ở nhiệt độ sấy từ 120°C đến 170°C (bước nhảy 10°C), tốc độ nhập liệu là 252mL/h. Xác định độ ẩm (%), hoạt tính enzyme (UI/g) và hàm lượng protein (mg/g).

2.2.5. Khảo sát ảnh hưởng của tốc độ bơm nhập liệu

Chuẩn bị 50mL dịch enzyme pectinase, bổ sung maltodextrin với nồng độ thích hợp thí nghiệm 2.3, sấy phun enzyme pectinase với nhiệt độ thích hợp thí nghiệm 2.4, tốc độ nhập liệu từ 180-360mL/h (bước nhảy 36mL/h). Xác định độ ẩm (%), hoạt tính enzyme (UI/g) và hàm lượng protein (mg/g).

2.2.6. Xác định thông số động học của enzyme

Tiến hành theo Bảng sau:

Bảng 1

Xác định thông số động học của enzyme

Hóa chất	Đơn vị	Các ống nghiệm					
		0	1	2	3	4	5
Pectin 1%	ml	0	1	2	3	4	5
Đệm pH = 5	ml	5	4	3	2	1	0
Pectinase 2%	ml	5	5	5	5	5	5
Đề yên ở 37°C trong 30 phút							

Hóa chất	Đơn vị	Các ống nghiệm					
		0	1	2	3	4	5
Đun cách thủy 3 phút, làm nguội, lọc lấy dịch bên dưới							
Hóa chất	Đơn vị	Các ống nghiệm					
		0'	1'	2'	3'	4'	5'
Dịch lọc	ml	1	1	1	1	1	1
Thuốc thử DNS	ml	3	3	3	3	3	3
Bịt ống nghiệm bằng giấy nhôm, đun cách thủy 15 phút							
Làm lạnh đến nhiệt độ phòng							
Đo OD tại $\lambda = 575\text{nm}$							
Chú ý: Ống 0 là ống kiểm chứng, các ống khác là ống nghiệm							

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Lượng sản phẩm tạo thành được xác định dựa vào đường chuẩn D galacturonic theo phương pháp (Miller, 1959). Qua đó xây dựng đồ thị của phương trình Lineweaver - Burk, từ đó xác định được thông số động học Km và Vmax của enzyme pectinase.

2.2.7. Khảo sát ảnh hưởng của pH

Sử dụng 1mL pectin 1% và 0,5mL dung dịch enzyme trong các bộ đệm khác nhau nồng độ 100mM ở khoảng pH 1,0-10,0, ở 37°C trong 30 phút. Thêm 3ml DNS, bịt ống nghiệm bằng giấy nhôm, đun cách thủy 15 phút, để nguội ở nhiệt độ phòng, đo OD tại $\lambda = 575\text{nm}$.

Các loại đệm: hydrochloric acid-potassium chloride (pH 1,0-2,0), citrate - phosphate (pH 3,0 - 7,0), sodium phosphate (pH 8,0), glycine-sodium hydroxide (pH 9,0-10,0).

Xác định hoạt tính enzyme (UI/g).

2.2.8. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ

Sử dụng 1mL pectin 1% và 0,5mL dung dịch enzyme có pH thích hợp từ thí nghiệm 2.7 ở nhiệt độ 25°C, 30°C, 37°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, ở trong 30 phút, 60 phút, 90 phút. Thêm 3ml DNS, bịt ống nghiệm bằng giấy nhôm, đun cách thủy 15 phút, để nguội ở nhiệt độ phòng, đo OD tại $\lambda = 575\text{nm}$.

Xác định hoạt tính enzyme (UI/g).

2.2.9. Xác định ảnh hưởng của chất ức chế và chất hoạt hóa

Sử dụng 1mL pectin 1% và 0,5mL dung dịch enzyme ở pH thích hợp từ thí nghiệm 2.7, nhiệt độ và thời gian thích hợp từ thí nghiệm 2.8. Bổ sung 0,1mL các ion kim loại 1mM: Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , K^{2+} , Na^{2+} , Ag^{2+} và các chất ức chế protein như KMnO_4 , EDTA. Thêm 3ml DNS, bịt ống nghiệm bằng giấy nhôm, đun cách thủy 15 phút, để nguội ở nhiệt độ phòng, đo OD tại $\lambda = 575\text{nm}$.

Xác định hoạt tính enzyme (UI/g), hoạt tính tương đối (%).

2.2.10. Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, kết quả được ghi nhận và xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphic Centurion XV.I, Excell 2013 với mức độ tin cậy 95%.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ chất trợ sấy

Nồng độ chất trợ sấy có ảnh hưởng đến hoạt tính, hàm lượng protein và độ ẩm của chế phẩm enzyme sau sấy phun (Bảng 2).

Bảng 2

Ảnh hưởng của nồng độ chất trợ sấy

Nồng độ (w/v)	Độ ẩm (%)	Hoạt tính (UI/g)	Hàm lượng protein (mg/g)
10	5,733±0,015 ^d	2455,04±10,99 ^d	17,93±0,50 ^d
15	5,230±0,265 ^c	2343,49±10,99 ^c	16,19±0,67 ^c
20	4,950±0,040 ^b	2324,29±35,50 ^c	13,87±0,43 ^b
25	4,973±0,015 ^b	1692,19±13,62 ^b	12,71±0,67 ^b
30	3,873±0,021 ^a	1042,08±15,69 ^a	10,97±1,09 ^a

(^{a, b, c, d} là các chữ cái thể hiện khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%, các nghiệm thức có phân hạng giống nhau thì chưa thể hiện rõ sự khác biệt về ý nghĩa thống kê)

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Hoạt tính enzyme giảm dần từ 2455,04 đến 1042,08UI/g khi nồng độ maltodextrin tăng dần (10-30%). Nguyên nhân có thể do maltodextrin cản trở quá trình phân giải cơ chất của enzyme. Bên cạnh đó, hàm lượng protein giảm dần khi nồng độ maltodextrin tăng dần, từ 17,93 còn 10,97mg/g.

Theo nghiên cứu của Dao, Nguyen, Do, và Nguyen (2017) đã khảo sát nồng độ chất trợ sấy sữa gây 10% (w/v) là thích hợp nhất cho quá trình sấy phun bromelain. Như vậy ở nồng độ chất trợ sấy 10% thì hoạt tính enzyme cao nhất (2455,1UI/g) và độ ẩm của chế phẩm 5,7% đáp ứng yêu cầu bảo quản enzyme.

3.2. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ sấy

Theo nghiên cứu của (Heller, Carpenter, & Randolph, 1999; Samborska, Witrowa-Rajchert, & Gonçalves, 2005) cho thấy hoạt tính enzyme phụ thuộc chủ yếu vào nhiệt độ không khí đầu vào và sự phân bố nhiệt độ trong thiết bị sấy. Kết quả nghiên cứu cho thấy hoạt tính enzyme giảm dần khi tăng nhiệt độ sấy từ 130-170°C (Bảng 3).

Bảng 3

Ảnh hưởng của nhiệt độ sấy

Nhiệt độ (°C)	Độ ẩm (%)	Hoạt tính (UI/g)	Hàm lượng protein (mg/g)
130	6,217±0,025 ^e	2489,82±52,43 ^e	19,09±0,44 ^d

Nhiệt độ (°C)	Độ ẩm (%)	Hoạt tính (UI/g)	Hàm lượng protein (mg/g)
140	5,723±0,021 ^d	2391,46±10,80 ^d	18,07±0,25 ^d
150	5,593±0,015 ^c	2243,93±3,60 ^c	15,03±0,67 ^c
160	4,953±0,021 ^b	1698,18±67,74 ^b	11,99±0,67 ^b
170	3,757±0,021 ^a	1303,56±14,98 ^a	9,81±0,90 ^a

(^{a, b, c, d} là các chữ cái thể hiện khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%, các nghiệm thức có phân hạng giống nhau thì chưa thể hiện rõ sự khác biệt về ý nghĩa thống kê)

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Khi tăng nhiệt độ sấy, enzyme tiếp xúc với nhiệt độ cao sẽ bị biến tính nên hoạt tính enzyme giảm dần (từ 2489,8 còn 1303,6UI/g). Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Devakate, Patil, Waje, và Thorat (2009). Độ ẩm của chế phẩm cũng giảm (từ 6,2 còn 3,8%) khi tăng nhiệt độ sấy từ 130-170°C. Theo nghiên cứu của Samborska và cộng sự (2005), nhiệt độ không khí sấy sẽ ảnh hưởng đến quá trình bốc hơi nước ra khỏi dung dịch sấy, khi tốc độ nhập liệu không thay đổi nhiệt độ sấy càng tăng thì nước bốc hơi khỏi dung dịch càng tăng do vậy độ ẩm chế phẩm enzyme càng giảm. Ngoài ra ở nhiệt độ sấy 120°C chế phẩm enzyme thu được có độ ẩm cao, chế phẩm tạo ra dạng bột ướt dính lại thành buồng sấy, khó thu hồi và bảo quản chế phẩm. Hoạt tính enzyme cao nhất nhiệt độ 130°C là 2489,8UI/g. Vì vậy, nhiệt độ sấy 130°C sẽ được chọn để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

3.3. Khảo sát ảnh hưởng của tốc độ bơm nhập liệu

Bảng 4

Ảnh hưởng của tốc độ bơm nhập liệu

Tốc độ bơm nhập liệu (mL/h)	Độ ẩm (%)	Hoạt tính (UI/g)	Hàm lượng protein (mg/g)
180	4,913±0,015 ^a	2223,54±23,96 ^a	10,25±0,50 ^a
216	5,427±0,021 ^b	2326,69±12,97 ^b	12,71±0,66 ^b
252	5,702±0,021 ^c	2552,19±5,50 ^c	17,64±0,25 ^c
288	6,067±0,083 ^d	2655,34±12,64 ^d	18,94±0,25 ^d

(^{a, b, c, d} là các chữ cái thể hiện khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%, các nghiệm thức có phân hạng giống nhau thì chưa thể hiện rõ sự khác biệt về ý nghĩa thống kê)

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Hoạt tính enzyme tăng dần (2223,5 đến 2655,3UI/g) và hàm lượng protein tăng dần (10,3 đến 18,9g/mg) khi tăng tốc độ nhập liệu từ 180-288mL/h. Ở tốc độ bơm nhập liệu thấp, kích thước hạt tạo ra nhỏ hơn, bề mặt tiếp xúc của hạt với nhiệt độ tăng, thời gian tiếp xúc dài hơn làm enzyme dễ bị biến tính (Samborska et al., 2005). Độ ẩm của chế phẩm enzyme cũng tăng dần (4,9 đến 6,1%) khi tăng tốc độ bơm nhập liệu từ 180-288mL/h. Ở các tốc độ nhập liệu 324 và 360mL/h, enzyme thu được có độ ẩm cao, bị dính lên thành buồng sấy, chế phẩm enzyme tạo ra ở dạng bột ướt gây khó khăn trong việc thu hồi, bảo quản và sử dụng. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của N. T. T. Nguyen và Nguyen (2011), Devakate và cộng sự

(2009), Dao và cộng sự (2017), 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 ít hơn làm độ ẩm tăng.

3.4. Xác định thông số động học của enzyme

Hình 1. Đồ thị Lineweaver-Burk

Hằng số Michaelis Menten (K_m) đặc trưng cho ái lực enzyme và cơ chất. Khi K_m càng nhỏ thì ái lực của enzyme và cơ chất càng lớn (vận tốc phản ứng do enzyme xúc tác càng lớn). Dựa vào mối tương quan giữa vận tốc phản ứng của enzyme và nồng độ cơ chất xây dựng phương trình Lineweaver-Burk có dạng $y = 51,184x + 1,8034$, từ đó tính được $K_m = 28,4$ (mg/ml) và $V_{max} = 0,56$ (mg/ml/phút). Enzyme pectinase đã tinh sạch từ *A.niger* có $K_m = 2,3$ mg/ml (Anand, Yadav, & Yadav, 2017), $K_m = 2,4$ mg/ml (Parenicova, Benen, Kester, & Visser, 1998).

Ngoài ra một số nghiên cứu về pectinase thu nhận từ các chủng vi sinh vật khác nhau thì giá trị K_m trong khoảng 0,1-0,5 (Chen et al., 2014; Martins, Leite, Silva, & Gomes, 2013). Như vậy, có thể do chế phẩm enzyme tạo ra chưa được tinh sạch nên hằng số K_m cao hơn khoảng 10 lần so với enzyme đã tinh sạch từ các nghiên cứu trên.

3.5. Khảo sát ảnh hưởng của pH

Hoạt tính enzyme tăng dần khi pH tăng từ 1 đến 5 đạt giá trị lớn nhất ở pH 5 (2650UI/g). Sau đó hoạt tính enzyme giảm mạnh khi pH tăng từ 6 đến 10, đặc biệt ở pH từ 8 đến 10 thì enzyme gần như mất hoạt tính. Theo Anand và cộng sự (2017) đã nghiên cứu sản xuất, tinh chế và xác định đặc tính hóa sinh của một exo-polygalacturonase từ *Aspergillus niger* MTCC 478. Nhóm tác giả đã khảo sát hoạt tính enzyme trong khoảng pH từ 1,0-12,0 với bước nhảy 1 pH. Kết quả, hoạt tính ở pH=4 là cao nhất. Đối với pectinase có nguồn gốc từ nấm mốc pH 3,0-5,0

là pH hoạt động tối thích (L. D. Nguyen, Cao, & Nguyen, 2004). Kết quả nghiên cứu trên cũng tương đồng với Dogan và Tari (2008), Kant và cộng sự (2013).

Hình 2. Ảnh hưởng của pH

3.6. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ

Hoạt tính enzyme tăng nhẹ từ 10 đến 30°C, tăng nhanh từ 30 đến 40°C, từ 40 ÷ 50°C hoạt tính enzyme giảm nhẹ, từ 50÷80°C, hoạt tính enzyme giảm mạnh và từ 80÷90°C thì enzyme gần như mất hoạt tính. Vậy hoạt tính enzyme tối ưu ở 40°C (2658,9UI/g).

Nhóm tác giả Anand và cộng sự (2017) đã khảo sát hoạt tính enzyme pectinase từ *Aspergillus niger* trong khoảng nhiệt độ từ 10-100°C. Kết quả, hoạt tính enzyme ở 50°C là cao nhất. Theo Dogan và Tari (2008), Thakur, Pahwa, Singh, và Gupta (2010) thì nhiệt độ tối ưu cho một số chủng nấm sinh enzyme pectinase là 40÷60°C. Đa số enzyme bị mất hoạt tính ở nhiệt độ trên 70°C. Phần lớn enzyme hoạt động mạnh nhất ở nhiệt độ 40-50°C. Enzyme pectinesterase từ nấm mốc có nhiệt độ tối ưu là 30-45°C và bị vô hoạt ở 55-62°C. (L. D. Nguyen et al., 2004).

Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ

3.7. Xác định ảnh hưởng của chất ức chế và chất hoạt hóa

Chất hoạt hóa là chất làm tăng hoạt tính của enzyme, ngược lại chất ức chế sẽ làm giảm hoạt tính enzyme.

Hình 4. Ảnh hưởng của chất hoạt hóa và chất ức chế

Mức độ ảnh hưởng của các ion kim loại và chất ức chế protein đối với enzyme pectinase là khác nhau. Đối với các ion Mn²⁺, Na⁺, KMnO₄ gần như không làm thay đổi hoạt tính enzyme. EDTA làm giảm gần 50% hoạt tính enzyme. Ca²⁺, Zn²⁺ và K⁺ làm hoạt tính enzyme giảm khoảng 2/3 so với đối chứng. Ion Co²⁺ làm hoạt tính enzyme giảm khoảng 25%. Ion Ag⁺ thì gần như làm mất hoạt tính enzyme, ion Cu²⁺ thì làm tăng hoạt tính enzyme. Như vậy ion Ag⁺ có thể coi là chất ức chế đối với enzyme pectinase, ion Cu²⁺ thì được coi là chất hoạt hóa. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Anand và cộng sự (2017). Ion Cu²⁺ được coi là chất hoạt hóa đối với enzyme endo polygalacturonase từ nấm mốc *Aspergillus fumigatus* (Anand, Yadav, & Yadav, 2016).

4. Kết luận và kiến nghị

4.1. Kết luận

Nghiên cứu đã xác định được nồng độ chất trợ sấy 10% matodextrin, nhiệt độ sấy 130°C, tốc độ nhập liệu 288mL/h để tạo chế phẩm enzyme pectinase dạng bột bằng phương pháp sấy phun. Ngoài ra, nghiên cứu đã xác định một số đặc tính của chế phẩm enzyme thu được: thông số động học Km 28,4mg/mL, nhiệt độ 40°C, và pH 5,0 tối ưu, chất hoạt hóa Cu²⁺, chất ức chế Ag⁺ ảnh hưởng đến hoạt động của chế phẩm enzyme.

4.2. Kiến nghị

Khảo sát thêm độ bền nhiệt và tính ổn định các pH khác nhau của chế phẩm enzyme để có hướng sử dụng phù hợp. Đồng thời khảo sát thêm ảnh hưởng của điều kiện bảo quản đến hoạt tính enzyme. Bên cạnh đó ứng dụng thử nghiệm pectinase dạng bột vào việc sản xuất mứt quả.

LỜI CẢM ƠN

Trân trọng cảm ơn sinh viên Nguyễn Hoàng Minh Nhật, Trần Đông Anh, Võ Hữu Thái An đã hỗ trợ trong quá trình thực hiện nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

- Ahlawat, S., Mandhan, R. P., Dhiman, S. S., Kumar, R., & Sharma, J. (2008). Potential application of alkaline pectinase from *Bacillus subtilis* ss in pulp and paper. *Industry Applied Biochemistry and Biotechnology*, 149(3), 287-293.
- Anand, G., Yadav, S., & Yadav, D. (2016). Purification and characterization of polygalacturonase from *Aspergillus fumigatus* MTCC 2584 and elucidating its application in retting of *Crotolaria juncea* fiber. *3 Biotech*, 6, Article 201.
- Anand, G., Yadav, S., & Yadav, D. (2017). Production, purification and biochemical characterization of an exo-polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 478 suitable for clarification of orange juice. *3 Biotech*, 7, 1-8.
- Barman, S., Sit, N., Badwaik, L. S., & Deka, S. C. (2015). Pectinase production by *Aspergillus niger* using banana (*Musa balbisiana*) peel as substrate and its effect on clarification of banana juice. *Journal of Food Science and Technology*, 52(6), 3579-3589.
- Cabral, A. C. S., Said, S., & Oliveira, W. P. (2009). 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), 536-548.
- Chen, Y., Sun, D., Zhou, Y., Liu, L., Han, W., Zeng, B., ... Zang, Z. (2014). Cloning, expression and characterization of a novel thermophilic polygalacturonase from *Caldicellulosiruptor bescii* DSM 6725. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(4), 5717-5729.
- Dao, L. T. M., Nguyen, M. T. Q., Do, T. H. T., & Nguyen, P. T. N. (2017). Khảo sát quá trình tạo chế phẩm bromelain dạng bột từ phụ phẩm dứa [Investigate the process of making powdered bromelain from pineapple by-products]. *Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm*, 12(1), 19-32.
- Desai, K. G. H., & Park, H. J. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23(7), 1366-1367.
- Devakate, R. V., Patil, V. V., Waje, S. S., & Thorat, B. N. (2009). Purification and drying of bromelain. *Separation and Purification Technology*, 64(3), 259-264.
- Dogan, N., & Tari, C. (2008). Characterization of three phase partitioned exo-polygalacturonase from *Aspergillus sojae* with unique properties. *Biochemical Engineering Journal*, 39(1), 43-50.
- Heller, M. C., Carpenter, J. F., & Randolph, T. W. (1999). Protein formulation and lyophilization cycle design: Prevention of damage due to freeze-concentration induced phase separation. *Biotechnology and Bioengineering*, 63(2), 166-174.
- Huynh, T. P. P., & Do, H. T. (2018). Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp enzyme pectinase từ *Aspergillus niger* trên nguồn cơ chất vỏ cam [Investigation of factors affecting the ability of pectinase enzyme biosynthesis from *Aspergillus niger* on orange peel substrate source]. *Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm*, 16, 54-60.

- Kant, S., Vohra, A., & Gupta, R. (2013). Purification and physicochemical properties of polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 3323. *Protein Expression and Purification*, 87(1), 11-16.
- Martins, E. S., Leite, R. S. R., Silva, R., & Gomes, E. (2013). Purification and properties of polygalacturonase produced by thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 on solid-state fermentation. *Enzyme Research*, 2013(2), 1-7.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.
- Mohsen, S. M., Bazaraa, W. A., & Doukani, K. (2009). Purification and characterization of *Aspergillus niger* U-86 polygalacturonase and its use in clarification of pomegranate and grape juices. *The 4th Conference on Recent Technology in Agriculture*, 84, 805-816.
- Nakkeeran E., Umesh-Kumar, S., & Subramanian, R. (2011). *Aspergillus carbonarius* polygalacturonases purified by integrated membrane process and affinity precipitation for apple juice production. *Bioresource Technology*, 102(3), 3293-3297.
- Nguyen, L. D., Cao, C., & Nguyen, T. A. (2004). *Thu nhận enzyme từ vi sinh vật. Công nghệ enzyme, từ lần 2, [Obtain enzymes from microorganisms. Enzyme technology, since the 2nd,]* (pp. 356-376). Ho Chi Minh, Vietnam: NXB Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.
- Nguyen, N. T. T., & Nguyen, M. T. H. (2011). Tối ưu hóa quá trình sấy phun dịch cà chua [Optimization of tomato juice spray drying]. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 9(6), 1014-1020.
- Nguyen, P. N. M., Che, H. V., Ly, B. N., & Chau, A. T. D. (2011). Tác động enzyme pectinase đến khả năng trích ly dịch quả và các điều kiện lên men đến chất lượng lượng rượu vang xoài sau thời gian lên men chính [Effects of pectinase enzyme on juice extraction and fermentation conditions on mango wine quality after main fermentation time]. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 20(a), 127-136.
- Nguyen, T. V., Nguyen, T. M., Le, N. H., & Le, H. T. (2013). Trích ly enzyme Bromelain từ phế phẩm khóm Cầu Đúc-Hậu Giang [Extraction of Bromelain enzyme from Cau Duc-Hau Giang pineapple waste product]. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 28, 21-27.
- Pan, X., Li, K., Ma, R., Shi, P., Huang, H., Yang, P., ... Yao, B. (2015). Biochemical characterization of three distinct polygalacturonases from *Neosartorya fischeri* P1. *Food Chemistry*, 188, 569-575.
- Parenticova, L., Benen, J. A., Kester, H. C., & Visser, J. (1998). PgaE encodes a fourth member of the endopolygalacturonase gene family from *Aspergillus niger*. *European Journal of Biochemistry*, 251(1/2), 72-80.
- Samborska, K., Witrowa-Rajchert, D., & Gonçalves, A. (2005). Spray-drying of α -amylase - the effect of process variables on the enzyme inactivation. *Drying Technology: An International Journal*, 23(4), 941-953.

- Thakur, A., Pahwa, R., Singh, S., & Gupta, R. (2010). Production, purification, and characterization of polygalacturonase from *Mucor circinelloides* ITCC 6025. *Enzyme Research*, 2010, Article 170549.
- Tran, X. T., Duong, T. V., & Le, L. T. H. (2012). *Nghiên cứu sử dụng hệ enzyme pectinase, cellulase của vi khuẩn B.subtilis, L.plantarum và nấm mốc A.niger, Ph.chrysosporium để xử lý lớp nhót của vỏ cà phê*. Paper presented at Tuyển tập báo cáo hội nghị sinh viên nghiên cứu khoa học lần thứ 8, Đại học Đà Nẵng, Danang, Vietnam.
- Walker, J. M. (1996). *The protein protocols handbook 2*. New York, NY: Springer Science & Business Media.