

KHẢO SÁT CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP ENZYME PECTINASE TỪ *Aspergillus niger* TRÊN NGUỒN CƠ CHẤT VỎ CAM

Đỗ Thị Hiền, Huỳnh Phan Phương Trang*

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

*Email: tranghpp@cntp.edu.vn

Ngày nhận bài: 05/7/2018; Ngày chấp nhận đăng: 30/8/2018

TÓM TẮT

Pectinase từ vi sinh vật chiếm 25% doanh số bán enzyme thực phẩm trên toàn cầu. Hầu như tất cả chế phẩm thương mại của pectinase đều được sản xuất từ nấm mốc. *Aspergillus niger* được sử dụng phổ biến nhất cho việc sản xuất pectinase. Nghiên cứu đã khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp enzyme pectinase của *Aspergillus niger* trên môi trường lỏng có bổ sung nguồn cơ chất cảm ứng là vỏ cam. Chỉ tiêu theo dõi của các thực nghiệm là hoạt tính enzyme pectinase. Kết quả thu được enzyme pectinase có hoạt tính cao nhất 194 UI/mL khi nuôi cấy *Aspergillus niger* trên môi trường lỏng với vỏ cam 80 g/L (hàm lượng pectin 0,72 g/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. Với điều kiện môi trường nuôi cấy trên có thể tạo ra chế phẩm enzyme pectinase từ *Aspergillus niger* và ứng dụng trong ngành công nghiệp sản xuất nước ép trái cây.

Từ khóa: Nấm mốc, *Aspergillus niger*, pectin, pectinase, vỏ cam.

1. MỞ ĐẦU

Nước trái cây thu được sau ép thường bị đục và phân lớp, nên giá trị cảm quan giảm và giá trị kinh tế cũng giảm theo. Nguyên nhân chủ yếu là do trong nước ép còn chứa nhiều chất pectin. Giải pháp khắc phục tình trạng này là sử dụng enzyme pectinase làm trong dịch quả. Bên cạnh đó, pectinase còn giúp tăng hiệu suất trích ly [1].

Enzyme pectinase được thu nhận chủ yếu nhờ vi nấm, trong đó loài *Aspergillus niger* có khả năng sinh nhiều enzyme pectinase khi nuôi cấy trong môi trường thích hợp. Pectinase từ *Aspergillus niger* là enzyme ngoại bào nên thu nhận sản phẩm khá thuận lợi và chế phẩm enzyme từ vi sinh vật này đã được Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) công nhận là an toàn khi ứng dụng trong công nghệ thực phẩm [2].

Aspergillus niger đồng hóa tốt các loại đường như glucose, fructose, saccharose, mannose. Đồng thời *Aspergillus niger* có khả năng sử dụng ure, các muối ammonium, nitrogen hữu cơ làm nguồn nitrogen. *Aspergillus niger* có khả năng sinh các enzyme như amylase, protease, pectinase và đặc biệt là hệ enzyme cellulase [3].

Pectin là yếu tố cơ bản kích thích vi nấm *Aspergillus niger* sinh enzyme pectinase. Do đó, nguồn cơ chất giàu pectin rất thích hợp cho vi sinh vật sinh pectinase [4]. Tỷ lệ carbon, nitrogen cũng có ý nghĩa rất lớn đối với sự gia tăng sinh khối và sinh tổng hợp enzyme ở vi sinh vật. Kết quả nghiên cứu của Hamdy cho thấy sự có mặt của NH_4NO_3 , NH_4Cl trong môi

trường nuôi cấy giúp vi nấm cải thiện đáng kể khả năng tạo pectinase [5]. Nhiệt độ nuôi cấy không ảnh hưởng nhiều đến hoạt động sinh tổng hợp enzyme pectinase ở vi nấm nói chung. Nhiệt độ nuôi cấy thích hợp để tạo pectinase nằm trong khoảng 25-40 °C [6]. Đối với *Aspergillus niger*, sự tạo enzyme cực đại trong quá trình nuôi cấy thường kết thúc khi nấm bắt đầu sinh đỉnh bào tử [2]. pH ban đầu của môi trường thường ảnh hưởng mạnh đến sự tăng trưởng sinh khối và tạo enzyme ở *Aspergillus niger*. Thông thường pH tối thích cho quá trình nuôi cấy thu enzyme pectinase của *Aspergillus niger* nằm trong khoảng 4,5-5,5 [7].

Cơ chất thích hợp cho nuôi cấy *Aspergillus niger* để thu nhận pectinase là 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. Do đó, nghiên cứu tận dụng nguồn vỏ cam phế liệu làm nguyên liệu nuôi cấy *Aspergillus niger* nhằm thu nhận chế phẩm enzyme pectinase, có thể sẽ góp phần phát triển ứng dụng trong lĩnh vực công nghệ thực phẩm, cụ thể là trong lĩnh vực sản xuất nước ép trái cây.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Giống *Aspergillus niger* lấy từ bộ sưu tập giống của Trường Đại học khoa học Tự nhiên TP.Hồ Chí Minh. Vỏ cam được cung cấp từ các cơ sở bán nước ép cam tại phường Tây Thạnh, Quận Tân Phú.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Chuẩn bị nguồn cơ chất vỏ cam

Bỏ phần vỏ xanh của cam tươi lấy phần thịt trắng, rửa sạch bằng nước ấm 60 °C, cắt nhỏ 1 mm, sấy bằng không khí nóng ở 55 °C đến khi trọng lượng không đổi (độ ẩm còn khoảng 10%) [3]. Nghiền thành bột sàng qua lưới 0,3 mm cho vỏ cam đồng nhất về kích thước. Xác định hàm lượng pectin trong vỏ cam theo phương pháp calcium pectate [8]. Kết quả hàm lượng pectin trong vỏ cam đạt 0,9% (w/w).

2.2.2. Chuẩn bị giống

Aspergillus niger được giữ giống trong thạch nghiêng PDA (Potato dextrose agar) ở 4 °C. Cấy chuyển giống sang ống thạch nghiêng PDA khác, để ở nhiệt độ 34-35 °C trong 72 đến 96 giờ. Lấy 5 mL nước cất vô trùng đánh tan bào tử *Aspergillus niger* và chuyển sang bình tam giác chứa môi trường PDA, để ở nhiệt độ 34-35 °C trong 72 đến 96 giờ. Mật độ bào tử được xác định bằng cách đếm trên buồng đếm hồng cầu đạt 10^7 bào tử/mL [9].

2.2.3. Chuẩn bị môi trường nuôi cấy

Thành phần môi trường nuôi cấy (g/L) gồm: KH_2PO_4 - 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 1,0 và FeSO_4 - 0,005, bột vỏ cam - 20, pH 5,0.

2.2.4. Phương pháp xác định hoạt tính enzyme pectinase [10]

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 575 nm.

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 1 mL. Sử dụng đường chuẩn D-galacturonic acid.

2.2.5. Khảo sát tỷ lệ nguồn cơ chất cảm ứng

Lượng cơ chất là bột vỏ cam với các tỷ lệ 2, 4, 6, 8 và 10% (w/v) được cho vào môi trường nuôi cấy dịch thể như đã nêu ở trên (TN1); bổ sung 2 mL huyền phù bào tử (10^7 bào tử/mL), lắc ở tốc độ 150 vòng/phút và hoạt tính pectinase được xác định sau 72 nuôi cấy.

2.2.6. Khảo sát tỷ lệ cơ chất cảm ứng và nguồn carbon bổ sung

Môi trường nuôi cấy với nguồn cơ chất là bột vỏ cam (TN1), bổ sung nguồn carbon vào môi trường theo tỷ lệ giữa bột vỏ cam và glucose hoặc saccharose lần lượt là 4:1, 4:2, 4:3 (w/w). Bổ sung 2 mL huyền phù bào tử (10^7 bào tử/mL) vào môi trường nuôi cấy, lắc ở tốc độ 150 vòng/phút, sau 72 giờ tiến hành xác định hoạt tính pectinase.

2.2.7. Khảo sát nguồn nitrogen

Môi trường nuôi cấy với nguồn cơ chất là bột vỏ cam (TN1), tỷ lệ bột vỏ cam và nguồn carbon (TN2) thích hợp được bổ sung nguồn nitrogen là: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , cao nấm men, peptone với các tỷ lệ tương ứng là: 2, 3 và 4% (w/v). Sau khi tiếp giống là 2 mL huyền phù bào tử (10^7 bào tử/mL) cho nuôi lắc ở tốc độ 150 vòng/phút. Hoạt tính pectinase được xác định sau 72 giờ nuôi cấy (TN3).

2.2.8. Khảo sát tỷ lệ giống

Môi trường nuôi cấy với nguồn cơ chất là bột vỏ cam (TN1), tỷ lệ bột vỏ cam và nguồn carbon (TN2), nguồn nitrogen (TN3) thích hợp được tiếp lượng giống với mật độ 10^7 bào tử/mL tương ứng là: 2, 4, 6, 8 và 10% (v/v), nuôi lắc ở tốc độ 150 vòng/phút, hoạt tính pectinase được xác định sau 72 giờ nuôi cấy (TN4).

2.2.9. Khảo sát pH và thời gian nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy với nguồn cơ chất là bột vỏ cam (TN1), tỷ lệ bột vỏ cam và nguồn carbon (TN2), nguồn nitrogen (TN3), tỷ lệ giống (TN4) thích hợp được điều chỉnh pH thay đổi từ 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 đến 6,0; nuôi lắc ở tốc độ 150 vòng/phút, sau mỗi 24, 48, 72 và 96 giờ tiến hành xác định hoạt tính pectinase.

2.2.10. Xử lý số liệu

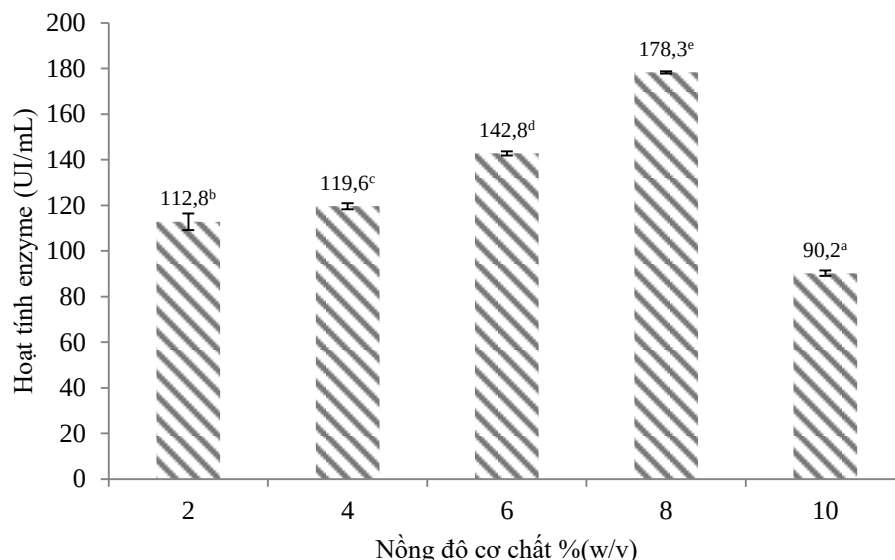
Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, kết quả được ghi nhận và xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphic Centurion XV.I với mức độ tin cậy 95%.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất đến sinh tổng hợp (STH) pectinase

Nồng độ cơ chất ảnh hưởng mạnh đến khả năng sinh tổng hợp enzyme pectinase ở *Aspergillus niger* nuôi cấy. Kết quả được thể hiện ở Hình 1. Kết quả này cho thấy hoạt tính

enzyme thu được tăng dần theo nồng độ cơ chất tăng từ 2 đến 8% và đạt cực đại ở nồng độ cơ chất 8%, sau đó giảm khi ở nồng độ 10%. Tại nồng độ cơ chất 2% hoạt tính thấp nhất là 112,758 UI/mL có thể do lượng cơ chất cảm ứng chưa đủ, ở nồng độ cơ chất 8% hoạt tính cao nhất đạt 178,32 UI/mL. Như vậy, có thể thấy sinh tổng hợp enzyme pectinase chịu ảnh hưởng mạnh của nồng độ cơ chất trong môi trường, cụ thể là nồng độ cơ chất trong môi trường nuôi cấy càng cao thì lượng enzyme pectinase thu được càng cao. Theo Galiotou-Panay *et al.*, lượng enzym pectinase thu được từ nuôi cấy *Aspergillus niger* NRRL-364 trong môi trường với nguồn cơ chất là vỏ cam chanh tăng tuyến tính khi tỷ lệ pectin tăng từ 0,5% đến 3% và đạt giá trị cao nhất ở nồng độ 3% [11].

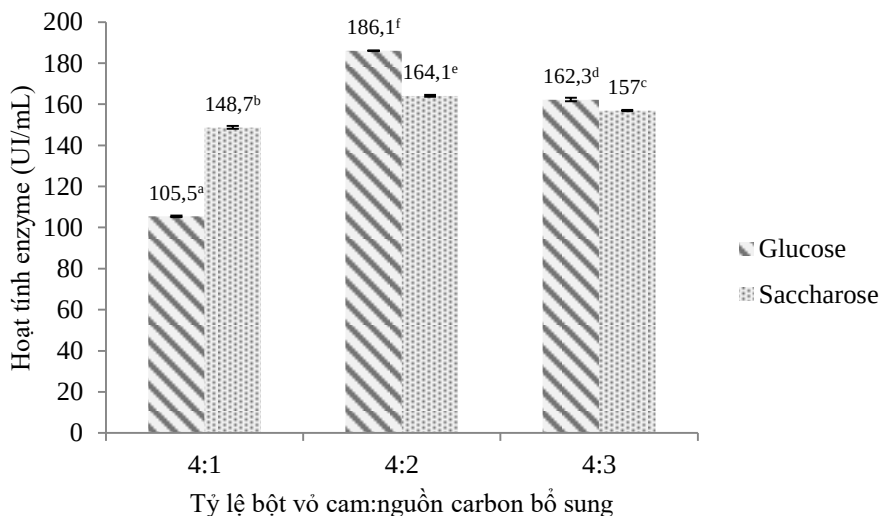


Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất
(^a, ^b, ^c, ^d, ^e: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%)

Kết quả này cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của Lê Thị Thu Trang [12]. Tuy nhiên, khi nồng độ cơ chất ở 10%, lượng cơ chất cảm ứng dư thừa nên lượng enzyme thu được sẽ giảm. Kết quả nghiên cứu này cũng tương tự với nghiên cứu của Acuña-Argüelles *et al.* ở hình thức nuôi cấy chìm, hoạt tính enzyme pectinase giảm ở nồng độ pectin 10 mg/mL [13].

3.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ cơ chất cảm ứng và nguồn carbon bổ sung đến STH pectinase

Nguồn cơ chất cảm ứng có ảnh hưởng đến khả năng sinh enzyme. Bên cạnh đó, tỷ lệ cơ chất cảm ứng bột vỏ cam (chứa pectin) và nguồn carbon bổ sung cũng ảnh hưởng đến khả năng sinh enzyme. Kết quả được thể hiện qua Hình 2. Ở thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nồng độ pectin (trong vỏ cam) đến khả năng sinh enzyme pectinase của *Aspergillus niger*, trong môi trường nuôi cấy không có glucose và saccharose thu được hoạt tính enzyme 178,32 UI/mL. Khi bổ sung glucose và saccharose thì hoạt tính enzyme có thay đổi. Tỷ lệ 4:1 cho hoạt tính enzyme thấp nhất, tỷ lệ 4:2 cho hoạt tính enzyme cao nhất. Ở tỷ lệ 4:1 giữa nguồn cơ chất cảm ứng và nguồn carbon bổ sung, saccharose cho hoạt độ cao hơn glucose. Tuy nhiên, khi tỷ lệ nguồn cơ chất cảm ứng và nguồn carbon bổ sung là 4:2 và 4:3 thì glucose có hoạt tính cao hơn saccharose. Hoạt tính enzyme cao nhất 186,092 UI/mL khi bổ sung glucose với tỷ lệ 4:2.

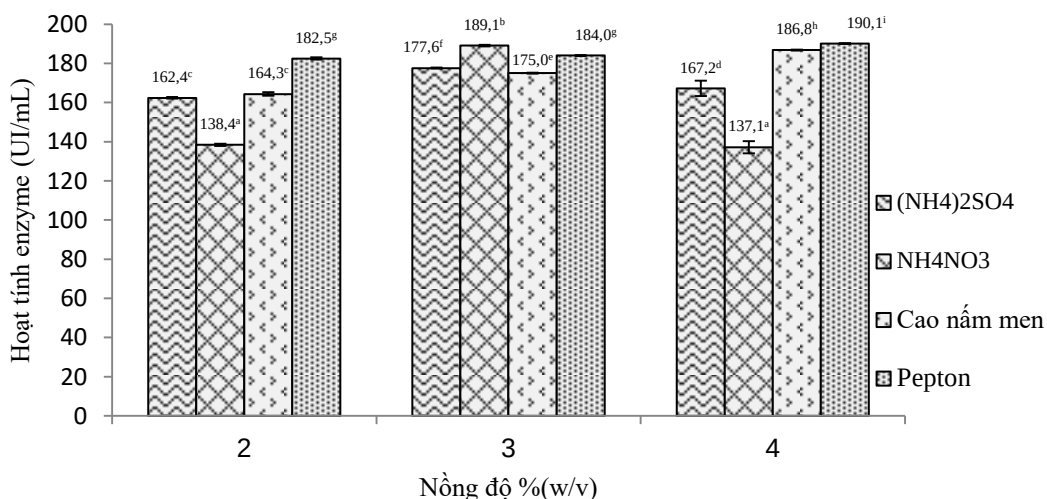


Hình 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ cơ chất cảm ứng/carbon
(^{a, b, c, ...}: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%)

Cả glucose và saccharose đều được *Aspergillus niger* đồng hóa tốt, nhưng tốt hơn với glucose. Tương tự nghiên cứu của Patil & Dayanand (2006) và Solis-Pereira (1993), ở điều kiện nuôi cấy lỏng nguồn carbon là glucose sẽ cho hoạt tính cao hơn so với saccharose [14]. Ngoài ra, nghiên cứu của Solis-Pereira (1996) cũng cho thấy hoạt tính pectinase đạt tối đa ở 72 giờ trong môi trường dịch thể chứa 10% glucose (w/v) [15].

3.3. Ảnh hưởng của nguồn nitrogen đến STH pectinase

Cố định môi trường nuôi cấy lỏng lắc ở tốc độ 150 vòng/phút, nồng độ bột vỏ cam 8%, tỷ lệ giống 2%, bổ sung glucose theo tỷ lệ bột vỏ cam/glucose là 4:2 (w/w). Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các nguồn nitrogen với tỷ lệ khác nhau đến khả năng sinh enzyme pectinase được thể hiện ở Hình 3.

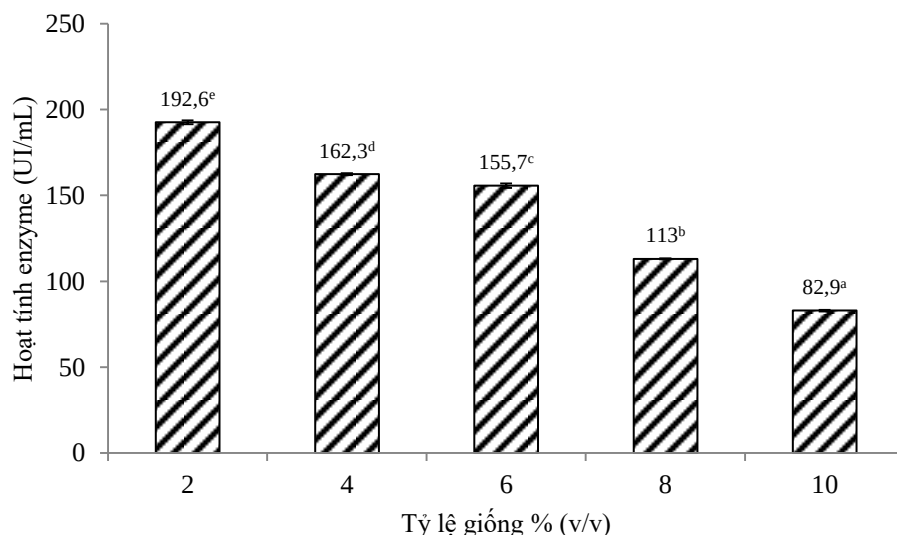


Hình 3. Ảnh hưởng của nguồn nitrogen
(^{a, b, c, ...}: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%,
các nghiệm thức có phân hạng giống nhau thì chưa thể hiện rõ sự khác biệt về ý nghĩa thống kê)

Không có sự khác biệt lớn về ảnh hưởng của các nguồn nitrogen sinh tổng hợp pectinase, hoạt tính dao động từ 138 UI/mL đến 190 UI/mL. Nguồn nitrogen hữu cơ (pepton, cao nấm men) có thể thích hợp hơn so với các nguồn nitrogen vô cơ (NH_4NO_3 và $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Với nguồn nitrogen vô cơ NH_4NO_3 3% và nguồn nitrogen hữu cơ pepton 4% hoạt tính enzyme thu được cao nhất, tương ứng là 189 UI/mL và 190 UI/mL. Kết quả này cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của Vivek *et al.* (2010) khi khảo sát ảnh hưởng của việc bổ sung nguồn nitrogen hữu cơ (nước chiết men, peptone và bột đậu nành) hoặc nguồn nitrogen vô cơ (NH_4NO_3 và $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl) từ 1 đến 5% (w/v) trong điều kiện nuôi cấy chìm và hoạt tính enzyme pectinase cao nhất khi bổ sung pepton 4% làm nguồn nitrogen [16]. Bên cạnh đó, khi khảo sát ảnh hưởng của nguồn nitrogen vô cơ đối sinh tổng hợp pectinase ở *Aspergillus niger*, Rajmane & Koreka (2012) cho thấy, NH_4NO_3 thích hợp cho sinh tổng hợp pectinase hơn so với các nguồn nitrogen khác là $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ [17].

3.4. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống đến sinh tổng hợp pectinase

Chuẩn bị môi trường với nguồn cơ chất là bột vỏ cam 8% (w/v), nguồn giống là dịch bào từ *A. niger*, mật độ 10^7 bào tử/mL được bổ sung vào môi trường với các tỷ lệ tương ứng: 2, 4, 6, 8 và 10% (v/v). Kết quả được thể hiện ở Hình 4. Ở tỷ lệ 2% hoạt tính enzyme cao nhất, đạt 183,358 UI/mL và thấp nhất ở tỷ lệ 10% đạt 64,755 UI/mL. Hoạt tính enzyme giảm theo chiều ngược lại với sự tăng tỷ lệ dịch bào từ bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Kết quả nhận được tương đồng với những kết quả khảo sát của Vivek *et al.* (2010) và Nighojkar *et al.* (2006), hoạt tính enzyme pectinase cao nhất khi bổ sung 5 mL dung dịch giống với mật độ 10^7 bào tử/mL hoặc bổ sung 5 mL dung dịch giống 10^6 bào tử/mL vào 100 mL môi trường [16, 18].



Hình 4. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống
(^{a, b, c, ..., e}: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%)

3.5. Ảnh hưởng của pH môi trường và thời gian nuôi cấy đến STH pectinase

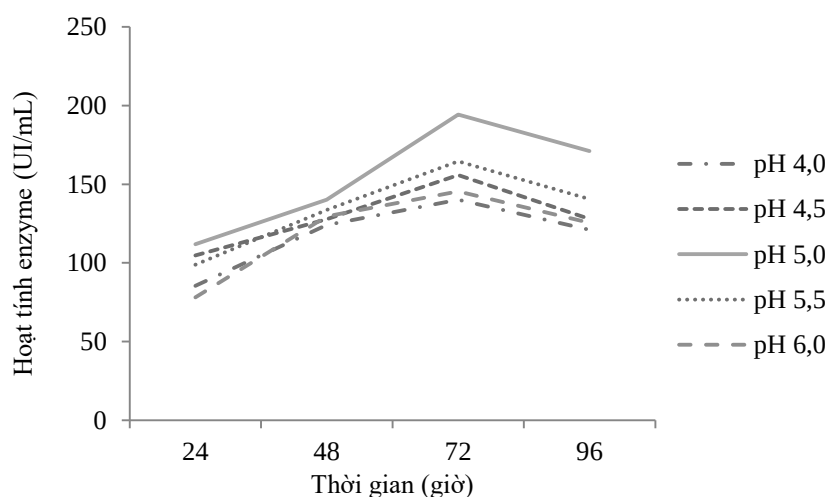
pH môi trường và thời gian nuôi cấy có ảnh hưởng đến khả năng sinh enzyme pectinase. Kết quả được thể hiện ở Bảng 1 và Hình 5. Ở tất cả các mức pH, hoạt tính enzyme tăng từ 24 giờ đến 72 giờ, nhưng đến 96 giờ hoạt tính enzyme bắt đầu giảm. Ở pH 5, thời gian nuôi cấy 72 giờ, hoạt tính enzyme đạt cao nhất (194,369 UI/mL), cao hơn các pH và thời gian nuôi cấy còn lại. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Patil & Dayanand (2005) và

Ire & Vinking (2016), khi nghiên cứu thu nhận và tinh sạch polygalacturonase từ *Aspergillus niger* nuôi cấy trong môi trường với nguồn cơ chất là vỏ chuối trong điều kiện pH và thời gian nuôi cấy tối ưu tương ứng là 5,0 và 72 giờ [4, 19].

Bảng 1. Ảnh hưởng của pH và thời gian nuôi cấy

pH \ Thời gian (giờ)	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0
24	85,339 ± 0,329 ^b	104,842 ± 0,432 ^d	111,894 ± 0,659 ^e	98,940 ± 0,659 ^c	78,069 ± 1,511 ^a
48	124,129 ± 0,659 ^g	127,727 ± 0,864 ⁱ	140,105 ± 0,543 ^l	133,7 ± 0,659 ^k	129,526 ± 0,899 ^j
72	140,105 ± 0,543 ^l	155,866 ± 0,758 ⁿ	194,369 ± 0,329 ^q	164,502 ± 0,873 ^o	145,359 ± 0,449 ^m
96	120,926 ± 0,659 ^f	128,015 ± 0,329 ⁱ	171,051 ± 0,899 ^p	140,465 ± 0,778 ^l	125,424 ± 0,758 ^h

(^{a, b, c,...}: thể hiện sự 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)



Hình 5. Ảnh hưởng của pH và thời gian nuôi cấy

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy, *Aspergillus niger* được nuôi cấy trong môi trường dịch thể chứa 8% bột vỏ cam, tỷ lệ bột vỏ cam/glucose là 4/2, 4% peptone, 2% dung dịch giống với mật độ bào tử 10^7 /mL, pH 5,0, thời gian nuôi cấy 72 giờ đã tạo được lượng enzyme pectinase đạt 194 UI/mL.

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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Nhật Minh Phương, Chế Văn Hoàng, Lý Nguyễn Bình, Châu Trần Diễm Ái. - Tác động enzyme pectinase đến khả năng trích ly dịch quả và các điều kiện lên men đến chất lượng rượu vang xoài sau thời gian lên men chính, Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ **20a** (2011) 127-136.
2. Nguyễn Đức Lượng - Công nghệ enzyme, NXB Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh (2012) 356-376.
3. Trần Thanh Trúc - Phân lập và tuyển chọn một số dòng *Aspergillus niger* sinh pectin methylesterase hoạt tính cao, Luận án Tiến sĩ Sinh học, Đại học Cần Thơ (2013) 15-16.
4. Patil S. R., Dayanand A. - Optimization of process for the production of fungal pectinases from deseeded sunflower head in submerged and solid-state conditions, Bioresource Technology **97** (18) (2006) 2340-4.
5. Hamdy H. S. - Purification and characterization of pectin lyase produced by *Rhizopus oryzae* grown on orange peels, Annals of Microbiology **55** (3) (2005) 205 -211.
6. Luh B. S., Phaff H. J. - Studies on polygalacturonase of certain yeasts, Archives of Biochemistry and Biophysics **33** (2) (1951) 212-227.
7. Trần Xuân Ngạch - Công nghệ enzyme, NXB Đại học Bách khoa Đà Nẵng (2007) 60-63.
8. Lê Thanh Mai - Các phương pháp phân tích ngành công nghệ lên men, NXB Khoa học và Kỹ thuật (2006) 95-96.
9. Nguyễn Đức Lượng - Vi sinh vật công nghiệp Tập 2, NXB Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh (2006) 338-339.
10. Mohsen S. M., Bazaraa W. A., Doukani K. - 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** (2009) 805-816.
11. Galiotou-Panayotou M., Rodis P., Kapantai M. - Enhanced polygalacturonase production by *Aspergillus niger* NRRL-364 grown on supplemented citrus pectin, Letters in Applied Microbiology **17** (4) (1993) 145-148.
12. Lê Thị Thu Trang - Nghiên cứu khả năng tổng hợp pectinesterase và polygalacturonase của *Aspergillus niger*, Luận văn Thạc sĩ kỹ thuật, Đại học Đà Nẵng (2011) 13-14.
13. Acuña-Argüelles M. E., Gutierrez-Rojas M., Viniegra-González G., Favela-Torres E. - Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation, Applied Microbiology and Biotechnology **43** (5) (1995) 808-814.
14. Patil S. R., Dayanand A. - Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions, Bioresource Technology **97** (16) (2006) 2054-2058.
15. Solis-Pereira S., Favela-Torres E., Viniegra-González G., Gutiérrez-Rojas M. - Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations, Applied Microbiology and Biotechnology **39** (1) (1993) 36-41.
16. Vivek Rangarajan, Rajasekharan M., Ravichandran R., Sriganesh K., Vaitheeswaran V. - Pectinase production from orange peel extract and dried orange peel solid as

- substrates using *Aspergillus niger*, International Journal of Biotechnology and Biochemistry **6** (3) (2010) 445-453.
17. Rajmane S. D., Korekar S. L. - Impact of carbon and nitrogen sources on pectinase production of post-harvest fungi, Current Botany **3** (3) (2012) 1-3.
18. Nighojkar S., Phanse Y., Sinha D., Nighojkar A., Kumar A. - Production of polygalacturonase by immobilized cells of *Aspergillus niger* using orange peel as inducer, Process Biochemistry **41** (5) (2006) 1136-1140.
19. Ire Francis, Vinking Emmanuel - Production, purification and characterization of polygalacturonase from *aspergillus niger* in solid state and submerged fermentation using banana peels, Journal of Advances in Biology and Biotechnology **10** (1) (2016) 1-15.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF FACTORS AFFECTING THE ABILITY OF PECTINASE BIOSYNTHESIS BY *Aspergillus niger* USING ORANGE PEELS AS SUBSTRATE

Do Thi Hien, Huynh Phan Phuong Trang*
Ho Chi Minh City University of Food Industry
*Email: tranghpp@cntp.edu.vn

Pectinase from microorganisms accounts for 25% of the global food enzyme sales. Almost all the commercial preparations of pectinase are produced from mold. *Aspergillus niger* is most commonly used for the production of pectinase. The study considered factors affecting the biosynthesis of pectinase by *Aspergillus niger* on liquid medium supplemented with inducer substrate source from orange peel. The results of the experiments were evaluated by pectinase enzyme activity. The results showed that the pectinase enzyme had the highest activity of 194 UI/mL when *Aspergillus niger* was cultured on liquid medium with 80 g/L orange peel (0.72 g/L pectin content), orange peel to glucose ratio of 4:2, suitable nitrogen source peptone 4% (w/v), seed rate 2% (v/v), density 10^7 spores/mL, pH 5.0 and culture period of 72 hours. This culture medium can produce pectinase enzyme by *Aspergillus niger* and it can be applied in the fruit juice industry.

Keywords: Mold, *Aspergillus niger*, pectin, pectinase, orange peel.