

NGHIÊN CỨU TẬN DỤNG CÙI TRÁI CHANH DÂY ĐỂ NUÔI CẤY VI SINH VẬT THU NHẬN CHẾ PHẨM PECTINASE

Nguyễn Uyên Mẫn⁽¹⁾, Nguyễn Thị Ngọc Tuyền⁽¹⁾,
Nguyễn Thị Kim Yến⁽¹⁾, Lý Hoàng Giáp⁽¹⁾, Trần Ngọc Hùng⁽¹⁾

(1) Trường Đại học Thủ Dầu Một

Ngày nhận bài 02/03/2019; Ngày gửi phản biện 15/03/2019; Chấp nhận đăng 24/04/2019

Email: hungngoc@tdmu.edu.vn

Tóm tắt

Tận dụng cùi trái chanh dây để nuôi cấy vi sinh tạo chế phẩm giàu pectinase không chỉ có ý nghĩa về kinh tế mà còn giảm bớt lượng rác thải ra môi trường. Kết quả nghiên cứu cho thấy bột cùi trái chanh dây khô cảm ứng *Bacillus subtilis* sinh tổng hợp pectinase tốt hơn so với nấm *Aspergillus niger* B2. Trên môi trường bán rắn chứa 1% bột cùi trái chanh dây khô, bột bắp và bã đậu nành với tỷ lệ 5 :5, chủng *Bacillus subtilis* sinh tổng hợp enzyme pectinase tốt nhất trong thời gian 4 ngày, hoạt độ enzyme đạt 4,3 UI/g môi trường khô.

Từ khóa : *Aspergillus niger* B2, *Bacillus subtilis* Ba 79, cùi trái chanh dây, pectinase

Abstract

STUDY ON REUSE THE PULP OF LEMON STRING FRUIT TO CULTURE MICROORGANISM FOR THE PECTINASE PRODUCT

Reusing the pulp of lemon string fruits to culture microorganism for the pectinase product is both economic meaning and environmental meaning. The results shows the dry powder of the lemon string pulp induce *Bacillus subtilis* higher than *Aspergillus niger* B2 for pectinase yield. On the semi-solid medium containing 1% of dry powder of lemon string pulp, the corn powder and soya grounds at the ratio of 5:5, *Bacillus subtilis* strain synthesises the highest yield of pectinase for 4 days, gets 4.3 UI/gr of dry cultured medium.

1. Đặt vấn đề

Pectinase xúc tác quá trình thủy phân liên kết este để tách nhóm methoxyl trong phân tử pectin, giải phóng ra methanol và acid pectic. Pectinase đóng một vai trò quan trọng trong các quá trình chiết xuất, giảm độ nhớt, loại bỏ vỏ và tăng sản lượng trong sản xuất rượu vang, nước trái cây và các thức uống không cồn. Ngoài ra, pectinase còn áp dụng trong một số lĩnh vực khác như công nghệ sản xuất giấy của Nhật Bản, ngành dệt, chiết xuất tinh dầu, xử lý nước thải có pectin, nuôi cấy tế bào... (Kashyap và cs., 2001).

Mặc dù enzyme pectinase có mặt ở nhiều thực vật và vi sinh vật, nhưng trong sản xuất công nghiệp, vi khuẩn *Bacillus* và nấm mốc *Aspergillus* luôn là lựa chọn hàng đầu. Với khả năng phát triển nhanh trên nhiều loại cơ chất khác nhau, đặc biệt là trên các phế liệu nông nghiệp giàu pectin,

vi khuẩn *Bacillus* và nấm *Aspergillus* luôn thu hút được nhiều sự quan tâm của các nhà nghiên cứu. So với nguồn khai thác enzyme từ nguồn động vật và thực vật, nguồn enzyme từ vi sinh vật có nhiều ưu điểm như hoạt tính enzyme cao, thời gian tổng hợp enzyme từ vi sinh vật rất ngắn, nguyên liệu sản xuất rẻ tiền và có thể sản xuất hoàn toàn theo quy mô công nghiệp. Hàng năm, ngành công nghệ chế biến thực phẩm thải ra một lượng lớn các loại phế phụ liệu giàu pectin như: cùi vỏ các loại trái cây có múi, bã táo, vỏ cà rốt, cùi mít, vỏ chanh dây... Hàm lượng pectin trong các nguồn phế liệu này dao động trong khoảng 1,2 đến 4,5%. Tận dụng nguồn phế phụ liệu này để bổ sung vào môi trường nuôi cấy bán rắn để cảm ứng quá trình sinh tổng hợp pectinase không chỉ giúp giảm bớt chi phí sản xuất mà còn làm giảm thiểu lượng xác bã thực vật thải ra môi trường. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tận dụng nguồn thải vỏ chanh dây để nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus subtilis* và *Aspergillus niger* thu nhận chế phẩm giàu enzyme pectinase; đánh giá tác động của các yếu tố như thành phần môi trường bán rắn, tỷ lệ cùi vỏ chanh dây và thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh pectinase của chủng vi sinh vật chọn lọc.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu: (1) Bột cùi trái chanh dây: Vỏ trái chanh dây được thu nhận tại các cửa hàng nước trái cây, gọt lớp vỏ phía ngoài. Phần cùi trắng được sấy khô và xay nhuyễn thành bột mịn. (2) Chủng *Bacillus subtilis* Ba 79: được phân lập từ đất, là kết quả từ nghiên cứu của Trần Ngọc Hùng (2010). (3) *Aspergillus niger* B2: được phân lập từ vỏ bưởi, là kết quả đề tài nghiên cứu của Trần Thị Ngọc Như và cs. (2015).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp nuôi cấy bán rắn vi khuẩn thu nhận chế phẩm giàu pectinase: Chủng *Bacillus subtilis* được tăng sinh trên môi trường cao thịt pepton. Sau 24 giờ, hút 3% (w/w) dịch tăng sinh cho vào bình tam giác có chứa 45 g môi trường bán rắn có thành phần bao gồm bột bắp, bã đậu nành, bột cùi chanh dây với tỷ lệ 4%. Dịch khoáng bổ sung vào môi trường chiếm 60%. Ủ ở nhiệt độ phòng (~ 30°C), sau 72 giờ, thu nhận môi trường nuôi và sấy khô ở 45°C cho đến khi độ ẩm khoảng 10% (Trần Ngọc Hùng, 2010).

Phương pháp nuôi cấy bán rắn nấm mốc thu nhận chế phẩm pectinase: Các chủng *Aspergillus niger* từ môi trường thạch nghiêng được cấy vào các erlen chứa 25 g môi trường bán rắn có thành phần: cám gạo 34%; trấu 16%; bột chanh dây 4%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1%, độ ẩm 45%. Mật độ giống ban đầu khoảng 10^7 bào tử/g canh trường. Ủ ở nhiệt độ phòng (30 °C). Sau 5 ngày, thu nhận và sấy khô canh trường ở 45°C cho đến khi độ ẩm còn khoảng 10%. Xác định hoạt độ enzyme pectinase trong canh trường bằng phương pháp định lượng đường khử (Trần Thị Thanh Thuận & Nguyễn Đức Lượng, 2009).

Xác định hoạt tính enzyme pectinase: Hoạt độ enzyme pectinase thô được xác định bằng cách sử dụng 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS). Hỗn hợp phản ứng bao gồm 1 mL pectin dung dịch 0,5%, 0,5 mL dung dịch đệm sodium acetate (0,1 M; pH 5,0) và 0,5 mL enzyme. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 30 °C. Sau 1 giờ, 1 mL thuốc thử DNS được thêm vào và đun sôi trong 5 phút. So màu dung dịch ở bước sóng 575 nm. Mẫu đối chứng được thực hiện trong cùng điều kiện với dung dịch enzyme đã bị bất hoạt bằng cách đun sôi cách thủy trong thời gian 5 phút. Đường cong chuẩn được xây dựng với acid galacturonic. Một đơn vị hoạt độ pectinase được định nghĩa là lượng enzyme cần

thiết để xúc tác phản ứng, giải phóng 1 μmol acid galacturonic ở điều kiện phản ứng, trong thời gian 1 phút (Miller, 1959).

Xác định hàm lượng pectin theo phương pháp canxi pectat: Phương pháp dựa trên cơ sở thu nhận muối canxi pectat ở dạng kết tủa. 0,15 g mẫu được xà phòng hóa bằng 100 mL NaOH 1N trong 7 giờ. Thêm 50 mL dung dịch acid acetic 0,1N và 50 mL CaCl_2 2N, giữ trong 1 giờ. Đun sôi 5 phút rồi lọc thu tủa canxi pectat. Sấy khô và xác định khối lượng canxi pectat, từ đó tính hàm lượng pectin trong mẫu (Nguyễn Văn Mùi, 2007).

Định lượng đường khử theo phương pháp Miller: Trộn đều 0,5 mL dịch lọc với 0,5 mL thuốc thử DNS, đun sôi cách thủy trong 5 phút, thêm nước cất cho đủ 5 mL và so màu ở bước sóng 540 nm. Hàm lượng đường khử trong dung dịch được xác định thông qua đường chuẩn của đường glucose (Nguyễn Văn Mùi, 2007).

Phương pháp xử lý thống kê: Các thử nghiệm trong phòng thí nghiệm được tiến hành lặp lại ít nhất 3 lần và phân tích ANOVA bằng phần mềm Stagraphic Centurion XV

2.3. Bố trí thí nghiệm

Đánh giá sơ bộ thành phần của bột cùi trái chanh dây: Cùi trái chanh dây được sấy khô, xay nhuyễn và xác định một số chỉ tiêu như hàm lượng pectin, hàm lượng đường khử, pH và độ ẩm. Các yếu tố này có ảnh hưởng lớn đến tốc độ phát triển và khả năng sinh tổng hợp enzyme pectinase của chủng *Bacillus subtilis*.

Chọn lọc chủng vi sinh vật sinh tổng hợp pectinase cao trên môi trường bán rắn chứa cùi trái chanh dây: Nuôi cấy chủng *Bacillus subtilis* Ba 79 và *Aspergillus niger* B2 trên các môi trường bán rắn tương ứng. Sau các khoảng thời gian thích hợp, thu nhận canh trường, sấy khô và xác định hoạt độ enzyme pectinase. Chọn chủng vi sinh vật sinh tổng hợp pectinase cao trên môi trường chứa bột vỏ trái chanh dây.

Ảnh hưởng của một số yếu tố đến khả năng sinh tổng hợp pectinase:

– *Ảnh hưởng của tỷ lệ cơ chất cảm ứng:* Tỷ lệ cơ chất cảm ứng là hàm lượng pectin trong môi trường nuôi cấy. Trong thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng cùi trái chanh dây ở dạng tươi và dạng bột khô. Lượng nước trong cùi tươi khoảng 95%. Cùi trái chanh dây tươi bổ sung vào môi trường được khảo sát ở 3 mức 10; 20 và 40%. Đối với bột khô, hàm lượng cùi là 1; 2 và 4%. Tỷ lệ bột bắp và bã đậu nành là 5 : 5. Đánh giá hoạt độ pectinase ở các nghiệm thức để xác định tỷ lệ cùi chanh dây tốt nhất.

– *Ảnh hưởng của thành phần môi trường bán rắn:* Tỷ lệ bột bắp và bã đậu nành có ảnh hưởng đến tốc độ sinh trưởng và phát triển của chủng. Qua đó, ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp enzyme pectinase của chủng *Bacillus subtilis*. Trong thí nghiệm này, hàm lượng bột bắp và bã đậu nành thay đổi theo các tỷ lệ 3:7; 4:6; 5:5; 6:4 và 7:3. Tỷ lệ cùi chanh dây cảm ứng được chọn từ thí nghiệm trước. Sau 3 ngày, xác định hoạt độ enzyme pectinase và chọn tỷ lệ bột bắp, bã đậu nành thích hợp nhất.

– *Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy:* Thời gian nuôi cấy có ảnh hưởng lớn đến tốc độ sinh trưởng và khả năng sinh tổng hợp enzyme pectinase. Thời điểm ban đầu, *Bacillus subtilis* sử dụng các cơ chất đơn giản sẵn có trong môi trường. Khi mật độ chủng đủ nhiều và lượng cơ chất này cạn kiệt, chủng sẽ tiết ra enzyme pectinase để phân giải pectin. Thí nghiệm được khảo

sát ở các khoảng thời gian 3; 4; 5 và 6 ngày. Chọn thời gian thu nhận chế phẩm có hoạt độ enzyme pectinase tốt nhất.

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Đánh giá sơ bộ thành phần của bột cùi trái chanh dây.

Bột cùi trái chanh dây được xác định một số chỉ tiêu có ảnh hưởng lớn đến tốc độ phát triển và khả năng sinh tổng hợp enzyme pectinase của vi sinh vật như hàm lượng pectin, hàm lượng đường khử, pH và độ ẩm. Kết quả phân tích được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1. Kết quả một số thành phần của bột cùi trái chanh dây

Chỉ tiêu	Giá trị
Hàm lượng pectin (%)	13,9 ± 0,2
Hàm lượng đường khử (mg/g)	29,0 ± 4,1
pH _{H2O}	4,33 ± 0,04
Độ ẩm (%)	7,6 ± 0,1

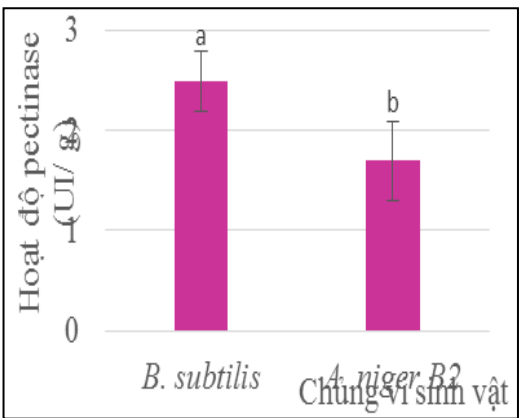
Cùi trái chanh dây thường được thải bỏ sau quy trình chế biến các sản phẩm nước ép chanh dây. Tuy nhiên, trong loại phế liệu này còn chứa nhiều chất dinh dưỡng với hàm lượng khá cao. Lượng đường khử chiếm 29 mg/g nguyên liệu khô, tương đương 2,9%, đây là yếu tố dinh dưỡng giúp vi sinh vật phát triển. Hàm lượng pectin chiếm 13,9% trong lượng khô, cao hơn nhiều so với các loại phế liệu giàu pectin khác như cùi vỏ các loại trái cây có múi, vỏ cà rốt, bã táo, bã nho... Đặc tính và hàm lượng pectin có vai trò quyết định trong việc cảm ứng các chủng vi sinh vật sinh tổng hợp enzyme pectinase.

3.2. Chọn lọc đối tượng vi sinh enzyme pectinase cao

Nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus subtilis* Ba 79 và nấm *Aspergillus niger* B2 trên các môi trường bán rắn tương ứng có chứa 4% bột cùi trái chanh dây. Sau các khoảng thời gian thích hợp, thu nhận môi trường và xác định hoạt độ enzyme pectinase. Kết quả thí nghiệm được thể hiện trong bảng 2 và hình 1.

Bảng 2. Hoạt độ pectinase của các chủng nghiên cứu trên môi trường bán rắn chứa bột cùi trái chanh dây (ký tự sau các giá trị biểu thị mức độ khác nhau ở độ tin cậy 95% ($P < 0,05$)).

Chủng vi sinh vật	<i>B. subtilis</i>	<i>A. niger</i> B2
Hoạt độ pectinase (UI/g)	2,5 ^a ± 0,3	1,7 ^b ± 0,4



Hình 1. Biểu đồ thể hiện hoạt độ pectinase của các chủng nghiên cứu trên môi trường bán rắn chứa bột cùi trái chanh dây. Ký tự trên các cột biểu thị mức độ khác nhau ở độ tin cậy 95% ($P < 0,05$).

Trên môi trường bán rắn chứa chất cảm ứng là bột cùi trái chanh dây, vi khuẩn *Bacillus subtilis* sinh tổng hợp enzyme pectinase tốt hơn so với chủng nấm *Aspergillus niger* B2, với hoạt độ đạt 2,5 UI/g, cao hơn 47% so với khi nuôi cấy nấm. Mặc dù nhiều báo cáo trước đây cho thấy nấm *Aspergillus niger* B2 sinh pectinase tốt trên cùi bưởi, có lẽ tính chất của pectin trong cùi chanh dây không thích hợp cho sự cảm ứng sinh enzyme. Do đó, chúng tôi chọn chủng *Bacillus subtilis* để khảo sát thêm ảnh hưởng của một số yếu tố lên quá trình tổng hợp enzyme pectinase

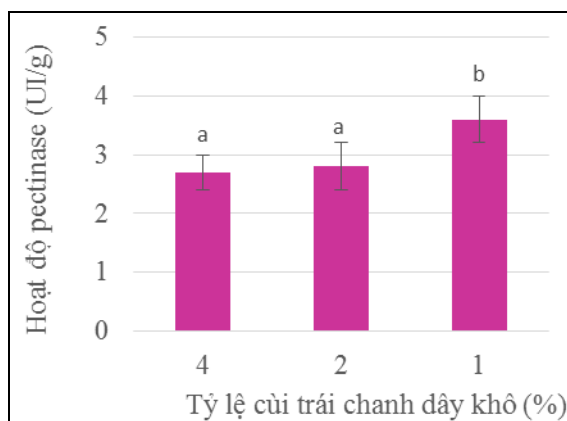
3.3. Ảnh hưởng của một số yếu tố đến khả năng sinh tổng hợp pectinase

Ảnh hưởng của tỷ lệ cơ chất cảm ứng: Cùi trái chanh dây tươi bổ sung vào thành phần cơ chất bán rắn ở 3 mức 10; 20 và 40%. Đối với bột khô, hàm lượng cùi là 1; 2 và 4%. Tỷ lệ bột bắp và bã đậu nành là 5 : 5. Hàm lượng nước chiếm 60%. Sau 3 ngày nuôi cấy, hoạt độ pectinase ở các nghiệm thức được thể hiện trong bảng 3 và hình 2.

Bảng 3. Ảnh hưởng của hàm lượng cơ chất cảm ứng đến khả năng sinh tổng hợp pectinase

	Bột cùi chanh dây khô			Cùi chanh dây tươi		
	4%	2%	1%	40%	20%	10%
Hoạt độ pectinase (UI/g)	2,7 ^a ± 0,3	2,8 ^a ± 0,4	3,6 ^b ± 0,4	-	-	-

(-): không phát hiện được với phương pháp kiểm tra; ký tự sau các giá trị biểu thị mức độ khác nhau ở độ tin cậy 95% ($P < 0,05$).



Hình 2. Biểu đồ thể hiện ảnh hưởng của hàm lượng cơ chất cảm ứng đến khả năng sinh tổng hợp pectinase. Ký tự trên các cột biểu thị mức độ khác nhau ở độ tin cậy 95% ($P < 0,05$).

Hàm lượng pectin và tính chất của nguyên liệu có ảnh hưởng lớn đến khả năng cảm ứng sinh enzyme pectinase. Trên nguyên liệu tươi, sự phát triển của chủng *Bacillus subtilis* vẫn bình thường nhưng không ghi nhận được hoạt độ enzyme pectinase ở tất cả các nghiệm thức. Có thể cấu trúc của nguyên liệu tươi đã cản trở sự giải phóng các phân tử pectin vào môi trường. Trong khi đó, bột cùi trái chanh dây khô cảm ứng sinh pectinase tốt hơn. Hoạt độ pectinase ở các nghiệm thức dao động trong khoảng 2,7 đến 3,6 UI/g. Hàm lượng bột cùi trái trong môi trường bán rắn càng cao, hiệu quả cảm ứng sinh pectinase càng giảm. Ở tỷ lệ 1% bột cùi chanh dây, hoạt độ pectinase của nghiệm thức cao nhất, đạt 3,6 UI/g, khác biệt với các nghiệm thức khác ở độ tin cậy 95%.

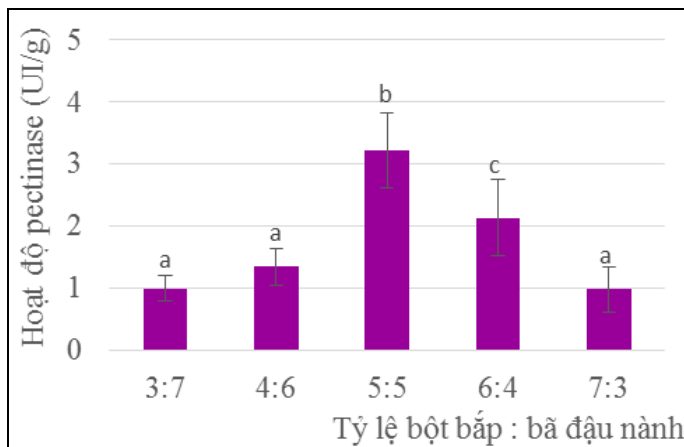
Ảnh hưởng của thành phần môi trường bán rắn: Nuôi cấy bán rắn chủng *Bacillus subtilis* trên các môi trường có hàm lượng bột bắp và bã đậu nành thay đổi theo các tỷ lệ 3:7; 4:6; 5:5; 6:4

và 7:3. Tỷ lệ bột cùi chanh dây khô chiếm 1%. Kết quả thí nghiệm được thể hiện trong bảng 4 và hình 3.

Bảng 4. Ảnh hưởng của tỷ lệ cơ chất đến khả năng sinh tổng hợp enzyme pectinase

Tỷ lệ bột bắp:bã đậu nành	3:7	4:6	5:5	6:4	7:3
Hoạt độ pectinase (UI/g)	$1,0^a \pm 0,2$	$1,4^a \pm 0,3$	$3,2^b \pm 0,6$	$2,1^a \pm 0,6$	$1,0^a \pm 0,4$

Ký tự trên các cột biểu thị mức độ khác nhau ở độ tin cậy 95% ($P < 0,05$).



Hình 3. Biểu đồ thể hiện ảnh hưởng của tỷ lệ cơ chất đến khả năng sinh tổng hợp enzyme pectinase. Ký tự trên các cột biểu thị mức độ khác nhau ở độ tin cậy 95% ($P < 0,05$).

Tỷ lệ cơ chất của môi trường bán rắn có ảnh hưởng lớn đến khả năng tổng hợp pectinase của chủng *Bacillus subtilis*. Hàm lượng bột bắp và bã đậu nành trong môi trường cao quá hoặc thấp quá đều không có lợi cho quá trình sinh tổng hợp pectinase. Môi trường bán rắn chứa bột bắp và bã đậu nành với tỷ lệ 5:5 cho hoạt độ pectinase cao nhất, đạt 3,2 UI/g môi trường khô. Khác biệt với các nghiệm thức khác ở độ tin cậy 95%.

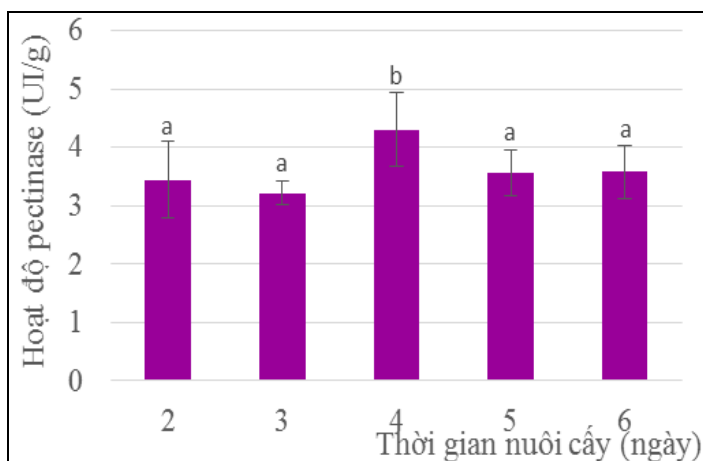
Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy: Nuôi cấy chủng *Bacillus subtilis* trên môi trường bán rắn có chứa 1% bột cùi chanh dây khô, 19,5% bột bắp và 19,5% bã đậu nành. Thí nghiệm được khảo sát ở các khoảng thời gian 2; 3; 4; 5 và 6 ngày. Hoạt độ enzyme pectinase trong các nghiệm thức được thể hiện trong bảng 5 và hình 4.

Bảng 5. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp enzyme pectinase

Thời gian nuôi cấy (ngày)	2	3	4	5	6
Hoạt độ pectinase (UI/g)	$3,4^a \pm 0,7$	$3,2^a \pm 0,2$	$4,3^b \pm 0,6$	$3,6^a \pm 0,4$	$3,6^a \pm 0,5$

Ký tự trên các cột biểu thị mức độ khác nhau ở độ tin cậy 95% ($P < 0,05$).

Thời gian nuôi cấy không có ảnh hưởng nhiều đến quá trình sinh tổng hợp pectinase của chủng nghiên cứu. Thời gian đầu, chủng sử dụng các chất dinh dưỡng đơn giản, sẵn có trong môi trường để sinh trưởng và phát triển. Khi mật độ chủng tăng mạnh cũng là lúc các chất dinh dưỡng sẵn có cạn kiệt, chủng sẽ sinh tổng hợp enzyme pectinase để thủy phân pectin lấy chất dinh dưỡng. Thời gian thích hợp để thu nhận chế phẩm giàu pectinase là 4 ngày, hoạt độ đạt 4,3 UI/g. Ở thời gian nuôi cấy lâu hơn, chủng không sinh tổng hợp thêm pectinase và hoạt độ enzyme này trong môi trường cũng giảm dần.



Hình 4. Biểu đồ thể hiện ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp enzyme pectinase. Ký tự trên các cột biểu thị mức độ khác nhau ở độ tin cậy 95% ($P < 0,05$).

4. Thảo luận

So với nhiều loại phế liệu nông nghiệp giàu pectin khác như vỏ các loại trái cây có múi, bã táo, bã nho, vỏ cà rốt... cùi chanh dây có chứa khá nhiều pectin, hàm lượng lên đến 13,9%. Đây không chỉ là điều kiện cần thiết để tận dụng nguồn nguyên liệu này nhằm sản xuất chế phẩm giàu enzyme pectinase mà còn có thể sử dụng để tách chiết pectin dùng cho thực phẩm. Tuy nhiên, bột cùi trái chanh dây có pH khá thấp, đạt 4,33, nên trong quá trình nuôi cấy cần có điều chỉnh pH cho phù hợp với nhu cầu sinh lý và sinh tổng hợp của chủng nuôi. Nhiều nghiên cứu trước đây đã cho thấy nấm *Aspergillus niger* được sử dụng để tổng hợp enzyme pectinase trên nhiều loại nguyên liệu khác nhau (Trần Thị Thanh Thuận & Nguyễn Đức Lượng, 2009; Nazneen Akhter và cs., 2011; Ashfaq Khan và cs., 2012; Dương Văn Tuấn và cs., 2012), tuy nhiên, trên môi trường chứa bột cùi trái chanh dây, nấm *Aspergillus niger* B2 sinh pectinase không tốt bằng vi khuẩn *Bacillus subtilis* Ba 79. Bên cạnh tỷ lệ cơ chất cảm ứng, nghiên cứu của chúng tôi cũng đã chọn được tỷ lệ bột bắp và bã đậu nành thích hợp cho sự phát triển và sinh tổng hợp pectinase của chủng là 5:5. Bã đậu nành không chỉ là nguồn cung cấp đạm hữu cơ chính mà còn là yếu tố giúp cho môi trường nuôi cấy xốp, thoáng khí. Bột bắp là nguồn cung cấp carbon chính nhưng khi hàm lượng quá cao, môi trường bán rắn sẽ vốn cục, giảm độ thoáng khí, không thuận lợi cho quá trình phát triển của vi khuẩn *Bacillus subtilis* Ba 79. Thời gian nuôi cấy tốt nhất cho quá trình thu nhận chế phẩm giàu enzyme pectinase là 4 ngày ở nhiệt độ phòng ($\sim 30^{\circ}\text{C}$). Kết quả này nhanh hơn so với một số nghiên cứu đã công bố về thời gian thu nhận chế phẩm pectinase từ nấm *Aspergillus niger* là từ 7 đến 12 ngày (Nazneen Akhter và cs., 2011; Ashfaq Khan và cs., 2012; Tivkaa Amande và cs., 2012). So với nhiều báo cáo trước đây về thu nhận enzyme pectinase từ nấm *Aspergillus niger*, chế phẩm của chúng tôi tuy hoạt tính enzyme pectinase không cao bằng, nhưng quá trình nuôi cấy và thu nhận chế phẩm thuận tiện hơn so với khi sử dụng nấm mốc. Thêm vào đó, enzyme pectinase từ vi khuẩn *Bacillus subtilis* Ba 79 có thể có những ưu điểm riêng đối với những quy trình cụ thể. Các đặc tính này cần được tìm hiểu trong những nghiên cứu tiếp theo, chẳng hạn như tinh sạch và ứng dụng enzyme pectinase vào các quá trình bóc vỏ tiêu, xử lý lớp nhót trên hạt cà phê, làm trong các loại nước ép trái cây, rượu vang...

5. Kết luận

Bột cùi trái chanh dây có chứa hàm lượng khá cao pectin và đường khử. Bột khô cảm ứng chủng *Bacillus subtilis* sinh pectinase tốt hơn với nấm *Aspergillus niger* B2. Chủng *Bacillus subtilis* sinh tổng hợp enzyme pectinase tốt nhất khi nuôi trên môi trường bán rắn chứa 1% bột cùi trái chanh dây khô, 19,5% bột bắp và 19,5% bã đậu nành trong thời gian 4 ngày, hoạt độ enzyme đạt 4,3 UI/g môi trường khô.

Lời cảm ơn : Chúng tôi xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí của Chương trình Sinh viên Nghiên cứu Khoa học, Trường Đại học Thủ Dầu Một và sự giúp đỡ của Trung tâm Nghiên cứu Thực nghiệm Trường Đại học Thủ Dầu Một.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Ashfaq Khan, Saniay Sahay and Neha Rai (2012). Production and optimization of pectinase enzyme using *Aspergillus niger* strains in solid state fermentation. *Research in Biotechnology*, 3(3), 19–25.
- [2] Dương Văn Tuấn, Lê Thị Hoàng Linh, Trần Thị Xô (2012). Nghiên cứu sử dụng hệ enzyme pectinase và cellulose của chủng của vi khuẩn *Bacillus subtilis*, *P. lantarum* và nấm mốc *A. niger*, *Ph. rhysosporium* để xử lý lớp nhót của vỏ cà phê. *Tuyển tập báo cáo Hội nghị sinh viên nghiên cứu khoa học lần thứ 8 Đại học Đà Nẵng*.
- [3] Kashyap, D.R.; Vohra P.K., Chopra, S.; Tewari (2001). Application of pectinase in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, 77, 512-227.
- [4] Miller L.G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem*, 31, 426 – 473.
- [5] Nazneen Akhter, M. Alam Morshed, Azim Uddin, Feroza Begum, Tipu Sultan, Abul Kalam Azad (2011). Production of pectinase by *Aspergillus niger* cultured in solid state media. *International journal of Biosciences*, 1(1), 33 – 42.
- [6] Nguyễn Văn Mùi (2007). Thực hành Hóa sinh học. Hà Nội: NXB. Đại học Quốc gia, tr. 60.
- [7] Tivkaa Amande, Bukola Adebayo Tayo (2012). Screening of new isolates fungal strains for polygalacturonase production in submerged fermentation, *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 11(9), 15 – 22.
- [8] Trần Ngọc Hùng (2010). *Nghiên cứu tạo chế phẩm giàu protease từ vi khuẩn Bacillus subtilis để bổ sung vào thức ăn cho gia cầm* (Luận văn thạc sĩ). Trường đại học Khoa học Tự nhiên.
- [9] Trần Thị Ngọc Như, Lê Thị Nhân, Huỳnh Như, Nguyễn Thị Ngọc Quyên (2015). *Nghiên cứu sử dụng vi nấm Trichoderma sp. và Aspergillus sp. để bóc vỏ tiêu xanh* (Đề tài sinh viên NCKH). Trường ĐH Thủ Dầu Một.
- [10] Trần Thị Thanh Thuần, Nguyễn Đức Lượng (2009). Nghiên cứu enzyme cellulase và pectinase từ chủng *Trichoderma viride* và *Aspergillus niger* nhằm xử lý nhanh vỏ cà phê. *Tạp chí phát triển Khoa học và Công nghệ*, 12(3), 50 – 56.