

Bán tinh sạch và ứng dụng enzyme pectinase từ nấm mốc *Aspergillus niger* vào xử lý nước ép táo và nho

Partial purification of pectinase production by *Aspergillus niger* and using treatment of apple and grape juice

Đỗ Thị Hiền^{1*}

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

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

THÔNG TIN

TÓM TẮT

DOI: 10.46223/HCMCOUJS.
tech.vi.15.1.1021.2020

Ngày nhận: 18/05/2020

Ngày nhận lại: 22/09/2020

Duyệt đăng: 20/10/2020

Từ khóa:

độ trong, hiệu suất thu hồi, nho,
pectinase, táo

Enzyme pectinase sử dụng trong nghiên cứu hoạt tính 194 UI/mL từ *Aspergillus niger* bước đầu tinh sạch bằng các phương pháp khác nhau: tủa muối, tủa bằng dung môi hữu cơ, lọc màng. Chế phẩm sau tinh sạch bằng lọc màng ứng dụng để tăng hiệu suất thu hồi, làm trong dịch ép táo và nho. Kết quả cho thấy sử dụng enzyme pectinase xử lý puree táo ở nhiệt độ phòng, nồng độ enzyme 8% (v/w), thời gian ủ 150 phút cho hiệu suất trích ly 82,7% tăng gần 24%, độ trong tăng 36%, độ nhớt giảm 18,8% so với mẫu không sử dụng enzyme. Đối với puree nho xử lý bằng enzyme pectinase ở nhiệt độ phòng, nồng độ enzyme 5% (v/w), thời gian ủ 120 phút cho hiệu suất trích ly 87,2% tăng gần 8,1%, độ trong tăng 66,7%, độ nhớt giảm 23,8% so với mẫu đối chứng.

ABSTRACT

The study used pectinase enzyme with activity of 194 UI/mL from *Aspergillus niger* initially purified by different methods: precipitation of salt, precipitation of organic solvents, membrane filtration. Post-purification preparations by membrane filtration application to increase recovery efficiency, transparency of apple and grape juice. The results showed that using pectinase enzyme with apple puree at room temperature, enzyme concentration 8% (v/w), incubation time 150 minutes gave an extraction efficiency of 82.7%, increased by 24%, transparency increased by 36%, viscosity down 18.8% compared with control sample. Using pectinase enzyme with grape puree at room temperature, enzyme concentration 5% (v/w), incubation time 120 minutes gave an extraction efficiency of 87.2%, increased by 8.1%, transparency increased by 66.7%, viscosity decreased by 23.8% compared with the control sample.

Keywords:

apple, clarification, grape,
pectinase, yield

1. Giới thiệu

Enzyme pectinase được thu nhận chủ yếu nhờ vi nấm, trong đó *Aspergillus niger* được cho là có khả năng sinh tổng hợp 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 (Phan, Pham, Ngo, & Tran, 2018) và chế phẩm enzyme từ vi sinh vật này được FDA công nhận là an toàn khi ứng dụng trong công nghệ thực phẩm.

Sau ép, nước trái cây thường bị đục và phân lớp do đó giá trị cảm quan giảm, đồng thời giá trị kinh tế cũng vì vậy mà giảm theo. Nguyên nhân chủ yếu là do trong nước ép còn chứa nhiều chất pectin. Để khắc phục tình trạng này là sử dụng enzyme pectinase làm trong dịch quả vì enzyme pectinase có khả năng phân cắt pectin thành những hợp chất đơn giản dễ tan từ đó sẽ làm giảm độ nhớt, tăng hiệu suất thu hồi và làm tăng độ trong của dịch nước ép trái cây (Nguyen, Ly, Chau, & Che, 2011).

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, & Gupta, 2013) đã sử dụng enzyme này để làm trong dịch ép ổi. Thu nhận polygalacturonase 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 Polygalacturonase từ *Neosartorya fisheri* làm trong dịch ép táo và dâu được công bố bởi (Pan et al., 2015).

Hiện nay trên thị trường nước trái cây thì táo và nho chiếm thị phần lớn, thường được sản xuất với qui mô công nghiệp vì nước ép táo và nho là những sản phẩm từ trái cây giàu vitamin, chất xơ, chất khoáng. Các chất này rất quan trọng với sức khỏe con người, đồng thời nước ép trái cây còn tiện lợi đối với người tiêu dùng. Do đó, nghiên cứu mong muốn sử dụng chế phẩm enzyme pectinase từ *Aspergillus niger* nuôi cấy trên môi trường có bổ sung vỏ cam (giàu pectin), một phụ phẩm thường bị bỏ đi hoặc làm phân bón hữu cơ sau khi ép lấy nước để làm trong và tăng hiệu suất thu hồi của táo và nho.

2. 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 Thành phố Hồ Chí Minh. Chế phẩm enzyme pectinase thu nhận từ *Aspergillus niger* (T. P. P. Huynh & Do, 2018).

Nho, táo mua tại siêu thị Aeon mall Quận Tân Phú, Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Chuẩn bị puree táo và nho

Táo đỏ (táo fuji): chọn quả màu sắc đồng đều, không chọn những quả sẫm màu hoặc màu nhạt vì có độ chín không đạt yêu cầu, quả nguyên vẹn không có mùi lạ, không bị dập, thối, gọt vỏ, bỏ hạt, xay thô bằng máy xay sinh tố trong 5 phút.

Nho đỏ (nho không hạt): chọn quả màu sắc đồng đều, không bị dập, thối, xay thô bằng máy xay sinh tố trong 3 phút.

2.2.2. Chuẩn bị chế phẩm enzyme

Nuôi cấy *Aspergillus niger* trong môi trường lỏng với vỏ cam 80 g/L - hàm lượng pectin 0,72 g/L (T. P. P. Huynh & Do, 2018). 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)- mật độ 107 bào tử/mL, pH 5,0 và thời gian nuôi cấy 72 giờ.

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%), (Tran, 2013). 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 (Le, 2006). Kết quả hàm lượng pectin trong vỏ cam đạt 0,9% (w/w).

Dịch nuôi cấy được ly tâm 4500 vòng/phút trong 15 phút, thu dịch. Sau đó, lọc qua màng 30 kDa thu nhận enzyme pectinase và ứng dụng vào các thí nghiệm. Hoạt tính enzyme là 194 UI/mL. Phương pháp xác định hoạt tính (Mohsen, Bazaraa, & Doukani, 2009).

Cho enzyme tác dụng với pectin (cơ chất) tạo ra acid galacturonic phản ứng màu với thuốc thử DNS (dinitrosalicylic acid), đo OD575 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 μ mol galacturonic acid giải phóng trong 1 phút trên 1 mL. Sử dụng đường chuẩn D-galacturonic acid.

Chế phẩm enzyme được quét phổ FTIR và xác định kích thước trên bản điện di nằm trong khoảng 30-80 kDa.

Dịch enzyme sau khi thu nhận từ quá trình nuôi cấy tiến hành tinh sạch sơ bộ bằng các phương pháp khác nhau: tủa muối, tủa cồn, tủa acetone và lọc màng. Sử dụng enzyme sau lọc màng vào xử lý nước ép nho và táo.

2.2.3. Các phương pháp phân tích (Srivastava & Tyagi, 2013)

Xác định độ nhớt bằng nhớt kế mao quản Ostwald.

$$\eta = K \cdot \bar{d} \cdot t \quad (1)$$

η : độ nhớt (cps); t : Thời gian chảy trung bình của dung dịch (s); \bar{d} : Tỷ trọng tương đối trung bình của dung dịch, $\bar{d} = (m_1 - m) / (m_2 - m)$; m : khối lượng bình tỷ trọng (g); m_1 : Khối lượng bình tỷ trọng chứa mẫu (g); m_2 : Khối lượng bình tỷ trọng chứa nước cất (g)

$$K = \frac{\eta_0}{d_0 \cdot t_0} \quad (2)$$

Thời gian chảy trung bình của nước cất t_0 (s); Độ nhớt của nước $\eta_0 = 0,801$ (cps); Tỷ trọng của nước $d_0 = 1$ (g/cm³)

Đo độ trong bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 450 nm. Phần trăm độ trong được tính bằng công thức:

$$\text{Độ trong} = \frac{OD_{KC} - OD_{TN}}{OD_{KC}} \times 100\% \quad (3)$$

OD_{TN}: OD của dịch quả đã xử lý enzyme

OD_{KC}: OD mẫu đối chứng (không xử lý enzyme)

Xác định hiệu suất thu hồi bằng phương pháp cân khối lượng. Hiệu suất thu hồi được tính bằng công thức:

$$H = \frac{m_2}{m_1} \times 100 \quad (4)$$

m_2 : khối lượng dịch quả sau khi xử lý enzyme (g); m_1 : khối lượng puree quả (100g)

2.2.4. Enzyme được tinh sạch bằng phương pháp kết tủa

Tủa bằng dung môi hữu cơ: cho từ từ dịch pectinase thô vào ethanol và acetone đã được làm lạnh đến 4°C với 5 tỷ lệ (dịch enzyme thô: dung môi): 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, khuấy đảo nhẹ và để yên ở 4°C trong 2 giờ. Tiến hành ly tâm 4000 rpm trong 10 phút, loại dịch thu tủa.

Tủa bằng muối trung tính: Bổ sung từ từ (NH₄)₂SO₄ 70% bão hòa (khoảng 54,76 g trong 100 mL dịch) vào cốc có chứa dịch enzyme thô, khuấy liên tục trên máy khuấy từ cho đến khi tan hết muối. Để yên 4°C trong 2 giờ và tiến hành thẩm tích loại bỏ muối và sau đó ly tâm 4000 rpm trong 10 phút, loại dịch thu tủa.

Sau khi tách tủa ta sẽ cho 3 mL đệm acetate hòa tan tủa (hoàn nguyên) để tiến hành xác định hoạt tính enzyme pectinase, hàm lượng protein (mg/mL), hoạt tính riêng enzyme pectinase (UI/mg protein).

2.2.5. Tinh sạch enzyme bằng phương pháp lọc màng

Chuẩn bị 1 lít dịch enzyme thô lọc qua cột lọc hollow fiber cartridge 30 kDa (thiết bị lọc tiếp tuyến Quix Stand System) với tốc độ nhập liệu 85 rpm và áp suất trên bề mặt màng không quá 15 Psi, thu dịch trên màng lọc và xác định hoạt tính enzyme pectinase.

2.2.6. Khảo sát nồng độ của enzyme pectinase đến đặc tính hóa lý dịch quả thu hồi

Bổ sung enzyme với các nồng độ 4%, 5%, 6%, 7%, 8% (v/w) vào 100 g puree táo hoặc nho, ủ ở 37°C, pH 5,0 trong 120 phút. Sau đó vô hoạt enzyme ở 85-90°C trong 3 phút, tiến hành ly tâm 3000 rpm trong 15 phút (Yusof & Ibrahim, 1994), thu dịch quả, xác định độ nhớt, độ trong, cân thể tích dịch quả để xác định hiệu suất thu hồi (Srivastava & Tyagi, 2013). Mẫu đối chứng là mẫu không bổ sung enzyme.

2.2.7. Khảo sát nhiệt độ ủ của enzyme pectinase đến đặc tính hóa lý quả thu hồi

Sử dụng 100 g puree táo hoặc nho, bổ sung enzyme với nồng độ thích hợp từ thí nghiệm mục 2.2.4. Ủ ở pH 5,0 thời gian ủ 120 phút với nhiệt độ ủ thay đổi: nhiệt độ phòng (30-32°C), 45, 50 và 55°C. Sau đó vô hoạt enzyme ở 85-90°C trong 3 phút, tiến hành ly tâm 3000 rpm trong 15 phút (Yusof & Ibrahim, 1994), thu dịch quả, xác định độ nhớt, độ trong, cân thể tích dịch quả để xác định hiệu suất thu hồi (Srivastava & Tyagi, 2013).

2.2.8. Khảo sát thời gian thủy phân của enzyme pectinase đến đặc tính hóa lý quả thu hồi

Sử dụng 100g puree táo hoặc nho, bổ sung enzyme với nồng độ thích hợp từ thí nghiệm mục 2.2.4. Ủ ở pH 5,0 nhiệt độ thích hợp từ thí nghiệm mục 2.2.5, thời gian ủ được thay đổi: 60, 90, 120, 150, 180 phút. Sau đó vô hoạt enzyme ở 85-90°C trong 3 phút, tiến hành ly tâm 3000 rpm trong 15 phút (Yusof & Ibrahim, 1994), thu dịch quả, xác định độ nhớt, độ trong, cân thể tích dịch quả để xác định hiệu suất thu hồi (Srivastava & Tyagi, 2013).

2.2.9. 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, Excel 2013 với mức độ tin cậy 95%.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Sử dụng phương pháp kết tủa để tinh sạch

Khi sử dụng cồn và acetone để tủa enzyme cho hiệu quả tốt hơn sử dụng muối. Sử dụng acetone tỷ lệ 1:3 tốt nhất (68,153 UI/mg) rồi đến tủa cồn ở tỷ lệ 1:4 (50,714 UI/mg) và cuối cùng là tủa muối (NH₄)₂SO₄ 70% bão hòa (59,505 UI/mg).

Bảng 1

Ảnh hưởng của các phương pháp rửa đến hoạt tính enzyme

Hình thức bán tinh sạch	Tỷ lệ	Ký hiệu	Hoạt tính enzyme (UI/mL)	Hàm lượng protein ($\mu\text{g/mL}$)	Hoạt tính riêng (UI/mg)
Tủa cồn	1:1	T1	21,31 \pm 0,71 ^a	3514,96 \pm 54,97 ^g	6,066 \pm 0,296 ^a
	1:2	T2	85,31 \pm 0,58 ^b	3128,87 \pm 109,57 ^d	27,282 \pm 0,784 ^b
	1:3	T3	103,18 \pm 0,56 ^c	3650,61 \pm 23,91 ^h	28,262 \pm 0,044 ^c
	1:4	T4	166,61 \pm 0,56 ^k	3285,39 \pm 31,31 ^f	50,714 \pm 0,586 ^j
	1:5	T5	149,77 \pm 0,28 ^g	3520,17 \pm 27,11 ^g	42,546 \pm 0,335 ^g
Tủa acetone	1:1	E1	114,08 \pm 0,67 ^d	3215,77 \pm 57,93 ^{ef}	35,481 \pm 0,426 ^d
	1:2	E2	141,72 \pm 0,65 ^f	3447,65 \pm 27,83 ^g	41,106 \pm 0,143 ^e
	1:3	E3	124,34 \pm 0,19 ^e	1824,46 \pm 16,1 ^a	68,153 \pm 0,558 ^k
	1:4	E4	160,18 \pm 0,33 ^j	2918,96 \pm 27,83 ^c	54,878 \pm 0,587 ⁱ
	1:5	E5	157,80 \pm 0,37 ⁱ	3197,22 \pm 27,83 ^{de}	49,358 \pm 0,444 ^h
Tủa muối (NH ₄) ₂ SO ₄	70%	M	152,14 \pm 1,25 ^h	2556,88 \pm 27,36 ^b	59,505 \pm 0,760 ^f

(a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k 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

Nghiên cứu của Mohsen và cộng sự (2009) đã dùng phương pháp bán tinh sạch tủa muối (NH₄)₂SO₄ và khảo sát các tỷ lệ từ 0 đến 80% bão hòa. Kết quả cho thấy 89,6% protein enzyme được rửa ở 70% bão hòa. Vì vậy chúng tôi cũng bố trí thí nghiệm rửa ở mức độ bão hòa tương tự và thu được độ tinh sạch 1.053 lần trong khi trong nghiên cứu của Mohsen là 3,5 lần. Có nhiều nguyên nhân có thể dẫn đến sự khác biệt này, trong đó một trong sự khác biệt là về chủng giống : chủng trong công bố của Mohsen và cộng sự (2009) là chủng vi sinh vật biến đổi gen.

Bên cạnh đó, nghiên cứu của Barman và cộng sự (2015) đã thực hiện tinh sạch enzyme bằng phương pháp rửa cồn ethanol với tỷ lệ 1:3 cho hoạt tính enzyme tốt nhất. Ngoài ra, Raghunath và cộng sự (2008) và Huo và cộng sự (2015) đều thực hiện bán tinh sạch enzyme pectinase bằng phương pháp rửa acetone với tỷ lệ 1:3 cho hoạt tính cao nhất. Vì vậy, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy có sự tương đồng với các nghiên cứu trên.

3.2. Tinh sạch pectinase bằng phương pháp lọc màng

Dịch enzyme sau khi nuôi cấy được tiến hành lọc màng kích thước 30 kDa và thu dịch trên màng xác định hoạt tính enzyme. Kết quả được thể hiện qua Bảng 2.

Bảng 2

Ảnh hưởng của hình thức thu nhận lọc màng đến hoạt tính enzyme

Loại enzyme	Thể tích (mL)	Hoạt tính (UI/mL)	Tổng hoạt tính (UI)	Hiệu suất hoạt tính (%)
Enzyme thô trước lọc màng	100	194	19400	
Enzyme trên màng	20	733,7	14674,67	75,6
Enzyme dưới màng	80	10,19	815,27	4,2

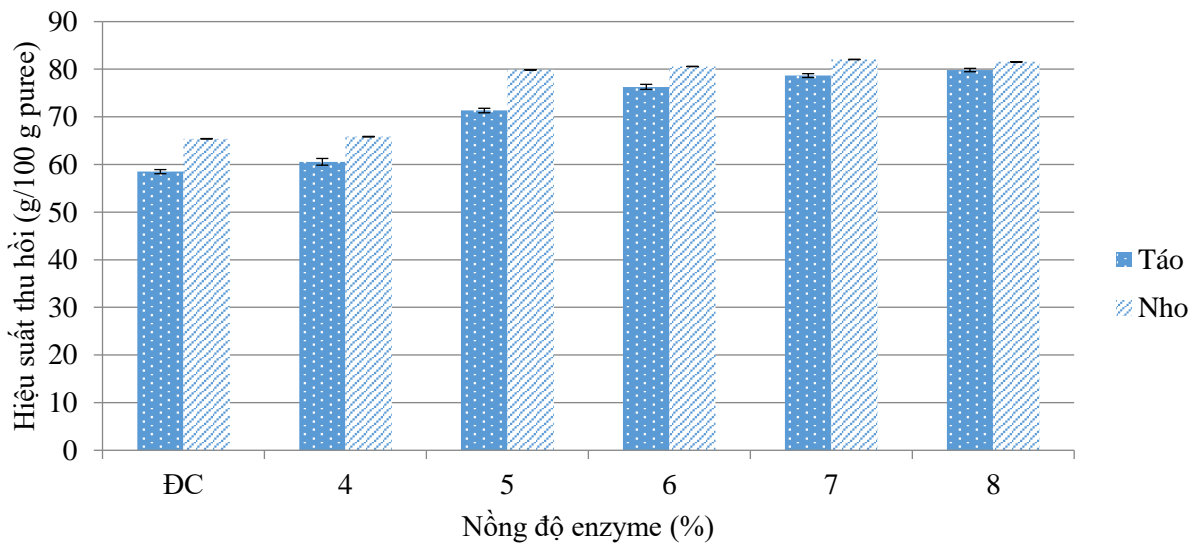
Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Sau khi tiến hành lọc màng dịch enzyme thô đã được loại bớt nước và một số tạp chất có kích thước nhỏ hơn kích thước màng lọc. Hoạt tính của enzyme trên màng tăng khoảng 3,78 lần so với dịch enzyme thô. Hiệu suất hoạt tính enzyme đạt 75,6% (tính theo tổng hoạt tính enzyme), hiệu suất thu hồi 20%. Kết quả nghiên cứu cũng gần tương đồng với nghiên cứu thu nhận enzyme pectinase từ *A. niger* và tinh sạch bằng phương pháp lọc màng, hiệu suất thu hồi 27,87% và hiệu suất hoạt tính 87,98%.

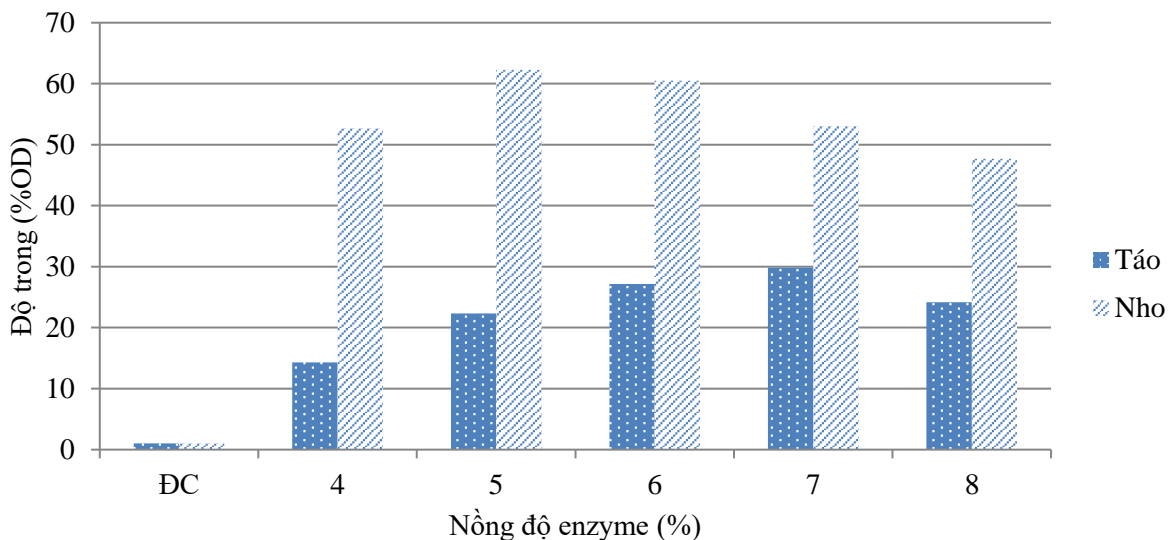
Từ các kết quả trên, để thuận tiện cho quá trình nghiên cứu về sau, chúng tôi chọn enzyme sau khi lọc màng để tiến hành các thí nghiệm ứng dụng vào sản xuất nước ép táo và nho.

3.3. Khảo sát nồng độ của enzyme pectinase đến đặc tính hóa lý dịch quả thu hồi

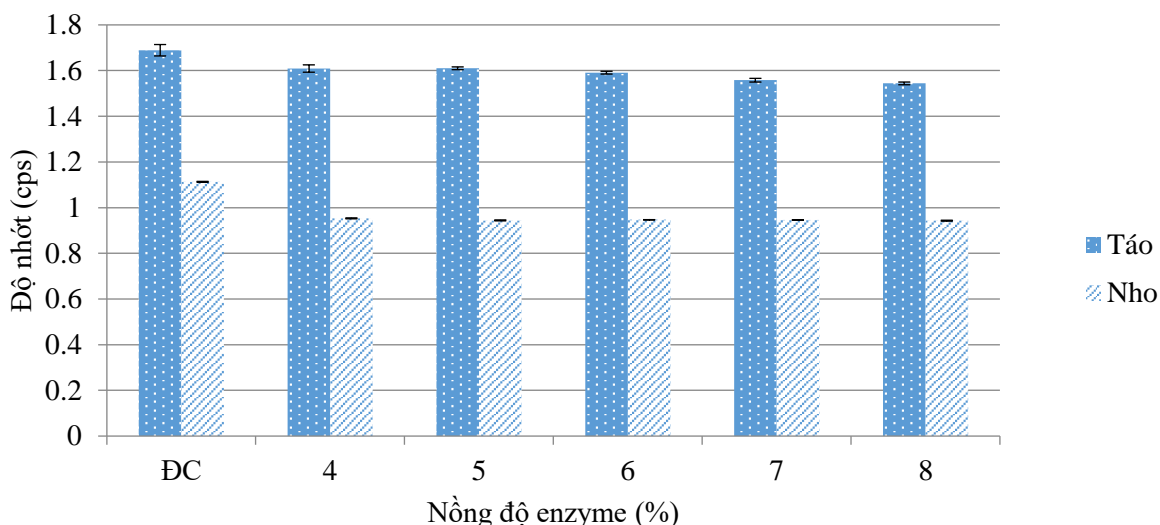
Bổ sung 4, 5, 6, 7, 8% (v/w) enzyme vào 100 g puree táo hoặc nho. Ủ ở 37⁰C, pH 5,0 trong thời gian 120 phút. Kết quả được thể hiện ở Hình 1, 2, 3.



Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme đến hiệu suất thu hồi dịch táo và nho



Hình 2. Tác động của nồng độ enzyme đến độ nhớt của dịch táo và nho

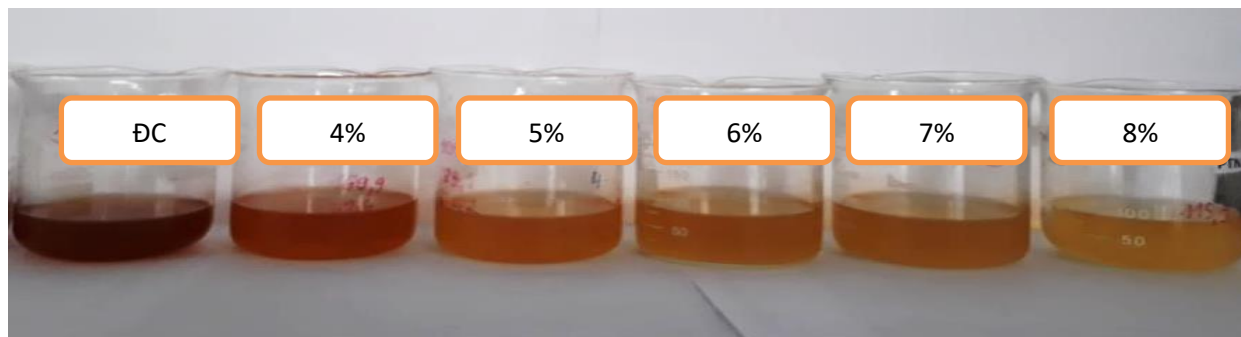


Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme đến độ trong của dịch táo và nho

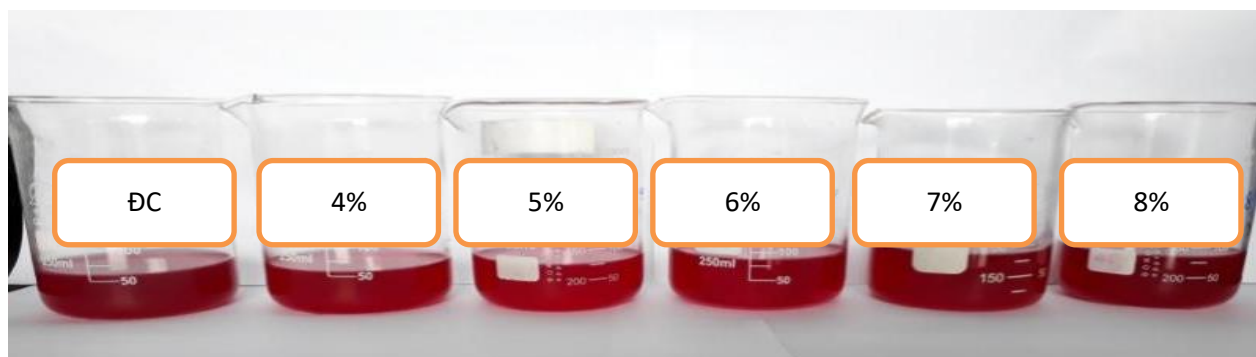
Đối với puree táo: hiệu suất thu hồi tăng dần theo nồng độ enzyme, ở nồng độ enzyme 7%-8% hiệu suất thu hồi đạt 79% và cao hơn mẫu đối chứng khoảng 21,3%. Khi nồng độ enzyme tăng dần thì độ nhớt giảm dần và độ trong tăng dần. Tuy nhiên, ở nồng độ enzyme 8% thì độ trong của táo lại giảm. Nguyên nhân có thể do chế phẩm enzyme ban đầu có màu sậm, khi enzyme được bổ sung vào dịch quả với lượng nhiều sẽ làm thay đổi độ trong (Srivastava & Tyagi, 2013). Kết quả thu được nước ép táo có hiệu suất thu hồi cao nhất 83,8%, độ trong tăng 29,8% so với mẫu đối chứng và độ nhớt đạt 0,7 cps. Vậy nồng độ enzyme 8% là thích hợp để xử lý nước ép táo.

Đối với puree nho: hiệu suất thu hồi tăng dần theo nồng độ enzyme. Ở nồng độ enzyme 4-6% thì hiệu suất thu hồi dịch nho tăng từ 65,9% đến 80,1%. Tuy nhiên ở nồng độ enzyme 6-8% thì hiệu suất thu hồi thay đổi không đáng kể (80,6% đến 81,5%). Độ nhớt giảm dần nhưng không khác biệt nhiều giữa các mẫu có nồng độ enzyme 5, 6, 7%, độ trong có sự khác biệt nhiều khi nồng độ enzyme 5% độ trong tăng 62% so với mẫu đối chứng. Do nho có hàm lượng pectin ít, nước nhiều vì vậy quá trình ép dễ dàng nên nếu chọn độ trong là yếu tố quyết định sử dụng enzyme và tăng giá trị kinh tế thì nồng độ enzyme 5% là thích hợp. Như vậy, enzyme pectinase có hiệu quả tốt đối với việc làm trong dịch nho (Pham, Mach, & Nguyen, 2012).

Như vậy nồng độ enzyme có ảnh hưởng đến hiệu suất thu hồi dịch quả tương tự như nghiên cứu của Yusof và Ibrahim (1994), thời gian ủ 180 phút nồng độ enzyme 0,05% cho hiệu suất thu hồi dịch mãng cầu tốt nhất. Bên cạnh đó, theo Nisha (2016), thời gian ủ 180 phút nồng độ enzyme 3,5mg/25g pulp cho hiệu suất thu hồi tốt nhất 79% (w/w).



Hình 4. Dịch táo sau khi xử lý enzyme ở các nồng độ khác nhau

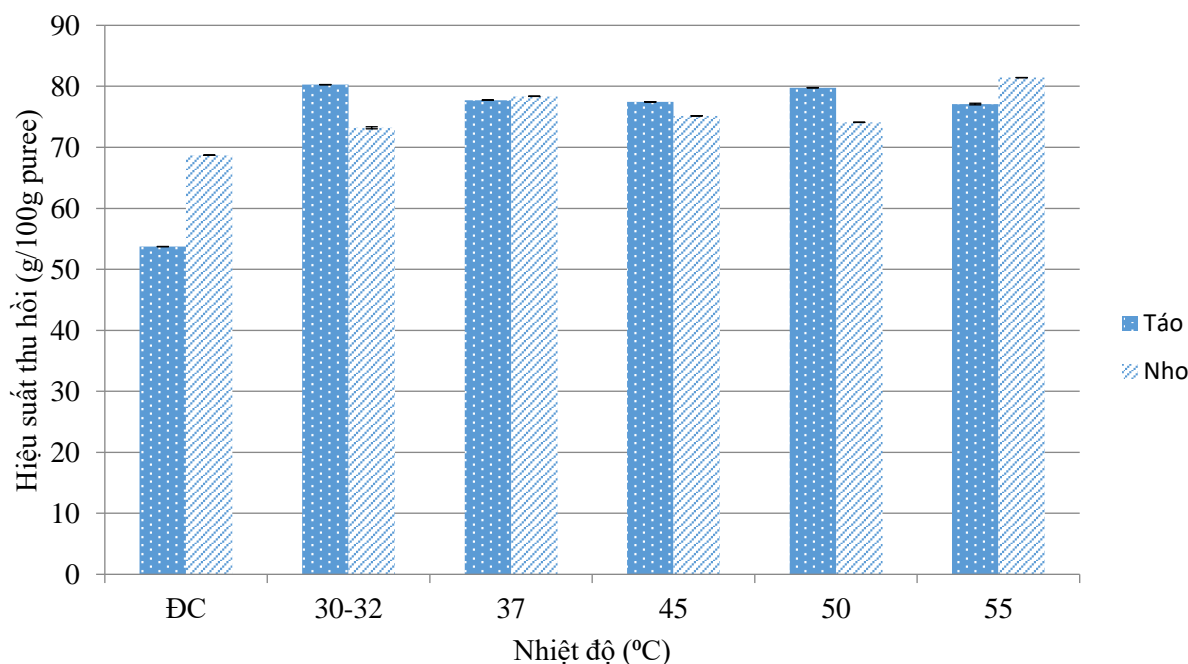


Hình 5. Dịch nho sau khi xử lý enzyme ở các nồng độ khác nhau

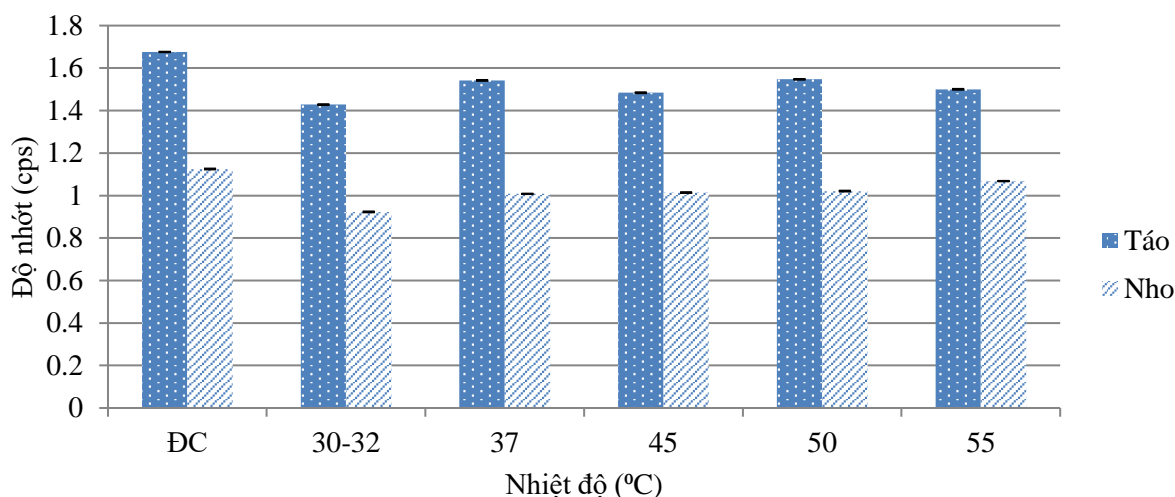
Từ kết quả trên chúng tôi nhận thấy sử dụng enzyme pectinase với nồng độ 8% có hiệu quả trong việc tăng hiệu suất trích ly của dịch táo (tăng 21,3% so với đối chứng), enzyme pectinase nồng độ 5% thì độ trong của dịch nho là tốt nhất (đạt 62,3%). Táo là nguyên liệu khó ép lấy dịch hơn so với nho nên hiệu suất thu hồi là yếu tố quyết định việc lựa chọn nồng độ enzyme. Đối với nho là nguyên liệu dễ thu hồi dịch quả nên độ trong là yếu tố quyết định việc lựa chọn nồng độ enzyme.

3.4. Khảo sát nhiệt độ ủ của enzyme pectinase đến đặc tính hóa lý dịch quả thu hồi

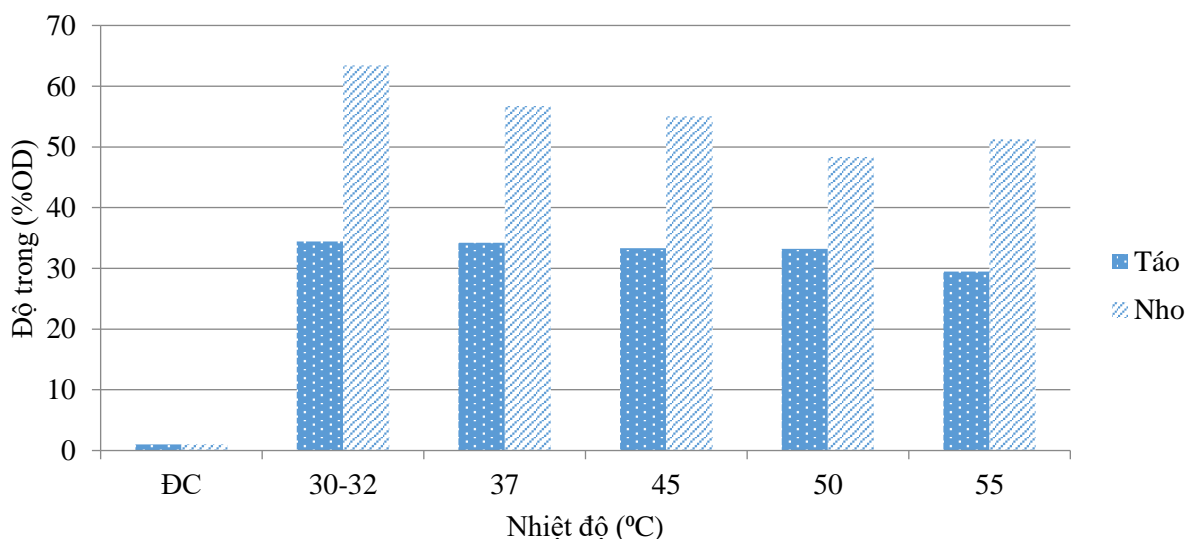
Sử dụng enzyme nồng độ 8% (v/w)-dịch táo và 5% (v/w)-dịch nho, tiến hành ủ ở nhiệt độ khác nhau: nhiệt độ phòng (khoảng 30-32⁰C), 45, 50 và 55⁰C.



Hình 6. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất thu hồi dịch táo và nho



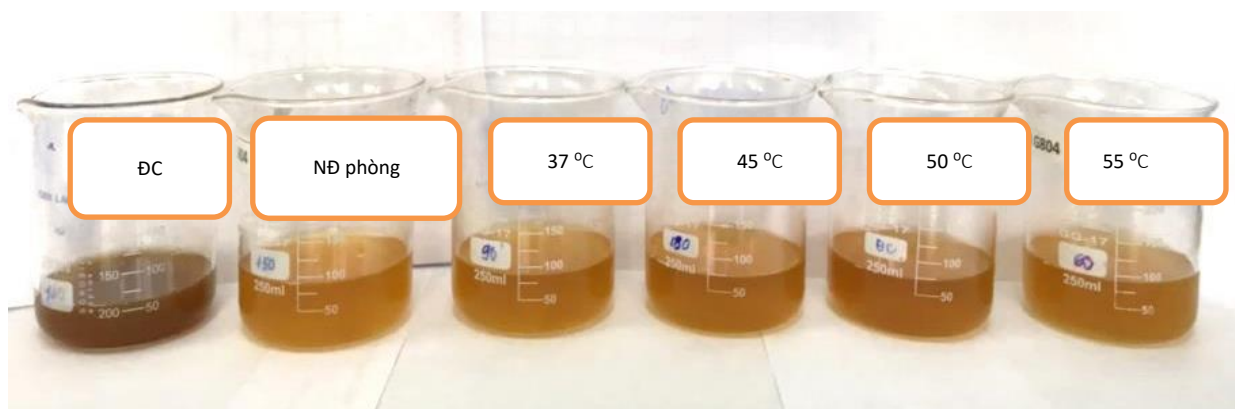
Hình 7. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến độ nhớt dịch tảo và nho



Hình 8. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến độ trong dịch tảo và nho

Đối với dịch tảo, ở nhiệt độ phòng hiệu suất thu hồi cao nhất 80,3% (cao hơn so với mẫu đối chứng 27%), ở các nhiệt độ khác hiệu suất thu hồi không thay đổi nhiều so với nhiệt độ phòng, nhưng xét về mặt thống kê thì vẫn có ý nghĩa. Điều này cũng tương đồng với kết quả đo độ nhớt, ở nhiệt độ phòng độ nhớt thấp nhất 1,43 cps. Bên cạnh đó độ trong ở các nhiệt độ khác nhau không có sự khác nhau nhiều (đều cao hơn so với mẫu đối chứng khoảng 34%).

Đối với dịch nho, hiệu suất thu hồi cao nhất 81,4% ở 55°C (cao hơn mẫu đối chứng 13%). Ở các nhiệt độ khác thì hiệu suất thu hồi không chênh lệch nhiều so với 55°C, ở 50°C thì hiệu suất thu hồi là 74,1%, ở 45°C thì hiệu suất thu hồi là 75,2%, ở nhiệt độ phòng là 73,2%. Tuy nhiên độ trong tăng cao nhất so với mẫu đối chứng 63% ở nhiệt độ phòng. Nếu chọn độ trong là yếu tố quyết định việc sử dụng enzyme để xử lý dịch nho thì nhiệt độ phòng là nhiệt độ thích hợp.



Hình 9. Dịch táo sau khi xử lý với enzyme trong các khoảng nhiệt độ khác nhau



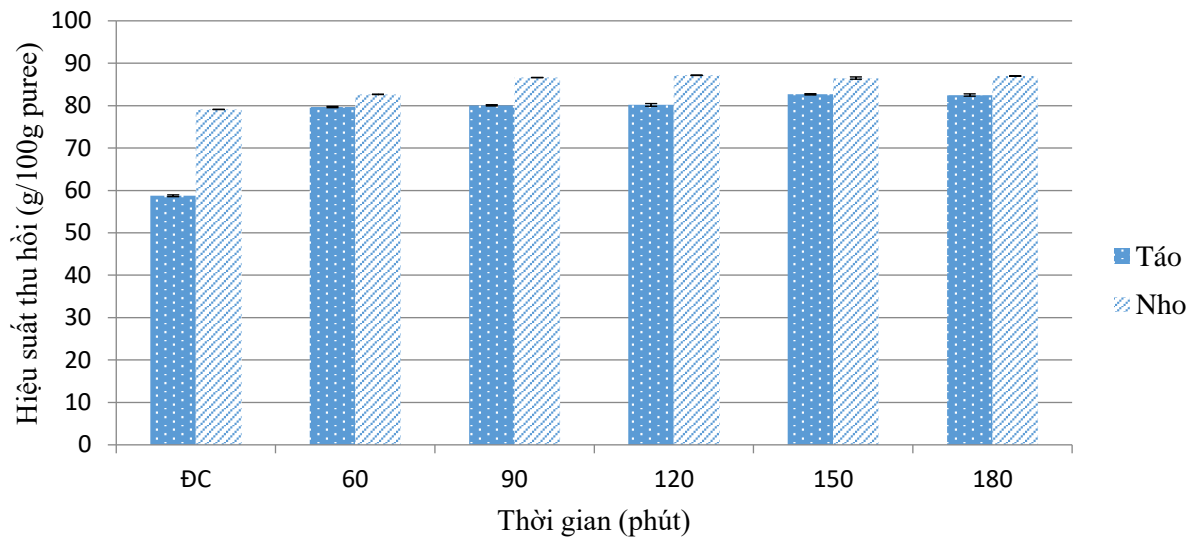
Hình 10. Dịch nho sau khi xử lý với enzyme trong các khoảng nhiệt độ khác nhau

Vì vậy nếu xét về tính kinh tế thì nhiệt độ phòng sẽ là lựa chọn thích hợp nhất do không tốn chi phí, đáp ứng việc tăng hiệu suất thu hồi, làm trong dịch táo và dịch nho.

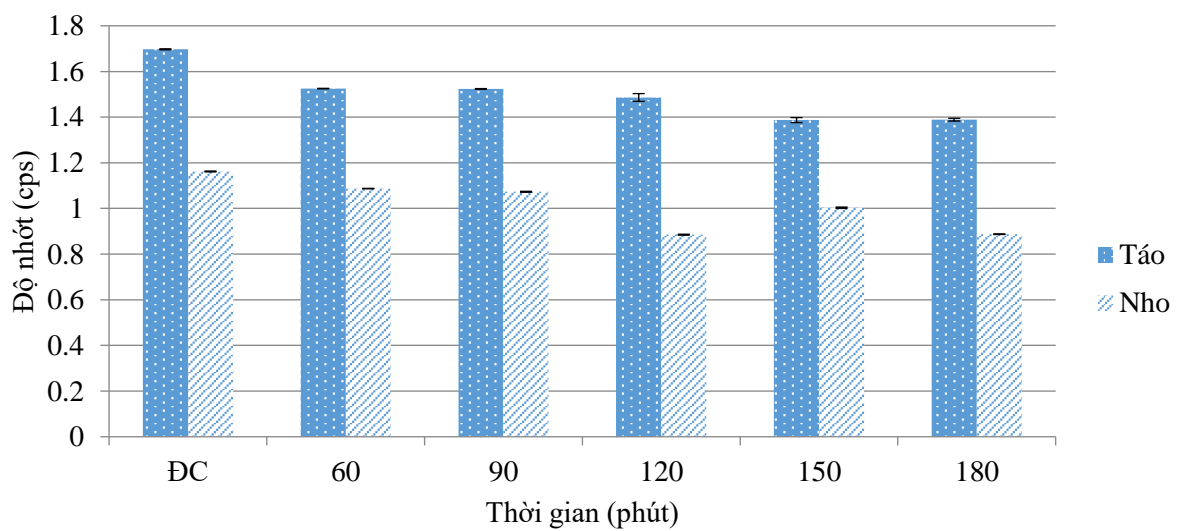
Theo kết quả nghiên cứu của Ajayi, Peter-Albert, Akeredolu, và Shokunbi (2015) trong thí nghiệm khảo sát nhiệt độ tối ưu của enzyme pectinase để làm trong dịch ép cà chua thì ở 25⁰C sẽ thu được kết quả tốt nhất. Bên cạnh đó, nghiên cứu của Sharma, Patel và Sugandha (2016) ở nhiệt độ 37⁰C cho hiệu suất thu hồi cao nhất 92,4% khi sử dụng enzyme pectinase để tăng hiệu suất trích ly dịch quả.

3.5. Khảo sát thời gian thủy phân của enzyme pectinase đến đặc tính hóa lý dịch quả thu hồi

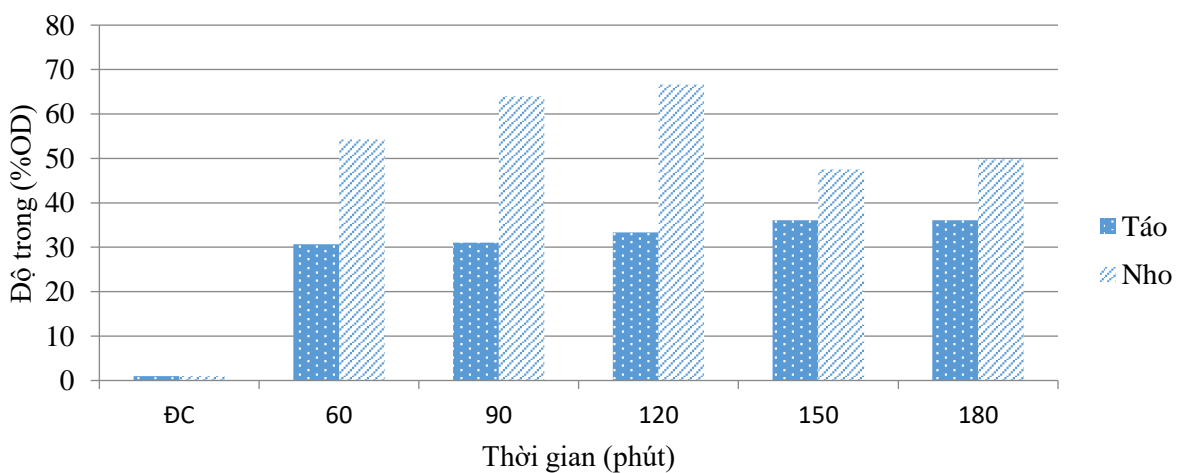
Tiến hành bổ sung enzyme pectinase nồng độ 8% (v/w) đối với dịch táo và 5% (v/w) đối với dịch nho, ủ ở nhiệt độ phòng pH 5,0 trong các khoảng thời gian: 60 phút, 90 phút, 120 phút, 150 phút, 180 phút. Kết quả sau các khoảng thời gian ủ:



Hình 11. Ảnh hưởng của thời gian ủ đến hiệu suất thu hồi dịch táo và nho



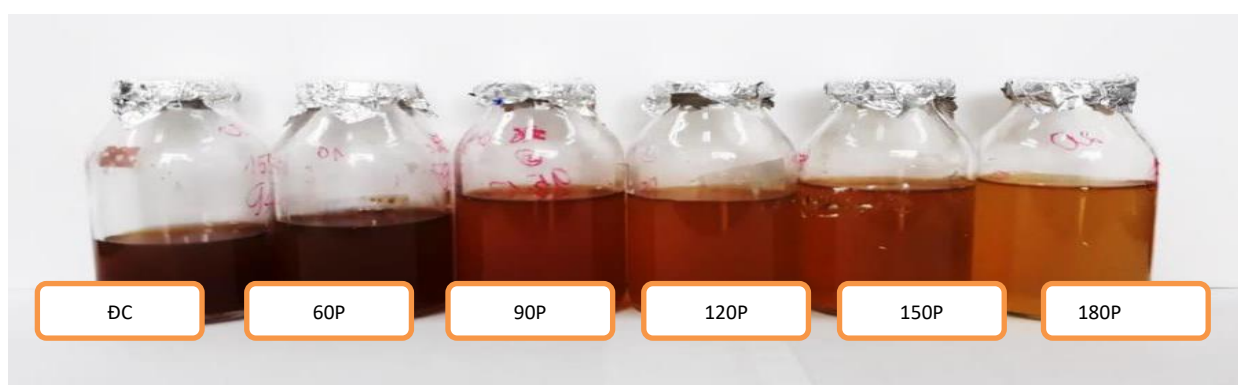
Hình 12. Ảnh hưởng của thời gian ủ đến độ nhớt dịch táo và nho



Hình 13. Ảnh hưởng của thời gian ủ đến độ trong dịch táo và nho

Hiệu suất thu hồi dịch táo tăng theo thời gian và đạt giá trị cao nhất (82,7%) ở 150 phút cao hơn mẫu đối chứng gần 24,3%. Ở thời gian ủ 180 phút thì hiệu suất không có sự khác biệt với 150 phút. Kết quả này phù hợp với kết quả về độ nhớt. Khi độ nhớt giảm thì hiệu suất thu hồi tăng. Độ trong của dịch táo tăng cao nhất 36,1% so với mẫu đối chứng ở 150 phút. Yusof và Ibrahim (1994) đã thực hiện khảo sát ảnh hưởng thời gian ủ đến hiệu suất thu hồi của nước ép mãng cầu với enzyme pectinase nồng độ 0,05%, kết quả ở thời gian ủ 180 phút cho hiệu suất thu hồi cao nhất.

Đối với dịch nho hiệu suất thu hồi tăng dần theo thời gian và đạt cao nhất (87,2%) ở 120 phút, tại thời gian này độ nhớt cũng đạt giá trị thấp nhất và độ trong đạt giá trị cao nhất. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Nisha (2016) đã khảo sát thời gian ủ ảnh hưởng đến hiệu suất thu hồi nước ép nho với enzyme pectinase nồng độ 3,5mg/25g pulp thời gian ủ 180 phút cho hiệu suất thu hồi tốt nhất 79% (w/w).



Hình 14. Dịch táo sau khi xử lý với enzyme ở các khoảng thời gian khác nhau



Hình 15. Dịch nho sau khi xử lý với enzyme ở các khoảng thời gian khác nhau

Như vậy khi sử dụng enzyme pectinase để xử lý dịch táo và nho thì thời gian ủ thích hợp là 150 phút đối với dịch táo và 120 phút đối với dịch nho.

4. Kết luận và khuyến nghị

Nghiên cứu đã tìm được nồng độ enzyme bổ sung, nhiệt độ và thời gian ủ phù hợp đối với puree táo và nho. Khi sử dụng enzyme pectinase (733,7 UI/mL) sau khi lọc qua màng kích thước 30 kDa có khả năng làm tăng hiệu suất thu hồi dịch quả, giảm độ nhớt và tăng độ trong. Như vậy enzyme pectinase có khả năng ứng dụng trong ngành công nghiệp sản xuất nước ép quả.

LỜI CẢM ƠN

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

Tài liệu tham khảo

- Ajayi, A. A., Peter-Albert, C. F., Akeredolu, M., & Shokunbi, A. A. (2015). Clarification of tomato juice with polygalacturonase obtained from tomato fruits infected by aspergillus niger. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 18(2), 74-80. doi:10.3923/pjbs.2015.74.80
- Barman, S., Sit, N., Badwaik, L., & Deka, S. (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. doi:10.1007/s13197-014-1413-8
- Huo, Y., Khatri, N., Hou, Q., Gilbert, J., Wang, G., & Man, H.-Y. (2015). The deubiquitinating enzyme USP 46 regulates AMPA receptor ubiquitination and trafficking. *Journal of Neurochemistry*, 134(6), 1067-1080. doi:10.1111/jnc.13194
- Huynh, O. N., & Tran, H. N. (2008). Thu nhận enzyme pectinase từ *A. niger* tinh sạch bằng phương pháp lọc gel và lọc màn [Obtained pectinase enzyme from purified *A. niger* by gel filtration and screen filtration]. *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*, 11(8), 46-50.
- 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]. *Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm*, 16(1), 79-88.
- 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. doi:10.1016/j.pep.2012.09.014
- Le, M. T. (2006). *Các phương pháp phân tích ngành công nghệ lên men [The methods of analysis of fermentation technology]*. Hanoi, Vietnam: Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
- 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*. Paper presented at 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. doi:10.1016/j.biortech.2010.10.048
- Nguyen, P. N. M., Ly, B. N., Chau, A. T. D., & Che, H. V. (2011). 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 [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*, 20a, 127-136.
- Nisha, M. (2016). Efficacy of purified pectinase obtained from *paecilomyces variotii* in extraction and clarification of juice from grapes and pomegranate fruits. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 7(4B), 479-484. doi:10.22376/ijpbs.2016.7.4.b479-484

- 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. doi:10.1016/j.foodchem.2015.05.022
- Pham, T. H. N., Mach, T. T. P., & Nguyen, T. M. (2012). Tối ưu điều kiện làm trong dịch nho ép bằng enzyme pectinase [Optimizing the working conditions in grape juice with pectinase enzyme]. *Tạp chí khoa học Công nghệ Thủy sản*, 3, 53-57.
- Phan, D. T. T., Pham, L. T. N., Ngo, C. T. B., & Tran, D. Q. (2018). Phân lập và sàng lọc một số chủng nấm mốc phục vụ cho nghiên cứu tạo dòng và biểu hiện gen pectinase [Isolation and screening of some mold strains to serve research on cloning and expression of pectinase gene]. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế*, 127(1C), 95-106.
- Raghunath, R., Murthy, S. K. R., Sneha, G., Shabana, S., Syama, A., & Radhika, V. S. (2008). Partial purification and biochemical characterization of extracellular pectinase from *Aspergillus niger* isolated from groundnut seeds. *J. Appl. Biosci.*, 9(1), 378-384.
- Sharma, H. P., Patel, H., & Sugandha (2016). Enzymatic added extraction and clarification of fruit juices. *Journal Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(6), 1215-1227. doi:10.1080/10408398.2014.977434
- Srivastava, S., & Tyagi, S. K. (2013). Effect of enzymatic hydrolysis on the juice yield from apple fruit (*Malus domestica*) pulp. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research*, 4, 299-306.
- Tran, T. T. (2013). *Phân lập và tuyển chọn một số dòng Aspergillus niger sinh pectin methylesterase hoạt tính cao [Isolation and selection of a number of strains of Aspergillus niger producing highly active pectin methylesterase]*. Can Tho, Vietnam: Can Tho University.
- Yusof, S., & Ibrahim, N. (1994). Quality of soursop juice after pectinase enzyme treatment. *Food Chemistry*, 51(1), 83-88. doi:10.1016/0308-8146(94)90052-3