



TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN LÊN MEN SINH TỔNG HỢP PECTIN METHYLESTERASE TỪ *Aspergillus niger* BẰNG PHƯƠNG PHÁP BỀ MẶT ĐÁP ỨNG

Trần Thanh Trúc¹ và Nguyễn Văn Mười¹

¹ Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 26/9/2014

Ngày chấp nhận: 07/11/2014

Title:

Optimization of fermentation parameters using Response surface Methodology for production of *Aspergillus niger* pectin methylesterase

Từ khóa:

Aspergillus niger, bã táo ta, phương pháp bề mặt đáp ứng, pectin methylesterase, vỏ cam sành

Keywords:

Aspergillus niger, apple pomace, Response surface methodology, pectin methylesterase, pomelo peels

ABSTRACT

A study was taken up to evaluate the role of some fermentation parameters on pectin methylesterase (PME) production. The Response surface methodology (RSM) based on four-variable central composite design (CCD) was used for modelling the correlation of the PME fermentation conditions such as inducer concentration-by mixture 1:1 of *Aspergillus niger* which were isolated from the peels of *Citrus sinensis* L. (*So*₂) and *Citrus maxima* (*R*₁), initial pH, incubation temperature and moisture content of medium. In this experiment, the dried apple pomace and fresh pomelo peels were used as substrate for PME production in the ratio 1:1 combined with the addition of 0.1% urea combined with 0.5% MgCl₂ and 0.15% CaCl₂ into fermentation media. The result showed that, the highest PME activity (65.6 ± 3.14 U/g) obtained after 96 hours incubation at a temperature of 35.5°C, pH 4.0 (adjusted by citrate buffer), moisture content adjusted to 57.4% and 16.5% v/w of inducer concentration (10⁵ cfu/mL). The research results indicated that RSM could be applied to found the optimum conditions of the process parameters in order to enhance the maximum pectin methylesterase production.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu xác định tác động của các điều kiện lên men bề mặt trên môi trường rắn đến quá trình tổng hợp pectin methylesterase. Phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) gồm 4 thừa số với mô hình phức hợp tại tâm (CCD) được sử dụng để tối ưu hóa các điều kiện lên men tổng hợp pectin methylesterase (PME), bao gồm tỷ lệ bào tử nấm mốc - với sự kết hợp ở tỷ lệ 1:1 của 2 dòng *Aspergillus niger* được phân lập từ vỏ cam sành (*So*₂) và vỏ bưởi Năm Roi (*R*₁) sử dụng, pH ban đầu, nhiệt độ ủ và độ ẩm môi trường lên men. Trong thí nghiệm này, môi trường lên men sử dụng cơ chất chính là bã táo ta khô và vỏ bưởi Năm Roi (tỷ lệ 1:1 w/w) làm cơ chất lên men chính, có bổ sung 0,1% urea, 0,5% MgCl₂ và 0,15% CaCl₂. Kết quả khảo sát cho thấy, hoạt tính PME đạt cao nhất (65,6±3,14 U/g) sau 96 giờ ủ ở nhiệt độ 35,5°C, pH ban đầu là 4,0 (điều chỉnh bằng đệm citrate), độ ẩm ban đầu là 57,4% và tỷ lệ huyền phù bào tử nấm ở mật số 10⁵ cfu/mL sử dụng là 16,5% v/w (mL/g). Kết quả nghiên cứu đã chứng tỏ phương pháp bề mặt đáp ứng có thể ứng dụng để tìm ra điều kiện tối ưu của quá trình lên men giúp cải thiện tối đa hiệu quả tổng hợp pectin methylesterase.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Pectin methylesterase (PME, EC 3.1.1.11) – một enzyme thuộc nhóm pectinase đã được quan tâm sử dụng và phát triển ở nhiều quốc gia (Saurel *et al.*, 2003; Suutarinen và Autio, 2004) với các mục đích hạn chế sự phá hủy cấu trúc của tế bào thực vật, tăng hiệu suất ly trích nước quả và thúc đẩy nhanh quá trình sấy rau quả (Van, 1979; Sajjaanantakul và Pitifer, 1991). Bên cạnh PME từ thực vật, nguồn giàu PME và được sử dụng nhiều nhất trong các chế phẩm pectinase thương mại là các PME từ vi sinh vật (Solis – Pereira *et al.*, 1993). Nấm mốc, đặc biệt là *Aspergillus niger* được biết đến như nguồn phổ biến nhất cho sản xuất enzyme này (Taragano *et al.*, 1997, trích dẫn bởi Patil và Dayanand, 2006). Nghiên cứu tuyển chọn dòng *Aspergillus niger* bản địa thích hợp cho quá trình tổng hợp và thu nhận PME tại chỗ đã được tiến hành trước đó (Tran *et al.*, 2009; Tran và Nguyen, 2010; Tran *et al.*, 2010). Tuy nhiên, để có thể nhân rộng và ứng dụng vào thực tiễn, việc tối ưu hóa điều kiện lên men sinh tổng hợp enzyme đặc thù là vấn đề được rất nhiều các nhà khoa học quan tâm. Phương pháp thông thường (thay đổi từng biến số khảo sát) theo truyền thống được sử dụng cho tối ưu hóa các thiết kế đa hệ số thử nghiệm gặp hạn chế do (i) tạo ra số lượng lớn các dữ liệu thường rất khó để giải thích; (ii) tốn kém chi phí và thời gian; (iii) bỏ qua ảnh hưởng của tương tác giữa các yếu tố. Để khắc phục những vấn đề này, việc sử dụng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) với mô hình phức hợp tại tâm (CCD) được áp dụng đã xác định mức độ tối ưu của các biến có ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp PME với số thí nghiệm vừa phải (Castilho *et al.*, 2000). Gần đây, Suresh *et al.* (2009) cũng đã bước đầu nghiên cứu tối ưu hóa quá trình lên men rắn sản xuất pectinase từ *A. awamori* bằng phương pháp bề mặt đáp ứng. Nghiên cứu này đã tiến hành khảo sát theo thừa số 4 nhân tố, 5 mức độ với điểm trung tâm, bao gồm nồng độ cơ chất (5÷25%), pH ban đầu của môi trường (3,0÷7,0), nhiệt độ lên men (25÷37°C) và tỷ lệ mốc sử dụng (2÷10%). Kết quả cho thấy, mô hình bậc hai mở rộng đã được thiết lập để xác định ảnh hưởng tương tác của các điều kiện lên men đến hiệu suất thu nhận enzyme.

Trong phạm vi nghiên cứu này, tương tác của các điều kiện lên men bề mặt trên môi trường rắn (bao gồm pH, độ ẩm môi trường, tỷ lệ huyền phù bào tử nấm và nhiệt độ ủ) đến quá trình tổng hợp pectin methylesterase từ dòng *A. niger* đã được tuyển chọn đã được thực hiện.

2 PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu

Nấm mốc: Hai dòng nấm mốc *Aspergillus niger* So₂ và R₁ đã được phân lập, định danh và bảo quản ở 4°C tại Bộ môn Công nghệ thực phẩm, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng và Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ. Cho 5 mL dung dịch NaCl 0,025M vào ống nghiệm chứa *A. niger* đã được nuôi cấy 4 ngày để thu nhận dung dịch có chứa bào tử nấm *A. niger*. Dung dịch này được sử dụng để chủng vào các bình tam giác có sẵn cơ chất.

Cơ chất: Bã táo ta được ép tách loại nước (bằng cơ học) và được sấy ở nhiệt độ 60±1°C đến độ ẩm 6±1% (thời gian sấy khoảng 3÷4 giờ). Bã táo khô được nghiền thành bột và đóng gói trong các bao PA, độ chân không 90%. Vỏ bưởi Năm Roi chỉ lấy phần vỏ trắng bên trong, rửa sạch và cắt nhỏ khoảng 1 mm, tách bớt độ ẩm vỏ bưởi xuống còn 50% trước khi phối trộn (Tran *et al.*, 2009).

2.2 Tối ưu hóa điều kiện môi trường sinh tổng hợp PME

2.2.1 Thành phần môi trường và dòng *Aspergillus niger* thích hợp

Thành phần môi trường lên men bề mặt trên môi trường rắn (SFF) sinh tổng hợp PME và dòng *Aspergillus niger* thích hợp dựa trên khảo sát của Tran *et al.* (2009), Tran và Nguyen (2010), Tran *et al.* (2010). Bã táo ta khô và vỏ bưởi Năm Roi được trộn với tỉ lệ 1:1 là thành phần cơ chất lên men chính. Thành phần dinh dưỡng bổ sung vào môi trường lên men gồm sung 0,1% urea, 0,5% MgCl₂ và 0,15% CaCl₂. Sự kết hợp của 2 dòng *A. niger* R₁ và So₂ có nguồn gốc từ vỏ bưởi Năm Roi và vỏ cam soàn với tỷ lệ 1:1 (mật số huyền phù bào tử nấm là 10⁵ cfu/mL) được lựa chọn trong nghiên cứu xác định điều kiện thích hợp cho quá trình lên men rắn sinh tổng hợp PME có hiệu quả cao nhất.

2.2.2 Ảnh hưởng tương tác của các điều kiện lên men đến hiệu quả thu nhận PME

Mục đích của khảo sát là xây dựng phương trình hồi quy của các yếu tố tương tác gồm pH, độ ẩm ban đầu của môi trường, tỷ lệ huyền phù bào tử nấm bổ sung và nhiệt độ ủ đến quá trình sinh tổng hợp PME từ *A. niger* theo phương pháp bề mặt đáp ứng.

Dựa trên kết quả khảo sát ảnh hưởng riêng lẻ của tỷ lệ huyền phù bào tử nấm sử dụng, pH, độ ẩm và nhiệt độ ủ (Tran và Nguyen, 2010), tiến

hành tối ưu hóa các điều kiện lên men này theo phương pháp bề mặt đáp ứng với 4 nhân tố thay

đổi ở 5 mức độ (Bảng 1) với 7 điểm trung tâm với tổng số nghiệm thức khảo sát được thiết lập là 31.

Bảng 1: Giá trị mã hóa và giá trị thực của các nhân tố tương tác đến hiệu quả sinh tổng hợp PME (U/g)

Nhân tố	Ký hiệu	Giá trị mã hóa				
		-2	-1	0	+1	+2
Tỷ lệ huyền phù bào tử nấm (10^5 cfu/mL) bổ sung	X_1 (%v/w; mL/100g)	12	14	16	18	20
pH ban đầu của môi trường	X_2	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0
Nhiệt độ ủ	X_3 (°C)	28	31	34	37	40
Độ ẩm ban đầu của môi trường	X_4 (%)	50	55	60	65	70

Tiến hành pha loãng cơ chất đến độ ẩm với các tỷ lệ khảo sát (X_4) ứng với các giá trị của pH (X_2) bằng dung dịch đệm citrate. Sau khi cấy nấm mốc với các tỷ lệ huyền phù bào tử nấm thay đổi (X_1), mẫu khảo sát được tiến hành lên men ở các tủ ủ có nhiệt độ khảo sát (X_3) tương ứng với thời gian lên men được cố định là 96 giờ (Tran và Nguyen, 2010).

Sử dụng dung dịch đệm citrate pH 3,6 để thu lấy dung dịch enzyme thô và canh trường sau lên men là 2:1. Quá trình trích ly tiến hành ở nhiệt độ 35°C và thời gian 50 phút (Tran et al., 2009). Thu dịch chứa enzyme tương ứng với từng mức thời gian khảo sát để đo đặc hoạt tính PME có trong dịch trích.

Từ hoạt tính của PME (U/g) tương ứng với các mẫu khảo sát, sử dụng chương trình Statgraphics Centurion 16,1 để phân tích tương tác của các nhân tố, xây dựng phương trình biểu thị hoạt tính PME

thu được trong mối tương quan của các thông số lên men. Vẽ đồ thị đường đồng điểm biểu diễn hoạt tính PME thu được dựa trên tương tác của 2 nhân tố và 2 nhân tố còn lại được giữ ở điểm trung tâm. Xác định các thông số tối ưu hóa của quá trình lên men.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nghiên cứu xác định hồi quy tương quan của 4 nhân tố, bao gồm tỷ lệ huyền phù bào tử nấm sử dụng X_1 ($12 \div 20\%$ v/w), pH ban đầu của môi trường X_2 ($3,0 \div 5,0$), nhiệt độ ủ X_3 ($28 \div 40^\circ\text{C}$) và độ ẩm ban đầu môi trường X_4 ($50 \div 70\%$) đến hoạt tính PME thu nhận (Y, U/g) được thực hiện. Ma trận thiết kế thí nghiệm theo phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) với mô hình phức hợp tại tâm (CCD) được thiết lập với 5 mức độ khảo sát tương ứng mỗi biến và 7 điểm trung tâm. Kết quả phân tích ảnh hưởng của các nhân tố mã hóa đối với phương trình hồi quy được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2: Ảnh hưởng của các nhân tố mã hóa đối với phương trình hồi quy

Nhân tố	Tổng bình phương	Bậc tự do	Phương sai	Tỷ số F	Giá trị P
X_1	37,2504	1	37,2504	5,68	0,0299
X_2	54,3004	1	54,3004	8,28	0,0109
X_3	1351,5000	1	1351,5000	206,19	0,0000
X_4	424,2000	1	424,2000	64,72	0,0000
$X_1 X_1$	1284,1800	1	1284,1800	195,92	0,0000
$X_1 X_2$	155,6260	1	155,6260	23,74	0,0020
$X_1 X_3$	73,5306	1	73,5306	11,22	0,0410
$X_1 X_4$	64,4006	1	64,4006	9,83	0,0064
X_2^2	4170,3500	1	4170,3500	636,25	0,0000
$X_2 X_3$	43,8906	1	43,8906	6,70	0,0198
$X_2 X_4$	172,2660	1	172,2660	26,28	0,0010
X_3^2	2467,3100	1	2467,3100	376,43	0,0000
$X_3 X_4$	117,1810	1	117,1810	17,88	0,0060
X_4^2	979,0660	1	979,0660	149,37	0,0000
Sai số	104,8730	16	6,5546		

Từ Bảng 2, tất cả giá trị P của các thừa số đều nhỏ hơn 0,05 đã chứng tỏ các nhân tố khảo sát đều ảnh hưởng đến quá trình lên men bề mặt trên môi trường SSF sinh tổng hợp PME từ *A. niger*. Hệ số hồi quy bậc một của X_1 , X_2 , X_3 và X_4 cũng như hệ

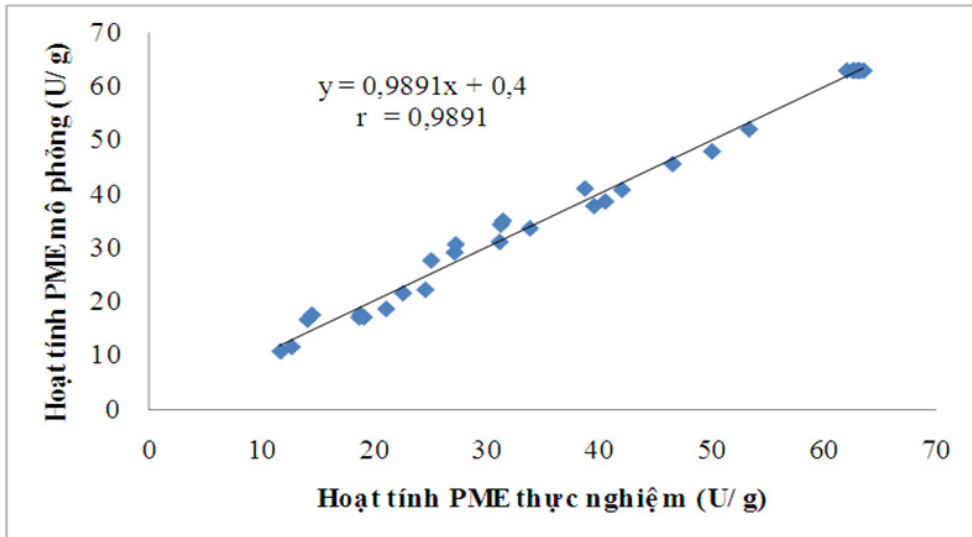
số tương tác của $X_1 X_2$, $X_1 X_3$, $X_1 X_4$, $X_2 X_3$, $X_2 X_4$ và $X_3 X_4$ đều khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%, đồng thời hệ số hồi quy bậc hai của X_1^2 , X_2^2 , X_3^2 và X_4^2 cũng khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê. Điều này đã góp phần khẳng định mức độ ảnh hưởng của từng biến độc lập cũng như

các tương tác có ý nghĩa đến quá trình lên men được khảo sát.

Dựa trên kết quả phân tích ANOVA, phương trình hồi quy thể hiện sự tương quan của điều kiện lên men đến hoạt tính PME thu nhận được thiết lập và sử dụng để dự đoán hiệu quả sinh tổng hợp PME. Hoạt tính PME mô phỏng (Y lý thuyết) được xác định bằng cách thay các biến với giá trị thực

vào phương trình sau: $Y = -3331,94 + 66,60 X_1 + 323,06 X_2 + 73,38 X_3 + 31,34 X_4 - 1,68 X_1^2 - 3,12X_1X_2 + 0,36X_1X_3 - 0,20X_1X_4 - 48,31X_2^2 + 1,10X_2X_3 + 1,31X_2X_4 - 1,03X_3^2 - 0,18X_3X_4 - 0,23X_4^2$ ($R^2 = 0,989$) (1)

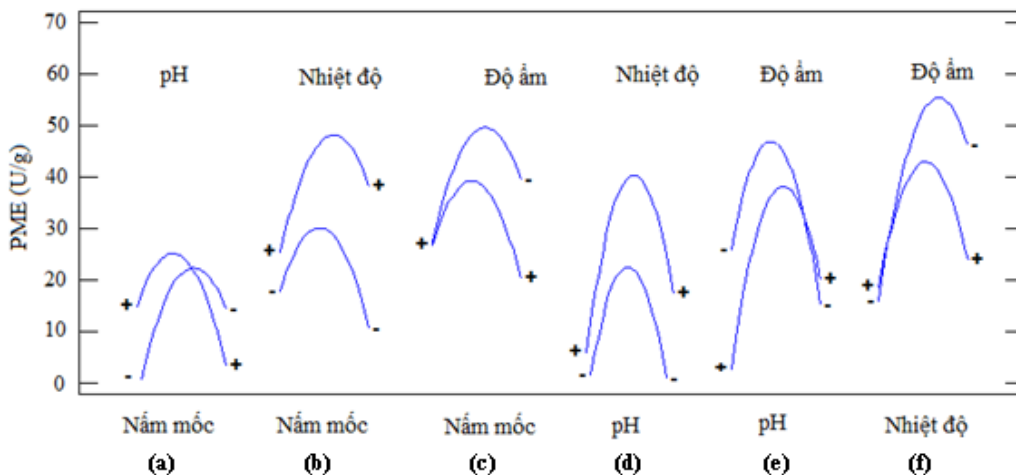
Hoạt tính PME thu được từ thực nghiệm và tính toán theo phương trình có độ tương thích cao ở giá trị $r = 0,9891$ (Hình 1).



Hình 1: Đồ thị tương quan giữa hoạt tính PME xác định thực nghiệm và tính toán theo phương trình hồi quy

Như vậy có thể kết luận rằng phương trình hồi quy đã mô tả đúng các kết quả thực nghiệm. Hệ số tương quan cho biết 98,9% sự biến đổi hoạt tính PME là do ảnh hưởng của các biến độc lập X_1, X_2, X_3 và X_4 và chỉ có 1,1% sự thay đổi là do các yếu tố không xác định được gây ra.

Chuỗi đồ thị biểu diễn tương quan của 2 nhân tố khảo sát (cố định 2 nhân tố còn lại ở điểm trung tâm) đến hoạt tính PME thu nhận được thể hiện ở Hình 2, 3, 4, 5, 6, 7 và 8 (đồ thị đường đồng điểm tương ứng với 6 cặp ảnh hưởng đồng thời).

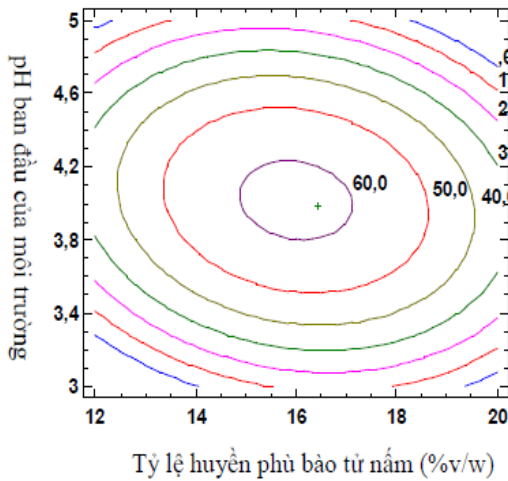


Hình 2: Đồ thị biểu diễn sự tương tác của cặp nhân tố đến hiệu quả thu nhận PME

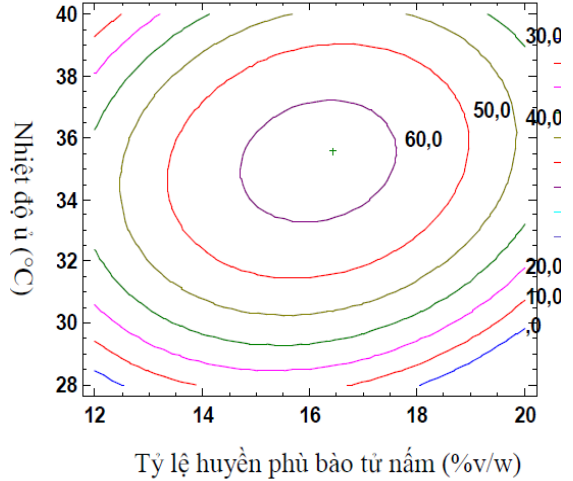
Đồ thị tổng quát ở Hình 2 cho thấy, hầu hết các nhân tố đều có sự ảnh hưởng đồng thời đến quá trình tổng hợp enzyme. Tuy nhiên, ảnh hưởng đồng thời của việc điều chỉnh tỷ lệ huyền phù bào tử nấm bổ sung và pH ban đầu của môi trường lên men không mang lại hiệu quả sinh tổng hợp PME vượt trội, thể hiện ở đỉnh tối ưu nằm ở mức thấp

khi so sánh với các cặp tương tác khác.

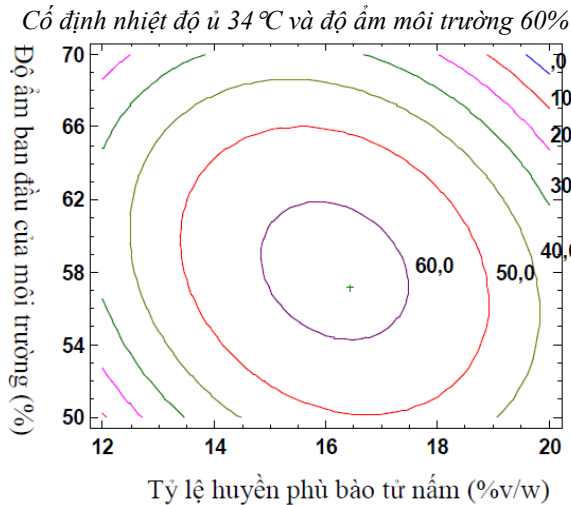
Ảnh hưởng đồng thời của việc điều chỉnh pH và các nhân tố khác như nhiệt độ ủ, độ ẩm ban đầu của môi trường lên men cũng không tạo nên hiệu quả thu nhận PME cao khi so sánh với các cặp tương tác của nhiệt độ ủ và độ ẩm hay tỷ lệ huyền phù bào tử nấm sử dụng (Hình 3, 4 và 5).



Hình 3: Đồ thị đường đồng điểm biểu diễn tương tác của tỷ lệ huyền phù bào tử nấm và pH môi trường ban đầu đến hoạt tính PME thu nhận

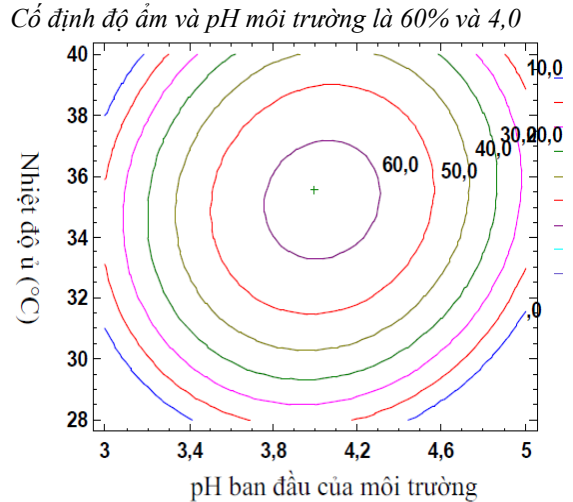


Hình 4: Đồ thị đường đồng điểm biểu diễn tương quan của tỷ lệ huyền phù bào tử nấm bổ sung và nhiệt độ ủ đến hoạt tính PME thu nhận



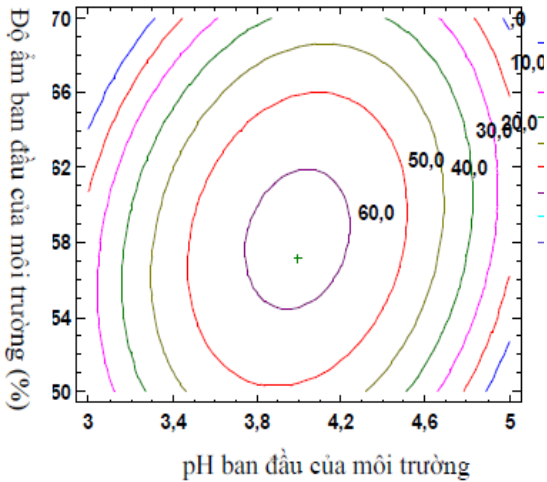
Hình 5: Đồ thị đường đồng điểm biểu diễn tương tác của tỷ lệ huyền phù bào tử nấm và độ ẩm môi trường ban đầu đến hoạt tính PME thu nhận

Cố định nhiệt độ ủ 34 °C và pH 4,0)



Hình 6: Đồ thị đường đồng điểm biểu diễn tương tác của nhiệt độ ủ và pH ban đầu của môi trường đến hoạt tính PME thu nhận

Tỷ lệ huyền phù bào tử nấm 16% và độ ẩm 60%



Hình 7: Đồ thị đường đồng điểm biểu diễn tương tác của pH và độ ẩm ban đầu của môi trường lên men đến hoạt tính PME thu nhận

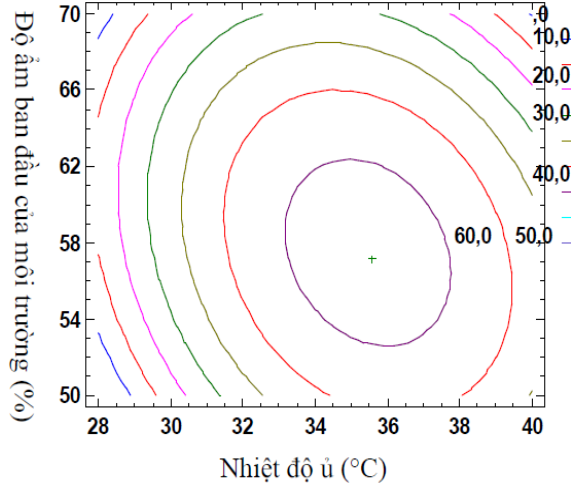
Tỷ lệ huyền phù bào tử nấm 16%; nhiệt độ ủ 34 °C

Ở tỷ lệ huyền phù bào tử nấm mốc bổ sung thấp (12%), việc điều chỉnh pH ban đầu của môi trường lên men ở mức cao (pH 5,0) cho hiệu suất cao hơn hẳn so với mức pH thấp (pH 3,0). Khi tỷ lệ huyền phù bào tử nấm mốc tăng đến khoảng 16÷17% thì hoạt tính PME thu được ứng với pH ban đầu cao nhất (5,0) hay thấp nhất (3,0) bằng nhau. Khi tăng tỷ lệ huyền phù nấm mốc lên đến 20% thì hoạt tính PME thu được có xu hướng cao hơn ở pH thấp (Hình 2a và 3).

Tương tự, khi cố định hai biến độ ẩm và pH ban đầu của môi trường ủ mốc (Hình 2b và 4), hoạt tính PME thu được thấp khi nhiệt độ môi trường ủ ở mức khảo sát thấp nhất (28°C) - ngay cả ở tỷ lệ nấm mốc sử dụng cao và chỉ thể hiện hoạt tính ở điều kiện nhiệt độ thấp với lượng nấm mốc sử dụng vừa phải. Ngược lại, ở nhiệt độ ủ cao nhất, mức độ ẩm môi trường thấp cho hiệu quả thu nhận enzyme cao hơn trường hợp điều chỉnh ẩm ở mức cao.

Nói cách khác, ở tỷ lệ huyền phù bào tử nấm bổ sung thấp, sự thay đổi nhiệt độ ủ không ảnh hưởng nhiều đến hoạt tính PME thu được. Điều này cũng xảy ra tương tự đối với sự ảnh hưởng đồng thời của độ ẩm và nấm mốc (Hình 2c và 5), pH và nhiệt độ (Hình 2d và 6), nhiệt độ và độ ẩm (Hình 2f và 8).

Ảnh hưởng đồng thời của độ ẩm và nấm mốc dẫn đến sự gia tăng hoạt tính PME cao hơn khi điều chỉnh tỷ lệ huyền phù bào tử nấm bổ sung về



Hình 8: Đồ thị đường đồng điểm biểu diễn tương tác giữa nhiệt độ ủ và độ ẩm ban đầu của môi trường lên men đến hoạt tính PME thu nhận

Cố định tỷ lệ huyền phù bào tử nấm 16% và pH 4,0 mức cao. Đặc biệt, độ ẩm thấp là điều kiện thích hợp hơn cho sự tạo thành PME ở tỷ lệ nấm mốc bổ sung gia tăng. Trong khi đó, nhiệt độ ủ tăng cao giúp sự tăng trưởng của nấm mốc tốt hơn, nhờ đó gia tăng khả năng tổng hợp enzyme. Điều kiện lên men sinh tổng hợp PME tối ưu ở khoảng trung bình của pH khảo sát, tuy nhiên nhiệt độ ủ thích hợp lại lệch dần về mức nhiệt độ cao. Mặc dù sự tác động của pH không cho hiệu quả thu nhận PME cao, tuy nhiên ở mức pH thấp, sự thay đổi nhiệt độ ủ hầu như không có ảnh hưởng mạnh mẽ đến hoạt động của nấm mốc và sự tổng hợp PME. Khi giá trị pH ban đầu của môi trường lên men tăng, hoạt tính PME thu được giảm dần ở nhiệt độ thấp. Đồ thị đường đồng điểm ở Hình 8 và đồ thị tương tác của hai yếu tố nhiệt độ và độ ẩm (Hình 2f) một lần nữa khẳng định, nhiệt độ ủ thích hợp lệch dần về mức cao (vượt hơn mức tâm 34°C). Ở nhiệt độ ủ cao nhất (40°C), độ ẩm môi trường cao có lẽ là nguyên nhân dẫn đến sự cộng hưởng về nhiệt độ do sự bốc hơi nước dẫn đến trở ngại về điều kiện phù hợp cho sự tổng hợp enzyme, đồng thời độ ẩm và nhiệt độ cao sẽ thúc đẩy sự tăng trưởng nấm mốc nhiều hơn sự tích lũy PME, dẫn đến hiệu quả thu nhận PME thấp hơn khi độ ẩm tăng cao cùng với sự gia tăng nhiệt độ (Suresh *et al.*, 2009). Nghiên cứu của Patil và Dayanand (2006) cũng tìm ra nhiệt độ tối ưu cho quá trình sinh tổng hợp các enzyme thuộc nhóm pectinase (PL, PG và PME) từ *A. niger* ở cả hai phương thức lên men lỏng (SmF) và SSF là 34°C. Mặc dù vậy, nhiệt độ thích hợp cho quá trình

sinh tổng hợp PME cũng thay đổi tùy thuộc vào dòng vi sinh vật sử dụng, và ngay cả điều kiện khí hậu bên ngoài. Bayoumi *et al.* (2008) đã đề xuất nhiệt độ ủ 37°C là điều kiện thích hợp khi nuôi cấy *Bacillus firmus* – I – 4071, sinh tổng hợp pectinase. Trong khi đó, rất nhiều các nghiên cứu sinh tổng hợp pectinase nói chung và PME nói riêng lại tìm ra mức nhiệt độ tối ưu là 30°C và 31°C (Boccas *et al.*, 1994; Castilho *et al.*, 2000).

Cuối cùng, ảnh hưởng đồng thời của độ ẩm và pH (Hình 2e và 7) lại tạo sự biến thiên ngược khi so sánh với các cặp tương tác khác. Ở giá trị pH cao (5,0), sự thay đổi độ ẩm môi trường nuôi ủ hầu như không có ảnh hưởng đến hiệu quả thu nhận enzyme.

Nhìn chung, các yếu tố nhiệt độ, độ ẩm, pH và tỷ lệ nấm mốc không chỉ thể hiện ảnh hưởng bậc 1 và bậc 2 đến hiệu quả thu nhận enzyme mà còn chịu sự ảnh hưởng đồng thời của từng cặp nhân tố đến khả năng tổng hợp PME.

Từ phương trình (1) cho thấy, điều kiện tối ưu để đạt được hoạt tính PME cao nhất (98,9%) như sau: Tỷ lệ huyền phù bào tử nấm *A. niger* (10^5 cfu/mL) sử dụng là 16,5% ở nhiệt độ ủ 35,5°C và pH cũng như độ ẩm ban đầu của môi trường lên men lần lượt là 4,0 và 57,4%. Hoạt tính PME được mô phỏng theo điều kiện lên men tối ưu là 66 U/g. Từ kết quả này, quá trình lên men SSF sinh tổng hợp PME từ *A. niger* SO_2 và R_1 dưới điều kiện lên men tối ưu được tiến hành với hoạt tính enzyme ở điều kiện thực nghiệm (3 lần lặp lại) là $65,6 \pm 3,14$ U/g.

4 KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu tìm ra được điều kiện lên men sinh tổng hợp PME được mô hình hóa bằng phương pháp bề mặt đáp ứng với mô hình phức hợp tại tâm. Các thông số tối ưu của quá trình lên men được xác định gồm độ ẩm ban đầu 57,4%, pH 4,0 (điều chỉnh bằng citrate), nhiệt độ 35,5°C, tỷ lệ huyền phù bào tử nấm 16,5% v/w, thời gian ủ: 96 giờ. Thành phần dưỡng chất bổ sung thích hợp là 0,15% $CaCl_2$, 0,5% $MgCl_2$ và 0,1% urea.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bayoumi R.A., H.M.Yassin., M.A. Swelim. and E.Z.Abdel-Al (2008). Production of Bacterial Pectinase(s) from Agro-Industrial Wastes Under Solid State Fermentation Conditions. *Journal of Applied Sciences Research* 4(12), pp. 1708 – 1721.

2. Boccas F., S. Roussos, M.Gutierrez, L.Serano and G.G.Viniegra (1994). Production of Pectinase from coffee pulp in solid state fermentation system: Selection of wild fungal isolate of high potency by a simple three-step screening technique. *Journal of Food Science and Technology*, 31(1), pp. 22–26.
3. Castilho L.R., T.L.M. Alves and R.A.Medronho (2000). Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agro-industrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology* 71, pp. 45–50.
4. Patil S.R. and A.Dayanand (2006). Exploration of regional agrowaste for the production of pectinase by *Aspergillus niger*. *Food Technology and Biotechnology*, 44: 289-292.
5. Sajjaanantakul T. and L.A.Pitifer (1991). Pectin. In: *The Chemistry and Technology of Pectin*, CRC Press, pp. 135 – 145.
6. Saurel R., S.Gavrilyuk and F.Renaud (2003). A multiphase model with internal degrees of freedom : application to shock-bubble interaction. *Journal of Fluid Mechanics* 495, pp. 283-321.
7. Solis-Pereira S., E.Favela-Torres, G.Viniegra-González and M.Gutiérrez-Rojas (1993). Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 39, pp. 36–41.
8. Suresh S., E.Prithiviraj and S.Prakash (2009). Dose-and time-dependant effects of ethanolic extract of *Mucuna pruriens* Linn. seed on sexual behaviour of normal male rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 122: 497-501.
9. Suutarinen M. and K. Autio (2004). Improving the texture of frozen fruit: the case of berries. In: Kilcas D. (Editor). *Texture of food – Volume 2: Solid foods*, Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC.
10. Tran T.T. and V.M. Nguyen (2010). Determination fermentation conditions for pectin esterase biosynthesis in SSF by *Aspergillus niger*”. *Oral Proceedings of Food Innovation Asia Conference 2010*, June 17-18: 390-396.

11. Tran.T.T., T.N. H. Le and V.M. Nguyen (2009), "Effect of different fermentation medium to *Aspergillus niger* pectin methylesterase production", *Poster Proceedings in 11th Asean Food Conference*, October 21-23, 2009, Brunei, pp. 453 – 457.
12. Tran.T.T., T.N. H. Le and V.M. Nguyen (2010). Optimal of medium fermentation for pectin esterase biosynthesis in SSF by *Aspergillus niger*", *Oral Proceedings of Food Innovation Asia Conference 2010*, June 17-18: 397-404.
13. Van B.J.P. (1979). The chemistry of texture in fruits and vegetables. *Journal of Texture Studies*, 10: 1–23.